



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES
AXÓN-NEUROGLÍA EN LA CABEZA DE
NERVIO ÓPTICO DE TELEÓSTEOS
DURANTE EL CRECIMIENTO
CONTINUADO Y LA REGENERACIÓN**



Marta Parrilla Monge

Tesis Doctoral

Salamanca, 2010



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES AXÓN-NEUROGLÍA EN LA
CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO DE TELEÓSTEOS DURANTE EL
CRECIMIENTO CONTINUADO Y LA REGENERACIÓN

-TESIS DOCTORAL-

MARTA PARRILLA MONGE

Salamanca, junio 2010



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES AXÓN-NEUROGLÍA EN LA
CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO DE TELEÓSTEOS DURANTE EL
CRECIMIENTO CONTINUADO Y LA REGENERACIÓN**

Memoria presentada por *Marta Parrilla Monge* para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:

Prof. Dr. D. José Aijón Noguera

Prof. Dra. D^a. Almudena Velasco Arranz

Junio 2010



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES AXÓN-NEUROGLÍA EN LA
CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO DE TELEÓSTEOS DURANTE EL
CRECIMIENTO CONTINUADO Y LA REGENERACIÓN**

Marta Parrilla Monge

Junio 2010



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

INCyL - C/ Pintor Fernando Gallego 1
E-37007 Salamanca (España/Spain)
Tel: +34 923 294500 ext. 5321. Fax: +34 923 294750.



D. José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular, y D^a. Almudena Velasco Arranz,
Profesora Titular de Biología Celular

HACEN CONSTAR:

QUE el presente trabajo titulado “*Estudio de las interacciones axón-neuroglía en la cabeza del nervio óptico de teleósteos durante el crecimiento continuado y la regeneración*”, ha sido realizado por la licenciada en Biología D^a. Marta Parrilla Monge en el departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

QUE ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y dentro del programa de doctorado *Neurociencias* de nuestra universidad.

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a treinta de marzo de dos mil diez.

El director

La directora

Fdo.: José Aijón Noguera

Fdo.: Almudena Velasco Arranz

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda de numerosas personas, por eso quiero agradecer sinceramente:

Al Prof. Dr. Aijón, por invitarme a formar parte de este grupo de investigación, en el que me he sentido muy bien acogida y en el que he trabajado muy a gusto durante estos nueve años. También quiero agradecerle como director de esta tesis, su gran disponibilidad cada vez que he necesitado su ayuda como con la microscopía electrónica o el papeleo. Muchas gracias por todas sus sugerencias, consejos y sobre todo su rápida corrección, que ha hecho posible la lectura de esta tesis dentro de las fechas previstas.

A la Prof. Dra. Velasco, ha sido un placer trabajar ella. Nos hemos entendido a la perfección, gracias porque ha sabido comprenderme y animarme en los momentos de bajón, y por todo lo que he aprendido con ella. Verdaderamente me encantaría que pudiéramos seguir trabajando juntas en el futuro.

Al Prof. Lara, por su gran interés en este proyecto de tesis y por emocionarse con los resultados que íbamos obteniendo, me ha dado mucho ánimo cuando pensaba que no tenía resultados. Gracias por todas las ideas e interpretaciones que me ha ido dando, por los consejos, he aprendido muchísimo él.

A la Dra. Lillo, gracias por los ánimos y toda la ayuda que me ha prestado, especialmente con la microscopía electrónica tanto en los experimentos como en las correcciones del texto de esta tesis. Gracias por haberme enseñado a interpretar resultados de ese maravilloso mundo de la microscopía electrónica.

Al Dr. Herrero-Turrión, por haberme enseñado el mundo de las PCR. Gracias por la grandísima paciencia que ha tenido conmigo, por ayudarme no sólo con la técnica sino también a interpretar los resultados y a corregir el texto que tanto ha depurado.

Al Dr. Jimeno, porque sin él no hubiera habido imágenes confocal en esta tesis. Gracias porque siempre ha estado cerca cuando he necesitado ayuda o algún consejo.

A todo el equipo del Prof. Dr. Chédotal, por acogerme en su laboratorio y permitirme trabajar en su línea de investigación que despertó en mí gran interés. En especial quiero agradecer a la Dra. Nguyen-Ba-Charvet todo el tiempo dedicado para integrarme en el laboratorio y a la Dra. Moreau-Fauvarque por haberme invitado su curso de hibridación *in situ* en el que tanto aprendí.

A todo el equipo del Prof. Dr. Goldman, por recibirme en su laboratorio y permitirme aprender técnicas que allí desarrollaban. En especial agradecer a Mike todo el tiempo que dedicó, incluidos sábados y domingos, para enseñarme el cultivo de explantes. También agradecer la ayuda del Dr Ramachandran con las hibridaciones *in situ*.

A los Profs. Drs. Arévalo, Porteros, Werruaga, Briñón y Alonso, que forman parte de nuestro área de Biología Celular, porque siempre me han ayudado cuando lo he necesitado.

A todos los grupos que forman parte del INCyL porque al estar especializados en diferentes áreas dentro de la Neurociencia, han podido ayudarme cuando me ha surgido algún problema en técnicas un poco alejadas de la biología celular. En especial quiero agradecer la ayuda del equipo de la Prof. Dra. Rodríguez que me han permitido utilizar sus instalaciones y me han ayudado a resolver problemas con la genética molecular.

A la Dra. Cid que tanto me ayudó cuando llegué al laboratorio, por enseñarme con los experimentos y a organizarme en el laboratorio, y sobre todo por toda la paciencia que tuvo siempre conmigo. A Maite, porque siempre ha estado dispuesta a ayudarme, gracias por toda su ayuda con la microscopía electrónica ¿verdad que formamos buen equipo? Muchas gracias. A todos mis compañeros de los laboratorios 10, 7 y 3, los que quedáis y los que ya os habéis marchado, por vuestro cariño y buen humor, por esos viernes por la tarde, por vuestra ayuda con los peces, la estadística, los papeleos, las becas, el maquetado de la tesis, vuestros consejos con los experimentos y la interpretación de resultados y sobretodo vuestra paciencia cuando he pasado temporadas de especial mal humor.

A todos mis amigos que habéis aguantado mis cambios de humor, mis crisis y mis *cuando acabe la tesis...* Gracias a Seila *my roommate* a pesar de que nadie daba dos duros por nuestra convivencia, *he he he* lo hemos pasado bien ¿verdad?. A *mami* Bego, no sé que hubiera sido este año sin su apoyo. A Silvia que siempre ha estado ahí y me ha acogido cuando he huido del agobio de Salamanca. A Carmen y Lucía mis siempre amigas de la carrera. A Maite, Saúl, Miguel, Fernando y Ana habéis hecho de este año uno de los mejores de mi vida en Salamanca, muchas gracias por vuestros ánimos y cariño, me va a dar mucha pena irme. A Fátima por escucharme cuando lo he necesitado y por darme otros puntos de vista. A Javi porque es uno de mis mejores amigos, siempre dispuesto a ayudarme y a escuchar cuando he tenido un problema, gracias por su paciencia infinita. A Leti porque aunque nos conocimos por poco tiempo en París se ha convertido en una verdadera amiga. A Nirmal porque sin él la estancia en Ann Arbor hubiera sido totalmente diferente.

A mi familia por todo su apoyo e interés, por escuchar no sólo mis problemas sino mis éxitos en el laboratorio. En especial agradecer a mi tía Hortensia todo lo que ha cuidado de mí durante estos años en Salamanca, ha sido como una segunda madre para mí. A mis hermanos Juan y Laura, por sus ánimos y tareas de las que me han liberado cuando he estado totalmente volcada con la tesis. Finalmente, a mis padres que tanto quiero, siempre han estado ahí para absolutamente todo lo que he necesitado, y gracias por haberme apoyado tanto en esta *cruzada* de la investigación a pesar de haber aguantado gran cantidad de cabreos y lloros fruto del estrés.

Este trabajo ha sido financiado por la beca FPU del Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2005-092), Fundación MMA, Red de Terapia Celular de Castilla y León, Fundación Alicia Koplowitz, Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia, GR-183), Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-11179).

Te doy gracias Señor de todo corazón... (Salmo 9,2)

Dedicada a mis padres y hermanos

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. LA RETINA	5
1.1 ORGANIZACIÓN DE LA RETINA	5
1.2 COMPONENTES DE LA RETINA	7
EPITELIO PIGMENTARIO	7
FOTORRECEPTORES	8
CÉLULAS HORIZONTALES.....	8
CÉLULAS BIPOLARES	8
CÉLULAS INTERPLEXIFORMES	9
CÉLULAS AMACRINAS	9
CÉLULAS GANGLIONARES.....	9
CÉLULAS DE MÜLLER	10
2. EL NERVIÓ ÓPTICO.....	11
2.1 COMPONENTES DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	13
ASTROCITOS	13
OLIGODENDROCITOS	15
MICROGLÍA	16
GLÍA RADIAL	18
VASOS SANGUINEOS	19
2.2 PARTES DEL NERVIÓ ÓPTICO	20
CABEZA DE NERVIÓ ÓPTICO	20
SEGMENTO INTRAORBITAL.....	25
QUIASMA ÓPTICO.....	28
TRACTO ÓPTICO.....	29
3. DESARROLLO DEL SISTEMA VISUAL	31
3.1 FORMACIÓN DEL SISTEMA VISUAL.....	31
MORFOGÉNESIS	31
REGULACIÓN	33
SONIC HEDGEHOG.....	34
PAX2.....	35
PAX6.....	37
3.2 RETINOGENÉNESIS.....	38
3.3 FORMACIÓN DE LA CNO	39
FORMACIÓN	39
REGULACIÓN	41
3.4 FORMACIÓN DEL QUIASMA ÓPTICO	44
FORMACIÓN	44
REGULACIÓN	46
3.5 ORIGEN DE LAS CÉLULAS MACROGLIALES.....	48
ORIGEN DE LOS ASTROCITOS DEL NERVIÓ ÓPTICO	48
ORIGEN DE LOS OLIGODENDROCITOS DEL NERVIÓ ÓPTICO	50
4. CRECIMIENTO CONTINUADO Y REGENERACIÓN	52
4.1 CRECIMIENTO CONTINUADO.....	52
LA ZONA PERIFÉRICA GERMINAL.....	53
PRECURSORES DE BASTONES	55
PRECURSORES GLIALES EN EL NERVIÓ ÓPTICO.....	56
4.2 REGENERACIÓN.....	57

REGENERACIÓN DE LA RETINA.....	57
REGENERACIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	58
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	63
MATERIAL Y MÉTODOS	69
1. MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES	71
1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	71
1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.....	71
CRIOLESIÓN DE LA ZPG	72
PINZAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO	73
2. INMUNOHISTOQUÍMICA	73
2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	73
FIJACIÓN POR PERFUSIÓN.....	74
FIJACIÓN POR INMERSIÓN	75
2.2 MARCADORES UTILIZADOS	75
CITOQUERATINA	76
GFAP.....	76
GLUTAMINA SINTETASA	77
MBP.....	77
PAX2	78
PCNA	79
S100.....	79
SOX10	80
ZN8.....	80
ZO1.....	81
TABLAS DE ANTICUERPOS.....	82
2.3 PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	83
MÉTODO ABC.....	83
MÉTODO INMUNOFLUORESCENTE.....	84
INMUNOHISTOQUÍMICA FLUORESCENTE IN TOTO.....	85
CONTROLES INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	86
ANÁLISIS DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	86
OBTENCIÓN DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN	87
3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	88
3.1 PROTOCOLOS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	88
OBTENCIÓN DEL TEJIDO.....	88
PROTOCOLO PARA IHQ PREINCLUSIÓN CON ORO COLOIDAL	89
INCLUSIÓN.....	90
TRATAMIENTO DE LAS SECCIONES.....	90
OBTENCIÓN DE IMÁGENES	91
4. TÉCNICAS DE PCR.....	91
4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	92
4.2 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL	92
PURIFICACIÓN POR COLUMNAS.....	92
PURIFICACIÓN POR TRIZOL	93
TRATAMIENTO CON DNasas	94
CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL.....	94
4.3 RETROTRANSCRIPCIÓN.....	94
PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	94
CUANTIFICACIÓN DEL cDNA	95
4.4 PCR	95
DISEÑO DE CEBADORES	95
PCR.....	96
ELECTROFORESIS	97
4.5 SECUENCIACIÓN	97

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR	97
SECUENCIACIÓN	98
4.6 PCR CUANTITATIVA	99
PROTOCOLO	99
CUANTIFICACIÓN	101
ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE EL MÉTODO COMPARATIVO DE LAS Ct	102
RESULTADOS	105
1. EL NERVIÓ ÓPTICO CONTROL	107
1.1 LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO	107
ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PAX2 ⁺	107
ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS S100 ⁺	109
LAS CÉLULAS DE MÜLLER	111
LA MIELINIZACIÓN EN LA CFNO Y LA CNO	111
PROLIFERACIÓN EN LA CNO	113
ORGANIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA CNO Y MARCAJE PARA PAX2	113
1.2 EL SEGMENTO INTRAORBITAL	115
ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PAX2 ⁺	115
ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS S100 ⁺	117
LA MIELINIZACIÓN EN EL SIO	117
PROLIFERACIÓN EN EL SIO	118
CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS PAX2 ⁺	118
1.3 RESUMEN	119
CARACTERIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS	119
CARACTERIZACIÓN DE LOS OLIGODENDROCITOS	121
2. EFECTOS EN LA CNO DESPUÉS DE LA CRIOLESIÓN	122
2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LESIÓN	122
A) Degeneración y regeneración temprana	122
B) Regeneración	123
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original	123
2.2. LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO	124
RESPUESTA DE LAS CÉLULAS PAX2 ⁺	124
A) Degeneración y regeneración temprana	124
B) Regeneración	124
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original	125
RESPUESTA DE LAS CÉLULAS S100 ⁺	126
A) Degeneración y regeneración temprana	126
B) Regeneración	127
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original	128
RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN LA CNO	128
RESPUESTA DE LOS OLIGODENDROCITOS Y ALTERACIÓN EN LA MIELINIZACIÓN	129
A) Degeneración y regeneración temprana	129
B) Regeneración	129
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original	130
MODIFICACIONES EN LA PROLIFERACIÓN	130
A) Degeneración y regeneración temprana	130
B) Regeneración	131
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original	132
MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES Y MARCAJE PARA PAX2	133
A) Degeneración y regeneración temprana	133
B) Regeneración	134
2.3 RESUMEN	136
3. EFECTOS EN LA CNO DESPUÉS DEL PINZAMIENTO	138
3.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LESIÓN	138
A) Degeneración y regeneración temprana	138
B) Regeneración	139

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original.....	140
3.2 LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO	141
RESPUESTA DE LAS CÉLULAS PAX2 ⁺	141
A) Degeneración y regeneración temprana	141
B) Regeneración	142
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original.....	144
RESPUESTA DE LAS CÉLULAS S100 ⁺	145
A) Degeneración y regeneración temprana	145
B) Regeneración	146
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original.....	147
RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN LA CNO.....	147
ALTERACIÓN EN LA MIELINIZACIÓN EN LA CNO	148
A) Degeneración y regeneración temprana	148
B) Regeneración	148
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original.....	149
MODIFICACIONES EN LA PROLIFERACIÓN.....	149
A) Degeneración y regeneración temprana	149
B) Regeneración	150
C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original.....	152
MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES Y MARCAJE PARA PAX2	153
A) Degeneración y regeneración temprana	153
B) Regeneración	156
3.3 RESUMEN	157
4. EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A Y SHH.....	159
4.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARCIAL DE PAX2A EN CARPÍN	159
4.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A Y SHH EN LA RETINA Y CNO	
EN ANIMALES CONTROL.....	162
EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A.....	162
EXPRESIÓN GÉNICA DE SHH.....	162
4.3 ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A	
EN LA CNO DURANTE LA REGENERACIÓN	162
ANIMALES CRIOLESIONADOS.....	163
ANIMALES PINZADOS.....	163
5. RESUMEN COMPARATIVO ENTRE CRIOLESIÓN Y PINZAMIENTO	164
ICONOGRAFÍA	167
DISCUSIÓN	267
1. EL NO CONTROL: COMPARACIÓN ENTRE LA CNO Y EL SIO	272
1.1 PAX2 EN EL NO.....	272
SECUENCIA DE PAX2	272
REGULACIÓN DE PAX2.....	273
EXPRESIÓN DE PAX2 EN LA CNO Y LA RETINA.....	275
EXPRESIÓN DE SHH EN LA CNO Y RETINA	277
LAS CÉLULAS PAX2 ⁺ EN LA CNO.....	279
LAS CÉLULAS PAX2 ⁺ EN EL SIO	281
1.2 S100 EN EL NO Y LA RETINA.....	282
LAS CÉLULAS S100 ⁺ EN LA CNO.....	282
LAS CÉLULAS S100 ⁺ EN LA RETINA	284
LAS CÉLULAS S100 ⁺ EN EL SIO	285
1.3 SOX10 EN EL NO.....	286
LAS CÉLULAS SOX10 ⁺ EN LA CFNO Y CNO	286
LA MIELINA EN LA CFNO Y CNO	289
LAS CÉLULAS SOX10 ⁺ EN LA SIO.....	290
1.4 LA ASTROGLÍA DE LA CNO.....	291
2. MODIFICACIONES EN LA CNO TRAS LESIÓN: CRIOLESIÓN Y PINZAMIENTO	293

2.1 EXPRESIÓN DE PAX2	293
VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PAX2 Y PAX6	293
REGULACIÓN DE PAX2	297
GENES REGULADOS POR PAX2	298
2.2 LAS CÉLULAS GLIALES	299
LOS ASTROCITOS PAX2 ⁺	299
A) Papel en la regeneración axonal	299
B) Proliferación de los astrocitos Pax2 ⁺	302
LOS ASTROCITOS S100 ⁺ , GFAP ⁺ , ZO1 ⁺ y CITOQUERATINA ⁺	303
A) Papel en la regeneración axonal	303
B) Proliferación de las células S100 ⁺	305
C) Los astrocitos S100 ⁺ en la CFNO	306
LAS CÉLULAS PAX2 ⁺ /GS ⁺	306
LOS OLIGODENDROCITOS SOX10 ⁺ Y LA MIELINIZACIÓN	307
A) Papel en la regeneración y análisis de la mielinización	307
B) Proliferación de los oligodendrocitos Sox10 ⁺	309
LAS CÉLULAS DE MÜLLER	310
LA MICROGLÍA Y OTRAS CÉLULAS NO NEURALES	311
3. RESUMEN FINAL	312
CONCLUSIONES.....	315
BIBLIOGRAFÍA.....	319

Abreviaturas

AC	Arteria central	GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	REr	Retículo endoplasmático rugoso
AG	Aparato de Golgi	Grg	Groucho	RT	Retrotranscripción
AR	Ácido Retinoico	GS	Glutamina sintetasa	SEA	Servicio de experimentación animal
BMP	Proteína morfogénica de hueso	Hh	Hedgehog	SF	Segmentos de los fotorreceptores
BSA	Suero albúmina bovina	hpf	Horas postfertilización	SIO	Segmento intraorbital
CAM	Moléculas de adhesión celular	IHQ	Inmunohistoquímica	SNC	Sistema nervioso central
CCG	Capa de las células ganglionares	JNK	Jun kinasa	SNP	Sistema nervioso periférico
CFNO	Capa de las fibras del nervio óptico	MBP	Proteína de la mielina básica	Shh	Sonic hedgehog
CNE	Capa nuclear externa	MET	Microscopía electrónica de transmisión	TA	Temperatura ambiente
CNI	Capa nuclear interna	MLE	Membrana limitante externa	TC	Tampón cacodilato
CNO	Cabeza de nervio óptico	MLI	Membrana limitante interna	Tf	Temperatura de fusión
CPE	Capa plexiforme externa	MS-222	Metanosulfonato de tricaina	TF	Tampón fosfato
CPI	Capa plexiforme interna	NIH	<i>National Institute of Health</i>	TFS	Tampón fosfato salino
Ct	Ciclo umbral	NO	Nervio óptico	TFST	Tampón fosfato salino triton X-100
d	Días	NrCAM	Molécula de adhesión celular neuronal	TR	Tracto óptico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	pb	Pares de bases	TTC	Tampón tris-clorhídrico
DMSO	Dimetilsulfóxido	PCNA	Antígeno de proliferación celular nuclear	ZMC	Zona marginal ciliar
DO	Disco óptico	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	ZO1	Zónula ocluyente
E	Eficiencia de la reacción	PFA	Paraformaldehído	ZPG	Zona periférica germinal
EP	Epitelio pigmentario	QO	Quiasma óptico	ZT	Zona de transición
Fgf	Factor de crecimiento de fibroblastos	qPCR	PCR cuantitativa		
g	Gen problema	r	Gen de referencia		
GA	Glutaraldehído	REl	Retículo endoplasmático liso		

Introducción

1. LA RETINA

La retina es una fina capa neural que tapiza el fondo del ojo. Se origina a partir de una evaginación del prosencéfalo y por tanto pertenece al sistema nervioso central (SNC). En la retina se produce la recepción y el primer procesamiento de la información visual que, posteriormente, será enviada a diversos centros encefálicos a través del nervio óptico (NO). Debido a su especial organización anatómica y su fácil acceso, la retina constituye una porción del SNC de gran interés para su estudio (Cid, 2006; Lillo, 2001; Ramón y Cajal, 1893).

1.1 ORGANIZACIÓN DE LA RETINA

La retina de vertebrados tiene una organización en estratos, que alterna capas de somas celulares con capas de neuropilo (Ramón y Cajal, 1893). De la porción más escleral a la más vitreal, se distinguen las siguientes capas (Fig. 1):

Epitelio pigmentario (EP). Es la capa más externa de la retina y un componente no neuronal de la misma.

Segmentos de los fotorreceptores (SF). Formada por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.

Membrana limitante externa (MLE). Es una capa muy fina constituida por las prolongaciones más externas de las células de Müller que se unen entre ellas y con los fotorreceptores mediante uniones especializadas de tipo adherente.

Capa nuclear externa (CNE). Está formada por los somas de los fotorreceptores: conos y bastones.

Capa plexiforme externa (CPE). Es una capa de neuropilo donde realizan sinapsis los fotorreceptores con las células bipolares, horizontales e interplexiformes.

Capa nuclear interna (CNI). Contiene los somas de células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes y células de Müller.

Capa plexiforme interna (CPI). Es otra lámina de neuropilo, en la que establecen sinapsis las células bipolares, interplexiformes, células ganglionares y amacrinas.

Capa de las células ganglionares (CCG). Es una capa fina donde se sitúan los somas de las células ganglionares y algunas células amacrinas desplazadas.

Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO). Está formada por los axones de las células ganglionares que se disponen paralelamente a la superficie de la retina, y que convergen en el disco óptico (DO) para formar el NO (Ramón y Cajal, 1893). En esta capa también encontramos células gliales: células de microglía, astrocitos, y en algunas especies oligodendrocitos. Los astrocitos se encuentran entre los axones de las células ganglionares y esta situación es común para todos los grupos de vertebrados (Boycott y Hopkins, 1981; Schnitzer, 1985). Los oligodendrocitos, por el contrario, no están presentes en la retina de la mayor parte de los vertebrados ya que los axones de las células ganglionares no comienzan a mielinizarse hasta la salida del globo ocular. Sin embargo, en teleósteos, los axones comienzan a mielinizarse antes de llegar al NO (Easter *et al.*, 1984; Lillo *et al.*, 2002).

Membrana limitante interna (MLI). Es la capa más vitreal, y constituye una lámina basal muy fina formada por glicoproteínas que se une a los pies de las células de Müller por hemidesmosomas.

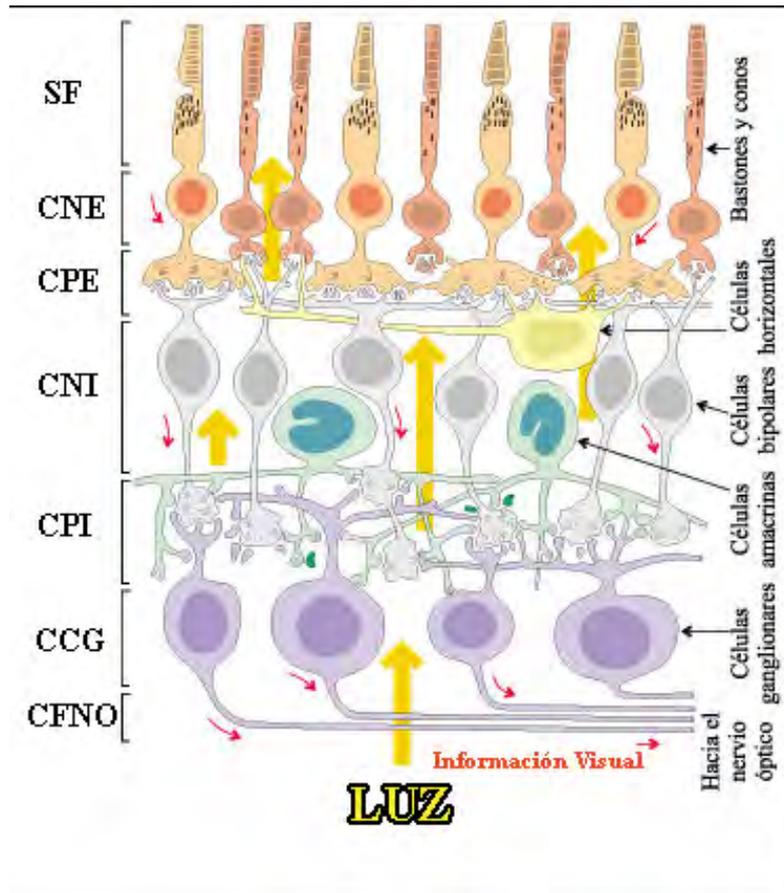


Figura 1: Esquema de la retina. La luz atraviesa todas las capas del tejido (flechas amarillas), excita los segmentos de los fotorreceptores y éstos transmiten la información visual hacia las células ganglionares que dirigen la información al encéfalo (flechas rojas). CCG: capa de las células ganglionares; CFNO: capa de las fibras del nervio óptico; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; SF: segmentos de los fotorreceptores. Esquema modificado de <http://iescarin.educa.aragon.es>

La luz alcanza los segmentos de los fotorreceptores, donde tiene lugar la fototransducción (conversión de la energía luminosa en cambios de potencial de membrana). La información visual es transmitida desde los fotorreceptores a células bipolares y de éstas a las ganglionares, que envían sus axones a los distintos centros encefálicos. Esta vía vertical de transmisión de la señal sufre modulación por las células horizontales, amacrinas e interplexiformes, en lo que se llama vía horizontal de transmisión de la información visual (Kolb, 2003).

1.2 COMPONENTES DE LA RETINA

EPITELIO PIGMENTARIO

Es un estrato de células epiteliales, que se sitúa entre la coroides y la retina neural, constituyendo la barrera hematorretiniana. Su lámina basal se sitúa hacia la coroides, y es uno de los constituyentes de la membrana de Bruch en humanos. En su cara apical las células poseen numerosos procesos alargados en el espacio subretinal, que envuelven a los segmentos externos de los fotorreceptores.

Sus funciones son: regular la concentración de iones y agua en el espacio subretinal e intervenir en la fototransducción, fagocitando los segmentos externos de los fotorreceptores permitiendo su continua renovación y aportando retinal que forma parte de los ftopigmentos (Young y Bok, 1969). Además, estas células contienen abundantes gránulos de melanina, cuya función parece ser la absorción de fotones extraviados que degradarían la imagen (Douglas y Wagner, 1982).

FOTORRECEPTORES

Son células con un soma pequeño, que se sitúa en la CNE. Hacia la región escleral, presentan un proceso especializado que se divide en segmento interno y segmento externo. El segmento externo contiene cientos de discos de membrana, orientados de forma transversal, en los que se insertan los pigmentos fotosensibles. Sus axones se dirigen hacia el vítreo y acaban en la CPE. A través del axón los fotorreceptores contactan con células bipolares, células horizontales e interplexiformes (Kolb *et al.*, 2000).

En todos los grupos de vertebrados existen dos tipos de fotorreceptores: **conos** y **bastones**. Los conos son de tamaño corto y de forma cónica, funcionalmente son los encargados de la visión en color. Los bastones, son de forma cilíndrica y se encargan de la visión escotópica (Kolb *et al.*, 2000).

CÉLULAS HORIZONTALES

Son células de gran tamaño cuyos somas se sitúan en la parte más externa de la CNI, en disposición horizontal. Contactan con las células bipolares, con las células fotorreceptoras y con las interplexiformes, en la CPE. Su función es modular la información que pasa de los fotorreceptores a las células bipolares (Bear *et al.*, 1998).

CÉLULAS BIPOLARES

Su soma se encuentra en la zona intermedia de la CNI. Sus dendritas se dirigen hacia la CPE, y contactan con los fotorreceptores, las células horizontales y las interplexiformes. Su axón se extiende hasta la CPI, y establece contacto con células ganglionares, con células amacrinas y con las células interplexiformes (Bear *et al.*, 1998).

CÉLULAS INTERPLEXIFORMES

Su soma también se encuentra en porciones centrales de la CNI y presentan ramificaciones en las dos capas plexiformes. Es el tipo celular que distribuye la información sensorial desde las células amacrinas hacia las células horizontales y bipolares (Dowling y Ehinger, 1978; Marshak y Dowling, 1987).

CÉLULAS AMACRINAS

Sus somas se localizan en la parte más vitreal de la CNI, aunque existen también amacrinas en la CCG denominadas **amacrinas desplazadas** (Hughes y Wieniawa-Narkiewicz, 1980). No poseen axón y sus dendritas se extienden hacia la CPI, donde contactan con todos los tipos neuronales de la retina salvo con los fotorreceptores. Su función es la de modular la información que llegará a las células ganglionares (Bear *et al.*, 1998).

CÉLULAS GANGLIONARES

Las células ganglionares son las neuronas de proyección de la retina y las primeras en diferenciarse a partir del neuroepitelio durante el desarrollo (ver apartado 2.1 Morfogénesis: Formación del Sistema Visual). Sus somas se disponen en hilera formando la CCG (Fig. 1), aunque existen algunas células ganglionares desplazadas localizadas en la CPI (Hayes y Holden, 1983). Sus dendritas establecen conexiones en la CPI con células bipolares y amacrinas (Fig. 1) (Sakai *et al.*, 1986); y sus axones parten en dirección vitreal discurriendo paralelos a la superficie retiniana formando la CFNO (Fig. 1). Dichos axones alcanzan el DO, situado aproximadamente en el centro de la retina; y en ese punto, el conjunto de axones atraviesa todas las capas de la retina y sale del globo ocular formando el NO.

Existen distintas clasificaciones de las células ganglionares basadas en su morfología y electrofisiología. Su función es llevar la información visual desde la retina hasta la siguiente estación de relevo, el núcleo geniculado lateral del tálamo en los mamíferos y el techo óptico en peces (Fig. 3) (Burrill y Easter, 1994; Stuermer, 1988).

CÉLULAS DE MÜLLER

Las células de Müller son células de la glía radial y el elemento glial predominante en la retina (Müller, 1952; Ramón y Cajal, 1893). Se originan a partir del neuroepitelio que da lugar a todas las neuronas retinianas (Turner y Cepko, 1987) al mismo tiempo que aparecen las células ganglionares (ver apartado 2.1 Morfogénesis: Formación del Sistema Visual).

Su cuerpo celular se sitúa en parte central o vitreal de la CNI. A partir de él se extienden dos prolongaciones principales en direcciones opuestas que cubren casi todo el espesor de la retina. Los procesos que se dirigen hacia la esclera forman parte de la MLE, donde establecen uniones de tipo adherente (zónulas adherentes y desmosomas) con los fotorreceptores y otras células de Müller, y emiten una serie de microvellosidades hacia el espacio subretinal (Fig. 2) (Geneser, 1993; Kolb *et al.*, 2000; Reichenbach y Robinson, 1995). Formando parte de estas uniones adherentes se encuentran las proteínas β -catenina, N-cadherina o zónula ocluyente-1 (ZO1) (Itoh *et al.*, 1999; Paffenholz *et al.*, 1999). Los procesos que van hacia el vítreo, se expanden en su extremo y se unen a los “pies” de otras células de Müller mediante uniones no especializadas. Además forman una lámina basal, rica en mucopolisacáridos, constituyendo la MLI, una barrera entre la retina y la lámina conjuntiva subyacente (Fig. 2) (Kolb *et al.*, 2000). Ambos procesos principales, experimentan ramificaciones que envuelven a somas, dendritas y estructuras sinápticas de todas las neuronas retinianas y organizan en haces los axones de las células ganglionares en la CFNO (Fig. 2) (Reichenbach *et al.*, 1989; Reichenbach y Robinson, 1995).

Su función es de soporte, síntesis y aporte nutritivo, ya que sintetizan y almacenan glucógeno y ceden glucosa a las células nerviosas. También llevan a cabo labores de protección, al acumular glutatión reducido que protege de los radicales libres. Controlan el microambiente neuronal regulando el pH y la concentración de K^+ . Forman la barrera hematorretiniana en retinas vascularizadas. Finalmente, retiran y reciclan rápidamente el exceso de neurotransmisores del espacio perisináptico, que incluso en el pollo, parecen capaces de reciclar el retinal de los fotorpigmentos (Bringmann *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 1999; Newman y Reichenbach, 1996).

En los últimos años, se les ha asignado un nuevo papel como células madre neurales que se encuentran latentes en mamíferos adultos (Das *et al.*, 2006), pero están potencialmente activas en peces (Bernardos *et al.*, 2007). Durante el desarrollo embrionario y en procesos de crecimiento continuado, las células de Müller participan en la guía de los axones jóvenes a través de la CFNO hacia el NO mediante moléculas que favorecen su crecimiento a nivel de sus pies, y moléculas de repulsión en sus somas (Stuermer y Bastmeyer, 2000) (Apdo. 3.1 Morfogénesis: Formación del Sistema Visual).

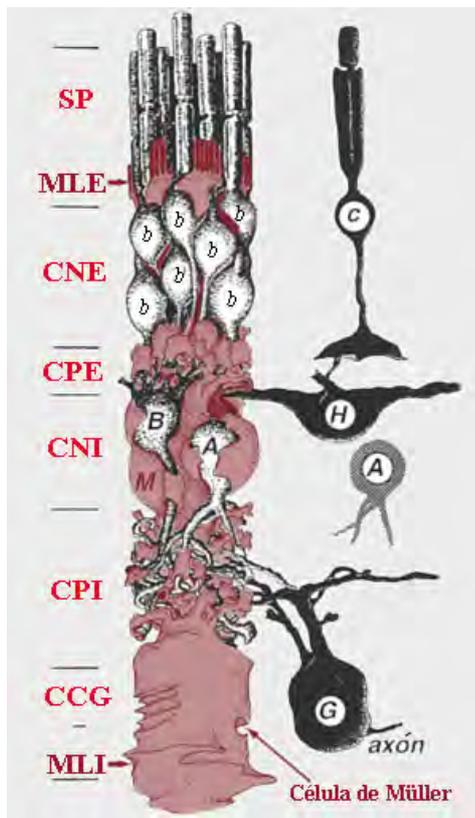


Figura 2: Esquema de la célula de Müller y su relación con los distintos tipos neuronales de la retina. A: célula amacrina; b: bastón; c: cono; CCG: capa de las células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; G: célula ganglionar; H: célula horizontal; MLE: membrana limitante externa; M: célula de Müller; MLI: membrana limitante interna; SP: segmentos de los fotorreceptores. Esquema modificado de <http://webvision.med.utah.edu/>.

Aunque en la retina se pueden encontrar astrocitos, células de microglía y, en algunos grupos de vertebrados, oligodendrocitos, éstos se analizarán en profundidad en el apartado siguiente (Apdo: 2.1 El Nervio Óptico: Componentes del Nervio Óptico).

2. EL NERVIÓ ÓPTICO

El NO es una estructura del sistema visual que conecta la retina neural con los centros diana en el mesencéfalo, diencefalo y telencefalo. En vertebrados está formado, en general, por los axones de las células ganglionares, células gliales y vasos

sanguíneos, y está recubierto por las meninges (Bunt, 1982; Levine, 1989; Maggs y Scholes, 1986; Maggs y Scholes, 1990; Tapp, 1973; Wolburg, 1981).

El NO se divide en varias regiones para su estudio y sus nombres varían dependiendo del grupo de vertebrados. En mamíferos, concretamente en humanos, se divide en cuatro regiones: intraocular, intraorbital, intracanalular e intracraneal (Brooks *et al.*, 1999; Hayreh, 1974). En aves, se distingue entre una parte intraocular y el NO propiamente dicho (Fujita *et al.*, 2001). En reptiles, el NO se divide en dos regiones: intraocular y extraocular en *Mauremys cáspica* (Dávila *et al.*, 1987), y zona intraocular o cabeza del nervio óptico (CNO), zona medial del nervio y zona caudal del nervio en *Gallotia galloti* (Casañas, 2005). En teleosteos se describen tres regiones para su estudio: el segmento prequiasmático, que incluye dos porciones: el segmento intraocular o CNO y el segmento extraocular o intraorbital (SIO), el quiasma óptico (QO) y el segmento postquiasmático o tracto óptico (TR) (Fig. 3) (Easter *et al.*, 1981; Levine, 1989; Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986; Maggs y Scholes, 1990).

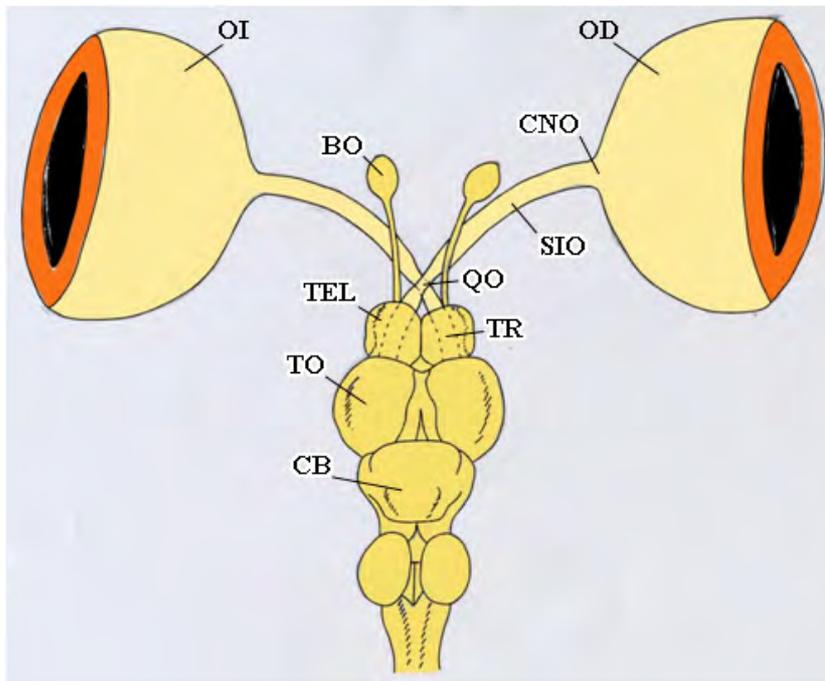


Figura 3: Esquema del cerebro de carpín dorado. BO: bulbo olfatorio; CB: cerebelo; CNO: cabeza de nervio óptico; OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; QO: quiasma óptico; SIO: segmento intraorbital; TEL: telencéfalo; TO: techo óptico; TR: tracto óptico.

2.1 COMPONENTES DEL NERVIÓ ÓPTICO

ASTROCITOS

Los astrocitos son células gliales que se encuentran tanto en la retina como en el NO. Proceden de precursores de astrocitos que migran por el NO hacia la retina (Ling y Stone, 1988; Schnitzer, 1988; Stone y Dreher, 1987; Watanabe y Raff, 1988), aunque se ha descrito una segunda zona de generación de astrocitos en la retina de rata y humanos (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001) (ver apartado 3.1 Morfogénesis: Origen de los Astrocitos del Nervio Óptico).

Se caracterizan ultraestructuralmente por tener un núcleo eucromático redondeado u oval y, en ocasiones, con indentaciones (Fig. 4). En su citoplasma presentan abundantes paquetes de filamentos intermedios o glófilamentos y gránulos de glucógeno (Fig. 4). Se han clasificado en tres tipos distintos, dependiendo de su organización espacial: 1) **astrocitos radiales**, cuyos procesos son muy largos y se extienden de forma perpendicular al resto de los componentes del tejido neural donde se encuentran (ver el apartado de Glía Radial); 2) **astrocitos fibrosos**, típicos de los tractos fibrosos del sistema nervioso, y 3) **astrocitos protoplasmáticos**, que se localizan en la sustancia gris, alrededor de las neuronas (Peters *et al.*, 1991). La diferencia fundamental entre los dos últimos tipos de astrocitos además de su localización, es que los astrocitos fibrosos contienen mayor cantidad de filamentos intermedios en su citoplasma que tienden a formar fascículos y, sus procesos se reúnen para formar láminas que agrupan las fibras nerviosas en fascículos. Los terminales de sus procesos pueden llegar a la superficie de los capilares y formar parte de la glía limitante en las superficies del cerebro (Peters *et al.*, 1991).

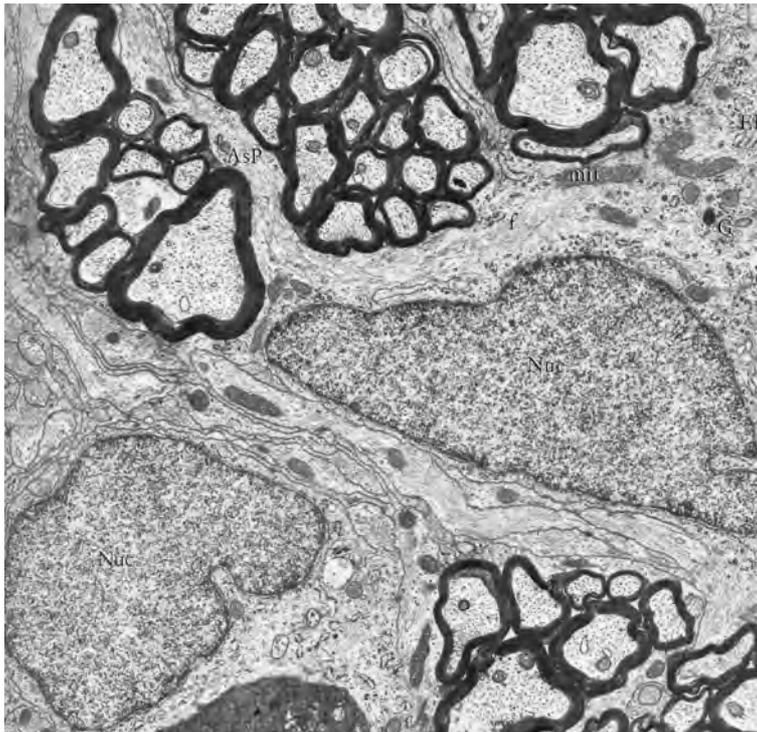


Figura 4: Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de dos astrocitos fibrosos. AsP: proceso astrocitario, ER: retículo endoplasmático rugoso; f: filamentos intermedios; G: gránulo de glucógeno; mit: mitocondria; Nuc: núcleo. Tomado de Peters *et al.*, 1991.

En la retina madura de vertebrados, en general, se sitúan en la CFNO (Ogden, 1978; Schnitzer, 1985; Vecino *et al.*, 1997), se marcan con anticuerpos anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y se clasifican como astrocitos fibrosos (Kolb *et al.*, 2000; Ramón y Cajal, 1913; Schnitzer, 1988). Sus somas se disponen entre los axones de las células ganglionares y sus prolongaciones envuelven varios fascículos nerviosos. Las funciones principales de los astrocitos dentro de la CFNO son las de servir de soporte y nutrir a los axones de las células ganglionares de la retina. En retinas vascularizadas como las de mamíferos tienen funciones relacionadas con el sistema vascular, aunque en teleósteos, a pesar de tener una retina avascular, presentan una distribución semejante (Vecino *et al.*, 1997). En el desarrollo participan en la angiogénesis de la retina y en la formación de la fovea (Dorrell *et al.*, 2002; Gariano, 2003; Kozulin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 1999). Sin embargo, poco se conoce sobre su papel en la guía de los axones de las células ganglionares hacia la CNO.

En el NO se distingue, en cuanto a organización, entre los astrocitos de la CNO y los del resto del NO. En la CNO los astrocitos son fibrosos y positivos a GFAP (Lillo *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996), y dependiendo de su localización en la CNO presentan mayor o menor cantidad de filamentos intermedios en su citoplasma. Cumplen un papel fundamental tanto en la guía como en el empaquetamiento de los axones en esta zona, así como proporcionan rigidez a la estructura (ver apartado 1.2

Partes del Nervio Óptico: Cabeza de Nervio Óptico). En el resto del NO de mamíferos son astrocitos fibrosos, conservan su marcaje positivo a GFAP y aparecen ordenados en hileras empaquetando los axones (Sun *et al.*, 2009). Sin embargo, en teleósteos se denominan **astrocitos reticulares** (Maggs y Scholes, 1990) y presentan características diferentes: 1) son negativos a GFAP (Dahl y Bignami, 1973), 2) son positivos a citoqueratina (filamento intermedio característico de la astrogía inmadura) (Giordano *et al.*, 1989; Maggs y Scholes, 1990) y 3) y se asocian entre ellos mediante uniones en hendidura (gap) (Wolburg *et al.*, 1983) y desmosomas (Maggs y Scholes, 1990); se encargan de formar la limitante glial y de fascicular los paquetes de axones (Maggs y Scholes, 1990) (Apdo: 1.2 Partes del Nervio Óptico: Segmento Intraorbital).

OLIGODENDROCITOS

Los oligodendrocitos son células gliales que se encuentran únicamente en el NO, aunque en teleósteos (Lillo *et al.*, 1998), en conejo (Morcos y Chan-Ling, 1997; Reichenbach *et al.*, 1988; Schnitzer, 1985), en reptiles (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000) y en aves (Cho *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 1993; Won *et al.*, 2000) aparecen en la CFNO. Se originan en múltiples focos reducidos del neuroepitelio germinal (Spassky *et al.*, 1998) y desde ellos migran hacia el NO y la retina (Ono *et al.*, 1998; Tsai y Miller, 2002). En los mamíferos, salvo excepciones, el avance se detiene a nivel de la lámina cribosa en la CNO, actuando como una barrera (Apdo. 3.5: Origen de las Células Gliales : Astrocitos y Oligodendrocitos) (Perry y Lund, 1990; Tsai y Miller, 2002).

Son un tipo celular con una gran variabilidad morfológica dependiendo de la orientación y ramificación de sus procesos. En general, tienen un soma pequeño y redondeado del que derivan varios procesos que posteriormente se ramifican, todas estas ramificaciones secundarias discurren paralelas entre sí (Butt y Ransom, 1989). A microscopía electrónica presentan un aspecto más oscuro a los electrones que los astrocitos. Su núcleo, que tiende a ocupar una posición lateral, puede ser redondeado, oval o irregular, y su cromatina tiende a agruparse dando un aspecto más denso que el de los astrocitos. Por otro lado, el citoplasma que ofrece un aspecto oscuro, no contiene filamentos intermedios ni gránulos de glucógeno pero presenta gran número de microtúbulos en sus procesos (Peters *et al.*, 1991).

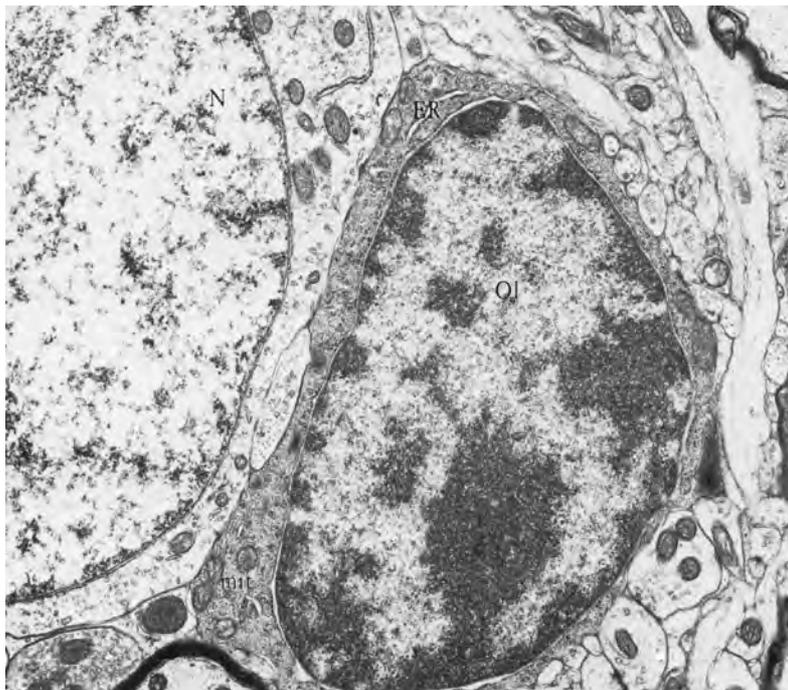


Figura 5: Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de un oligodendrocito. ER: retículo endoplasmático rugoso; mit: mitocondria; N: núcleo; Ol: oligodendrocito. Tomado de Peters *et al.*, 1991.

Su función principal es la de formar la vaina de mielina. En las retinas en las que están presentes, se encargan de mielinizar algunas de las porciones de los axones de las células ganglionares en la CFNO. En teleósteos, estos axones mielinizados se han descrito como fibras retinópetas (Uchiyama, 1990), aunque su gran número parece indicar que también las retinófugas deben estar mielinizadas (Lillo *et al.*, 1998). En carpín, se ha propuesto que los axones no mielinizados, que son los más superficiales, corresponden a células ganglionares jóvenes, y los mielinizados a ganglionares más antiguas (Easter *et al.*, 1984).

MICROGLÍA

Las células de microglía se encuentran tanto en la retina como en el NO. A diferencia del resto de las células gliales del sistema nervioso, son de origen mesodérmico (Navascués *et al.*, 2000; Stoll y Jander, 1999).

Aparecen dos tipos de microglía: la **microglía residente** o **ramificada**, que permanece en estado latente hasta que se activa ante situaciones patológicas transformándose en **microglía ameboide** o **reactiva**, con alta capacidad de migración y encargada de la fagocitosis de los desechos del sistema nervioso (Fulcrand y Privat, 1977; Lillo *et al.*, 2001; Springer y Wilson, 1989; Thanos *et al.*, 1992). Ultraestructuralmente se caracterizan por tener un núcleo oval o alargado, con parches de cromatina prominentes. La densidad del citoplasma se parece a la de los

oligodendrocitos, pero contiene pocos microtúbulos y no tiene gránulos de glucógeno ni haces de filamentos intermedios. Poseen un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi muy desarrollados. Además, es frecuente en su citoplasma la presencia de cuerpos densos laminares, gotitas homogéneas, lisosomas y gránulos de lipofuscina (Peters *et al.*, 1991).

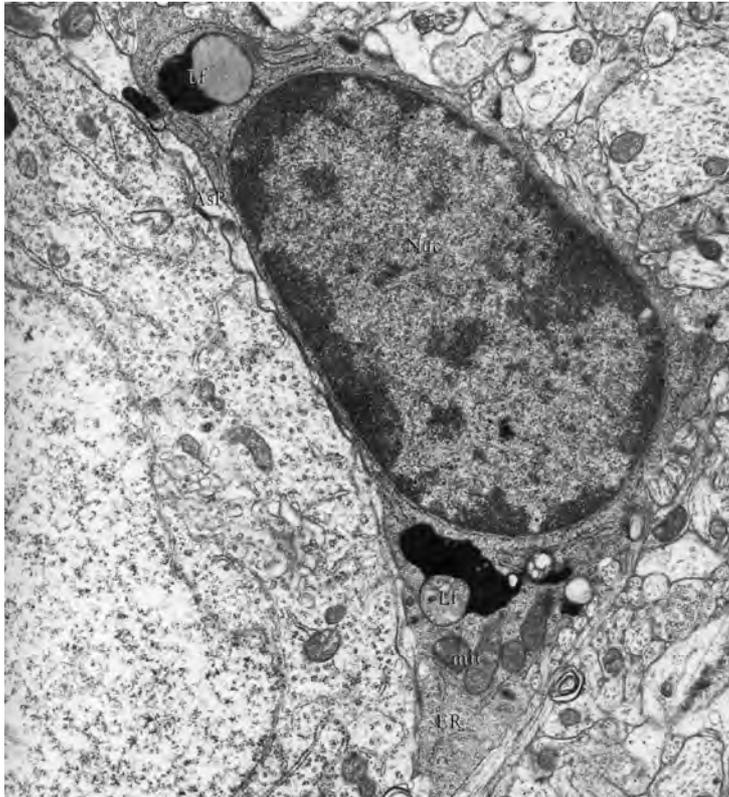


Figura 6: Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de una célula de microglía. AsP: proceso astrocitario; ER: retículo endoplasmático rugoso; Lf: gránulo de lipofuscina; mit: mitocondria; N: núcleo. Tomado de Peters *et al.*, 1991.

Durante el desarrollo de la retina, las células de microglía parecen entrar tanto por el DO como por el margen ciliar (en la periferia de la retina). Algunas aparecen antes de producirse la vascularización retiniana y otras migran junto a los precursores vasculares (Chen *et al.*, 2002; Provis *et al.*, 1996). La microglía en la retina ha sido descrita en numerosas especies de vertebrados: en conejo (Boycott y Hopkins, 1981; Schnitzer, 1989; Vrabec, 1970), en rata (Ling, 1982), en mono (Boycott y Hopkins, 1981; Vrabec, 1970), en ratón (Hume *et al.*, 1983), en aves (Navascués *et al.*, 1994), en anfibios (Goodbrand y Gaze, 1991) y en humano (Díaz-Araya *et al.*, 1995; Penfold *et al.*, 1991). En teleósteos, se localiza principalmente en la CPE, en la CPI y en la CFNO, y en menor medida en la CNE, en la CNI y en la CCG. La mayor parte es de tipo ramificado, pero también hay microglía ameboide en la periferia de la retina y en la superficie vitreal, asociada a los vasos (Jimeno *et al.*, 1999; Jimeno, 2001; Lillo, 2001; Lillo *et al.*, 2001; Salvador-Silva *et al.*, 2000; Velasco *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1999).

La función principal de la microglía es responder ante situaciones patológicas. Ante lesiones, inflamaciones o infecciones del SNC actúan como macrófagos (Perry y Gordon, 1988; Río Hortega, 1932; Streit *et al.*, 1988) y modulan el grado de la respuesta inmune liberando citoquinas (Frei *et al.*, 1987), factores neuroprotectores y neurotoxinas (Barron, 1995; Giulian y Baker, 1986; Giulian y Young, 1986; Giulian, 1987; Giulian y Corpuz, 1993).

GLÍA RADIAL

Las células de la glía radial son cruciales en el desarrollo del SNC. Están involucradas en procesos clave durante el desarrollo, desde el diseño de la citoarquitectura y migración neuronal hasta su reciente papel como precursores durante la neurogénesis (Campbell y Gotz, 2002; Merkle *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2001).

Aparecen pronto en el desarrollo, a partir de células neuroepiteliales, presentando una característica morfología radial. Estas células pierden su morfología típica en los estadios adultos excepto en el caso de dos subtipos celulares, la glía de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina. De acuerdo con estudios recientes, durante los últimos estadios del desarrollo de la corteza, las células de la glía radial se dividen asimétricamente en la zona ventricular del cerebro para generar células de la glía radial y células progenitoras intermediarias y, posteriormente las células intermediarias se dividen nuevamente de forma asimétrica en la zona subventricular para producir múltiples neuronas (Martínez-Cerdeño *et al.*, 2006; Noctor *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2008).

Se caracterizan principalmente: 1) por sus largos procesos radiales que se extienden desde la zona ventricular hasta la superficie pial y, 2) por sus componentes típicos de células astrogliales como los gránulos de glucógeno, el transportador de glutamato específico de astrocitos y la existencia de gliofilamentos positivos a GFAP. Sin embargo, también presentan características exclusivas como la proteína de unión a lípidos del cerebro (FABP7), cuya expresión es inducida por Notch-1 y, éste a su vez actúa bajo el control de la reelina (Anthony *et al.*, 2005; Keilani y Sugaya, 2008).

VASOS SANGUINEOS

La retina es uno de los tejidos metabólicamente más activos con una elevada tasa de consumo de oxígeno mayor que el cerebro (Wangsa-Wirawan y Linsenmeier, 2003). Nutrir la retina mediante red vascular es crítico para la visión.

Las retinas de mamíferos son vascularizadas y tienen dos fuentes de suministro de sangre: la arteria central (CA) y los vasos sanguíneos de la coroides. La coroides recibe la mayoría del flujo sanguíneo (65-85%) (Henkind *et al.*, 1979) y es vital para el mantenimiento de la retina externa (particularmente de los fotorreceptores); el resto del flujo sanguíneo (20-30%) de la retina discurre a través de la AC que llega desde la CNO y alimenta a las capas retinianas internas. En la retina, la AC se ramifica (Fig. 7) y sus ramas forman redes capilares, de forma que los capilares van introduciéndose en la retina desde la CFNO hacia las CPI y CPE (Kolb *et al.*, 2000; Zhang, 1994). Los vasos sanguíneos de mamíferos no son fenestrados y alimentan la retina por transcitosis de nutrientes, encapsulados en vesículas (Essner *et al.*, 1986). Se ha visto que la formación de la vasculatura y la extensión y diferenciación de los astrocitos en la retina en mamíferos están altamente relacionados (Chan-Ling *et al.*, 2004; Mi y Barres, 1999).

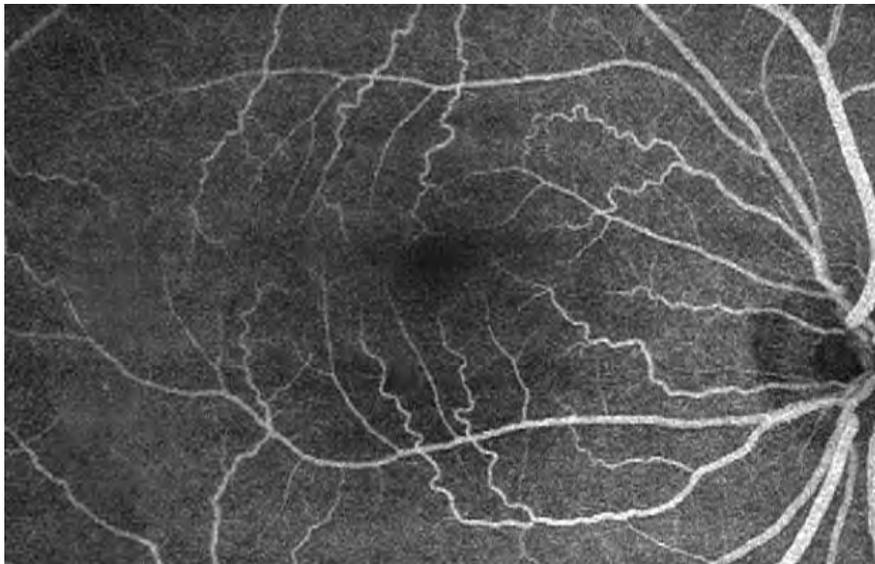


Figura 7: Fotografía del fondo de ojo humano marcado con fluoresceína mostrando las arterias de mayor tamaño y las venas. Tomado de www.webvision.med.utah.edu.

En teleósteos, aunque las retinas son avasculares, la AC entra en el espacio vitreal a través de la CNO. Desde el DO la AC se ramifica y los vasos sanguíneos se distribuyen sobre toda la superficie interna de la retina y contactan con una vena circunferencial que rodea la retina en el margen ciliar (Fig. 8) (Álvarez *et al.*, 2007). Los vasos están en contacto directo con la CCG, pero no se introducen hacia capas

internas de la retina. Existe un íntimo contacto entre los pies de las células de Müller y los vasos sanguíneos (Álvarez *et al.*, 2007). De esta manera, la alimentación de la retina de peces teleósteos se produce a través de la vasculatura de la coroides y la AC desde la superficie vitreal, mediante el intercambio de vesículas entre los vasos y la retina (Álvarez *et al.*, 2007).

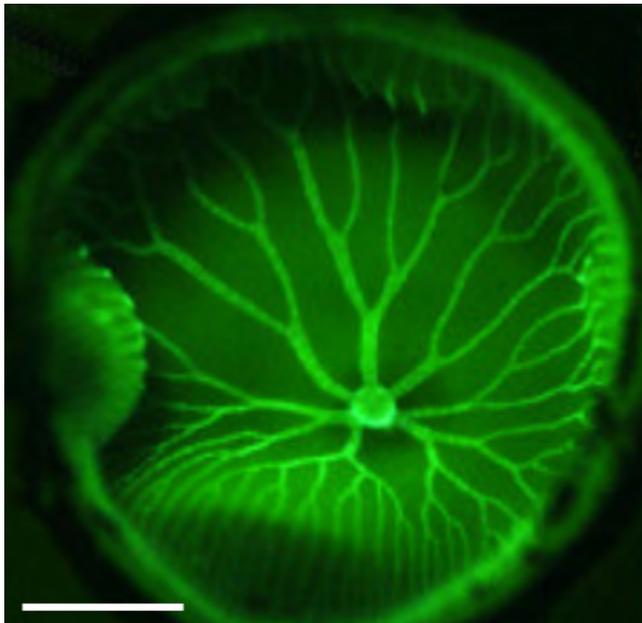


Figura 8: Vasculatura típica de un pez cebra adulto (*Danio rerio* L., 1758, Cyprinidae Teleostei). Barra de escala: 500µm. Tomada de Álvarez *et al.*, 2007.

La AC, tanto en mamíferos como en teleósteos, sale de la retina por la parte central de la CNO y pasa a situarse lateral al NO (Bunt, 1982; Lillo *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2009). Por otro lado, existen numerosos vasos sanguíneos que irrigan el NO, dispuestos entre el tejido conectivo de dicho nervio (Velasco, 1994).

2.2 PARTES DEL NERVIO ÓPTICO

CABEZA DE NERVIO ÓPTICO

La CNO es una zona de transición entre la retina y el SIO, y juega un papel fundamental tanto en el desarrollo del sistema visual como durante el crecimiento continuado y la regeneración (Apdos. 3: Desarrollo del Sistema Visual, y 4: Crecimiento Continuado y Regeneración).

Esta región del sistema visual está constituida únicamente por los axones de las células ganglionares y células gliales, aunque también presenta vasos sanguíneos y

elementos del tejido conjuntivo. En cada grupo de vertebrados tiene una organización y características particulares.

En mamíferos, concretamente en humanos, los astrocitos se disponen separando el NO del vítreo, la retina, la coroides y la esclera formando las denominadas: membrana limitante de Elschnig, menisco central de Kuhnt, tejido intermediario de Kuhnt y tejido de Jacoby (Fig. 9). También se encuentran empaquetando y organizando los axones de las células ganglionares junto con elementos de tejido conjuntivo en la parte posterior de la CNO, formando una estructura característica tanto de mamíferos como de aves denominada **lámina cribosa** (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996). Es importante destacar que los astrocitos muestran variaciones en sus características citoplasmáticas dependiendo de su localización en la CNO. En zonas cercanas a la CFNO tienen poca cantidad de gliofilamentos y se piensa que básicamente se encuentran organizando los axones. Sin embargo, en zonas posteriores, y principalmente formando las membranas limitantes, sus citoplasmas contienen grandes cantidades de filamentos intermedios, aislando los axones del resto de tejidos circundantes y soportando fuerzas tensionales (Triviño *et al.*, 1996). Por otro lado, tanto los oligodendrocitos como la mielinización de los axones, no aparecen hasta la parte posterior de la lámina cribosa que es el inicio del SIO (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009).

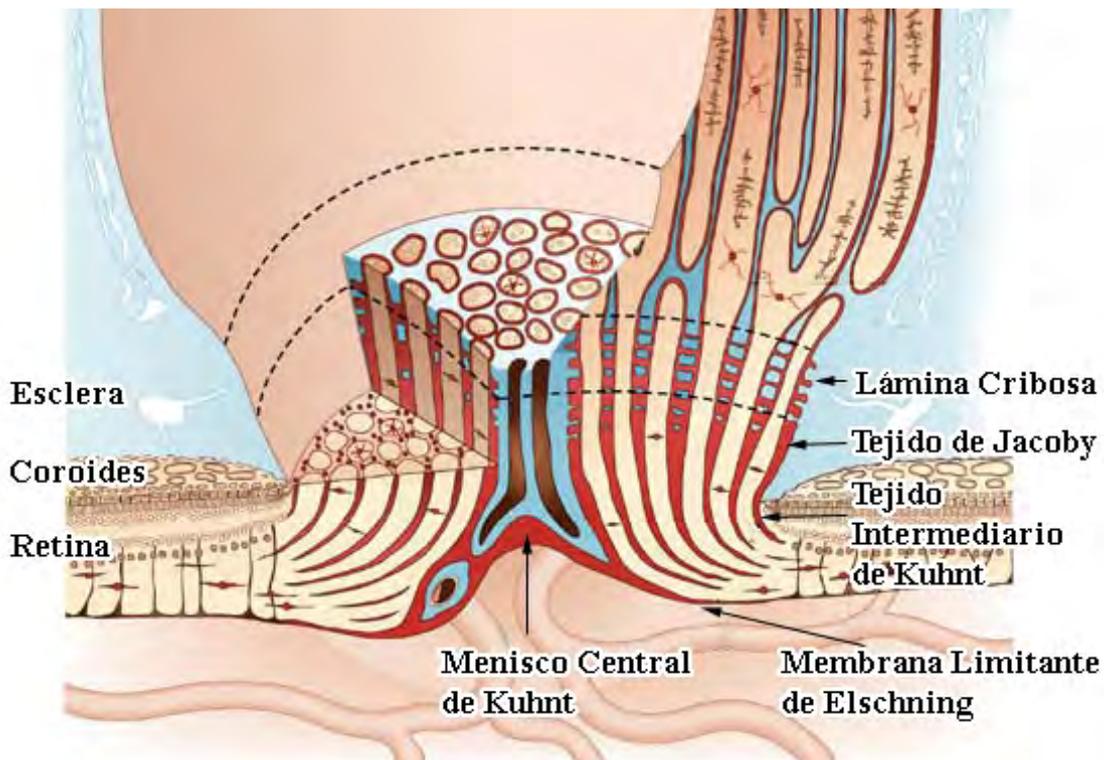


Figura 9: Esquema de la CNO de humano. Modificado de www.images.md.

La retina de aves y reptiles, a diferencia de mamíferos, es avascular; y la CNO se caracteriza por presentar una estructura vascularizada, denominada *pecten oculi* en aves y *conus papilar* en reptiles, que sale desde la CNO hacia el vítreo (Casañas, 2005; Schuck *et al.*, 2000). En aves, tanto los astrocitos del *pecten* como una glía muy específica denominada glía peripapilar que se encuentra limitando la retina con el NO en la CNO (Fig. 10), muestran características muy especiales. En concreto, la glía peripapilar presenta marcadores de neuronas, glía radial, astrocitos y oligodendrocitos (Quesada *et al.*, 2004; Schuck *et al.*, 2000). En reptiles, sin embargo, son los astrocitos los que se encargan de limitar la retina con el NO (Dávila *et al.*, 1987). En aves se considera que presentan lámina cribosa en la parte posterior de la CNO (Fujita *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2001; Morcos y Chan-Ling, 2000). Los reptiles, sin embargo, no tienen lámina cribosa como tal, aunque los astrocitos localizados en dicha zona se organizan perpendiculares al NO y presentan gruesos procesos que acompañan a los axones de las células ganglionares (Dávila *et al.*, 1987). Tanto en aves como en reptiles se ha descrito la presencia de oligodendrocitos y de mielinización de los axones de las células ganglionares, en zonas anteriores a la lámina cribosa e incluso en la CFNO (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2001; Morcos y Chan-Ling, 2000).

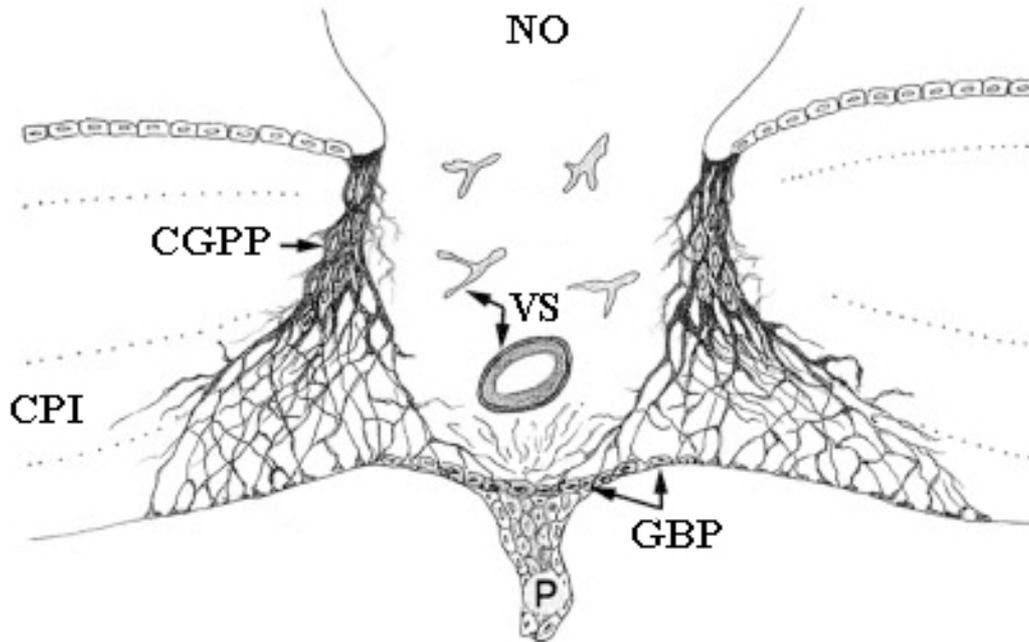


Figura 10: Esquema de la CNO de pollo. CGPP: células de la glía peripapilar; CPI: capa plexiforme interna; GBP: glía de la base del pecten; NO: nervio óptico; P: pecten; VS: vasos sanguíneos. Modificado de Quesada *et al.*, 2004.

En teleósteos no existe lámina cribosa en la parte posterior de la CNO (Fujita *et al.*, 2000) y son las células de Müller las que se encuentran limitando el NO con la retina y el vítreo (Lillo *et al.*, 2002). Estas células de Müller presentan unos procesos vitreales más gruesos que en el resto de la retina, y están íntimamente asociadas a astrocitos y células de microglía (Fig. 11) (Lillo *et al.*, 2002). Limitando la CNO con la coroides y la esclera, en la parte posterior de la CNO, aparecen astrocitos positivos a GFAP formando la limitante glial (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009), marcador que desaparece al inicio del SIO. Por otro lado, tanto en la CNO como en la CFNO de teleósteos, se ha descrito tanto la presencia de axones mielinizados como de oligodendrocitos (Fujita *et al.*, 2000; Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002).

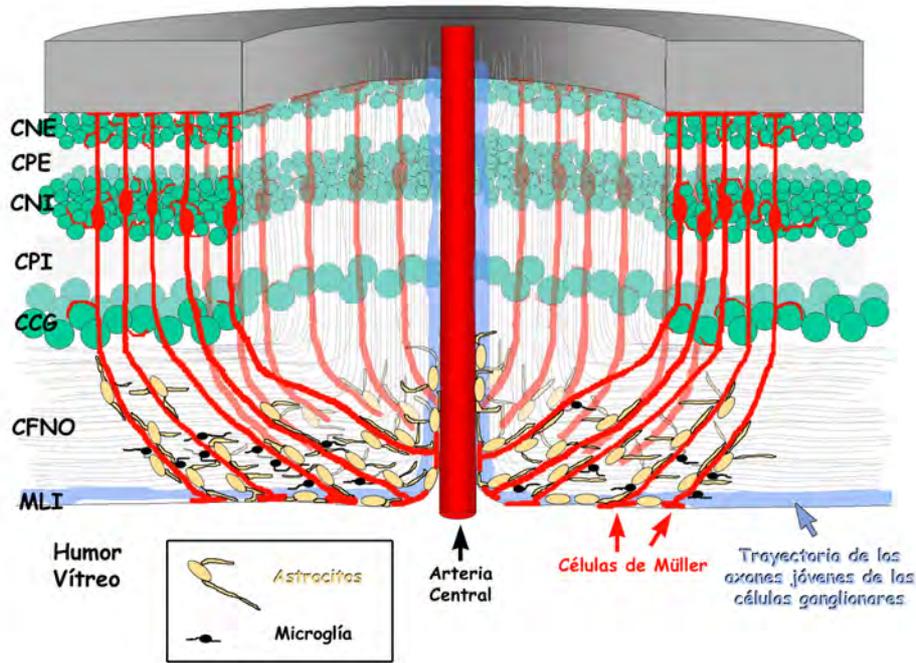


Figura 11: Esquema de la CNO de la tenca (*Tinca tinca* L., 1758, Cyprinidae Teleostei). CCG: capa de las células ganglionares; CFNO: capa de las fibras del nervio óptico; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna, CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna, MLI: membrana limitante interna. Modificado de Lillo *et al.*, 2002.

Los teleósteos son animales que experimentan procesos de crecimiento continuado y regeneración. En la CNO de estos animales adultos se han descrito axones de nueva generación y precursores gliales inmaduros (Lillo *et al.*, 2002). En el caso de los axones de las células ganglionares, presentan una ordenación por edad que conservan desde la retina hasta el SIO. En la retina, los axones jóvenes discurren por la región más vitreal de la CFNO, se introducen junto a la AC por la parte central de la CNO y pasan a una localización ventral junto a la AC cuando alcanzan el SIO (Fig. 12) (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1981; Easter *et al.*, 1984).

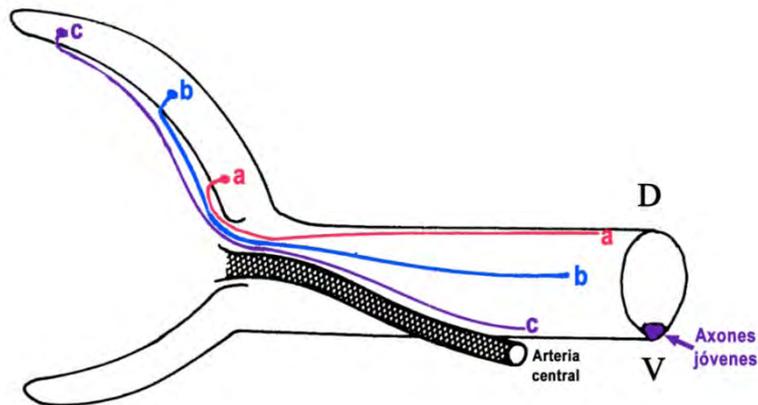


Figura 12: Esquema que muestra la disposición que adquieren los axones de las células ganglionares desde la retina hasta el SIO de teleosteos. a-c: axones maduros más antiguos en formación a axones jóvenes; D: dorsal; V: ventral. Modificado de Bunt, 1982.

Además, como se verá a continuación (Apdo. 3.3: Formación del la CNO) la expresión diferencial de numerosas moléculas de guía axonal así como las células gliales de la CFNO y CNO, juegan un papel fundamental en la guía de los axones jóvenes. Estas regiones también son claves en el empaquetamiento axonal durante el desarrollo del sistema visual de vertebrados y en los procesos de crecimiento continuado y regeneración que experimentan ciertos grupos de vertebrados, como son los anfibios y los peces.

SEGMENTO INTRAORBITAL

El SIO comprende desde la parte posterior de la CNO hasta el QO. Está constituido básicamente por células ganglionares y células gliales, aunque también contiene vasos sanguíneos y tejido conjuntivo. Al igual que ocurre en la CNO, el SIO presenta variaciones en cuanto a organización en los distintos grupos de vertebrados.

En mamíferos, los axones del NO se agrupan en fascículos separados por tabiques derivados de la piamadre (Kaufman y Alm, 2004). Los astrocitos, positivos a GFAP, presentan morfología variada, y establecen contacto entre ellos y con los axones de las células ganglionares, los vasos sanguíneos y la superficie pial (Sun *et al.*, 2009), formando junto con esta última, una capa denominada manto glial de Fuchs (Kaufman y Alm, 2004). La mielinización y la aparición de oligodendrocitos comienza a partir de la lámina cribosa en la parte posterior de la CNO, en primates inmediatamente después (Oyama *et al.*, 2006) y, en ratones un poco posterior a la misma (Sun *et al.*, 2009). De esta forma, en mamíferos, el SIO se encuentra completamente mielinizado en toda su extensión (Kaufman y Alm, 2004).

En teleósteos, el SIO se organiza como una lámina plegada, cuyo grado de plegamiento varía en función de la especie (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1981; Lillo *et al.*, 1998; Mack y Wolburg, 2006; Tapp, 1973; Vanegas y Ito, 1983). Los axones de las células ganglionares discurren paralelos a los pliegues de dicha lámina (Maggs y Scholes, 1986). En el SIO se conserva el ordenamiento por edad de los axones y de esta manera se distingue una **zona madura** y un **borde en crecimiento** donde se encuentran los axones amielínicos (Fig. 13) (Easter *et al.*, 1981; Mack y Wolburg, 2006; Maggs y Scholes, 1990).

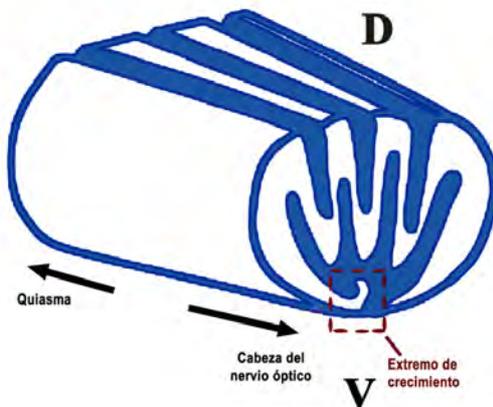


Figura 13:
 Esquema del SIO de la tenca (*Tinca tinca* L., 1758, Cyprinidae Teleostei). D: dorsal; V: ventral. Modificado de Lillo *et al.*, 1998.

En la zona madura, aparecen los axones mielinizados y estrechamente empaquetados por los procesos de los astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1990). Los cuerpos celulares de los astrocitos se encuentran entre fascículos y sus procesos forman un entramado separando los axones en fascículos (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986; Maggs y Scholes, 1990). En el carpín dorado (*Carassius auratus* L., 1758, Cyprinidae, Teleostei) se ha observado que, desde la parte posterior de la CNO hacia el QO, el SIO experimenta un grado de empaquetamiento cada vez mayor (Easter *et al.*, 1981). Los astrocitos reticulares se unen entre sí mediante uniones estrechas o GAP y desmosomas (Lillo *et al.*, 1998; Mack y Wolburg, 2006; Maggs y Scholes, 1990; Wolburg *et al.*, 1983), y expresan ciertas proteínas asociadas a los filamentos intermedios como la citoqueratina (Giordano *et al.*, 1989; Maggs y Scholes, 1990) y la vimentina (Cohen *et al.*, 1993). Sin embargo, a diferencia de mamíferos, no presentan la proteína GFAP en condiciones normales (Blaugrund *et al.*, 1991; Dahl y Bignami, 1973; Levine, 1989; Markl y Franke, 1988). A este nivel los oligodendrocitos son muy numerosos (Ankerhold y Stuermer, 1999) y aparecen gran cantidad de vasos sanguíneos de pequeño tamaño situados endoneuralmente (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes,

1986). Rodeando al SIO están los astrocitos que forman la limitante glial. Esta limitante glial está constituida por una agrupación de numerosos procesos astrocíticos y cuerpos celulares que se unen entre sí mediante desmosomas y por su superficie externa están cubiertos por una lámina basal (Peters *et al.*, 1991). Estos astrocitos presentan diferencias con los astrocitos reticulares del resto del NO. Son células de mayor tamaño con procesos citoplasmáticos muy gruesos y no forman fascículos de axones ya que se dedican a organizar la limitante glial.

Por otro lado, el borde en crecimiento es de tamaño muy limitado y, en general, se sitúa en posición ventral a la lámina plegada. Contiene muy pocos fascículos formados únicamente por fibras no mielinizadas, siendo la mayoría fascículos mixtos con fibras mielinizadas y no mielinizadas (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986). En esta zona, aparecen astrocitos que presentan distintos grados de madurez (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1990), de forma que se establece un gradiente de maduración. Las células más inmaduras se sitúan en la zona donde se localizan los fascículos no mielinizados, y al alejarse de la zona de crecimiento aumenta la maduración (Fig. 14) (Maggs y Scholes, 1990). Además, se ha descrito un incremento en el marcaje para ZO1 y claudina-1, proteínas presentes en las uniones estrechas, en la zona en crecimiento sugiriendo una cierta compartimentalización de la zona (Mack y Wolburg, 2006). El tejido conectivo que envuelve el borde en crecimiento es rico en capilares y se encuentra en íntimo contacto con la glía limitante (Lillo *et al.*, 1998; Scholes, 1979).

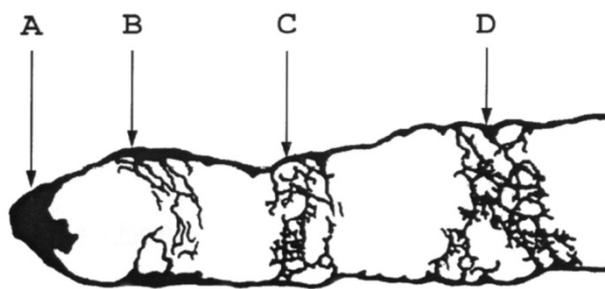


Figura 14: Esquema del gradiente de maduración astrocitario que se establece en el borde en crecimiento. A: células gliales indiferenciadas; B: células gliales activas; C: comienzo de la reticulación de los procesos astrocíticos; D: estado de máxima maduración. Modificado de Maggs y Scholes, 1990.

QUIASMA ÓPTICO

El QO es la zona del NO donde los axones procedentes de cada ojo se entretrejen unos sobre otros en la línea media (Thanos y Bonhoeffer, 1984). Este encuentro entre fibras de los dos ojos ofrece la oportunidad de proyectar ipsilateralmente, base de la visión binocular y la percepción de la profundidad. Los animales con los ojos en posición frontal y mayor porcentaje de proyecciones de las células ganglionares ipsilaterales, tendrán mayor grado de visión binocular (Petros *et al.*, 2008). En todos los embriones de vertebrados, el QO se desarrolla inicialmente cuando el tallo óptico se une con el cerebro (Silver y Rutishauser, 1984). Durante el desarrollo embrionario, la interacción de los axones jóvenes con células de la glía radial y diversas moléculas de guía axonal determina que los axones decusen o continúen en una dirección ipsilateral (Petros *et al.*, 2008).

En mamíferos, el NO penetra en el cráneo a través del canal óptico, un conducto que se extiende inmediatamente superonasal a la hendidura orbitaria superior. Una vez que los NO han penetrado en el cráneo, se entrecruzan en el QO. Los humanos presentan el mayor grado de visión binocular con cerca de un 40% de axones ipsilaterales (Kaufman y Alm, 2004; Petros *et al.*, 2008), los hurones conservan alrededor de un 15% de axones sin cruzar y, los ratones, sin embargo, presentan una baja visión binocular con entre un 3-5% de fibras ipsilaterales (Fig. 15) (Petros *et al.*, 2008).

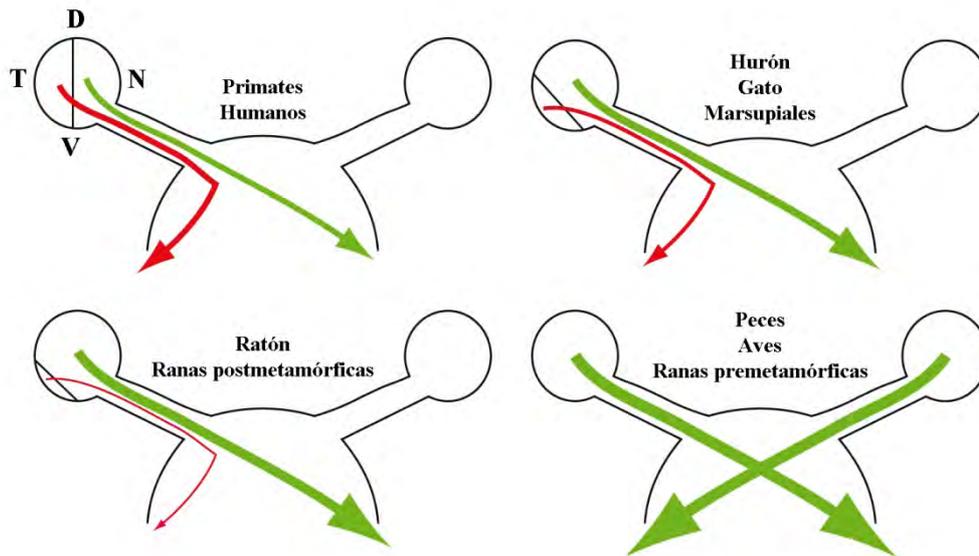


Figura 15: Esquema de la divergencia de los axones retinianos en el QO de diferentes especies de vertebrados. Representación de los orígenes y proporciones relativas (pero no la trayectoria precisa de las fibras) de las proyecciones de la retina que decusan y que no. D: dorsal; N: nasal; T: temporal; V: ventral. Modificado de Petros *et al.*, 2008.

En teleósteos, en este punto, finaliza la organización en lámina plegada del NO y los axones cambian su orientación, de forma que los dos nervios ópticos se cruzan para alcanzar posteriormente los centros cerebrales contralaterales a sus retinas de origen. Además, el entorno glial del SIO y el TR cambia completamente y aísla los dos nervios entre sí cuando se cruzan en la línea media, lo que impide la proyección ipsilateral, y determina una visión monocular (Fig. 13) (Maggs y Scholes, 1986; Petros *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha demostrado (Caminos *et al.*, 1998; Vanegas y Ito, 1983) que algunos axones proyectan ipsilateralmente. Los axones no mielinizados procedentes del borde en crecimiento del SIO, se sitúan en la periferia (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986) y decusan en su mayoría (Lillo *et al.*, 1998). Las células gliales poseen características similares a las del SIO, no cambian mucho su morfología y distribución (Lillo *et al.*, 1998).

TRACTO ÓPTICO

El TR comprende la zona que va desde el QO hasta la primera estación de relevo del cerebro. En mamíferos dicha estación es principalmente el núcleo geniculado lateral

del tálamo dorsal, aunque una pequeña cantidad de las fibras llegarán a formar conexiones con células del hipotálamo y del mesencéfalo (Bear *et al.*, 1998). En el resto de los grupos de vertebrados, la mayor parte de las proyecciones retinianas van a conectar con la región dorsal del mesencéfalo, que se denomina techo óptico, aunque también llegan conexiones a núcleos diencefálicos (Caminos *et al.*, 1998; Fraser y O'Rourke, 1990; Hergueta *et al.*, 1992; Mey y Thanos, 1992; Picouet y Clairambault, 1975).

El TR en mamíferos se denomina cintilla óptica. En euterios (o mamíferos placentarios) los axones de las células ganglionares se encuentran organizados topográficamente desde que salen de la retina, pero la organización se pierde al aproximarse al quiasma (Guillery, 1995; Jeffery, 2001). En el QO los fascículos de axones dejan de estar rodeados por células gliales y disminuye su grado de empaquetamiento. Mientras atraviesan el QO, los axones ipsilaterales se separan de aquellos que proyectan contralateralmente, de esta manera cada componente entra en el TR habiendo perdido su ordenamiento por edad y su organización retinotópica (Jeffery, 2001; Plas *et al.*, 2005). En marsupiales, sin embargo, tanto la ordenación retinotópica como la organización de los axones en fascículos en el NO se mantienen hasta zonas posteriores al QO (Dunlop *et al.*, 2000) y, las fibras ipsilaterales proyectan directamente en el TR.

En teleósteos, en el TR se pierde completamente su plegamiento y sufre una disminución en su fasciculación por los procesos astrocitarios, de manera que los axones de las células ganglionares presentan un patrón característico en espiga (Maggs y Scholes, 1986). Por otro lado, la mayoría de los axones son mielinizados, donde los axones de mayor diámetro se localizan en el centro (Easter *et al.*, 1981; Rusoff y Easter, 1980; Stuermer y Easter, 1984) y los axones amielínicos se sitúan en la periferia, formando un pequeño anillo que se dispersa entre los axones mielinizados cerca del punto de entrada al cerebro (Lanners y Grafstein, 1980; Lillo *et al.*, 1998; Rusoff, 1984). Las células gliales presentan características similares a las del resto del NO, salvo que su distribución presenta ligeras variaciones dependientes de la diferente fasciculación de este segmento (Lillo *et al.*, 1998). En esta zona también aparecen gran número de vasos sanguíneos. Además, en la parte posterior del TR se observan procesos pertenecientes a la glía radial del TO (somatos situados limitando el receso óptico y las

paredes del tercer ventrículo). Dichos procesos son GFAP⁺/GS⁺/S100⁺ (Levine, 1989; Nona *et al.*, 1989; Nona, 1995; Parrilla *et al.*, 2009; Velasco, 1994).

3. DESARROLLO DEL SISTEMA VISUAL

3.1 FORMACIÓN DEL SISTEMA VISUAL

MORFOGÉNESIS

Hay dos procesos inductivos que gobiernan el desarrollo del ojo de los vertebrados: un proceso inicial de morfogénesis que resulta en la especificación regional de varias estructuras del ojo; y dentro de esos dominios anatómicos específicos, otro en el que ocurre la adquisición del destino celular y su posterior función dentro del ojo maduro (Pei y Rhodin, 1970).

El desarrollo de los ojos de los vertebrados ocurre a partir de evaginaciones laterales del prosencéfalo, las **vesículas ópticas** que, permanecen unidas al cerebro anterior mediante una estructura transitoria denominada **pedúnculo** o **tallo óptico** (Fig. 16A) (Chow y Lang, 2001; Geneser, 1993). En ratón comienza en la fase embrionaria de E8,5 y en pez cebra alrededor de las 11,5 horas postfertilización (hpf). Las vesículas contactan con el ectodermo superficial e inducen la formación de la **placoda del cristalino**, que posteriormente constituirá el **cristalino**. Al mismo tiempo, las vesículas ópticas se invaginan y forman las **copas ópticas** o **vesículas secundarias** (Fig. 16B). En las copas ópticas se diferencian dos capas, la externa y la interna, separadas por un espacio, denominado **lúmen**, que conecta a través del pedúnculo con el tercer ventrículo. La capa más externa se adelgazará para dar lugar al **epitelio pigmentario** (EP), y la capa más interna proliferará y se transformará en la **retina neuronal** (Chow y Lang, 2001; Geneser, 1993). En la unión entre ambas, el margen de la copa óptica, las células formarán el epitelio biestratificado del **cuerpo ciliar** y el **iris** (Beebe, 1986; Zhao *et al.*, 2002). Entre el margen de la copa óptica, la placoda del cristalino y el ectodermo, se acumulan células procedentes del mesodermo y de la cresta neural craneal que darán lugar a los estromas del iris, el cuerpo ciliar y la córnea (Fig. 16C) (Johnston *et al.*, 1979; Soules y Link, 2005; Thut *et al.*, 2001).

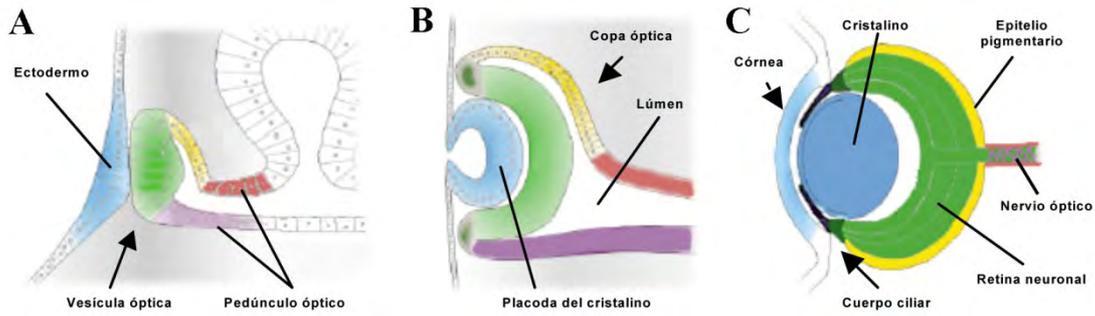


Figura 16: Esquema representando la morfogénesis del ojo de vertebrados. Modificaco de Chow y Lang, 2001.

La formación de las copas ópticas es un proceso asimétrico que tiene lugar en el borde ventral de la vesícula óptica y no en su centro, resultando en la formación de una hendidura llamada **fisura coroidea**, que se continúa por el tallo óptico (Figs. 17A y B). Sobre ella se van depositando células mesenquimales que finalmente formarán los vasos sanguíneos que irrigan la retina, siendo la más importante la AC que se dirige hacia la cámara posterior del ojo. A medida que aumenta la invaginación, la fisura va profundizándose y acaba cerrándose sobre sí misma al fusionarse sus bordes (Fig. 17C). Como consecuencia, la región dorsal al lúmen del tallo óptico pasa a ser externa y la ventral interna. La primera dará lugar al tejido no neural que recubre el NO y la segunda a glía del nervio (Fig. 17D) (Chow y Lang, 2001; Geneser, 1993).

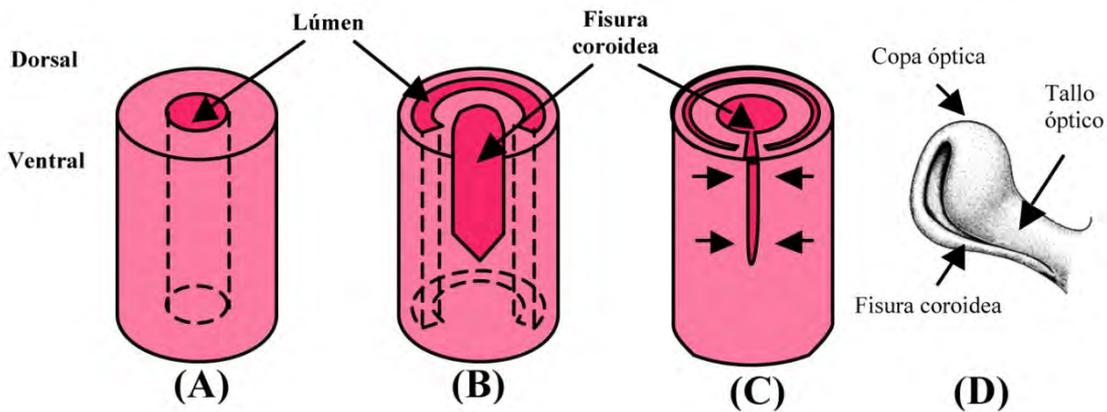


Figura 17: Esquema mostrando el cierre de la fisura coroidea. **A:** tallo óptico con el lúmen en su interior; **B:** Formación de la fisura coroidea; **C:** cierre de la fisura coroidea; **D:** vista tridimensional del cierre de la fisura coroidea. Modificado de www.med.unc.edu/embryo_images.

Cabe destacar, que en teleósteos la morfogénesis del ojo presenta algunas diferencias con respecto a la de mamíferos. En primer lugar, los primordios ópticos no emergen del prosencéfalo como vesículas sino como *alas ópticas*, discos planos y compactos de neuroepitelio y, el lumen se origina después extendiéndose a través del

tallo óptico hasta unirse a los futuros ventrículos del cerebro (Schmitt y Dowling, 1994). Por otro lado, en pez cebra se han descrito dos rotaciones del primordio óptico, una ocurre durante la primera flexión cefálica, el borde lateral del DO se comba en dirección ventral: la superficie dorsal pasa a ser lateral, y la ventral se hace medial (Schmitt y Dowling, 1994). La segunda rotación se produce cuando la flexión cefálica se hace más acentuada, el primordio óptico se desprende del prosencéfalo por su región posterior de forma que el pedúnculo óptico y, posteriormente, la fisura coroidea están inicialmente en posición nasal y no ventral como ocurre en los mamíferos. Una vez formada la copa óptica, los ojos rotan de modo que la fisura coroidea pasa a ser ventral (Schmitt y Dowling, 1994). Finalmente, en algunos teleósteos, principalmente ciprínidos, la fisura coroidea se cierra tal y como hemos indicado, manteniéndose la entrada de los vasos sanguíneos al interior del ojo a través de DO (Duke-Elder, 1958); sin embargo, en la mayoría de teleósteos la fisura permanece siempre abierta, o se cierra solo en la región próxima al DO, permitiendo la penetración de una expansión de tejido coroideo encargada de nutrir el interior del ojo (Duke-Elder, 1958).

REGULACIÓN

Para el establecimiento de la placa neural anterior, región que dará lugar a las vesículas ópticas y, por lo tanto, el desarrollo normal del ojo, son esenciales una serie de factores de transcripción, entre ellos Pax6 (Chow y Lang, 2001). Posteriormente, los patrones de expresión de este y otros factores transcripcionales especificarán las diferentes estructuras que derivan de la vesícula. Típicamente, Pax2 delimita el pedúnculo óptico, Pax6 el neuroepitelio y Mitf el límite entre el neuroepitelio y el epitelio pigmentario (Fig. 18) (Chow y Lang, 2001; Jean *et al.*, 1998; Martínez-Morales *et al.*, 2004; Nornes *et al.*, 1990). Además, Sonic hedgehog (Shh), una proteína de señalización secretada muy conocida por su papel como morfógeno, se expresa en el cerebro anterior ventral, estableciendo estructuras ventrales del mismo como las vesículas ópticas (Chiang *et al.*, 1996; Rubenstein y Beachy, 1998).

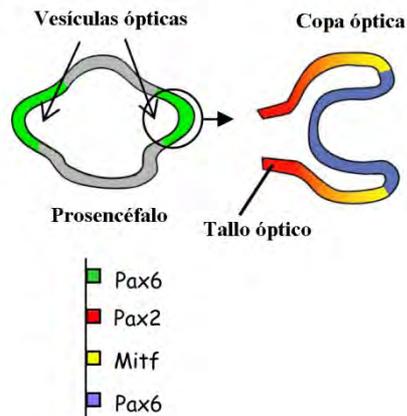


Figura 18: Esquema representando la expresión de los factores de transcripción: Pax6, Pax2 y Mitf, durante la formación de la copa óptica. Modificado de Levine y Green, 2004.

SONIC HEDGEHOG

Los miembros de la familia de moléculas de señalización Hedgehog (Hh) están implicados en la especificación del tejido neural ventral. *Hh* fue identificado por primera vez en *Drosophila* como una molécula de establecimiento de la segmentación. Posteriormente se ha visto que está implicada en muchos aspectos del desarrollo de *Drosophila*, incluyendo la morfogénesis del ojo (Heberlein *et al.*, 1993; Heberlein *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1993). En vertebrados, se han llevado a cabo numerosos estudios que han implicado a los miembros de la familia Hh en la especificación del tubo neural ventral (Ericson *et al.*, 1997; Patten y Placzek, 2000) y el desarrollo de las extremidades (Capdevila y Johnson, 2000). Shh, un homólogo de Hh en vertebrados, aparece tanto en cerebro anterior ventral como en el mesodermo precordial subyacente (Echelard *et al.*, 1993; Ekker *et al.*, 1995; Krauss *et al.*, 1993; Macdonald *et al.*, 1995; Riddle *et al.*, 1993).

En la retina durante el desarrollo, *shh* se expresa en mayor concentración en la retina central y disminuye hacia la periferia (Kolpak *et al.*, 2005), situándose en la futura capa de las células ganglionares (Dakubo *et al.*, 2003). Shh está involucrado en la proliferación, diferenciación y organización de los neuroblastos en la retina (Jensen y Wallace, 1997; Levine *et al.*, 1997; Stenkamp *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Zhang y Yang, 2001) y, en pez cebra, también dirige la neurogénesis a lo largo de la misma (Neumann y Nuesslein-Volhard, 2000). Participa en el proceso de guía axonal, con un efecto inhibitorio a altas concentraciones y activador a bajas (Kolpak *et al.*, 2005). Además de estar en la retina, Shh está presente a lo largo de toda la línea media del eje del embrión y, por tanto, donde se situará el futuro QO (Erskine y Herrera, 2007; Fuccillo *et al.*, 2006). Cuando los axones de las células ganglionares se aproximan a

esta área, se reprime su expresión, permitiendo así su formación (Trousse *et al.*, 2001). En mutantes para *pax2*, Shh no se reprime, de manera que el quiasma no se desarrolla correctamente (Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996). Por tanto, Shh en el QO funciona como una señal inhibitoria. Por otro lado, Shh regula el desarrollo de las células gliales y la expresión de otras señales en el QO (Barresi *et al.*, 2005; Wallace y Raff, 1999).

En humanos, mutaciones en *SHH* se asocian con la holoprosencefalia, una condición que resulta con el desarrollo anormal de estructuras de la línea media incluyendo la ciclopia en el caso más extremo (Belloni *et al.*, 1996; Roessler *et al.*, 1996).

PAX2

Las proteínas Pax constituyen una familia de factores de transcripción altamente conservados en la evolución (Chalepakis *et al.*, 1991; Czerny *et al.*, 1993), que están implicados en la regulación de muchos aspectos durante el desarrollo temprano (Stuart *et al.*, 1994). Se encontraron por primera vez entre los genes de segmentación de *Drosophila* (Bopp *et al.*, 1986), y posteriormente en otros organismos como: nematodos, erizo de mar, pez cebra, lagarto, pollo, ratón, rata y humano (Burri *et al.*, 1989; Dressler y Gruss, 1988). Los genes *pax* se definen por la presencia de un dominio *paired-domain* (PD o *prd*) de unión al ADN muy conservado (Callaerts *et al.*, 1997).

La familia de genes *pax* en vertebrados, está compuesta por cuatro grupos (Balczarek *et al.*, 1997): (I) *pax1* y *pax9*, (II) *pax2*, *pax5* y *pax8*; (III) *pax3* y *pax7* y (IV) *pax4* y *pax6*, agrupados según la presencia o ausencia de un dominio de unión al DNA adicional (HD), un dominio octapéptido que es responsable de las interacciones proteína-proteína y puede unir al DNA, y un dominio de transactivación/inhibición en la zona carboxi-terminal de la proteína (Dörfler y Busslinger, 1996; Goode y Elgar, 2009; Lun y Brand, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998; Wehr y Gruss, 1996). En el sistema nervioso se encuentran frecuentemente en regiones de diferenciación neuronal, lo que sugiere que algunas proteínas Pax son morforreguladores del desarrollo cerebral (Macdonald *et al.*, 1994; Puelles y Rubenstein, 1993; Stoykova y Gruss, 1994).

Se ha comprobado que Pax2 y Pax6 son factores de transcripción cruciales para la formación del ojo (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996). Sin embargo,

mientras *pax6* se restringe a regiones del ojo procedentes de la vesícula óptica distal y de la placoda del cristalino, *pax2* se expresa inicialmente en la zona ventral de la vesícula óptica, y más tarde queda confinado a regiones más proximales destinadas a originar el NO y el QO (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996).

Por tanto, durante el desarrollo del NO todas las células del tallo óptico expresan el factor de transcripción *pax2* y, algunas de estas células se introducen en la retina, rodeando la fisura coroidea donde persisten durante los últimos periodos de la embriogénesis formando un anillo alrededor de los axones de las células ganglionares. Estas células separan los axones del neuroepitelio retinal (Otteson *et al.*, 1998) y el futuro espacio subretinal (Rhodes, 1982). Cuando la fisura se cierra en torno a los axones que han salido hacia el tallo óptico, las células Pax2⁺ continúan bordeando la vía que siguen los axones ópticos al salir de la retina (Dressler *et al.*, 1990; Krauss *et al.*, 1991; Macdonald *et al.*, 1997; Nornes *et al.*, 1990; Pfeffer *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que Pax2 es fundamental para la correcta formación del NO y del ojo. La expresión de *pax2* se necesita para el cierre de la fisura coroidea y la correcta diferenciación de las células gliales del NO. Además, está involucrado en la formación del QO, concretamente en las proyecciones contralaterales (Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996). En humanos, mutaciones en *PAX2* producen severos problemas visuales y coloboma, dado que la fisura coroidea no llega a cerrarse (Chu *et al.*, 2001; Sanyanusin *et al.*, 1995). En pez cebra, se han descrito dos genes *pax2*: *pax2a* y *pax2b*, resultado de un fenómeno de duplicación génica. Ambos co-ortólogos participan en la formación del NO, sin embargo, *pax2b* se empieza a expresar más tarde en el desarrollo (Goode y Elgar, 2009; Pfeffer *et al.*, 1998).

En vertebrados adultos la expresión de Pax2 persiste y queda restringida a los astrocitos de la retina, la glía peripapilar y el NO, pero existen diferencias sustanciales entre los distintos grupos de vertebrados (Stanke *et al.*, 2010). En teleósteos, Pax2 se conserva en una población de astroglía perteneciente a los astrocitos reticulares y a la glía limitante del NO y la CNO (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009). En pollo, Pax2 está presente en la glía de la CNO y glía peripapilar así como en las células de Müller de la retina central (Stanke *et al.*, 2010). En ratón, tanto los astrocitos de la CNO como los de la CFNO son positivos a Pax2 (Stanke *et al.*, 2010), aunque en el NO de rata se asegura que los niveles de expresión de Pax2 decrecen en animales adultos (Mi y

Barres, 1999). En cobaya, Pax2 queda restringido a la glía de la CNO y en macaco se ha descrito su presencia en la CFNO (Stanke *et al.*, 2010). Finalmente, en humanos, también persiste la síntesis de Pax2 en una población astrocitaria que se restringe a la región que rodea la CNO (Chu *et al.*, 2001).

PAX6

En vertebrados, *pax6* se expresa a lo largo del desarrollo y en estadios adultos, en diversas áreas del SNC (Callaerts *et al.*, 1997). La expresión de *pax6* comienza en fases tempranas de la neurulación manteniéndose, al principio de la morfogénesis del ojo, en el tallo óptico, la vesícula óptica, la placoda del cristalino y el futuro epitelio de la córnea (Del Rio-Tsonis *et al.*, 1995; Hirsch y Harris, 1997; Krauss *et al.*, 1991; Nishina *et al.*, 1999; Nornes *et al.*, 1998; Puschel *et al.*, 1992; Walther y Gruss, 1991). Pax6 desaparece pronto en el tallo óptico (Baumer *et al.*, 2003; Krauss *et al.*, 1991; Puschel *et al.*, 1992; Walther y Gruss, 1991) y, en el cristalino, aumenta al principio de la diferenciación y desaparece después, permaneciendo sólo en el epitelio anterior (Del Rio-Tsonis *et al.*, 1995; Hirsch y Harris, 1997; Strickler *et al.*, 2001). En la copa óptica, a medida que avanza la diferenciación, se pierde la expresión de *pax6* en las células del EP y de la CNE (Hirsch y Harris, 1997; Walther y Gruss, 1991).

El gen *pax6* es uno de los genes fundamentales para el desarrollo del ojo. Para la formación de la vesícula óptica no es indispensable, ya que su inactivación no afecta a la expresión de otros genes que participan en el desarrollo de la misma. Sin embargo, para la formación del cristalino, Pax6 es imprescindible (Ashery-Padan *et al.*, 2000; Ashery-Padan y Gruss, 2001). Por otro lado, la interacción antagonista de Pax6 con Pax2 ayuda a mantener la identidad de la retina neural y del tallo óptico respectivamente (Macdonald y Wilson, 1996; Schwarz *et al.*, 2000). Las células del EP, sin embargo, requieren la acción redundante de ambos genes para determinar su función (Baumer *et al.*, 2003). En el neuroepitelio de la copa óptica, Pax6 no es necesario para mantener la identidad de los retinoblastos, aunque sí parece afectar a su proliferación y es indispensable para mantener su multipotencialidad (Marquardt *et al.*, 2001). Se ha demostrado que Pax6 es un activador transcripcional directo de varios genes responsables de la determinación de distintos tipos celulares retinianos. Mutaciones del gen en humanos causa cataratas congénitas, aniridia y anomalía de Peter (Ton *et al.*, 1991).

En la retina madura, *pax6* se expresa en la CCG y el estrato vitreal de la CNi en todas las especies analizadas (Belecky-Adams *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 1999; Hirsch y Harris, 1997; Hitchcock *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1999; Krauss *et al.*, 1991; Martín *et al.*, 1992; Puschel *et al.*, 1992; Strickler *et al.*, 2001; Ziman *et al.*, 2001).

Mediante el estudio de mutantes, se ha comprobado que deficiencias en la expresión de Shh afectan a los dominios de expresión de *pax2* y *pax6*, aumentando el de *pax6* y disminuyendo el de *pax2* (Krauss *et al.*, 1993). Por otro lado, la sobreexpresión de *shh* produce la expresión ectópica de *pax2* y la pérdida complementaria de la expresión de *pax6* (Macdonald *et al.*, 1995). De esta forma, parece que *shh* es responsable de la regulación de *pax2*, que a su vez, reprime la expresión de *pax6*, permitiendo que el primordio óptico se diferencie como tejido del tallo óptico, y no como EP o retina neural. Los mutantes para *pax2*, presentan una expresión anómala de *shh* (Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996), sugiriendo que mientras *shh* puede promover la expresión de *pax2*, la actividad de *pax2* puede limitar la expresión de *shh* (Ekker *et al.*, 1995; Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996).

3.2 RETINOGENÉISIS

La diferenciación celular de la retina neural presenta dos características conservadas en todos los vertebrados: 1) la génesis de los distintos tipos celulares es un proceso ordenado cronológicamente y, 2) comienza desde posiciones centrales y progresa hacia la periferia (Saito, 1999).

En mamíferos se distinguen dos períodos de diferenciación en la retina. Durante la primera fase de la neurogénesis las células que aparecen en primer lugar son las células ganglionares, los conos, las células horizontales y una subpoblación de las células amacrinas. En segundo lugar aparecen otra subpoblación de células amacrinas, los bastones, las células bipolares y las células de Müller (La Vail *et al.*, 1991; Levine y Green, 2004; Marquardt, 2003; Rapaport *et al.*, 1996; Young, 1985). Algunos autores, sin embargo, afirman que las células de Müller surgen temprano en el desarrollo (Peterson *et al.*, 2001; Willbold y Layer, 1998) (Fig. 19). En los vertebrados anamniotas no es tan fácil establecer esa secuencia de aparición de los distintos tipos celulares de la retina porque la retinogénesis es muy rápida y la formación de unas células y otras se va superponiendo cronológicamente (Marquardt, 2003; Saito, 1999). En cualquier caso, las

primeras neuronas que se diferencian son las células ganglionares (Hagedorn y Fernald, 1992; Holt *et al.*, 1988; Schmitt y Dowling, 1999; Sharma y Ungar, 1980).

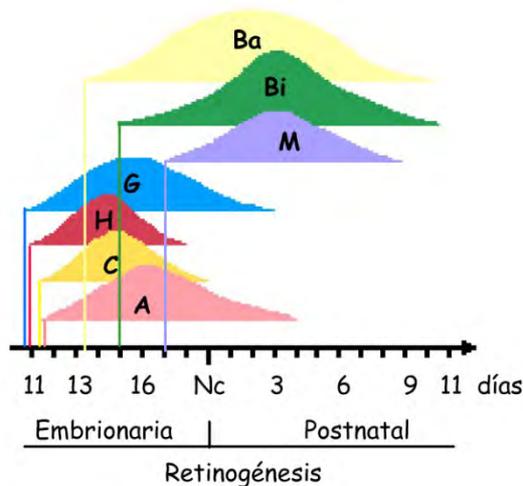


Figura 19: Esquema que representa la retinogénesis en ratón. A: células amacrinias; Ba: bastones; Bi: células bipolares; C: conos; G: células ganglionares; H: células horizontales; M: células de Müller. Modificado de Marquardt y Gruss, 2002.

Por otro lado, la diferenciación de la retina se origina desde el centro y progresa hacia la periferia de forma concéntrica (Grun, 1975; Holt *et al.*, 1988; La Vail *et al.*, 1991; Prada *et al.*, 1991; Rapaport *et al.*, 2004; Young, 1985). En pez cebra, se ha observado que el punto de inicio de la diferenciación no es exactamente central sino ventral y se encuentra próximo y en posición nasal al tallo óptico; de esta forma, el avance de la diferenciación es asimétrico (de ventro-nasal a nasal, después dorsal y, finalmente temporal) debido a la barrera que constituyen el tallo óptico y la fisura coroidea (Hu y Easter, 1999; Schmitt y Dowling, 1999).

3.3 FORMACIÓN DE LA CNO

FORMACIÓN

Cuando los primeros axones de las células ganglionares salen del ojo, la retina está todavía conectada al cerebro anterior por el tallo óptico, estructura que presenta características neuroepiteliales y que constituye el sustrato para que los axones se extiendan desde el ojo hacia el diencéfalo. La ruta de salida de los conos de crecimiento se mantiene por la fisura coroidea, que permite su acceso desde la CNO hacia el tallo óptico. Más tarde, cuando la fisura coroidea se cierra los axones en crecimiento pasan a formar parte de una estructura circular denominada disco óptico (DO). A la vez que estos axones avanzan, células epiteliales del tallo óptico se diferencian a las primeras células gliales, que se localizan delimitando la fisura y se encuentran directamente

involucradas en su cierre (Macdonald *et al.*, 1995). Cuando la fisura se está cerrando, estas células se retienen alrededor del DO, y se extienden hacia la CNO, contribuyendo a la guía de axones hacia el NO (Stuermer y Bastmeyer, 2000). Durante el periodo de salida de los axones desde la retina, el tallo óptico se reemplaza gradualmente por el NO, y las células epiteliales del tallo óptico o mueren o se diferencian a células gliales del NO maduro.

Como se ha descrito en el apartado anterior, las primeras células ganglionares diferenciadas aparecen cuando se va a completar el cierre de la fisura coroidea y se localizan en la región central de la retina próxima a la CNO recién formada. Estos axones pioneros no tienen axones previos que actúen como guía. Por otro lado, las células que se originen más tarde se irán añadiendo hacia la periferia, de manera que los axones tienen que encontrar su camino hacia el NO en diferentes momentos durante el desarrollo y, cada vez, deben recorrer distancias mayores desde su sitio de origen (Fig. 20) (Oster *et al.*, 2004; Stuermer y Bastmeyer, 2000). Todos los axones de las células ganglionares proyectan hacia la parte vitreal de la capa de neuroepitelio, donde contactan con los pies de las células neuroepiteliales y, posteriormente con los pies de las células de Müller que se van diferenciando durante la retinogénesis (Fig. 20) (Stuermer y Bastmeyer, 2000). Hay dos teorías que tratan de explicar la correcta llegada de los axones a la CNO: 1) los axones discurren al azar por la parte vitreal de la retina y sólo algunos consiguen encontrar el camino de salida hacia el NO (Craig y Banker, 1994; Higgins *et al.*, 1997); y 2) los axones recorren trayectorias específicamente dirigidas hacia la CNO (Fig. 20) (Birgbauer *et al.*, 2000; Mason y Sretavan, 1997), mediante mecanismos de guía axonal. Esta última teoría es la más aceptada dado que se van descubriendo cada vez más moléculas que parecen estar implicadas en este proceso (Apdo. siguiente: Regulación).

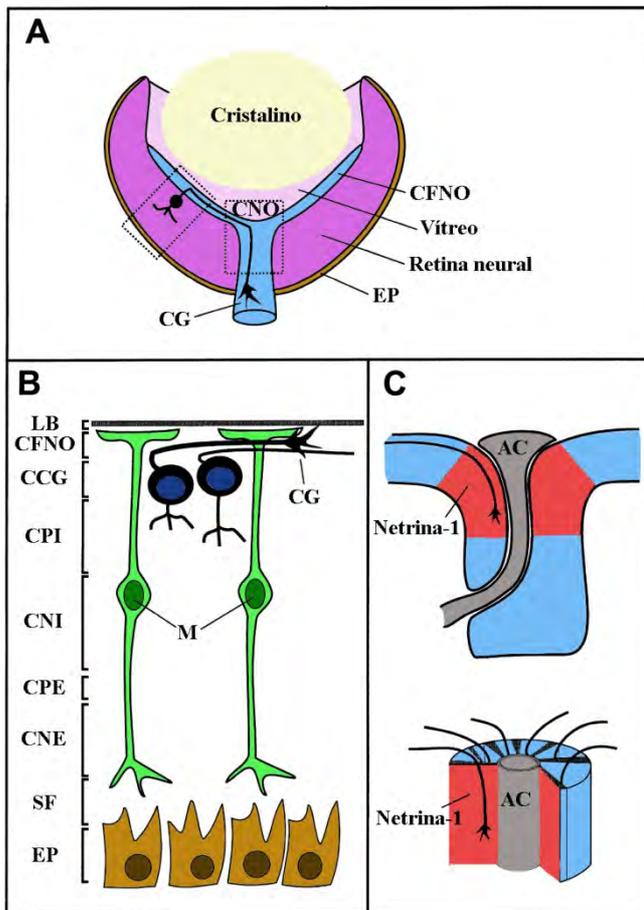


Figura 20: Esquema que muestra la salida de la retina hacia la CNO de los axones de las células ganglionares en crecimiento. **A:** Esquema general del ojo. **B:** Detalle de la retina mostrando que los axones recién formados discurren por la parte más vitreal de la CFNO en contacto con los pies de las células de Müller. **C:** Detalle de la CNO, en rojo se indica la zona de localización de Netrina-1. AC: arteria central; CCG: capa de las células ganglionares; CFNO: capa de las fibras del nervio óptico; CG: célula ganglionar; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CNO: cabeza del nervio óptico; CPE=capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; EP: epitelio pigmentario; LB: lámina basal; M: célula de Müller; NO: nervio óptico; SP: segmentos de los fotorreceptores. Modificado de Stuermer y Bastmeyer, 2000.

REGULACIÓN

El proceso de guía de los axones jóvenes comienza en el momento que la célula ganglionar termina su diferenciación y empieza a emitir su axón. En pollo, el crecimiento del axón ocurre perpendicular al eje de mitosis de la célula (Prada *et al.*, 1981). Se ha observado que en *Xenopus* y en pollo las cadherinas (familia de proteínas de adhesión dependientes de calcio) pueden estar implicadas en este proceso (Hatta y Takeichi, 1986; Matsunaga *et al.*, 1988; Riehl *et al.*, 1996). El ordenamiento de filamentos de actina, microtúbulos y orgánulos celulares como centrosomas y aparato de Golgi, también parecen jugar un papel importante en determinar la dirección inicial en el crecimiento axonal (Lefcort y Bentley, 1989).

Una vez que el cono de crecimiento emerge del cuerpo de la célula ganglionar parental, este tiene que orientarse en la dirección correcta hacia la CNO. Se ha descrito la existencia de un anillo de proteoglicanos tipo condroitín sulfato (CSPGs) que forman parte de la matriz extracelular (Brittis *et al.*, 1992) e inhiben el crecimiento axonal *in vitro* (Snow y Letourneau, 1992). Dicho anillo impide que los axones crezcan hacia la

periferia y favorece que se dirijan hacia la parte central de la retina. Por otro lado, se ha descubierto que la familia de proteínas de guía axonal Slit juega un papel crítico en el desarrollo del sistema visual. En la retina, en concreto, Slit 1 y 3 aparecen en la futura CFNO, así como su receptor ROBO 1 (Yuan *et al.*, 1999); y en la CNO se expresa Slit 2 (Holmes *et al.*, 1998). Sin embargo, mientras que en el QO funcionan como moléculas inhibitoras del cono de crecimiento axonal (Erskine *et al.*, 2000; Fricke *et al.*, 2001; Hutson y Chien, 2002; Karlstrom *et al.*, 1996; Plump *et al.*, 2002), en la retina tienen un papel de atracción dirigiendo a los axones hacia la retina central (Jin *et al.*, 2003).

Aunque todavía no está bien demostrado, se cree que la interacción de los axones en crecimiento con aquellos que ya han alcanzado la CNO facilita su correcta llegada al formar pequeños fascículos (Oster *et al.*, 2004). Estos fascículos son particularmente evidentes en teleósteos, donde estudios de adición de nuevos axones se pueden realizar en animales adultos (Ott *et al.*, 1998). Una proteína que está implicada en la fasciculación de los axones es L1 en roedores (Brittis *et al.*, 1995) y neurolina en teleósteos (Leppert *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 1998), ambas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se han encontrado otras funciones de L1 y neurolina en la guía axonal, como son la interacción con otros receptores de integrinas o modular la respuesta de otras moléculas de guía axonal, sin embargo todavía no se ha demostrado su presencia en la retina (Oster *et al.*, 2004; Stuermer y Bastmeyer, 2000).

La familia de las efrinas y sus receptores tirosina kinasa Eph parecen estar también implicados en asegurar la correcta llegada de los axones en crecimiento a la CNO. Los receptores EphB se sitúan en la retina en gradiente descendente de ventral a dorsal y, las Efrinas-B están presentes en un patrón inverso, con una elevada expresión en la retina dorsal y baja en la ventral (Fig. 21). Las Efrinas-A y sus receptores EphA siguen unos gradientes de expresión similares pero en dirección temporonasal (Oster *et al.*, 2004; Stuermer y Bastmeyer, 2000). Se ha demostrado que las EphB tienen un papel inhibitorio, impidiendo que los axones crezcan hacia el lado opuesto de la retina (Birgbauer *et al.*, 2000; Birgbauer *et al.*, 2001).

Además, se ha comprobado que las células de Müller juegan un papel fundamental en el proceso de guía de los axones en dirección a la CNO (Stuermer y Bastmeyer, 2000). El soma de las células de Müller presenta propiedades inhibitoras de los axones de las células ganglionares pero no de sus dendritas. Sus pies gliales sin

embargo, promueven el crecimiento axonal (Fig. 20B) (Bauch *et al.*, 1998; Steinbach y Schlosshauer, 2000; Stier y Schlosshauer, 1995). Los pies de las células de Müller forman una capa continua en la superficie vitreal de la retina en desarrollo (Holt, 1989), pero parece que dejan espacios a través de los cuales los conos de crecimiento tienen acceso a la lámina basal y a numerosas moléculas de la matriz extracelular que también intervienen en el avance de los mismos hacia la CNO (Easter *et al.*, 1984; Ledig *et al.*, 1999; Stuermer y Bastmeyer, 2000).

Una vez que los axones de las células ganglionares llegan a la CNO deben entrar por la misma y dirigirse hacia el NO. Una de las moléculas implicadas en este proceso es la Netrina-1. La Netrina-1 es una proteína difusible, perteneciente al grupo de las lamininas, que es secretada por las células neuroepiteliales que rodean la fisura coroidea y se extienden hacia la CNO (Figs. 20C-D; 21) (de la Torre *et al.*, 1997; Deiner *et al.*, 1997; Lauderdale *et al.*, 1997; Strahle *et al.*, 1997). Por otro lado, los axones en crecimiento de las células ganglionares presentan el receptor de Netrina-1 denominado DCC (Deiner *et al.*, 1997). En ratón, mutaciones en la Netrina-1 o el receptor DCC, supone la imposibilidad de entrada en la CNO de multitud de axones procedentes de toda la retina (Deiner *et al.*, 1997). La Netrina-1 ejerce un efecto de atracción sobre los axones, pero una vez dentro de la CNO la respuesta cambia a inhibitoria. Este cambio de efecto de atracción a repulsión todavía no se comprende muy bien. Por un lado, en *Xenopus* parece que la interacción con la laminina produce dicho cambio (Hopker *et al.*, 1999). Por otro lado, el cambio de receptores DCC a Unc5H por las neuronas puede originar una modificación de comportamiento (de Castro, 2003; Kennedy, 2000);, pero la coexpresión de estos receptores en las células ganglionares todavía no se ha demostrado.

Otra molécula que colabora en la guía axonal, asegurando que los axones en crecimiento permanezcan fasciculados y entren en el NO, es la Semaforina 5A, una molécula transmembrana de la familia de las moléculas de guía axonal semaforinas. La Semaforina 5A se sitúa rodeando los axones de las células ganglionares, formando un anillo en torno a la CNO que ejerce un efecto de repulsión sobre los mismos (Fig. 21) (Adams *et al.*, 1996; Oster *et al.*, 2004; Raper, 2000).

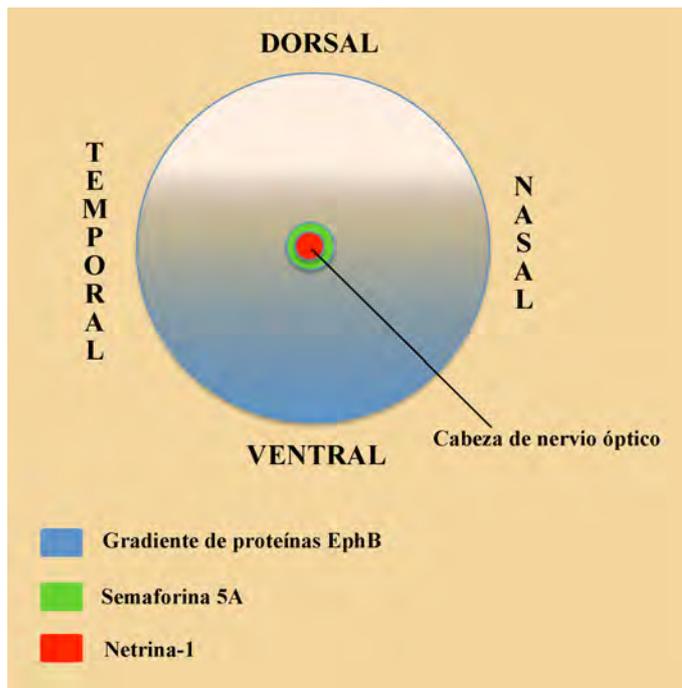


Figura 21: Esquema que representa la localización en la retina durante el desarrollo embrionario de las moléculas de guía axonal: EphB (azul), Semaforina 5A (verde) y Netrina-1 (rojo).

3.4 FORMACIÓN DEL QUIASMA ÓPTICO

FORMACIÓN

Otro fenómeno crucial durante el desarrollo del NO es la formación del QO, ya que se determina las fibras que decusan y las que permanecen ipsilaterales (Petros *et al.*, 2008). El crecimiento de los axones de las células ganglionares durante el establecimiento del QO se divide en tres fases: temprana, de pico y tardía (Fig. 22). En el ratón, las primeras células ganglionares (Fig. 22A), se originan en la fase temprana desde la retina dorso-central y entran en el diencefalo entre las edades embrionarias de E12-13,5, formando proyecciones contralaterales e ipsilaterales (Colello y Guillery, 1990; Godement *et al.*, 1987b; Marcus y Mason, 1995). Los axones ipsilaterales se extienden directamente al TR ipsilateral, pero son temporales y no se conoce su destino. Se consideran axones pioneros porque parece que marcan el sitio futuro donde se va a establecer el QO; y suponen un andamio para los axones que se formarán posteriormente, como se ha observado en pez cebra (Bak y Fraser, 2003). Se piensa que un grupo de neuronas positivas a Tuj1/CD44 y células de la glía radial de la línea media que se diferencian en el hipotálamo central, juegan un papel crucial posicionando y guiando el futuro quiasma. La inducción de ambos tipos de células requiere la actividad de Shh (Dale *et al.*, 1997; Ericson *et al.*, 1995; Mason y Sretavan, 1997; Trousse *et al.*, 2001).

La fase de pico (Fig. 22B), es la etapa de mayor formación de células ganglionares que, en ratón ocurre desde el estadio embrionario de E14 al E17. Los axones de la zona ventrotemporal llegan al QO, atraviesan una parte y vuelven sobre su recorrido dirigiéndose hacia la zona ipsilateral del TR. Los axones de las otras zonas atraviesan el QO y proyectan al TR contralateral (Guillery *et al.*, 1995). En la fase tardía (Fig. 22C), los axones que decusan se siguen formando desde la periferia de la retina, fenómeno que continúa hasta el nacimiento del animal. En esta fase la mayor parte de los axones de la zona ventrotemporal proyectan contralateralmente (Drager, 1985).

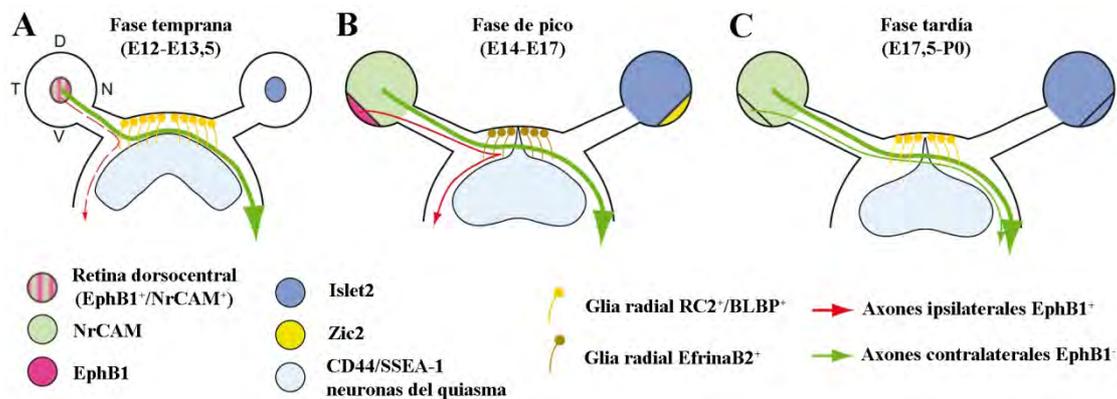


Figura 22: Esquema que muestra las fases de extensión de los axones retinianos durante la formación del quiasma óptico en ratón. Las moléculas de guía axonal se indican en la retina izquierda y los factores de transcripción aparecen en la retina derecha. **A:** Fase temprana (E12-13,5), **B:** fase de pico (E14-17) y, **C:** fase tardía (E17,5-P0). D: dorsal; N: nasal; T: temporal; V: ventral. Modificado de Petros *et al.*, 2008.

Tanto los axones contralaterales como los ipsilaterales, pasan por una empalizada de glía radial situada en el tercer ventrículo que emite sus prolongaciones hacia el QO (Marcus y Mason, 1995). Estas células de la glía radial expresan los marcadores gliales RC2 y BLBP, pero no GFAP, durante el desarrollo. Por otro lado, hay una población de neuronas que se desarrolla a partir de la zona caudal del QO y se extiende hacia la línea media, que expresan epítomos como SSEA-1 (Capela y Temple, 2002) y CD44 (Marcus y Mason, 1995; Sretavan *et al.*, 1994). La interacción de los axones con estas células de la glía radial y neuronas de la línea media parece ser importante para determinar la decusación o no en el QO (Fig. 23) (Petros *et al.*, 2008).

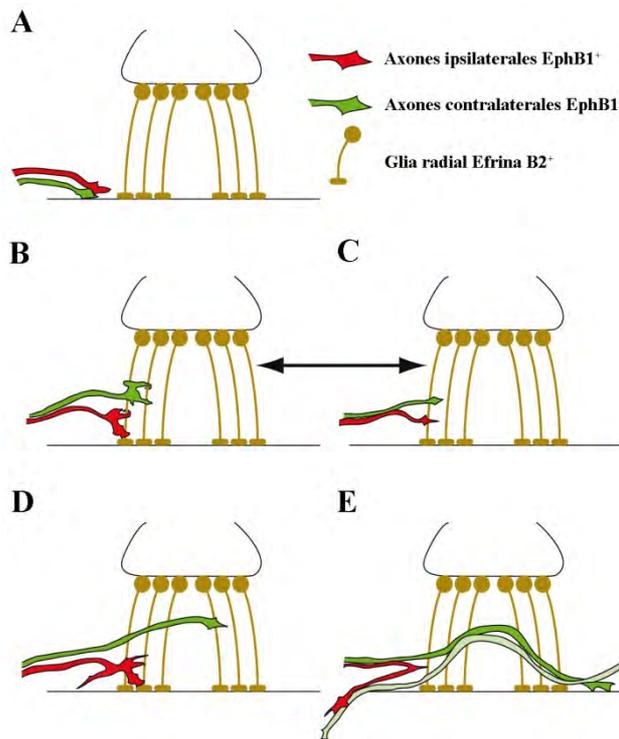


Figura 23: Descripción del comportamiento de los conos de crecimiento retinianos durante la fase de pico. **A:** Axones ipsilaterales y contralaterales se aproximan al quiasma. **B:** Ambos interactúan con procesos de la glía radial. **C:** Los dos tipos de axones experimentan procesos de avance y retracción. **D:** Los axones ipsilaterales se despliegan y emiten ramificaciones en diferentes direcciones. Los axones contralaterales atraviesan la línea media. **E:** Los axones ipsilaterales reorientan sus filopodios y avanzan hacia el tracto ipsilateral con ayuda de los axones contralaterales (verde claro). Los axones contralaterales se dirigen hacia el tracto contralateral. Modificado de Petros *et al.*, 2008.

REGULACIÓN

Hay numerosos estudios que tratan de desentrañar los mecanismos de señalización responsables de la formación del quiasma óptico (Petros *et al.*, 2008). Se ha visto que las efrinas y sus receptores Eph median la correcta formación de las proyecciones ipsilaterales (Figs 22-23). Así, la EfrinaB2 se expresa por las células de la glía radial del QO especialmente durante la fase de pico, y su receptor EphB1 aparece principalmente en los axones ventrotemporales durante esta misma fase, produciendo un efecto inhibitor en los mismos (Williams *et al.*, 2003).

Por otro lado, una molécula que parece estar implicada en la correcta decusación de los axones de las células ganglionares es la NrCAM, de la superfamilia de las inmunoglobulinas que actúan como moléculas de adhesión celular (CAM) (Fig. 22). La NrCAM (CAM neuronal) se expresa en el QO (Lustig *et al.*, 2001) y en la retina, salvo en la parte ventrotemporal cuando se producen la mayor parte de las proyecciones ipsilaterales (Williams *et al.*, 2006). Otras proteínas de la familia CAM, como L1, neurofascina y TAG-1, se expresan en la retina siguiendo un patrón similar a la NrCAM y, probablemente estén también asegurando el correcto cruce de los axones en el QO (Williams *et al.*, 2006). Las semaforinas son proteínas secretadas o de membrana que también están implicadas en mecanismos de guía axonal, y parece que también pueden

jugar un papel importante en la formación de las proyecciones cruzadas tanto en ratón como en pez cebra (Bechara *et al.*, 2007; Callander *et al.*, 2007; Oster *et al.*, 2003; Sakai y Halloran, 2006).

También se ha tratado de dilucidar qué elementos regulan la expresión de las Efrinas/Eph y las CAMs. Parece que el factor de transcripción Zic2 (perteneciente a la familia de proteínas con dedos de zinc), que se expresa en la retina ventrotemporal durante la formación de proyecciones ipsilaterales, está regulando al receptor EphB1 (Fig. 22) (García-Frigola *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2003). Por otro lado, el factor de transcripción Islet2 (Fig. 22) (factor de transcripción con homeodominio LIM) se expresa en la retina, salvo en la zona ventro-temporal cuando se producen las proyecciones ipsilaterales (Fig. 22) (Pak *et al.*, 2004) y, se piensa que, o bien regula a NrCAM o bien suprime a Zic2 o EphB1 (Petros *et al.*, 2008).

Una vez que los axones se dirigen hacia el TR se reorganizan nuevamente. Parece ser que la presencia de los axones contralaterales ayuda a los ipsilaterales a proyectar correctamente (Fig. 23E) (Chan *et al.*, 1999; Godement *et al.*, 1987a). Por otro lado, parece que proteoglicanos como el condroitín sulfato (CSPGs) y el heparán sulfato (HSPGs) (Grumet *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004) juegan un papel mediando la reorganización axonal.

En mamíferos, la neurogénesis se limita al periodo de desarrollo embrionario en el útero, sin embargo en otros grupos de vertebrados como peces y anfibios, nuevas células ganglionares son añadidas constantemente dado que sus ojos crecen durante la vida adulta. Así pues, en peces y anfibios, el problema de la guía axonal hacia la CNO, QO y las distintas dianas del encéfalo, debe ser resuelto durante toda la vida del animal.

3.5 ORIGEN DE LAS CÉLULAS MACROGLIALES

ORIGEN DE LOS ASTROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO

Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), las células gliales y las neuronas se forman a partir de precursores neurales multipotentes cuyo potencial de diferenciación se va haciendo progresivamente más restringido (Chan-Ling *et al.*, 2009).

Los astrocitos del NO (astrocitos tipo-1) proceden de células precursoras de astrocitos (APCs) (Fig. 24). Durante el desarrollo están presentes en el NO mucho antes de la llegada por migración de los precursores de oligodendrocitos (OPCs). Estas APCs se han caracterizado en estudios en rata *in vitro* como Pax2⁺/vimentina⁺/GFAP⁻/S100⁻ (Mi y Barres, 1999). Pax2, es un factor de transcripción fundamental en la diferenciación de las APCs a astrocitos, ya que en ausencia del mismo las APCs *in vitro* originan neuronas (Soukkaieh *et al.*, 2007); y en mutantes de ratón y pez cebra carentes del gen no consiguen diferenciarse correctamente (Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996) (Apdo. 3.1: Formación del Sistema Visual. Regulación. Pax2). Cuando estos astrocitos alcanzan la madurez, en mamíferos adultos, acaban siendo GFAP⁺/S100⁺ perdiendo la expresión de Pax2 con la edad (Mi y Barres, 1999). En peces adultos, se caracterizan por ser citoqueratina⁺/ZO1⁺, conservando una subpoblación de astrocitos la expresión de Pax2 durante toda la vida del animal (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009). Además de Pax2, otros factores que parecen estar implicados en el desarrollo de los astrocitos del NO son BMP7 (proteína morfogénica de hueso, perteneciente a la subfamilia de factores de señalización TGFβ) que controla la formación de la fisura coroidea influyendo en la proliferación y apoptosis de los progenitores Pax2⁺ del DO (Morcillo *et al.*, 2006), Shh y Fgf8 (proteína de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos) que inducen la proliferación de las células Pax2⁺ tanto del DO como del resto del NO (Dakubo *et al.*, 2003; Dakubo *et al.*, 2008; Seth *et al.*, 2006; Soukkaieh *et al.*, 2007) y Vax1 (factor de transcripción, con homeodominio HD) que también participa en el cierre de la fisura coroidea favoreciendo las interacciones entre los astrocitos del NO y, por tanto, la fasciculación (Bertuzzi *et al.*, 1999) (Figura24).

En 1985, Miller *et al.* encontraron que, los astrocitos tipo-1 aparecen por primera vez en el NO de rata en el estadio embrionario de E16, mientras que los oligodendrocitos aparecen en la etapa postnatal P0 y una segunda clase de astrocitos, llamados astrocitos tipo-2, se detectan a partir de los periodos postnatales P8-10. Además, observaron que los oligodendrocitos y los astrocitos tipo-2 proceden de un precursor común y, por ello a las OPCs se les denomina también O-2A (Fig. 24) (Miller *et al.*, 1985). Sin embargo, otros autores defienden que los astrocitos tipo-2 sólo aparecen en cultivo pero no existen *in vivo* (Fulton *et al.*, 1992).

Por otro lado, parece haber una íntima relación temporal y espacial entre las células endoteliales y los astrocitos en diferenciación. Así, *in vitro* se ha demostrado que células endoteliales purificadas expresan elementos que inducen la diferenciación de los astrocitos (Mi *et al.*, 2001).

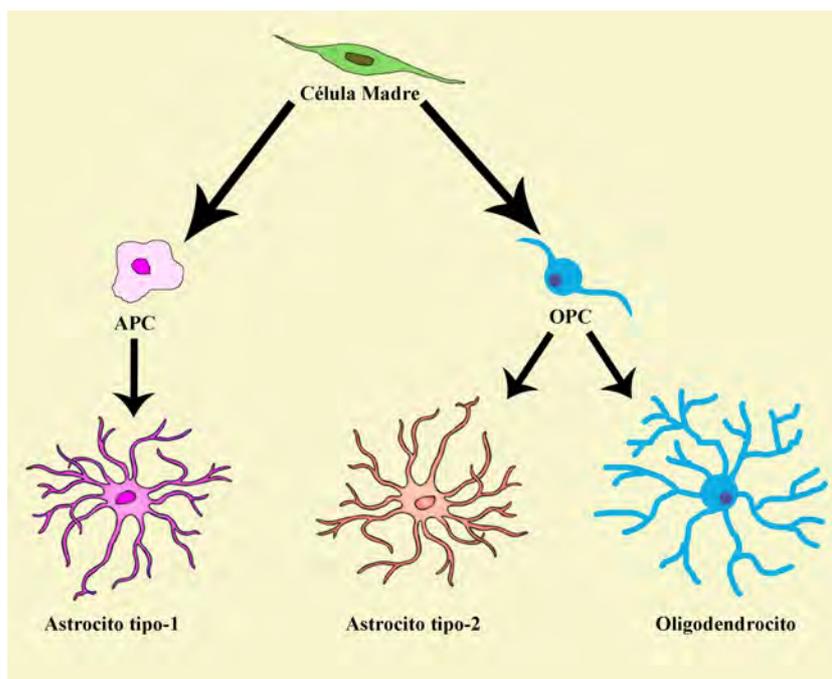


Figura 24: Esquema que representa el linaje de astrocitos tipo-1 y oligodendrocitos y astrocitos tipo-2.

En la retina, los astrocitos sólo se encuentran en aquellas especies cuya retina es vascularizada, o que presentan una red de vasos sanguíneos por toda la superficie vitreal de la misma como ocurre en teleósteos. Durante el desarrollo embrionario, los APCs migran a la retina desde el NO (Fig. 25) (Ling y Stone, 1988; Schnitzer, 1988; Stone y Dreher, 1987; Watanabe y Raff, 1988). En rata los astrocitos en migración, con aspecto de células bipolares, se detectan próximos a la CNO durante el estadio embrionario de E18 (Ling *et al.*, 1989). Sin embargo, los progenitores de oligodendrocitos y astrocitos

tipo-2 (O-2A) no penetran en la retina debido a la lámina cribosa de la CNO (Ffrench-Constant *et al.*, 1988; Morcos y Chan-Ling, 2000). En este proceso de migración parece que está implicada la Semaforina 3a, que funciona como un quimiorepelente de las APCs desde el QO haciendo que avancen hacia la retina (Fig. 25) (Sugimoto *et al.*, 2001; Tsai y Miller, 2002). Estudios recientes, han identificado una zona de generación temporal de astrocitos temporal restringida a un anillo que rodea la CNO muy próximo a la superficie ventricular. Esta nueva fuente de astrocitos aparece entre los estadios embrionarios E12-13,5 de rata (Chan-Ling *et al.*, 2009), y también ha sido identificada en humanos (Chu *et al.*, 2001).

Tanto en la retina de rata como en la de humano, se han identificado tres estadios de diferenciación en los astrocitos: células Pax2⁺/vimentina⁺/GFAP⁻ consideradas como APCs, células Pax2⁺/vimentina⁺/GFAP⁺ denominados astrocitos inmaduros perinatales y, células Pax2⁺/vimentina⁻/GFAP⁺ definiendo a los astrocitos maduros perinatales (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001).

Además, se ha encontrado que la extensión de las APCs por la retina y su posterior diferenciación está fuertemente ligada a la formación de la vasculatura en mamíferos, y la fovea en primates (Chan-Ling *et al.*, 2004; Kozulin *et al.*, 2009; Mi *et al.*, 2001).

ORIGEN DE LOS OLIGODENDROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO

Los oligodendrocitos del NO proceden de OPCs originados en el área preóptica, bajo la influencia de Shh y migran por el NO hacia la retina (Fig. 25) (Gao y Miller, 2006; Ono *et al.*, 1997). Tanto la migración de APCs como de OPCs a lo largo del NO no es el resultado de un movimiento al azar, sino que está dirigido, por señales quimio-atrayentes y/o quimio-repelentes (Sugimoto *et al.*, 2001). Se ha observado que la Netrina-1 se expresa tanto en el QO como en la CNO. La Netrina-1 funciona inicialmente como quimio-atrayente y posteriormente como quimio-repelente para los OPCs, de manera que es responsable de su avance desde el QO hacia la retina (Bribián y de Castro, 2007; Sugimoto *et al.*, 2001). Otros gradientes de moléculas secretadas, como Semaforinas, FGF-2 y Shh cooperan para dirigir la migración de los OPCs a lo largo del NO (Bribián *et al.*, 2006; Bribián y de Castro, 2007; Merchán *et al.*, 2007; Spassky *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2001).

En muchas especies de mamíferos los OPCs, a diferencia de los APCs, paran su proceso de migración al llegar a la lámina cribosa que se encuentra en la CNO (Ffrench-Constant *et al.*, 1988; Perry y Lund, 1990; Tsai y Miller, 2002). Todavía no se conocen cuáles son las señales de parada, pero parecen estar implicadas moléculas quimio-atrayentes y/o repelentes como la Netrina-1, moléculas de la matriz extracelular o quimiocinas (Deiner *et al.*, 1997; Kiernan *et al.*, 1996; Tsai y Miller, 2002), mientras que las moléculas BMPs parecen impedir la diferenciación de los oligodendrocitos en la CNO y la retina (Gao *et al.*, 2006).

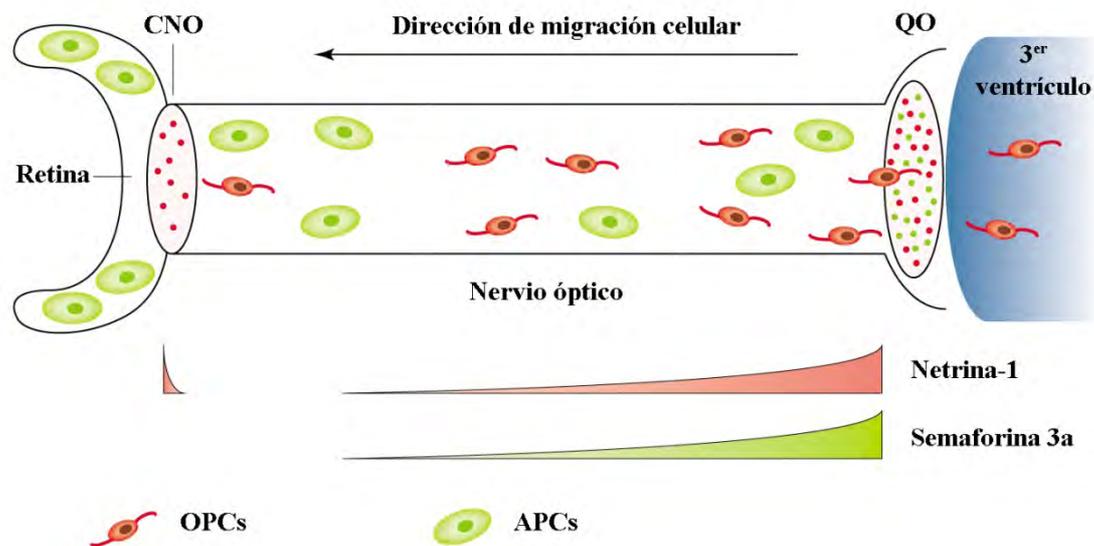


Figura 25: Esquema que representa la migración de los precursores gliales: APCs y OPCs a lo largo del NO de rata. APCs y OPCs son guiados por gradientes difusibles de Semaforina 3a y Netrina-1 respectivamente, originados en la región del quiasma óptico (QO). La migración de los OPCs es inhibida en la cabeza de nervio óptico (CNO) en parte por la expresión local de Netrina-1. La migración de los APCs atraviesa la CNO y llegan a la retina. Modificado de Tsai y Miller, 2002.

Finalmente, los oligodendrocitos maduran y se encargan de la mielinización de los axones de las células ganglionares del NO, dejando la retina y CNO amielínica (Sun *et al.*, 2009). Sin embargo, existen numerosas excepciones donde los oligodendrocitos atraviesan la CNO y llegan a la retina donde aparecen fibras mielinizadas, como ocurre en teleosteos (Lillo *et al.*, 1998), en conejo (Morcos y Chan-Ling, 1997; Reichenbach *et al.*, 1988; Schnitzer, 1985), en reptiles (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000) y en aves (Cho *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 1993; Won *et al.*, 2000).

4. CRECIMIENTO CONTINUADO Y REGENERACIÓN

En el sistema nervioso de mamíferos, la neurogénesis finaliza prácticamente en la etapa de desarrollo. Cuando el animal ha alcanzado su estadio adulto, la formación de nuevas neuronas se restringe a cuatro regiones: el epitelio olfatorio (Calof *et al.*, 2002), la zona subependimal de los ventrículos laterales (que genera neuronas del bulbo olfatorio) (Álvarez-Buylla *et al.*, 2002; Taupin y Gage, 2002), el giro dentado del hipocampo (Gould *et al.*, 2000) y el margen de la retina y el cuerpo ciliar en el ojo (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008).

Sin embargo, el grado de neurogénesis en adultos es muy superior en los demás grupos de vertebrados, especialmente en anfibios y peces (Ekstrom *et al.*, 2001; Zupanc, 1999). En los teleósteos se han encontrado zonas de división celular activa en todas las regiones principales del SNC adulto: bulbo olfatorio, áreas telencefálicas, techo óptico, cerebelo, etc. Se localizan siempre en la zona ventricular o bien en regiones que corresponden a porciones ventriculares embrionarias como ocurre en el cerebelo (Ekstrom *et al.*, 2001; Zupanc, 1999).

La presencia de células mitóticamente activas en vertebrados anamniotas, es la base de la capacidad de su SNC para crecer a lo largo de toda la vida del animal y para regenerarse después de sufrir una lesión (Easter, 1983; Raymond y Hitchcock, 2000).

4.1 CRECIMIENTO CONTINUADO

La retina adulta de teleósteos crece de forma continua, durante toda la vida del animal, mediante dos procesos: adición de nuevas células y expansión del tejido maduro. De esta manera, desde la eclosión hasta los estadios adultos hay un incremento en el número total de neuronas retinianas y en el número de fibras de la CFNO (Johns y Easter, 1977; Kock, 1982; Lyall, 1956; Müller, 1952), además la densidad celular de todos los tipos celulares se reduce salvo la de los bastones (Ali, 1964; Johns y Easter, 1977; Kock, 1982; Lyall, 1956; Müller, 1952; Powers *et al.*, 1988).

Esta constante formación de neuronas en la retina se debe a un anillo de células neuroepiteliales dispuesto en el margen de la retina, que se denomina zona periférica

germinal (ZPG) (Johns y Easter, 1977; Meyer, 1978; Müller, 1952). Pero aun habiendo un incremento en el número de células, la causa principal en el aumento del volumen de la retina es la expansión del tejido maduro por el aumento en los procesos celulares, lo que lleva a una disminución en la densidad celular (Johns y Easter, 1977; Kock, 1982; Lyall, 1956; Macy y Easter, 1981). Las únicas células que no disminuyen en densidad son los bastones, dado que hay una formación continua de los mismos a partir de progenitores dispersos por la CNE y la CNI (Johns, 1982).

LA ZONA PERIFÉRICA GERMINAL

La ZPG fue identificada por Müller en 1952. Constituye un anillo de células madre que se sitúa en el margen de la retina y está presente, en cierto modo, en todos los grupos de vertebrados, pero se comporta de forma distinta en cada uno de ellos.

En teleósteos, se considera la ZPG como un remanente de retinoblastos acabada la embriogénesis. Las células proliferativas de la ZPG presentan una morfología neuroepitelial típica (Raymond y Rivlin, 1987) y se disponen en todo el margen de la retina (Johns y Easter, 1977; Müller, 1952). En su extremo central, la ZPG se continúa con la retina neural, mientras que, en su extremo periférico, se continúa con el estrato no pigmentado del epitelio ciliar (EC) (Fig. 26) (Olson *et al.*, 1999).

La ZPG además de autorenovarse, genera las células de Müller y todos los tipos neuronales de la retina, excepto los bastones (Fernald, 1990; Johns y Easter, 1977; Meyer, 1978; Müller, 1952; Olson *et al.*, 1999; Otteson y Hitchcock, 2003; Rusoff y Easter, 1980; Sharma y Ungar, 1980). La retina, por lo tanto, crece a partir de la ZPG por formación de anillos completos de nuevo tejido (Easter, 1992; Johns y Easter, 1977; Rusoff y Easter, 1980; Scholes, 1979). Las células postmitóticas procedentes de la ZPG permanecen en su sitio, mientras que la siguiente oleada de células que se generan se disponen en posiciones más periféricas (Easter, 1992; Rusoff y Easter, 1980; Scholes, 1979). Por lo tanto, entre la retina madura, con una laminación clara, y la ZPG existe una **zona de transición** (ZT) donde hay células en diferenciación (Fig. 26) (Lillo *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 1999). La diferenciación en la ZT sigue un orden similar al que ocurre durante la retinogénesis, de forma que la primera capa que se forma es la CCG (Olson *et al.*, 1999). De esta manera, las nuevas células ganglionares envían sus axones por la parte más vitreal de la CFNO y se van añadiendo al NO (Fig. 26) (Bunt, 1982;

Easter *et al.*, 1981; Easter *et al.*, 1984; Raymond y Hitchcock, 2000; Stuermer y Bastmeyer, 2000).

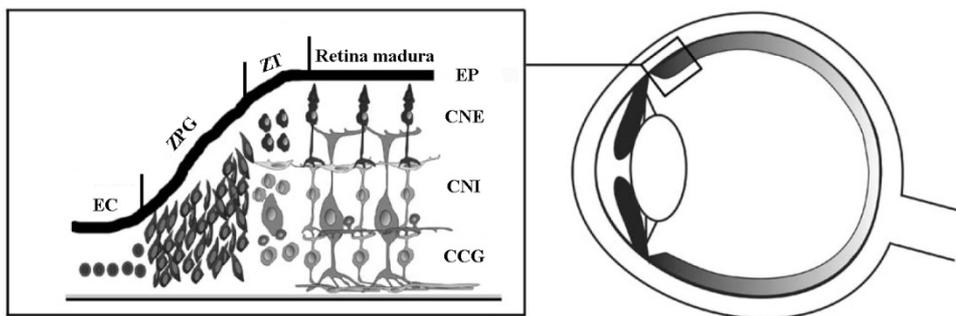


Figura 26: Esquema del margen de la retina en peces. El neuroepitelio de la ZPG se renueva y forma un anillo de neuronas que se añade sobre la retina preexistente. CCG: capa de las células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; EC: epitelio ciliar; EP: epitelio pigmentario; ZPG: zona periférica germinal; ZT: zona de transición. Modificado de Hitchcock *et al.*, 2004.

En anfibios, en estudios con renacuajos y posteriormente con ranas, se encontró que también hay un anillo de neuroepitelio en la periferia de la retina (Hollyfield, 1968; Reh y Constantine-Paton, 1983; Straznicky y Hiscock, 1984; Straznicky y Gaze, 1971). Este anillo se denomina **zona marginal ciliar (ZMC)** y es capaz de generar todos los elementos neuronales de la retina, además de las células de Müller y células del EP, que se añaden en anillos concéntricos a las regiones periféricas de la retina (Ohnuma *et al.*, 1999; Perron *et al.*, 1998; Wetts y Fraser, 1988; Wetts *et al.*, 1989).

En aves se ha demostrado que también se produce neurogénesis desde la ZMC, pero este fenómeno está prácticamente restringido a las primeras semanas después de la eclosión (Fischer y Reh, 2000; Morris *et al.*, 1976); sin embargo estudios posteriores parecen demostrar que puede persistir durante el periodo adulto (Kubota *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha comprobado que las células de la ZMC de aves tras la eclosión sólo pueden dar un limitado número de tipos celulares de la retina, y son incapaces de originar células ganglionares o fotorreceptores (Fischer *et al.*, 2002a; Hitchcock *et al.*, 2004).

Durante los últimos años se han realizado estudios que parecen indicar la posible existencia de neuroblastos en el margen de la retina de mamíferos. En marsupiales se ha identificado la ZMC, aunque en el mismo estudio no se pudo encontrar en ratones (Kubota *et al.*, 2002). En otros estudios se han podido aislar células del cuerpo ciliar de mamíferos incluidos roedores y humanos, con características de células madre, que en

in vitro pueden diferenciarse a neuronas y células gliales de la retina (Ahmad *et al.*, 2004; Coles *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2005; Engelhardt *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2005). *In vivo* se han encontrado células que expresan marcadores de progenitores retinianos en primates adultos y en humanos (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008).

PRECURSORES DE BASTONES

Los bastones proceden de un segundo grupo de progenitores neurales que se encuentran en la retina diferenciada (Hagedorn y Fernald, 1992; Johns y Fernald, 1981; Johns, 1982). Nuevos bastones se van añadiendo mientras la retina crece por expansión, de esta forma la densidad de los bastones no disminuye, incluso aumenta levemente (Johns, 1982; Powers *et al.*, 1988).

Se ha establecido un modelo consenso de formación de fotorreceptores en peces adultos (Fig. 27A) (Otteson *et al.*, 2001; Otteson y Hitchcock, 2003). Durante la diferenciación temprana del embrión, células madre del neuroepitelio se retienen en la CNI entre las neuronas diferenciadas, donde permanecen asociadas a las células de Müller (Julian *et al.*, 1998; Otteson *et al.*, 2001). Estas células se dividen asimétricamente, renovando la población de células madre y dando células hijas que pueden proliferar y migrar desde la CNI a la CNE (Hitchcock y Raymond, 2004; Otteson *et al.*, 2001; Raymond y Rivlin, 1987). Allí continúan dividiéndose y diferenciándose en bastones (Hagedorn y Fernald, 1992; Johns y Fernald, 1981; Johns, 1982; Raymond y Rivlin, 1987).

Estudios recientes han encontrado que las células de Müller son capaces de dar bastones, entre otros tipos neuronales de la retina, tras lesión (Fausett y Goldman, 2006; Fimbel *et al.*, 2007). En condiciones normales, las células de Müller pueden entrar en el ciclo celular y dar preferentemente bastones, aunque también son capaces de originar conos dependiendo de señales extrínsecas todavía sin identificar (Fig. 27B) (Bernardos *et al.*, 2007).

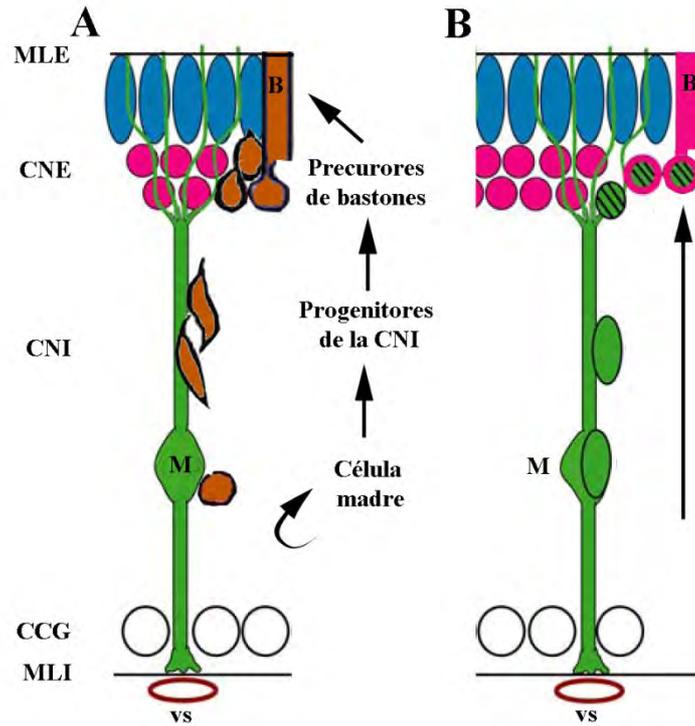


Figura 27: Esquema del linaje de bastones. **A:** Formación de bastones a partir de células madre de la CNI. **B:** Formación de bastones a partir de las células de Müller. B: bastón; CCG: capa de las células ganglionares; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; M: célula de Müller; MLE: membrana limitante externa; MLI: membrana limitante interna; vs: vaso sanguíneo. Modificado de Bernardos *et al.*, 2007 y Ottenson y Hitchcock, 2003.

PRECURSORES GLIALES EN EL NERVIÓ ÓPTICO

Como se ha comentado anteriormente, el sistema visual de teleósteos está en continuo crecimiento. Por tanto, a lo largo de todo el NO se encuentran numerosas células progenitoras gliales (Maggs y Scholes, 1986; Maggs y Scholes, 1990; Parrilla *et al.*, 2009), así como astrocitos y oligodendrocitos en distintos estados de maduración (Lillo *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2009), que se localizan en la proximidad del borde en crecimiento.

En la región intraocular de la CNO, en el límite entre la retina y el NO, aparece una pequeña población de astroblastos (Lillo *et al.*, 2002) cuya función sería servir de fuente de nuevas células gliales a la CNO, factor muy importante en una estructura donde el aporte de nuevos axones es constante.

En el NO propiamente dicho, los precursores gliales se localizan a lo largo del extremo del borde en crecimiento, y los más jóvenes bordeando la fila de los nuevos

conos de crecimiento. En estas células durante su diferenciación, los procesos se ramifican a través de los nuevos axones estableciendo los límites a ambos lados de la lámina plegada que constituye el SIO con sus pies gliales, quedando sus somas en el interior de la lámina (Fig. 14) (Maggs y Scholes, 1986). Sin embargo, la distribución de células en división PCNA⁺ no muestra diferencias entre la zona madura y el borde en crecimiento (Jimeno, 2001; Parrilla, 2006).

4.2 REGENERACIÓN

Los animales anamniotas (peces y anfibios), que se desarrollan sin membranas extraembrionarias, tienen una impresionante capacidad regenerativa. Por el contrario, los animales amniotas (reptiles, aves y mamíferos), que se desarrollan dentro de las membranas extraembrionarias, tienen una limitada capacidad de regeneración cuando son adultos, especialmente en el SNC (García y Koke, 2009).

Los estudios del sistema visual en regeneración se han enfocado en tres aspectos del proceso: el origen de las neuronas que regeneran, los mecanismos moleculares responsables de dirigir y regular la regeneración neuronal y, la restauración anatómica y funcional del órgano regenerado (Hitchcock y Raymond, 2004).

REGENERACIÓN DE LA RETINA

La lesión en la retina activa la neurogénesis en la retina de teleósteos, anfibios y aves, pero de distinta manera en cada grupo.

En anfibios premetamórficos y aves en estadios embrionarios, el EP origina progenitores retinianos mediante transdiferenciación tras una lesión. Estos progenitores son capaces de diferenciar y originar una retina completa y funcional (Del Rio-Tsonis y Tsonis, 2003; Hitchcock y Raymond, 2004; Mitashov, 1996; Reh y Pittack, 1995). La plasticidad del EP es temporal en embriones de aves y se pierde tras la metamorfosis en anuros. Sin embargo, la capacidad de transdiferenciación del EP en urodelos persiste durante la vida adulta del animal (Hitchcock y Raymond, 2004). Estudios recientes muestran que las células de Müller tras una lesión en la retina en pollos posteclosión, son capaces de generar neuroblastos y restaurar la retina (Fischer y Reh, 2001).

En teleósteos no son las células del EP las responsables de la regeneración de la retina tras la lesión. Inicialmente se pensó que la ZPG era la responsable de la

regeneración de la retina (Lombardo, 1968; Lombardo, 1972); pero, posteriormente se demostró que todos los estadios celulares pertenecientes al linaje de bastones son capaces de recuperar la retina tras una lesión (Hitchcock *et al.*, 1992; Jimeno *et al.*, 2003; Julian *et al.*, 1998; Otteson *et al.*, 2001; Raymond *et al.*, 1988; Wu *et al.*, 2001). Además, recientemente se ha demostrado que las células de Müller tienen también capacidad neurogénica en respuesta a una lesión (Bernardos *et al.*, 2007; Fausett y Goldman, 2006; Fimbel *et al.*, 2007). En cualquier caso, se han realizado numerosos estudios para evaluar la anatomía de la retina regenerada en peces y se ha comprobado que, todos los elementos celulares y sinápticos se recuperan, así como su funcionalidad; sin embargo los mosaicos celulares no se restauran correctamente (Hitchcock y Raymond, 2004).

En mamíferos adultos no hay regeneración retiniana y, tras una lesión se produce una gliosis reactiva mediada por las células de Müller, resultando en una cicatriz glial (Bringmann y Reichenbach, 2001; Dyer y Cepko, 2000).

REGENERACIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

Debido a su gran accesibilidad y puesto que está formado únicamente por los axones de las células ganglionares y por células gliales, el NO se ha utilizado para estudiar la lesión y regeneración en los distintos grupos de vertebrados, especialmente en ratón y pez cebra (García y Koke, 2009).

En mamíferos adultos, un aplastamiento de los axones en el SIO supone la muerte rápida de las células ganglionares por necrosis o apoptosis (Berry *et al.*, 1988a; Berry *et al.*, 1988b; Quigley *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 1994; Vidal-Sanz *et al.*, 1987). Mediante numerosos estudios, se ha comprobado que la capacidad de crecimiento de los axones cortados no sólo depende de su capacidad intrínseca de crecer de nuevo, sino que también depende de la permisividad del medio ambiente que los rodea (García y Koke, 2009; Kolb *et al.*, 2000). Por un lado, los astrocitos que durante el desarrollo embrionario actúan guiando el crecimiento de los axones y favorecen el desarrollo neuronal (ver apartado 3: Desarrollo del Sistema Visual). Sin embargo, pierden esta capacidad en animales adultos, de manera que ante una lesión los astrocitos forman la **cicatriz glial**. La cicatriz glial consiste en una barrera física y química que impide a los axones regenerar (Asher *et al.*, 2001; Chierzi y Fawcett, 2001; Cho *et al.*, 2005; Cho y

Chen, 2008; Reier *et al.*, 1983). Por otro lado, se ha visto que moléculas asociadas a la mielina son otra de las principales causas de la imposibilidad de regeneración de los axones en el NO (Filbin, 2003). En el sistema nervioso periférico (SNP) de mamíferos, por el contrario, si es posible cierta regeneración axonal probablemente debida a las células de Schwann (encargadas de la mielinización en el SNP) y las diferentes componentes de la matriz extracelular que están ausentes en el SNC (Berry *et al.*, 1996; Martini, 1994).

En anamniotas, particularmente en peces, los axones regeneran y recuperan la función tras sufrir una lesión en el NO. Estos animales parecen reunir todas las condiciones que favorecen la supervivencia de las células ganglionares de la retina y su vigoroso crecimiento axonal en ausencia de manipulaciones externas. También se han realizado estudios de regeneración de NO en anfibios y reptiles (Dunlop *et al.*, 2002; Dunlop *et al.*, 2004), pero la regeneración es mucho más efectiva en peces.

La primera respuesta ante la lesión se caracteriza por la desaparición de astrocitos en la zona dañada (Nona, 1998; Nona *et al.*, 1998) y la invasión de macrófagos (Colavincenzo y Levine, 2000). Los macrófagos parecen favorecer la regeneración debido a que eliminan los desechos que tienen señales inhibitorias del crecimiento (Bastmeyer *et al.*, 1991; Colavincenzo y Levine, 2000; Sivron *et al.*, 1994), liberan moléculas de crecimiento (Kolb *et al.*, 2000) y, suponen un “puente” que favorece el crecimiento de los axones regenerantes (Dunlop *et al.*, 2002). Además, las células ganglionares rápidamente sintetizan proteínas del citoesqueleto y lípidos que son trasladados al cono de crecimiento, donde son cruciales para que los axones crucen tras la zona dañada, esta respuesta se denomina **cromatolisis** (Benowitz y Lewis, 1983; Dunlop *et al.*, 2002; Grafstein y Murray, 1969; Grafstein, 1986; Murray, 1982; Perrone-Bizzozero y Benowitz, 1987; Quitschke y Schechter, 1983).

Tras la rápida respuesta por parte de los axones dañados y macrófagos, el NO se va recuperando poco a poco hasta adquirir su organización original. De manera que, disminuye la cantidad de macrófagos de la zona dañada y se llena de axones regenerantes. Además, poco a poco los astrocitos se empiezan a organizar en torno a dichos axones, formando nuevos fascículos y favoreciendo su avance a lo largo del NO (Nona *et al.*, 1998). Los efectos de la lesión en la zona distal al punto de pinzamiento del NO, se ponen de manifiesto más tarde. De esta manera, cuando la zona pinzada ya

está limpia de restos celulares en degeneración, la zona distal muestra gran cantidad de restos de mielina que son fagocitados por los astrocitos (Colavincenzo y Levine, 2000; Nona *et al.*, 1998). La mielinización no comienza hasta que apenas quedan deshechos de mielina y, la citoarquitectura del NO comienza a parecerse al NO normal (Battisti *et al.*, 1995; Nona *et al.*, 2000; Wolburg, 1981). En peces, la mielinización del NO tras lesión está a cargo de oligodendrocitos con características similares a las células de Schwann (Ankerhold y Stuermer, 1999; Nona *et al.*, 1992; Nona, 1995; Nona y Stafford, 1995; Nona, 1998; Nona *et al.*, 2000). Se piensa que la mielinización se desencadena cuando los axones pasan por un periodo de refinamiento de sus conexiones, de forma que aquellos que han llegado a la diana correcta en el TO se mielinizarían antes que aquellos que todavía no han alcanzado su meta (García y Koke, 2009; Nona *et al.*, 2000).

En la actualidad se están estudiando numerosas moléculas que pueden estar implicadas en procesos de regeneración del NO, tomando como modelo experimental tanto el pez cebra como el carpín (Becker y Becker, 2007). Proteínas asociadas al crecimiento axonal durante el desarrollo embrionario, como el GAP-43 (proteína que interacciona con el citoesqueleto) o numerosas moléculas de reconocimiento de la familia de las inmunoglobulinas como las CAM y L1, se ha visto que se expresan tras la lesión por pinzamiento (Becker *et al.*, 2004a; Bernhardt, 1999). Por tanto, la capacidad de aumentar la expresión de genes asociados al crecimiento axonal durante el desarrollo embrionario puede favorecer la regeneración. Sin embargo, hay diferencias frente al desarrollo embrionario: moléculas como la Gelsoina (proteína que interacciona con la actina) (Roth *et al.*, 1999), moléculas de reconocimiento zFNLR (Bormann *et al.*, 1999) y Contactina1a (Schweitzer *et al.*, 2007), se expresan a unos niveles mucho mayores durante el proceso de regeneración. Por el contrario, el ácido polisialico modificado de NCAM, no está en los axones en regeneración pero sí en los axones jóvenes durante el desarrollo (Harman *et al.*, 2003). También se ha descrito que los genes de GAP-43 y α -tubulina se sobreexpresan durante el desarrollo embrionario y regeneración, sin embargo se activan mediante distintas vías (Senut *et al.*, 2004; Udvardi *et al.*, 2001). Recientemente, se han encontrado los genes KLF6a y KLF7a que son exclusivos del proceso de regeneración de los axones de las células ganglionares en pez cebra (Veldman *et al.*, 2007). Por lo tanto, aunque durante la regeneración se

activen mecanismos de activación génica similares al desarrollo embrionario, éstos no son idénticos.

Uno de los mayores inhibidores del crecimiento axonal en mamíferos son las proteínas de la mielina (Fawcett, 2006); sin embargo, no pasa lo mismo en peces o la actividad inhibidora está a menor nivel (Sivron y Schwartz, 1994; Wanner *et al.*, 1995). Por ejemplo, un inhibidor asociado a la mielina Nogo-A que impide la regeneración en mamíferos, carece de su dominio inhibidor en pez zebra (Diekmann *et al.*, 2005). En cuanto a la cicatriz glial y los condroitín-sulfatos de la matriz extracelular que inhiben la regeneración en mamíferos (Silver y Miller, 2004), no se expresan en un nivel que inhiba los axones regenerantes en peces (Battisti *et al.*, 1992; Becker y Becker, 2002). Otro inhibidor del crecimiento axonal en mamíferos son las semaforinas (Niclou *et al.*, 2006), que en la lesión del nervio óptico de peces no se detectan (Becker y Becker, 2007). Por otro lado, los astrocitos en peces muestran una gran plasticidad en respuesta a una lesión envolviendo a los axones en paquetes y eliminando los desechos de mielina (Hitchcock y Raymond, 2004; Kolb *et al.*, 2000), pudiendo modular el microambiente durante la regeneración mediante el establecimiento de uniones estrechas (Mack y Wolburg, 2006).

Moléculas de guía axonal como la Netrina-1 (Petrausch *et al.*, 2000), la Tenascina-R (Becker *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004b) o algunas Efrinas (Becker *et al.*, 2000; King *et al.*, 2003; Rodger *et al.*, 2004) también se encuentran involucradas en el proceso de regeneración; así como la recientemente descrita Purpurina (molécula de unión al retinol) que, mediante la inducción de formación de ácido retinoico (AR), favorece la regeneración (Matsukawa *et al.*, 2004a; Nagashima *et al.*, 2009). También se propone que los genes *pax2*, *pax6* y *pax7* fundamentales en la formación del sistema visual durante el desarrollo embrionario, puede jugar un papel importante durante el proceso de regeneración (Ziman *et al.*, 2001).

Aunque la regeneración de los axones ópticos se hace correctamente, no es tan precisa como durante el desarrollo embrionario. La mayoría de los axones alcanzan sus dianas, pero se producen algunos errores como por ejemplo un aumento en las proyecciones ipsilaterales (Becker *et al.*, 2000; Springer, 1981). También se sabe que

Introducción

después de una reinervación inicial del techo óptico, ocurre un período de refinamiento para el establecimiento de la retinotopía original (Schmidt, 2004).

Justificación y Objetivos

La CNO es una estructura crucial en los procesos de crecimiento, ordenación y fasciculación de los axones de la retina que se integran al NO (Macdonald *et al.*, 1997; Oster *et al.*, 2004; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Torres *et al.*, 1996). La escasa plasticidad y capacidad regenerativa de esta zona en mamíferos dificulta, cuando no impide, el diseño de terapias efectivas para patologías que con frecuencia generan ceguera permanente (Chu *et al.*, 2001; Downs *et al.*, 2008; Hayreh, 2009; Sanyanusin *et al.*, 1995). Por el contrario, en teleósteos adultos esta zona del SNC crece y es capaz de regenerar espontáneamente (Easter *et al.*, 1984; Hitchcock y Raymond, 2004; Raymond y Hitchcock, 2000; Stuermer y Bastmeyer, 2000). Son las relaciones axón-glia las que determinan la ordenación, fasciculación y crecimiento de los axones retinianos, tanto jóvenes como regenerantes, y condicionan su progresión en el resto del NO (Jimeno *et al.*, 1999; Jimeno, 2001; Lillo, 2001; Lillo *et al.*, 2002; Stuermer y Bastmeyer, 2000). En este trabajo nos proponemos conocer a nivel citoarquitectónico y molecular, estas interacciones y cómo evolucionan en un modelo con regeneración estructural y funcional. Ello puede ser un buen fundamento para abordar la modificación de sistemas con regeneración espontánea tan poco efectiva como el de mamíferos.

Nuestro grupo ha descrito la organización básica de la CNO de teleósteos y ha iniciado el estudio la asociación de diversos tipos gliales con axones maduros, en crecimiento y regenerantes (Jimeno *et al.*, 1999; Jimeno, 2001; Lillo *et al.*, 1998; Lillo, 2001; Lillo *et al.*, 2002). Además ha demostrado la asociación de la proliferación neural en la retina y la CNO con procesos de crecimiento y regeneración de axones retinianos (Jimeno *et al.*, 1999; Jimeno, 2001; Lillo, 2001; Lillo *et al.*, 2002). El diseño por nuestro equipo de un sistema de criolesión controlada de zonas discretas de la retina, permite inducir la regeneración en unas condiciones que implican novedosos e interesantes abordajes del crecimiento y la regeneración axónica (Cid, 2006; Jimeno *et al.*, 1999; Jimeno, 2001; Jimeno *et al.*, 2003). Por otro lado, aunque se han realizado numerosos análisis de la regeneración del NO postpinzamiento, incluyendo a nuestro grupo de investigación (Jimeno, 2001; Lillo, 2001; Vecino *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 2000), son escasos los estudios que analizan el papel de las células gliales en CNO durante la regeneración tras esta lesión (Jimeno, 2001; Lillo, 2001).

Por otra parte, se dispone de datos sobre algunas sustancias cuya expresión, o ausencia de la misma, en axones o células gliales se relaciona con el éxito o fracaso de

procesos de crecimiento y/o regeneración de axones retinógenos (Battisti *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 2000; Becker y Becker, 2002; Becker *et al.*, 2004a; Becker y Becker, 2007; Bernhardt, 1999; Bormann *et al.*, 1999; Diekmann *et al.*, 2005; Matsukawa *et al.*, 2004b; Nagashima *et al.*, 2009; Niclou *et al.*, 2006; Petrusch *et al.*, 2000; Rodger *et al.*, 2004; Rodger *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 1999; Schweitzer *et al.*, 2007; Silver y Miller, 2004; Sivron y Schwartz, 1994; Veldman *et al.*, 2007; Wanner *et al.*, 1995). Así, se ha propuesto que los genes *pax2* y *pax6*, fundamentales en la formación del sistema visual durante el desarrollo embrionario (Curto *et al.*, 2007; Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996; Macdonald *et al.*, 1997; Marquardt, 2003; Schwarz *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 1996), pueden jugar un papel importante durante la regeneración (Rodger *et al.*, 2006; Ziman *et al.*, 2001). En nuestro laboratorio se ha demostrado con experimentos de qPCR que genes involucrados en la retinogénesis, incluido *pax6*, juegan un papel fundamental en la regeneración postcrialesión (Cid, 2006). Sin embargo, no disponemos de estudios que analicen el papel de *pax2* en la CNO durante la regeneración, a pesar de que se ha demostrado que es fundamental en la formación de la CNO durante el desarrollo embrionario (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001; Goode y Elgar, 2009; Macdonald *et al.*, 1997; Morcillo *et al.*, 2006; Sanyanusin *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996). Por tanto, conocer las modificaciones en la expresión génica de *pax2* en la CNO durante el proceso de regeneración aportará nuevos datos sobre la función de este gen, cuya ausencia es responsable de numerosas enfermedades humanas (Busse *et al.*, 2009; Sanyanusin *et al.*, 1995; Tavassoli *et al.*, 1997).

Para realizar este estudio, hemos escogido el carpín dorado (*Carassius auratus*), dado que es un excelente modelo de crecimiento continuado y regeneración ampliamente utilizado en la bibliografía y en cuyo manejo tenemos suficiente experiencia (Ankerhold y Stuermer, 1999; Bastmeyer *et al.*, 1989; Colavincenzo y Levine, 2000; Easter *et al.*, 1984; Hitchcock *et al.*, 2004; Matsukawa *et al.*, 2004a; Nona, 1998; Parrilla *et al.*, 2009; Raymond *et al.*, 1988; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Wolburg, 1981).

Los objetivos concretos de esta tesis doctoral han sido:

- La caracterización morfológica y molecular de los distintos tipos neurogliales presentes en la CNO de teleosteos adultos.

- Conocer las características moleculares básicas de las interacciones neurona-glía en la CNO de teleósteos adultos.
- Determinar las modificaciones de los distintos tipos neurogliales presentes en la CNO de teleósteos adultos, originadas por distintos tipos de lesiones experimentales de la retina y el NO.
- Determinar la posible variación de las características moleculares de las interacciones neurona-glía en la CNO de teleósteos adultos, inducida por distintos tipos de lesiones experimentales de la retina y NO.

Material y Métodos

1. MANIPULACIÓN DE LOS ANIMALES

1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para llevar a cabo este trabajo se emplearon 167 ejemplares adultos de entre 8 y 10 cm de longitud (estándar) de carpín dorado (*Carassius auratus* L., 1758, Cyprinidae, Teleostei) (Fig. 28). Una vez trasladados al laboratorio, los animales fueron mantenidos en acuarios a una temperatura de 20°C (\pm 2°C), buena aireación, un fotoperíodo de 12 h. de luz y 12 h de oscuridad, y alimentados una vez al día.



Figura 28: Fotografía de un ejemplar adulto de carpín dorado (*Carassius auratus* L., 1758, Cyprinidae Teleostei). Tomada de www.mediterranea.org.

Todos los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según las líneas establecidas en la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC y 2003/65/EC), la Legislación Española (RD 1201/2005 (BOE 252/34367-91, 2005)) y de acuerdo con la guía norteamericana del *National Institute of Health* (NIH), vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Y bajo la supervisión del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca.

Los animales fueron anestesiados con metanosulfonato de triclaína al 0,03% (MS-222) antes de realizar cualquier tipo de operación.

1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se estudiaron individuos control, a los que no se les hizo ningún tipo de cirugía previa al sacrificio, e individuos lesionados. Se realizaron dos tipos de lesiones: 1) criolesión de la zona periférica germinal (ZPG) y, 2) pinzamiento del NO.

CRIOLESIÓN DE LA ZPG

Al lesionar la ZPG conseguimos eliminar temporalmente la llegada a la CNO de los axones jóvenes, procedentes de las células ganglionares de nueva generación. De esta forma, podemos analizar el efecto que ocasiona la ausencia de los mismos en los distintos tipos celulares presentes en la CNO y, por lo tanto, deducir su posible interacción en condiciones normales.

La técnica de criolesión fue puesta a punto en el año 2001 en nuestro laboratorio (Jimeno, 2001). Consiste en cauterizar la región coincidente con el límite entre el iris y la coroides y entre la córnea y la esclera, mediante aplicaciones puntuales de frío. Para ello, se utiliza un crioadaplicador (Cry-AC, Brymill) compuesto por una bombona con nitrógeno líquido a presión que, al salir, enfría una punta metálica de 1mm de diámetro (Fig. 29A). En cada aplicación, la punta fría se mantiene durante 10 s sobre el tejido, procurando ejercer siempre la misma presión. Se realizaron las aplicaciones necesarias hasta cubrir toda el área a lesionar (Fig. 29B).

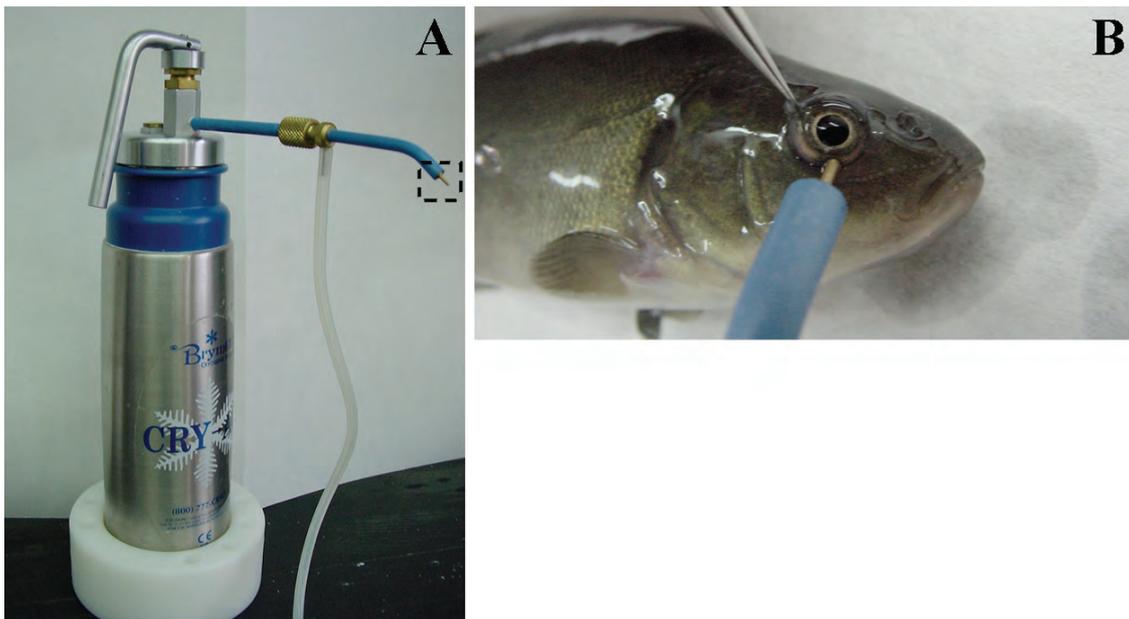


Figura 29: **A:** Fotografía de un crioadaplicador. **B:** Fotografía de una tenca (*Tinca tinca* L., 1758, Cyprinidae Teleostei) que está siendo criolesionada. Tomado de Jimeno, 2001.

La lesión se llevó a cabo en ambos ojos del animal y, los tiempos de supervivencia postlesión analizados fueron: 2, 7, 15, 21, 30, 60, 90 y 120 días (d).

PINZAMIENTO DEL NERVIO ÓPTICO

Al pinzar el NO producimos una degeneración temporal de los axones y su posterior regeneración. De esta manera podemos estudiar el efecto que produce en la glía de la CNO la entrada masiva de axones en crecimiento.

El pinzamiento del NO es una técnica puesta a punto en distintos laboratorios que llevan a cabo investigación es este campo (Nona *et al.*, 1992; Velasco *et al.*, 1995). Para visualizar el NO se recorta parte del tejido conjuntivo que rodea al ojo y con ayuda de unas pinzas se gira el ojo para poder tener acceso mismo. El NO se pinzó a unos 2 mm de distancia del ojo durante unos 3 s teniendo cuidado de no dañar la AC (Fig. 30).



Figura 30: Fotografía de una tenca (*Tinca tinca* L., 1758, Cyprinidae Teleostei) a la que se le está pinzando el NO. Tomado de Jimeno, 2001.

La lesión se llevó a cabo en el ojo izquierdo del animal para experimentos de inmunohistoquímica (IHQ), y en los dos ojos para experimentos de expresión génica. Los tiempos de supervivencia postlesión fueron: 2, 7, 15, 21, 30, 90, 120, 180 y 210 d.

2. INMUNOHISTOQUÍMICA

La IHQ es una técnica de marcaje de proteínas que aprovecha la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Mediante esta técnica pueden diferenciarse tipos celulares en base a las proteínas que expresan, tal y como se describe a continuación.

2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras se extrajeron y fijaron de diferente manera dependiendo del tipo de IHQ que se iba a realizar. Para IHQ en sección se fijó el tejido por perfusión intracardiaca, para la IHQ en tejido *in toto* se fijó previamente por inmersión.

Para IHQ en sección se emplearon 20 animales control y 4 animales lesionados de cada tiempo de supervivencia y de cada tipo de lesión. Para la IHQ *in toto* se utilizaron 3 animales control y 3 animales criolesionados de 7, 21 y 30d de supervivencia.

FIJACIÓN POR PERFUSIÓN

La perfusión intracardiaca se realizó, previa anestesia de los animales con MS-222, de la siguiente forma: en primer lugar se abrió el animal desde el ano hacia la cabeza de forma que quedó expuesto el corazón. A continuación se introdujo la cánula en el cono aórtico y se comenzó la perfusión por medio de una bomba perfusora (Gilson), primero con 10 ml de solución salina (NaCl al 0.63%) para eliminar la sangre de los tejidos y, posteriormente con 100 ml de fijador Somogyi (paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0.2% en tampón fosfato) (Figs. 31A-B). Finalmente se extrajeron el encéfalo, los NO y los ojos; en éstos se realizó un orificio en la córnea, se retiró el cristalino (para evitar que se rasgue el tejido al cortarlo posteriormente al criostato) y se postfijó el tejido durante 2 h a temperatura ambiente (TA) en el mismo fijador (Somogyi) (Fig. 31C).

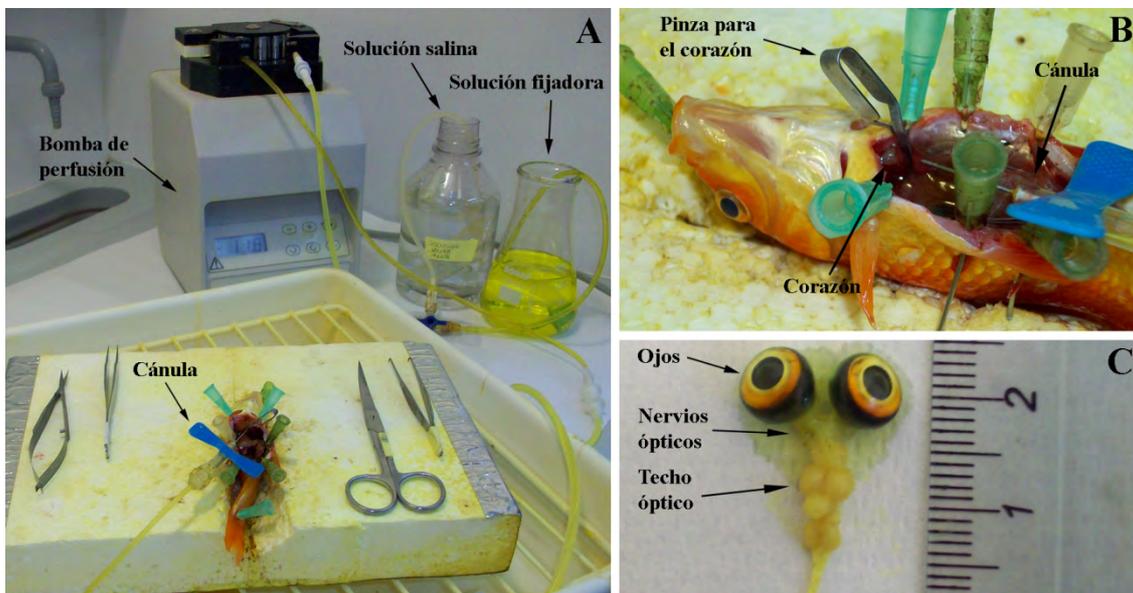


Figura 31: A: Fotografía de la perfusión de un carpín (*Carassius auratus* L., 1758, Cyprinidae Teleostei). B: Detalle de un carpín que se está fijando por perfusión. C: Fotografía de los ojos, nervios ópticos y encéfalo extraídos de un carpín fijado por perfusión.

Tras la postfijación, se realizaron varios lavados en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (TF) durante al menos 2 h a TA para eliminar el resto de fijador del tejido.

Posteriormente se procedió a la crioprotección del tejido, mediante su inmersión en sacarosa progresivamente más concentrada desde el 10% al 50% en TF durante dos días hasta que el tejido se hundió en el líquido de crioprotección. A continuación, se procedió a su congelación utilizando medio OCT[®]. La congelación se realizó utilizando nitrógeno líquido.

Las secciones se obtuvieron mediante un criostato (CM 3050 S Leica y HM 560 Micron) a 14 µm de grosor, y se recogieron sobre portaobjetos gelatinizados (gelatina al 0,5% y $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en agua) para evitar que se despegaran los cortes en tratamientos posteriores. Las secciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

FIJACIÓN POR INMERSIÓN

Para la fijación por inmersión de las retinas y CNO, fue necesario poner a los animales en oscuridad al menos 3 h antes de realizar la extracción de los tejidos. En peces, durante el periodo de oscuridad, el pigmento del EP migra en dirección opuesta a la retina neural, de forma que facilita la extracción de la retina libre de pigmento.

A continuación, previa anestesia con MS-222, se decapitó a los animales y se les extrajeron los ojos conservando la parte anterior de la CNO. Bajo la lupa, se realizaron dos cortes en sentido contrario desde la córnea hacia la ZPG de la retina. Con ayuda de unas pinzas, se fueron separando la esclera y la coroides de la retina.

Una vez limpias, las retinas con su CNO se lavaron 5 s en metanol para favorecer su extensión y, a continuación, se dejaron en agitación durante 12 h a 4°C en fijador Somogyi. Antes de iniciar el protocolo de IHQ, las retinas se lavaron repetidas veces con TF.

2.2 MARCADORES UTILIZADOS

A continuación se describe cada proteína inmunodetectada en este trabajo: tipo de células del sistema nervioso central que reconoce, especificidad en nuestro modelo experimental y su utilidad para estudiar los procesos de crecimiento continuado y regeneración.

CITOQUERATINA

El anticuerpo anti-citoqueratina (Sigma, C2562) reconoce una mezcla de anticuerpos monoclonales. Las citoqueratinas son proteínas que contienen el filamento intermedio queratina, encontrado en el citoesqueleto del tejido epitelial (Franke *et al.*, 1979; Schweizer *et al.*, 2006). Hay dos tipos de citoqueratinas: 1) las citoqueratinas tipo I que son ácidas y, 2) las citoqueratinas tipo II neutras. La expresión de estas citoqueratinas es frecuentemente órgano o tejido específica. Por tanto, los tipos de citoqueratinas que una célula epitelial expresa dependen del tipo de epitelio, del momento de diferenciación o del estadio de desarrollo en que se encuentre. En el NO del carpín dorado las citoqueratinas son el elemento mayoritario del citoesqueleto en los astrocitos reticulares (Giordano *et al.*, 1989; Maggs y Scholes, 1990). Se han descrito varias citoqueratinas distintas pertenecientes a ambos grupos tipo I y II (Druger *et al.*, 1992; Druger *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 1990) y, parecen estar distribuidas en diferentes tipos celulares (Druger *et al.*, 1992; Druger *et al.*, 1994). El mantenimiento de estas queratinas durante la edad adulta del carpín dorado, parece estar relacionada con los procesos de crecimiento continuado y su capacidad regenerativa tras sufrir una lesión (Druger *et al.*, 1992; Druger *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 1989; Giordano *et al.*, 1990; Maggs y Scholes, 1990).

GFAP

El anticuerpo utilizado para su detección (Sigma, G6171) reconoce un antígeno con peso molecular de 51 kDa (Nona *et al.*, 1989) que es una de las dos variantes de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que presentan los peces (Cohen *et al.*, 1993). Es un marcador específico de astrocitos que forma parte de los gliofilamentos de células astrogliales (astrocitos protoplasmáticos y fibrosos), glía de Bergmann y glía radial en vertebrados (Dahl *et al.*, 1985; Didier *et al.*, 1986; Levitt y Rakic, 1980; Monzón-Mayor *et al.*, 1990; Monzón-Mayor *et al.*, 1998; Onteniente *et al.*, 1983); también se localiza en ependimocitos (Bodega *et al.*, 1990; Didier *et al.*, 1986; Rubio *et al.*, 1992). Es una proteína del citoesqueleto que modula la forma y el movimiento de los procesos astrocitarios; frente a lesiones y traumatismos se sobreexpresa y es característica en la astrogliosis (Dahl y Bignami, 1973; Hozumi *et al.*, 1990; Latov *et al.*, 1979; Nathaniel y Nathaniel, 1977). En mamíferos se expresa en el NO postnatal cuando ocurre la mielinización (Dahl, 1981). En peces, marca las células de Müller de la retina (Velasco,

1994) y la limitante glial de la CNO (Lillo *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2009); pero no la expresa la astrogliá del NO (Dahl y Bignami, 1973), hasta llegar al TR, en el que vuelve a aparecer el marcaje en la glía radial del TO (Velasco, 1994).

GLUTAMINA SINTETASA

El anticuerpo utilizado es una IgG2a (Chemicon, MAB302) obtenida en ratón a partir de la glutamina sintetasa (GS) aislada de cerebro de oveja y reacciona en rata, oveja y humano. Este mismo anticuerpo ha sido empleado para el estudio del sistema nervioso de peces (Hernández *et al.*, 1999; Lillo *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2009) y su especificidad ha sido comprobada mediante *Western Blot* en carpa y carpín dorado. La GS, en el SNC de vertebrados, cataliza la formación de glutamina a glutamato y amonio, participando en la detoxificación (Vardimon, 2000), así como en la regulación metabólica del glutamato (Hamberger *et al.*, 1979; Vardimon, 2000). Se localiza fundamentalmente en los astrocitos (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Struzynska *et al.*, 2005; Vardimon, 2000), aunque también se ha observado en oligodendrocitos de mamíferos (Cammer, 1990; Domercq *et al.*, 1999; Romero-Alemán Mdel *et al.*, 2003; Warringa *et al.*, 1988). En teleósteos se ha detectado en las células de Müller de la retina (Lillo *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2009) y en células del NO (Parrilla *et al.*, 2009).

MBP

El anticuerpo policlonal, amablemente cedido por el Prof. Appel (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee), reconoce la secuencia aminoacídica CSRSRSPPKRWSTIF, específica de la proteína de mielina básica (MBP) de pez cebra (*Danio rerio* L., 1758, Cyprinidae Teleostei). La proteína MBP es la segunda proteína más abundante en el SNC (Boggs, 2006). Juega un papel fundamental en la formación de la mielina (Carré *et al.*, 2002; Readhead *et al.*, 1990) y, aunque no es imprescindible (Martini y Schachner, 1997), también participa en la mielinización del SNP (Gould *et al.*, 1995). La proteína MBP está situada en la superficie citosólica de la membrana plasmática de los oligodendrocitos, estableciendo interacciones electrostáticas con los lípidos cargados negativamente (Boggs, 2006). Está presente a lo largo de la mielina internodal compacta y es responsable de la adhesión entre las superficies citosólicas de la vaina de mielina formada por numerosas capas (Boggs, 2006; Omlin *et al.*, 1982; Readhead *et al.*, 1990). Sin embargo, parece tener otras funciones como en señalización

intracelular al interactuar con el citoesqueleto (Boggs y Rangaraj, 2000; Boggs, 2006; Dyer *et al.*, 1995; Dyer y Cepko, 2000), o en la regulación de la expresión de otras proteínas de la mielina dado que algunas isoformas de MBP pueden localizarse en el núcleo (Carré *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 1996; Pedraza *et al.*, 1997; Staugaitis *et al.*, 1996). La proteína MBP está presente en la vaina de mielina de todos los vertebrados, excepto los evolutivamente más antiguos (mixinos y lampreas, miembros de los Agnatos ciclóstomos). La secuencia de MBP está altamente conservada desde mamíferos a pollo y *Xenopus* (Harauz *et al.*, 2004). También está presente en peces como el carpín dorado y pez cebra (Brosamle y Halpern, 2002; Mastronardi *et al.*, 1993); en tiburón, MBP tiene sólo un 44% de homología con la proteína MBP de mamíferos (Milne *et al.*, 1990; Saavedra *et al.*, 1989). Sin embargo, no se han encontrado homólogos en invertebrados, lo que sugiere que la proteína MBP apareció relativamente tarde en la evolución de la mielina (Gould *et al.*, 2005). El estudio de MBP es interesante porque está implicada en enfermedades como la esclerosis múltiple (Boggs *et al.*, 2006).

PAX2

El anticuerpo policlonal anti-Pax2 (Covance, PRB-276P) detecta una proteína recombinante de peso molecular de 22 kDa y su especificidad se ha comprobado en numerosas especies tales como ratón, pez cebra y carpín entre otros (Parrilla *et al.*, 2009; Puschel *et al.*, 1992). La proteína Pax2 pertenece a una familia de factores de transcripción denominada genes *Pax* altamente conservados en la evolución e implicados en numerosos aspectos durante el desarrollo temprano (Chalepakakis *et al.*, 1991; Czerny *et al.*, 1993; Stuart *et al.*, 1994). En el desarrollo embrionario Pax2 es responsable de la correcta formación del NO: cierre de la fisura coroidea, guía de los axones de las células ganglionares a lo largo de toda la vía visual y la diferenciación de las células gliales (Chu *et al.*, 2001; Macdonald *et al.*, 1997; Sanyanusin *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996). En teleósteos la proteína Pax2 se conserva en astrocitos del NO, pudiendo jugar un papel importante en procesos de crecimiento continuado y regeneración (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009).

PCNA

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA (clon PC10, Santa Cruz Biotechnology, sc-56) se une de forma específica a la proteína nuclear PCNA (antígeno de proliferación celular nuclear) de 35 kDa. La PCNA es un cofactor de la DNA polimerasa δ cuya expresión es necesaria para la síntesis de DNA en la horquilla de replicación (Bravo *et al.*, 1987; Prelich *et al.*, 1987). Esta proteína se encuentra en dos formas básicas: 1) soluble y fácil de extraer con detergentes, que no está relacionada con la replicación y, 2) insoluble situada en el núcleo y asociada a la síntesis de DNA (Bravo y Macdonald-Bravo, 1987). La PCNA se expresa inicialmente en fase tardía (G1) del ciclo celular, aumenta en la fase S y decrece en la transición S/G2 y durante G2 y M (Bravo *et al.*, 1987; Takahashi y Caviness, 1993). En la vía óptica de peces, la PCNA se ha detectado en células proliferativas localizadas en la retina (Cid *et al.*, 2002; Julian *et al.*, 1998; Kwan *et al.*, 1996; Negishi *et al.*, 1990a; Negishi *et al.*, 1990b; Velasco *et al.*, 2001), en la CNO (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009) y en el NO (Parrilla *et al.*, 2009).

S100

El anticuerpo policlonal anti-S100 consiste en una IgG de conejo anti-S100 de vaca (Dako, Z0311). Este anticuerpo policlonal reacciona específicamente contra S100 A y B de vaca y, cruzadamente con S100 de gato, caballo, ratón, rata, cerdo y humano (Donato, 2001). La especificidad ha sido demostrada mediante inmunoelectroforesis (Mata *et al.*, 1990; Nona *et al.*, 1992). Mediante técnicas inmunocitoquímicas, se comprobó que este anticuerpo marca específicamente células gliales tanto del sistema nervioso central como del periférico (Miyake *et al.*, 1989; Müller, 1992; Schmidt-Kastner y Szymas, 1990; Stagaard Janas *et al.*, 1991a; Stagaard Janas *et al.*, 1991b). En la tenca ha sido probada la especificidad de este anticuerpo mediante IHQ y *Western Blot*, observándose el marcaje en las células gliales de la vía visual (Velasco *et al.*, 1997). Las proteínas S100 fueron caracterizadas inicialmente como proteínas acídicas dimericas del sistema nervioso, compuestas primariamente por dos subunidades similares S100- α y S100- β (Isobe *et al.*, 1983; Moore, 1965). A partir de entonces se ha utilizado en inmunocitoquímica como marcador específico de astrocitos. En retina de teleosteos marca las células de Müller y astrocitos de la CFNO (Dahl *et al.*, 1986; Nona *et al.*, 1989; Vecino *et al.*, 1997), y en tenca detecta además células horizontales en la

CNI (Vecino *et al.*, 1997). A lo largo de todo el NO aparecen astrocitos y oligodendrocitos S100⁺ (Casañas, 2005; Clemente, 2003; Vecino *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 1997).

SOX10

El anticuerpo policlonal, amablemente cedido por el Prof. Appel (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee), reconoce el factor de transcripción Sox10. Sox10 pertenece al grupo de factores de transcripción caracterizados por un dominio HMG (grupo de alta movilidad) de unión al DNA y, junto a Sox8 y Sox9 forman la familia SoxE, y promueven la formación, diferenciación y supervivencia de las células pertenecientes al linaje de los oligodendrocitos (Wegner y Stolt, 2005; Wegner, 2008). Estudios en mutantes para *sox10* en ratón y pez cebra, demuestran que es necesario en la diferenciación de los oligodendrocitos (Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.* 2010). Sox10 promueve la expresión de algunos genes de la mielina; por ejemplo, es responsable directo de la regulación de la proteína MBP (Wegner y Stolt, 2005; Wegner, 2008). Además, se piensa que promueve la expresión de genes que codifican factores que median las interacciones entre axones y oligodendrocitos, necesarias para la supervivencia de los últimos (Takada *et al.* 2010). El factor de transcripción Sox10 también está involucrado en el desarrollo del sistema nervioso periférico y en la mielinización del mismo (Wegner y Stolt, 2005). En el sistema nervioso adulto, la proteína Sox10 continúa presente y mantiene el fenotipo de los oligodendrocitos diferenciados (Wegner y Stolt, 2005).

ZN8

El anticuerpo monoclonal (IgG1) anti-Zn8 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 5-ea) permite inmunodetectar las células ganglionares y sus axones en crecimiento (Westerfield, 1995). El antígeno reconocido por el anticuerpo anti-Zn8 es una molécula de superficie de la superfamilia de las inmunoglobulinas llamada Neurolina/ALCAM (Laessing *et al.*, 1994; Paschke *et al.*, 1992). Durante el desarrollo embrionario de peces, la Neurolina (también llamada ALCAM o zf DM-GRASP) (Kanki *et al.*, 1994) está involucrada en el crecimiento y guía de los axones de las células ganglionares hasta el DO (Leppert *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 1998; Paschke *et al.*, 1992; Stuermer y Bastmeyer, 2000) y de los axones de las motoneuronas secundarias (Fashena y Westerfield, 1999; Ott *et al.*, 2001). En procesos de crecimiento continuado

y regeneración de la retina tras lesión, la Neurolina participa en la guía axonal de la misma manera que lo hace durante el desarrollo (Parrilla *et al.*, 2009; Paschke *et al.*, 1992). Sin embargo, en neuronas maduras sólo se encuentra en los sitios de contacto y sinapsis (Paschke *et al.*, 1992), pudiendo estar implicada en la comunicación célula-célula y en la transducción de las señales (Diekmann y Stuermer, 2009). En mamíferos, el complejo proteico DM-GRASP/SC-1/BEN participa en la adhesión celular y promueve el crecimiento y fasciculación de axones (Pourquie *et al.*, 1992), así como la formación de sinapsis (Chédotal *et al.*, 1996). Recientemente se han encontrado dos genes para la Neurolina en pez cebra: *Neurolina-a* necesaria para la diferenciación de las células ganglionares y precede al crecimiento axonal y, *Neurolina-b* involucrada en la guía de los axones desde el QO hacia el TO (Diekmann y Stuermer, 2009). El anticuerpo posiblemente reconozca ambas proteínas dado que son muy parecidas (Mann *et al.*, 2006).

ZO1

El anticuerpo monoclonal anti-ZO1 (Invitrogen, 33-9100) permite inmunolocalizar las uniones estrechas. Las uniones estrechas o zónulas ocluyentes son barreras selectivas y semipermeables que se forman entre algunas células. También sirven para separar distintas regiones de la membrana plasmática en diferentes compartimentos fisiológicos (Gumbiner, 1996). Los componentes mayoritarios de las uniones estrechas de vertebrados son las proteínas ZO1, ZO2 y la ocludina. ZO1 es una proteína periférica de membrana que se encuentra en la porción citoplasmática de las uniones estrechas (Willott *et al.*, 1992). Durante el desarrollo ZO1 está implicada en el establecimiento de la polaridad ápico-basal de las células epiteliales (Willott *et al.*, 1993). ZO1 y la proteína con la que interactúa ZO2 son miembros de una familia de proteínas de transducción de señales (MAGUK) cuyos miembros contienen un dominio SH3, un dominio con homología a las guanilato kinasas y un dominio PDZ (mediador potencial en la interacción proteína-proteína), que se encuentran en muchas proteínas asociadas a sinapsis (Nagano *et al.*, 1998; Willott *et al.*, 1993). La proteína ZO1 también puede estar asociada a otros complejos de unión como las uniones GAP que establecen tanto astrocitos como oligodendrocitos (Li *et al.*, 2004; Penes *et al.*, 2005). En la retina de vertebrados, la proteína ZO1 forma parte de las uniones adherentes que establecen las células de Müller dando lugar a la MLE (Herranz, 2009; Itoh *et al.*, 1999; Paffenholz *et al.*, 1999). En el NO de teleósteos, se encuentra en las uniones estrechas

que establecen los astrocitos reticulares, especialmente representada en el borde en crecimiento por donde discurren los axones en crecimiento (Mack y Wolburg, 2006).

TABLAS DE ANTICUERPOS

A continuación se incluyen el listado de anticuerpos primarios con sus concentraciones de uso y procedencia (Tabla 1). Lo mismo se recoge para los anticuerpos secundarios (Tabla 2).

<i>Antígeno</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Dilución de uso</i>
Citoqueratina	IgG monoclonal ratón	Sigma	1:100
GFAP	IgG monoclonal ratón	Sigma	1:400
GS	IgG monoclonal ratón	Chemicon	1:1000
MBP	IgG policlonal conejo	Cedida por Prof. Appel	1:1000
			1:1000 (ABC)
Pax2	IgG policlonal conejo	Covance	1:900 (Fluo)
			1:200 (MET)
PCNA	IgG monoclonal ratón	Santa Cruz Biotech.	1:500
S100	IgG policlonal conejo	Dako	1:1500
Sox10	IgG policlonal conejo	Cedida por Prof. Appel	1:1000
Zn8	IgG monoclonal ratón	Hybridoma Bank	1:300
ZO1	IgG monoclonal ratón	Zymed	1:100

Tabla 1: Relación de anticuerpos primarios.

<i>Método</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Conjugado con</i>	<i>Casa comercial</i>
ABC	IgG de ratón	IgG de caballo	Biotina	Vector
	IgG de conejo	IgG de cabra	Biotina	Vector
Fluorescencia	IgG de ratón	IgG de cabra	Cy2	Jackson
	IgG de conejo	IgG de cabra	Cy3	Jackson
Oro coloidal	IgG de conejo	IgG de cabra	Oro coloidal	Aurion

Tabla2: Relación de anticuerpos secundarios.

2.3 PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se realizaron dos técnicas IHQ distintas: la IHQ indirecta denominada método ABC (Fig. 32) y la IHQ indirecta de fluorescencia (Fig. 33). La primera se utilizó para los marcajes simples y, la segunda para hacer dobles marcajes.

MÉTODO ABC

Las secciones se descongelaron a TA durante al menos 2 h y se lavaron en tampón fosfato salino pH 7,4 a 0,1 M con Triton X-100 al 0,02% (TFST), eliminando los restos de OCT® y rehidratando el tejido. Todos los lavados se realizaron 3 veces durante 10 min cada uno en agitación. Se eliminó la actividad peroxidasa endógena tratando los cortes con un baño de 5 min de H₂O₂ al 0,18% en metanol.

Tras lavar de nuevo en TFST, se realizó una preincubación de 1 h a TA con suero no inmune al 2% en el mismo TFST utilizado en los lavados. En cada IHQ se utilizó suero procedente de la misma especie animal en que se ha hecho el anticuerpo secundario. El objetivo de esta incubación es facilitar la penetración de los anticuerpos y reducir las uniones inespecíficas de los mismos al tejido.

A continuación, las secciones se incubaron 12 h a TA en el medio de preincubación, al que se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% y el anticuerpo primario cuyas diluciones de uso están indicadas en la Tabla 1. Posteriormente, los cortes se lavaron con TFST y se incubaron durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario biotinilado diluido a 1:200 en el medio de preincubación (Tabla 2).

Después de eliminar el exceso de anticuerpo secundario con TFST, se realizó una incubación de 45 min a TA con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit Elite ABC, Vectastain™) a una dilución 1:250 en el medio de preincubación. Las secciones se lavaron en TFST y, finalmente se realizó un lavado en tris-clorhídrico (TTC) pH 7.6 a 0.1 M.

El revelado se realizó con H₂O₂ al 0.0012% y el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.02% en TTC pH 7.6 a 0.2 M. La reacción fue controlada bajo microscopio y se detuvo lavando las secciones con TTC pH 7.6 a 0.1 M.

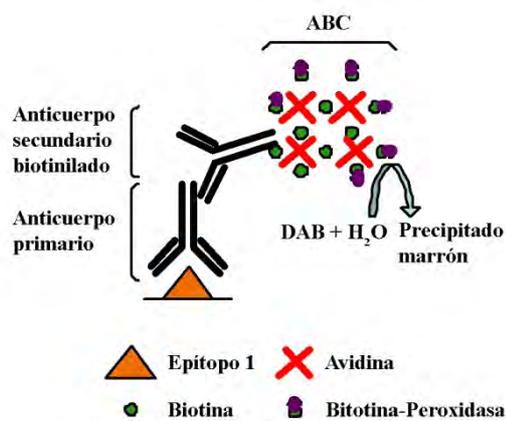


Figura 32: Esquema de la IHQ indirecta por el método ABC.

Para preservar los cortes, se deshidrataron en una batería de alcoholes de gradación creciente durante 5 min en cada uno y dos aclarados de 10 min en xilol, todo a TA. Finalmente se montaron con Entellan®.

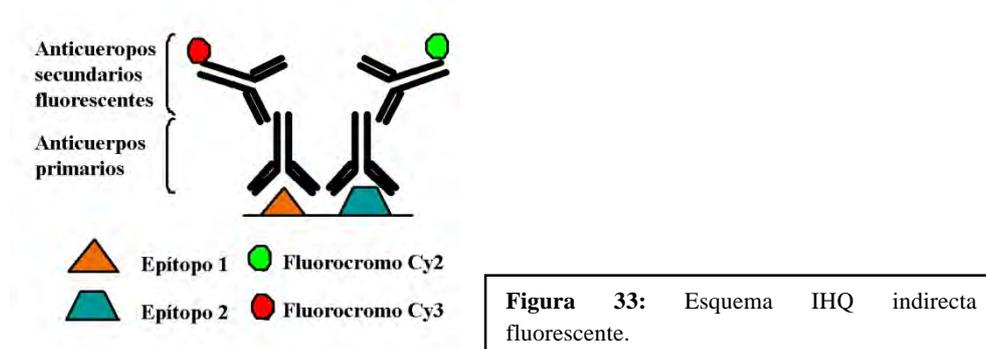
MÉTODO INMUNOFLUORESCENTE

Las secciones se descongelaron a TA y se lavaron en TFST de la misma forma que en el método ABC. Como las IHQ dobles se realizaron en tejido fijado con Somogyi y el anticuerpo para PCNA requiere de un tratamiento previo en alcohol, las secciones se trataron con metanol durante 5 min. Previo lavado con TFST, se eliminó la autofluorescencia del tejido tratando las secciones con borohidruro sódico a una concentración de 2.5 g/l en TFS durante 10 min a TA y bajo luz.

Tras eliminar el borohidruro sódico lavando con TFST, se realizó la preincubación con el mismo medio utilizado en el método ABC durante 1 h a TA. Posteriormente se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 1) en el medio de preincubación con DMSO al 1%, durante 12 h a TA. Después de lavar con

TFS, los cortes se incubaron durante 1 h a TA y en oscuridad con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (Tabla 2), diluidos 1:250 en el medio de preincubación sin Triton X-100 para evitar fluorescencia de fondo. A esta incubación se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluido a 1:10000, para poder visualizar todos los núcleos celulares en la sección ya que se une selectivamente al DNA de la célula.

En el caso de las IHQ dobles que incluían el anticuerpo para PCNA, se aumentó la intensidad del marcaje incubando con un anticuerpo secundario biotinilado (Tabla 2) durante 1h a TA en oscuridad, y una incubación en estreptavidina Cy2, que se une a dicho anticuerpo biotinilado (Jackson Immuno Research), diluida 1:200 en TFS durante 2 h a TA en oscuridad.



En ambos casos, las secciones se lavaron en oscuridad con TFS y se montaron con un medio protector de fluorescencia (0.42 g de Glicina, 0.021 g NaOH, 0.51 g de ClNa, 1 ml de Thimerosal 2%, 5 g de N-propil galato; disueltos en 30 ml de agua destilada y 70 ml de Glicerina).

INMUNOHISTOQUÍMICA FLUORESCENTE IN TOTO

La IHQ *in toto* se realizó de forma similar al método inmunofluorescente en sección. Los lavados en tampón fueron más numerosos y frecuentes, además se realizaron en agitación fuerte.

En primer lugar, las retinas se postfijaron con metanol durante 5 min. Previo lavado con TFST, se eliminó la autofluorescencia del tejido con borohidruro sódico a una concentración de 2.5 g/l en TFS durante 30 min a TA y bajo luz.

El borohidruro sódico se eliminó lavando con TFS y, posteriormente, se realizó la preincubación con el mismo medio utilizado en el método ABC durante 2 h a TA. A continuación se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 1) en el medio de preincubación con DMSO al 1% y azida sódica al 0,02% durante 5 d a 4°C. Después de lavar con TFS, las retinas se incubaron durante 12 h a 4°C y en oscuridad con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (Tabla 2), diluidos 1:250 en el medio de preincubación sin Triton X-100. A esta incubación se le añadió DAPI diluido a 1:10000.

Finalmente, las retinas se lavaron en oscuridad con TFS y se montaron con un medio protector de fluorescencia ProLong® Gold antifading.

CONTROLES INMUNOHISTOQUÍMICOS

Su objetivo fue determinar la especificidad de los anticuerpos empleados y fueron los siguientes:

1. Eliminación de los anticuerpos primarios, para determinar la presencia de uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
2. Eliminación de los anticuerpos secundarios, para detectar la posible interacción entre el complejo ABC con los anticuerpos primarios, o la posible autofluorescencia del tejido.
3. Eliminación del complejo ABC, para analizar la presencia de peroxidasas endógenas en el tejido.
4. Eliminación de la Estreptavidina Cy2 en la tercera incubación del marcaje Pax2-PCNA, para analizar la posible autofluorescencia del tejido.

No encontramos marcaje en ninguno de los controles realizados.

ANÁLISIS DEL NERVIO ÓPTICO

Para describir los distintos elementos inmunodetectados a lo largo del NO, dividimos el NO en cuatro partes utilizando la nomenclatura descrita por Lillo *et al.* (1998, 2002): CNO, SIO, QO y TR.

Por otro lado, la CNO se divide en tres regiones diferentes (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009): el DO y las dos zonas intraoculares (IO1 e IO2). En el DO analizamos el área donde los axones de las células ganglionares procedentes de la CFNO giran para entrar al NO. En la zona IO1 analizamos el límite entre la retina y el NO al nivel del límite con la coroides, denominado en mamíferos la membrana de Kuhnt y el tejido intermedio de Jacoby. En la zona IO2, analizamos el área del NO que limita con la esclera y donde discurre la AC, correspondiente a la lámina cribosa en mamíferos (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009).

Las secciones del NO se realizaron tanto longitudinal como transversalmente al mismo y en ambas direcciones: naso-temporal y dorso-ventral.

OBTENCIÓN DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Olympus PROVIS AX70 y un microscopio confocal Leica; y fueron capturadas con el programa informático *Micro CCD* y el programa *Leica Confocal Software*, respectivamente. El tratamiento posterior de las imágenes digitales se realizó con el programa *Adobe Photoshop® CS4*.

Para el análisis estadístico, contamos células de 3 secciones escogidas al azar de cada animal y, a su vez, tomamos tres animales distintos de cada grupo experimental. En cada sección de NO, excluyendo la CNO, seleccionamos al azar tres áreas a lo largo del eje longitudinal, de $4006 \mu\text{m}^2$ cada una y se contaron todas las células de esas tres áreas. Para el análisis de la CNO, contabilizamos todas las células marcadas del área localizada entre los dos bordes de la retina neural próximos a la CNO, excluyendo la AC. Para estandarizar el recuento, se consideraron parámetros como el objetivo bajo el que se hicieron las fotografías, las diferencias entre las zonas del NO a estudiar, el grosor de las secciones ($14 \mu\text{m}$), el número de secciones contadas y las distancias entre las secciones medidas. El recuento se realizó con el programa *Image J*. Mediante el análisis estadístico de la *t de Student*, determinamos las diferencias significativas entre el número de células de cada parte del NO analizada en el animal control. Mediante el análisis estadístico de la *t de Dunnett*, comprobamos las diferencias significativas en el número de células en las distintas partes analizadas del NO de cada grupo experimental respecto al animal control. El nivel de significación se estableció en significativo

(* $p < 0,05$) y altamente significativo (** $p < 0,01$). Se utilizó el programa estadístico SSPS 18.0.

3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Realizamos técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) para analizar las distintas poblaciones gliales existentes en el NO y la retina adyacente a la CNO y el aspecto de los axones del NO, tanto en animales controles como lesionados. También realizamos técnicas de IHQ para MET, con el objetivo de diferenciar la subpoblación de astrocitos positivos a Pax2 del resto de astrocitos existentes en el NO.

Para MET convencional se emplearon 2 animales control y para IHQ para MET utilizamos 2 animales control y 2 animales lesionados de 7 y 21d de supervivencia de cada tipo de lesión.

3.1 PROTOCOLOS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

OBTENCIÓN DEL TEJIDO

La fijación para MET se realizó por perfusión del animal y una postfijación del tejido por inmersión. La solución fijadora para la MET convencional fue una mezcla de PFA-GA (2% de PFA, 2% de glutaraldehído (GA) en tampón cacodilato (TC) 0,1 M a pH 7,4), tanto para la perfusión como para la postfijación. En el caso de la IHQ previa a la inclusión para MET, la solución fijadora utilizada en la perfusión intracardiaca fue Somogyi-GA (PFA al 4%, GA al 0,25% y ácido pícrico al 0,2% en TF), y en la postfijación se utilizó PFA-GA (PFA al 4% y GA al 0,2% en TF).

Una vez finalizado el proceso de fijación, los ojos, cerebro y NO se lavaron bien con TC en el caso del protocolo para MET convencional y con TF para la IHQ preinclusión para MET. En ambos casos el lavado se realizó durante 2 h a TA para eliminar el resto de fijador del tejido. Finalmente, se aislaron los NO junto con la CNO y la retina adyacente a la misma.

PROTOCOLO PARA IHQ PREINCLUSIÓN CON ORO COLOIDAL

Los NO junto con sus CNO y la retina adyacente, se incluyeron en agar al 2,5% y se realizaron secciones transversales de 200 μm de grosor con un vibratomo (Microm HM 650V). Las secciones obtenidas se limpiaron de los restos de agar y se crioprotegieron con glicerol-sacarosa (25% sacarosa y 10% glicerol en TF) durante 12 h a 4°C en agitación. Una vez crioprotegidas, las secciones se sometieron a un proceso de congelación y descongelación con nitrógeno líquido 3 veces para abrir poros en el tejido y facilitar la penetración del anticuerpo. Una vez permeabilizado el tejido, se lavó abundantemente con TF.

Después de los lavados se procedió a una preincubación de las muestras con una mezcla de suero albúmina bovina (BSA) al 4% y gelatina de pez al 0,1% para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo al tejido, y Tween 20 al 0,5% en TFS como detergente para permeabilizar las membranas y facilitar la penetración de los anticuerpos. En este medio se incubaron las muestras durante 2 h en agitación a 4°C. A continuación, se puso el anticuerpo anti-Pax2 a la concentración indicada en la Tabla 1 en el mismo medio, al que se le añadió NaN_3 (0,02%) para evitar la contaminación por hongos. La incubación en el anticuerpo primario se prolongó durante 72 h en agitación a 4°C. A continuación, el tejido se lavó abundantemente con TFS y se puso en el anticuerpo secundario anti-conejo *Ultrasmall* (Aurion) a una concentración de 1:100 marcado con oro coloidal cuyas características se indican en la Tabla 2. La incubación en el anticuerpo secundario se realizó en el mismo medio de bloqueo, con NaN_3 y sin gelatina de pez, durante 48 h en agitación a 4°C. Finalizada dicha incubación, se lavó nuevamente el tejido con abundante TFS.

A continuación, se lavó el tejido con agua destilada y se realizó una intensificación del marcaje de oro coloidal con plata (R-GENT SE-EM, Aurion) durante 45 min a TA. Posteriormente, y tras lavar con agua destilada, se realizó una postfijación en 2% de glutaraldehído (GA) en agua destilada durante 20 min a TA, para ayudar a que ambos anticuerpos y el intensificado con plata quedaran bien unidos al tejido. Después de lavar nuevamente con agua destilada, se postfijó el tejido con una mezcla de tetróxido de osmio y ferricianuro potásico (0,5% OsO_4 y 0,5% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en agua

destilada) durante 20 min en agitación y oscuridad a TA. Finalmente, se lavó el tejido con abundante agua destilada.

INCLUSIÓN

Para MET convencional, se cortó el NO en secciones transversales de distintos tamaños con ayuda de unas tijeras y se postfijaron en una mezcla de tetróxido de osmio y ferricianuro potásico (1% OsO_4 y 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en agua destilada) durante 2 h en agitación y oscuridad a 4°C. Posteriormente se lavaron abundantemente con agua destilada y se procedió a su deshidratación.

Tanto en el protocolo de MET convencional como en el de IHQ preinclusión con oro coloidal, una vez lavado el tejido de la postfijación en osmio, se procedió a preparar el tejido para su inclusión en resina.

En primer lugar, se deshidrató el tejido con gradaciones de etanol ascendentes 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y dos de 100% durante 10 min en cada uno y agitación a 4°C. A continuación, se terminó de deshidratar el tejido con óxido de propileno realizado tres cambios de 10 min cada uno a 4°C y en agitación.

Una vez deshidratado el tejido se procedió a la infiltración del mismo en resina Epon (Embed 812: 20 ml Epon 812, 16 ml DDSA, 8 ml MNA, 0,66 ml DMP-30). Para su mejor penetración antes de la inclusión definitiva, el tejido fue sometido a mezclas de óxido de propileno con resina de la siguiente forma: 1) óxido de propileno:Epon 3:1 durante 1 h; 2) óxido de propileno:Epon 1:1 durante 12 h; 3) óxido de propileno:Epon 1:3 durante 1 h; y 4) dos veces en Epon durante 1 h cada una. Todos estos pasos se realizaron a TA y en agitación.

La inclusión final se realizó en resina Epon. Se colocó el tejido en los moldes definitivos en la orientación deseada y la resina polimerizó durante 12 h en la estufa a 60°C.

TRATAMIENTO DE LAS SECCIONES

De los bloques obtenidos realizamos cortes semifinos de 1 μm de grosor y cortes ultrafinos de entre 50-80 nm de grosor, en un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-

Jung). Las secciones de los NO se realizaron tanto transversales como longitudinales a los mismos.

Los cortes semifinos de las zonas a analizar fueron recogidos de forma seriada en portaobjetos gelatinizados y, posteriormente, fueron teñidos con Azul de Toluidina (0,5% de Azul de Toluidina con 0,5% de tetraborato sódico en agua destilada). En los cortes semifinos se localizó, a microscopía óptica, la zona a analizar ultraestructuralmente y, a continuación se retalló el bloque, delimitando dicha zona para la realización de cortes ultrafinos consecutivos.

Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de ojal de cobre (Electron Microscopy Science), recubiertas con una película de 0,5% colodión en amil acetato; y posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo (2% acetato de uranilo en etanol al 50%) durante 15 min en oscuridad a TA y con citrato de plomo (Merck) durante 10 min a TA en atmósfera sin CO₂ para evitar que precipitara el plomo. Finalmente se lavaron las secciones con abundante agua destilada y se dejaron secar antes de su observación al microscopio electrónico.

OBTENCIÓN DE IMÁGENES

Para la observación y fotografía de las secciones semifinas se utilizó un microscopio Olympus PROVIS AX70 y capturamos las imágenes con el programa informático *Micro CCD*. Las rejillas con las secciones ultrafinas fueron visualizadas en un microscopio electrónico ZEISS-EM 900 con una cámara TRS (*Slow Scan CCD*) acoplada y las imágenes fueron tomadas con el programa informático *ImageSP Viewer*. Las imágenes tomadas se trataron con el programa *Adobe Photoshop® CS4*.

4. TÉCNICAS DE PCR

Utilizamos la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida de retrotranscripción (RT), para comprobar la expresión de los genes *shh* y *pax2a* en la retina y en el NO. Posteriormente, mediante la PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR), analizamos la variación en la expresión génica de *pax2a* (ver resultados) durante la regeneración tras criolesión o pinzamiento.

Se emplearon 6 animales control y 3 animales lesionados de cada tiempo de supervivencia y de cada tipo de lesión.

4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para extraer el RNA total de las retinas y de las CNO hubo que aislarlas previamente. Se evitó la acción de RNasas en estas muestras y en todas las disoluciones acuosas empleadas durante todo el proceso y experimentos posteriores, mediante el uso de agua milliQ libre de RNasas. Asimismo, para evitar la actuación de estas enzimas, el material quirúrgico empleado se trató con etanol 70% en agua milliQ libre de RNasas.

Una vez anestesiado, el animal se decapitó con unas tijeras. A continuación, se fue retirando el cráneo dejando al descubierto el encéfalo y los dos ojos. Posteriormente, se separaron cuidadosamente del cráneo los dos ojos unidos por sus respectivos NO al encéfalo, cortando el tejido conjuntivo, los nervios del tronco encefálico y el hueso necesarios para aislarlos. Seguidamente, bajo la lupa y en una placa con TF se aislaron las CNO y las retinas. Cada retina se colocó individualmente en un tubo con 1 ml de *Trizol*® (Invitrogen). En el caso de las CNO se dispusieron 6 muestras por tubo.

4.2 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

El RNA total de las CNO fue purificado utilizando columnas de Qiagen (RNeasy® Mini Kit, Qiagen), que permiten aislar de forma eficaz el RNA total de muestras con poca cantidad de tejido y que son difíciles de homogeneizar por su alto contenido en tejido conjuntivo. Dado que las retinas contienen mayor cantidad de tejido y tienen un bajo contenido en tejido conjuntivo, el RNA total se obtuvo por el método del *Trizol*® (Invitrogen).

PURIFICACIÓN POR COLUMNAS

En primer lugar, inmediatamente extraídas, las CNO, se sumergieron en sus respectivos tubos en nitrógeno líquido a -180°C . Una vez congeladas, se trituró el tejido con ayuda de unos micropistilos (Eppendorf®); a continuación, se les añadió 600 μl de RLT- β -Mercaptoetanol (incluido en el *kit*) y se procedió a la homogenización del tejido con ayuda de los mismos micropistilos.

Una vez homogenizado el tejido, se realizó una primera centrifugación a 20800 xg durante 3 min y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo, descartando el precipitado con todos los restos de NO no homogenizado. Al sobrenadante se le añadieron 600 µl de etanol 70% libre de RNAsas y se mezcló pipeteando. Se transfirieron 700 µl de mezcla a la columna y se centrifugó a 8000 xg durante 20 s, quedando el RNA retenido en la membrana de la columna. El tampón recogido en la columna colectora se descartó, al igual que los diferentes tampones de lavado utilizados posteriormente. A continuación, se realizaron varios lavados con tampones incluidos en el *kit*, seguidos igualmente de una centrifugación a 8000 xg durante 20 s. Para asegurarse del secado del RNA total retenido en la membrana, se cambió la columna colectora y se centrifugó durante 1 min a 20800 xg. Finalmente, se trasladó la columna a un tubo limpio y se añadieron 30 µl de agua libre de RNAsas. Para favorecer la dilución del RNA en el agua, se mantuvo la columna junto con el agua durante 10 min antes de centrifugar de nuevo. Mediante una centrifugación de 1 min a 10000 xg, el RNA total se liberó de la membrana quedando recogido en el tubo. Todo el proceso se realizó a TA.

Las muestras de RNA total se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

PURIFICACIÓN POR TRIZOL

Las retinas se homogenizaron con ayuda del *Polytron®* a una concentración final de 1 ml de *Trizol* por 100 mg de tejido y se incubó durante 5 min a TA. A continuación, se realizó una extracción selectiva del RNA total por separación de fases mediante la adición de cloroformo (200 µl de cloroformo por cada ml de *Trizol*). Se mezcló vigorosamente, se incubó durante 5 min a TA y finalmente se centrifugó a 12000 xg durante 15 min a 4°C. El RNA retenido en la fase acuosa, se traspasó a un tubo nuevo y se precipitó con 1 ml de isopropanol, incubando 10 min a TA y centrifugando a 12000 xg durante 10 min a 4°C. Para facilitar la visualización del precipitado se añadieron 2 µl de glicógeno (20 mg/ml, Roche) junto con el isopropanol. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol 70% en agua libre de RNAsas y se precipitó nuevamente a 7000 xg, durante 5 min a 4°C. Después de secar al aire el precipitado, se resuspendió en 15 µl de agua libre de RNAsas incubando durante 10 min a 60°C para su óptima disolución.

Las muestras de RNA se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

TRATAMIENTO CON DNAsas

El RNA total purificado, en ocasiones, puede tener restos de DNA genómico. Para evitar este problema, todas las muestras se trataron con DNasa (TURBO DNA-free™ Kit, Applied Biosystems).

En primer lugar se añadieron a cada tubo con muestra de RNA 0,1 volúmenes de tampón suministrado por el *kit*, quedando a una concentración de 1x y 1µl de enzima DNasa I. La mezcla se incubó a 37°C durante 25 min. A continuación, se añadieron a cada tubo 0,1 volúmenes de agente inactivador de DNasa, se mezcló pipeteando y se incubó durante 2 min a TA agitando ocasionalmente. Finalmente se centrifugó a 10000 xg durante 1,5 min y se transfirió el RNA recogido en el sobrenadante a un tubo nuevo.

Las muestras de RNA total se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

La cuantificación del RNA total se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza del mismo mediante la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀), en un espectrofotómetro (Nanophotometro, IMPLEN). La concentración de RNA total en las muestras de CNO osciló entre los 20 y 160 ng/µl. En las retinas la concentración varió entre los 1 y 2 µg/µl.

4.3 RETROTRANSCRIPCIÓN

Se realizó una RT del RNA total para obtener el DNA complementario (cDNA), a partir del cual se realizaron los experimentos de expresión génica. La cantidad de RNA total utilizado en cada reacción fue de un 1 µg.

PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN

Para la RT se utilizó el Kit ImPromII™ Reverse Transcription System (Promega), empleando hexámeros de secuencias al azar como cebadores. El proceso se llevó a cabo en un termociclador (Primus, MWG-Biotech). En primer lugar, el RNA total de cada muestra con los cebadores (25 ng/µl) se incubó 5 min a 70°C para la desnaturalización de los mismos, y se enfrió a 4°C durante 5 min. A continuación, se añadió el tampón ImPromII™ (1x), el cloruro de magnesio (MgCl₂ 3 mM), los desoxinucleótidos trifosfato (0,5 mM cada uno de los cuatro tipos: dATP, dGTP, dCTP y dTTP), el

inhibidor de ribonucleasas (1 U/ μ l) y la transcriptasa reversa (1 U), todo ello diluido en agua libre de RNasas hasta un volumen final de 20 μ l. Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la RT son las siguientes: anillamiento de los cebadores a 25°C durante 5 min, síntesis de cDNA a 42°C durante 1 h e inactivación de la enzima a 70°C durante 15 min. El cDNA se almacenó a -20°C para su posterior uso.

CUANTIFICACIÓN DEL cDNA

Nuevamente se cuantificó las concentración de cDNA, midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza del mismo mediante la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm (A260/A280) en un espectrofotómetro (Nanophotometro, IMPLÉN). La concentración de cDNA en las muestras de CNO osciló entre los 20 y 160 ng/ μ l. En las retinas la concentración fluctuó entre los 1 y 2 μ g/ μ l.

4.4 PCR

DISEÑO DE CEBADORES

Las secuencias de los cebadores para detectar la expresión de *pax2a* de pez cebra se tomaron de Pfeffer *et al.* (1998); y las secuencias de los cebadores de β -actina de pez cebra y de *rRNA 18s* de carpín, se tomaron de Cid (2006). El resto de cebadores se diseñaron mediante el programa informático *Custom Primers-OligoPerfect™ Designer* de Invitrogen (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>), basándonos en las secuencias de cDNA publicadas para carpín en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>). Todos se ajustaron a valores aproximados de 20 nucleótidos de longitud, 50% de G+C, 60°C de temperatura de fusión (tf) y un producto de amplificación de 90-150 pares de bases (pb). Salvo para *shh*, el resto de los cebadores fueron interexónicos, constituyendo una prueba de posible contaminación de DNA genómico. La especificidad de las secuencias seleccionadas como cebadores se comprobó con el programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabla 3).

<i>Gen</i>	<i>Nº GenBank sp</i>	<i>Secuencia 5'-3'</i>	<i>Posición</i>
<i>pax2a</i>	NM_131184 dr	S: GCAGCCTTTCCACCCATCCTC A: GCTCTGGCTTGATGTGTTCTG	933-953 1291-1271
<i>pax2a_t2</i>	ca	S: CCCGTGGGGTCCTACTCTAT A: AGCCATCTGAACCATCATCA	100-119 171-190
<i>shh</i>	AY471608.1 ca	S: CCACTACGAGGGAAGAGCTG A: TCCAGCTTCCACAGCTAACC	296-315 367-386
<i>18s*</i>	EF189737 ca	S: ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG A: AACGCCACTTGTCCTCTAA	991 1118
<i>EF1α*</i>	AB056104.1 ca	S: ATGGTGACAACATGCTGGAG A: TCCAGGGCATCAAGAAGAGT	625-644 714-733
<i>β-actina*</i>	NM_131031 dr	S: ACGACCCAGACATCAGGGAG A: CCTCTCTTGCTCTGAGCCTCA	161-180 241-221

Tabla 3: Relación de los cebadores empleados. Para cada gen estudiado se indica la secuencia de los cebadores *sentido* (S) y *antisentido* (A), el número de acceso en GenBank y la especie (sp: dr, *Danio rerio* y ca, *Carassius auratus*) de la secuencia de cDNA (DNA copia) empleada para el diseño y, finalmente, la posición del cebador en dicha secuencia en GenBank. *rRNA 18S**, *EF1 α ** y *β -actina** son los genes utilizados como gen de referencia en las qPCRs. *Pax2_t2* hace referencia a la isoforma transcrita 2 como se verá en los resultados.

PCR

Para comprobar la expresión de los genes *pax2a* y *shh*, se empleó cDNA de animales control. A cada reacción se añadieron 50 ng de cDNA, tampón Green GoTaq® Flexi Buffer (1x), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (0,1 mM cada uno de los cuatro tipos), cebadores S y A (0,3 pmol/μl cada uno, Tabla 3) y la enzima GoTaq® DNA

Polymerase (0,025 U/ μ l), todos ellos de Promega, y se completó con agua libre de RNasas hasta un volumen final de 25 μ l.

El programa de amplificación empleado en el termociclador fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min; 35 ciclos de amplificación de 94°C durante 30 s, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; la extensión final se realizó a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

En cada experimento se realizó un control negativo con agua y un control negativo con la muestra de control negativo de la RT, para comprobar que el producto de amplificación de PCR no se debe a una contaminación y, un control de carga, donde se amplificó parcialmente el cDNA de la β -actina.

ELECTROFORESIS

Para visualizar el producto amplificado, este se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Low Melting, Pronadisa) de una concentración del 2%. Como tampón de electroforesis se empleó TBE 0,5x (TBE 1X: Tris base 1,08%, ácido bórico 0,55% y EDTA 2 mM a pH 8, en agua miliQ hasta completar 1 l). En el gel se añadieron 0,4 μ l/ml de bromuro de etidio (Sigma), para poder visualizar los fragmentos de DNA amplificado con una lámpara de luz UV (BIO RAD). Como marcador de peso molecular se empleó Pbr322 DNA-Msp I Digest (BioLabs). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 40 min.

4.5 SECUENCIACIÓN

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

En el caso del gen *pax2a*, hubo que aislar las bandas obtenidas para su posterior secuenciación (ver resultados). Las bandas se aislaron y se purificaron usando el sistema comercial de extracción de bandas por columnas (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen).

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se pesó cada banda y se añadió 6 veces su peso de tampón QG medido en μ l suministrado por el *kit*, y se incubó durante 10 min a 50°C para conseguir la completa disolución del gel en el medio QG. A continuación,

se añadió un volumen en μl de isopropanol del peso de cada banda y se mezcló mediante un vórtex. Todo el contenido de la disolución se transfirió a una columna y se centrifugó a 17900 xg durante 1 min a TA. El producto de PCR queda retenido en la membrana de la columna, así que se descartó el líquido recogido en la columna colectora después de la centrifugación. Se realizó el mismo proceso durante los siguientes pasos de lavado. A continuación, se añadieron 500 μl de medio QG y se centrifugó a 17900 xg durante 1 min a TA. Luego, se añadieron 750 μl de medio PE suministrado por el *kit*, se incubó durante 5 min sobre la membrana, y se centrifugó nuevamente a 17900 xg durante 1 min a TA. Para asegurarse del secado del DNA retenido en la membrana, se cambió la columna colectora y se centrifugó 1 min a 17900 xg a TA. Finalmente, se trasladó la columna a un tubo limpio y se añadieron 30 μl de medio EB suministrado por el *kit*. Para favorecer la dilución del DNA en el medio EB, éste se incubó en la columna durante 5 min antes de centrifugar nuevamente. Mediante una centrifugación de 1 min a 17900 xg, el DNA se liberó de la membrana quedando recogido en el tubo.

Se comprobó la presencia de DNA mediante electroforesis, cargando 7 μl de banda purificada en tampón de carga Gel Loading Dye Blue (1,2X, BioLabs) y completando con agua milliQ hasta un volumen final de 15 μl .

SECUENCIACIÓN

Las bandas se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca). Para ello se prepararon para cada banda dos tubos con 7 μl de muestra, uno de ellos con el cebador S y el otro con el cebador A específicos del cDNA que se ha amplificado anteriormente por PCR, ambos a una concentración de 0,37 pmoles/ μl .

Las secuencias de carpín se analizaron con el programa de uso gratuito *Chromas 2.0* y se compararon frente a los publicados en la base de datos GenBank de pez cebra utilizando el programa *ClustalW2*. Asimismo, los fragmentos nucleotídicos secuenciados se tradujeron en el adecuado marco de lectura utilizando el servidor *ExpASy Proteomics Server* (<http://www.expasy.ch/>), obteniendo una secuencia parcial aminoacídica, las cuales se compararon con las del pez cebra con el programa *ClustalW2*.

Las secuencias de proteína obtenidas del cDNA de carpín, se alinearon con todas las secuencias aminoácidas de genes ortólogos descritos en distintas especies en la base de datos de GenBank. Los alineamientos obtenidos en ClustalW (<http://clustalw.genome.jp>), se utilizaron para construir un árbol filogenético de proximidad evolutiva.

4.6 PCR CUANTITATIVA

Los experimentos de qPCR permitieron determinar los niveles de expresión de *pax2a_t2* en la CNO de carpín dorado, durante los distintos tiempos de regeneración analizados tras criolesión y pinzamiento. De esta manera, se analizaron las variaciones postlesión del nivel de expresión de *pax2a_t2*, comparando las CNO de los animales lesionados de diferentes tiempos de supervivencia frente a las CNO control (de animales no lesionados). Al realizar un análisis cuantitativo relativo de las qPCRs, tanto para experimentos control como para cada tiempo de supervivencia, se compararon los niveles de expresión de *pax2a_t2* con el nivel de expresión de los genes de referencia *EF1 α* y *rRNA 18s* (Tabla 3).

El método de cuantificación a tiempo real que hemos empleado se basa en la detección continua del producto de PCR mediante el fluoróforo SYBR Green I (Applied Biosystems). Esta molécula se intercala en el surco menor de la doble hélice del DNA, emitiendo un pico de fluorescencia máxima de 520 nm. La intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de DNA de doble cadena generado, dado que la unión es estequiométrica. Se utilizó un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección de fluorescencia (7000 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems) y recoge la señal de fluorescencia emitida al final de cada ciclo de PCR.

PROTOCOLO

El medio con el que se llevaron a cabo las qPCRs estaba compuesto por los cebadores sentido y antisentido (0,4 pmoles/ μ l de S y A, Tabla 3), el *Mastermix*® (contiene todos los elementos necesarios para realizar una PCR además del SYBR Green, Applied Biosystems) y el cDNA de cada muestra a analizar, todo ello disuelto en agua miliQ hasta un volumen final de 20 μ l. De cada muestra de cDNA se realizaron diluciones seriadas de concentraciones conocidas, para determinar su rango dinámico, eficiencia y pendiente de la recta de regresión. Para el análisis de expresión de *pax2a_t2*

y *EF1 α* se realizaron qPCRs con un rango de diluciones seriadas de cDNA de 60 ng, 6 ng y 0,6 ng en cada reacción; y para el análisis de expresión de *rRNA 18s* se utilizaron de 0,01 ng, 0,001 ng, 0,0001 ng y 0,00001 ng. En cada experimento se realizó un control negativo con agua.

El programa de amplificación empleado fue el siguiente: un paso inicial de 50°C durante 2 min, un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min y, 40 ciclos de amplificación de 94°C durante 15 s y de 63°C, 60°C y 62°C para *pax2a_t2*, *rRNA 18s* y *EF1 α* , respectivamente durante 1 min.

Al utilizar una sonda inespecífica (SYBR Green) en las qPCRs, en el programa de la qPCR se debe incluir un análisis de curva de disociación o desnaturalización para comprobar la especificidad del producto de PCR obtenido. La curva de desnaturalización se obtiene al aumentar grado a grado el producto de PCR hasta que se observa que en un determinado grado centígrado se desnaturaliza. Al desnaturalizarse, la fluorescencia emitida por el fluorocromo cae drásticamente. La representación de la derivada primera de la fluorescencia respecto a la temperatura frente a la temperatura, muestra un único pico si amplificó un único producto específico (Fig. 34).

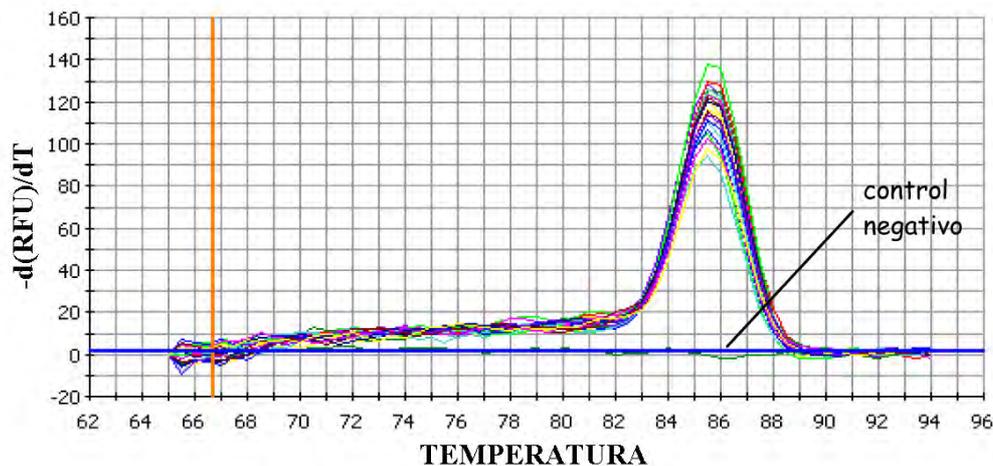


Figura 34: Ejemplo de curva de disociación. Se ha amplificado un solo producto de 85,5°C de temperatura de disociación en todas las muestras, excepto en el control negativo donde no ha habido amplificación. La RFU hace referencia a la medida de la fluorescencia.

CUANTIFICACIÓN

El sistema de cuantificación en la qPCR se basa en el parámetro fundamental denominado el ciclo umbral (Ct). El Ct define el ciclo inicial de amplificación y es inversamente proporcional al número de copias inicial del molde. Asimismo, es el ciclo al cual la fluorescencia es estadísticamente significativa respecto al ruido de fondo (Fig. 35).

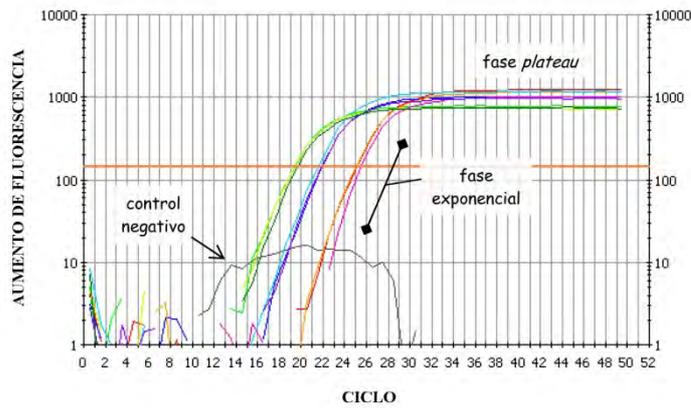


Figura 35: Curva de amplificación, en escala logarítmica, de varias muestras. La línea naranja indica el nivel de fluorescencia tomado para obtener los datos de Ct. Las muestras con mayor concentración de cDNA del gen de estudio (líneas verdes) tienen un Ct, dado que necesitan un número de ciclos menor para alcanzar el mismo nivel de fluorescencia.

Para establecer el rango dinámico, la eficacia y la pendiente de la recta se realizaron al menos tres diluciones distintas, dependiendo del nivel de expresión de cada gen en estudio en la CNO. Asimismo, para asegurar la reproducibilidad y aplicar índices estadísticos, se realizaron tres repeticiones de cada dilución.

A partir de las tres diluciones, se realizó una recta patrón ($Y = a * X + b$), donde se tomó como X el logaritmo en base 10 de la cantidad total de cDNA, y como Y la Ct para cada cantidad conocida (Fig. 36).

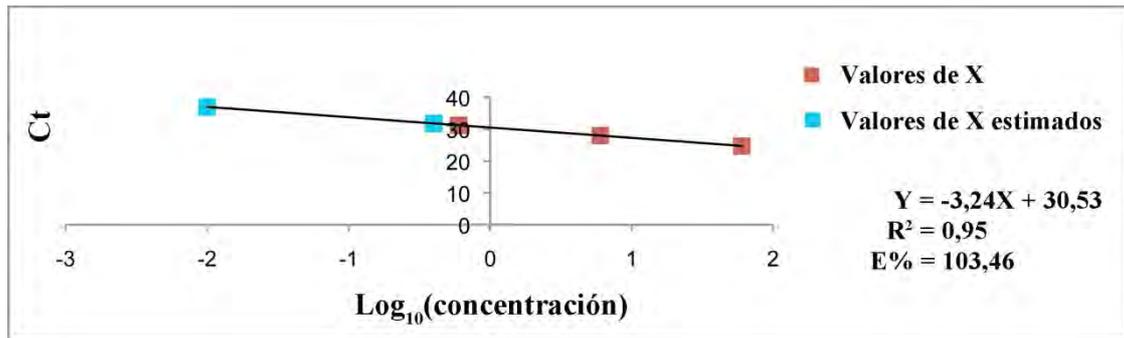


Figura 36: Recta patrón realizada con tres diluciones diferentes de una muestra de cDNA de CNO de animales control que dan tres valores de X (rojo). A partir de la ecuación de la recta ($Y = a * X + b$), se pueden estimar otros valores (azul) que pueden ser comparables con datos del gen de referencia. a=pendiente de la recta, b=punto de corte en el eje Y.

De la recta se obtuvieron tres parámetros importantes: 1) la pendiente de la recta (a), 2) el coeficiente de correlación (R^2), y 3) la eficacia o eficiencia de la reacción (E). La pendiente de la recta siempre osciló entre -3,2 y -3,6. El coeficiente R^2 fue siempre mayor a 0,90. La E se calcula a partir de la pendiente de la recta, y viene determinada por la idoneidad de los cebadores a utilizar por cada muestra a analizar. La eficiencia siempre estuvo próxima al $100 \pm 10\%$.

$$E = [10^{(-1/pendiente)} - 1] * 100$$

ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE EL MÉTODO COMPARATIVO DE LAS Ct

A continuación, procedimos a normalizar las Ct del gen problema (g) y del gen de referencia (r) definiendo el ΔCt para cada grupo experimental.

$$\begin{aligned} \Delta Ct_{\text{control}} &= Ct_r - Ct_g \\ \Delta Ct_{2d} &= Ct_r - Ct_g \\ &\dots \\ \Delta Ct_{90d} &= Ct_r - Ct_g \end{aligned}$$

A continuación, para establecer la cuantificación relativa de los distintos tiempos de supervivencia respecto al grupo control, se aplicó una segunda normalización con la siguiente fórmula

$$\begin{aligned} \Delta \Delta Ct_{\text{control}} &= \Delta Ct_{\text{control}} - \Delta Ct_{\text{control}} \\ \Delta \Delta Ct_{2d} &= \Delta Ct_{2d} - \Delta Ct_{\text{control}} \\ &\dots \\ \Delta \Delta Ct_{90d} &= \Delta Ct_{90d} - \Delta Ct_{\text{control}} \end{aligned}$$

propuesta por Pfaffl (2001):

El incremento de la cantidad de DNA diana de cada grupo experimental, en nuestro caso niveles de expresión génica, respecto al grupo control vino finalmente definido por R.

La R obtenida para cada tiempo de supervivencia constituyó un número adimensional, comparable con el resto de los tiempos de supervivencia y el grupo control. De esta manera, aplicando el análisis estadístico de la *t de Student* se determinaron

$$\begin{aligned}
 \mathbf{R}_{\text{control}} &= \mathbf{E}^{-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{control}}} = \mathbf{E}^0 = \mathbf{1} \\
 \mathbf{R}_{2\text{d}} &= \mathbf{E}^{-\Delta\Delta\text{Ct}_{2\text{d}}} < +\infty \\
 &\dots \\
 \mathbf{R}_{90\text{d}} &= \mathbf{E}^{-\Delta\Delta\text{Ct}_{90\text{d}}} < +\infty
 \end{aligned}$$

las diferencias significativas en el nivel de expresión de cada gen a lo largo de la lesión. El nivel de significación se estableció en significativo (*p<0,05) y altamente significativo (**p<0,01). Se utilizó el programa estadístico de SPSS 18.0.

Resultados

1. EL NERVIÓ ÓPTICO CONTROL

Mediante técnicas de IHQ hemos estudiado la organización y la distribución celular utilizando los distintos marcadores descritos en el apartado de Material y Métodos (Apdo. 2.2 Marcadores Utilizados), tanto en la CNO como en el SIO de individuos control.

1.1 LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO

ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PAX2⁺

La distribución de las células Pax2⁺ no es homogénea y éstas se localizan principalmente rodeando la CNO, formando un límite con la retina neural en la zona IO1 y con el humor vítreo y la AC en el DO y la zona IO2; el resto de células positivas a Pax2 son escasas y se sitúan entre los axones de las células ganglionares en el DO y la zona IO2 (Figs. 37A-B). La mayoría de estas células Pax2⁺ están concentradas de forma altamente significativa en el DO (**p<0,01; Fig. 38A), comparando su porcentaje con ambas porciones intraoculares en la CNO. Además, no encontramos diferencias significativas entre dichas porciones intraoculares (p>0,05; Fig. 38A). El marcaje Pax2-DAPI revela que en la CNO no todas las células son positivas a Pax2 (Fig. 39A).

En el DO distinguimos dos tipos de células Pax2⁺, de acuerdo con su localización: 1) aquellas que se encuentran formando parte de la glía limitante con la AC y que están íntimamente asociadas a los pies de las células de Müller (Figs. 37A, C; 39B-C, F-G, 40E); y 2) aquellas que no forman parte de la glía limitante, pero que se encuentran próximas a los procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺/GS⁺ (Figs. 37A, D; 39B-C, F-G, 40E). Las células Pax2⁺ de la glía limitante se marcan fuertemente, y muestran un núcleo de morfología fusiforme (Figs. 37C; 39C, G, I, K). Se localizan longitudinalmente a la AC (Figs. 37A, C). Estas células Pax2⁺ muestran, aunque débilmente, características clásicas de los astrocitos del NO de peces, tales como inmunomarcaje positivo al filamento intermedio citoqueratina (Figs. 39H-I) y a la proteína presente en las uniones estrechas ZO1 (Figs. 39J-K). Sin embargo, este marcaje es débil comparado con el presente en el SIO, como se describirá más adelante. Encontramos también astrocitos negativos a Pax2 y positivos a citoqueratina (Fig. 39I) o ZO1 (Fig. 39K). Además, algunas células Pax2⁺ muestran finos procesos GFAP⁺, por

lo que se trata de astrocitos (Figs. 39B-C). En el DO, algunas células Pax2⁺ se localizan próximas y longitudinales a los axones jóvenes de las células ganglionares Zn8⁺ (Fig. 40A).

El segundo tipo de células Pax2⁺ situadas en el DO, se localizan entre la CCG y el límite vitreal de la CFNO (Figs. 37A, D; 39B-C, F-G). Las células positivas a Pax2 en esta zona cambian su morfología de ovals a fusiformes (Figs. 37D; 39C, G). Algunas de ellas se localizan paralelas y otras perpendiculares a los procesos vitreales de las células de Müller, que son positivos a GFAP y a GS (Figs. 39B-C, F-G).

En la zona IO1, las células Pax2⁺ se encuentran organizadas en hileras a lo largo de todo el límite de la CNO con la retina, coroides y esclera (Figs. 37A-B, 40E). Su núcleo es alargado y de tamaño algo menor que aquellas que se encuentran en el DO (Figs. 37E-F). En esta zona, las células positivas a Pax2 presentan procesos débilmente marcados para citoqueratina y para ZO1 (Figs. 39H-J, L), sugiriendo que se trata de astrocitos. Además, detectamos astrocitos Pax2⁻/ZO1⁺ formando parte de dichas hileras de células (Figs. 39I, L). El doble marcaje Pax2-GFAP demuestra que dichas células son astrocitos Pax2⁺/GFAP⁺ (Figs. 39B, D), y algunas se encuentran íntimamente asociadas a los procesos más esclerales de las células de Müller positivos a GS (Figs. 39F-G).

En la zona IO2, observamos células positivas y negativas a Pax2 formando el límite entre el NO y la AC (Fig. 40E). Presentan procesos débilmente marcados para citoqueratina (Figs. 39H-I) y ZO1 (Figs. 39J-K). Algunas de ellas son astrocitos Pax2⁺/GFAP⁺ (Fig. 39E), y todos ellos discurren próximos a los axones jóvenes de las células ganglionares (Figs. 40A-B). En la zona posterior de la CNO, los axones jóvenes Zn8⁺ cambian a una disposición lateral en el NO y modifican su posición de un área restringida en el DO a una distribución más dispersa en el NO, las células Pax2⁺ se encuentran todavía en íntima asociación a los mismos (Fig. 40A). En la región IO2 detectamos también algunas células positivas a Pax2 localizadas entre los axones maduros de las células ganglionares, siendo algunas de ellas astrocitos Pax2⁺/GFAP⁺ (Figs. 39E, 40E).

Como se describe a continuación, en ocasiones por motivos de fijación, el marcaje con GS, muestra células en la CNO distintas a las células de Müller. Estas células GS⁺ nunca co-localizan con Pax2 (datos no mostrados).

ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS S100⁺

Mediante el inmunomarcaje para S100, observamos que las células S100⁺ son escasas respecto al total de células presentes en la CNO marcadas con DAPI (Fig. 41A). Distinguimos dos tipos de células positivas a S100: 1) células con marcaje suave de soma pequeño y sin procesos marcados, y 2) células fuertemente marcadas con somas de mayor tamaño y largos procesos positivos a S100 (Fig. 41A).

Las células de soma pequeño S100⁺, se encuentran fundamentalmente en el DO y en la parte anterior de la zona IO2 (Fig. 41A). Estas células aparecen tanto aisladas como formando parte de grupos de células positivas y negativas a S100; en el DO se organizan fundamentalmente en grupos y en la zona IO2 en hilera (Fig. 41A). Aunque se observan algunas próximas a las células de la limitante glial de la AC, no parecen ser una parte fundamental de la misma (Fig. 41A). Su orientación es longitudinal a los axones de las células ganglionares (Fig. 41A). Con dobles marcajes con GFAP (Fig. 41B) o con ZO1 (Fig. 41E), no observamos ninguna co-localización con este tipo de células positivas a S100. Sin embargo, el doble inmunomarcaje S100-citoqueratina muestra que algunas de las células S100⁺ situadas en el DO presentan un ligero marcaje a citoqueratina en su citoplasma (Figs. 41F-G). También detectamos células S100⁻/citoqueratina⁺ (Figs. 41F-G).

Por otro lado, las células S100⁺ de mayor tamaño y con largos procesos, están presentes en la CNO desde el DO hasta la parte posterior en la zona IO2 (Fig. 41A). Son células que se encuentran aisladas unas de otras y presentan largos procesos (Figs. 41A-B). Aparecen fundamentalmente entre los axones de las células ganglionares, orientadas longitudinales a los mismos. Pocas de estas células positivas a S100 forman parte de la limitante glial de la AC (Figs. 41E, H) y no las encontramos limitando la retina con el NO en la zona IO1 (Figs. 41A-B, F). En secciones más laterales de la CNO, observamos que las células S100⁺ con largos procesos son más numerosas y se disponen en dirección al eje longitudinal del NO (Fig. 41D). En la parte posterior de la CNO, los somas y prolongaciones de las células positivas a S100 adquieren una

disposición transversal al NO (Figs. 41A, D). Esta nueva disposición recuerda a la que adquieren en el SIO, como se verá en el apartado 1.2 del SIO. En sección lateral de la CNO se observa que estas células se encuentran formando un anillo limitando el EP de la retina con el NO (Fig. 41D). El doble inmunomarcaje S100-GFAP pone de manifiesto algunos procesos positivos a ambos marcadores (Figs. 41B-C). Estos procesos presentan co-localización en algunas zonas, sin embargo parte de los mismos son S100⁺/GFAP⁻ y viceversa S100⁻/GFAP⁺ (Fig. 41C). Con el doble marcaje S100-citoqueratina, encontramos algún proceso S100⁺ ligeramente positivo a citoqueratina, aunque no es frecuente (Fig. 41G).

En el DO, ambos tipos de células S100⁺ se encuentran entre los procesos vitreales de las células de Müller positivos a GFAP y GS; sin embargo no muestran una asociación clara con los mismos (Figs. 41B y H).

La IHQ para GS, como se verá a continuación, marca tanto somas como procesos de las células de Müller de la retina. Además, en ocasiones el anticuerpo anti-GS marca levemente somas celulares en la CNO diferentes a las células de Müller (Figs. 41H-I). Estas células GS⁺ aparecen ordenadas en hilera o en grupos desde el DO hasta la parte posterior de la CNO, sin llegar a formar parte de la limitante glial (Fig. 41H). La presencia de estas células en la CNO parece estar determinada por la calidad de la fijación del tejido. Los dobles marcajes con S100 muestran cuatro tipos de células: 1) células de soma pequeño S100⁺ y citoplasma S100⁺/GS⁺, 2) células de soma pequeño S100⁺ y citoplasma S100⁻/GS⁺, 3) células S100⁺/GS⁻ y, 4) células S100⁻/GS⁺ (Figs 41H-I).

Para ver la relación entre las células positivas a S100 y los axones jóvenes, realizamos un doble marcaje con Zn8. Las células S100⁺ presentan una disposición dispersa en la CNO, y no parecen estar organizadas preferentemente en torno a los axones en crecimiento Zn8⁺ (Fig. 40F).

En la CFNO de la retina, también observamos células S100⁺ (Fig. 41J). Éstas presentan un soma alargado y dispuesto longitudinalmente a los axones de las células ganglionares (Figs. 41J-L). De cada polo del soma normalmente parten dos prolongaciones muy finas, que en ocasiones son S100⁺/GFAP⁺ (Figs. 41L). Sin

embargo, las células S100⁺ de la retina no muestran una relación clara con los axones jóvenes Zn8⁺ ni con los vasos sanguíneos (Fig. 41J).

LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Las células de Müller próximas a la CNO establecen una separación entre el NO y la retina.

El marcaje con GFAP pone de manifiesto un proceso de gran tamaño que parte de la CNI, donde se encuentra el soma de la célula GFAP⁺, y se dirige hacia la zona vitreal de la retina donde, junto con el resto de células de Müller, forman la MLI (Fig. 39B). En el caso de la CNO estos procesos, que son especialmente gruesos, alcanzan la AC en el DO y forman parte de la limitante glial (Figs. 39B-C). Aunque levemente, los procesos esclerales de las células de Müller también son positivos a GFAP (Fig. 39B).

Mediante el anticuerpo anti-GS observamos que las células de Müller tienen un soma relativamente grande situado en la CNI (Fig. 39F). Desde su proceso vitreal principal GFAP⁺/GS⁺ parte una elevada cantidad de finos procesos GFAP⁺/GS⁺ que se distribuyen horizontalmente a lo largo de las capas internas de la retina (Fig. 39F). De la misma forma ocurre con los procesos esclerales GFAP⁺/GS⁺ (Fig. 39F). El límite externo de las células de Müller forma la llamada MLE, positiva a ZO1, que termina en el límite retina-NO (Figs. 39J, L). A partir de esa región, son los astrocitos de la limitante glial ZO1⁺ los que presentan dicho marcaje hacia zonas posteriores de la CNO (Figs. 39J, L).

Aunque en el carpín dorado no hemos encontrado células de Müller positivas a S100 (Figs. 41B, H), en algunas ocasiones detectamos procesos S100⁺ entre la CPI de la retina circundante a la CNO (Fig. 41M) y largos procesos S100⁺ dirigidos desde dicha capa hacia la superficie vitreal próxima al DO y paralelos a los procesos vitreales de las células de Müller (Fig. 41M). En general estos procesos S100⁺ no se corresponden con los procesos de las células de Müller GS⁺, sin embargo existen algunas prolongaciones S100⁺/GS⁺ situadas entre los procesos de la CPI (Fig. 41M).

LA MIELINIZACIÓN EN LA CFNO Y LA CNO

Con los anticuerpos anti-MBP y anti-Sox10, amablemente cedidos por el Prof. Appel (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee), hemos observado la disposición

de las fibras mielínicas (MBP⁺) y los oligodendrocitos (Sox10⁺) desde la CFNO de la retina hasta la CNO.

En la retina próxima a la ZPG ya se observan pequeñas zonas de mielinización MBP⁺ en la CFNO (Fig 42A). El marcaje MBP⁺ se va haciendo más abundante hacia las zonas centrales de la retina donde los axones de las células ganglionares convergen en la CNO (Figs. 42B, E). La CNO, a diferencia de la retina, está completamente mielinizada y se marca fuertemente con el anticuerpo anti-MBP (Figs. 42B, J). Mediante dobles marcajes MBP-Zn8 observamos que, tanto en la retina (Figs. 42A, E) como en la CNO junto a la AC (Figs. 42B-C), los axones jóvenes son Zn8⁺/MBP⁻ ya que son amielínicos.

El marcaje con MBP en la retina se presenta con zonas intensamente teñidas y otras marcadas de forma más suave, con un aspecto desordenado en la CFNO (Fig. 42E). En la CNO, sin embargo, el marcaje es mucho más fuerte, observándose vainas de mielina MBP⁺ orientadas longitudinalmente al NO (Fig. 42D).

La IHQ para el factor de transcripción Sox10 marca los núcleos de los oligodendrocitos excluyendo el nucleolo, que son de morfología ovalada o redondeada (Fig. 42F). Como ocurre con el marcador MBP, los oligodendrocitos se detectan en la CFNO de la retina, son muy escasos en zonas próximas a la ZPG (datos no mostrados) y se van haciendo más numerosos en la retina central (Fig. 42F). Las células Sox10⁺ se localizan en todo el espesor de la CFNO, próximas a las células ganglionares y en zonas más vitreales y, aparecen de forma individual pero también formando grupos o hileras (Fig. 42F). En la CNO, los oligodendrocitos son muy numerosos y se organizan en hileras (Fig. 42G). Las células positivas a Sox10 también forman pequeños grupos en el DO y en la parte posterior de la zona IO1 en el límite del NO con la esclera y la coroides (Fig. 42G). No encontramos oligodendrocitos Sox10⁺ formando parte de las limitantes gliales de la AC en el DO y zona IO2, ni en la limitante glial de la retina en la zona IO1 (Fig. 42G).

Cuando, a causa de una fijación más suave, se ven células GS⁺ en la CNO, observamos que todas las células GS⁺ co-localizan con las células Sox10⁺ (Figs 42H-I). Las células Sox10⁺/GS⁺ se organizan en grupos en el DO o en hileras distribuidas por toda la CNO (Figs. 42H-I). Sin embargo, no todos los oligodendrocitos positivos a

Sox10 presentan marcaje para GS, y algunos de ellos son Sox10⁺/GS⁻ (Fig. 42H). En la parte posterior de la CNO en la zona IO1, algunos de los grupos de células Sox10⁺ son positivos a GS y otros negativos a GS (Fig. 42H). Mediante doble marcaje MBP-GS, encontramos que hileras de células GS⁺ se sitúan entre las vainas de mielina MBP⁺ (Figs. 42J-K).

PROLIFERACIÓN EN LA CNO

Para detectar las células que se encuentran próximas a la división celular, realizamos IHQ para la proteína PCNA. Para clasificar los tipos de progenitores existentes en la CNO, combinamos el marcaje de PCNA con Pax2, S100 y Sox10.

Encontramos pocas células proliferativas Pax2⁺/PCNA⁺ en la CNO control. En la porción IO1, estas células se sitúan en el área que forma el límite entre los SF y el NO (Fig.40C). En una zona posterior de la CNO y formando parte de la glía limitante, observamos otro pequeño grupo de células Pax2⁺ en división (Fig. 40C). Por último, en la porción IO2, localizamos algunas células Pax2⁺/PCNA⁺ limitando la AC visibles en sección transversal de la CNO (Fig. 40D).

En cuanto al marcaje para S100-PCNA, detectamos igualmente un número muy reducido de células S100⁺/PCNA⁺ situadas en la parte posterior de la zona IO2 entre los axones de las células ganglionares (Fig. 40G).

La doble IHQ Sox10-PCNA, muestra nuevamente escasas células positivas a Sox10 que van a iniciar procesos de división celular situadas entre los axones de las células ganglionares en la zona IO2 (Figs. 40H-I).

ORGANIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA CNO Y MARCAJE PARA PAX2

Para analizar en profundidad la organización celular de la CNO realizamos un estudio ultraestructural de la misma. A su vez, realizamos una caracterización ultraestructural de las células Pax2⁺.

En el DO encontramos gran cantidad de células próximas al límite entre el vítreo y la AC con la CNO (Figs. 43A-B). Muchas de estas células presentan núcleos eucromáticos de morfología alargada y con indentaciones (Fig. 43C), en su citoplasma

contienen numerosos paquetes de filamentos intermedios y se unen entre ellas mediante desmosomas (Figs. 43C-D), por lo tanto son astrocitos. Parte de estos astrocitos forman la limitante glial y se caracterizan por contener gran cantidad de filamentos intermedios orientados longitudinalmente a la lámina basal (Fig. 43F). Además, observamos algunos grupos de células organizadas en hilera con núcleos heterocromáticos y de morfología redondeada, tratándose de oligodendrocitos (Fig. 43C). También en esta zona observamos células de núcleos eucromáticos y otras con núcleos con cierta heterocromatización que no presentan características típicas de ninguno de los tipos celulares descritos anteriormente (Figs. 43C, E). Son células que presentan unos evidentes retículo endoplasmático rugoso (REr) y aparato de Golgi (AG) en su citoplasma (Fig. 43E). Aunque no es frecuente, se observan pequeñas zonas aisladas de degeneración y células con vesículas fagocíticas pertenecientes a la microglía (Fig. 43C). En esta región, junto a la AC discurren los axones jóvenes amielínicos, cuyo cono de crecimiento se abre paso rodeado de procesos astrocitarios ricos en filamentos intermedios (Figs. 43C, G). Aunque la mayoría de los axones de esta región del DO no están mielinizados, algunos de ellos comienzan a tener una fina capa de mielina (Fig. 43C).

En la zona IO1 se establece el límite entre la retina y el NO (Figs. 44A-B). La limitante glial está constituida por numerosos procesos que presentan gran cantidad de filamentos intermedios en su citoplasma y establecen numerosas conexiones entre ellos mediante desmosomas, pertenecientes a astrocitos (Fig. 44C). Estos procesos astrocitarios presentan un citoplasma oscuro a los electrones y contienen mitocondrias, REr y AG (Fig. 44C); no obstante, también detectamos algunos astrocitos con el citoplasma claro a los electrones, por lo que es probable que sean astrocitos inmaduros (Fig. 44C). El límite establecido entre los astrocitos de la limitante glial y el tejido conjuntivo adyacente no es continuo, sino que ambos tejidos se entrelazan formando numerosas circunvoluciones, siempre separados por la lámina basal. Además, en esta región, dentro del tejido nervioso, es posible encontrar células con un núcleo eucromático, un nucleolo aparente, y un sistema de vesículas bien desarrollado: REr y AG, características típicas de células del tejido conjuntivo (Fig. 44D). Además, también se observan algunas células con gránulos de pigmento en su citoplasma que pueden provenir del EP (Fig. 44E). En la zona IO1, los axones generalmente contienen vaina de

mielina; sin embargo, es posible encontrar algunos axones amielínicos. Ambos poseen grandes mitocondrias (Fig. 44C).

Finalmente, entre los axones, se observan células organizadas en hileras (Figs. 45A-B) que se encuentran empaquetadas por prolongaciones astrocitarias con paquetes de filamentos intermedios en su citoplasma y unidas entre ellos por desmosomas (Fig. 45C). Algunas de estas células muestran un núcleo heterocromático de morfología redondeada y escaso citoplasma alrededor del núcleo (Figs. 45D-E). El citoplasma es oscuro a los electrones y contiene distintos orgánulos celulares: mitocondrias, RE, AG, ribosomas y pequeñas vesículas (Figs. 45D-E). Por todas estas características deducimos que son oligodendrocitos (Fig. 45C). Los axones que rodean a estas células dependiendo de su proximidad al borde en crecimiento, muestran mielinización o no (Fig. 45C).

El marcaje para Pax2 se sitúa de forma precisa y exclusiva en el núcleo de las células, excluyendo el nucleolo (Figs. 46A-C). Además, el único tipo celular positivo a Pax2 que encontramos son astrocitos. Estos astrocitos positivos forman parte de la limitante glial de la AC en el DO (Fig. 46A) y la limitante glial de la CNO con la retina, coroides y esclera en la zona IO1 (Fig. 46C). También detectamos astrocitos Pax2⁺ en zonas internas del DO entre los axones (Fig. 46B). Tanto formando parte de las limitantes gliales (Fig. 46D) como entre los axones de las células ganglionares (Fig. 46E), encontramos astrocitos Pax2⁻. Las características ultraestructurales de todos ellos son similares. Presentan núcleos eucromáticos que pueden tener indentaciones (Figs. 46B, E), y en algunos de ellos es posible visualizar el nucleolo (Figs. 46C, E). En su citoplasma contienen abundantes filamentos intermedios, mitocondrias ovaladas y RE, y se unen entre ellos mediante desmosomas (Figs. 46A, C). Tanto oligodendrocitos (Fig. 46F), células de microglía residente (Fig. 46G) como células cuyos citoplasmas no presentan características de ningún tipo celular descrito anteriormente (Fig. 46H), no presentan marcaje positivo para Pax2.

1.2 EL SEGMENTO INTRAORBITAL

ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PAX2⁺

El SIO es la región donde se encuentran la mayor parte de las células positivas a Pax2 en relación con el resto del NO (**p<0,01) (Fig. 38B y 47A).

En el SIO las células Pax2⁺ están, principalmente, empaquetando los fascículos de axones (Figs. 47B, 48K). En secciones longitudinales, muestran un ordenamiento en hilera (Fig. 47C) con núcleos alargados (Fig. 47D), aunque algunas células situadas entre los axones de las células ganglionares tienen núcleos de forma oval o estrellada (Fig. 47D). Las células positivas a Pax2 se encuentran también formando parte de la limitante glial, tanto del NO como de la AC (Figs. 47C, E), y presentan un núcleo ovalado en sección longitudinal (Fig. 47E). Desde la región anterior del SIO a la posterior, observamos un incremento en el empaquetamiento de los axones (Fig. 47A). Aunque las células Pax2⁺ se encuentran distribuidas a lo largo de todo el SIO, se aprecia una ligera concentración de células localizadas en torno a la zona en crecimiento, donde discurren los axones jóvenes positivos a Zn8 (Figs. 48A-C). Las células positivas a Pax2 en esta zona se encuentran organizadas longitudinalmente a los axones en crecimiento Zn8⁺ (Fig. 48D).

Los astrocitos Pax2⁺ presentan procesos fuertemente marcados con anticuerpos anti-citoqueratina y anti-ZO1, aunque también encontramos astrocitos Pax2⁻/citoqueratina⁺ y Pax2⁻/ZO1⁺ (Figs. 48E-G, 48K). A diferencia de la CNO, en el SIO, se aprecia un gran incremento en el marcaje de citoqueratina y ZO1, mientras que el inmunomarcaje para GFAP desaparece (datos no mostrados).

La IHQ para la detección de la GS demuestra, por primera vez en el carpín dorado, células GS⁺ claramente marcadas en el SIO, a diferencia de la CNO en que su presencia depende del grado de fijación del tejido. Aunque tanto las células Pax2⁺ como las células GS⁺ muestran una distribución similar, paralelas a los axones en sección longitudinal (Fig. 48I) y sus procesos GS⁺ rodean los fascículos de axones en sección transversal, nunca encontramos co-localización de ambas proteínas (Figs. 48H-J). Por tanto, hay dos subpoblaciones gliales en el SIO: 1) las células Pax2⁺/GS⁻ y 2) las células Pax2⁻/GS⁺ (Figs. 48H-J). Al igual que las células Pax2⁺, las células positivas a GS muestran modificaciones importantes, tanto en número como en intensidad de marcaje, a lo largo de todo el SIO. Mientras en áreas próximas a la CNO hay muy pocas células GS⁺ y débilmente marcadas (Fig. 48H), en zonas posteriores, encontramos numerosas células fuertemente marcadas (Figs. 48I-J). Tampoco apreciamos diferencias en la distribución de las células GS⁺ entre la zona madura y la zona en crecimiento del SIO (datos no mostrados).

ORGANIZACIÓN DE LAS CÉLULAS S100⁺

En el SIO las células S100⁺ se encuentran formando parte de la limitante glial y empaquetando los fascículos de axones (Figs. 49A-I). Mediante doble IHQ con citoqueratina comprobamos que, tanto en la parte anterior (Fig. 49G) como en la posterior del SIO (Fig. 49H), muchas células son S100⁺/citoqueratina⁺ por lo que pertenecen al grupo de astrocitos reticulares (Figs. 49A-C, G-H), cuyo marcaje es especialmente intenso en aquellos astrocitos S100⁺/citoqueratina⁺ que forman parte de la limitante glial (Fig. 49C). De la misma forma, observamos astrocitos S100⁺/ZO1⁺ que se unen entre ellos mediante zónulas ocluyentes y, como ocurre con el marcaje con citoqueratina, se marcan de manera más intensa aquellos que se sitúan en la limitante glial (Figs. 49F, I). Además, encontramos astrocitos S100⁻/citoqueratina⁺ y S100⁻/ZO1⁺ empaquetando los axones del SIO (Figs. 49G-I) y células S100⁺/citoqueratina⁻ y S100⁺/ZO1⁻ que se encuentran entre los fascículos nerviosos (Figs. 49G-I). Si analizamos el SIO desde la zona anterior (Fig. 49G) hasta la posterior del SIO (Fig. 49H) observamos que el grado de empaquetamiento de los axones va en aumento.

Dobles marcajes GS-S100 muestran que buena parte de las células GS⁺ son positivas a S100 (Fig. 49J). Como ocurre en la CNO, observamos dos tipos de células S100⁺/GS⁺: 1) Células positivas que presentan una co-localización completa (Figs. 49J-K), y 2) células que presentan únicamente co-localización en el soma y parte de su citoplasma y procesos es S100⁻/GS⁺ (Figs. 49J-K). Asimismo, hay células S100⁺/GS⁻ situadas especialmente en la limitante glial, aunque también es posible encontrarlas en el interior del SIO entre los axones de las células ganglionares (Fig. 49J). De la misma forma, también aparecen células S100⁻/GS⁺ entre los axones (Fig. 49J).

LA MIELINIZACIÓN EN EL SIO

La IHQ para MBP, pone de manifiesto la mielinización del SIO (Figs. 50A, D, I). El SIO está completamente marcado con la excepción del borde en crecimiento por donde discurren los axones jóvenes Zn8⁺/MBP⁻ sin mielinizar (Figs. 50A-C, J).

A diferencia de la CNO, los axones mielinizados se encuentran empaquetados en fascículos bien delimitados por los astrocitos que se unen entre sí por zónulas ocluyentes ZO1⁺ (Figs. 50D-F, K).

Con la IHQ para Sox10 marcamos los oligodendrocitos que, en sección transversal del SIO se encuentran distribuidos por todo el grosor del mismo, sin distinguir entre la zona de crecimiento y madura (Figs. 50G-I). La gran mayoría de los oligodendrocitos son Sox10⁺/GS⁺, sin embargo detectamos una pequeña subpoblación Sox10⁺/GS⁻ (Fig. 50L). Las células Sox10⁺/GS⁺ presentan finos procesos GS⁺ que se introducen entre los fascículos de axones MBP⁺ (Figs. 50L-M). Muchas de las células Sox10⁺ se encuentran formando parte de los fascículos nerviosos y son negativas a citoqueratina; sin embargo, otras células positivas a Sox10 se sitúan en el límite de los fascículos y no hemos podido comprobar si son positivas o negativas a citoqueratina (Fig. 50N).

PROLIFERACIÓN EN EL SIO

Mediante la IHQ para PCNA encontramos sólo unas pocas células cercanas a la división celular en el SIO, distribuidas por igual en toda la sección longitudinal del SIO sin diferenciar entre la zona madura y el borde en crecimiento. Con doble marcaje Pax2, S100 o Sox10 con PCNA, no detectamos células Pax2⁺/PCNA⁺ (Fig. 48L) y, sólo muy escasas células S100⁺/PCNA⁺ (Fig. 49L) y Sox10⁺/PCNA⁺ (Fig. 50Ñ), las primeras situadas tanto en la limitante glial como entre los axones, y las segundas únicamente entre los axones.

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS PAX2⁺

Mediante la técnica de IHQ para MET realizamos una caracterización ultraestructural de los astrocitos positivos y negativos a Pax2 en el SIO.

A lo largo del NO, encontramos dos tipos de astrocitos de acuerdo con el grado de empaquetamiento de su cromatina nuclear mostrando ambos la ultraestructura típica de astrocitos. En su citoplasma presentan paquetes de filamentos intermedios y se unen unos a otros por numerosos desmosomas (Figs. 51C, E-F). El núcleo de los astrocitos es, normalmente, de forma irregular y tiene indentaciones (Figs. 51D, E). Estas células forman la limitante glial entre el tejido nervioso y tejido conectivo (Figs. 51A-D) y, también, empaquetan los fascículos de axones en el interior del NO (Fig. 51E-F).

El marcaje para Pax2, al igual que en la CNO, demuestra que esta proteína se encuentra localizada de forma precisa y exclusiva en el núcleo de las células (Figs. 51A, C, E).

En la limitante glial, encontramos astrocitos positivos a Pax2 de los dos tipos: 1) con núcleo eucromático, y 2) con núcleo heterocromático (Figs. 51A, C). También detectamos astrocitos negativos a Pax2 con los dos tipos de empaquetamiento de la cromatina (Figs. 51B, D).

En el interior del NO, los astrocitos reticulares Pax2⁺, que se encuentran empaquetando los axones, muestran un núcleo eucromático (Fig. 51E). En algunos casos, estos astrocitos positivos a Pax2 se localizan empaquetando los axones jóvenes amielínicos (datos no mostrados). Sin embargo, los astrocitos de núcleo heterocromático en estas zonas internas del nervio siempre son Pax2⁻ (Fig. 51F).

1.3 RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS

Los astrocitos del NO se encuentran formando la limitante glial o entre los axones de las células ganglionares, especialmente en el SIO donde se encargan de empaquetar los axones en fascículos.

Los astrocitos de la limitante glial se caracterizan por ser citoqueratina⁺/ZO1⁺ y Pax2⁺, aunque nuestros resultados muestran que algunos de ellos son negativos a Pax2. En la limitante glial en el SIO detectamos muchas células S100⁺, al contrario que lo que ocurre en la CNO en que son muy escasas salvo en la zona posterior de la misma en lo que se empieza a adquirir la organización y marcadores típicos del SIO. Únicamente encontramos células Pax2⁺/GFAP⁺ en la limitante glial de la CNO.

Los astrocitos que se sitúan entre los axones de las células ganglionares son citoqueratina⁺/ZO1⁺ en el SIO, pero no en la CNO. En el SIO, algunos astrocitos citoqueratina⁺/ZO1⁺ co-localizan con Pax2 o con S100. En la CNO detectamos astrocitos Pax2⁺/GFAP⁺, así como células de soma grande y procesos marcados S100⁺/GFAP⁺ y S100⁺/GFAP⁻. Finalmente, tanto en la CNO como en el SIO encontramos células S100⁺/GS⁻ (Tabla 4).

Detectamos escasas células Pax2⁺/PCNA⁺ y S100⁺/PCNA⁺ en la CNO, las primeras se sitúan en la limitante glial de la AC y en el límite con la retina, coroides y esclera con el NO, las segundas se localizan entre los axones. En el SIO no encontramos células Pax2⁺/PCNA⁺, y las células S100⁺/PCNA⁺ se sitúan tanto entre los axones como en la limitante glial.

Finalmente, acompañando a los axones jóvenes Zn8⁺ encontramos numerosos astrocitos Pax2⁺ tanto en la CNO como en el SIO.

ASTROCITOS					
		CNO		SIO	
LIMITANTE GLIAL	Pax2 ⁺ /citoqueratina ⁺				
	Pax2 ⁺ /ZO1 ⁺				
	Pax2 ⁺ /GFAP ⁺	Pax2 ⁺ /GFAP [?]	Pax2 ⁺ /GFAP [?]	-----	-----
	S100 ⁺ /citoqueratina ⁺	S100 ⁺ /citoqueratina ⁺	S100 ⁺ /citoqueratina ⁺	-----	-----
	S100 ⁺ /ZO1 ⁺	S100 ⁺ /ZO1 ⁺	S100 ⁺ /ZO1 ⁺	-----	-----
	-----	-----	-----	-----	-----
ENTRE AXONES	-----	-----	Pax2 ⁺ /citoqueratina ⁺	Pax2 ⁺ /citoqueratina ⁺	Pax2 ⁺ /citoqueratina ⁺
	-----	-----	Pax2 ⁺ /ZO1 ⁺	Pax2 ⁺ /ZO1 ⁺	Pax2 ⁺ /ZO1 ⁺
	Pax2 ⁺ /GFAP ⁺	Pax2 ⁺ /GFAP [?]	Pax2 ⁺ /GFAP [?]	-----	-----
	Pax2 ⁺ /GS ⁻				
	-----	-----	S100 ⁺ /citoqueratina ⁺	S100 ⁺ /citoqueratina ⁺	S100 ⁺ /citoqueratina ⁺
	-----	-----	S100 ⁺ /ZO1 ⁺	S100 ⁺ /ZO1 ⁺	S100 ⁺ /ZO1 ⁺
	S100 ⁺ /GFAP ⁺	S100 ⁺ /GFAP ⁺	-----	-----	-----
	S100 ⁺ /GS ⁻				

Tabla 4: Tipos de astrocitos detectados en la CNO y el SIO en la limitante glial o entre los axones de las células ganglionares. Escasos (rojo), desconocemos si hay (azul), ausencia (rayas).

Formando el límite entre la retina y la CNO se encuentran las células de Müller GFAP⁺/GS⁺; sin embargo, paralelos a los procesos vitreales de las mismas, hemos detectado escasos procesos S100⁺ situados exclusivamente en este límite retina-CNO.

Además, hemos localizado numerosos astrocitos S100⁺/GFAP⁺ y células S100⁺/GFAP⁻ distribuidos por toda la CFNO de la retina.

CARACTERIZACIÓN DE LOS OLIGODENDROCITOS

Los oligodendrocitos no forman parte de la limitante glial y únicamente los encontramos entre los fascículos de axones, tanto en la CNO como en el SIO.

Los oligodendrocitos se caracterizan por ser MBP⁺/Sox10⁺, como se ha descrito previamente en la literatura tanto para ratón como pez cebra. Nuestros resultados muestran que la mayoría de ellos son además GS⁺ y, puesto que todas las células GS⁺ son positivas a Sox10 en los animales control, consideramos la GS como un marcador de oligodendrocitos. Además, como parte de las células S100⁺ co-localizan con GS, podemos proponer que algunos oligodendrocitos presentan dicha proteína (Tabla 5).

Como en el caso de los astrocitos, son escasos los oligodendrocitos Sox10⁺/PCNA⁺ tanto en la CNO como en el SIO.

Finalmente, como ya se ha descrito ampliamente en la bibliografía, los axones jóvenes Zn8⁺ son negativos a MBP dado que no presentan mielinización ni en la CNO ni en el SIO.

		OLIGODENDROCITOS			
		CNO		SIO	
ENTRE AXONES	Sox10 ⁺ /GS ⁺	Sox10 ⁺ /GS ⁻	Sox10 ⁺ /GS ⁺	Sox10 ⁺ /GS ⁻	
	S100 ⁺ /GS ⁺				
	MBP ⁺		MBP ⁺		

Tabla 5: Tipos de oligodendrocitos detectados en la CNO y en el SIO entre las células ganglionares. Escasos (rojo).

2. EFECTOS EN LA CNO DESPUÉS DE LA CRIOLESIÓN

A continuación, mediante técnicas de IHQ estudiamos las modificaciones que sufren los distintos tipos celulares en la CNO tras criolesión.

2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LESIÓN

La criolesión de la ZPG es un tipo de lesión que se ha practicado de forma efectiva en nuestro laboratorio (Cid, 2006; Jimeno, 2001; Lillo, 2001), y permite estudiar el efecto que produce la ausencia temporal de axones jóvenes en las distintas poblaciones gliales de la CNO, cómo ocurre el proceso de regeneración y los elementos implicados en el mismo.

Para comprobar la fiabilidad de nuestra lesión realizamos IHQ para PCNA, que nos permitió detectar las células proliferativas en la zona periférica de la retina. De esta forma, comparando con los resultados obtenidos por Cid (2006), analizamos el proceso de destrucción de la ZPG, y la posterior recuperación de dicha zona a lo largo de los distintos tiempos de supervivencia analizados, hasta alcanzar la organización original. Para facilitar el seguimiento de los resultados durante los distintos tiempos de regeneración, agrupamos los tiempos de supervivencia de la siguiente manera: A) **degeneración y regeneración temprana**, que comprende los tiempos postlesión 2d y 7d; B) **regeneración**, que incluye los tiempos de 15d y 21d postlesión; y C) **regeneración tardía y recuperación de la organización original**, que engloba los tiempos de 30d, 60d, 90d y 120d postlesión.

A) Degeneración y regeneración temprana

En los animales control las células PCNA⁺ se localizan en el límite de la retina constituyendo la ZPG; aunque también es posible observar algunas células positivas a PCNA en las CNI y CNE, correspondientes al linaje de bastones (Fig. 52A). Esta organización y marcaje se pierden por completo a los 2d de la lesión (Fig. 52B). Tanto a los 2d (Fig. 52B) como a los 7d (datos no mostrados), las únicas células positivas a PCNA que se observan en la periferia de la retina se encuentran dispersas o formando pequeños grupos en la zona de la retina adyacente a la zona de lesión (Fig. 52B).

B) Regeneración

A los 15-21d postlesión, tal y como describe Cid (2006), encontramos gran variabilidad en el nivel de regeneración de cada individuo, hecho que se repite en los resultados obtenidos en la CNO que describimos a continuación.

En este período el tejido que sufrió la lesión ya no presenta signos degenerativos. En la ZPG comienzan a observarse células PCNA⁺ aisladas, y en la retina laminada próxima a la misma aparecen grandes columnas de células inmunorreactivas a PCNA que se extienden desde la CNI hacia la CNE donde se encuentran concentradas (Fig. 52C).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

A los 30d postlesión, en la ZPG comienzan a observarse una mayor cantidad de células PCNA⁺, disminuyendo la concentración de células PCNA en la CNE y en las columnas de células marcadas localizadas entre la CNI hacia la CNE (Fig. 52D).

A partir de los 60d postlesión, la periferia de la retina adquiere una organización morfológica similar a la de los animales control. Las células PCNA⁺ se concentran en la ZPG, que aparece de un tamaño mayor a la de los animales control, especialmente en la zona más vitreal correspondiente a las células ganglionares de nueva formación (Fig. 52E). También se observan bastantes células pertenecientes al linaje de bastones, que van desde la CNI hacia la CNE (Fig. 52E).

A los 90 y 120d se observan características similares a las descritas a 60d y, aunque la ZPG está aparentemente recuperada, encontramos una cantidad de células PCNA⁺ ligeramente superior a la que aparece en los animales control, tal y como observó Cid (2006) (datos no mostrados).

2.2. LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO

RESPUESTA DE LAS CÉLULAS PAX2⁺

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 2d postlesión, no encontramos un cambio significativo en el número de células positivas a Pax2 (Fig. 53A). Por el contrario, a los 7d el número de células Pax2⁺ disminuye de forma altamente significativa (**p<0,01) (Fig. 53A). Por otro lado, aunque es difícil de cuantificar, la intensidad de marcaje para Pax2 disminuye tanto a los 2d como a los 7d postlesión (Figs. 54A-C). Sin embargo, no encontramos diferencias en cuanto a la morfología y la localización de las células positivas a Pax2 con respecto a los animales control (Figs. 54A-C).

Mediante la doble IHQ para Zn8-Pax2, normalmente no encontramos axones Zn8⁺ (Fig. 54A) dado que la ZPG se encuentra completamente dañada por la criolesión (Fig. 52B) tanto a los 2d como a los 7d postlesión. En ocasiones, pudimos localizar pequeños fascículos de axones jóvenes Zn8⁺ junto a la AC (Fig. 54B) y, muy raramente, detectamos axones positivos a Zn8 en zonas internas de la CNO, próximas al límite entre la retina y NO en la zona IO1 (Fig. 54C).

Dobles marcajes de citoqueratina, ZO1 y GFAP con Pax2, no muestran variaciones en el marcaje con respecto a los animales control en ninguno de los dos tiempos postlesión.

B) Regeneración

A los 15d postlesión, se recupera el número de células Pax2⁺ con respecto a los animales control; sin embargo, a los 21d se produce un aumento significativo en el número de células (*0,05>p>0,01) (Fig. 53A). Por otro lado, las células marcadas para Pax2 recuperan la intensidad de marcaje que se detecta de forma habitual en los individuos control (Figs. 54D, F). Las células Pax2⁺ se localizan distribuidas en el DO y en las porciones IO1 e IO2, tal y como lo hacen en los animales control. Sin embargo, observamos grupos de células positivas a Pax2 concentradas en la zona posterior de la CNO junto al EP, coroides y esclera (Fig. 54D). La morfología de las células Pax2⁺ no varía con respecto a los animales control; sin embargo, a partir de los 21d se observa que algunas células Pax2⁺, localizadas en el DO junto a los procesos vitreales de las

células de Müller, presentan uno o dos nucleolos muy prominentes que son negativos a Pax2 (Fig. 54E).

Tanto a los 15d como a los 21d, es frecuente encontrar pequeños fascículos de axones jóvenes Zn8⁺ que discurren por la parte más vitreal de la retina y alcanzan la CNO, introduciéndose en el NO situándose junto a la AC (Fig. 54F). Acompañando a los axones Zn8⁺ se encuentran células positivas a Pax2 (Fig. 54F).

Los dobles marcajes de Pax2 con ZO1, citoqueratina y GFAP no muestran variaciones con respecto a los individuos control. Sin embargo, detectamos algunas células citoqueratina⁺ fuertemente marcadas, y negativas a Pax2, en la zona posterior de la CNO entre los axones de las células ganglionares ausentes en control y en el período de supervivencia analizado previamente (Fig. 54G).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

A los 30d postlesión, el número de células Pax2⁺ es superior, de forma altamente significativa (**p<0,01), con respecto a los animales control (Fig. 53A). Sin embargo, desde los 60d hasta los 120d postlesión, el número de células Pax2⁺ permanece similar a los animales control (p>0,05) (Fig. 53A). Además, dichas células conservan su intensidad de marcaje, morfología y distribución, tal y como se describen en el animal control. Sin embargo, a los 30d después de la lesión todavía se observan células Pax2⁺, con uno o dos grandes nucleolos negativos a dicho marcador, situadas en el DO junto a los procesos vitreales de las células de Müller (Fig. 54H). A los 60d postlesión ya no se observan nucleolos llamativos. Por el contrario, a los 60d postlesión, todavía es posible detectar algunas células Pax2⁺ localizadas en la zona posterior de la CNO fuera del NO pero junto a él, entre el EP, la coroides y la esclera (Fig. 54L), tal y como ocurre a los 21d postlesión. Estas células ya no las encontramos a partir de los 90d postlesión.

Durante este período de regeneración tardía, en la ZPG se forman numerosas células ganglionares cuyos somas y axones son Zn8⁺ (Fig. 54I). A los 30d postlesión, la zona de generación de células ganglionares en la ZPG ocupa una importante extensión (Fig. 54I), pero su tamaño se va reduciendo a lo largo de los siguientes períodos de regeneración analizados. No obstante, a los 120d postlesión sigue siendo ligeramente de mayor tamaño que en los individuos control (Fig. 54J). En la CNO, los fascículos de

axones jóvenes $Zn8^+$ que alcanzan la CNO son más numerosos que a los 15-21d postlesión. A los 90d postlesión, son muy numerosos y discurren principalmente junto a la AC; también se observan pequeños fascículos $Zn8^+$ que se encuentran en zonas internas de la CNO, próximos al límite entre la retina y el NO (Fig. 54K). A los 120d, el aspecto de los axones en crecimiento positivos a $Zn8$ es similar a los individuos control.

Al igual que ocurre durante todo el periodo de regeneración tras criolesión, no observamos diferencias en el doble marcaje para ZO1 y GFAP con el inmunomarcaje para Pax2 (Fig. 54L). El marcaje para citoqueratina, también es similar a los animales control y no detectamos las células citoqueratina⁺ descritas en el apartado anterior.

Hay que señalar que, aunque la mayoría de los animales presentan características similares relativas a su tiempo de supervivencia, algunos individuos muestran características correspondientes a tiempos de supervivencia inferiores, lo que supone un retraso en el proceso de regeneración.

RESPUESTA DE LAS CÉLULAS S100⁺

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 2d postlesión, no observamos cambios en cuanto a los tipos de células S100⁺ y su distribución descritas en los animales control.

Sin embargo, a los 7d postlesión la CNO se observa completamente ocupada por procesos S100⁺, pertenecientes a las células S100⁺ de mayor tamaño y fuertemente marcadas. Estas células y sus procesos se disponen principalmente longitudinales al NO y aparecen tanto junto a los límites de la CNO con la AC y la retina como entre los axones de las células ganglionares (Fig. 55A-B). Además, la cantidad de procesos marcados es especialmente grande en la limitante del NO en la parte posterior de la CNO (Fig. 55A). En ocasiones, se encuentran asociadas a los procesos vitreales GFAP⁺ de las células de Müller, adquiriendo una disposición longitudinal a los mismos (Fig. 55B). Al igual que ocurre en los individuos control, en raras ocasiones observamos procesos S100⁺/GFAP⁺ entre los numerosos procesos S100⁻/GFAP⁺ (Figs. 55A-B). En algunos animales, a los 7d postlesión se observa un anillo de células S100⁺ que rodea la parte posterior de la CNO. Este anillo presenta co-localización parcial con GS (Fig. 55C) y los procesos celulares se dirigen hacia el interior del NO.

Al igual que ocurre en individuos control, tanto a los 2d como a los 7d postlesión encontramos células S100⁺ de menor tamaño suavemente marcadas situadas preferentemente en el DO formando pequeños grupos (Fig. 55B).

En la ZPG criolesionada, a los 7d postlesión se observan células S100⁺ que se sitúan en el límite entre la retina no lesionada y la zona dañada, y otras células positivas a S100 se localizan dispersas por la zona desorganizada debido a la lesión (Fig. 55D). Estas células presentan procesos cortos y sin una disposición clara. A lo largo de toda la retina, desde la zona próxima a la lesión hasta la CNO, se observan numerosas células positivas a S100 situadas en la CFNO, con la misma disposición y características que se describen en los individuos control. En torno a la CNO encontramos gran cantidad de estas células S100⁺ (Fig. 55E).

B) Regeneración

A los 15-21d postlesión, todavía detectamos numerosas células S100⁺ con largos procesos marcados distribuidos por toda la CNO, aunque no de forma tan llamativa como a los 7d postlesión (Fig. 55F). También encontramos células levemente positivas a S100 situados fundamentalmente en el DO, tal y como ocurre en los individuos control (Fig. 55H).

Como ya observamos en algunos individuos durante la regeneración temprana, a los 21d aparece un anillo de células S100⁺ rodeando la parte posterior de la CNO, cuyo soma se sitúa próximo al límite con la retina, y sus procesos, ligeramente GFAP⁺, se dirigen hacia el interior de la CNO (Fig. 55G). Mediante cortes consecutivos, comprobamos que estas células son S100⁺/GFAP⁺/GS⁺ (Fig. 55F, H), pero son negativas para Pax2 (Fig. 54D). Por encima de este anillo de células, encontramos hileras de células GFAP⁺ (Fig 55F), S100⁺ (Fig. 55F, H) y Pax2⁺ (Fig. 54D).

A los 15-21d postlesión, en la ZPG aparecen numerosas células ganglionares Zn8⁺ nuevas que emiten sus axones hacia el centro de la retina (Fig. 55I). También se detectan pequeños fascículos de axones positivos a Zn8 que describen trayectorias anómalas (Fig. 55I). Entre los numerosos axones jóvenes Zn8⁺ encontramos abundantes células S100⁺, a diferencia de las retinas control en que son más escasas. Estas células tienen aspecto fusiforme y algunas de ellas acompañan a los axones Zn8⁺, tanto a los que están orientados correctamente como los que presentan trayectorias anómalas (Fig.

55I). Aunque no siempre parecen tener una relación clara con los axones. Además, en la retina laminada próxima a la ZPG encontramos algunas células S100⁺ cuyo soma se sitúa en la CFNO y emiten sus procesos hacia capas internas de la retina (Fig. 55I-J). En el resto de la retina encontramos numerosas células S100⁺ con distribución y orientación similar a las descritas en los animales control.

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

Desde los 30d hasta los 120d postlesión, la organización y apariencia de las células S100⁺ en la CNO es similar a los individuos control (Figs. 55K-L). Encontramos tanto células de somas pequeños levemente marcadas y situadas preferentemente en el DO, como pocas células de somas de mayor tamaño y con procesos fuertemente marcados, distribuidas por toda la CNO.

A los 60d postlesión, se observan escasas células positivas a S100 en la zona donde se situaba el anillo externo que rodea la CNO posterior descrito durante el periodo de regeneración (Fig. 55K). Este anillo no se observa a los 120d postlesión.

Con dobles marcajes S100-GS, tal y como se describe en control, en algunos animales durante todo el período de regeneración se observan células S100⁺/GS⁺ organizadas en hilera o en grupo (Fig. 55L). En algunas de estas células co-localizan ambos marcadores, otras presentan un citoplasma S100⁻/GS⁺ (Figs. 55L-M). En la CNO, también detectamos células S100⁺/GS⁻ y viceversa S100⁻/GS⁺ (Fig. 55L).

En este período postlesión, la ZPG adquiere una organización similar a la control, sin embargo, podemos observar células S100⁺/GFAP⁺ próximas a la ZPG, cuyo soma se sitúa en la CFNO y sus procesos discurren hacia las capas externas de la retina (Fig. 55N).

RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN LA CNO

Las células de Müller que rodean a la CNO sufren desorganización en sus procesos vitreales a lo largo de todo el período de regeneración. Tanto con el marcaje con GFAP (Fig. 55F) como con GS (Fig. 54D), a partir de los 15-21d postlesión se observa menor cantidad de procesos que cruzan la CFNO y alcanzan la superficie

vitreal del DO. Sin embargo, a los 60d postlesión, son numerosos los procesos vitreales GFAP⁺/GS⁺ de las células de Müller que atraviesan, paralelos unos a otros, la CFNO y limitan el DO con el vítreo (Figs. 54L, 55K-L). A los 120d postlesión, el aspecto de las células de Müller es similar a los individuos control (datos no mostrados).

Tal y como describimos en individuos control, en el DO encontramos procesos de las células de Müller S100⁺/GFAP⁺/GS⁺ a los 21d postlesión (Figs 54D, 55F, H). Estos procesos discurren desde la CPI de la retina adyacente al NO y se dirigen hacia la superficie vitreal del DO. Sin embargo, durante este periodo de regeneración son mucho más llamativos y no alcanzan la MLI, sino que se dirigen hacia el interior del NO por la CFNO (Figs 54D, 55F, G). A los 60d postlesión se recupera la organización original.

RESPUESTA DE LOS OLIGODENDROCITOS Y ALTERACIÓN EN LA MIELINIZACIÓN

A) Degeneración y regeneración temprana

Nuevamente, a los 2d postlesión no encontramos modificaciones en el marcaje IHQ para la mielina. Sin embargo, a los 7d de supervivencia se observan numerosas zonas distribuidas por toda la CNO, donde ha disminuido o incluso desaparecido el marcaje para MBP tanto desde zonas próximas a donde discurren los axones jóvenes junto a la AC como zonas adyacentes a la retina (Fig. 56A).

Mediante el marcaje con Sox10 encontramos que tanto a los 2d como a los 7d postlesión los oligodendrocitos Sox10⁺ se encuentran dispuestos de forma similar a los individuos control en la CNO. Se organizan en hileras entre los axones de las células ganglionares o formando pequeños grupos en el DO. En la parte posterior de la CNO en la zona IO1, al igual que en control, detectamos grupos de células positivas a Sox10 próximas a procesos GS⁺ (Fig. 56B).

B) Regeneración

A los 15-21d postlesión, observamos numerosas zonas con escaso o nulo marcaje para MBP distribuidas por toda la CNO, igual que ocurre a los 7d de supervivencia (Fig. 56C). La zona por donde discurren los axones jóvenes permanece sin mielinizar y es negativa a MBP (Fig. 56C).

Los oligodendrocitos positivos a Sox10 continúan presentes en la CNO, y se organizan en hileras entre los axones de las células ganglionares o formando grupos principalmente localizados en el DO (Fig. 56D). Cuando el marcaje con GS aparece en las células de la CNO en éstas, como ocurre en el control, co-localiza con Sox10, aunque una pequeña subpoblación de células Sox10⁺ son negativas a GS (Fig. 56D), al igual que ocurre en el control. En la parte posterior de la CNO, en la zona IO1, detectamos numerosas células Sox10⁺ entre abundantes procesos GS⁺ (Figs. 56D-E).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

Desde los 30d hasta los 120d, la mielinización MBP⁺ de la CNO recupera el aspecto similar al de los individuos control. Únicamente las zonas próximas a la AC, por donde discurren los axones jóvenes, son las que presentan ausencia de marcaje para MBP en la CNO, tal y como ocurre en control (Fig. 56F).

Durante los tiempos de supervivencia desde 30d hasta 120d, como ocurre durante todo el periodo de regeneración, la disposición de los oligodendrocitos Sox10⁺ no cambia. En la parte posterior de la CNO, en la zona IO1, se conserva un pequeño grupo de células Sox10⁺ situado entre procesos GS⁺, más reducido y con prolongaciones GS⁺ menos numerosas que en tiempos de supervivencia cortos, adquiriendo una apariencia similar a la situación control (Fig. 56G).

MODIFICACIONES EN LA PROLIFERACIÓN

A) Degeneración y regeneración temprana

Tal y como ocurre con otros elementos analizados en la CNO, a los 2d postlesión no encontramos cambios significativos ni en el número de células PCNA⁺ (Fig. 53B) ni en su distribución. Con dobles marcajes con Pax2, detectamos escasas células Pax2⁺/PCNA⁺ que se localizan, al igual que en los individuos control, en la zona IO1 y junto a la AC. De la misma forma, en la doble IHQ PCNA-S100 a los 2d postlesión encontramos escasas células doblemente marcadas igual que los animales control. En cuanto al doble marcaje Sox10-PCNA, no encontramos ninguna co-localización a los 2d de supervivencia.

Por el contrario, a los 7d tras criolesión en la CNO, observamos un aumento altamente significativo (** $p < 0,01$) de células positivas a PCNA (Fig. 53B). Estas células, aunque se encuentran distribuidas por toda la CNO, se concentran principalmente en grandes grupos en el DO y la zona IO2 junto a la AC (Fig. 57A). Dobles marcajes Pax2-PCNA muestran escasa co-localización y fundamentalmente en la zona IO1 en el límite retina-NO, aunque también encontramos alguna en el DO junto a la AC (Fig. 57A).

Con dobles marcajes S100-PCNA, a los 7d postlesión detectamos unas pocas células S100⁺/PCNA⁺, localizadas entre los axones de las células ganglionares tanto en zonas anteriores como posteriores de la CNO (Fig. 57B-C).

Con la doble IHQ para Sox10-PCNA, a los 7d de supervivencia no observamos ninguna co-localización (Fig. 58A).

B) Regeneración

Al igual que a los 7d, a los 15d postlesión el número de células PCNA⁺ es altamente significativo (** $p < 0,01$) (Fig. 53B). A los 21d, aunque el número de células en división disminuye respecto a los 7-15d postlesión, sigue siendo altamente significativo respecto a los individuos control (** $p < 0,01$) (Fig. 53B).

Con los dobles marcajes con Pax2-PCNA, a 15d y 21d encontramos con mayor frecuencia células Pax2⁺/PCNA⁺ situadas, al igual que en los individuos control, próximas a la AC y en la zona IO1 tanto junto a la retina como en zonas posteriores de la CNO (Fig. 21D). Mediante imágenes tomadas con un microscopio confocal, observamos dos tipos de células que co-localizan: 1) células que presentan una fuerte inmunoreactividad para ambos marcadores y, 2) células fuertemente marcadas para Pax2 y con una leve reacción para PCNA (Fig. 57E).

A los 15-21d postlesión, observamos una cantidad de dobles marcajes S100-PCNA similar a los 7d postlesión. Estas células se sitúan entre los axones de las células ganglionares y se localizan fundamentalmente en el DO (Fig. 57F).

Realizando dobles marcajes PCNA/Sox10, tanto a los 15d como a los 21d postlesión, encontramos numerosas células Sox10⁺/PCNA⁺ localizadas tanto entre las hileras de células Sox10⁺ como entre los grupos de oligodendrocitos Sox10⁺ situados en

el DO (Figs. 58B-E). Sin embargo, no observamos co-localizaciones en el grupo de células positivas a Sox10 situadas en la parte posterior de la CNO en la zona IO1 (Fig. 58B).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

Desde los 30d hasta los 90d postlesión, el número de células PCNA⁺ continúa siendo altamente significativo con respecto a los animales control (**p<0,01) (Fig. 53B). Sin embargo, a los 120 d tras criolesión, dicho número adquiere valores similares a los individuos control (p>0,05) (Fig. 53B).

Los dobles marcajes Pax2-PCNA muestran que son escasas las células que co-localizan desde los 30d hasta los 120d postlesión (Figs. 57G, J). Las células Pax2⁺/PCNA⁺ se localizan fundamentalmente en las limitantes gliales de la AC y la zona IO1 (Figs. 57G, J). En imágenes tomadas con microscopio confocal, detectamos dos tipos de células con doble marcaje Pax2-PCNA, aquellas células que muestran co-localización total, y otras que están fuertemente marcadas para Pax2 pero presentan un leve marcaje para PCNA (Fig. 57H).

El marcaje para S100 recupera progresivamente el aspecto similar a los individuos control desde los 30d hasta los 120d. Con los dobles marcajes, durante este periodo de regeneración se observan escasas células en las que co-localizan S100⁺ con PCNA (Figs. 57I, K). Estas células se disponen entre los axones de las células ganglionares repartidas por toda la longitud de la CNO y son de los dos tipos descritos anteriormente (Fig. 57K).

La doble IHQ Sox10-PCNA muestra que desde los 30d hasta los 120d postlesión todavía es posible encontrar algunos oligodendrocitos Sox10⁺/PCNA⁺, situados entre las hileras de células Sox10⁺/PCNA⁻, y los grupos de células positivos a Sox10 localizados en el DO (Figs. 58F-G).

MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES Y MARCAJE PARA PAX2

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 7d postlesión, en secciones semifinas el DO presenta un aspecto similar a los individuos control (Figs 59A-B). En secciones ultrafinas, se observa la lámina basal bien definida y la limitante glial constituida por numerosas prolongaciones, que contienen gran cantidad de filamentos intermedios y que se unen entre sí por desmosomas pertenecientes a astrocitos (Fig. 59C). También encontramos axones amielínicos y otros con una fina vaina de mielina (Fig. 59C). A diferencia de los individuos control, la población glial presenta modificaciones. Por un lado, detectamos muchas células que presentan un núcleo muy eucromático con un nucleolo aparente y un citoplasma poco electrodensito que contiene numerosas mitocondrias de gran tamaño, con forma alargada y de media luna (Figs. 59C-D); por todas estas características creemos que puede tratarse de células inmaduras. Por otro lado, observamos otras células que tienen un núcleo muy heterocromático con indentaciones y escaso citoplasma con abundante REr (Figs. 59C, E). Ni unas ni otras presentan características ultraestructurales que permitan identificarlas como astrocitos u oligodendrocitos, y tampoco presentan marcaje positivo a Pax2. También detectamos células con núcleo escotado y heterocromático, y un citoplasma rico en REr, mitocondrias de morfología ovalada y numerosas vesículas; por todo ello deducimos que se trata de células de microglía negativas a Pax2 (Figs. 59C, F). Las células de microglía no se encuentran unidas a otros elementos del tejido mediante uniones estables (Figs. 59C, F). Formando parte de los astrocitos de la limitante glial de la AC encontramos astrocitos Pax2⁺ (Fig. 59G). En zonas más internas del DO, detectamos tanto astrocitos Pax2⁺ como astrocitos Pax2⁻ (Fig. 59H).

A los 7d postlesión, en la parte posterior de la CNO, entre los axones de las células ganglionares encontramos escasos astrocitos Pax2⁺ con un núcleo claro a los electrones, que no presentan diferencias en su citoplasma respecto a los astrocitos control (Fig. 60A). Además, también observamos astrocitos negativos a Pax2 que presentan un núcleo electrodensito y las características típicas de un astrocito (Fig. 60B). En ambos tipos de astrocitos llama la atención la presencia de un nucleolo aparente (Figs. 60A-B). En esta zona IO2, los axones de las células ganglionares están rodeados

por una fina vaina de mielina (Fig. 60A). Entre los axones también encontramos zonas de degeneración en las que se distinguen mitocondrias y mielina de células en degeneración (Fig. 60C). En esta zona observamos tanto astrocitos fagocíticos (Fig. 60D) como microglía reactiva (Fig. 60E) y células de microglía en división (Fig. 60F). Los astrocitos fagocíticos presentan un núcleo eucromático y son Pax2⁺. En el citoplasma contienen numerosas vesículas con gránulos de pigmento. Estos gránulos de pigmento atraen al anticuerpo de forma inespecífica, dado que encontramos numeroso marcaje positivo a su alrededor (Fig. 60D). Las células de microglía tienen un núcleo heterocromático Pax2⁻ y abundante citoplasma. En su citoplasma contienen numerosas vesículas fagocíticas de distinto aspecto, gránulos de pigmento y abundante RER. Las células de microglía en división no presentan envuelta nuclear y en el citoplasma se observan cromosomas y numerosos fagosomas (Fig. 60F). En algunas células de microglía y en las células en división, detectamos mitocondrias ovaladas y de forma de media luna (Figs. 60E-F).

B) Regeneración

A los 21d postlesión, el DO presenta un aspecto muy diferente al de los individuos control. En secciones semifinas se observan gran cantidad de células y numerosas zonas en degeneración (Figs. 61A-B). En secciones ultrafinas, se localiza nuevamente el límite entre el tejido nervioso y el tejido conjuntivo de la AC establecido por una lámina basal y numerosas prolongaciones astrocitarias, que contienen filamentos intermedios en su citoplasma y se unen entre ellos por desmosomas (Fig. 61C). Los axones de las células ganglionares son amielínicos y se encuentran desorganizados, únicamente observamos mielina en degeneración (Fig. 61C). El DO presenta numerosas células que parecen ser extravasadas, ya que no están integradas en el tejido. Entre éstas se encuentran células sanguíneas, que presentan núcleos heterocromáticos y escaso citoplasma (Fig. 61C), o células del EP con fagosomas de restos de fotorreceptores en su citoplasma (Fig. 61G). También detectamos células que presentan núcleos heterocromáticos y con indentaciones, algunas con nucleolos aparentes. En su citoplasma no encontramos células con características típicas de astrocitos ni de oligodendrocitos, y algunas de ellas contienen numerosas mitocondrias ovaladas y alargadas (Figs. 61C-D). Estas células, a diferencia de las anteriores, pertenecen al tejido nervioso dado que se encuentran integradas en el tejido. Próximos a estas células, encontramos gran cantidad de procesos astrocitarios ricos en paquetes de

filamentos intermedios muy oscuros a los electrones (Figs. 61C, E). También encontramos en el DO células fagocíticas con vesículas y gránulos de pigmento en su citoplasma, que probablemente se trate de células de microglía (Figs. 61C, F). En ningún caso detectamos células positivas a Pax2.

En la zona IO1, limitando la CNO con el tejido conjuntivo encontramos numerosos astrocitos de núcleo oscuro Pax2⁺ que como ocurre en control, contienen gran cantidad de filamentos intermedios en su citoplasma y se unen unos con otros mediante desmosomas (Fig. 62A). A los 21d postlesión, los axones de las células ganglionares que discurren próximos a esta zona están rodeados por una fina vaina de mielina, y muchos de ellos presentan signos de degeneración (Fig. 62A).

En la zona IO2, a los 21d postlesión, los axones de las células ganglionares están igualmente mielinizados y son numerosas las áreas de degeneración (Figs. 62B, D). En esta zona encontramos astrocitos de núcleo eucromático negativo para Pax2. En su citoplasma contienen numerosos paquetes de filamentos intermedios y se unen a otros astrocitos mediante desmosomas (Fig. 62B). También detectamos células que han entrado en procesos de muerte celular (Fig. 62B). Al igual que a los 7d, a los 21d postcriolesión observamos astrocitos fagocíticos y células de microglía. Los astrocitos fagocíticos presentan un núcleo oscuro y un nucleolo aparente, ambos negativos a Pax2. En su citoplasma presentan filamentos intermedios y vesículas con gránulos de pigmento. Se unen a otros astrocitos mediante desmosomas (Fig. 62C). Además, entre los axones de las células ganglionares, encontramos células con numerosos gránulos de pigmento y vesículas en su citoplasma, que posiblemente se trate de células del EP que han migrado hacia el interior de la CNO. Los gránulos de pigmento presentan también como ya se dijo afinidad inespecífica por el anticuerpo para Pax2, de forma que observamos gran cantidad de oro coloidal junto a los mismos (Figs. 62C-D).

En la parte posterior de la CNO, cerca del inicio del SIO, en secciones semifinas se observan numerosos vasos sanguíneos de pequeño calibre y zonas en degeneración (Fig 63A). En secciones ultrafinas a los 21d postlesión, cerca del endotelio de los vasos sanguíneos se observan células con numerosas vesículas en su citoplasma, claras y oscuras a los electrones, que parecen ser granulocitos (Fig. 63B). Estas células las encontramos también junto a la AC y en el límite entre el NO con la coroides y esclera, aunque no integradas en el tejido nervioso (datos no mostrados). En torno a los vasos

sanguíneos hay numerosas prolongaciones con abundantes paquetes de filamentos intermedios en su citoplasma, que se unen entre sí mediante desmosomas pertenecientes a astrocitos (Fig. 63B-C). En esta zona, también encontramos muchas áreas en degeneración (Fig. 63B). Las células, como se ha descrito en las otras zonas, presentan núcleos oscuros a los electrones y nucleolos aparentes. En su citoplasma no detectamos características que nos ayuden a determinar a qué tipo celular pertenecen (Fig. 63B). Alguna de estas células presenta marcaje positivo a Pax2 (Figs. 63B, D). También observamos células cuya cromatina se empieza a condensar y la envuelta nuclear está desorganizada, por lo tanto se encuentran en la profase de la mitosis (Figs. 63B, E).

2.3 RESUMEN

Los astrocitos Pax2⁺ se ven afectados por la criolesión. Disminuye su número y la intensidad de marcaje durante los primeros días de supervivencia, pero recuperan en cuanto los axones jóvenes Zn8⁺ comienzan a llegar de nuevo a la CNO. Durante tiempos de supervivencia mayores, se produce una llegada masiva de axones Zn8⁺ procedentes de la ZPG recién regenerada, entonces se produce un aumento en el número de astrocitos positivos a Pax2 (Figs. 83B-C).

Las células S100⁺ también sufren modificaciones durante el proceso de regeneración. Durante los primeros tiempos de supervivencia incrementan la cantidad de procesos positivos, aunque pronto recuperan su organización original en la CNO (Figs. 83B-C). Estos resultados se ven reforzados por la gran cantidad de procesos astrocitarios que detectamos mediante microscopía electrónica.

En la zona posterior de la CNO, en el límite con la coroides y la esclera, detectamos una fuerte reacción astrocitaria que coincide con la primera llegada de los axones durante la regeneración postcriolesión. En esta zona, una subpoblación de astrocitos de la limitante glial S100⁺/GFAP⁺/GS⁺, ausente en animales control, forma un anillo en torno a la CNO desde el cual emiten largos procesos hacia el interior del NO transversales al mismo (Figs. 83B-C). Igualmente, detectamos grupos de astrocitos Pax2⁺ en esta misma zona, ausentes en control.

De modo similar y acompañando a esta reacción astrocitaria, se encuentran las células de Müller que limitan la retina con la CNO, puesto que durante los primeros tiempos de supervivencia sus procesos vitreales aparecen desorganizados (Fig. 83B); y

en períodos de regeneración tardíos se observa mucha más cantidad de procesos vitreales en comparación con el control (Figs. 83A, C).

Participando en la regeneración de la ZPG, detectamos células S100⁺ que se sitúan en la zona criolesionada (Fig. 83G) al principio de la regeneración. En tiempos de supervivencia tardíos, células S100⁺/GFAP⁺ se distribuyen por todo el grosor de la retina recién formada, desde las capas más vitreales hacia las más esclerales (Fig. 83H).

Los oligodendrocitos Sox10⁺/GS⁺ no muestran modificaciones en cuanto a organización durante la regeneración postcriolesión. Únicamente detectamos pequeños grupos Sox10⁺ que se sitúan en el límite de la CNO con la coroides y la esclera, especialmente llamativos durante periodos tempranos de regeneración. La mielina, sin embargo, se ve afectada y detectamos grandes áreas en degeneración, tanto con el marcaje para MBP como mediante MET, durante los tiempos de supervivencia tempranos. Las células encargadas de retirar los restos celulares son tanto astrocitos como células de microglía.

Tanto astrocitos Pax2⁺ como células S100⁺ u oligodendrocitos Sox10⁺ inician procesos de división celular (PCNA⁺) pero, aunque son ligeramente más numerosas que en estados control, son pocas comparadas con el gran aumento en la división celular que se produce en la CNO durante los primeros tiempos de supervivencia (Fig. 83B). Los precursores de astrocitos Pax2⁺/PCNA⁺ se sitúan fundamentalmente en las limitantes gliales de la CNO; sin embargo, las células S100⁺/PCNA⁺ y los oligodendrocitos Sox10⁺/PCNA⁺ se localizan entre los axones de las células ganglionares (Fig. 83B). Con MET también observamos células de microglía en estado de división celular, y células Pax2⁻ que pueden ser tanto astrocitos como oligodendrocitos o células extravasadas.

Finalmente, en la CNO entre los axones de las células ganglionares observamos por primera vez células citoqueratina⁺ fuertemente marcadas y negativas a Pax2, únicamente visibles durante períodos tempranos de regeneración. Mediante MET, observamos células de microglía, granulocitos, células sanguíneas, células del epitelio pigmentario, astrocitos con gránulos de pigmento en su citoplasma y células sin características ultraestructurales que nos ayuden a determinar de qué tipo celular se tratan, todas ellas distribuidas por toda la CNO.

3. EFECTOS EN LA CNO DESPUÉS DEL PINZAMIENTO

Al igual que durante la regeneración tras criolesión, mediante técnicas de IHQ analizamos qué modificaciones sufren los distintos tipos celulares en la CNO durante la regeneración postpinzamiento.

3.1 ASPECTOS GENERALES DE LA LESIÓN

La lesión por pinzamiento del NO es un tipo de lesión que se ha llevado a cabo en nuestro grupo de forma efectiva (Clemente, 2003; Jimeno, 2001; Lillo, 2001; Velasco, 1994). En nuestro trabajo, este tipo de lesión nos permite analizar el efecto que produce en las distintas poblaciones gliales de la CNO la degeneración de la mayor parte de los axones del NO debido al aplastamiento de los mismos y su posterior regeneración.

Para comprobar la fiabilidad de nuestra lesión analizamos en la zona pinzada todo el proceso de regeneración descrito en los trabajos de Nona (Kolb *et al.*, 2000). De esta forma, analizamos cómo la zona dañada es colonizada por numerosas células en división (PCNA⁺), disminuye la población astrocitaria y la mielina queda totalmente destruida para que, a lo largo de todo el período regenerativo, recupere la organización original. Para facilitar el seguimiento de los resultados durante los distintos tiempos de regeneración, al igual que en el análisis de la criolesión, agrupamos los tiempos de supervivencia de la siguiente manera: A) **degeneración y regeneración temprana**, que comprende los tiempos postlesión 2d y 7d; B) **regeneración**, que incluye los 15d, 21d y 30d postlesión; y C) **regeneración tardía y recuperación de la organización original**, que engloba los tiempos de 60d, 90d, 120d, 180d y 210d postlesión.

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 2d postpinzamiento, observamos que en la zona dañada desaparece el marcaje para Pax2⁺ y la citoqueratina comienza a adquirir un aspecto desorganizado (datos no mostrados), sugiriendo una ausencia de astrocitos. Además, se empiezan a

acumular células PCNA⁺ en torno a la zona de lesión. Al igual que en los individuos control no encontramos marcaje para GFAP en el SIO.

A los 7d postlesión, las características descritas a los 2d se incrementan. No observamos marcaje para Pax2 y, sólo encontramos pequeños acúmulos citoqueratina⁺ dispersos en la zona dañada. Aunque observamos abundante marcaje para ZO1, éste adquiere un aspecto muy desorganizado acumulándose, al igual que la citoqueratina, en algunas zonas (Figs 64A-C). En regiones próximas a la zona de lesión, se observan células Pax2⁺, algunas de ellas GFAP⁺, marcaje ausente en el control (Figs. 64D-E). Además, en torno a la zona dañada se acumulan numerosas células PCNA⁺, muchas de las cuales son células Pax2⁺/PCNA⁺ (Fig. 64F).

En la zona de lesión, a los 7d de supervivencia, se produce una gran degeneración de la mielina, que se observa en acúmulos de distinto tamaño MBP⁺. En las zonas libres de mielina MBP⁺ en degeneración, discurren numerosos axones regenerantes Zn8⁺ (Figs. 64G-I).

B) Regeneración

Desde los 15d hasta los 30d postlesión, tanto en la zona lesionada (Figs 65A-B) como en el SIO posterior alejado de la lesión (Figs. 65C-D), encontramos numerosas células PCNA⁺. Muchas de estas células son Pax2⁺/PCNA⁺ y son de dos tipos: 1) células fuertemente marcadas para ambos marcadores, y 2) células Pax2⁺ levemente marcadas para PCNA. De la misma forma, encontramos células negativas para Pax2 marcadas fuerte y débilmente para PCNA (Figs. 65B, D).

En sección transversal del SIO, encontramos que buena parte de la zona pinzada está libre de residuos de mielina MBP⁺ (Figs. 65H-I). Estas zonas limpias son colonizadas por células Pax2⁺, citoqueratina⁺ y ZO1⁺ (Figs. 65E-G). El marcaje para Zn8, muestra que los axones en crecimiento Zn8⁺ se encuentran reducidos a una pequeña zona del SIO (Figs. 65J-K), a diferencia de los 7d postlesión. El borde en crecimiento por donde discurren los axones jóvenes se encuentra sin mielinizar (Figs. 65I-K).

A diferencia de la zona pinzada en la parte posterior del SIO a los 15-21-30d postlesión la mielina MBP⁺ presenta un alto grado de degeneración (Fig. 65Ñ). Por la

zona libre de mielina en degeneración discurren los axones regenerantes Zn8⁺ (Figs. 65O-P). En la parte posterior del SIO los astrocitos no desaparecen, dado que se mantiene el marcaje para Pax2, citoqueratina y ZO1. Además, en la zona por donde discurren los axones en regeneración Zn8, se observa un ligero aumento en la cantidad de células Pax2⁺ y en la inmunofluorescencia para citoqueratina y ZO1 (Figs. 65L-N).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

A los 60 y 90d postlesión, el SIO va adquiriendo una organización similar a los individuos control. Disminuye la cantidad de células positivas a PCNA a lo largo del SIO, aunque permanecen ligeramente concentradas en la zona de pinzamiento. Se conserva la co-localización de PCNA-Pax2, como ocurre en períodos de supervivencia inferiores. Las células Pax2⁺ presentan una distribución similar a los animales control y desaparece el marcaje para GFAP. Los axones de las células ganglionares comienzan a mielinizarse y van adquiriendo vainas de mielina MBP⁺ con un aspecto similar a los individuos control. Por otro lado, los axones jóvenes Zn8⁺ quedan restringidos al borde de crecimiento en SIO, tal y como lo hacen en control. En la zona dañada, todavía se observa una parte sin células Pax2⁺ y sin mielina MBP⁺ (datos no mostrados).

A partir de los 120d hasta los 210d postpinzamiento, el SIO se recupera de la lesión y adquiere características parecidas a los animales control. Desaparece la zona de lesión, que queda poblada por células Pax2⁺ y los axones de las células ganglionares presentan vainas de mielina MBP⁺. Aunque se observa menor cantidad de células PCNA⁺, todavía detectamos co-localizaciones Pax2⁺/PCNA⁺ (datos no mostrados). En algunos animales lesionados de 120d hasta 210d de supervivencia apreciamos un retraso en la regeneración del SIO, dado que encontramos características similares a las descritas a tiempos de regeneración anteriores (30d-90d). Esto puede deberse a la variabilidad intraespecífica que puede existir entre los distintos individuos analizados.

3.2 LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO

RESPUESTA DE LAS CÉLULAS PAX2⁺

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 2d postpinzamiento, no encontramos cambios significativos en el número de células positivas a Pax2, tal y como ocurre durante la criolesión (Fig. 66A). Tampoco observamos modificaciones en su distribución y morfología (Fig. 67A). Sin embargo, a los 7d el número de células Pax2⁺ aumenta de forma altamente significativa (**p<0,01) (Fig. 66A). Al contrario de lo que ocurre en los animales criolesionados, no detectamos modificaciones en la intensidad de marcaje para Pax2 en ninguno de los tiempos de supervivencia analizados (Figs. 67-69). Tampoco observamos diferencias en cuanto a la morfología y la localización de las células positivas a Pax2, con respecto a los animales control (Figs. 67B, D, F, H, M).

Las células Pax2⁺, como ocurre en los individuos control y criolesionados, acompañan a los axones en crecimiento Zn8⁺ en su recorrido por la CNO desde el DO hacia la zona IO2 junto a la AC (Figs. 67A-C). A los 2d postlesión, los axones positivos a Zn8 discurren fundamentalmente junto a la AC y tienen un aspecto similar a los animales control, pero también observamos escasos axones Zn8⁺ en zonas internas de la CNO junto a la zona IO1 (Fig. 67A). A los 7d postlesión, el marcaje para Zn8 se incrementa y, detectamos grandes fascículos Zn8⁺ que discurren junto a la AC y numerosos axones regenerantes positivos a Zn8 próximos a la zona IO1 (Figs. 67B-C). En la zona posterior también encontramos axones Zn8⁺ alejados de su recorrido habitual junto a la AC (Fig. 67B).

A los 2d postlesión los dobles marcaje de Pax2 con GFAP, GS, citoqueratina y ZO1 no muestran diferencias frente a los individuos control (datos no mostrados). Sin embargo, a los 7d postpinzamiento, encontramos numerosos procesos GFAP⁺ con aspecto desorganizado, situados fundamentalmente en el DO (Figs. 67D-E). También detectamos prolongaciones positivas a GFAP en la zona IO1 y en la parte posterior de la CNO (Fig. 67D). En el DO las células Pax2⁺ se sitúan longitudinales a los numerosos procesos desorganizados positivos a GFAP, muchos de los cuales pertenecientes a las células de Müller (Fig. 67E). En la zona IO1, las células Pax2⁺/GFAP⁺ se sitúan formando la limitante glial como lo hacen en los animales control (Fig. 67E).

El marcaje Pax2-GS muestra, como en los animales control y durante criolesión, células Pax2⁺/GS⁻ y Pax2⁻/GS⁺ distribuidas por toda la CNO. Sin embargo, a los 7d de supervivencia también detectamos células Pax2⁺/GS⁺ (Figs. 67F-G). Estas células se encuentran tanto en el DO como en la zona IO2 y en regiones posteriores de la CNO próximas al inicio del SIO, situadas entre los axones de las células ganglionares (Figs. 67F-G). En la zona posterior de la CNO las células Pax2⁺/GS⁺ también forman parte de la limitante glial del NO (Fig. 67F).

Con la IHQ para citoqueratina, observamos que el marcaje es más intenso a los 7d postlesión. Se localiza fundamentalmente formando parte de los límites de la CNO con la AC y la retina, coroides y esclera, como lo hace en control (Fig. 67H). Además, en el DO detectamos procesos que parten desde la retina próxima a la CNO hacia la superficie vitreal del DO, y en esta zona las células Pax2⁺ se sitúan paralelas a los mismos (Figs. 67H-I). A más aumentos, en el DO encontramos numerosas células Pax2⁺/citoqueratina⁺ fuertemente marcadas, aunque también detectamos células Pax2⁻/citoqueratina⁺ (Fig. 67I). En la zona IO1 posterior, también observamos numerosas células Pax2⁺/citoqueratina⁺ formando la limitante glial con la esclera y la coroides, entre ellas se sitúan células Pax2⁻/citoqueratina⁺ (Fig. 67J).

Finalmente, el marcaje para ZO1 no muestra diferencias respecto a los individuos control a los 7d postlesión (Fig. 67K). Sin embargo, detectamos células Pax2⁺/ZO1⁺ localizadas próximas a la zona IO1 pero externas al NO (Figs. 67K-L).

B) Regeneración

A los 15d postlesión, el número de células Pax2⁺ disminuye con respecto a los 7d; sin embargo, es significativamente mayor que en los individuos control (*0,05>p>0,01) (Fig. 66A). A los 21-30d el número de células positivas a Pax2 adquiere valores similares a los animales control (p>0,05) (Fig. 66A). La morfología y distribución de las células Pax2⁺ no varía respecto a los individuos control (Figs. 68A, C, D, E, I, L, N-Ñ); sin embargo, como ocurre durante la criolesión, entre los 15-30d algunas células positivas a Pax2 situadas en el DO pero no formando parte de la limitante glial, presentan grandes nucleolos negativos a Pax2 (Figs. 68A-B).

Con el doble marcaje Pax2-Zn8 a los 15-30d de supervivencia observamos que las células Pax2⁺ acompañan a los axones en crecimiento Zn8⁺, como se describe a los 7d

(Figs. 68A, C-D). A los 15-21d postlesión, los fascículos de axones positivos a Zn8 que discurren a lo largo del borde en crecimiento junto a la AC y en la zona ventral del SIO son numerosos (Figs. 68A, C). En la zona posterior todavía detectamos bastantes axones regenerantes Zn8⁺ alejados del borde en crecimiento (Fig. 68A). A los 30d postlesión, los axones positivos a Zn8 discurren fundamentalmente junto a la AC, con un aspecto similar a los animales control (Fig. 68D). A diferencia de los 7-21d de supervivencia, a los 30d postlesión detectamos escasos axones regenerantes Zn8⁺ alejados del borde en crecimiento (Fig. 68D).

Con la IHQ para GFAP observamos resultados similares desde los 15d hasta los 30d postlesión. Detectamos numerosos procesos positivos localizados en el DO, muchos de ellos pertenecientes a las células de Müller, en las limitantes de la zona IO1 con la retina, coroides y esclera, y en la limitante de la AC en el DO y zona IO2 (Fig. 68E). Asociadas a los procesos vitreales de las células de Müller, encontramos abundantes células Pax2⁺ (Fig. 68F). Formando parte de la limitante glial de la AC y la zona IO1, como ocurre en el control, observamos bastantes células Pax2⁺/GFAP⁺, aunque también hay células Pax2⁻/GFAP⁺ (Figs. 68G-H). En ocasiones, en la zona IO1, la limitante glial se introduce entre la retina, la coroides y la esclera (Fig. 68H). También detectamos escasas células Pax2⁺ negativas a GFAP junto a la limitante glial pero externas al NO situadas en el límite de la retina, la coroides y la esclera (Fig. 68G).

A los 15-30d postpinzamiento, como a los 7d, localizamos células Pax2⁺/GS⁻, Pax2⁻/GS⁺ y Pax2⁺/GS⁺ (Figs. 68I-K), sin embargo, estas últimas quedan restringidas a la zona posterior de la CNO en este período de supervivencia. Por tanto, en el DO, como ocurre en el control, detectamos células Pax2⁻/GS⁺ que se organizan en hileras o formando grupos y, junto a ellas o formando la limitante glial, observamos células Pax2⁺/GS⁻ (Figs. 68J). Por el contrario, en la zona posterior de la CNO e inicio del SIO, detectamos células de los tres tipos. Las células Pax2⁺/GS⁻ y Pax2⁺/GS⁺ se sitúan formando parte de la limitante glial; y por otro lado, células Pax2⁻/GS⁺ y Pax2⁺/GS⁺ se organizan entre los axones de las células gliales (Figs. 68I, K).

Con la IHQ para citoqueratina a los 15-30d postlesión, la CNO adquiere un aspecto similar a los individuos control (Figs. 68L, N). Las células Pax2⁺/citoqueratina⁺ se sitúan formando parte de las limitantes de la AC y el NO con la retina, coroides y esclera (Figs. 68L, N). A los 15d, observamos las células Pax2⁺ con un ligero marcaje

para citoqueratina (Fig. 68M) y, como ocurre durante la criolesión, detectamos células negativas a Pax2 fuertemente marcadas para citoqueratina (Fig. 68M). En el DO, a los 30d de supervivencia podemos detectar procesos que parten desde la retina próxima a la CNO hacia la superficie vitreal del DO, donde las células Pax2⁺ de esta zona se sitúan paralelas a los mismos (Fig. 68N).

El marcaje para ZO1, como ocurre a los 7d, no muestra diferencias respecto a los individuos control a los 15-30d postlesión (Fig. 68Ñ). Detectamos escasas células Pax2⁺/ZO1⁺ localizadas próximas a la zona IO1 pero externas al NO, y la mayor parte de ellas forman parte de la limitante glial de esta zona (Figs. 68Ñ-O).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

A diferencia de la criolesión, a los 60d de supervivencia postpinzamiento el número de células Pax2⁺ aumenta nuevamente de forma altamente significativa (**p<0,01) y se mantiene hasta los 120d postlesión (Fig. 66A). A partir de los 180-210d de supervivencia, el número de células positivas a Pax2 es nuevamente similar a los individuos control (p>0,05) (Fig. 66A). Tanto la morfología como la distribución de las células Pax2⁺ durante este período de regeneración son similares a lo observado en los animales control (Figs. 69A, C, F, I,).

Con el doble marcaje Pax2-Zn8 observamos que las células Pax2⁺ acompañan a los axones en crecimiento Zn8⁺, como ocurre en el control y durante la regeneración (Fig. 69A). Sin embargo, aunque de forma menos llamativa que en periodos de supervivencia analizados previamente, detectamos axones en crecimiento localizados en zonas más internas de la CNO (Fig. 69A). En la zona posterior de la CNO algunos axones describen trayectorias perpendiculares al NO, aunque la mayoría de ellos discurren paralelos y próximos a la AC (Fig. 69B).

El marcaje para Pax2-GFAP ofrece una apariencia similar a lo observado en los individuos control. Encontramos células Pax2⁺/GFAP⁺ formando parte de la limitante glial de la AC y la retina, coroides y esclera, como ocurre en el control (Figs. 69C-D). De la misma forma, las células Pax2⁺ del DO se sitúan junto a los procesos vitreales de las células de Müller (Figs. 69C-D). Sin embargo, en algunos animales de tiempos de supervivencia de 60d hasta 210d, todavía detectamos numerosos procesos positivos y

longitudinales al NO, localizados desde el DO hasta la parte posterior de la CNO (Figs. 69C, E). En la zona IO1, en el límite de la retina con la coroides y la esclera, en algunos individuos pinzados, observamos procesos GFAP⁺ que se disponen transversales al NO (Figs. 69C, E). Al observar el SIO de estos animales, encontramos que todavía no se encuentra completamente regenerado.

El marcaje para Pax2-GS, como ocurre con la GFAP, muestra variaciones de unos individuos u otros en los distintos tiempos de supervivencia analizados. En todos los animales, el DO presenta un aspecto similar al control, con células de Müller GS⁺ y células Pax2⁺/GS⁻ y Pax2⁻/GS⁺ distribuidas por la CNO (Figs. 69F-G). Además, desaparece el marcaje para GS en la limitante glial de la CNO posterior. Sin embargo, en otros individuos la inmunorreactividad para GS⁺ de la limitante glial descrita en tiempos de supervivencia inferiores, persiste junto con células Pax2⁺/GS⁺ únicamente presentes en la zona posterior de la CNO (Figs. 69F, H).

El inmunomarcaje Pax2-citoqueratina, en todos los individuos analizados desde los 60d hasta los 210d postlesión, presenta una distribución similar a los animales control, situándose las células Pax2⁺/citoqueratina⁺ únicamente formando parte de la limitante glial de la AC y la retina, coroides y esclera (Fig. 69I). No detectamos las células Pax2⁻/citoqueratina⁺ descritas durante los 15-30d postlesión.

El marcaje para ZO1, como ocurre durante todo el período de regeneración postpinzamiento, no muestra modificaciones respecto a los animales control (datos no mostrados).

RESPUESTA DE LAS CÉLULAS S100⁺

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 2d postlesión, no observamos cambios en cuanto a los tipos de células S100⁺ y la distribución y características descritas en los animales control (datos no mostrados).

A los 7d de supervivencia, a diferencia de la criolesión, observamos escasas células S100⁺ en la CNO y en la CNO posterior con el inicio del SIO (Figs. 70A-B). Estas células pertenecen al grupo de mayor tamaño, fuertemente marcadas y con grandes procesos (Figs. 70A-C). Se encuentran distribuidas por toda la CNO entre las

células ganglionares orientadas longitudinalmente a los mismos, y no forman parte de la limitante glial ni de la AC ni de la retina, coroides y esclera en la zona IO1 (Figs. 70A-B). Mediante doble marcajes con S100-GFAP, observamos escasos procesos positivos a ambos marcadores (Fig. 70A); y con IHQ doble S100-GS no encontramos ninguna co-localización (Figs. 70B-C). Tampoco detectamos células S100⁺ asociadas a los procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺/GS⁺ (Figs. 70A-B).

Tal y como ocurre en control, distribuidas por toda la CFNO de la retina desde zonas próximas a la ZPG hasta la CNO, se observan células S100⁺ orientadas longitudinalmente a los axones de las células ganglionares (Fig. 70B).

B) Regeneración

A los 15-30d de supervivencia, se recupera el marcaje para S100, y detectamos los dos tipos de células S100⁺ en la CNO descritos en control. Las células positivas a S100⁺, de gran tamaño y con largos procesos, se sitúan distribuidas por toda la CNO en orientación longitudinal a los axones de las células ganglionares (Figs. 70D-E, I). Algunas de estas células S100⁺ se encuentran íntimamente asociadas a los procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺, situando su soma y prolongaciones longitudinales a los mismos (Fig. 70F). En la parte posterior de la CNO, las células S100⁺ pasan a formar parte de la limitante glial y en sus prolongaciones hay co-localización con GFAP⁺ de la limitante glial de esta zona (Fig. 70D); las prolongaciones S100⁺/GFAP⁺ parten del límite del NO y se extienden en dirección transversal al mismo (Fig. 70D). En la zona IO1, en el límite de la CNO con la coroides y esclera, detectamos un pequeño grupo de células S100⁺/GFAP⁻ que se mantiene hasta los 30d postlesión (Figs. 70D, I-J).

Situadas fundamentalmente en el DO, encontramos el segundo tipo de células S100⁺ de soma pequeño levemente marcado y sin prolongaciones positivas. Se encuentran, al igual que en los individuos control, formando pequeños grupos junto a células S100⁺ del primer tipo (Figs. 70D-E).

Con doble marcaje S100-GS, cuando por motivos de la fijación detectamos células GS⁺ en la CNO, encontramos resultados similares a los individuos control. Células únicamente positivas a S100 o a GS, y células S100⁺/GS⁺ de dos tipos, unas que presentan un citoplasma negativo a S100 y otras positivo (Figs. 70G-H).

En la retina, y especialmente en zonas próximas a la CNO, encontramos numerosas células S100⁺ situadas en la CFNO, tanto en zonas vitreales como esclerales de la misma. Presentan una morfología similar a los de los individuos control, y presentan un soma y procesos orientados longitudinalmente a los axones de las células ganglionares (Fig. 70D).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

Desde los 60d hasta los 210d postlesión, el marcaje para S100 adquiere un aspecto y organización similares a lo observado en los animales control. Sin embargo, en algunos individuos, observamos gran cantidad de células S100⁺ con largos procesos que co-localizan con GFAP⁺ orientados longitudinales a los axones de las células ganglionares (Figs. 70K, M). Además, estos individuos presentan un anillo de células S100⁺/GFAP⁺ situado en el límite entre la CNO y la coroides y esclera (70K). En la parte posterior de la CNO e inicio del SIO encontramos, en estos animales, células S100⁺/GFAP⁺ con grandes prolongaciones (Fig. 70L).

En la retina se detectan células S100⁺ distribuidas en la CFNO, como ocurre en el control (Fig. 70M).

RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN LA CNO

Las células de Müller que limitan con la CNO sufren modificaciones a lo largo de todo el período de regeneración postpinzamiento, al igual que durante la criolesión. A los 7d de supervivencia se observan escasos procesos vitreales GFAP⁺/GS⁺ de las células de Müller rodeando al DO (Figs. 67D-F, 70A-B). Estos procesos, presentan un aspecto desorganizado (Figs. 67D-F, 70A-B) y algunos muestran una orientación longitudinal a los axones de las células ganglionares, a diferencia de lo que ocurre en los controles, que todos se dirigen hacia la superficie vitreal. A los 15-30d postlesión, el anillo de células de Müller que rodea la CNO comienza a adquirir un aspecto similar a los individuos control. Los procesos vitreales GFAP⁺/GS⁺ son abundantes y se dirigen hacia el vítreo (Figs. 70D, G, I). Aunque la organización y el aspecto se mantienen similares a lo observado en los controles durante el período tardío de regeneración (60-210d postlesión), algunos ejemplares presentan una sorprendente

cantidad de procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺ próximas a la CNO (Fig. 70M), que atraviesan las capas internas de la retina y se dirigen hacia la superficie vitreal de la misma.

Durante el proceso de regeneración postpinzamiento, encontramos procesos S100⁺ que parten de la CPI de la retina adyacente a la CNO y se dirigen hacia la superficie vitreal del DO, descritos ya en los controles. A diferencia de lo observado en la criolesión, estos no presentan modificaciones en su orientación durante la regeneración tras pinzamiento ni a los 15d (Fig. 72H) ni a los 180d de supervivencia (Fig. 70M). A los 180d caracterizamos estos procesos como S100⁺/GFAP⁺ (Fig. 70M); y observamos células S100⁺/GFAP⁻ cuyo soma se encuentra en el DO próximo a la limitante glial de la AC, y emiten un gran proceso que atraviesa la CFNO y se dirige hacia capas más externas de la retina adyacente a la CNO (Fig. 70M).

ALTERACIÓN EN LA MIELINIZACIÓN EN LA CNO

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 2d postlesión no encontramos modificaciones en el marcaje de la mielina MBP⁺ respecto a los individuos control (datos no mostrados). Sin embargo, a los 7d de supervivencia el inmunomarcaje para MBP disminuye drásticamente en toda la CNO (Fig. 71A). A más aumentos, observamos que el leve marcaje para MBP de la CNO tiene un aspecto desordenado y apenas vemos vainas de mielina MBP⁺ (Fig. 71B).

El marcador Sox10, muestra que a los 2d postlesión los oligodendrocitos Sox10⁺ están organizados de forma similar a lo visto en los individuos control en la CNO (datos no mostrados). Sin embargo, a los 7d postlesión observamos pocas células positivas a Sox10 en la CNO, que se encuentran fundamentalmente en el DO formando pequeños grupos o aisladas entre los axones de las células ganglionares (Fig. 71C).

B) Regeneración

A los 15-21d postlesión, como a los 7d, observamos gran ausencia de mielina MBP⁺, aunque también detectamos zonas MBP⁺ desorganizadas ocupando parte de la CNO (Fig. 71D). En la zona posterior de la CNO, sin embargo, el marcaje para MBP comienza a adquirir un aspecto más organizado, a modo de hileras longitudinales al NO (Fig. 71D). A los 30d postpinzamiento, la parte posterior de la CNO aparece

mielinizada, y en la zona anterior el marcaje para MBP va adquiriendo un aspecto más organizado (Fig. 71G), de forma que se observan numerosas vainas de mielina MBP⁺ (Fig. 71H).

La IHQ para Sox10, muestra que desde los 15d postpinzamiento se recupera la disposición original de los oligodendrocitos Sox10⁺ (Figs. 71E, I). Con doble marcaje Sox10-GS, encontramos que buena parte de las células Sox10⁺ son positivas a GS, aunque también detectamos células Sox10⁺/GS⁻ (Fig. 71E). A los 30d postlesión, observamos largos procesos GS⁺ que parten desde zonas internas del DO y se dirigen hacia el interior de la CNO (Fig. 71I). Tanto a los 15d como a los 30d postlesión encontramos un fuerte marcaje para GS en la zona posterior de la CNO e inicio del SIO. Este marcaje se encuentra tanto en la limitante del NO como en zonas internas del mismo (Figs. 71E, I). Algunas de las células marcadas en esta zona son Sox10⁺/GS⁺, pero también detectamos células GS⁺ negativas para Sox10 (Fig. 71F).

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

A los 60d postpinzamiento, el aspecto de la CNO con el marcaje para MBP es similar al de los 30d descrito en el apartado anterior (datos no mostrados). Sin embargo, a partir de los 90d postlesión la CNO aparece completamente mielinizada. El marcaje tiene un aspecto ordenado, y a más aumentos observamos numerosas vainas de mielina orientadas longitudinalmente al NO (Figs. 71J-K).

Como ocurre a partir de los 15d, desde los 60d hasta los 210d no observamos modificaciones en la distribución de las células Sox10⁺ en la CNO (Fig. 71L).

MODIFICACIONES EN LA PROLIFERACIÓN

A) Degeneración y regeneración temprana

Tal y como ocurre con otros elementos analizados en la CNO, a los 2d postlesión no encontramos cambios significativos ni en el número de células PCNA⁺ ($p > 0,05$) (Fig. 66B) ni en su distribución (datos no mostrados). Con dobles marcajes con Pax2, igual que en el control, observamos escasas células Pax2⁺/PCNA⁺, localizadas fundamentalmente en la zona IO1 y en la limitante de la AC (datos no mostrados). De la misma forma, con la doble IHQ PCNA-S100 a los 2d postlesión encontramos pocas

células doblemente marcadas entre los axones de las células ganglionares, igual que en los animales control (datos no mostrados).

Por el contrario, a los 7d postpinzamiento observamos en la CNO un aumento altamente significativo de células positivas a PCNA (** $p < 0,01$) (Fig. 66B), que se encuentran distribuidas por toda la CNO (Figs. 72A, D, 73A).

Con el doble marcaje Pax2-PCNA, encontramos co-localización en el DO tanto en la limitante con la AC como entre los axones de las células ganglionares (Figs. 72A-C). En la parte posterior de la CNO, en el límite del NO con el EP, llaman la atención grandes grupos de células positivas a PCNA (Fig. 72A). Formando parte de estos grupos de células PCNA⁺ detectamos células Pax2⁺/PCNA⁺ (Fig. 72A). En la parte posterior de la CNO, en la zona IO2 y en el inicio del SIO observamos numerosas astrocitos Pax2⁺/PCNA⁺ (Fig. 72B). Como ocurre durante la criolesión, encontramos dos tipos de marcaje: células Pax2⁺/PCNA⁺ completamente marcadas y células positivas a Pax2 levemente marcadas con PCNA (Figs. 72B-C).

Con dobles marcajes S100-PCNA, a los 7d postlesión encontramos pocas células S100⁺/PCNA⁺ localizadas entre los axones de las células ganglionares tanto en la zona IO2 de la CNO (Fig. 72D). Éstas células son únicamente del tipo S100⁺ donde se marca su citoplasma y procesos. En la zona posterior de la CNO e inicio del SIO, estas células S100⁺/PCNA⁺ se van haciendo más numerosas (Fig. 72D). No observamos células positivas a S100 formando parte de los grupos de células PCNA⁺ en la zona IO1 en el límite del NO con el EP (Fig. 72D).

Con la doble IHQ para Sox10-PCNA, tanto a los 2d (datos no mostrados) como a los 7d encontramos co-localizaciones distribuidas tanto en el DO como en la zona IO2 entre los axones de las células ganglionares (Fig. 73A).

B) Regeneración

Al igual que a los 7d, a los 15d postlesión el número de células PCNA⁺ es altamente significativo y se mantiene hasta los 30d de supervivencia (** $p < 0,01$) (Fig. 66B). Las células PCNA⁺ se encuentran repartidas por toda la CNO, aunque especialmente concentradas en los límites de la CNO con la AC y retina, coroides y

esclera, en este último forman grandes grupos de células PCNA⁺ al igual que a los 7d (Figs. 72E, H, K).

El doble marcaje Pax2-PCNA a los 15d postpinzamiento muestra numerosos astrocitos Pax2⁺/PCNA⁺, que se encuentran fundamentalmente en la glía limitante de la AC, aunque también aparecen en la zona IO1 y entre los axones de las células ganglionares (Figs. 72E-F). A los 21-30d de supervivencia, la distribución de células positivas a PCNA es similar a los 15d postlesión, y aunque también observamos células Pax2⁺/PCNA⁺ en la glía limitante de la AC y entre los axones de las células ganglionares, aparecen concentradas principalmente entre los astrocitos de la limitante de la CNO con la retina, esclera y coroides (Fig. 72K). Al igual que a los 7d de supervivencia, entre los 15-30d observamos dos tipos de marcaje: células Pax2⁺/PCNA⁺ y células positivas a Pax2 levemente marcadas con PCNA (Figs. 72E-G, K); además, por la morfología característica de algunas células Pax2⁺, sabemos que se encuentran en procesos de división celular, a pesar de ser negativas a PCNA (Fig. 72G).

A los 15d postlesión, observamos un marcaje S100-PCNA similar a los 7d postlesión. Las células S100⁺/PCNA⁺ son del tipo positivo a S100 con citoplasma y procesos marcados (Figs. 72H-I). Estas células se sitúan entre los axones de las células ganglionares desde zonas próximas al DO pero principalmente en la zona IO2 (Fig. 72H). También detectamos alguna co-localización en los grupos de células positivas a PCNA situados en la zona IO1 en el límite del NO con el EP, a diferencia de los 7d de supervivencia (Fig. 72H). Además, detectamos células PCNA⁺ asociadas a los procesos S100⁺ situados en la CPI de la retina adyacente a la CNO, que se dirigen hacia la superficie vitreal del DO (Figs. 72H, J). Estas células positivas a PCNA se sitúan longitudinalmente a dichos procesos, a diferencia del resto de células en división que están entre los axones de las células ganglionares que se orientan paralelas a los mismos (Figs. 72H, J). Ni a los 21d ni a los 30d de supervivencia no observamos diferencias en el marcaje S100-PCNA respecto a los 15d postlesión (datos no mostrados).

El doble marcaje PCNA con el marcador de oligodendrocitos Sox10, tanto a los 15d como a los 21 y 30d postlesión, muestra escasas células Sox10⁺/PCNA⁺ localizadas tanto en el DO y en la zona IO2 entre los axones de las células ganglionares (Figs. 73B-E). No detectamos co-localizaciones en la zona IO1.

C) Regeneración tardía y recuperación de la organización original

A los 60d de supervivencia, el número de células en división permanece altamente significativo con respecto a los animales control (** $p < 0,01$) (Fig. 66B), aunque es inferior a los días de supervivencia previos analizados. A los 90d postlesión el número de células PCNA⁺ disminuye, aunque permanece en unos niveles significativamente mayores que en el control (* $0,05 > p > 0,01$). Finalmente, a los 120d la cantidad de células positivas a PCNA alcanza cifras similares a los individuos control, dato que se mantiene hasta los 210d postlesión ($p > 0,05$) (Fig. 66B). Las células marcadas con PCNA se encuentran distribuidas por toda la CNO entre los axones de las células ganglionares y formando las limitantes gliales con la AC y con la retina, coroides y esclera en la zona IO1. Sin embargo, desaparecen los grandes grupos de células en división localizadas en la zona IO1, siendo únicamente células aisladas.

A los 60d postlesión todavía se observan bastantes células Pax2⁺/PCNA⁺ localizadas fundamentalmente entre los axones de las células ganglionares y junto a la AC (datos no mostrados). A partir de los 90d hasta los 210d de supervivencia, son escasas las co-localizaciones en las limitantes de la AC y en la zona IO1, como ocurre en el control (Fig. 72M), aunque es posible encontrar alguna célula Pax2⁺/PCNA⁺ entre los axones de las células ganglionares a los 210d postpinzamiento (datos no mostrados). Como se describe durante todos los tiempos de supervivencia anteriores, al final del periodo regenerativo encontramos los dos tipos de células Pax2⁺/PCNA⁺ (Fig. 72M).

Desde los 60d hasta los 210d postlesión detectamos, al igual que en el resto de tiempos de supervivencia, células S100⁺/PCNA⁺ de soma y procesos marcados para S100 entre los axones de las células ganglionares, tanto en el DO como en la zona IO2 (Figs. 72L, N). Sin embargo, a los 90d postpinzamiento encontramos escasas células S100⁺/PCNA⁺ de soma pequeño levemente marcado para ambos marcadores (Fig. 72L). En la zona IO1 posterior, limitando con la esclera y la coroides, las co-localizaciones son muy escasas y se detectan en raras ocasiones (datos no mostrados). En algunos individuos de 180d postlesión, en esta zona IO1, detectamos una fuerte reacción glial con largos procesos positivos a S100 junto a los cuales observamos bastantes células S100⁺/PCNA⁺ (Fig. 72N). En algunos individuos a los 210d, en menor medida que a los 180d, también observamos cierta reacción glial en la zona IO1 (datos no mostrados).

Con la doble IHQ Sox10-PCNA, al igual que los tiempos de supervivencia analizados previamente, desde los 60d hasta los 210d postlesión detectamos escasas células Sox10⁺/PCNA⁻, aisladas y situadas únicamente entre los axones de las células ganglionares en el DO y zona IO2 (Figs. 73F-H).

MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES Y MARCAJE PARA PAX2

A) Degeneración y regeneración temprana

A los 7d postlesión, en secciones semifinas del DO observamos zonas en degeneración y numerosas células situadas junto a la AC (Fig. 74A). En secciones ultrafinas, como ocurre en el control, se observa la lámina basal limitada por astrocitos, algunos de ellos positivos a Pax2 (datos no mostrados), y sus prolongaciones que contienen gran cantidad de paquetes de filamentos intermedios, como en los animales control (Fig. 74B). Formando parte de esta limitante glial se encuentran los pies de las células de Müller como ocurre en los controles (Fig. 74B, D). En esta zona únicamente observamos axones amielínicos, que discurren entre procesos astrocitarios que contienen filamentos intermedios y se unen entre sí mediante desmosomas (Fig. 74B). Como consecuencia de la lesión, detectamos zonas en degeneración y, junto a ellas, gran cantidad de células (Fig. 74B). Estas células tienen un aspecto alargado y presentan prolongaciones. Su núcleo es heterocromático y contienen numerosas vesículas en su citoplasma con aspecto variado, unas claras y otras oscuras a los electrones; además presentan abundantes mitocondrias alargadas y REr (Figs. 74B-C), por todas estas características deducimos que se trata de células de microglía reactiva. En estas zonas en degeneración del DO, observamos astrocitos Pax2⁻ de núcleo eucromático con las características típicas de este tipo celular (Figs. 74B-C). También detectamos células pigmentadas que se introducen en el tejido nervioso próximo a la AC (Fig. 74B).

En zonas más internas del DO, a diferencia de los animales control y criolesionados, la mayor parte de los axones son amielínicos, siendo muy escasos los que presentan vaina de mielina. Estos últimos se sitúan fundamentalmente en zonas más internas del DO, próximas a la retina (Fig. 75A). También detectamos muchas áreas en degeneración (Fig. 75A). A lo largo de todo el grosor del DO, observamos numerosas células asociadas a los procesos vitreales de las células de Müller. Presentan un núcleo

heterocromático y escotado; y en su citoplasma contienen mitocondrias, RER y vesículas, que son características de células microgliales. Son menos abundantes que la microglía reactiva descrita junto a la AC (Figs. 75A-B). En esta zona también observamos numerosos astrocitos Pax2⁺ (Figs. 75C-D) y Pax2⁻ (Figs. 75C, E). Ambos presentan núcleos eucromáticos, numerosos paquetes de filamentos intermedios y se unen entre sí por desmosomas (Figs. 75C-E).

En la zona IO1, la limitante glial está formada por numerosos astrocitos Pax2⁺ unos de núcleo claro y otros de núcleo oscuro a los electrones (Fig. 76A). Como en control, presentan abundantes paquetes de filamentos intermedios y se unen entre sí por numerosos desmosomas. Algunos de ellos han fagocitado gránulos de pigmento (Fig. 76B, D). En el límite del NO con la coroides y la esclera, entre los astrocitos Pax2⁺ observamos células de núcleo muy eucromático negativas a Pax2 y abundante citoplasma que, como ocurre en control, probablemente pertenezcan al tejido conjuntivo (Figs. 76C-D). En la zona IO1, también detectamos células con un núcleo muy heterocromático Pax2⁻ y con escaso citoplasma, aunque no podemos distinguir de qué tipo celular se trata (Fig. 76E). En esta zona observamos mayor cantidad de axones mielinizados (Figs. 76B, E-F), aunque también observamos axones jóvenes (Fig. 76B). También aparecen numerosas zonas en degeneración, consecuencia de la lesión (Figs. 76A, C, F), y células que presentan un núcleo con numerosas zonas en condensación y en las membranas de sus mitocondrias tienen un aspecto menos compacto (Fig. 76F), características de que han entrado en un proceso de muerte celular.

En la parte posterior de la CNO, a los 7d postlesión, el NO presenta numerosas zonas en degeneración (Figs. 77A-B, D-E) y, a diferencia del DO, observamos numerosos axones mielinizados (Figs. 77A, C, E, G). En esta zona, encontramos muchos astrocitos Pax2⁺ (Figs. 77A-B). Éstos se sitúan empaquetando los axones mielinizados, su núcleo es eucromático y en su citoplasma presentan abundantes mitocondrias ovaladas y numerosos paquetes de filamentos intermedios, uniéndose a otros astrocitos mediante desmosomas (Fig. 77A). Como consecuencia de la lesión, detectamos astrocitos Pax2⁺ fagocíticos, que contienen en su citoplasma numerosas vesículas, algunas de ellas con restos lipídicos, y fagosomas (Fig. 77B). También observamos astrocitos Pax2⁻ situados entre los axones de las células ganglionares. Su núcleo y citoplasma presentan características similares a los astrocitos positivos a Pax2, y también pueden contener fagosomas (Fig. 77C). Además, detectamos numerosas

células de núcleo heterocromático, escotado y negativo a Pax2; en el citoplasma contienen abundantes vesículas y fagosomas, además de gran cantidad de mitocondrias cuya forma varía entre ovalada y alargada. Por todas estas características las clasificamos como microglía reactiva (Fig. 77D). También encontramos células que tienen un núcleo heterocromático y escotado; en su citoplasma contienen un retículo endoplasmático liso (REI) muy desarrollado y numerosas vesículas de distinta densidad a los electrones, las más claras contienen sustancias acuosas o lipídicas y las oscuras de tipo proteico (Fig. 77E-F). Estas células, como ocurre en la criolesión, son granulocitos extravasados procedentes del torrente sanguíneo (Fig. 41E).

Entre los axones de las células ganglionares observamos hileras de células rodeadas de procesos astrocitarios, con un núcleo heterocromático negativo a Pax2, un nucleolo aparente y escaso citoplasma en el que observamos grupos de pequeñas vesículas que probablemente contengan lípidos (Figs. 77G-H). Por estas características es muy posible que se trate de oligodendrocitos (Fig. 77G).

A los 7d de supervivencia, también detectamos numerosas células en división, tanto positivas como negativas a Pax2 (Figs. 78A, 79A). Ambos tipos carecen de envuelta nuclear y se observan los cromosomas libres en el citoplasma. Éste es claro a los electrones, y contiene numerosas mitocondrias cuya morfología varía de forma de media luna o de lupa, hasta la habitual ovalada (Figs. 78A-C). Las células Pax2⁺ en mitosis, las detectamos tanto entre los axones de las células ganglionares (Fig. 78A) como próximas a los vasos sanguíneos (Fig. 78D). También observamos células Pax2⁺ con núcleo eucromático, nucleolo aparente y con envuelta nuclear visible; su citoplasma es abundante y contienen numerosas mitocondrias ovaladas. Este tipo celular probablemente se trate de astrocitos inmaduros (Fig. 78F). Las células en mitosis negativas a Pax2, las encontramos entre los axones de las células ganglionares y próximas a vasos sanguíneos formando grupos (Fig. 79A) o aisladas (Fig. 79B). Algunas de ellas pueden ser células de microglía en mitosis, dado que contienen fagosomas en su citoplasma (Fig. 79B). También observamos células inmaduras, o en estado previo a la división celular, negativas a Pax2. Estas células tienen envuelta nuclear visible pero su cromatina presenta cierto grado de condensación. En su citoplasma encontramos numerosas mitocondrias ovaladas y en forma de media luna (Fig. 79C). Finalmente, detectamos células negativas a Pax2 con núcleo eucromático y nucleolo aparente, y cuyo citoplasma es abundante y con numerosas mitocondrias

ovaladas y alargadas. Estas células además tiene gran cantidad de microtúbulos, características todas ellas de oligodendrocitos inmaduros (Figs. 79D-E).

B) Regeneración

A los 21d postlesión, el DO presenta escasa mielinización y gran cantidad de células fundamentalmente situadas junto a la AC (Figs. 80A-B). La sección ultrafina revela que el DO está delimitado por la limitante glial, formada por numerosas prolongaciones astrocitarias con gran cantidad de filamentos intermedios que se unen entre sí mediante desmosomas (Fig. 80C). Los axones que discurren por esta zona son amielínicos (Fig. 80C). Además, al igual que a los 7d postlesión, detectamos escasas zonas en degeneración y gran cantidad de células (Fig. 80C). Algunas de estas células presentan un núcleo muy heterocromático y en su citoplasma contienen numerosas mitocondrias ovaladas y gran cantidad de vesículas y gránulos de pigmento (Figs. 80C-E), tratándose de células de microglía reactiva. También detectamos abundantes células de núcleo heterocromático y escaso citoplasma que no están integradas en el tejido nervioso, que pueden ser células sanguíneas extravasadas (Fig. 80C). En el citoplasma de otras células también observamos que presentan aspecto claro y con mitocondrias en forma de media luna, probablemente perteneciente a células inmaduras o en estado de división celular (Figs. 80C, F).

En el DO, pero en zonas más próximas a la retina, encontramos numerosos astrocitos Pax2⁺ con un nucleolo aparente y abundantes paquetes de filamentos intermedios en su citoplasma (Figs. 81A-B). La mayor parte de los axones de esta zona, como ocurre a los 7d postlesión, se encuentra sin mielinizar (Fig. 81B).

En la zona IO1, observamos numerosos astrocitos Pax2⁺. Estos astrocitos presentan un núcleo eucromático y con indentaciones. En su citoplasma contienen mitocondrias ovaladas o redondeadas, RE y gránulos de pigmento; además, poseen abundantes paquetes de filamentos intermedios y se unen entre sí por desmosomas (Fig. 81C). En esta zona también encontramos astrocitos de núcleo oscuro ligeramente heterocromático y positivos a Pax2, con mitocondrias ovaladas en su citoplasma y uniones de membrana de tipo desmosoma (Fig. 81D).

En la zona IO2, limitando a la AC detectamos tanto astrocitos negativos a Pax2 (Figs 82. A-B) como positivos a Pax2 (Fig. 82C). Ambos tipos de astrocitos presentan

las características típicas de este tipo celular (Figs. 82A-C). Asociadas a los astrocitos de esta zona detectamos células de núcleo heterocromático y sin características particulares en su citoplasma que nos indiquen de qué tipo celular se trata (Fig. 82A). Los axones de las células ganglionares en esta región no presentan vaina de mielina.

Finalmente, en la zona posterior de la CNO, buena parte de los axones de las células ganglionares se encuentran sin mielinizar como consecuencia de la lesión (Fig. 82D). También observamos áreas en degeneración (Fig. 82E). Entre los axones, localizamos astrocitos de núcleo oscuro y con indentaciones, negativos a Pax2 (Fig. 82D). Además, encontramos células de núcleo heterocromático y citoplasma rico en RER, que probablemente se trate de oligodendrocitos (Fig. 82F).

3.3 RESUMEN

Durante la regeneración tras pinzamiento, la subpoblación de astrocitos Pax2⁺ se ve aumentada en dos ocasiones: la primera durante los primeros tiempos de supervivencia y asociada a la llegada masiva de axones regenerantes Zn8⁺ a la CNO (Fig. 83D); la segunda está relacionada con la adquisición de la organización original de la CNO, al final del periodo de regeneración (Fig. 83E). Además, durante los primeros tiempos de supervivencia, aparece un grupo de células Pax2⁺/ZO1⁺ localizado en el límite de la retina, EP y CNO.

Por otro lado, tanto las células de Müller que limitan la retina con la CNO, como los astrocitos de la limitante glial de la zona IO1 y CNO posterior sufren modificaciones. Estas variaciones se manifiestan en un incremento en la cantidad de procesos positivos a GFAP en la CNO (Fig. 83D). En el DO son los procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺/GS⁺ que presentan una fuerte desorganización durante el inicio de la regeneración (Fig. 83D), y una gran concentración de los mismos en periodos posteriores (Fig. 83E). En la zona IO1 los astrocitos que limitan la retina con la CNO, muchos de ellos Pax2⁺, presentan gran cantidad de procesos GFAP⁺ (Fig. 83D). En zonas posteriores de la CNO, los astrocitos de la limitante glial se marcan fuertemente con GFAP-S100 y, además, como consecuencia del pinzamiento, con GS. Estos astrocitos, originan un anillo alrededor del límite de la CNO y emiten sus procesos hacia el interior de la misma en dirección transversal, desde el inicio de la

regeneración hasta períodos tardíos (Fig. 83D-E). Algunas de estas células S100⁺ se introducen desde la CNO hacia el límite entre el EP, coroides y esclera.

En la CNO durante la regeneración postpinzamiento, detectamos una nueva población de astrocitos Pax2⁺/GS⁺ que en las primeras etapas de supervivencia se encuentran tanto en el DO como en la zona posterior de la CNO; sin embargo, en periodos más largos en la regeneración, quedan restringidos a la CNO posterior e inicio del SIO, donde se encuentran tanto en limitante glial como entre los axones (Figs. 83D-E).

En la CFNO de la retina se observan células S100⁺ durante todo el periodo regenerativo tal y como ocurre en control.

En los primeros tiempos de supervivencia posteriores al pinzamiento, observamos una disminución en la población de oligodendrocitos Sox10⁺ coincidente con la ausencia de células S100⁺ de soma pequeño descritas en control (Fig. 83D). Sin embargo estas células recuperan rápidamente su distribución original a mitad del periodo regenerativo (Fig. 83E).

Por otro lado, la mielina desaparece prácticamente de la CNO durante los primeros tiempos de supervivencia postpinzamiento, tal y como muestra el marcaje para MBP y el análisis ultraestructural de la CNO (Fig. 83D). A diferencia de la criolesión, en la CNO anterior no observamos tantas zonas en degeneración a los mismos tiempos de supervivencia, pero sí en la zona posterior donde tanto astrocitos como microglía retiran los restos celulares. El marcaje MBP⁺ de la CNO se recupera poco más tarde que la población de oligodendrocitos Sox10⁺.

Tanto astrocitos Pax2⁺ como células S100⁺ u oligodendrocitos Sox10⁺ inician procesos de división celular (PCNA⁺) y, como ocurre durante la criolesión, son ligeramente más numerosas que en estados control (Fig. 83D). Sin embargo, son pocas células proliferativas comparadas con el gran aumento en la división celular que se produce en la CNO durante los primeros tiempos de supervivencia tras el pinzamiento. Al contrario que durante la criolesión, tanto los precursores de astrocitos Pax2⁺/PCNA⁺ como las células S100⁺/PCNA⁺ se localizan tanto en las limitantes gliales como entre los axones de las células ganglionares (Fig. 83D). Los oligodendrocitos Sox10⁺/PCNA⁺ se sitúan únicamente entre los axones de las células ganglionares (Fig. 83D). Con

microscopía electrónica detectamos tanto células de microglía en división como células Pax2⁻ que pueden ser tanto astrocitos, como oligodendrocitos o células extravasadas.

Como ocurre en la criolesión, entre los axones de las células ganglionares en la CNO, observamos células citoqueratina⁺ fuertemente marcadas y negativas a Pax2, únicamente visibles durante períodos tempranos de regeneración. Mediante microscopía electrónica, en toda la CNO también observamos células de microglía, granulocitos, células sanguíneas, astrocitos con gránulos de pigmento en su citoplasma y células sin características ultraestructurales particulares que nos ayuden a determinar de qué tipo celular se tratan.

4. EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A Y SHH

4.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARCIAL DE PAX2A EN CARPÍN

En pez cebra el gen *pax2a* se encuentra en el cromosoma 13 y contiene 12 exones, 10 de ellos similares a los descritos en otras especies y 2 específicos de pez cebra (exones 5.1 y 7.1) (Lun y Brand, 1998). Se han observado 12 variantes del gen obtenidas por procesamiento alternativo, entre las cuales las dos variantes mayoritarias son el transcrito 1 (t1) y el transcrito 2 (t2) que contienen o carecen del exón 5.1 respectivamente (Fig. 84A) (Lun y Brand, 1998).

Para secuenciar un fragmento de transcrito del gen *pax2a* de carpín, necesario para el diseño específico de los cebadores a utilizar en la qPCR, realizamos experimentos de PCR utilizando cDNA de NO de carpín y cDNA de pez cebra de 5dpf como control positivo y como cebadores, que los utilizados por Pfeffer *et al.* (1998) como susceptibles de ser específicos de este gen en los ciprínidos. Obtuvimos dos productos de PCR en ambas especies (Fig. 84B). Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron de 359 pb y 404 pb, dado que el cebador S es complementario de una región del exón 4 y el cebador A es complementario de una región del exón 6 de pez cebra, la banda de mayor tamaño (404 pb) se debe a la incorporación del exón 5.1 (Fig. 84A). Según las 12 variantes de *pax2a* descritas por Lun y Brand (1998), el

fragmento amplificado de *pax2a* de 359 pb en pez cebra puede corresponder a los transcritos 2, 5, 9, 10 y 12; y el fragmento de 404 pb puede pertenecer a los transcritos 1, 3, 4, 7, 8, 11. Sin embargo, ninguno de ellos puede tratarse del transcrito 6, dado que éste carece del exón 6. Este hecho refuerza la validez de amplificar esta región mayoritaria de gran parte de las isoformas presentes en dicho gen.

Mediante el programa ClustalW comparamos las secuencias obtenidas de carpín con las secuencias de las variantes mayoritarias de *pax2a* en pez cebra (*pax2a_t1*: ENSDART00000076992 y *pax2a_t2*: NM_131184.2) (Lun y Brand, 1998) descritas en la base de datos de GenBank y Ensembl. La secuencia de cDNA de menor tamaño t2 (359 pb) de carpín presenta escasas modificaciones frente a la de pez cebra: cambia una T por una C y una T por una A en el exón 4; una T por una C en el exón 5; y una T por una A y una C por una T en el exón 6 (Fig. 85A). Estas modificaciones se traducen en un único cambio en la secuencia aminoacídica predicha: un aminoácido serina (Ser) en el pez cebra por un aminoácido treonina (Thr) en el carpín (Fig. 85C). Ambos aminoácidos presentes en el dominio responsable de unión con otras proteínas denominado octapéptido (Lun y Brand, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998; Wehr y Gruss, 1996), pertenecen al grupo de los aminoácidos hidrófilos y, por tanto, no suponen una modificación en la estructura tridimensional de la proteína. Dada la gran similitud entre secuencias: 98% en el análisis del cDNA y 99% en la comparación de aminoácidos, deducimos que son homólogas y, del mismo modo, los genes codificantes de estos cDNAs son ortólogos.

La secuencia de cDNA de mayor tamaño t1 (404 pb) de carpín, contiene el exón 5.1 que representa una adición de 45 pb a la secuencia del anterior transcrito y, asimismo, codifica en el adecuado marco de lectura 17 aminoácidos más a la secuencia aminoacídica del t2 (Figs. 85B, D). El exón 5.1 es idéntico en ambas especies, de forma que en carpín las únicas modificaciones que sufre *pax2a_t1* respecto a su homólogo en pez cebra son las descritas para *pax2a_t2*.

Los genes de la familia *pax* se encuentran altamente conservados en la evolución (Chalepakis *et al.*, 1991; Czerny *et al.*, 1993) y en vertebrados dicha familia está compuesta por cuatro grupos de genes según su similitud en secuencia y expresión: 1) *pax1* y *pax9*, 2) *pax2*, *pax5* y *pax8*, 3) *pax3* y *pax7* y 4) *pax4* y *pax6* (Balczarek *et al.*, 1997); donde los del grupo dos están evolutivamente más próximos. Cuando

comparamos la secuencia aminoacídica parcial de los dos transcritos del gen *pax2a* de carpín dorado descritos en este trabajo con la secuencia de aminoácidos de la proteína Pax2 de distintos vertebrados descritas en la base de datos de GenBank (Fig. 84C), deducimos que ambas isoformas de Pax2a en carpín (*Carassius auratus*) y pez cebra (*Danio rerio*, Pax2a_t2: NP_571259.1, Pax2a_t1: ENSDART00000076992) están más próximas evolutivamente entre sí que el Pax2 del otro teleósteo analizado, medaka (*Oryzias latipes*, CAB09696.1). A su vez, como era esperado, la proteína Pax2 de teleósteos está evolutivamente más próxima entre sí que la de anfibios, como muestra el único ejemplo de este *phylum* (*Xenopus laevis*, NP_001079830.1). Por su parte, la proteína Pax2 de humanos (*Homo sapiens*, isoforma PAX2A: NP_003978.2), ratón (*Mus musculus*, NP_035167.3) y rata (*Rattus norvegicus*, NP_001099831.1) están evolutivamente próximas entre sí y éstas, a su vez, próximas a la proteína Pax2 de pollo (*Gallus gallus*, NP_990124.1). Finalmente, la familia de proteínas Pax2 está separada de la familias de proteínas Pax5 (*Homo sapiens*: NP_057953.1; *Mus musculus*: NP_032808.1; *Gallus gallus*: NP_989755.1; *Xenopus laevis*: NP_001079237.1; *Danio rerio*: NP_571713.1) y Pax8 (*Homo sapiens*, isoforma PAX8A: NP_003457.1; *Rattus norvegicus*: NP_112403.2; *Mus musculus*: NP_035170.1; *Xenopus laevis*: NP_001081941.1; *Danio rerio*: XP_001339893.3) utilizadas como grupo de proteínas control del agrupamiento de las proteínas Pax, todas ellas separadas de la proteína ancestral Shaven de *Drosophila melanogaster* (NP_726645.3) (Balczarek *et al.*, 1997; Fu y Noll, 1997; Fu *et al.*, 1998) (Fig. 84C), demostrándose que *pax2a* de carpín es ortólogo a otros *pax2* de vertebrados.

Dado que la mayor parte de los estudios de expresión génica de *pax2a* en pez cebra se realizan con *pax2a_t2*, ortólogo al del resto de vertebrados estudiados, escogimos la secuencia de *pax2a_t2* en carpín para diseñar cebadores específicos de ésta y analizar su expresión génica mediante qPCRs en este trabajo de tesis doctoral.

4.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A Y SHH EN LA RETINA Y CNO EN ANIMALES CONTROL

EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A

Para analizar el patrón de expresión de *pax2a_t2* en la retina y CNO de carpín control realizamos experimentos de PCR. Los resultados obtenidos demuestran su expresión génica en ambos tejidos. Sin embargo, es apreciable que el nivel de expresión génica es menor en la retina que en la CNO (Fig. 84D).

EXPRESIÓN GÉNICA DE SHH

Del mismo modo, mediante experimentos de PCR, analizamos el patrón de expresión génica de *shh* en la retina y CNO de carpín control. Demostramos su expresión génica en ambos tejidos. Además, observamos que el nivel de expresión génica es ligeramente inferior en la retina que en la CNO (Fig 84D).

Para comprobar si la expresión génica de *shh* en la retina está relacionada con la ZPG, realizamos experimentos de PCR tomando la retina completa, y la ZPG y la retina madura por separado. En los tres casos detectamos su expresión génica, siendo inferior en la ZPG y mayor en la retina completa al añadir la misma cantidad de cDNA inicial a cada una de las muestras (Fig. 84E).

4.3 ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE PAX2A EN LA CNO DURANTE LA REGENERACIÓN

Para analizar la posible modificación del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO como consecuencia de la criolesión o el pinzamiento, realizamos qPCRs y analizamos cuantitativamente éstas mediante la cuantificación, relativa tomando como genes de referencia el *rRNA 18s* y el *EF1 α* . Los resultados obtenidos comparando el gen *pax2a_t2* con cada uno de estos genes fueron similares.

ANIMALES CRIOLESIONADOS

En los animales criolesionados, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO a los 2d postlesión es similar al de los animales control ($p>0,05$). Sin embargo, a partir de los 7d de supervivencia su nivel de expresión génica aumenta de forma altamente significativa ($**p<0,01$) en un 351% con respecto a los individuos control (Fig. 86A). A los 15d postcriolesión, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* se incrementa de forma más acusada y de forma altamente significativa ($**p<0,01$) hasta el 768%, alcanzando el máximo pico de expresión génica durante los tiempos de supervivencia analizados. A los 21-30d postlesión, disminuye el nivel de expresión génica a un 572% y un 636% respectivamente, sin embargo se mantiene altamente significativo ($**p<0,01$) comparado con los individuos control (Fig. 86A). A los 60d postlesión, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* disminuye a un 290%, pero continúa siendo altamente significativo con respecto a los animales control ($**p<0,01$). Finalmente, a los 90d de supervivencia, la expresión de *pax2a_t2* alcanza niveles similares a los animales control de un 101% ($p>0,05$) (Fig. 86A).

ANIMALES PINZADOS

En los animales pinzados, a diferencia de la criolesión, a los 2d postlesión el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO aumenta de forma altamente significativa ($**p<0,01$), es de un 7305%, muy superior comparado con el resto de tiempos de supervivencia analizados. A los 7d postpinzamiento, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* es de 1301%, inferior a los 2d de supervivencia pero significativamente superior a los individuos control ($**p<0,01$) (Fig. 86B). Desde los 15d hasta los 30d postlesión, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* se mantiene altamente significativo comparado con los animales control ($**p<0,01$); sin embargo, disminuye a cifras próximas al 830%, inferiores a los 2d y 7d postpinzamiento (Fig. 86B). Desde los 60d hasta los 90d, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* disminuye nuevamente a un 367% y 344% respectivamente, no obstante, mayor de forma altamente significativa a los animales control ($**p<0,01$). A los 120d postlesión, el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* disminuye a un 160%, permaneciendo significativamente superior a los animales control ($*0,05>p>0,01$) (Fig. 86B). Cabe esperar que en tiempos superiores alcance los niveles control.

5. RESUMEN COMPARATIVO ENTRE CRIOLESIÓN Y PINZAMIENTO

Realizamos dos lesiones muy diferentes y alejadas de la CNO, sin embargo ambas producen una fuerte reacción en la población glial de esta región (Tabla 6).

Mediante criolesión, además de lesionar la ZPG dañamos las células ganglionares de nueva formación (Fig. 83G) y con ellas eliminamos los axones jóvenes de la CNO que inician procesos de degeneración (Fig. 83B). Cuando pinzamos el SIO, la CNO pierde la mielina casi por completo y la mayor parte de los axones que discurren por la misma son regenerantes (Fig. 83D).

En ambas lesiones, se incrementa la expresión génica de *pax2a_t2*, aunque de forma más acentuada durante el pinzamiento. Por otro lado, la población de células Pax2⁺ disminuye al principio de la criolesión y luego aumenta su número con respecto al control; en los animales pinzados, se producen dos aumentos de células Pax2⁺ a lo largo de la regeneración (Tabla 6).

Entre los axones de la CNO, observamos un aumento en la cantidad de procesos S100⁺ después de la criolesión y GFAP⁺ después del pinzamiento (Figs. 83B, D). Además, únicamente en los animales pinzados, la limitante glial GFAP⁺/citoqueratina⁺ aumenta su marcaje (Fig. 83D).

En ambas lesiones, detectamos un anillo de células S100⁺/GFAP⁺/GS⁺ en el límite posterior de la CNO, apenas existente en animales control (Figs. 83B, D). También observamos una fuerte desorganización en los procesos vitreales de las células de Müller al principio de la regeneración y un aumento de los mismos en tiempos de supervivencia largos.

Únicamente en los animales pinzados, detectamos una nueva población de células Pax2⁺/GS⁺ ausente en control y criolesión (Figs. 83D-E).

Ambos tipos de lesión se ven acompañados de un aumento en la división de células Pax2⁺, S100⁺ y Sox10⁺, aunque en la mayoría de ellas no co-localizan ninguno de estos tres marcadores (Figs. 83B, D).

La población de células Sox10⁺/GS⁺ y Sox10⁺/GS⁻ así como las células S100⁺ de soma pequeño no se ven afectadas durante la criolesión, pero sí disminuyen durante el pinzamiento (Figs. 83B, D). Esto se ve reflejado con el marcaje MBP⁺, donde en criolesión observamos pequeñas áreas desmielinizadas pero en pinzamiento la CNO carece de mielina casi por completo (Fig. 83D).

CRIOLESIÓN	PINZAMIENTO
↑ Expresión génica de <i>pax2a_t2</i>	↑↑ Expresión génica de <i>pax2a_t2</i>
↓ Número de células Pax2 ⁺ ↑ Número de células Pax2 ⁺	↑ Número de células Pax2 ⁺ ↑ Número de células Pax2 ⁺
↑ Cantidad de procesos S100 ⁺	= Cantidad de procesos S100 ⁺
= Cantidad de procesos GFAP ⁺	↑ Cantidad de procesos GFAP ⁺
= Limitante glial GFAP ⁺ /citoqueratina ⁺	↑ Limitante glial GFAP ⁺ /citoqueratina ⁺
↑ Anillo S100 ⁺ /GFAP ⁺ /GS ⁺	↑ Anillo S100 ⁺ /GFAP ⁺ /GS ⁺
Desorganización pies de Müller ↑ Pies de Müller	Desorganización pies de Müller ↑ Pies de Müller
-----	Células Pax2 ⁺ /GS ⁺
↑ Células PCNA ⁺	↑ Células PCNA ⁺
= Sox10 ⁺ /GS ⁺ y Sox10 ⁺ /GS ⁻ = S100 ⁺ soma pequeño	↓ Sox10 ⁺ /GS ⁺ y Sox10 ⁺ /GS ⁻ ↓ S100 ⁺ soma pequeño
↓ Mielina MBP ⁺	↓↓↓ Mielina MBP ⁺

Tabla 6: Comparación de la CNO en criolesión y pinzamiento. Aumento (↑), disminución (↓), no hay variaciones (=).

Iconografía

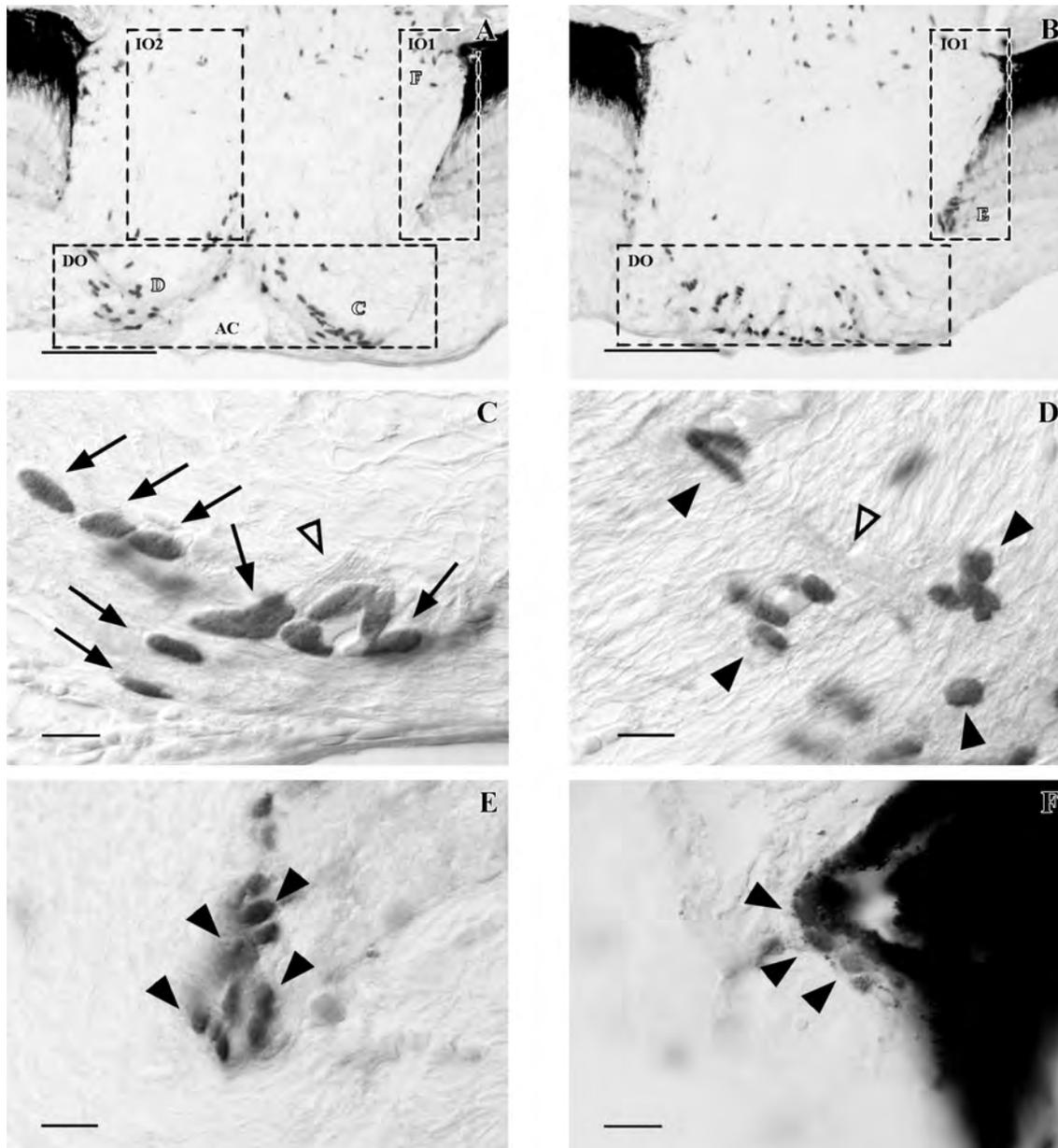


Figura 37: Inmunorreactividad a Pax2 en la CNO. **A-B:** Distribución de las células Pax2⁺. Las células Pax2⁺ se concentran en el DO próximas a la AC y en la zona IO1 adyacente a la retina. Las células Pax2⁺ aisladas están en la zona IO2. Las tres zonas de la CNO están indicadas con recuadros en secciones longitudinales del NO. **C:** Detalle del DO de la imagen A. Núcleos grandes y alargados de células Pax2⁺ limitando la AC (flechas) e íntimamente asociados a los procesos vitreales de las células de Müller (cabeza de flecha hueca). **D:** Detalle del DO de la foto A. Células Pax2⁺ (cabezas de flecha) organizadas longitudinalmente y perpendicularmente a los procesos vitreales de las células de Müller (cabeza de flecha hueca). **E:** Detalle de la zona IO1 próxima a la CCG en la imagen B. Núcleos pequeños y alargados de las células Pax2⁺ limitando la CNO con las capas internas de la retina (cabezas de flecha). **F:** Ampliación de la zona IO1 posterior de A. Núcleos pequeños y alargados de las células Pax2⁺ entre la CNO y la región escleral de la retina (cabezas de flecha). Barras de escala: A-B: 100 μ m; C-F: 10 μ m.

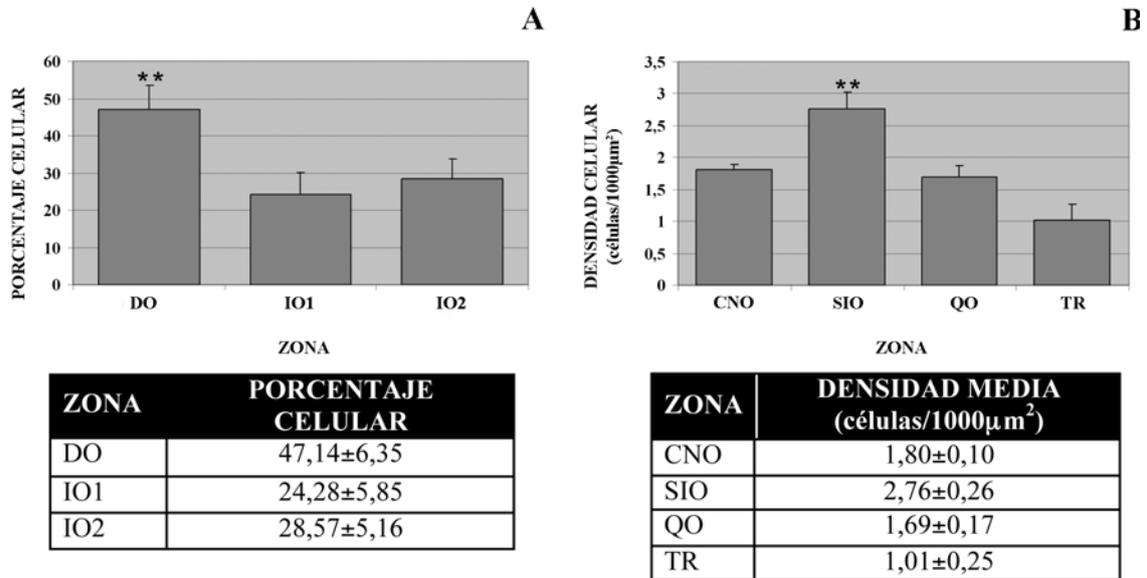
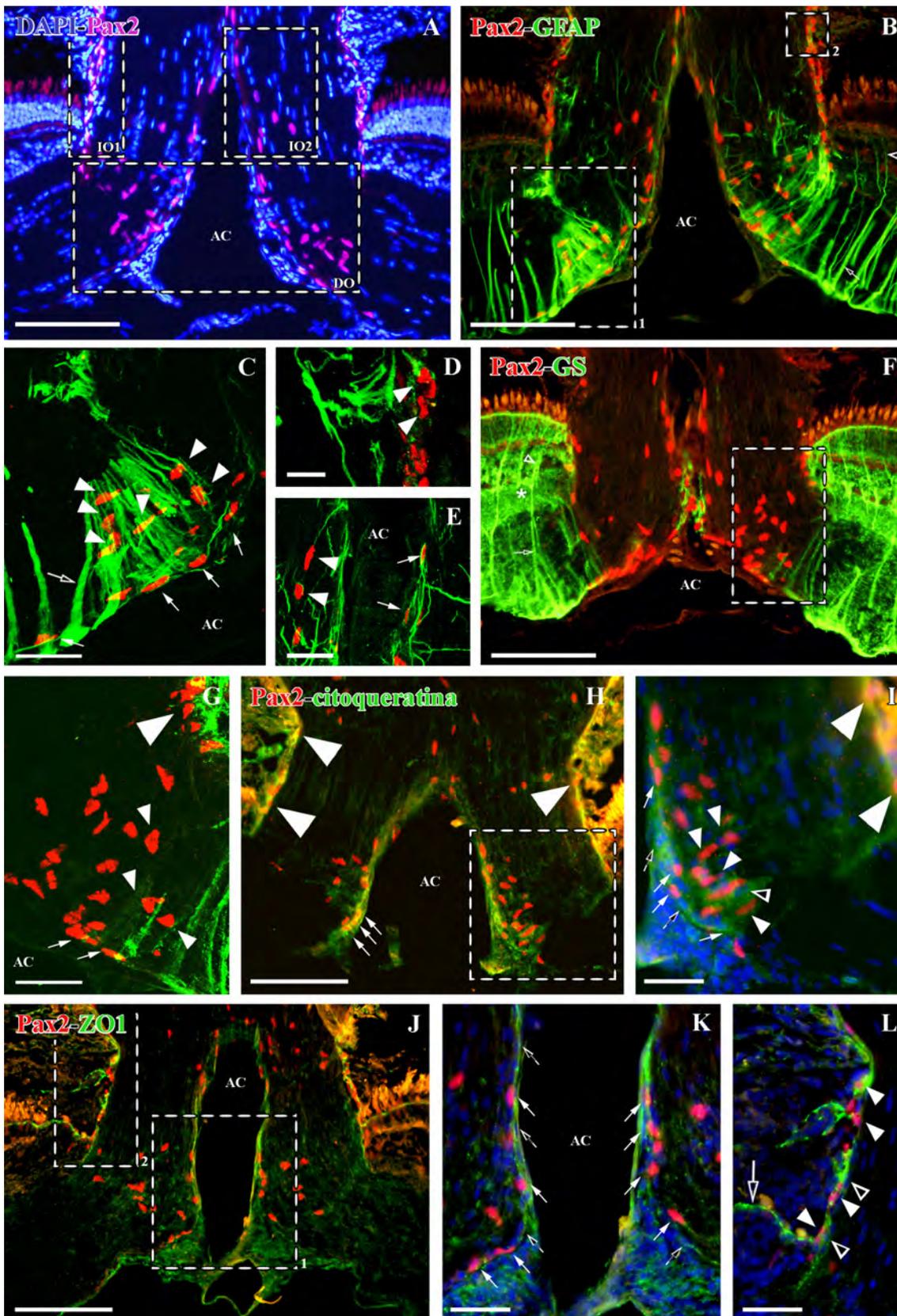


Figura 38: Resultados del análisis estadístico en control. **A:** Diferencias en el porcentaje de células Pax2⁺ entre las tres regiones de la CNO. **B:** Resultados de la densidad de células Pax2⁺ a lo largo de las cuatro regiones del NO. Las tablas indican el porcentaje y la densidad media de células, respectivamente; **p<0,01: diferencias altamente significativas.

Figura 39: Caracterización de las células Pax2⁺ con dobles marcajes en secciones longitudinales de la CNO. **A:** Escasas células Pax2⁺ (rosa) respecto al número total de células en la CNO marcadas con DAPI (azul). Las regiones de la CNO aparecen recuadradas. **B:** Relación entre las células Pax2⁺ (rojo) y los procesos GFAP⁺ (verde). Procesos esclerales de las células de Müller (cabeza de flecha hueca) y procesos vitreales (flecha hueca), ambos GFAP⁺. Ampliación de los recuadros 1 y 2 en C y D, respectivamente. **C:** Células Pax2⁺/GFAP⁺ limitando la AC (flechas) y células Pax2⁺ (cabezas de flecha) situadas entre los procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺ (flecha hueca). **D:** Células Pax2⁺/GFAP⁺ de zona IO1 (cabezas de flecha). **E:** Células Pax2⁺/GFAP⁺ de la limitante glial de la AC (flechas) y localizadas entre los axones (cabezas de flecha). **F:** Doble marcaje Pax2 (rojo)-GS (verde). Procesos vitreales de las células de Müller (flecha hueca) y procesos esclerales (cabeza de flecha hueca), soma de la célula (asterisco), todos GS⁺. Recuadro ampliado en G. **G:** Células Pax2⁺ de la limitante glial de la AC (flechas), entre los procesos vitreales de las células de Müller (cabezas de flecha) y en la zona IO1 (cabeza de flecha grande). **H:** Doble marcaje Pax2 (rojo)-citoqueratina (verde). Débil inmunorreactividad a citoqueratina, localizada en el límite de la AC (flechas) y de la retina-NO (cabezas de flecha). Recuadro ampliado en I. **I:** Detalle del DO y de la zona IO1 con DAPI (azul). Células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (flechas) y células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (flechas huecas) de la limitante glial de la AC. Células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabeza de flecha hueca) del DO, y células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha grandes). **J:** Doble marcaje Pax2 (rojo)-ZO1 (verde). Leve inmunorreactividad de ZO1. Recuadros 1 y 2 ampliados en K y L, respectivamente. **K:** Detalle del DO y la zona IO2 con DAPI (azul). Células Pax2⁺/ZO1⁺ (flechas) y células Pax2⁺/ZO1⁺ (flechas huecas) de la limitante glial de la AC. **L:** Detalle de la zona IO1 con DAPI (azul). Células Pax2⁺/ZO1⁺ (cabezas de flecha), células Pax2⁺/ZO1⁺ (cabezas de flecha huecas) de la glía limitante de la retina-NO y MLE ZO1⁺ (flecha hueca). Barras de escala: A-B, F, H y J: 100 μm; C, E, G, I y K-L: 30 μm; D: 10 μm.



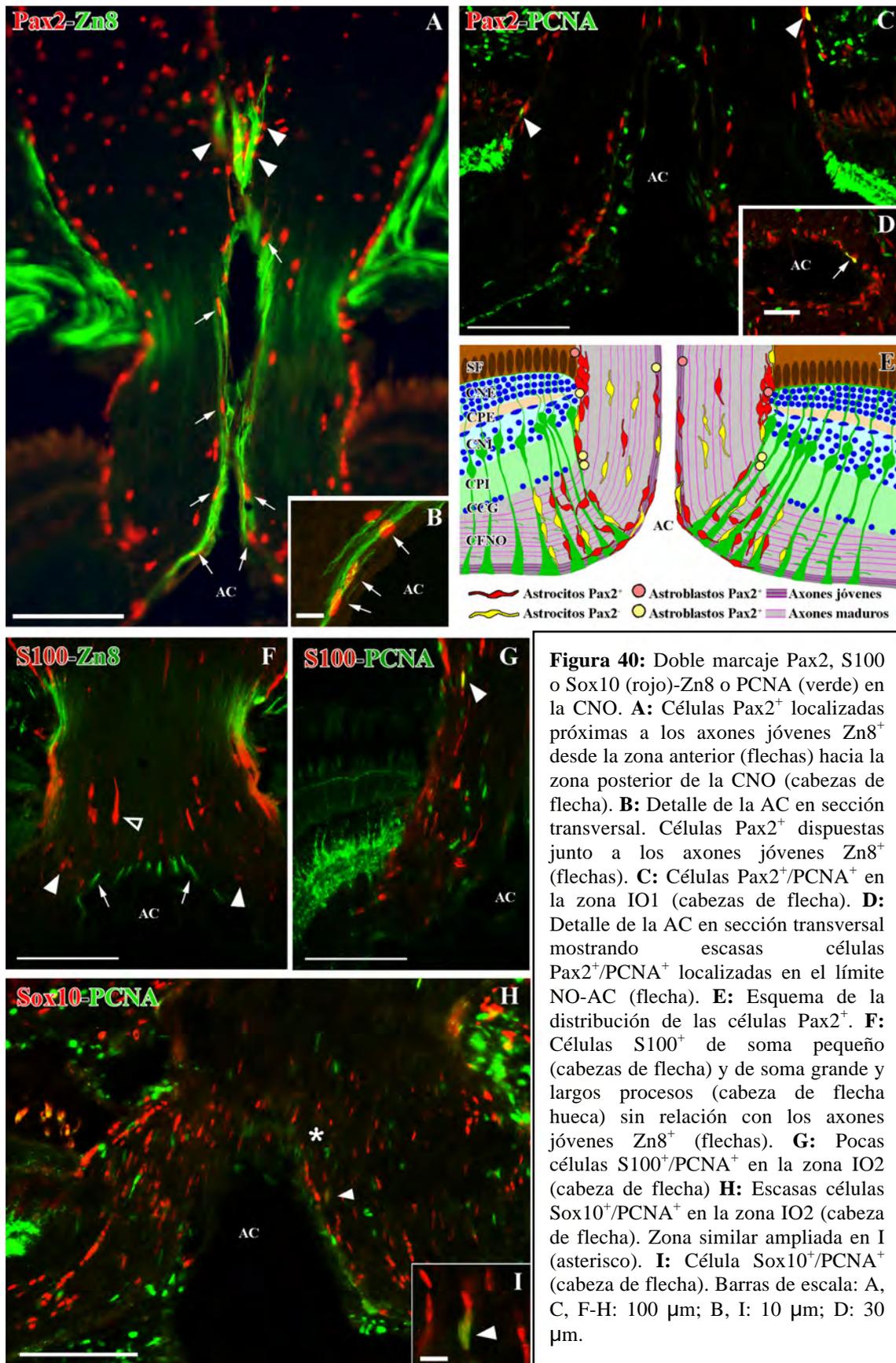


Figura 41: Caracterización de las células S100⁺ con dobles marcajes en secciones longitudinales de la CNO. **A:** Escasas células S100⁺ (rosa) respecto al número total de células marcadas con DAPI (azul). Células S100⁺ de soma pequeño (cabezas de flecha) y de soma grande (cabezas de flecha hueca) y largos procesos (flechas). **B:** Relación entre las células S100⁺ (rojo) y los procesos GFAP⁺ (verde). Células S100⁺ de soma pequeño (cabezas de flecha), células S100⁺ de soma grande (cabeza de flecha hueca), procesos S100⁺ (flechas), procesos S100⁺/GFAP⁺ (amarillo), procesos GFAP⁺ (flechas huecas) y procesos vitreales de las células de Müller (flecha hueca grande). Ampliación del recuadro en la imagen C. **C:** Célula S100⁺/GFAP⁺ con DAPI (azul). Proceso S100⁺/GFAP⁺ (flecha hueca) y proceso S100⁻/GFAP⁺ (flecha). **D:** Sección longitudinal lateral de la CNO. Células S100⁺ de soma grande (cabezas de flecha hueca) y largos procesos (flechas). **E:** Doble marcaje S100 (rojo)-ZO1 (verde). Escasas células S100⁺/ZO1⁺ (flechas). **F:** Doble tinción S100 (rojo)-citoqueratina (verde). Débil inmunorreactividad a citoqueratina localizada en los límites con la AC y la retina con el NO (flechas huecas). Zona similar ampliada en G (asterisco). **G:** Células S100⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha), células S100⁻/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha huecas) y proceso S100⁺/citoqueratina⁺ (flecha). **H:** Doble inmunomarcaje S100 (rojo)-GS (verde). Células S100⁺ (flechas), células GS⁺ (flechas huecas), células S100⁺/GS⁺ doblemente inmunopositivas (cabezas de flecha), S100⁺/GS⁺ con citoplasma S100⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas), células S100⁺/GS⁻ (flechas), células S100⁻/GS⁺ (flechas huecas) y procesos vitreales de las células de Müller (flecha hueca grande). Recuadro ampliado en I. **I:** Células con citoplasma S100⁺/GS⁺ (cabeza de flecha) y con citoplasma S100⁻/GS⁺ (cabezas de flecha huecas). **J:** Doble inmunorreactividad S100-Zn8 sobre retina *in toto*. Células S100⁺ (rojo), axones jóvenes Zn8⁺ (verde, cabezas de flecha) y vasos sanguíneos (flechas). **K:** Célula S100⁺/GFAP⁻ (rojo/verde) con DAPI (azul). **L:** Célula S100⁺ con proceso GFAP⁺ (flecha) con DAPI (azul). **M:** Sección transversal de la retina próxima a la CNO. Procesos S100⁺ en la CPI (cabezas de flecha), procesos S100⁺/GS⁺ en la CPI (amarillo), largos procesos S100⁺ dirigidos hacia la superficie vitreal (flechas), células de Müller (verde). Barras de escala: A-B, D-F, H, M: 100 μ m; C, K-L: 10 μ m; G, J: 50 μ m; I: 20 μ m.

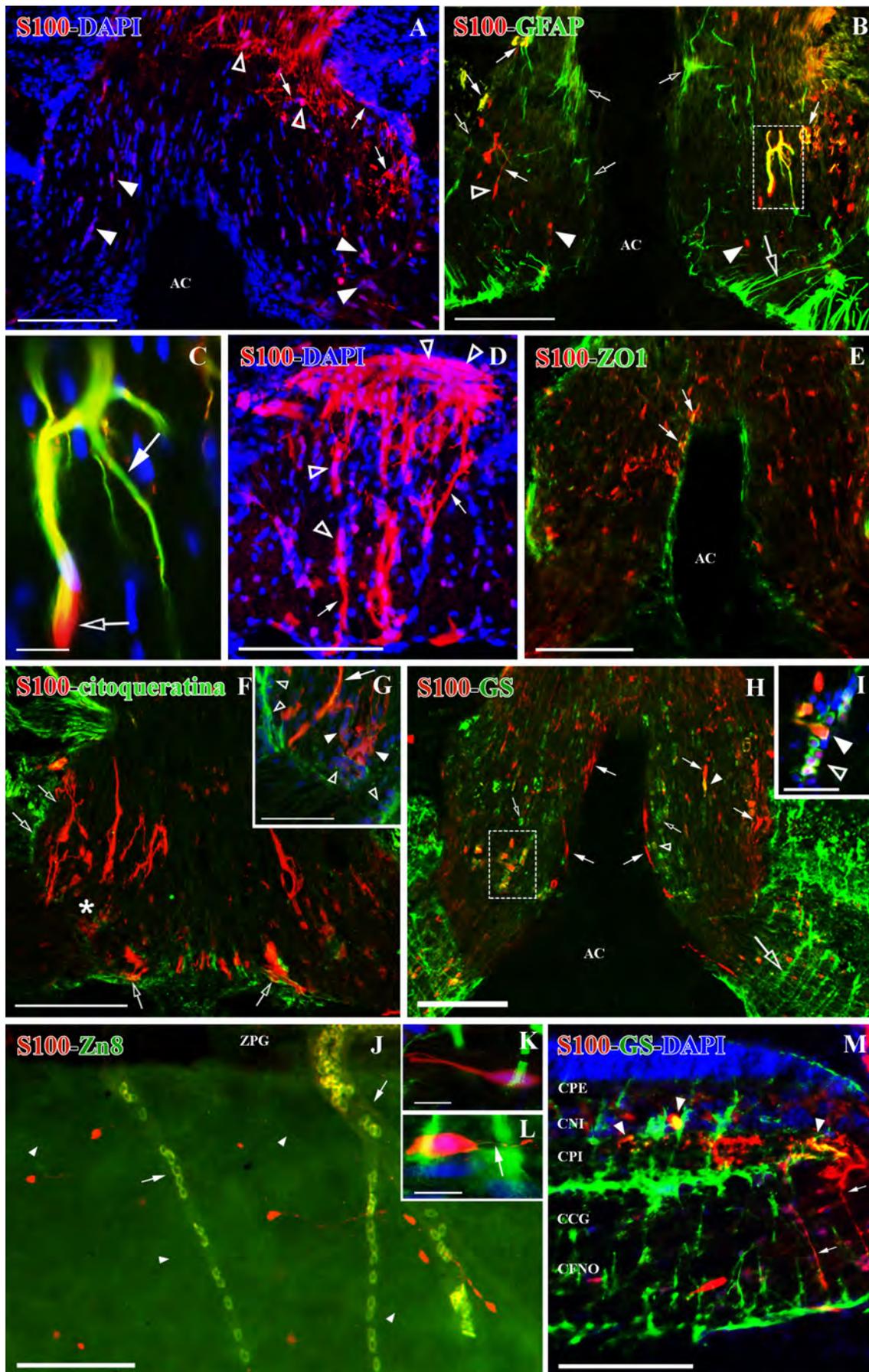


Figura 42: Mielinización (MBP⁺) y distribución de oligodendrocitos (Sox10⁺) en la retina y CNO. MBP o Sox10 (rojo), Zn8 o GS (verde) y DAPI (azul). **A:** Imagen de la ZPG (recuadro). Células ganglionares jóvenes Zn8⁺ (flecha hueca), zonas en mielinización MBP⁺ (flechas). **B:** CNO mielinizada MBP⁺ salvo en el borde en crecimiento con los axones jóvenes Zn8⁺. Recuadros 1, 2 y 3 ampliados en C, D y E, respectivamente. **C:** Entrada de los axones Zn8⁺ en el DO rodeados de axones mielinizados MBP⁺. **D:** Vaina de mielina MBP⁺ (flecha) en la zona IO2. **E:** Retina próxima a la CNO. Escasas zonas en mielinización MBP⁺ (cabezas de flecha). Axones jóvenes Zn8⁺ (flecha hueca) por la zona más vitreal de la CFNO. **F:** Sección transversal de la retina próxima a la CNO. Oligodendrocitos Sox10⁺ en grupos (cabeza de flecha hueca) o en hilera (flecha hueca) en la CFNO. **G:** Sección longitudinal de la CNO con DAPI. Oligodendrocitos Sox10⁺ organizados en hileras (flechas huecas) o en grupos (cabeza de flecha hueca). Grupos de oligodendrocitos Sox10⁺ en la zona IO1 (cabezas de flecha). **H:** Doble marcaje Sox10-GS en la CNO longitudinal. Oligodendrocitos Sox10⁺/GS⁺ (cabezas de flecha) y oligodendrocitos Sox10⁺/GS⁻ (flechas). Grupo de células Sox10⁺/GS⁺ en la zona IO1 (cabeza de flecha hueca). Recuadro ampliado en I. **I:** Células Sox10⁺/GS⁺ en grupo (cabeza de flecha) y en hilera (flecha hueca). **J:** Doble inmunoreactividad MBP-GS de la CNO longitudinal. Recuadro ampliado en K. **K:** Hilera de células GS⁺ (flechas huecas) entre vainas de mielina MBP⁺ (flecha). Barras de escala: A-B, G-H, J: 100 μm; C-D, I, K: 10 μm; E-F: 50 μm.

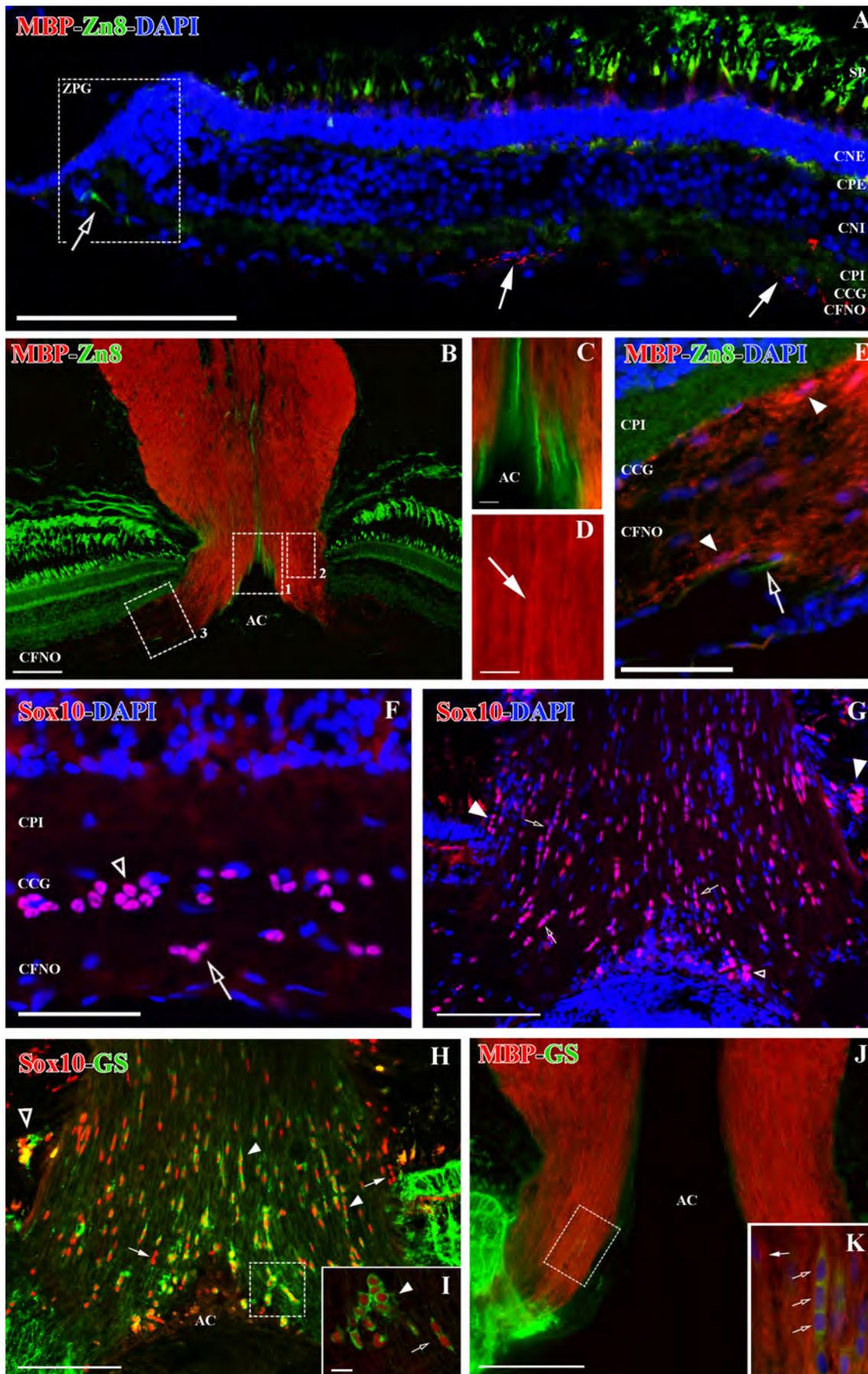


Figura 43: Microscopía óptica y electrónica del DO en la CNO. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal de la CNO. Recuadro ampliado en la imagen B. **B:** Grupo de células. El asterisco indica una zona próxima analizada en C. **C:** Micrografía electrónica que muestra gran cantidad de células entre axones amielínicos (Ax). Algunas son astrocitos (As), oligodendrocitos (Olig) o microglía (Mic). Recuadros 1 y 2 ampliados en D y F respectivamente. **D:** Astrocito (As). **E:** Célula sin características típicas de astrocito, oligodendrocito o microglía. **F:** Detalle de la limitante glial. **G:** Detalle del borde en crecimiento donde destaca un cono de crecimiento (CC). Arteria central (AC), aparato de Golgi (AG), astrocito (As), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), indentaciones (In), lámina basal (LB), microglía (Mic), núcleo (N), nucleolo (Nuc), oligodendrocito (Olig), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 100 μm ; B: 50 μm ; C: 2500 nm; D: 500 nm; E-F: 1000 nm.

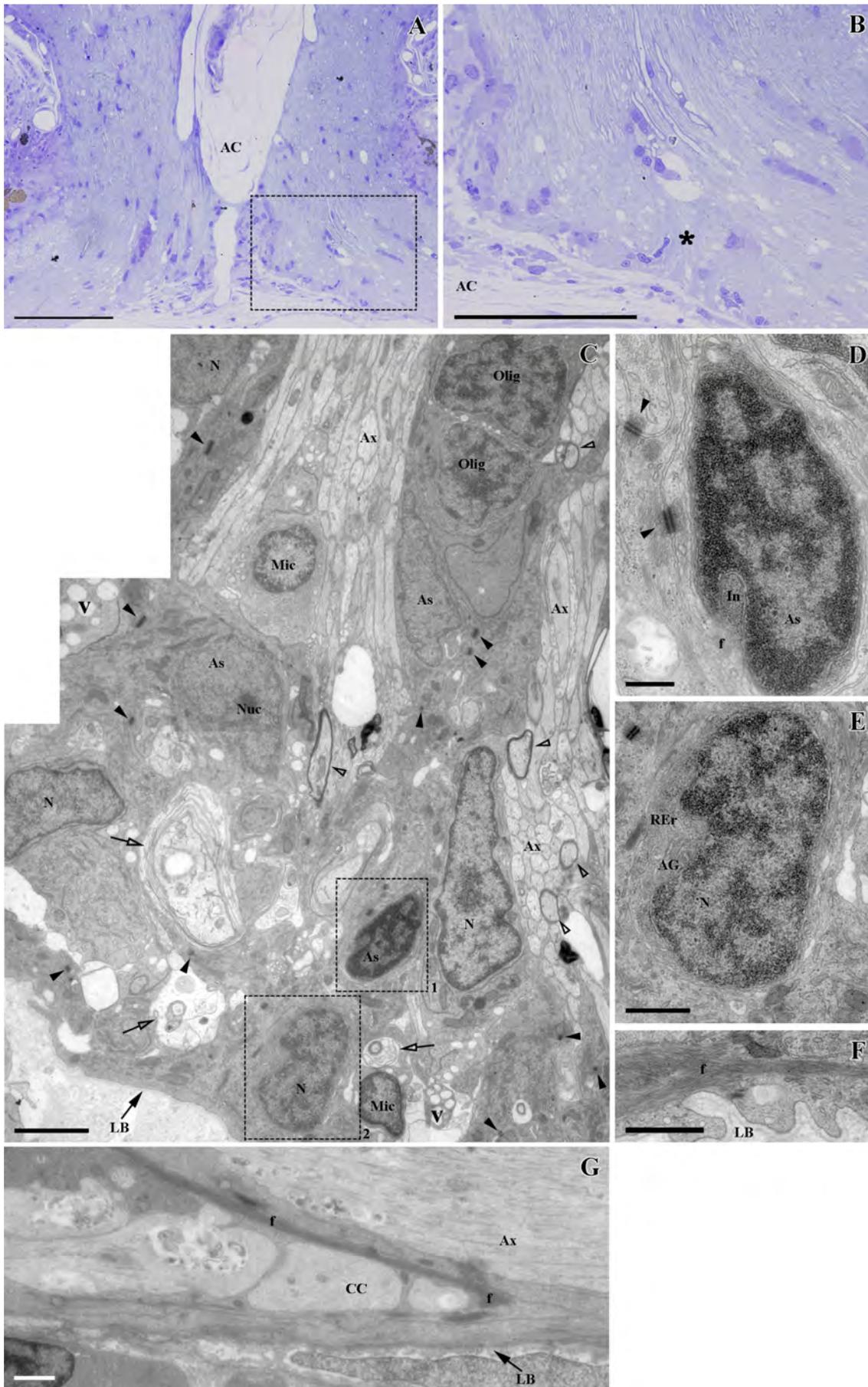


Figura 44: Microscopía óptica y electrónica de la zona IO1 en la CNO. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal. Recuadro ampliado en **B**. **B:** Grupos de células en el límite retina-CNO. El asterisco indica una zona próxima analizada en **C**. **C:** Micrografía electrónica de la limitante glial, formada por astrocitos de citoplasma denso a los electrones con filamentos intermedios (f) y de citoplasma claro a los electrones (As) que originan numerosas circunvoluciones. **D:** Célula de conjuntivo en el tejido nervioso. **E:** Célula con gránulos de pigmento (P) en el citoplasma. Arteria central (AC), aparato de Golgi (AG), astrocito (As), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), lámina basal (LB), mitocondria (mit), núcleo (N), nucleolo (Nuc), gránulo de pigmento (P), retículo endoplasmático rugoso (REr), mielina (cabezas de flecha huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 100 μm ; B: 30 μm ; C-E: 1000nm.

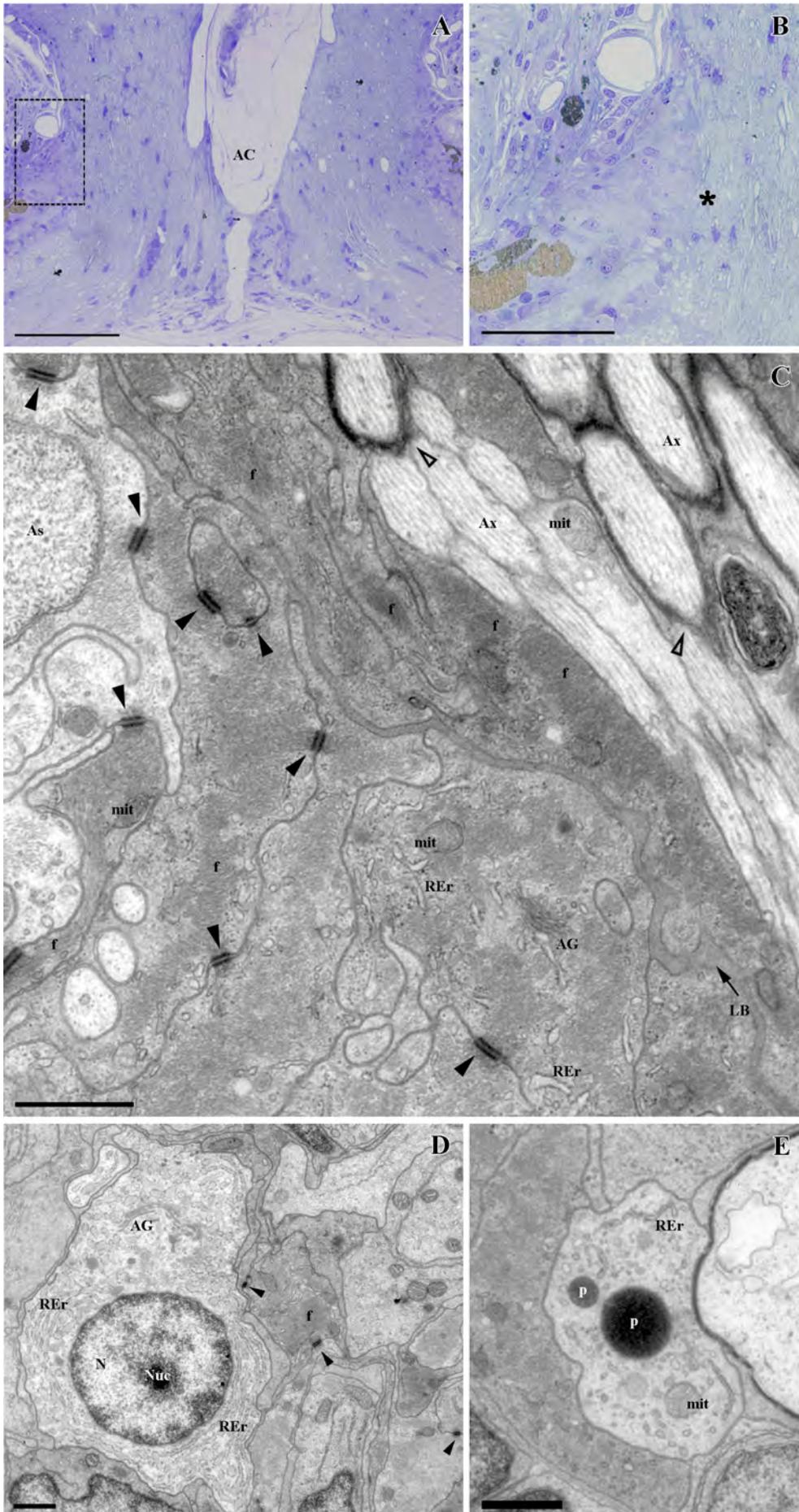


Figura 45: Microscopía óptica y electrónica de la zona IO2 en la CNO. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal a la CNO. Recuadro ampliado en B. **B:** Hileras de células entre los axones. El asterisco indica una zona próxima analizada en C. **C:** Micrografía electrónica de una hilera de oligodendrocitos (Olig1 y Olig2), rodeada de procesos astrocitarios con filamentos intermedios (f). **D:** Detalle ampliado de Olig1. **E:** Detalle ampliado de Olig2. Arteria central (AC), aparato de Golgi (AG), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), mitocondria (mit), núcleo (N), oligodendrocitos (Olig), ribosomas (r), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 100 μm ; B: 30 μm ; C-E: 1000nm.

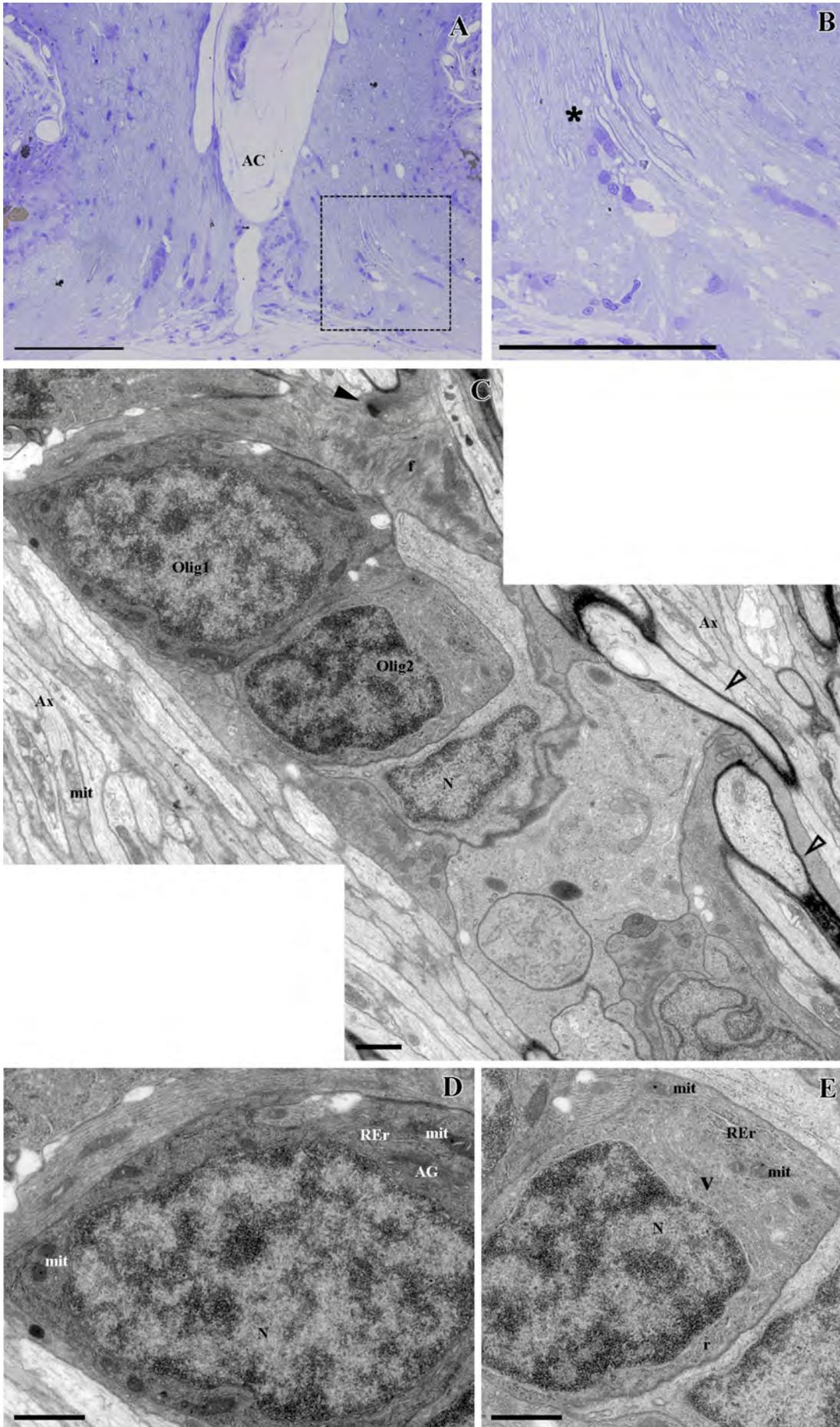
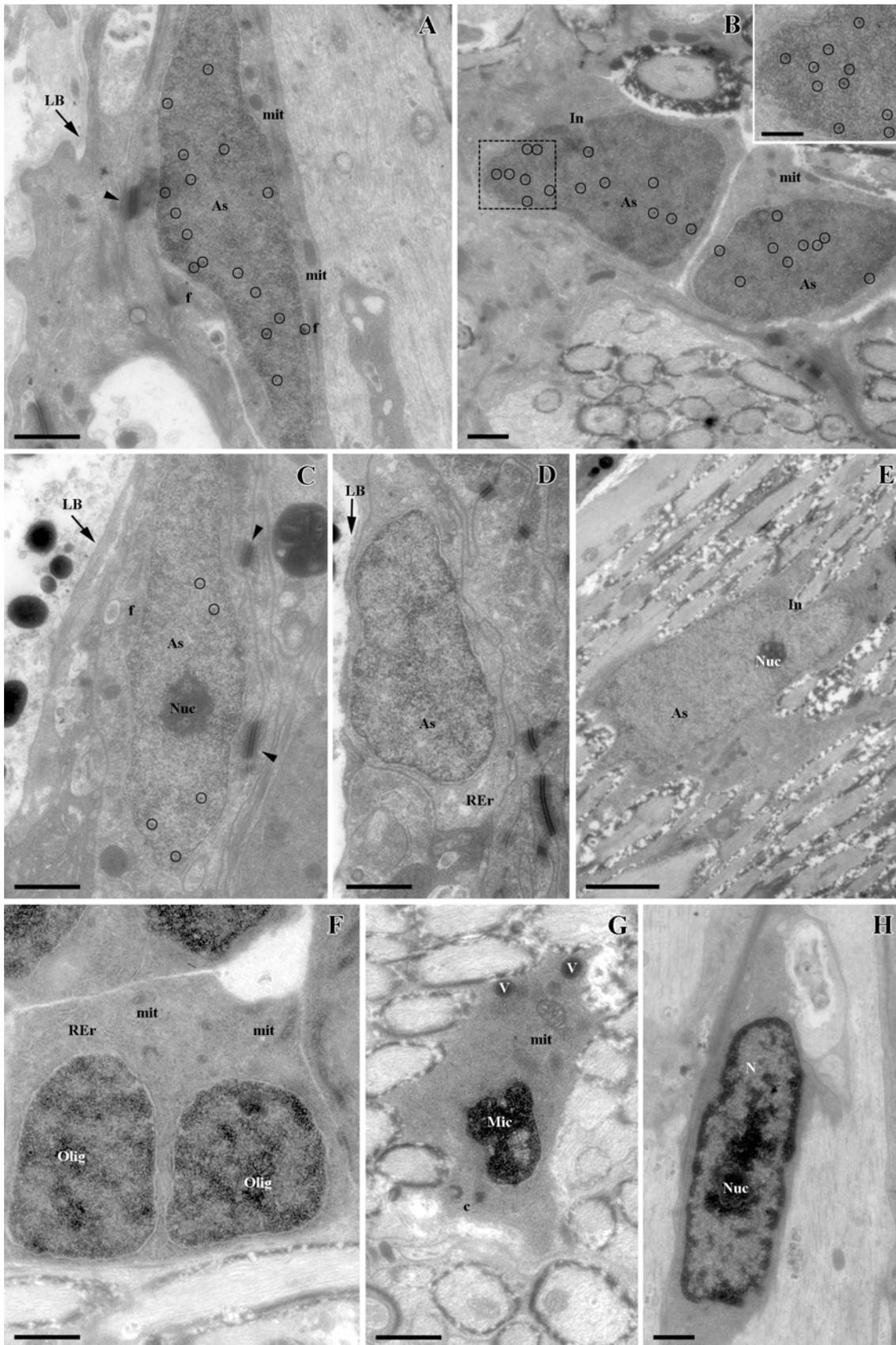


Figura 46: Marcaje con oro coloidal para MET de las células Pax2⁺ (marcaje rodeado por círculos) de la CNO. **A:** Astrocito Pax2⁺ (As) de la limitante glial de la AC. **B:** Astrocitos Pax2⁺ (As) del DO entre los axones. Inseto: detalle del marcaje Pax2⁺. **C:** Astrocito Pax2⁺ (As) de la limitante glial de la zona IO1. **D:** Astrocito Pax2⁻ (As) de la limitante glial de la zona IO1. **E:** Astrocito Pax2⁻ (As) entre los axones. **F:** Grupo de oligodendrocitos Pax2⁻ (Olig) entre los axones. **G:** Célula de microglía Pax2⁻ (Mic) entre los axones. **H:** Célula sin características típicas de astrocito, oligodendrocito o microglía Pax2⁻ entre axones. Centriolos (c), filamentos intermedios (f), indentaciones (In), lámina basal (LB), mitocondria (mit), núcleo (N), nucleolo (Nuc), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A-C, E-G: 1000 nm; D: 2500 nm; inserto: 500 nm.



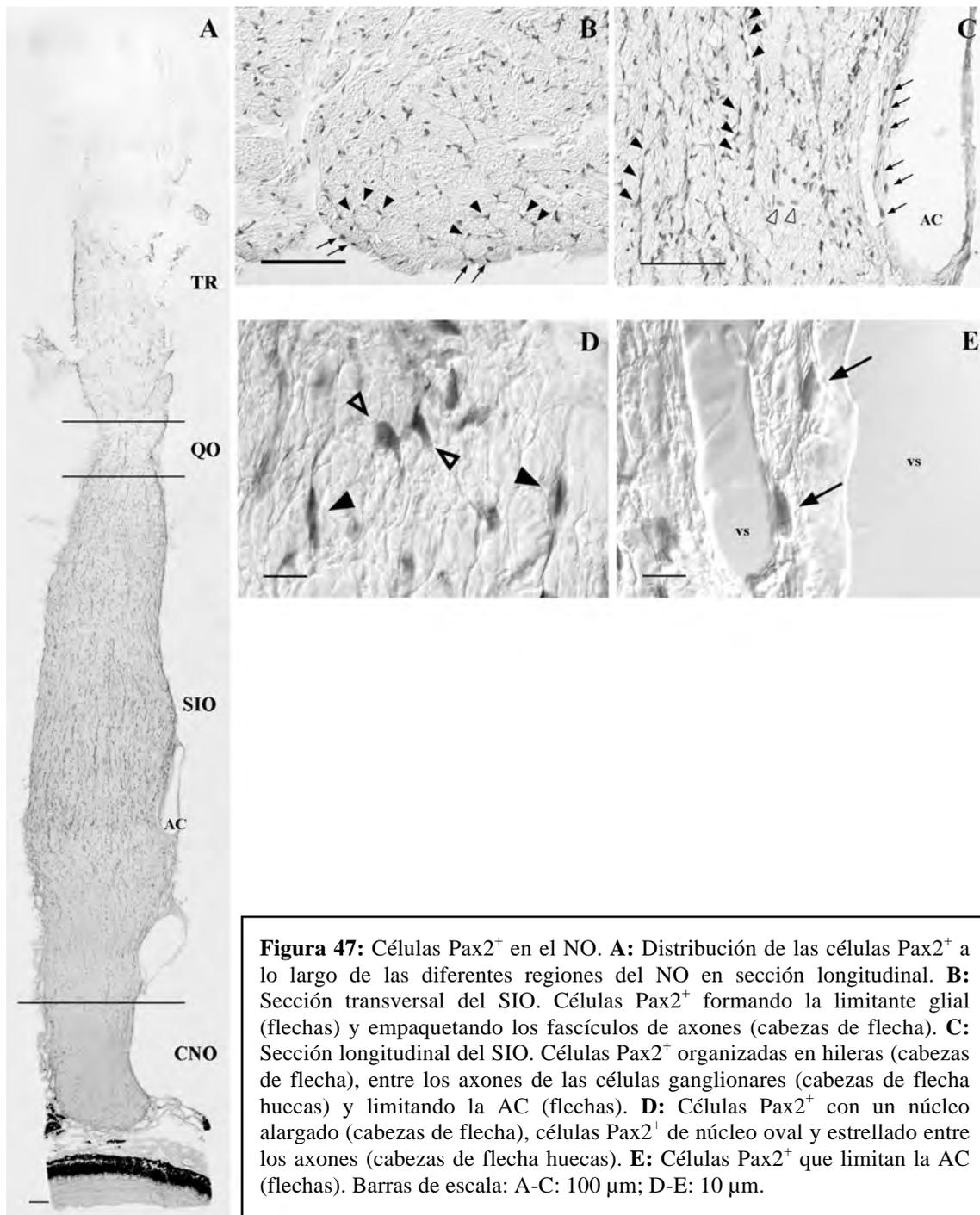


Figura 47: Células Pax2⁺ en el NO. **A:** Distribución de las células Pax2⁺ a lo largo de las diferentes regiones del NO en sección longitudinal. **B:** Sección transversal del SIO. Células Pax2⁺ formando la limitante glial (flechas) y empaquetando los fascículos de axones (cabezas de flecha). **C:** Sección longitudinal del SIO. Células Pax2⁺ organizadas en hileras (cabezas de flecha), entre los axones de las células ganglionares (cabezas de flecha huecas) y limitando la AC (flechas). **D:** Células Pax2⁺ con un núcleo alargado (cabezas de flecha), células Pax2⁺ de núcleo oval y estrellado entre los axones (cabezas de flecha huecas). **E:** Células Pax2⁺ que limitan la AC (flechas). Barras de escala: A-C: 100 µm; D-E: 10 µm.

Figura 48: Células Pax2⁺ en el SIO. **A–C:** Sección transversal del SIO mostrando la concentración de células Pax2⁺ (rojo) en la zona de crecimiento (asterisco) donde se localizan los axones jóvenes Zn8⁺ (verde). **D:** Detalle de la íntima relación entre las células Pax2⁺ y los axones jóvenes Zn8⁺ en el borde en crecimiento. **E:** Células Pax2⁺/citoqueratina⁺/DAPI⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁻/citoqueratina⁺/DAPI⁺ (cabezas de flecha huecas) empaquetando los axones en sección longitudinal. **F:** Células Pax2⁺/citoqueratina⁺/DAPI⁺ (cabeza de flecha) y Pax2⁻/citoqueratina⁺/DAPI⁺ (cabeza de flecha hueca) empaquetando los axones en sección transversal. **G:** Células Pax2⁺/ZO1⁺/DAPI⁺ (cabezas de flecha) y Pax2⁻/ZO1⁺/DAPI⁺ (cabezas de flecha huecas) empaquetando los axones en sección longitudinal. **H:** Sección longitudinal del SIO anterior. Células Pax2⁺ (cabezas de flecha) y células GS⁺ (flecha). **I:** Sección longitudinal del SIO posterior. Células Pax2⁺ (cabezas de flecha) y células GS⁺ (flechas). **J:** Células Pax2⁺ (cabeza de flecha) y células GS⁺ (flecha) en sección transversal. **K:** Esquema de la distribución de las células Pax2⁺ en el SIO. **L:** Células Pax2⁺ (rojo) y células PCNA⁺ (verde) en sección longitudinal. Barras de escala: A–C, L: 100 µm; D: 30 µm; E, G, H, L: 50 µm; I: 75 µm; F, J: 10 µm.

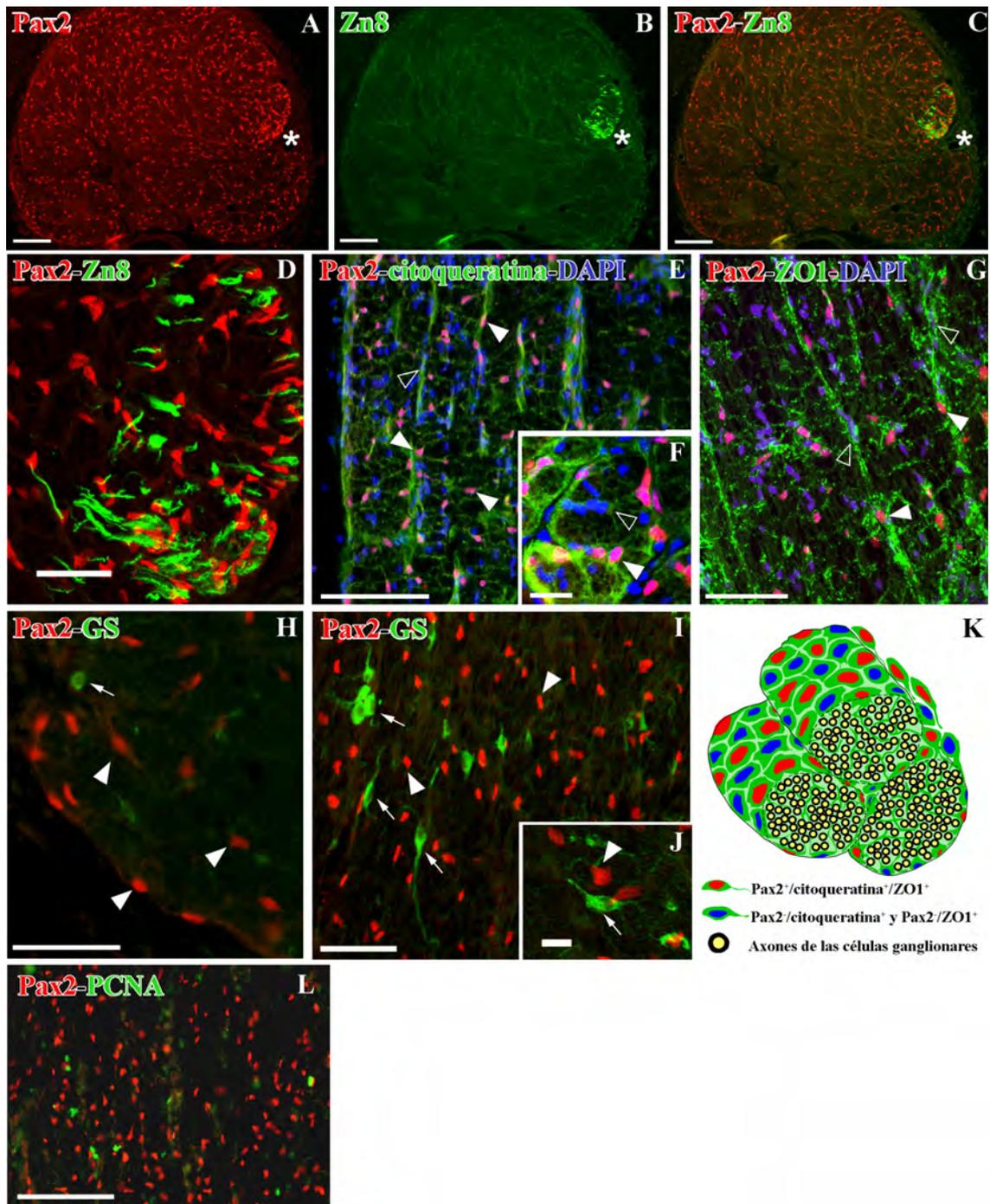


Figura 49: Células S100⁺ en el SIO. **A–C:** Sección transversal mostrando la co-localización de las células S100⁺ (rojo) con citoqueratina (verde). Células S100⁺/citoqueratina⁺ fuertemente marcadas en la limitante glial (flechas). **D–F:** Sección transversal mostrando la co-localización de las células S100⁺ (rojo) con ZO1 (verde). Células S100⁺/ZO1⁺ fuertemente marcadas en la limitante glial (flechas). **G:** Detalle del bajo grado de empaquetamiento de los axones en el SIO anterior transversal. Células S100⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha), células S100⁻/citoqueratina⁺ (cabeza de flecha hueca) y células S100⁺/citoqueratina⁻ (flechas). Núcleos marcados con DAPI (azul). **H:** Detalle del alto grado de empaquetamiento de los axones en el SIO posterior transversal. Células S100⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha), células S100⁻/citoqueratina⁺ (cabeza de flecha hueca) y células S100⁺/citoqueratina⁻ (flechas). Núcleos marcados con DAPI (azul). **I:** Detalle del SIO posterior transversal. Células S100⁺/ZO1⁺ (cabezas de flecha), células S100⁻/ZO1⁺ (cabeza de flecha hueca) y células S100⁺/ZO1⁻ (flechas). Núcleos marcados con DAPI (azul). **J:** Doble marcaje S100 (rojo)-GS (verde) en sección longitudinal. Núcleos marcados con DAPI (azul). Células S100⁺/GS⁺ con citoplasma marcados (cabezas de flecha), S100⁺/GS⁺ con citoplasma S100⁻/GS⁺ (cabezas de flecha huecas), células S100⁺/GS⁻ (flechas) especialmente situadas en la limitante glial (asterisco) y células S100⁻/GS⁺ (flechas huecas). **K:** Detalle ambos tipos de células S100⁺/GS⁺: con citoplasma S100⁺/GS⁺ (cabeza de flecha) y con citoplasma S100⁻/GS⁺ (cabezas de flecha huecas) en sección longitudinal. **L:** Células S100⁺ (rojo), células PCNA⁺ (verde) y célula S100⁺/PCNA⁺ (flecha). Barras de escala: A–F, J, L: 100 µm; G–I: 50 µm; K: 20 µm.

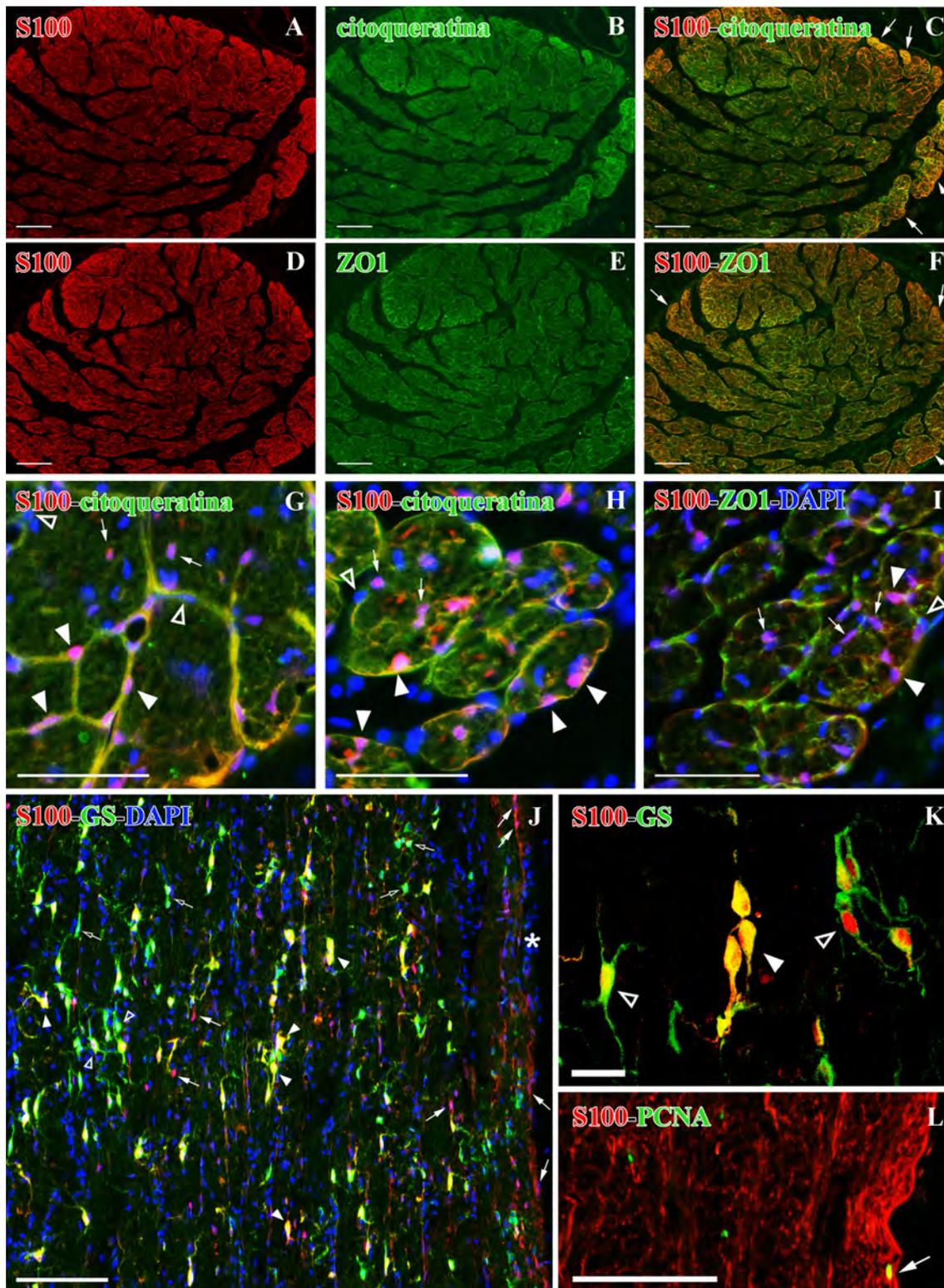


Figura 50: Análisis de la mielinización del SIO mediante dobles marcajes con MBP y Sox10 (rojo) y Zn8, ZO1, GS, citoqueratina y PCNA (verde). DAPI marca todas las células (azul). **A–C:** Sección transversal del SIO mostrando la mielina MBP⁺ y los axones jóvenes Zn8⁺ en la zona de crecimiento (asterisco). **D–F:** Sección transversal del SIO mostrando la mielina MBP⁺ y su empaquetamiento por procesos celulares ZO1⁺. Recuadro de F muestra una sección contigua marcada con Zn8 mostrando el borde en crecimiento (asterisco) de las fotos D-I. **G–I:** sección transversal del SIO mostrando los oligodendrocitos Sox10⁺/GS⁺. Borde en crecimiento (asterisco). **J:** Detalle de los axones jóvenes Zn8⁺/MBP⁻. **K:** Detalle del empaquetamiento de los axones MBP⁺ en fascículos por los astrocitos DAPI⁺/ZO1⁺. **L:** Detalle de los oligodendrocitos Sox10⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas) y Sox10⁺/GS⁻ (cabezas de flecha). **M:** Células GS⁺ (cabezas de flecha huecas) entre los fascículos nerviosos mielinizados MBP⁺. **N:** Doble inmunorreactividad Sox10-citoqueratina. Oligodendrocitos Sox10⁺ entre los fascículos de axones (cabezas de flecha huecas) o limitándolos (cabezas de flecha). **Ñ:** Doble marcaje Sox10-PCNA en el SIO longitudinal. Células Sox10⁺/PCNA⁺ (flecha). Barras de escala: A- I, recuadro de F: 100 µm; J-M, Ñ: 50 µm; N: 10 µm.

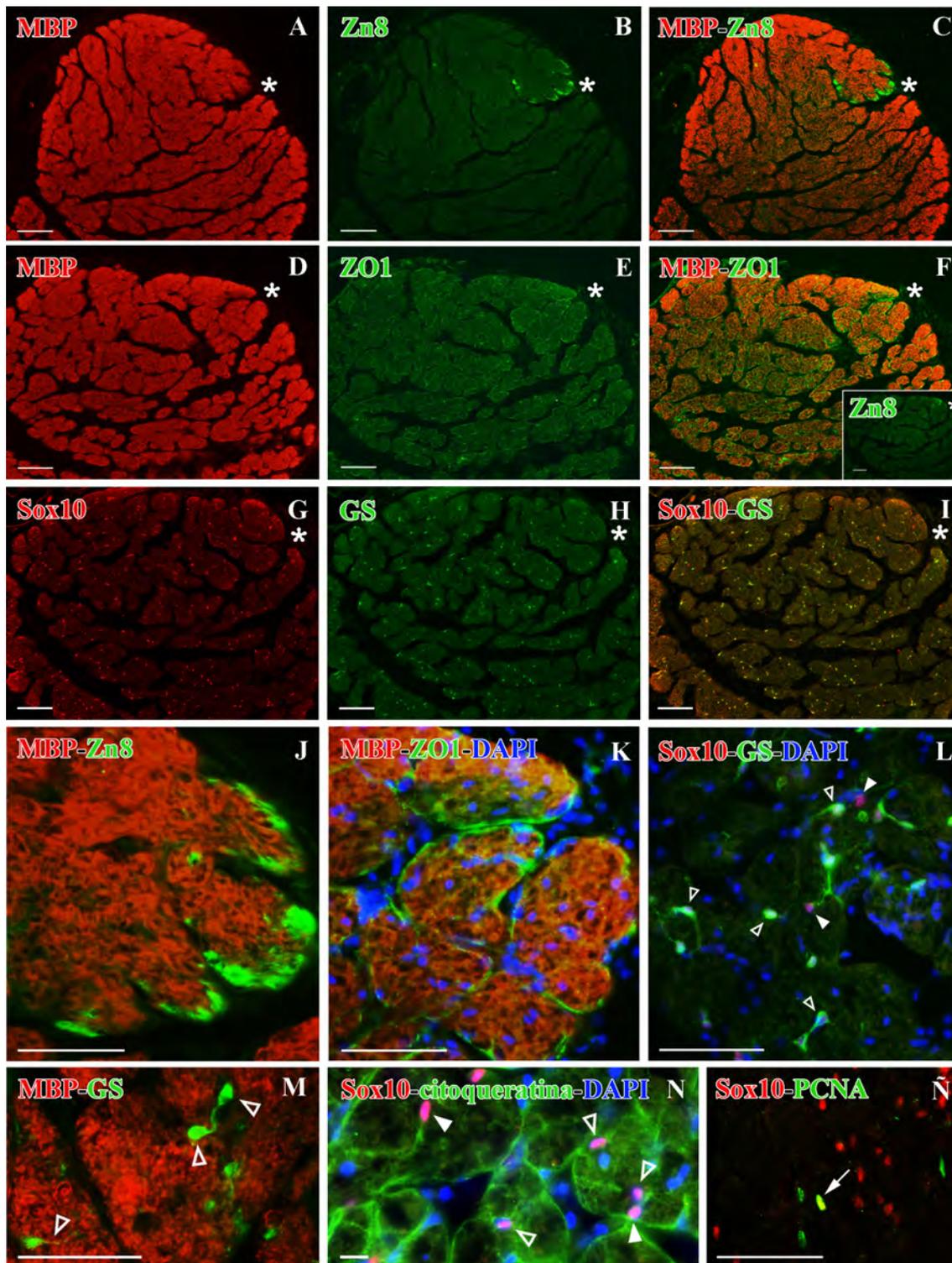
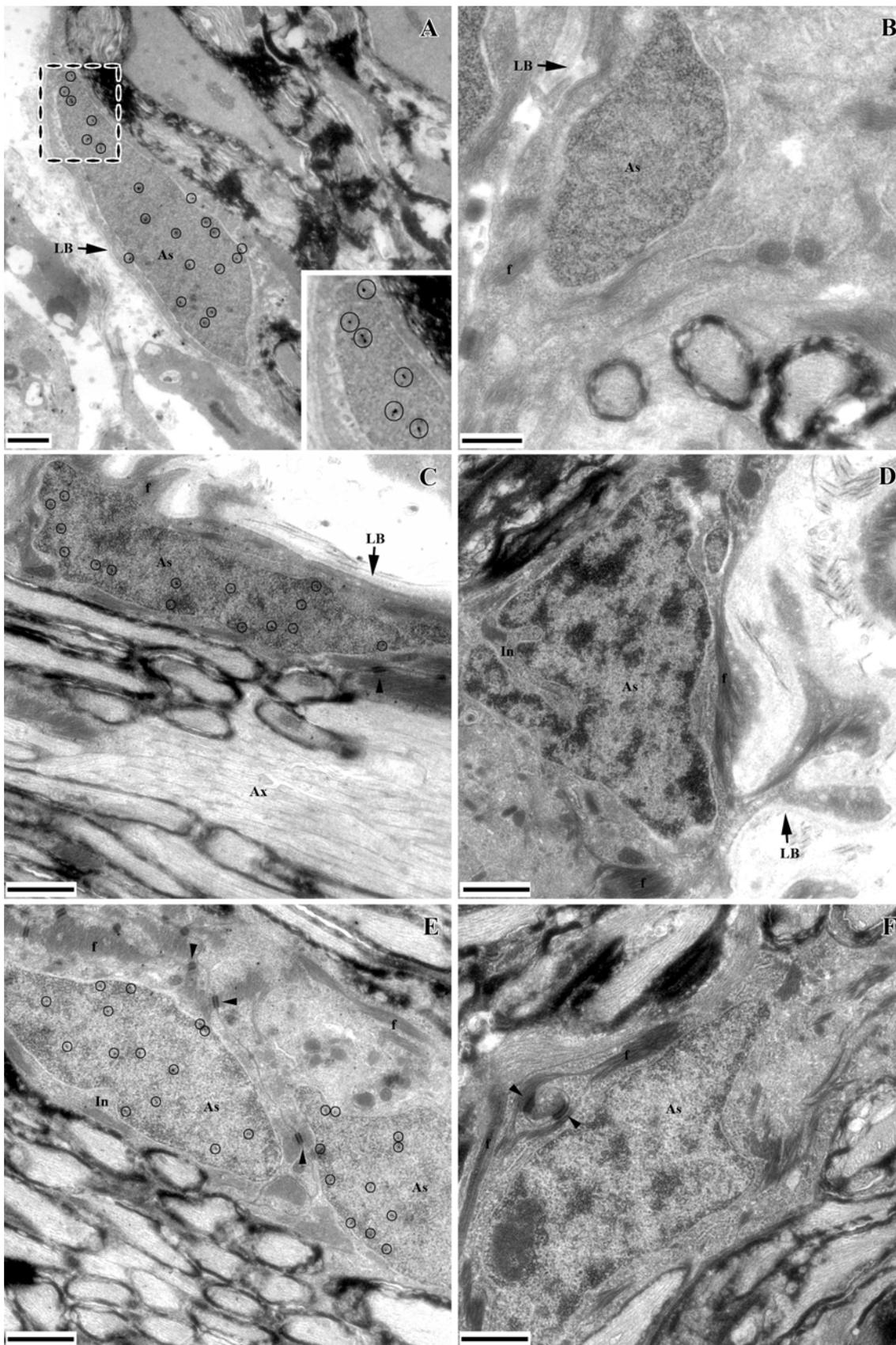


Figura 51: Marcaje con oro coloidal para MET de las células Pax2⁺ (marcaje rodeado por círculos) en el SIO. **A:** Astrocito Pax2⁺ (As) de la limitante glial de núcleo eucromático. Inserto: detalle del recuadro mostrando que Pax2 está localizado principalmente en el núcleo. **B:** Astrocito Pax2⁻ (As) con núcleo eucromático de la limitante glial. **C:** Astrocito Pax2⁺ de la limitante glial, de núcleo heterocromático. **D:** Astrocito Pax2⁻ de la limitante glial, de núcleo heterocromático. **E:** Astrocito reticular Pax2⁺ con núcleo eucromático. **F:** Astrocito reticular Pax2⁻ con núcleo heterocromático. Axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), indentaciones (In), lámina basal (LB), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A, C-F: 1000nm; B: 500nm.



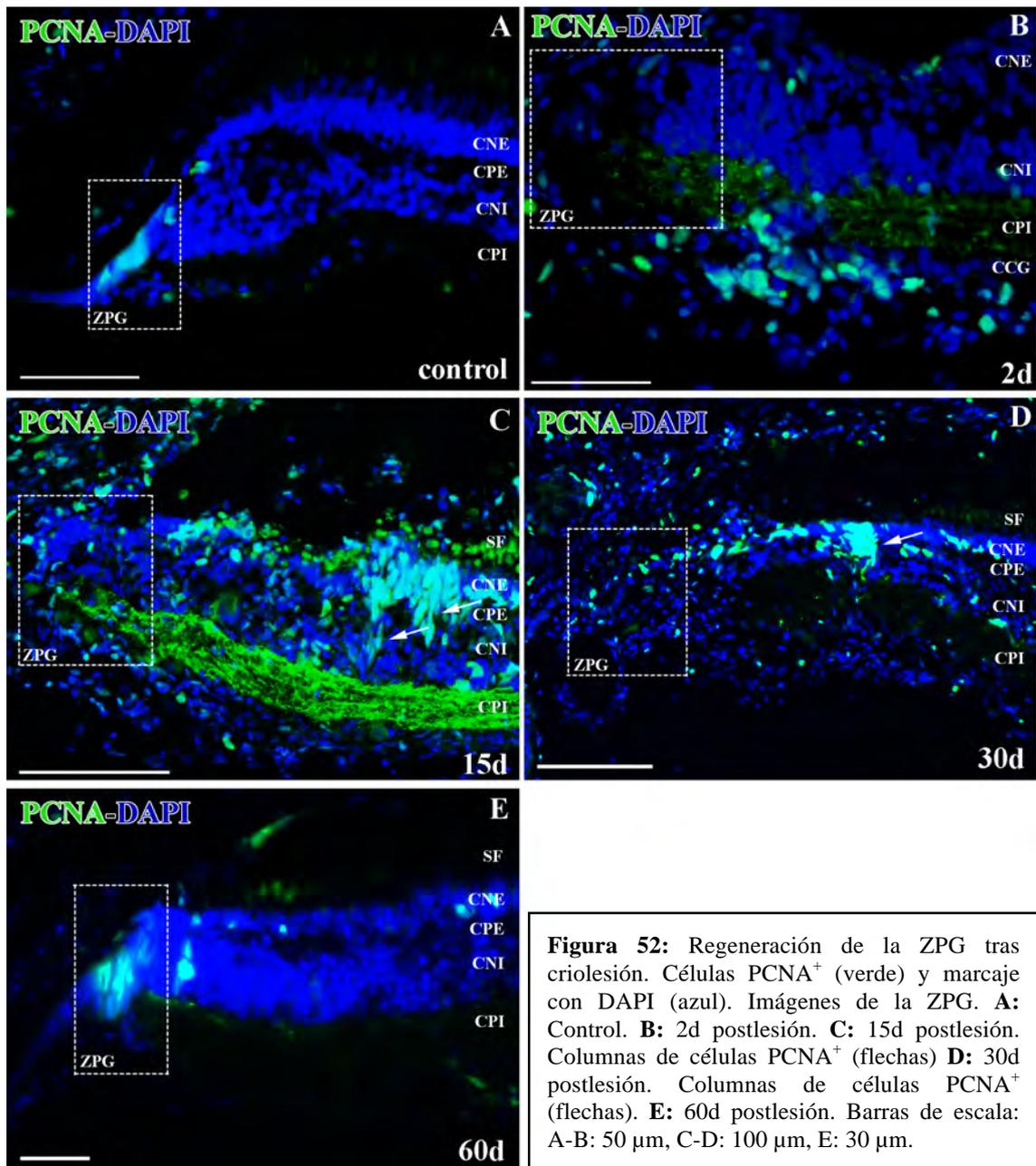
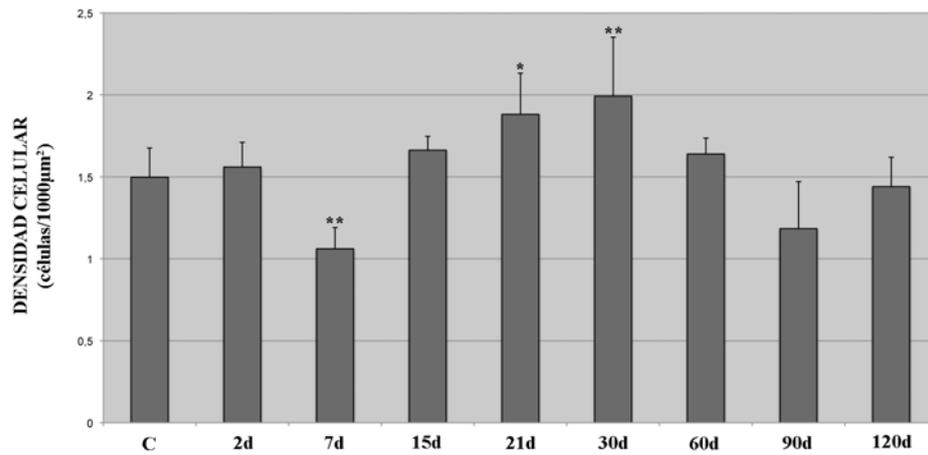


Figura 53: Análisis estadístico de la CNO durante la regeneración tras criolesión. **A:** Diferencias en la densidad de células Pax2⁺ en CNO durante los periodos de postlesión. **B:** Variaciones en la densidad de células PCNA⁺ en CNO durante los periodos de postlesión. Las tablas indican la densidad media de células en números; **p<0,01: diferencias altamente significativas; *p<0,05: diferencias significativas.

Células Pax2⁺

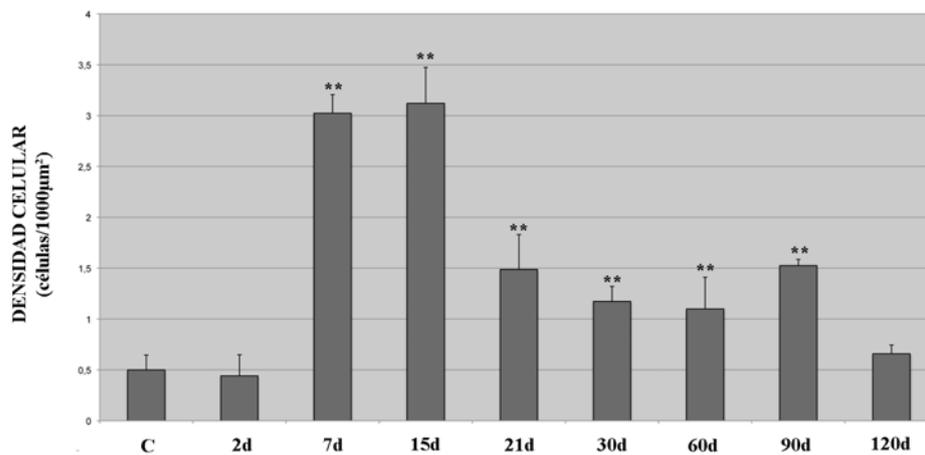
A



GRUPO EXPERIMENTAL	DENSIDAD MEDIA (células/1000μm ²)
Control	1,49±0,17
2d criolesión	1,56±0,14
7d criolesión	1,06±0,12
15d criolesión	1,66±0,08
21d criolesión	1,88±0,25
30d criolesión	1,99±0,35
60d criolesión	1,63±0,09
90d criolesión	1,18±0,28
120d criolesión	1,44±0,17

Células PCNA⁺

B



GRUPO EXPERIMENTAL	DENSIDAD MEDIA (células/1000μm ²)
Control	0,49±0,14
2d criolesión	0,44±0,20
7d criolesión	3,02±0,18
15d criolesión	3,12±0,35
21d criolesión	1,48±0,34
30d criolesión	1,17±0,14
60d criolesión	1,09±0,31
90d criolesión	1,52±0,06
120d criolesión	0,65±0,08

Figura 54: Respuesta de las células Pax2⁺ en la CNO durante la regeneración tras la criolesión. Células Pax2⁺ (rojo); axones Zn8⁺, células GS⁺, citoqueratina⁺ y GFAP⁺ (verde); núcleos marcados con DAPI (azul). **A:** Células Pax2⁺ (flechas) en el DO a 7d postlesión. **B:** Células Pax2⁺ (flechas) junto a escasos fascículos Zn8⁺ (flecha hueca) en el DO a 7d postlesión. **C:** Pocos axones Zn8⁺ (flecha hueca) próximos a la retina en la CNO a los 7d postlesión y células Pax2⁺ (cabeza de flecha). **D:** Doble inmunotinción Pax2-GS en la CNO a 21d postlesión. Células Pax2⁺ (cabezas de flecha) y células GS⁺ (cabezas de flecha huecas) en el límite posterior de la CNO, procesos GS⁺ dirigidos hacia el interior de la CNO (flecha hueca), procesos vitreales de células de Müller (flecha hueca grande). **E:** Células inmunorreactivas a Pax2 con DAB (marrón) y nucleolos Pax2⁻ (cabezas de flecha) en el DO junto a la retina a 21d postlesión. **F:** Escasos fascículos Zn8⁺ (flecha hueca) y células Pax2⁺ (flechas) en el DO a 21d postlesión. **G:** Pocas células Pax2⁻/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha huecas) en la parte posterior de la CNO a 21d postlesión. **H:** Células Pax2⁺ con DAB (marrón) y nucleolos Pax2⁻ (cabezas de flecha), procesos vitreales de las células de Müller (flechas huecas) en el DO junto a la retina a 30d postlesión. **I-J:** Imágenes de la ZPG a 30d y 120d postlesión respectivamente. Células ganglionares Zn8⁺ (cabezas de flecha huecas) y axones jóvenes Zn8⁺ (flechas huecas). **K:** Numerosos fascículos de axones jóvenes Zn8⁺ (flechas huecas) junto a células Pax2⁺ (flechas) en el DO a 90d postlesión. Pequeños fascículos Zn8⁺ próximos a la retina (cabeza de flecha hueca). **L:** Doble inmunomarcaje Pax2-GFAP de la CNO a 60d postlesión. Procesos GFAP⁺ localizados en la limitante de la AC (flechas), limitando con la retina (cabezas de flecha huecas), procesos vitreales de células de Müller (flecha hueca). Barras de escala: A-C, F: 20 µm; D, L: 100 µm, E: 5 µm; G, I-K:50 µm; H: 10 µm.

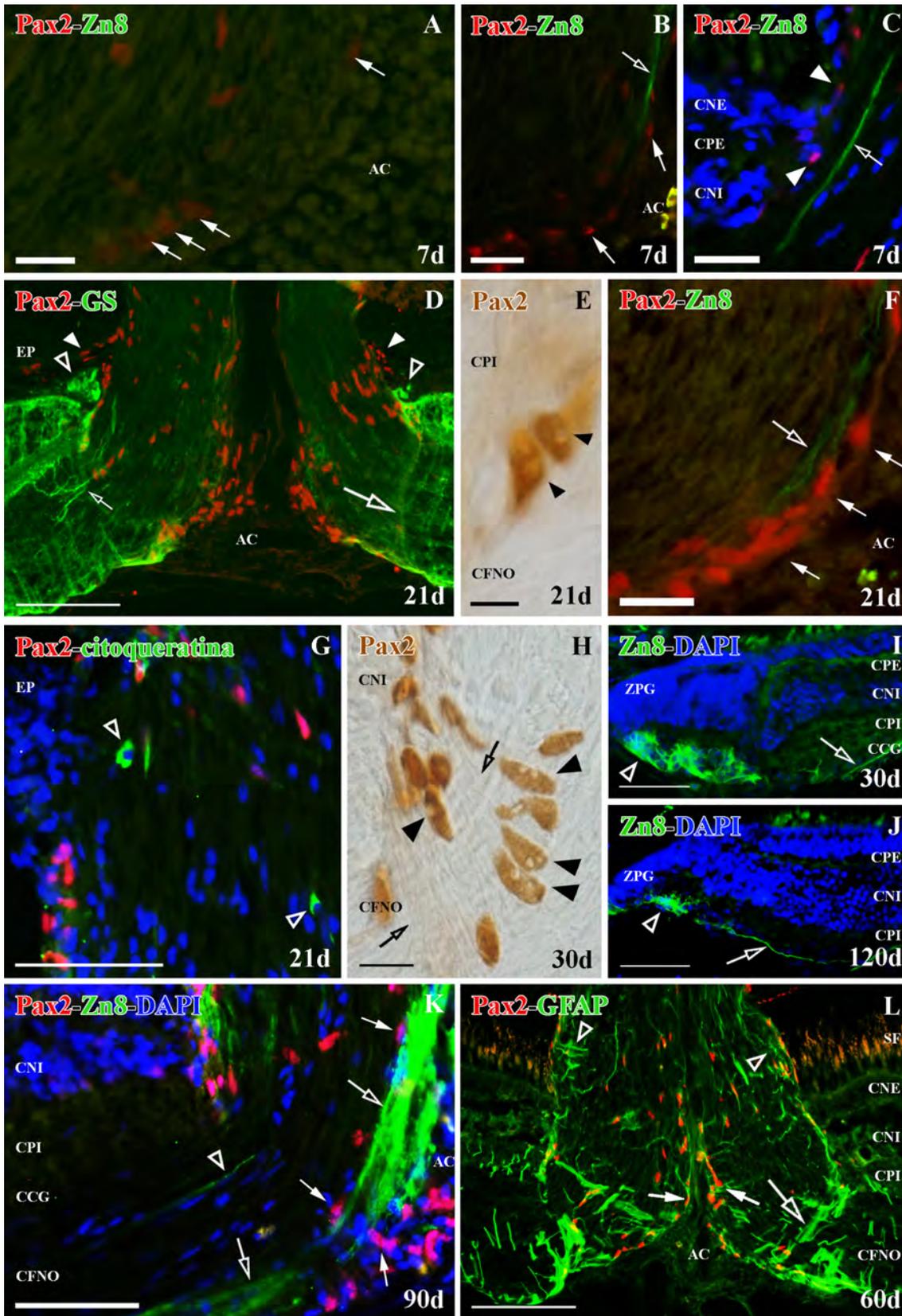
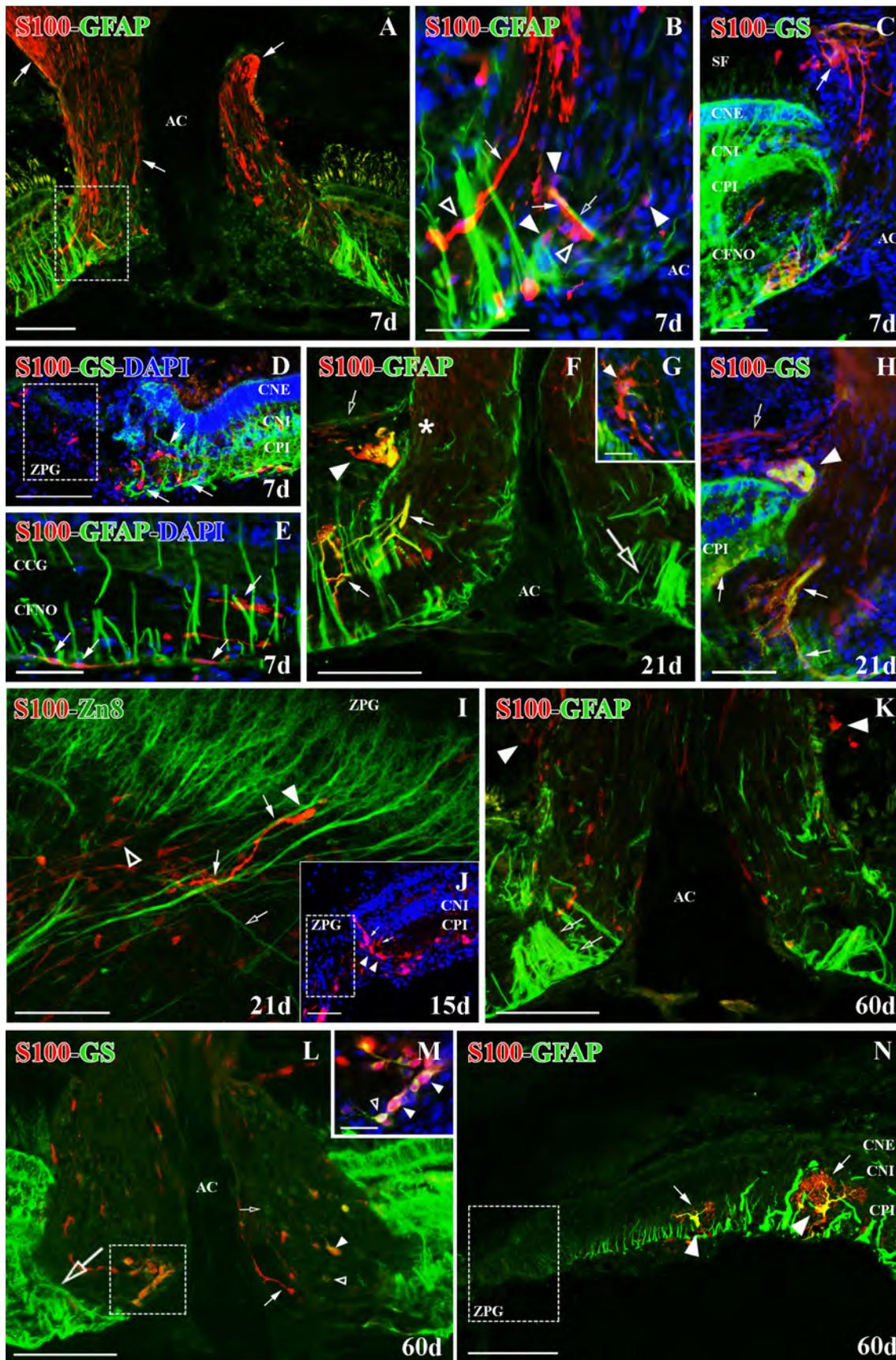


Figura 55: Estudio de las células S100⁺ en la CNO y CFNO durante la regeneración de la criolesión. Células S100⁺ (rojo); axones Zn8⁺, células GS⁺ y células GFAP⁺ (verde); núcleos marcados con DAPI (azul). **A:** Doble inmunoreactividad S100-GFAP. Células S100⁺ (flechas) en la limitante glial a 7d postlesión en la CNO. Recuadro ampliado en B. **B:** Células de soma pequeño S100⁺ (cabezas de flecha), células S100⁺ de soma grande (cabezas de flecha huecas) y largos procesos (flechas), proceso vitreal de célula de Müller GFAP⁺ (flecha hueca) en el DO. **C:** Doble marcaje S100-GS. Células S100⁺/GS⁺ de la limitante de la CNO con la coroides y esclera (flecha) a 7d postlesión en la CNO. **D:** Inmunomarcaje S100-GS en la ZPG (recuadro) a 7d postlesión. Células S100⁺ acumuladas en la zona de lesión (flechas). **E:** Marcaje S100-GS en la retina madura a 7d postlesión. Células S100⁺ en la CFNO (flechas). **F:** Doble inmunotinción S100-GFAP en la CNO a 21d postlesión. Procesos S100⁺/GFAP⁺ en el DO (flechas), células S100⁺/GFAP⁺ en la zona IO1 (cabeza de flecha), procesos S100⁻/GFAP⁺ externos a la CNO (flecha hueca), procesos vitreales de células de Müller (flecha hueca grande). Asterisco indica la zona similar analizada en G. **G:** Marcaje S100-GFAP a 21d postlesión. Células S100⁺/GFAP⁺ con largos procesos próximos a la limitante glial de la parte posterior de la CNO (cabeza de flecha). **H:** Marcaje S100-GS en la CNO a 21d postlesión. Procesos S100⁺/GS⁺ en el DO y CPI (flechas), células S100⁺/GS⁺ en la zona IO1 (cabeza de flecha) y procesos S100⁺/GS⁻ externos a la CNO (flecha hueca). **I:** Doble inmunorreactividad S100-Zn8 en la ZPG *in toto* a 21d postlesión. Axones Zn8⁺ paralelos a la ZPG (flecha hueca), células S100⁺ junto a axones Zn8⁺ (cabeza de flecha hueca), células S100⁺ en retina vitreal (cabeza de flecha) y procesos S100⁺ que se introducen hacia el interior de la retina (flechas). **J:** Marcaje S100 en la ZPG (recuadro) a 15d postlesión. Células S100⁺ en el límite entre la zona de lesión y la retina laminada (cabezas de flecha) y sus procesos transversales a la misma (flechas). **K:** Doble inmunorreactividad S100-GFAP en la CNO a 60d postlesión. Escasas células S100⁺ en el límite entre la CNO y la esclera y coroides (cabezas de flecha), gran cantidad de procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺ (flechas huecas). **L:** Doble marcaje S100-GS en la CNO a 60d postlesión. Células S100⁺/GS⁺ con citoplasma marcados (cabeza de flecha), células S100⁺/GS⁺ con citoplasma negativo a S100 (cabeza de flecha hueca), células S100⁺/GS⁻ (flecha), células S100⁻/GS⁺ (flecha hueca), procesos vitreales de células de Müller (flecha hueca grande). Recuadro ampliado en M. **M:** Células S100⁺/GS⁺ con citoplasma marcados (cabezas de flecha), células S100⁺/GS⁺ con citoplasma S100⁻/GS⁺ (cabeza de flecha hueca). **N:** Doble tinción S100-GFAP en la ZPG (recuadro) a 60d postlesión. Células S100⁺/GFAP⁺ con soma en zonas vitreales (cabezas de flecha) y prolongaciones S100⁺/GFAP⁻ en zonas esclerales de la retina (flechas). Barras de escala: A-D, F, K, L: 100 μ m; B-C, E, H: 50 μ m, G, M: 20 μ m; I, N: 75 μ m.



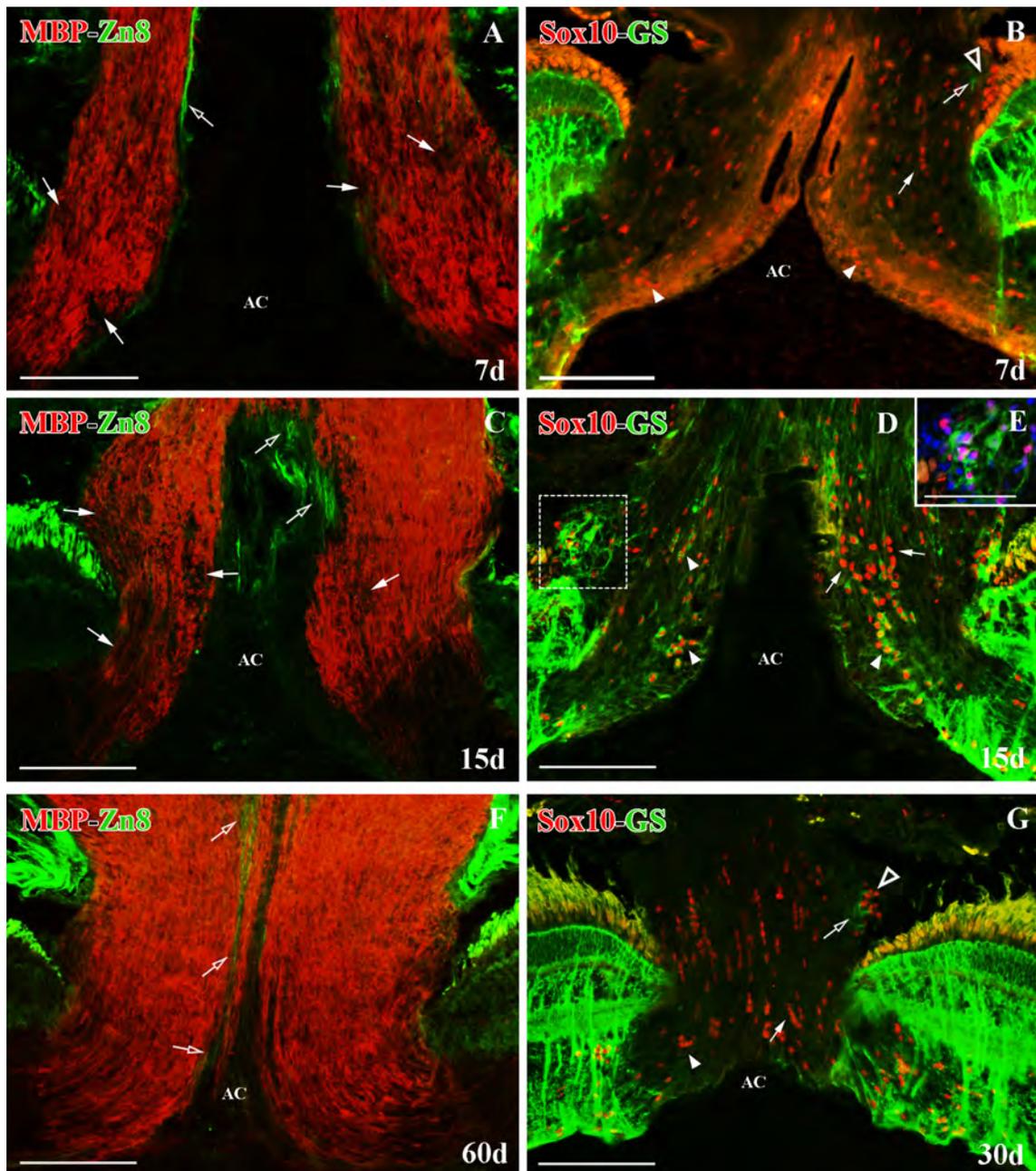
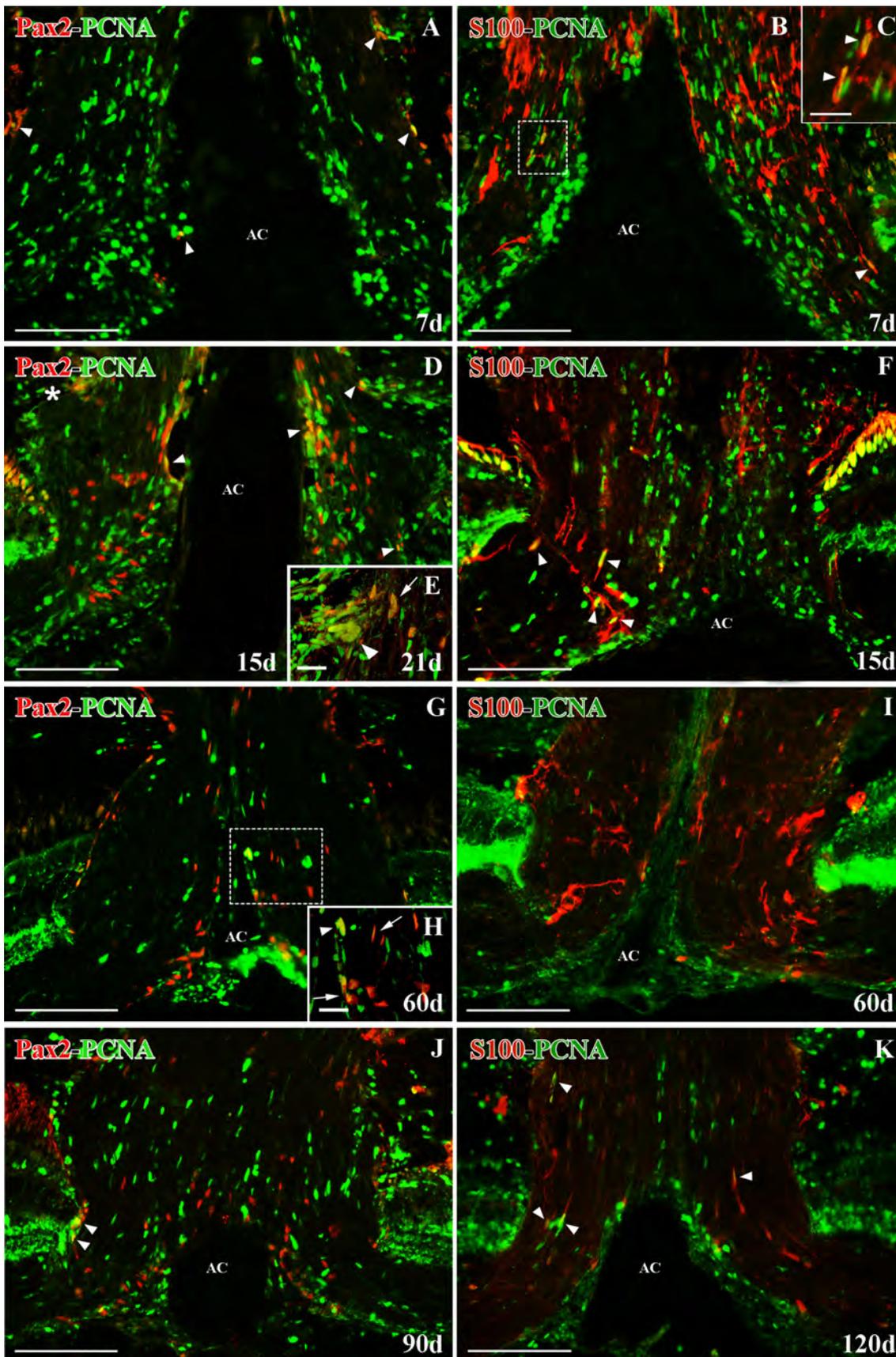


Figura 56: Estudio de la distribución de la mielina MPB⁺ y oligodendrocitos Sox10⁺ (rojo) en la CNO durante la regeneración postcriolesión. Axones jóvenes Zn8⁺ y marcaje GS⁺ (verde). **A, C, E:** Doble inmunorreactividad MPB-Zn8 a 7, 15 y 60d postlesión. Los axones jóvenes Zn8⁺ (flechas huecas) y las zonas con degeneración de mielina (flechas). **B, G:** Doble marcaje Sox10-GS a 7 y 30d postlesión. Grupos de células Sox10⁺ en DO (cabezas de flecha) e hileras de células Sox10⁺ (flechas). Células Sox10⁺ (cabezas de flecha huecas) junto a procesos GS⁺ (flechas huecas) en la zona IO1 posterior. **D:** Doble tinción Sox10-GS a 15d postlesión. Células Sox10⁺/GS⁺ (cabezas de flecha) y células Sox10⁺/GS⁻ (flechas). Recuadro ampliado en E. **E:** Doble marcaje Sox10-GS más DAPI (azul). Células Sox10⁺ junto a procesos GS⁺ en la zona IO1. Barras de escala: A-D, F-G: 100 μ m; E: 50 μ m.

Figura 57: Análisis de la proliferación en la CNO durante la regeneración tras criolesión. Células en división PCNA⁺ (verde) y células Pax2⁺ y S100⁺ (rojo). **A, D, G, J:** Doble marcaje Pax2-PCNA. Doble inmunorreactividad (cabezas de flecha). Asterisco en D indica la ampliación de una zona similar en E, recuadro en G ampliado en H. **E y H:** Dobles marcajes Pax2-PCNA. Células Pax2⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁺ ligeramente positivas a PCNA (flechas). **B, F, I, K:** Doble tinción Pax2-S100. Células S100⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha). Recuadro en B ampliado en C. **C:** Células S100⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha). Barras de escala: A-B, D, F, G, I-K: 100 μm; C, E, H: 20 μm.



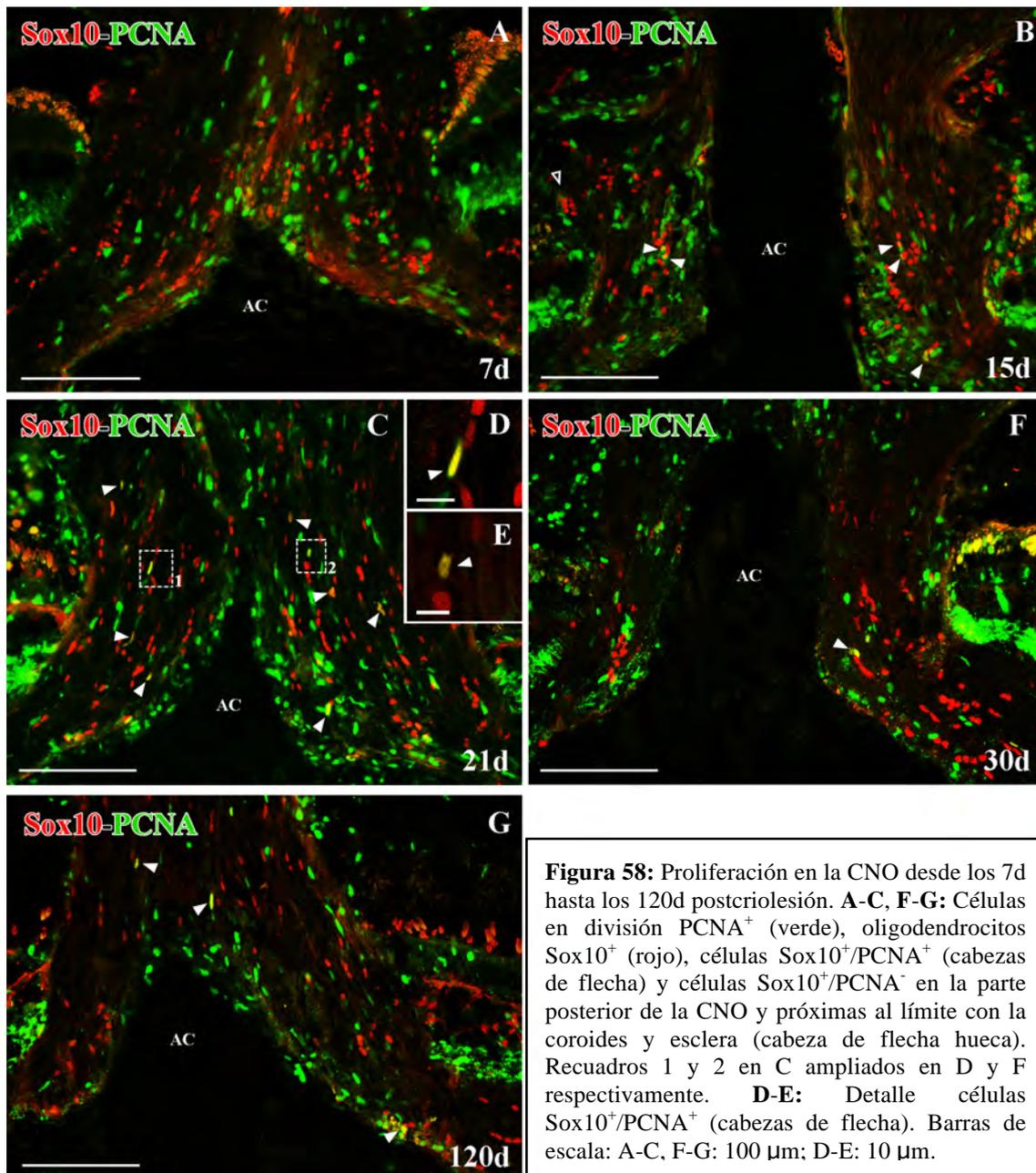


Figura 58: Proliferación en la CNO desde los 7d hasta los 120d postriolesión. **A-C, F-G:** Células en división PCNA⁺ (verde), oligodendrocitos Sox10⁺ (rojo), células Sox10⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha) y células Sox10⁺/PCNA⁻ en la parte posterior de la CNO y próximas al límite con la coroides y esclera (cabeza de flecha hueca). Recuadros 1 y 2 en C ampliados en D y F respectivamente. **D-E:** Detalle células Sox10⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha). Barras de escala: A-C, F-G: 100 μ m; D-E: 10 μ m.

Figura 59: Microscopía óptica y electrónica del DO a 7d postcriolesión. El marcaje con oro coloidal de las células Pax2⁺ está rodeado por círculos. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal a la CNO. Recuadro ampliado en B. **B:** Detalle de un grupo de células próximas a la limitante glial de la AC. La zona aproximada analizada en las secciones ultrafinas (asterisco). **C:** Micrografía de un grupo de células sin características típicas de astrocitos, oligodendrocitos o microglía. Recuadros 1, 2 y 3 ampliados en D, E y F respectivamente. **D:** Célula inmadura Pax2⁻ con mitocondrias en forma de media luna (mit). **E:** Célula de núcleo muy heterocromático Pax2⁻ (N). **F:** Célula de microglía Pax2⁻ (Mic) cuya membrana deja un espacio respecto al resto del tejido (flechas). **G:** Astrocito Pax2⁺ de la limitante glial de la AC. **H:** Astrocito Pax2⁺ (As1) y astrocito Pax2⁻ (As2) entre los axones. Arteria central (AC), aparato de Golgi (AG), astrocito (As), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), indentaciones (In), lámina basal (LB), microglía (Mic), mitocondria (mit), núcleo (N), nucleolo (Nuc), oligodendrocito (Olig), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 100 μm; B: 50 μm; C: 500nm; D-F: 250nm; G-H: 2500nm.

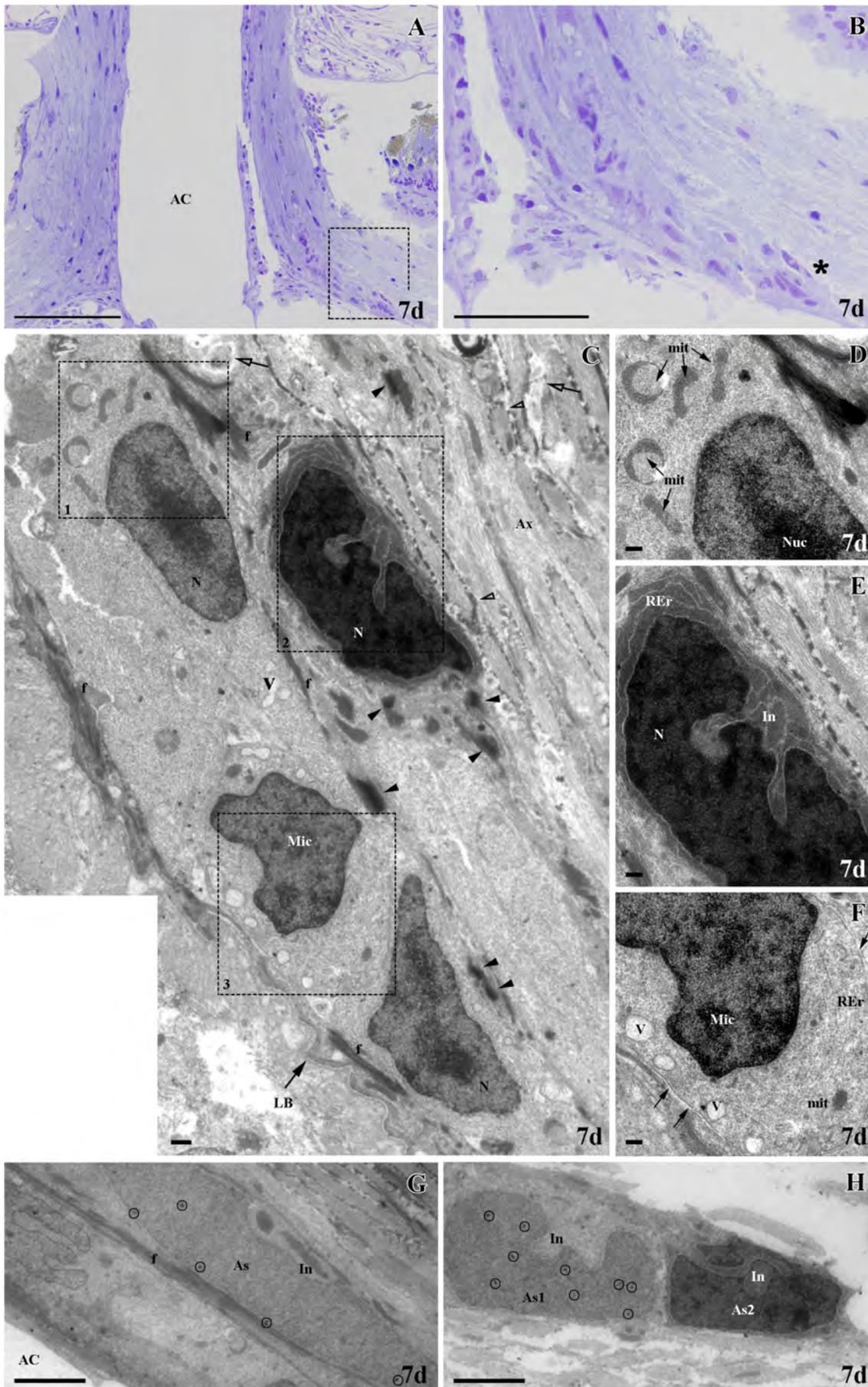


Figura 60: Microscopía electrónica de la zona IO2 a 7d postriolesión. El marcaje con oro coloidal de las células Pax2⁺ está rodeado por círculos. **A:** Astrocito Pax2⁺ (As) con núcleo claro a los electrones. Inserto: detalle del núcleo marcado para Pax2. **B:** Astrocito negativo para Pax2 (As) con núcleo denso a los electrones. **C:** Zonas en degeneración. **D:** Astrocito Pax2⁺ fagocítico (As) con núcleo eucromático (N) y citoplasma con gránulos de pigmento (P). Inserto de los gránulos de pigmento que atraen de forma inespecífica el anticuerpo para Pax2 (círculos). **E:** Célula de microglía reactiva Pax2⁻ (Mic). **F:** Célula de microglía en división. Astrocito (As), axones amielínicos (Ax), cromosomas (Cr), filamentos intermedios (f), fagosomas (F), gránulos de pigmento (P), indentaciones (In), microglía (Mic), mitocondria (mit), nucleolo (Nuc), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), axones amielínicos (Ax), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas). Barras de escala: A, C, D: 500 nm; inserto A, B: 250 nm; inserto D: 100 nm; E-F: 2500nm.

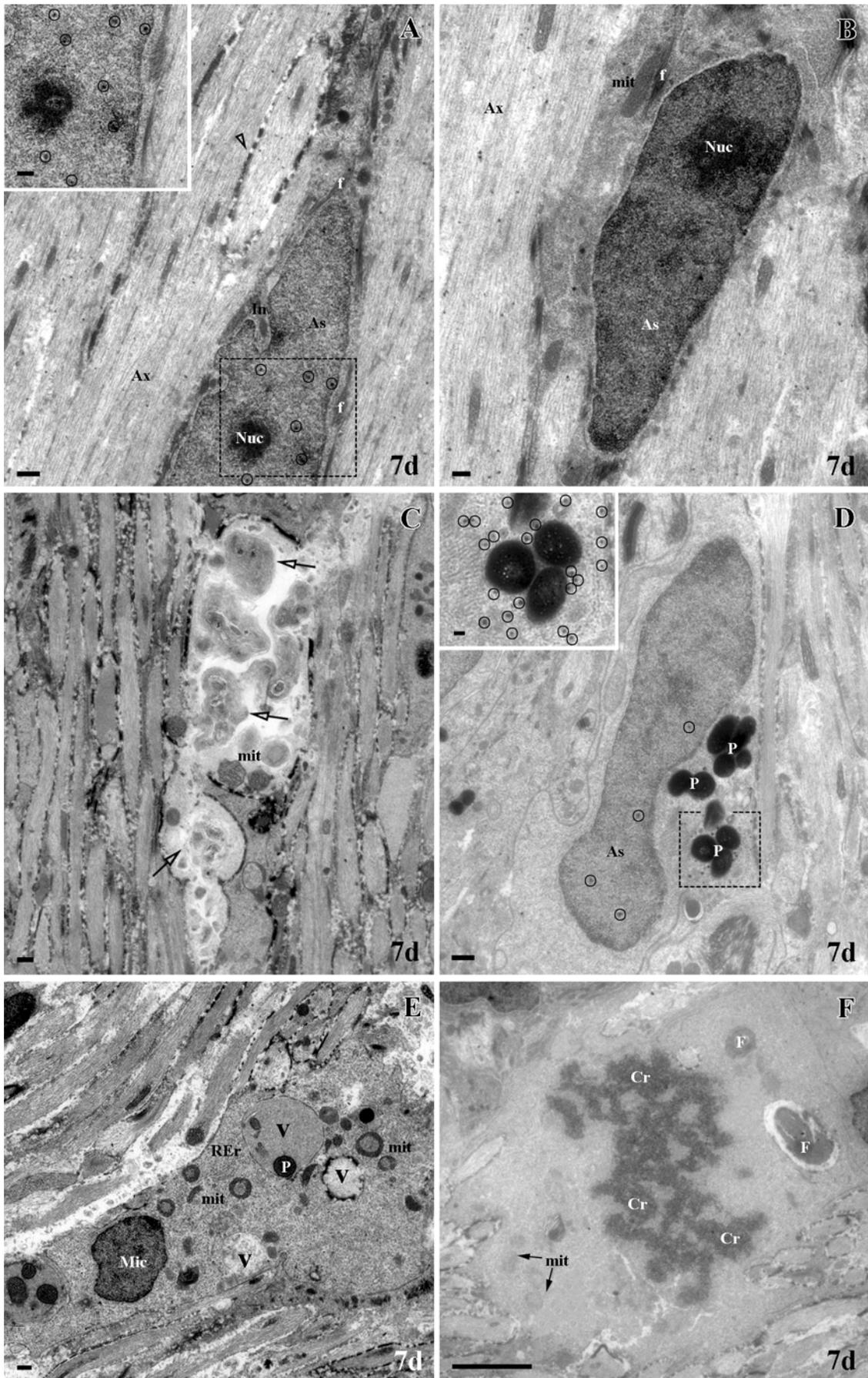
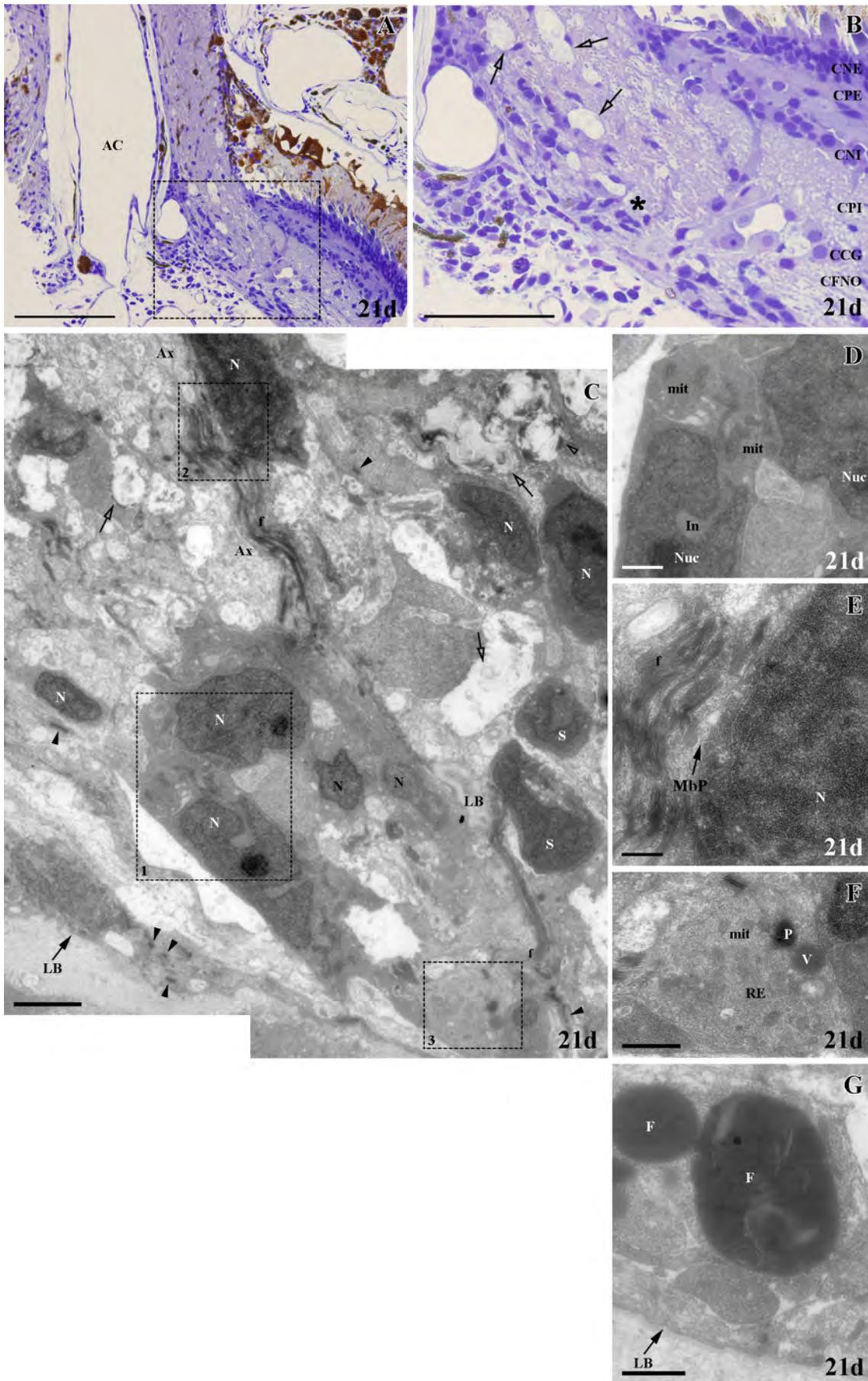


Figura 61: Microscopía óptica y electrónica del DO a 21d postcriolesión. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal a la CNO. Recuadro ampliado en B. **B:** Detalle de un grupo de células próximas a la limitante glial de la AC y áreas en degeneración (flechas huecas). Zona aproximada analizada en las secciones ultrafinas (asterisco). **C:** Micrografía electrónica de numerosas células del tejido nervioso (N) y células sanguíneas extravasadas (S). Recuadros 1, 2 y 3 ampliados en D, E y F respectivamente. **D:** Células sin características de astrocitos y oligodendrocitos. **E:** Célula de núcleo heterocromático (N). **F:** Célula de microglía. **G:** Célula del EP con restos de fotorreceptores en los fagosomas (F). Arteria central (AC), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), fagosoma (F), gránulos de pigmento (P), indentaciones (In), lámina basal (LB), membrana plasmática (MbP), microglía (Míc), mitocondria (mit), núcleo (N), nucleolo (Nuc), retículo endoplasmático rugoso (REr), célula sanguínea (S), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 100 μ m; B: 50 μ m; C: 2500nm; D, F-G: 1000nm; E: 500nm.



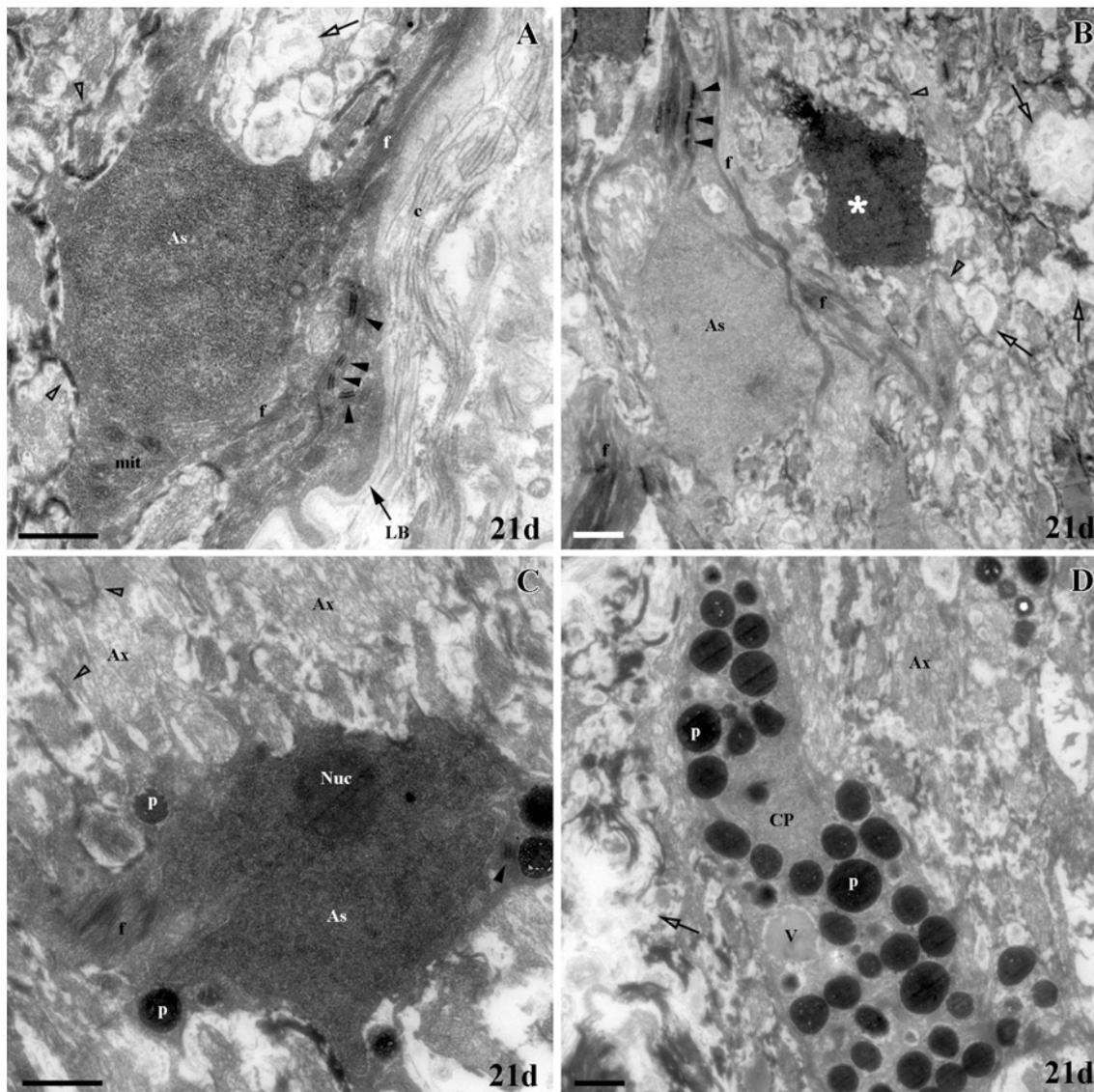
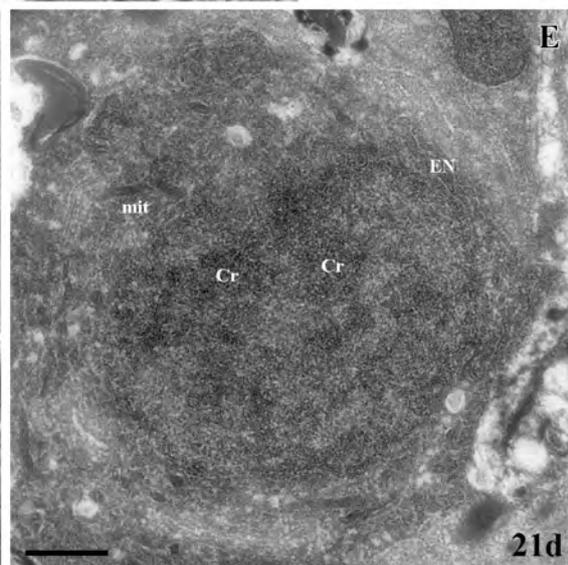
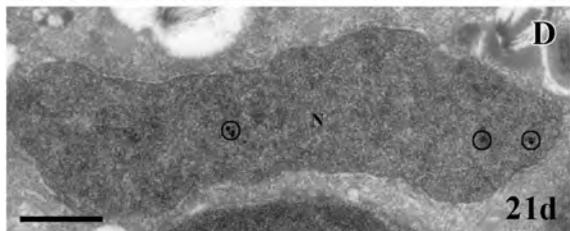
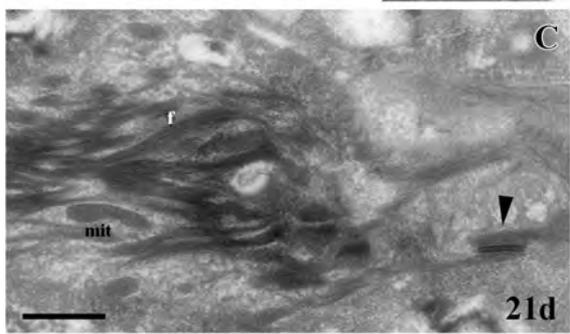
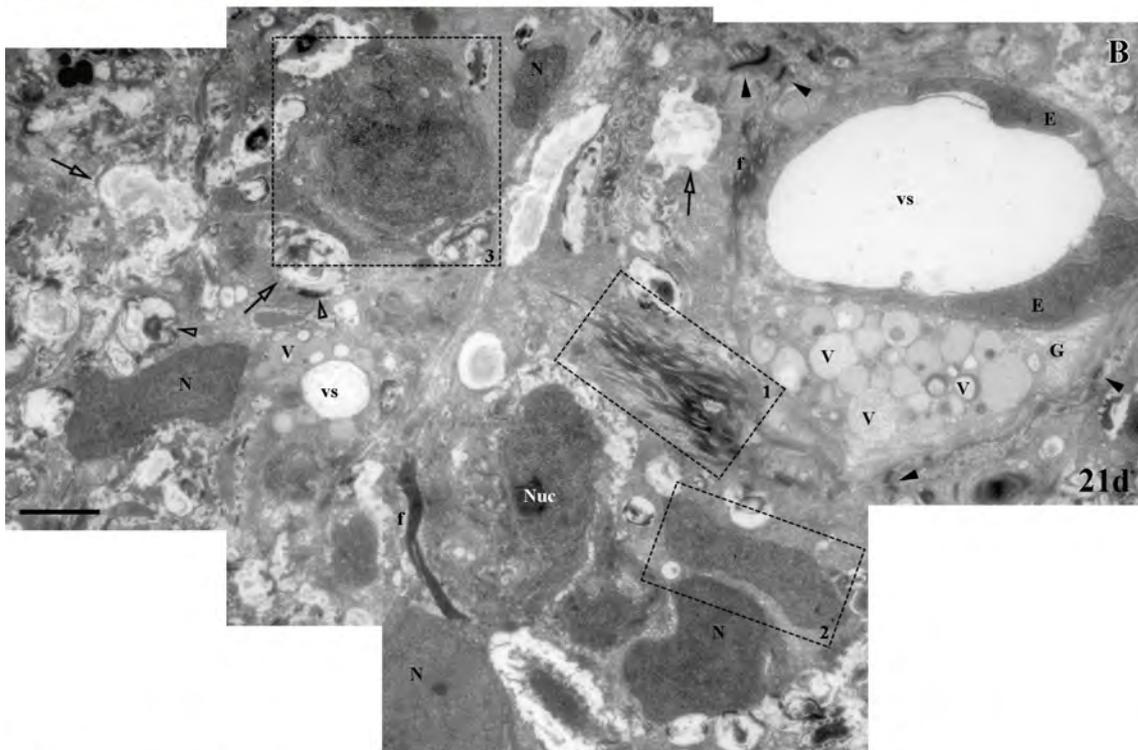
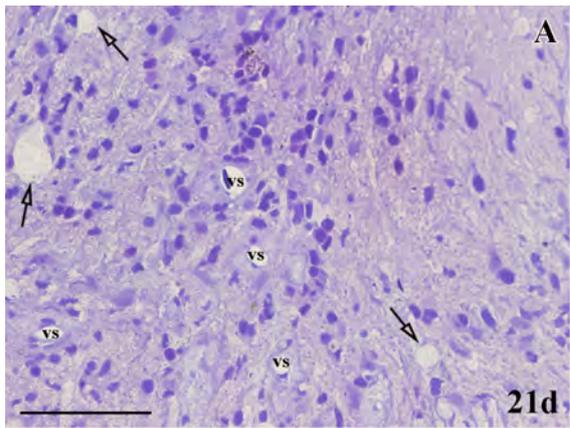


Figura 62: Microscopía electrónica de las zonas IO1 e IO2 a 21d postriolesión. **A:** Astrocito Pax2⁻ (As) de la limitante glial del NO con la esclera con núcleo oscuro a los electrones de la zona IO1. **B:** Astrocito Pax2⁻ (As) y célula que ha entrado en muerte celular (asterisco) en la zona IO2. **C:** Astrocito Pax2⁻ fagocítico (As) con gránulos de pigmento (P) en el citoplasma en la zona IO2. **D:** Célula del EP (CP) que ha migrado al NO en la zona IO2. Astrocitos (As), axones amielínicos (Ax), fibras de colágeno (c), célula del epitelio pigmentario (CP), filamentos intermedios (f), gránulos de pigmento (P), lámina basal (LB), mitocondria (mit), nucleolo (Nuc), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A- D: 1000 nm.

Figura 63: microscopía óptica y electrónica de la parte posterior de la CNO a 21d posterolesión. El marcaje con oro coloidal de las células Pax2⁺ está rodeado por círculos. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal a la CNO con numerosas células, vasos sanguíneos (vs) y áreas en degeneración (flechas huecas). **B:** Micrografía electrónica de una región similar a A. Numerosas células en las que se indica su núcleo (N) entre prolongaciones astrocitarias con paquetes de filamentos intermedios (f) y áreas en degeneración (flechas huecas). Junto a los vasos sanguíneos (vs) se detectan granulocitos (G). Recuadros 1, 2 y 3 ampliados en C, D y E respectivamente. **C:** Detalle de prolongaciones astrocitarias con filamentos intermedios (f). **D:** Célula con núcleo (N) Pax2⁺. **E:** Célula en mitosis. Cromatina condensada (Cr), células endoteliales (E), envuelta nuclear (EN), filamentos intermedios (f), granulocito (G), mitocondria (mit), núcleo (N), nucleolo (Nuc), vesículas (V), vasos sanguíneos (vs), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 50 μ m; B: 2500nm; C-E: 1000nm.



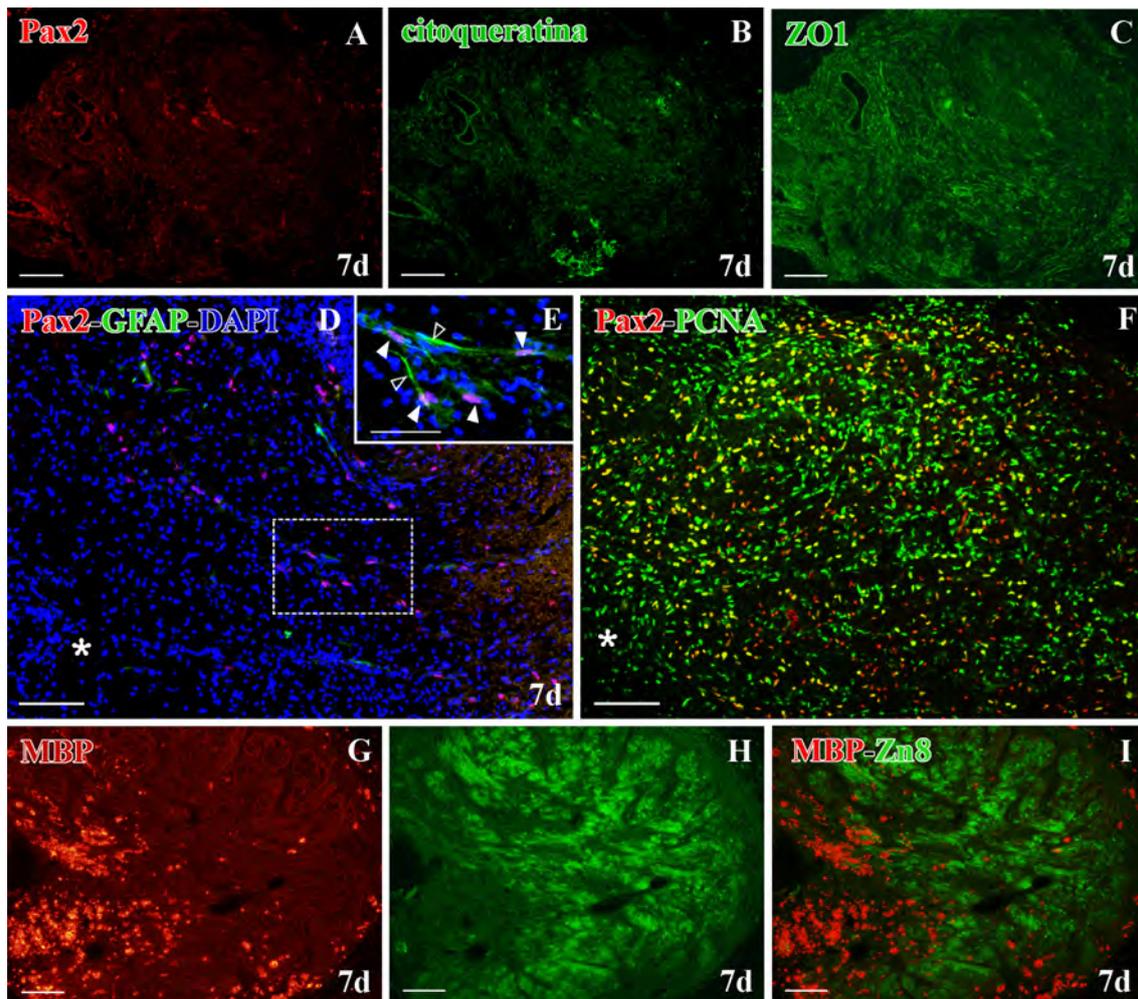


Figura 64: Análisis de la zona pinzada en el SIO a 7d de supervivencia. **A:** Ausencia de células Pax2⁺ (rojo) en sección transversal. **B:** Pérdida de marcaje para citoqueratina (verde) en sección transversal. **C:** Procesos desorganizados ZO1⁺ (verde) en sección transversal. **D:** Doble inmunotinción Pax2 (rojo)-GFAP (verde) con DAPI (azul) en sección longitudinal. Zona pinzada (asterisco) recuadro ampliado en E. **E:** Células Pax2⁺ (cabezas de flecha) y procesos GFAP⁺ (cabezas de flecha huecas). **F:** Doble inmunoreactividad Pax2 (rojo)-PCNA (verde) en sección longitudinal. Células Pax2⁺/PCNA⁺ (amarillo), zona pinzada (asterisco). **G-I:** Doble inmunohistoquímica MBP (rojo)-Zn8 (verde) en sección transversal. Los axones regenerantes Zn8⁺ discurren por las zonas sin mielina en degeneración MBP⁺. Barras de escala: A-D, F-I: 100 μm, E: 50 μm.

Figura 65: Análisis de la zona pinzada (A-B, E-K) y la zona posterior (C-D, L-P) del SIO a 21d de supervivencia. **A, C:** Doble inmunoreactividad Pax2 (rojo)-PCNA (verde). Células Pax2⁺/PCNA⁺ (amarillo), zona pinzada (asterisco) en sección longitudinal, recuadros de A y C ampliados en B y D respectivamente. **B, D:** Doble marcaje Pax2-PCNA con DAPI (azul). Células Pax2⁺/PCNA⁺ fuertemente positivas (cabezas de flecha), células Pax2⁺/PCNA⁺ levemente marcadas para PCNA (flechas), células Pax2⁺/PCNA⁺ fuertemente teñidas (cabezas de flecha huecas), células Pax2⁺/PCNA⁺ levemente inmunorreactivas para PCNA (flechas huecas). **E:** Células Pax2⁺ (rojo) en sección transversal, zona lesionada (asterisco) carente de células positivas. **F:** Marcaje citoqueratina⁺ organizado (verde) en sección transversal, zona lesionada (asterisco) carente de marcaje. **G:** Procesos ZO1⁺ organizados (verde) en sección transversal, zona lesionada (asterisco) carente de marcaje. **H:** Mielina desorganizada MBP⁺ (rojo) en zona lesionada de E-G. **I-K:** Doble tinción MBP (rojo)-Zn8 (verde) en sección transversal. Los axones regenerantes Zn8⁺ se encuentran en una zona limitada al borde en crecimiento (flecha) carente de mielina en degeneración MBP⁺. **L-N:** Marcaje para Pax2 (rojo), citoqueratina (verde) y ZO1 (verde) en sección transversal. Borde en crecimiento (flecha). **Ñ-P:** Doble inmunohistoquímica para MBP (rojo)-Zn8 (verde) en sección transversal. Los axones regenerantes Zn8⁺ en el borde en crecimiento (flecha) carente de mielina en degeneración MBP⁺. Barras de escala: A, C, D-P: 100 μm; B, D: 50 μm.

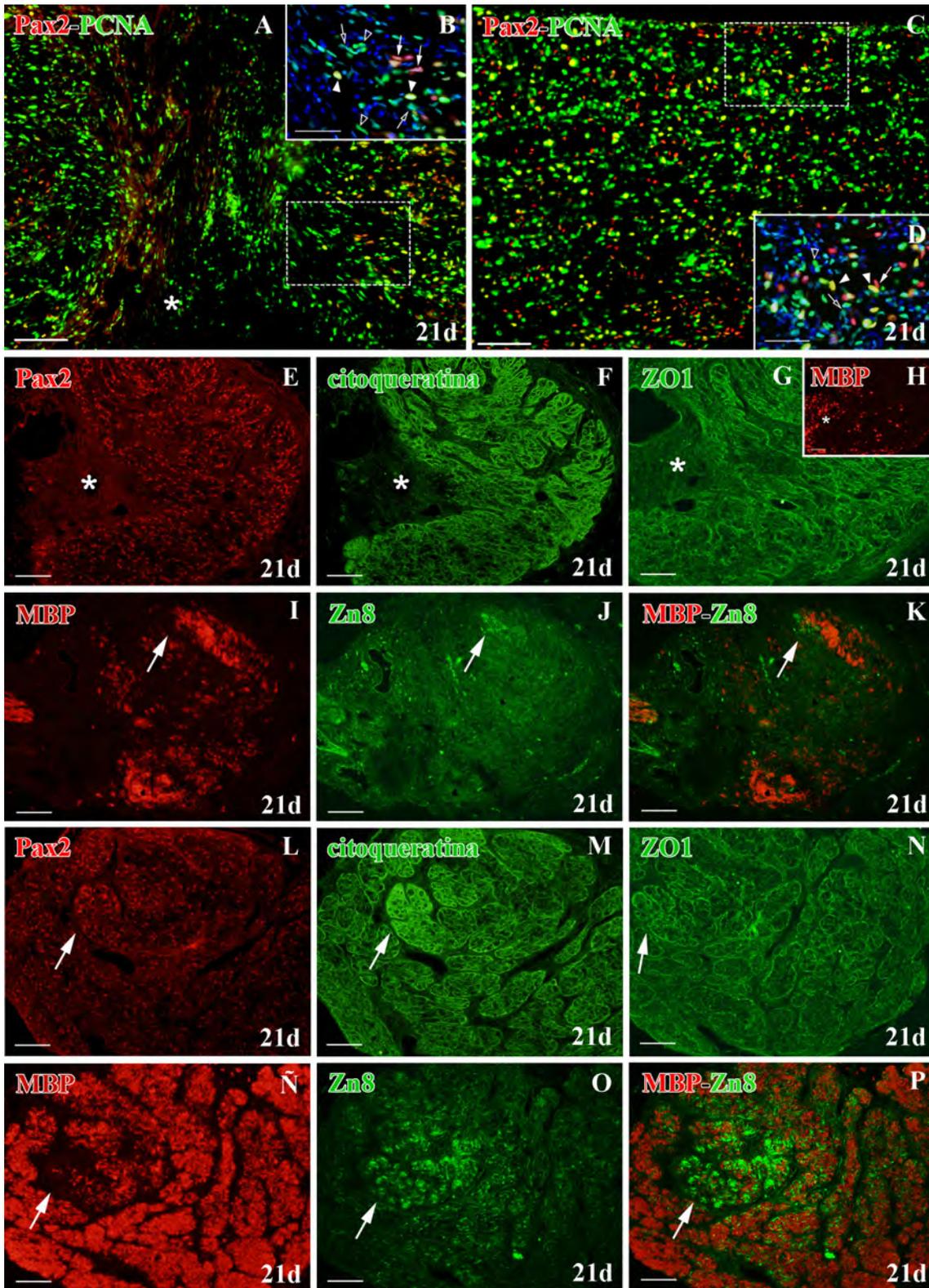
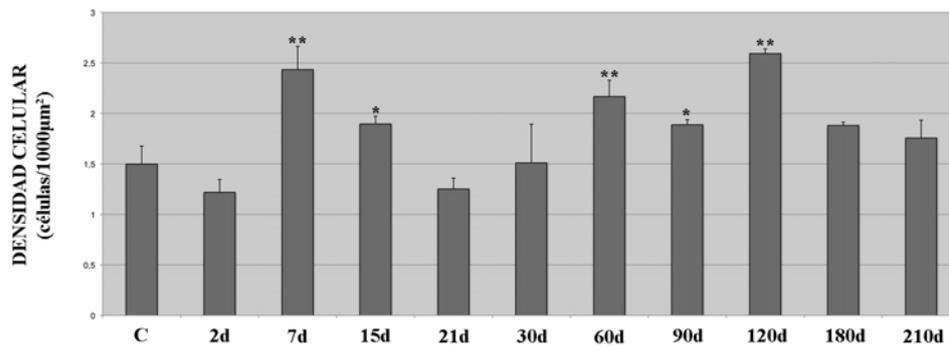


Figura 66: Resultados del análisis estadístico en la CNO durante la regeneración tras pinzamiento. **A:** Diferencias en la densidad de células Pax2⁺ en CNO durante los periodos de postlesión. **B:** Diferencias en la densidad de células PCNA⁺ en CNO durante los periodos de postlesión. Las tablas indican la densidad media de células en números; **p<0,01: diferencias altamente significativas; *p<0,05: diferencias significativas.

Células Pax2⁺

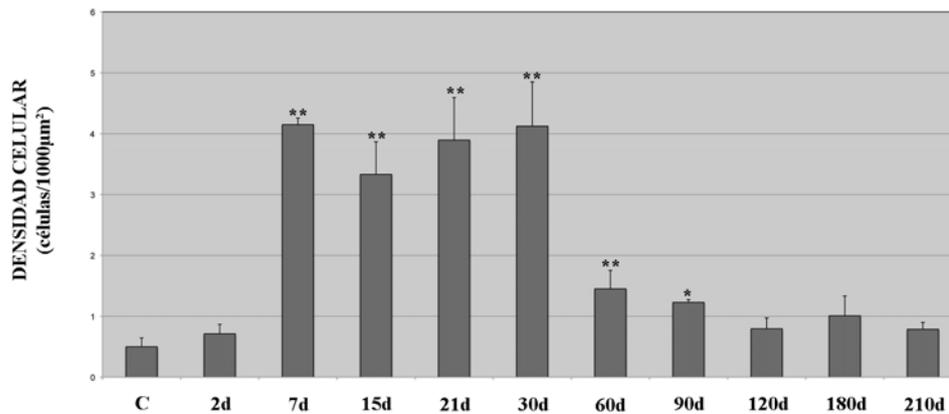
A



GRUPO EXPERIMENTAL	DENSIDAD MEDIA (células/1000μm ²)
Control	1,49±0,17
2d pinzamiento	1,21±0,12
7d pinzamiento	2,43±0,22
15d pinzamiento	1,89±0,07
21d pinzamiento	1,25±0,10
30d pinzamiento	1,51±0,38
60d pinzamiento	2,16±0,16
90d pinzamiento	1,88±0,05
120d pinzamiento	2,59±0,04
180d pinzamiento	1,88±0,03
210d pinzamiento	1,75±0,17

Células PCNA⁺

B



GRUPO EXPERIMENTAL	DENSIDAD MEDIA (células/1000μm ²)
Control	0,49±0,14
2d pinzamiento	0,71±0,15
7d pinzamiento	4,14±0,10
15d pinzamiento	3,33±0,53
21d pinzamiento	3,89±0,69
30d pinzamiento	4,12±0,72
60d pinzamiento	1,45±0,30
90d pinzamiento	1,22±0,04
120d pinzamiento	0,79±0,17
180d pinzamiento	1,00±0,32
210d pinzamiento	0,78±0,11

Figura 67: Estudio de las células Pax2⁺ en la CNO a 2-7d postpinzamiento. Células Pax2⁺ (rojo); axones Zn8⁺, células GFAP⁺, GS⁺, citoqueratina⁺ y ZO1⁺ (verde); núcleos marcados con DAPI (azul). **A-C:** Células Pax2⁺ (flechas) y axones Zn8⁺ (flechas huecas) en el DO, axones Zn8⁺ (cabezas de flecha huecas) alejados del borde en crecimiento Recuadro de B ampliado en C. **D:** Doble tinción Pax2-GFAP. Procesos GFAP⁺ en la CNO posterior (cabezas de flecha huecas), recuadro ampliado en E. **E:** Detalle del DO mostrando procesos GFAP⁺ (cabeza de flecha), procesos vitreales de las células de Müller GFAP⁺ desorganizados (flechas huecas), células Pax2⁺ paralelas a los mismos (flechas). Células Pax2⁺/GFAP⁺ en zona IO1 (cabeza de flecha). **F:** Doble inmunoreactividad Pax2-GS. Procesos vitreales de las células de Müller GS⁺ en el DO (flechas huecas), células Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha) y Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas) en CNO posterior. Recuadro ampliado en G. **G:** Células Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha) y Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas) en el DO. **H:** Doble marcaje Pax2-citoqueratina. Procesos intensamente positivos a citoqueratina en el DO (flechas huecas) y en la CNO posterior (flechas). Asteriscos 1 y 2 son ampliaciones de zonas similares en I y J respectivamente. **I:** Células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha) y Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha huecas) en el DO. **J:** Células Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha) y Pax2⁺/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha huecas) en la zona IO1 posterior. **K:** Doble marcaje Pax2-ZO1. Recuadro ampliado en L. **L:** Células Pax2⁺/ZO1⁺ (cabezas de flecha) próximas a la zona IO1 externas al NO. Barras de escala: A-B, D, F, H, K: 100 µm; C, E: 50 µm; G, I-J, L: 20 µm.

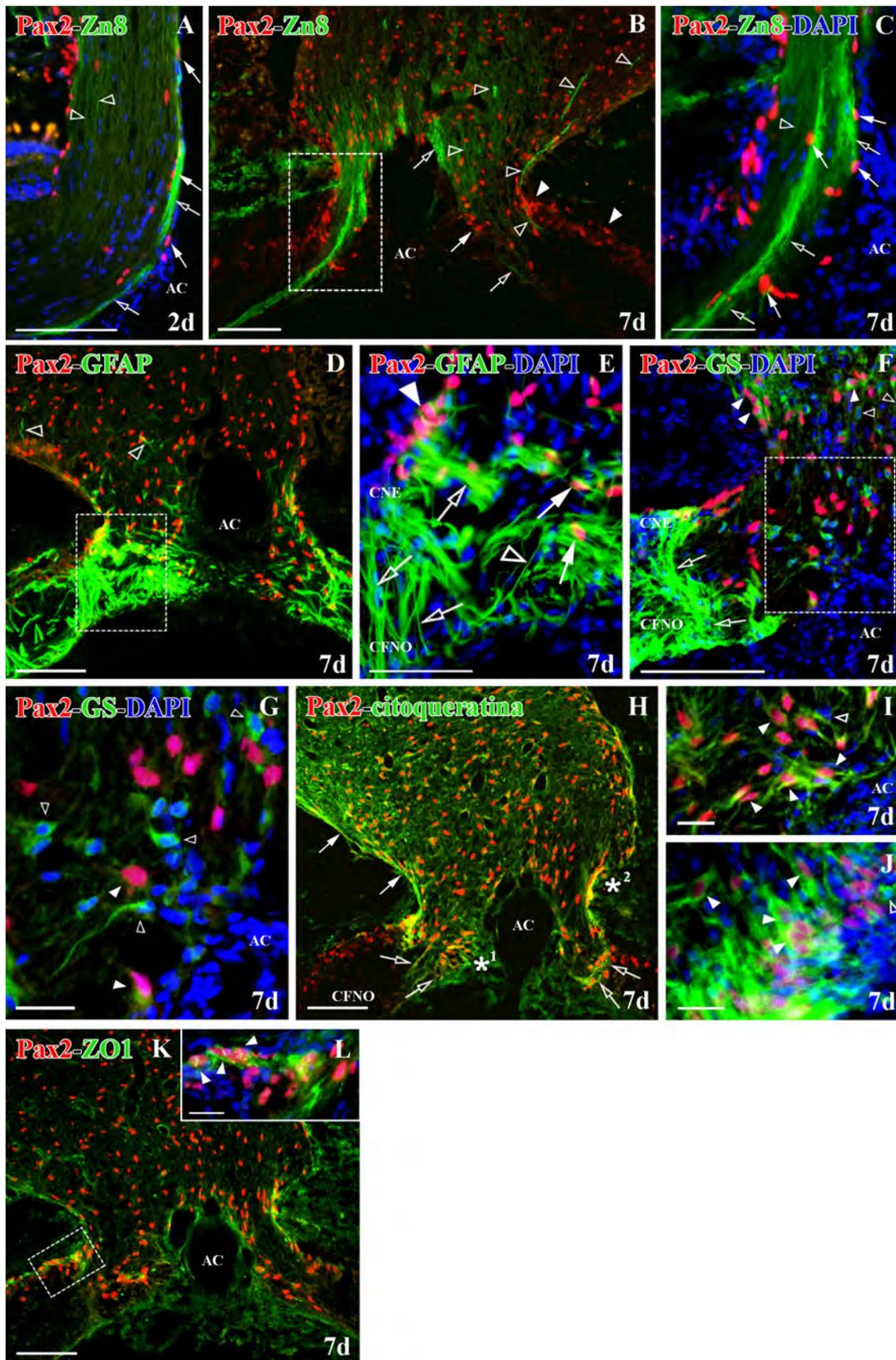


Figura 68: Estudio de las células Pax2⁺ en la CNO a 15-30d postpinzamiento. Células Pax2⁺ (rojo); axones Zn8⁺, células GFAP⁺, GS⁺, citoqueratina⁺ y ZO1⁺ (verde); núcleos marcados con DAPI (azul). **A, C-D:** Células Pax2⁺ (flechas) y axones Zn8⁺ (flechas huecas) en el borde en crecimiento, axones Zn8⁺ alejados del borde en crecimiento (cabezas de flecha huecas). Recuadro A ampliado en B. **B:** Células Pax2⁺ con nucleolos negativos (cabezas de flecha) en el DO. **E:** Doble marcaje Pax2-GFAP. Procesos GFAP⁺ en la CNO posterior (flechas), recuadros 1 y 2 ampliados en F y G respectivamente. **F:** Detalle del DO. Procesos GFAP⁺ (cabeza de flecha hueca), procesos vitreales GFAP⁺ de células de Müller en el DO (flechas huecas) y células Pax2⁺ paralelas a los mismos (flechas), células Pax2⁺/GFAP⁺ en la limitante de la AC (cabeza de flecha). **G:** Detalle de la zona IO1. Células Pax2⁺/GFAP⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁻/GFAP⁺ (cabezas de flecha huecas) en la limitante glial. Células Pax2⁺/GFAP⁻ externas al NO (flechas). **H:** Ampliación de una zona similar al recuadro 2 en E. Células Pax2⁺/GFAP⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁻/GFAP⁺ (cabeza de flecha hueca) en la limitante glial. **I:** Doble marcaje Pax2-GS. Procesos vitreales de las células de Müller GS⁺ en el DO (flechas huecas) y procesos GS⁺ en la limitante de la CNO posterior (flechas). Asterisco muestra la ampliación de una zona similar en J, recuadro ampliado en K. **J:** Células Pax2⁺/GS⁻ (cabezas de flecha) y Pax2⁻/GS⁺ (cabezas de flecha huecas). **K:** Células Pax2⁺/GS⁻ (flecha), Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁻/GS⁺ (cabezas de flecha huecas). **L, N:** Doble marcaje Pax2-citoqueratina. Células Pax2⁺/citoqueratina⁺ en las limitantes de la AC (cabezas de flecha) y zona IO1 (flechas), procesos Pax2⁻/citoqueratina⁺ en el DO (flechas huecas). Recuadro en L ampliado en M. **M:** Células Pax2⁺/citoqueratina⁻ (cabezas de flecha) y Pax2⁻/citoqueratina⁺ (cabezas de flecha huecas) en el DO. **N:** Doble marcaje Pax2-ZO1. Recuadro ampliado en O. **O:** Células Pax2⁺/ZO1⁺ (cabezas de flecha) próximas a la zona IO1 y en la limitante glial de la misma. Barras de escala: A, D, E, I, L, N-Ñ: 100 µm; B, G-H, J-K, O: 20 µm; C, F: 50 µm.

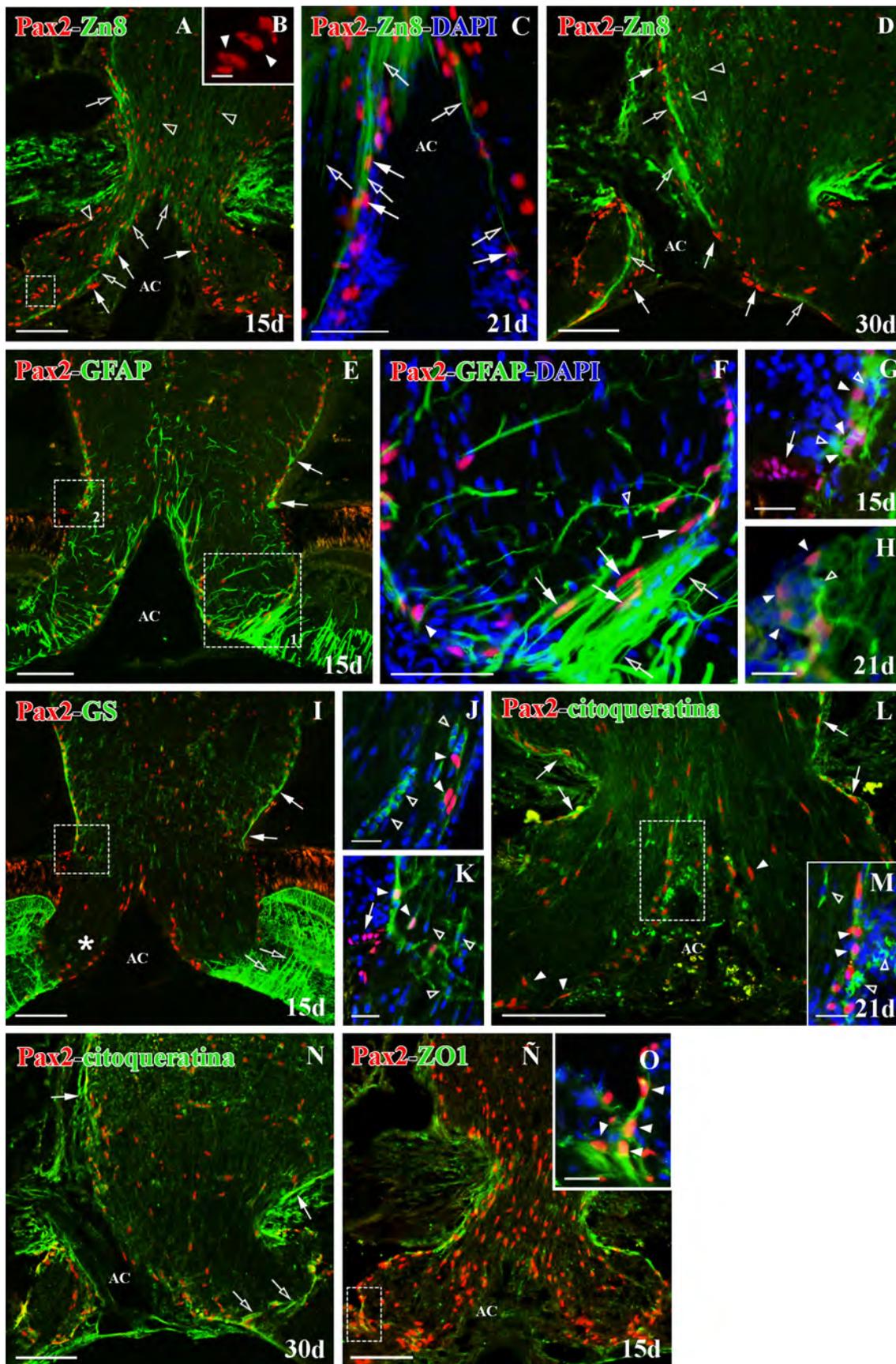


Figura 69: Estudio de las células Pax2⁺ en la CNO a 90 y 180d postpinzamiento. Células Pax2⁺ (rojo); axones Zn8⁺, células GFAP⁺, GS⁺ y citoqueratina⁺ (verde); núcleos marcados con DAPI (azul). **A:** Células Pax2⁺ (flechas) y axones Zn8⁺ (flechas huecas) en el borde en crecimiento, axones Zn8⁺ alejados del borde en crecimiento (cabezas de flecha huecas). **B:** Zona posterior de la CNO, axones Zn8⁺ del borde en crecimiento (flecha hueca) y axones Zn8⁺ transversales al NO (cabeza de flecha hueca), células Pax2⁺ (rojo). **C:** Doble tinción Pax2-GFAP a los 90d. Procesos GFAP⁺ longitudinales a los axones en el DO (cabezas de flecha huecas), células Pax2⁺ (cabezas de flecha). Recuadros 1 y 2 ampliados en D y E respectivamente. **D:** Procesos vitreales GFAP⁺ de las células de Müller (flechas huecas), procesos GFAP⁺ longitudinales a los axones (cabezas de flecha huecas), células Pax2⁺/GFAP⁺ (cabezas de flecha). **E:** Procesos vitreales GFAP⁺ de las células de Müller (flechas huecas), células Pax2⁺/GFAP⁺ de la limitante glial (cabezas de flecha), procesos GFAP⁺ de la zona posterior de la CNO (flecha). **F:** Doble inmunohistoquímica para Pax2-GS en la CNO a los 90d. Procesos vitreales de las células de Müller GS⁺ (flechas huecas), células Pax2⁺/GS⁺ (cabeza de flecha), células Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas), procesos GS⁺ en la zona posterior de la CNO (flecha). Recuadros 1 y 2 ampliados en G y H respectivamente. **G:** Detalle del DO. Procesos vitreales GS⁺ de las células de Müller (flechas huecas), células Pax2⁺/GS⁺ (flechas), células Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas). **H:** Detalle de la zona IO1 posterior. Células Pax2⁺/GS⁻ (flecha), células Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas) y células Pax2⁺/GS⁺ (cabezas de flecha). **I:** Doble marcaje Pax2-citoqueratina en la CNO a los 180d. Células Pax2⁺/citoqueratina⁺ de la limitante glial de la AC (cabezas de flecha) y de la zona IO1 (flechas). Barras de escala: A, I: 100 µm; C, F: 75 µm; B, D, E, G, H: 50 µm.

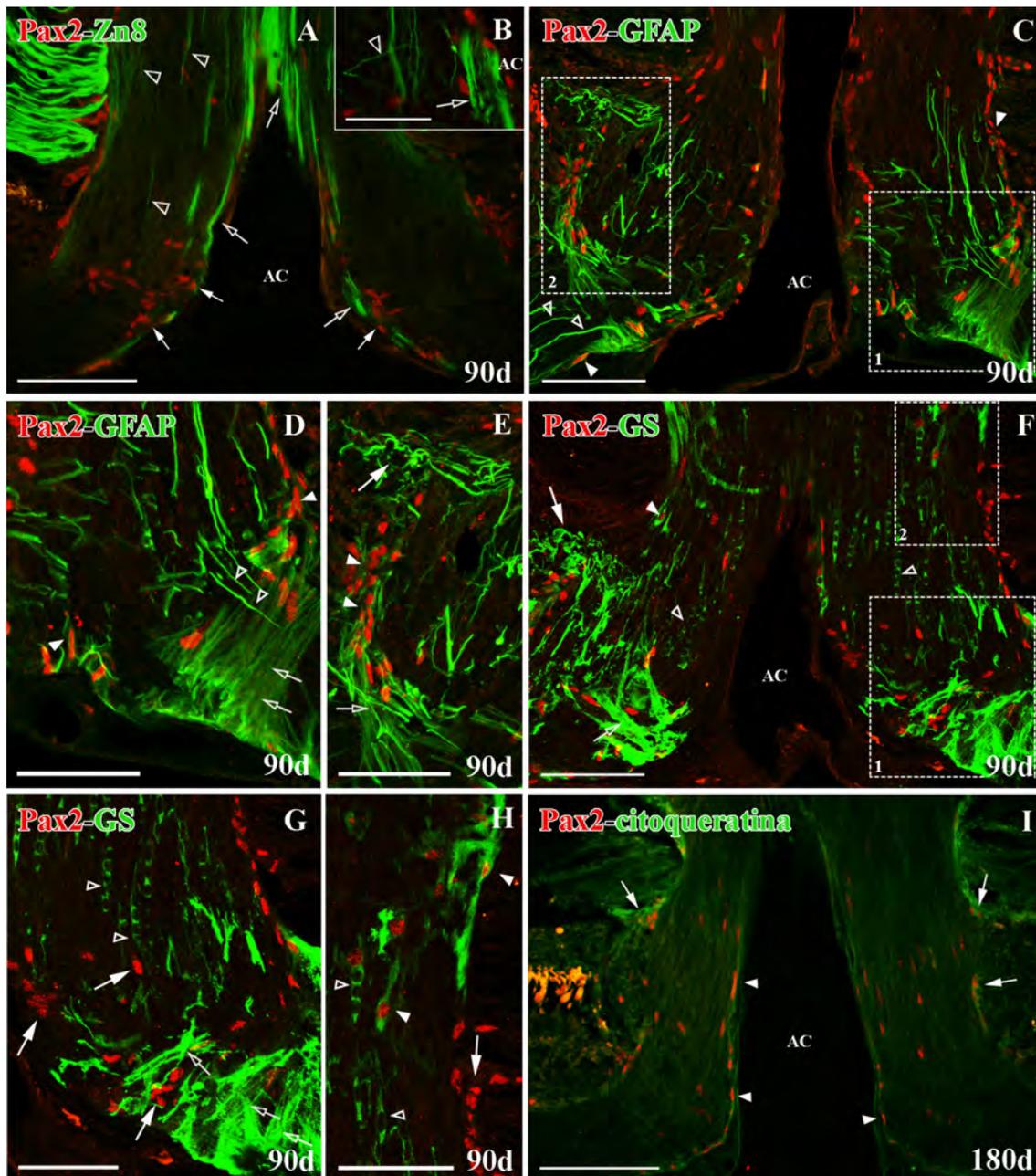


Figura 70: Análisis de la variación de las células S100⁺ en la CNO durante la regeneración tras pinzamiento. Células S100⁺ (rojo); células GFAP⁺ y células GS⁺ (verde); núcleos marcados con DAPI (azul). **A:** Doble marcaje S100-GFAP a los 7d. Procesos S100⁺/GFAP⁺ (flechas) y procesos desorganizados de las células de Müller GFAP⁺ (flechas huecas). **B:** Doble tinción S100-GS a 7d. Células S100⁺ de la CFNO (cabezas de flecha huecas), procesos desorganizados de las células de Müller GS⁺ (flechas huecas). Recuadro ampliado en C. **C:** Células S100⁺/GS⁻ (flechas) y células S100⁺/GS⁺ (flecha hueca). **D:** Doble inmunotinción S100-GFAP a los 15d. Células S100⁺ de la CFNO (cabezas de flecha huecas), procesos de las células de Müller GFAP⁺ (flechas huecas), procesos S100⁺/GFAP⁺ de la zona IO1 y CNO posterior (flechas) y, células S100⁺/GFAP⁺ en zona externa a CNO (cabeza de flecha). Recuadro 1 y 2 ampliados en E y F respectivamente. **E:** Detalle del DO. Células S100⁺ fuertemente inmunorreactivas (cabeza de flecha hueca) y células S100⁺ con marcaje suave (cabezas de flecha). **F:** Célula S100⁺ (cabeza de flecha hueca) con largos procesos (flechas) asociada a proceso de Müller GFAP⁺ (flecha hueca). **G:** Doble marcaje S100-GS a 15d. Células S100⁺/GS⁻ (flecha), células S100⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas). Asterisco señala la ampliación de una zona similar en G. **H:** Células completamente S100⁺/GS⁺ (cabeza de flecha hueca), células S100⁺/GS⁺ y citoplasma GS⁺ (cabezas de flecha). **I:** Doble tinción S100-GFAP a los 30d. Células S100⁺ de la CFNO y la CNO (cabeza de flecha hueca), procesos de las células de Müller GFAP⁺ (flechas huecas), procesos S100⁺/GFAP⁺ de la limitante de la CNO posterior (flechas). Recuadro ampliado J. **J:** Células S100⁺ externas al NO (cabeza de flecha). **K:** Doble marcaje S100-GFAP a 180d. Células S100⁺ de la CFNO (cabeza de flecha hueca), procesos de las células de Müller GFAP⁺ (flechas huecas), procesos S100⁺/GFAP⁺ de la en la CNO (flechas) y células S100⁺/GFAP⁺ externas al NO en la zona IO1 (cabezas de flecha). **L:** Células S100⁺/GFAP⁺ en la CNO posterior (flecha). **M:** Doble inmunoreactividad a S100-GFAP a los 180d. Células S100⁺ de la CFNO (cabeza de flecha hueca), procesos de las células de Müller GFAP⁺ (flechas huecas), procesos S100⁺/GFAP⁺ de la en la CNO (flechas) y procesos S100⁺/GFAP⁺ en la CPI próxima a la CNO (flecha hueca). Barras de escala: A-B, D, G, I, K: 100 μ m; C, E, H, J, L: 20 μ m, F: 10 μ m; M: 75 μ m.

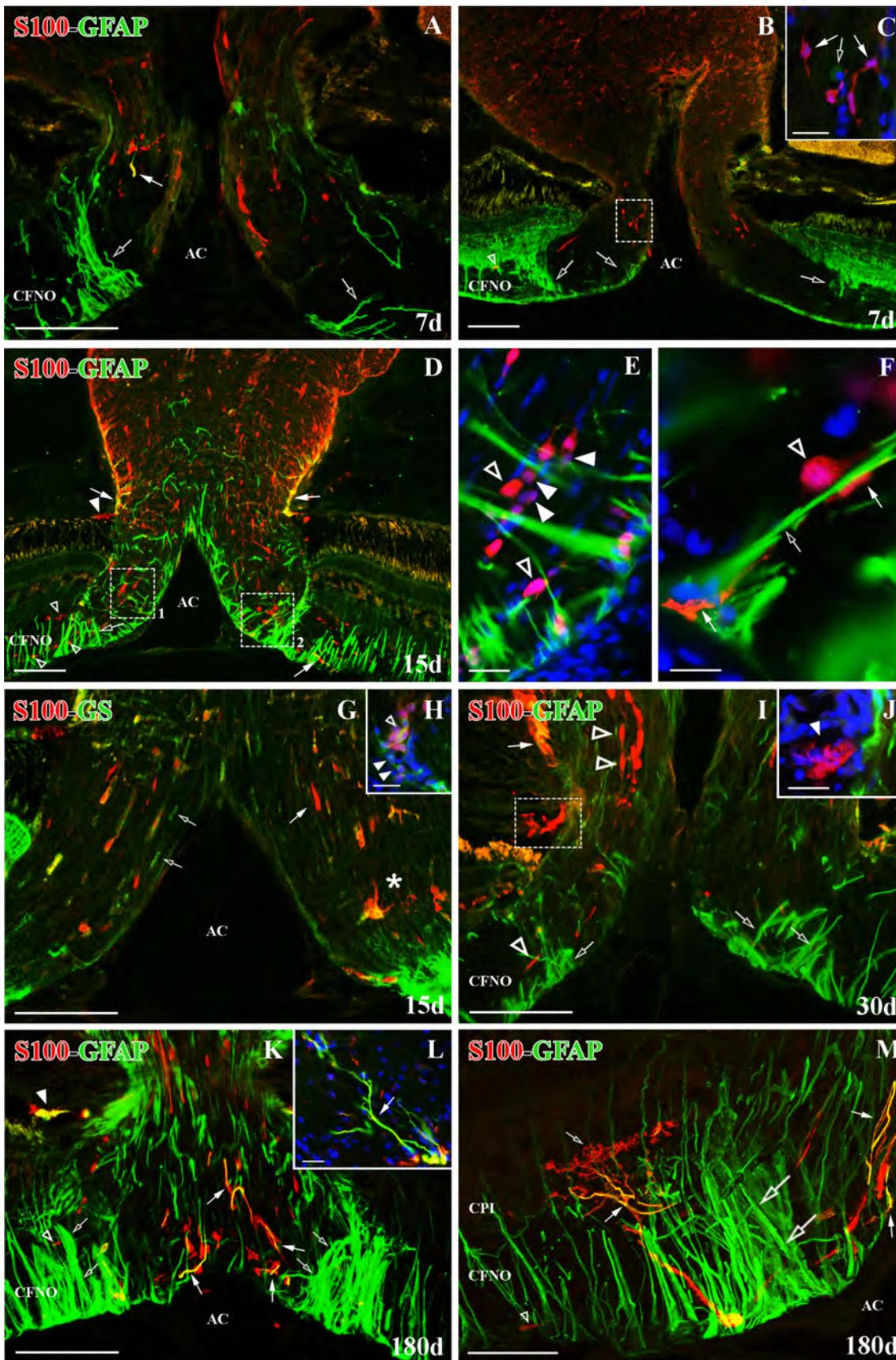


Figura 71: Variación de la distribución de la mielina MBP⁺ y oligodendrocitos Sox10⁺ (rojo) en la CNO durante la regeneración postpinzamiento. Los núcleos marcados con DAPI (azul) y las células GS⁺ (verde). **A, D, G, J:** Marcaje MBP-DAPI. Mielina organizada (flechas) y en degeneración (cabezas de flecha), recuadros en A, G y J ampliados en B, H y K. **B, H, K:** Detalle de la mielina y las vainas de mielina MBP⁺ (flechas). **C:** Marcaje Sox10-DAPI. Grupos de células Sox10⁺ (cabeza de flecha hueca) y células aisladas Sox10⁺ (flecha hueca). **E, I, L:** Doble tinción Sox10-GS. Células Sox10⁺/GS⁺ (cabezas de flecha), procesos GS⁺ desorganizados (flechas huecas), marcaje GS⁺ en la limitante de la CNO (cabezas de flecha huecas). Recuadro en E ampliado en F. **F:** Doble marcaje Sox10-GS con DAPI. Células Sox10⁺/GS⁺ (cabezas de flecha) y células Sox10⁺/GS⁺ (cabezas de flecha huecas). Barras de escala: A,C-E, G, I-J, L: 100 μm; B, F, H, K: 20 μm.

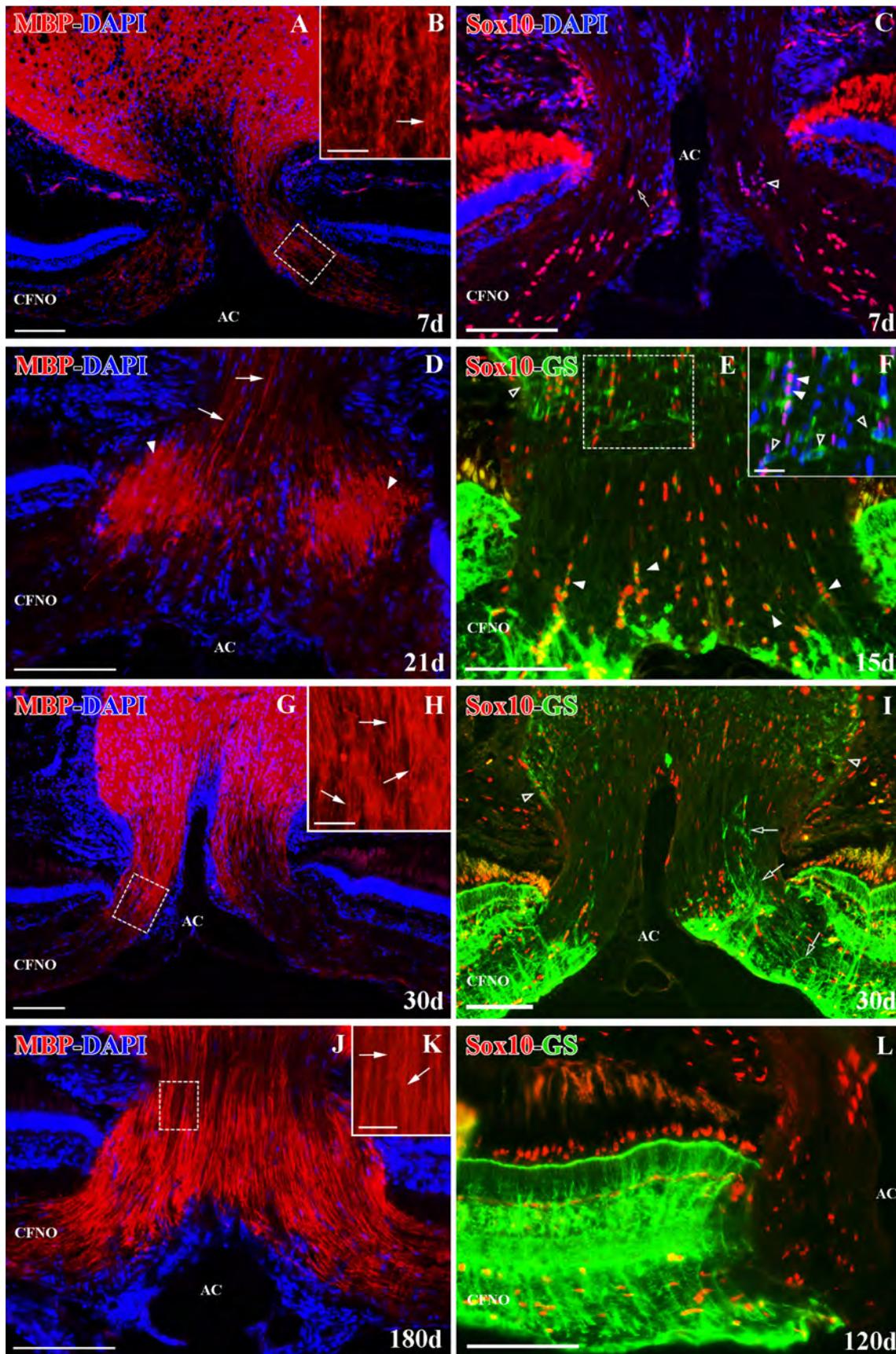
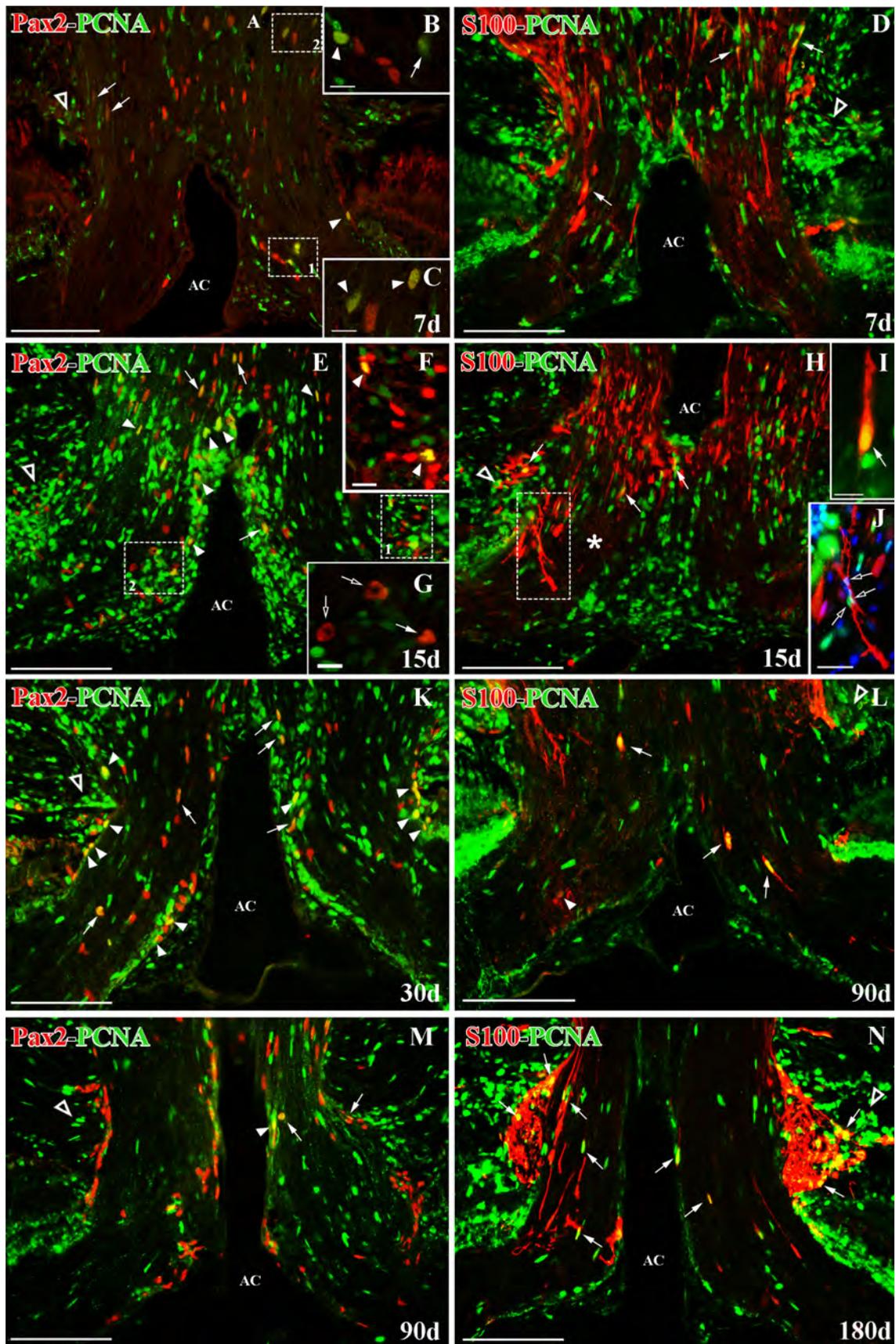


Figura 72: Análisis de la proliferación en la CNO durante la regeneración tras pinzamiento. Células PCNA⁺ (verde) y células Pax2⁺ y S100⁺ (rojo). **A, E, K, M:** Doble marcaje Pax2-PCNA en la CNO durante el proceso de regeneración. Células Pax2⁺/PCNA⁺ fuertemente marcadas (cabezas de flecha) y células PCNA⁺ levemente inmunoreactivas para Pax2 (flechas), células PCNA⁺ de la zona IO1 (cabezas de flecha huecas). Recuadros 1 y 2 en A y B indican la ampliación de una zona similar en B-C y E-F respectivamente. **B:** Doble marcaje Pax2-PCNA en el DO. Células Pax2⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha) y células Pax2⁺ ligeramente positivas a PCNA (flecha). **C:** Células Pax2⁺/PCNA⁺ en la zona IO2 posterior (cabezas de flecha). **F:** Doble marcaje Pax2-PCNA en la zona IO1. Células Pax2⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha). **G:** Células Pax2⁺/PCNA⁻ en división (flechas huecas) y células Pax2⁺ ligeramente positivas a PCNA (flecha) en el DO. **B, H, L, N:** Doble marcaje S100-PCNA en la CNO durante todo el proceso de regeneración. Células S100⁺/PCNA⁺ de soma y procesos marcados para S100 (flechas), células S100⁺/PCNA⁺ levemente marcadas (cabeza de flecha) y células PCNA⁺ de la zona IO1. El asterisco y el recuadro en F indican la ampliación de una zona similar en I y J respectivamente. **I:** Detalle de célula S100⁺/PCNA⁺ de soma y procesos marcados para S100 (flecha). **J:** Células PCNA⁺ (flechas huecas) asociadas a procesos S100⁺ en el DO, núcleos marcados con DAPI (azul). Arteria central (AC). Barras de escala: A: 75 μm; D, H, K-N: 100 μm; B-C, F-H: 10 μm; J: 20 μm.



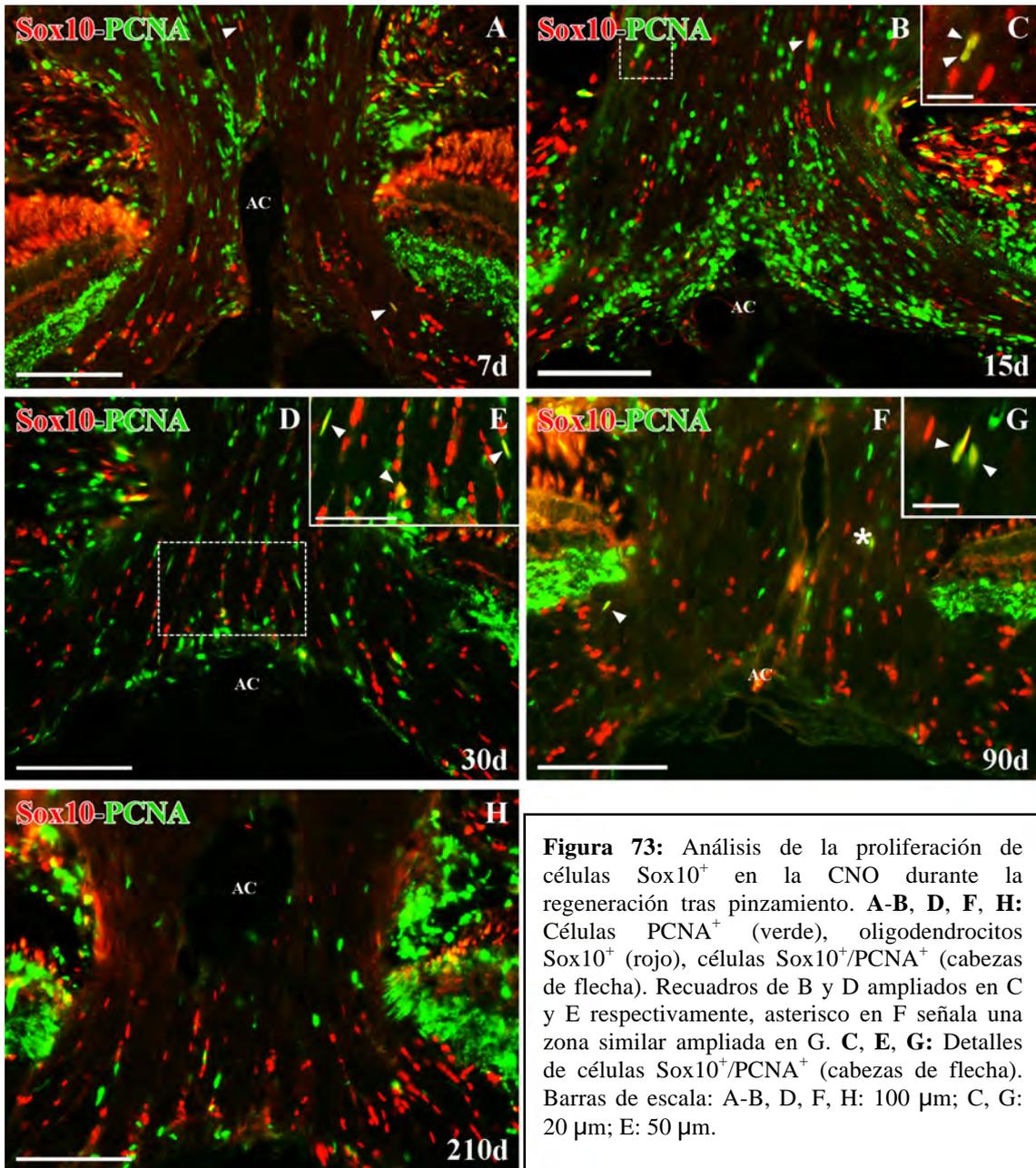


Figura 73: Análisis de la proliferación de células Sox10⁺ en la CNO durante la regeneración tras pinzamiento. A-B, D, F, H: Células PCNA⁺ (verde), oligodendrocitos Sox10⁺ (rojo), células Sox10⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha). Recuadros de B y D ampliados en C y E respectivamente, asterisco en F señala una zona similar ampliada en G. C, E, G: Detalles de células Sox10⁺/PCNA⁺ (cabezas de flecha). Barras de escala: A-B, D, F, H: 100 μm; C, G: 20 μm; E: 50 μm.

Figura 74: Microscopía óptica y electrónica del DO a los 7d postpinzamiento. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal a la CNO donde se señalan áreas en degeneración (flechas huecas) y una zona aproximada que se analiza en B (asterisco). **B:** Micrografía electrónica mostrando numerosas células de microglía (Mic), células del epitelio pigmentario (CP) y astrocitos (As) en el DO. Recuadros 1 y 2 ampliados en C y D respectivamente. **C:** Detalle de células de microglía reactiva (Mic) y astrocito Pax2⁺ (As). **D:** Detalle del pie vitreal de una célula de Müller (Mü). Arteria central (AC), astrocitos (As), axones amielínicos (Ax), célula del epitelio pigmentario (CP), filamentos intermedios (f), lámina basal (LB), microglía (Mic), mitocondria (mit), procesos vitreales de células de Müller (Mü), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 50 μm ; B: 2500 μm ; C-D: 1000nm.

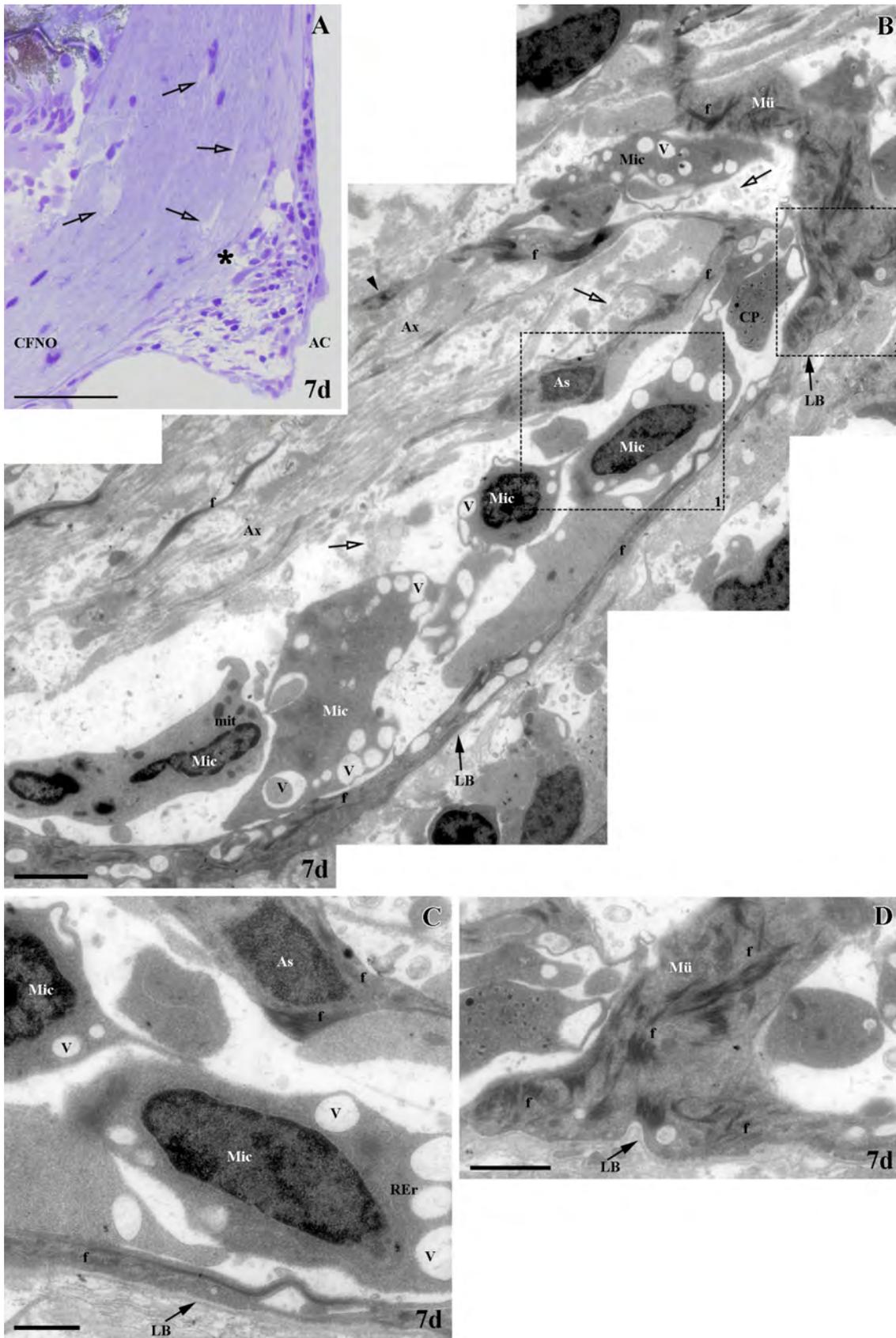


Figura 75: Microscopía electrónica del DO a los 7d postpinzamiento. Marcaje con oro coloidal de las células Pax2⁺ está rodeado por círculos. **A:** Proceso vitreal de una célula de Müller (Mü) con células de microglía asociadas (Mic). A lo largo de todo el grosor del DO la mayoría de los axones son amielínicos (Ax). Recuadro ampliado en B. **B:** Detalle de dos células de microglía (Mic) asociadas a un proceso vitreal de Müller (Mü). **C:** Astrocito Pax2⁺ (As1) y Pax2⁻ (As2) en el DO entre axones amielínicos (Ax) y mielinizados (cabezas de flecha huecas) y zonas en degeneración (flechas huecas). **(D)** Detalle de As1 Pax2⁺ de C. **(E)** Detalle de As2 Pax2⁻ de C. Astrocitos (As), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), lámina basal (LB), microglía (Mic), mitocondria (mit), procesos vitreales de células de Müller (Mü), retículo endoplasmático rugoso (REr), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A, C: 2500 nm; B, D-E: 1000 nm.

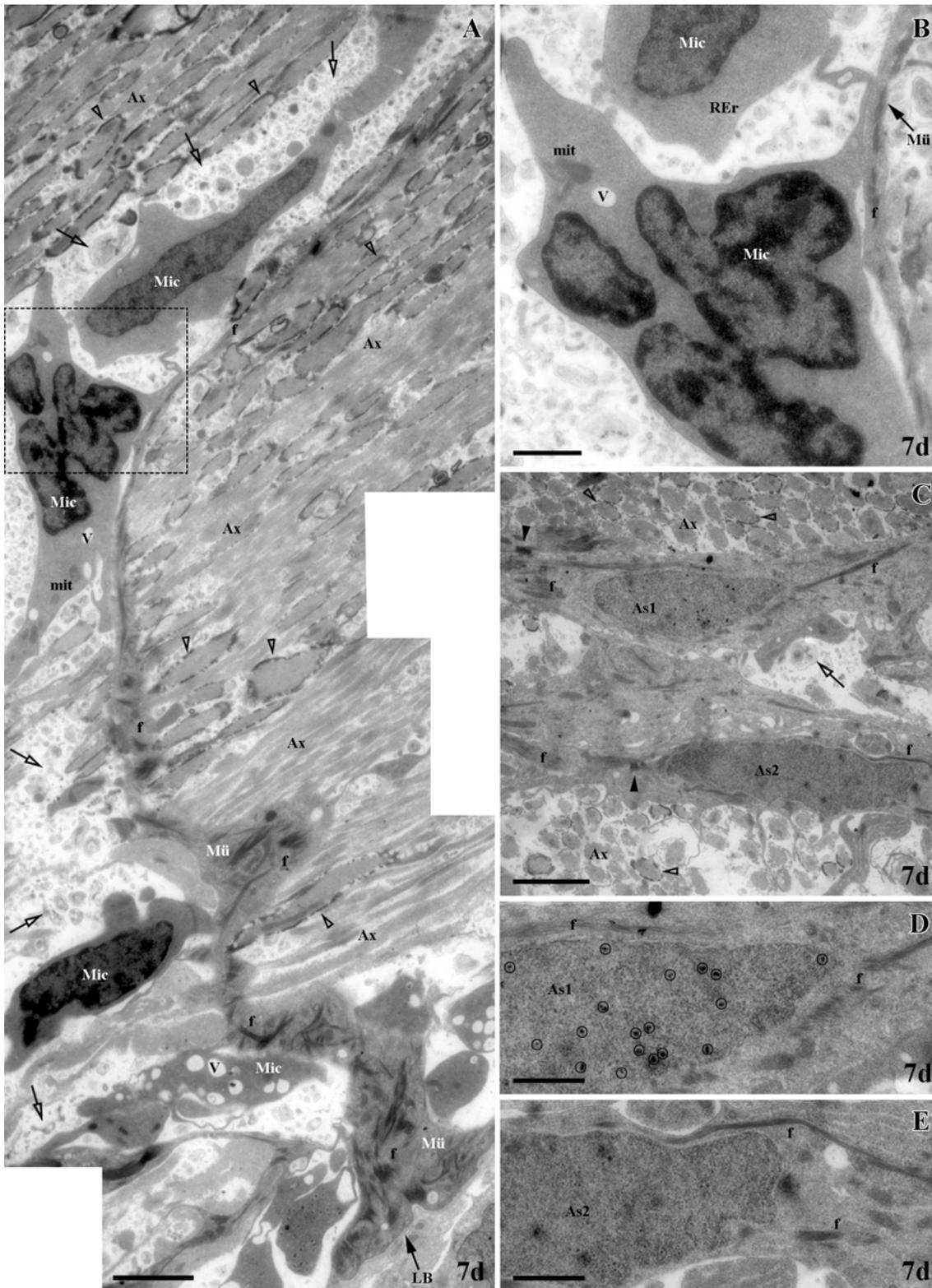


Figura 76: Microscopía electrónica de la zona IO1 a los 7d postpinzamiento. El marcaje con oro coloidal está rodeado por círculos. **A:** Astrocitos Pax2⁺ de la limitante glial de núcleo denso a los electrones (As1) y de núcleo claro a los electrones (As2). **B:** Astrocito Pax2⁺ de la limitante glial fagocítico con gránulos de pigmento (P) en su citoplasma. **C:** Numerosos astrocitos Pax2⁺ de la limitante glial y células del tejido conjuntivo en la que se señala su núcleo (N) situadas en el tejido nervioso. Recuadro ampliado en D. **D:** Astrocito Pax2⁺ fagocítico de la limitante glial con gránulos de pigmento (P) en su citoplasma y células del tejido conjuntivo en las que se señala su núcleo (N) situadas en el tejido nervioso. **E:** Célula de la limitante glial con núcleo heterocromático (N). **F:** Célula de la limitante glial que muestra signos de degeneración. Astrocitos (As), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), gránulos de pigmento (P), indentaciones (In), lámina basal (LB), mitocondria (mit), núcleo (N), nucleolo (Nuc), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A-B, D-F: 1000 nm , C: 2500 nm.

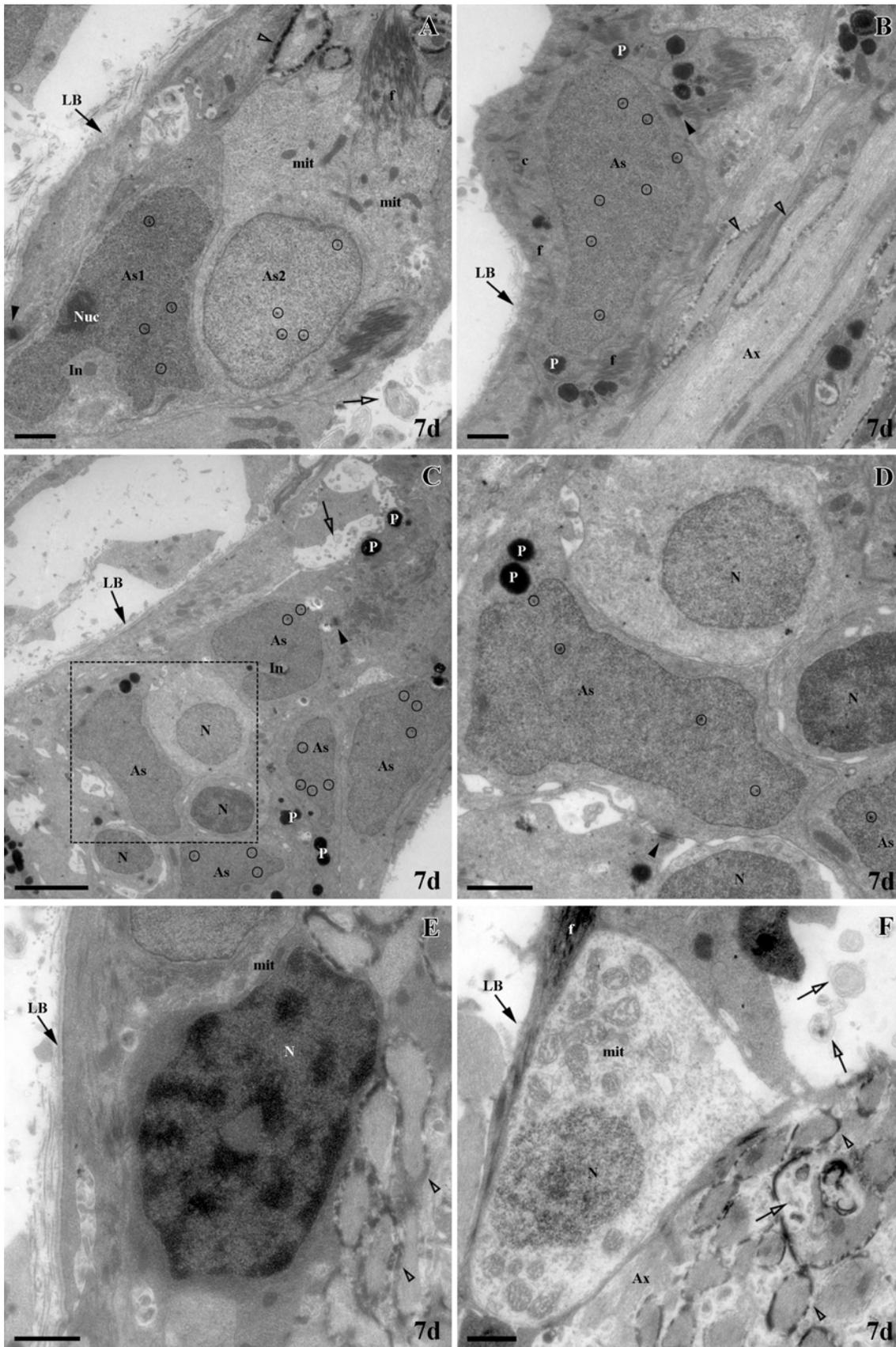
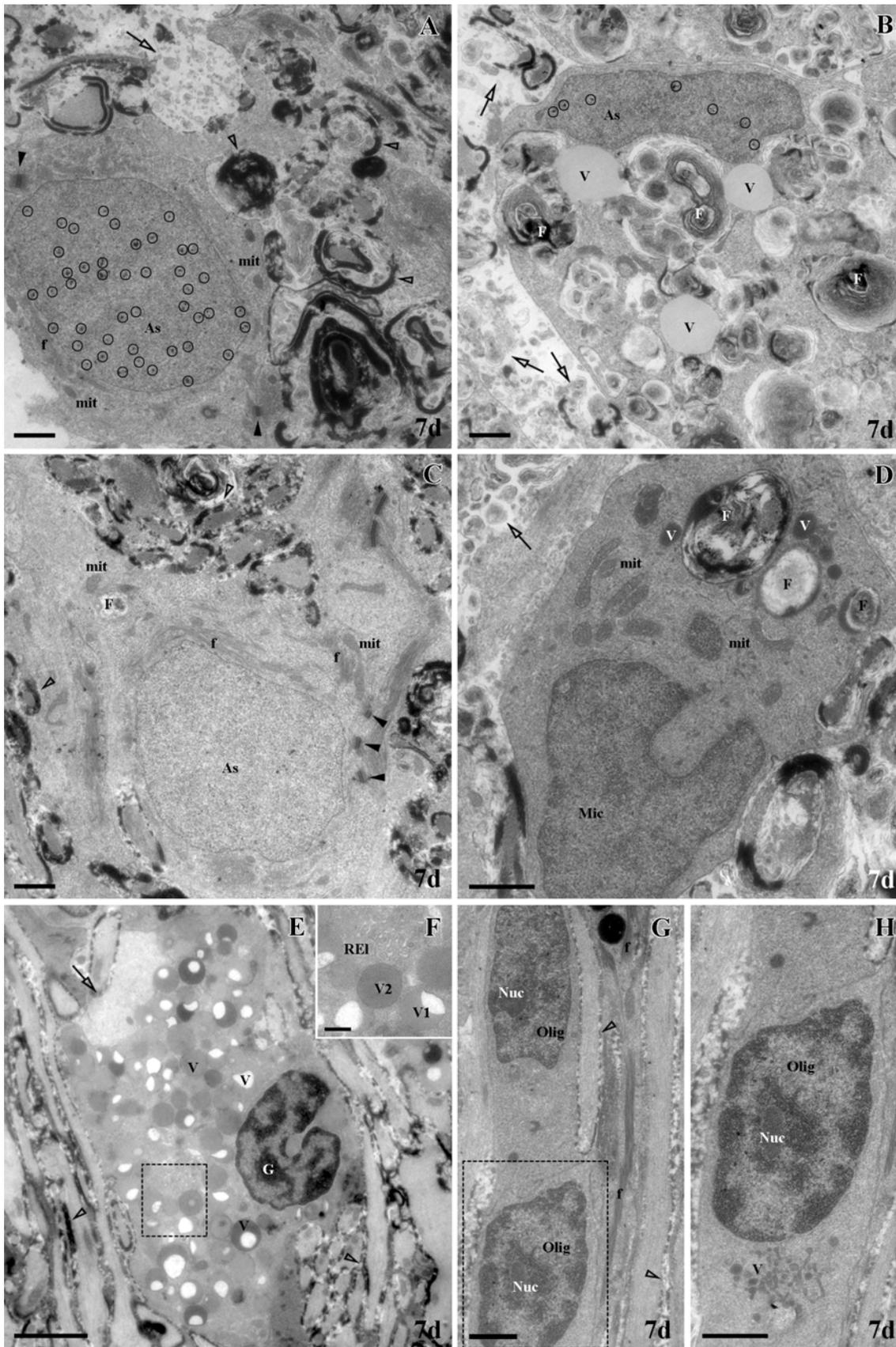


Figura 77: Microscopía electrónica de la zona posterior de la CNO a los 7d postpinzamiento. Marcaje con oro coloidal está rodeado con círculos. **A:** Astrocito Pax2⁺ entre zonas en degeneración (flechas huecas). **B:** Astrocito Pax2⁺ fagocítico con vesículas (V) y fagosomas (F) en su citoplasma. **C:** Astrocito Pax2⁻ fagocítico con fagosomas (F) en su citoplasma. **D:** Célula de microglía (Mic) reactiva. **E:** Granulocito (G) entre axones. **F:** detalle de vesículas claras (V1) y oscuras (V2) a los electrones. **G:** Detalle de oligodendrocitos (Ol) entre los axones. Recuadro ampliado en H. **H:** Detalle de oligodendrocito (Ol) con pequeñas vesículas en su citoplasma (V). Astrocitos (As), filamentos intermedios (f), fagosomas (F), granulocito (G), microglía (Mic), mitocondria (mit), nucleolo (Nuc), oligodendrocitos (Olig), retículo endoplasmático liso (REl), vesículas (V), mielina (cabezas de flecha huecas), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A-D, G-H: 1000 nm; E: 2500 nm; F: 500 nm.



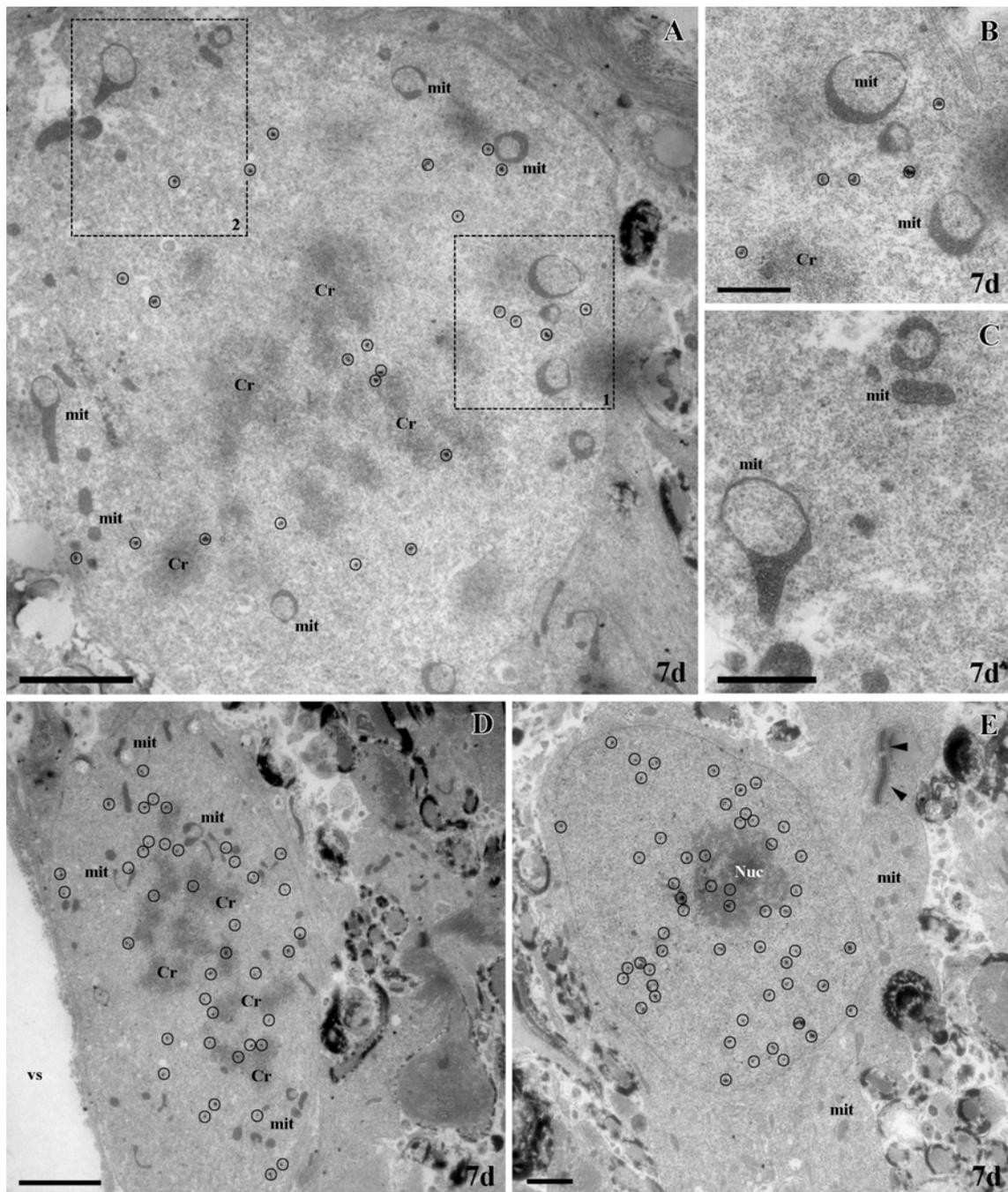


Figura 78: Microscopía electrónica de células en distintos estadios de madurez Pax2⁺ en la CNO a los 7d postpinzamiento. El marcaje con oro coloidal está rodeado con círculos. **A:** Célula Pax2⁺ en división entre los axones. Recuadros 1 y 2 ampliados en B y C respectivamente. **B-C:** Detalle de mitocondrias con forma de media luna, lupa y ovaladas (mit). **D:** Célula Pax2⁺ en división junto a vaso sanguíneo (vs). **E:** Astrocito inmaduro Pax2⁺ entre los axones. Cromosomas (Cr), mitocondrias (mit), nucleolo (Nuc), vaso sanguíneo (vs), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A, D: 2500 nm, B-C, E: 1000 nm.

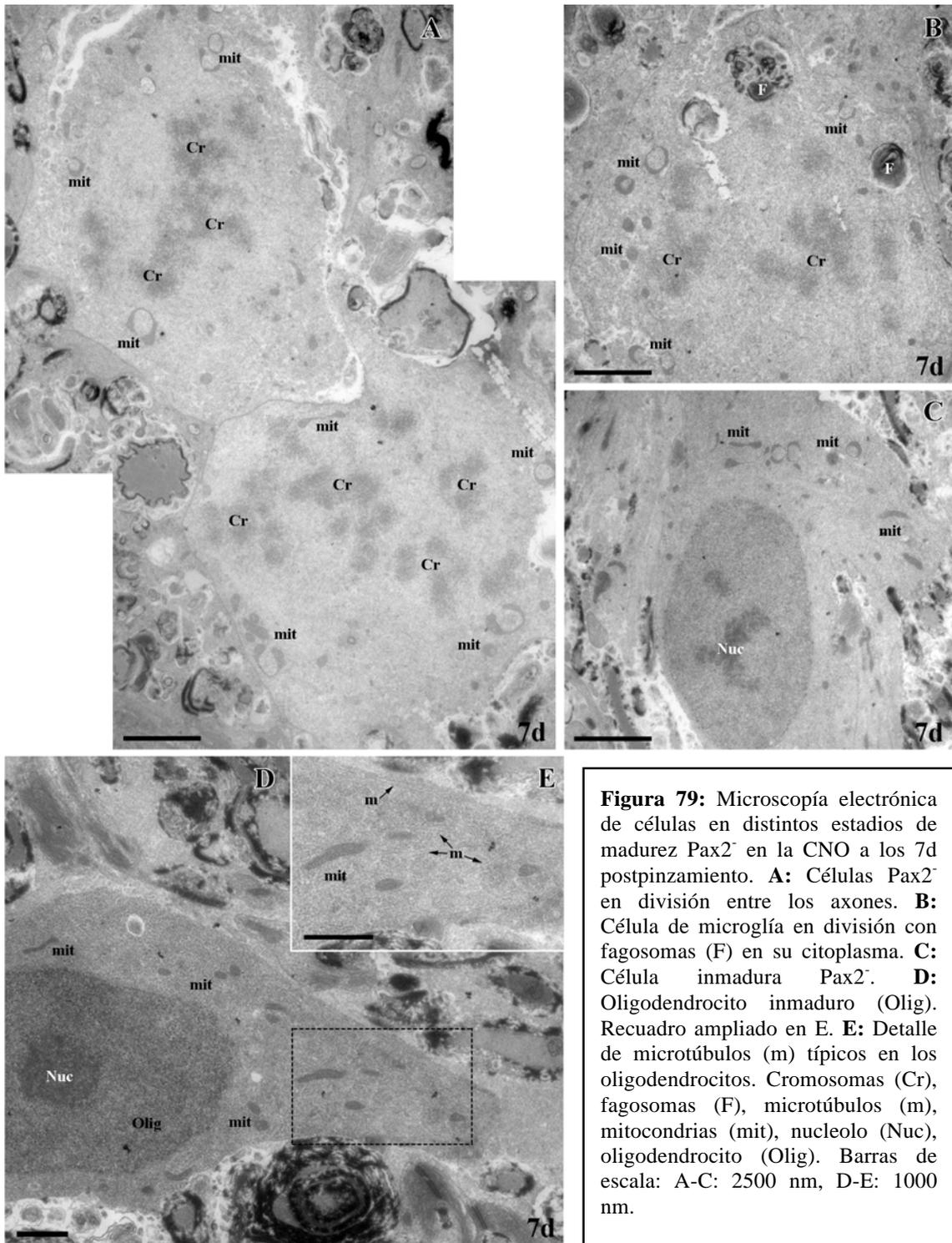
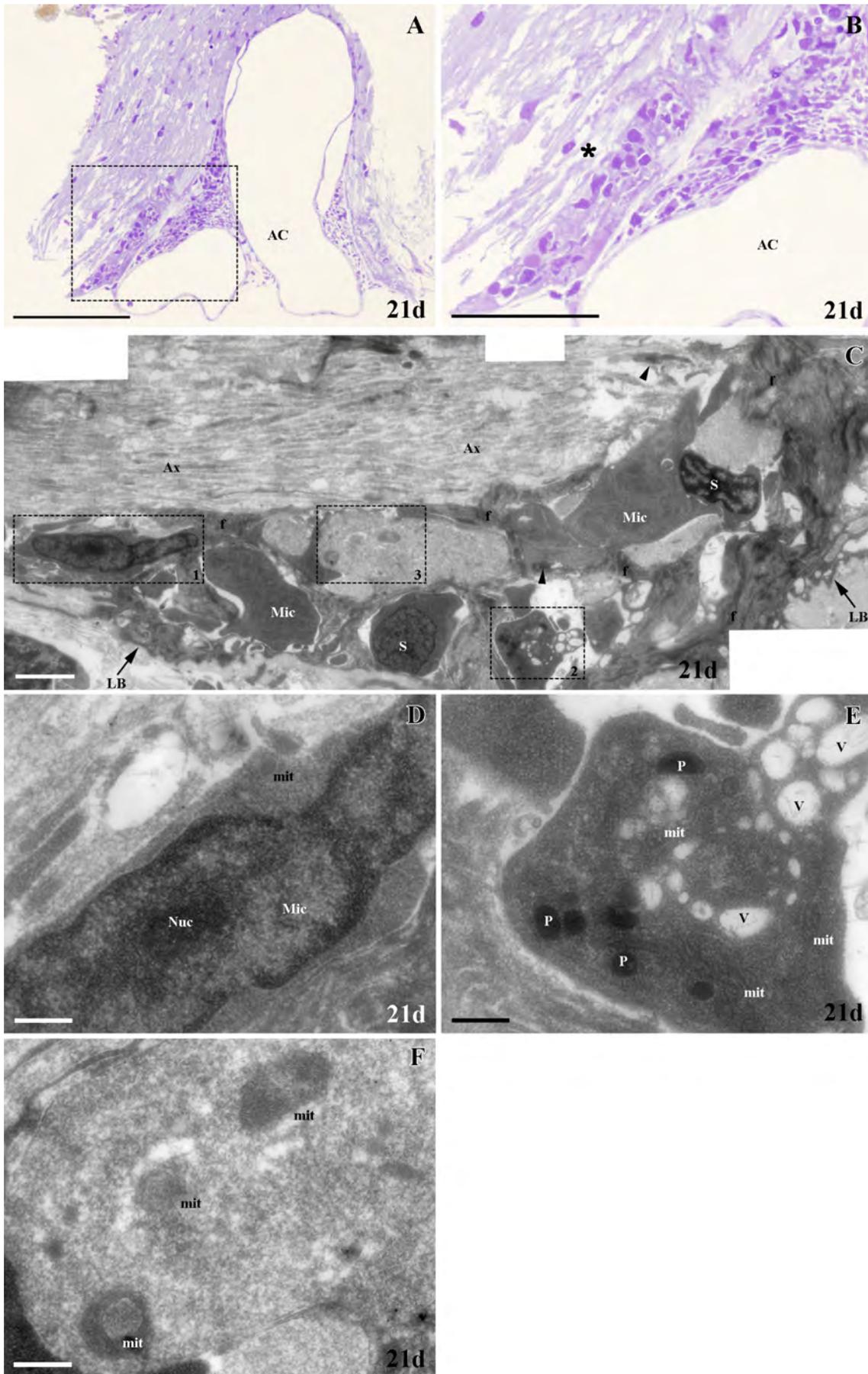


Figura 79: Microscopía electrónica de células en distintos estadios de madurez Pax2⁺ en la CNO a los 7d postpinzamiento. **A:** Células Pax2⁺ en división entre los axones. **B:** Célula de microglía en división con fagosomas (F) en su citoplasma. **C:** Célula inmadura Pax2⁺. **D:** Oligodendrocito inmaduro (Olig). Recuadro ampliado en E. **E:** Detalle de microtúbulos (m) típicos en los oligodendrocitos. Cromosomas (Cr), fagosomas (F), microtúbulos (m), mitocondrias (mit), nucleolo (Nuc), oligodendrocito (Olig). Barras de escala: A-C: 2500 nm, D-E: 1000 nm.

Figura 80: Microscopía óptica y electrónica del DO a 21d postpinzamiento. **A:** Micrografía de una sección semifina longitudinal a la CNO. Recuadro ampliado en la imagen B. **B:** Detalle mostrando un grupo de células junto a la AC. El asterisco indica una zona aproximada analizada en C. **C:** Numerosas células sanguíneas extravasadas (S) y microglía (Mic) entre axones amielínicos (Ax). Recuadros 1-3 ampliadas en D-F respectivamente. **D-E:** Detalles de células de microglía (Mic). **F:** Detalle del citoplasma de una célula inmadura con mitocondrias con forma de media luna (mit). Arteria central (AC), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), lámina basal (LB), microglía (Mic), mitocondria (mit), nucleolo (Nuc), gránulos de pigmento (P), retículo endoplasmático rugoso (REr), células sanguíneas (S), vesículas (V), degeneración (flechas huecas), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A: 100 μm ; B: 50 μm ; C: 2500 nm; D-F: 1000nm.



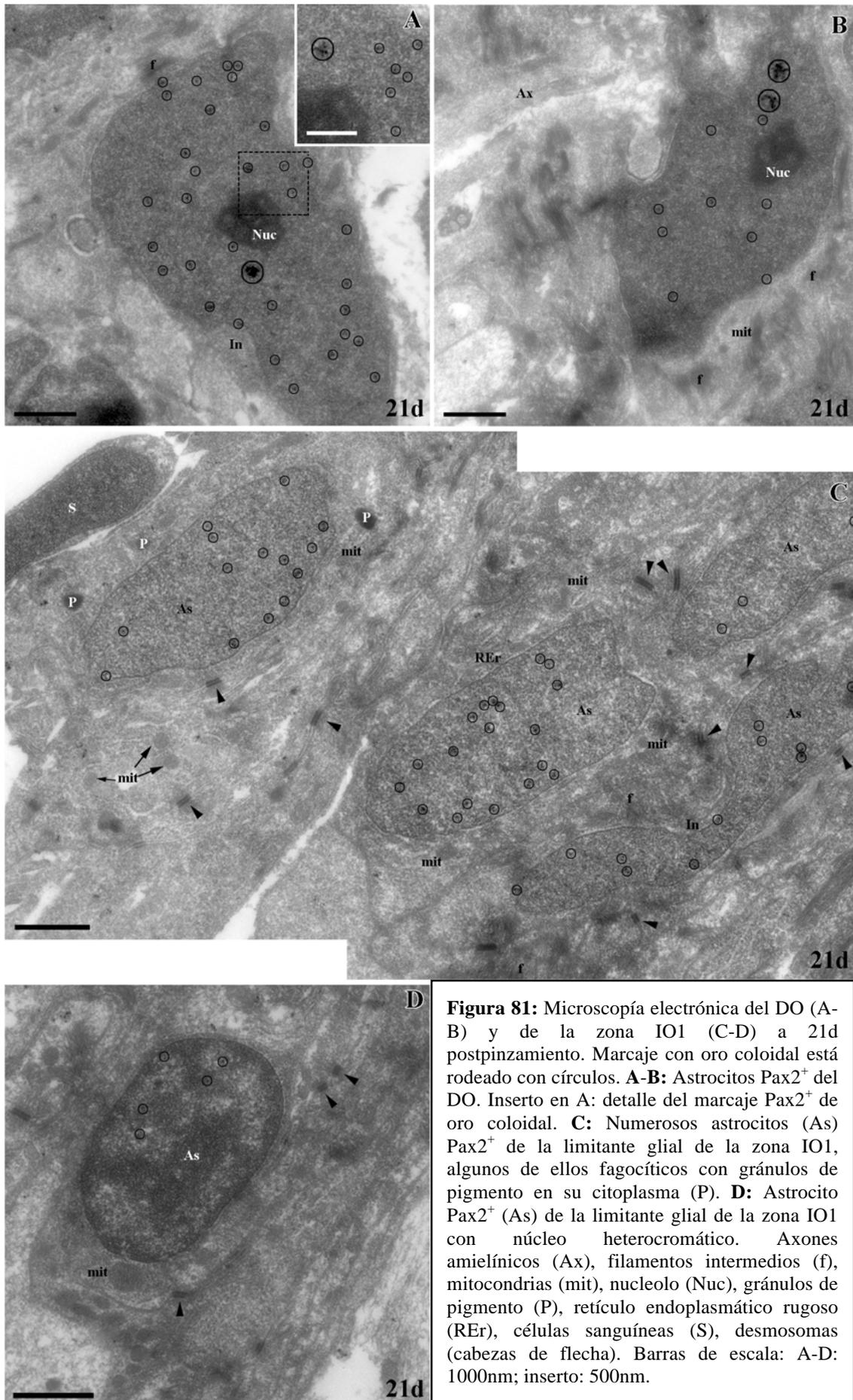


Figura 81: Microscopía electrónica del DO (A-B) y de la zona IO1 (C-D) a 21d postpinzamiento. Marcaje con oro coloidal está rodeado con círculos. **A-B:** Astrocitos Pax2⁺ del DO. Inserto en A: detalle del marcaje Pax2⁺ de oro coloidal. **C:** Numerosos astrocitos (As) Pax2⁺ de la limitante glial de la zona IO1, algunos de ellos fagocíticos con gránulos de pigmento en su citoplasma (P). **D:** Astrocito Pax2⁺ (As) de la limitante glial de la zona IO1 con núcleo heterocromático. Axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), mitocondrias (mit), nucleolo (Nuc), gránulos de pigmento (P), retículo endoplasmático rugoso (REr), células sanguíneas (S), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A-D: 1000nm; inserto: 500nm.

Figura 82: Microscopía electrónica de la zona IO2 a 21d postpinzamiento. Marcaje con oro coloidal está rodeado con círculos. **A:** Astrocito Pax2⁻ de la limitante de la AC y células sin características típicas de astrocito, oligodendrocito o microglía en las que se señala el núcleo (N). Recuadro ampliado en B. **B:** Detalle del núcleo (N) y citoplasma de un astrocito Pax2⁻ de la limitante glial. **C:** Astrocito Pax2⁺ de la limitante de la AC. **D:** Astrocito Pax2⁻ (As) de núcleo heterocromático entre los axones. **E:** Pequeña zona en degeneración (flecha hueca). **F:** Célula Pax2⁻ sin características típicas de astrocito, oligodendrocito o microglía entre los axones. Arteria central (AC), astrocitos (As), axones amielínicos (Ax), filamentos intermedios (f), indentaciones (In), lámina basal (LB), núcleo (N), nucleolo (Nuc), retículo endoplasmático rugoso (REr), desmosomas (cabezas de flecha). Barras de escala: A, D, F: 1000nm; B, E: 500nm.

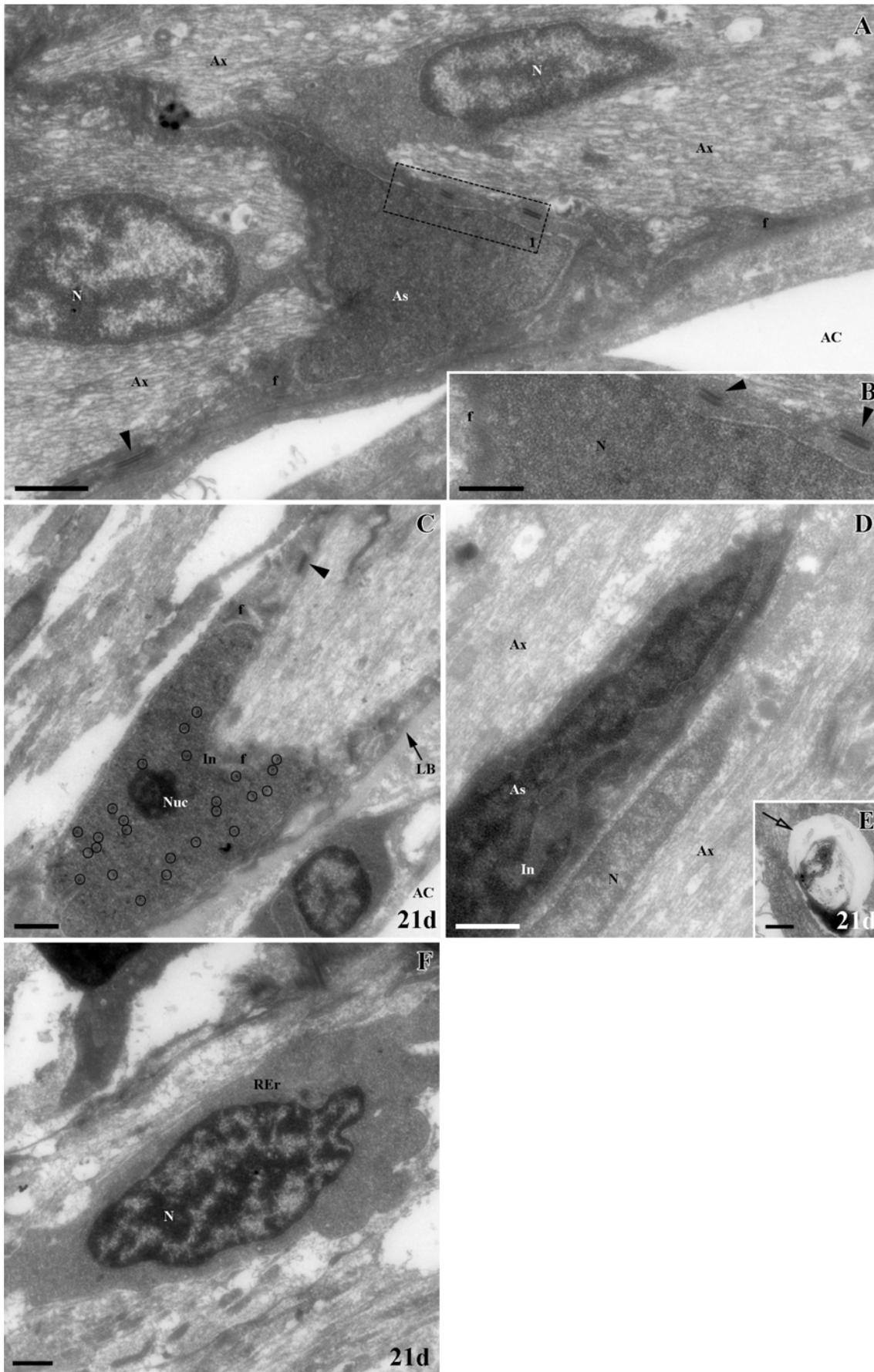


Figura 83: Esquemas de la regeneración de la CNO tras criolesión (**B-C**) y pinzamiento (**D-E**), comparados con control (**A**). Esquema de la regeneración de la ZPG (**G-H**) comparada con control (**F**).

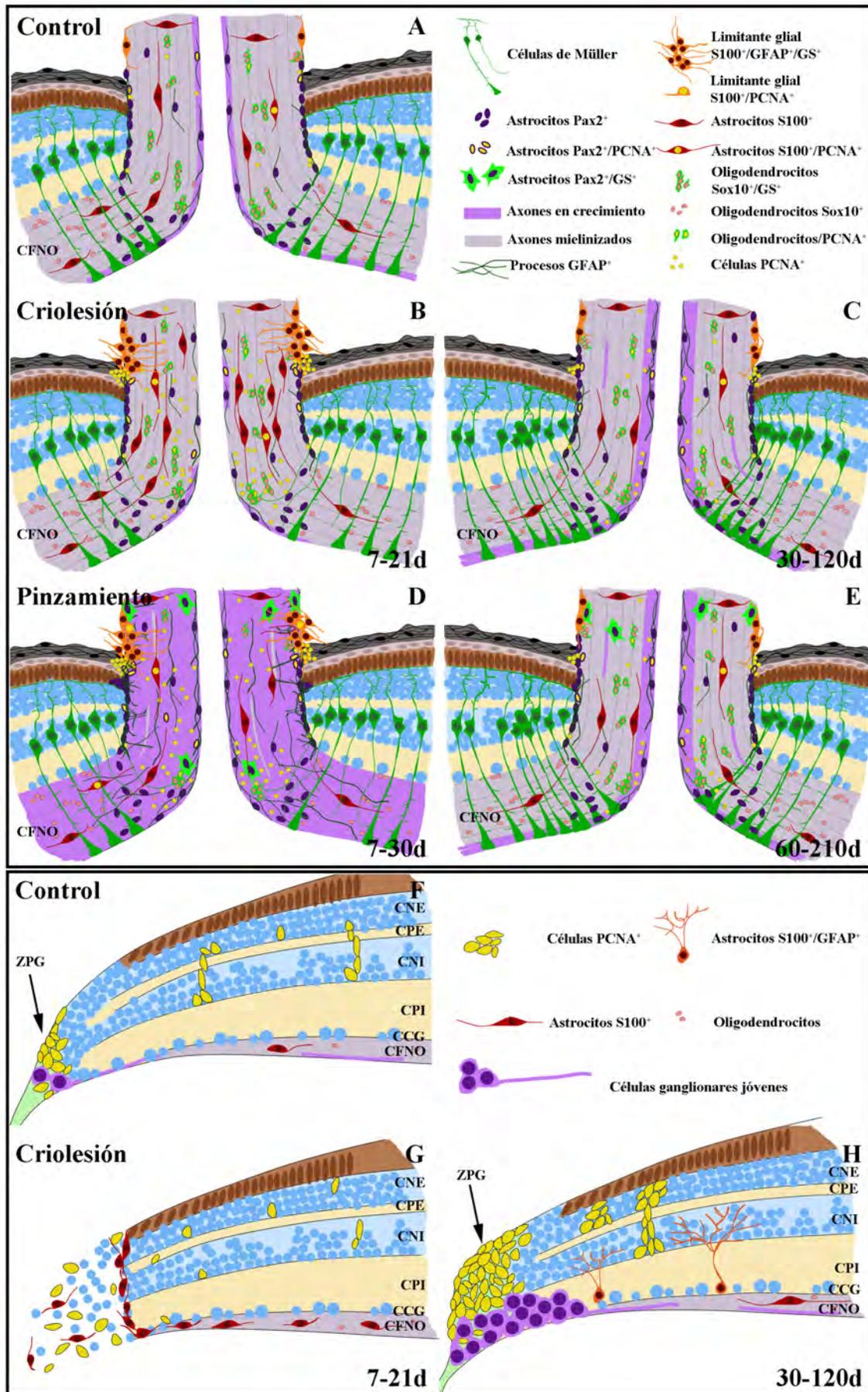


Figura 84: Expresión génica de *pax2a* y *shh*. **A:** Esquema modificado de la base de datos *Ensembl* mostrando la localización del gen *pax2a* en el cromosoma 13 de pez cebra y los dos transcritos *pax2a_t1* y *pax2a_t2* con la posición de sus exones. Los *Contigs* hacen referencia a los fragmentos de DNA empleados para su clonación. **B:** PCR mostrando las variantes transcritas *pax2a_t1* y *pax2a_t2* de carpín y pez cebra con sus tamaños en pares de bases (pb). MPM hace referencia al marcador de pesos moleculares. **C:** Árbol filogenético de Pax2, Pax5 y Pax8. *Carassius auratus* (ca, flechas), *Danio rerio* (dr), *Oryzias latipes* (ol), *Xenopus laevis* (xl), *Homo sapiens* (hs), *Mus musculus* (mm), *Rattus norvegicus* (rn), *Gallus gallus* (gg) y *Drosophila melanogaster* (dm). **D:** Expresión génica de *pax2a_t2* y *shh* de carpín en retina y CNO. En el control negativo (C-) no existe amplificación y el control de carga, la β -actina, es similar en ambas regiones. **E:** Expresión génica de *shh* de carpín en la retina completa, retina madura y ZPG. En el control negativo (C-) no existe amplificación y el control de carga, la β -actina, es similar en todas las regiones.

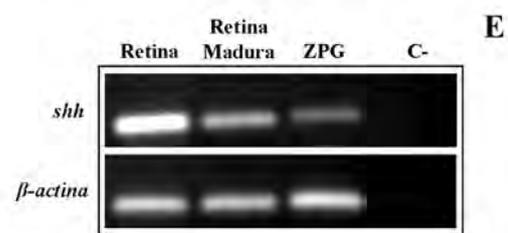
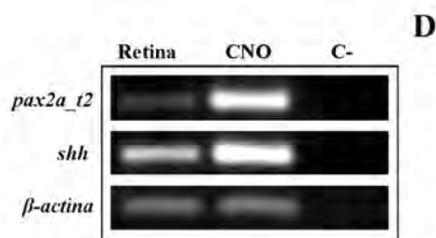
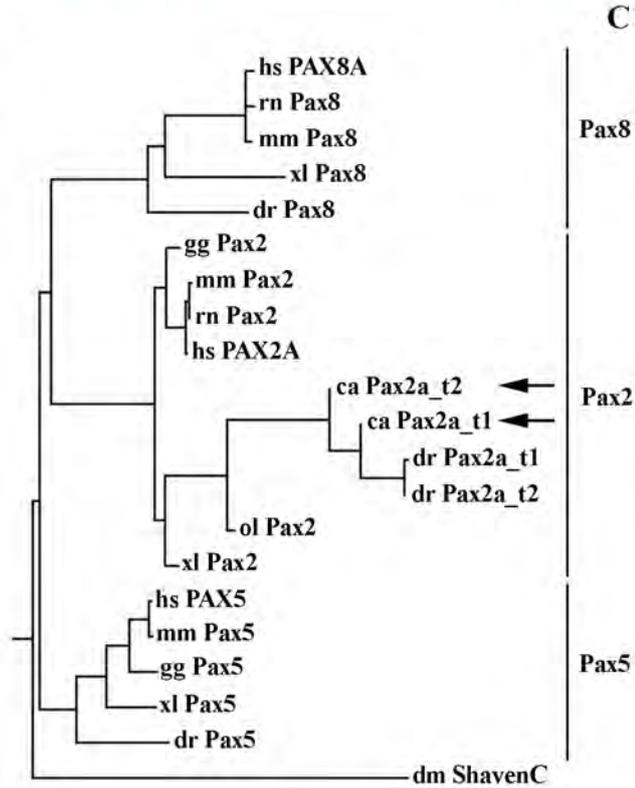
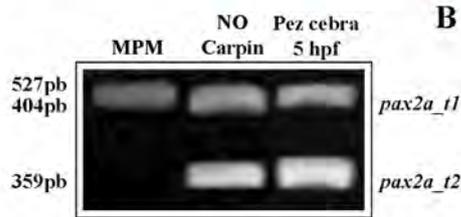
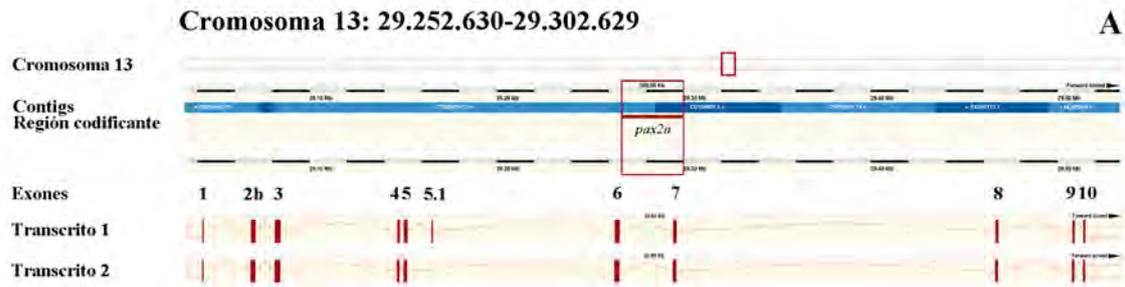


Figura 85: Comparación de la secuencia génica parcial de *pax2a* de carpín con pez cebra. **C, D:** Alineamiento de la secuencia génica de *pax2a_tv2* y *pax2a_tv1* de pez cebra (dr) frente a carpín (ca). Los cebadores subrayados, el cambio de tono de la secuencia indica los distintos exones, en rojo se señala la diferencia de bases entre las dos especies, el asterisco muestra la similitud de bases, el exón 5.1 del transcrito *pax2a_t1* en gris. **E, F:** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de Pax2a_tv2 y Pax2a_tv1 de pez cebra (dr) frente a carpín (ca). El cambio de tono de la secuencia indica los distintos exones, en rojo se señala la diferencia de aminoácidos entre las dos especies, el asterisco muestra la similitud de aminoácidos, la secuencia aminoacídica correspondiente al exón 5.1 de Pax2a_t1 en gris.

B
pax2a_t1

pax2a_t1 dr TCATATAACAGGATTAATTCGAACCAAGTTCAGCAGGCTTCCACCCATCTCCGACGGC 960
 pax2a_t1 ca -----GCAGCCTTTCGACCCCTCCGACGGC 28

pax2a_t1 dr ACAGGACACCTCTTTCCACAGCGGACACACTATATAGTCCCGCAGCAGCCTCCCACT 1020
 pax2a_t1 ca ACAGGACACCTCTCTCCACAGCGGACACACTATATAGTCCCGCAGCAGCCTCCCACT 88

pax2a_t1 dr GTGTCAAGCGCTTCCCAATGACCCCGTGGGTCCTACTCTATTAATGGCATCTTAGAATC 1080
 pax2a_t1 ca GTGTCAAGCGCTTCCCAATGACCCCGTGGGTCCTACTCTATTAATGGCATCTTAGAATC 148

pax2a_t1 dr CCTCGCTCCAAACCGGAAAGAAACGTCGATGATCTCTCTGGAGTGGCAACCACTTG 1140
 pax2a_t1 ca CCTCGCTCCAAACCGGAAAGAAACGCGATGATCTCTCTGGAGTGGCAACCACTTG 208

pax2a_t1 dr GATGGAGGAAATAGGATATATGGTTTCAGATGGCTCTGGCCCTAACAGTGTTCAG 1200
 pax2a_t1 ca GATGGAGGAAATAGGATATATGGTTTCAGATGGCTCTGGCCCTAACAGTGTTCAG 268

pax2a_t1 dr GSTAGTGTGGAGATTTACGGAAGCACTGAGGCTGATCCCTCACTCAAGCAGCTG 1260
 pax2a_t1 ca GSTAGTGTGGAGATTTACGGAAGCACTGAGGCTGATCCCTCACTCAAGCAGCTG 328

pax2a_t1 dr GAGCCTCTGGATCGGCTGTTGGGGCCCTCATACCCGAGCTTTCCTCCAGTCAAGA 1320
 pax2a_t1 ca GAGCCTCTGGATCGGCTGTTGGGGCCCTCATACCCGAGCTTTCCTCCAGTCAAGA 388

pax2a_t1 dr CACATCAAGCCAGACAGCCAGCTAATGAGTACTCGCTACCAGCAGCAGCTGACTGGAC 1380
 pax2a_t1 ca CACATCAAGCCAGACAGC----- 404

D
Pax2_t1

Pax2a_t1 dr GVCNDTVPSVSSINRIIRTKVQPFHPSSDGTGTPLS TAGHTIVPSTASPFVSSASNDP 180
 Pax2a_t1 ca -----OPFHPSSDGTGTPLT TAGHTIVPSTASPFVSSASNDP 37

Pax2a_t1 dr VGSYSINGILGIPRNGEKRRKDDVLSGNHLDGRKIGYVSDSGSPNSDQGSVESLRK 240
 Pax2a_t1 ca VGSYSINGILGIPRNGEKRRKDDVLSGNHLDGRKIGYVSDSGSPNSDQGSVESLRK 97

Pax2a_t1 dr HLRADAFQOQLEALDRVFERPSYDFVPTSEHIKPEQANEYSLPALNPLGLDEVKPSLST 300
 Pax2a_t1 ca HLRADAFQOQLEALDRVFERPSYDFVPTSEHIKPE----- 134

A
pax2a_t2

pax2a_t2 dr TCATATAACAGGATTAATTCGAACCAAGTTCAGCAGGCTTCCACCCATCTCCGACGGC 960
 pax2a_t2 ca -----GCAGCCTTTCGACCCCTCCGACGGC 28

pax2a_t2 dr ACAGGACACCTCTTTCCACAGCGGACACACTATATAGTCCCGCAGCAGCCTCCCACT 1020
 pax2a_t2 ca ACAGGACACCTCTCTCCACAGCGGACACACTATATAGTCCCGCAGCAGCCTCCCACT 88

pax2a_t2 dr GTGTCAAGCGCTTCCCAATGACCCCGTGGGTCCTACTCTATTAATGGCATCTTAGAATC 1080
 pax2a_t2 ca GTGTCAAGCGCTTCCCAATGACCCCGTGGGTCCTACTCTATTAATGGCATCTTAGAATC 148

pax2a_t2 dr CCTCGCTCCAAACCGGAAAGAAACGTCGATGATCTCTCTGGAGTGGCAACCACTTG 1140
 pax2a_t2 ca CCTCGCTCCAAACCGGAAAGAAACGCGATGATCTCTCTGGAGTGGCAACCACTTG 208

pax2a_t2 dr AACAGTGTATTCAGGCTAGTGTGGAGATTTACGGAAGCACTGAGGCTGATCCCTC 1200
 pax2a_t2 ca AACAGTGTATTCAGGCTAGTGTGGAGATTTACGGAAGCACTGAGGCTGATCCCTC 268

pax2a_t2 dr ACTCAACAGCAGCTGAGGCTTGGATCGGGTGTGGAGGCTGATCCCTCACTCAAGCAGCTG 1260
 pax2a_t2 ca ACTCAACAGCAGCTGAGGCTTGGATCGGGTGTGGAGGCTGATCCCTCACTCAAGCAGCTG 328

pax2a_t2 dr TTCCCTACGTCAGACACACTCAAGCCAGAC----- 1320
 pax2a_t2 ca TTCCCTACGTCAGACACACTCAAGCCAGAC----- 359

C
Pax2_t2

Pax2a_t2 dr GVCNDTVPSVSSINRIIRTKVQPFHPSSDGTGTPLS TAGHTIVPSTASPFVSSASNDP 180
 Pax2a_t2 ca -----OPFHPSSDGTGTPLT TAGHTIVPSTASPFVSSASNDP 37

Pax2a_t2 dr VGSYSINGILGIPRNGEKRRKDDVLSGNHLDGRKIGYVSDSGSPNSDQGSVESLRK 240
 Pax2a_t2 ca VGSYSINGILGIPRNGEKRRKDDVLSGNHLDGRKIGYVSDSGSPNSDQGSVESLRK 97

Pax2a_t2 dr DRVFERPSYDFVPTSEHIKPEQANEYSLPALNPLGLDEVKPSLSTVSSDLGSSVQSYP 300
 Pax2a_t2 ca DRVFERPSYDFVPTSEHIKPE----- 119

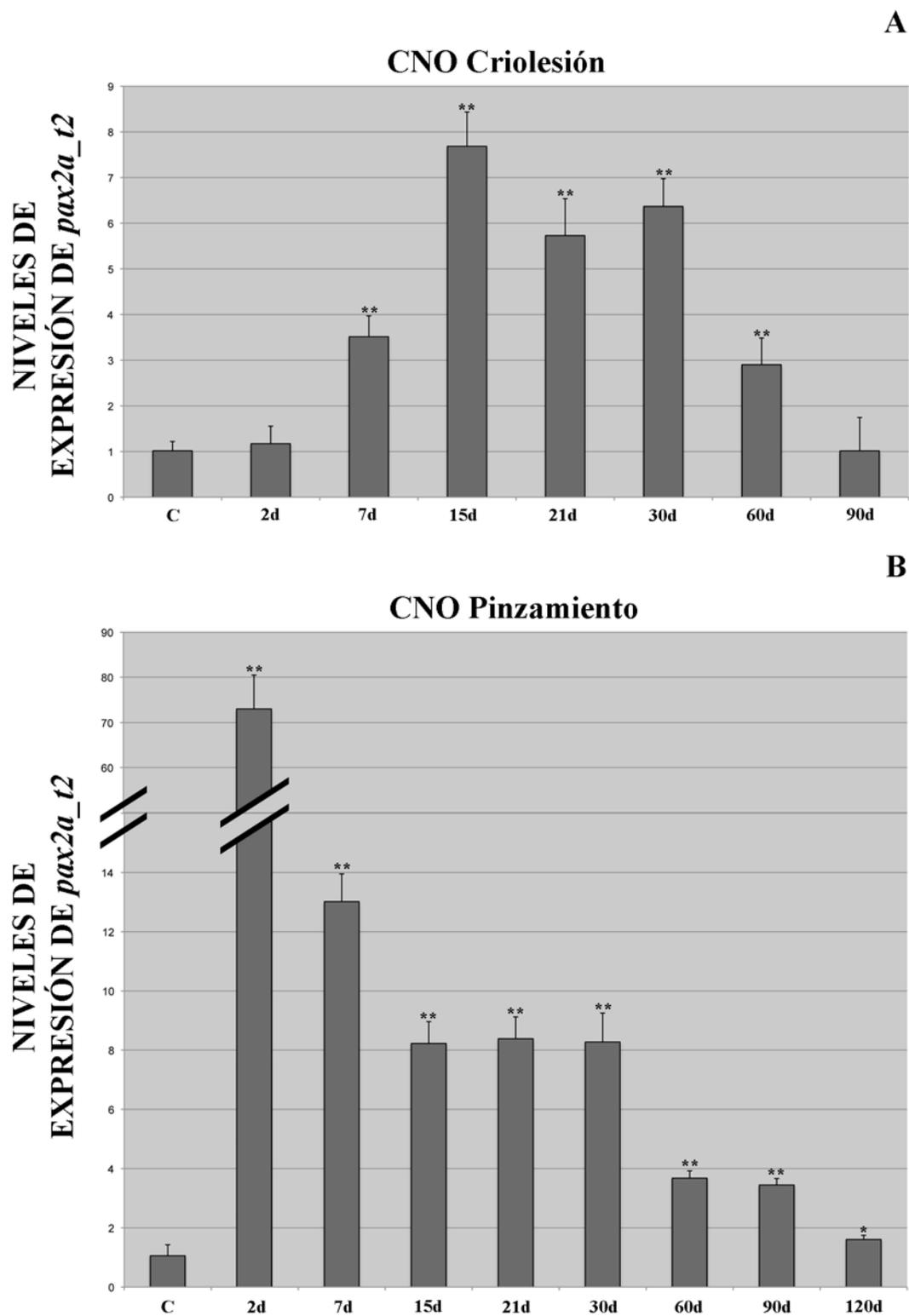


Figura 86: Análisis del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO de carpín durante la regeneración postcriolesión (A) y postpinzamiento (B). * $0,05 > p > 0,01$: diferencias significativas; ** $p < 0,01$: diferencias altamente significativas.

Discusión

Durante los últimos años, la CNO viene siendo una región de estudio del NO de gran interés. Por un lado, presenta una organización glial muy particular y, a su vez, diferente entre los distintos grupos de vertebrados (Casañas, 2005; Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2001; Lillo *et al.*, 2002; Morcos y Chan-Ling, 2000; Parrilla *et al.*, 2009; Quesada *et al.*, 2004; Schuck *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996). Por otro lado, cumple un papel fundamental durante el desarrollo embrionario (Adams *et al.*, 1996; Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001; de la Torre *et al.*, 1997; Deiner *et al.*, 1997; Lauderdale *et al.*, 1997; Macdonald *et al.*, 1997; Morcillo *et al.*, 2006; Oster *et al.*, 2004; Raper, 2000; Strahle *et al.*, 1997; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Torres *et al.*, 1996) y en los procesos de crecimiento continuado en los animales que lo experimentan durante la vida adulta. (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1984; Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009; Stuermer y Bastmeyer, 2000). Sin embargo, hay pocos estudios que analicen la CNO en procesos de regeneración (Sherpa *et al.*, 2008; Stuermer y Bastmeyer, 2000). En este trabajo de tesis doctoral, hemos empleado el carpín dorado (*Carassius auratus*) como animal de experimentación, dado que es un excelente modelo de crecimiento continuado y regeneración ampliamente utilizado en la bibliografía (Ankerhold y Stuermer, 1999; Bastmeyer *et al.*, 1989; Colavincenzo y Levine, 2000; Easter *et al.*, 1984; Hitchcock *et al.*, 2004; Matsukawa *et al.*, 2004a; Nona, 1998; Parrilla *et al.*, 2009; Raymond *et al.*, 1988; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Wolburg, 1981). Nosotros, presentamos por primera vez un análisis detallado de la organización glial de la CNO de este teleosteo, y la comparamos con la organización del SIO en animales control. Además, estudiamos la reacción de la glía de la CNO y su implicación durante la regeneración tras dos tipos diferentes de lesión: criolesión de la ZPG y pinzamiento del NO.

El factor de transcripción Pax2 juega un papel fundamental en la formación del NO durante el desarrollo embrionario (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001; Goode y Elgar, 2009; Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996; Macdonald *et al.*, 1997; Mi y Barres, 1999; Otteson *et al.*, 1998; Sanyanusin *et al.*, 1995; Soukkarieh *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 1996). Estudios recientes confirman que la proteína Pax2 se expresa en la retina y/o CNO de animales adultos representantes de distintos grupos de vertebrados, donde se discute su posible papel en el mantenimiento de la identidad astrocitaria de las células que lo expresan (Chu *et al.*, 2001; Kozulin *et al.*, 2009; Parrilla *et al.*, 2009; Stanke *et al.*, 2010). En este trabajo, caracterizamos por primera

vez en el carpín dorado la subpoblación de células Pax2⁺, localizadas en la CNO y el SIO, y analizamos su función en la CNO durante la regeneración axonal (tras pinzamiento y criolesión). También hemos secuenciado parcialmente el transcrito *pax2a* en carpín dorado, y hemos cuantificado las modificaciones en su nivel de expresión génica en la CNO a lo largo de todo el proceso regenerativo subsiguiente pinzamiento o la criolesión.

1. EL NO CONTROL: COMPARACIÓN ENTRE LA CNO Y EL SIO

1.1 PAX2 EN EL NO

SECUENCIA DE PAX2

El gen *pax2a* de pez cebra, como se describe en los resultados (Fig. 84A), se encuentra en el cromosoma 13 y contiene 12 exones, 10 de ellos similares a los descritos en otras especies y 2 especie-específicos de pez cebra (exones 5.1 y 7.1) (Lun y Brand, 1998). La secuencia parcial de *pax2a* de carpín que hemos secuenciado en este trabajo, traduce el fragmento que codifica el dominio responsable de unión con otras proteínas denominado octapéptido (Lun y Brand, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998; Wehr y Gruss, 1996), característico de los miembros de la subfamilia de genes *pax2/5/8* (Balczarek *et al.*, 1997; Goode y Elgar, 2009), y comprende en su secuencia genómica desde el exón 4 hasta el exón 6 del locus *pax2a* del pez cebra (Fig. 84A). Como mencionamos, esta secuencia parcial de *pax2a* en carpín se encuentra altamente conservada con respecto al pez cebra, pero con algunas diferencias. Estas diferencias radican en el cambio de 5 pares de bases en su secuencia, que se traducen en una única modificación en la secuencia aminoacídica (Figs. 85A-B), el cambio de un aminoácido serina (Ser) en el pez cebra por un aminoácido treonina (Thr) en el carpín. Estos aminoácidos al pertenecer ambos al grupo de los aminoácidos hidrófilos, teóricamente no supondrían ninguna modificación en la estructura tridimensional de la proteína (Figs. 85C-D). Dada la gran similitud entre ambas secuencias aminoacídicas, deducimos que son homólogas y, del mismo modo, los genes *pax2a* de carpín y pez cebra son ortólogos.

Dentro de la secuencia parcial de *pax2a* de carpín hemos detectado en su correspondiente secuencia genómica el exón 5.1 homólogo al de pez cebra (Fig. 85B). Como se indicó anteriormente, los exones 5.1 y 7.1 se han clasificado como especie-específicos de *pax2a* de pez cebra y diferentes a otras secuencias de *pax2/5/8* (Lun y Brand, 1998). Sin embargo, al estar conservada en la secuencia génica de *pax2a* de carpín, al menos el exón 5.1, se puede tratar de un exón específico de teleósteos y/o ciprínidos y no de la especie como tal. Estos dos exones específicos junto con los 10 típicos de *pax2a* en pez cebra originan hasta 12 variantes transcritas diferentes descritas, aunque los transcritos mayoritarios son *pax2a_t1* y *pax2a_t2* que contienen o carecen del exón 5.1, respectivamente (Lun y Brand, 1998). En el NO de carpín, hemos amplificado dos fragmentos de *pax2a* caracterizados por la presencia o ausencia del exón 5.1 y, debido a su alta homología con los del pez cebra, los hemos denominado *pax2a_t1* y *pax2a_t2* respectivamente (Figs. 85A-B). Sin embargo, si en carpín se encontrasen conservadas las 12 isoformas de *pax2a* de pez cebra, la secuencia parcial de *pax2a_t2* podría corresponder a los transcritos 2, 5, 9, 10 y 12 y, la secuencia parcial de *pax2a_t1* podría pertenecer a los transcritos 1, 3, 4, 7, 8, 11 (Lun y Brand, 1998). Sin embargo, ninguno de ellos correspondería al transcrito 6 de *pax2a* de pez cebra, dado que éste carece del exón 6 (Lun y Brand, 1998).

Cuando comparamos la secuencias aminoacídicas predichas de carpín Pax2a_t1 y Pax2a_t2 con la proteína Pax2 de distintas especies representantes de cada grupo de vertebrados observamos que son homólogas, y al analizar su localización en el correspondiente árbol filogenético, están incluidas en la rama de las proteínas Pax2 de teleósteos (Fig. 84C). De esta manera, demostramos que Pax2a de carpín es ortólogo al Pax2 del resto de vertebrados. Además, al incluir en el árbol filogenético secuencias proteicas de Pax5/8 (Balczarek *et al.*, 1997; Goode y Elgar, 2009) probamos nuevamente que *pax2a* de carpín, es ortólogo de todos los Pax2 identificacos en vertebrados y del gen ancestral *shaven* de *Drosophila melanogaster* (Fu y Noll, 1997; Fu *et al.*, 1998; Goode y Elgar, 2009).

REGULACIÓN DE PAX2

Uno de los sistemas de regulación de expresión génica es el procesamiento alternativo del mRNA ya que representa un mecanismo fundamental para la generación de diversas proteínas a partir de un *locus* genético (Smith *et al.*, 1989). El fenómeno de

procesamiento alternativo en el gen *pax2* se ha descrito en distintas especies, desde el gen equivalente en *Amphioxus amphi2/5/8* (Short y Holland, 2008), hasta numerosas especies representantes de los distintos grupos de vertebrados como el pez cebra (Lun y Brand, 1998), *Xenopus laevis* (Heller y Brandli, 1997), pollo (Stanke *et al.*, 2010), ratón (Dressler *et al.*, 1990; Dressler y Woolf, 1999; Phelps y Dressler, 1996), humano (Busse *et al.*, 2009; Sanyanusin *et al.*, 1996; Tavassoli *et al.*, 1997) o carpín (nuestros resultados). Todas estas especies, además de contener exones conservados, presentan exones específicos de cada especie para *pax2*, como es el caso del exón 5.1 y 7.1 en el pez cebra (Lun y Brand, 1998) y el exón 5.1 en el carpín (nuestros resultados), lo que sugiere que se ha producido una especialización funcional entre ortólogos en los diferentes vertebrados.

La función de las distintas variantes transcritas todavía es incierta (Chi y Epstein, 2002; Short y Holland, 2008). En ratón, las dos isoformas más frecuentes Pax2a y Pax2b, similares a las descritas en humano (Dressler y Douglass, 1992), presentan zonas de unión al DNA similares. Por este motivo, se propone que las modificaciones en los dominios reguladores y la interacción con otras proteínas o cofactores, son las que determinan su diferente función (Phelps y Dressler, 1996). En humanos, distintas isoformas parecen estar involucradas en enfermedades como coloboma, síndrome renal, riñones poliquísticos y cáncer (tumor de Wilms) (Busse *et al.*, 2009; Sanyanusin *et al.*, 1996; Tavassoli *et al.*, 1997), o están implicadas en fenómenos como la regulación de la expresión del glucagón en el páncreas (Ritz-Laser *et al.*, 2000). En *Xenopus laevis*, se ha visto que todas las isoformas preservan los mismos dominios de unión al DNA; sin embargo varían en sus dominios C-terminales, determinando su regulación temporal durante la embriogénesis, aunque no parecen ser tejido-específicas (Heller y Brandli, 1997). Estudios en mutantes de pez cebra, muestran que cuando se preservan algunas de las isoformas de *pax2*, los efectos descritos para los mutantes totales del gen son menores, por lo que las preservadas son capaces de conservar algunas de las funciones de *pax2* (Lun y Brand, 1998). Sin embargo, *pax2a* de pez cebra difiere de *pax2* de ratón, ya que en mutantes de ambas especies los genes de la misma subfamilia *pax5/8* son capaces de compensar la ausencia de *pax2* en ratón, pero no en pez cebra (Macdonald *et al.*, 1997; Pfeffer *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1996). Únicamente en el desarrollo embrionario de algunas regiones donde participa *pax2a* en pez cebra, como en la

formación del NO, el co-ortólogo *pax2b* es capaz de compensar parcialmente su ausencia (Pfeffer *et al.*, 1998).

Al igual que ocurre con el estudio de la función de las distintas isoformas de Pax2, tampoco se conoce mucho en cuanto a la regulación de la actividad de la proteína. Se sabe, que la proteína Jun kinasa (JNK), elemento integrante en la ruta de las MAP kinasas, se transloca al núcleo y es capaz de fosforilar el dominio de transactivación C-terminal de Pax2, rico en aminoácidos serina y treonina, incrementando su actividad (Cai *et al.*, 2002). Por otro lado, Groucho (Grg), concretamente Grg4, una proteína perteneciente a la familia de proteínas que interaccionan con proteínas de unión al DNA y promueven la inhibición de la transcripción, interacciona y suprime la fosforilación de Pax2 cuando ésta se encuentra unida al DNA (Cai *et al.*, 2003). En la secuencia de aminoácidos parcial predicha de Pax2a de carpín y pez cebra, encontramos un cambio de un aminoácido treonina por uno serina, respectivamente, ambos aminoácidos susceptibles de ser fosforilados por alguna de las fosforilasas citadas (JNK, Grg4) u otras (Figs. 85C-D). Además, esta secuencia parcial no se encuentra en el dominio de transactivación sino en el octapéptido, donde únicamente en la proteína Pax5 se ha descrito la interacción conjunta del octapéptido y el dominio de transactivación con Grg4 (Eberhard *et al.*, 2000). Por todo ello, no parece probable que la variación aminoacídica entre carpín y pez cebra suponga modificaciones en al menos parte de la regulación de la proteína Pax2a.

La mayor parte de los estudios que tratan de desentrañar la función de *pax2* durante el desarrollo embrionario se han realizado con el transcrito *pax2a_t2* de pez cebra y sus equivalentes ortólogos en el resto de vertebrados estudiados (Goode y Elgar, 2009), de manera que escogimos el fragmento de secuencia génica de *pax2a_t2* de carpín para tratar de dilucidar su función en la CNO de animales adultos control y en regeneración.

EXPRESIÓN DE PAX2 EN LA CNO Y LA RETINA

Como era de esperar, la variante *pax2a_t2* de carpín se expresa tanto en la CNO como en el resto del NO (Figs. 84B, D), dado que se ha descrito la presencia de la proteína en el NO de carpín y de pez cebra adultos (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009). Nosotros también hemos detectado un bajo nivel de expresión génica en

pax2a_t2 en la retina, aunque los resultados de IHQ no muestran células positivas en los animales control (Parrilla *et al.*, 2009). La especificidad del anticuerpo anti-Pax2 ha sido ampliamente testada mediante *Western blot* en distintos animales, como carpín (Parrilla *et al.*, 2009), pollo (Stanke *et al.*, 2010) o ratón (Dressler y Douglass, 1992), y es susceptible de reconocer distintas isoformas (Dressler y Douglass, 1992; Stanke *et al.*, 2010). La expresión génica de *pax2a_t2* en la retina de carpín adulto no es anómala, dado que ya se ha descrito mediante IHQ la presencia de células Pax2⁺ en la retina de numerosos animales adultos como pollo, ratón, perro, mono y humano (Chu *et al.*, 2001; Stanke *et al.*, 2010), aunque se ha demostrado que están ausentes en cobaya (Stanke *et al.*, 2010). El hecho de que *pax2a_t2* se exprese en la retina pero no sea detectable mediante el uso de anticuerpos, se puede deber a dos razones: 1) el bajo nivel de expresión génica se traduce en una escasa cantidad de proteína no detectable mediante las técnicas de IHQ empleadas o, 2) estamos detectando una isoforma que varía su antigenicidad y por lo tanto no es susceptible de ser reconocida por el anticuerpo.

Además de demostrar la expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO y el resto del NO de carpín adulto, mediante IHQ detectamos células Pax2⁺ a lo largo de todo el NO. Las células Pax2⁺ se distribuyen desde la CNO hasta el inicio del TR (Figs. 37A-B, 47A), donde la expresión de *pax2* es fundamental durante el desarrollo del NO en pez cebra (Goode y Elgar, 2009; Lun y Brand, 1998; Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald *et al.*, 1997; Pfeffer *et al.*, 1998), ratón (Goode y Elgar, 2009; Keller *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1996) y humanos (Goode y Elgar, 2009; Sanyanusin *et al.*, 1995). En concreto, la expresión génica de *pax2* asegura durante el desarrollo embrionario el desarrollo de la astrogliá y organiza la entrada y empaquetamiento de los axones de las células ganglionares en la CNO y su cruce en el QO (Goode y Elgar, 2009; Macdonald *et al.*, 1997; Soukkaieh *et al.*, 2007; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Thanos *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 1996). Todos estos procesos de diferenciación glial y adición de nuevos axones, se conservan en el NO del carpín adulto (Hitchcock *et al.*, 1992; Sperry, 1948); por lo tanto, pensamos que Pax2 en el animal adulto puede realizar funciones similares a las que desempeña durante el desarrollo del NO. Otro dato que apoya esta teoría es que estas células Pax2⁺ en el adulto se encuentran ligeramente concentradas a lo largo de todo el borde en crecimiento (Figs. 40A, 48C-D), junto a los axones jóvenes y células inmaduras descritas en esta zona (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986).

Por otra parte, en la retina y NO en mamíferos y aves, donde la capacidad de crecimiento continuado de la retina durante la vida adulta del animal es muy limitada (Bhatia *et al.*, 2009; Martínez-Navarrete *et al.*, 2008), Pax2 se mantiene en el animal adulto (Chu *et al.*, 2001; Stanke *et al.*, 2010). En este caso, su función parece estar relacionada con el mantenimiento del fenotipo glial de las células que lo expresan (Stanke *et al.*, 2010), inhibiendo el fenotipo neuronal al suprimir la expresión génica de *pax6* que, a su vez, promueve la multipotencialidad de los progenitores retinianos (Marquardt, 2003). Este fenómeno de inhibición recíproca entre *pax2* y *pax6* también se puede postular en teleosteos, dado que ambos marcadores han sido descritos en el NO y la retina, respectivamente (Cid, 2006; Hitchcock *et al.*, 1996; Macdonald y Wilson, 1996).

EXPRESIÓN DE SHH EN LA CNO Y RETINA

Uno de los reguladores de la expresión de *pax2* en la vía visual durante el desarrollo embrionario es el morfógeno Shh, cuya expresión se encuentra limitada por la propia actividad de Pax2 (Ekker *et al.*, 1995; Goode y Elgar, 2009; Krauss *et al.*, 1993; Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996). En ratón se ha demostrado que los axones de las células ganglionares en etapas perinatales expresan *shh* y los astrocitos Pax2⁺ del NO sus receptores (Wallace y Raff, 1999), de manera que *shh* estimula su proliferación (Burne *et al.*, 1996; Burne y Raff, 1997; Ulshafer y Clavert, 1979; Wallace y Raff, 1999). Nuestros resultados muestran que, tanto en la retina como en la CNO de carpín adulto se expresa *shh* (Fig. 84D), sugiriendo que mecanismos de regulación Shh-Pax2 descritos en el desarrollo embrionario deben estar ocurriendo en el animal adulto. Sin embargo, se plantean numerosas dudas: ¿qué tipos celulares de la retina expresan *shh*? ¿la expresión de *shh* está relacionada con la ZPG? ¿de dónde proviene el *shh* que se expresa en la CNO?.

La expresión de *shh* en la retina neural adulta ha sido descrita previamente en el pez cebra (Stenkamp *et al.*, 2008), en los anfibios *Cynops pyrrhogaster* y en *Xenopus laevis* (Takabatake *et al.*, 1997) y en el ratón (Jensen y Wallace, 1997). Mediante técnicas de hibridación *in situ*, se conoce que *shh* se expresa en las células ganglionares y células amacrinas de la retina del ratón adulto (P14) (Jensen y Wallace, 1997). Desgraciadamente, la ribosonda para detectar el mRNA de *shh* en pez cebra funciona perfectamente durante el desarrollo embrionario (Stenkamp *et al.*, 2000) pero no en la

retina del animal adulto (comprobado en nuestra estancia en el laboratorio del Prof. Goldman, Universidad de Michigan, Ann Arbor). Dado que no se han descrito mecanismos de procesamiento alternativo de *shh*, lo más probable es que *shh* no sea detectable mediante técnicas de hibridación *in situ* convencionales, puesto que sabemos que su nivel de expresión en la retina de carpín adulto control es muy bajo (resultados preliminares no mostrados en este trabajo).

Por otro lado, separamos la ZPG de la retina madura y comprobamos que *shh* se expresa en ambas regiones de la retina del carpín adulto (Fig. 84E), incluso la expresión génica es superior en la región madura que en la ZPG, presentando la misma distribución que durante el desarrollo embrionario (Kolpak *et al.*, 2005). Esto tiene sentido ya que la expresión de *shh* en la retina no sólo interacciona con los astrocitos del NO (Wallace y Raff, 1999) sino que presenta numerosas dianas en la retina durante el desarrollo embrionario, desde las propias células ganglionares y amacrinas hasta células bipolares, horizontales, fotorreceptores y células de Müller (Shkumatava *et al.*, 2004; Stenkamp *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2007; Zhang y Yang, 2001), presentando estas últimas receptores de Shh en zonas centrales de la retina adulta de ratón (Jensen y Wallace, 1997).

Finalmente, la expresión génica de *shh* en la CNO de carpín adulto, que es incluso ligeramente superior a la de la retina (Fig. 84I), resulta sorprendente. En ratón, se ha demostrado que tanto el mRNA como la proteína Shh se encuentran en la retina, sin embargo la proteína es detectable únicamente en el NO (hasta la edad de P7) (Jensen y Wallace, 1997; Wallace y Raff, 1999). Nosotros proponemos dos posibles explicaciones: 1) el mRNA de *shh* sintetizado en el núcleo de las células ganglionares se transporta de modo anterógrado a través de los axones hacia el cono de crecimiento donde se traduciría a proteína o, 2) existe otra fuente de producción de Shh en la CNO del carpín. En cuanto al transporte anterógrado de mRNA, se ha comprobado que este fenómeno proporciona ventajas durante el desarrollo embrionario dado que ofrece la posibilidad de sintetizar proteínas en el cono de crecimiento permitiendo al axón adaptarse de forma rápida a los cambios del ambiente (Campbell y Holt, 2001; Ming *et al.*, 2002; Satkauskas y Bagnard, 2007; Vuppalanchi *et al.*, 2009). Pero este proceso también se ha descrito en animales adultos (Piper y Holt, 2004; Satkauskas y Bagnard, 2007) o durante la regeneración (Gumy *et al.* 2010; Satkauskas y Bagnard, 2007; Vuppalanchi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2001). Por tanto, el transporte

axonal de mRNA por parte de las células ganglionares de la retina de carpín adulto a lo largo del NO tiene sentido biológico, dado que su sistema visual presenta crecimiento continuado durante toda la vida y, como ocurre durante el desarrollo, Shh puede participar en el proceso de guía axonal y diferenciación glial (Barresi *et al.*, 2005; Erskine y Herrera, 2007; Fuccillo *et al.*, 2006; Kolpak *et al.*, 2005; Trousse *et al.*, 2001; Wallace y Raff, 1999). Referente a la segunda hipótesis, es difícil determinar qué tipo celular puede expresar *shh* en el animal adulto porque, además de las células ganglionares, las únicas fuentes de producción de Shh descritas en el desarrollo de sistema visual se encuentran en estructuras embrionarias como las células de la placa del suelo o las de la zona donde se situará el futuro QO (Dakubo *et al.*, 2003; Petros *et al.*, 2008) que desaparecen en el animal adulto.

LAS CÉLULAS PAX2⁺ EN LA CNO

El análisis de las células Pax2⁺ en la retina y en la CNO es un tema cuyo interés ha aumentado en los últimos años. Cuando iniciamos nuestro trabajo, el único estudio publicado analizaba las células Pax2⁺ durante el desarrollo embrionario de la retina de humanos, y se describía únicamente una pequeña subpoblación de células Pax2⁺ que se conserva en el límite retina-CNO en adultos de edad avanzada (Chu *et al.*, 2001). A continuación, el mismo grupo realizaba un estudio detallado de las células Pax2⁺ en el desarrollo embrionario de rata pero únicamente hasta estadios perinatales (Chan-Ling *et al.*, 2009). Unos meses más tarde, publicamos el análisis exhaustivo de la distribución y caracterización de las células Pax2⁺ en la CNO de carpín adulto, como parte de este trabajo (Parrilla *et al.*, 2009). Recientemente, células Pax2⁺ han sido detectadas en la retina y CNO de aves y mamíferos adultos (Stanke *et al.*, 2010), con una distribución particular en cada especie, como se discutirá a continuación.

En primer lugar, encontramos que las células Pax2⁺ son exclusivamente astrocitos, aunque no todos los astrocitos de la CNO son positivos a Pax2 (Fig. 46). Las células Pax2⁺ son menos numerosas que en el SIO y presentan una organización y características diferentes que las del resto del NO (Figs. 37A-B, 38B). Muchas de ellas, tienen las características de astrocitos maduros de pez: núcleos eucromáticos (Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002), procesos GFAP⁺ (Kàlmàn, 1998) y citoqueratina⁺ (Maggs y Scholes, 1990), la proteína asociada a uniones estrechas ZO1 (Mack y Wolburg, 2006), y la morfología ultraestructural típica de astrocitos maduros (Lillo *et al.*, 1998),

aunque son negativas a GS (Fig. 39F). Sin embargo, a diferencia del SIO, el marcaje para citoqueratina y ZO1 es muy inferior, debido probablemente a que el grado de empaquetamiento de los axones es menor en la CNO (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1981; Lillo *et al.*, 1998; Mack y Wolburg, 2006; Tapp, 1973; Vanegas y Ito, 1983). Por lo tanto, las células Pax2⁺ son una subpoblación de astrocitos de la CNO de carpín. Se sitúan principalmente en el DO formando la limitante glial con la AC, junto a los axones de las células ganglionares y en contacto con los procesos vitreales de las células de Müller (Fig. 39C), de forma similar a los astrocitos del DO en tenca (Lillo *et al.*, 2002). En la zona IO1, las células Pax2⁺ son parte de la limitante glial de la retina con la CNO (Fig., 39D) en una distribución de los astrocitos similar a la membrana limitante de Elsching, el menisco central de Kuhnt y el tejido intermediario de Kuhnt en humanos (Triviño *et al.*, 1996) y la glía peripapilar de aves (Quesada *et al.*, 2004) y reptiles (Viñoly, 2005). Estos astrocitos Pax2⁺/GFAP⁺ tienen una localización equivalente a los astrocitos perinatales descritos en la CNO de humano adulto y rata en estadios perinatales (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001) y a los astrocitos GFAP⁺/S100⁻ en tenca (Lillo *et al.*, 2002).

Tanto en mamíferos (cobaya, ratón, perro y macaco) como en aves (pollo), se ha detectado la presencia de astrocitos Pax2⁺ en la CNO, pero no se asegura la existencia de astrocitos negativos a Pax2 (Kozulin *et al.*, 2009; Stanke *et al.*, 2010). Nuestros resultados con IHQ en carpín, muestran células positivas a citoqueratina y ZO1 negativas a Pax2, y probablemente también existan células Pax2⁻/GFAP⁺ (Figs. 39I, L). Mediante microscopía electrónica observamos astrocitos Pax2⁻ localizados tanto en las limitantes gliales como entre los axones (Fig. 46). Aunque no hemos realizado un estudio cuantitativo de estas células, salvo en la limitante glial de la zona IO1 donde las células son mayoritariamente Pax2⁺, en el resto de las regiones de la CNO parece existir una cantidad similar de astrocitos positivos y negativos a Pax2.

A diferencia de carpín (nuestros resultados) y cobaya (Stanke *et al.*, 2010), en ratón, perro, macaco y pollo se detectan células Pax2⁺ en la retina (Kozulin *et al.*, 2009; Stanke *et al.*, 2010). Pero mientras que en la retina de los mamíferos marcan astrocitos de la CFNO (Kozulin *et al.*, 2009; Stanke *et al.*, 2010), en pollo el marcaje únicamente está presente en las células de Müller de la retina central y no de la periferia (Stanke *et al.*, 2010). Esta particular disposición parece deberse a que Pax2 actúa suprimiendo la transdiferenciación de las células de Müller o promueve el fenotipo glial en las regiones

centrales, mientras que en las células de Müller de la periferia que tienen mayor capacidad para proliferar y producir neuronas (Fischer *et al.*, 2002b; Fischer, 2005; Fischer *et al.*, 2009), los niveles de Pax2 son indetectables (Stanke *et al.*, 2010). Esto puede explicar la ausencia de Pax2 que encontramos en las células de Müller de carpín, dado que se ha demostrado en pez cebra que las células de Müller constituyen una fuente de producción de neuronas tanto en control como lesión (Bernardos *et al.*, 2007; Fausett y Goldman, 2006; Fimbel *et al.*, 2007). Todos estos resultados podrían indicar que la ausencia de Pax2 en las células de Müller de la retina de mamíferos puede estar relacionada con su presunto potencial neurogénico (Fischer y Reh, 2003; Jadhav *et al.*, 2009).

Finalmente, nuestros resultados muestran un bajo número de células Pax2⁺/PCNA⁺ localizadas en el IO1 (Fig. 40C). Estas células fueron previamente descritas mediante MET y con el marcador PCNA como astroblastos en la CNO de tenca (Lillo *et al.*, 2002). Además, en esta región se ha descrito una segunda fuente de formación de astrocitos del NO y retina durante el desarrollo (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001). También encontramos pocas células Pax2⁺/PCNA⁺ en la zona IO2 de la limitante glial de la AC (Fig. 4D). La proteína PCNA está principalmente presente en la fase S (Bravo *et al.*, 1987; Valero *et al.*, 2005), y el astroblasto puede estar en diversas fases del ciclo celular. Así, las células Pax2⁺/PCNA⁺ pueden ser una fuente de astrocitos, que migrarían a su localización final para llevar a cabo su función. No obstante, no descartamos que otras células PCNA⁺ pero negativas a Pax2, presentes en la CNO y en el SIO, puedan diferenciarse a astrocitos.

LAS CÉLULAS PAX2⁺ EN EL SIO

A diferencia de la escasa población de células Pax2⁺ presentes en la CNO, QO y TR, la mayoría de las células Pax2⁺ se localizan en el SIO (Fig. 38B). Estas células se encuentran empaquetando los axones de las células ganglionares (Figs. 48E-G) y se sitúan de acuerdo con la organización en lámina plegada descrita en teleósteos (Fig. 48K) (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1981; Lillo *et al.*, 1998; Vanegas y Ito, 1983). Se sitúan dispersas a lo largo de todo el SIO y ligeramente concentradas en el borde en crecimiento (Fig. 48A). Al contrario que las células Pax2⁺ del NO de peces cebra adultos, todas ellas caracterizadas como astrocitos reticulares Pax2⁺/citoqueratina⁺ (Macdonald *et al.*, 1997), encontramos que en el SIO de carpín adulto no todos los

astrocitos reticulares son positivos a Pax2. Por tanto, hay dos subpoblaciones de astrocitos reticulares: Pax2⁺/citoqueratina⁺/ZO1⁺/GS⁻ con núcleo eucromático, y astrocitos reticulares Pax2⁻/citoqueratina⁺ y Pax2⁻/ZO1⁺ con un núcleo heterocromático, ambos mostrando desmosomas, característicos de los astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1990). Además, a diferencia de la CNO, el marcaje para GFAP está ausente en el SIO (Kalmàn, 1998; Maggs y Scholes, 1990). Nuestro estudio, muestra otra diferencia importante todavía no descrita en la limitante glial: está compuesta por células con núcleos Pax2⁺ y Pax2⁻ eucromáticos y heterocromáticos, que sugieren una gran variedad de astrocitos en el SIO (Fig. 51).

A diferencia de en la CNO, no se ha realizado un análisis en profundidad del marcaje para Pax2 en el SIO en otros grupos de vertebrados. En ratón, cobaya, perro y pollo se menciona su presencia en zonas próximas a la CNO (Stanke *et al.*, 2010), y en rata se asegura que los astrocitos del NO pierden su marcaje para Pax2 con la edad (Mi y Barres, 1999). Pensamos que se deberían realizar más estudios para comprobar si el marcaje para Pax2 se mantiene únicamente en la retina y CNO en estos animales adultos o, por el contrario, se distribuye también a lo largo del SIO.

Finalmente, en el SIO no hemos detectado células Pax2⁺/PCNA⁺ y únicamente hemos encontrado escasas células PCNA⁺/Pax2⁻ distribuidas por todo el SIO, como se ha descrito previamente en tenca (Jimeno, 2001). Como se explica en la CNO, la ausencia de marcaje Pax2⁺/PCNA⁺ no significa que no existan células proliferativas, sino que es posible que la frecuencia de división sea muy baja por lo que es difícil detectarlas.

1.2 S100 EN EL NO Y LA RETINA

LAS CÉLULAS S100⁺ EN LA CNO

A diferencia del marcaje para Pax2, la distribución y caracterización de las células S100⁺ ha sido ampliamente estudiada en la retina y NO de peces y mamíferos (Clemente *et al.*, 2008; Cocchia *et al.*, 1983; Lillo *et al.*, 2002; Nona *et al.*, 1989; Schnitzer, 1987; Terenghi *et al.*, 1983; Vecino *et al.*, 1997). En nuestro trabajo encontramos diferencias en el marcaje para S100 y aportamos nuevos datos en la caracterización de este tipo celular.

En la CNO de carpín adulto, encontramos dos tipos de células S100⁺: 1) de soma pequeño y sin procesos marcados y, 2) de soma grande y largos procesos positivos (Fig. 41A). Estos dos tipos celulares han sido detectados previamente en el NO de tenca (Clemente *et al.*, 2008) pero no se han descrito en la CNO de este mismo animal (Lillo *et al.*, 2002; Vecino *et al.*, 1997). Como las células S100⁺ de pequeño tamaño hay co-localización con GS, y se han caracterizado como oligodendrocitos en tenca (Clemente *et al.*, 2008); como este dato está en consonancia con nuestros resultados, lo discutiremos en el apartado de caracterización de células Sox10⁺. El segundo tipo celular presenta la misma morfología y distribución que los astrocitos S100⁺ detectados en la CNO de tenca (Lillo *et al.*, 2002; Vecino *et al.*, 1997) y son negativos a GS a diferencia de los descritos en el SIO de tenca (Clemente *et al.*, 2008). En el DO, se sitúan entre los procesos vitreales de las células de Müller y algunos de ellos son GFAP⁺ (Fig. 41B-C) (Lillo *et al.*, 2002), sin embargo, probamos que son muy escasos los que se sitúan en la limitante glial de la AC, dato apoyado por su escasa co-localización con citoqueratina y ZO1 (Figs. 41E-G). Por esta razón, al contrario de lo que se propone en tenca (Lillo *et al.*, 2002), pensamos que estos astrocitos S100⁺ son responsables de empaquetar los axones maduros situados en las zonas internas de la CNO y no los axones jóvenes junto a la AC (Fig. 40F). Por la disposición de estas células S100⁺ cabe pensar que al menos algunas de ellas podrían ser Pax2⁺, aunque no hemos podido realizar los dobles marcajes.

En la zona IO1 limitando la retina con el NO, no encontramos marcaje para S100 (Figs. 41A-B) tal y como se describe en tenca (Lillo *et al.*, 2002). Sin embargo, en la zona posterior de la CNO, en el límite con la coroides y la esclera, detectamos un anillo de células S100⁺ que co-localiza parcialmente con GFAP (Figs. 41B, D). Estas células orientan sus procesos transversales al NO y, como se describe en tenca (Lillo *et al.*, 2002), establecen una separación entre la CNO y el SIO en la zona donde se sitúa la lámina cribosa en aves y mamíferos (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996), y se corresponde con la región donde en peces los axones comienzan a empaquetarse (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1981; Lillo *et al.*, 1998; Vanegas y Ito, 1983).

Finalmente, como ocurre con Pax2, nuestros resultados muestran un bajo número de células S100⁺/PCNA⁺ en los animales control; sin embargo, y a diferencia de las Pax2⁺/PCNA⁺, se localizan entre los axones de las células ganglionares (Fig. 40G) y no

formando parte de la limitante glial, constituyendo una fuente diferente de producción de nuevas células de la CNO.

LAS CÉLULAS S100⁺ EN LA RETINA

En la retina, encontramos una gran diferencia frente a lo descrito previamente en la bibliografía. El anticuerpo S100 marca tanto los somas como los procesos de las células de Müller en la retina de carpín (Nona *et al.*, 1989), tenca (Lillo *et al.*, 2002; Vecino *et al.*, 1997), conejo (Schnitzer, 1987), rata (Cocchia *et al.*, 1983; Terenghi *et al.*, 1983), cobaya y hámster Chino (Terenghi *et al.*, 1983). Sin embargo, realizando el mismo experimento en paralelo con secciones de retina de carpín, tenca y ratón (datos no mostrados), el anticuerpo únicamente marcó las células de Müller de tenca y ratón, siendo S100⁻ las de carpín, demostrando el correcto funcionamiento del anticuerpo. Desconocemos el motivo por el cual las células de Müller de carpín no se marcan habiendo sido descritas en trabajos previos (Nona *et al.*, 1989). Únicamente hemos detectado escasas células S100⁺ en el límite retina-CNO, con un marcaje y localización similar a las células de Müller (Fig. 41M). Estas células presentan co-localización parcial con GS. Mediante los experimentos realizados en este trabajo no podemos afirmar si se trata de células de Müller especializadas como se describe en tenca (Lillo *et al.*, 2002), o de otro tipo de glía peripapilar como se ha demostrado en pollo (Quesada *et al.*, 2004).

También detectamos en la retina de carpín adulto, como se ha descrito en tenca (Vecino *et al.* 1997), células S100⁺ distribuidas por la CFNO (Figs. 41J-L). Estas células tienen morfología bipolar y se han caracterizado como astrocitos (Vecino *et al.*, 1997) y no presentan ningún tipo de asociación con los axones jóvenes ni con los vasos sanguíneos (Fig. 41J). Además, en nuestro trabajo hemos detectado que algunas de ellas presentan marcaje para GFAP (Fig. 41L).

Se han descrito hasta 20 proteínas S100 diferentes, con una semejanza en la secuencia que varía desde un 22% hasta un 57% y pueden estar distribuidas desde el citoplasma y distintos compartimentos intracelulares, tales como el núcleo, hasta el espacio extracelular (Marenholz *et al.*, 2004). Por este motivo, es muy posible que la proteína S100 esté presente tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células positivas a S100, incluso que únicamente se encuentre en el núcleo de las células S100⁺

de soma pequeño y sin procesos marcados (Fig. 41A). Nosotros hemos detectado que algunas de las células $S100^+/GFAP^+$, tanto en la retina como en la CNO, presentan una distribución peculiar de ambas proteínas dentro de la misma célula. De manera que mientras la proteína S100 se sitúa próxima al soma celular y en el inicio de las prolongaciones astrocitarias, la proteína GFAP se encuentra en el extremo de dichas prolongaciones (Figs. 41C, L). Se sabe que la S100 inhibe el ensamblaje de la GFAP (Donato, 2001), que explica los dominios excluyentes en el citoplasma de estas células.

LAS CÉLULAS $S100^+$ EN EL SIO

Al contrario que en la CNO, las células $S100^+$ del SIO, forman parte tanto de la limitante glial como de los astrocitos reticulares empaquetando los fascículos nerviosos, y el marcaje aparece tanto en el cuerpo celular como en los procesos (Velasco *et al.*, 1997), aunque no se puede descartar que la proteína se encuentre también en el núcleo (Marenholz *et al.*, 2004). En la limitante glial muestra colocación tanto con citoqueratina como con ZO1 (Figs. 49G-I) y por tanto, al menos parte de ellos, son susceptibles de ser positivas a Pax2. En el interior del SIO, el marcaje es más heterogéneo, dado que algunos son $S100^+/citoqueratina^+/ZO1^+$ pudiendo incluirse dentro de los astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1986; Maggs y Scholes, 1990), y otros son negativos para ambos marcadores (Figs. 49G-I). Por otro lado, detectamos células $S100^+/GS^-$ y $S100^+/GS^+$ (Figs. 49J-K), estas últimas, como se ha propuesto en otros trabajos (Clemente *et al.*, 2002; Nona *et al.*, 1992; Velasco *et al.*, 1997), pensamos que son oligodendrocitos y los discutiremos en el apartado de Sox10. Por lo tanto, es muy posible que las células $S100^+/GS^-$ sean astrocitos reticulares que presentan la proteína Pax2.

A diferencia del marcaje Pax2-PCNA en el SIO, sí detectamos células $S100^+/PCNA^+$, pero como ocurre en la CNO, son muy escasas, y se encuentran tanto en la limitante glial como en el interior del NO (Fig. 49L). Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado la presencia de escasas células $PCNA^+$ distribuidas de forma homogénea a lo largo de todo el SIO de carpín y tenca (Jimeno, 2001; Parrilla *et al.*, 2009), así como numerosas células gliales inmaduras en el borde en crecimiento (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1990). Nuestros resultados muestran que, al menos, en la limitante glial se están produciendo nuevos astrocitos caracterizados como $S100^+/PCNA^+$. Sin embargo, no podemos determinar si las células $S100^+/PCNA^+$

situadas entre los axones son precursores de astrocitos u oligodendrocitos.

1.3 SOX10 EN EL NO

LAS CÉLULAS SOX10⁺ EN LA CFNO Y CNO

La presencia de axones mielinizados así como de oligodendrocitos tanto en la CNO como en la CFNO de peces ha sido descrita mediante técnicas de microscopía electrónica (Bunt, 1982; Easter *et al.*, 1984; Fujita *et al.*, 2000; Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002; Uchiyama, 1989; Witkovsky, 1971). Sin embargo, probablemente debido al escaso nivel de conservación de algunas proteínas relacionadas con la especificación de los oligodendrocitos y la mielina en peces respecto a otros grupos de vertebrados (Brosamle y Halpern, 2002; Gould *et al.*, 2005; Mastronardi *et al.*, 1993; Milne *et al.*, 1990; Saavedra *et al.*, 1989), hay pocos estudios con IHQ (Ankerhold y Stuermer, 1999; Arata y Nakayasu, 2003; Bastmeyer *et al.*, 1989; Bastmeyer *et al.*, 1991; Schweitzer *et al.*, 2007; Tomizawa *et al.*, 2000).

En nuestro trabajo, presentamos por primera vez un análisis de la distribución de los oligodendrocitos en la retina y el NO, inmunodetectando el factor de transcripción Sox10 (Figs. 42F-G), con un anticuerpo diseñado específicamente para reconocer la proteína en pez cebra (Park *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 2010). Se ha demostrado que en el SNC, la proteína Sox10 es exclusiva de oligodendrocitos tanto de ratón como de pez cebra (Takada *et al.*, 2010; Wegner y Stolt, 2005; Wegner, 2008). Tanto en la CFNO como en la CNO de carpín, detectamos numerosas células Sox10⁺ y, como otros factores de transcripción, el marcaje se localiza en el núcleo, aunque excluye el nucleolo (Fig. 42G). Son células que se organizan en hileras entre los axones o formando pequeños grupos, principalmente localizados en el DO y zona IO1 de la CNO. Nunca forman parte de la limitante glial. La presencia de oligodendrocitos en la CFNO y CNO en peces, al contrario que en mamíferos (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009), se ha explicado por la ausencia de lámina cribosa (Fujita *et al.*, 2000). Sin embargo, hay numerosas excepciones de animales con lámina cribosa que presentan mielinización en la CFNO y CNO (Cho *et al.*, 1999; Morcos y Chan-Ling, 1997; Nakazawa *et al.*, 1993; Reichenbach *et al.*, 1988; Schnitzer, 1985; Won *et al.*, 2000).

Mediante un análisis de microscopía electrónica convencional, detectamos grupos o hileras de células con una disposición similar a las células Sox10⁺. Estas células presentan características ultraestructurales similares a los oligodendrocitos en fase de

diferenciación (Fig. 45) descritos en la CNO y SIO de tenca (Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002). Además, son células negativas a Pax2 (Fig. 46F). Por lo tanto, aunque no hemos realizado marcaje con oro coloidal para Sox10, es muy posible que se trate de las mismas células.

La expresión de Sox10 es característica tanto de OPCs como de oligodendrocitos maduros, tanto en ratón como en pez cebra (Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.* 2010; Wegner y Stolt, 2005; Wegner, 2008). Como se indica en la introducción (Apdo. 3.5 Origen de las Células Macrogliales del Nervio Óptico), los OPCs pueden originar astrocitos tipo-2 (Miller *et al.*, 1985) y, además, pueden presentar marcaje positivo a Pax2 en la corteza cerebral (Curto, 2010). El marcaje para Pax2 con oro coloidal a microscopía electrónica muestra que los oligodendrocitos en fase de diferenciación de la CNO son negativos para Pax2. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo dobles marcajes Pax2-Sox10 para asegurar por completo la ausencia de Sox10 en los OPCs. Por otro lado, con nuestros resultados tampoco podemos determinar si todas las células Sox10⁺ en la CNO son oligodendrocitos inmaduros o están en diferentes fases de maduración.

La mayor parte de los oligodendrocitos son Sox10⁺/GS⁺, y aunque detectamos una pequeña subpoblación de oligodendrocitos Sox10⁺/GS⁻, todas las células GS⁺ muestran co-localización con Sox10 (Figs. 42H-I). Por tanto, podemos decir que en el NO de carpín control la GS se localiza exclusivamente en los oligodendrocitos de la CNO y del SIO (como veremos a continuación). Aunque la GS se ha considerado clásicamente como un marcador típico de astrocitos (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Struzynska *et al.*, 2005), numerosos estudios han demostrado que, en diferentes regiones del SNC incluyendo el NO, los oligodendrocitos pueden ser GS⁺ (Cammer, 1990; Domercq *et al.*, 1999; Jennings *et al.*, 2002; Romero-Alemán Mdel *et al.*, 2003; Warringa *et al.*, 1988). En mamíferos, se ha demostrado que las células ganglionares pueden liberar glutamato a lo largo de los axones y no únicamente en los terminales nerviosos (Kukley *et al.*, 2007). Este glutamato evoca señales de Ca²⁺ intracelular tanto en astrocitos como en OPCs del NO (Hamilton *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2010). Los oligodendrocitos son muy vulnerables al exceso de glutamato por lo tanto, es necesaria la retirada rápida de este glutamato del espacio extracelular y convertirlo a glutamina, gracias a la presencia de la GS en estas mismas células (Domercq *et al.*, 1999).

Como se explica en varias ocasiones en los resultados, el marcaje de los oligodendrocitos GS^+ varía en función de la fijación. La dependencia del nivel de fijación para marcar GS no es extraña, ya que se ha demostrado que el exceso de fijación o incluso distintos tipos de fijadores pueden modificar la antigenicidad de las proteínas (Valero, 2003). Desconocemos el motivo por el cual el marcaje para GS de las células de Müller no se ve afectado, cuando sí lo hace en los oligodendrocitos. Podría deberse a que no presentan la misma proteína GS , dado que se ha descrito la presencia de dos isoformas diferentes sintetizadas por mecanismos de procesamiento alternativo (Shin *et al.*, 2003; Shin y Park, 2004), o simplemente que la GS es menos abundante en los oligodendrocitos.

En el apartado anterior describíamos la presencia en la CNO de células $S100^+$ de soma pequeño y sin procesos marcados, estas células son $S100^+/GS^+$. Dado que todas las células GS^+ son $Sox10^+$, podemos decir que se trata de oligodendrocitos (Figs. 41H-I). La presencia de la proteína $S100$ en los oligodendrocitos ya se ha descrito previamente tanto en peces como mamíferos (Bastmeyer *et al.*, 1993; Clemente *et al.*, 2008; Isobe *et al.*, 1984; Ludwin *et al.*, 1976; Nona *et al.*, 1992; Rickmann y Wolff, 1995; Velasco *et al.*, 1997); sin embargo, a diferencia del SIO en tenca en donde han sido caracterizados como $S100^+/GS^-$ (Clemente *et al.*, 2008), tanto en la CNO como en el SIO (como se discutirá a continuación) de carpín, los oligodendrocitos son $S100^+/GS^+$. Por último, en los oligodendrocitos de la CNO la proteína $S100$ está situada mayoritariamente en el núcleo o zona perinuclear, lo que explica por qué no se superpone con el marcaje para GS en la mayoría de los casos, ya que este último se sitúa en el citoplasma. Sin embargo, hay que recordar que algunos oligodendrocitos $S100^+/GS^+$ presentan una mayor extensión de proteína $S100$ por su citoplasma mostrando una co-localización total con la GS (Fig. 41I). Esta diferente localización de la proteína $S100$ entre astrocitos (apartado anterior) y oligodendrocitos podría deberse a que ejerza diferentes funciones en cada tipo celular (Marenholz *et al.*, 2004).

Como ocurre con $Pax2$ y $S100$, nuestros resultados muestran un bajo número de células $Sox10^+/PCNA^+$, demostrando una baja tasa de proliferación de células macrogliales en la CNO de carpín adulto control. Como ocurre con las células $S100^+/PCNA^+$, las células $Sox10^+/PCNA^+$ se localizan entre los axones de las células ganglionares (Figs. 40H-I) aunque con nuestros resultados no podemos saber si se trata del mismo tipo celular. Por lo tanto, proponemos que la fuente de producción de

oligodendrocitos no está asociada a la limitante glial, al contrario de lo que ocurre con los astrocitos.

LA MIELINA EN LA CFNO Y CNO

La mielina, inmunodetectada con el anticuerpo anti-MBP, se distribuye desde la CFNO de zonas próximas a la ZPG hasta la CNO (Figs. 42A-B), y coincide con las descripciones realizadas mediante microscopía electrónica en varias especies de peces (Easter *et al.*, 1984; Fujita *et al.*, 2000; Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002), con el inmunomarcaje para MBP y el antígeno A20 (red periaxonal) en pez cebra (Arata y Nakayasu, 2003), y la distribución de los oligodendrocitos Sox10⁺ descrito por nosotros (Figs. 6F-G).

El marcaje para MBP va en aumento desde la retina inmadura a la retina central (Fig. 42E) y presenta un aspecto desorganizado (Lillo *et al.*, 1998) dejando sin marcar el extremo vitreal de la CFNO donde discurren los axones jóvenes (Figs. 42B-C) (Easter *et al.*, 1984). La distinta organización que presenta la mielina en la retina, sugiere que deben existir diferencias bioquímicas y antigénicas respecto a la mielina en el NO (Easter *et al.*, 1984). Aunque algunos autores han descrito los axones mielinizados de la CFNO de la retina como axones retinópetos procedentes del cerebro (Easter *et al.*, 1984; Meyer *et al.*, 1993; Tapp, 1973; Wolburg, 1981), pensamos que su número es demasiado elevado y, como proponen Lillo *et al.* (1998), las fibras retinófugas también deben presentar mielinización. En aves, que también presentan oligodendrocitos en la CFNO y CCG, se ha propuesto que participan tanto en la mielinización como en la nutrición y protección de las células ganglionares en la retina (Cho *et al.*, 1999; Won *et al.*, 2000). En conejos, se han descrito además de oligodendrocitos maduros MBP⁺, gran cantidad de precursores de oligodendrocitos no mielinizantes (Morcos y Chan-Ling, 1997).

El marcaje MBP⁺ adquiere un aspecto más organizado cuando llega a la CNO, pudiéndose detectar las vainas de mielina (Fig. 42D), tal y como se ha descrito mediante microscopía electrónica (Bunt, 1982), observándose los axones amielínicos junto a la AC (Figs. 43C, G) (Easter *et al.*, 1984; Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002).

LAS CÉLULAS SOX10⁺ EN LA SIO

En carpín, los oligodendrocitos Sox10⁺ se distribuyen por todo el SIO tanto por la zona madura como por el borde en crecimiento (Fig. 50G), al igual que lo hacen las células GS⁺ (Parrilla *et al.*, 2009). Sin embargo, la mielina MBP⁺ está ausente en la zona por la cual discurren los axones amielínicos (Easter *et al.*, 1984; Easter *et al.*, 1981; Lillo *et al.*, 1998; Maggs and Scholes, 1986, nuestros resultados). Estos oligodendrocitos, al igual que en la CNO, son Sox10⁺/GS⁺ aunque una pequeña subpoblación es Sox10⁺/GS⁻ (Figs. 50I, L); por este motivo, consideramos la GS un marcador exclusivo de oligodendrocitos en el SIO del carpín adulto. A diferencia de la CNO, el marcaje para GS en el SIO no depende del nivel de fijación, de forma que es visible en todos los animales analizados. Desconocemos si estas diferencias de marcaje se deben a que la proteína presenta distintas modificaciones postranscripcionales o postraduccionales o si simplemente, se expresa en menor cantidad en la CNO, y el exceso de fijación la hace indetectable.

Al igual que en la CNO, detectamos células S100⁺/GS⁺ en el interior del SIO pero nunca formando parte de la limitante glial (Figs. 50I, L). Dado que todas las células GS⁺ son oligodendrocitos Sox10⁺, deducimos que la subpoblación de células S100⁺/GS⁺ (Fig. 49J) son oligodendrocitos. En tenca se han clasificado las células S100⁺ del SIO, atendiendo a su morfología, como astrocitos y oligodendrocitos (Clemente *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 1997). Sin embargo, estos oligodendrocitos S100⁺ son negativos a GS, siendo la población astrocitaria S100⁺ la que presenta marcaje con GS (Clemente *et al.*, 2008).

De forma similar a la CNO, en algunas células la proteína S100 se sitúa únicamente en el núcleo o en zonas citoplasmáticas perinucleares, y en otras células también se extiende por el citoplasma (Fig. 49K).

Como ha sido ampliamente descrito, los astrocitos reticulares del NO, caracterizados por presentar el filamento intermedio citoqueratina en su citoplasma y que contactan entre ellos mediante uniones estrechas, se encuentran empaquetando los fascículos nerviosos en el SIO (Cohen *et al.*, 1993; Easter *et al.*, 1981; Giordano *et al.*, 1989; Lillo *et al.*, 1998; Mack y Wolburg, 2006; Maggs y Scholes, 1986; Maggs y Scholes, 1990; Wolburg *et al.*, 1983). En nuestro trabajo mostramos que los astrocitos Pax2⁺/citoqueratina⁺ y Pax2⁺/ZO⁺ se encuentran empaquetando los axones mielinizados MBP⁺, así como el borde en crecimiento (Figs. 50F, K). Pero también observamos

células negativas a Pax2 que son citoqueratina⁺ y ZO1⁺. Como se ha analizado previamente, puede tratarse de astrocitos ya que en este trabajo hemos descrito una subpoblación de astrocitos Pax2⁻ mediante IHQ con oro coloidal. Sin embargo, con el doble marcaje Sox10-citoqueratina no estamos completamente seguros de la ausencia de células Sox10⁺/citoqueratina⁺ (Fig. 50N).

Hay datos en la bibliografía que sugieren que los oligodendrocitos pueden presentar ambas proteínas: ZO1 y citoqueratina. Por un lado, la proteína ZO1, aunque inicialmente se identificó en uniones estrechas, se ha encontrado tanto en uniones adherentes (Herranz, 2009; Itoh *et al.*, 1999; Paffenholz *et al.*, 1999) como en uniones GAP (Li *et al.*, 2004; Penes *et al.*, 2005). En las uniones GAP, la proteína ZO1 interacciona con proteínas conexas, formando parte de las uniones astrocito-astrocito y astrocito-oligodendrocito (Li *et al.*, 2004; Penes *et al.*, 2005). Aunque en el NO de teleósteos no se han detectado este tipo de uniones entre las membranas del soma de astrocitos y oligodendrocitos (Lillo *et al.*, 1998), no descartamos que algunas de las células ZO1⁺ negativas para Pax2 puedan ser oligodendrocitos. Por otro lado, aunque las citoqueratinas son exclusivas de astrocitos del NO de teleósteos (Giordano *et al.*, 1989; Maggs y Scholes, 1990), se ha descrito la presencia de estos filamentos intermedios en líneas celulares de oligodendrocitos de mamíferos (Campagnoni *et al.*, 2001; Kashima *et al.*, 1993). Además, mediante estudios de microscopía electrónica del NO de carpín (Figs. 43C, E) y de tenca (Lillo *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2002) hemos observado células gliales sin las características típicas de astrocitos u oligodendrocitos. Estas células podrían ser células en estadios de maduración intermedios, susceptibles de presentar marcadores de ambos tipos celulares tales como Sox10 y citoqueratina.

Finalmente, en el SIO parece haber una baja tasa de proliferación de oligodendrocitos en carpines adultos, dado que detectamos escasas células Sox10⁺/PCNA⁺ (Fig. 50Ñ), coincidiendo con los resultados obtenidos con las células S100⁺/PCNA⁺ y Pax2⁺/PCNA⁺. Además, estas células Sox10⁺/PCNA⁺ siempre se sitúan entre los axones y no formando parte de la limitante glial.

1.4 LA ASTROGLÍA DE LA CNO

Se ha demostrado en los diferentes grupos de vertebrados: mamíferos (Fujita *et al.*, 2000; May y Lutjen-Drecoll, 2002; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996), aves (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Quesada *et*

al., 2004; Schuck *et al.*, 2000), reptiles (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000), anfibios (Fujita *et al.*, 2000) y peces (Fujita *et al.*, 2000; Koke *et al.*, 2010; Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009, nuestros resultados), que la población glial de la CNO presenta una organización y características diferentes a las del resto del NO. Concretamente, la astrogliá de la CNO se ha especializado atendiendo a las necesidades del órgano en esa región.

En primer lugar, como se ha analizado ampliamente en la introducción, tanto durante el desarrollo embrionario como en animales que presentan fenómenos de crecimiento continuado, los astrocitos de la CNO son responsables de la producción de numerosas moléculas de guía axonal (Adams *et al.*, 1996; Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001; de la Torre *et al.*, 1997; Deiner *et al.*, 1997; Lauderdale *et al.*, 1997; Macdonald *et al.*, 1997; Morcillo *et al.*, 2006; Oster *et al.*, 2004; Raper, 2000; Strahle *et al.*, 1997; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Torres *et al.*, 1996).

En animales adultos, la limitante glial de la retina-CNO protege de fuerzas tensionales. De manera que en mamíferos los astrocitos contienen gran cantidad de paquetes de filamentos intermedios GFAP⁺ en su citoplasma, a diferencia de otros astrocitos similares situados en la CFNO (Triviño *et al.*, 1996). En aves se han detectado unas células específicas en esa zona, denominadas glía peripapilar, que expresan GFAP y vimentina (Quesada *et al.*, 2004; Schuck *et al.*, 2000). En teleósteos, las células de Müller presentan unos procesos vitreales GFAP⁺ más gruesos que en el resto de la retina, estableciendo el límite de la retina vitreal con la CNO. En el límite de la retina escleral, coroides y esclera con la CNO, son astrocitos que expresan GFAP los que se encargan de proteger de fuerzas tensionales en estos animales (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009).

Por otro lado, los astrocitos de la CNO aseguran la nutrición de la retina. En retinas vasculares como los de mamíferos, los astrocitos acompañan a los vasos sanguíneos (Chan-Ling *et al.*, 2004; Triviño *et al.*, 1996). En retinas avasculares como los de reptiles y aves, son los astrocitos especializados del *pecten* o *conus papillaris* los que se encargan de transferir los nutrientes a la retina (Casañas, 2005; Quesada *et al.*, 2004; Schuck *et al.*, 2000). En peces, aunque la retina es avascular, los vasos sanguíneos se distribuyen a lo largo de toda la superficie vitreal de la retina, y son los pies de las células de Müller los que desde la entrada de la AC en la CNO establecen

contacto con los vasos sanguíneos (Álvarez *et al.*, 2007).

Finalmente, en la zona posterior de la CNO de los animales que presentan lámina cribosa, los astrocitos se organizan junto al tejido conjuntivo formando columnas a través de las cuales discurren los axones (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996). En animales sin lámina cribosa, los astrocitos igualmente se organizan de forma particular dando lugar a estructuras que recuerdan a la lámina cribosa pero sin la participación del tejido conjuntivo (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000; nuestros resultados).

Dada esta clara especialización de los astrocitos de la CNO, se ha propuesto que tienen un origen embrionario diferente al resto de astrocitos del NO (Ling y Stone, 1988; Macdonald *et al.*, 1997; Mi y Barres, 1999; Schnitzer, 1988; Stone y Dreher, 1987; Tsai y Miller, 2002; Watanabe y Raff, 1988). Dos descubrimientos recientes apoyan esta teoría: 1) las células de la CNO presentan características embrionarias diferentes a las del NO, de manera que los progenitores de astrocitos Pax2⁺ de esta región dependen de la actividad secuencial de las proteínas MBP7 y Shh, a diferencia del resto de progenitores astrocitarios del tallo óptico (Morcillo *et al.*, 2006); y 2) se ha identificado una nueva fuente de formación de astrocitos proveniente de la superficie ventricular que forma un anillo en torno a la CNO (Chan-Ling *et al.*, 2009). Nuestros resultados apoyan esta teoría, dado que fundamentalmente la producción de nuevos astrocitos caracterizados como Pax2⁺/PCNA⁺ se localiza en este límite retina-CNO, que probablemente se conserve desde el desarrollo embrionario.

2. MODIFICACIONES EN LA CNO TRAS LESIÓN: CRIOLESIÓN Y PINZAMIENTO

2.1 EXPRESIÓN DE PAX2

VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PAX2 Y PAX6

En los últimos años, se está analizando el papel de numerosas proteínas responsables del desarrollo del sistema visual durante el proceso de regeneración (ver Introducción, Apdo. 3.2: Regeneración: Regeneración del NO). Se ha propuesto que los

factores de transcripción Pax6 y Pax2, que se expresan en la retina y el NO, respectivamente, son candidatos importantes a jugar un papel fundamental durante la regeneración (Ziman *et al.*, 2001). Se han realizado diversas investigaciones sobre las variaciones de la expresión de Pax6 en la retina durante la regeneración de la retina en carpín y tenca (Cid, 2006) y de NO en pez cebra y lagarto (*Ctenophorus ornatos*) (Rodger *et al.*, 2006). Sin embargo, no disponemos de estudios de este tipo sobre el factor de transcripción Pax2. Por lo tanto, nuestro trabajo es el primero en analizar las modificaciones en el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO de carpín, durante la regeneración axonal tras dos tipos de lesión: criolesión de la retina y pinzamiento del NO (Figs. 86A-B).

Así, empleando la técnica de qPCR, tras ambos tipos de lesión, hemos detectado un aumento en el nivel de expresión génica de *pax2a_t2*. Después de la criolesión, el aumento se produce a partir de los 7d y se incrementa paulatinamente hasta el día 30, a partir del cual comienza a descender (Fig. 86A). Sin embargo, tras el pinzamiento el aumento se produce rápidamente y de forma más acentuada a los 2d y a partir de ese momento comienza a descender, pero manteniendo unos niveles altos hasta el final de la regeneración a los 120d (Fig. 86B).

Al comparar las variaciones del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO con el de *pax6* en la retina de carpín y tenca durante la regeneración postcriolesión (Cid, 2006; nuestros resultados) (Figs. 87A-B), observamos que cuando *pax2a_t2* aumenta a partir de los 7d postlesión, *pax6* disminuye. Esta situación se mantiene hasta los 30d postlesión, cuando el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* decrece y se produce el aumento del nivel de *pax6*. La alternancia en los niveles de expresión génica de ambos genes durante la regeneración, sugiere que se producen mecanismos de inhibición recíproca similares a los descritos durante el desarrollo embrionario (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996; Macdonald *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 1996).

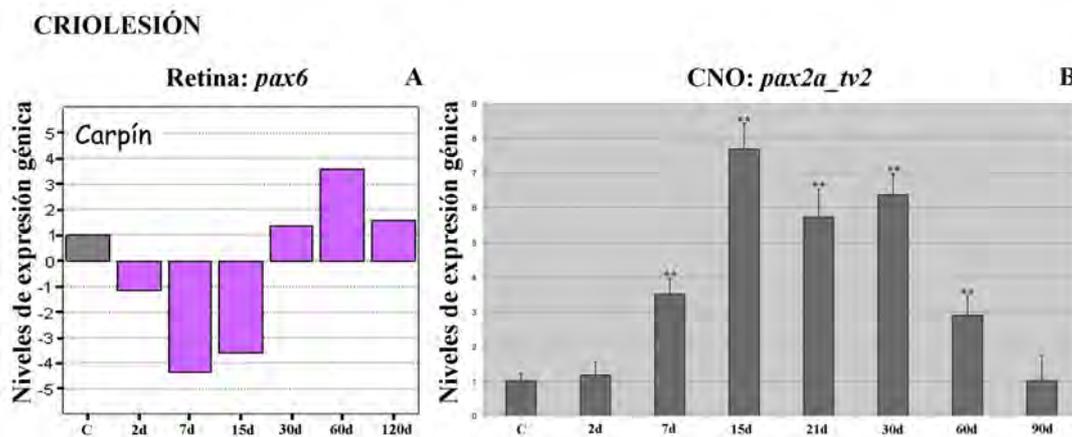


Figura 87: Comparación entre los niveles de expresión génica de *pax6* en retina (A) (Cid, 2006) y *pax2a_tv2* en la CNO de carpín criolesionado (B) (nuestros resultados).

De la misma manera, si comparamos el nivel de expresión génica de *pax2a_tv2* en la CNO con la producción de proteína Pax6 en la retina de pez cebra durante la regeneración postpinzamiento (Rodger *et al.*, 2006; nuestros resultados) (Figs. 88A-B), observamos que el nivel de mRNAs de *pax2a_tv2* aumenta a partir de los 2d postlesión, mientras que la producción de proteína Pax6 se encuentra disminuida a los 7d. A partir de los 15d el nivel de expresión génica de *pax2a_tv2* todavía se mantiene alto, aunque es inferior al período de regeneración inicial. A este tiempo, la síntesis de proteína Pax6 aumenta y se mantiene alta hasta los 30d postlesión. En la etapa tardía de regeneración (90-120 d), el nivel de *pax2a_tv2* en la CNO de carpín sufre un nuevo descenso y va adquiriendo valores próximos al control, mientras que en pez cebra los niveles de proteína Pax6 se asemejan a la de la retina control a los 60d. Al igual que proponemos en criolesión, durante la regeneración postpinzamiento es posible que se produzca una inhibición recíproca Pax2-Pax6 durante la regeneración temprana tal y como se ha descrito en desarrollo embrionario (Macdonald *et al.*, 1995; Macdonald y Wilson, 1996; Macdonald *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 1996). Sin embargo, en etapas posteriores, aunque el aumento de la producción de la proteína Pax6 supone un descenso del nivel de expresión génica de *pax2a_tv2*, desconocemos los mecanismos por los cuales ambos conviven en unos niveles de expresión superiores al del animal control (Fig. 88). No hay que olvidar que durante el desarrollo del sistema visual participan otros genes responsables de regular la expresión de *pax2*, como por ejemplo *shh* y AR que se analizarán en el apartado siguiente, o *fgf8* y *lhx2* sobre los cuales no hemos encontrado ningún estudio en regeneración (Goode y Elgar, 2009). Todos ellos podrían

estar participando en la regulación de la expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO durante la lesión, manteniendo su nivel de expresión por encima del control a pesar del alto nivel de expresión de Pax6 en la retina durante los mismos tiempos de supervivencia.

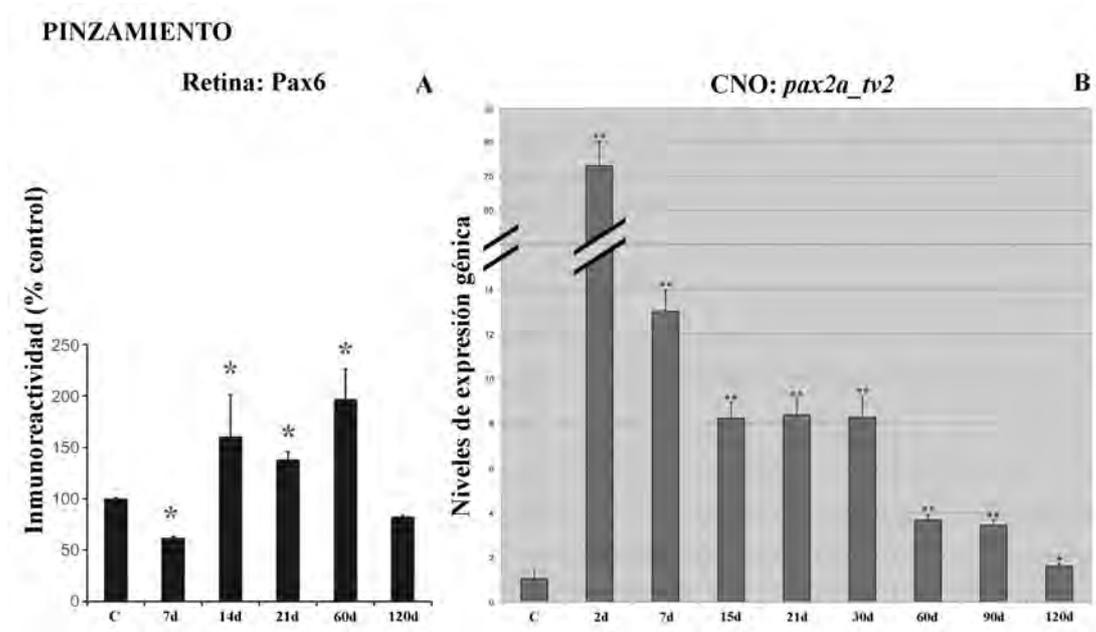


Figura 88: Comparación entre la expresión de Pax2 en la retina de pez cebra (A) (Rodger *et al.*, 2006) y el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO de carpín (B) (nuestros resultados), ambos durante la regeneración postpinzamiento.

La inhibición de expresión de Pax6 y, por tanto, el aumento del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* (Figs. 86A-B) (Cid, 2006; Rodger *et al.*, 2006), parecen estar relacionado con la regeneración espontánea de los axones, la reorganización de los mismos y su empaquetamiento hasta llegar al QO. Este fenómeno ocurre durante el inicio de la regeneración postpinzamiento (7-14d en pez cebra, 7-30d en carpín) (Figs. 67A-C, 68B) (Bernhardt *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2003; Matsukawa *et al.*, 2004a). En la regeneración postriolesión, este fenómeno se encuentra retrasado, dado que no se detecta la llegada de los primeros axones de las células ganglionares generadas *de novo* a la CNO hasta los 15d, alcanzando su pico máximo a los 30d (Fig. 54I) (Jimeno, 2001).

Por el contrario, el aumento de expresión de Pax6 durante la regeneración postpinzamiento parece estar relacionado con la llegada de los axones al techo óptico y la formación y refinamiento de las conexiones sinápticas (a partir de los 14d en pez

cebra y durante los 40-100d en carpín) (Matsukawa *et al.*, 2004a; Rodger *et al.*, 2006). Este proceso es coincidente con el segundo descenso en la expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO de carpín (Fig. 86B). Sin embargo, a pesar del vigoroso crecimiento axonal que se produce al inicio de la regeneración tras pinzamiento, todavía se observan axones regenerantes en etapas tardías (120d) (Velasco *et al.*, 2000) y, por tanto permanece la necesidad de reorganizar y empaquetar estos axones. Esto podría explicar el mantenimiento del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* a los 60-120d postlesión, superior a los animales control (Fig. 86B). Por otro lado, no disponemos de estudios que analicen la llegada de los axones regenerantes al techo óptico y el refinamiento de las conexiones tras criolesión. Nosotros suponemos que este proceso es posterior al crecimiento axonal, a partir de los 60d, momento en que se alcanza el máximo nivel de expresión génica de *pax6* (Cid, 2006) y disminuye el nivel de expresión génica de *pax2a_t2* (Fig. 86A).

REGULACIÓN DE PAX2

Un posible candidato para regular el nivel de expresión génica de *pax2* en la CNO es el AR, vía la proteína purpurina. La proteína purpurina (proteína específica de la retina que une al retinol) se ha identificado recientemente en la retina de pez cebra tanto en desarrollo embrionario como en animales adultos (Matsukawa *et al.*, 2004b). Durante los primeros días de regeneración postpinzamiento en pez cebra (2-5d) esta proteína es secretada por los fotorreceptores y tomada por las células ganglionares (Tanaka *et al.*, 2007), éstas promueven la síntesis de AR que, a su vez, estimula su crecimiento axonal (Matsukawa *et al.*, 2004b; Nagashima *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2007). Durante el desarrollo embrionario Pax2 es diana del AR (Goode y Elgar, 2009; Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000). Dado que los niveles máximos de expresión génica de *pax2a_t2* en la CNO de carpín se producen durante ese mismo periodo de tiempo (Fig. 86B), es muy probable que Pax2 esté regulado por el AR, al menos durante la regeneración postpinzamiento (Fig. 89).

Otra proteína candidata en la regulación del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* es Shh. Estudios preliminares en retinas criolesionadas de carpín, muestran que el nivel de expresión génica de *shh* disminuye a partir de los 2d y se mantiene inferior al nivel control hasta los 60d y a partir de entonces aumenta hasta 9 veces respecto a los animales control (datos no mostrados en este trabajo). Durante las etapas

del desarrollo del sistema visual definidas por el establecimiento del eje dorso-ventral, formación del DO y fisura coroidea, y posteriormente, en la formación del tallo óptico y guía axonal, Shh promueve la expresión de Pax2 (Bertuzzi *et al.*, 1999; Dakubo *et al.*, 2003; Ekker *et al.*, 1995; Mui *et al.*, 2005; Soukkarieh *et al.*, 2007; Take-uchi *et al.*, 2003). Sin embargo, al final del desarrollo, cuando se forma el QO, Pax2 inhibe la expresión de Shh (Goode y Elgar, 2009; Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996). La represión del nivel de mRNA de *shh* en la retina hasta los 60d postcriolesión, parece estar determinada por el aumento del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* durante este periodo de supervivencia (Figs. 86A, 89). Como se menciona repetidas veces en este trabajo, Shh es crucial para la correcta diferenciación de los distintos tipos celulares de la retina y en concreto, de las células ganglionares. Además, se ha demostrado que la diferenciación de progenitores neurales a células ganglionares es inhibida si los niveles de Shh son muy altos (Spence *et al.*, 2004; Zhang y Yang, 2001). El máximo nivel de expresión génica de *shh* detectado en la retina a los 60d postcriolesión coincide con la disminución de células ganglionares Zn8⁺ recién formadas en la ZPG (Fig. 54J).

GENES REGULADOS POR PAX2

Uno de los genes diana de Pax2 es la *netrina-1*, ya que Pax2 regula su expresión en la CNO durante el desarrollo embrionario (Dakubo *et al.*, 2003; Goode y Elgar, 2009; Macdonald *et al.*, 1997). La Netrina-1 es responsable de guiar a los axones de las células ganglionares hacia la CNO e introducirse en el NO (de la Torre *et al.*, 1997; Deiner *et al.*, 1997; Lauderdale *et al.*, 1997; Strahle *et al.*, 1997). La expresión de Netrina-1 en la CNO de carpín adulto se mantiene, y se ha comprobado que tras pinzamiento del NO (14d postlesión) se produce un incremento de receptores de Netrina-1 en los axones de las células ganglionares (Petrausch *et al.*, 2000). Sin embargo, no se han analizado las variaciones en la expresión de Netrina-1 en la CNO después de lesión. Es muy probable que las modificaciones en la expresión génica de *pax2a_t2*, que describimos en este estudio, estén alterando la expresión de Netrina-1, por eso sugerimos futuros experimentos para comprobar esta hipótesis (Fig. 89).

Otro grupo de proteínas reguladas indirectamente por Pax2 vía Pax6 son las EfrinasB1/B2 y sus receptores tiroxina kinasa EphB2/B3 (Goode y Elgar, 2009; Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000). Su función durante la retinogénesis es impedir que los axones crezcan hacia el lado opuesto de la región de la retina de la que proceden

(Birgbauer *et al.*, 2000; Birgbauer *et al.*, 2001). Así, en ratones lesionados por pinzamiento del NO, se ha comprobado que los axones dañados expresan EfrinaB3 y que los macrófagos que acuden a la zona de lesión expresan el receptor EphB3 promoviendo el crecimiento axonal (Liu *et al.*, 2006). Con estos datos, es muy probable que tanto las EfrinasB1/B2 como sus receptores EphB2/B3 estén también afectados por la lesión promoviendo la regeneración en peces (Fig. 89).

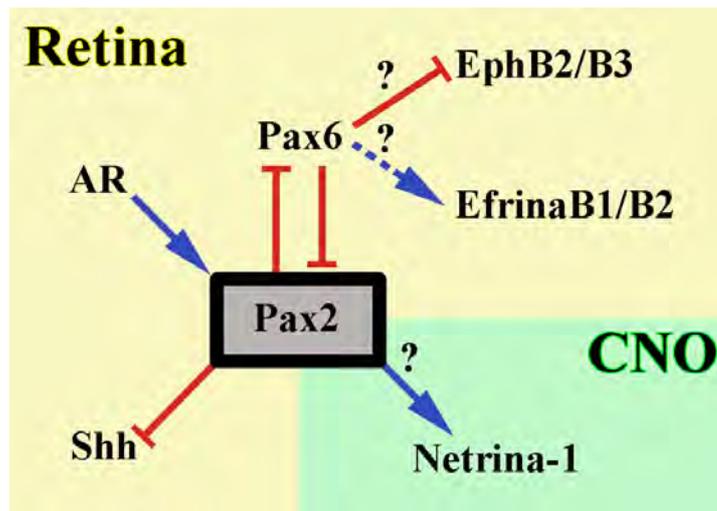


Figura 89: Regulación de Pax2 en la CNO durante la regeneración. Activación (azul), inhibición (rojo), participación de otras proteínas (línea discontinua), hipótesis no comprobadas (interrogante).

2.2 LAS CÉLULAS GLIALES

LOS ASTROCITOS PAX2⁺

A) Papel en la regeneración axonal

En este trabajo de tesis doctoral, analizamos por primera vez la respuesta de los astrocitos Pax2⁺ de la CNO durante procesos de regeneración. Detectamos que, en los dos tipos de lesión (criolesión y pinzamiento), se producen modificaciones en el número de astrocitos Pax2⁺ en la CNO (Figs. 53A, 66A).

A los 7d postcriolesión observamos un descenso en la cantidad de astrocitos Pax2⁺, esto puede deberse a que parte de ellos mueran como consecuencia de la lesión. Nuestras imágenes de microscopía electrónica muestran numerosos axones y mielina en degeneración (Figs. 60C, 61C), así como células en fase de muerte celular tanto a los 7d como a los 21d (Figs. 60C, 62B). Sin embargo, en los animales pinzados durante esos mismos periodos de supervivencia son escasas las zonas en degeneración en la CNO y se sitúan principalmente en la zona posterior de la CNO (Figs. 74A, 77B). Hay que

tener en cuenta que la lesión de la ZPG elimina el soma de células ganglionares de la periferia (Jimeno, 2001), cuyos axones sufren rápidamente procesos de degeneración. El fenómeno de degeneración neuronal en mamíferos implica la liberación de numerosas señales de muerte celular como la caspasa-3 o Bax (Koriyama *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 1994). Estas señales pueden afectar la supervivencia de las células vecinas; concretamente, los astrocitos establecen contacto con los axones así como entre ellos (Danesh-Meyer *et al.*, 2008; García y Koke, 2009; James y Butt, 2001; Kerr *et al.* 2010) siendo susceptibles de iniciar procesos de muerte celular. Estos datos podrían explicar el descenso en el número de estas células Pax2⁺. Por el contrario, en la retina de los animales pinzados, hay controversia en cuanto a la detección de apoptosis en la CCG. Algunos autores demuestran que no hay muerte celular en peces cebras pinzados (García y Koke, 2009; Rodger *et al.*, 2006); sin embargo, otros autores demuestran lo contrario tanto en pez cebras (Zhou y Wang, 2002) como en carpín (Murray, 1982). En cualquiera de los casos, se inhiben las señales de muerte celular (caspasa-3 y Bax) y se activan las de supervivencia celular como fosfo-Akt o Bcl-2 (Koriyama *et al.*, 2006). Nosotros tampoco detectamos ningún descenso en el número de astrocitos Pax2⁺ de la CNO de carpín por debajo del nivel control (Fig. 66A).

Por otro lado, en ambos tipos de lesión, se produce un aumento en el número de astrocitos Pax2⁺ coincidente con la llegada masiva de axones regenerantes Zn8⁺ a la CNO, tanto en tenca como en carpín durante los primeros días de supervivencia (Jimeno *et al.*, 2003; Matsukawa *et al.*, 2004a). Probablemente este aumento de astrocitos Pax2 en la CNO sea necesario para la guía hacia el NO de estos nuevos axones (García y Koke, 2009; Jimeno *et al.*, 1999; Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009; Stuermer y Bastmeyer, 2000; Velasco *et al.*, 1997). Durante la regeneración postpinzamiento se produce un segundo incremento en la cantidad de astrocitos Pax2⁺ a los 60-120d de supervivencia, correspondiente al periodo de remielinización de la CNO (Fig. 71J) y del NO (Matsukawa *et al.*, 2004a; Murray, 1982), así como el momento de refinamiento de conexiones en el techo óptico en carpín (Matsukawa *et al.*, 2004a; Meyer, 1980; Meyer y Kageyama, 1999). Este aumento de astrocitos en la CNO puede estar relacionado con el empaquetamiento y adquisición de la organización original de los axones (García y Koke, 2009; Jimeno *et al.*, 1999; Lillo *et al.*, 2002; Mack y Wolburg, 2006; Parrilla *et al.*, 2009; Velasco *et al.*, 1997). Finalmente, en ambos tipos de lesión, al final del periodo de regeneración el número de astrocitos Pax2⁺ disminuye hasta adquirir cifras

similares al control (Figs. 53A, 66A). Desconocemos si esta disminución es provocada por fenómenos de muerte celular o por pérdida del fenotipo positivo a Pax2.

Cuando comparamos el aumento del nivel de expresión génica de *pax2a_t2* de ambos tipos de lesión frente al número de células Pax2⁺, observamos un retraso temporal de la detección de la proteína frente al mRNA. Este retraso se ve incrementado en el caso de la criolesión donde, además de disminuir el número de células Pax2⁺, su intensidad de marcaje es menor (Fig. 54A). Desconocemos cuál es el motivo por el cual se produce este retraso, dado que, como se analiza al inicio de la discusión (Apdo 1.1 Pax2 en el NO: Regulación de Pax2), hay muy pocos estudios sobre regulación de Pax2. Se sabe que Pax2 tiene dominios de unión a otras proteínas, como por ejemplo JNK y Grg4, y es susceptible de ser fosforilada (Cai *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2003). Por lo tanto, sería interesante determinar si estas modificaciones producen un cambio en la antigenicidad haciéndola indetectable mediante técnicas IHQ, lo que explicaría las diferencias encontradas entre el nivel de expresión génica y el marcaje de la proteína en el tejido.

Mediante marcaje a microscopía electrónica, las únicas células que observamos inmunoreactivas para Pax2 son astrocitos, tanto en criolesión (Figs. 59G-H, 60A, 63D) como en pinzamiento (Figs., 75D, 76A-D, 77A-B, 81A-D, 82C), aunque también detectamos astrocitos negativos a Pax2. Durante el pinzamiento, observamos una gran cantidad de estos astrocitos Pax2⁺ en los tiempos de supervivencia analizados, tal y como contabilizamos a microscopía óptica (Fig. 66A). Sin embargo, durante la criolesión estos astrocitos son muy escasos. La poca cantidad de astrocitos Pax2⁺ detectados mediante microscopía electrónica a los 7d postcriolesión, coincide con los resultados de inmunomarcaje a microscopía óptica (Fig. 53A). Sin embargo, el escaso número de astrocitos positivos a Pax2 a los 21d postcriolesión obtenidos por MET se contradice con los resultados obtenidos mediante IHQ de fluorescencia; creemos que esto puede deberse a la mala penetración del anticuerpo en estas muestras.

Además, observamos tanto astrocitos Pax2⁺ como Pax2⁻ fagocíticos (Figs. 60D, 62C, 77A-C). En los fagosomas contienen tanto restos de mielina degenerada como gránulos de pigmento procedentes del EP, que sufre desorganización como consecuencia de ambos tipos de lesión (Lillo *et al.*, 2001). La capacidad fagocítica de los astrocitos ya ha sido probada en numerosos procesos de degeneración. En teleósteos,

se ha descrito tanto en la CNO de tenca (Lillo, 2001) como en el NO de carpín (Colavincenzo y Levine, 2000; Nona, 1998), ayudando a la microglía a retirar los restos celulares más rápidamente, para favorecer la regeneración.

En el DO entre los axones, mediante microscopía óptica y electrónica, hemos detectado núcleos de astrocitos Pax2⁺ con uno o dos nucleolos negativos a este marcador. Estas células las observamos durante las etapas de crecimiento axonal a los 7-21d postpinzamiento (Fig. 68B) y a los 21-30d postcriolesión (Figs. 54E, H), sugiriendo que presentan una gran actividad. Las características morfológicas de hipertrofia del cuerpo celular y núcleo, sumados con la elongación del citoplasma y los procesos son típicos de la reacción astrocitaria en el SNC ante una lesión (García y Koke, 2009). Curiosamente, este fenómeno de hipertrofia también se ha descrito en las células ganglionares a partir de los 10-12d postpinzamiento, que se recuperan a partir los 40-100d de supervivencia (Devadas *et al.*, 2000; Grafstein, 1975; Murray, 1982). La actividad hipertrófica se ha relacionado con la aceleración de señales de supervivencia e inhibición de señales proapoptóticas (Koriyama *et al.*, 2006). Desconocemos si estas modificaciones morfológicas en los astrocitos están relacionadas con una astrogliosis típica o, como ocurre en las células ganglionares constituyen un sistema de protección frente a la apoptosis.

B) Proliferación de los astrocitos Pax2⁺

Aunque no hemos realizado un recuento del número de células Pax2⁺/PCNA⁺ durante la regeneración, en ambos tipos de lesión se aprecia un notable aumento en la cantidad de co-localizaciones que se inicia a partir de los 7d postlesión y continúa hasta tiempos de supervivencia tardíos (Figs. 57, 72). Tal y como ocurre en el control, estas células Pax2⁺/PCNA⁺ se sitúan fundamentalmente en la limitante glial de la AC y la limitante glial de la zona IO1, pero son más numerosas en lesión (Parrilla *et al.*, 2009). No obstante, también detectamos células Pax2⁺/PCNA⁺ entre los axones, especialmente en los animales pinzados, debido probablemente a la magnitud de la lesión (Matsukawa *et al.*, 2004a).

En la zona IO1 se observa una alta concentración de células PCNA⁺, formando un anillo en torno a la CNO. Formando parte de este anillo detectamos astroblastos Pax2⁺/PCNA⁺ y astrocitos Pax2⁺/ZO1⁺ que se introducen ligeramente hacia el límite del

NO con la retina (especialmente llamativos en animales pinzados). Estos datos sugieren una activación del anillo de producción de astrocitos descrito durante el desarrollo embrionario en rata y humano (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001), probando su existencia en carpín mediante este trabajo.

Nuestros resultados de microscopía electrónica, muestran que el marcaje positivo a Pax2 no sólo se sitúa en el núcleo de los astrocitos maduros, sino que también está presente en el núcleo de astrocitos inmaduros (Fig. 78E) (Lillo *et al.*, 2002), así como en el citoplasma de astrocitos que han iniciado el proceso de división celular (Figs. 78A, D) (Lillo, 2001; Peters *et al.*, 1991). Sin embargo, la mayor parte de las células que se encuentran en división no son positivas a Pax2 (Figs. 79A-B), tratándose de otros tipos celulares como analizaremos más adelante.

Dada la alta proliferación que se produce en la CNO en ambos tipos de lesión, especialmente durante los primeros días de supervivencia, tal y como ocurre en desarrollo embrionario, Pax2 pudiera ejercer una triple función en las células que lo expresan: 1) promover su supervivencia (Mi y Barres, 1999; Torban *et al.*, 2000), 2) asegurar su identidad como astrocitos (Macdonald *et al.*, 1997; Soukkaieh *et al.*, 2007; Stanke *et al.* 2010; Torres *et al.*, 1996) y, 3) impedir su diferenciación a células pigmentadas (Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996).

Para finalizar, hemos detectado mitocondrias con morfología de media luna o de lupa que siempre están asociadas a células en división o próximas a la fase de división positivas o negativas a Pax2. Desconocemos cuál es el significado biológico de esta morfología, pudiendo tratarse de mitocondrias que aíslan porciones de citoplasma circundante o simplemente que se están dividiendo.

LOS ASTROCITOS S100⁺, GFAP⁺, ZO1⁺ y CITOQUERATINA⁺

A) Papel en la regeneración axonal

Encontramos que estas subpoblaciones gliales reaccionan en la CNO de forma antagonista en ambos tipos de lesión. Durante los primeros tiempos de supervivencia postriolesión, observamos un incremento en los procesos de astrocitos S100⁺ situados entre los axones (Figs. 55A-B), tal y como se ha descrito en tenca (Jimeno *et al.*, 1999). Sin embargo, este aumento no se produce en los animales pinzados ni en carpín (Figs.

70A-B) ni en tenca (Vecino *et al.*, 1997). Por el contrario, el marcaje para GFAP y citoqueratina, que apenas experimenta cambios en los animales criolesionados al compararlos con el control (datos no mostrados) (Jimeno *et al.*, 1999), aumenta en animales pinzados, especialmente en las zonas de la limitante glial (Figs. 67D, H, 68E, I, N, 70D). En ambos tipos de lesión observamos una fuerte reacción glial GFAP⁺/S100⁺/GS⁺ formando un anillo en torno a la CNO limitando con la coroides y esclera no descrito hasta ahora (Figs. 55C, F-H, 70D, I, K), que en algunos animales pinzados puede detectarse hasta períodos de supervivencia de 180d debido probablemente a que la lesión ha sido algo más agresiva que en el resto (Fig. 72N).

La proteína S100 participa en numerosas funciones, entre ellas presenta actividad neurotrófica previniendo la muerte neuronal y promoviendo el crecimiento axonal, y tiene actividad quimioatrayente en la respuesta inflamatoria (Donato, 2001; Marenholz *et al.*, 2004). Dada la elevada cantidad de elementos en degeneración y células extravasadas que detectamos mediante MET en los animales criolesionados (Figs. 60C, 61C), es muy posible que el aumento de marcaje para S100 en estos animales esté relacionado con dichas funciones. Además, la proteína S100 está involucrada en la dinámica del citoesqueleto (Donato, 2001; Marenholz *et al.*, 2004). Al inicio de la criolesión no sólo observamos gran cantidad de procesos S100⁺ sino que, mediante MET, detectamos numerosos somas celulares con núcleos eucromáticos y escotados que nos sugieren que se trata de astrocitos, en cuyo citoplasma no observamos filamentos intermedios pero sí los encontramos en gran cantidad en las prolongaciones astrocitarias de alrededor (Figs. 61C-D, 63B-D). Es posible que, como consecuencia de la lesión, los astrocitos extiendan sus prolongaciones y los filamentos intermedios se sitúen en dichas prolongaciones por mediación de la proteína S100, dificultando la caracterización de los astrocitos en la CNO de estos animales.

Por otro lado, tanto la GFAP como la citoqueratina son proteínas estructurales típicas de los somas y procesos astrocitarios encargadas de conferir rigidez y protección a los axones retinianos (Giordano *et al.*, 1989; Lillo *et al.*, 2002; Maggs y Scholes, 1990; Triviño *et al.*, 1996), y se encuentran formando parte de las limitantes gliales de la CNO de teleósteos (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009). El aumento de marcaje para GFAP y citoqueratina en ambas limitantes gliales (rodeando a la AC y la retina-CNO), durante el periodo de máximo crecimiento axonal (Figs. 67D, H, 68E, L) (Matsukawa *et al.*, 2004a), sugiere un refuerzo al establecimiento de los límites del NO

además de proporcionar una rigidez extra a la estructura que se encuentra frágil por el pinzamiento. No hay que olvidar, que el incremento de procesos GFAP⁺ es una característica típica de los astrocitos reactivos ante una lesión (García y Koke, 2009), que ha sido descrita previamente en el área lesionada del NO pinzado de teleósteos (Jimeno *et al.*, 1999; Stafford *et al.*, 1990; Velasco, 1994). Estos astrocitos reactivos emiten sus procesos tratando de reorganizar el NO afectado por la lesión (Jimeno *et al.*, 1999). Por otro lado, el mantenimiento de las queratinas durante la edad adulta del animal parece estar relacionada con los procesos de crecimiento continuado y su capacidad regenerativa tras sufrir una lesión, dado que confiere a los astrocitos características de inmadurez y por tanto mayor plasticidad (Druger *et al.*, 1992; Druger *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 1989; Giordano *et al.*, 1990; Maggs y Scholes, 1990). Es posible que, debido a la magnitud de axones regenerantes que discurren por la CNO tras pinzamiento, permita inmunodetectar modificaciones en la citoqueratina no visibles tras criolesión.

El desarrollo del anillo astrocitario GFAP⁺/S100⁺/GS⁺ en la zona posterior de la CNO y la emisión de sus procesos hacia el interior del NO en ambos tipos de lesión, sugiere su participación en la reorganización de los axones regenerantes, facilitando su entrada en el SIO donde comienza el empaquetamiento de los mismos (Giulian y Iwanij, 1985; Giulian *et al.*, 1985; Jimeno *et al.*, 1999; Murray, 1982; Velasco *et al.*, 1997). Además, refuerza la hipótesis de la existencia de estructuras astrocitarias especiales en una zona similar a la región donde se localiza la lámina cribosa en aves y mamíferos (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000; nuestros resultados en control), que quizás por la ausencia de elementos del conjuntivo, favorezca el proceso de regeneración.

Finalmente, se ha propuesto que los astrocitos durante la regeneración pueden modular el microambiente mediante el establecimiento de uniones estrechas (Mack y Wolburg, 2006), sin embargo, en la CNO no detectamos modificaciones en dichas uniones cuando marcamos la proteína ZO1.

B) Proliferación de las células S100⁺

Al igual que para el marcaje con Pax2, no hemos realizado un recuento del número de células S100⁺/PCNA⁺ durante la regeneración, pero en ambos tipos de lesión

se aprecia un notable aumento de co-localizaciones que se inicia a partir de los 7d postlesión y continúa durante todo el proceso regenerativo (Figs. 57, 72). Sin embargo, encontramos diferencias en la distribución de células $S100^+/PCNA^+$. En criolesión se sitúan fundamentalmente entre los axones y en pinzamiento, además, forman parte de la limitante glial. Estas diferencias en la localización coinciden con las diferencias de inmunorreactividad a S100 que detectamos para cada tipo de lesión. Durante el pinzamiento, por tanto, células $S100^+/PCNA^+$ forman parte del anillo de producción de astrocitos descrito durante el desarrollo embrionario en rata y humano (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001), que permanece activo durante procesos de crecimiento continuado (Parrilla *et al.*, 2009) y regeneración (nuestros resultados). Entre las numerosas funciones de las proteínas S100 están las de progresión del ciclo celular y dinámica del citoesqueleto (Donato, 2001; Marenholz *et al.*, 2004), pudiendo jugar un papel en los fenómenos de división celular. Mediante MET también detectamos células en división sin marcaje para Pax2 (Fig. 79A) y células en estadios inmaduros (Fig. 79C); ambas pueden tratarse de astrocitos Pax2⁻ o astrocitos $S100^+$ aunque también de oligodendrocitos, microglía o células extravasadas.

C) Los astrocitos $S100^+$ en la CFNO

Para finalizar, detectamos numerosas células $S100^+$ distribuidas por toda la CFNO al igual que en control. En tenca pinzada no se han descrito modificaciones en esta población de astrocitos $S100^+$ (Vecino *et al.*, 1997). Estudios preliminares realizados en retinas *in toto* de carpín criolesionado y pinzado muestran un aumento en esta población astrocitaria. Además, en la ZPG criolesionada observamos una fuerte reacción de células $S100^+$ que cubren la zona dañada (Fig. 55D). A partir de los 15d postlesión, coincidente con la zona de detección de columnas de células $PCNA^+$ en la retina adyacente a la zona lesionada en tenca y carpín (Cid, 2006; Jimeno *et al.*, 2003), encontramos astrocitos $S100^+/GFAP^+$ cuyo soma se sitúa en la retina vitreal y emite sus procesos hacia capas esclerales (Figs. 55I-J, N). Proponemos que estas células constituyen una estructura a modo de “andamio” que facilita la adquisición de la organización en capas de la retina perdida por la lesión (Figs. 83F-H).

LAS CÉLULAS $PAX2^+/GS^+$

A diferencia de en los animales control y criolesionados, en la CNO de los animales pinzados detectamos una nueva subpoblación de células caracterizada por ser

Pax2⁺/GS⁺. Estas células se distribuyen desde el DO hasta la CNO posterior, situándose en la limitante glial y entre los axones durante el periodo de crecimiento axonal a los 7d de supervivencia (Figs. 67F-G) (Matsukawa *et al.*, 2004a). En etapas posteriores de regeneración, su ubicación queda restringida a la CNO posterior (Figs. 68I-K, 69F-H). Esta gran variabilidad celular durante la regeneración del NO ya ha sido descrita previamente mediante MET (Blaugrund *et al.*, 1993; Lillo, 2001; Sivron y Schwartz, 1995). En estos estudios observan astrocitos, oligodendrocitos, células inmaduras y numerosas células que presentan características ultraestructurales intermedias entre ambos tipos macrogliales (Lillo, 2001). Nuestros resultados de MET también muestran esta variabilidad macroglial, aunque únicamente los astrocitos y algunas células inmaduras que posiblemente se trate de astrocitos, presentan marcaje para Pax2.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, las células ganglionares pueden liberar glutamato a lo largo de los axones (Kukley *et al.*, 2007). Ante una lesión, se acumulan grandes cantidades de glutamato en el medio extracelular debido a su liberación masiva por parte de las neuronas dañadas (Vardimon, 2000). El glutamato acumulado produce la muerte neuronal por sobreexcitación que, a su vez, causa daño a las células vecinas (Vardimon, 2000). La GS en condiciones normales tiene un papel de detoxificación del glutamato transformándolo a glutamina (Bringmann *et al.*, 2009; Linser *et al.*, 1984; Riepe y Norenberg, 1978; Vardimon, 2000) y protege de la degeneración neuronal teniendo carácter neuroprotector (Gorovits *et al.*, 1997; Vardimon, 2000). Se ha comprobado que en el pinzamiento del NO en ratón (Politis y Miller, 1985) y en carpín (nuestros resultados) se produce un aumento en la expresión de la GS que se interpreta como un intento de controlar la excitotoxicidad por glutamato y proteger al tejido de la muerte celular (Eddleston y Mucke, 1993).

LOS OLIGODENDROCITOS SOX10⁺ Y LA MIELINIZACIÓN

A) Papel en la regeneración y análisis de la mielinización

Se han realizado numerosos estudios analizando el papel de los oligodendrocitos en la regeneración y la remielinización de los axones tras pinzamiento del NO en carpín (Ankerhold y Stuermer, 1999; Bastmeyer *et al.*, 1991; Bastmeyer *et al.*, 1993; Nona *et al.*, 1992; Nona *et al.*, 1998; Nona *et al.*, 2000), así como en zonas distales a la zona

lesionada próximas al QO (Kolb *et al.*, 2000); sin embargo, apenas hay estudios que profundicen sobre estos fenómenos en la CNO (Lillo, 2001).

En nuestro trabajo no detectamos modificaciones en la distribución de los oligodendrocitos Sox10⁺ en la CNO tras criolesión (Figs. 56B, D, G), pero sí un descenso de estas células durante los primeros días postpinzamiento (Fig. 71C), correspondientes al período de regeneración axonal (7d) (Matsukawa *et al.*, 2004a). Aunque no hemos realizado un conteo de estas células, dicha disminución se ve apoyada por la ausencia de células S100⁺ de soma pequeño y sin procesos marcados (Fig. 70A-B), que caracterizamos previamente como oligodendrocitos en los animales control y, como se describe a continuación, por una disminución en la mielinización MBP⁺ de la CNO.

Sin embargo, tanto el marcaje IHQ de la mielina con MBP como las imágenes de microscopía electrónica muestran alteraciones en la mielinización de la CNO en ambos tipos de lesión (Figs. 56, 71). En los animales criolesionados, detectamos zonas dispersas entre los axones negativas a MBP (Figs. 56A, C), coincidentes con numerosas zonas en degeneración observadas mediante microscopía electrónica (Figs. 60C, 61A). Esta degeneración la localizamos durante el principio de la lesión (7-21d), y es debida probablemente a los fenómenos de muerte celular que se desencadenan como consecuencia de la eliminación del soma de las células ganglionares de la periferia (discutido anteriormente). Además, coincide con el descenso de astrocitos Pax2⁺ y la respuesta astrocitaria S100⁺, previa a la llegada masiva de los axones jóvenes Zn8⁺ (Jimeno *et al.*, 1999; Jimeno, 2001; nuestros resultados). En los animales pinzados, a los 7-21d postlesión apenas detectamos marcaje para MBP (Figs. 71A, D) dado que mayoría de los axones que discurren por la CNO son regenerantes Zn8⁺ (Figs. 74B, 75A, 80C) (Matsukawa *et al.*, 2004a) y carentes de mielina. Únicamente se observan zonas en degeneración situadas en la parte posterior de la CNO (Figs. 77B, D, F). Este resultado es especialmente llamativo, dado que en numerosos estudios se describe una rápida respuesta regenerativa de los axones lesionados en la zona de pinzamiento (Benowitz y Lewis, 1983; Dunlop *et al.*, 2002; Grafstein y Murray, 1969; Grafstein, 1986; Murray, 1982; Perrone-Bizzozero y Benowitz, 1987; Quitschke y Schechter, 1983; Zhou y Wang, 2002); sin embargo, debe de existir un proceso de degeneración retrógrado previo dada la fuerte desmielinización que sufre la CNO al inicio de la regeneración (Figs. 71A, D), quizás relacionada con el proceso de apoptosis que sufren

las células ganglionares descrito por algunos autores (Murray, 1982; Zhou y Wang, 2002). Estos resultados coinciden con el descenso de oligodendrocitos Sox10⁺, el aumento de células Pax2⁺, la reacción glial GFAP⁺/citoqueratina⁺ y la aparición de células Pax2⁺/GS⁺ (nuestros resultados).

Se ha propuesto que la pérdida de contacto con los axones produce la muerte de los oligodendrocitos (Barres *et al.*, 1993; Takada *et al.* 2010; Trapp *et al.*, 1997). Sería interesante analizar si la disminución del marcaje Sox10 se debe a la muerte de los oligodendrocitos o una inhibición del factor de transcripción. Por otro lado, experimentos en los que se analiza el nivel de expresión génica de *sox10* no solo en la CNO sino en todo el SIO pinzado, aportarían información valiosa de la función de esta proteína en los procesos de remielinización. Se ha comprobado que Sox10 está involucrado en la síntesis de proteínas de la mielina como MBP (Wegner y Stolt, 2005; Wegner, 2008) y de integrinas que, a su vez, interaccionan con lamininas (Takada *et al.* 2010). Las neuronas expresan lamininas (Liesi *et al.*, 2001) y durante la mielinización los axones se rodean de una matriz extracelular rica en laminina (Colognato *et al.*, 2002; Farwell y Dubord-Tomasetti, 1999).

En cuanto a la eliminación de los restos de mielina, axones y células en degeneración, que detectamos mediante microscopía electrónica en la CNO durante los dos tiempos de supervivencia analizados (7d y 21d) tanto en pinzamiento como en criolesión, está a cargo tanto de células microgliales (Figs. 60E, 61E, 74C, 77D, 80E), como granulocitos extravasados (Figs. 63B, 77F), células del epitelio pigmentario que han migrado al NO (Fig. 62D) y astrocitos fagocíticos Pax2⁺ (Figs. 60D, 77A-B) y Pax2⁻ (Figs. 62C, 77C), tal y como se ha descrito en el NO de carpín y tenca pinzados (Kolb *et al.*, 2000; Lillo, 2001).

B) Proliferación de los oligodendrocitos Sox10⁺

Como con el marcaje con Pax2 y S100, no hemos realizado un recuento del número de células Sox10⁺/PCNA⁺ durante la regeneración, pero en ambos tipos de lesión se aprecia un ligero aumento en la cantidad de co-localizaciones, aunque únicamente en tiempos de supervivencia previos a la remielinización: 15-21d postcriolesión (Figs. 58B-C) y 30d postpinzamiento (Fig. 73D).

Estas células Sox10⁺/PCNA⁺ se sitúan entre los axones y, aunque se detectan grupos de células Sox10⁺ próximos al anillo de producción de astrocitos descrito durante el desarrollo embrionario en rata y humano (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001), éstas no son positivas a PCNA. Por todo ello creemos que el anillo de células proliferativas origina exclusivamente astrocitos.

Mediante microscopía electrónica detectamos oligodendrocitos en distintas fases de maduración (Figs. 77G-H, 79D), y aunque no podemos identificar las células en división sin marcaje para Pax2 como oligodendrocitos, todos estos datos en conjunto sugieren que nuevos oligodendrocitos se están formando como consecuencia de la lesión en la CNO. Estos oligodendrocitos proceden probablemente de precursores ya existentes en el animal control, que hemos identificado en este trabajo (Figs. 40H-I), y de la migración de células mielinizantes provenientes de otras zonas como se ha descrito en la zona pinzada (Ankerhold y Stuermer, 1999; Nona *et al.*, 1992; Nona *et al.*, 2000).

LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Las células de Müller juegan un papel fundamental en la guía de los axones hacia la CNO durante el desarrollo embrionario, promoviendo su crecimiento a lo largo de la CFNO e inhibiendo su entrada hacia capas internas de la retina (Bauch *et al.*, 1998; Steinbach y Schlosshauer, 2000; Stier y Schlosshauer, 1995; Stuermer y Bastmeyer, 2000). Además, aportan distintas proteínas a la lámina basal y moléculas de adhesión y reconocimiento celular que, en conjunto, también determinan su avance hacia el DO (Easter *et al.*, 1984; Ledig *et al.*, 1999; Stuermer y Bastmeyer, 2000).

Se ha demostrado que las células de Müller reaccionan ante enfermedades retinianas o lesiones, y así, por ejemplo, dirigen la proteína GS hacia los procesos vitreales de las células donde las células ganglionares liberan glutamato como consecuencia de la lesión, o cambian la conductancia de su membrana perdiendo interacciones con las neuronas (Bringmann *et al.*, 2006). Es conocido que la lesión de la retina central de pez cebra produce la desdiferenciación de las células de Müller adyacentes, que contribuyen a la regeneración de la zona como células progenitoras (Bernardos *et al.*, 2007; Fausett y Goldman, 2006; Fimbel *et al.*, 2007; Senut *et al.*, 2004). Por otro lado, la lesión del NO o de la retina de ratones (Besser *et al.*, 2009;

Wang *et al.*, 2006), o de la retina de anfibios (Ortiz *et al.*, 1992; Reh *et al.*, 1987), produce modificaciones en la composición de la lámina basal y en las moléculas de adhesión, sugiriendo su importancia durante la regeneración. Finalmente, el pinzamiento del NO de carpín y pez cebra produce sobreexpresión de moléculas de adhesión celular, tales como la neuropilina y sus receptores (Lang *et al.*, 2001; Paschke *et al.*, 1992; Petrusch *et al.*, 2000).

Nuestros resultados muestran que los procesos vitreales de las células de Müller presentan desorganización, especialmente llamativa en los animales pinzados durante los primeros días de regeneración (Figs. 31E-F, 34A-B), coincidente con el período de crecimiento axonal (Matsukawa *et al.*, 2004a). Además, se ha descrito un aumento en el marcaje S100⁺ en las células de Müller de tenca tras criolesión (Jimeno *et al.*, 1999). En nuestro trabajo, también observamos desorganización, en ambos tipos de lesión, en las células S100⁺/GS⁺/GFAP⁺ con distribución similar a las células de Müller ubicadas exclusivamente en el DO (Figs. 54D, 55F, H, 70M). Todos estos datos, junto con la detección de axones regenerantes Zn8⁺ que discurren tanto por el borde en crecimiento como por zonas maduras de la CNO de carpín (Figs. 54C, K, 67C, 68A, D) y tenca (Jimeno, 2001), sugieren que se deben estar produciendo modificaciones mediadas por las células de Müller en la matriz extracelular y en moléculas de adhesión y reconocimiento que promueven la regeneración.

LA MICROGLÍA Y OTRAS CÉLULAS NO NEURALES

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, describen el aumento de células de microglía en la CNO tras criolesión y pinzamiento (Jimeno *et al.*, 1999; Lillo, 2001). Este aumento coincide con la gran cantidad de células PCNA⁺ que observamos durante los primeros días en ambos tipos de lesión (Figs. 54B, 66B). Dada la escasa cantidad de células Pax2⁺, S100⁺ y Sox10⁺ que se dividen durante este período, es muy probable que se traten de células de microglía o células fagocíticas extravasadas descritas en ambos tipos de lesión en tenca (Jimeno *et al.*, 1999; Lillo, 2001). Apoyando estos datos, observamos a microscopía electrónica gran cantidad de células de microglía fagocítica (Figs. 60E, 61E, 74C, 77D, 80E) así como abundantes células de microglía en división (Figs. 60F, 79B), con características similares a las descritas en tenca (Lillo, 2001).

Se ha descrito tanto en la CNO como en el NO de carpín y tenca pinzados, la participación de macrófagos del torrente sanguíneo en la retirada de restos celulares de la lesión promoviendo la regeneración (Lillo, 2001; Nona *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 1995). En nuestros resultados también observamos células sanguíneas (Figs. 61C, 80C) y granulocitos extravasados (Figs. 63B, 77F), lo que sugiere que participan en la regeneración de la CNO en ambos tipos de lesión. Además, la detección de células citoqueratina⁺ fuertemente marcadas y negativas a Pax2 en la CNO, en los dos tipos de lesión durante estos mismos tiempos de supervivencia (Figs. 54G, 68L-M), sugiere que se están marcando células no neurales (Franke *et al.*, 1979; Schweizer *et al.*, 2006).

Finalmente, como se ha descrito en retinas lesionadas de tenca y carpín (Hitchcock *et al.*, 1992; Lillo *et al.*, 2001; Raymond *et al.*, 1988), tanto en carpín criolesionado como en pinzado detectamos células pigmentadas en la CNO que probablemente han migrado desde el EP (Fig. 62D), y astrocitos y células de microglía con gránulos de pigmento fagocitados en su citoplasma. Todos estos datos sugieren que hay una cierta desorganización del EP como consecuencia de la lesión y, como sugieren Lillo *et al.* (2001), es posible que sea dicha reorganización la consecuencia de la destrucción de barreras físicas o químicas, lo que facilitaría la migración de las células del EP.

3. RESUMEN FINAL

En este trabajo de tesis doctoral hemos secuenciado parcialmente el transcrito *pax2a* de carpín y en el NO hemos detectado la expresión de al menos dos isoformas transcritas. El análisis de la expresión génica *pax2a_t2* en la CNO, transcrito mayoritario en otros grupos de vertebrados, sugiere que juega un papel fundamental en los procesos de guía axonal durante la regeneración. Además, hemos realizado un análisis IHQ y de distribución completo de las células macrogliales de la CNO de carpín comparándolas con el SIO y la CNO del resto de vertebrados.

Nuestros datos apoyan que la glía de esta región está especializada atendiendo a las funciones que debe desempeñar tanto durante el desarrollo embrionario como en el animal adulto. Además, demostramos la existencia de un anillo de precursores de astrocitos en el límite posterior de la retina con la CNO de carpín, previamente descrito

en rata y humanos (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001), que en control y especialmente en lesión supone una fuente de producción de astrocitos.

Finalmente, la respuesta de las células macrogliales: astrocitos y oligodendrocitos, en la CNO ante dos tipos de lesión diferentes, sugiere que juegan un papel fundamental tanto en la retirada de restos celulares en degeneración, como en la guía y empaquetamiento de los axones de nueva formación.

Profundizar en el estudio de otros genes responsables del correcto desarrollo del NO así como de proteínas involucradas en la guía de los axones hacia la CNO durante el proceso de regeneración, aportaría nuevos datos que ayudarían a comprender por qué los teleósteos son capaces de restablecer el sistema visual después de una lesión mientras que en mamíferos no se produce tal restauración, lo que permitiría diseñar nuevas terapias para tratar enfermedades degenerativas en el sistema visual de humanos.

Conclusiones

1. La secuencia parcial de *pax2a* de carpín se encuentra altamente conservada respecto al pez cebra y es ortólogo a *pax2* del resto de vertebrados. Como ocurre en otras especies hay expresión de diferentes isoformas de *pax2* en el NO de carpín.

2. Existen diferentes poblaciones de astrocitos en el NO de teleósteos según la expresión de las proteínas Pax2 y S100. Pax2 es exclusivo de astrocitos, pero S100 marca también oligodendrocitos.

3. La población astrocitaria de la CNO es diferente a la del SIO en organización, distribución y expresión de las proteínas S100, GFAP, ZO1 y citoqueratina.

4. Los oligodendrocitos del NO de carpín presentan una alta complejidad en cuanto a su caracterización molecular, ya que pueden expresar tanto proteínas típicas de oligodendrocitos como de astrocitos de mamíferos como la S100 y la GS. De acuerdo con nuestros resultados no descartamos la existencia de poblaciones macrogliales intermedias.

5. Tanto oligodendrocitos, que expresan el factor de transcripción Sox10, como axones mielinizados de las células ganglionares, se encuentran a lo largo de toda la vía visual desde la CFNO en regiones próximas a la ZPG hasta el QO.

6. La respuesta de astrocitos y oligodendrocitos en la CNO ante dos tipos de lesiones diferentes sugiere que juegan un papel fundamental tanto en la retirada de restos celulares durante la regeneración, como en la guía y empaquetamiento de los axones de nueva formación. Sin embargo, estas células responden de forma diferente dependiendo del tipo de lesión, como se demuestra con la variación en la expresión de las proteínas S100, citoqueratina, GFAP y GS.

7. El aumento en el nivel de expresión génica de *pax2a* en la CNO tras lesión así como el incremento de astrocitos Pax2⁺ y su proximidad con los axones regenerantes, indica que este factor de transcripción juega un papel fundamental en la guía axonal.

8. Hay una fuente de producción exclusiva de astrocitos que forma un anillo que rodea la parte posterior de la CNO en peces, y que se activa durante la lesión incrementando el número de estas células que participan en el proceso de regeneración. Además, hay proliferación de oligodendrocitos tanto control como en la lesión.

9. Es necesaria la proliferación y activación de astrocitos y oligodendrocitos, para hacer posible los procesos de crecimiento continuado y regeneración tras lesión.

Bibliografía

- Adams, R.H., Betz, H., Puschel, A.W. (1996). A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev.* 57, 33-45.
- Ahmad, I., Das, A.V., James, J., Bhattacharya, S., Zhao, X. (2004). Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 15, 53-62.
- Ali, M.A. (1964). Stretching of Retina during Growth of Salmon (*Salmo salar*). *Growth.* 28, 83-9.
- Álvarez, Y., Cederlund, M.L., Cottell, D.C., Bill, B.R., Ekker, S.C., Torres-Vázquez, J., Weinstein, B.M., Hyde, D.R., Vihtelic, T.S., Kennedy, B.N. (2007). Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish. *BMC Dev Biol.* 7, 114.
- Álvarez-Buylla, A., Seri, B., Doetsch, F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull.* 57, 751-8.
- Ankerhold, R., Stuermer, C.A. (1999). Fate of oligodendrocytes during retinal axon degeneration and regeneration in the goldfish visual pathway. *J Neurobiol.* 41, 572-84.
- Anthony, T.E., Mason, H.A., Gridley, T., Fishell, G., Heintz, N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev.* 19, 1028-33.
- Arata, N., Nakayasu, H. (2003). A periaxonal net in the zebrafish central nervous system. *Brain Res.* 961, 179-89.
- Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Moon, L.D., Fawcett, J.W. (2001). Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res.* 132, 611-9.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* 14, 2701-11.
- Ashery-Padan, R., Gruss, P. (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 706-14.
- Bak, M., Fraser, S.E. (2003). Axon fasciculation and differences in midline kinetics between pioneer and follower axons within commissural fascicles. *Development.* 130, 4999-5008.
- Balczarek, K.A., Lai, Z.C., Kumar, S. (1997). Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol.* 14, 829-42.
- Barres, B.A., Jacobson, M.D., Schmid, R., Sendtner, M., Raff, M.C. (1993). Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr Biol.* 3, 489-97.
- Barresi, M.J., Hutson, L.D., Chien, C.B., Karlstrom, R.O. (2005). Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. *Development.* 132, 3643-56.
- Barron, K.D. (1995). The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci.* 134, 57-68.
- Bastmeyer, M., Beckmann, M., Nona, S.M., Cronly-Dillon, J.R., Stuermer, C.A. (1989). Identification of astrocyte- and oligodendrocyte-like cells of goldfish optic nerves in culture. *Neurosci Lett.* 101, 127-32.
- Bastmeyer, M., Beckmann, M., Schwab, M.E., Stuermer, C.A. (1991). Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocyte-like cells and fish CNS myelin. *J Neurosci.* 11, 626-40.
- Bastmeyer, M., Bahr, M., Stuermer, C.A. (1993). Fish optic nerve oligodendrocytes support axonal regeneration of fish and mammalian retinal ganglion cells. *Glia.* 8, 1-11.

- Battisti, W.P., Shinar, Y., Schwartz, M., Levitt, P., Murray, M. (1992). Temporal and spatial patterns of expression of laminin, chondroitin sulphate proteoglycan and HNK-1 immunoreactivity during regeneration in the goldfish optic nerve. *J Neurocytol.* 21, 557-73.
- Battisti, W.P., Wang, J., Bozek, K., Murray, M. (1995). Macrophages, microglia, and astrocytes are rapidly activated after crush injury of the goldfish optic nerve: a light and electron microscopic analysis. *J Comp Neurol.* 354, 306-20.
- Bauch, H., Stier, H., Schlosshauer, B. (1998). Axonal versus dendritic outgrowth is differentially affected by radial glia in discrete layers of the retina. *J Neurosci.* 18, 1774-85.
- Baumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Spieler, D., Treichel, D., Ashery-Padan, R., Gruss, P. (2003). Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development.* 130, 2903-15.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (1998). Neurociencia. Explorando el cerebro. *Masson-Williams y Wikins*, Barcelona.
- Bechara, A., Falk, J., Moret, F., Castellani, V. (2007). Modulation of semaphorin signaling by Ig superfamily cell adhesion molecules. *Adv Exp Med Biol.* 600, 61-72.
- Becker, C.G., Meyer, R.L., Becker, T. (2000). Gradients of ephrin-A2 and ephrin-A5b mRNA during retinotopic regeneration of the optic projection in adult zebrafish. *J Comp Neurol.* 427, 469-83.
- Becker, C.G., Becker, T. (2002). Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *J Neurosci.* 22, 842-53.
- Becker, C.G., Schweitzer, J., Feldner, J., Becker, T., Schachner, M. (2003). Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *J Neurosci.* 23, 6232-7.
- Becker, C.G., Lieberoth, B.C., Morellini, F., Feldner, J., Becker, T., Schachner, M. (2004a). L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *J Neurosci.* 24, 7837-42.
- Becker, C.G., Schweitzer, J., Feldner, J., Schachner, M., Becker, T. (2004b). Tenascin-R as a repellent guidance molecule for newly growing and regenerating optic axons in adult zebrafish. *Mol Cell Neurosci.* 26, 376-89.
- Becker, C.G., Becker, T. (2007). Growth and pathfinding of regenerating axons in the optic projection of adult fish. *J Neurosci Res.* 85, 2793-9.
- Beebe, D.C. (1986). Development of the ciliary body: a brief review. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 105 (Pt 2), 123-30.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.S., Ploder, L., McInnes, R.R., Sundin, O., Adler, R. (1997). Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, 1293-303.
- Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverso, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H.F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A.V., Heng, H.H., Koop, B., Martindale, D., Rommens, J.M., Tsui, L.C., Scherer, S.W. (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet.* 14, 353-6.
- Benowitz, L.I., Lewis, E.R. (1983). Increased transport of 44,000- to 49,000-dalton acidic proteins during regeneration of the goldfish optic nerve: a two-dimensional gel analysis. *J Neurosci.* 3, 2153-63.

- Bernardos, R.L., Barthel, L.K., Meyers, J.R., Raymond, P.A. (2007). Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci.* 27, 7028-40.
- Bernhardt, R.R., Tongiorgi, E., Anzini, P., Schachner, M. (1996). Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol.* 376, 253-64.
- Bernhardt, R.R. (1999). Cellular and molecular bases of axonal regeneration in the fish central nervous system. *Exp Neurol.* 157, 223-40.
- Berry, M., Hall, S., Follows, R., Rees, L., Gregson, N., Sievers, J. (1988a). Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *J Neurocytol.* 17, 727-44.
- Berry, M., Rees, L., Hall, S., Yiu, P., Sievers, J. (1988b). Optic axons regenerate into sciatic nerve isografts only in the presence of Schwann cells. *Brain Res Bull.* 20, 223-31.
- Berry, M., Carlile, J., Hunter, A. (1996). Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol.* 25, 147-70.
- Bertuzzi, S., Hindges, R., Mui, S.H., O'Leary, D.D., Lemke, G. (1999). The homeodomain protein Vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes Dev.* 13, 3092-105.
- Besser, M., Horvat-Brocker, A., Eysel, U.T., Faissner, A. (2009). Differential expression of receptor protein tyrosine phosphatases accompanies the reorganisation of the retina upon laser lesion. *Exp Brain Res.* 198, 37-47.
- Bhat, S.P., Rayner, S.A., Huang, C.M., Ariyasu, R.G. (1999). Quantitative estimation of RNA transcripts suggests persistence of Pax-6 expression in the postembryonic chick retina. *Dev Neurosci.* 21, 140-6.
- Bhatia, B., Singhal, S., Lawrence, J.M., Khaw, P.T., Limb, G.A. (2009). Distribution of Müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Exp Eye Res.* 89, 373-82.
- Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W., Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development.* 127, 1231-41.
- Birgbauer, E., Oster, S.F., Severin, C.G., Sretavan, D.W. (2001). Retinal axon growth cones respond to EphB extracellular domains as inhibitory axon guidance cues. *Development.* 128, 3041-8.
- Blaugrund, E., Cohen, I., Shani, Y., Schwartz, M. (1991). Glial fibrillary acidic protein in the fish optic nerve. *Glia.* 4, 393-9.
- Blaugrund, E., Lavie, V., Cohen, I., Solomon, A., Schreyer, D.J., Schwartz, M. (1993). Axonal regeneration is associated with glial migration: comparison between the injured optic nerves of fish and rats. *J Comp Neurol.* 330, 105-12.
- Bodega, G., Suárez, I., Fernández, B. (1990). Radial astrocytes and ependymocytes in the spinal cord of the adult toad (*Bufo bufo* L.). An immunohistochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 260, 307-14.
- Boggs, J.M., Rangaraj, G. (2000). Interaction of lipid-bound myelin basic protein with actin filaments and calmodulin. *Biochemistry.* 39, 7799-806.
- Boggs, J.M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 63, 1945-61.

- Boggs, J.M., Rangaraj, G., Gao, W., Heng, Y.M. (2006). Effect of phosphorylation of myelin basic protein by MAPK on its interactions with actin and actin binding to a lipid membrane in vitro. *Biochemistry*. 45, 391-401.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G., Noll, M., 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell*. 47, 1033-40.
- Bormann, P., Roth, L.W., Andel, D., Ackermann, M., Reinhard, E. (1999). zfNLRR, a novel leucine-rich repeat protein is preferentially expressed during regeneration in zebrafish. *Mol Cell Neurosci*. 13, 167-79.
- Boycott, B.B., Hopkins, J.M. (1981). Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience*. 6, 679-88.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., Macdonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*. 326, 515-7.
- Bravo, R., Macdonald-Bravo, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol*. 105, 1549-54.
- Bribián, A., Barallobre, M.J., Soussi-Yanicostas, N., de Castro, F. (2006). Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve. *Mol Cell Neurosci*. 33, 2-14.
- Bribián, A., de Castro, F. (2007). Oligodendrocytes: their embryonic origin, migration and therapeutic implications. *Rev Neurol*. 45, 535-46.
- Bringmann, A., Skatchkov, S.N., Pannicke, T., Biedermann, B., Wolburg, H., Orkand, R.K., Reichenbach, A. (2000). Müller glial cells in anuran retina. *Microsc Res Tech*. 50, 384-93.
- Bringmann, A., Reichenbach, A. (2001). Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci*. 6, E72-92.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 25, 397-424.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., Reichenbach, A. (2009). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int*. 54, 143-60.
- Brittis, P.A., Canning, D.R., Silver, J. (1992). Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*. 255, 733-6.
- Brittis, P.A., Lemmon, V., Rutishauser, U., Silver, J. (1995). Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: a time-lapse study of the living retina. *Mol Cell Neurosci*. 6, 433-49.
- Brooks, D.E., Komaromy, A.M., Kallberg, M.E. (1999). Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol*. 2, 3-11.
- Brosamle, C., Halpern, M.E. (2002). Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia*. 39, 47-57.
- Bunt, S.M. (1982). Retinotopic and temporal organization of the optic nerve and tracts in the adult goldfish. *J Comp Neurol*. 206, 209-26.
- Burne, J.F., Staple, J.K., Raff, M.C. (1996). Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J Neurosci*. 16, 2064-73.
- Burne, J.F., Raff, M.C. (1997). Retinal ganglion cell axons drive the proliferation of astrocytes in the developing rodent optic nerve. *Neuron*. 18, 223-30.

- Burri, M., Tromvoukis, Y., Bopp, D., Frigerio, G., Noll, M. (1989). Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *EMBO J.* 8, 1183-90.
- Burrill, J.D., Easter, S.S., Jr. (1994). Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol.* 346, 583-600.
- Busse, A., Rietz, A., Schwartz, S., Thiel, E., Keilholz, U. (2009). An intron 9 containing splice variant of PAX2. *J Transl Med.* 7, 36.
- Butt, A.M., Ransom, B.R. (1989). Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase. *Glia.* 2, 470-5.
- Cai, Y., Lechner, M.S., Nihalani, D., Prindle, M.J., Holzman, L.B., Dressler, G.R. (2002). Phosphorylation of Pax2 by the c-Jun N-terminal kinase and enhanced Pax2-dependent transcription activation. *J Biol Chem.* 277, 1217-22.
- Cai, Y., Brophy, P.D., Levitan, I., Stifani, S., Dressler, G.R. (2003). Groucho suppresses Pax2 transactivation by inhibition of JNK-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 22, 5522-9.
- Callaerts, P., Halder, G., Gehring, W.J. (1997). PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci.* 20, 483-532.
- Callander, D.C., Lamont, R.E., Childs, S.J., McFarlane, S. (2007). Expression of multiple class three semaphorins in the retina and along the path of zebrafish retinal axons. *Dev Dyn.* 236, 2918-24.
- Calof, A.L., Bonnin, A., Crocker, C., Kawauchi, S., Murray, R.C., Shou, J., Wu, H.H. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc Res Tech.* 58, 176-88.
- Caminos, E., Velasco, A., Vecino, E., Lara, J., Aijón, J. (1998). Diencephalic and mesencephalic structures related to the optic nerve organization in tench (*Tinca tinca* L., 1758). A study using fluoro-gold. *Arch Ital Biol.* 136, 1-16.
- Cammer, W. (1990). Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes. *J Neuroimmunol.* 26, 173-8.
- Campagnoni, C.W., Landry, C.F., Pribyl, T.M., Schonmann, V., Kampf, K., Handley, V.W., Watson, J.B., Bongarzone, E.R., Campagnoni, A.T. (2001). Identification of genes in the oligodendrocyte lineage through the analysis of conditionally immortalized cell lines. *Dev Neurosci.* 23, 452-63.
- Campbell, D.S., Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron.* 32, 1013-26.
- Campbell, K., Gotz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25, 235-8.
- Capdevila, J., Johnson, R.L. (2000). Hedgehog signaling in vertebrate and invertebrate limb patterning. *Cell Mol Life Sci.* 57, 1682-94.
- Capela, A., Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron.* 35, 865-75.
- Carré, J.L., Goetz, B.D., O'Connor, L.T., Bremer, Q., Duncan, I.D. (2002). Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neurosci Lett.* 330, 17-20.
- Casañas, N. (2005). Proliferación y Diversidad de las células astrogiales durante la ontogenia del Sistema Visual de *Gallotia galloti*. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna.
- Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M., Gruss, P. (1991). The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation. *Cell.* 66, 873-84.

- Chan, S.O., Chung, K.Y., Taylor, J.S. (1999). The effects of early prenatal monocular enucleation on the routing of uncrossed retinofugal axons and the cellular environment at the chiasm of mouse embryos. *Eur J Neurosci.* 11, 3225-35.
- Chan-Ling, T., McLeod, D.S., Hughes, S., Baxter, L., Chu, Y., Hasegawa, T., Luty, G.A. (2004). Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 2020-32.
- Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible Ii, M., Hughes, S. (2009). In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis. *Glia.* 57, 39-53.
- Chédotal, A., Pourquie, O., Ezan, F., San Clemente, H., Sotelo, C. (1996). BEN as a presumptive target recognition molecule during the development of the olivocerebellar system. *J Neurosci.* 16, 3296-310.
- Chen, L., Yang, P., Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm.* 10, 27-39.
- Chi, N., Epstein, J.A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* 18, 41-7.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 383, 407-13.
- Chierzi, S., Fawcett, J.W. (2001). Regeneration in the mammalian optic nerve. *Restor Neurol Neurosci.* 19, 109-18.
- Cho, K.S., Yang, L., Lu, B., Feng Ma, H., Huang, X., Pekny, M., Chen, D.F. (2005). Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice. *J Cell Sci.* 118, 863-72.
- Cho, K.S., Chen, D.F. (2008). Promoting optic nerve regeneration in adult mice with pharmaceutical approach. *Neurochem Res.* 33, 2126-33.
- Cho, S.S., Lucas, J.J., Hyndman, A.G. (1999). Transferrin binding protein is expressed by oligodendrocytes in the avian retina. *Brain Res.* 816, 229-33.
- Chow, R.L., Lang, R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 255-96.
- Chu, Y., Hughes, S., Chan-Ling, T. (2001). Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J.* 15, 2013-5.
- Chung, K.Y., Leung, K.M., Lin, C.C., Tam, K.C., Hao, Y.L., Taylor, J.S., Chan, S.O. (2004). Regionally specific expression of L1 and sialylated NCAM in the retinofugal pathway of mouse embryos. *J Comp Neurol.* 471, 482-98.
- Cid, E., Velasco, A., Ciudad, J., Orfao, A., Aijón, J., Lara, J.M. (2002). Quantitative evaluation of the distribution of proliferating cells in the adult retina in three cyprinid species. *Cell Tissue Res.* 308, 47-59.
- Cid, E. (2006). Participación de las poblaciones proliferativas y de factores de transcripción en el crecimiento continuado y la regeneración del sistema visual de teleósteos. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Clemente, D., Porteros, A., Alonso, J.R., Weruaga, E., Aijón, J., Arévalo, R. (2002). Effects of axotomy on the expression of NADPH-diaphorase in the visual pathway of the tench. *Brain Res.* 925, 183-94.
- Clemente, D. (2003). Caracterización de las células positivas a NADPH-diaforasa en la vía visual de la tenca (*Tinca tinca*, L. 1758) durante los procesos de degeneración y regeneración. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.

- Clemente, D., Porteros, A., Arenzana, F.J., Aijón, J., Parrilla, M., Santos-Ledo, A., Arévalo, R. (2008). Characterization of NADPH-diaphorase-positive glial cells of the tench optic nerve after axotomy. *Arch Ital Biol.* 146, 35-52.
- Cocchia, D., Polak, J.M., Terenghi, G., Battaglia, F., Stolfi, V., Gangitano, C., Michetti, F. (1983). Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina-2. Electron microscopical immunocytochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24, 980-4.
- Cohen, I., Shani, Y., Schwartz, M. (1993). Cloning and characteristics of fish glial fibrillary acidic protein: implications for optic nerve regeneration. *J Comp Neurol.* 334, 431-43.
- Colavincenzo, J., Levine, R.L. (2000). Myelin debris clearance during Wallerian degeneration in the goldfish visual system. *J Neurosci Res.* 59, 47-62.
- Colello, R.J., Guillery, R.W. (1990). The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: retinal position and axonal course. *Development.* 108, 515-23.
- Coles, B.L., Angenieux, B., Inoue, T., Del Rio-Tsonis, K., Spence, J.R., McInnes, R.R., Arsenijevic, Y., van der Kooy, D. (2004). Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 15772-7.
- Colognato, H., Baron, W., Avellana-Adalid, V., Relvas, J.B., Baron-Van Evercooren, A., Georges-Labouesse, E., Ffrench-Constant, C. (2002). CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol.* 4, 833-41.
- Craig, A.M., Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17, 267-310.
- Curto, G.G., Lara, J.M., Parrilla, M., Aijón, J., Velasco, A. (2007). Modifications of the retina neuronal populations of the heterozygous mutant small eye mouse, the Sey(Dey). *Brain Res.* 1127, 163-76.
- Curto, G.G. (2010). Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6 (+/Sey Dey). Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Czerny, T., Schaffner, G., Busslinger, M. (1993). DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev.* 7, 2048-61.
- Dahl, D., Bignami, A. (1973). Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.* 61, 279-93.
- Dahl, D. (1981). The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res.* 6, 741-8.
- Dahl, D., Crosby, C.J., Sethi, J.S., Bignami, A. (1985). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Neurol.* 239, 75-88.
- Dahl, D., Crosby, C.J., Bignami, A. (1986). Neurofilament proteins in fish: a study with monoclonal antibodies reacting with mammalian NF 150K and NF 200K. *J Comp Neurol.* 250, 399-402.
- Dakubo, G.D., Wang, Y.P., Mazerolle, C., Campsall, K., McMahon, A.P., Wallace, V.A. (2003). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development.* 130, 2967-80.
- Dakubo, G.D., Beug, S.T., Mazerolle, C.J., Thurig, S., Wang, Y., Wallace, V.A. (2008). Control of glial precursor cell development in the mouse optic nerve by sonic hedgehog from retinal ganglion cells. *Brain Res.* 1228, 27-42.

- Dale, J.K., Vesque, C., Lints, T.J., Sampath, T.K., Furley, A., Dodd, J., Placzek, M. (1997). Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell*. 90, 257-69.
- Danesh-Meyer, H.V., Huang, R., Nicholson, L.F., Green, C.R. (2008). Connexin43 antisense oligodeoxynucleotide treatment down-regulates the inflammatory response in an in vitro interphase organotypic culture model of optic nerve ischaemia. *J Clin Neurosci*. 15, 1253-63.
- Das, A.V., James, J., Rahnenfuhrer, J., Thoreson, W.B., Bhattacharya, S., Zhao, X., Ahmad, I. (2005). Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res*. 45, 1653-66.
- Das, A.V., Mallya, K.B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W.B., Hegde, G.V., Ahmad, I. (2006). Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol*. 299, 283-302.
- Dávila, J.C., Guirado, S., de la Calle, A., Marín-Girón, F. (1987). The intra-ocular portion of the optic nerve in the turtle *Mauremys caspica*. *J Anat*. 151, 189-98.
- de Castro, F. (2003). Chemotropic molecules: guides for axonal pathfinding and cell migration during CNS development. *News Physiol Sci*. 18, 130-6.
- de la Torre, J.R., Hopker, V.H., Ming, G.L., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., Holt, C.E. (1997). Turning of retinal growth cones in a Netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron*. 19, 1211-24.
- Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron*. 19, 575-89.
- Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C.H., Tsonis, P.A. (1995). Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 5092-6.
- Del Rio-Tsonis, K., Tsonis, P.A. (2003). Eye regeneration at the molecular age. *Dev Dyn*. 226, 211-24.
- Devadas, M., Sugawara, K., Shimada, Y., Sugitani, K., Liu, Z.W., Matsukawa, T., Kato, S. (2000). Slow recovery of goldfish retinal ganglion cells' soma size during regeneration. *Neurosci Res*. 37, 289-97.
- Díaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., Billson, F.A. (1995). Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol*. 363, 53-68.
- Didier, M., Harandi, M., Aguera, M., Bancel, B., Tardy, M., Fages, C., Calas, A., Stagaard, M., Mollgard, K., Belin, M.F. (1986). Differential immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic (GFA) protein, S-100 protein and glutamine synthetase in the rat subcommissural organ, nonspecialized ventricular ependyma and adjacent neuropil. *Cell Tissue Res*. 245, 343-51.
- Diekmann, H., Klinger, M., Oertle, T., Heinz, D., Pogoda, H.M., Schwab, M.E., Stuermer, C.A. (2005). Analysis of the reticulon gene family demonstrates the absence of the neurite growth inhibitor Nogo-A in fish. *Mol Biol Evol*. 22, 1635-48.
- Diekmann, H., Stuermer, C.A. (2009). Zebrafish neurolin-a and -b, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *J Comp Neurol*. 513, 38-50.
- Domercq, M., Sánchez-Gómez, M.V., Areso, P., Matute, C. (1999). Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *Eur J Neurosci*. 11, 2226-36.

- Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.
- Dörfler, P., Busslinger, M. (1996). C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8. *EMBO J.* 15, 1971-82.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E., Friedlander, M. (2002). Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 3500-10.
- Douglas, R.H., Wagner, H.J. (1982). Endogenous patterns of photomechanical movements in teleosts and their relation to activity rhythms. *Cell Tissue Res.* 226, 133-44.
- Dowling, J.E., Ehinger, B. (1978). The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 201, 7-26.
- Downs, J.C., Roberts, M.D., Burgoyne, C.F. (2008). Mechanical environment of the optic nerve head in glaucoma. *Optom Vis Sci.* 85, 425-35.
- Drager, U.C. (1985). Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 224, 57-77.
- Dressler, G.R., Gruss, P. (1988). Do multigene families regulate vertebrate development? *Trends Genet.* 4, 214-9.
- Dressler, G.R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H.O., Gruss, P. (1990). Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development.* 109, 787-95.
- Dressler, G.R., Douglass, E.C. (1992). Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 1179-83.
- Dressler, G.R., Woolf, A.S. (1999). Pax2 in development and renal disease. *Int J Dev Biol.* 43, 463-8.
- Druger, R.K., Levine, E.M., Glasgow, E., Jones, P.S., Schechter, N. (1992). Cloning of a type I keratin from goldfish optic nerve: differential expression of keratins during regeneration. *Differentiation.* 52, 33-43.
- Druger, R.K., Glasgow, E., Fuchs, C., Levine, E.M., Matthews, J.P., Park, C.Y., Schechter, N. (1994). Complex expression of keratins in goldfish optic nerve. *J Comp Neurol.* 340, 269-80.
- Duke-Elder, S. (1958). System of ophthalmology. En: The eye in evolution. *Henry Kimpton Publishers.* Londres.
- Dunlop, S.A., Tee, L.B., Beazley, L.D. (2000). Topographic order of retinofugal axons in a marsupial: implications for map formation in visual nuclei. *J Comp Neurol.* 428, 33-44.
- Dunlop, S.A., Tennant, M., Beazley, L.D. (2002). Extent of retinal ganglion cell death in the frog *Litoria moorei* after optic nerve regeneration induced by lesions of different sizes. *J Comp Neurol.* 446, 276-87.
- Dunlop, S.A., Tee, L.B., Stirling, R.V., Taylor, A.L., Runham, P.B., Barber, A.B., Kuchling, G., Rodger, J., Roberts, J.D., Harvey, A.R., Beazley, L.D. (2004). Failure to restore vision after optic nerve regeneration in reptiles: interspecies variation in response to axotomy. *J Comp Neurol.* 478, 292-305.
- Dyer, C.A., Philibotte, T.M., Billings-Gagliardi, S., Wolf, M.K. (1995). Cytoskeleton in myelin-basic-protein-deficient shiverer oligodendrocytes. *Dev Neurosci.* 17, 53-62.

- Dyer, M.A., Cepko, C.L. (2000). Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci.* 3, 873-80.
- Easter, S.S. (1983). Postnatal neurogenesis and changing connections. *Trends in Neurosciences.* 6, 53-56.
- Easter, S.S., Jr., Rusoff, A.C., Kish, P.E. (1981). The growth and organization of the optic nerve and tract in juvenile and adult goldfish. *J Neurosci.* 1, 793-811.
- Easter, S.S., Jr., Bratton, B., Scherer, S.S., 1984. Growth-related order of the retinal fiber layer in goldfish. *J Neurosci.* 4, 2173-90.
- Easter, S.S., Jr. (1992). Retinal growth in foveated teleosts: nasotemporal asymmetry keeps the fovea in temporal retina. *J Neurosci.* 12, 2381-92.
- Eberhard, D., Jiménez, G., Heavey, B., Busslinger, M. (2000). Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *EMBO J.* 19, 2292-303.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell.* 75, 1417-30.
- Eddleston, M., Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 54, 15-36.
- Ekker, S.C., Ungar, A.R., Greenstein, P., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Moon, R.T., Beachy, P.A. (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol.* 5, 944-55.
- Ekstrom, P., Johnsson, C.M., Ohlin, L.M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J Comp Neurol.* 436, 92-110.
- Engelhardt, M., Wachs, F.P., Couillard-Despres, S., Aigner, L. (2004). The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res.* 78, 1025-36.
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T.M., Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell.* 81, 747-56.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell.* 90, 169-80.
- Erskine, L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Mason, C.A. (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of Robos and Slits. *J Neurosci.* 20, 4975-82.
- Erskine, L., Herrera, E. (2007). The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol.* 308, 1-14.
- Essner, E., Lin, W.L., Gordon, S. (1986). Surface-associated vesicles in retinal arterioles and venules. *Cell Tissue Res.* 245, 431-7.
- Farwell, A.P., Dubord-Tomasetti, S.A. (1999). Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. *Endocrinology.* 140, 4221-7.
- Fashena, D., Westerfield, M. (1999). Secondary motoneuron axons localize DM-GRASP on their fasciculated segments. *J Comp Neurol.* 406, 415-24.
- Fausett, B.V., Goldman, D. (2006). A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci.* 26, 6303-13.

- Fawcett, J.W. (2006). Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J Neurotrauma*. 23, 371-83.
- Fernald, R.D. (1990). Teleost vision: seeing while growing. *J Exp Zool Suppl*. 5, 167-80.
- Ffrench-Constant, C., Miller, R.H., Burne, J.F., Raff, M.C. (1988). Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve. *J Neurocytol*. 17, 13-25.
- Filbin, M.T. (2003). Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*. 4, 703-13.
- Fimbel, S.M., Montgomery, J.E., Burket, C.T., Hyde, D.R. (2007). Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci*. 27, 1712-24.
- Fischer, A.J., Reh, T.A. (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol*. 220, 197-210.
- Fischer, A.J., Reh, T.A. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci*. 4, 247-52.
- Fischer, A.J., Dierks, B.D., Reh, T.A. (2002a). Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development*. 129, 2283-91.
- Fischer, A.J., McGuire, C.R., Dierks, B.D., Reh, T.A. (2002b). Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci*. 22, 9387-98.
- Fischer, A.J., Reh, T.A. (2003). Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia*. 43, 70-6.
- Fischer, A.J. (2005). Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res*. 24, 161-82.
- Fischer, A.J., Scott, M.A., Tuten, W. (2009). Mitogen-activated protein kinase-signaling stimulates Müller glia to proliferate in acutely damaged chicken retina. *Glia*. 57, 166-81.
- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K. (1979). Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 81, 570-80.
- Fraser, S.E., O'Rourke, N.A. (1990). In situ analysis of neuronal dynamics and positional cues in the patterning of nerve connections. *J Exp Biol*. 153, 61-70.
- Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C., Fontana, A. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol*. 17, 1271-8.
- Fricke, C., Lee, J.S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F., Chien, C.B. (2001). *Aastray*, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. *Science*. 292, 507-10.
- Fu, W., Noll, M. (1997). The Pax2 homolog Sparkling is required for development of cone and pigment cells in the *Drosophila* eye. *Genes Dev*. 11, 2066-78.
- Fu, W., Duan, H., Frei, E., Noll, M. (1998). Shaven and Sparkling are mutations in separate enhancers of the *Drosophila* Pax2 homolog. *Development*. 125, 2943-50.
- Fuccillo, M., Joyner, A.L., Fishell, G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*. 7, 772-83.
- Fujita, Y., Imagawa, T., Uehara, M. (2000). Comparative study of the lamina cribrosa and the pial septa in the vertebrate optic nerve and their relationship to the myelinated axons. *Tissue Cell*. 32, 293-301.

- Fujita, Y., Imagawa, T., Uehara, M. (2001). Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken. *Tissue Cell*. 33, 129-34.
- Fulcrand, J., Privat, A. (1977). Neuroglial reactions secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat: ultrastructural and quantitative study. *J Comp Neurol*. 176, 189-222.
- Fulton, B.P., Burne, J.F., Raff, M.C. (1992). Visualization of O-2A progenitor cells in developing and adult rat optic nerve by quisqualate-stimulated cobalt uptake. *J Neurosci*. 12, 4816-33.
- Gao, L., Macklin, W., Gerson, J., Miller, R.H. (2006). Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev Biol*. 290, 277-86.
- Gao, L., Miller, R.H. (2006). Specification of optic nerve oligodendrocyte precursors by retinal ganglion cell axons. *J Neurosci*. 26, 7619-28.
- García, D.M., Koke, J.R. (2009). Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration - a mini-review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 152, 135-8.
- García-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., Mason, C., Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development*. 135, 1833-41.
- Gariano, R.F. (2003). Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res*. 22, 295-306.
- Geneser, F. (1993). Ojo. Histología. *Editorial Médica Panamericana*, Buenos Aires.
- Giordano, S., Glasgow, E., Tesser, P., Schechter, N. (1989). A type II keratin is expressed in glial cells of the goldfish visual pathway. *Neuron*. 2, 1507-16.
- Giordano, S., Hall, C., Quitschke, W., Glasgow, E., Schechter, N. (1990). Keratin 8 of simple epithelia is expressed in glia of the goldfish nervous system. *Differentiation*. 44, 163-72.
- Giulian, D., Iwanij, V. (1985). The response of optic tract glia during regeneration of the goldfish visual system. II. Tectal factors stimulate optic tract glia. *Brain Res*. 339, 97-104.
- Giulian, D., Tomozawa, Y., Hindman, H., Allen, R.L. (1985). Peptides from regenerating central nervous system promote specific populations of macroglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82, 4287-90.
- Giulian, D., Baker, T.J. (1986). Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*. 6, 2163-78.
- Giulian, D., Young, D.G. (1986). Brain peptides and glial growth. II. Identification of cells that secrete glia-promoting factors. *J Cell Biol*. 102, 812-20.
- Giulian, D. (1987). Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 18, 155-71, 132-3.
- Giulian, D., Corpuz, M. (1993). Microglial secretion products and their impact on the nervous system. *Adv Neurol*. 59, 315-20.
- Godement, P., Salaun, J., Metin, C. (1987a). Fate of uncrossed retinal projections following early or late prenatal monocular enucleation in the mouse. *J Comp Neurol*. 255, 97-109.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., Bonhoeffer, F. (1987b). A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*. 101, 697-713.
- Goodbrand, I.A., Gaze, R.M. (1991). Microglia in tadpoles of *Xenopus laevis*: normal distribution and the response to optic nerve injury. *Anat Embryol (Berl)*. 184, 71-82.
- Goode, D.K., Elgar, G. (2009). The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev Dyn*. 238, 2951-74.

- Gorovits, R., Avidan, N., Avisar, N., Shaked, I., Vardimon, L. (1997). Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 7024-9.
- Gould, E., Tanapat, P., Rydel, T., Hastings, N. (2000). Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry*. 48, 715-20.
- Gould, R.M., Byrd, A.L., Barbarese, E. (1995). The number of Schmidt-Lanterman incisures is more than doubled in shiverer PNS myelin sheaths. *J Neurocytol*. 24, 85-98.
- Gould, R.M., Morrison, H.G., Gilland, E., Campbell, R.K. (2005). Myelin tetraspan family proteins but no non-tetraspan family proteins are present in the ascidian (*Ciona intestinalis*) genome. *Biol Bull*. 209, 49-66.
- Grafstein, B., Murray, M. (1969). Transport of protein in goldfish optic nerve during regeneration. *Exp Neurol*. 25, 494-508.
- Grafstein, B. (1975). The nerve cell body response to axotomy. *Exp Neurol*. 48, 32-51.
- Grafstein, B. (1986). The retina as a regeneration organ. *The Retina A Model for Cell Biology Studies*. Part II. London.
- Grumet, M., Friedlander, D.R., Sakurai, T. (1996). Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect Dev Neurobiol*. 3, 319-30.
- Grun, G. (1975). Structural basis of the functional development of the retina in the cichlid *Tilapia leucosticta* (teleostei). *J Embryol Exp Morphol*. 33, 243-57.
- Guillery, R.W. (1995). A comparison of eutherian and marsupial optic chiasms: a brief review. *Rev Bras Biol*. 55 Suppl 1, 1-10.
- Guillery, R.W., Mason, C.A., Taylor, J.S. (1995). Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci*. 15, 4727-37.
- Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84, 345-57.
- Gumy, L.F., Tan, C.L., Fawcett, J.W. (2010). The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol*. 223, 28-37.
- Hagedorn, M., Fernald, R.D. (1992). Retinal growth and cell addition during embryogenesis in the teleost, *Haplochromis burtoni*. *J Comp Neurol*. 321, 193-208.
- Hamberger, A.C., Chiang, G.H., Nysten, E.S., Scheff, S.W., Cotman, C.W. (1979). Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res*. 168, 513-30.
- Hamilton, N., Vayro, S., Kirchhoff, F., Verkhatsky, A., Robbins, J., Gorecki, D.C., Butt, A.M. (2008). Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia*. 56, 734-49.
- Hamilton, N., Hubbard, P.S., Butt, A.M. (2009). Effects of glutamate receptor activation on NG2-glia in the rat optic nerve. *J Anat*. 214, 208-18.
- Hamilton, N., Vayro, S., Wigley, R., Butt, A.M. (2010). Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia. *Glia*. 58, 66-79.
- Harauz, G., Ishiyama, N., Hill, C.M., Bates, I.R., Libich, D.S., Fares, C. (2004). Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron*. 35, 503-42.
- Hardy, R.J., Lazzarini, R.A., Colman, D.R., Friedrich, V.L., Jr. (1996). Cytoplasmic and nuclear localization of myelin basic proteins reveals heterogeneity among oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 46, 246-57.

- Harman, A.M., Rodger, J., Ahmat, A., Thomas, C., Bartlett, C., Chen, P., Dunlop, S.A., Beazley, L.D. (2003). PSA-NCAM is up-regulated during optic nerve regeneration in lizard but not in goldfish. *Exp Neurol.* 182, 180-5.
- Hatta, K., Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature.* 320, 447-9.
- Hayes, B.P., Holden, A.L. (1983). The distribution of displaced ganglion cells in the retina of the pigeon. *Exp Brain Res.* 49, 181-8.
- Hayreh, S.S. (1974). Anatomy and physiology of the optic nerve head. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 78, OP240-54.
- Hayreh, S.S. (2009). Ischemic optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res.* 28, 34-62.
- Heberlein, U., Wolff, T., Rubin, G.M. (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell.* 75, 913-26.
- Heberlein, U., Singh, C.M., Luk, A.Y., Donohoe, T.J. (1995). Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature.* 373, 709-11.
- Heller, N., Brandli, A.W. (1997). *Xenopus* Pax-2 displays multiple splice forms during embryogenesis and pronephric kidney development. *Mech Dev.* 69, 83-104.
- Henkind, P., Hansen, R.I., Szalay, J. (1979). Ocular circulation. Physiology of the human eye and visual system. *Records, R.E.* New York.
- Hergueta, S., Lemire, M., Ward, R., Rio, J.P., Reperant, J. (1992). A reconsideration of the primary visual system of the turtle *Emys orbicularis*. *J Hirnforsch.* 33, 515-44.
- Hernández, C., Martín, M., Bodega, G., Suárez, I., Pérez, J., Fernández, B. (1999). Reponse of carp central nervous system to hyperammonemic conditions: an immunocytochemical study of glutamina synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 kDa heat-shock protein (HSP70). *Aquat. Toxicol.* 45, 195-207.
- Herranz, S. (2009). Expresión de las proteínas CRB1 y CRB3 en la retina de los murinos. Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.
- Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., Mason, C.A. (2003). Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell.* 114, 545-57.
- Higgins, D., Burack, M., Lein, P., Banker, G. (1997). Mechanisms of neuronal polarity. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 599-604.
- Hirsch, N., Harris, W.A. (1997). *Xenopus* Pax-6 and retinal development. *J Neurobiol.* 32, 45-61.
- Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., Otteson, D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 23, 183-94.
- Hitchcock, P.F., Lindsey Myhr, K.J., Easter, S.S., Jr., Mangione-Smith, R., Jones, D.D. (1992). Local regeneration in the retina of the goldfish. *J Neurobiol.* 23, 187-203.
- Hitchcock, P.F., Macdonald, R.E., VanDeRyt, J.T., Wilson, S.W. (1996). Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J Neurobiol.* 29, 399-413.
- Hitchcock, P.F., Raymond, P.A. (2004). The teleost retina as a model for developmental and regeneration biology. *Zebrafish.* 1, 257-71.

- Hollyfield, J.G. (1968). Differential addition of cells to the retina in *Rana pipiens* tadpoles. *Dev Biol.* 18, 163-79.
- Holmes, G.P., Negus, K., Burridge, L., Raman, S., Algar, E., Yamada, T., Little, M.H. (1998). Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate *slit* homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev.* 79, 57-72.
- Holt, C.E., Bertsch, T.W., Ellis, H.M., Harris, W.A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* 1, 15-26.
- Holt, C.E. (1989). A single-cell analysis of early retinal ganglion cell differentiation in *Xenopus*: from soma to axon tip. *J Neurosci.* 9, 3123-45.
- Hopker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., Holt, C. (1999.) Growth-cone attraction to Netrin-1 is converted to repulsion by Laminin-1. *Nature.* 401, 69-73.
- Hozumi, I., Chiu, F.C., Norton, W.T. (1990). Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res.* 524, 64-71.
- Hu, M., Easter, S.S. (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol.* 207, 309-21.
- Hughes, A., Wieniawa-Narkiewicz, E. (1980). A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal ganglion cell layer. *Nature.* 284, 468-70.
- Hume, D.A., Perry, V.H., Gordon, S. (1983). Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol.* 97, 253-7.
- Hutson, L.D., Chien, C.B. (2002). Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of Astray/Robo2. *Neuron.* 33, 205-17.
- Isobe, T., Ishioka, N., Masuda, T., Takahashi, Y., Ganno, S., Okuyama, T. (1983). A rapid separation of S100 subunits by high performance liquid chromatography: the subunit compositions of S100 proteins. *Biochem Int.* 6, 419-26.
- Isobe, T., Takahashi, K., Okuyama, T. (1984). S100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem.* 43, 1494-6.
- Itoh, M., Morita, K., Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem.* 274, 5981-6.
- Jadhav, A.P., Roesch, K., Cepko, C.L. (2009). Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 28, 249-62.
- James, G., Butt, A.M. (2001). Changes in P2Y and P2X purinoceptors in reactive glia following axonal degeneration in the rat optic nerve. *Neurosci Lett.* 312, 33-6.
- Jean, D., Ewan, K., Gruss, P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mech Dev.* 76, 3-18.
- Jeffery, G. (2001). Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol Rev.* 81, 1393-414.
- Jennings, A.R., Kirilak, Y., Carroll, W.M. (2002). In situ characterisation of oligodendrocyte progenitor cells in adult mammalian optic nerve. *J Neurocytol.* 31, 27-39.
- Jensen, A.M., Wallace, V.A. (1997). Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development.* 124, 363-71.

- Jimeno, D., Velasco, A., Lillo, C., Lara, J.M., Aijón, J. (1999). Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of tench. *Brain Res.* 816, 175-89.
- Jimeno, D. (2001). Implicaciones de la retina periférica en el crecimiento continuado y la regeneración del sistema visual de teleósteos. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Jimeno, D., Lillo, C., Cid, E., Aijón, J., Velasco, A., Lara, J.M. (2003). The degenerative and regenerative processes after the elimination of the proliferative peripheral retina of fish. *Exp Neurol.* 179, 210-28.
- Jin, Z., Zhang, J., Klar, A., Chédotal, A., Rao, Y., Cepko, C.L., Bao, Z.Z. (2003). Irx4-mediated regulation of Slit1 expression contributes to the definition of early axonal paths inside the retina. *Development.* 130, 1037-48.
- Johns, P.R., Easter, S.S., Jr. (1977). Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number. *J Comp Neurol.* 176, 331-41.
- Johns, P.R., Fernald, R.D. (1981.) Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature.* 293, 141-2.
- Johns, P.R. (1982). Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J Neurosci.* 2, 178-98.
- Johnston, M.C., Noden, D.M., Hazelton, R.D., Coulombre, J.L., Coulombre, A.J. (1979). Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res.* 29, 27-43.
- Julian, D., Ennis, K., Korenbrot, J.I. (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol.* 394, 271-82.
- Kàlmàn, M. (1998). Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Anat Embryol (Berl).* 198, 409-33.
- Kaneko, Y., Matsumoto, G., Hanyu, Y. (1999). Pax-6 expression during retinal regeneration in the adult newt. *Dev Growth Differ.* 41, 723-9.
- Kanki, J.P., Chang, S., Kuwada, J.Y. (1994). The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse. *J Neurobiol.* 25, 831-45.
- Karlstrom, R.O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A.D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S.U., Muller, B.K., Richter, S., van Eeden, F.J., Nusslein-Volhard, C., Bonhoeffer, F. (1996). Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development.* 123, 427-38.
- Kashima, T., Tiu, S.N., Merrill, J.E., Vinters, H.V., Dawson, G., Campagnoni, A.T. (1993). Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas. *Cancer Res.* 53, 170-5.
- Kaufman, P.L., Alm, A. (2004). Adler. Fisiología del ojo. Aplicación clínica. *Mosby Elsevier.* Madrid.
- Keilani, S., Sugaya, K. (2008). Reelin induces a radial glial phenotype in human neural progenitor cells by activation of Notch-1. *BMC Dev Biol.* 8, 69.
- Keller, S.A., Jones, J.M., Boyle, A., Barrow, L.L., Killen, P.D., Green, D.G., Kapousta, N.V., Hitchcock, P.F., Swank, R.T., Meisler, M.H. (1994). Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus. *Genomics.* 23, 309-20.
- Kennedy, T.E. (2000). Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem Cell Biol.* 78, 569-75.
- Kerr, N.M., Johnson, C.S., de Souza, C.F., Chee, K.S., Good, W.R., Green, C.R., Danesh-Meyer, H.V. (2010). Immunolocalization of Gap Junction Protein

- Connexin43 (GJA1) in the Human Retina and Optic Nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. In press.
- Kiernan, B.W., Gotz, B., Faissner, A., Ffrench-Constant, C. (1996). Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci*. 7, 322-35.
- King, C.E., Wallace, A., Rodger, J., Bartlett, C., Beazley, L.D., Dunlop, S.A. (2003). Transient up-regulation of retinal EphA3 and EphA5, but not ephrin-A2, coincides with re-establishment of a topographic map during optic nerve regeneration in goldfish. *Exp Neurol*. 183, 593-9.
- Kock, J.H. (1982). Neuronal addition and retinal expansion during growth of the crucian carp eye. *J Comp Neurol*. 209, 264-74.
- Koke, J.R., Mosier, A.L., García, D.M. (2010). Intermediate filaments of zebrafish retinal and optic nerve astrocytes and Müller glia: differential distribution of cytokeratin and GFAP. *BMC Res Notes*. 3, 50.
- Kolb, H., Fernández, E., Nelson, R. (2000). Webvision: <http://webvision.med.utah.edu/>
- Kolb, H. (2003). How the retina works. *American Scientist*. 91, 28-35.
- Kolpak, A., Zhang, J., Bao, Z.Z. (2005). Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci*. 25, 3432-41.
- Koriyama, Y., Homma, K., Kato, S. (2006). Activation of cell survival signals in the goldfish retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Adv Exp Med Biol*. 572, 333-7.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K., Ogura, T. (2000). Tbx5 and the retinotectum projection. *Science*. 287, 134-7.
- Kozulin, P., Natoli, R., Madigan, M.C., O'Brien, K.M., Provis, J.M. (2009). Gradients of Eph-A6 expression in primate retina suggest roles in both vascular and axon guidance. *Mol Vis*. 15, 2649-62.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V., Fjose, A. (1991). Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis. *Development*. 113, 1193-206.
- Krauss, S., Concordet, J.P., Ingham, P.W. (1993). A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 75, 1431-44.
- Kubota, R., Hokoc, J.N., Moshiri, A., McGuire, C., Reh, T.A. (2002). A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res*. 134, 31-41.
- Kukley, M., Capetillo-Zarate, E., Dietrich, D. (2007). Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci*. 10, 311-20.
- Kwan, J.W., Lee, M.J., Mack, A.F., Chiu, J.F., Fernald, R.D. (1996). Nonuniform distribution of cell proliferation in the adult teleost retina. *Brain Res*. 712, 40-4.
- La Vail, M.M., Rapaport, D.H., Rakic, P. (1991). Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol*. 309, 86-114.
- Laessing, U., Giordano, S., Stecher, B., Lottspeich, F., Stuermer, C.A. (1994). Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. *Differentiation*. 56, 21-9.
- Lang, D.M., Warren, J.T., Jr., Klisa, C., Stuermer, C.A. (2001). Topographic restriction of TAG-1 expression in the developing retinotectal pathway and target

- dependent reexpression during axon regeneration. *Mol Cell Neurosci.* 17, 398-414.
- Lanners, H.N., Grafstein, B. (1980). Early stages of axonal regeneration in the goldfish optic tract: an electron microscopic study. *J Neurocytol.* 9, 733-51.
- Latov, N., Nilaver, G., Zimmerman, E.A., Johnson, W.G., Silverman, A.J., Defendini, R., Cote, L. (1979). Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. *Dev Biol.* 72, 381-4.
- Lauderdale, J.D., Davis, N.M., Kuwada, J.Y. (1997). Axon tracts correlate with netrin-1a expression in the zebrafish embryo. *Mol Cell Neurosci.* 9, 293-313.
- Ledig, M.M., McKinnell, I.W., Mrcic-Flogel, T., Wang, J., Alvares, C., Mason, I., Bixby, J.L., Mueller, B.K., Stoker, A.W. (1999). Expression of receptor tyrosine phosphatases during development of the retinotectal projection of the chick. *J Neurobiol.* 39, 81-96.
- Lee, J.S., von der Hardt, S., Rusch, M.A., Stringer, S.E., Stickney, H.L., Talbot, W.S., Geisler, R., Nusslein-Volhard, C., Selleck, S.B., Chien, C.B., Roehl, H. (2004). Axon sorting in the optic tract requires HSPG synthesis by ext2 (dackel) and extl3 (boxer). *Neuron.* 44, 947-60.
- Lefcort, F., Bentley, D. (1989). Organization of cytoskeletal elements and organelles preceding growth cone emergence from an identified neuron in situ. *J Cell Biol.* 108, 1737-49.
- Leppert, C.A., Diekmann, H., Paul, C., Laessing, U., Marx, M., Bastmeyer, M., Stuermer, C.A. (1999). Neurolin Ig domain 2 participates in retinal axon guidance and Ig domains 1 and 3 in fasciculation. *J Cell Biol.* 144, 339-49.
- Leung, K.M., Taylor, J.S., Chan, S.O. (2003). Enzymatic removal of chondroitin sulphates abolishes the age-related axon order in the optic tract of mouse embryos. *Eur J Neurosci.* 17, 1755-67.
- Levine, E.M., Roelink, H., Turner, J., Reh, T.A. (1997). Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro. *J Neurosci.* 17, 6277-88.
- Levine, E.M., Green, E.S. (2004). Cell-intrinsic regulators of proliferation in vertebrate retinal progenitors. *Semin Cell Dev Biol.* 15, 63-74.
- Levine, R.L. (1989). Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 285, 231-45.
- Levitt, P., Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol.* 193, 815-40.
- Li, X., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., Lu, S., Kamasawa, N., Morita, M., Davidson, K.G., Yasumura, T., Rash, J.E., Nagy, J.I. (2004). Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience.* 126, 611-30.
- Liesi, P., Fried, G., Stewart, R.R. (2001). Neurons and glial cells of the embryonic human brain and spinal cord express multiple and distinct isoforms of laminin. *J Neurosci Res.* 64, 144-67.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Lara, J.M., Aijón, J. (1998). Ultrastructural organization of the optic nerve of the tench (Cyprinidae, Teleostei). *J Neurocytol.* 27, 593-604.
- Lillo, C. (2001). Estudio ultraestructural de la retina y el nervio óptico de un teleosteo (*Tinca tinca* L., 1758) en procesos de degeneración y regeneración. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.

- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Aijón, J., Lara, J.M. (2001). Non-neuronal cells involved in the degeneration and regeneration of the fish retina. *J Neurocytol.* 30, 475-91.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Lara, J.M., Aijón, J. (2002). The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem.* 50, 1289-302.
- Ling, E.A. (1982). A light microscopic demonstration of amoeboid microglia and microglial cells in the retina of rats of various ages. *Arch Histol Jpn.* 45, 37-44.
- Ling, T.L., Stone, J. (1988). The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Brain Res Dev Brain Res.* 44, 73-85.
- Ling, T.L., Mitrofanis, J., Stone, J. (1989). Origin of retinal astrocytes in the rat: evidence of migration from the optic nerve. *J Comp Neurol.* 286, 345-52.
- Linser, P.J., Sorrentino, M., Moscona, A.A. (1984). Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Brain Res.* 315, 65-71.
- Liu, X., Hawkes, E., Ishimaru, T., Tran, T., Sretavan, D.W. (2006). EphB3: an endogenous mediator of adult axonal plasticity and regrowth after CNS injury. *J Neurosci.* 26, 3087-101.
- Lombardo, R. (1968). The regeneration of the retina in the adult teleost. *Accademia Lincei-Rendiconti. Sci. Fisicali Matematiche Naturale.* 45, 631-635.
- Lombardo, R. (1972). Course and localization of mitoses during the regeneration of the retina of an adult teleost. *Accademia Lincei Rendiconti. Sci. Fisicali Matematiche Naturale.* 53, 323-327.
- Ludwin, S.K., Kosek, J.C., Eng, L.F. (1976). The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol.* 165, 197-207.
- Lun, K., Brand, M. (1998). A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development.* 125, 3049-62.
- Lustig, M., Erskine, L., Mason, C.A., Grumet, M., Sakurai, T. (2001). Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. *J Comp Neurol.* 434, 13-28.
- Lyall, A.H. (1956). The growth of the trout retina. *The Quarterly Journal of Microscopical Science.* 98, 101-110.
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P.A., Moses, K. (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell.* 75, 927-38.
- Macdonald, R., Xu, Q., Barth, K.A., Mikkola, I., Holder, N., Fjose, A., Krauss, S., Wilson, S.W. (1994). Regulatory gene expression boundaries demarcate sites of neuronal differentiation in the embryonic zebrafish forebrain. *Neuron.* 13, 1039-53.
- Macdonald, R., Barth, K.A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., Wilson, S.W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development.* 121, 3267-78.
- Macdonald, R., Wilson, S.W. (1996.) Pax proteins and eye development. *Curr Opin Neurobiol.* 6, 49-56.
- Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M., Wilson, S.W. (1997). The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development.* 124, 2397-408.

- Mack, A.F., Wolburg, H. (2006). Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. *Brain Res.* 1103, 25-31.
- Macy, A., Easter, S.S., Jr. (1981). Growth-related changes in the size of receptive field centers of retinal ganglion cells in goldfish. *Vision Res.* 21, 1497-504.
- Maggs, A., Scholes, J. (1986). Glial domains and nerve fiber patterns in the fish retinotectal pathway. *J Neurosci.* 6, 424-38.
- Maggs, A., Scholes, J. (1990). Reticular astrocytes in the fish optic nerve: macroglia with epithelial characteristics form an axially repeated lacework pattern, to which nodes of Ranvier are apposed. *J Neurosci.* 10, 1600-14.
- Mann, C.J., Hinitz, Y., Hughes, S.M. (2006). Comparison of neurolin (ALCAM) and neurolin-like cell adhesion molecule (NLCAM) expression in zebrafish. *Gene Expr Patterns.* 6, 952-63.
- Marcus, R.C., Mason, C.A. (1995). The first retinal axon growth in the mouse optic chiasm: axon patterning and the cellular environment. *J Neurosci.* 15, 6389-402.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W., Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1111-22.
- Markl, J., Franke, W.W. (1988). Localization of cytokeratins in tissues of the rainbow trout: fundamental differences in expression pattern between fish and higher vertebrates. *Differentiation.* 39, 97-122.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* 105, 43-55.
- Marquardt, T., Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in Neurosci.* 25, 32-38.
- Marquardt, T. (2003). Transcriptional control of neuronal diversification in the retina. *Prog Retin Eye Res.* 22, 567-77.
- Marshak, D.W., Dowling, J.E. (1987). Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *J Comp Neurol.* 256, 430-43.
- Martín, P., Carrière, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M.A., Vandembunder, B., Stehelin, D., Saule, S. (1992). Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene.* 7, 1721-8.
- Martínez-Cerdeño, V., Noctor, S.C., Kriegstein, A.R. (2006). The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 16 Suppl 1, 152-61.
- Martínez-Morales, J.R., Rodrigo, I., Bovolenta, P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays.* 26, 766-77.
- Martínez-Navarrete, G.C., Angulo, A., Martín-Nieto, J., Cuenca, N. (2008). Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *J Comp Neurol.* 511, 557-80.
- Martini, R. (1994). Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol.* 23, 1-28.
- Martini, R., Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia.* 19, 298-310.
- Mason, C.A., Sretavan, D.W. (1997). Glia, neurons, and axon pathfinding during optic chiasm development. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 647-53.

- Mastronardi, F.G., Boulias, C., Roots, B.I., Moscarello, M.A. (1993). Characterization of basic proteins from goldfish myelin. *J Neurochem.* 60, 153-60.
- Mata, M., Alessi, D., Fink, D.J. (1990). S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. *J Neurocytol.* 19, 432-42.
- Matsui, K., Hosoi, N., Tachibana, M. (1999). Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci.* 19, 6755-66.
- Matsukawa, T., Arai, K., Koriyama, Y., Liu, Z., Kato, S. (2004a). Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. *Biol Pharm Bull.* 27, 445-51.
- Matsukawa, T., Sugitani, K., Mawatari, K., Koriyama, Y., Liu, Z., Tanaka, M., Kato, S. (2004b). Role of purpurin as a retinol-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: its priming action on neurite outgrowth. *J Neurosci.* 24, 8346-53.
- Matsunaga, M., Hatta, K., Takeichi, M. (1988). Role of N-cadherin cell adhesion molecules in the histogenesis of neural retina. *Neuron.* 1, 289-95.
- May, C.A., Lutjen-Drecoll, E. (2002). Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 2206-12.
- Mayer, E.J., Carter, D.A., Ren, Y., Hughes, E.H., Rice, C.M., Halfpenny, C.A., Scolding, N.J., Dick, A.D. (2005). Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol.* 89, 102-6.
- Merchán, P., Bribián, A., Sánchez-Camacho, C., Lezameta, M., Bovolenta, P., de Castro, F. (2007). Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol Cell Neurosci.* 36, 355-68.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., Álvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 17528-32.
- Mey, J., Thanos, S. (1992). Development of the visual system of the chick-a review. *J Hirnforsch.* 33, 673-702.
- Meyer, D.L., Lara, J., Malz, C.R., Graf, W. (1993). Diencephalic projections to the retinae in two species of flatfishes (*Scophthalmus maximus* and *Pleuronectes platessa*). *Brain Res.* 601, 308-12.
- Meyer, R.L. (1978). Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Exp Neurol.* 59, 99-111.
- Meyer, R.L. (1980). Mapping the normal and regenerating retinotectal projection of goldfish with autoradiographic methods. *J Comp Neurol.* 189, 273-89.
- Meyer, R.L., Kageyama, G.H. (1999). Large-scale synaptic errors during map formation by regeneration optic axons in the goldfish. *J Comp Neurol.* 409, 299-312.
- Mi, H., Barres, B.A. (1999). Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J Neurosci.* 19, 1049-61.
- Mi, H., Haeberle, H., Barres, B.A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci.* 21, 1538-47.
- Miller, R.H., David, S., Patel, R., Abney, E.R., Raff, M.C. (1985). A quantitative immunohistochemical study of macroglial cell development in the rat optic nerve: in vivo evidence for two distinct astrocyte lineages. *Dev Biol.* 111, 35-41.
- Milne, T.J., Atkins, A.R., Warren, J.A., Auton, W.P., Smith, R. (1990). Shark myelin basic protein: amino acid sequence, secondary structure, and self-association. *J Neurochem.* 55, 950-5.
- Ming, G.L., Wong, S.T., Henley, J., Yuan, X.B., Song, H.J., Spitzer, N.C., Poo, M.M. (2002). Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature.* 417, 411-8.

- Mitashov, V.I. (1996). Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol.* 40, 833-44.
- Miyake, T., Hattori, T., Fukuda, M., Kitamura, T. (1989). Reactions of S-100-positive glia after injury of mouse cerebral cortex. *Brain Res.* 489, 31-40.
- Monzón-Mayor, M., Yanes, C., Ghandour, M.S., de Barry, J., Gombos, G. (1990). Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the developing and adult midbrain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol.* 295, 569-79.
- Monzón-Mayor, M., Yanes, C., De Barry, J., Capdevilla-Carbonell, C., Renau-Piqueras, J., Tholey, G., Gombos, G. (1998). Heterogeneous immunoreactivity of glial cells in the mesencephalon of a lizard: a double labeling immunohistochemical study. *J Morphol.* 235, 109-19.
- Moore, B.W. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 19, 739-44.
- Morcillo, J., Martínez-Morales, J.R., Trousse, F., Fermín, Y., Sowden, J.C., Bovolenta, P. (2006). Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development.* 133, 3179-90.
- Morcos, Y., Chan-Ling, T. (1997). Identification of oligodendrocyte precursors in the myelinated streak of the adult rabbit retina in vivo. *Glia.* 21, 163-82.
- Morcos, Y., Chan-Ling, T. (2000). Concentration of astrocytic filaments at the retinal optic nerve junction is coincident with the absence of intra-retinal myelination: comparative and developmental evidence. *J Neurocytol.* 29, 665-78.
- Morris, V.B., Wylie, C.C., Miles, V.J. (1976). The growth of the chick retina after hatching. *Anat Rec.* 184, 111-3.
- Mui, S.H., Kim, J.W., Lemke, G., Bertuzzi, S. (2005). Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes Dev.* 19, 1249-59.
- Müller, C.M. (1992). Astrocytes in cat visual cortex studied by GFAP and S-100 immunocytochemistry during postnatal development. *J Comp Neurol.* 317, 309-23.
- Müller, H. (1952). Bau und wachstum der netzhaut des Guppy (*Lebistes reticulatus*). *Zool Jb. Abt. Allg. Zool. Physiol.* 63, 275-324.
- Murray, M. (1982). A quantitative study of regenerative sprouting by optic axons in goldfish. *J Comp Neurol.* 209, 352-62.
- Nagano, T., Jourdi, H., Nawa, H. (1998). Emerging roles of Dlg-like PDZ proteins in the organization of the NMDA-type glutamatergic synapse. *J Biochem.* 124, 869-75.
- Nagashima, M., Sakurai, H., Mawatari, K., Koriyama, Y., Matsukawa, T., Kato, S. (2009). Involvement of retinoic acid signaling in goldfish optic nerve regeneration. *Neurochem Int.* 54, 229-36.
- Nakazawa, T., Tachi, S., Aikawa, E., Ihnuma, M. (1993). Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia.* 8, 114-21.
- Nathaniel, E.J., Nathaniel, D.R. (1977). Astroglial response to degeneration of dorsal root fibers in adult rat spinal cord. *Exp Neurol.* 54, 60-76.
- Navascués, J., Moujahid, A., Quesada, A., Cuadros, M.A. (1994). Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J Comp Neurol.* 350, 171-86.
- Navascués, J., Calvente, R., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (2000). Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc.* 72, 91-102.

- Negishi, K., Stell, W.K., Takasaki, Y. (1990a). Early histogenesis of the teleostean retina: studies using a novel immunochemical marker, proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin). *Brain Res Dev Brain Res.* 55, 121-5.
- Negishi, K., Teranishi, T., Karkhanis, A., Stell, W.K. (1990b). Emergence and development of immunoreactive cells in teleostean retinas during the perinatal period. *Brain Res Dev Brain Res.* 55, 127-37.
- Neumann, C.J., Nüsslein-Volhard, C. (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science.* 289, 2137-9.
- Newman, E., Reichenbach, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19, 307-12.
- Niclou, S.P., Ehlert, E.M., Verhaagen, J. (2006). Chemorepellent axon guidance molecules in spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 23, 409-21.
- Nishina, S., Kohsaka, S., Yamaguchi, Y., Handa, H., Kawakami, A., Fujisawa, H., Azuma, N. (1999). PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol.* 83, 723-7.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 409, 714-20.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7, 136-44.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Kriegstein, A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol.* 508, 28-44.
- Nona, S.N., Shehab, S.A., Stafford, C.A., Cronly-Dillon, J.R. (1989). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: its localisation in visual pathway. *Glia.* 2, 189-200.
- Nona, S.N., Duncan, A., Stafford, C.A., Maggs, A., Jeserich, G., Cronly-Dillon, J.R. (1992). Myelination of regenerated axons in goldfish optic nerve by Schwann cells. *J Neurocytol.* 21, 391-401.
- Nona, S.N. (1995). Repair by Schwann cells in the regenerating goldfish visual pathway. *Neuron-Glia Interactions during Phylogeny, Vol. 2. Humana, Totowa.* New Jersey.
- Nona, S.N., Stafford, C.A. (1995). Glial repair at the lesion site in regenerating goldfish spinal cord: an immunohistochemical study using species-specific antibodies. *J Neurosci Res.* 42, 350-6.
- Nona, S.N. (1998). Invited Review: Repair in Goldfish Central Nervous System. *Restor Neurol Neurosci.* 12, 1-11.
- Nona, S.N., Thomlinson, A.M., Stafford, C.A. (1998). Temporary colonization of the site of lesion by macrophages is a prelude to the arrival of regenerated axons in injured goldfish optic nerve. *J Neurocytol.* 27, 791-803.
- Nona, S.N., Thomlinson, A.M., Bartlett, C.A., Scholes, J. (2000). Schwann cells in the regenerating fish optic nerve: evidence that CNS axons, not the glia, determine when myelin formation begins. *J Neurocytol.* 29, 285-300.
- Norenberg, M.D., Martínez-Hernández, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303-10.
- Nornes, H.O., Dressler, G.R., Knapik, E.W., Deutsch, U., Gruss, P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development.* 109, 797-809.

- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J.P., Krauss, S., Johansen, T. (1998). Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev.* 77, 185-96.
- Ogden, T.E. (1978). Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17, 499-510.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C.E., Harris, W.A. (1999). p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell.* 99, 499-510.
- Olson, A.J., Picones, A., Julian, D., Korenbrot, J.I. (1999). A developmental time line in a retinal slice from rainbow trout. *J Neurosci Methods.* 93, 91-100.
- Omlin, F.X., Webster, H.D., Palkovits, C.G., Cohen, S.R. (1982). Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J Cell Biol.* 95, 242-8.
- Ono, K., Yasui, Y., Rutishauser, U., Miller, R.H. (1997). Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron.* 19, 283-92.
- Ono, K., Tsumori, T., Kishi, T., Yokota, S., Yasui, Y. (1998). Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J Comp Neurol.* 398, 309-22.
- Onteniente, B., Kimura, H., Maeda, T. (1983). Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 215, 427-36.
- Ortiz, J.R., Vigny, M., Courtois, Y., Jeanny, J.C. (1992). Immunocytochemical study of extracellular matrix components during lens and neural retina regeneration in the adult newt. *Exp Eye Res.* 54, 861-70.
- Oster, S.F., Bodeker, M.O., He, F., Sretavan, D.W. (2003). Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development.* 130, 775-84.
- Oster, S.F., Deiner, M., Birgbauer, E., Sretavan, D.W. (2004). Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve. *Semin Cell Dev Biol.* 15, 125-36.
- Ott, H., Bastmeyer, M., Stuermer, C.A. (1998). Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in retinal axon pathfinding to the optic disk. *J Neurosci.* 18, 3363-72.
- Ott, H., Diekmann, H., Stuermer, C.A., Bastmeyer, M. (2001). Function of Neurolin (DM-GRASP/SC-1) in guidance of motor axons during zebrafish development. *Dev Biol.* 235, 86-97.
- Otteson, D.C., Shelden, E., Jones, J.M., Kameoka, J., Hitchcock, P.F. (1998). Pax2 expression and retinal morphogenesis in the normal and Krd mouse. *Dev Biol.* 193, 209-24.
- Otteson, D.C., D'Costa, A.R., Hitchcock, P.F. (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol.* 232, 62-76.
- Otteson, D.C., Hitchcock, P.F. (2003). Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res.* 43, 927-36.
- Oyama, T., Abe, H., Ushiki, T. (2006). The connective tissue and glial framework in the optic nerve head of the normal human eye: light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol.* 69, 341-56.
- Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S., Franke, W.W. (1999). The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer

- limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp Cell Res.* 250, 452-64.
- Pak, W., Hindges, R., Lim, Y.S., Pfaff, S.L., O'Leary, D.D. (2004). Magnitude of binocular vision controlled by Islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell.* 119, 567-78.
- Park, H.C., Boyce, J., Shin, J., Appel, B. (2005). Oligodendrocyte specification in zebrafish requires notch-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor function. *J Neurosci.* 25, 6836-44.
- Parrilla, M. (2006). Localización y caracterización de células Pax2 positivas en el nervio óptico del carpín dorado (*Carassius auratus*, L., 1758). Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M.J., Arévalo, R., Lara, J.M., Aijón, J., Velasco, A. (2009). Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth. *Brain Res.* 1255, 75-88.
- Paschke, K.A., Lottspeich, F., Stuermer, C.A. (1992). Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J Cell Biol.* 117, 863-75.
- Patten, I., Placzek, M. (2000). The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci.* 57, 1695-708.
- Pedraza, L., Fidler, L., Staugaitis, S.M., Colman, D.R. (1997). The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron.* 18, 579-89.
- Pei, Y.F., Rhodin, J.A. (1970). The prenatal development of the mouse eye. *Anat Rec.* 168, 105-25.
- Penes, M.C., Li, X., Nagy, J.I. (2005). Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)-MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain. *Eur J Neurosci.* 22, 404-18.
- Penfold, P.L., Madigan, M.C., Provis, J.M. (1991). Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci.* 7, 383-8.
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M.L., Harris, W.A. (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol.* 199, 185-200.
- Perrone-Bizzozero, N.I., Benowitz, L.I. (1987). Expression of a 48-kilodalton growth-associated protein in the goldfish retina. *J Neurochem.* 48, 644-52.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11, 273-7.
- Perry, V.H., Lund, R.D. (1990). Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol.* 19, 265-72.
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H. (1991). The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells. *Oxford University Press.*
- Peterson, R.E., Fadool, J.M., McClintock, J., Linser, P.J. (2001). Müller cell differentiation in the zebrafish neural retina: evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J Comp Neurol.* 429, 530-40.
- Petrausch, B., Jung, M., Leppert, C.A., Stuermer, C.A. (2000). Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats. *Mol Cell Neurosci.* 16, 350-64.
- Petros, T.J., Rebsam, A., Mason, C.A. (2008). Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci.* 31, 295-315.

- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002-07.
- Pfeffer, P.L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M., Busslinger, M. (1998). Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development.* 125, 3063-74.
- Phelps, D.E., Dressler, G.R. (1996). Identification of novel Pax-2 binding sites by chromatin precipitation. *J Biol Chem.* 271, 7978-85.
- Picouet, M.J., Clairambault, M.P. (1975). The pathways and primary visual centers of *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura). *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 281, 1979-82.
- Piper, M., Holt, C. (2004). RNA translation in axons. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20, 505-23.
- Plas, D.T., López, J.E., Crair, M.C. (2005). Pretarget sorting of retinocollicular axons in the mouse. *J Comp Neurol.* 491, 305-19.
- Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron.* 33, 219-32.
- Politis, M.J., Miller, J.E. (1985). Post-traumatic alterations in glutamine synthetase activity in peripheral and central nerves. *Brain Res.* 359, 183-6.
- Pourquie, O., Hallonet, M.E., Le Douarin, N.M. (1992). Association of BEN glycoprotein expression with climbing fiber axonogenesis in the avian cerebellum. *J Neurosci.* 12, 1548-57.
- Powers, M.K., Bassi, C.J., Rone, L.A., Raymond, P.A. (1988). Visual detection by the rod system in goldfish of different sizes. *Vision Res.* 28, 211-21.
- Prada, C., Puelles, L., Genis-Galvez, J.M. (1981). A golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat Embryol (Berl).* 161, 305-17.
- Prada, C., Puga, J., Pérez-Méndez, L., López, R., Ramírez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci.* 3, 559-569.
- Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., Stillman, B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature.* 326, 517-20.
- Provis, J.M., Díaz, C.M., Penfold, P.L. (1996). Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol.* 3, 213-22.
- Puelles, L., Rubenstein, J.L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16, 472-9.
- Puschel, A.W., Gruss, P., Westerfield, M. (1992). Sequence and expression pattern of pax-6 are highly conserved between zebrafish and mice. *Development.* 114, 643-51.
- Quesada, A., Prada, F.A., Aguilera, Y., Espinar, A., Carmona, A., Prada, C. (2004). Peripapillary glial cells in the chick retina: A special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. *Glia.* 46, 346-55.
- Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J., Zack, D.J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 774-86.

- Quitschke, W., Schechter, N. (1983). *In vitro* protein synthesis in the goldfish retinotectal pathway during regeneration: evidence for specific axonal proteins of retinal origin in the optic nerve. *J Neurochem.* 41, 1137-42.
- Ramón y Cajal, S. (1893). La retina des vertébrés. *Cellule.* 9, 17-255.
- Ramón y Cajal, S. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. Trabajo de laboratorio de investigación en Biología. Universidad de Madrid. 18, 225-315.
- Rapaport, D.H., Rakic, P., LaVail, M.M. (1996). Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina. *Perspect Dev Neurobiol.* 3, 147-59.
- Rapaport, D.H., Wong, L.L., Wood, E.D., Yasumura, D., LaVail, M.M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol.* 474, 304-24.
- Raper, J.A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol.* 10, 88-94.
- Raymond, P.A., Rivlin, P.K. (1987). Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev Biol.* 122, 120-38.
- Raymond, P.A., Reifler, M.J., Rivlin, P.K. (1988). Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J Neurobiol.* 19, 431-63.
- Raymond, P.A., Hitchcock, P.F. (2000). How the neural retina regenerates. *Results Probl Cell Differ.* 31, 197-218.
- Readhead, C., Takasashi, N., Shine, H.D., Saavedra, R., Sidman, R., Hood, L. (1990). Role of myelin basic protein in the formation of central nervous system myelin. *Ann N Y Acad Sci.* 605, 280-5.
- Reh, T.A., Constantine-Paton, M. (1983). Qualitative and quantitative measures of plasticity during the normal development of the *Rana pipiens* retinotectal projection. *Brain Res.* 312, 187-200.
- Reh, T.A., Nagy, T., Gretton, H. (1987). Retinal pigmented epithelial cells induced to transdifferentiate to neurons by laminin. *Nature.* 330, 68-71.
- Reh, T.A., Pittack, C. (1995). Transdifferentiation and retinal regeneration. *Semin Cell Biol.* 6, 137-42.
- Reichenbach, A., Schippel, K., Schumann, R., Hagen, E. (1988). Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer-neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum. *J Hirnforsch.* 29, 481-91.
- Reichenbach, A., Schneider, H., Leibnitz, L., Reichelt, W., Schaaf, P., Schumann, R. (1989). The structure of rabbit retinal Müller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat Embryol (Berl).* 180, 71-9.
- Reichenbach, A., Robinson, S.R. (1995). Ependymoglia and ependymoglia-like cells. Neuroglia. *University Press.* Oxford.
- Reier, P.J., Stensaas, L.J., Guth, L. (1983). The astrocyte scar as an impediment to regeneration in central nervous system. *Spinal Cord Reconstruction.* Raven. New York.
- Rhodes, R.H. (1982). Development of the optic nerve. In Ocular anatomy, embryology and teratology. *Harper and Row.* Philadelphia.
- Rickmann, M., Wolff, J.R. (1995). S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci Lett.* 186, 13-6.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell.* 75, 1401-16.
- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G.B., Cornel, E., Lilienbaum, A., Holt, C.E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells *in vivo*. *Neuron.* 17, 837-48.

- Riepe, R.E., Norenberg, M.D. (1978). Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res.* 27, 435-44.
- Río Hortega, P.D. (1932). Cytology and cellular pathology of the nervous system. Microglia. *Penfield, W.* New York. 481-584.
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B., Philippe, J. (2000). The paired homeodomain transcription factor Pax-2 is expressed in the endocrine pancreas and transactivates the glucagon gene promoter. *J Biol Chem.* 275, 32708-15.
- Rodger, J., Vitale, P.N., Tee, L.B., King, C.E., Bartlett, C.A., Fall, A., Brennan, C., O'Shea, J.E., Dunlop, S.A., Beazley, L.D. (2004). EphA/ephrin-A interactions during optic nerve regeneration: restoration of topography and regulation of ephrin-A2 expression. *Mol Cell Neurosci.* 25, 56-68.
- Rodger, J., King, C.E., Lukehurst, S., Chen, P.B., Dunlop, S.A., Beazley, L.D., Ziman, M.R. (2006). Changing Pax6 expression correlates with axon outgrowth and restoration of topography during optic nerve regeneration. *Neuroscience.* 142, 1043-54.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 14, 357-60.
- Romero-Alemán Mdel, M., Monzón-Mayor, M., Yanes, C., Arbelo-Galván, J.F., Lang, D., Renau-Piqueras, J., Negrín-Martínez, C. (2003). S100 immunoreactive glial cells in the forebrain and midbrain of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. *J Neurobiol.* 57, 54-66.
- Roth, L.W., Bormann, P., Wiederkehr, C., Reinhard, E. (1999). Beta-thymosin, a modulator of the actin cytoskeleton is increased in regenerating retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci.* 11, 3488-98.
- Rubenstein, J.L., Beachy, P.A. (1998). Patterning of the embryonic forebrain. *Curr Opin Neurobiol.* 8, 18-26.
- Rubio, M., Suárez, I., Bodega, G., Fernández, B. (1992). Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the posterior rhombencephalon of the Iberian barb (*Barbus comiza*). *Neurosci Lett.* 134, 203-6.
- Rusoff, A.C., Easter, S.S., Jr. (1980). Order in the optic nerve of goldfish. *Science.* 208, 311-2.
- Rusoff, A.C., 1984. Paths of axons in the visual system of perciform fish and implications of these paths for rules governing axonal growth. *J Neurosci.* 4, 1414-28.
- Saavedra, R.A., Fors, L., Aebersold, R.H., Arden, B., Horvath, S., Sanders, J., Hood, L. (1989). The myelin proteins of the shark brain are similar to the myelin proteins of the mammalian peripheral nervous system. *J Mol Evol.* 29, 149-56.
- Saito, T. (1999). Development and regeneration of the retina. The retinal basis of vision. *Elsevier Science B.V.* Amsterdam.
- Sakai, H.M., Naka, K., Dowling, J.E. (1986). Ganglion cell dendrites are presynaptic in catfish retina. *Nature.* 319, 495-7.
- Sakai, J.A., Halloran, M.C. (2006). Semaphorin 3d guides laterality of retinal ganglion cell projections in zebrafish. *Development.* 133, 1035-44.
- Salvador-Silva, M., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P. (2000). Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol.* 417, 431-47.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L.A., McNoe, L.A., Ward, T.A., Pierpont, M.E., Sullivan, M.J., Dobyns, W.B., Eccles, M.R. (1995). Mutation of the PAX2 gene in a

- family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet.* 9, 358-64.
- Sanyanusin, P., Norrish, J.H., Ward, T.A., Nebel, A., McNoe, L.A., Eccles, M.R. (1996). Genomic structure of the human PAX2 gene. *Genomics.* 35, 258-61.
- Satkauskas, S., Bagnard, D. (2007). Local protein synthesis in axonal growth cones: what is next? *Cell Adh Migr.* 1, 179-84.
- Schmidt, J.T. (2004). Activity-driven sharpening of the retinotectal projection: the search for retrograde synaptic signaling pathways. *J Neurobiol.* 59, 114-33.
- Schmidt-Kastner, R., Szymas, J. (1990). Immunohistochemistry of glial fibrillary acidic protein, vimentin and S-100 protein for study of astrocytes in hippocampus of rat. *J Chem Neuroanat.* 3, 179-92.
- Schmitt, E.A., Dowling, J.E. (1994). Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol.* 344, 532-42.
- Schmitt, E.A., Dowling, J.E. (1999). Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *J Comp Neurol.* 404, 515-36.
- Schnitzer, J. (1985). Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J Comp Neurol.* 240, 128-42.
- Schnitzer, J. (1987). Immunocytochemical localization of S-100 protein in astrocytes and Müller cells in the rabbit retina. *Cell Tissue Res.* 248, 55-61.
- Schnitzer, J. (1988). Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia.* 1, 74-89.
- Schnitzer, J. (1989). Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol.* 282, 249-63.
- Scholes, J.H. (1979). Nerve fibre topography in the retinal projection to the tectum. *Nature.* 278, 620-4.
- Schuck, J., Gerhardt, H., Wolburg, H. (2000). The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. *Anat Rec.* 259, 263-75.
- Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M., Gruss, P. (2000). Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development.* 127, 4325-34.
- Schweitzer, J., Gimnopoulos, D., Lieberoth, B.C., Pogoda, H.M., Feldner, J., Ebert, A., Schachner, M., Becker, T., Becker, C.G. (2007). Contactin1a expression is associated with oligodendrocyte differentiation and axonal regeneration in the central nervous system of zebrafish. *Mol Cell Neurosci.* 35, 194-207.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A., Wright, M.W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol.* 174, 169-74.
- Senut, M.C., Gulati-Leekha, A., Goldman, D. (2004). An element in the alpha1-tubulin promoter is necessary for retinal expression during optic nerve regeneration but not after eye injury in the adult zebrafish. *J Neurosci.* 24, 7663-73.
- Seth, A., Culverwell, J., Walkowicz, M., Toro, S., Rick, J.M., Neuhauss, S.C., Varga, Z.M., Karlstrom, R.O. (2006). *belladonna*/*Ihx2* is required for neural patterning and midline axon guidance in the zebrafish forebrain. *Development.* 133, 725-35.
- Sharma, S.C., Ungar, F. (1980). Histogenesis of the goldfish retina. *J Comp Neurol.* 191, 373-82.
- Sherpa, T., Fimbel, S.M., Mallory, D.E., Maaswinkel, H., Spritzer, S.D., Sand, J.A., Li, L., Hyde, D.R., Stenkamp, D.L. (2008). Ganglion cell regeneration following whole-retina destruction in zebrafish. *Dev Neurobiol.* 68, 166-81.

- Shin, D., Park, S., Park, C. (2003). A splice variant acquiring an extra transcript leader region decreases the translation of glutamine synthetase gene. *Biochem J.* 374, 175-84.
- Shin, D., Park, C. (2004). N-terminal extension of canine glutamine synthetase created by splicing alters its enzymatic property. *J Biol Chem.* 279, 1184-90.
- Shkumatava, A., Fischer, S., Müller, F., Strahle, U., Neumann, C.J. (2004). Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development.* 131, 3849-58.
- Short, S., Holland, L.Z. (2008). The evolution of alternative splicing in the Pax family: the view from the Basal chordate amphioxus. *J Mol Evol.* 66, 605-20.
- Silveira, L.C., Russelakis-Carneiro, M., Perry, V.H. (1994). The ganglion cell response to optic nerve injury in the cat: differential responses revealed by neurofibrillar staining. *J Neurocytol.* 23, 75-86.
- Silver, J., Rutishauser, U. (1984). Guidance of optic axons in vivo by a preformed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet. *Dev Biol.* 106, 485-99.
- Silver, J., Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5, 146-56.
- Sivron, T., Schwab, M.E., Schwartz, M. (1994). Presence of growth inhibitors in fish optic nerve myelin: postinjury changes. *J Comp Neurol.* 343, 237-46.
- Sivron, T., Schwartz, M. (1994). Nonpermissive nature of fish optic nerves to axonal growth is due to presence of myelin-associated growth inhibitors. *Exp Neurol.* 130, 411-3.
- Sivron, T., Schwartz, M. (1995). Glial cell types, lineages, and response to injury in rat and fish: implications for regeneration. *Glia.* 13, 157-65.
- Smith, C.W., Patton, J.G., Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet.* 23, 527-77.
- Snow, D.M., Letourneau, P.C. (1992). Neurite outgrowth on a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG). *J Neurobiol.* 23, 322-36.
- Soukkarieh, C., Agius, E., Soula, C., Cochard, P. (2007). Pax2 regulates neuronal-glial cell fate choice in the embryonic optic nerve. *Dev Biol.* 303, 800-13.
- Soules, K.A., Link, B.A. (2005). Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *BMC Dev Biol.* 5, 12.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martínez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B., Thomas, J.L. (1998). Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci.* 18, 8331-43.
- Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B., Thomas, J.L. (2002). Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci.* 22, 5992-6004.
- Spence, J.R., Madhavan, M., Ewing, J.D., Jones, D.K., Lehman, B.M., Del Rio-Tsonis, K. (2004). The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development.* 131, 4607-21.
- Sperry, R.W. (1948). Patterning of central synapses in regeneration of the optic nerve in teleosts. *Physiol. Zool.* 21, 351-361.
- Springer, A.D. (1981). Normal and abnormal retinal projections following the crush of one optic nerve in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol.* 199, 87-95.
- Springer, A.D., Wilson, B.R. (1989). Light microscopic study of degenerating cobalt-filled optic axons in goldfish: role of microglia and radial glia in debris removal. *J Comp Neurol.* 282, 119-32.

- Sretavan, D.W., Feng, L., Pure, E., Reichardt, L.F. (1994). Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44, cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth. *Neuron*. 12, 957-75.
- Stafford, C.A., Shehab, S.A., Nona, S.N., Cronly-Dillon, J.R. (1990). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in goldfish optic nerve following injury. *Glia*. 3, 33-42.
- Stagaard Janas, M., Nowakowski, R.S., Mollgard, K. (1991a). Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions. II. Early appearance of S-100 protein positive astrocytes in human fetal hippocampus. *Anat Embryol (Berl)*. 184, 559-69.
- Stagaard Janas, M., Nowakowski, R.S., Terkelsen, O.B., Mollgard, K. (1991b). Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions. I. Selective appearance of S-100 protein in radial glial cells of the hippocampal fimbria in human fetuses. *Anat Embryol (Berl)*. 184, 549-58.
- Stanke, J., Moose, H.E., El-Hodiri, H.M., Fischer, A.J. (2010). Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals. *J Comp Neurol*. 518, 2316-33.
- Staugaitis, S.M., Colman, D.R., Pedraza, L. (1996). Membrane adhesion and other functions for the myelin basic proteins. *Bioessays*. 18, 13-8.
- Steinbach, K., Schlosshauer, B. (2000). Regulatory cell interactions between retinal ganglion cells and radial glia during axonal and dendritic outgrowth. *Microsc Res Tech*. 48, 12-24.
- Stenkamp, D.L., Frey, R.A., Prabhudesai, S.N., Raymond, P.A. (2000). Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev Biol*. 220, 238-52.
- Stenkamp, D.L., Satterfield, R., Muhunthan, K., Sherpa, T., Vihtelic, T.S., Cameron, D.A. (2008). Age-related cone abnormalities in zebrafish with genetic lesions in sonic hedgehog. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49, 4631-40.
- Stier, H., Schlosshauer, B. (1995). Axonal guidance in the chicken retina. *Development*. 121, 1443-54.
- Stoll, G., Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol*. 58, 233-47.
- Stolt, C.C., Rehberg, S., Ader, M., Lommes, P., Riethmacher, D., Schachner, M., Bartsch, U., Wegner, M. (2002). Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev*. 16, 165-70.
- Stone, J., Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol*. 255, 35-49.
- Stoykova, A., Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci*. 14, 1395-412.
- Strahle, U., Fischer, N., Blader, P. (1997). Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. *Mech Dev*. 62, 147-60.
- Straznicky, C., Hiscock, J. (1984). Post-metamorphic retinal growth in *Xenopus*. *Anat Embryol (Berl)*. 169, 103-9.
- Straznicky, K., Gaze, R.M. (1971). The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J Embryol Exp Morphol*. 26, 67-79.
- Streit, W.J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*. 1, 301-7.
- Strickler, A.G., Yamamoto, Y., Jeffery, W.R. (2001). Early and late changes in Pax6 expression accompany eye degeneration during cavefish development. *Dev Genes Evol*. 211, 138-44.

- Struzynska, L., Chalimoniuk, M., Sulkowski, G. (2005). The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology*. 212, 185-94.
- Stuart, E.T., Kioussi, C., Gruss, P. (1994). Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet*. 28, 219-36.
- Stuermer, C.A., Easter, S.S., Jr. (1984). Rules of order in the retinotectal fascicles of goldfish. *J Neurosci*. 4, 1045-51.
- Stuermer, C.A. (1988). Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. *J Neurosci*. 8, 4513-30.
- Stuermer, C.A., Bastmeyer, M. (2000). The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog Neurobiol*. 62, 197-214.
- Sugimoto, Y., Taniguchi, M., Yagi, T., Akagi, Y., Nojyo, Y., Tamamaki, N. (2001). Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development*. 128, 3321-30.
- Sun, D., Lye-Barthel, M., Masland, R.H., Jakobs, T.C. (2009). The morphology and spatial arrangement of astrocytes in the optic nerve head of the mouse. *J Comp Neurol*. 516, 1-19.
- Takabatake, T., Ogawa, M., Takahashi, T.C., Mizuno, M., Okamoto, M., Takeshima, K., 1997. Hedgehog and patched gene expression in adult ocular tissues. *FEBS Lett*. 410, 485-9.
- Takada, N., Kucenas, S., Appel, B. (2010). Sox10 is necessary for oligodendrocyte survival following axon wrapping. *Glia*. 58(8), 996-1006.
- Takahashi, T., Caviness, V.S., Jr. (1993). PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol*. 22, 1096-102.
- Take-uchi, M., Clarke, J.D., Wilson, S.W. (2003). Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development*. 130, 955-68.
- Tanaka, M., Murayama, D., Nagashima, M., Higashi, T., Mawatari, K., Matsukawa, T., Kato, S. (2007). Purpurin expression in the zebrafish retina during early development and after optic nerve lesion in adults. *Brain Res*. 1153, 34-42.
- Tapp, R.L. (1973). The structure of the optic nerve of the teleost: *Eugerres plumieri*. *J Comp Neurol*. 150, 239-52.
- Taupin, P., Gage, F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*. 69, 745-9.
- Tavassoli, K., Ruger, W., Horst, J. (1997). Alternative splicing in PAX2 generates a new reading frame and an extended conserved coding region at the carboxy terminus. *Hum Genet*. 101, 371-5.
- Terenghi, G., Cocchia, D., Michetti, F., Diani, A.R., Peterson, T., Cole, D.F., Bloom, S.R., Polak, J.M. (1983). Localization of S-100 protein in Muller cells of the retina--1. Light microscopical immunocytochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 24, 976-80.
- Thanos, S., Bonhoeffer, F. (1984). Development of the transient ipsilateral retinotectal projection in the chick embryo: a numerical fluorescence-microscopic analysis. *J Comp Neurol*. 224, 407-14.
- Thanos, S., Pavlidis, C., Mey, J., Thiel, H.J. (1992). Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*. 55, 101-17.

- Thanos, S., Puttmann, S., Naskar, R., Rose, K., Langkamp-Flock, M., Paulus, W. (2004). Potential role of Pax-2 in retinal axon navigation through the chick optic nerve stalk and optic chiasm. *J Neurobiol.* 59, 8-23.
- Thut, C.J., Rountree, R.B., Hwa, M., Kingsley, D.M. (2001). A large-scale in situ screen provides molecular evidence for the induction of eye anterior segment structures by the developing lens. *Dev Biol.* 231, 63-76.
- Tomizawa, K., Inoue, Y., Doi, S., Nakayasu, H. (2000). Monoclonal antibody stains oligodendrocytes and Schwann cells in zebrafish (*Danio rerio*). *Anat Embryol (Berl)*. 201, 399-406.
- Ton, C.C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M.M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N.D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., *et al.* (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell.* 67, 1059-74.
- Torban, E., Eccles, M.R., Favor, J., Goodyer, P.R. (2000). PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells. *Am J Pathol.* 157, 833-42.
- Torres, M., Gómez-Pardo, E., Gruss, P. (1996). Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development.* 122, 3381-91.
- Trapp, B.D., Nishiyama, A., Cheng, D., Macklin, W. (1997). Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol.* 137, 459-68.
- Triviño, A., Ramírez, J.M., Salazar, J.J., Ramírez, A.I., García-Sánchez, J. (1996). Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Res.* 36, 2015-28.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M., Bovolenta, P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development.* 128, 3927-36.
- Tsai, H.H., Miller, R.H. (2002). Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci.* 25, 173-5.
- Turner, D.L., Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature.* 328, 131-6.
- Uchiyama, H. (1989). Centrifugal pathways to the retina: influence of the optic tectum. *Vis Neurosci.* 3, 183-206.
- Uchiyama, H. (1990). Immunohistochemical subpopulations of retinopetal neurons in the nucleus olfactoretinalis in a teleost, the whitespotted greenling (*Hexagrammos stelleri*). *J Comp Neurol.* 293, 54-62.
- Udvardia, A.J., Koster, R.W., Skene, J.H. (2001). GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration. *Development.* 128, 1175-82.
- Ulshafer, R.J., Clavert, A. (1979). Cell death and optic fiber penetration in the optic stalk of the chick. *J Morphol.* 162, 67-76.
- Valero, J. (2003). Marcadores de proliferación neuronal en la corriente migratoria rostral de roedores. Biología celular y patología. Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.
- Valero, J., Weruaga, E., Murias, A.R., Recio, J.S., Alonso, J.R. (2005). Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res Brain Res Protoc.* 15, 127-34.
- Vanegas, H., Ito, H. (1983). Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res.* 287, 117-37.
- Vardimon, L., 2000. Neuroprotection by glutamine synthetase. *Isr Med Assoc J.* 2 Suppl, 46-51.

- Vecino, E., Velasco, A., Caminos, E., Aijón, J. (1997). Distribution of S100 immunoreactivity in the retina and optic nerve head of the teleost *Tinca tinca* L. *Microsc Res Tech.* 36, 17-25.
- Velasco, A. (1994). Glía en procesos degenerativos/regenerativos en la vía visual de tenca (*Tinca tinca*): Estudio histoquímica e inmunohistoquímico. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Velasco, A., Caminos, E., Vecino, E., Lara, J.M., Aijón, J. (1995). Microglia in normal and regenerating visual pathways of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Teleost): a study with tomato lectin. *Brain Res.* 705, 315-24.
- Velasco, A., Briñón, J.G., Caminos, E., Lara, J.M., Aijón, J. (1997). S-100-positive glial cells are involved in the regeneration of the visual pathway of teleosts. *Brain Res Bull.* 43, 327-36.
- Velasco, A., Jimeno, D., Lillo, C., Caminos, E., Lara, J.M., Aijón, J. (1999). Enzyme histochemical identification of microglial cells in the retina of a fish (*Tinca tinca*). *Neurosci Lett.* 263, 101-4.
- Velasco, A., Bragado, M.J., Jimeno, D., Caminos, E., Lillo, C., Aijón, J., Lara, J.M. (2000). Growing and regenerating axons in the visual system of teleosts are recognized with the antibody RT97. *Brain Res.* 883, 98-106.
- Velasco, A., Cid, E., Ciudad, J., Orfao, A., Aijón, J., Lara, J.M. (2001). Temperature induces variations in the retinal cell proliferation rate in a cyprinid. *Brain Res.* 913, 190-4.
- Veldman, M.B., Bembem, M.A., Thompson, R.C., Goldman, D. (2007). Gene expression analysis of zebrafish retinal ganglion cells during optic nerve regeneration identifies KLF6a and KLF7a as important regulators of axon regeneration. *Dev Biol.* 312, 596-612.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Villegas-Pérez, M.P., Thanos, S., Aguayo, A.J. (1987). Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci.* 7, 2894-909.
- Viñoly, R. (2005). Inmunohistoquímica de las células GS y Lectina positivas durante la ontogenia del sistema visual de *Gallotia galloti*. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna.
- Vrabec, F. (1970). Microglia in the monkey and rabbit retina. *J Neuropathol Exp Neurol.* 29, 217-24.
- Vuppalanchi, D., Willis, D.E., Twiss, J.L. (2009). Regulation of mRNA transport and translation in axons. *Results Probl Cell Differ.* 48, 193-224.
- Wallace, V.A., Raff, M.C. (1999). A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development.* 126, 2901-9.
- Walther, C., Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development.* 113, 1435-49.
- Wan, J., Zheng, H., Xiao, H.L., She, Z.J., Zhou, G.M. (2007). Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Müller glia in the mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 363, 347-54.
- Wang, A.G., Yen, M.Y., Hsu, W.M., Fann, M.J. (2006). Induction of vitronectin and integrin alphaV in the retina after optic nerve injury. *Mol Vis.* 12, 76-84.
- Wang, W., van Niekerk, E., Willis, D.E., Twiss, J.L. (2007). RNA transport and localized protein synthesis in neurological disorders and neural repair. *Dev Neurobiol.* 67, 1166-82.
- Wang, Y.P., Dakubo, G., Howley, P., Campsall, K.D., Mazarolle, C.J., Shiga, S.A., Lewis, P.M., McMahon, A.P., Wallace, V.A. (2002). Development of normal

- retinal organization depends on Sonic hedgehog signaling from ganglion cells. *Nat Neurosci.* 5, 831-2.
- Wangsa-Wirawan, N.D., Linsenmeier, R.A. (2003). Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Arch Ophthalmol.* 121, 547-57.
- Wanner, M., Lang, D.M., Bandtlow, C.E., Schwab, M.E., Bastmeyer, M., Stuermer, C.A. (1995). Reevaluation of the growth-permissive substrate properties of goldfish optic nerve myelin and myelin proteins. *J Neurosci.* 15, 7500-8.
- Warringa, R.A., van Berlo, M.F., Klein, W., Lopes-Cardozo, M. (1988). Cellular location of glutamine synthetase and lactate dehydrogenase in oligodendrocyte-enriched cultures from rat brain. *J Neurochem.* 50, 1461-8.
- Watanabe, T., Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature.* 332, 834-7.
- Wegner, M., Stolt, C.C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28, 583-8.
- Wegner, M. (2008). A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci.* 35, 3-12.
- Wehr, R., Gruss, P. (1996). Pax and vertebrate development. *Int J Dev Biol.* 40, 369-77.
- Westerfield, M. (1995). The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press.
- Wetts, R., Fraser, S.E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science.* 239, 1142-5.
- Wetts, R., Serbedzija, G.N., Fraser, S.E. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev Biol.* 136, 254-63.
- Willbold, E., Layer, P.G. (1998). Müller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro. *Histol Histopathol.* 13, 531-52.
- Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., Henkemeyer, M. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron.* 39, 919-35.
- Williams, S.E., Grumet, M., Colman, D.R., Henkemeyer, M., Mason, C.A., Sakurai, T. (2006). A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron.* 50, 535-47.
- Willott, E., Balda, M.S., Heintzelman, M., Jameson, B., Anderson, J.M. (1992). Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol.* 262, C1119-24.
- Willott, E., Balda, M.S., Fanning, A.S., Jameson, B., Van Itallie, C., Anderson, J.M. (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* disc-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 7834-8.
- Witkovsky, P. (1971). Synapses made by myelinated fibers running to teleost and elasmobranch retinas. *J Comp Neurol.* 142, 205-21.
- Wolburg, H. (1981). Axonal transport, degeneration, and regeneration in the visual system of the goldfish. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 67, 1-94.
- Wolburg, H., Kastner, R., Kurz-Isler, G. (1983). Lack of orthogonal particle assemblies and presence of tight junctions in astrocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). A freeze-fracture study. *Cell Tissue Res.* 234, 389-402.
- Won, M.H., Kang, T.C., Cho, S.S. (2000). Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc Res Tech.* 50, 151-60.

- Wu, D.M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L., Raymond, P.A. (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 2115-24.
- Young, R.W., Bok, D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol.* 42, 392-403.
- Young, R.W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec.* 212, 199-205.
- Yuan, W., Zhou, L., Chen, J.H., Wu, J.Y., Rao, Y., Ornitz, D.M. (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol.* 212, 290-306.
- Zhang, H.R. (1994). Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Prog. Ret. Eye Res.* 13, 243-270.
- Zhang, X.M., Yang, X.J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development.* 128, 943-57.
- Zhang, Y., Porat, R.M., Alon, T., Keshet, E., Stone, J. (1999). Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 118, 135-45.
- Zhao, S., Chen, Q., Hung, F.C., Overbeek, P.A. (2002). BMP signaling is required for development of the ciliary body. *Development.* 129, 4435-42.
- Zheng, J.Q., Kelly, T.K., Chang, B., Ryazantsev, S., Rajasekaran, A.K., Martin, K.C., Twiss, J.L. (2001). A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J Neurosci.* 21, 9291-303.
- Zhou, L.X., Wang, Z.R. (2002). Changes in number and distribution of retinal ganglion cells after optic nerve crush in zebrafish. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 35, 159-62.
- Ziman, M.R., Rodger, J., Chen, P., Papadimitriou, J.M., Dunlop, S.A., Beazley, L.D. (2001). Pax genes in development and maturation of the vertebrate visual system: implications for optic nerve regeneration. *Histol Histopathol.* 16, 239-49.
- Zupanc, G.K. (1999). Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. *J Exp Biol.* 202, 1435-46.