

T- proo-21/83

3/1111

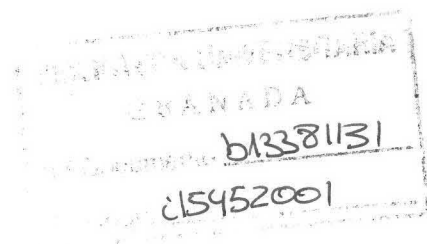
UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 05-03-98
ENTRADA NUM. ... 934

**MUERTE CELULAR Y MIGRACIÓN DE
PRECURSORES MICROGLIALES DURANTE EL
DESARROLLO DE LA RETINA DE CODORNIZ**

TESIS DOCTORAL



JOSÉ LUIS MARÍN TEVA

GRANADA, FEBRERO DE 1998



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular

**MUERTE CELULAR Y MIGRACIÓN DE PRECURSORES
MICROGLIALES DURANTE EL DESARROLLO
DE LA RETINA DE CODORNIZ**

Trabajo presentado por **JOSÉ LUIS MARÍN TEVA**, Licenciado en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor.

Directores

Prof. Dr. JULIO NAVASCUÉS MARTÍNEZ, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Granada.

Prof. Dr. MIGUEL ANGEL CUADROS OJEDA, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Granada.

Prof. Dr. ANTONIO M. ALMENDROS GALLEGO, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Granada.

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACION DE LA TESIS

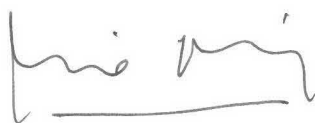
JULIO NAVASCUÉS MARTÍNEZ, CATEDRÁTICO DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, Y MIGUEL ANGEL CUADROS OJEDA Y ANTONIO M. ALMENDROS GALLEGO, PROFESORES TITULARES DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICAN: Que la presente Tesis, titulada "Muerte celular y migración de precursores microgliales durante el desarrollo de la retina de codorniz", de la que es autor el Ldo. D. JOSÉ LUIS MARÍN TEVA, que superó el Programa de Doctorado "Inmunología Básica", ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

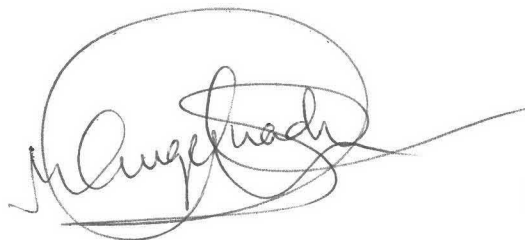
Revisado el presente trabajo, los Directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que

AUTORIZAN la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 185/1985, de 23 de Enero.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada a veinte de Febrero de mil novecientos noventa y ocho.



Julio Navascués Martínez

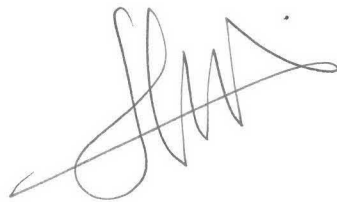


Miguel A. Cuadros Ojeda



Antonio M. Almendros Gallego

Esta Tesis Doctoral fué realizada por el que suscribe en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y concluída el 20 de Febrero de 1998.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'J' followed by several loops and a final flourish.

Fdo. José Luis Marín Teva

A mis padres y hermana

A Marian

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que de una manera u otra han contribuido a la realización de esta tesis.

Al Prof. Dr. D. Julio Navascués Martínez, Director de esta tesis, a quien estoy especialmente agradecido por iniciarme en la línea de trabajo de su grupo de investigación de la cual ha nacido esta tesis, porque siempre ha perseguido con esfuerzo y generosidad que mi formación científica estuviese a un alto nivel, por su cuidadosa revisión del manuscrito y por su hábil y experta dirección de la que he aprendido infinidad de cosas para el futuro, no sólo en lo que a la ciencia se refiere.

Al Prof. Dr. D. Miguel Angel Cuadros Ojeda, Director de esta tesis, por su apoyo y dedicación a este trabajo, por su detenida corrección del manuscrito, por su gran ayuda con la bibliografía, por mostrarme lo interesantes y a la vez divertidos que pueden llegar a ser los congresos y por compartir y enseñarme muchas cosas desde que empecé a dar mis primeros pasos en investigación.

Al Prof. Dr. D. Antonio Almendros Gallego, Director de esta tesis, por su constante estímulo y asistencia durante estos años, por su participación en la revisión del manuscrito y por sus siempre oportunos consejos sobre microscopía electrónica, que han sido fundamentales para la realización de una gran parte de este trabajo.

A la Prof. Dra. D^a. Ruth Calvente Iglesias, porque además de su valiosa colaboración en la parte experimental, siempre ha estado dispuesta para ayudarme a resolver los diferentes problemas de tipo informático que me han ido surgiendo, participando en la confección de algunas de las figuras de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Gervasio Martín Partido, de la Universidad de Extremadura, por tener la gentileza de invitarnos a su laboratorio para la realización de las imágenes de microscopía confocal de este trabajo y por la gran cantidad de horas que desinteresadamente nos dedicó durante aquella estancia.

Al Prof. Dr. D. Antonio Ríos Guadix, Director del Departamento de Biología Celular, por la amabilidad que siempre ha demostrado conmigo en las innumerables ocasiones en las que le he solicitado escritos, certificados, informes, etc, para diferentes asuntos académicos y científicos.

A Juan de Dios Bueno y Concepción Hernández, miembros del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por su valiosa ayuda en la preparación de las muestras destinadas a microscopía electrónica de transmisión y barrido. Además, les estoy muy agradecido por la atención y cordialidad que me han mostrado siempre.

A Isabel Guerra, Alicia González, María José Martínez y David Porcel, pertenecientes al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por la ayuda y amabilidad mostradas durante la observación de las muestras con los microscopios electrónicos de barrido y transmisión.

A Miguel Angel González, perteneciente al laboratorio de análisis de imágenes del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por haber hecho fácil la complicada preparación de algunas de las figuras de esta tesis.

A la Prof. Dra. D^a. Leny Cavalcante, de la Universidad Federal de Rio de Janeiro. Aunque su estancia en nuestro laboratorio fue corta dejó su influencia en este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Luis Caballero López-Lendínez, por las numerosas ocasiones en las que ha manifestado su interés por esta tesis, con comentarios siempre constructivos.

Al resto del personal del Departamento de Biología Celular, porque me han acogido como a uno más y por los cafés que hemos tomado durante estos años, condimentados con interesantes e instructivas tertulias.

A mis padres y hermana, por su apoyo incondicional y su cariño y porque siempre han procurado que nada obstaculizara este camino tan importante para mí.

A Marian, por su comprensión y por haber sacrificado muchas horas en beneficio de mi labor científica; sin ella no sería lo mismo.

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos de la DGICYT PB91-0722 y PB94-0789. Durante la realización del mismo he disfrutado de una Beca Predoctoral del Programa Sectorial de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador de la DGICYT, del Ministerio de Educación y Ciencia.

Mi éxito como hombre de ciencia, cualquiera que sea la altura que haya alcanzado, ha sido determinado, en la medida que puedo juzgar, por complejas y diversas cualidades y condiciones mentales. De ellas, las más importantes han sido: la pasión por la ciencia, paciencia ilimitada para reflexionar largamente sobre cualquier tema, laboriosidad en la observación y recolección de datos, y una mediana dosis de inventiva así como de sentido común. Con unas facultades tan ordinarias como las que poseo, es verdaderamente sorprendente que haya influenciado en grado considerable las creencias de los científicos respecto a algunos puntos importantes.

Charles Darwin, 1881

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	3
Desarrollo de las células microgliales	3
Desarrollo de las células microgliales en la retina	8
OBJETIVOS	10
REFERENCIAS	12
CAPÍTULO I: MIGRACIÓN TANGENCIAL DE LA MICROGLÍA AMEBOIDE:	
MECANISMOS DE MIGRACIÓN Y COMPORTAMIENTO MIGRATORIO	17
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Aislamiento de las retinas y preparación de las láminas MLI/PTCM	24
Microscopía electrónica	25
Inmunocitoquímica	26
RESULTADOS	29
Migración tangencial de la microglía ameboide sobre los pies terminales de células de Müller	29
Morfología de la microglía ameboide que migra tangencialmente: emisión de lamelipodios	29
Anclaje al sustrato de la microglía ameboide en proceso de migración	31
Prolongaciones filamentosas de algunas células microgliales ameboides en proceso de migración	32
Variabilidad morfológica de la microglía ameboide en migración tangencial: células ameboides monopolares, bipolares y multipolares	33
Relación entre caracteres morfológicos y localización crono-topográfica de las células microgliales ameboides	35
DISCUSIÓN	62
Los pies terminales de las células de Müller son el sustrato sobre el que migra tangencialmente la microglía ameboide	62

Mecanismos celulares implicados en la locomoción de la microglía ameboide durante su migración tangencial	64
Orientación de las células microgliales ameboides en proceso de migración	68
Conducta migratoria de las células microgliales ameboides la retina en desarrollo	69
REFERENCIAS	72

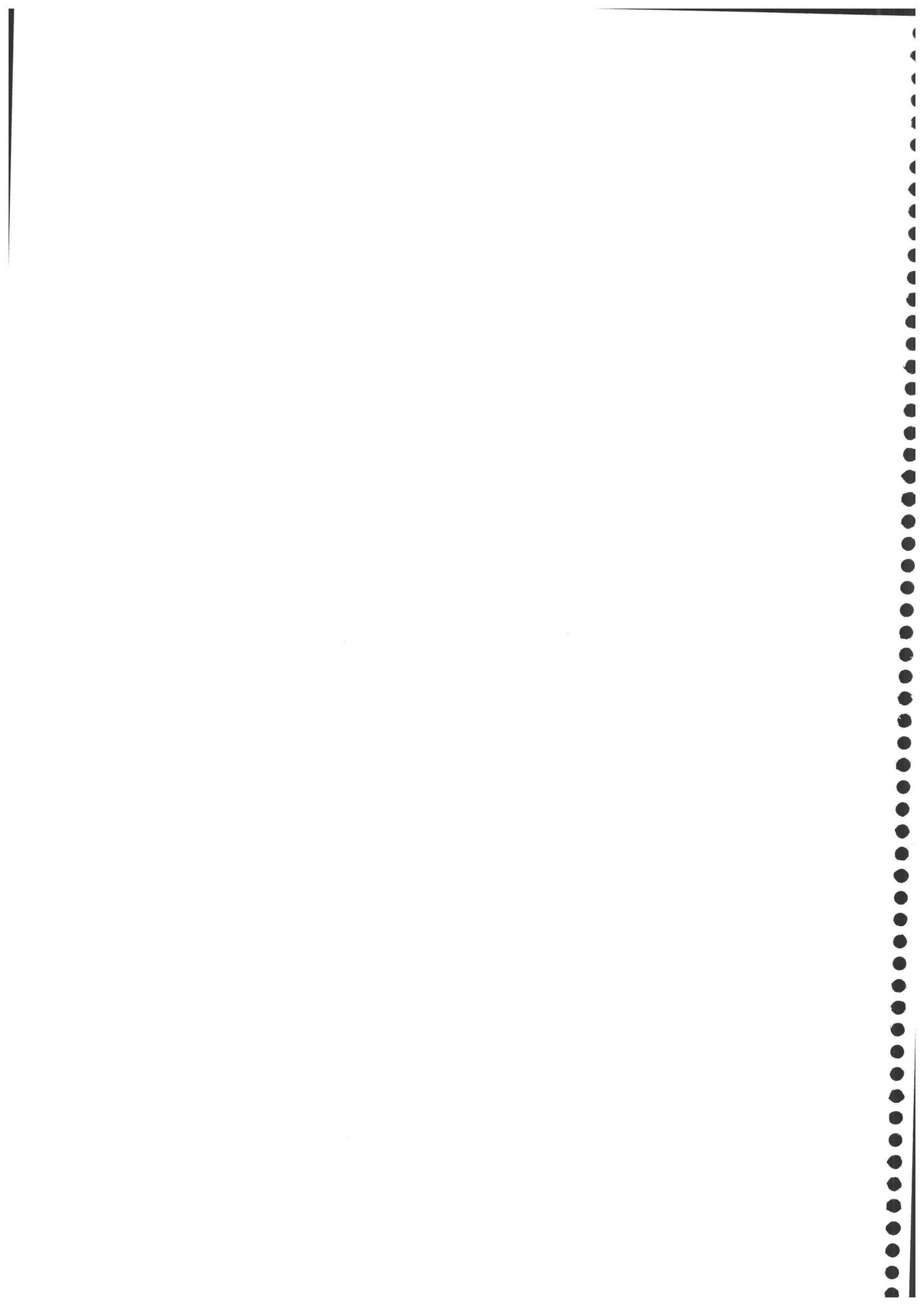
CAPÍTULO II: PROLIFERACIÓN DE LA MICROGLÍA AMEBOIDE

EN PROCESO DE MIGRACIÓN	79
RESUMEN 81	81
INTRODUCCIÓN	82
MATERIALES Y MÉTODOS	84
Inmunocitoquímica con QH1 en montajes totales de retina	84
Preparación de las láminas MLI/PTCM	84
Doble inmunofluorescencia de láminas MLI/PTCM	85
Microscopía electrónica de las láminas MLI/PTCM	87
RESULTADOS	88
Mitosis en células microgliales ameboides que muestran morfología de células en proceso de migración	88
Caracteres morfológicos de las células microgliales ameboides en citocinesis	89
Variaciones de la orientación y distribución topográfica de las células microgliales ameboides en división	90
Marcaje con anti-PCNA de células microgliales ameboides en migración	91
DISCUSIÓN	106
La proliferación celular contribuye a incrementar la población de células microgliales ameboides en migración	106
Ciclos de migración/división y conducta migratoria de las células microgliales ameboides	109
REFERENCIAS	112

CAPÍTULO III: MIGRACIÓN MARGINAL CIRCUNFERENCIAL DE PRECURSORES MICROGLIALES	119
RESUMEN	121
INTRODUCCIÓN	123
MATERIALES Y MÉTODOS	125
Aislamiento de las retinas y obtención de las extensiones	125
Inmunomarcaje QH1	126
Mapas de distribución de precursores microgliales que migran tangencialmente	127
RESULTADOS	128
Microglía ameboide orientada circunferencialmente en la periferia retiniana	129
Orientación de las células en distintos niveles topográficos del AMMC: diferencias temporo-nasales	133
Ramificación de los precursores microgliales del AMMC: diferencias temporo-nasales	134
Desarrollo de células dendríticas en el cuerpo ciliar y entrada de precursores microgliales en la periferia de la retina	135
DISCUSIÓN	158
Entrada en la retina de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar	160
Asimetría del desarrollo de la microglía en la retina	161
REFERENCIAS	164
 CAPÍTULO IV: MUERTE NEURONAL Y MIGRACIÓN DE PRECURSORES MICROGLIALES DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA	167
RESUMEN	169
INTRODUCCIÓN	171
MATERIALES Y MÉTODOS	176
Detección de cuerpos apoptóticos mediante la técnica TUNEL	176
Reconocimiento de precursores microgliales mediante inmunocitoquímica con QH1	178

Dobles marcajes para la detección simultánea de cuerpos apoptóticos y precursores microgliales	180
Determinaciones de densidad de cuerpos apoptóticos	181
Mapas de distribución de precursores microgliales	182
Microscopía electrónica	183
RESULTADOS	186
Apoptosis en la CCG y CNI	186
Patrón cronotopográfico de distribución de núcleos apoptóticos en la CCG	186
Patrón cronotopográfico de distribución de núcleos apoptóticos en la CNI	187
Patrón cronotopográfico de distribución de precursores microgliales en la parte vítrea de la retina (migración tangencial)	188
Patrón cronotopográfico de distribución de precursores microgliales en diferentes capas de la retina (migración radial)	189
Comparación de la distribución de células apoptóticas en la CCG y CNI con la migración tangencial y radial de precursores microgliales	190
Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por precursores microgliales en la CFN y CCG	192
Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por células de Müller en la CNI	193
DISCUSIÓN	232
Procedimiento técnico	232
Muerte neuronal en la retina de aves	234
Gradientes de muerte neuronal en el desarrollo de la retina	237
Apoptosis y entrada de precursores microgliales en la retina	240
Tipos celulares responsables de la eliminación de restos apoptóticos en la retina	244
REFERENCIAS	250
CONCLUSIONES	261

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



INTRODUCCIÓN

El objeto de la presente tesis es el estudio de la microglía durante el desarrollo embrionario en una región particular del Sistema Nervioso Central (SNC), la retina. Para situar los antecedentes del trabajo realizado vamos a describir brevemente algunos aspectos previos acerca de (1) el desarrollo de la microglía, y (2) el desarrollo de tales células en la retina.

Desarrollo de las células microgliales

En su artículo de 1932, Rio Hortega describió sistemáticamente la microglía, afirmando que es un tipo celular de origen mesodérmico, probablemente derivado de células de la sangre. La idea de que la microglía deriva de células mesodérmicas, en concreto de origen sanguíneo, es compartida hoy por muchos autores, aunque algunos autores han descrito algunas evidencias en favor del origen neuroectodérmico de las células microgliales. Es conveniente señalar que el origen de las células microgliales durante el desarrollo es un proceso claramente diferente del origen de las células microgliales que se renuevan en el adulto, en consonancia con el hecho de que las circunstancias en las que se produce la diferenciación microglial son muy distintas.

Para referirnos al desarrollo de las células microgliales durante el periodo embrionario haremos referencia a diversos puntos. En primer lugar trataremos la cuestión del origen inicial de tales células. En relación con este primer aspecto también nos referiremos a las posibles vías de entrada que utilizan estas células para entrar en el SNC, en el caso de que se originen fuera de él. A continuación las células microgliales colonizan las diferentes regiones del parénquima nervioso. Finalmente, se produce la diferenciación de estas células con la aparición de microglía madura, que presenta un patrón complejo de ramificación.

Origen inicial de las células microgliales

Como ya hemos señalado anteriormente, la mayoría de los autores sostiene que las células microgliales provienen de la diferenciación de células de tipo

mesodérmico, y no son de origen ectodérmico como sucede con las neuronas y el resto de las células gliales.

¿Qué células en concreto son los precursores de las células microgliales? La opinión más extendida es que se trata de células de linaje monocítico/macrofágico (Ling & Wong, 1993). Esta idea se apoya en el hecho de que monocitos/macrófagos y células microgliales presentan similitudes. Basándose en las características morfológicas de las células microgliales en el embrión, Rio Hortega (1932) propuso que tales células derivan de leucocitos sanguíneos. Posteriormente se comprobaría que tanto monocitos/macrófagos como células microgliales se marcan con diferentes lectinas (Streit & Kreutzberg, 1987; Acarin et al., 1994), y casi todos los anticuerpos que marcan células microgliales también reconocen células de linaje monocítico (por ejemplo: Imamura et al., 1990; Perry & Gordon, 1991; Penfold et al., 1991). Ling y sus colaboradores (Ling, 1979; Ling et al., 1980) inocularon una solución de tinta china, o monocitos previamente marcados con tinta china, en el torrente sanguíneo de ratas recién nacidas; en ambos casos encontraron una pequeña cantidad de células microgliales marcadas en el interior del SNC, y estos autores concluyeron que la microglía se origina a partir de monocitos que invaden el parénquima nervioso desde la sangre.

Las células microgliales podrían también derivar directamente de células hematopoyéticas pluripotenciales, sin pasar por el estadio de monocito. La existencia de estos precursores microgliales específicos viene avalada por algunos estudios, que manifiestan la existencia de células proliferantes con capacidad de producir microglía tanto en la médula ósea como en el parénquima nervioso en desarrollo y adulto (Alliot et al., 1991).

Independientemente de que la microglía derive de macrófagos/monocitos o de células hematopoyéticas indiferenciadas, el análisis de animales que han recibido un trasplante de médula ósea puede proporcionar información acerca de la relación de la microglía con el sistema hematopoyético. La utilización de esta estrategia ha puesto de manifiesto que solo alrededor de un 10% o menos de las células microgliales del parénquima son de tipo donante varios meses después del

transplante (De Groot et al., 1992; Hickey et al., 1992), a pesar de que en el parénquima nervioso del huésped se localizan numerosas células de origen donante (Lassmann et al., 1993). Estos resultados variaban poco si el transplante se realizaba en animales recién nacidos, en los que las células microgliales todavía no poseen su morfología y distribución definitivas (De Groot et al., 1992). A partir de estos datos se puede pensar que solo una escasa proporción de células microgliales derivan de precursores hematopoyéticos. Pero también puede suponerse que la mayoría de los precursores microgliales entran en el parénquima nervioso antes de que se realice el transplante, en concreto durante el desarrollo embrionario.

Algunos autores defienden que las células microgliales son de origen neuroectodérmico, dado que la microglía es reconocida por anticuerpos dirigidos contra la proteína lipocortina-1 (McKanna & Fedoroff, 1996) que aparece también en otras células gliales, y se producen células microgliales y macrófagos en cultivos aparentemente puros de células neuroepiteliales (Hao et al., 1991; Papavasiliou et al., 1996). Sin embargo, estas interpretaciones son cuestionadas, ya que el que dos células se marquen con un mismo anticuerpo no implica que tengan un origen común, y los cultivos de células neuroepiteliales pueden contener células de origen externo al SNC que se ha visto que están presentes desde fases tempranas del desarrollo (Cuadros et al., 1993).

Entrada de precursores microgliales en el SNC en desarrollo

La entrada de células exógenas en el interior del SNC durante el desarrollo puede producirse a través de diferentes rutas.

Células exógenas pueden pasar al interior del parénquima nervioso desde el torrente sanguíneo, atravesando la pared de los vasos. Este mecanismo es semejante al que ocurre para la entrada de monocitos a diversos tejidos y su posterior transformación en macrófagos. A favor de que los precursores microgliales utilicen esta vía están las experiencias descritas anteriormente, en las que se inoculan monocitos marcados en la sangre y se encuentran luego células microgliales con marcaje en el parénquima (Ling et al., 1980). También se ha

observado que durante el periodo de mayor aumento de células microgliales en el SNC en desarrollo hay un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión que participan en la extravasación selectiva de células monocíticas (Dalmau et al., 1997b).

La migración a través de los vasos no es la única vía utilizada para la entrada de precursores microgliales, ya que en algunas regiones del SNC aparecen células microgliales antes de que estas regiones estén vascularizadas (Ashwell et al., 1989; Diaz-Araya et al., 1995). Algunas imágenes sugieren que células microgliales entran en el parénquima nervioso desde el ventrículo atravesando el neuroepitelio (Cuadros et al., 1997). Rio-Hortega (1932) propuso que gran número de precursores microgliales entran en el parénquima en desarrollo desde las meninges en puntos concretos de la superficie pial; esta idea ha sido posteriormente apoyada por imágenes histológicas obtenidas durante el desarrollo de diferentes regiones del SNC y en diferentes especies (Boya et al., 1991; Cuadros et al., 1994, 1997; Dalmau et al., 1997a).

Colonización del parénquima nervioso

La microglía aparece en todas las regiones del SNC maduro (Lawson et al., 1990). Dos mecanismos contribuyen a que los precursores microgliales colonicen todo el SNC: la proliferación y la migración.

Las agresiones al SNC maduro provoca una reacción microglial que, entre otras consecuencias, da lugar a una proliferación rápida de las células microgliales (Streit et al., 1988; Amat et al., 1996). Durante el desarrollo normal, los precursores microgliales muestran actividad mitótica (Mander & Morris, 1996; Dalmau, 1997), aunque la importancia de su proliferación para el incremento en número de células microgliales en la colonización de todo el parénquima nervioso no se conoce.

Para alcanzar las diferentes regiones del SNC los precursores microgliales han de migrar a través del parénquima nervioso distancias más o menos largas. La distribución de las células microgliales en el SNC en desarrollo de diversas especies sugieren que numerosas células microgliales migran para invadir

diferentes regiones (Perry et al., 1985; Milligan et al., 1991; Caggiano & Brunjes, 1993). Detallados estudios en el cerebro de codorniz durante el desarrollo han mostrado que la migración de estas células en diferentes regiones ocurre en dos fases (Cuadros et al., 1994, 1997; Navascués et al., 1995). En la primera de ellas, o “migración tangencial”, gran cantidad de células microgliales migran unas junto a otras, normalmente siguiendo el curso de fascículos de axones; la segunda fase es la “migración radial”, en la cual células microgliales se mueven individualmente para alcanzar regiones más profundas del parénquima nervioso.

Sea cual sea la importancia relativa de estos fenómenos, el resultado final es que las células microgliales se reparten por todo el SNC, a pesar que durante etapas anteriores del desarrollo su localización aparecía restringida a determinadas áreas y estaban ausentes de otras.

Diferenciación

La microglía comprende varios tipos celulares, que representan distintas fases del desarrollo y/o diferentes estados fisiológicos. La microglía ameboide muestra muchas similitudes con los macrófagos presentes en otros tejidos, y es el tipo principal de microglía presente durante el desarrollo; en concreto, las células microgliales en migración pertenecen a este tipo. Según una idea ampliamente aceptada, las células ameboides, o una proporción apreciable de ellas, se diferencian en microglía ramificada. Dentro de la microglía ramificada se distingue la madura o completamente ramificada y la que posee una ramificación primitiva.

Estudios in vitro han sido utilizados para intentar determinar qué factores afectan la diferenciación, al menos morfológica, de las células microgliales. Las células microgliales recién aisladas adoptan la morfología de microglía ameboide, tras exponerlas a distintos factores, como componentes de matriz extracelular (Chamak & Mallat, 1991; Giulian et al., 1995) o factores de crecimiento (Suzumura et al., 1991; Giulian et al., 1995; Fujita et al., 1996). La diferenciación morfológica de las células de microglía ameboide se acompaña de disminución o desaparición total de la expresión de algunas moléculas, como el antígeno reconocido por el anticuerpo ED-1 (Milligan et al., 1991) o del resto glucosilado al que se une la

lectina de *Griffonia simplicifolia* (Wu et al., 1994), de la modificación de la organización de los microtúbulos del citoesqueleto (Ilschner & Brandt, 1996), y la disminución de su movilidad y capacidad fagocítica (Davis et al., 1994).

Algunos autores han puesto de manifiesto que en el cerebro adulto aparecen distintos tipos morfológicos de microglía, localizados en diferentes regiones del SNC: esto les ha llevado a proponer que la morfología, y por tanto la diferenciación, de las células microgliales depende del ambiente en que se encuentran estas células (Perry & Gordon, 1991). En concreto, las células presentan escasa ramificación en aquellas regiones en las que el parénquima nervioso no está totalmente aislado del torrente sanguíneo, y por tanto sus células están expuestas al plasma sanguíneo (Perry & Gordon, 1991).

Desarrollo de las células microgliales en la retina

La retina es una región del SNC con características particulares. En primer lugar se encuentra claramente delimitada del resto del SNC; además sus células adoptan una disposición laminar estricta, laminación que puede ser reconocida ya en etapas tempranas del desarrollo. Una ventaja añadida de la retina de las aves para el estudio de la microglía es que no se encuentra vascularizada, con lo que se elimina una posible vía de penetración en la retina de precursores microgliales.

Tanto en la retina adulta de aves como de mamíferos las células microgliales presentan una distribución claramente laminar (Schnitzer, 1989; Ashwell et al., 1989; Navascués et al., 1994; Diaz-Araya et al., 1995). Aunque la distribución de células microgliales presenta algunas diferencias según la especie, e incluso la raza (Humphrey & Moore, 1995), se puede decir que las células microgliales se sitúan a nivel de los estratos fibrosos (capa plexiforme interna y externa, y capa de fibras ópticas), mientras que pocas, o ninguna, de estas células aparecen en las capas celulares. El desarrollo de esta topografía ha sido estudiado en algunos mamíferos, como el ratón, (Hume et al., 1983), la rata (Ashwell et al., 1989), el conejo (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989) y el hombre (Diaz-Araya et al., 1995). En la codorniz se ha llevado a cabo un detallado estudio (Navascués et al., 1995) que ha puesto de manifiesto que el desarrollo de la

microglía en la retina ocurre siguiendo fases semejantes a las descritas en otras regiones del SNC en desarrollo: los precursores microgliales realizan primero una migración en sentido centro-periférico a través de la capa de fibras ópticas (migración tangencial centro-periférica); en una segunda fase células individuales cambian la dirección de su migración, dirigiéndose desde niveles vítreos hacia regiones más esclerales (migración radial vítreo-escleral). Las células microgliales comienzan su diferenciación morfológica después de alcanzar su localización definitiva en las capas plexiformes (Navascués et al., 1995).

OBJETIVOS

El objetivo general perseguido en la presente tesis era profundizar en el estudio de los mecanismos celulares y factores que intervienen en la diseminación de los precursores microgliales durante el desarrollo de la retina de codorniz. Dentro de este objetivo general, los objetivos concretos eran:

Primero. Estudio morfológico y estructural de las células microgliales ameboides que migran centro-periféricamente en la parte vítrea de la retina, para determinar el mecanismo de migración de las mismas, así como su conducta migratoria.

Segundo. Análisis de la participación de la proliferación celular como un mecanismo que, simultáneamente con la migración celular, interviene en el proceso de diseminación de precursores microgliales en la retina embrionaria.

Tercero. Estudio de la entrada en la retina de algunos precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar y del patrón de migración de éstos en las regiones periféricas de la retina.

Cuarto. Determinación de los patrones crono-topográficos de muerte neuronal en las diferentes capas de la retina en desarrollo y análisis de las células que intervienen en la fagocitosis de los restos procedentes de las neuronas muertas. Comparación de estos resultados con los patrones de migración tangencial y radial de precursores microgliales, con objeto de comprobar la hipótesis de la participación de la muerte celular como factor desencadenante de la entrada de éstos en la retina.

Estos objetivos han sido tratados en capítulos separados. Cada uno de estos cuatro capítulos ha sido confeccionado con una estructura similar a la exigida en la generalidad de las revistas para la publicación de artículos científicos, incluyendo los siguientes apartados: resumen, introducción, materiales

y métodos, resultados, discusión y referencias. Este modo de estructurar la presente memoria tiene el inconveniente de que algunas técnicas se pueden repetir en los materiales y métodos de distintos capítulos. Esto se ha intentado evitar en lo posible, de manera que cuando en un capítulo se menciona una técnica ya descrita en capítulos precedentes, se hace referencia al capítulo en el que aparece descrita en su totalidad, a la vez que se hace un pequeño resumen de la misma. La repetición de algunas referencias en el respectivo apartado de diferentes capítulos es otra inconveniencia de este tipo de estructuración. Sin embargo, la total independencia de cada capítulo, dentro de la interrelación de todos ellos, los hace asimilables a diferentes artículos científicos, lo que tiene indudables ventajas tanto para el lector como para una correcta valoración del conjunto de la tesis, que superan los mencionados inconvenientes. La versión en inglés del primer capítulo ha sido publicada en la revista *Glia*, mientras que la del segundo capítulo ha sido enviada a *Journal of Neuroscience Research*. Las versiones en inglés del tercer y cuarto capítulo están en preparación.

REFERENCIAS

- Acarin, L., Vela, J.M., González, B., Castellano, B. (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in the rat brain by tomato lectin binding. *J. Histochem. Cytochem.*, 42:1033-1041.
- Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B. (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1541-1545.
- Amat, J.A., Ishiguro, H., Nakamura, K., Norton, W.T. (1996) Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia*, 16:368-382.
- Ashwell, K. (1989) Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 287:286-301.
- Ashwell, K.W.S., Holländer, H., Streit, W., Stone, J. (1989) The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis. Neurosci.*, 2:437-448.
- Boya, J., Calvo, J.L., Carbonell, A.L., Borregón, A. (1991) A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J. Anat.*, 175:229-236.
- Caggiano, A.O., Brunjes, P.C. (1993) Microglia and the developing olfactory bulb. *Neuroscience*, 52:717-724.
- Chamak, B., Mallat, M. (1991) Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience*, 45:513-527.
- Cuadros, M.A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., Navascués, J. (1993) First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 330:113-129.
- Cuadros, M.A., Rodríguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marín-Teva, J.L., Navascués, J. (1997) Microglia development in the quail cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 389:390-401.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Quesada, A., Navascués, J. (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J. Comp. Neurol.*, 348:207-224.

- Dalmau, I. (1997) Las células de microglía en el cerebro de la rata en desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Dalmau, I., Finsen, B., Tønder, N., Zimmer, J., Gonzalez, B., Castellano, B. (1997a) Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 377:70-84.
- Dalmau, I., Vela, J.M., Gonzalez, B., Castellano, B. (1997b) Expression of LFA-1a and ICAM-1 in the developing rat brain: A potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Dev. Brain Res.*, 103:163-170.
- Davis, E.J., Foster, T.D., Thomas, W.E. (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.*, 34:73-78.
- De Groot, C.J.A., Huppes, W., Sminia, T., Kraal, G., Dijkstra, C.D. (1992) Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia*, 6:301-309.
- Diaz-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.
- Fujita, H., Tanaka, J., Toku, K., Tateishi, N., Suzuki, Y., Matsuda, S., Sakanaka, M., Maeda, N. (1996) Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: A morphometrical study. *Glia*, 18:269-281.
- Giulian, D., Bartel, S., Broker, J., Li, X., Kirkpatrick, J.B. (1995) Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J. Neurosci.*, 15:7712-7726.
- Hao, C., Richardson, A., Fedoroff, S. (1991) Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: Characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9:1-14.
- Hickey, W.F., Vass, K., Lassmann, H. (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: An immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 51:246-256.
- 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.*, 97:253-257.
- Humphrey, M.F., Moore, S.R. (1995) Strain differences in the distribution of NDPase labelled microglia in the normal rabbit retina. *Glia*, 15:367-376.
- Imamura, K., Ito, M., Suzumura, A., Asai, J., Takahashi, A. (1990) Generation and characterization of monoclonal antibodies against rat microglia and ontogenic distribution of positive cells. *Lab. Invest.*, 63:853-861.
- Ilschner, S., Brandt, R. (1996) The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia*, 18:129-140.
- Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K., Hickey, W.F. (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia*, 7:19-24.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., Gordon, S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39:51-170.
- Ling, E.A. (1979) Transformation of monocytes into ameboid microglia and into microglia in the corpus callosum of postnatal rats as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J. Anat.*, 128:847-858.
- Ling, E.A., Penney, D., Leblond, C.P. (1980) Use of carbon labelling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the "amoeboid cells" present in the corpus callosum of postnatal rats. *J. Comp. Neurol.*, 193:631-657.
- Ling, E.A., Wong, W.C. (1993) The origin and nature of ramified and ameboid microglia: A historical review and current concepts. *Glia*, 7:9-18.
- Mander, T.H., Morris, J.F. (1996) Development of microglia and macrophages in the postnatal rat pituitary. *Cell Tissue Res.*, 286:347-355.
- McKanna, J.A., Fedoroff, S. (1996) Development of microglia in situ and in cultures. In Ling, E.A., Tan, C.K., Tan, C.B.C. (eds), *Topical Issues in Microglia Research*. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 21-42.

- Milligan, C.E., Cunningham, T.J., Levitt, P. (1991) Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 314:125-135.
- Navascués, J., Moujahid, A., Quesada, A., Cuadros, M.A. (1994) Microglia in the avian retina: Immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J. Comp. Neurol.*, 350:171-186.
- Navascués, J., Moujahid, A., Almendros, A., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1995) Origin of microglia in the quail retina: Central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.*, 354:209-228.
- Papavasiliou, A.K., Mehler, M.F., Dobrenis, K., Marmur, R., Mabie, P.C., Kessler, J.A. (1996) Microglial lineage species are expressed in mammalian epidermal growth factor-generated embryonic neurospheres. *J. Neurosci. Res.*, 46:49-57.
- Penfold, P.L., Madigan, M.C., Provis, J.M. (1991) Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis. Neurosci.*, 7:383-388.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 125:203-244.
- Perry, V.H., Hume, D.A., Gordon, S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15:313-326.
- Rio-Hortega, P. del (1932) Microglia. En Penfield, W. (ed), *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, Vol. 2*. Paul B Hoeber, New York, pp. 483-534.
- Schnitzer, J. (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 282:249-263.
- Streit, W.J., Kreutzberg, G.W. (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol.*, 16:249-260.
- Streit, W.J., M.B. Graeber, Kreutzberg, G.W. (1988) Functional plasticity of microglia: A review. *Glia*, 1:301-307.

- Suzumura, A., Marunouchi, T., Yamamoto, H. (1991) Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.*, 545:301-306.
- Wu, C.H., Wen, C.Y., Shieh, J.Y., Ling, E.A. (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in ameboid microglia transformation into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol.*, 23:258-269.



CAPÍTULO I

MIGRACIÓN TANGENCIAL DE LA MICROGLÍA AMEBOIDE: MECANISMOS DE MIGRACIÓN Y COMPORTAMIENTO MIGRATORIO



RESUMEN

La migración a larga distancia de los precursores microgliales en el sistema nervioso central es esencial para la colonización del parénquima nervioso. En este capítulo hemos estudiado los caracteres morfológicos y estructurales de las células microgliales ameboides que están en proceso de migración tangencial en la retina embrionaria de codorniz, con objeto de aclarar el mecanismo de migración y el comportamiento migratorio de estos precursores microgliales. A partir de extensiones de retina se obtuvieron láminas que contenían la membrana limitante interna revestida de pies terminales de células de Müller. Muchos precursores microgliales permanecían adheridos sobre estas láminas, demostrando que la mayoría de las células microgliales ameboides migran tangencialmente sobre los pies terminales de las células de Müller. Muchas de estas células mostraban una morfología polarizada en dirección centro-periférica, con extensos lamelipodios que se esparcían sobre los canales flanqueados por las prolongaciones radiales de células de Müller, a las que frecuentemente estaban anclados. En la cara vítrea de algunos precursores microgliales, con microscopía electrónica de transmisión, se observaban ligeras protuberancias que estaban firmemente unidas a la lámina basal subyacente, a la que accedían a través de pequeñas aberturas en la alfombra de pies terminales de células de Müller. Estos resultados sugieren un mecanismo de migración que implica la extensión polarizada de lamelipodios en el polo delantero de la célula, fuerte unión de la célula al sustrato, translocación hacia delante del cuerpo celular y retracción de la parte trasera de la célula. Otras células ameboides eran multipolares, con prolongaciones lamelipódicas irradiando desde el cuerpo celular en todas direcciones, lo que sugiere que los precursores microgliales exploran el ambiente que los rodea para orientar la dirección de su movimiento. La migración centro-periférica de los precursores microgliales en la retina no sigue un camino rectilíneo, sino que estas células pueden moverse transitoriamente hacia delante, hacia atrás y hacia los lados, como se deduce de la presencia de: a) células ameboides bipolares en forma de V, con su vértice dirigido hacia el centro o hacia la periferia de la retina; y b) células con una prolongación filamentosa que

parece corresponder a la parte trasera que se está retrayendo y que en algunas células microgliales ameboides surge desde el polo celular que mira hacia la periferia de la retina, mientras que en otras lo hace desde el polo que da hacia el centro de la retina.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se acepta que las células microgliales derivan de precursores relacionados con el linaje de monocitos/macrófagos (Perry & Gordon, 1991; Thomas, 1992; Theele & Streit, 1993). El desarrollo de la microglía en el sistema nervioso central (SNC) puede dividirse en tres etapas: entrada de células precursoras de microglía en el SNC en desarrollo, migración de estas células en el SNC hasta sus localizaciones finales, y posterior diferenciación de las mismas en dichas localizaciones (Navascués et al., 1996).

En relación a la primera etapa, estudios en nuestro laboratorio apoyaban la vieja idea de que la mayoría de los precursores microgliales entran en el SNC desde las meninges, atravesando la superficie pial (Rio-Hortega, 1932; Boya et al., 1979, 1991; Caggiano & Brunjes, 1993) en áreas bien delimitadas de la superficie del cerebro en desarrollo (Cuadros et al., 1994, 1997; Navascués et al., 1996). Una vez que han entrado en el parénquima nervioso, los precursores microgliales adquieren la apariencia morfológica de microglía ameboide (Perry et al., 1985; Jordan & Thomas, 1988; Perry & Gordon, 1988, 1991; Ling & Wong, 1993; Wu et al., 1994) y migran largas distancias para conseguir diseminarse por todo el SNC y alcanzar sus lugares de destino, donde se diferencian en microglía ramificada. La existencia de largas migraciones de la microglía ameboide en el SNC fué sugerida por Rio-Hortega (1932) y apoyada por estudios más recientes (Schnitzer, 1989; Pearson et al., 1993; Cuadros et al., 1994; Navascués et al., 1995; Wolswijk, 1995; Diaz-Araya et al., 1995a,b). Todavía se conoce poco sobre las vías, sustratos y mecanismos implicados en las migraciones de la microglía ameboide, a diferencia de las migraciones de otros tipos celulares en el SNC, tales como neuronas (Rakic, 1990; Edmonson & Hatten, 1987; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Leber & Sanes, 1995; O'Rourke et al., 1995; Jankovski & Sotelo, 1996; Rakic et al., 1996), oligodendrocitos (Small et al., 1987; Leber & Sanes, 1995; Kiernan & French-Constant, 1993; Baron-Van Evercooren et al., 1996) y astrocitos (Watanabe & Raff, 1988; Ling & Stone, 1988; Chan-Ling, 1994; Orentas & Miller, 1996).

Algunos estudios in vitro de cultivos celulares (Thomas, 1990; Booth & Thomas, 1991; Abd-el-Basset & Fedoroff, 1995; Haapaniemi et al., 1995) y cultivos de secciones cerebrales (Brockhaus et al., 1996) han aclarado ciertos aspectos de la motilidad microglial. Sin embargo, los estudios in situ son imprescindibles para comprender los mecanismos implicados en las largas migraciones de la microglía ameboide a través del SNC. La retina embrionaria de codorniz es un excelente material para el estudio de las migraciones microgliales por varias razones. Primeramente, todos los tipos de células microgliales de esta especie se marcan inmunocitoquímicamente con el anticuerpo QH1. En segundo lugar, la retina de aves es completamente avascular, evitando interferencias derivadas de la covisualización de microglía en desarrollo y vasos sanguíneos. En tercer lugar, se pueden usar montajes totales de retina para identificar las células microgliales de toda la retina, así como su localización topográfica. Y en cuarto lugar, la cronología del desarrollo microglial es bien conocida en la retina de codorniz (Navascués et al., 1995). Los precursores microgliales entran en la retina embrionaria de codorniz a través del área ocupada por la cabeza del nervio óptico / base del pecten entre los días 7 y 16 de incubación (E7-E16) y migran tangencialmente desde áreas centrales hacia regiones periféricas. Posteriormente, los precursores microgliales migran radialmente desde niveles vítreos hacia niveles esclerales, accediendo así a las capas plexiformes, donde se diferencian en microglía ramificada. Este patrón de invasión de los precursores microgliales en la retina de aves parece similar al que tiene lugar en mamíferos, ya que en éstos las células microgliales entran por el disco óptico (Diaz-Araya et al., 1995a,b) y migran tangencialmente a través de la superficie de la retina (Pearson et al., 1993; Diaz-Araya, 1995a,b) y radialmente hacia planos más profundos de ésta (Hume et al., 1983; Diaz-Araya et al., 1995a,b).

En el presente estudio se demuestra que la microglía ameboide en la retina en desarrollo de la codorniz utiliza los pies terminales de las células de Müller como sustrato para migrar tangencialmente. El mecanismo de esta migración parece tener lugar a través de varias fases: 1) exploración del ambiente mediante la extensión de lamelipodios en varias direcciones; 2) distribución polarizada de

lamelipodios; 3) fuerte anclaje de las células al sustrato; 4) translocación del soma a la parte delantera de la célula; y 5) retracción de la parte trasera de la célula. Además, la migración tangencial de las células microgliales ameboides tiene lugar sigue una vía tortuosa, con movimientos hacia delante, hacia atrás y hacia los lados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio, se emplearon retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) entre E7 y E16. Estas etapas del desarrollo constituyen el periodo comprendido entre el comienzo y la finalización de la migración tangencial de precursores microgliales desde el centro hacia la periferia de la retina (Navascués et al., 1995). Muchas de las observaciones fueron realizadas en retinas de E9 y E10, ya que en estas etapas del desarrollo una gran proporción de la superficie vítrea de la retina está colonizada por precursores microgliales que migran tangencialmente, mientras que la migración radial hacia las capas plexiformes es todavía escasa.

Se utilizaron extensiones totales de retina y unas láminas que contenían la membrana limitante interna (lámina basal) cubierta por una alfombra formada por los pies terminales de células de Müller (láminas MLI/PTCM), las cuales fueron estudiadas con métodos inmunocitoquímicos como se describe más adelante. Los estudios con microscopía electrónica de transmisión (MET) fueron realizados sobre secciones ultrafinas tanto de láminas MLI/PTCM como de retinas completas, y las observaciones con microscopía electrónica de barrido (MEB) se hicieron sobre láminas MLI/PTCM.

Aislamiento de las retinas y preparación de las láminas MLI/PTCM

Para aislar las retinas de los embriones, el ojo fue disecado rápidamente en solución de Hanks (para las láminas MLI/PTCM) o en diferentes fijadores (como se describe más adelante). Seguidamente, la córnea, cristalino, cuerpo ciliar, esclera, y cuerpo vítreo fueron eliminados. Estos pasos se realizaron rápidamente para conseguir que la coroides y el epitelio pigmentario se desprendieran junto con la esclera. A continuación, las retinas fueron extendidas sobre un porta mediante la realización de unas incisiones radiales alrededor de la retina, y los restos de pecten y nervio óptico fueron eliminados.

Las láminas MLI/PTCM se obtuvieron conforme al método de Halfter et al. (1987) con ligeras modificaciones. Con este método se aislaba la parte más vítrea

de la retina en desarrollo mediante una separación mecánica de la retina montada entre dos sustratos adhesivos. Las retinas de los embriones eran aisladas en solución de Hanks con Ca^{2+} y Mg^{2+} . La presencia de estos cationes prevenía el desprendimiento de los precursores microgliales que estaban adheridos sobre los pies terminales de las células de Müller, ya que las láminas MLI/PTCM aisladas en solución de Hanks libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} contenían menos células que las aisladas en solución que contenía estos cationes. En cada retina aislada se cortaba una pieza de aproximadamente 5 x 5 mm, que se montaba sobre un filtro de nitrocelulosa con la cara vítrea hacia arriba.

El conjunto formado por la extensión de retina adherida al filtro de nitrocelulosa se fijaba en paraformaldehído 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1M (para inmunofluorescencia) o en glutaraldehído 2%, paraformaldehído 1% en tampón cacodilato 0.1M (para MET y MEB) durante 1 minuto. A continuación, este conjunto se disponía con la superficie vítrea hacia arriba sobre una gota del mismo fijador en un cubreobjetos. Seguidamente, se colocaba un cubreobjetos pretratado con poli-L-lisina (2 mg/ml durante 2 horas) sobre el conjunto retina-filtro, de tal forma que la superficie vítrea de la retina quedara en contacto con la poli-L-lisina. Se colocaba un pequeño peso sobre este cubreobjetos, con objeto de presionar ligeramente la superficie vítrea de la retina contra la poli-L-lisina. Después de 3-4 minutos, el conjunto retina-filtro era separado enérgicamente del cubreobjetos revestido de con poli-L-lisina, sobre el cual quedaba adherida una lámina MLI/PTCM que también contenía los precursores microgliales que estaban migrando sobre los pies terminales de las células de Müller (Fig. I-1A), mientras que el resto de la retina quedaba unida al filtro de nitrocelulosa.

Microscopía electrónica

Para los estudios de MET y MEB se utilizaron embriones de codorniz E9-E10. Para MET, se aislaban retinas completas que fueron fijadas en glutaraldehído 3% en tampón cacodilato 0.1M (pH 7.4). Pequeñas piezas de zonas seleccionadas de estas retinas fueron sumergidas en el mismo fijador durante 3 h, lavadas en tampón, postfijadas en tetróxido de osmio, deshidratadas mediante sucesivos pasos

por acetonas de concentración creciente y óxido de propileno, e incluídas en resina de Spurr. Se realizaron secciones ultrafinas transversales, las cuales fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinadas con un microscopio Zeiss EM902.

Para MET también se usaron láminas MLI/PTCM obtenidas según el protocolo descrito en el apartado anterior, con la única diferencia de que éstas eran adheridas sobre pequeños trozos de placas de petri de plástico pretratados con poli-L-lisina (4 mg/ml durante 2 h). A continuación, las láminas MLI/PTCM adheridas al plástico fueron fijadas en glutaraldehído 2%, paraformaldehído 1% en tampón cacodilato 0.1M (pH 7.4) durante otras 2 h, lavadas toda la noche en tampón cacodilato 0.1M, postfijadas en tetróxido de osmio, y teñidas con acetato de uranilo 1%. Después de la deshidratación en etanol, las láminas MLI/PTCM adheridas al plástico fueron incluídas en Epon. Se realizaron secciones ultrafinas paralelas a la superficie del plástico, obteniendo de esta manera secciones de las láminas MLI/PTCM que eran tangenciales a la superficie vítrea de la retina. Estas secciones fueron teñidas con citrato de plomo y examinadas en el microscopio electrónico.

Para MEB, las láminas MLI/PTCM fueron fijadas durante 30 min en glutaraldehído 2%, paraformaldehído 1% en tampón cacodilato, postfijadas en tetróxido de osmio durante 1 h, deshidratadas mediante sucesivos pasos por acetonas de concentración creciente, y desecadas mediante la técnica del punto crítico. A continuación, las muestras fueron sombreadas con oro y observadas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM950.

Inmunocitoquímica

Los precursores microgliales fueron puestos de manifiesto en la retina de embriones de codorniz mediante el marcaje con el anticuerpo monoclonal QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA), el cual reconoce todas las células de línea hemangioblástica de codorniz excepto los eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987), y todas las fases del desarrollo de las células microgliales (Cuadros et al., 1992). También se utilizó un antisuero anti-

tubulina (Sigma, St. Louis, MO) para marcar los precursores microgliales y los procesos radiales de las células de Müller en las láminas MLI/PTCM.

Para la inmunocitoquímica QH1 sobre extensiones totales de retina, éstas fueron aisladas en paraformaldehído 4% en PBS 0.1M (pH 7.4), fijadas durante 1-3 días mediante inmersión en el mismo fijador, tratadas durante 45 min con tripsina (Difco, Detroit, MI) en PBS (0,4 mg/ml) a 37°C, y lavadas en PBS. Para mejorar la penetración del anticuerpo en la retina, las piezas se lavaron durante 1 h con agitación en PBS con Triton X-100 1% (T-PBS). Seguidamente, las retinas fueron sumergidas durante 5 min en peróxido de hidrógeno 3% (para eliminar la actividad peroxidasa endógena), incubadas durante 3 h en suero normal de cabra (NGS) diluído 1:20 en albúmina de suero bovino 1% en PBS (BSA-PBS), e incubadas a 4°C durante 40 h con agitación en sobrenadante QH1 diluído 1:2 en PBS-BSA. A continuación, las retinas fueron lavadas en T-PBS, incubadas a temperatura ambiente durante 4 h con agitación en anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado (Sigma) diluído 1:50 en PBS-BSA, lavadas de nuevo en T-PBS, e incubadas durante 4 h con agitación en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Extravidin, Sigma) diluído 1:150 en PBS-BSA. Finalmente, las retinas se lavaron durante 30 min en PBS sin Triton, y se reveló la actividad peroxidasa con diaminobenzidina 0.05% y peróxido de hidrógeno 0.02% en PBS; no se utilizó ninguna tinción de contraste. Las retinas se lavaron en PBS y después en agua destilada, se extendieron sobre portas pretratados con poli-L-lisina con la cara vítrea hacia arriba y se montaron con Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany).

Para la inmunofluorescencia QH1 sobre láminas MLI/PTCM, éstas se fijaron durante 15 min en paraformaldehído 4% en PBS 0.1M. Las láminas fueron lavadas en PBS, sumergidas durante 1 h en NGS diluído en PBS-BSA, incubadas a temperatura ambiente durante 1 h en sobrenadante QH1 diluído 1:2 en PBS-BSA, y lavadas varias veces en PBS. A continuación, fueron incubadas durante 1 h en anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) diluído 1:60 en PBS-BSA, lavadas en PBS y montadas con glicerol-PBS con dihidrocloruro de p-fenilendiamina 0.1%. Las observaciones de inmunofluorescencia fueron realizadas con un microscopio Zeiss Axiophot.

Para doble inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-tubulina y QH1, las láminas MLI/PTCM fueron sumergidas durante 2 min en paraformaldehído 1% en PBS 0.1M con Triton X-100 0.5% para facilitar la penetración del anticuerpo anti-tubulina, lavadas en PBS, postfijadas durante 10 min en paraformaldehído 4% en PBS, lavadas de nuevo en PBS, y sumergidas en NGS diluído en PBS-BSA. Seguidamente, fueron incubadas durante 1 h en antisuero anti-tubulina (obtenido en conejo) diluído 1:40 en PBS-BSA, lavadas en PBS, y sumergidas durante 1 h en anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído 1:50 en PBS-BSA. Después, las láminas MLI/PTCM fueron lavadas en PBS y procesadas para inmunofluorescencia QH1 como se describió anteriormente.

En retinas de E9-E10 también se realizó inmunocitoquímica QH1 pre-inclusión para MET. Las retinas se aislaron en glutaraldehído 2%, paraformaldehído 1% en PBS 0.1M y en zonas seleccionadas se cortaron piezas de aproximadamente 4 x 7 mm, las cuales fueron sumergidas durante 2 h en el mismo fijador. El tratamiento inmunocitoquímico de estas piezas fué similar al descrito para las extensiones totales de retina, con la diferencia de que fueron omitidos los pasos en tripsina, Triton X-100 y peróxido de hidrógeno. Después de visualizar la actividad peroxidasa con diaminobenzidina, las piezas de retina fueron postfijadas en tetróxido de osmio 1%, deshidratadas, e incluídas en resina de Spurr. Las secciones ultrafinas fueron teñidas solamente con acetato de uranilo y examinadas con el microscopio electrónico.

RESULTADOS

Migración tangencial de la microglía ameboide sobre los pies terminales de células de Müller

En las láminas MLI/PTCM se observaban canales, cuyo suelo estaba formado por los pies terminales de las células de Müller y sus paredes laterales estaban compuestas de hileras de prolongaciones radiales de estas células que se habían partido durante el aislamiento de las láminas. Sobre estos canales había muchas células ameboides (Figs. 1 y 2A-C), aunque los fascículos de axones de la capa de fibras nerviosas se habían eliminado durante la preparación técnica. Esto indicaba que las células ameboides estaban fuertemente unidas a los pies terminales y prolongaciones radiales de las células de Müller, pero no así los fascículos de axones de células ganglionares. En algunas láminas MLI/PTCM, los fascículos axónicos de la capa de fibras nerviosas no eran completamente eliminados y permanecían sobre las células ameboides y pies terminales de las células de Müller (Fig. 2D-F).

El tratamiento inmunocitoquímico de las láminas MLI/PTCM revelaba que las células ameboides adheridas a las mismas se marcaban con QH1 (Fig. 2). Por lo tanto, concluíamos que eran células microgliales ameboides que estaban migrando sobre la parte más vítrea de la retina embrionaria, a la que se adherían fuertemente. Esto era confirmado mediante observaciones con MET de secciones ultrafinas de retinas tratadas con inmunocitoquímica QH1 (Fig. 3).

Morfología de la microglía ameboide que migra tangencialmente: emisión de lamelipodios

Aunque las células microgliales ameboides que migraban tangencialmente mostraban morfologías variables, tenían algunas características en común. Tenían un soma ovoide o fusiforme que contenía el núcleo (Fig. 4A) y mostraba numerosas depresiones revestidas (Fig. 4B) en su superficie. El citoplasma del soma mostraba los caracteres morfológicos que ha sido descritos como típicos de la microglía ameboide (Ling, 1981; Ling & Wong, 1993), tales como la presencia de un

prominente complejo de Golgi cercano al centrosoma, desde el que irradiaban numerosos microtúbulos (Fig. 4C,D), mitocondrias, perfiles de retículo endoplasmático rugoso, abundantes polisomas y numerosas vesículas de contenido claro o denso y tamaño variable.

Una de las características más destacadas de la microglía ameboide en migración tangencial era la presencia de lamelipodios de extensión variable (Fig. 2). El citoplasma de estos lamelipodios contenía ribosomas y una red filamentosa (Fig. 5A,B), probablemente de actina, pero no se observaban ni microtúbulos ni otros orgánulos. Normalmente, los lamelipodios de la microglía ameboide estaban estrechamente adheridos a los pies terminales de las células de Müller, tal como se podía observar en las láminas MLI/PTCM (Fig. 2C) y se confirmaba a MET en secciones ultrafinas de retina marcadas con QH1 (Fig. 5C), si bien ciertas porciones de algunos lamelipodios se metían entre los axones de células ganglionares de la capa de fibras nerviosas.

Los lamelipodios emergían directamente del soma (Figs. 6A-C y 7A,B) o de prolongaciones celulares que podían ser cortas y gruesas (Figs. 6A,B,D y 7C,D) o largas y delgadas (Fig. 8A). En algunos precursores microgliales los lamelipodios emergían solamente desde el soma (Fig. 6C, célula de la derecha); del soma de otras células surgían no solo lamelipodios, sino también prolongaciones que, a su vez, eran soporte de otros lamelipodios (Fig. 6A y 7A); un tercer caso era el de células microgliales de cuyo soma solamente surgían prolongaciones celulares que eran soporte de lamelipodios (Fig. 6C, célula de la izquierda, y 8A). Generalmente, cada prolongación celular terminaba en un lamelipodio (Figs. 6A,D y 7D). Otros lamelipodios se localizaban en mitad de las prolongaciones y a ambos lados de las mismas (Fig. 8B) o emergían hacia un solo lado de ellas (Fig. 8C). Frecuentemente, desde el borde de los lamelipodios emergían finos filopodios de longitud variable (Fig. 8D). Estos filopodios terminaban en un extremo puntiagudo (Fig. 8D) o en un nuevo lamelipodio pequeño y en forma de abanico (Fig. 6D,E).

El eje longitudinal de muchas células microgliales ameboides estaba orientado en dirección centro-periférica. Por lo tanto, estas células mostraban una polarización topográfica, con un extremo dirigido hacia la periferia de la retina y el

extremo opuesto hacia el centro de la misma. Los lamelipodios estaban presentes indistintamente en ambos polos de las células microgliales ameboides (Fig. 6A y 7).

La relación topográfica entre los lamelipodios y los canales flanqueados por prolongaciones radiales de las células de Müller era variable. Así, los lamelipodios podían extenderse longitudinalmente en un solo canal (Fig. 7D) o lateralmente a través de varios canales adyacentes en cada uno de los cuales se extendía un lóbulo del lamelipodio (Fig. 2C y 8E,F).

Todos estos resultados sugieren que las células microgliales ameboides migran sobre los pies terminales de las células de Müller mediante la emisión de lamelipodios que se adhieren a los mismos. Algunos lamelipodios procedentes de células vecinas establecían contacto entre ellos, pero nunca se llegaban a solapar, sugiriendo que la extensión de lamelipodios se frenaba mediante inhibición por contacto.

Anclaje al sustrato de la microglía ameboide en proceso de migración

Los bordes laterales de muchos lamelipodios estaban frecuentemente asociados a las porciones más vítreas de las prolongaciones radiales de las células de Müller, justo por encima de los pies terminales (Figs. 6E y 7B,D). Se observaban interacciones morfológicas y contactos superficiales entre cortas proyecciones de los lamelipodios y dichas porciones vítreas de las prolongaciones radiales de las células de Müller (Fig. 9A,B), sugiriendo que los lamelipodios se anclaban fuertemente a las citadas prolongaciones radiales. También se detectaban estrechos contactos entre las prolongaciones radiales de las células de Müller y las partes laterales del soma de las células microgliales ameboides (Fig. 9C,D). El citoplasma de las porciones vítreas de las prolongaciones radiales de las células de Müller siempre mostraba una o más cisternas de retículo endoplasmático liso adyacentes a los contactos con lamelipodios (Fig. 9B) o somas (Fig. 9D) de la microglía ameboide.

Los bordes laterales de los pies terminales de las células de Müller establecían contacto entre sí, formando una lámina continua (Fig. 10A) a la que se adhería estrechamente la membrana de las células microgliales ameboides (Fig. 3).

En algunos puntos, la membrana de las prolongaciones de las células microgliales (Fig. 10B,C) o del soma de éstas (Fig. 10D,E) contactaba directamente con la lámina basal subyacente, a través de pequeños huecos abiertos entre los pies terminales de las células de Müller.

Estas observaciones mostraban que las células microgliales ameboides en migración tangencial sobre la parte vítrea de la retina se anclaban transitoriamente al sustrato mediante dos tipos de uniones: a) las de la superficie lateral de lamelipodios o somas microgliales a las prolongaciones radiales de las células de Müller, y b) las de la cara vítrea de las prolongaciones y somas microgliales a la lámina basal. Estas uniones podrían explicar porqué las células microgliales permanecían adheridas a las láminas MLI/PTCM cuando el resto de la retina era mecánicamente separada.

Prolongaciones filamentosas de algunas células microgliales ameboides en proceso de migración

Algunas células microgliales ameboides mostraban una prolongación filamentosa muy fina de longitud variable (Fig. 11A), la cual no surgía de lamelipodios sino que estaba conectada con el soma o con alguna prolongación celular gruesa. Generalmente, las prolongaciones filamentosas terminaban en un extremo puntiagudo (Fig. 11A), aunque ocasionalmente podían terminar en un pequeño lamelipodio o en una estructura con forma de maza (Fig. 11B). Las prolongaciones filamentosas tenían un grosor aproximado de 0,5 μm y una longitud que por lo general oscilaba entre 10 y 100 μm , aunque en ocasiones se observaban prolongaciones extremadamente largas, que llegaban a alcanzar hasta 500 μm .

Las prolongaciones filamentosas podían proyectar desde ambos extremos de las células microgliales ameboides, tanto desde el extremo que mira hacia el centro de la retina como desde el que se dirige hacia la periferia de la misma (Fig. 11A). Raramente podían emerger desde las partes laterales del soma. Algunas veces tenían una trayectoria rectilínea (Fig. 11B), localizándose aparentemente en un solo canal flanqueado por hileras de prolongaciones radiales de células de Müller. Otras veces, las prolongaciones filamentosas mostraban una trayectoria curva (Fig. 11D),

que cruzaba transversalmente varios canales adyacentes. Con menos frecuencia, estas prolongaciones filamentosas describían giros de 180° , cambiando su dirección una o dos veces (Fig. 11E). En ocasiones, las prolongaciones filamentosas podían conectar longitudinalmente dos células ameboides adyacentes (Fig. 11F) y eran similares a largos puentes de citocinesis.

Con relativa frecuencia se observaban largas prolongaciones filamentosas que estaban fragmentadas (Fig. 11C,D), no siendo raro ver fragmentos de las mismas aislados (Fig. 11G).

La presencia y longitud de las prolongaciones filamentosas eran variables en diferentes etapas del desarrollo. Así, en estadios en los que los precursores microgliales estaban comenzando a entrar en la retina (E8-E9) había una proporción relativamente alta de células microgliales con prolongaciones filamentosas. En estadios más avanzados (E10-E16), se observaba una proporción menor de células microgliales con este tipo de filamentos. Además, por lo general, éstos eran más largos en E8-E9 que en estadios posteriores.

Variabilidad morfológica de la microglía ameboide en migración tangencial: células ameboides monopolares, bipolares y multipolares

La morfología de las células microgliales ameboides era variable. Una pequeña proporción de las mismas era redonda u ovoide, y estaban totalmente desprovistas de lamelipodios o prolongaciones celulares (Fig. 12A). Estas células eran células en división (ver capítulo II de esta tesis). El resto de células microgliales tenían proyecciones (lamelipodios o prolongaciones celulares) que surgían desde el soma y se podían clasificar como monopolares, bipolares o multipolares, de acuerdo con el número y distribución de dichas proyecciones.

Las células microgliales ameboides monopolares tenían un único lamelipodio o una única prolongación con lamelipodios que proyectaba desde el polo enfrentado a la periferia (Fig. 12B) o desde el polo enfrentado al centro de la retina (Fig. 12C).

Las células microgliales ameboides bipolares eran alargadas y tenían dos proyecciones que emergían desde polos opuestos del soma celular (Figs. 6A y

12D-H). Por lo general, estas células tenían un grosor de 5-8 μm y una longitud de 50-150 μm , aunque células bipolares de mayor longitud también podían verse en ocasiones. Dependiendo de que su eje longitudinal fuera rectilíneo o curvado, se podían identificar dos tipos de células ameboides bipolares: rectilíneas y con forma de V.

Las células bipolares rectilíneas generalmente estaban orientadas en dirección centro-periférica, es decir paralelas a los canales flanqueados por prolongaciones radiales de células de Müller (Figs. 6E y 12D,E). Algunas células ameboides bipolares rectilíneas emitían proyecciones lamelipódicas similares desde ambos polos (Fig. 6A), mientras que otras tenían uno o varios lamelipodios en un polo y una prolongación larga y delgada en el polo opuesto (Fig. 12D,E). Esta prolongación tenía un grosor de 1-2 μm , es decir más gruesa que las prolongaciones filamentosas descritas con anterioridad. Su longitud oscilaba entre 40 y 80 μm y terminaba en un pequeño lamelipodio (Fig. 12D) o en un engrosamiento (Fig. 12E). Estas prolongaciones podían emerger desde el polo enfrente al centro de la retina (Fig. 12D) o desde el polo enfrente a la periferia (Fig. 12E) de las células bipolares; por lo tanto, en diferentes células bipolares rectilíneas la polaridad era inversa en relación con la posición de la larga prolongación celular.

El eje longitudinal de las células microgliales bipolares con forma de V estaba dividido en dos brazos que formaban ángulo agudo, de forma que el soma estaba localizado en el vértice y las prolongaciones celulares desde ambos polos se dirigían en la misma dirección (Fig. 12F,G). El vértice de este tipo de células podía estar orientado hacia el centro (Fig. 12F) o hacia la periferia (Fig. 12G) de la retina. Los demás caracteres morfológicos de las células con forma de V eran similares a los descritos para las células bipolares rectilíneas. En algunas células bipolares, el soma y la proyección desde un polo formaban un ángulo de 90° con la proyección desde el otro polo (Fig. 12H).

Las células microgliales ameboides multipolares mostraban varias proyecciones celulares que irradiaban desde el soma en distintas direcciones. Algunas proyecciones eran prolongaciones que terminaban en lamelipodios más o menos extensos (Fig. 12I), mientras que otras eran lamelipodios que emergían

directamente del soma (Fig. 12J). También se observaban células con morfología intermedia entre multipolar, bipolar y monopolar (Fig. 12K), sugiriendo el paso de unos tipos morfológicos a otros.

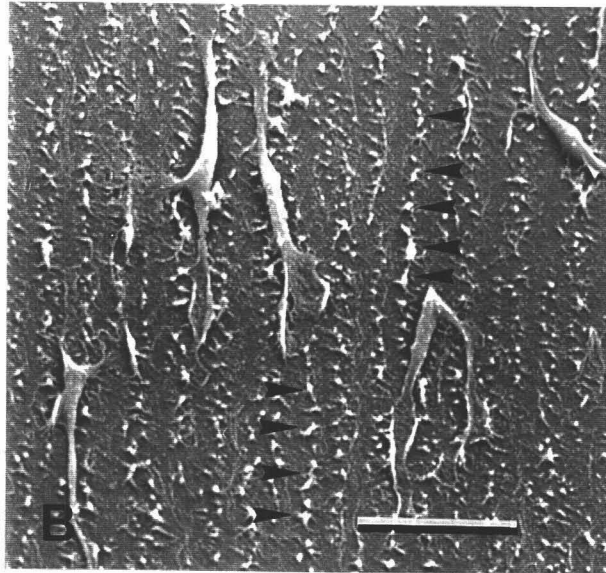
Relación entre caracteres morfológicos y localización crono-topográfica de las células microgliales ameboides

Generalmente, los caracteres morfológicos de las células microgliales ameboides diferían dependiendo de la zona de la retina y el estadio del desarrollo. Estas diferencias se ponían de manifiesto al comparar las morfologías de las células en tres regiones de la parte mediotemporal de la retina, en diferentes estadios (Fig. 13). Estas regiones eran: a) la zona adyacente a la cabeza del nervio óptico / base del pecten (zona CNO) desde donde los precursores microgliales entran en la retina; b) el frente de avance de la región retiniana ocupada por microglía ameboide en migración (zona FA); y c) una zona intermedia, equidistante de las dos anteriores (zona IN).

En E8-E9, muchas células microgliales que estaban migrando en las zonas CNO e IN eran largas células bipolares con su eje longitudinal orientado en dirección centro-periférica (Fig. 13A,B), es decir paralelamente a los canales flanqueados por las prolongaciones radiales de las células de Müller. En estos estadios del desarrollo las células microgliales ameboides eran generalmente más cortas en la zona FA (Fig. 13C) que en las zonas CNO e IN, aunque la orientación era similar en todas las zonas. En E10, los caracteres morfológicos y orientación de las células microgliales (Fig. 13D,E) eran similares a los observados en estas mismas zonas en E8-E9. Sin embargo, en la zona FA muchas células microgliales no se disponían en dirección centro-periférica (Fig. 13F). En E12, la mayoría de las células microgliales que migraban en la zona CNO eran alargadas y estaban orientadas en dirección centro-periférica (Fig. 13G). En la zona IN, muchas células no tenían una orientación definida (Fig. 13H), mientras que en la zona FA tampoco estaban orientadas y no eran alargadas (Fig. 13I), sugiriendo que no estaban en proceso de migración.

En resumen, estos resultados demostraban que durante todos los estadios del desarrollo estudiados muchas células microgliales ameboides que migraban en regiones centrales de la retina eran alargadas y claramente orientadas hacia la periferia de la retina. Por el contrario, en regiones periféricas de retinas de E10 en adelante, muchas células eran cortas y no mostraban una particular orientación. En regiones intermedias de la retina hasta E12, las células microgliales tenían una apariencia similar a las situadas en regiones centrales, pero a partir de E12 estas células eran más cortas y tendían a no estar orientadas, de forma similar a lo que ocurría en regiones periféricas.

Fig. I-1. Células ameboides sobre láminas MLI/PTCM tal como se observan con contraste de fase (A) y MEB (B). Las células se localizan a lo largo de canales flanqueados por hileras paralelas de prolongaciones radiales de células de Müller (cabezas de flecha) que se han quebrado al obtener la lámina. Barra de escala: 80 μm para A; 23 μm para B.



1978
1/8 11/11/78
Columbia University

Fig. I-2. Doble inmunofluorescencia de láminas MLI/PTCM obtenidas de retinas de E10 tras el marcaje con QH1 y un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (**A, D**) y tras el marcaje con anti-tubulina y un anticuerpo secundario conjugado con FITC (**B, E**). El anticuerpo QH1 reconoce células microgliales ameboides (**A, D**) con lamelipodios que emergen tanto de prolongaciones cortas y gruesas, como del soma celular. La anti-tubulina pone de manifiesto los somas y las prolongaciones de las células microgliales junto con las prolongaciones radiales de las células de Müller que flanquean una serie de canales (**B**), así como los fascículos de axones de células ganglionares, cuando éstos permanecen unidos a la lámina (**E**). Las imágenes de doble exposición muestran la relación topográfica de las células microgliales ameboides QH1-positivas con los canales limitados por las prolongaciones radiales de células de Müller (**C**) y con los fascículos de axones (**F**). Barra de escala: 25 μ m.

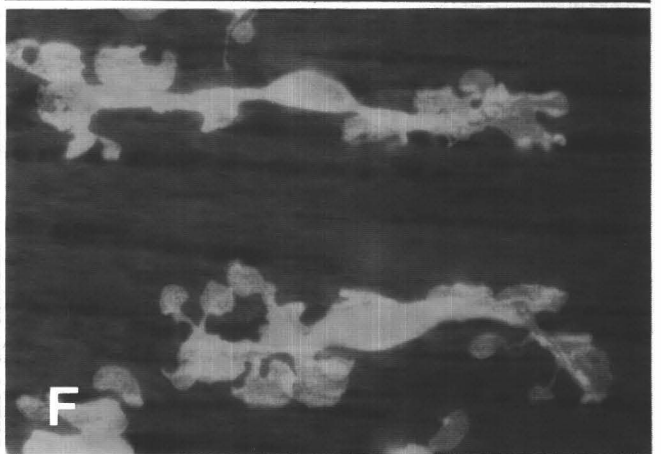
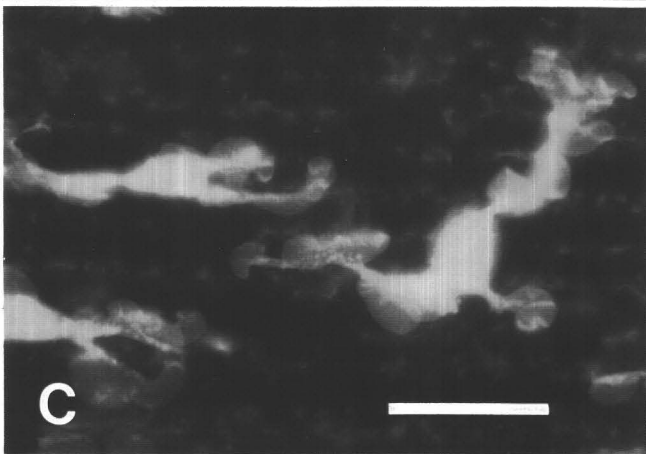
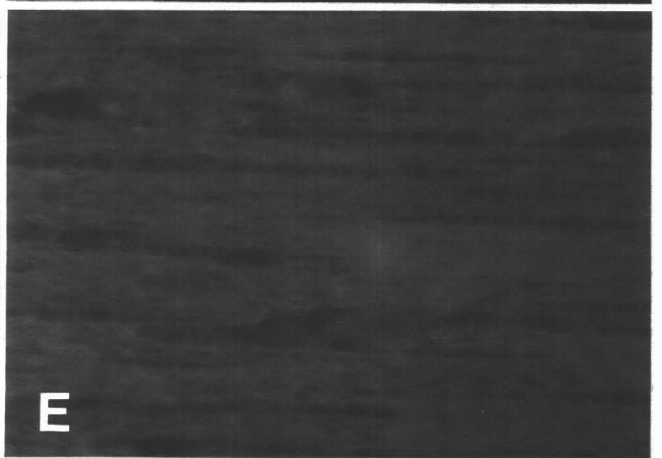
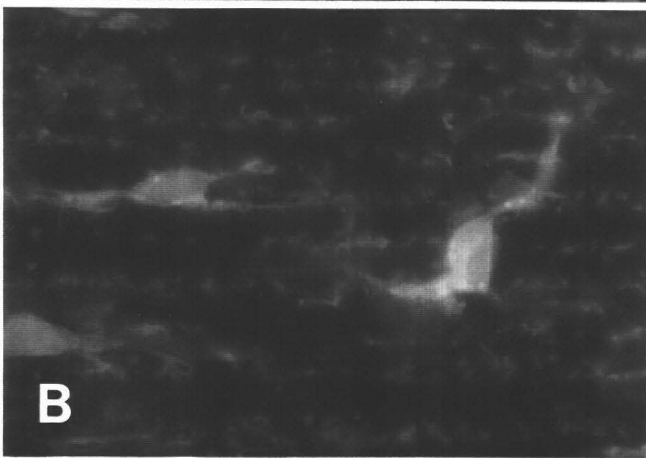
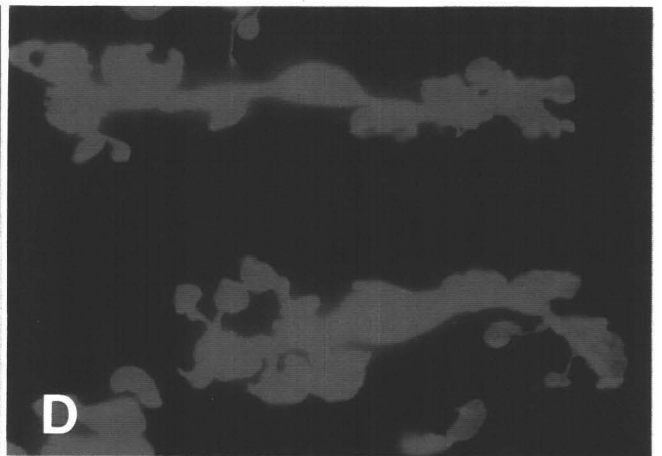
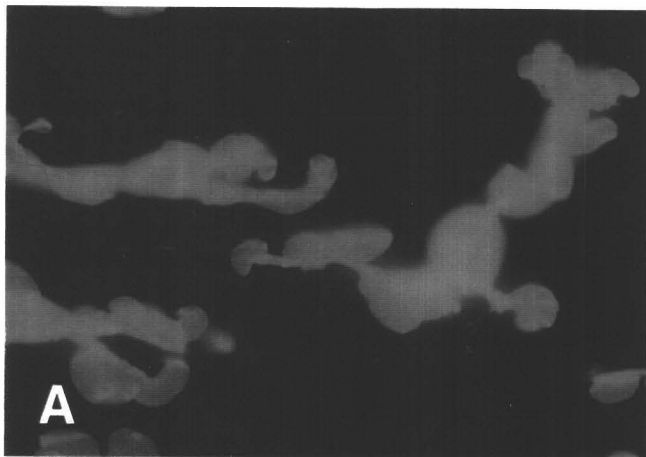


Fig. I-3. Imagen con MET de la parte más vítrea de una retina de codorniz de E10 marcada con QH1 antes de la inclusión. Solo se ha teñido con acetato de uranilo. Se observa una célula microglial QH1-positiva bajo la capa de fibras nerviosas (NFL), estrechamente adherida a los pies terminales de células de Müller (flechas). Barra de escala: 2 μ m.

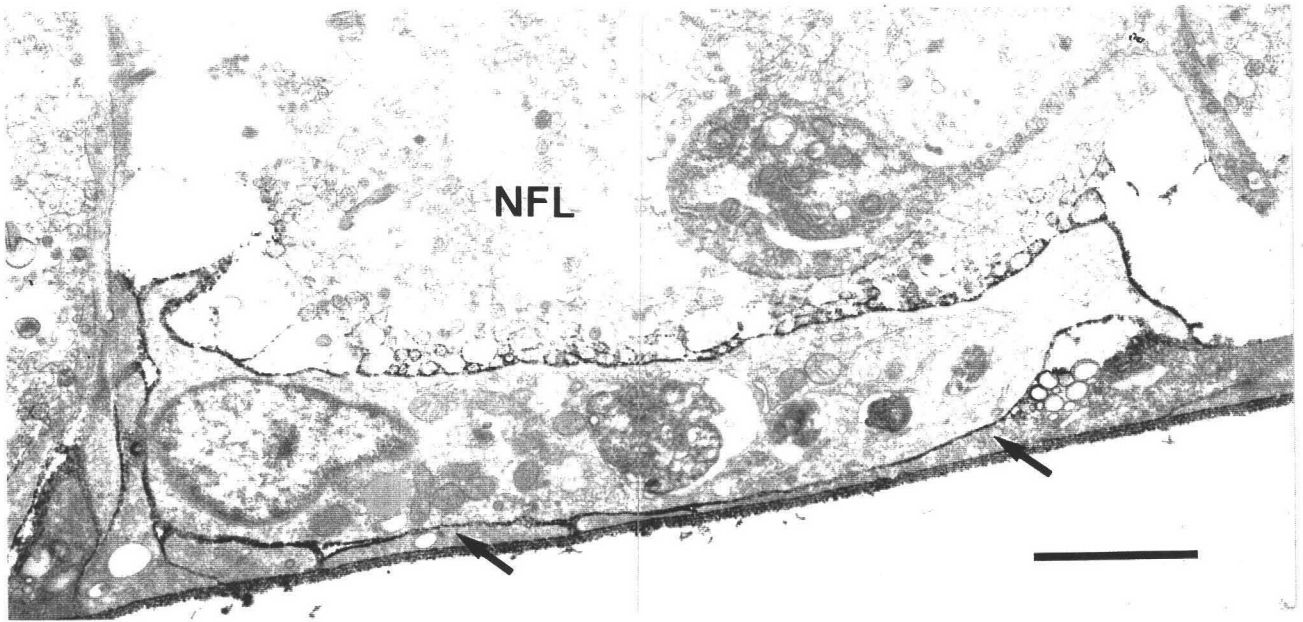


Fig. I-4. Caracteres morfológicos de la microglía ameboide que está migrando tangencialmente en una retina de E9, tal como se observan con MET en una sección tangencial de una lámina MLI/PTCM. **A:** Célula microglial con su eje longitudinal paralelo al curso de los fascículos de axones de células ganglionares (asteriscos), localizada en un canal flanqueado por prolongaciones radiales de células de Müller (cabezas de flecha), que han sido seccionadas transversalmente. Se indican las regiones que se muestran a mayor aumento en **B**, **C** y **D**. **B:** Depresiones revestidas en la superficie del soma. **C, D:** El centrosoma desde el que irradian numerosos microtúbulos (**C**) se localiza en la vecindad de un prominente complejo de Golgi (**D**). Barra de escala: 4,2 μm para **A**; 0,5 μm para **B**; 0,3 μm para **C** y **D**.

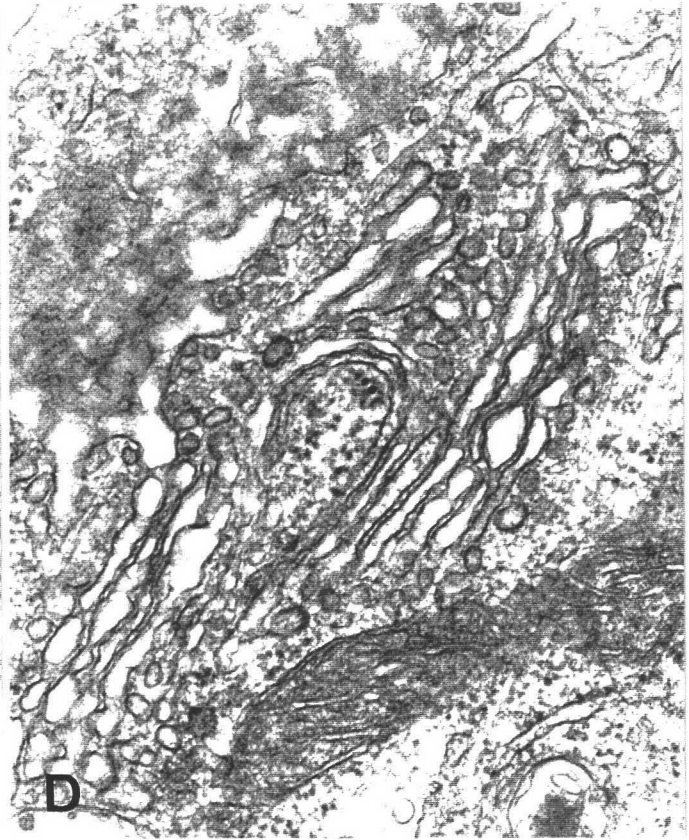
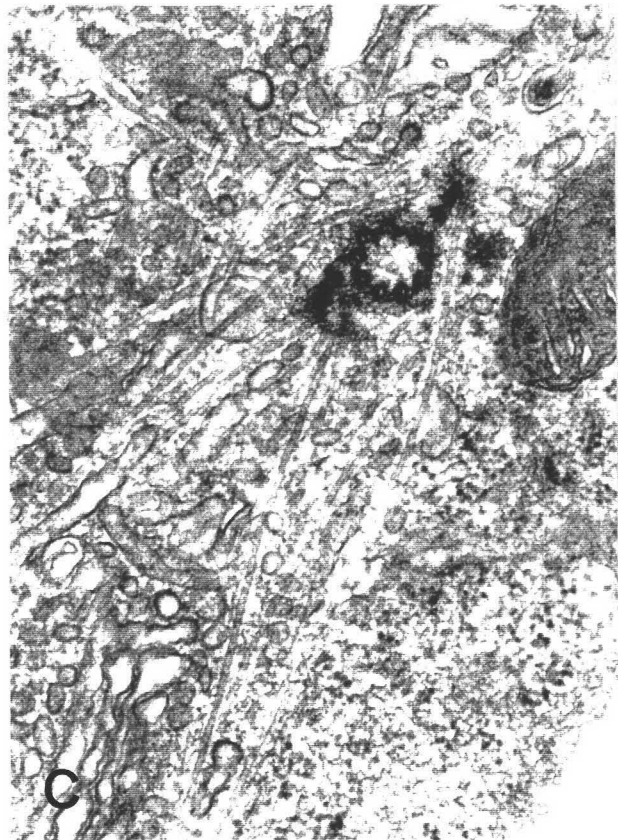
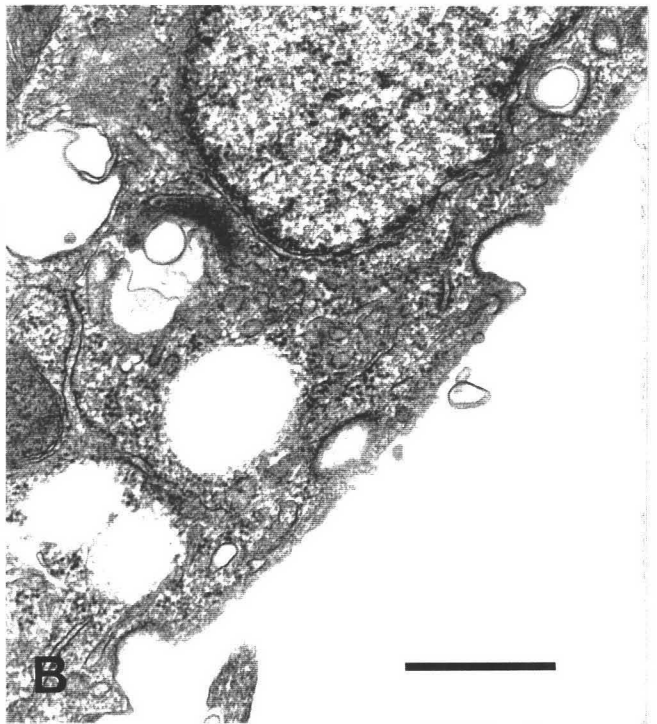
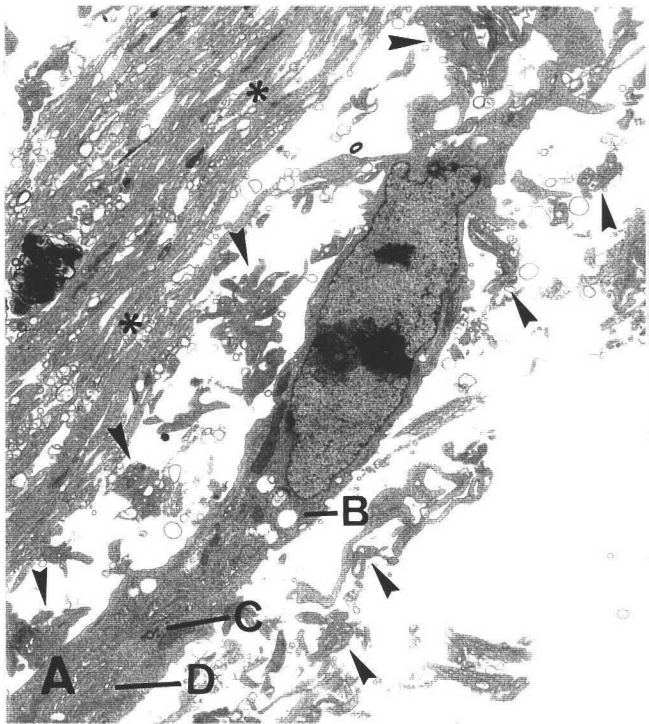


Fig. I-5. Imágenes con MET de lamelipodios de microglía ameboide en migración tangencial en la retina embrionaria de codorniz. **A:** Célula microglial ameboide en una sección tangencial de una lámina MLI/PTCM de una retina de E9. Un lamelipodio, que está seccionado transversalmente, proyecta desde el soma de la célula. **B:** Aumento del lamelipodio observado en **A**. Su citoplasma contiene ribosomas y una red filamentosa (flechas). **C:** Sección transversal de una retina de E10 marcada con QH1 antes de la inclusión, que muestra un lamelipodio QH1-positivo de una célula microglial. La sección se ha teñido solamente con acetato de uranilo. Un parte del lamelipodio (a la derecha) está estrechamente adherida a los pies terminales de células de Müller (flechas), mientras que la parte de la izquierda está separada de los pies terminales por axones de células ganglionares. Un inmunomarcaje rodea a algunos axones en estrecho contacto con el lamelipodio. NFL: capa de fibras nerviosas. Barra de escala: 2,1 μm para **A**; 0,2 μm para **B**; 1,8 μm para **C**.

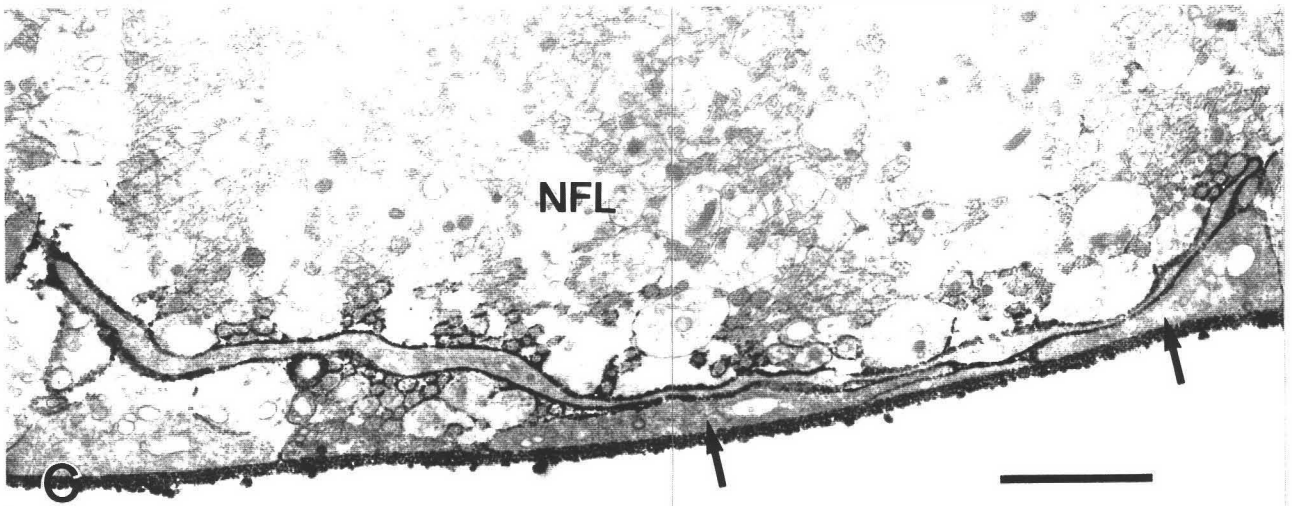
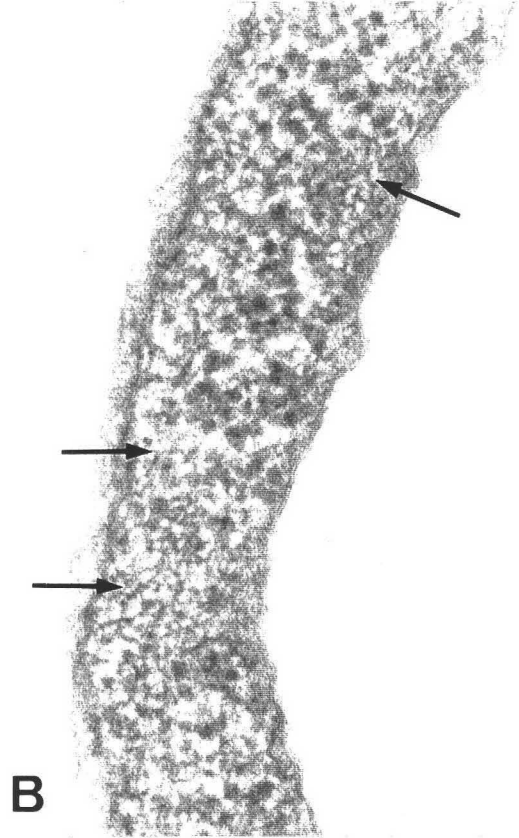
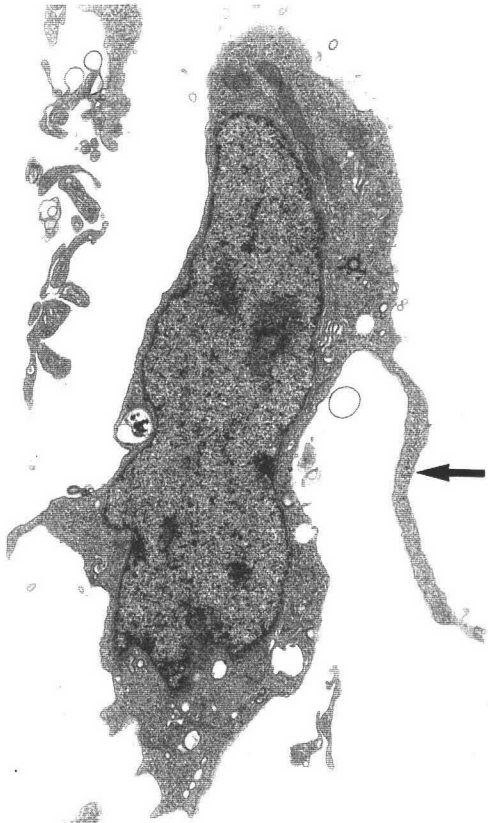


Fig. I-6. Caracteres morfológicos de las células microgliales ameboides que migran tangencialmente en retinas de codorniz de E9, tal como se observan con inmunofluorescencia con QH1 (**A, B**) y MEB (**C, D, E**) sobre láminas MLI/PTCM. **A:** Célula bipolar QH1-positiva. Una prolongación relativamente corta (flecha), que termina en un lamelipodio, emerge desde el polo del soma que mira hacia el centro de la retina. Desde el polo contrario se proyecta un largo lamelipodio. **B:** Célula ameboide QH1-positiva con una corta prolongación (flecha) que emerge del polo celular que mira hacia la periferia de la retina. Varios lamelipodios se proyectan desde las partes laterales de la célula, así como desde el polo que mira hacia el centro de la retina. **C:** A la izquierda se observa una célula microglial ameboide que tiene dos prolongaciones cortas y gruesas (flechas vacías) que emergen desde el polo celular que mira hacia la periferia de la retina y una prolongación larga y delgada que se proyecta desde el polo opuesto. Otra célula ameboide (a la derecha) tiene varios lamelipodios (flechas finas) que emergen del soma. Un lamelipodio tiene dos lóbulos (asteriscos), desde uno de los cuales se proyecta una prolongación delgada (cabeza de flecha), que termina en otro pequeño lamelipodio. Se indican las regiones que están aumentadas en **D** y **E**. **D:** Aumento de **C**. Varios lamelipodios (asteriscos) surgen de las prolongaciones celulares cortas y gruesas. De uno de ellos sale un delgado filopodio que termina en un nuevo lamelipodio en forma de abanico (estrella). **E:** Aumento de **C**. Un pequeño lamelipodio (estrella) en el extremo de un filopodio se adhiere a las prolongaciones radiales de células de Müller (flechas) que están partidas. Barra de escala: 25 μm para **A** y **B**; 11 μm para **C**; 5 μm para **D**; 4 μm para **E**.

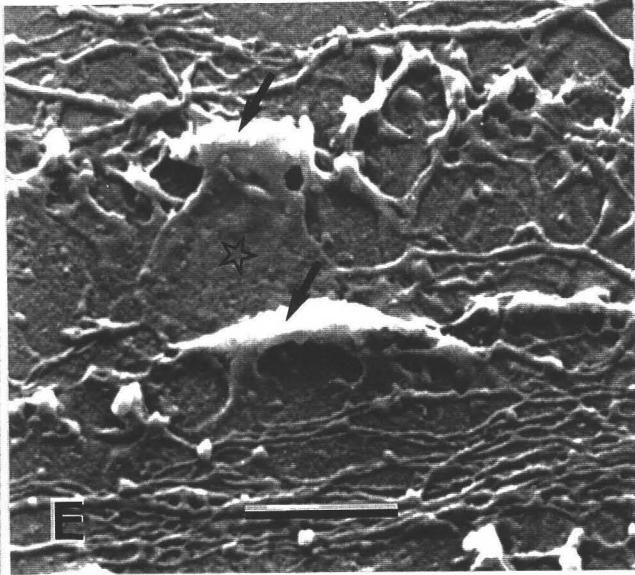
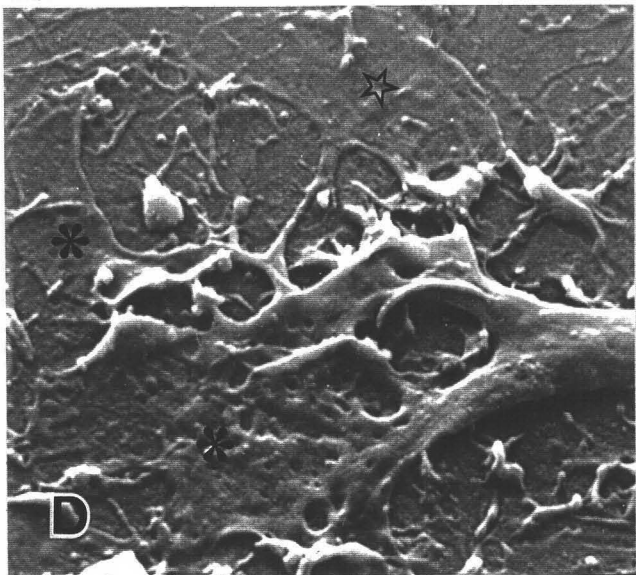
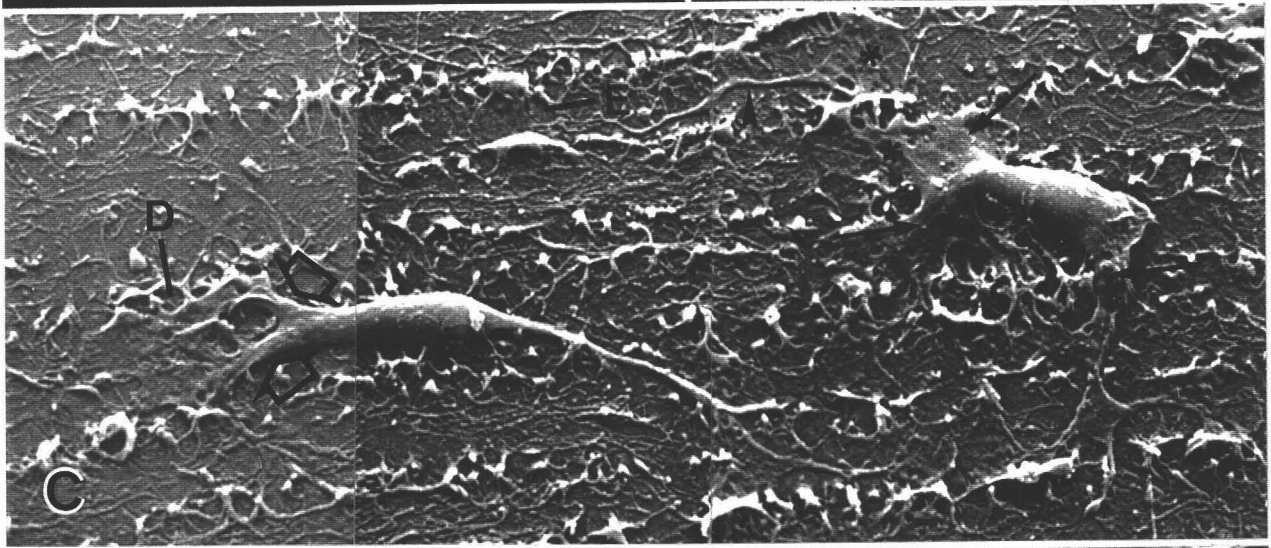
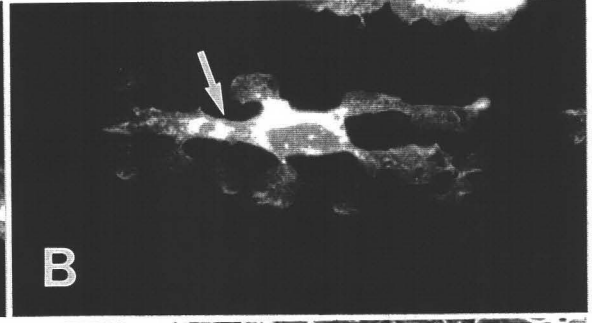
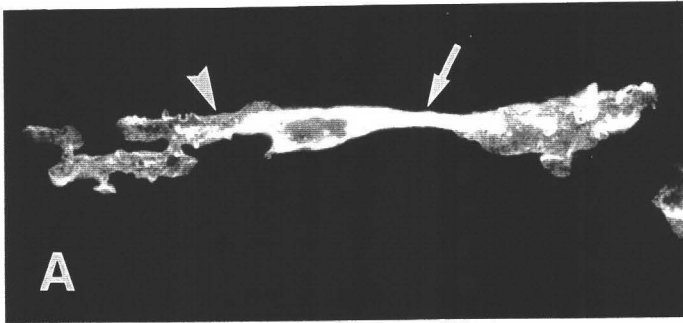


Fig. I-7. Imágenes con MEB de una célula microglial ameboide sobre una lámina MLI/PTCM de una retina de codorniz de E9. **A:** Vista general de la célula. Desde ambos polos del soma emergen, respectivamente, un lamelipodio y una gruesa prolongación bifurcada. Se indican las zonas aumentadas en **B, C** y **D**. **B:** El lamelipodio que emerge de un polo celular está adherido a prolongaciones radiales de células de Müller (flechas). **C:** Pequeños lamelipodios que emergen de una corta prolongación celular. **D:** Lamelipodio en el extremo de una prolongación celular, que está adherido lateralmente a prolongaciones radiales de células de Müller (flechas). Barra de escala: 14 μm para **A**; 5,5 μm para **B**; 6 μm para **C**; 7 μm para **D**.

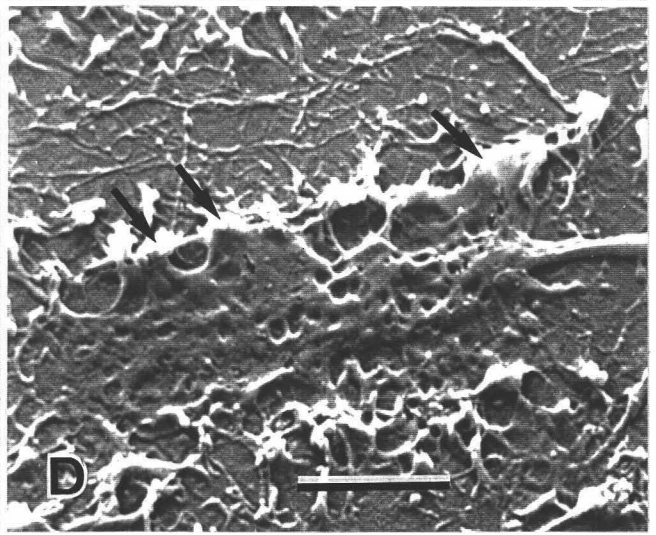
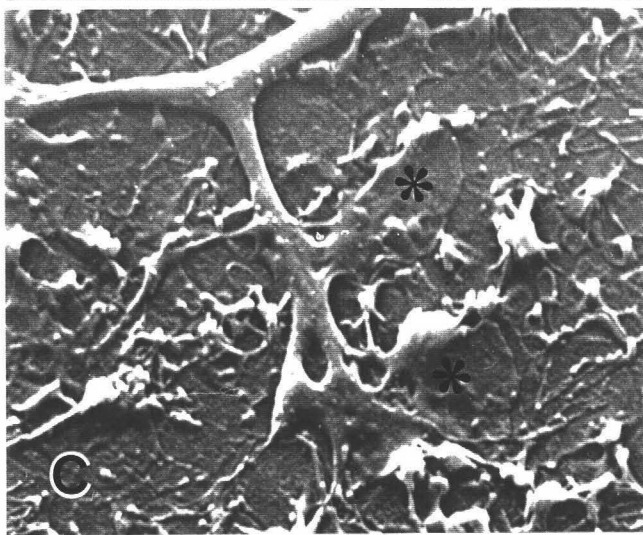
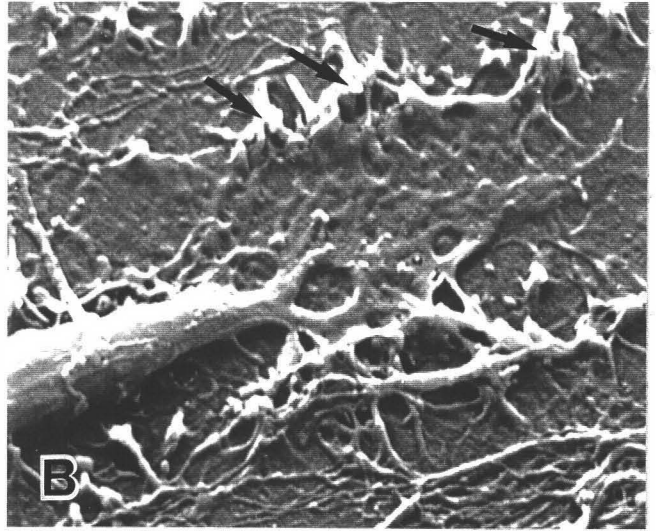
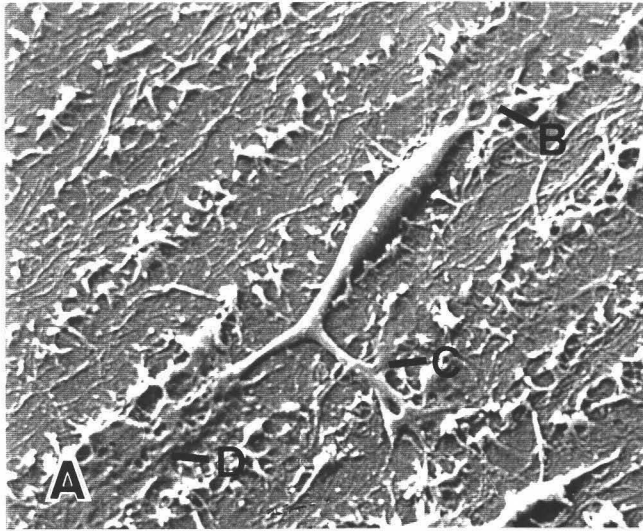


Fig. I-8. Células microgliales ameboides que migran tangencialmente en retinas de codorniz de E9, tal como se observan con MEB (**A-D, F**) e inmunofluorescencia con QH1 (**E**) sobre láminas MLI/PTCM. **A:** Células bipolares con prolongaciones largas y delgadas (flechas) que emergen desde ambos polos. Se indican las zonas aumentadas en **B** y **D**. **B:** Lamelipodio con dos lóbulos (asteriscos) localizado en la mitad de una prolongación celular (flecha). **C:** Pequeño lamelipodio (asterisco) que emerge lateralmente de una prolongación celular. **D:** Filopodio (flecha) que se origina en un lamelipodio (asterisco). **E:** Célula microglial ameboide con lamelipodios en ambos polos. Cada lamelipodio tiene varios lóbulos (asteriscos) que adoptan la forma de los canales adyacentes sobre los que se localizan. **F:** Lamelipodio con tres lóbulos (asteriscos), cada uno de los cuales se extiende en un canal diferente. Barra de escala: 25 μm para **A**; 4,5 μm para **B** y **C**; 5,5 μm para **D**; 20 μm para **E**; 7,5 μm para **F**.

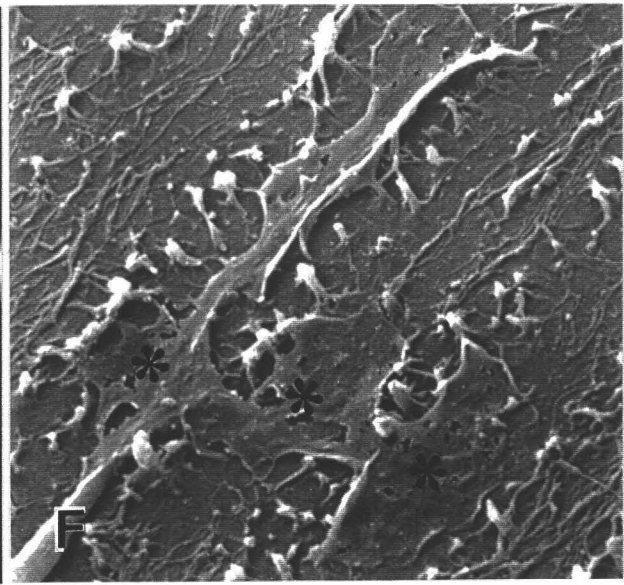
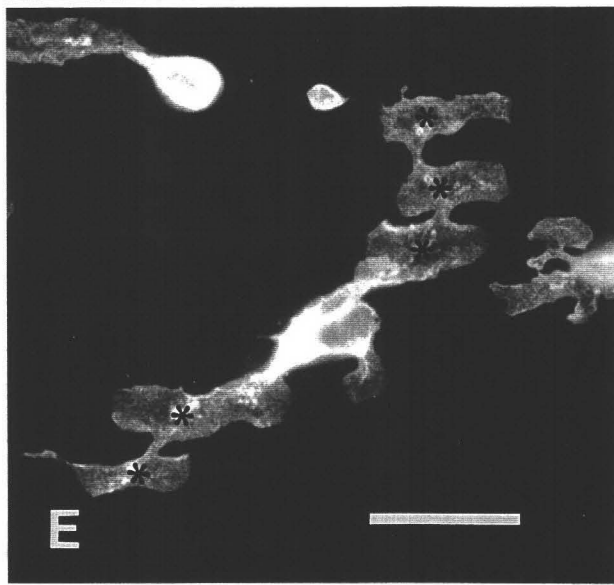
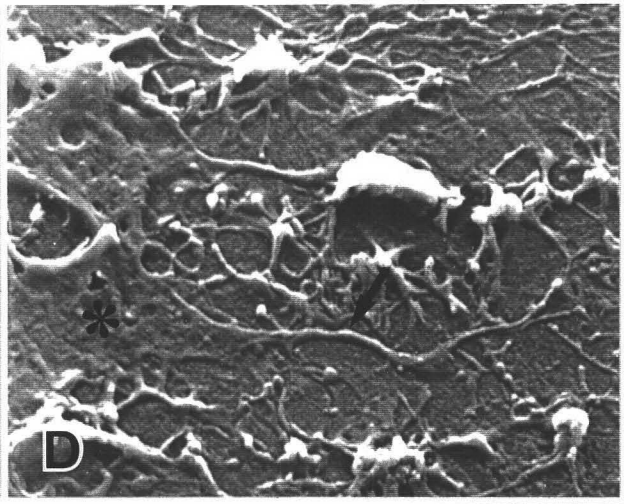
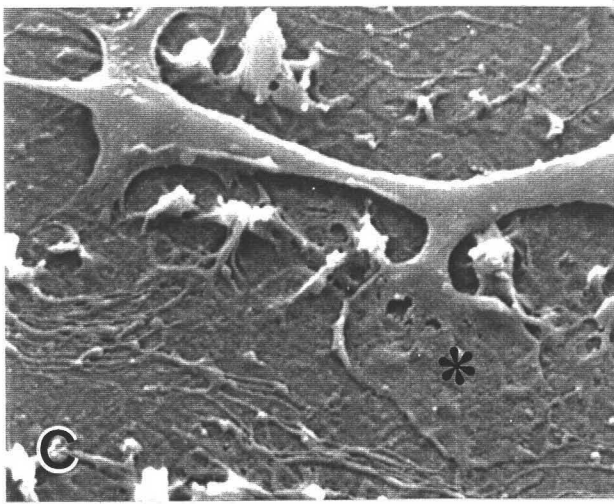
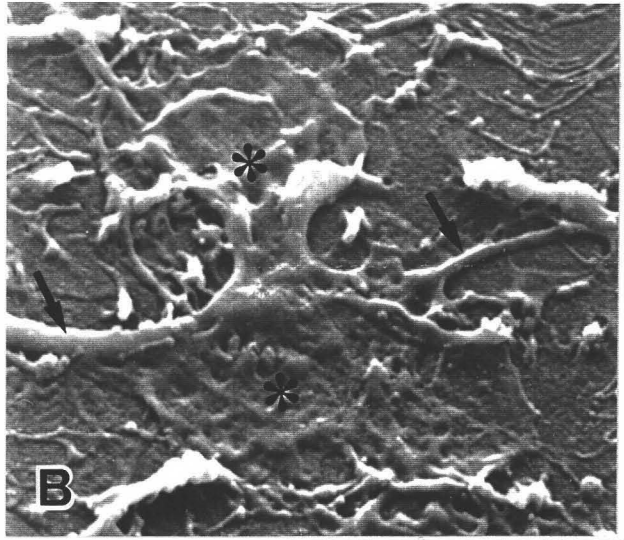
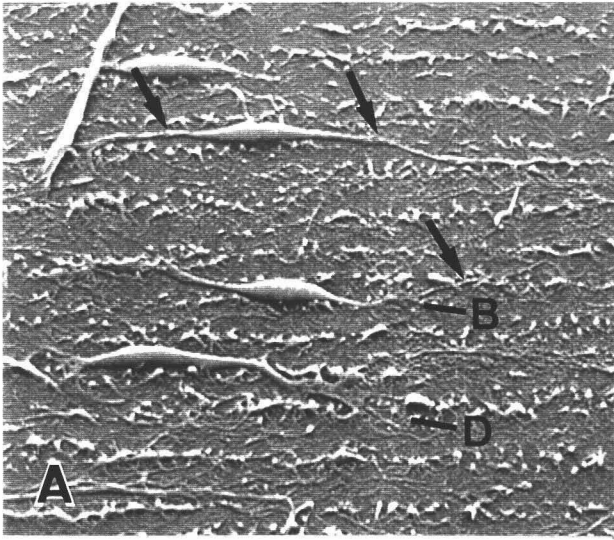


Fig. I-9. Uniones de los lamelipodios (**A, B**) y el soma (**C, D**) de células microgliales ameboides a prolongaciones radiales de células de Müller, tal como se observan con MET en secciones tangenciales de láminas MLI/PTCM de retinas de codorniz de E9. **A:** Secciones transversales de prolongaciones radiales de células de Müller (flechas) dispuestas en hileras que flanquean canales, y de perfiles de lamelipodios (cabezas de flecha) que se localizan en dichos canales. Se señala la zona aumentada en **B**. **B:** Tres proyecciones de un lamelipodio (cabezas de flecha) están estrechamente adheridas a la superficie de las prolongaciones radiales de células de Müller. **C:** Porción del soma de una célula microglial ameboide que contacta con una prolongación radial de una célula de Müller (flecha), que se observa en **D** a mayor aumento. **D:** Estrechos contactos (cabezas de flecha) entre la célula microglial y la prolongación radial de una célula de Müller, en la que están presentes varias cisternas de retículo endoplasmático liso. Barra de escala: 3 μm para **A**; 0,5 μm para **B** y **C**; 0,2 μm para **D**.

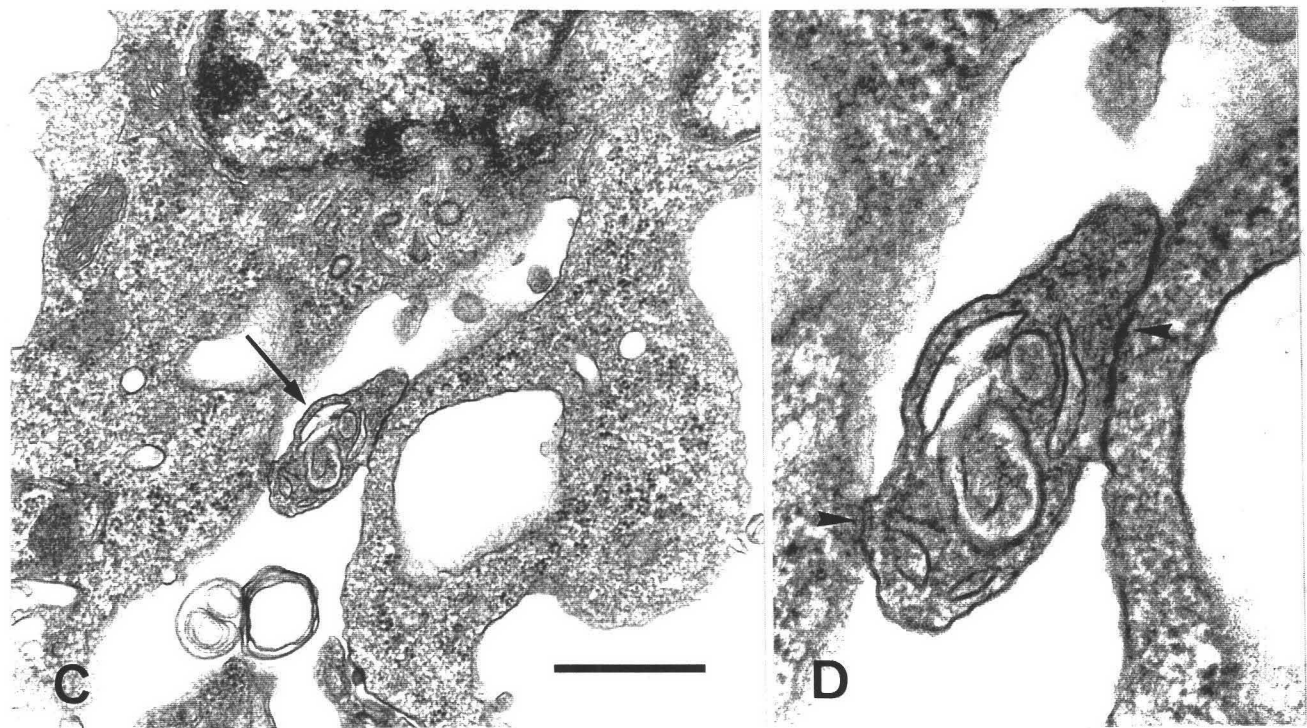
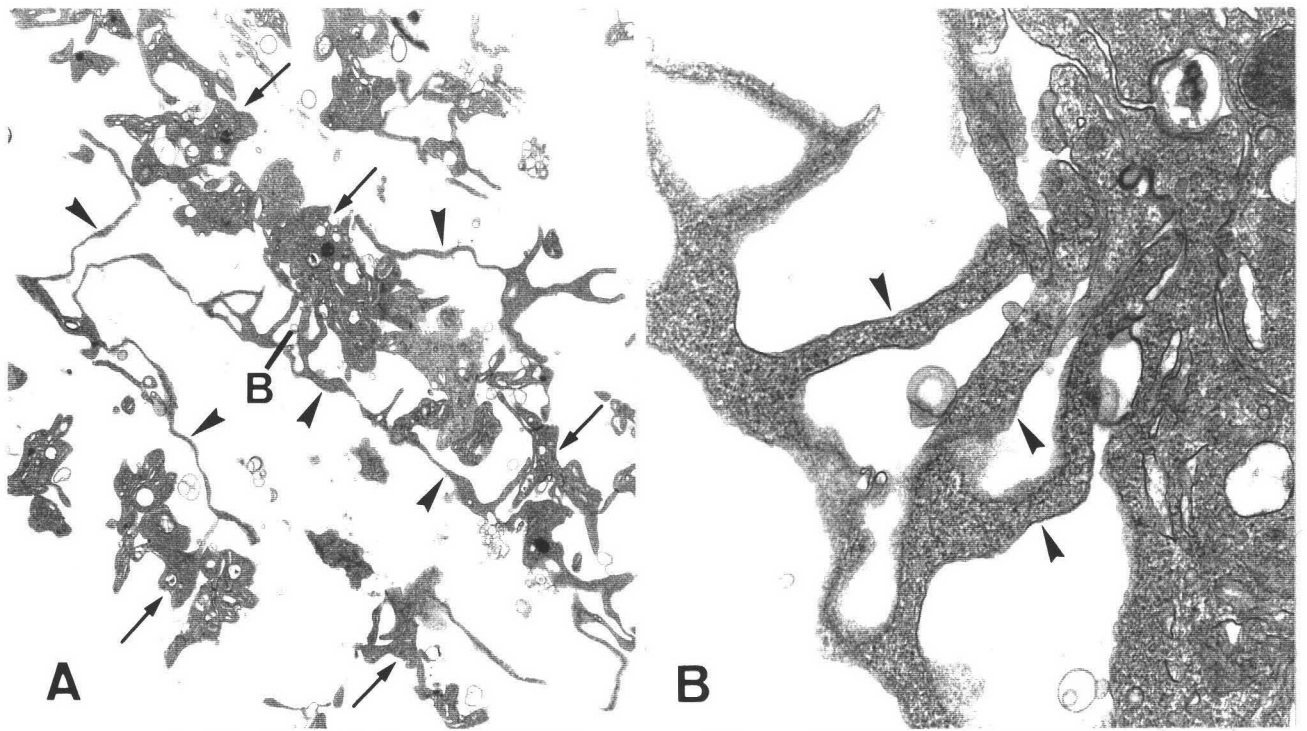


Fig. I-10. Imágenes con MET de uniones de prolongaciones celulares (**B, C**) y del soma (**D, E**) de células microgliales ameboides a la lámina basal de la superficie vítrea de la retina de codorniz de E9. **A:** Pies terminales de células de Müller que forman una lámina continua, tal como se observa en una sección tangencial de una lámina MLI/PTCM. **B:** Sección transversal de una retina que muestra una prolongación celular (cabezas de flecha) que surge del soma de una célula microglial ameboide y se extiende sobre los pies terminales de células de Müller. Se indica el área aumentada en **C** que muestra dos protuberancias (flechas) de la prolongación que descansan sobre la lámina basal a través de huecos que quedan entre pies terminales adyacentes. **D:** Sección transversal de una retina que muestra el soma de una célula microglial estrechamente adherido a los pies terminales de células de Müller. Se indica el área aumentada en **E**, en la que se ve un hueco entre dos pies terminales adyacentes a través del cual la superficie de la célula microglial se une a la lámina basal subyacente (cabezas de flecha). NFL: capa de fibras nerviosas. Barra de escala: 0,5 μm para **A**; 2 μm para **B**; 0,7 μm para **C** y **D**.

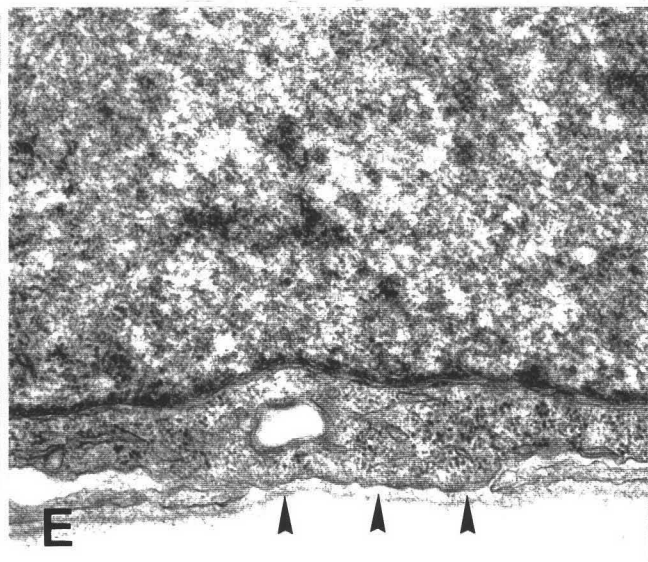
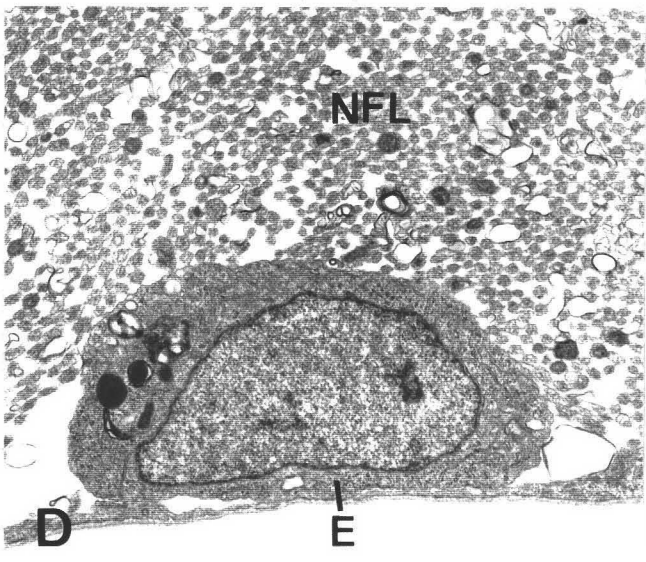
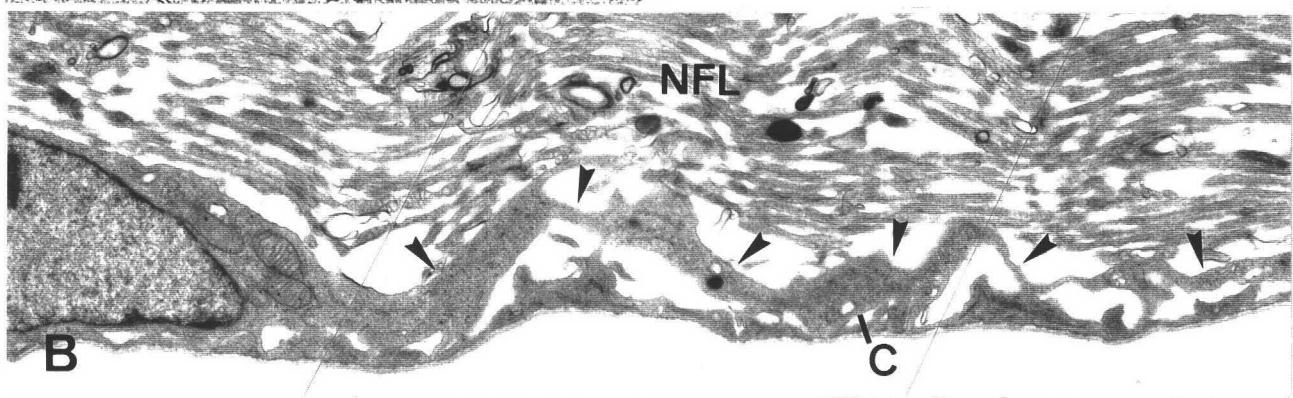
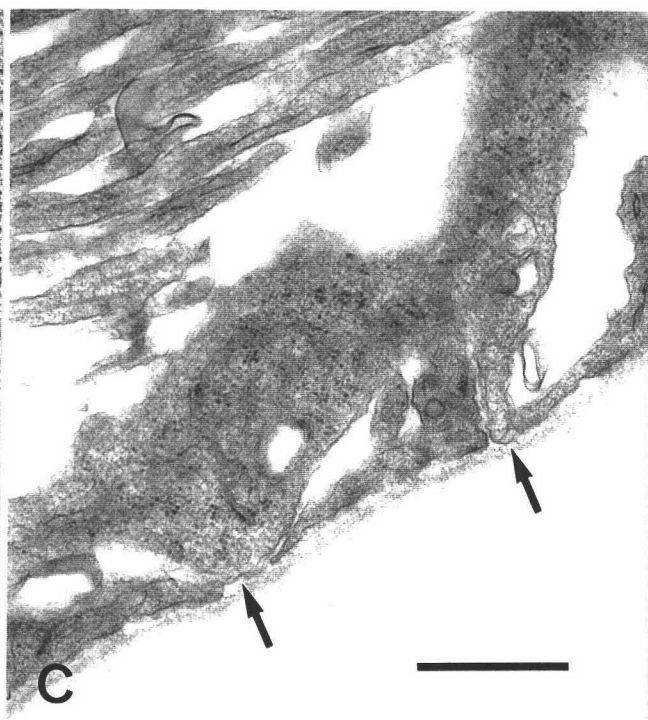
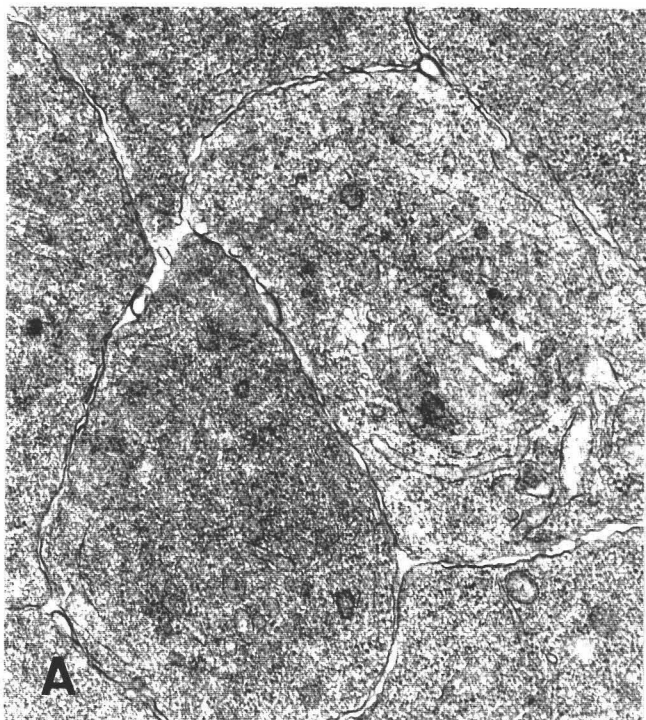


Fig. I-11. Prolongaciones filamentosas de células microgliales ameboides en proceso de migración tal como se observan en montajes totales de retinas de E9 (**A, D**) y E8 (**B, C, E-G**) tratadas con inmunocitoquímica-QH1. En todas las micrografías la periferia de la retina está hacia la izquierda y el centro hacia la derecha. Las prolongaciones filamentosas de las células microgliales QH1-positivas proyectan desde el polo celular que mira hacia el centro de la retina (cabezas de flecha en **A-D** y **F**) o desde el polo que mira hacia la periferia (flechas en **A** y **E**). Algunas prolongaciones filamentosas terminan en una estructura en forma de maza (triángulos en **B, C** y **E**) y otras son extremadamente largas (**C** y **E**). Una prolongación filamentososa describe un doble giro de 180° (**E**), mientras que otra parece establecer un puente entre dos células microgliales (flecha vacía en **F**). También se observa una prolongación filamentososa aislada sobre el sustrato (flecha vacía en **G**). Barra de escala: 50 μm para todas las micrografías, excepto **C**; 80 μm para **C**.

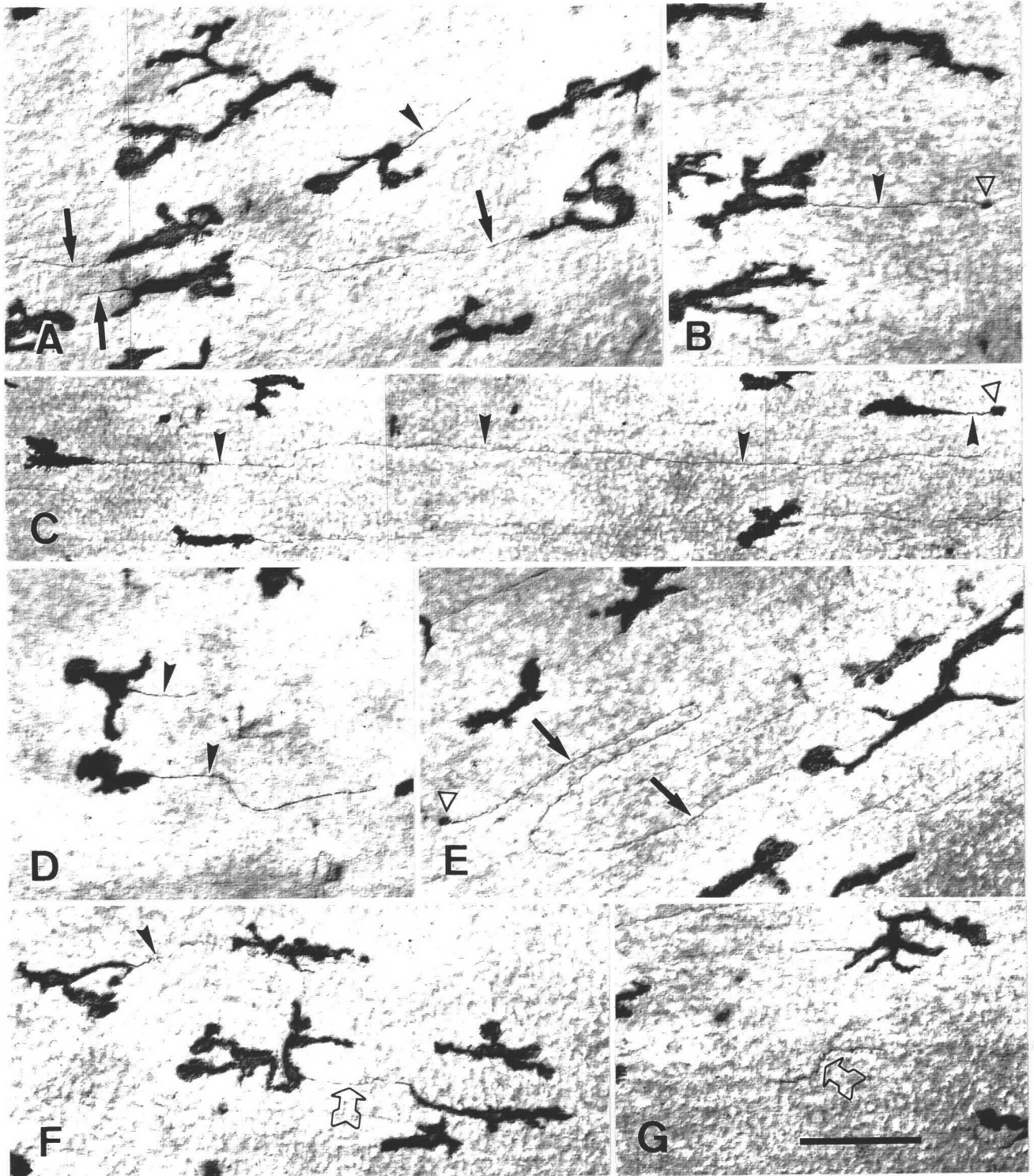


Fig. I-12. Caracteres morfológicos variables de las células microgliales ameboides de retinas de codorniz de E9, tal como se observan en láminas MLI/PTCM con inmunofluorescencia-QH1 (A-D, F-H, K) y en montajes totales de retina inmunoteñidos con QH1, utilizando avidina-biotina-peroxidasa para la visualización del marcaje (E, I). En todas las micrografías la periferia de la retina está hacia la izquierda y el centro hacia la derecha. Se observan células microgliales redondas (A), monopolares (B, C), bipolares rectilíneas (D, E), bipolares curvadas (F-H), multipolares (I, J) e intermedias (K). En las células monopolares, las proyecciones lamelipódicas emergen desde el polo del soma que mira hacia la periferia (B) o desde el que mira hacia el centro (C). Las células bipolares rectilíneas también muestran lamelipodios desde el polo que mira hacia la periferia (D) o desde el que mira hacia el centro (E), mientras que una larga prolongación emerge desde el polo opuesto. Algunas células bipolares curvadas tienen forma de V con su vértice dirigido hacia el centro (F) o hacia la periferia (G) de la retina. Otras células bipolares curvadas tienen forma de L (H), con un aspecto intermedio entre las células bipolares rectilíneas y en forma de V. En las células multipolares, varias prolongaciones que emiten lamelipodios (I) o varios lamelipodios (J) emergen desde el soma en distintas direcciones. La célula mostrada en K parece ser una célula bipolar rectilínea que ha retraído sus prolongaciones desde ambos polos y está emitiendo proyecciones lamelipódicas desde un lado. Barra de escala: 30 μ m en todas las micrografías.

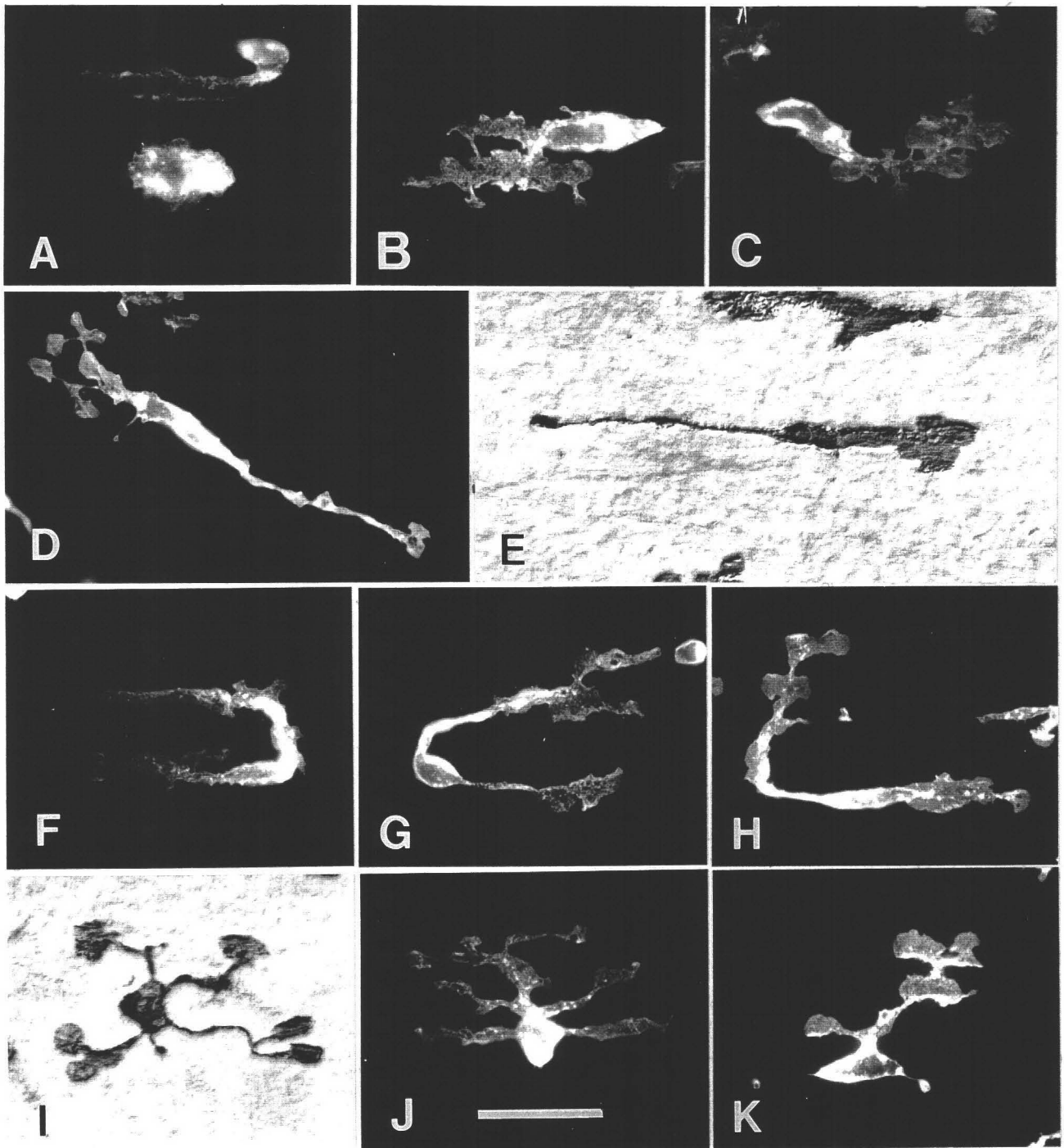
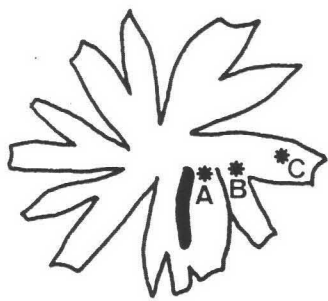
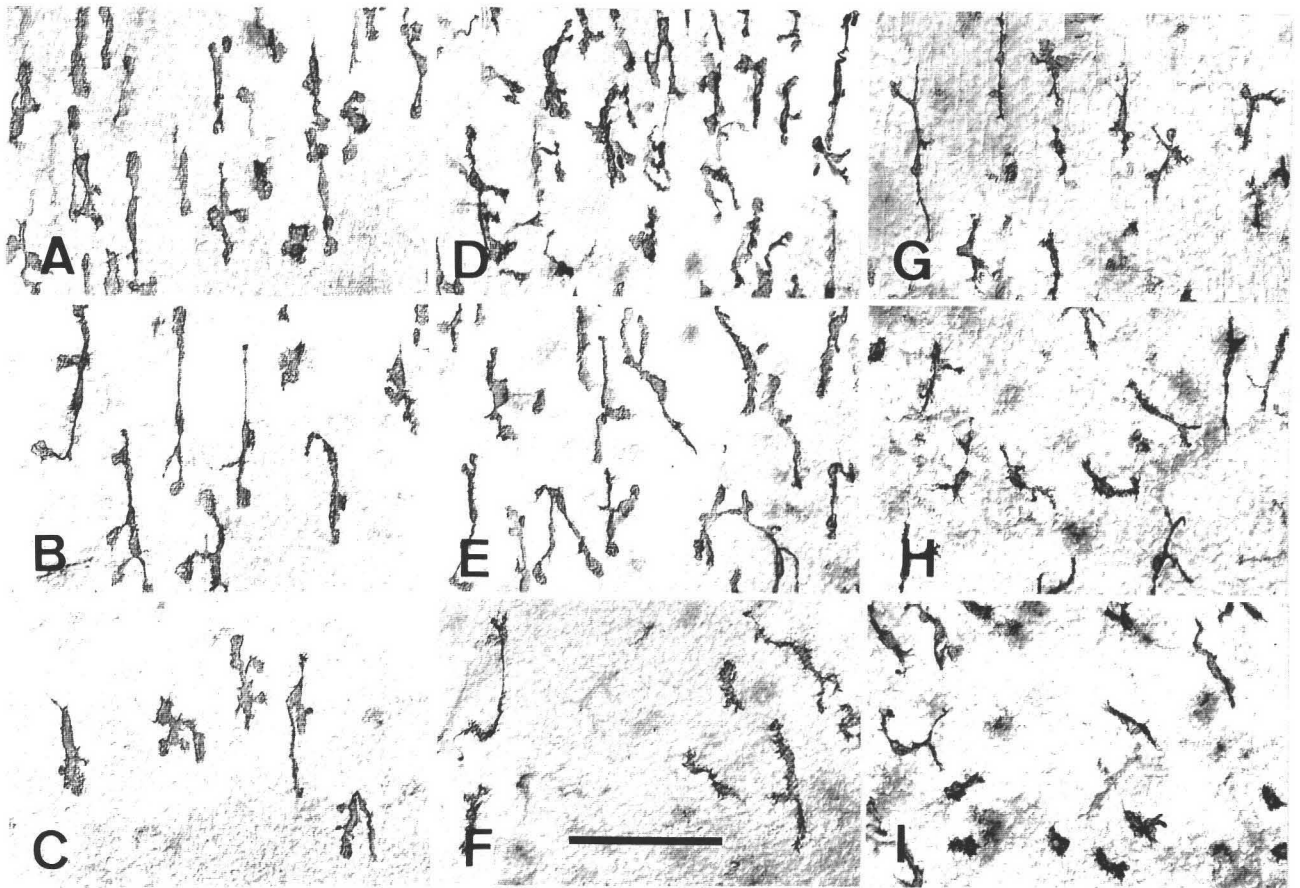
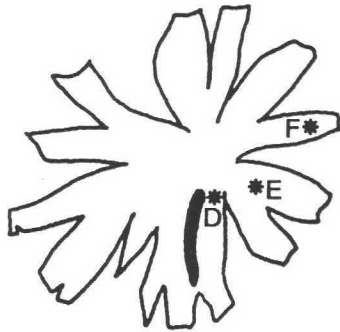


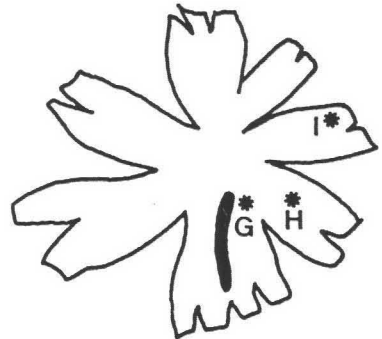
Fig. I-13. Caracteres morfológicos de la microglía ameboide en proceso de migración tangencial en diferentes áreas de montajes totales de retinas de codorniz de E9 (A-C), E10 (D-F) y E12 (G-I) inmunotefidos con QH1. En cada retina, las micrografías se obtuvieron en la zona CNO, adyacente a la cabeza del nervio óptico (A, D, G), en la zona IN, a medio camino entre la cabeza del nervio óptico y la periferia retiniana (B, E, H) y en la zona FA, es decir el frente de avance de la región ocupada por microglía ameboide (C, F, I). Las localizaciones exactas de las diferentes micrografías dentro de cada retina se indican con asteriscos en los dibujos de la parte inferior. Las áreas en negro en estos dibujos representan las respectivas cabezas del nervio óptico. Las células microgliales ameboides son largas y orientadas centro-periféricamente en todas las áreas de la retina de E9 (A, B, C), en las zonas CNO e IN de E10 (D, E) y en la zona CNO de E12 (G). Células microgliales más cortas y aparentemente no orientadas se observan en la zona FA de E10 (F) y E12 (I), así como en la zona IN de E12 (H). Barra de escala: 90 μ m.



E9



E10



E12

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos estudiado los caracteres morfológicos de la microglía ameboide en proceso de migración tangencial en la retina embrionaria de la codorniz, con objeto de obtener información sobre los mecanismos de migración y al conducta migratoria de estas células. Las láminas MLI/PTCM son un excelente material para estudiar in situ los precursores microgliales que están migrando, ya que este tipo de preparaciones ofrecen ventajas similares a las de cultivos celulares in vitro, haciendo posible el análisis de células no seccionadas con una variedad de técnicas tales como microscopía con contraste de fase, inmunocitoquímica y MEB.

De nuestros resultados, hemos concluído que: 1) las células microgliales ameboides migran tangencialmente sobre los pies terminales de las células de Müller; 2) el mecanismo de migración de las células microgliales es similar al descrito para la locomoción de fibroblastos en cultivo; 3) las células microgliales parecen alternar fases de locomoción activa con fases de orientación para elegir la ruta adecuada; y 4) la migración centro-periférica de las células microgliales ameboides no sigue una ruta rectilínea, sino que estas células presentan movimientos hacia delante, hacia atrás y hacia los lados. Estos cuatro puntos son discutidos seguidamente en diferentes apartados.

Los pies terminales de las células de Müller son el sustrato sobre el que migra tangencialmente la microglía ameboide

La presencia de células microgliales ameboides en las láminas MLI/PTCM de la retina embrionaria demuestra claramente que muchas células microgliales utilizan los pies terminales de las células de Müller como sustrato sobre el que migran tangencialmente. No se puede descartar que algunas células microgliales migren sobre axones de células ganglionares, al menos durante una parte de su trayecto. En efecto, se han observado algunas células microgliales ameboides entre los fascículos axónicos de la capa de fibras nerviosas de la retina embrionaria de codorniz (Navascués et al., 1995), y la microglía ameboide también parece migrar a lo largo de axones en el nervio óptico en desarrollo (Moujahid et al., 1996) y en la sustancia blanca del cerebelo (Navascués et al., 1996; Cuadros et al., 1997).

Los pies terminales sobre los que migran los precursores microgliales parecen pertenecer a células de Müller (no a progenitores radiales de glía o neuronas) ya que las neuronas retinianas y las células de Müller han abandonado el ciclo celular en los estadios del desarrollo estudiados por nosotros. En efecto, en la retina de pollo, casi todas las neuronas y células de Müller han dejado el ciclo en E10 (Spence & Robson, 1989; Prada et al., 1991), que equivale a E8 en el desarrollo de la codorniz.

Los pies terminales de las células de Müller constituyen un sustrato orientado, ya que forman el suelo de los canales flanqueados por hileras de las prolongaciones radiales que terminan en dichos pies terminales. Estos canales irradian desde la cabeza del nervio óptico hacia la periferia de la retina (Suburo et al., 1979). La coincidencia entre la orientación del sustrato y la dirección centro-periférica de las células microgliales en proceso de migración sugiere que la conducción mecánica está implicada en la migración tangencial de la microglía ameboide a través de la retina. En este sentido, otros autores han descrito que los fibroblastos o los precursores oligodendrogiales que se mueven *in vitro* sobre una superficie de canales paralelos llegaban a alinearse en la dirección de los canales (Clark et al., 1990; Webb et al., 1995). Tanto la profundidad como la anchura de los canales influían en el grado de alineamiento de las células. Nuestros resultados están de acuerdo con este principio, puesto que las células microgliales ameboides mostraban mayor grado de alineamiento en las zonas CNO (donde los canales flanqueados por prolongaciones radiales de células de Müller son profundos y claramente delimitados) que en la periferia retiniana (donde los canales son más aplanados y difusos).

Además de su papel en la conducción mecánica de las células microgliales, los pies terminales de las células de Müller pueden participar en la conducción adhesiva de estas células. En efecto, se ha demostrado que las moléculas adhesivas N-CAM y laminina están presentes en los pies terminales de la retina embrionaria de pollo y codorniz (Halfter et al., 1987; Halfter & Fua, 1987). Además, las células de Müller de retinas de conejo adulto en cultivo también expresan laminina (Wakakura & Foulds, 1989).

Los pies terminales de las células de Müller están en íntimo contacto unos con otros, formando un sustrato laminar. Las células ameboides que migran sobre

este sustrato se aplanan y emiten lamelipodios, aparentemente como consecuencia de su adhesión al sustrato laminar. Por el contrario, la microglía ameboide en ambientes no laminares del SNC llega a redondearse y emite tanto pseudópodos como lamelipodios y ocasionalmente filopodios (Rio-Hortega, 1932; Ling, 1976; Boya et al., 1979, 1991; Ling et al., 1980; Murabe & Sano, 1982; Perry et al., 1985; Ashwell, 1990; Cuadros et al., 1994; Brockhaus et al., 1996; Navascués et al., 1996). Por lo tanto, la naturaleza física del sustrato parece influir decisivamente en la morfología de las células microgliales ameboides que migran sobre él, aunque la presencia de lamelipodios es una característica constante.

Mecanismos celulares implicados en la locomoción de la microglía ameboide durante su migración tangencial

Hasta el presente no hay estudios in situ que traten del mecanismo de migración de la microglía ameboide en el SNC, aunque sí se han descrito algunos análisis in vitro (Booth & Thomas, 1991; Ward et al., 1991; Haapaniemi et al., 1995; Brockhaus et al., 1996). Mediante la combinación de estudios con inmunocitoquímica QH1, MEB y MET sobre láminas MLI/PTCM y montajes totales de retina, nosotros hemos demostrado que la microglía ameboide en la retina embrionaria de codorniz tiene morfología aplanada, con extensos lamelipodios que emergen tanto del soma como de prolongaciones celulares de longitud variable. Estos caracteres morfológicos son similares a los observados en la microglía cultivada bajo ciertas condiciones (Abd-El-Basset & Fedoroff, 1995; Ilshner & Brandt, 1996). Los lamelipodios de la microglía ameboide in situ contienen ribosomas y una red filamentosa, probablemente de actina, pero no microtúbulos ni otros orgánulos. Estas características estructurales coinciden con las de los lamelipodios en la microglía cultivada (Abd-El-Basset & Fedoroff, 1995). Los caracteres morfológicos de la microglía ameboide de la retina in situ son similares a los de los fibroblastos cultivados que se mueven sobre sustratos adhesivos (Abrecrombie et al., 1970; Bershadsky & Vasiliev, 1988; Bray, 1992) y a los de las neuronas que migran en el SNC en desarrollo (Book et al., 1991; Liesi, 1992). Por lo tanto, para interpretar nuestros resultados podemos usar el modelo actualmente aceptado para explicar la locomoción de los fibroblastos. Este modelo comprende la extensión polarizada de lamelipodios en el borde delantero de la célula, una fuerte

adhesión de la célula al sustrato, la translocación del cuerpo celular hacia delante, y la retracción de la parte trasera de la célula, que se observa frecuentemente como una prolongación larga y rectilínea denominada borde trasero (Bershadsky & Vasiliev, 1988; Bray, 1992).

Polarización celular

Un requisito previo para la locomoción direccional de las células parece ser la polarización de las mismas. Abd-El-Basset & Fedoroff (1995) han demostrado que en cultivo de tejidos las células microgliales no migratorias extienden lamelipodios en varias direcciones. Cuando se añade lipopolisacárido a los cultivos, algunas células llegan a polarizarse y comienzan a migrar mediante la extensión de un gran lamelipodio en su borde delantero. No obstante, Haapaniemi et al., (1995) han descrito recientemente un tipo de locomoción no ameboide de la microglía cultivada en el que no parece tener lugar la polarización celular. Como se ha visto en el presente estudio, en la retina en desarrollo la polarización morfológica es evidente en las células microgliales monopolares y bipolares, pero no en las células redondas o multipolares. Por lo tanto, las células monopolares y bipolares son interpretadas como células en activo proceso de migración, mientras que las células no polarizadas no parecen estar en proceso de locomoción (ver más adelante).

La variada morfología de los diferentes tipos de células microgliales ameboides refleja fases del movimiento semejantes a las diferentes etapas del mecanismo de locomoción de los fibroblastos en cultivo. Las células microgliales bipolares con una larga prolongación en uno de sus polos y un amplio lamelipodio en el otro polo serían similares a fibroblastos que están en proceso de retracción del borde trasero, mientras que las células monopolares serían parecidas a fibroblastos en los que se completado dicha retracción.

Uniones de las células al sustrato

En una de las fases del mecanismo de locomoción de los fibroblastos hay fuertes uniones de la célula al sustrato. En nuestro estudio hemos demostrado la presencia de dos tipos de uniones aparentemente fuertes de los precursores microgliales al sustrato: las uniones de las prolongaciones celulares y el soma con la

lámina basal de la retina y las uniones de las superficies laterales de los lamelipodios y del soma a las prolongaciones radiales de las células de Müller.

Algunos pies terminales de células de Müller se separan parcialmente dejando pequeños huecos a través de los cuales las células microgliales establecen uniones con la lámina basal subyacente. Diversos tipos celulares en proceso de migración *in vitro* sobre láminas MLI/PTCM de pollo o codorniz también son capaces de separar los pies terminales, dejando rastros que ponen de manifiesto el camino seguido por los mismos en la monocapa de pies terminales (Halfter et al., 1988). Esto parece demostrar que la unión de las células migratorias a la lámina basal es un mecanismo general que participa en su migración sobre la parte más vítrea de la retina de aves. Estas uniones podrían estar mediadas por laminina, que está presente en la lámina basal de la retina de embriones de pollo y codorniz en la segunda semana de incubación (Halfter et al., 1987; Cohen et al., 1987; Morissette & Carbonetto, 1995; Kröger & Mann, 1996). Otras moléculas como el proteoglicano heparán-sulfato también están presentes en la lámina basal de la retina de embriones de pollo (Halfter, 1993) donde podrían desempeñar un papel en las uniones entre las células microgliales y la lámina basal.

Nuestras observaciones con MET y MEB demuestran con claridad que los lamelipodios y los somas de las células microgliales ameboides también se unen a la parte más vítrea de las prolongaciones radiales de las células de Müller, inmediatamente por encima de los pies terminales. Esto sugiere que los lamelipodios delanteros avanzarían en los canales de la retina hasta que se unen a una o varias prolongaciones radiales. Estas uniones célula-célula, junto con las uniones célula-lámina basal, harían que los precursores microgliales en migración se anclasen fuertemente al sustrato, permitiendo la posterior retracción del borde trasero.

Retracción del borde trasero

El mecanismo de retracción del borde trasero durante la locomoción de fibroblastos en cultivo ha sido estudiada detalladamente (Chen, 1981; Reger & Horwitz, 1992). En el presente estudio hemos hecho dos observaciones que sugieren la existencia de un mecanismo similar en las células microgliales ameboides polarizadas. Estas observaciones son: primero, la presencia de

prolongaciones filamentosas que proyectan desde algunos precursores microgliales en migración, y segundo, la existencia de algunos fragmentos de prolongaciones filamentosas que aparentemente se han roto y permanecen dispersas en el sustrato.

Las prolongaciones filamentosas pueden ser el resultado de la retracción de las prolongaciones celulares traseras que estarían fuertemente ancladas al sustrato. Esas fuertes uniones ofrecerían resistencia a la retracción, de manera que la parte trasera de la célula podría dar lugar a una fina prolongación filamentosas. La presencia ocasional de pequeños lamelipodios o estructuras en forma de maza en el extremo de algunas prolongaciones filamentosas parecen avalar esta interpretación. A este respecto, es interesante significar que las células microgliales en las láminas MLI/PTCM cultivadas *in vitro* retraen sus prolongaciones y lamelipodios y frecuentemente muestran prolongaciones filamentosas (resultados no mostrados), de forma parecida a lo observado *in situ*. En la microglía cultivada procedente de ratas recién nacidas también han sido descritas largas prolongaciones filamentosas (Giulian et al., 1995).

Una explicación alternativa sería que las prolongaciones filamentosas fueran puentes de citocinesis de precursores microgliales que acaban de dividirse. La evidencia de que las células microgliales ameboides puede dividirse por mitosis (capítulo II de esta tesis), así como la presencia de algunas prolongaciones filamentosas que conectan dos células microgliales adyacentes (Fig. I-11F), dan validez a esta interpretación. Las células hijas parecen reanudar su locomoción cuando todavía están unidas por un puente de citocinesis, de forma que si se mueven en sentidos opuestos, el puente se alargaría considerablemente, dando lugar a una prolongación filamentosas. Estas hipótesis no excluye a la anteriormente propuesta, de manera que algunas prolongaciones filamentosas podrían ser restos de prolongaciones traseras retraídas, mientras que otras serían puentes de citocinesis.

La presencia de fragmentos de prolongaciones filamentosas aislados en el sustrato podría ser explicada por un mecanismo similar al que tiene lugar en los fibroblastos que migran en cultivo. Conforme avanza la retracción, la cola del fibroblasto se rompe, dejando pequeños fragmentos unidos al sustrato (Bard & Hay, 1975; Chen, 1981). Por lo tanto, las prolongaciones filamentosas QH1-positivas que

se observan aisladas en la parte vítrea de la retina podrían ser fragmentos de la prolongación trasera de los precursores microgliales que están migrando.

Orientación de las células microgliales ameboides en proceso de migración

Como se ha discutido con anterioridad, las células microgliales ameboides monopolares y bipolares son células polarizadas que parecen estar en proceso de migración activa. Sin embargo, los precursores microgliales redondos y multipolares también son frecuentes en la retina en desarrollo. Las células QH1-positivas redondas son precursores microgliales que han detenido su migración para entrar en mitosis (capítulo II de esta tesis). Las células multipolares aparentemente no están en locomoción activa, ya que las mismas tienen diferentes procesos con lamelipodios que se localizan en diferentes canales flanqueados por prolongaciones radiales de células de Müller. Ello quiere decir que algunos de estos lamelipodios deben retraerse para que la célula pueda moverse a través de alguno de los canales. Por lo tanto, estos lamelipodios de las células multipolares podrían funcionar como aparatos de exploración del sustrato, capaces de reconocer señales que ayudarían a determinar la dirección del posterior movimiento de los precursores microgliales. En consecuencia, las células multipolares parecen estar en proceso de exploración del ambiente que las rodea para orientar su movimiento.

La fase de orientación probablemente precede a la de polarización y locomoción de los precursores microgliales y parece ser esencial para el movimiento direccional centro-periférico de la microglía ameboide de la retina embrionaria. Esto concuerda con la opinión de Van Duijn & Van Haastert (1992), que consideraban la locomoción y la orientación de las células que se mueven direccionalmente como dos componentes diferentes de la migración celular, cada uno controlado independientemente. El movimiento direccional de las células migratorias puede ser controlado por quimiotaxis o por gradientes adhesivos en el sustrato (Bershadsky & Vasiliev, 1988; Erickson, 1990). Así, los lamelipodios podrían controlar la orientación de las células microgliales ameboides de la retina embrionaria mediante la detección de concentraciones variables de ciertas moléculas en el ambiente.

Nuestras observaciones son compatibles con la participación de la inhibición por contacto (Bershadsky & Vasiliev, 1988; Bray, 1992) en los mecanismos de orientación de la microglía ameboide que migra tangencialmente en la retina. En

efecto, ocasionalmente se pueden ver contactos entre lamelipodios de células microgliales ameboides adyacentes, pero no se observa solapamiento de los lamelipodios, incluso cuando las células en migración están muy densamente dispuestas, como ocurre en la zona CNO de la retina. La polarización celular es más evidente en esta zona que en la zona FA (Fig. 13), donde los precursores microgliales se distribuyen más laxamente. Las células microgliales ameboides también muestran una alta polarización en zonas adyacentes a la cabeza del nervio óptico de la retina embrionaria humana (Diaz-Araya et al., 1995a,b). Esta intensa polarización celular podría explicarse suponiendo que la alta densidad de las células en migración favorece los contactos entre lamelipodios laterales, que rápidamente se retraerían, mientras que los lamelipodios generados en dirección centro-periférica se mantendrían, ayudando a mantener la orientación de las células en esta dirección. Esta explicación concuerda con el hecho de que la inhibición por contacto puede desembocar en la orientación paralela de las células que migran en cultivos con alta densidad celular (Bershadsky & Vasiliev, 1988).

Conducta migratoria de las células microgliales ameboides de la retina en desarrollo

Una observación interesante es la presencia en la retina embrionaria de células microgliales ameboides bipolares con forma de V, cuyo vértice puede apuntar hacia la periferia o hacia el centro de la retina. En ambos casos, estas células parecen estar girando 180° . Las células en V con su vértice apuntando hacia la periferia pueden ser células que están girando hacia el centro de la retina (Fig. 14). Esto es válido tanto si consideramos como bode delantero de la célula un brazo de la V, como consideramos el otro, ya que ambos están dirigidos hacia el centro de la retina. Por el contrario, los precursores microgliales en V con su vértice apuntando hacia el centro de la retina pueden considerarse como células que están girando hacia la periferia (Fig. 14). Por lo tanto, la presencia de células microgliales en V con orientaciones opuestas sugieren con fuerza que la microglía ameboide puede moverse hacia delante y hacia atrás en la retina en desarrollo. Este concepto también es apoyado por la presencia de células ameboides que tienen prolongaciones filamentosas dirigidas hacia el centro o hacia la periferia de la retina. Como se ha discutido con anterioridad, estos filamentos son con toda probabilidad

el resultado de la retracción de la parte trasera de las células microgliales. Además, la observación de precursores microgliales con prolongaciones filamentosas que describen una trayectoria curva que gira 180° es una evidencia más en apoyo de la existencia de una inversión de la dirección del movimiento de algunas células microgliales durante su migración.

Algunos precursores microgliales también parecen moverse lateralmente en la retina, cruzando a través de varios canales adyacentes (ver Figs. 2C y 12H). Este movimiento lateral permitiría a las células desplazarse de unos canales a otros (Fig. 14).

En conjunto, el movimiento de los precursores microgliales que entran en la retina embrionaria desde la zona de la cabeza del nervio óptico es centro-periférico (Pearson et al., 1993; Navascués et al., 1995; Diaz-Araya et al., 1995a,b). Sin embargo, cada célula microglial no va a seguir el camino más corto desde el centro a la periferia, sino que puede vagar transitoriamente hacia delante y hacia atrás hasta recuperar de nuevo su camino centro-periférico. Esta conducta es parecida a la descrita para las células que migran en un gradiente quimioatractivo (Yao et al., 1990; Bray, 1992). Todavía están por descubrir los mecanismos celulares y señales moleculares que participan en esta conducta migratoria de las células microgliales ameboides.

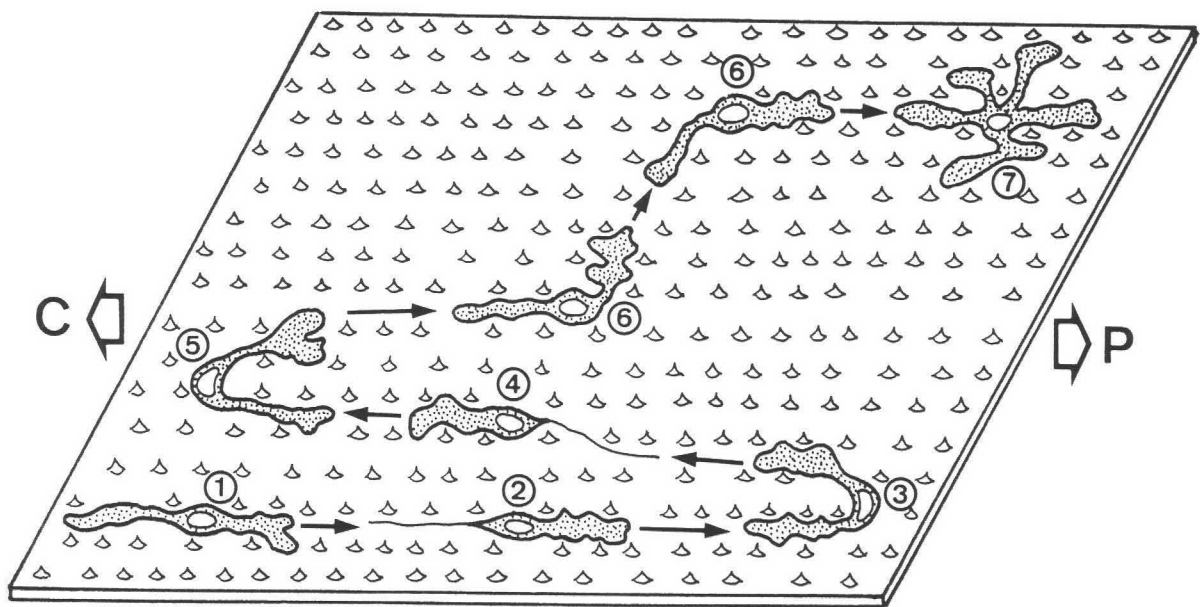


Fig. I-14. Dibujo esquemático de las diferentes fases del hipotético movimiento de una célula microglial amebode sobre una lámina MLI/PTCM, deducidas de nuestras observaciones en el presente estudio. La célula se mueve hacia delante (fases 1-3), hacia atrás (fases 3-5) y hacia los lados (fase 6) a lo largo de canales flanqueados por prolongaciones radiales de células de Müller (dibujadas como pequeños conos) y orientados desde el centro (C) hacia la periferia (P) de la retina. La célula pasa a ser multipolar (fase 7), preparándose para posteriores movimientos. La fase 3 muestra una célula en forma de V con su vértice apuntando hacia la periferia, representando que está girando 180° para cambiar el sentido de su migración. La fase 5, una célula en forma de V con su vértice apuntando hacia el centro, representa que la célula está cambiando de nuevo el sentido de su movimiento. La célula en forma de L de la fase 6 está experimentando un giro de 90° en su dirección.

REFERENCIAS

- Abercrombie, M., Heaysman, J.E.M., Pegrum, S.M. (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp. Cell Res.*, 59:393-398.
- Abd-El-Basset, A., Fedoroff, S. (1995) Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J. Neurosci. Res.*, 41:222-237.
- Ashwell, K. (1990) Microglia cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.*, 55:219-230.
- Bard, J.B.L., Hay, E.D. (1975) The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea: their morphology and movement in situ and in vitro. *J. Cell Biol.*, 67:400-418.
- Baron-Van Evercooren, A., Avellana-Adalid, V., Ben Younes-Chennoufi, A., Gansmüller, A., Nait-Oumesmar, B., Vignais, L. (1996) Cell-cell interactions during the migration of myelin-forming cells transplanted in the demyelinated spinal cord. *Glia*, 16:147-164.
- Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M. (1988) Cytoskeleton. Plenum Press, New York, 298 pp.
- Book, K.J., Howard, R., Morest, D.K. (1991) Direct observation in vitro of how neuroblasts migrate: medulla and cochleovestibular ganglion of the chick embryo. *Exp. Neurol.*, 111:228-243.
- Booth, P.L., Thomas, W.E. (1991) Evidence for motility and pinocytosis in ramified microglia in tissue culture. *Brain Res.*, 548:163-171.
- Boya, J., Calvo, J., Prado, A. (1979) The origin of microglial cells. *J. Anat.*, 129: 177-186.
- Boya, J., Calvo, J.L., Carbonell, A.L., Borregon, A. (1991) A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J. Anat.*, 175:229-236.
- Bray, D. (1992) *Cell Movements*. Garland Publishing, New York, 406 pp.
- Brockhaus, J., Möller, T., Kettenmann, H. (1996) Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia*, 16:81-90.
- Caggiano, A.O., Brunjes, P.C. (1993) Microglia and the developing olfactory bulb. *Neuroscience*, 52:717-724.

- Chan-Ling, T. (1994) Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina. *Progr. Ret. Eye Res.*, 13:357-389.
- Chen, W.T. (1981) Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J. Cell Biol.*, 90:187-200.
- Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S.G., Wilkinson, C.D.W. (1990) Topographical control of cell behaviour. II. Multiple grooved substrata. *Development*, 108:635-644.
- Cohen, J., Burne, J.F., McKinlay, C., Winter, J. (1987) The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. *Dev. Biol.*, 122:407-418.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Martín-Partido, G., Navascués, J. (1992) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci. Lett.*, 148:11-14.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Quesada, A., Navascués, J. (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J. Comp. Neurol.*, 348:207-224.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L. (1995a) Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina. *Glia*, 15:458-470.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., Billson, F.A. (1995b) Development of microglial topography in human retina. *J. Comp. Neurol.*, 363:53-68.
- Edmondson, J.C., Hatten, M.E. (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.*, 7:1928-1934.
- Erickson, C.A. (1990) Cell migration in the embryo and adult organism. *Curr. Op. Cell Biol.*, 2:67-74.
- Giulian, D., Li, J., Bartel, S., Broker, J., Li, X., Kirkpatrick, J.B. (1995) Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J. Neurosci.*, 15:7712-7726.
- Haapaniemi, H., Tomita, M., Tanahashi, N., Takeda, H., Yokoyama, M., Fukuuchi, Y. (1995) Non-amoeboid locomotion of cultured microglia obtained from newborn rat brain. *Neurosci. Lett.*, 193:121-124.
- Halfter, W. (1993) A heparan sulfate proteoglycan in developing avian axonal tracts. *J. Neurosci.*, 13:2863-2873.

- Halfter, W., Fua, C.S. (1987) Immunohistochemical localization of laminin, neural cell adhesion molecule, collagen type IV and T-61 antigen in the embryonic retina of the Japanese quail by in vivo injection of antibodies. *Cell Tissue Res.*, 249:487-496.
- Halfter, W., Reckhaus, W., Kröger, S. (1987) Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *J. Neurosci.*, 7:3712-3722.
- Halfter, W., Diamantis, I., Monard, D. (1988) Migratory behavior of cells on embryonic retina basal lamina. *Dev. Biol.*, 130:259-275.
- 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.*, 97:253-257.
- Ilshner, S., Brandt, R. (1996) The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia*, 18:129-140.
- Jankovski, A., Sotelo, C. (1996) Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J. Comp. Neurol.*, 371:376-396.
- Jordan, F.L., Thomas, W.E (1988) Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.*, 13:165-178.
- Kiernan, B.W., French-Constant, C. (1993) Oligodendrocyte precursor (O-2A progenitor cell) migration; a model system for the study of cell migration in the developing central nervous system. *Development*, Supplement:219-225.
- Kröger, S., Mann, S. (1996) Biochemical and functional characterization of basal-bound agrin in the chick central nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, 8:500-509.
- Leber, S.M., Sanes, J.R. (1995) Migratory paths of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *J. Neurosci.*, 15:1236-1248.
- Liesi, P. (1992) Neuronal migration on laminin involves neuronal contact formation followed by nuclear movement inside a preformed process. *Exp. Neurol.*, 117:103-113.
- Ling, E.A. (1976) Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. *J. Anat.*, 121:29-45.

- Ling, E.A. (1981) The origin and nature of microglia. En Fedoroff, S., Hertz, L. (eds), *Advances in Cellular Neurobiology, Vol. 2*. Academic Press, London, pp. 33-82.
- Ling, E.A., Penney, D., Leblond, C.P. (1980) Use of carbon labelling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the "amoeboid cells" present in the corpus callosum of postnatal rats. *J. Comp. Neurol.*, 193:631-657.
- Ling, E.A., Wong, W.C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7:9-18.
- Ling, T., Stone, J. (1988) The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Dev. Brain Res.*, 44:73-85.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264:1145-1148.
- Morissette, N., Carbonetto, S. (1995) Laminin a2 chain (M chain) is found within the pathway of avian and murine retinal projections. *J. Neurosci.*, 15:8067-8082.
- Moujahid, A., Navascués, J., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1996) Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat. Embryol.*, 193:131-144.
- Murabe, Y., Sano, Y. (1982) Morphological studies on neuroglia. VI. Postnatal development of microglial cells. *Cell Tiss. Res.*, 225:469-485.
- Navascués, J., Moujahid, A., Almendros, A., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.*, 354:209-228.
- Navascués, J., Cuadros, M.A., Almendros, A. (1996) Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En Ling, E.A., Tan, C.K., Tan, C.B.C (eds), *Topical Issues in Microglial Research*. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 43-64.
- Orentas, D.M., Miller, R.H. (1996) A novel form of migration of glial precursors. *Glia*, 16:27-39.
- O'Rourke, N.A., Sullivan, D.P., Kaznowski, C.E., Jacobs, A.A., McConnell, S.K. (1995) Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development*, 121:2165-2176.

- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lièvre, F., Buck, C.A. (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100:339-349.
- Pearson, H.E., Payne, B.R., Cunningham, T.J. (1993) Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. *Dev. Brain Res.*, 76:249-255.
- Perry, V.H., Hume, D.A., Gordon, S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15:313-326.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 11:273-277.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 125:203-244.
- 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.
- Rakic, P. (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46:882-891.
- Rakic, P., Knyihar-Csillik, E., Csillik, B. (1996) Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9218-9222.
- Regen, C.M., Horwitz, A.F. (1992) Dynamics of β_1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 119:1347-1359.
- Rio-Hortega, P. (1932) Microglia. En Penfield, W. (ed), *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, Vol. 2. Paul B. Hoeber, New York, pp. 481-534.
- Schnitzer, J. (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 282:249-263.
- Small, R.K., Riddle, P., Noble, M. (1987) Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature*, 328:155-157.
- Spence, S.G., Robson, J.A. (1989) An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*, 32:801-812.

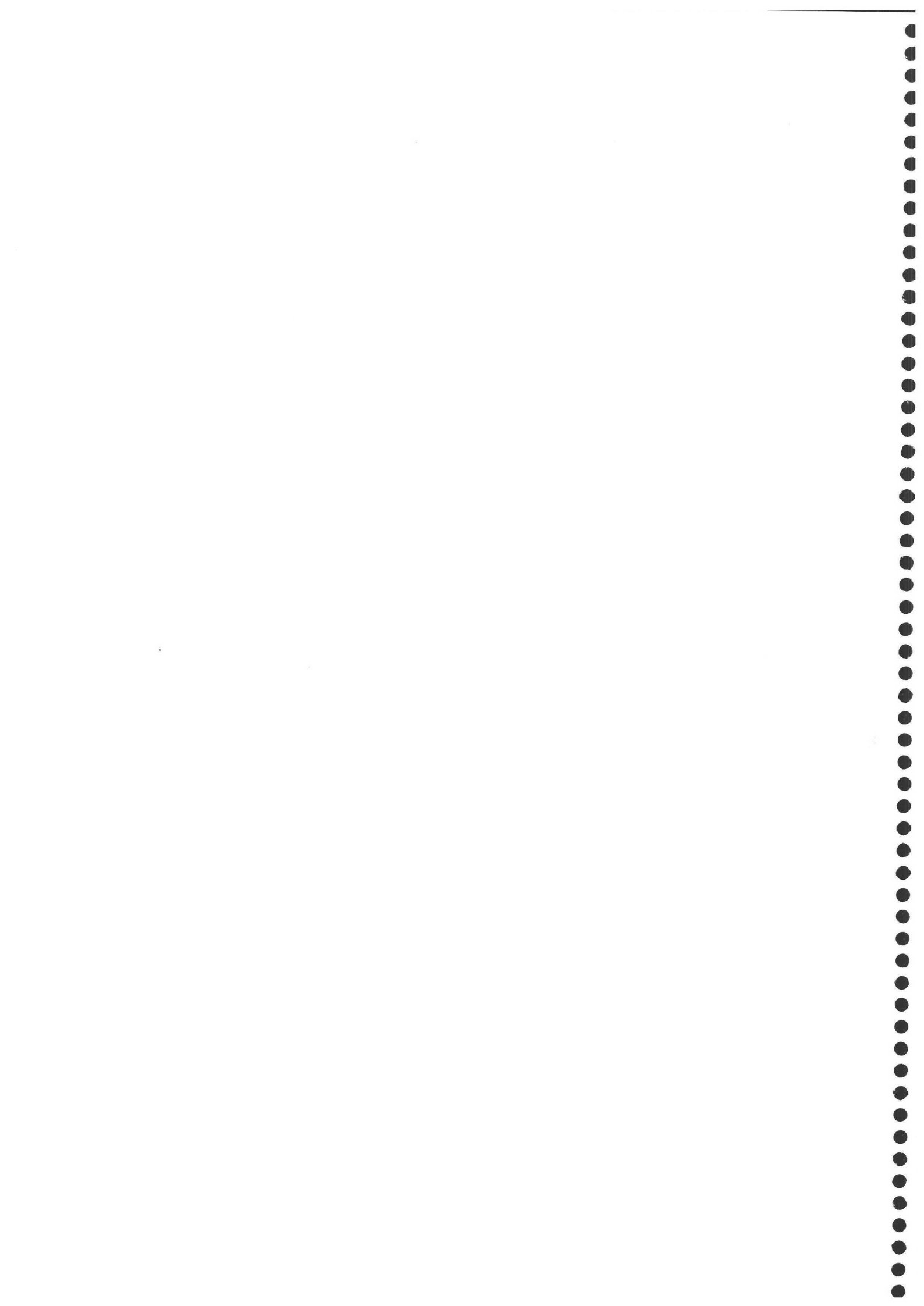
- Suburo, A., Carri, N., Adler, R. (1979) The environment of axonal migration in the developing chick retina: a scanning electron microscopic (SEM) study. *J. Comp. Neurol.*, 184:519-536.
- Theele, D.P., Streit, W.J. (1993) A chronicle of microglial ontogeny. *Glia*, 7:5-8.
- Thomas, W.E. (1990) Characterization of the dynamic nature of microglial cells. *Brain Res. Bull.*, 25:351-354.
- Thomas, W.E. (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Rev.*, 17:61-74.
- Van Duijn, B., Van Haastert, P.J.M. (1992) Independent control of locomotion and orientation during *Dictyostelium discoideum* chemotaxis. *J. Cell Sci.*, 102:763-768.
- Wakakura, M., Foulds, W.S. (1989) Laminin expressed by cultured Müller cells stimulates growth of retinal neurites. *Exp. Eye Res.*, 48:577-582.
- Ward, S.A., Ransom, P.A., Booth, P.L., Thomas, W.E. (1991) Characterization of ramified microglia in tissue culture: pinocytosis and motility. *J. Neurosci. Res.*, 29:13-28.
- Watanabe, T., Raff, M.C. (1988) Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature*, 332:834-837.
- Webb, A., Clark, P., Skepper, J., Compston, A., Wood, A. (1995) Guidance of oligodendrocytes and their progenitors by substratum. *J. Cell Sci.*, 108:2747-2760.
- Wolswijk, G. (1995) Strongly G_{D3}^+ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. *Glia*, 13:13-26.
- Wu, C.H., Wen, C.Y., Shieh, J.Y., Ling, E.A. (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol.*, 23:258-269.
- Yao, J., Harvath, L., Gilbert, D.L., Colton, C.A. (1990) Chemotaxis by a CNS macrophage, the microglia. *J. Neurosci. Res.*, 27:36-42.





CAPÍTULO II

PROLIFERACIÓN DE LA MICROGLÍA AMEBOIDE EN PROCESO DE MIGRACIÓN



RESUMEN

Se han utilizado láminas que contienen la membrana limitante interna cubierta por una alfombra de pies terminales de células de Müller obtenidas a partir de retinas embrionarias de codorniz para demostrar que las células microgliales ameboides que están migrando tangencialmente en la parte vítrea de la retina sufren mitosis. El doble marcaje con anti- β -tubulina/QH1 o con Hoechst 33342/QH1 ponía de manifiesto que algunas células microgliales con caracteres morfológicos típicos de migración activa estaban en profase temprana. En anafase y telofase temprana, las células microgliales habían retraído sus lamelipodios y eran de forma ovoide. En telofase más avanzada, pero bastante antes de que se completase la citocinesis, las dos células hijas volvían a emitir lamelipodios, recuperando así la morfología típica de las células que están en migración. De nuestros resultados concluimos que las células microgliales ameboides muestran ciclos en los que alternan migración y mitosis, de manera que ambos mecanismos contribuyen a la diseminación de la microglía por toda la extensión de la retina embrionaria. El huso mitótico de las células microgliales en división mostraba orientaciones variables, que probablemente influían en la dirección seguida por las células hijas durante su posterior migración. Todas las células microgliales ameboides que estaban migrando tangencialmente tenían capacidad proliferativa, como se deducía de la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) en su núcleo. Se observaban diferentes patrones de inmunotinción de PCNA, que demostraban que las células microgliales ameboides estaban en diferentes fases del ciclo celular.

INTRODUCCIÓN

La microglía ameboide está constituida por precursores de células microgliales que se diferenciarán para dar lugar a la microglía ramificada del sistema nervioso central (SNC) del adulto (Perry & Gordon, 1991; Thomas, 1992; Leong & Ling, 1992; Ling & Wong, 1993; Hurley & Streit, 1996). A su vez, la microglía ramificada se activa y da lugar a la microglía reactiva, en respuesta a agresiones cerebrales o enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Streit et al., 1988; Gehrmann et al., 1995). La potencialidad proliferativa parece ser característica de la microglía. Así, la microglía ramificada prolifera en el SNC adulto con una velocidad de proliferación muy baja (Perry & Gordon, 1991; Lawson et al., 1992; Perry & Lawson, 1992), que se incrementa espectacularmente tras la activación microglial (Streit et al., 1988; Gehrmann et al., 1995). La actividad proliferativa de la microglía ameboide también tiene lugar durante el desarrollo normal del SNC de vertebrados (Ling, 1981; Ling & Wong, 1993), como se desprende de la descripción de células microgliales ameboides en mitosis (Ling & Tan, 1974; Kaur & Ling, 1991; Wu et al., 1996) y de estudios autorradiográficos (Imamoto & Leblond, 1978; Kitamura et al., 1984) en el cuerpo calloso de ratas durante el desarrollo postnatal.

Frecuentemente, se han usado estrategias experimentales que utilizan cultivos de microglía ameboide para estudiar los factores que controlan la proliferación microglial (Giulian & Baker, 1986; Giulian & Ingemann, 1988; Suzumura et al., 1990; Lee et al., 1994; Suzumura and Sawada, 1996). Sin embargo, la microglía en cultivo adquiere caracteres típicos de la microglía activada *in situ* (Slepko & Levi, 1996), tales como la estimulación de la proliferación celular. Por lo tanto, los estudios *in vitro* no son totalmente fiables para investigar la proliferación de la microglía ameboide durante la ontogenia microglial, siendo más adecuados los estudios *in situ*.

Estudios en aves en desarrollo han demostrado que la mayoría de los precursores microgliales entran desde las meninges atravesando la superficie pial (Navascués et al., 1996). Una vez dentro del SNC, los precursores microgliales

adquieran caracteres de microglía ameboide y migran largas distancias antes de alcanzar los lugares donde se diferencian (Schnitzer, 1989; Cuadros et al., 1994, 1997; Navascués et al., 1995). En el presente capítulo nos hemos planteado la siguiente pregunta: ¿prolifera los precursores microgliales mientras están migrando dentro del SNC? La retina embrionaria de codorniz es un modelo adecuado para responder a esta pregunta, ya que la microglía ameboide migra tangencialmente en la parte más vítrea de la misma para conseguir dispersarse centro-periféricamente en la superficie retiniana (Navascués et al., 1995; capítulo I de la presente tesis). Más tarde, la microglía ameboide migra radialmente y alcanza las capas plexiformes de la retina, en donde los precursores microgliales se diferencian para dar lugar a la microglía ramificada (Navascués et al., 1995). La mayoría de las células microgliales migran tangencialmente en la retina embrionaria de codorniz mediante adhesión sobre los pies terminales de las células de Müller, lo que ha permitido aislar dichas células sobre láminas que contienen la membrana limitante interna (lámina basal) cubierta por una fina capa de pies terminales de células de Müller (láminas MLI/PTCM). La utilización de estas láminas ha facilitado el estudio del mecanismo de migración de las células microgliales ameboides de la retina (ver capítulo I), puesto que pueden ser tratadas como si fuesen cultivos de células.

En este apartado de nuestro trabajo, hemos utilizado estas láminas para comprobar la presencia de células en división en la población de células microgliales ameboides que están migrando tangencialmente, demostrando que la microglía ameboide prolifera durante el proceso de diseminación tangencial en la retina embrionaria de codorniz.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de 9-11 días de incubación (E9-E11). En estas etapas del desarrollo, toda la superficie vítrea (en E11) o una gran proporción de ella (en E9 y E10) contiene precursores microgliales que están migrando tangencialmente, mientras que la migración radial de los mismos hacia las capas plexiformes está tan solo comenzando.

Immunocitoquímica con QH1 en montajes totales de retina

Los montajes totales de retina se prepararon como en trabajos anteriores (Navascués et al., 1995; capítulo I de esta tesis). Posteriormente se trataron inmunocitoquímicamente con el anticuerpo monoclonal QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), que reconoce células de linaje hemangioblástico de codorniz con la excepción de eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987) y todas las fases del desarrollo de las células microgliales de codorniz (Cuadros et al., 1992). Como anticuerpo secundario se utilizó una anti-IgG de ratón biotinilada (Sigma, St. Louis, MO) y para su visualización se empleó el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Extravidin, Sigma) revelado con diaminobenzidina. El procedimiento técnico ha sido detallado en el capítulo I.

Preparación de láminas MLI/PTCM

El ojo era rápidamente disecado en solución salina balanceada de Hanks, y la retina era aislada mediante eliminación de la córnea, cristalino, cuerpo ciliar, esclera, coroides, epitelio pigmentario y cuerpo vítreo. La retina se extendía sobre un porta haciendo incisiones radiales desde la periferia hacia el centro, y se eliminaban el pecten y el nervio óptico. A partir de retinas aisladas se obtenían pequeñas piezas cuadradas de aproximadamente 5 x 5 mm cuya superficie vítrea era desprendida mediante rotura mecánica de la pieza de retina montada entre dos substratos adhesivos, según el método de Halfter et al. (1987) con ligeras modificaciones como se ha descrito previamente (capítulo I de la presente tesis).

Resumidamente, las piezas de retina eran montadas sobre un filtro de nitrocelulosa y fijadas durante 1 minuto en paraformaldehido 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0.1M (para inmunofluorescencia) o en una mezcla de glutaraldehido 2% y paraformaldehido 1% en tampón cacodilato 0.1M (para microscopía electrónica). Un cubreobjetos revestido de poli-L-lisina era colocado sobre la pieza de retina adherida sobre el filtro de nitrocelulosa, con la precaución de que la cara vítrea de la retina contactara con la superficie revestida de poli-L-lisina. Transcurridos 3-4 minutos, el conjunto retina-filtro era desprendido del cubreobjetos revestido de poli-L-lisina. Tras esta acción, una delgada lámina MLI/PTCM que contenía precursores microgliales quedaba adherida a la superficie revestida de poli-L-lisina.

Doble inmunofluorescencia de láminas MLI/PTCM

Se utilizó doble inmunofluorescencia con anti- β -tubulina monoclonal (Sigma) y QH1 en láminas MLI/PTCM con objeto de marcar tanto la microglía ameboides en proceso de migración como los microtúbulos de las células, incluidos los del huso mitótico de las células en división. Las láminas MLI/PTCM se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en paraformaldehido 4% en tampón citoesqueleto (HEPES 30 mM, EGTA 10 mM, EDTA 0,5 mM, $MgSO_4$ 5mM, acetato potásico 33 mM, y PEG400 7%). Seguidamente, se lavaron tres veces en tampón citoesqueleto y se permeabilizaron durante 2 minutos a temperatura ambiente en paraformaldehido 1% en tampón citoesqueleto con Triton X-100 0,5%. Las láminas se lavaron en tampón citoesqueleto, se postfijaron durante 5 minutos en paraformaldehido 4% en tampón citoesqueleto, se lavaron de nuevo, y se mantuvieron durante 45 minutos en suero normal de cabra diluído 1:30 en PBS con albúmina de suero bovino 1% (PBS-BSA). A continuación, las láminas MLI/PTCM se incubaron durante 1 hora en anti- β -tubulina diluída 1:100 en PBS-BSA, se lavaron en PBS, y se sumergieron durante 1 hora en anti-IgG de ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) diluída 1:50 en PBS-BSA. Las muestras se lavaron en PBS, se bañaron durante 1 hora en suero normal de cabra diluído en PBS-BSA, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en

sobrenadante de QH1 diluído 1:2 en PBS-BSA, y se lavaron en PBS. Finalmente se incubaron durante 1 hora en anti-IgG de ratón conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma) diluída 1:50 en PBS-BSA, se lavaron en PBS y se montaron con glicerol-PBS con dihidrocloruro de para-fenilendiamina 0,1%. Las observaciones de inmunofluorescencia se llevaron a cabo con un microscopio Zeiss Axiophot.

Algunas láminas MLI/PTCM también fueron doblemente marcadas con Hoechst 33342 (Sigma) y QH1, con el objetivo de poner de manifiesto el aspecto de la cromatina en las células microgliales ameboides. Para ello, las láminas se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído 4% en PBS 0,1M, se permeabilizaron durante 15 minutos a -20°C en etanol/ácido acético (19:1 vol/vol), se lavaron tres veces en PBS, y se incubaron en Hoechst diluído en PBS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las láminas MLI/PTCM se lavaron abundantemente en PBS y se procesaron para la inmunofluorescencia con QH1 siguiendo el protocolo descrito para la doble inmunofluorescencia anti- β -tubulina/QH1.

También se utilizó doble inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal contra el antígeno nuclear de células proliferantes (anti-PCNA, Sigma) y con QH1 para determinar si este antígeno, que denota la existencia de proliferación celular, se expresaba en la microglía ameboides. Las láminas se fijaron durante 90 segundos a 4°C en paraformaldehído 1% en PBS 0,1M, se trataron durante 10 minutos a -20°C con metanol, y se dejaron en PBS a 4°C . Las células microgliales de las láminas se permeabilizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en PBS con Triton-X-100 0.1% y se bloquearon durante 1 hora con suero normal de cabra diluído 1:30 en PBS-BSA. A continuación, las láminas MLI/PTCM se incubaron durante una noche a 4°C en anti-PCNA diluído 1:70 en PBS-BSA, se lavaron en PBS y se incubaron durante 12 horas a temperatura ambiente en anti-IgG de ratón conjugada con FITC diluída 1:50 en PBS-BSA. Las muestras se lavaron seguidamente en PBS y se procesaron para inmunofluorescencia con QH1 según el protocolo descrito para la doble inmunofluorescencia anti- β -tubulina/QH1, con la salvedad de que la incubación en QH1 se alargó hasta 24 horas a 4°C y la incubación en anti-IgG de ratón conjugada con TRITC se redujo a 15 minutos.

Microscopía electrónica de las láminas MLI/PTCM

Se utilizó microscopía electrónica tanto de barrido (MEB) como de transmisión (MET) para examinar las láminas MLI/PTCM. Para MEB, las láminas MLI/PTCM adheridas sobre vidrio se fijaron durante 30 minutos en glutaraldehído 2%, paraformaldehído 1% en tampón cacodilato 0,1M (pH 7,4), se postfijaron durante 1 hora en tetróxido de osmio 1%, se deshidrataron en soluciones de acetona gradualmente más concentradas, se secaron mediante el método del punto crítico, se revistieron con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM950.

Para MET, las láminas MLI/PTCM se obtuvieron tal como se ha descrito con anterioridad, pero se adhirieron a pequeñas piezas de placas de petri de plástico revestidas de poli-L-lisina en vez de hacerlo sobre cubreobjetos de vidrio. Las láminas MLI/PTCM adheridas sobre plástico se fijaron durante 2 horas en el mismo fijador usado para MEB, se lavaron durante una noche en tampón cacodilato, se postfijaron en tetróxido de osmio 2%, se tiñeron con acetato de uranilo 1%, se deshidrataron en soluciones de etanol gradualmente más concentradas, y se incluyeron en Epon. Se cortaron secciones ultrafinas paralelas a la superficie del plástico, obteniendo de esta forma secciones de la lámina MLI/PTCM en un plano tangencial a la superficie vítrea de la retina. Las secciones fueron teñidas con citrato de plomo y examinadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM10C.

RESULTADOS

Mitosis en células microgliales ameboides que muestran morfología de células en proceso de migración

Con contraste de fase, la mayoría de las células microgliales ameboides que migran tangencialmente sobre los pies terminales de las células de Müller mostraban una morfología alargada, con prolongaciones que surgían de los polos celulares. Sin embargo, unas pocas células eran ovoides y carecían de prolongaciones celulares, al tiempo que eran considerablemente más brillantes que las restantes células microgliales (Fig. II-1A). El brillo en contraste de fase indicaba que estas células se habían redondeado y sobresalían por encima de la superficie de la lámina, como es característico de las células en división sobre un substrato bidimensional. Algunas células brillantes estaban divididas en dos mitades mediante un surco central (Fig. II-1B), lo que sugería que estaban en proceso de citocinesis.

La presencia de células en división sobre las láminas MLI/PTCM se confirmó con MET, observándose células en profase (Fig. II-1C), metafase y telofase. El citoplasma de estas células mitóticas contenía muchas vesículas claras y gránulos densos característicos de los precursores microgliales que migran tangencialmente en la retina embrionaria de codorniz (capítulo I de esta tesis). De forma similar a lo observado con contraste de fase sobre láminas MLI/PTCM, en montajes totales de retina inmunomarcados con QH1 había algunas células QH1-positivas (QH1+) de morfología ovoide con (Fig. II-1D) o sin (Fig. II-1E) un surco central. Estas observaciones ponían de manifiesto que las células en división eran precursores microgliales. La proporción de células mitóticas era baja en relación con las mucho más abundantes células QH1+ alargadas con prolongaciones y lamelipodios.

El doble marcaje Hoechst/QH1 en láminas MLI/PTCM permitió relacionar la fase mitótica de los precursores microgliales en división y su correspondiente morfología celular (Fig. II-2). En las láminas MLI/PTCM había muchas células QH1+ de forma alargada bipolar con lamelipodios (Fig. II-2A). Este tipo de morfología, que es característica de células que están migrando activamente (capítulo I de esta

tesis), generalmente eran células interfásicas (Fig. II-2B). Sin embargo, unas pocas células con este aspecto contenían un núcleo con cromatina en forma de grumos que se teñía más intensamente con Hoechst que la cromatina de los núcleos interfásicos (Fig. II-2C,D), revelando que eran células que habían entrado en profase. Algunas células QH1+ en profase eran más cortas que estas últimas y también mostraban lamelipodios (Fig. II-2E,F). Las células QH1+ en metafase tenían una morfología similar a las células profásicas cortas (Fig. II-2G,H), en tanto que en anafase o telofase temprana se hacían ovoides mediante la retracción de sus lamelipodios (Fig. II-2I,J). Las células QH1+ en telofase tardía mostraban dos células hijas unidas mediante un puente de citocinesis (Fig. 2K,L) y se podían ver algunos lamelipodios que surgían desde ambas células hijas. En resumen, estas secuencia de acontecimientos revelaba que los precursores microgliales de la retina embrionaria entraban en profase cuando aún estaban migrando. Seguidamente disminuían su longitud y retraían progresivamente sus lamelipodios hasta hacerse ovoides durante anafase y telofase temprana.

A partir de las observaciones efectuadas en láminas MLI/PTCM con doble inmunomarcaje anti- β -tubulina/QH1 (Fig. II-3) se obtuvieron conclusiones similares. Las células QH1+ con huso mitótico típico de prometafase tenían numerosos lamelipodios que surgían del cuerpo celular (Fig. II-3A-C), mientras que las que tenían huso mitótico característico de metafase o anafase tendían a ser ovoides con algún pequeño lamelipodio (Fig. II-3D-F). Las células QH1+ con huso mitótico típico de telofase temprana habían perdido por completo sus lamelipodios y eran de morfología ovoide (Fig. II-3H-I).

Caracteres morfológicos de las células microgliales ameboides en citocinesis

Las observaciones efectuadas sobre láminas MLI/PTCM con doble marcaje Hoechst/QH1, así como las llevadas a cabo con MEB, pusieron de manifiesto que las células microgliales ameboides en división recuperaban la morfología de células que migran activamente antes de que completaran la reorganización de la cromatina en las células hijas y la citocinesis. Con MEB, las células telofásicas tempranas se identificaban por su forma ovoide con un incipiente surco de

segmentación (Fig. II-4A,B) que indicaba el comienzo de la citocinesis. En esta fase de la división, los precursores microgliales solo mostraban algunos lamelipodios de poca extensión. Conforme avanzaba la telofase, las células hijas se alargaban progresivamente y llegaba a identificarse un delgado puente de citocinesis que unía a las dos células hijas (Fig. II-4C,D). En esta etapa de telofase tardía varios lamelipodios relativamente extensos habían emergido de la superficie de ambas células hijas (Figs. II-2H y II-4D). Esto indicaba que el aparato locomotor de las células se reconstituía inmediatamente después del comienzo de la citocinesis.

En montajes totales de retina se observaban parejas de células microgliales ameboides QH1+ que estaban unidas mediante un delgado filamento de longitud variable (Fig. II-4E). Estas parejas de células parecían ser células hijas procedentes de la división de una célula progenitora y mostraban lamelipodios similares a los presentes en células alargadas que estaban en migración. Estas observaciones implicaban que el puente de citocinesis unía a las dos células hijas durante un cierto tiempo, durante el cual estas células probablemente se movían en sentido opuesto, contribuyendo a la rotura del puente.

En ocasiones, el soma de una célula hija de una pareja formaba un ángulo agudo con el puente de citocinesis (Fig. II-4F) y parecía estar girando 180° para conseguir migrar en el mismo sentido que la otra célula hija.

Variaciones de la orientación y distribución topográfica de las células microgliales ameboides en división

La orientación de las células microgliales ameboides en división era variable. Con mayor frecuencia, su huso mitótico estaba orientado paralelamente a la superficie retiniana (Figs. II-2I-L y II-3) y esta orientación ha sido denominada tangencial. Las células mitóticas con orientación tangencial mostraban, a su vez, dos orientaciones diferentes en relación con los canales flanqueados por hileras de procesos radiales de células de Müller. Estos canales tienen una dirección centro-periférica, idéntica a la de los fascículos de axones ópticos que discurren sobre ellos en la retina intacta. La mayoría de las células mitóticas con orientación tangencial mostraban un surco de segmentación perpendicular a la dirección de los

canales (Fig. II-1B), indicando que su huso estaba orientado paralelamente a dichos canales. Raramente, aunque se podían observar algunas, las células mitóticas orientadas tangencialmente tenían un surco de segmentación paralelo a los canales (Fig. II-1A), es decir su huso era perpendicular a éstos.

En las láminas MLI/PTCM también se podían observar algunas células mitóticas orientadas radialmente, cuyo huso estaba orientado perpendicularmente a la superficie retiniana, tal como se podía apreciar con doble marcaje anti- β -tubulina/QH1. En láminas con doble marcaje Hoechst/QH1, las telofases radiales mostraban los núcleos hijos en proceso de reorganización en diferentes planos de foco, indicando que estaban orientados perpendicularmente al plano de la lámina, y por lo tanto de la superficie retiniana.

Las observaciones efectuadas en montajes totales de retina mostraban que la distribución topográfica de los precursores microgliales en mitosis era variable. Algunas retinas tenían un número relativamente elevado de células mitóticas QH1+, como se podía deducir de la presencia de células ovoides carentes de lamelipodios (Fig. II-1E), mientras que otras retinas tenían muy pocas células mitóticas QH1+. Además, en retinas con muchos precursores microgliales mitóticos, éstos no se distribuían homogéneamente a través de la retina, sino que normalmente estaban más concentrados en ciertas áreas retinianas y casi ausentes en otras.

Marcaje con anti-PCNA de células microgliales ameboides en migración

En láminas MLI/PTCM con doble marcaje anti-PCNA/QH1, todas las células QH1+ eran también PCNA-positivas (Fig. II-5A,B). Puesto que el PCNA es una proteína asociada con la replicación del DNA que solo se expresa en células que proliferan, la expresión de PCNA en todos los precursores microgliales que migran tangencialmente en la parte vítrea de la retina embrionaria implicaba que toda la población de estas células era proliferativa, es decir ninguna célula había escapado del ciclo celular mientras estaba migrando. El marcaje con PCNA se observaba principalmente en el núcleo de los precursores microgliales (Fig. II-5B,D) aunque un interesante y débil marcaje también se podía detectar en el citoplasma de algunas células QH1+ (Fig. II-5C,D).

En los núcleos PCNA-positivos de los precursores microgliales en migración se identificaban diferentes modelos de inmunotinción (Fig. II-6). En muchos núcleos microgliales el marcaje era muy intenso (Fig. II-6B-G) mientras que en otros era más débil. En estos últimos, se observaban áreas PCNA-negativas que se intercalaban entre las zonas de cromatina débilmente marcadas (Fig. II-6A). En otros núcleos microgliales se identificaba un patrón de inmunomarcaje similar a éste pero mucho más intensamente fluorescente (Fig. II-6B). Las áreas PCNA-negativas en estos núcleos eran redondas u ovoides, similares a los nucleolos PCNA-negativos descritos en otros tipos celulares (Bravo, 1986; Humbert et al., 1992), mientras que las zonas de cromatina PCNA-positivas estaban homogéneamente inmunoteñidas. En otros núcleos, estas zonas PCNA-positivas se observaban moteadas con pequeños grumos más intensamente fluorescentes (Fig. II-6C,D), mientras que las áreas PCNA-negativas similares a nucleolos desaparecían progresivamente. Otras células microgliales ameboides mostraban núcleos con una expresión de PCNA difusa y un grumo central intensamente fluorescente (Fig. II-6E) que parecía tener una localización nucleolar (Celis & Celis, 1985). Otros núcleos microgliales PCNA fuertemente positivos mostraban un patrón puntiforme, con muchos puntos intensamente positivos de tamaño variable distribuidos sobre un fondo PCNA-negativo (Fig. II-6F,G). Las células mitóticas eran PCNA-positivas, aunque el marcaje era citoplasmático, mientras que las masas cromosómicas eran PCNA-negativas (Fig. II-6H).



Fig. II-1. Células microgliales ameboides mitóticas en la parte vítrea de la retina de embriones de codorniz de E10, tal como se observan con contraste de fase (**A, B**), MET (**C**) e inmunocitoquímica con QH1 (**D, E**). **A, B:** Láminas MLI/PTCM que muestran hileras de procesos radiales de células de Müller que se han quebrado al obtener las láminas. Estas hileras flanquean canales en los que se adhieren células microgliales ameboides. Las células en división (flechas) son mucho más brillantes que las células no mitóticas que son alargadas bipolares y están en proceso de migración. Las parejas de células ovoides brillantes están en citocinesis y muestran un surco de segmentación que es paralelo (flecha en la parte superior de **A**) o perpendicular (flecha en **B**) a la dirección de los canales. **C:** Sección ultrafina de una lámina MLI/PTCM en la que se observa una célula microglial ameboide en profase. Su citoplasma contiene numerosas vesículas claras y gránulos densos, como es característico de la microglía. **D, E:** Montajes totales de retina tratados con inmunocitoquímica QH1. La célula ovoide QH1+ (flecha en **E**) y la pareja de células QH1+ con un surco de segmentación (flecha en **D**) son similares a las observadas en las láminas MLI/PTCM con contraste de fase. Barra de escala: 60 μm para **A** y **B**; 1,5 μm para **C**; 40 μm para **D** y **E**.

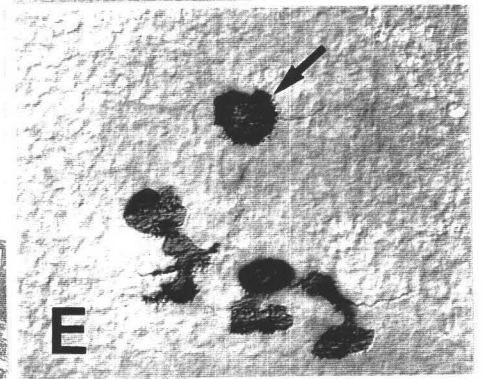
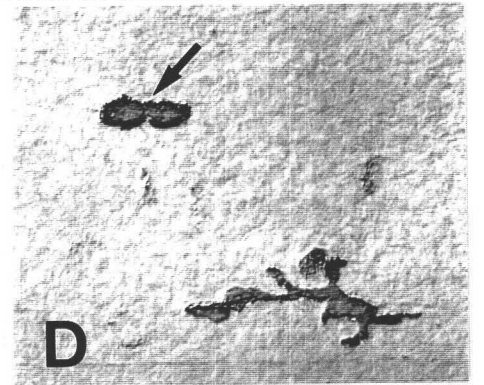
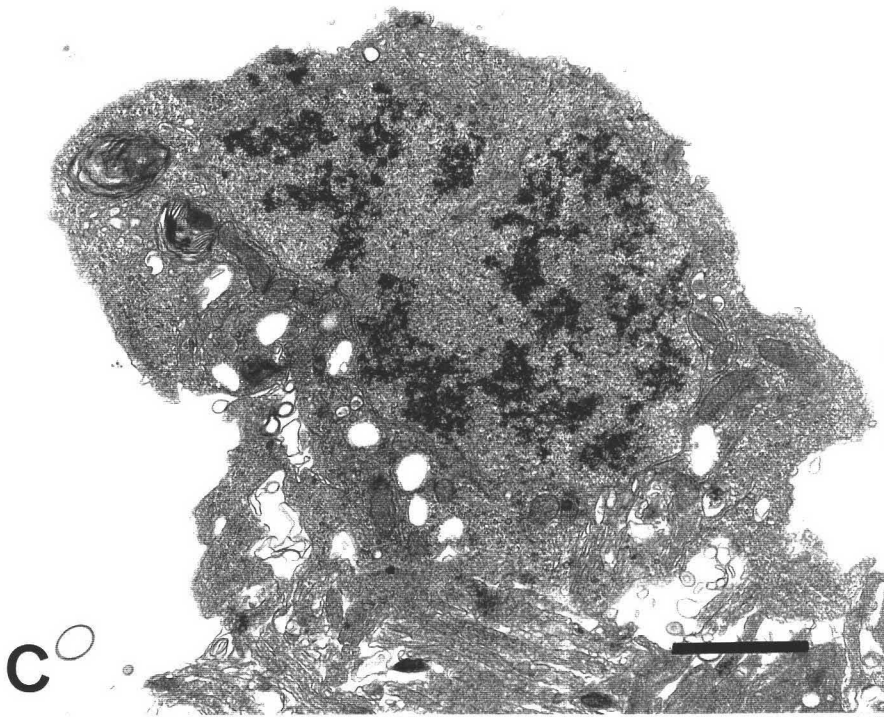
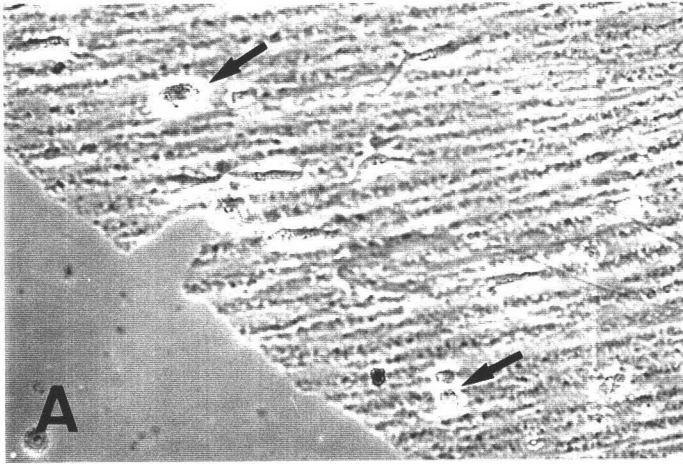


Fig. II-2. Morfologías de células microgliales ameboides en diferentes fases de la mitosis observadas en láminas MLI/PTCM con doble marcaje Hoechst/QH1. La morfología celular puesta de manifiesto mediante inmunomarcaje de superficie con QH1 (columna izquierda) se emparejan con el aspecto del material cromosómico de las mismas células mostrado mediante tinción fluorescente con Hoechst (columna derecha). **A, B:** Célula microglial alargada bipolar en interfase. El núcleo interfásico es moderadamente fluorescente. **C, D:** Célula microglial alargada bipolar en profase temprana, como se deduce de la presencia del núcleo intensamente fluorescente, con cromatina que tiende a formar grumos. **E, F:** Célula microglial en profase más avanzada, con los cromosomas intensamente fluorescentes y claramente visibles en el interior del núcleo. Esta célula no es bipolar, aunque posee lamelipodios. A la derecha se ven dos células interfásicas. **G, H:** Célula microglial con sus cromosomas dispuestos en la placa metafásica. Los lamelipodios todavía están presentes, aunque son poco extensos. **I, J:** Célula microglial en telofase temprana con morfología ovoide sin lamelipodios. **K, L:** Pareja de células microgliales hijas en telofase tardía. Se observa el puente de citocinesis (flecha) y varios lamelipodios que se extienden desde ambas células hijas. Barra de escala: 20 μm .

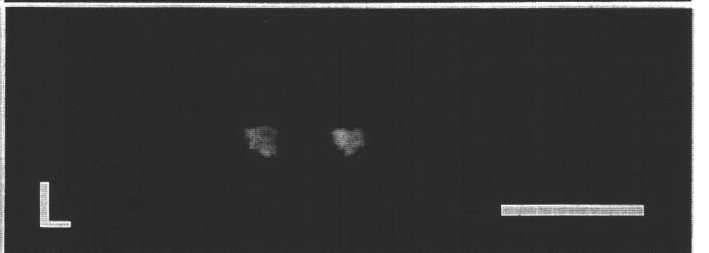
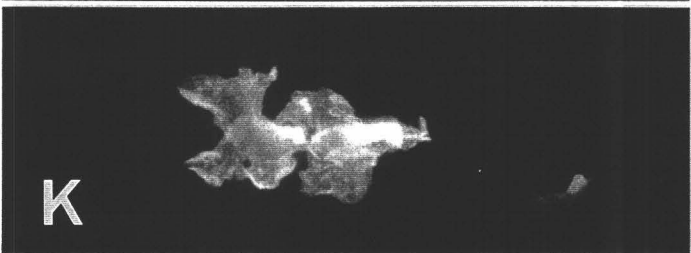
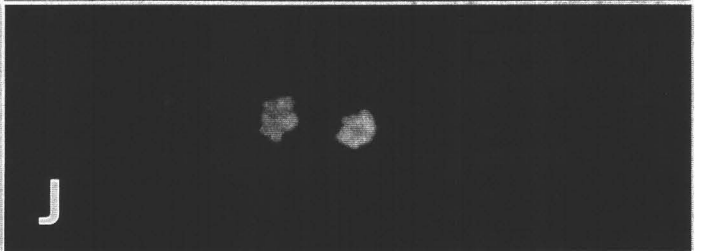
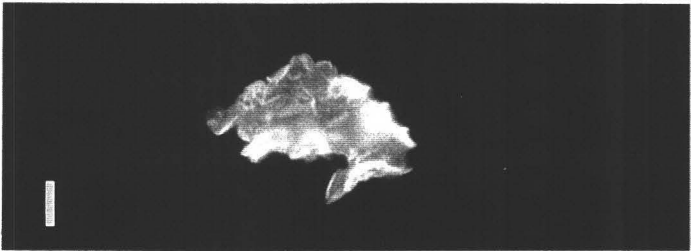
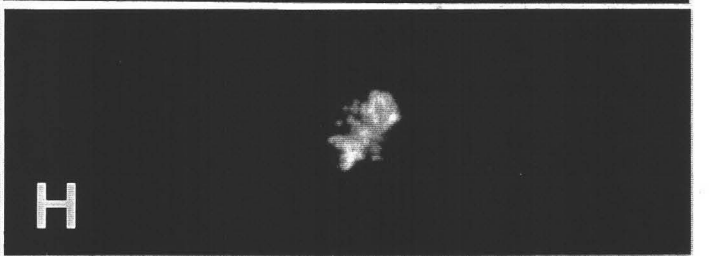
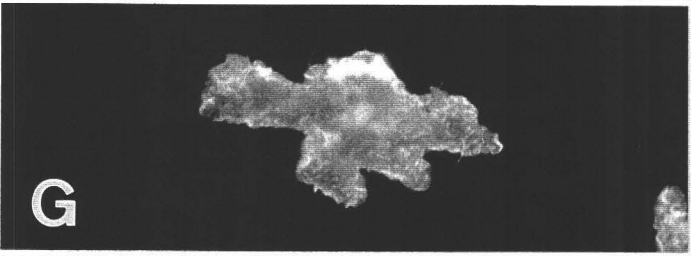
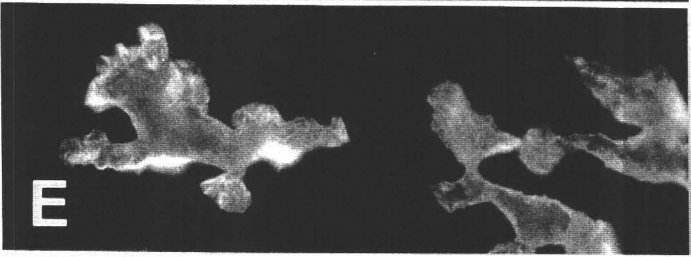
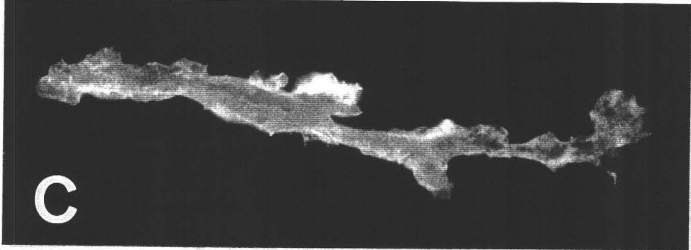
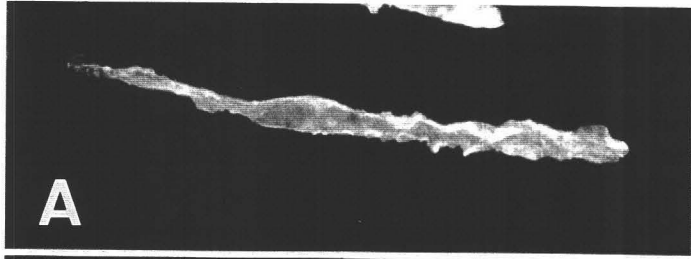


Fig. II-3. Morfología de células microgliales ameboides en diferentes fases de la mitosis observadas en láminas MLI/PTCM con doble inmunomarcaje anti- β -tubulina/QH1. La morfología de las células es puesta de manifiesto mediante inmunomarcaje con QH1 (columna izquierda), mientras que el aspecto del huso mitótico de las mismas células es mostrado mediante inmunotinción con anti- β -tubulina (columna central). Las imágenes con doble exposición se muestran en la columna derecha. **A-C:** Una célula microglial (flecha) con un huso mitótico característico de prometafase tiene extensos lamelipodios. **D-F:** Una célula microglial con un huso típico de metafase o anafase temprana muestra morfología ovoide con tan solo dos pequeños lamelipodios. **G-I:** Una célula microglial con un huso mitótico característico de telofase temprana es ovoide y carece por completo de lamelipodios. Barra de escala: 25 μ m.

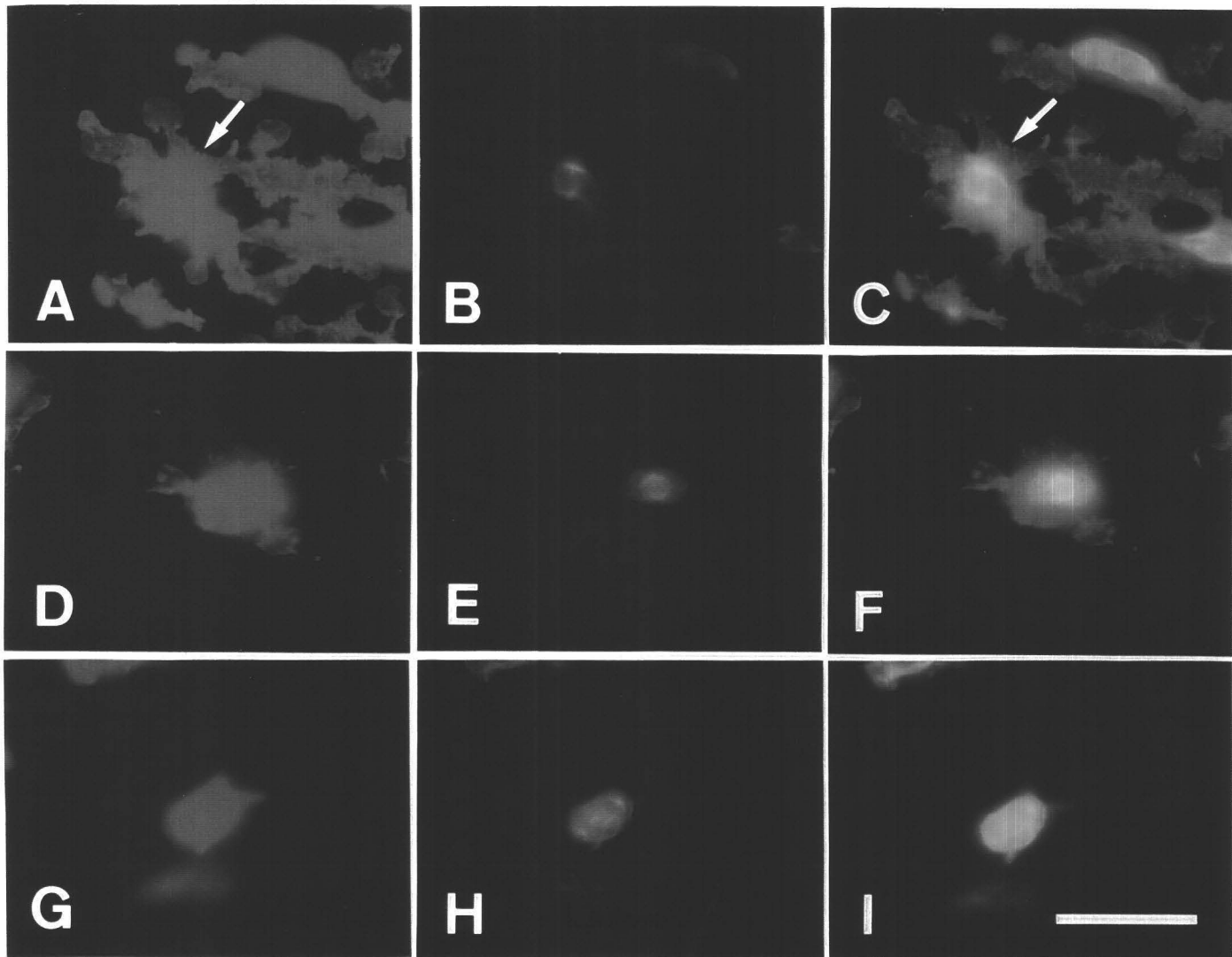


Fig. II-4. Células microgliales ameboides en citocinesis observadas con MEB en láminas MLI/PTCM (A-D) o con microscopía óptica en montajes totales de retinas tratadas inmunocitoquímicamente con QH1 (E, F). **A, B:** Célula microglial ovoide al comienzo de citocinesis. En el ecuador de la célula se aprecia un incipiente surco de segmentación (cabezas de flecha). Se observan pequeños lamelipodios (asteriscos) que se extienden desde la célula. **B** es un aumento de **A**. **C, D:** Células microgliales hijas en fase avanzada de citocinesis. Las células son alargadas y permanecen unidas mediante un puente de citocinesis, que se observa a mayor aumento en **D** (flecha). Desde ambas células emergen lamelipodios relativamente extensos (asteriscos). **E, F:** Parejas de células microgliales QH1+ unidas mediante sendos puentes de citocinesis (flechas). En cada pareja, las dos células hijas muestran amplios lamelipodios. Las células hijas están dispuestas en línea recta (**E**), o una de ellas parece estar dándose la vuelta (cabeza de flecha en **F**). Barra de escala: 9 μm para **A**; 3 μm para **B**; 14 μm para **C**; 4,5 μm para **D**; 40 μm para **E** y **F**.

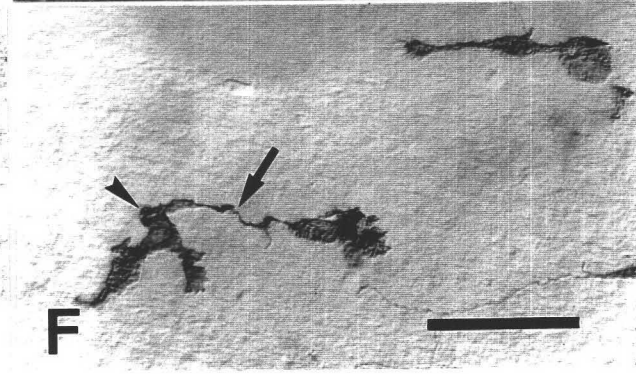
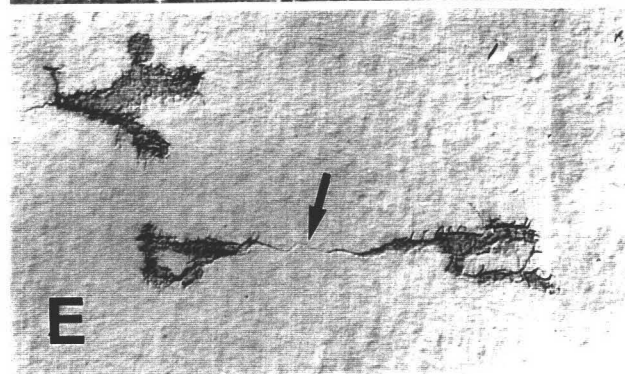
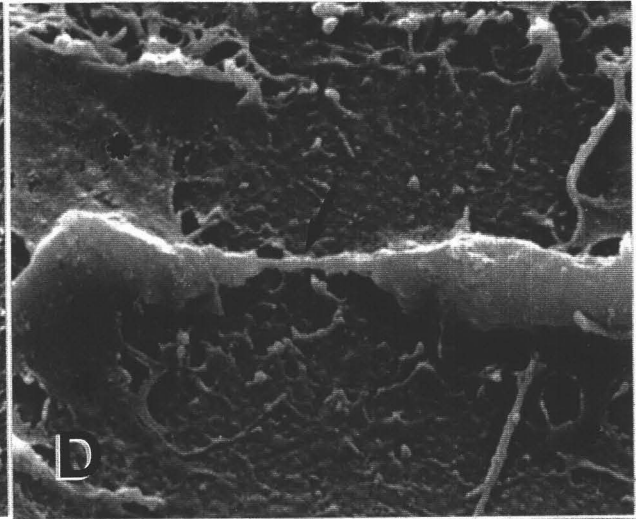
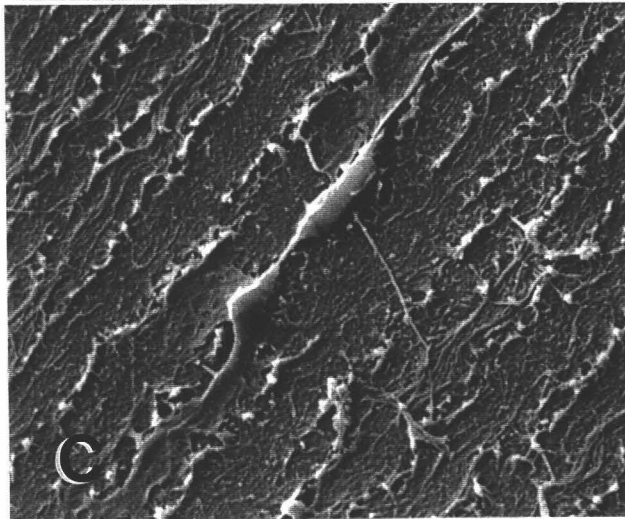
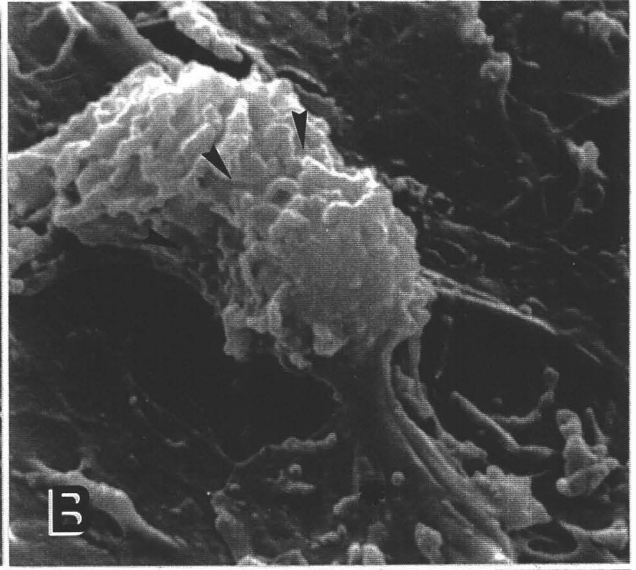
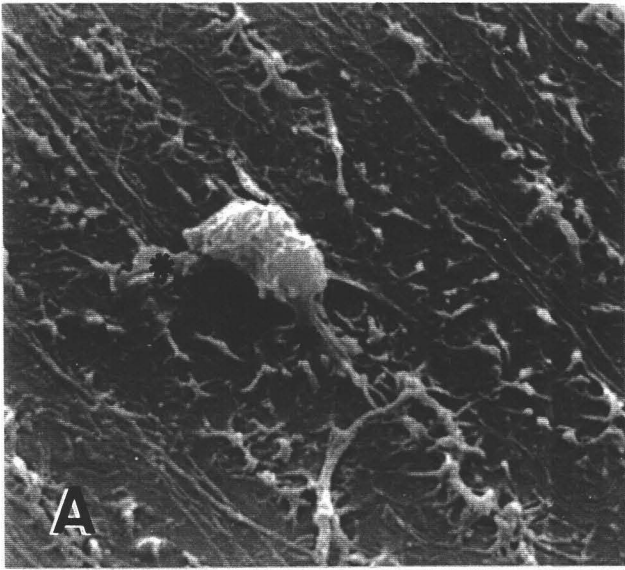


Fig. II-5. Células microgliales ameboides doblemente inmunomarcadas con QH1 (**A, C**) y anti-PCNA (**B, D**) en láminas MLI/PTCM. El núcleo de todas las células microgliales ameboides QH1+ también es PCNA-positivo (comparar **A** con **B**). En el citoplasma de algunas células microgliales se aprecia un ligero marcaje de PCNA (flecha en **D**). Barra de escala: 100 μm para **A** y **B**; 20 μm para **C** y **D**.

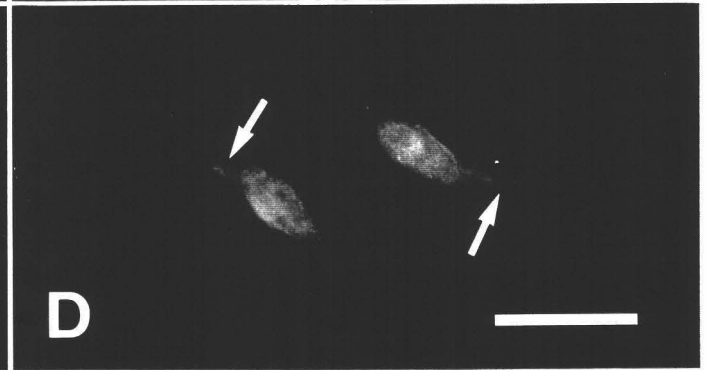
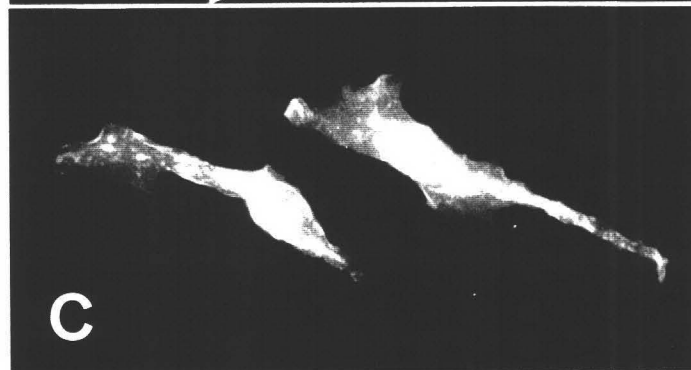
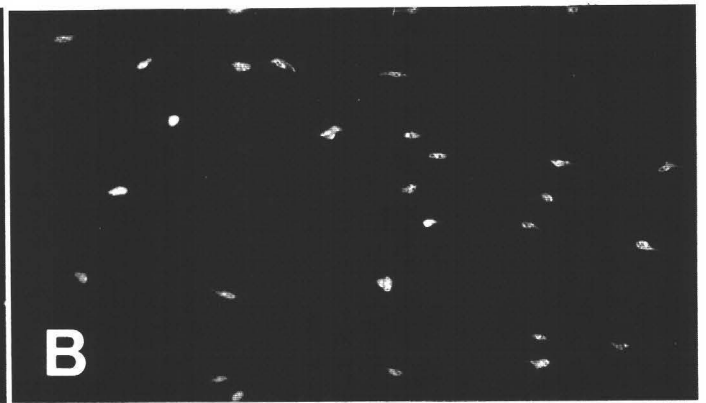
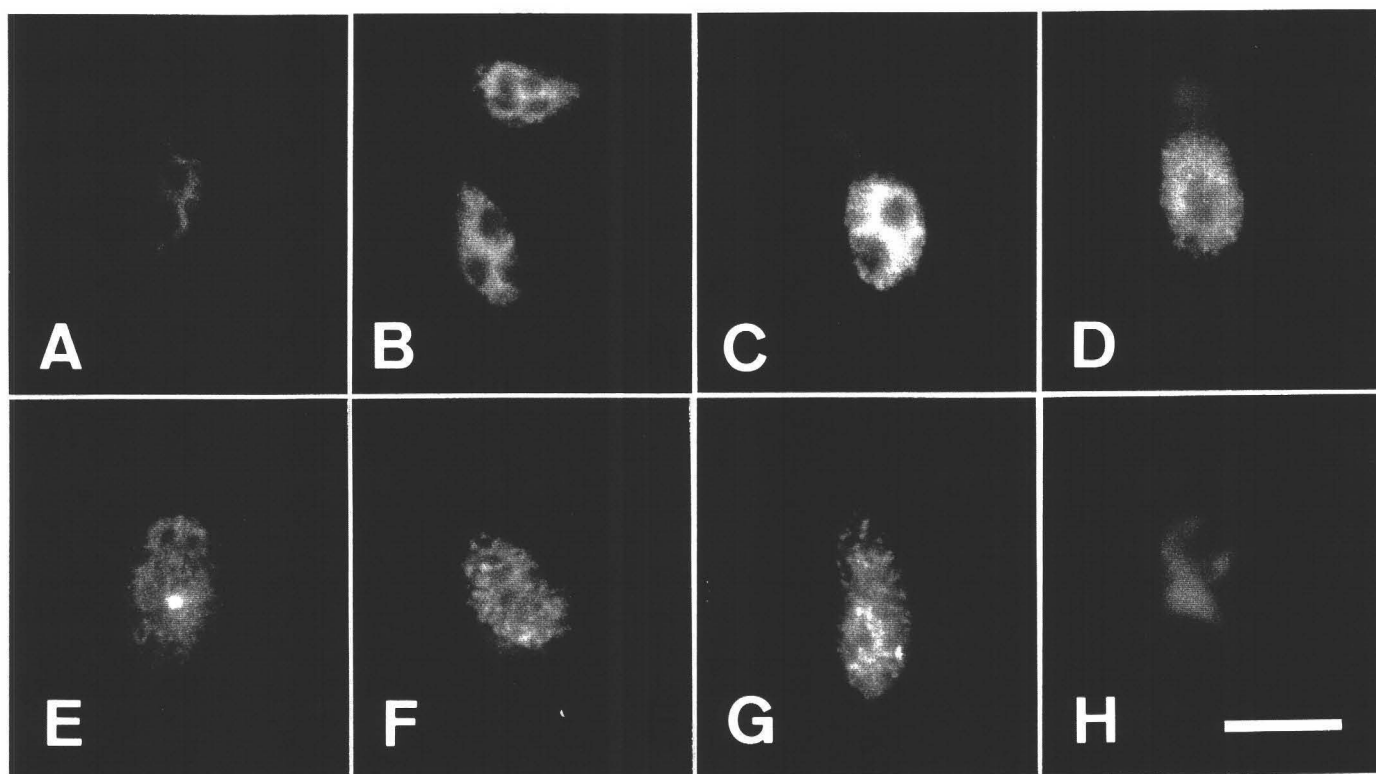


Fig. II-6. Diferentes patrones de inmunotinción con anti-PCNA en el núcleo de las células microgliales ameboides. **A:** Núcleo ligeramente positivo con varias zonas PCNA-negativas. **B:** Núcleo intensamente marcado con zonas PCNA-negativas similares a nucleolos. **C:** Núcleo parecido al observado en **B**, con grumos intensamente inmunoteñidos sobre un fondo homogéneamente marcado. **D:** Núcleo PCNA-positivo con grumos intensamente marcados. Se observa un área PCNA-negativa similar a un nucleolo en la que la ausencia de marcaje no es tan evidente como en **B** y **C**. **E:** Núcleo con un grumo central fuertemente inmunofluorescente sobre un fondo de cromatina difusamente marcada. **F:** Núcleo con grumos PCNA-positivos relatiavmente grandes sobre un fondo no marcado. **G:** Núcleo con pequeños grumos PCNA-positivos sobre un fondo PCNA-negativo. **H:** Célula aparentemente en telofase que muestra inmunofluorescencia de PCNA en el citoplasma pero no en las masas de cromosomas. Barra de escala: 10 μ m.



DISCUSIÓN

La proliferación celular contribuye a incrementar la población de células microgliales ameboides en migración

Los precursores microgliales se diseminan en el parénquima nervioso entrando desde las meninges y migrando largas distancias hacia sus lugares de diferenciación (Rio-Hortega, 1932; Boya et al., 1979; Cuadros et al., 1994, 1997; Navascués et al., 1995, 1996). Nuestros resultados demuestran que la microglía ameboide que está migrando tangencialmente en la retina embrionaria de codorniz sufre mitosis. Estos resultados están de acuerdo con otras descripciones en el desarrollo de la retina de mamíferos. En efecto, se han descrito mitosis de probables células microgliales en la capa de fibras ópticas de la retina de conejo en desarrollo, tanto en condiciones normales (Schnitzer, 1989) como tras la sección del nervio óptico (Schnitzer y Scherer, 1990). La evidencia de que normalmente la microglía ameboide se divide indica que los precursores microgliales colonizan la retina tanto mediante entrada desde una fuente exógena a la misma (Schnitzer, 1989; Navascués et al., 1995; Diaz-Araya et al., 1995a,b; capítulo I de esta tesis) como mediante proliferación dentro de la propia retina. Se ha descrito que la división celular de los precursores microgliales tiene lugar en regiones donde estos precursores están migrando activamente (Rio-Hortega, 1932), tales como la sustancia blanca del cerebelo en desarrollo de codorniz (Cuadros et al., 1997) y el cuerpo calloso en desarrollo de rata (Ling & Tan, 1974; Kaur & Ling, 1991; Wu et al., 1996). Por lo tanto, además del reclutamiento desde fuera del SNC, la proliferación de la microglía ameboide dentro del mismo parece contribuir decisivamente a la diseminación de los precursores microgliales a través del SNC durante el desarrollo normal. Esta idea está de acuerdo con algunas sugerencias anteriores (Dalmau et al., 1997a,b).

Se ha descrito con anterioridad la existencia de proliferación de macrófagos que invaden el SNC durante su desarrollo temprano (Martín-Partido & Navascués, 1990; Sorokin et al., 1992; Cuadros et al., 1993; Cossman et al., 1997), mucho antes de la entrada masiva de precursores microgliales en el parénquima nervioso.

Sin embargo, no está claro si estos macrófagos son realmente precursores microgliales. De hecho, los macrófagos QH1+ presentes en la retina de codorniz durante su desarrollo temprano (hasta E5) no se siguen observando durante E6, etapa del desarrollo inmediatamente anterior a la entrada masiva de precursores microgliales desde la región de la cabeza del nervio óptico/pecten, que tiene lugar a partir de E7. La proliferación de células QH1+ que se describe en este capítulo implica a células que migran en la retina entre E9 y E11, las cuales llegarán a transformarse en microglía ramificada (Navascués et al., 1995). Por lo tanto, estas células que proliferan sí son verdaderos precursores microgliales.

¿Todos los precursores microgliales proliferan o solo una subpoblación de ellos es capaz de dividirse? Todas las células microgliales ameboides que están migrando tangencialmente en la retina tienen núcleos PCNA-positivos. El PCNA es una proteína asociada con la replicación del DNA, y se expresa principalmente durante la fase S temprana, de tal forma que solo está presente en el núcleo de las células que proliferan (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987; Kurki et al., 1988; Morris & Mathews, 1989). Su síntesis comienza al final de la fase G₁ y continúa a través de la fase S, disminuyendo rápidamente al final de la misma (Bravo, 1986; Morris & Mathews, 1989). El marcaje con anti-PCNA se ha utilizado con anterioridad como un índice de la proliferación de células microgliales (Lee et al., 1994; Vela-Hernández et al., 1997). Por lo tanto, durante el desarrollo de la retina de codorniz, todos los precursores microgliales son capaces de proliferar y no solo una subpoblación de los mismos. La expresión de PCNA por células microgliales también se ha demostrado en el hipocampo y corteza cerebral de ratas embrionarias y postnatales (Dalmau et al., 1997b), así como en la sustancia blanca de la médula espinal en desarrollo del ratón "jimmy" (Vela-Hernández et al., 1997).

El marcaje de PCNA en el núcleo de las células microgliales ameboides muestra diferentes patrones de inmunotinción. La comparación de nuestros resultados con los descritos en otros tipos celulares que crecen sincrónicamente (Celis & Celis, 1985; Bravo, 1986; Bravo & Macdonald-Bravo, 1987; van Dierendonck et al., 1991; Humbert et al., 1992; Baptist et al., 1993) sugiere que los núcleos fuertemente PCNA-inmunomarcados estaban en diferentes momentos de la fase S, de manera que las figuras II-6B a II-6G indican una progresión desde las

etapas tempranas de la fase S hasta las tardías. Los núcleos fuertemente inmunoteñidos con áreas PCNA-negativas similares a nucleolos corresponderían a núcleos en fase S temprana, mientras que el patrón puntiforme parece ser característico de núcleos en fase S tardía. Los núcleos con un patrón de inmunotinción que es transición entre los dos anteriores estarían en etapas medias de la fase S. Los núcleos débilmente teñidos probablemente corresponden a la fase G₁. El marcaje citoplasmático de PCNA en las células microgliales ameboides mitóticas que se demuestra en el presente capítulo es similar al previamente descrito en la mitosis de otros tipos celulares (van Dierendonck et al., 1991; Baptist et al., 1993). El débil marcaje citoplasmático de algunas células microgliales ameboides interfásicas también ha sido descrito en otros tipos celulares (Kurki et al., 1988; Baptist et al., 1993), y podría explicarse suponiendo que representa el PCNA que se está sintetizando en el citoplasma antes de ser transportado al núcleo de la célula.

Nuestros resultados muestran variaciones en la distribución topográfica de las mitosis de células microgliales ameboides en diferentes retinas de un mismo estadio de desarrollo, así como en diferentes áreas de una misma retina. Esta variabilidad es similar a la descrita durante el "turnover" de la microglía ramificada (Perry & Gordon, 1991; Perry & Lawson, 1992). Además, Glenn et al. (1992) describían que la proliferación de la microglía ramificada también mostraba variaciones en diferentes cultivos así como en diferentes localizaciones dentro de un mismo cultivo. La significación de la heterogénea distribución topográfica de las mitosis de células microgliales ameboides es desconocida, aunque probablemente refleja una distribución heterogénea de mitógenos microgliales en la retina en desarrollo.

Probablemente, la proliferación de la microglía ameboide en la retina embrionaria de codorniz es promovida por mitógenos similares a los que actúan en otras regiones del SNC (Giulian et al., 1991; Suzumura & Sawada, 1996). Se ha demostrado que los astrocitos son una fuente de algunos de estos factores, tales como CSF-1 (Hao et al., 1990; Alliot et al., 1991; Frei et al., 1992; Théry et al., 1992; Gehrmann et al., 1995) y GM-CSF (Aloisi et al., 1992; Lee et al., 1994; Gehrmann et al., 1995). Esto explicaría la acción estimulante de estas células

gliales sobre la proliferación de la microglía (Alliot et al., 1991; Ganter et al., 1992). Puesto que los precursores microgliales de la retina embrionaria de codorniz migran sobre los pies terminales de las células de Müller (capítulo I de esta tesis), no es descabellado suponer que estas células macrogliales de la retina favorecen la proliferación de los precursores microgliales.

En la parte vítrea de la retina embrionaria de codorniz se ha demostrado la presencia de contactos directos entre la lámina basal (membrana limitante interna) y las células microgliales ameboides que están migrando (capítulo I de esta tesis). La laminina está presente en la lámina basal y parece ser un potencial activador de la microglía ramificada del adulto (Chamak & Mallat, 1991); además, esta molécula promueve la proliferación de otras líneas de células macrofágicas (Ohki & Kohashi, 1994). Por lo tanto, los contactos de las células microgliales en migración con la lámina basal de la parte vítrea de la retina podrían contribuir a estimular su proliferación. En relación con esto, algunos estudios que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio demuestran que la microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz cultivada in vitro tiene una mayor tasa de proliferación cuando se cultiva sobre láminas MLI/PTCM que cuando se cultiva sobre poli-L-lisina.

Ciclos de migración/división y conducta migratoria de las células microgliales ameboides

El inmunomarcaje con anti- β -tubulina/QH1 y con Hoechst/QH1 revela que las células microgliales ameboides sufren mitosis mientras están migrando activamente en la parte vítrea de la retina embrionaria de codorniz. Estas células son aplanadas y emiten lamelipodios mientras avanzan sobre los pies terminales de las células de Müller (capítulo I de esta tesis). El hecho de que las células en profase temprana muestren esta misma morfología demuestra que las células que entran en mitosis estaban en proceso de migración. Conforme avanza la mitosis, las células microgliales retraen sus lamelipodios y se hacen redondeadas, de forma similar a lo descrito para la microglía ramificada que se divide en cultivo (Glenn et al., 1992). De esta forma, las células microgliales ameboides detienen transitoriamente su

migración mientras pasan por metafase, anafase y telofase temprana. Antes de que se complete la citocinesis, las células hijas vuelven a emitir lamelipodios, continuando aparentemente su migración. Por lo tanto, las células microgliales ameboides parecen alternar los procesos de migración y mitosis durante su diseminación a través de la parte vítrea de la retina embrionaria de codorniz.

La relación entre división y migración de la microglía ameboide no es sorprendente, ya que la proliferación de las células normales es dependiente de su adhesión a un sustrato (revisado por Giancotti, 1997); las células que no se adhieren son incapaces de proliferar a pesar de la presencia de los factores de crecimiento adecuados. Esto es consecuencia de la activación mediada por adhesión de las vías de señalización que promueven el progreso del ciclo celular en presencia de mitógenos. En fibroblastos se ha descrito que los mecanismos de migración y proliferación están conectados a través de una protein-quinasa que actúa tanto en la vía de señalización de la proliferación como en la maquinaria de la migración (Klemke et al., 1997). La migración de las células microgliales ameboides sobre los pies terminales de las células de Müller transcurre a través de varias fases, una de las cuales es la fuerte adhesión al sustrato (capítulo I de esta tesis). Esta adhesión, junto a la acción de mitógenos, podría estimular la división celular.

Los ciclos de migración/mitosis influyen directamente la conducta migratoria de la microglía ameboide. En el capítulo I de esta tesis hemos demostrado que los precursores microgliales pueden moverse transitoriamente hacia atrás (desde la periferia hacia el centro de la retina) durante su diseminación centro-periférica en la parte vítrea de la retina embrionaria. La división celular puede ser uno de los factores responsables de esta inversión del movimiento de algunas células. En efecto, las células hijas que proceden de la división de una célula progenitora tienen polaridades opuestas, ya que el centrosoma de la célula hija delantera debe localizarse en el polo de la célula que mira hacia la periferia de la retina, mientras que el centrosoma de la célula hija trasera debe situarse en el polo de la célula que mira hacia el centro de la retina. Puesto que el centrosoma de las células en movimiento se localiza por delante del núcleo en el polo celular delantero (Albrecht-Bühler & Bushnell, 1979; Kupfer et al., 1982; Nemere et al., 1985; Bershadsky & Vasiliev, 1988; Carney & Couve, 1989; Ueda et al., 1997), una

de las células hijas debe girar 180° para recuperar su polaridad adecuada. Las dos células microgliales hijas parecen reanudar el movimiento antes de que se complete la citocinesis, y por lo tanto antes de que el centrosoma de la célula hija trasera haya podido migrar hacia el polo que mira hacia la periferia de la retina. De esta forma, una de las células hijas migrará hacia la periferia retiniana, mientras que la otra célula hija se moverá transitoriamente hacia el centro de la retina. Esta interpretación es apoyada por la observación de parejas de células microgliales unidas por un puente que muestran lamelipodios (que señalan el extremo delantero de la célula) que miran hacia la periferia de la retina en una célula y hacia el centro de la misma en la otra (Fig. II-4E). La célula hija que se mueve transitoriamente hacia el centro de la retina parece girar 180° e invertir el sentido de su movimiento, como se deduce de la presencia de parejas de células unidas por un puente en las cuales una de ellas está curvada (Fig. II-4F).

Las células microgliales mitóticas que tienen el huso orientado tangencialmente y perpendicular a la dirección de los canales flanqueados por prolongaciones de células de Müller probablemente contribuyen al movimiento lateral (es decir, perpendicular a los canales) de las células hijas en la retina. Por lo tanto, esta orientación de la división celular facilita la diseminación lateral de los precursores microgliales a través de la retina embrionaria. Por otra parte, la migración radial de los precursores microgliales es esencial para la colonización de las capas plexiformes por parte de éstos (Navascués et al., 1995) y podría estar facilitada por la orientación radial de algunas células mitóticas en las que la célula hija que se localiza mirando hacia el espesor de la retina podría migrar fácilmente hacia el interior.

REFERENCIAS

- Albrecht-Bühler, G. , Bushnell, A. (1979) The orientation of centrioles in migrating 3T3 cells. *Exp. Cell Res.*, 120: 111-118.
- Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B. (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1541-1545.
- Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa U., Levi, G., Peschle, C. (1992) Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, 149: 2358-2366.
- Baptist, M., Dumont, J.E., Roger P.P. (1993) Demonstration of cell cycle kinetics in thyroid primary culture by immunostaining of proliferating cell nuclear antigen: differences in cyclic AMP-dependent and -independent mitogenic stimulations. *J. Cell Sci.*, 105: 69-80.
- Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M. (1988) *Cytoskeleton*. Plenum Press, New York, 298 pp.
- Boya, J., Calvo, J., Prado, A. (1979) The origin of microglial cells. *J. Anat.*, 129: 177-186.
- Bravo, R. (1986) Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp. Cell Res.*, 163: 287-293.
- 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: 1549-1554.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., Macdonald-Bravo, H. (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature*, 326: 515-517.
- Carney, P.R., Couve, E. (1989) Cell polarity changes and migration during early development of the avian peripheral auditory system. *Anat. Rec.*, 225: 156-164.

- Celis, J.E., Celis, A. (1985) Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3262-3266.
- Chamak, B., Mallat, M. (1991) Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience*, 45: 513-527.
- Cossmann, P.H., Eggli, P.S., Christ, B., Kurz, H. (1997) Mesoderm-derived cells proliferate in the embryonic central nervous system: confocal microscopy and three-dimensional visualization. *Histochem. Cell Biol.*, 107: 205-213.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Martín-Partido, G., Navascués, J. (1992) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci. Lett.*, 148:11-14.
- Cuadros, M.A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., Navascués, J. (1993) First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 330: 113-129.
- Cuadros, M. A., Moujahid, A., Quesada, A., Navascués, J. (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J. Comp. Neurol.*, 348: 207-224.
- Cuadros, M. A., Rodríguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marín-Teva, J. L., Navascués, J. (1997) Microglia development in the quail cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, en prensa.
- Dalmau, I., Finsen, B., Tonder, N., Zimmer, J., González, B., Castellano, B. (1997a) Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 377: 70-84.
- Dalmau, I., Vela, J.M., González, B., Castellano, B. (1997b) Cinética de las células de microglía en el cerebro en desarrollo de la rata. *Resúmenes de Establecimiento y Consolidación de la Red Glial Española*, p. 67.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L. (1995a) Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina. *Glia*, 15: 458-470.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., Billson, F.A. (1995b) Development of microglial topography in human retina. *J. Comp. Neurol.*, 363: 53-68.
- Frei, K., Noahava, K., Malipiero, U.V., Schwerdel, C., Fontana, A. (1992) Production of colony-stimulating factor by astrocytes and brain macrophages. *J. Neuroimmunol.*, 40: 189-195.

- Ganter, S., Northoff, H., Männel, P., Gebicke-Härter, P.J. (1992) Growth control of cultured microglia. *J. Neurosci. Res.*, 33: 218-230.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W. (1995) Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.*, 20: 269-287.
- Giancotti, F.G. (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 691-700.
- Giulian, D., Baker, T. J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.*, 6: 2163-2178.
- Giulian, D., Ingeman, J. E. (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J. Neurosci.*, 8: 4707-4717.
- Giulian, D., Johnson B., Krebs, J.F., George, J.K., Tapscott, M. (1991) Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain. *J. Cell Biol.*, 112: 323-333.
- Glenn, J.A., Ward, S.A., Stone, C.R., Booth, P.L., Thomas, W.E. (1992) Characterisation of ramified microglial cells: detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J. Anat.*, 180: 109-118.
- Halfter, W., Reckhaus, W., Kröger, S. (1987) Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *J. Neurosci.*, 7: 3712-3722.
- Hao, C., Guilbert, L.J., Fedoroff, S. (1990) Production of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) by mouse astroglia in vitro. *J. Neurosci. Res.*, 27: 314-323.
- Humbert, C., Santisteban, M.S., Usson, Y., Robert-Nicoud, M. (1992) Intranuclear co-location of newly replicated DNA and PCNA by simultaneous immunofluorescent labelling and confocal microscopy in MCF-7 cells. *J. Cell Sci.*, 103: 97-103.
- Hurley, S.D., Streit, W.J. (1996) Microglia and the mononuclear phagocyte system. En Ling, E.A., Tan, C.K., Tan, C.B.C. (eds), *Topical Issues in Microglia Research*. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 1-19.
- Imamoto, K., Leblond, C. P. (1978) Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J. Comp. Neurol.*, 180: 134-164.

- Kaur, C., Ling, E. A. (1991) Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin *Griffonia simplicifolia* in postnatal rats. *Acta Anat.*, 142: 118-125.
- Kitamura, T., Miyake, T., Fujita, S. (1984) Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 226: 421-433.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., Cheresch, D.A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.*, 137: 481-492.
- Kupfer, A., Louvard, D., Singer, S.J. (1982) Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2603-2607.
- Kurki, P., Ogata, K., Tan, E.M. (1988) Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Meth.*, 109: 49-59.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Gordon, S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48: 405-415.
- Lee, S., Liu, W., Brosnan, C., Dickson, D. (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia*, 12: 309-318.
- Leong, S.K., Ling, E.A. (1992) Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia*, 6: 39-47.
- Ling, E. A. (1981) The origin and nature of microglia. En Fedoroff, S., Hertz, L. (eds), *Advances in Cellular Neurobiology*, Vol. 2. Academic Press, London, pp. 33-82.
- Ling, E. A., Tan, C. K. (1974) Ameboid microglia cells in the corpus callosum of neonatal rats. *Arch. Histol. Jap.*, 36: 265-280.
- Ling, E. A., Wong, W. C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7: 9-18.
- Martín-Partido, G., Navascués, J. (1990) Macrophage-like cells in the presumptive optic pathways in the floor of the diencephalon of the chick embryo. *J. Neurocytol.*, 19: 820-832.

- Morris, G.F., Mathews, M.B. (1989) Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 264: 13856-13864.
- Navascués, J., Cuadros, M. A., Almendros, A. (1996) Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En Ling, E.A., Tan, C.K., Tan, C.B.C. (eds), *Topical Issues in Microglia Research*. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 43-64.
- Navascués, J., Moujahid, A., Almendros, A., Marín-Teva, J. L., Cuadros, M. A. (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.*, 354: 209-228.
- Nemere, I., Kupfer, A., Singer, S.J. (1985) Reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center inside macrophages subjected to a chemotactic gradient. *Cell Motil.*, 5: 17-29.
- Ohki, K., Kohashi, O. (1994) Laminin promotes proliferation of bone marrow-derived macrophages and macrophage cell lines. *Cell Struct. Func.*, 19: 63-71.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kito, P., Dieterlen-Lièvre, F., Buck, C.A. (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100: 339-349.
- Perry, V. H., Lawson, L. J. (1992) Macrophages in the Central Nervous System. En Lewis, E.C., McGee, J.O.D. (eds), *The Macrophage*. IRL Press, Oxford, pp. 389-413.
- Perry, V. H., Gordon, S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 125: 203-244.
- 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- δ auxiliary protein. *Nature*, 326: 517-520.
- Rio-Hortega, P. (1932) Microglia. En Penfield, W. (ed), *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, Vol. 2*. Paul B. Hoeber, New York, pp. 481-534.
- Schnitzer, J. (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 282: 249-263.

- Schnitzer, J., Scherer, J. (1990) Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J. Comp. Neurol.*, 302: 779-791.
- Slepko, N., Levi, G. (1996) Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia*, 16: 241-246.
- Sorokin, S.P., Hoyt, R.F., Blunt, D.G., McNelly, N.A. (1992) Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat. Rec.*, 232: 527-550.
- Streit, W. J., Graeber, M. B., Kreutzberg, G. W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, 1: 301-307.
- Suzumura, A., Sawada, M. (1996) Microglia as immunoregulatory cells in the central nervous system. En Ling, E.A., Tan, C.K., Tan, C.B.C. (eds), *Topical Issues in Microglia Research*. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 189-202.
- Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., Marunouchi, T. (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J. Neuroimmunol.*, 30: 111-120.
- Théry, C., Stanley, E.R., Mallat, M. (1992) Interleukin 1 and tumor necrosis factor-stimulate the production of colony-stimulating factor 1 by murine astrocytes. *J. Neurochem.*, 59: 1183-1186.
- Thomas, W. E. (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Rev.*, 17: 61-74.
- Ueda, M., Gräf, R., MacWilliams, H.K., Schliwa, M., Euteneuer, U. (1997) Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9674-9678.
- van Dierendonck, J.H., Wijsman, J.H., Keijzer, R., van de Velde, C.J.H., Cornelisse, C.J. (1991) Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am. J. Pathol.*, 138: 1165-1172.
- Vela-Hernández, J. M., Dalmau, I., González, B., Castellano, B. (1997) Abnormal expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the spinal cord of the hypomyelinated jimpy mutant mice. *Brain Res.*, 747: 130-139.

Wu, C.H., Wen, C.Y., Shieh, J.Y., Ling, E.A. (1996) Use of lectin as a tool for the study of microglial cells: expression and regulation of lectin receptors in normal development and under experimental conditions. En Ling, E.A., Tan, C.K., Tan, C.B.C. (eds), *Topical Issues in Microglia Research*. Singapore Neuroscience Association; Singapore, pp. 83-202.



CAPÍTULO III

MIGRACIÓN MARGINAL CIRCUNFERENCIAL DE PRECURSORES MICROGLIALES



RESUMEN

Durante el desarrollo de la retina de codorniz existe una migración tangencial de precursores microgliales en la parte vítrea de la misma, que comienza en E7 y avanza centro-periféricamente desde la cabeza del nervio óptico / base del pecten. El presente estudio aporta nuevos datos acerca de la migración tangencial de precursores microgliales en las regiones periféricas de la retina. Se empleó el anticuerpo QH1 para marcar los precursores microgliales tanto en montajes totales de retina como en extensiones que contenían el esbozo de iris, el cuerpo ciliar y la retina periférica. Antes de que las células microgliales que migran centro-periféricamente alcancen el margen periférico de la retina, en el mismo se observan algunas células ameboides QH1-positivas que muestran una orientación circunferencial y unos caracteres morfológicos típicos de estar en proceso de migración. Los precursores microgliales que llevan a cabo una migración marginal circunferencial se observan primeramente en los niveles temporales de la retina en E6 y avanzan en dirección temporo-dorso-nasal hasta alcanzar el cuadrante naso-ventral. Las células que migran circunferencialmente muestran una forma generalmente alargada con prolongaciones y lamelipodios localizados en ambos polos del soma celular, similar a la de las células que migran centro-periféricamente. La confluencia de estas últimas con las que migran circunferencialmente comienza en la mitad temporal y avanza en dirección temporo-dorso-nasal, existiendo diferencias entre las mitades temporal y nasal. En la mitad temporal parece haber una incorporación de células que han migrado centro-periféricamente a la zona marginal de migración circunferencial. Por el contrario, en la mitad nasal, algunos precursores microgliales que estaban migrando circunferencialmente parecen cambiar su dirección para seguir trayectorias periférico-centrales. El patrón de maduración de los precursores microgliales que migran circunferencialmente sigue un modelo similar a la migración de las mismas (temporo-dorso-nasal). Finalmente, algunas células QH1-positivas del cuerpo ciliar muestran prolongaciones que se introducen en la retina a través de la ora serrata, orientándose circunferencialmente en la misma. Estas observaciones sugieren que

las células microgliales que migran circunferencialmente en el margen de la retina entran desde el cuerpo ciliar.

INTRODUCCIÓN

En la retina de la codorniz adulta, las células microgliales se localizan principalmente en las capas plexiforme interna (CPI) y externa (CPE), aunque también se pueden observar unas pocas entre los somas neuronales de la capa de células ganglionares y en la capa de fibras ópticas (Navascués et al., 1994). Este modelo de distribución laminar es similar al observado en la retina de diferentes especies de mamíferos adultos, incluyendo el mono, gato, ratón, rata, conejo y humano (Vrabec, 1968, 1970; Gallego, 1976; Boycott y Hopkins, 1981; Hume et al., 1983; Sanyal y De Ruiter, 1985; Boya et al., 1987; Penfold et al., 1991; Provis et al., 1995; Humphrey y Moore, 1995), y se consigue a través de la migración de precursores microgliales en la retina y posterior diferenciación de los mismos para dar microglía ramificada. Trabajos previos en nuestro laboratorio (Navascués et al., 1995, 1996) han demostrado que durante el desarrollo de la retina de codorniz existe una migración tangencial de precursores microgliales en la parte vítrea de la misma. Esta migración tangencial avanza centro-periféricamente desde la cabeza del nervio óptico / base del pecten (CNO/BP) hasta que los precursores microgliales colonizan toda la superficie retiniana. Además, los precursores microgliales que han migrado tangencialmente, seguidamente migran en dirección radial para colonizar las capas plexiformes interna y externa, en donde se diferencian, dando lugar al modelo adulto de distribución microglial. Sin embargo, dos trabajos del grupo de Provis (Diaz-Araya et al., 1995a, b) revelaban que en la retina humana existen dos tipos de migración tangencial: una inicial, antes del comienzo de la vasculogénesis, en la que los precursores microgliales entran en la retina periférica desde el esbozo de iris y cuerpo ciliar y migran hacia el centro, y otra posterior, coincidiendo con la vasculogénesis, en la que además de la inicial se produce una migración tangencial desde la cabeza del nervio óptico hacia la periferia. En estudios previos de nuestro laboratorio (Navascués et al., 1995) se observaba una migración tangencial desde la CNO/BP en la retina de la codorniz, pero no una migración periférica. Esta diferencia podría ser achacada a la existencia de variaciones en el desarrollo de la microglía entre aves y mamíferos. Sin embargo, también se podría deber a

dificultades técnicas en la obtención de las extensiones de retina sobre las que se llevaron a cabo los estudios. En efecto, era muy frecuente que al obtener extensiones de retina de codorniz, la parte más periférica de la misma se desprendía junto con el vítreo que está especialmente adherido al borde marginal de la retina y al pecten. Por ello, hicimos un nuevo estudio empleando extensiones de retina en las que se tuvo especial cuidado de preservar el margen de la retina. Además, se utilizaron extensiones que incluían todo el cuerpo ciliar y la zona periférica de la retina, aunque se eliminaba toda la parte central de la misma. Este estudio reveló que en el margen de la retina embrionaria de codorniz también existe una migración de precursores microgliales que proceden del esbozo de cuerpo ciliar y siguen una dirección circunferencial, similar a la del sustrato de esta zona de la retina. En el margen nasal de la retina, algunas células microgliales que migran circunferencialmente pueden cambiar su dirección, incorporándose a regiones más centrales, mientras que en el margen temporal algunos precursores microgliales que estaban migrando centro-periféricamente parecen incorporarse a la corriente marginal de células que migran circunferencialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) entre el quinto día de incubación (E5) y la eclosión (E16), y codornices de 1 a 3 días posteclosión (P1-P3). Estas etapas del desarrollo incluyen el periodo en el que se produce la entrada y migración tangencial de precursores microgliales en la retina (Navascués et al., 1995).

Se realizaron montajes totales de retinas de E6-E16 y P1-P3, y unas extensiones obtenidas a partir de ojos de E5-E10, que incluían todo el cuerpo ciliar y la zona periférica retiniana (extensiones de cuerpo ciliar/retina periférica). Ambos tipos de preparaciones fueron inmunomarcados con el anticuerpo QH1. Se emplearon dos montajes totales y cuatro extensiones de cuerpo ciliar/retina periférica por estadio. Para la obtención de las retinas, las codornices eclosionadas se anestesiaron previamente con éter, de acuerdo con los métodos de eutanasia de la Unidad de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada.

Aislamiento de las retinas y obtención de las extensiones

El aislamiento y preparación de los montajes totales de retina se realizaron en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0.1 M (pH 7.4) siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el capítulo I de esta tesis.

Para la obtención de extensiones de cuerpo ciliar/retina periférica se empleó un procedimiento técnico diferente. El ojo se disecaba de forma rápida en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M. A continuación, se eliminaba la córnea y se realizaba un corte frontal con la ayuda de unas tijeras de Pascheff que dividía el ojo en dos mitades, la mitad anterior y la mitad posterior. La mitad anterior, que contenía el esbozo de iris, el cuerpo ciliar y la retina periférica, se limpiaba cuidadosamente de los restos de humor vítreo. Seguidamente, con la ayuda de unas pinzas, se separaban la esclerótica y la coroides y se eliminaba el cristalino. De esta forma quedaba aislada la retina periférica con el epitelio pigmentario junto con el esbozo de cuerpo ciliar e iris. Finalmente, se colocaba sobre un porta y se efectuaban unas incisiones radiales que permitían su total

extensión. Una vez preparadas las extensiones de cuerpo ciliar/retina periférica se postfijaban por inmersión en la misma solución fijadora empleada durante su aislamiento, durante 6 a 12 horas a 4°C y se lavaban en PBS 0.1 M durante 2 horas.

Inmunomarcaje QH1

Para el marcaje de los precursores microgliales se utilizó un inmunomarcaje con el anticuerpo QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA), que reconoce células de linaje hemangioblástico de codorniz con la excepción de eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987) y todas las fases del desarrollo de las células microgliales de codorniz (Cuadros et al., 1992).

El protocolo inmunocitoquímico usado para los montajes totales de retina ha sido descrito previamente en el capítulo I de esta tesis.

Las extensiones de cuerpo ciliar/retina periférica se sometieron a un marcaje inmunofluorescente con el anticuerpo QH1 cuyo protocolo se describe a continuación. Previamente, se realizó un tratamiento permeabilizador que consistía en sumergir las extensiones en agua oxigenada al 3% en PBS 0.1 M durante 5 minutos, PBS 0.1 M durante 15 minutos y Triton X-100 al 1% en PBS 0.1 M durante 4 horas, todo ello a temperatura ambiente y con agitación suave. Después de lavar de nuevo en PBS, se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por suero normal de cabra (Sigma) diluido 1:30 en una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS (BSA-PBS) durante 1 hora. Seguidamente, las extensiones se incubaron en el sobrenadante anti-QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) diluido 1:2 en BSA-BSA con 0.2% Triton X-100 durante 18 horas a 4 °C con agitación y se lavaron en PBS. Finalmente, se incubaron en el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma), diluido 1:60 en BSA-PBS durante 3 horas, se lavaron en PBS y se montaron con glycerol-PBS (1:1) con dihidrocloruro de p-fenilendiamina (Sigma) al 0.1%. Las observaciones de inmunofluorescencia se realizaron en un microscopio Zeiss Axiophot y en un microscopio confocal Zeiss.

Mapas de distribución de precursores microgliales que migran tangencialmente

Para la elaboración de mapas de distribución de precursores microgliales en proceso de migración tangencial, se utilizaron los montajes totales de retina que habían sido tratados inmunocitoquímicamente con el anticuerpo QH1. Para ello, se dibujó el perfil de cada extensión de retina aumentada 12 veces y en él se representaron aquellas áreas en las que se distribuían los precursores microgliales localizados en la capa de fibras ópticas. Estas áreas se identificaron cuidadosamente con la ayuda del microscopio.

Por otra parte, en estos mapas se representaron las posibles rutas seguidas por los precursores microgliales durante su migración tangencial. Esto se determinó a partir de la orientación que mostraban los precursores microgliales en las diferentes regiones de cada extensión de retina.

RESULTADOS

Las extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica (Fig. III-1) utilizadas en el presente estudio facilitaron considerablemente el análisis del modelo de migración tangencial de los precursores microgliales en la periferia de la retina. En estas extensiones, el centro estaba ocupado por un hueco de forma circular, que corresponde a la pupila, rodeado del esbozo del iris. Alrededor del mismo se observaba la zona plegada del cuerpo ciliar, con numerosos pliegues orientados radialmente, y la zona plana del mismo. La ora serrata, que constituye el límite entre el cuerpo ciliar y la retina periférica, se apreciaba como una línea que rodea al cuerpo ciliar. Esta línea estaba difuminada en los estadios E5 y E6 (Fig. III-1A), y era mucho más evidente a partir de E7 (Fig. III-1B). Con luz transmitida, en la parte más ventral del cuerpo ciliar se observaba una estrecha banda transparente, desprovista de pigmento, dispuesta paralelamente a los pliegues de la parte plegada. En estadios muy precoces (E5), esta banda transparente se localizaba desde la ora serrata hasta el esbozo de iris, y se continuaba con la fisura óptica de la retina (Fig. III-1A), donde se estaba desarrollando el pecten y la cabeza del nervio óptico. Conforme avanzaba el desarrollo, la banda luminosa iba quedando progresivamente relegada a la parte plegada del cuerpo ciliar (Fig. III-1B). Con microscopía de fluorescencia, en extensiones de cuerpo ciliar tratadas con inmunocitoquímica con QH1, dicha banda se observaba débilmente fluorescente por la presencia de un gran vaso sanguíneo.

El desarrollo de la mitad temporal del cuerpo ciliar durante los estadios del desarrollo estudiados estaba considerablemente más adelantado que el de la parte nasal, y lo mismo sucedía con la mitad dorsal en relación con la mitad ventral. Como resultado de esto, el cuadrante dorsotemporal del cuerpo ciliar siempre era el de mayor superficie y desarrollo, mientras que el cuadrante ventronasal era el más pequeño y menos desarrollado. La presencia del vaso sanguíneo localizado en la banda transparente ventral y la morfología asimétrica del cuerpo ciliar permitieron una fácil identificación en las extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica de ocho niveles consecutivos en la línea de la ora serrata. Los niveles considerados fueron

los siguientes: ventral (V), temporoventral (TV), temporal (T), temporodorsal (TD), dorsal (D), nasodorsal (ND), nasal (N), y nasoventral (NV) (Fig. III-1B). Estos niveles también podían identificarse en las extensiones de retina, teniendo en cuenta que la cabeza del nervio óptico / base del pecten (CNO/BP) se localizaba en la mitad ventral de la misma y estaba desplazada hacia la parte temporal (Fig. III-2A). La identificación de los citados niveles era de gran importancia, ya que la distribución de los precursores microgliales en proceso de migración difería según la zona topográfica considerada en la retina.

Microgía ameboide orientada circunferencialmente en la periferia retiniana

Las observaciones efectuadas sobre las extensiones de retina confirmaban la migración tangencial centro-periférica de precursores microgliales a partir de E7, como se había descrito previamente (Navascués et al., 1995; capítulo I de la presente tesis). Estos precursores procedían de la CNO/BP y se observaban como largas células ameboides. Como consecuencia de la localización ventral de la CNO/BP, de su forma considerablemente alargada y de la forma de la retina, parecida a una esfera, los precursores microgliales que migraban centro-periféricamente orientaban su eje longitudinal según trayectorias que confluían oblicuamente con la línea de la ora serrata (Fig. III-2C). En la parte más dorsal de la retina, la orientación de las células microgliales que migran centro-periféricamente era casi perpendicular a la ora serrata.

Tanto en extensiones de retina como en extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica, también se observaron células ameboides QH1 positivas localizadas en las regiones marginales de la periferia retiniana, adyacentes a la ora serrata, orientadas paralelamente a la misma. Es decir, estas células microgliales ameboides del margen periférico de la retina mostraban una orientación circunferencial (Fig. III-2B, E). La morfología de estas células era similar a la de las células microgliales que migran centro-periféricamente, mostrando una forma generalmente alargada con prolongaciones y lamelipodios localizados en ambos polos del cuerpo celular. Las células microgliales orientadas circunferencialmente se observaban antes de que los primeros precursores microgliales que migran

centro-periféricamente hubiesen alcanzado regiones periféricas de la retina (Figs. III-2B, C y III-3A-C). Estos resultados sugieren que, junto a la migración tangencial centro-periférica de la mayoría de los precursores microgliales, una pequeña proporción de éstos migran tangencialmente en el margen periférico de la retina siguiendo un curso circunferencial (paralelo a la ora serrata).

En extensiones de retina entre E7 y E10, la zona invadida por precursores microgliales que migran centro-periféricamente estaba separada en mayor o menor extensión de la ocupada por precursores microgliales que migran circunferencialmente en el margen periférico de la retina, de manera que ambas regiones eran claramente identificadas. El área de migración centro-periférica (AMCP) se localizaba alrededor de la CNO/BP y quedaba limitada exteriormente por el frente de avance de los precursores microgliales que migran centro-periféricamente, mientras que el área marginal de migración circunferencial (AMMC) se situaba en una estrecha franja de la zona marginal de la periferia de la retina (Fig. III-3).

En E5 no existían precursores microgliales QH1 positivos en ninguna zona de la retina. En E6 se observaron por primera vez un pequeño número de precursores microgliales, localizados en los niveles TV, T y TD del AMMC, y orientados circunferencialmente (Fig. III-3A). Estos resultados indican que los primeros precursores microgliales que entran en la retina, lo hacen en regiones marginales y migran circunferencialmente.

En E7 había mayor número de células ameboides QH1 positivas orientadas circunferencialmente en el AMMC y ésta tenía mayor extensión que en E6, localizándose desde el nivel TV hasta el nivel D. Por lo tanto, el AMMC era una estrecha franja que ocupaba gran parte del margen de la mitad temporal de la retina (Fig. III-3B). En este estadio comenzaban a verse algunos precursores microgliales orientados centro-periféricamente alrededor de la CNO/BP, es decir comenzaba a detectarse el AMCP. Una observación interesante era que unos pocos precursores microgliales orientados centro-periféricamente se disponían en una estrecha franja del cuadrante temporoventral de la retina, que unía el AMMC con el AMCP, por lo que fue denominada puente de conexión entre el AMCP y el AMMC (puente AMCP/AMMC) de la mitad temporal.

En E8 continuaba incrementándose el número de precursores microgliales localizados en el AMMC, al tiempo que ésta seguía creciendo en dirección temporo-dorso-nasal, alcanzando un punto del margen de la retina muy cercano al nivel N (Fig. III-3C). La densidad de precursores microgliales en el AMMC era claramente mayor en la mitad temporal (Fig. III-2C, E) que en la mitad nasal de la retina. El número de precursores microgliales que migraban centro-periféricamente en el AMCP también se había incrementado considerablemente, y en la mitad nasal, el frente de avance de este área era equidistante entre la CNO/BP y la ora serrata, mientras que en la mitad temporal dicho frente estaba más cercano al margen de la retina. En el cuadrante temporoventral seguía observándose el puente AMCP/AMMC, a través del cual algunas células que migraban centro-periféricamente habían alcanzado el margen de la retina (Fig. III-3C). En relación con la situación observada en E7, el puente AMCP/AMMC de la mitad temporal era más ancho y ocupaba ahora una posición algo más dorsal dentro del cuadrante temporoventral.

En E9, el AMMC seguía su crecimiento en dirección temporo-dorso-nasal y su extremo alcanzaba el nivel NV (Fig. III-3D). Es interesante destacar que algunas células del AMMC localizadas en los niveles ND y N mostraban una orientación oblicua a la ora serrata, introduciéndose ligeramente hacia el centro de la retina. Como consecuencia de ello, el AMMC aparecía ligeramente ensanchado en dichos niveles (Fig. III-3D). La confluencia entre el frente de avance del AMCP y el AMMC llegaba hasta el nivel TD, de forma que el puente AMCP/AMMC de la mitad temporal era más ancho que en E8. En la mitad nasal todavía no había uniones entre el AMCP y el AMMC.

En E10, el AMMC había alcanzado la parte más ventral de la retina, de forma que se extendía por todo el perímetro marginal de la misma (Fig. III-3E), aunque la distribución de los precursores microgliales era muy diferente según el nivel topográfico considerado. Así, en la mitad temporal (Fig. III-4A) la densidad de precursores microgliales del AMMC era mucho mayor que en la mitad nasal (Fig. III-4B). En este estadio, el puente AMCP/AMMC de la mitad temporal de la retina había alcanzado el nivel D, de manera que la confluencia entre el AMCP y el AMMC se extendía a todo el perímetro marginal de dicha mitad. En la mitad nasal existía

una estrecha banda desprovista de precursores microgliales entre el AMCP y el AMMC. Sin embargo, esta banda libre de microglía estaba interrumpida por dos estrechas áreas que contenían células microgliales. Estas áreas conectaban el AMCP y el AMMC en dos puntos que coincidían aproximadamente con los niveles ND y N (Fig. III-3E), y fueron denominadas puentes AMCP/AMMC de la mitad nasal.

A medida que avanzaba el desarrollo, nuevos precursores microgliales iban añadiéndose a los puentes AMCP/AMMC de la mitad nasal, de forma que éstos se iban ensanchando. Como consecuencia, la banda carente de precursores microgliales, situada entre el AMCP y el AMMC, se iba reduciendo, y en E11 solo ocupaba dos pequeñas áreas que coincidían con los niveles ND y N (Fig. III-3F). Finalmente, en E12 había desaparecido por completo y toda la superficie vítrea de la retina estaba colonizada por precursores microgliales (Fig. III-3G).

Los precursores microgliales que migraban en el AMMC mostraban caracteres morfológicos similares a los de las células ameboides QH1 positivas que migraban en el AMCP (capítulo I de la presente tesis). Así, las células bipolares con prolongaciones y lamelipodios localizados en ambos polos del cuerpo celular eran muy frecuentes (Fig. III-2B, E), pero también se detectaban células con morfología monopolar y multipolar (Fig. III-5A). Además, algunas células bipolares mostraban una forma en V (Fig. III-5B). Algunos precursores microgliales del AMMC tenían prolongaciones filamentosas similares a los observados en los precursores que migran centro-periféricamente (capítulo I de la presente tesis). Estas prolongaciones podían localizarse tanto en el polo celular que mira hacia el extremo del AMMC que crece temporo-dorso-nasalmente como en el polo opuesto (Fig. III-5A, B). También se observaban numerosas parejas de precursores microgliales unidos por un fino puente citoplasmático (Fig. III-5C), similares a las parejas de células recién divididas descritas en el AMCP (capítulo II de esta tesis). Estos resultados sugerían que las células que migran en el AMMC mostraban un comportamiento migratorio y una actividad proliferativa similares a las descritas en el AMCP (capítulos I y II de la presente tesis).

Orientación de las células en distintos niveles topográficos del AMCP y AMMC: diferencias temporo-nasales

En los niveles temporales de retinas de E7-E11, las células microgliales del AMCP se orientaban formando un ángulo agudo con la trayectoria circunferencial de los precursores microgliales del AMMC (Figs. III-6C y III-7). Pero a medida que las células microgliales procedentes del AMCP confluían con el AMMC, su orientación era progresivamente más paralela a las células que migran circunferencialmente. Finalmente, los precursores microgliales de ambas áreas se mezclaban y mostraban orientaciones similares (Fig. III-6C). Estas observaciones sugerían que en regiones temporales de la retina, algunas células que habían migrado centro-periféricamente en el AMCP se incorporaban al AMMC en donde migraban circunferencialmente.

En los niveles dorsales de la retina, los precursores microgliales del AMCP se orientaban de una forma más o menos perpendicular a los del AMMC (Fig. III-7). La confluencia entre ambas áreas en estos niveles dorsales tenía lugar entre E10 y E11. En la zona de confluencia, los precursores microgliales del AMCP mantenían una orientación perpendicular a los que migraban circunferencialmente en el AMMC (Fig. III-8). Por lo tanto, a diferencia de lo descrito en los niveles temporales, no había un progresivo cambio de orientación de las células que migraban centro-periféricamente conforme éstas se acercaban al AMMC.

En los niveles nasales, igual que en los niveles temporales, las células microgliales del AMCP mostraban una orientación oblicua en relación a la ora serrata (Figs. III-6D y III-7). En el AMMC de estos niveles muchas células estaban orientadas circunferencialmente. Sin embargo, los ensanchamientos del AMMC de los niveles ND y N de la retina de E9 (Fig. III-3D), previamente descritos, contenían precursores microgliales orientados oblicuamente a la trayectoria circunferencial (Figs. III-6E y III-7B). La presencia de estas células microgliales del AMMC, ligeramente desviadas hacia el centro de la retina y con una orientación no circunferencial, sugería que algunos precursores microgliales del AMMC cambiaban su trayectoria en la mitad nasal, introduciéndose desde el margen de la retina hacia el centro de la misma. Estas células que migraban centralmente desde el margen

retiniano llegaban a confluir con el frente de avance del AMCP, dando lugar a los puentes AMCP/AMMC de la mitad nasal de la retina de E10. Por ello, en la mitad nasal, la confluencia entre células del AMMC y del AMCP tenía lugar en zonas retinianas algo más alejadas del margen que en la mitad temporal. Además, las células que confluían procedentes de ambas áreas tenían la misma orientación oblicua (comparar D y E de la Fig. III-6).

Las observaciones descritas en este apartado sugerían que en la mitad temporal había una incorporación de células del AMCP al AMMC, mientras que en la mitad nasal parecía haber una incorporación desde el AMMC hacia el AMCP. Una vez que había tenido lugar la confluencia del AMCP con el AMMC en todo el perímetro marginal de la retina, no era posible distinguir las células de una y otra procedencia, ya que no existían diferencias morfológicas entre ambas. Por lo tanto, no se pudo determinar el destino final de los precursores microgliales que parecían migrar desde el margen nasal hacia regiones más centrales de la retina.

Ramificación de los precursores microgliales del AMMC: diferencias temporonasaes

A partir de E12, las células orientadas circunferencialmente en el margen de la retina se ramificaban progresivamente. La ramificación de estas células seguía una evolución topográfica similar a la migración de las mismas, de forma que las células de la mitad temporal estaban más adelantadas en el proceso de ramificación que las de la mitad nasal. La comparación de los niveles TV, que es el más adelantado, y NV, que es el más atrasado, en retinas de diferentes estadios de desarrollo (Fig. III-9) hacía muy evidentes estas diferencias.

Cuando se comparaba la morfología de los precursores microgliales en el nivel TV, se podía comprobar que el proceso de ramificación de las células orientadas circunferencialmente era incipiente en E12 (Fig. III-9A), estaba más avanzado en E15 (Fig. III-9C), y estaba prácticamente conseguido en P3 (Fig. III-9E). En este estadio, la completa ramificación de las células microgliales del margen de la retina hacía desaparecer la orientación circunferencial de las mismas.

En el nivel NV del margen de la retina, los precursores microgliales todavía mostraban una morfología ameboide en retinas de E12 (Fig. III-9B). En E15, tenían una orientación claramente circunferencial y un aspecto poco ramificado, parecido al observado en el nivel TV de E12 (Fig. III-9D). En P3, la ramificación había avanzado, pero las células microgliales todavía mostraban una orientación circunferencial (Fig. III-9F), que denotaba que la ramificación no estaba totalmente conseguida. La finalización de la ramificación microglial en este nivel NV tenía lugar en los últimos días de la primera semana postnatal.

Desarrollo de células dendríticas en el cuerpo ciliar y entrada de precursores microgliales en la periferia de la retina

En las extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica de embriones E5-E10, se observaban células QH1 positivas en el esbozo de iris y cuerpo ciliar. La morfología, densidad y localización de estas células dentro del cuerpo ciliar dependían del estadio de desarrollo estudiado. Además, en cada estadio, existían grandes diferencias entre distintos niveles topográficos.

En E5, las células QH1 positivas del cuerpo ciliar adoptaban una morfología ameboide, con lamelipodios, que a veces emergían de cortos y gruesas prolongaciones celulares, orientadas en cualquier dirección (Fig. III-10A). Estas células se localizaban en zonas cercanas a la pupila, separadas de la ora serrata por un espacio carente de ellas. Además, se observaban principalmente en los niveles TV, T, TD, D y ND del cuerpo ciliar, aunque unas pocas se disponían en el nivel NV y todavía menos en el nivel N.

En E6, había mayor cantidad de células QH1 positivas en todos los niveles del esbozo de cuerpo ciliar, sobre todo en los niveles TV, T y TD (Fig. III-10B). Estas células tenían una morfología más dendrítica que en E5. Es decir, su forma era más alargada y tenían mayor número de prolongaciones celulares con lamelipodios más finos y largos. Además, tanto el soma como las prolongaciones y lamelipodios tendían a disponerse en la dirección de los pliegues radiales del cuerpo ciliar, es decir, se orientaban perpendicularmente a la ora serrata. Algunas células QH1 positivas así orientadas se localizaban adyacentes a la ora serrata y

mostraban el soma y algunas prolongaciones dentro del cuerpo ciliar, mientras que otras prolongaciones se adentraban en el margen de la retina (Fig. III-10B). Este tipo de células a medio camino entre el cuerpo ciliar y la retina se localizaban principalmente en los niveles TV, T y TD. Por el contrario, en el nivel N la densidad de células QH1 positivas era mucho menor y ninguna se localizaba cerca de la ora serrata. Estos resultados, junto a la presencia de los primeros precursores microgliales en el margen de la misma (Figs. III-3A y III-10B), sugerían la existencia de una migración de células QH1 positivas desde el cuerpo ciliar hacia la retina, que en este estadio del desarrollo tenía lugar en niveles temporales.

En E7, la orientación perpendicular a la ora serrata de las células QH1 positivas del cuerpo ciliar era más evidente. Además, en los niveles TV, T, TD y D había una mayor concentración de las mismas en las cercanías de la ora serrata. En estos niveles, se observaban algunas células a medio camino entre el cuerpo ciliar y la zona marginal de la retina (Fig. III-10C). Las porciones de estas células situadas en la retina mostraban una orientación circunferencial, mientras que las prolongaciones localizados en el cuerpo ciliar tendían a orientarse perpendiculares a la ora serrata. En el nivel N del cuerpo ciliar, cuyo desarrollo estaba muy retrasado, había un ligero incremento en la densidad de células QH1 positivas pero éstas todavía no se observaban en localizaciones adyacentes a la ora serrata.

En E8, las células QH1 positivas del cuerpo ciliar eran más alargadas y dendríticas y mantenían su orientación perpendicular a la ora serrata (Fig. III-10D, E). En los niveles TV, T, TD, D y ND muchas de estas células se concentraban en las zonas adyacentes a la ora serrata, y seguían observándose células que parecían estar pasando desde el cuerpo ciliar a la retina (flechas en la Fig. III-10D, E). En el nivel N del cuerpo ciliar aún había pocas células QH1 positivas, aunque algunas de ellas ya habían alcanzado el límite con la retina.

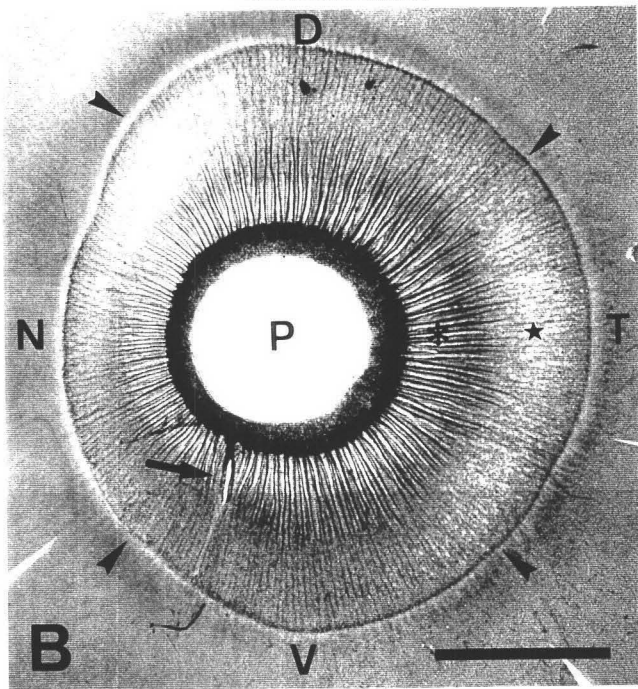
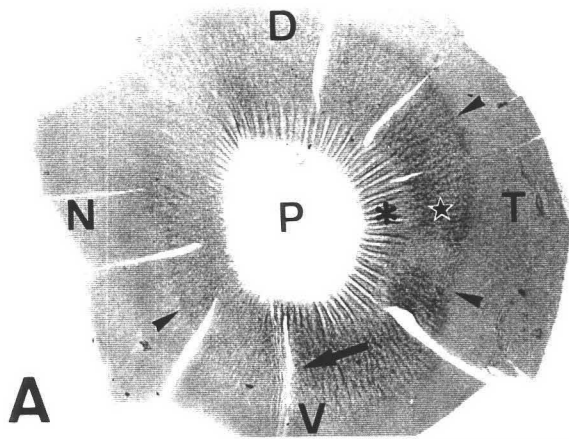
En E9, las células QH1 positivas del cuerpo ciliar tenían una morfología y orientación similares a las descritas en E8, aunque el nivel V estaba más desarrollado, mostrando mayor número de células con una morfología dendrítica, orientada perpendicularmente a la ora serrata (Fig. III-10F). Las regiones en las que se observaban células QH1 positivas a medio camino entre el cuerpo ciliar y la retina se extendían a todo el perímetro del cuerpo ciliar, incluyendo los niveles N,

NV y V. (Fig. III-10F), sugiriendo que la entrada de precursores microgliales desde el cuerpo ciliar hacia el margen periférico de la retina tenía lugar en toda la circunferencia de la ora serrata.

En E10, las células QH1 positivas del cuerpo ciliar continuaban mostrando una morfología dendrítica y una orientación más o menos perpendicular a la ora serrata. La entrada de precursores microgliales desde el cuerpo ciliar, parecía tener lugar en todos los niveles de la ora serrata, aunque parecía especialmente incrementada en los niveles D y ND, que coinciden con los espacios de superficie retiniana situados entre el AMCP y el AMMC que en este estadio carecen todavía de precursores microgliales (ver Fig. III-3E). Además, las células QH1 positivas a medio camino entre el cuerpo ciliar y la retina periférica eran menos evidentes en la mitad temporal, sugiriendo que la entrada de células en la retina desde el cuerpo ciliar estaba comenzando a desaparecer en dicha mitad.

Todos estos resultados sugieren que había una entrada de células QH1-positivas desde el cuerpo ciliar hacia la retina, en donde migrarían circunferencialmente en el AMMC. Esta entrada comenzaba en niveles temporales y parecía extenderse en dirección temporo-dorso-nasal hasta alcanzar niveles ventrales. Una vez que había llegado a estos niveles, la entrada de células desde el cuerpo ciliar iba desapareciendo siguiendo el mismo patrón temporo-dorso-nasal.

Fig. III-1. Extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica de ojos derechos de embriones de codorniz de E6 (**A**) y E10 (**B**), en las que se observa la pupila (P), el esbozo de iris, el cuerpo ciliar, con su parte plegada (asterisco) y su parte plana (estrella), y la ora serrata (cabezas de flechas), que constituye el límite entre el cuerpo ciliar y la retina. En la zona ventral del cuerpo ciliar se observa una banda clara (flecha) que se dispone de forma paralela a los pliegues de la parte plegada y que en estadios iniciales del desarrollo (**A**) aparece como una prolongación de la fisura óptica desde la ora serrata hasta el esbozo de iris. Conforme avanza el desarrollo, esta banda ventral va quedando relegada a la parte plegada del cuerpo ciliar (**B**). Barra de escala: 1,5 μm .



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Fig. III-2. Montaje total de retina (**A-C**) y extensión de cuerpo ciliar / retina periférica (**D-F**) inmunomarcados con QH1, obtenidos de ojos derechos de codorniz de E8. **A:** Vista general del montaje total de retina en el que se indican dos áreas que están aumentadas en **B** y **C**. La cabeza del nervio óptico / pecten (flecha) se localiza en la mitad ventral y está desplazada hacia el lado temporal. **B:** Aumento de la zona temporal periférica en la que se observan precursores microgliales QH1-positivos localizados en el margen retiniano con una orientación paralela a la ora serrata (orientación circunferencial). **C:** Aumento de una zona intermedia de la retina temporal que muestra células microgliales QH1-positivas orientadas de forma oblicua a la línea de la ora serrata. **D:** Vista general con luz transmitida de la extensión de cuerpo ciliar / retina periférica sometida a inmunofluorescencia con el anticuerpo QH1. La zona señalada con una flecha se muestra aumentada en **E**. **E:** Aumento del límite cuerpo ciliar / retina periférica en el nivel temporal en el que se observan precursores microgliales QH1-positivos en el margen retiniano (R) con una orientación circunferencial. Dentro del cuerpo ciliar (CC) se observan células QH1-positivas con morfología dendrítica que tienden a localizarse cerca de la ora serrata. Una célula QH1-positiva del cuerpo ciliar (flecha) se observa en **F** aumentada con microscopía confocal. Está orientada perpendicularmente a la ora serrata y muestra dos prolongaciones orientadas circunferencialmente dentro de la retina. En todas las imágenes dorsal queda arriba y temporal a la izquierda. Barra de escala: 5 mm para **A** y **D**; 550 μm para **B**, **C** y **E**; 60 μm para **F**.

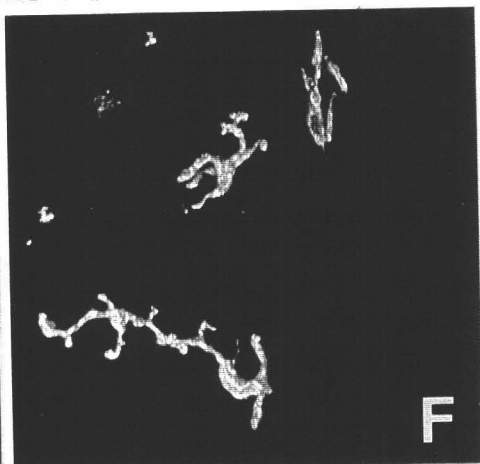
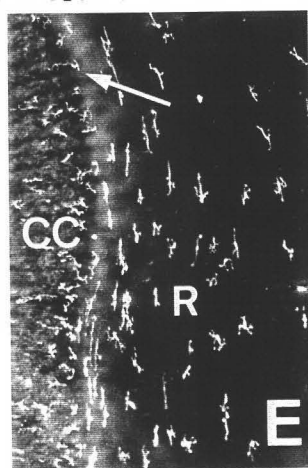
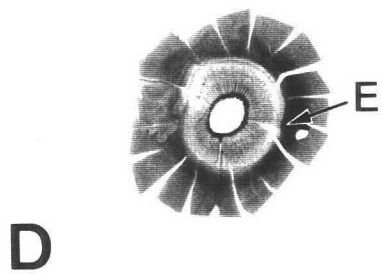
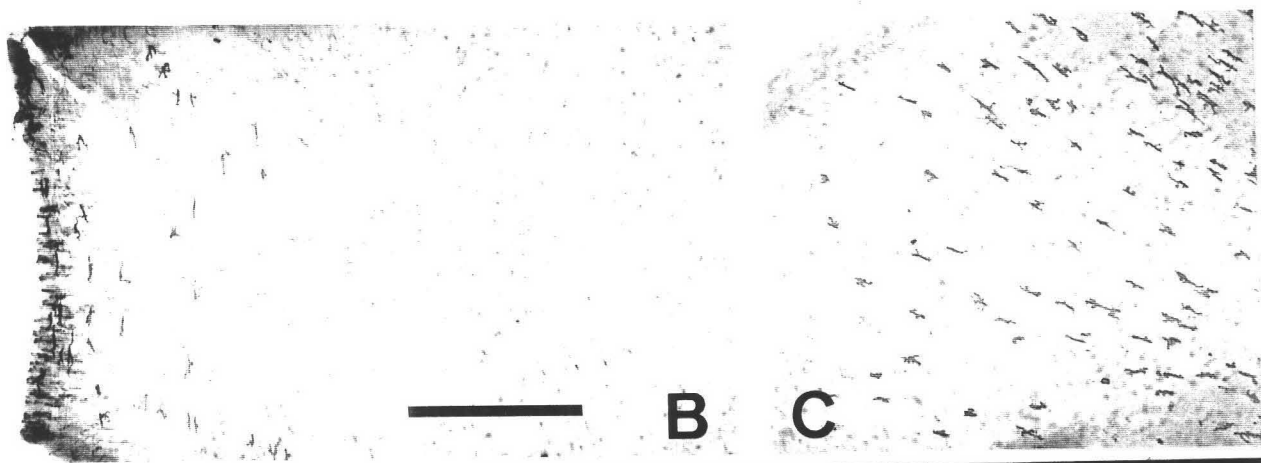
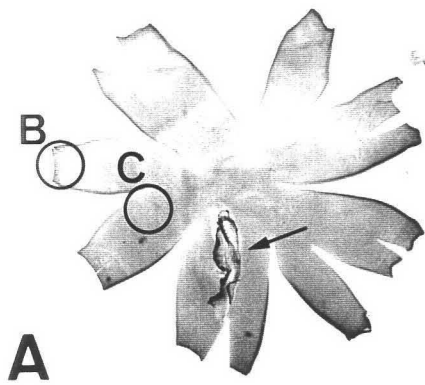
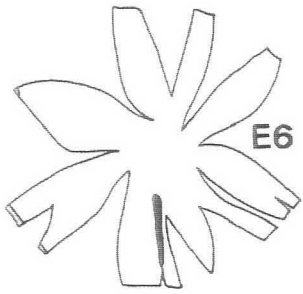
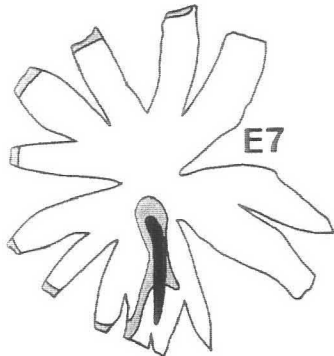


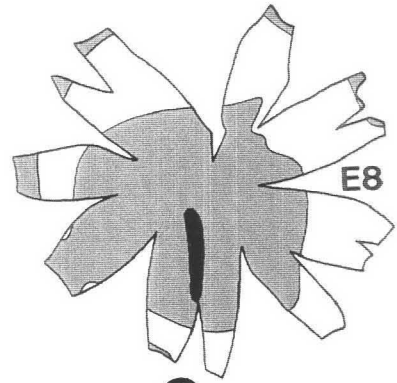
Fig. III-3. Mapas de distribución de precursores microgliales en proceso de migración tangencial en la capa de fibras nerviosas, realizados a partir de montajes totales de retinas de codorniz de E6 (A), E7 (B), E8 (C), E9 (D), E10 (E), E11 (F) y E12 (G), tratados con inmunocitoquímica-QH1. Las áreas rellenas en color gris representan zonas ocupadas por precursores microgliales y las áreas en blanco son zonas carentes de ellos. Se identifican dos áreas de migración de precursores microgliales: el AMCP localizada alrededor de la cabeza del nervio óptico (en negro) y el AMMC, situada en el margen periférico de la retina. En E7 (B), el AMCP conecta con el AMMC a través del estrecho puente AMCP/AMMC de la mitad temporal, con células microgliales orientadas centro-periféricamente, que se va ensanchando en E8-E9 (C, D), a medida que aumenta el AMCP, hasta ocupar toda la mitad temporal en E10 (E). En la mitad nasal, la conexión entre el AMCP y el AMMC se produce en E10 (E) en dos puntos del cuadrante nasodorsal (puentes AMCP/AMMC de la mitad nasal), como consecuencia del avance del AMCP y la migración hacia el centro de algunos precursores microgliales desde el AMMC (D). En E10-E11 (E, F), en la retina periférica nasal se observan varias franjas desprovistas de precursores microgliales, como consecuencia de la existencia de los puentes AMCP/AMMC nasales. En E12 (G) toda la retina se encuentra colonizada por precursores microgliales que migran tangencialmente en la capa de fibras nerviosas.



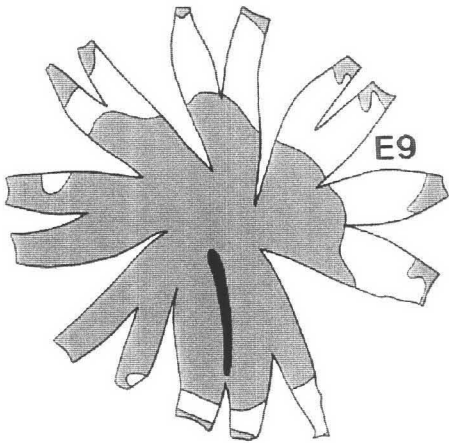
A



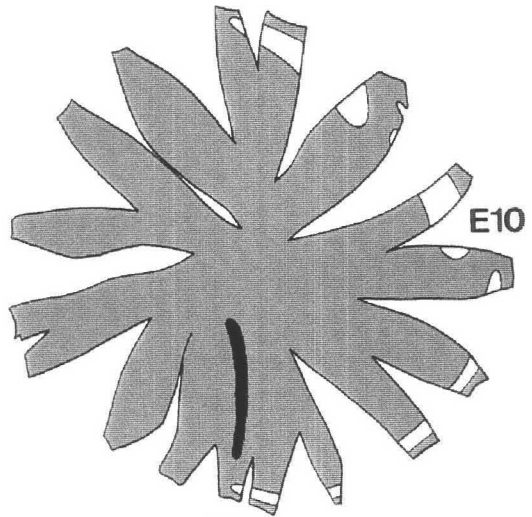
B



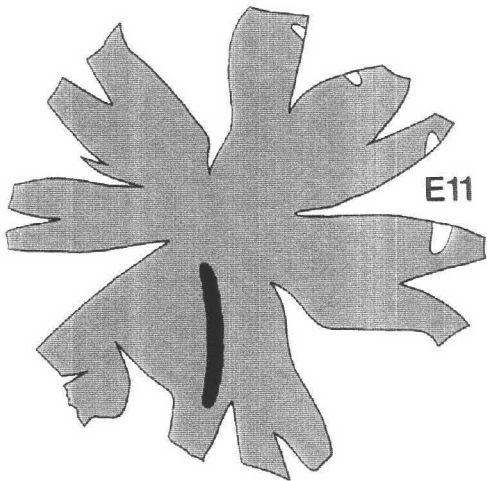
C



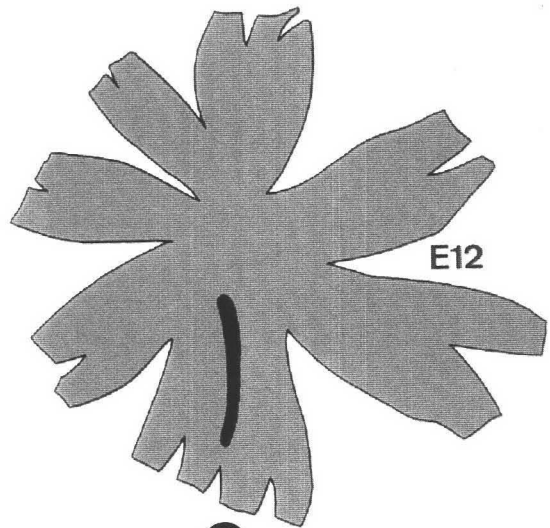
D



E



F



G

Fig. III-4. Nivel temporal (A) y nasal (B) de una extensión de cuerpo ciliar / retina periférica de E10 tratada con inmunofluorescencia-QH1. La densidad de precursores microgliales del AMMC en el nivel temporal (A) es muy superior a la observada en el nivel nasal (B). Además, en el nivel temporal (A), las células QH1-positivas del cuerpo ciliar tienden a concentrarse cerca de la ora serrata, mientras que en el nivel nasal (B) se distribuyen de forma más homogénea. En ambas micrografías la parte dorsal queda hacia abajo. R, retina; CC, cuerpo ciliar. Barra de escala: 250 μ m.

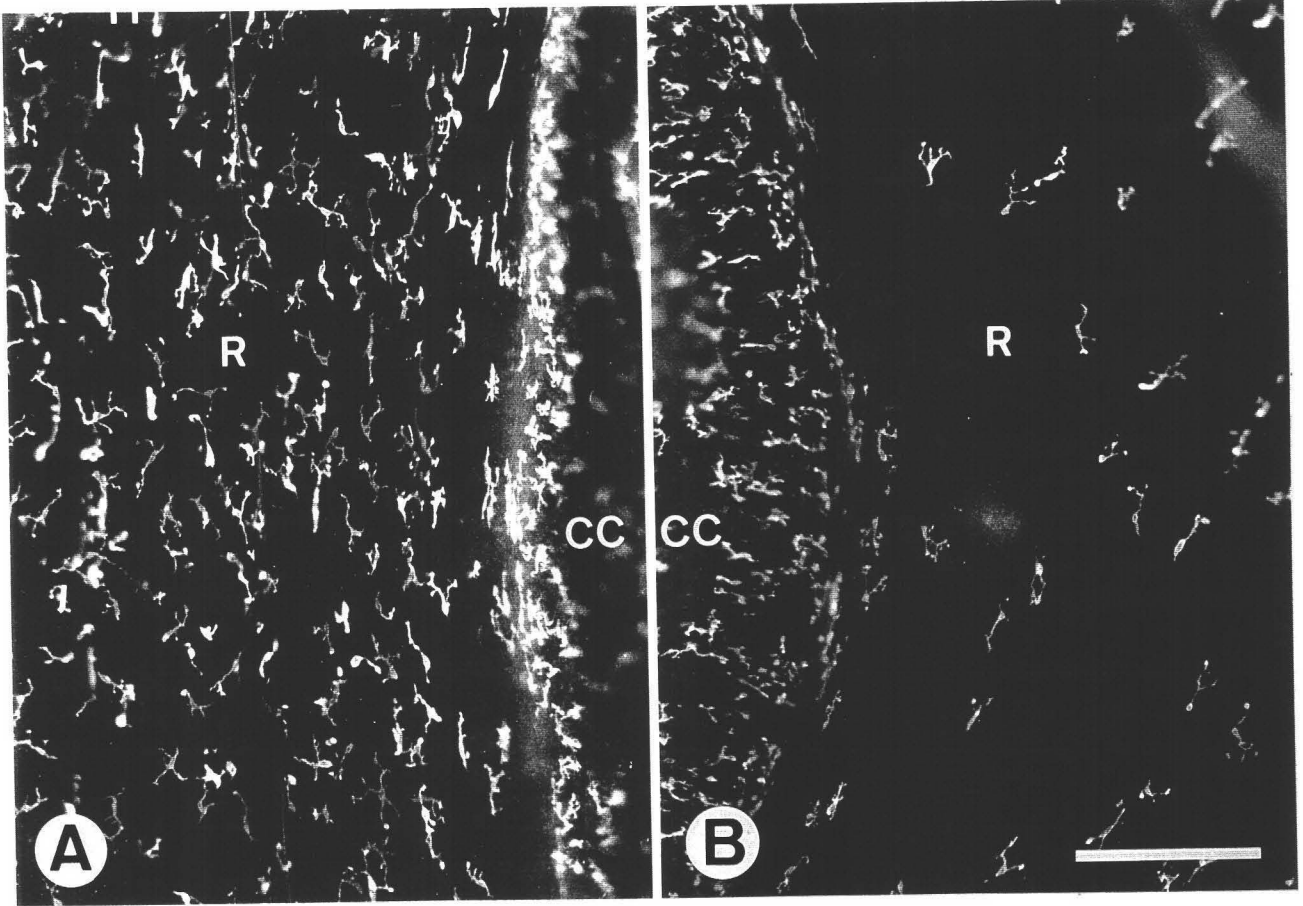


Fig. III-5. Precursores microgliales QH1-positivos pertenecientes al AMMC de retinas derechas de codornices de E8, vistos con inmunofluorescencia QH1 en extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica. Las tres micrografías corresponden al nivel temporal, quedando la zona dorsal hacia la izquierda. **A:** Células microgliales con morfología monopolar o multipolar que muestran prolongaciones filamentosas (flechas), similares a las observadas en los precursores que migran centro-periféricamente. **B:** Tres precursores microgliales del AMMC, dos de ellos con una morfología monopolar con prolongaciones y lamelipodios en uno de los polos celulares y una prolongación filamentosas en el otro (flechas), y un tercero con una morfología bipolar en forma de V (asterisco). **C:** Pareja de precursores microgliales QH1-positivos unidos por un fino puente citoplasmático (flecha) similar a las parejas de células recién divididas existentes en el área de migración centro-periférica. Barra de escala: 100 μ m.

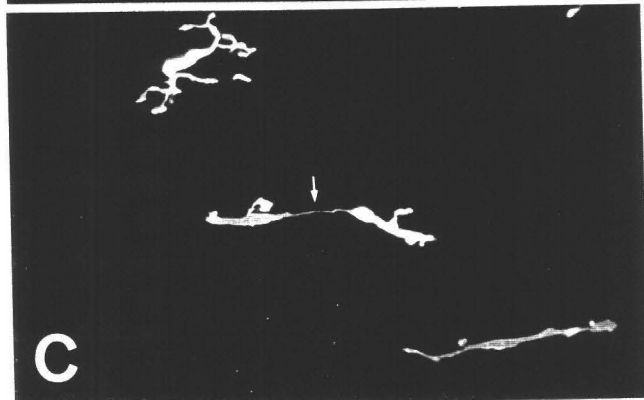
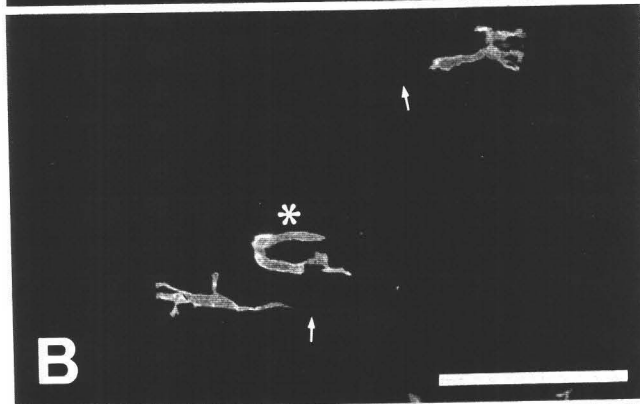


Fig. III-6. Montaje total de retina de codorniz de E9, tratado con inmunocitoquímica-QH1. **A:** Dibujo del montaje total en el que se representan los límites del AMCP y AMMC. Se indica mediante un recuadro la franja de retina mostrada en **B**. El área alargada en negro representa la cabeza del nervio óptico / base del pecten. **B:** Vista a pequeño aumento de una franja retiniana tomada desde el nivel temporoventral (izquierda) hasta el nivel nasodorsal (derecha), con precursores microgliales QH1-positivos localizados en el AMCP y en el AMMC. En la zona central y abajo se observa la parte dorsal de la cabeza del nervio óptico (asterisco). Las flechas vacías señalan las zonas que se muestran aumentadas en **C**, **D** y **E**. **C:** Zona temporoventral periférica en la que se observa la confluencia entre el AMCP y el AMMC. A medida que los precursores microgliales que migran centro-periféricamente se acercan al margen retiniano muestran una orientación más paralela a la de los precursores que migran circunferencialmente. **D:** Aumento del frente de avance del AMCP en una zona intermedia de la retina nasal. La orientación de los precursores microgliales es oblicua a la ora serrata. **E:** Aumento de un ensanchamiento del AMMC en la zona nasodorsal, en el que se observan precursores microgliales orientados de forma oblicua a la ora serrata que parecen estar migrando hacia la retina central. Barra de escala: 2 mm para **B**; 500 μ m para **C**, **D** y **E**.

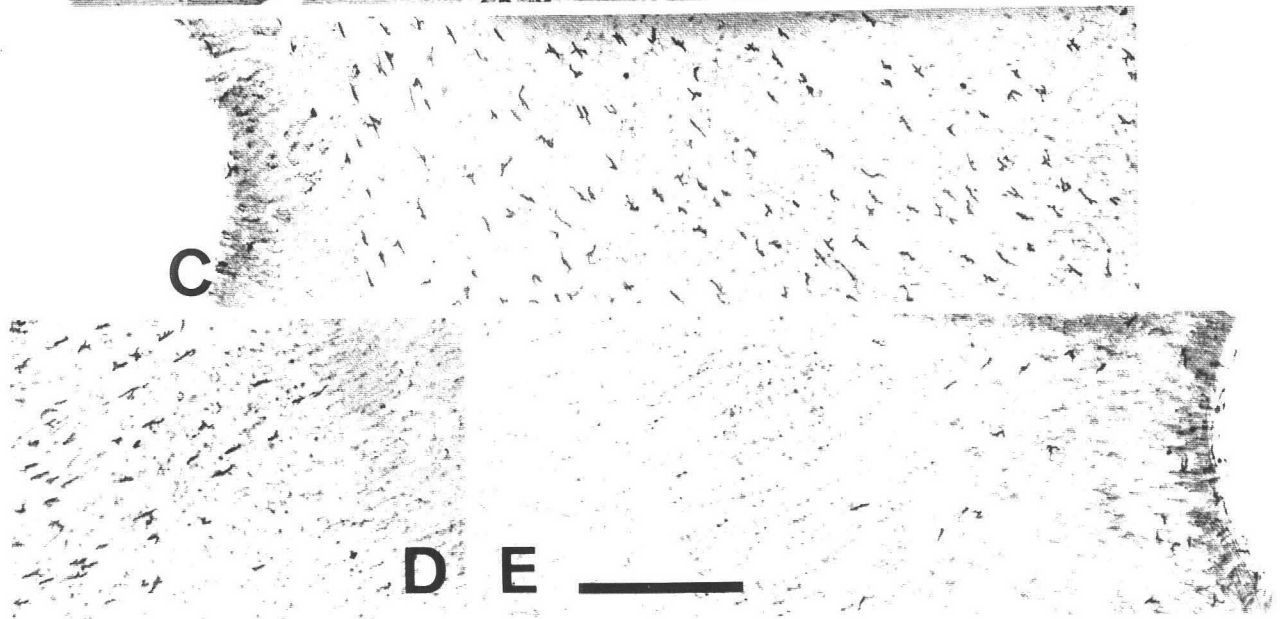
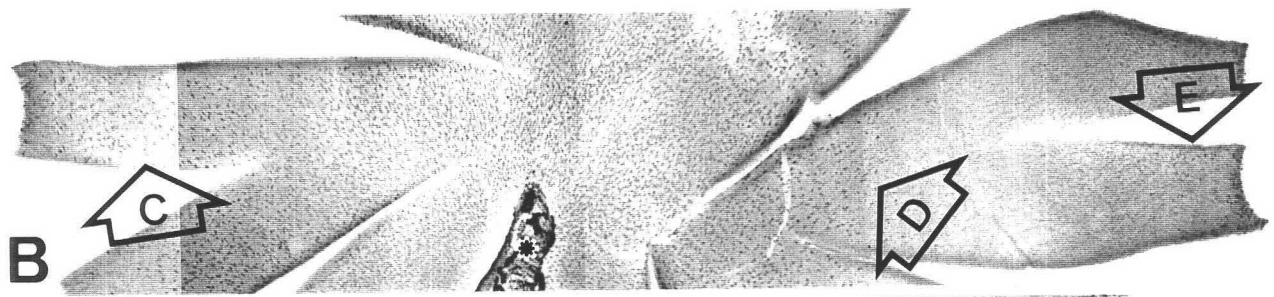
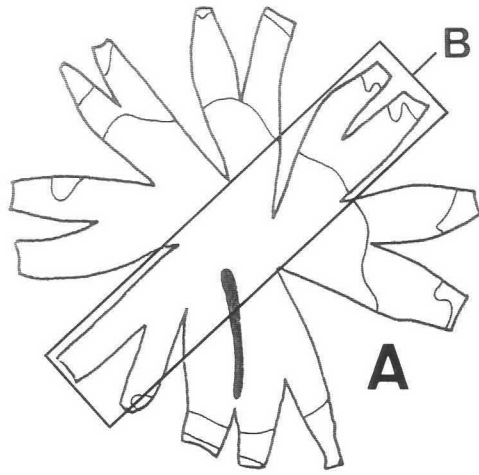


Fig. III-7. Representación de las trayectorias seguidas por los precursores microgliales en el AMCP (líneas punteadas terminadas en punta de flecha) y el AMMC (flechas), como se deduce de las observaciones efectuadas en los montajes totales de retinas de E8 (A), E9 (B) y E10 (C). Las áreas sombreadas representan las zonas de la retina que contienen células microgliales y las áreas en blanco son las zonas desprovistas de ellos.

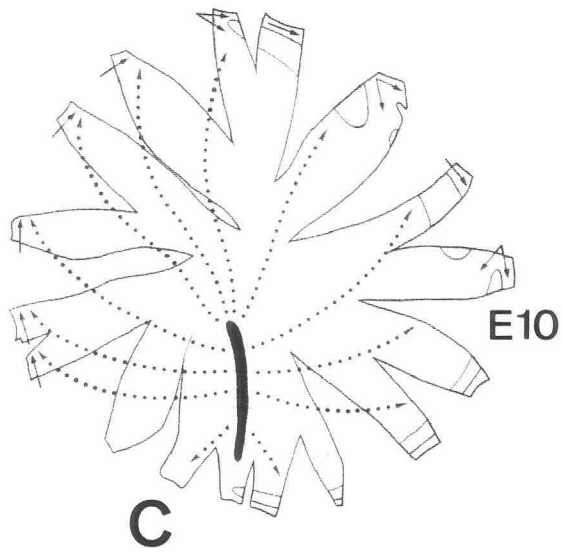
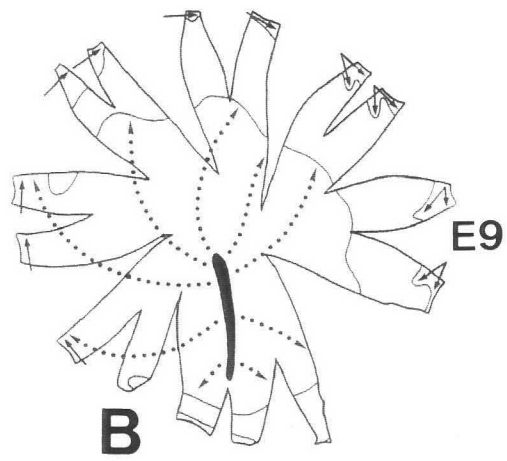
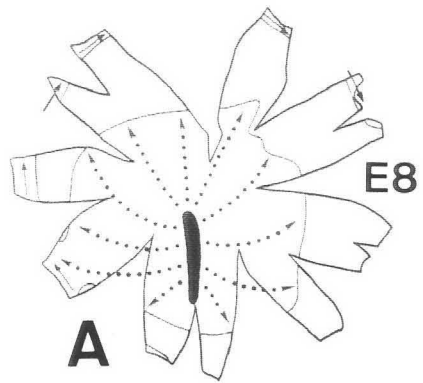


Fig. III-8. Vista con microscopía confocal de la zona de confluencia entre el AMCP y el AMMC en el nivel temporo-dorsal de una extensión de cuerpo ciliar / retina periférica de E10 tratada con inmunofluorescencia-QH1. Se observan precursores que migran centro-periféricamente (MC-P), que están orientados perpendicularmente a los que migran circunferencialmente (MC). En la zona de confluencia (a la izquierda) muestran una orientación variable. El cuerpo ciliar queda hacia arriba y el nivel temporal está hacia la izquierda. Barra de escala: 150 μm .

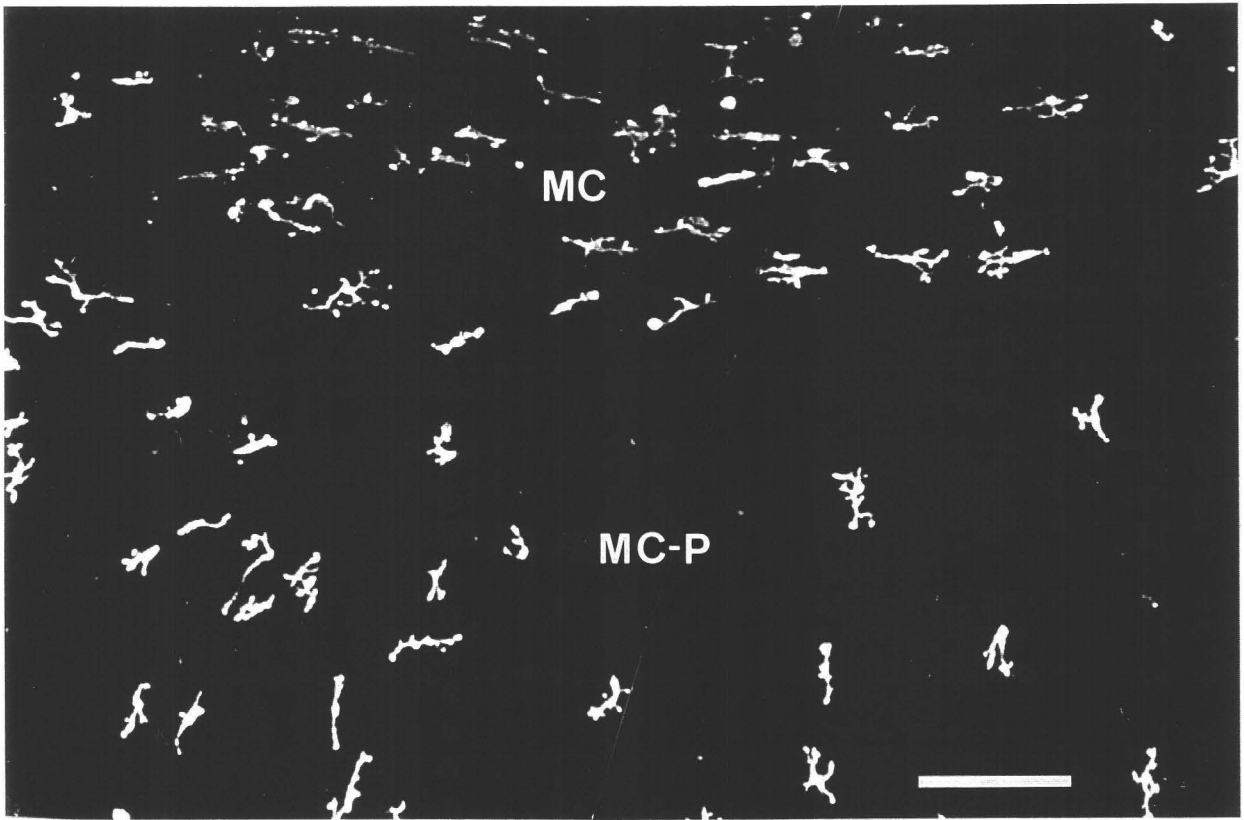


Fig. III-9. Comparación de la ramificación de células microgliales en los niveles marginales temporoventrales (**A, C**) y nasoventrales (**B, D**) de extensiones de retina de E12 (**A, B**) y P3 (**C, D**) tratadas con inmunocitoquímica-QH1. La ramificación de las células orientadas circunferencialmente en el margen de la retina es casi completa en el nivel temporoventral de P3 (**C**), mientras que en el nivel nasoventral (**D**) todavía se observan algunas células microgliales poco ramificadas con una orientación circunferencial. TV, temporoventral; NV, nasoventral. Barra de escala: 200 μ m.

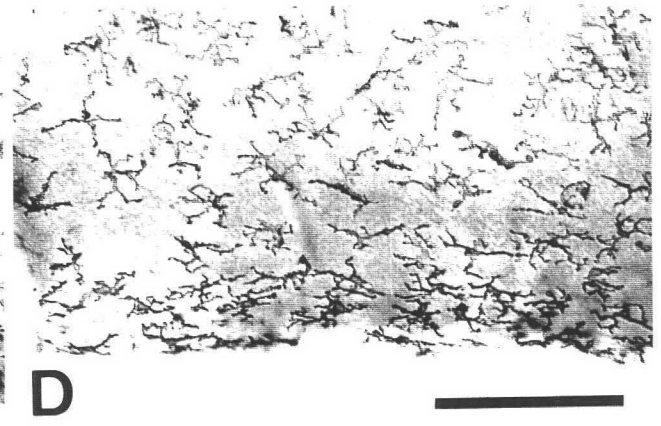
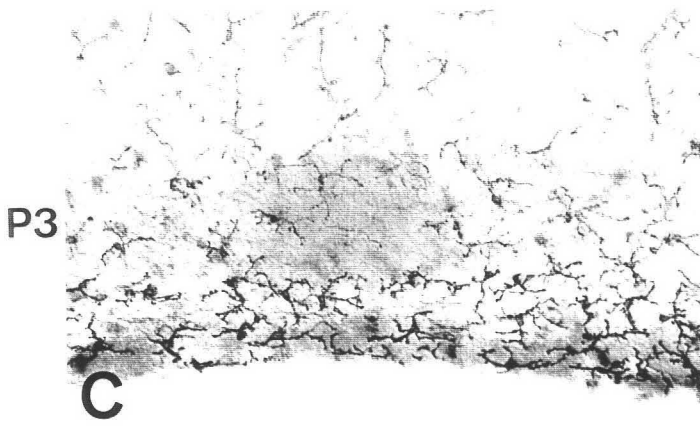
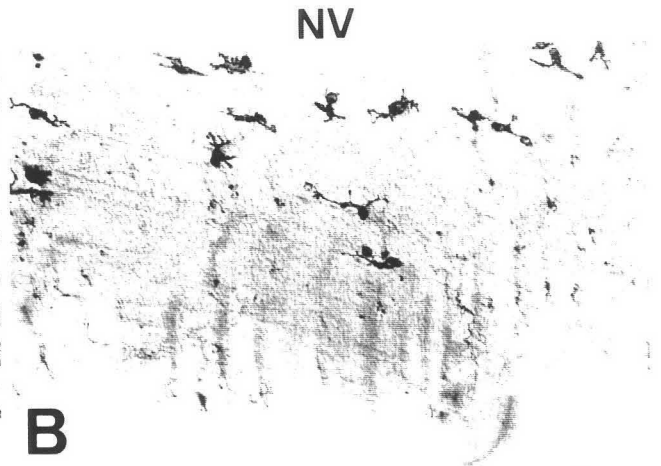
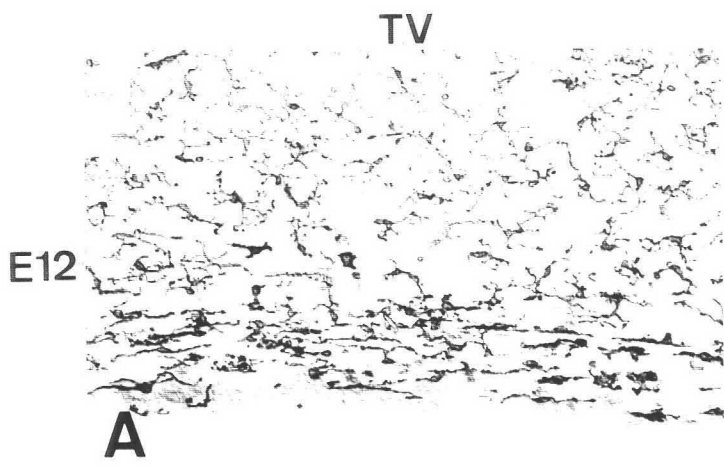
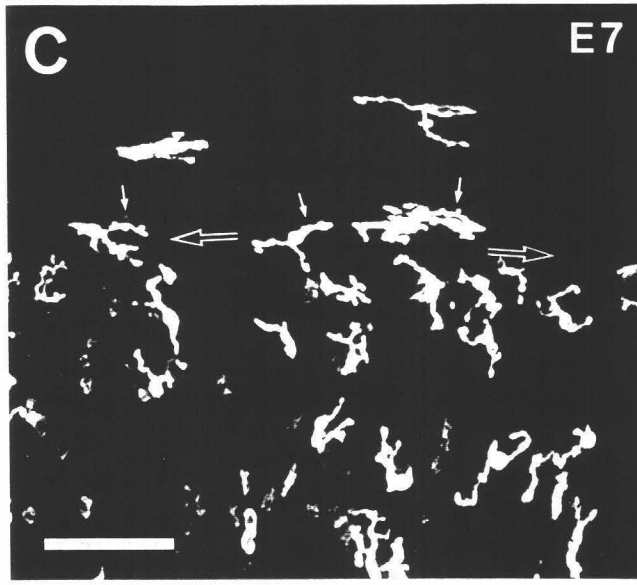
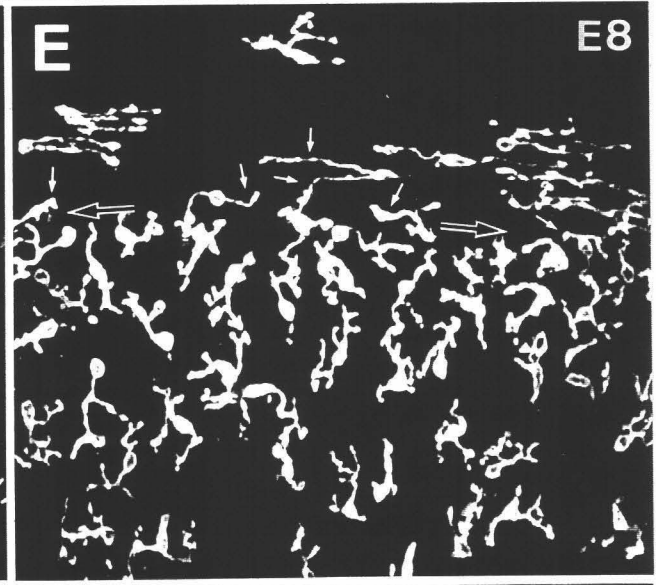
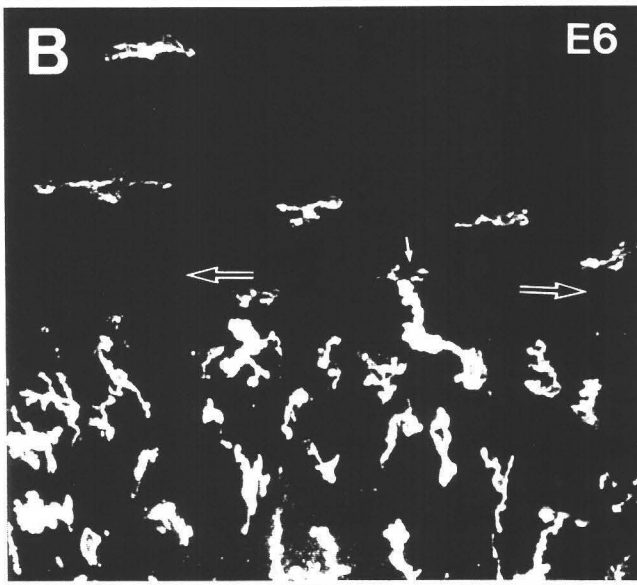
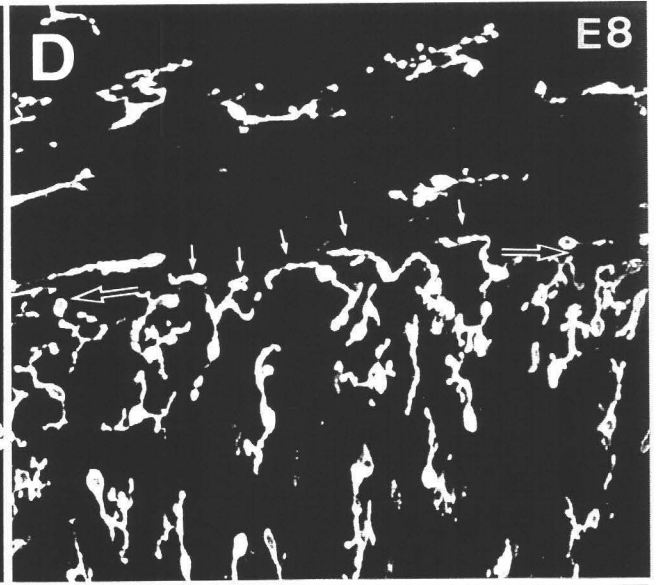
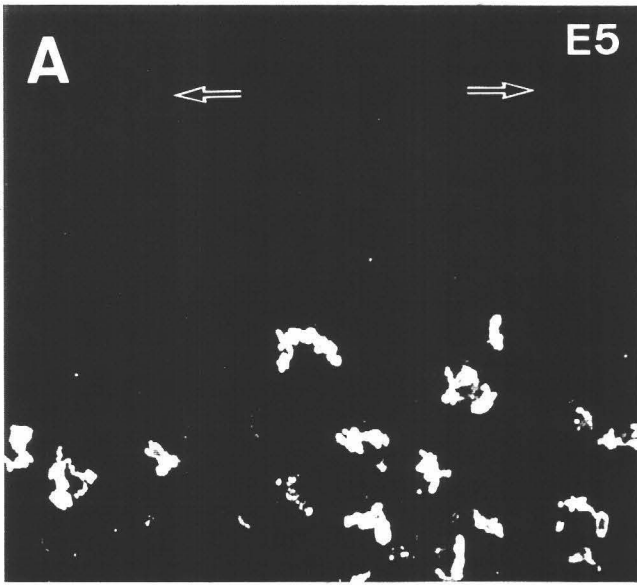


Fig. III-10. Imagen con microscopía confocal de células QH1-positivas en extensiones de cuerpo ciliar / retina periférica de ojos derechos de codornices de E5 (A), E6 (B), E7 (C), E8 (D, E) y E9 (F). Las flechas grandes señalan el límite entre el cuerpo ciliar y la retina periférica (ora serrata). Las imágenes corresponden al nivel temporal (A-E) y ventral (F). Las células QH1-positivas del cuerpo ciliar de E5 muestran una morfología ameboide y están separadas de la ora serrata por un espacio vacío de células (A). Entre E6 y E8 las células QH1-positivas del cuerpo ciliar son progresivamente más numerosas, se aproximan a la ora serrata en dirección perpendicular a la misma y adoptan una morfología más dendrítica (B-E). Algunas células del cuerpo ciliar que se disponen en el límite con la retina muestran el soma o algunas prolongaciones dentro del cuerpo ciliar con una orientación perpendicular a la ora serrata, mientras que otras prolongaciones se adentran en la retina periférica y muestran una orientación circunferencial (flechas pequeñas). Otros precursores microgliales orientados circunferencialmente están claramente situados en la retina periférica. F: Nivel ventral del cuerpo ciliar de una codorniz de E9 en el que comienzan a observarse algunas células QH1-positivas a medio camino entre el cuerpo ciliar y la retina (flechas pequeñas). Barra de escala: 50 μ m.



DISCUSIÓN

Migración marginal circunferencial de precursores microgliales y orientación del sustrato

El presente estudio aporta nuevos datos acerca de la migración tangencial de los precursores microgliales en la retina. Hemos demostrado la existencia de una migración marginal circunferencial que no había sido descrita con anterioridad, ni en aves ni en mamíferos. Únicamente, en estudios realizados en la retina humana, se ha descrito una migración periférica de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar (Diaz-Araya et al., 1995a, b). Sin embargo, estos precursores microgliales de la retina periférica humana muestran una orientación perpendicular a la ora serrata y no una orientación circunferencial. Así pues, existen dos tipos de migración tangencial de precursores microgliales en la retina de la codorniz: una migración centro-periférica desde la CNO/BP y una migración marginal circunferencial paralela a la ora serrata. El conocimiento exacto de las rutas migratorias de los precursores microgliales durante la colonización de la retina es de gran importancia antes de efectuar manipulaciones experimentales que induzcan alteraciones del modelo de migración de este tipo de células.

El patrón cronotopográfico de distribución y la orientación de los precursores microgliales que migran circunferencialmente en el AMMC (véase Figs. III-2 y III-3) coincide exactamente con el modelo de desarrollo de los fascículos de fibras ópticas circunferenciales que se observan en el margen de la retina del embrión de pollo (Goldberg y Coulombre, 1972). Las fibras ópticas marginales comienzan a desarrollarse en la retina de pollo a partir de E5.5, que equivale a E5 de la codorniz (Zacchei, 1961), en un punto localizado en la retina temporal, desde el cual siguen direcciones divergentes. En E7 (E6 de la codorniz), estas fibras muestran ya una orientación circunferencial, ocupando los niveles TV, T y TD del margen de la retina, y el punto de divergencia se localiza en el nivel TD. En este estadio no se observan fibras circunferenciales en la mitad nasal. Paralelamente, en la retina de codorniz de E6, se observan los primeros precursores microgliales del AMMC ocupando los niveles temporales de la retina (Fig. III-3A). Entre E7 y E12 (E6-E9 de

la codorniz), el punto de divergencia de las fibras circunferenciales se va desplazando progresivamente hasta alcanzar el nivel ND. En E12 (E9 de la codorniz) ya se observan fibras con orientación circunferencial en toda la mitad nasal. Entre E6 y E9 de la codorniz, el AMMC alcanza los niveles D (E7), ND (E8) y N (E9) (Fig. III-3B-D). En E9, se observa una diferencia importante en la orientación entre las fibras ópticas periféricas temporales y nasales. Las fibras temporales salen del margen de la retina formando un ángulo agudo, dirigiéndose hacia las regiones ventrales. Sin embargo, las fibras nasales salen del margen de la retina con un ángulo más próximo a 90°, de tal forma que se dirigen hacia regiones centrales. Estas diferencias temporo-nasales en la orientación de las fibras nerviosas periféricas, coinciden con la incorporación al AMMC de células que han migrado centro-periféricamente en la mitad temporal y la migración periférico-central de células desde el AMMC en la mitad nasal (véase las Figs. III-6 y III-7). Por lo tanto, los precursores microgliales del AMMC siempre ocupan regiones del margen retiniano en las que existen fibras circunferenciales, mostrando la misma orientación que éstas. Por otra parte, la orientación de los precursores microgliales que migran centro-periféricamente en el AMCP también coincide con la orientación centro-periférica de los fascículos de fibras ópticas en porciones no marginales de la retina (Goldberg y Coulombre, 1972; Halfter et al., 1985). La orientación circunferencial o centro-periférica de las fibras ópticas determina esa misma orientación en los canales flanqueados por prolongaciones radiales de células de Müller, sobre cuyos pies terminales migran los precursores microgliales (capítulo I de esta tesis). Por lo tanto, podemos concluir que tanto la migración marginal circunferencial como la migración centro-periférica parecen estar mediadas por la orientación del sustrato.

El margen periférico de la retina podría constituir una "vía de circunvalación retiniana" que utilizarían los precursores microgliales para migrar desde la parte temporal a la nasal (como se deduce de lo descrito en resultados; véase la Fig. III-7) o desde la nasal a la temporal (posibilidad que puede suceder, aunque nuestros resultados no permiten pronunciarse). Este desplazamiento sería probablemente más rápido que si las células intentasen pasar de una mitad retiniana a otra a través de la zona central, en donde tendrían que seguir trayectorias que cruzan los

canales flanqueados por prolongaciones radiales de células de Müller. En este caso, tendrían que desplazarse en direcciones diferentes a la orientación de un sustrato que además está siendo atravesado por otras células que migran a favor de la orientación del sustrato. El significado del desplazamiento de los precursores microgliales desde una mitad de la retina a otra es desconocido.

Entrada en la retina de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren fuertemente que hay una entrada en la retina de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar que parecen incorporarse al conjunto de células que migran circunferencialmente en el margen de la retina (véase Fig. 10). Esta entrada de células microgliales desde el margen de la retina está de acuerdo con los resultados de Diaz-Araya et al. (1995a, b) en la retina embrionaria humana, aunque estos autores sugieren que dichas células migran desde la periferia hacia el centro de la retina, no observando una incorporación de éstos a una migración circunferencial.

Los precursores microgliales que migran circunferencialmente tienen una doble procedencia. Algunos proceden de células que previamente han migrado centro-periféricamente procedentes de la CNO/BP, que se incorporan al AMMC a través del puente AMCP/AMMC de la mitad temporal que aparece en E7 y crece en dirección temporo-dorso-nasal (véase la Fig. III-7). Otros proceden del cuerpo ciliar (véase Fig. III-10)

Esta doble vía de entrada de precursores microgliales en la retina es compatible con la posible heterogeneidad de la microglía retiniana descrita por el grupo de Provis (Penfold et al., 1991; Provis et al., 1995). Estos autores defienden que en la retina humana hay dos poblaciones de células microgliales, una de células de linaje macrofágico y otra de células de linaje dendrítico, y que ambas poblaciones tienen diferentes vías de entrada (Diaz-Araya et al., 1995a,b). En el caso de la codorniz, las células que entran desde la CNO/BP parecen ser de naturaleza macrofágica, independientemente de si proceden del nervio óptico (procederían de macrófagos que lo invaden en etapas precoces del desarrollo,

Moujahid et al. 1996) o del pecten (serían macrófagos que se localizan inicialmente en los tejidos del pecten en desarrollo). Las que entran desde el cuerpo ciliar (véase la Fig. III-10) parecen ser de tipo dendrítico, ya que las células QH1-positivas del mismo muestran una morfología similar a las células dendríticas descritas en el cuerpo ciliar de rata, ratón y hombre (Knisely et al., 1991; McMenamin et al., 1992, 1994) y tienen la misma localización dentro de éste (entre la capa pigmentada y la no pigmentada del epitelio ciliar).

La entrada de precursores microgliales desde el cuerpo ciliar es compatible con los resultados previos en nuestro laboratorio, que demuestran la entrada de precursores microgliales en el cerebro de embriones de codorniz desde zonas restringidas de las meninges (Cuadros et al., 1994; Navascués et al., 1996; Cuadros et al., 1997). Téngase en cuenta que las meninges que envuelven al cerebro se continúan a través de las cubiertas meníngeas del nervio óptico con la coroides de la retina y ésta, a su vez, con el tejido conectivo ricamente vascularizado del cuerpo ciliar. Por lo tanto, la coroides y la zona de tejido conectivo del cuerpo ciliar adyacente a la retina serían cubiertas retinianas conceptualmente equivalentes a las meninges del cerebro. Así, las células QH1 positivas que pasan desde el cuerpo ciliar a la retina a través de la ora serrata parecen proceder de una zona restringida de la cubierta de la retina. Después de su entrada en la retina por esta vía, los precursores microgliales migran circunferencialmente de forma semejante a las largas migraciones que tienen lugar en el cerebro desde sus puntos de entrada a sus destinos finales (Cuadros et al., 1994; Navascués et al., 1996; Cuadros et al., 1997)

Asimetría del desarrollo de la microglía en la retina

El desarrollo de la microglía en la retina es claramente asimétrico, y sigue un gradiente temporo-dorso-nasal, de forma que entre E6 y P3 el cuadrante temporoventral siempre es el más desarrollado y el cuadrante nasoventral es el menos avanzado. Esta asimetría coincide con las diferencias naso-temporales descritas en la retina humana por Diaz-Araya et al. (1995a). Estos autores observan que la retina temporal es colonizada por precursores microgliales antes que la

retina nasal. Además, encuentran diferencias morfológicas entre las células de las mitades temporal y nasal, mostrando una mayor ramificación las de la mitad temporal.

En la retina de la codorniz, la asimetría del desarrollo de la microglía se manifiesta en varios procesos:

a) Asimetría de la migración tangencial centro-periférica. Desde E7, cuando se inicia la migración centro-periférica, hasta E12, cuando toda la superficie vítrea de la retina está rellena de precursores microgliales, la migración centro-periférica siempre está más avanzada en la mitad temporal que en la nasal. La llegada al margen de la retina en la parte temporal antes que en la parte nasal parece ser consecuencia no solo de la menor distancia a recorrer debida a la menor extensión que ocupa la mitad temporal, sino también a que realmente hay una menor velocidad de desplazamiento de las células en la parte nasal. Esto es muy evidente si comparamos lo que sucede a ambos lados (temporal y nasal) de la parte ventral de la CNO/BP. En la parte temporal el puente AMCP/AMMC revela un estrecho reguero de células que en el primer día de migración centro-periférica (E7) ya alcanzan el margen de la retina (Fig. III-3B), mientras que en la parte nasal las células que migran centro-periféricamente desde esta parte ventral de la CNO/BP no llegan al margen retiniano hasta E11 (Fig. III-3F).

b) Asimetría de la migración marginal circunferencial. Comienza en el nivel TV y avanza en dirección temporo-dorso-nasal, para terminar en el nivel NV. Por ello, entre E6 y E12, la migración marginal circunferencial siempre se ve más avanzada en la mitad temporal que en la mitad nasal (véase la Fig. III-4).

c) Asimetría de la entrada en la retina periférica de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar. En E6 entran en los niveles TV, T y TD y en los estadios siguientes van entrando en niveles que evolucionan en dirección temporo-dorso-nasal, hasta que en E9 la entrada se observa en la parte más ventral de la retina nasal.

d) Asimetría en la incorporación de precursores que migran centro-periféricamente a la vía de migración circunferencial, que parece suceder en la parte temporal, y de la incorporación de precursores que migran

circunferencialmente a una vía de migración periférico-central, que parece ocurrir en la parte nasal (véase Figs. III-6 y III-7).

e) Asimetría de la diferenciación de los precursores microgliales. La ramificación de los precursores microgliales orientados circunferencialmente se produce siguiendo un patrón cronotopográfico similar a la migración de los mismos, de forma que el proceso de ramificación se consigue antes en la mitad temporal que en la nasal, y finaliza en el cuadrante NV.

Además del desarrollo de la microglía, otros procesos del desarrollo de la retina de aves transcurren de forma asimétrica. Así, la neurogénesis en la retina de pollo (Prada et al., 1991), la muerte celular por apoptosis de neuronas de la CCG y CNI en la codorniz (capítulo IV de esta tesis), y la diferenciación de neuronas (Layer y Kotz, 1983; Halfter et al., 1985; Prada et al., 1991), fotorreceptores (Bruhn and Cepko, 1996) y glía de Müller (Casado et al., 1996) tienen lugar de forma asimétrica.

La asimetría del desarrollo de la retina parece ser una consecuencia del desarrollo asimétrico del ojo en su conjunto. Téngase en cuenta la asimetría del desarrollo del cuerpo ciliar (presente trabajo) y la asimetría de la anatomía retiniana (con la parte temporal más reducida que la parte nasal, como consecuencia de la localización ventrotemporal de la CNO).

REFERENCIAS

- Boya, J., Calvo, J., Carbonell, A.L. (1987) Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch. Histol. Jap.*, 50:223-228.
- 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*, 6:679-688.
- Bruhn, S.L., Cepko, C.L. (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J. Neurosci.*, 16: 1430-1439.
- Casado, F.J., Pouponnot, C., Jeanny, J.C., Lecoq, O., Calothy, G., Pierani, A. (1996) QR1, a retina-specific gene, encodes an extracellular matrix protein exclusively expressed during neural retina differentiation. *Mech. Dev.*, 54:237-250.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Martín-Partido, G., Navascués, J. (1992) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci. Lett.*, 148:11-14.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Quesada, A., Navascués, J. (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J. Comp. Neurol.*, 348:207-224.
- Cuadros, M.A., Rodríguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marín-Teva, J.L., Navascués, J. (1997) Microglia development in the quail cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 389:390-401.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L. (1995a) Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina. *Glia*, 15:458-470.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., Billson, F.A. (1995b) Development of microglial topography in human retina. *J. Comp. Neurol.*, 363:53-68.
- Gallego, A. (1976) La microglía de la retina. *An. R. Acad. Nac. Med.*, 93:393-407.
- Goldberg, S., Coulombre, A.J. (1972) Topographical development of the ganglion cell fiber layer in the chick retina. A whole mount study. *J. Comp. Neurol.*, 146:507-518.
- Halfter, W., Deiss, S., Schwarz, U. (1985) The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina. *J. Comp. Neurol.*, 232:466-480.

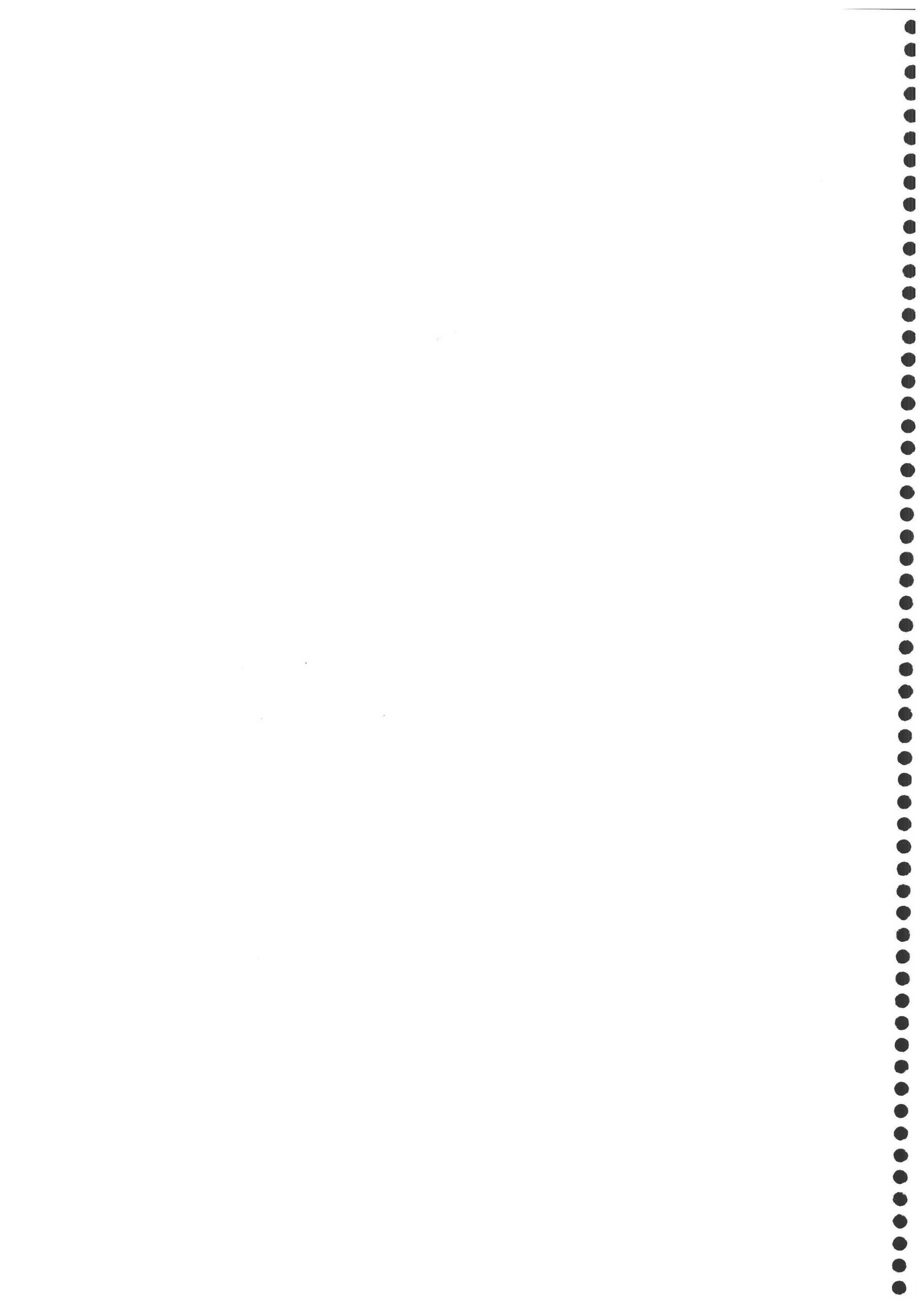
- Hume, D.A., Perry, V.H., Gordon, S. (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: Phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell. Biol.*, 97:253-257.
- Humphrey, M.F., Moore, S.R. (1995) Strain differences in the distribution of NDP-ase labelled microglia in the normal rabbit retina. *Glia*, 15:367-376.
- Knisely, T.L., Anderson, T.M., Sherwood, M.E., Flotte, T.J., Albert, D.M., Granstein, R.D. (1991) Morphologic and ultrastructural examination of I-A+ cells in the murine iris. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 32:2423-2431.
- Layer, P.G., Kotz, S. (1983) Asymmetrical developmental pattern of uptake of Lucifer Yellow into amacrine cells in the embryonic chick retina. *Neuroscience*, 9:931-941.
- McMenamin, P.G., Holthouse, I., Holt, P.G. (1992) Class II major histocompatibility complex (Ia) antigen-bearing dendritic cells within the iris and ciliary body of the rat eye: distribution, phenotype and relation to retinal microglia. *Immunology*, 77:385-393.
- McMenamin, P.G., Crewe, J., Morrison, S., Holt, P.G. (1994) Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:3234-3250.
- Moujahid, A., Navascués, J., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1996) Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat. Embryol.*, 193:131-144.
- Navascués, J., Moujahid, A., Quesada, A., Cuadros, M.A. (1994) Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J. Comp. Neurol.*, 350:171-186.
- Navascués, J., Moujahid, A., Almendros, A., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.*, 354:209-228.
- Navascués, J., Cuadros, M.A., Almendros, A. (1996) Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En Ling, E.A., Tan,

- C.K., Tan, C.B.C. (eds), *Topical Issues in Microglia Research*. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 43-64.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitis, P., Dieterlen-Lièvre, F., Buck, C.A. (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100:339-349.
- Penfold, P.L., Madigan, M.C., Provis, J.M. (1991) Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis. Neurosci.*, 7:383-388.
- 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.
- Provis, J.M., Penfold, P.L., Edwards, A.J., van Driel, D. (1995) Human retinal microglia: Expression of immune markers and relationship to the *glia limitans*. *Glia*, 14:243-256.
- Sanyal, S., De Ruiter, A. (1985) Inosine diphosphatase as a histochemical marker of retinal microvasculature, with special reference to transformation of microglia. *Cell Tiss. Res.*, 241:291-297.
- Schnitzer, J. (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 282:249-263.
- Vrabec, F. (1968) La microglie de la rétine, des voies optiques, du corps genouillé latéral, de l'aire striée, ainsi que du toit optique du Macaque. *Arch. Ophthalmol. (Paris)*, 28:417-426.
- Vrabec, F. (1970) Microglia in the monkey and rabbit retina. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 29:217-224.
- Zacchei, A.M. (1961) Lo sviluppo embrionale della quaglia giapponese (*Coturnix coturnix japonica* T.e.S.). *Arch. Ital. Anat. Embryol.*, 66:36-62.



CAPÍTULO IV

MUERTE CELULAR Y MIGRACIÓN DE PRECURSORES MICROGLIALES



RESUMEN

El objetivo del presente estudio era comprobar si la muerte celular es el estímulo que desencadena la entrada y migración de precursores microgliales en la retina de codorniz en desarrollo. Para ello hemos comparado los patrones cronotopográficos de distribución de células apoptóticas en la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa nuclear interna (CNI) con los patrones de migración tangencial y radial de los precursores microgliales durante el periodo comprendido entre el quinto día de incubación (E5) y el quinto día posteclosión (P5). Las células apoptóticas eran identificadas con la técnica TUNEL y los precursores microgliales con el anticuerpo monoclonal QH1.

La muerte celular en la CCG se observa entre E7 y E13, con un pico en E10. Comienza en una zona central y avanza siguiendo gradientes centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral, para finalizar en una banda periférica del cuadrante naso-ventral. La muerte celular en la CNI muestra un retraso respecto a la observada en la CCG, ya que comienza en E7 y finaliza en P3, mostrando un pico en E12. El modelo cronotopográfico de avance del área de distribución de células apoptóticas en la CNI es similar al observado en la CCG, mostrando los mismos gradientes y terminando también en la periferia del cuadrante naso-ventral.

La entrada y migración tangencial de precursores microgliales en la retina tiene lugar entre E7 y E16, coincidiendo parcialmente con el período de muerte celular en la CCG y en la CNI. Sin embargo, la migración de las células microgliales tiene lugar sobre los pies terminales de las células de Müller, por lo que no hay colocalización entre la microglía que migra tangencialmente y las células apoptóticas de la CCG. Cuando la microglía migra radialmente llega a alcanzar la CCG y entonces sí hay colocalización entre células ganglionares apoptóticas y células microgliales. Pero la llegada de microglía a la CCG sigue un patrón que muestra diferencias sustanciales con el patrón de distribución de células apoptóticas en la CCG. Todo ello sugiere que la muerte celular en la CCG no es el estímulo para la entrada y migración de la microglía en la retina.

Tampoco existe una correlación entre el patrón de distribución de células apoptóticas en la CNI y el patrón de llegada de precursores microgliales a la misma durante su migración radial en la retina. Por el contrario, el paso de las células microgliales a través de la CNI sólo tiene lugar cuando la muerte celular ha cesado en la misma, por lo que la muerte de neuronas en la CNI no sólo no atrae a los precursores microgliales, sino que parece impedir la migración radial de éstos en esta capa. Así, las células microgliales no participan en la fagocitosis de los restos de las células apoptóticas de la CNI, que es llevada a cabo por las células de Müller. Las células microgliales sí intervienen en la fagocitosis de restos de células ganglionares, aunque no es descartable que las células de Müller también participen en dicho proceso.

INTRODUCCIÓN

Las células de la microglía derivan de precursores relacionados con el linaje hematopoyético (Perry & Gordon, 1991; Theele & Streit, 1993; Ling & Wong, 1993; Navascués et al., 1996; Hurley & Streit, 1996) que tienen una procedencia externa al SNC. Durante el desarrollo, los precursores microgliales entran en el SNC, adquieren la morfología de microglía ameboide, y migran largas distancias a través del parénquima nervioso (Schnitzer, 1989; Pearson et al., 1993; Cuadros et al., 1994, 1997; Navascués et al., 1995, 1996; Wolswijk, 1995; capítulo I de esta tesis) antes de alcanzar sus lugares de destino, donde se diferencian en microglía ramificada (Murabe & Sano, 1982; Perry et al., 1985; Perry & Gordon, 1991; Ling & Wong, 1993; Wu et al., 1994; Navascués et al., 1995). La muerte natural programada mediante apoptosis de aquellas neuronas que no han conseguido establecer correctamente sus conexiones aferentes y eferentes (Oppenheim, 1991; Clarke, 1994; Clarke & Oppenheim, 1995; Lo et al., 1995; Naruse & Keino, 1995) ha sido propuesta como un factor que atrae a los precursores microgliales, estimulando su dispersión en el parénquima nervioso (Perry & Gordon, 1991; Thanos et al., 1996).

La hipótesis de que los precursores microgliales son atraídos por las neuronas que mueren ha sido apoyada por tres tipos de evidencias. En primer lugar, la coincidencia cronológica y topográfica entre las neuronas que mueren y los precursores microgliales durante el desarrollo del SNC. Esta coincidencia ha sido observada tanto en la retina (Hume et al., 1983; Perry, 1987; Schnitzer, 1989; Pearson et al., 1993) como en otras regiones del SNC (Perry et al., 1985; Perry, 1987; Ashwell, 1990, 1991; Perry & Gordon, 1991; Milligan et al., 1991). En segundo término, se ha descrito una estrecha asociación física entre neuronas apoptóticas y precursores de células microgliales, de forma que éstos son los principales fagocitos de restos de neuronas apoptóticas en el SNC (Wong & Hughes, 1987; Ashwell, 1990, 1991; Ferrer et al., 1990; Thanos, 1991; Thanos et al., 1996; Ashwell & Bobryshev, 1996; Egensperger et al., 1996; Moujahid et al., 1996; Dalmau, 1997). Una tercera línea de evidencia en favor de que la muerte

celular es un factor estimulante de la entrada y dispersión de precursores microgliales en el parénquima nervioso deriva de los resultados obtenidos en ratas con distrofia retiniana congénita (Thanos, 1992; Thanos & Richter, 1993; Roque et al., 1996; Thanos et al., 1996). En la retina de estos animales, la muerte de fotorreceptores desencadena la migración hacia la parte escleral de células microgliales localizadas en regiones más vítreas que previamente habían participado en la fagocitosis de los restos apoptóticos de células ganglionares.

En contra de la hipótesis de que la muerte celular sea el estímulo que desencadena la entrada de precursores microgliales en el SNC, en la retina de mamíferos se ha descrito la entrada de precursores microgliales mucho antes del período de muerte neuronal en la misma (Ashwell, 1989; Ashwell et al., 1989; Diaz-Araya et al., 1995b). Según Thanos et al. (1996) este hecho no contradice la relación entre muerte neuronal y entrada de precursores microgliales, sino que implica que dichos precursores también desempeñan un papel en la regulación de otros procesos de desarrollo anteriores a la muerte neuronal. Sin embargo, también es contraria a la citada hipótesis la ausencia de macrófagos en regiones cerebrales donde es conocida la existencia de muerte celular (Milligan et al., 1991). Por lo tanto, la hipótesis de que la muerte neuronal es el estímulo que atrae a los precursores microgliales durante el desarrollo del SNC es controvertida y necesita ser revisada en nuevas investigaciones.

La muerte neuronal durante el desarrollo normal de la retina ha sido ampliamente investigada en mamíferos. En efecto, numerosos estudios han permitido conocer con detalle el patrón cronotopográfico de distribución de las neuronas que mueren en la capa de células ganglionares (CCG) de diferentes especies de mamíferos, como canguro (Dunlop & Beazley, 1987), gato (Wong & Hughes, 1987; Pearson et al., 1993), hamster (Sengelaub & Finlay, 1982; Sengelaub et al., 1986), rata (Cunningham et al., 1982; Linden & Perry, 1982; Potts et al., 1982; Dreher et al., 1983; Fawcett et al., 1984; Horsburgh & Sefton, 1987; Voyvodic et al., 1995), ratón (Hume et al., 1983; Young, 1984) y hombre (Penfold & Provis, 1986; Provis et al., 1987). La evolución durante el desarrollo de la muerte neuronal en la capa nuclear interna (CNI) también es bien conocida en canguro (Harman et al., 1989), gato (Wong & Hughes, 1987), rata (Spira et al., 1984;

Beazley et al., 1987; Horsburgh & Sefton, 1987; Voyvodic et al., 1995), ratón (Hume et al., 1983; Young, 1984; Robinson, 1988) y hombre (Penfold & Provis, 1986).

En aves, la evolución de la muerte celular durante el desarrollo de la retina también ha sido analizada en el embrión de pollo, conociéndose que existen tres períodos bien definidos de muerte celular por apoptosis. El primero de ellos tiene lugar en el neuroepitelio indiferenciado de la retina entre el segundo y tercer día de incubación (E2-E3) y coincide con el proceso de invaginación de las vesículas ópticas (García-Porrero & Ojeda, 1979; Martín-Partido et al., 1988). El segundo período de muerte celular programada se lleva a cabo entre E4 y E7, coincidiendo con el proceso de nacimiento de una gran proporción de células ganglionares en el seno del neuroepitelio retiniano y la consiguiente migración de éstas para ocupar su lugar en la CCG (Cuadros & Ríos, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Frade et al., 1996, 1997). El tercer período de apoptosis en la retina de embriones de pollo tiene lugar a partir de E8-E9, una vez que ha comenzado el proceso de inervación tectal de las células ganglionares (Rager & Rager, 1978; Rager, 1980; Hughes & McLoon, 1979; Straznicky & Chehade, 1987; Kobayashi, 1993; Frade et al., 1997). En este último período mueren una gran proporción de células ganglionares que no tienen éxito en el establecimiento de conexiones sinápticas con las neuronas tectales. Simultáneamente a la muerte de células ganglionares, también se ha descrito la existencia de apoptosis de interneuronas en la CNI de la retina de embriones de ave (Hughes & Lavelle, 1975; Yew, 1979; Kobayashi, 1993; Reuter & Zilles, 1993; Frade et al., 1997). Sin embargo, estos estudios solo daban noticia de este hecho, pero no determinaban el patrón cronotopográfico de la distribución de las neuronas que mueren en la CNI durante el desarrollo. Por lo tanto, es necesario estudiar detalladamente este patrón con objeto de determinar si la muerte neuronal en la CNI tiene influencia sobre la dispersión de precursores microgliales en la retina. Coincidiendo con el tercer período de apoptosis, los precursores microgliales entran en la retina de aves, en la que migran centro-periféricamente (Navascués et al., 1996).

En la retina avascular de aves la dispersión de los precursores microgliales durante el desarrollo tiene lugar mediante dos tipos bien definidos de migración: tangencial (en sentido centro-periférico) y radial (en sentido vítreo-escleral)

(Navascués et al., 1995, 1996). Probablemente, estos dos tipos de migración de células microgliales también tienen lugar en la retina de mamíferos. En efecto, los resultados de Hume et al. (1983) sugieren que en la retina de ratón tiene lugar una migración radial de precursores microgliales desde niveles vítreos hacia niveles esclerales, mientras que Diaz-Araya et al. (1995a,b) describen migración de microglía desde el disco óptico en la retina humana. Sin embargo, otros estudios no han observado las migraciones tangencial y radial de precursores microgliales durante el desarrollo de la retina de mamíferos (Schnitzer, 1989; Ashwell, 1989; Ashwell et al., 1989). Esto podría estar relacionado con la presencia de vasos sanguíneos en la retina de mamíferos, a través de los cuales los precursores microgliales podrían alcanzar sus localizaciones finales (Hume et al., 1983; Ashwell et al., 1989; Diaz-Araya et al., 1995a,b). La inequívoca existencia de migración centro-periférica y vítreo-escleral de los precursores microgliales en la retina de codorniz (Navascués et al., 1995) hacen de ella un material idóneo para comprobar la posible relación entre migración microglial y muerte neuronal en la CCG y CNI.

Por otra parte, para obtener conclusiones fiables en favor o en contra de la hipótesis que defiende que la muerte de neuronas en la retina es el estímulo que atrae a los precursores microgliales, el estudio comparativo entre la distribución de neuronas apoptóticas y la localización de precursores microgliales debe cumplir varios requisitos: 1) tener en cuenta que la muerte neuronal en la retina tiene lugar tanto en la CCG como en la CNI; 2) hacer determinaciones de distribución de neuronas apoptóticas y de precursores microgliales en intervalos de tiempo suficientemente cortos, que permitan conocer con precisión la evolución de dichas distribuciones durante el desarrollo; 3) en cada intervalo de tiempo considerado, hacer determinaciones en todas las regiones de la retina, para conocer con detalle las variaciones de distribución en dichas regiones. Algunos estudios que han comparado la dispersión de precursores microgliales con la presencia de neuronas apoptóticas durante el desarrollo de la retina de mamíferos solo han cuantificado neuronas picnóticas en la CCG (Schnitzer, 1989; Pearson et al., 1993), pero no en la CNI, mientras que otros no han determinado la densidad de neuronas apoptóticas en diferentes regiones retinianas (Hume et al., 1983) o los intervalos de

tiempo analizados no han sido suficientes (Hume et al., 1983; Schnitzer, 1989; Pearson et al., 1993).

En este estudio hemos establecido los patrones cronotopográficos de distribución de neuronas apoptóticas en la CCG y CNI durante el desarrollo de la retina de codorniz, a partir de determinaciones de densidad en todas las regiones de la retina a intervalos de tiempo de un día, durante todo el período de desarrollo en el que transcurre la muerte neuronal en la retina. Estos patrones han sido comparados con el patrón de dispersión de los precursores microgliales durante el mismo período de tiempo. Los precursores microgliales eran reconocidos mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo QH1, que marca todas las fases del desarrollo de la microglía de codorniz (Cuadros et al., 1992), mientras que las neuronas que mueren eran identificadas in situ mediante la técnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) (Gavrieli et al., 1992), específica para el reconocimiento de los extremos del DNA fragmentado, típico de neuronas apoptóticas (Johnson & Deckwerth, 1993; Bredesen, 1995).

Nuestros resultados demuestran que hay tres gradientes cronotopográficos de distribución de las neuronas que mueren, tanto en la CCG como en la CNI. Estos gradientes son centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral. La migración tangencial de precursores microgliales en la retina embrionaria coincide cronológicamente con la muerte de células ganglionares, pero dicha migración tiene lugar principalmente sobre los pies terminales de las células de Müller (capítulo I de esta tesis). Por otra parte, durante casi todo el período de muerte neuronal en la CNI, que tiene lugar durante la segunda mitad del desarrollo embrionario, en dicha capa no se observa colocalización de células microgliales y neuronas apoptóticas, siendo éstas fagocitadas por las células de Müller. Solo en la parte final del período de muerte neuronal en la CNI (a partir de E13), los precursores microgliales la atraviesan radialmente en sentido vítreo-escleral, para acceder a la capa plexiforme externa (CPE). Estos resultados sugieren que no hay una relación directa entre muerte de neuronas y dispersión de precursores microgliales en la retina, aunque la muerte neuronal podría desencadenar una cascada de acontecimientos en las células de Müller que podrían favorecer la migración tangencial y radial de las células microgliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) entre el quinto día de incubación (E5) y la eclosión (E16), y retinas de codornices de 1 a 5 días posteclosión (P1-P5). Estas etapas del desarrollo embrionario y posteclosión comprenden todo el período en el que tiene lugar la muerte neuronal en la CCG y CNI. Además, entre E6 y E16 se produce la entrada y migración tangencial de precursores microgliales en la retina (Navascués et al., 1995; capítulo III de esta tesis). Para la obtención de las retinas, las codornices eclosionadas se anestesiaron previamente con éter, de acuerdo con los métodos de eutanasia de la Unidad de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada.

Detección de cuerpos apoptóticos mediante la técnica TUNEL

Las neuronas apoptóticas de la CCG y la CNI, así como los fragmentos de las mismas, se marcaron mediante la técnica TUNEL (Gavrieli et al., 1992), que detecta de forma específica la fragmentación del DNA, característica de las células que mueren por apoptosis. Esta técnica está basada en la adición de desoxirribonucleótidos-trifosfato marcados con biotina a los extremos OH-3' del DNA de cadena doble o simple, gracias a la acción de la transferasa terminal de timo de ternera (TDT).

La técnica TUNEL se realizó tanto sobre montajes totales de retina como sobre secciones de 10 μm de retinas incluidas en parafina. En ambos casos, la fijación de las retinas se efectuó por inmersión en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1M (pH 7,4) durante 5-7 días a 4°C.

TUNEL sobre montajes totales de retina

Se emplearon dos embriones o codornices eclosionadas de cada uno de los días comprendidos entre E5 y P5. En cada animal, la retina derecha se sometía a la técnica TUNEL y la retina izquierda se trataba inmunocitoquímicamente con el anticuerpo QH1. Esto permitió comparar el patrón cronotopográfico de muerte

celular de la retina derecha con el patrón cronotopográfico de migración de precursores microgliales de la retina izquierda de los mismos individuos.

La retina derecha de cada animal, aislada según el procedimiento descrito previamente (Navascués et al., 1995; capítulo I de esta tesis), era sometida a la técnica de marcaje con TUNEL siguiendo el protocolo descrito por Gavrieli et al. (1992), con ligeras modificaciones. Durante todo el proceso, las retinas aisladas se sumergieron en las diferentes soluciones utilizadas y fueron sometidas a agitación. Tras una permeabilización previa con Triton X-100 1% en PBS 0,1M (pH 7.4) durante 45 minutos, las retinas se lavaron en PBS y se introdujeron durante 15 minutos en tampón Tris-CIH 10 mM (pH 8). Seguidamente se trataron durante 20 minutos en una solución de proteinasa K en tampón Tris-CIH (20 μ gr/ml), con el fin de eliminar las proteínas de los núcleos celulares, haciéndolos más accesibles a la reacción. Las retinas se lavaron durante 10 minutos en agua destilada, se sumergieron durante 5 minutos en agua oxigenada 3% para eliminar la actividad peroxidasa endógena, se lavaron de nuevo en agua destilada y se depositaron durante 15 minutos en el tampón TDT (Trizma base 30 mM, pH 7,2, cacodilato sódico 140 mM y cloruro de cobalto 1 mM). A continuación, se incubaron durante 2 horas a 37 °C en la solución de reacción, que estaba compuesta por 13 nmol/ml de biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) y 200 unidades/ml del enzima TDT (Boehringer Mannheim) en tampón TDT. La reacción se detuvo trasladando las retinas a un baño con tampón TB (cloruro sódico 300 mM, citrato sódico 30 mM), en el que permanecieron durante 15 minutos. Con posterioridad, las muestras se bloquearon durante 15 minutos con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS, se lavaron durante 5 minutos en PBS para eliminar el exceso de BSA y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Extravidin, Sigma, St. Louis, MO) diluído 1:20 en PBS. Después de lavar abundantemente en PBS, la actividad peroxidasa se reveló durante 5 minutos con diaminobenzidina 0,05% y agua oxigenada 0,03% en PBS. Finalmente, las extensiones de retina se lavaron en PBS y en agua destilada, y se montaron sobre portas pretratados con poli-L-lisina, utilizando Aquatex como medio de montaje (Merck, Darmstadt, Germany).

TUNEL sobre secciones de parafina

Se utilizaron secciones seriadas de 10 μm , en las que el plano de corte de la retina era perpendicular al eje naso-temporal del ojo y paralelo al eje dorso-ventral. Se seleccionaron parejas de cortes adyacentes a intervalos periódicos, que iban desde una pareja de cada 14 cortes para las retinas de E5 hasta una pareja de cada 25 cortes para las retinas de E16. De cada pareja de cortes, uno se sometía a la técnica TUNEL y el adyacente se destinaba a inmunocitoquímica con el anticuerpo QH1. Este procedimiento permitía comparar la distribución de cuerpos apoptóticos con la de precursores microgliales en las diferentes capas retinianas de cada estadio del desarrollo.

Una vez aisladas y fijadas, las retinas se lavaron en PBS 0.1M y en agua destilada, se deshidrataron en baños de etanol de concentración creciente y tolueno y se incluyeron en parafina. Las secciones seleccionadas se adhirieron sobre portas pretratados con poli-L-lisina (PM > 300.000, Sigma) 0,01%, se desparafinaron y se hidrataron.

El protocolo seguido para el marcaje con TUNEL de las secciones de retina fué similar al descrito para los montajes totales, con las únicas diferencias de que no se realizó la permeabilización previa con Triton X-100 y se acortaron los tiempos de incubación en proteinasa K (15 minutos), en la solución de reacción (1.5 horas a 37 °C) y en la solución bloqueante de BSA 2% en PBS (10 minutos). Finalmente, los cortes se deshidrataron, se aclararon con xilol y se montaron con DPX (BDH, Poole, England).

Reconocimiento de precursores microgliales mediante inmunocitoquímica con QH1

Para el marcaje de los precursores microgliales se utilizó inmunocitoquímica con el anticuerpo QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA), que reconoce células de linaje hemangioblástico de codorniz con la excepción de eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987) y todas las fases del desarrollo de las células microgliales de codorniz (Cuadros et al., 1992).

Inmunocitoquímica-QH1 sobre montajes totales

Se aislaron las retinas izquierdas de los mismos embriones de codorniz y codornices eclosionadas cuyas retinas derechas habían sido tratadas con TUNEL y se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS 0.1M (pH 7.4) durante 1-3 días a 4°C. La preparación de los montajes totales y el protocolo inmunocitoquímico con el anticuerpo QH1 se realizó como en trabajos anteriores (Navascués et al., 1995; capítulo I de esta tesis). Se empleó una anti-IgG de ratón biotinizada (Sigma) como anticuerpo secundario, que era visualizada con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Extravidin, Sigma) revelado con diaminobenzidina.

Inmunocitoquímica-QH1 sobre secciones

Se emplearon las secciones de parafina adyacentes a las utilizadas para TUNEL. El protocolo de inmunotinción con QH1 de estas secciones era similar al utilizado en los montajes totales, aunque variaban los tiempos y concentraciones de algunas soluciones. Después de desparafinar e hidratar, los cortes se lavaron con PBS durante 30 minutos, se trataron con agua oxigenada 0.35% en PBS durante 30 minutos para eliminar la actividad peroxidasa endógena, se lavaron de nuevo en PBS y se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por suero normal de cabra (Sigma) diluído 1:30 en solución de BSA 1% en PBS (BSA-PBS). Seguidamente, las secciones se incubaron en el anticuerpo QH1 diluído 1:2 en BSA-PBS durante 12 horas a 4°C, se lavaron en PBS durante 30 minutos, se incubaron en el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón biotinizada, Sigma) diluído 1:50 en BSA-PBS durante 45 minutos, se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron en el complejo avidina-biotina-peroxidasa diluído 1:200 en BSA-PBS durante 75 minutos. La actividad peroxidasa se reveló con diaminobenzidina. Después de una tinción de contraste con hematoxilina, los cortes se deshidrataron, se aclararon en xilol y se montaron con DPX.

Dobles marcajes para la detección simultánea de cuerpos apoptóticos y precursores microgliales

Se utilizaron dos técnicas de doble marcaje para el reconocimiento simultáneo de precursores microgliales y cuerpos apoptóticos. Por una parte, se realizó doble marcaje con TUNEL y QH1 sobre montajes totales de E8, E10 y E13 y sobre secciones de parafina de 10 μm de E10 y E13. También se empleó doble marcaje con Hoechst 33342 (Sigma) y QH1 sobre láminas de membrana limitante interna y pies terminales de células de Müller (láminas MLI/PTCM, capítulos I y II de esta tesis), obtenidas a partir de retinas de E10. Ambas técnicas se realizaron para comparar en una misma extensión de retina o en una misma sección la relación topográfica entre los cuerpos apoptóticos en las diferentes capas y los precursores microgliales, así como para comprobar la capacidad fagocítica de éstos. Se emplearon retinas de E8, E10 y E13, ya que en estos estadios había un elevado número de neuronas apoptóticas en la CCG o en la CNI y mostraban fases progresivamente más avanzadas de la migración de precursores microgliales en la retina.

Doble marcaje TUNEL/QH1

Tanto en los montajes totales de retina como en las secciones, primero se realizó el marcaje con TUNEL y a continuación la inmunotinción con QH1. El protocolo seguido en ambas técnicas fué similar al realizado en los marcajes simples, con la diferencia de que se utilizaron fluorocromos para la visualización de los nucleótidos añadidos a los extremos fragmentados de DNA (TUNEL) y del anticuerpo secundario (inmunotinción con QH1). Concretamente, en el marcaje con TUNEL se utilizó el complejo avidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), mientras que en la inmunotinción con QH1 se empleó como anticuerpo secundario una anti-IgG de ratón conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC, Sigma), omitiéndose la incubación en el complejo avidina-biotina-peroxidasa. No se utilizó ningún tratamiento para permeabilizar las muestras.

Doble marcaje Hoechst /QH1 sobre láminas MLI/PTCM

El aislamiento y preparación de las láminas MLI/PTCM se detalló en el capítulo I de esta tesis, mientras que la técnica de doble marcaje inmunofluorescente Hoechst/QH1 fué descrita en el capítulo II.

Determinaciones de densidad de cuerpos apoptóticos

La determinación de la densidad de cuerpos apoptóticos en diferentes regiones retinianas se llevó a cabo a partir de los recuentos efectuados en áreas muestreadas sobre los montajes totales de retina sometidos a la técnica TUNEL. Para ello, se dibujó el perfil de cada extensión de retina aumentada 12 veces y se superpuso una retícula de cuadrados de 1,5 cm de lado. Los puntos de intersección de dicha retícula se tomaron como los puntos de muestreo (Fig. IV-1). Cada uno de estos puntos se identificaba cuidadosamente en la extensión de retina con la ayuda del microscopio. El área de recuento en cada punto era de $10.000 \mu\text{m}^2$, empleando el objetivo de 40X. En cada área se contaron por separado los cuerpos apoptóticos en la CCG y en la CNI, que estaban claramente localizados en dos planos de foco diferentes. Solamente se contaron aquellos cuerpos apoptóticos cuyo diámetro era mayor que $4 \mu\text{m}$, y que por tanto correspondían a núcleos nada o poco fragmentados de células apoptóticas.

Para determinar las variaciones topográficas de distribución de neuronas apoptóticas en las extensiones de retina, cada una de ellas se dividió en cuatro cuadrantes: dorso-temporal (DT), dorso-nasal (DN), ventro-temporal (VT) y ventro-nasal (VN) y dentro de cada cuadrante se distinguió entre zona central y zona periférica (Fig. IV-1). Por lo tanto, se consideraron ocho zonas en cada retina. Para realizar esta división se tomó como referencia la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP), considerando que la línea que divide las mitades nasal y temporal estaba determinada por el eje longitudinal de la CNO/BP, mientras que la línea de división entre las mitades dorsal y ventral era perpendicular a la anterior y su posición estaba determinada por el extremo dorsal de la CNO/BP. Así, la CNO/BP separaba las mitades temporal y nasal de la retina y quedaba incluida en la mitad ventral. En cada cuadrante, la separación entre la zona central y la

periférica era una línea más o menos paralela al perímetro de la retina (ora serrata) localizada a una distancia de aproximadamente 3 mm de éste.

A partir de los recuentos, se determinó la densidad media de cuerpos apoptóticos por mm^2 en la CCG y CNI tanto en la totalidad como en cada una de las ocho zonas de las diferentes retinas utilizadas. Se utilizaron dos montajes totales pertenecientes a embriones diferentes por cada estadio. A partir de los valores de densidad encontrados en cada uno de ellos se determinó la densidad media de cuerpos apoptóticos en la CCG y CNI para cada estadio, considerando tanto la retina completa como los cuadrantes por separado y distinguiendo entre retina central y periférica.

Por otra parte, para mostrar el patrón cronotopográfico de la muerte celular en la CCG y CNI, se representaron mapas de isodensidad de cuerpos apoptóticos. Estos mapas se construyeron a partir de los dibujos de los montajes totales utilizados para hacer los recuentos, en los cuales los diferentes rangos de densidad de cuerpos apoptóticos determinados en los diferentes puntos de muestreo se agrupaban dentro de curvas de nivel de isodensidad. Cada rango de densidad se representaba con un color diferente.

Mapas de distribución de precursores microgliales

Para determinar los patrones cronotopográficos de migración tangencial y radial de los precursores microgliales en la retina se confeccionaron dos tipos de mapas de distribución de dichos precursores. Primeramente, los mapas de distribución de las células microgliales localizadas en la parte más vítrea de la retina, que estaban en proceso de migración tangencial. En segundo lugar, los mapas de distribución de los precursores microgliales localizados en diferentes capas de la retina, que estaban en proceso de migración radial.

Los mapas de distribución de las células microgliales que estaban migrando tangencialmente se confeccionaron a partir de recuentos de las células enfocadas en la parte más vítrea de montajes totales de retinas tratados con inmunocitoquímica-QH1. Estos recuentos se llevaron a cabo con una metodología similar a la descrita en los recuentos de cuerpos apoptóticos; es decir, se

efectuaron en áreas de $10.000 \mu\text{m}^2$ elegidas en los puntos de intersección de una redícula. A partir de estos recuentos se representaron mapas de isodensidad de las células microgliales en proceso de migración tangencial.

En los mapas de distribución de los precursores microgliales en proceso de migración radial se representaron cuatro niveles de localización de los mismos en la profundidad de la retina: a) el límite entre la capa de fibras nerviosas (CFN) y la CCG; b) la parte más vítrea de la capa plexiforme interna (CPI), justo por encima de la CCG; c) la parte más escleral de la CPI, justo por debajo de la CNI; y d) la CPE. Las áreas de distribución de células microgliales en la CPE se determinaron sobre montajes totales de retina, en los que dichas células eran fácilmente identificables por estar localizadas en el plano de foco de la CPE. Por el contrario, en los montajes totales de retina era difícil distinguir las células localizadas en los tres primeros niveles, ya que se superponían en planos de foco muy próximos. Por lo tanto, los límites de distribución de células microgliales en dichos niveles se determinaron sobre secciones tratadas con inmunocitoquímica-QH1. Posteriormente, estos límites eran representados con la mayor aproximación posible en los correspondientes mapas. En estos mapas de distribución de células microgliales en distintos niveles de profundidad de la retina no se representaron densidades celulares, sino solamente la presencia o no de microglía en cada nivel de profundidad.

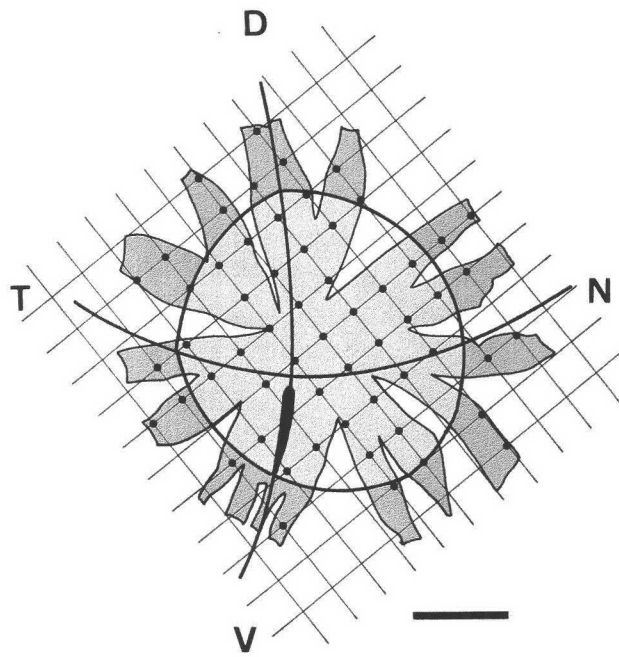
Aunque los mapas de distribución de las células microgliales se confeccionaron a partir de retinas derechas, dichos mapas se representaron como una imagen especular, semejando retinas izquierdas, con objeto de facilitar su comparación con los mapas de isodensidad de cuerpos apoptóticos.

Microscopía electrónica

Para identificar la naturaleza de las células encargadas de eliminar los cuerpos apoptóticos de la retina, se realizaron estudios con microscopía electrónica de transmisión (MET) sobre secciones ultrafinas de retinas de E9 y E10 y estudios con microscopía electrónica de barrido (MEB) sobre láminas MLI/PTCM de retinas

de los mismos estadios de desarrollo. Ambas técnicas han sido descritas en el capítulo I de esta tesis.

Fig. IV-1. Esquema que representa el método de muestreo utilizado en nuestro estudio. Sobre el dibujo de cada extensión de retina aumentada 12 veces, se superpuso una retícula de cuadrados de 1,5 cm de lado. Los puntos de intersección de dicha retícula se tomaron como puntos de muestreo. En cada extensión de retina se trazaron dos líneas. Una de ellas estaba determinada por el eje longitudinal de la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) y divide la retina en dos mitades, temporal (T) y nasal (N). La otra línea era perpendicular a la anterior y su posición estaba determinada por el extremo dorsal de la CNO/BP, separando las mitades dorsal (D) y ventral (V). Por lo tanto, cada extensión de retina se dividió en cuatro cuadrantes: dorso-temporal, dorso-nasal, ventro-temporal y ventro-nasal, y dentro de estos se distinguió entre zona central (en color gris claro) y zona periférica (en color gris oscuro). Barra de escala: 3 mm.



RESULTADOS

Apoptosis en la CCG y CNI

Durante el desarrollo de la retina de codorniz se observaron núcleos TUNEL+ tanto en la CCG como en la CNI (Fig. IV-2A), cuyo número y distribución eran variables en diferentes etapas del desarrollo. Con MET se observaban células de núcleo condensado, cuya cromatina formaba agregados bajo la envoltura nuclear (Fig. IV-2B). El citoplasma de estas células era algo más denso a los electrones que el de las células con núcleos normales y mantenía la integridad de sus orgánulos. Estos rasgos ultraestructurales, característicos del proceso de apoptosis, confirmaban la presencia de células en apoptosis en la CCG y en la CNI. Por el contrario, no se observaron núcleos TUNEL+ en la CNE.

Las determinaciones de densidad de núcleos apoptóticos realizadas sobre montajes totales de retina tratados con TUNEL demostraban que la muerte celular por apoptosis se extendía entre E7 y E14 en la CCG y entre E7 y P3 en la CNI (Fig. IV-2C). En todos los estadios analizados, la densidad media de núcleos apoptóticos en la CNI era mayor que en la CCG. La máxima densidad en la CCG se alcanzaba en E10, mientras que en la CNI se observaba en E12 y era entre 7 y 8 veces superior a la densidad máxima en la CCG. Estos resultados demostraban que el período de muerte celular en la CNI estaba retrasado respecto al observado en la CCG y que el número absoluto de células apoptóticas era mucho mayor en la CNI que en la CCG.

Patrón cronotopográfico de distribución de núcleos apoptóticos en la CCG

En cada estadio del desarrollo, la densidad de núcleos apoptóticos en la CCG era muy diferente en distintas zonas de la retina (Fig. IV-3). En las zonas centrales de cada cuadrante retiniano dicha densidad alcanzaba el máximo más tempranamente que en las zonas periféricas (Fig. IV-4). Además, dicho valor máximo era generalmente mayor en las zonas periféricas que en las centrales. Por otra parte, la densidad de núcleos apoptóticos en las zonas centrales alcanzaba valores próximos a cero antes que en las zonas periféricas. Estos resultados

demostraban que la muerte celular en la CCG comenzaba en zonas centrales de la retina y se iba desplazando progresivamente hacia zonas periféricas, es decir que existía un gradiente centro-periférico de muerte celular.

En los primeros estadios (E7-E8) del período de muerte celular los dos cuadrantes de la mitad temporal mostraban mayor densidad de núcleos apoptóticos que los de la mitad nasal (Figs. IV-3 y IV-4). Además, en la mitad temporal se alcanzaba una densidad próxima a cero antes que en la nasal (Fig. IV-4). Esto sugería la existencia de un gradiente temporo-nasal de muerte celular en la CCG.

En los cuadrantes de la mitad dorsal también se alcanzaban densidades de núcleos apoptóticos próximas a cero antes que en los de la mitad ventral (Fig. IV-4), sugiriendo la existencia de un gradiente dorso-ventral de muerte celular en la CCG.

Los tres gradientes de muerte celular (centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral) eran claramente identificados en los mapas de isodensidad de núcleos apoptóticos en la CCG (Fig. IV-5). En ellos se observa que la muerte celular comenzaba en E7 en la retina central y durante E8 y E9 se iba desplazando hacia los cuadrantes temporo-dorsal y temporo-ventral y en menor grado hacia la mitad nasal. En E10, estadio que mostraba el valor máximo de densidad de núcleos apoptóticos en la CCG de la retina completa (Fig. IV-2C), la muerte celular era intensa en todos los cuadrantes (Fig. IV-5). En E11, la muerte celular en la CCG se localizaba fundamentalmente en los cuadrantes nasales, disminuyendo drásticamente en el cuadrante temporo-dorsal y algo menos en el temporo-ventral; en cada uno de ellos la disminución era más evidente en las zonas centrales que en las periféricas. Finalmente, en E12 y E13, la muerte celular quedaba relegada a la periferia naso-ventral y desaparecía a partir de E14.

Patrón cronotopográfico de distribución de núcleos apoptóticos en la CNI

El patrón cronotopográfico de distribución de núcleos apoptóticos en la CNI mostraba los mismos gradientes observados en la CCG: centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral (Figs. IV-6, IV-7 y IV-8).

En los cuatro cuadrantes, la densidad de núcleos apoptóticos en la región central alcanzaba sus valores máximo y mínimo antes que en la periférica (Fig. IV-

7). Esto revelaba la existencia de un gradiente centro-periférico de muerte celular en la CNI.

La aparición y desaparición de núcleos apoptóticos en los cuadrantes de la mitad temporal tenían lugar antes que en los de la mitad nasal (Figs. IV-6 y IV-7), sugiriendo la existencia de un gradiente temporo-nasal de muerte celular. Además, tanto en la mitad nasal como en la temporal, los cuadrantes ventrales mostraban un retraso respecto a los dorsales, mostrando un gradiente dorso-ventral en la distribución de la muerte celular en la CNI.

Los gradientes centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral eran muy evidentes en los mapas de isodensidad de núcleos apoptóticos en la CNI (Fig. IV-8). En ellos se observaba que la muerte celular comenzaba en E7 en dos focos puntuales. Uno de ellos se localizaba en el centro geométrico de la retina (Figs. IV-8 y IV-9) y el otro estaba desplazado dorso-temporalmente. En E8, los dos focos de muerte celular seguían estando individualizados, pero eran más extensos (Figs. IV-8 y IV-10). En E9, la muerte celular era más intensa en ambos focos, los cuales tendían a solaparse y estaban desplazados hacia la mitad temporal de la retina, sobre todo en el cuadrante temporo-dorsal (Figs. IV-6 y IV-8). Entre E10 y E13, la muerte celular se desplazaba progresivamente desde los cuadrantes temporales hacia los nasales, quedando relegada en E14 a una estrecha franja periférica a lo largo de todo el perímetro de la retina, con un foco de mayor densidad de núcleos apoptóticos en el cuadrante naso-ventral (Fig. IV-8). A partir de este estadio, la franja periférica de muerte celular desaparecía progresivamente desde el cuadrante temporo-dorsal hacia el naso-ventral. En P3, había desaparecido casi por completo, a excepción de un área muy pequeña en el cuadrante naso-ventral.

Patrón cronotopográfico de distribución de precursores microgliales en la parte vítrea de la retina (migración tangencial)

La figura IV-11 muestra los cambios en la distribución de los precursores microgliales que migran tangencialmente en la parte más vítrea de la retina desde que se iniciaba su entrada en la retina (E7) hasta que toda la superficie retiniana estaba ocupada por dichos precursores (E12). La mayor proporción de células

microgliales entraban en la retina desde la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) a partir de E7. Sin embargo, una pequeña cantidad de precursores microgliales entraba desde el cuerpo ciliar a partir de E6 (ver capítulo III de esta tesis), pudiéndose identificar una estrecha banda periférica ocupada por células microgliales en migración. Esta banda periférica comenzaba en la mitad temporal y progresaba hacia la mitad nasal, de forma que en E10 era continua en todo el perímetro de la retina.

Conforme avanzaba el desarrollo, el área de distribución de los precursores microgliales que entraban desde la CNO/BP se extendía siguiendo un gradiente centro-periférico muy evidente hasta unirse con la banda periférica de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar (Fig. IV-11). En E8, el frente de avance de los precursores microgliales procedentes de la CNO/BP llegaba a contactar con la banda periférica en un punto situado en el cuadrante temporoventral. En E9 y E10, la unión entre el área de distribución de los precursores microgliales procedentes de la CNO/BP y la banda periférica se extendía al cuadrante temporo-dorsal. Dicha unión alcanzaba el cuadrante naso-ventral en E11 y el cuadrante naso-dorsal en E12. Este modelo de avance del área de distribución de la microglía procedente de la CNO/BP revelaba la existencia de un gradiente temporo-nasal, pero no de un gradiente dorso-ventral, sino más bien ventro-dorsal.

Al avanzar el desarrollo, la densidad de células microgliales que migraban en la parte vítrea de la retina se incrementaba como resultado de la entrada de nuevas células desde la CNO/BP. El incremento de densidad de precursores microgliales también mostraba gradientes centro-periférico y temporo-dorsal, pero no dorso-ventral (Fig. IV-11).

Patrón cronotopográfico de distribución de precursores microgliales en diferentes capas de la retina (migración radial)

El estudio de la distribución de precursores microgliales en las diferentes capas de la retina a lo largo del desarrollo (Fig. IV-12) permitió descubrir el patrón cronotopográfico de la migración radial de éstos desde la CFN hasta la CPE. Entre E8 y E12 los precursores microgliales migraban hasta la CCG y la parte más vítrea

de la CPI. Solo cuando las células microgliales habían alcanzado la parte más vítrea de la CPI en toda la extensión de la retina (en E12), comenzaban a verse células en la parte más escleral de dicha capa, limitando con la CNI, y posteriormente (a partir de E13) en la CPE. Por lo tanto, se distinguían dos fases claramente definidas de migración radial de precursores microgliales: en la primera, entre E8 y E12, éstos se desplazaban desde los pies terminales de las células de Müller hasta la parte más vítrea de la CPI, mientras que en la segunda, entre E12 y E16, las células microgliales migraban desde la parte más vítrea de la CPI hasta la CPE, atravesando la CNI.

El patrón cronotopográfico de distribución de precursores microgliales era diferente en las dos fases de su migración radial (Fig. IV-12: comparar las áreas de tono gris claro en E8-E12 con las áreas de tono gris oscuro en E12-E16). Así, la primera fase comenzaba alrededor de la CNO/BP y seguía un patrón centro-periférico, ligeramente desplazado hacia la mitad temporal. Por el contrario, la segunda fase de migración radial comenzaba tanto alrededor de la CNO/BP como en una banda periférica localizada en la mitad temporal de la retina. A continuación, esta segunda fase de migración radial avanzaba en sentido centro-periférico desde la CNO/BP y en sentido periférico-central desde la banda periférica. Al mismo tiempo, la banda periférica se iba extendiendo hacia la mitad nasal. En E15 los precursores microgliales habían alcanzado la CPE en la mayor parte de la retina, excepto en un área en forma de semiluna localizada en una región relativamente central del cuadrante temporo-dorsal (Fig. IV-12). Finalmente, en E16 toda la retina mostraba precursores microgliales en la CPE.

Comparación de la distribución de células apoptóticas en la CCG y CNI con la migración tangencial y radial de precursores microgliales

Los precursores microgliales migraban tangencialmente en la retina embrionaria de la codorniz sobre los pies terminales de las células de Müller (capítulo I de esta tesis), aunque algunos también migraban entre los axones de la CFN (Fig. IV-13A) y alcanzaban la CCG en algunas zonas (Fig. IV-13B). Sin embargo, no se observaba una correlación entre el patrón cronotopográfico de

distribución de precursores microgliales que migran en la parte vítrea de la retina y el patrón de distribución de células apoptóticas en la CCG (comparar los respectivos mapas de E7-E11 en las Figs. IV-5 y IV-11), sino que, por el contrario, había diferencias llamativas entre ambos patrones. En primer lugar, en E7 y E8 la banda periférica de precursores microgliales procedentes del cuerpo ciliar coincidía con zonas de la retina carentes de muerte celular; en E9 las porciones temporales de esta banda periférica sí colocalizaban con áreas de muerte de células ganglionares, pero no así las porciones nasales de la misma. Una segunda diferencia era que en E8 las células apoptóticas de la CCG se localizaban en dos focos situados en los cuadrantes temporo-dorsal y naso-dorsal (Fig. IV-5), mientras que los precursores microgliales procedentes de la CNO/BP migraban más o menos homogéneamente en todos los cuadrantes (Fig. IV-11). En tercer lugar, en E11 dejaba de haber muerte de células ganglionares en áreas centrales de la retina (Fig. IV-5) y, sin embargo, continuaba habiendo entrada de precursores microgliales desde la CNO/BP, como demostraba el avance de las áreas de mayor densidad de éstos (Fig. IV-11).

Tampoco había correlación entre la distribución de células apoptóticas en la CNI (Fig. IV-8) y la migración radial de los precursores microgliales (Fig. IV-12), como se deducía de las siguientes observaciones. Primeramente, entre E9 y E11 había extensas áreas de la retina con una elevada densidad de células apoptóticas en la CNI (Figs. IV-8 y IV-13), pero los precursores microgliales no eran atraídos a dicha capa, ya que permanecían en la CFN y CCG (Figs. IV-12 y IV-13). Además, la muerte celular en la CNI seguía un patrón cronotopográfico centro-periférico y temporo-nasal, mientras que la migración de precursores microgliales desde la parte vítrea de la CPI hasta la CPE (es decir, la migración a través de la CNI) mostraba un patrón en parte centro-periférico y en parte periférico-central, terminando en un área relativamente central del cuadrante temporo-dorsal. En tercer lugar, es llamativo que en amplias áreas de la retina el acceso de las células microgliales a la CPE solo tenía lugar cuando la muerte celular en la CNI ya había cesado en dichas áreas. Así, en E13 se observaba un área en forma de semiluna en el cuadrante temporo-dorsal en la que ya había finalizado la muerte celular en la CNI (Fig. IV-8) y los precursores microgliales todavía permanecían en el límite

vítreo de la CPI (Fig. IV-12). Posteriormente, entre E14 y E16, este área carente de muerte celular se extendía a la mayor parte de la retina (Fig. IV-8), coincidiendo con la migración de células microgliales a través de la CPI y CNI, hasta alcanzar la CPE (Fig. IV-12).

Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por precursores microgliales en la CFN y CCG

El empleo de láminas MLI/PTCM procedentes de retinas en las que había muerte celular en la CCG y CNI, demostraba la presencia de pequeños cuerpos esféricos en los niveles más vítreos de la retina, adyacentes a los pies terminales de las células de Müller (Fig. IV-14). Estos cuerpos eran identificados como fragmentos apoptóticos ya que eran Hoechst-positivos (Figs. IV-14 y IV-15) y TUNEL+. Algunos de estos cuerpos apoptóticos se encontraban libres en las cercanías de precursores microgliales que migraban tangencialmente sobre los pies terminales de las células de Müller (Fig. IV-14), mientras que otros estaban siendo englobados por precursores microgliales (Figs. IV-15A-D) o estaban alojados en el citoplasma de los mismos (Figs. IV-15E-F). Generalmente, los precursores microgliales fagocitaban fragmentos apoptóticos mediante la emisión de lamelipodios que los envolvían (Figs. IV-15A,B). En ocasiones, algunas células microgliales mostraban un fino filopodio que se ensanchaba en su extremo, englobando un fragmento apoptótico (Fig. IV-15C,D). Estas observaciones demostraban que los precursores microgliales fagocitaban fragmentos apoptóticos durante su migración sobre los pies terminales de las células de Müller.

El doble marcaje TUNEL/QH1 tanto en secciones como en montajes totales de retinas de E10 (en las que hay una elevada densidad de núcleos apoptóticos en la CCG), demostraba que en las áreas centrales de estas retinas ya se había iniciado la migración radial de los precursores microgliales (ver Fig. IV-12) y algunos de ellos se localizaban en diferentes niveles de la CFN, llegando a alcanzar la CCG (Fig. IV-13). Algunas células microgliales con estas localizaciones estaban en proceso de fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Fig. IV-16A) o ya los habían fagocitado (Fig. IV-16B). Estas observaciones demostraban que los

precursores microgliales localizados en la CFN y en la CCG fagocitaban fragmentos apoptóticos, probablemente procedentes de células ganglionares muertas.

Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por células de Müller en la CNI

Como se ha mencionado con anterioridad, en la mayor parte de la retina, la migración de precursores microgliales a través de la CNI para acceder a la CPE solo tenía lugar cuando la muerte celular en la CNI ya había cesado y no se observaban fragmentos apoptóticos en dicha capa. Por lo tanto, los precursores microgliales no eran responsables de la fagocitosis y eliminación de los restos de células muertas en la CNI. Nuestro estudio con MET revelaba que las células encargadas de limpiar la CNI de fragmentos apoptóticos eran las células de Müller.

En los estadios del desarrollo en los que tenía lugar la muerte celular en la CNI, las células de Müller ya mostraban caracteres morfológicos que las identificaban (Fig. IV-17). En efecto, su núcleo era ligeramente más grande y notablemente más claro que el de las neuronas (Fig. IV-17A). Su citoplasma también era mucho más claro que el de las neuronas y contenía abundantes polisomas, escasas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, pequeñas vesículas de contenido claro y numerosos microtúbulos y redes filamentosas (Fig. IV-17B,C). La superficie de las células de Müller formaba una especie de nidos en los que se alojaban las neuronas adyacentes, que se disponían en unidades columnares (Fig. IV-17B) similares a las descritas por Reichenbach et al. (1994, 1995) en la retina de mamíferos.

Igual que las neuronas sanas, las neuronas en proceso de apoptosis también estaban abrazadas por prolongaciones de las células de Müller (Fig. IV-18A,B). En fases avanzadas del proceso de apoptosis, las neuronas se fragmentaban en varios cuerpos que contenían porciones muy condensadas del núcleo rodeadas por una banda citoplasmática. Algunos fragmentos apoptóticos se observaban en el citoplasma de las células de Müller (Fig. IV-18C), demostrando que habían sido fagocitados por éstas. Algunas células de Müller mostraban áreas citoplasmáticas con numerosos cuerpos densos, pequeños y heterogéneos (Fig. IV-18C), probablemente procedentes de la digestión de fragmentos apoptóticos. Estas

observaciones demostraban que las células de Müller fagocitaban y digerían los fragmentos resultantes de la apoptosis de neuronas en la CNI.

En secciones de retina tratadas con TUNEL no era infrecuente observar pequeños fragmentos apoptóticos dispuestos en hileras radiales (Fig. IV-19A) o aislados en la CPI. Con MET se comprobó que estos fragmentos estaban localizados en el interior de las prolongaciones radiales de las células de Müller que atravesaban la CPI (Fig. IV-19B,C). También existían fragmentos apoptóticos en el interior de las prolongaciones radiales de las células Müller a nivel de la CCG (Fig. IV-19D,E) y de la CFN (Fig. IV-20B). Incluso, algunos fragmentos apoptóticos estaban alojados en el interior de los pies terminales de las células de Müller (Fig. IV-20C). Estos resultados eran compatibles con la posibilidad de que las células de Müller, además de fagocitar los fragmentos apoptóticos en la CNI, también eran capaces de fagocitar restos celulares localizados en otras capas de la retina, incluyendo los existentes en las porciones más vítreas de la misma.

Fig. IV-2. Núcleos apoptóticos en la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa nuclear interna (CNI) de retinas de codorniz. **A:** Cuerpos apoptóticos TUNEL-positivos de diámetro variable (flechas), distribuidos de forma no uniforme en la CCG y en la CNI en una sección de retina de codorniz E10. Véase como la capa nuclear externa (CNE) está libre de cuerpos apoptóticos. **B:** Vista con microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la CNI de una retina de codorniz E10, en la que se observan varias neuronas apoptóticas, que son reconocidas por mostrar unos agregados de la cromatina bajo la envuelta nuclear (cabezas de flecha) y una lobulación del núcleo (flecha abierta) en etapas iniciales del proceso de muerte celular, y un elevado grado de condensación y fragmentación (flecha) en las etapas finales. El citoplasma de estas neuronas en proceso de apoptosis es algo más denso a los electrones que el de las células con núcleos normales y mantiene la integridad de sus orgánulos. **C:** Gráfica en la que se representa la densidad media de cuerpos apoptóticos (ca) TUNEL-positivos por mm^2 en la CCG (círculos) y CNI (triángulos) de extensiones de retina de codornices E7-E16 y P1-P3. La densidad máxima en la CCG se alcanza en E10, mientras que en la CNI se observa en E12 y es entre 7 y 8 veces superior. Barra de escala: 150 μm para **A**; 3 μm para **B**.

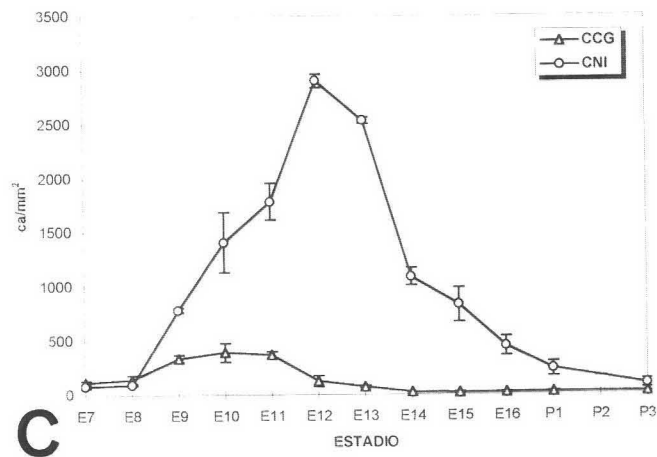
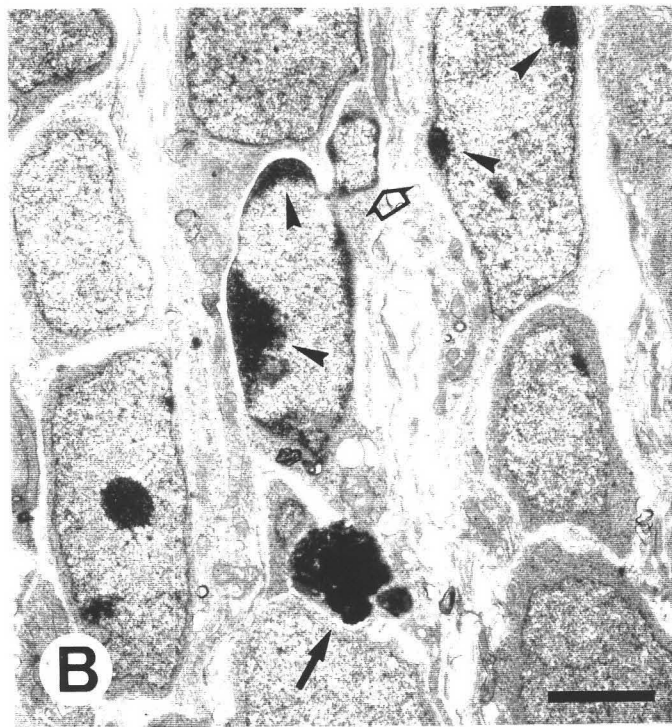
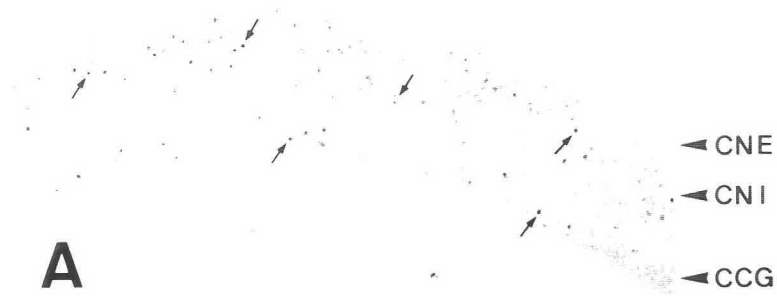


Fig. IV-3. Cuerpos apoptóticos TUNEL-positivos de la CCG en diferentes regiones de extensiones de retina de codornices entre E7 y E16. Se muestra una micrografía de las zonas ventro-temporal (VT), dorso-temporal (DT), central (C), dorso-nasal (DN) y ventro-nasal (VN) de cada extensión. Barra de escala: 300 μ m.

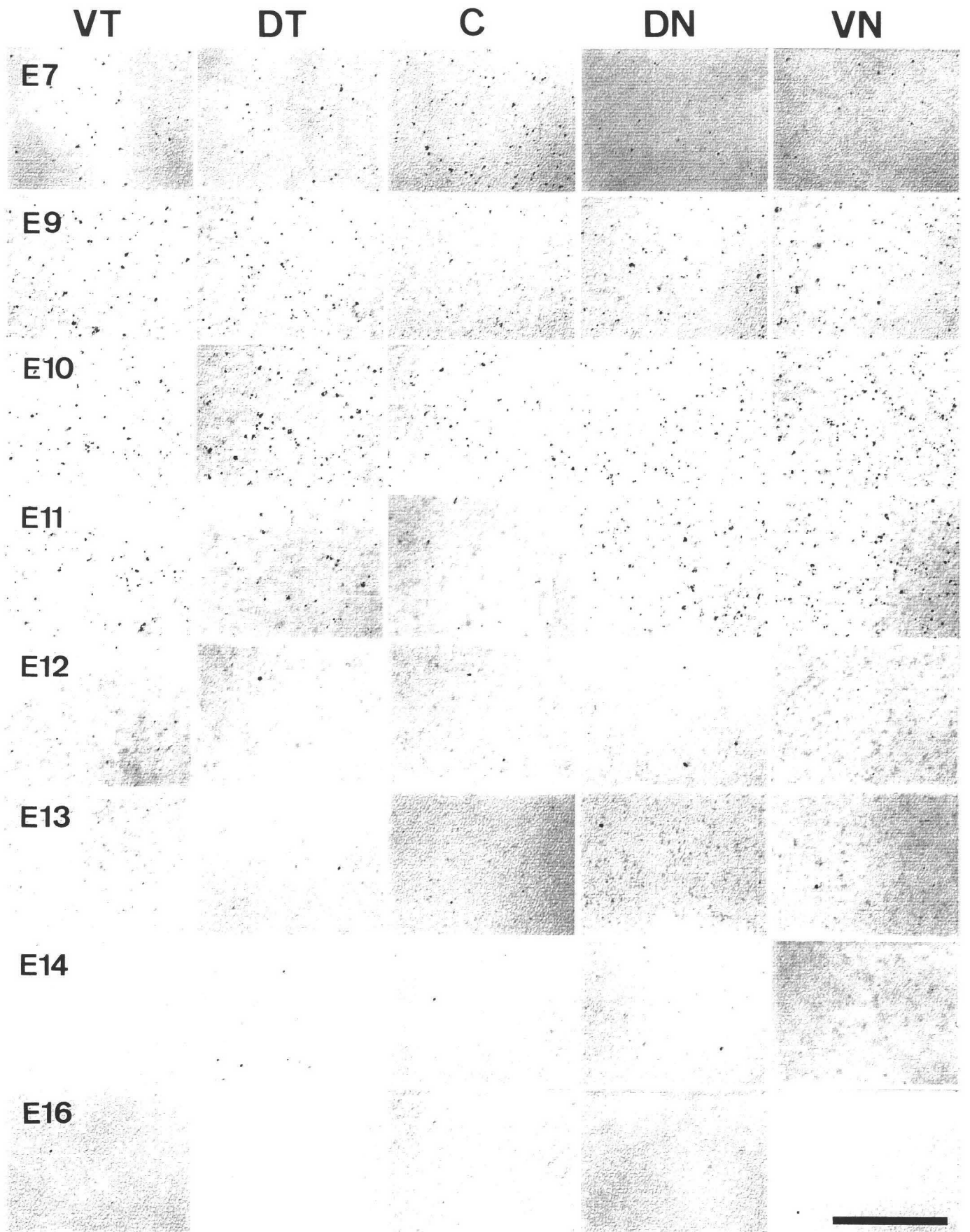


Fig. IV-4. Gráficas en las que se representan por separado las densidades medias de cuerpos apoptóticos (ca) TUNEL-positivos por mm^2 en cada cuadrante de la CCG, DT (A), DN (B), VT (C) y VN (D), en extensiones de retina de codornices E7-E16 y P1-P3. Dentro de cada cuadrante se diferenció entre retina central (triangulos vacíos) y periférica (triángulos negros). DT, dorso-temporal; DN, dorso-nasal; VT, ventro-temporal; VN, ventro-nasal.

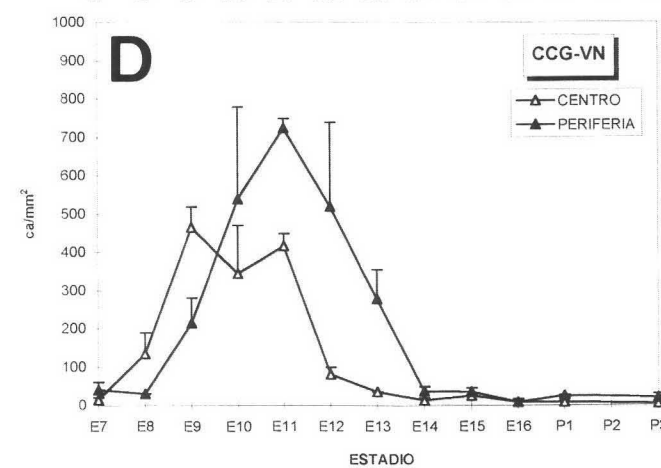
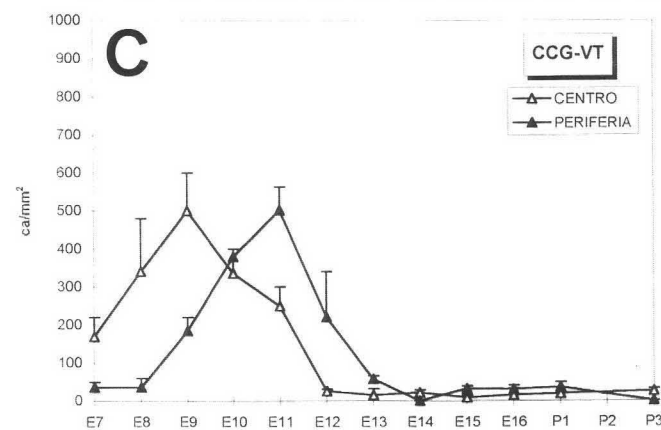
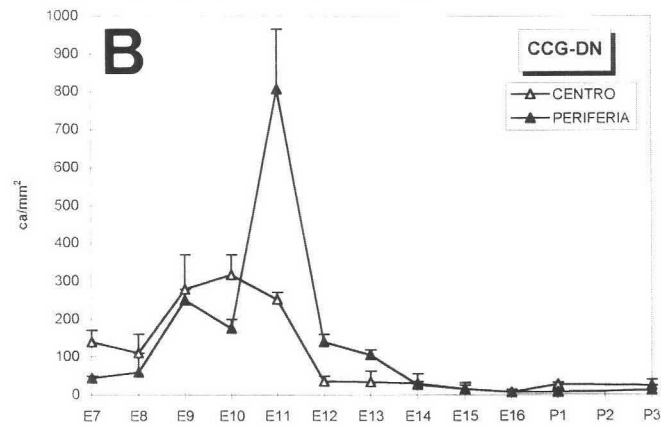
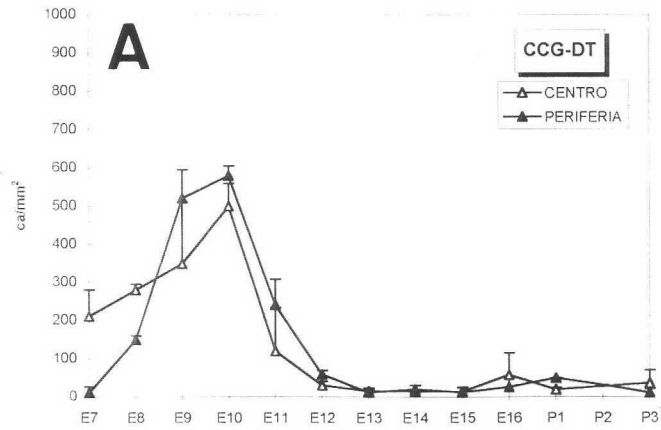
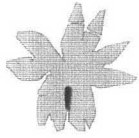
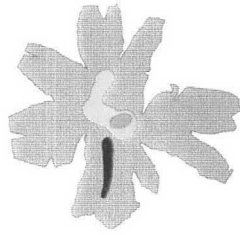


Fig. IV-5. Mapas de isodensidad de núcleos apoptóticos (ab) TUNEL-positivos en la CCG de extensiones de retina de codornices E5-E16 y P1-P3. Los rangos de densidad de cuerpos apoptóticos determinados en los diferentes puntos de muestreo se agrupan dentro de curvas de nivel de isodensidad. Cada rango de densidad se representa de un color diferente. Se observa como la muerte celular comienza en E7 en la retina central y durante E8 y E9 se va desplazando hacia los cuadrantes temporo-dorsal y temporo-ventral y en menor grado hacia la mitad nasal. En E10, la muerte celular es intensa en todos los cuadrantes. Entre E11 y E13 la muerte celular disminuye progresivamente en los cuadrantes nasales y en E14 desaparece. El área alargada de color negro localizada en la mitad ventral, representa la cabeza del nervio óptico/base del pecten. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal. Barra de escala: 8 mm.

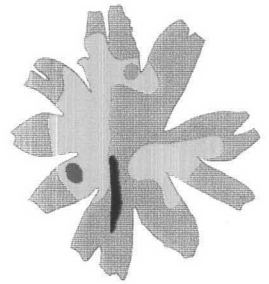
E5



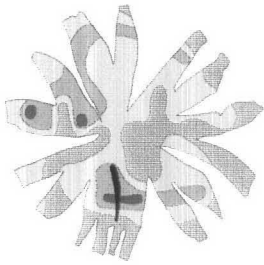
E7



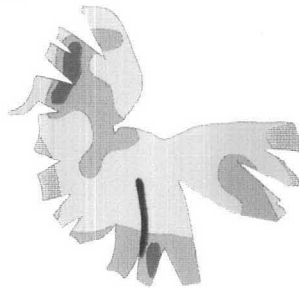
E8



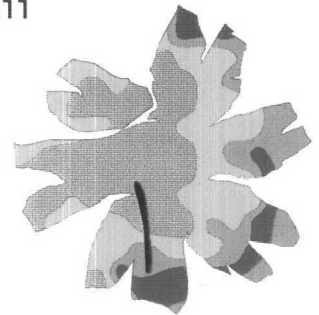
E9



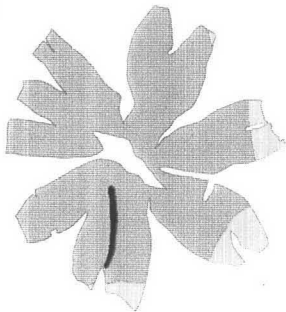
E10



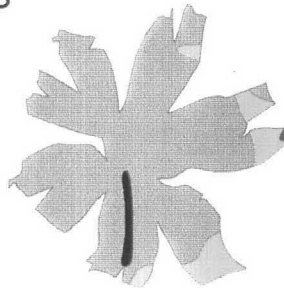
E11



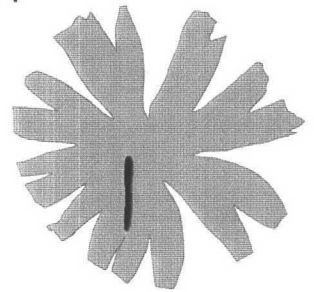
E12



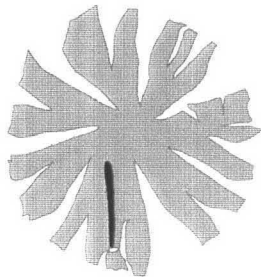
E13



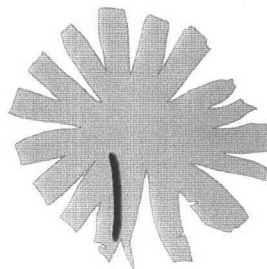
E14



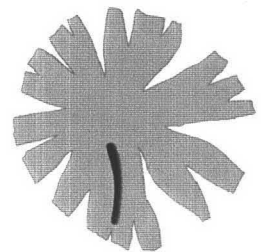
E15



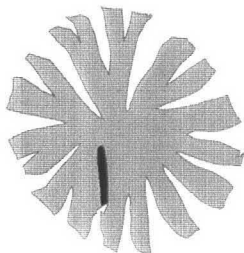
E16



P1



P3



GCL

ab/mm²

0-300

300-600

600-900

>900

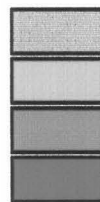


Fig. IV-6. Cuerpos apoptóticos TUNEL-positivos de la CNI en diferentes regiones de extensiones de retina de codornices entre E7 y E16. Se muestra una micrografía de las zonas ventro-temporal (VT), dorso-temporal (DT), central (C), dorso-nasal (DN) y ventro-nasal (VN) de cada extensión. Barra de escala: 300 μ m.

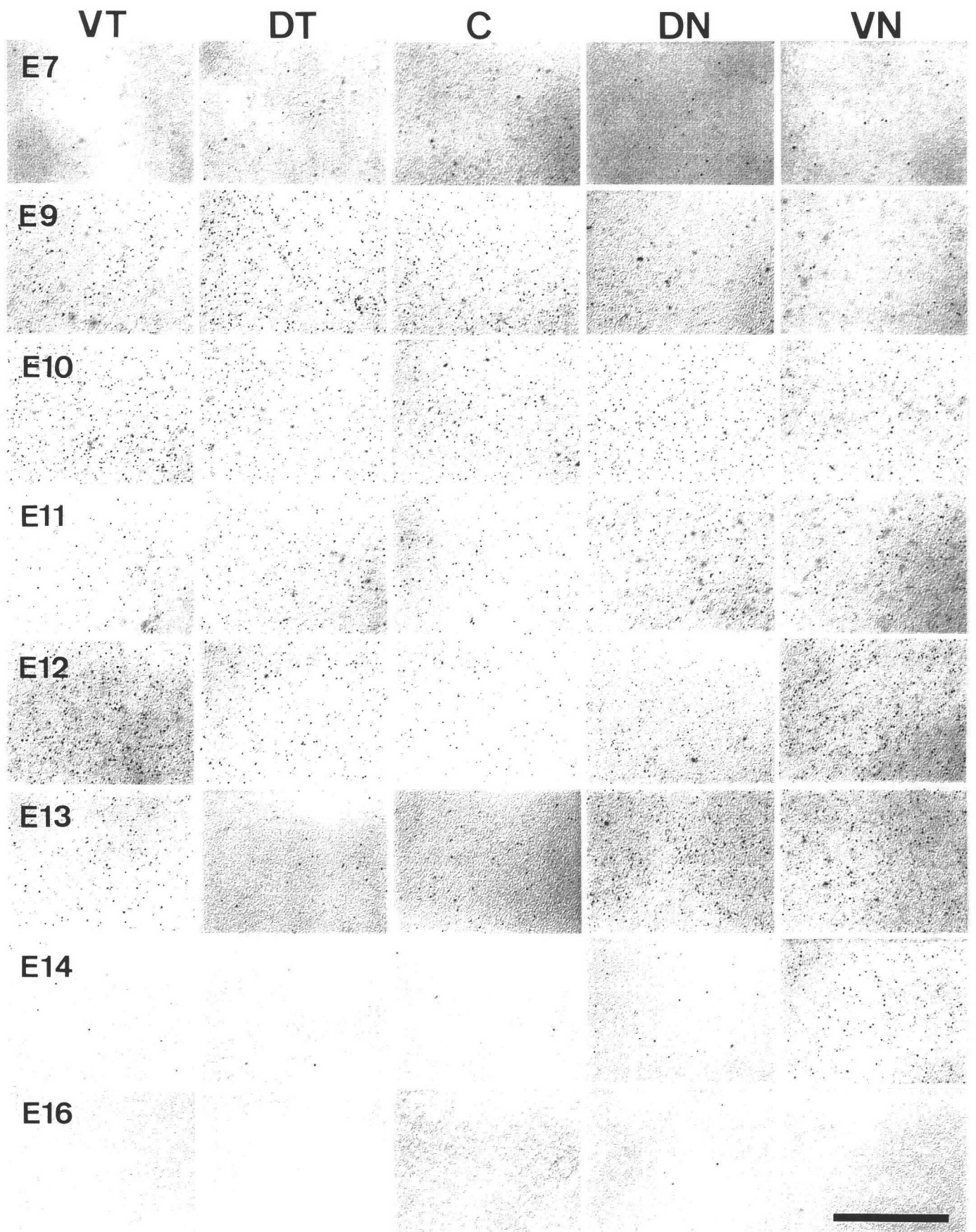


Fig. IV-7. Gráficas en las que se representan por separado las densidades medias de cuerpos apoptóticos (ca) TUNEL-positivos por mm^2 en cada cuadrante de la CNI, DT (A), DN (B), VT (C) y VN (D), en extensiones de retina de codornices E7-E16 y P1-P3. Dentro de cada cuadrante se diferenció entre retina central (triángulos vacíos) y periférica (triángulos negros). DT, dorso-temporal; DN, dorso-nasal; VT, ventro-temporal; VN, ventro-nasal.

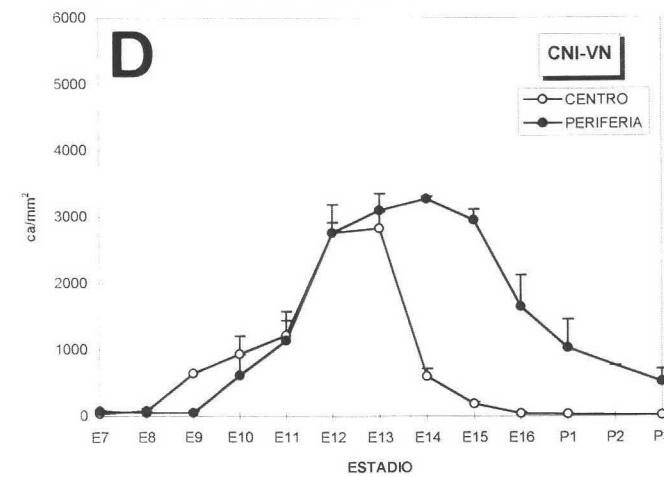
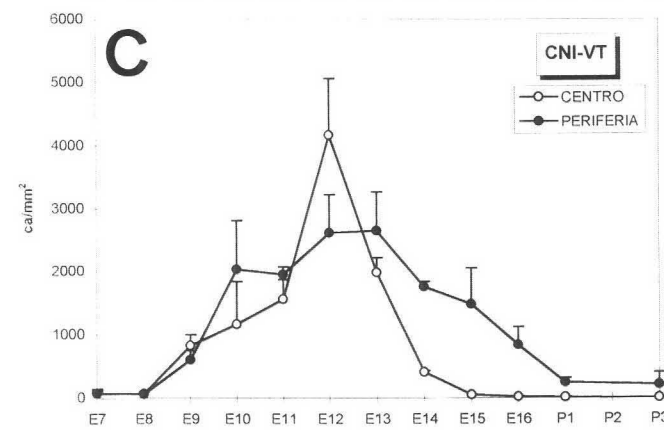
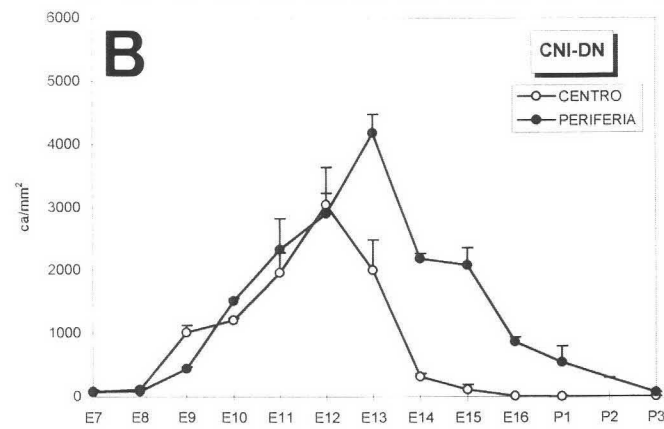
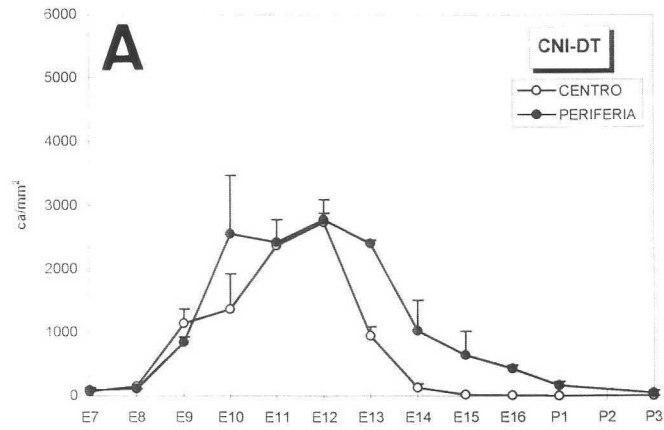
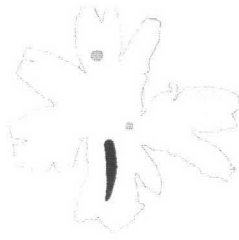


Fig. IV-8. Mapas de isodensidad de núcleos apoptóticos (ab) TUNEL-positivos en la CNI de extensiones de retina de codornices E5-E16 y P1-P3. Los rangos de densidad de cuerpos apoptóticos determinados en los diferentes puntos de muestreo se agrupan dentro de curvas de nivel de isodensidad. Cada rango de densidad se representa de un color diferente. Se observa como la muerte celular comienza en E7 en dos focos puntuales, localizados en el centro geométrico de la retina y en el cuadrante dorso-temporal respectivamente, que se extienden progresivamente hacia la mitad temporal entre E8 y E9. Entre E10 y E13, la muerte celular se desplaza progresivamente desde los cuadrantes temporales hacia los nasales, quedando relegada en E14 a una estrecha franja periférica a lo largo de todo el perímetro de la retina con un foco de mayor densidad en el cuadrante naso-ventral. Entre E15 y P3, esta franja de muerte celular desaparece progresivamente. El área alargada de color negro localizada en la mitad ventral, representa la cabeza del nervio óptico/base del pecten. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal. Barra de escala: 8 mm.

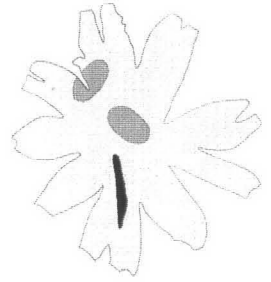
E5



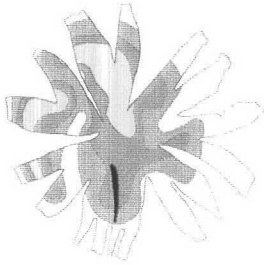
E7



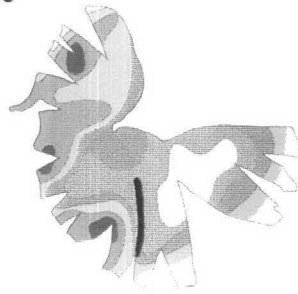
E8



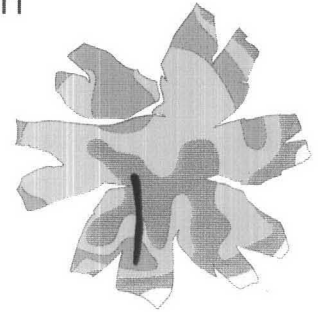
E9



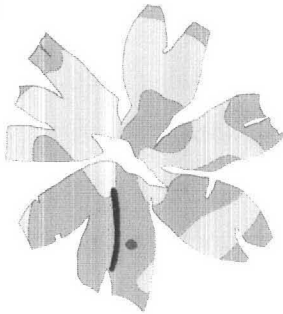
E10



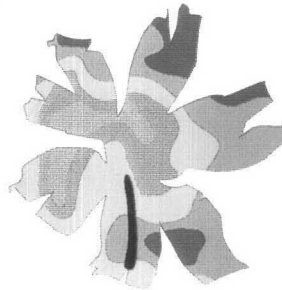
E11



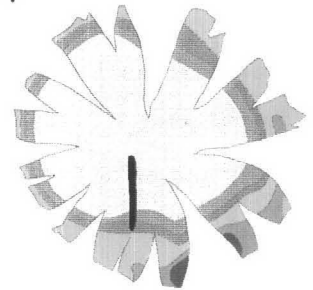
E12



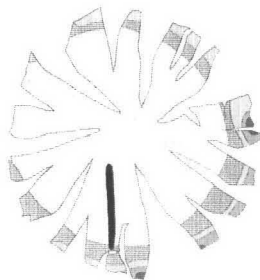
E13



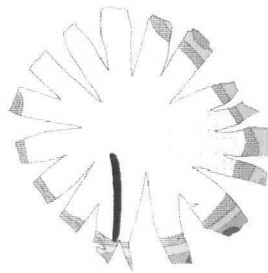
E14



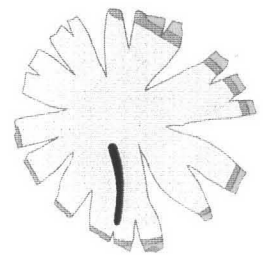
E15



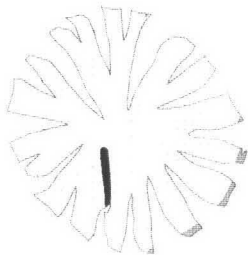
E16



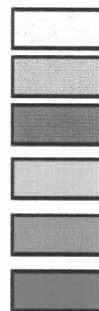
P1



P3



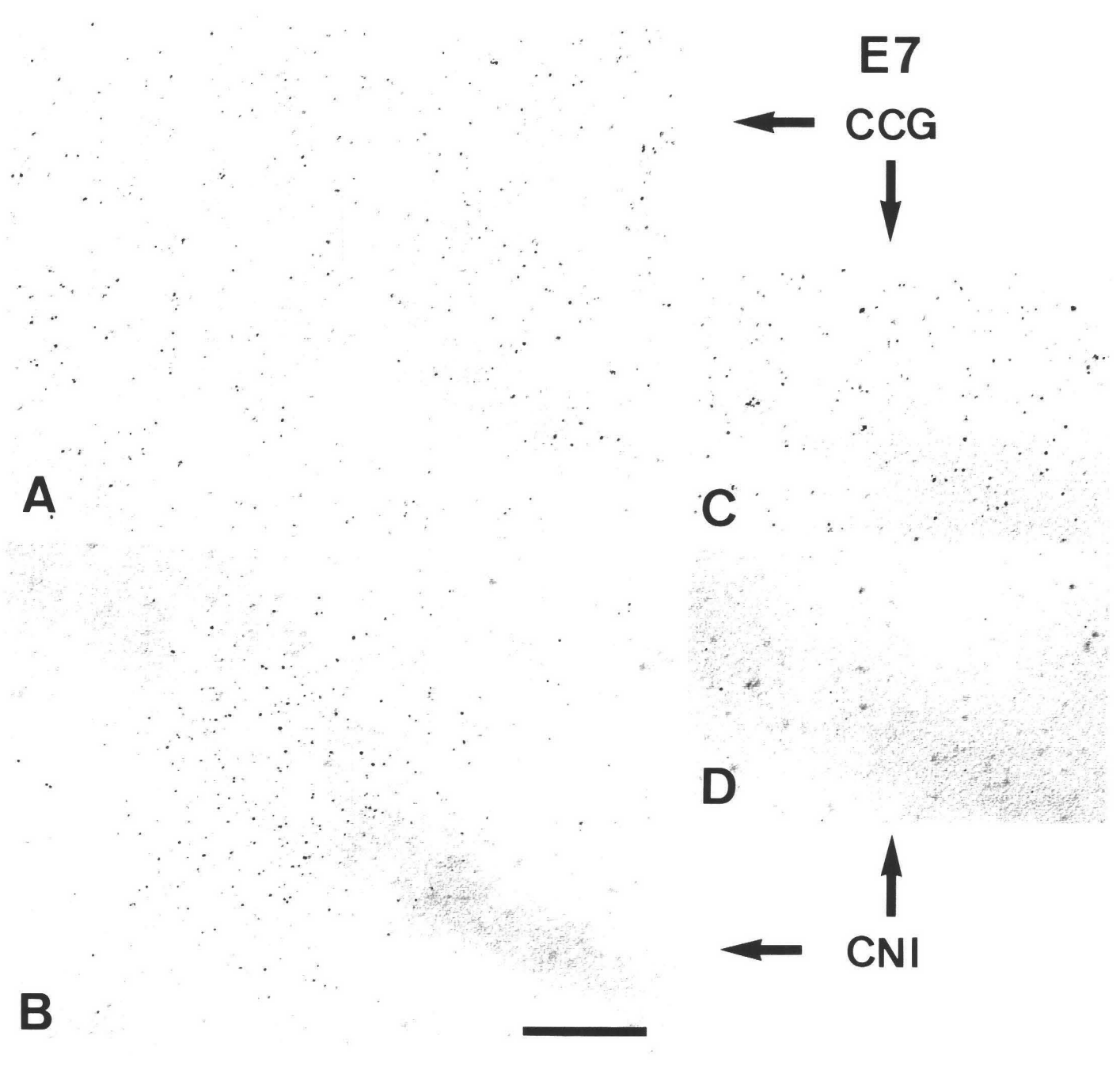
INL



ab/mm²



Fig. IV-9. Imágenes tomadas en el centro geométrico de una extensión de retina de E7 tratada con TUNEL, a nivel de la CCG (**A**) y de la CNI (**B**), comparadas con las imágenes obtenidas a nivel de la CCG (**C**) y de la CNI (**D**) en una región dorsal a dicho centro geométrico. Obsérvese como los cuerpos apoptóticos de la CNI se localizan en un área restringida del centro geométrico de la retina (**B**) y no fuera de ella (**D**). Sin embargo en la CCG, los cuerpos apoptóticos se localizan tanto en el centro geométrico de la retina (**A**) como en una región dorsal a este (**C**), formando parte del foco central de muerte celular en esta capa. Barra de escala: 200 μm .



A

B

C

D

E7

CCG

CNI



Fig. IV-10. Comparación entre el nivel de la CCG y el nivel de la CNI en las regiones donde se localizan el foco central (FC) y el foco temporal (FT) de muerte celular en la CNI y en una región dorsal a este foco temporal (D-FT), de una extensión de retina de E8 tratada con TUNEL. No se observan cuerpos apoptóticos a nivel de la CCG en la zona del FC de muerte celular en la CNI, pero sí en la zona del FT y en la zona D-FT. Barra de escala: 250 μm .

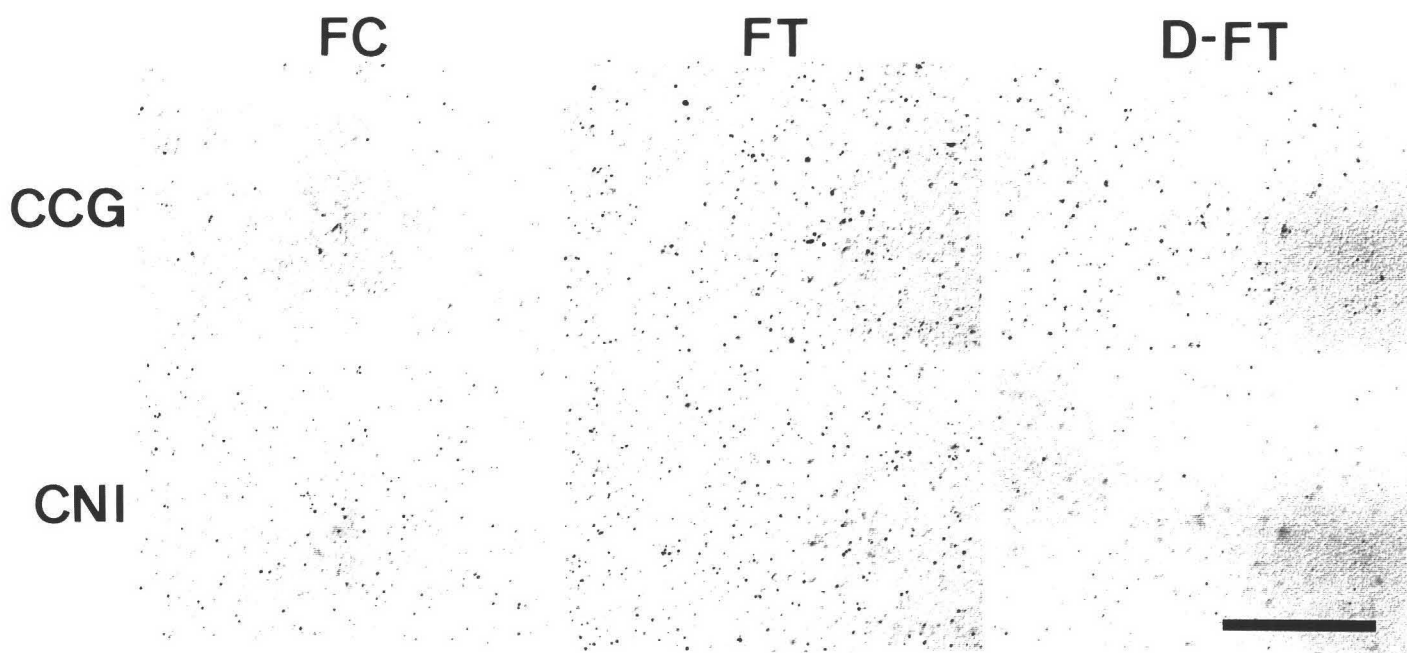
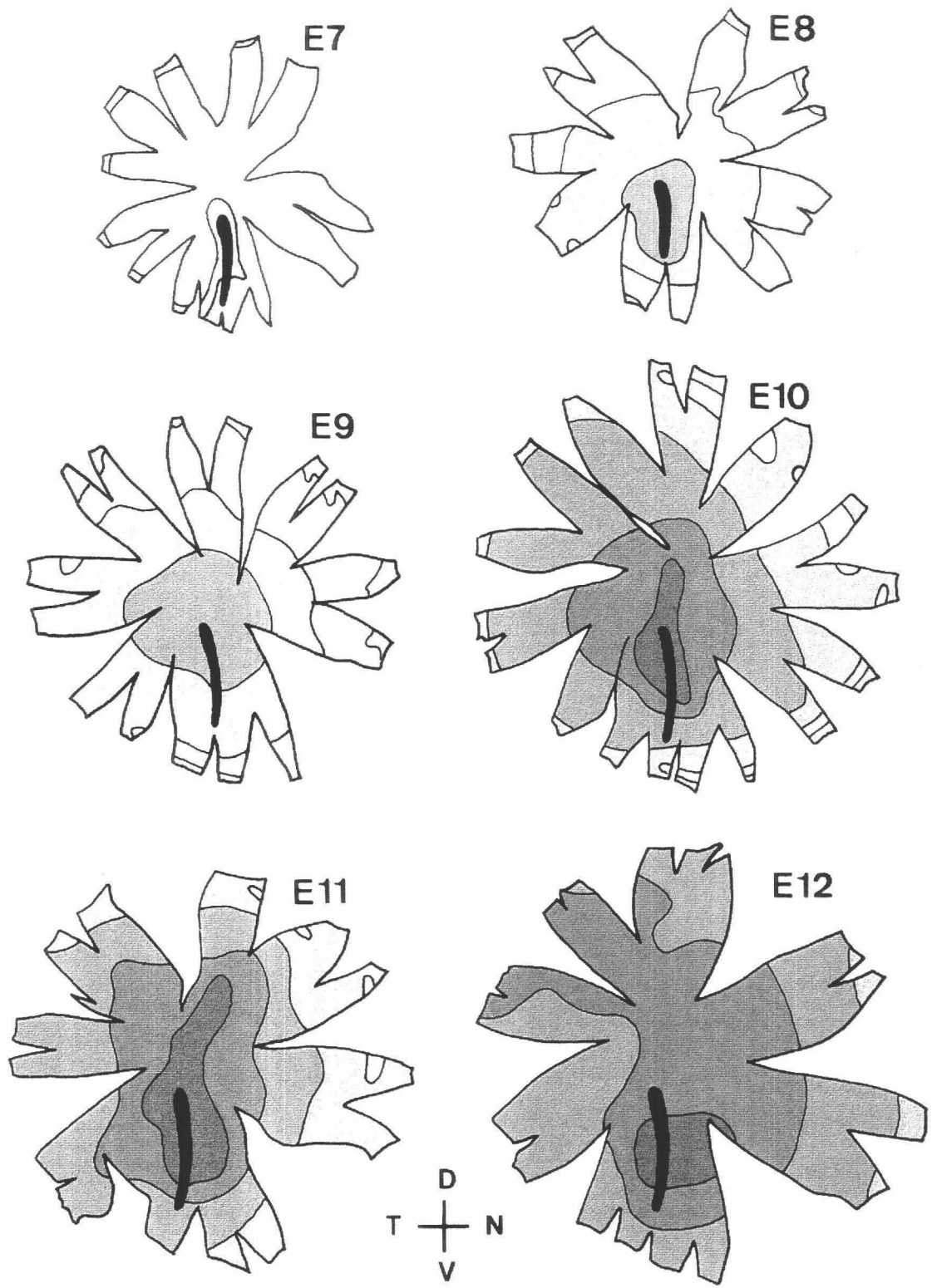


Fig. IV-11. Mapas de isodensidad de precursores microgliales que migran tangencialmente en la parte más vítrea de la retina, desde su entrada (E7) hasta que ocupan toda la superficie retiniana (E12). Los diferentes rangos de densidad de precursores microgliales en proceso de migración tangencial determinados en los diferentes puntos de muestreo se agrupan dentro de curvas de nivel de isodensidad. Cada rango de densidad se representa con un tono de gris diferente. El área alargada de color negro localizada en la mitad ventral, representa la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP). Se observa que en E7 los precursores microgliales se localizan alrededor de la CNO/BP y en una estrecha banda periférica del margen retiniano temporal. Entre E8 y E10, esta banda periférica progresa hacia la mitad nasal pasando por los niveles dorso-nasal (E8), nasal (E9) y ventro-nasal (E10), ocupando todo el margen periférico. El área ocupada por los precursores microgliales que entran desde la CNO/BP se extiende progresivamente entre E8 y E12 siguiendo un gradiente centro-periférico, uniéndose con la banda periférica primero en la mitad temporal (E8-E9) y después en la mitad nasal (E10-E12). La disposición concéntrica decreciente de los diferentes rangos de densidad alrededor de la CNO/BP entre E7 y E12, demuestra la existencia de una entrada continua de precursores microgliales en esta zona. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal. Barra de escala: 10 mm.



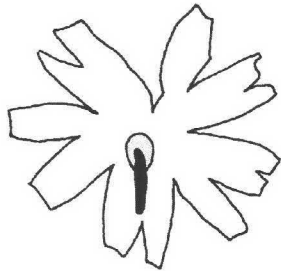
MICROGLIA
 N. cells/mm²

0	1-150	151-300	301-450	>450

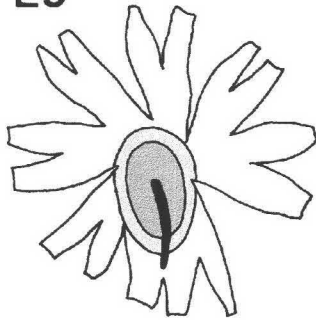
10 mm

Fig. IV-12. Mapas de distribución de precursores microgliales en proceso de migración radial desde la capa de fibras nerviosas (NFL) hasta la capa plexiforme externa (OPL) entre E8 y E16. Se representan cuatro niveles de localización de los precursores microgliales: el límite entre la NFL y la CCG (NFL-GCL), la parte más vítrea de la capa plexiforme interna (IPL-V), la parte más escleral de la capa plexiforme interna (IPL-E) y la OPL. Cada uno de estos niveles se muestra en un tono de gris diferente. No se representan densidades celulares, sino solamente la presencia o no de microglía en cada nivel de profundidad. El área alargada de color negro localizada en la mitad ventral, representa la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP). Se distinguen dos fases en la migración radial. En la primera, entre E8 y E12, los precursores microgliales migran progresivamente hasta los niveles CCG y IPL-V siguiendo un patrón que comienza alrededor de la CNO/BP y que se extiende centro-periféricamente, ligeramente desplazado hacia la mitad temporal. En la segunda fase, entre E12 y E16, las células microgliales migran desde el nivel IPL-V hasta la CPE, atravesando la CNI. Esta fase, comienza alrededor de la CNO/BP y en una banda periférica localizada en la mitad temporal, que avanzan en sentido centro-periférico y periférico-central respectivamente. Obsérvese que la migración hacia la OPL no comienza hasta que toda la retina muestra precursores microgliales en el nivel IPL-V. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal. Barra de escala: 5 mm.

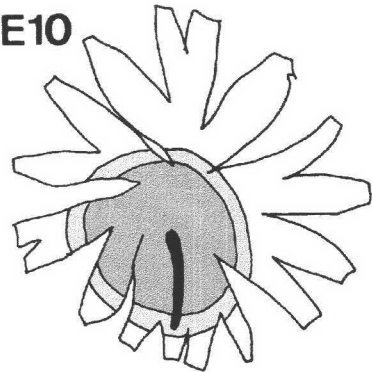
E8



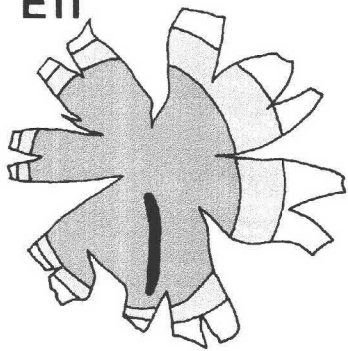
E9



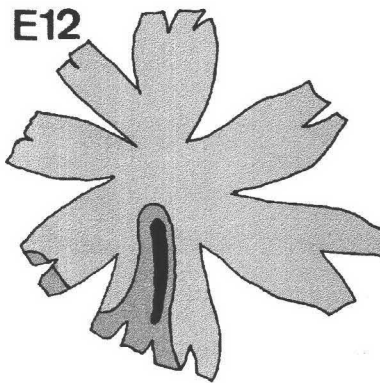
E10



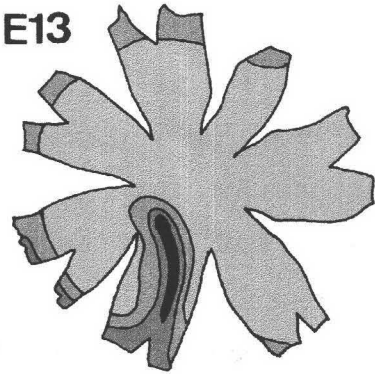
E11



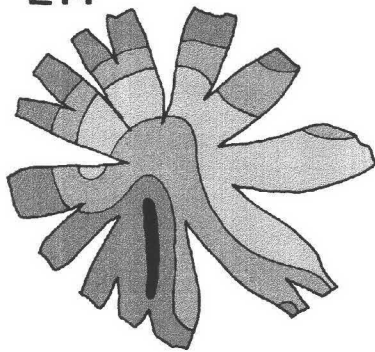
E12



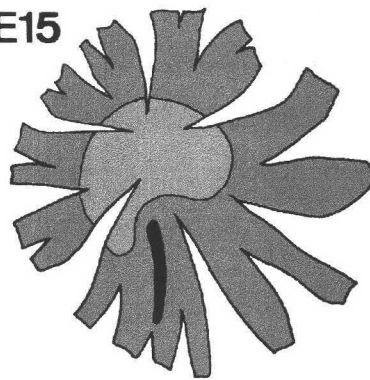
E13



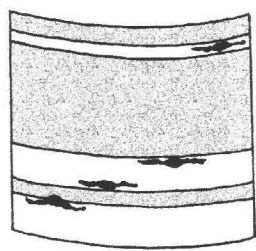
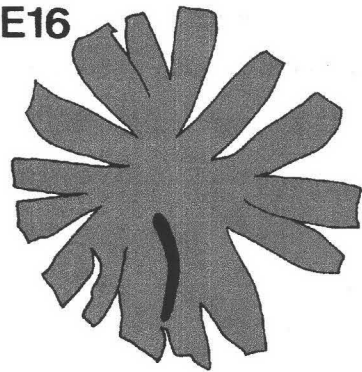
E14







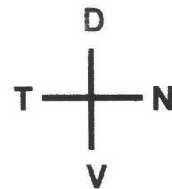
E15



E16



-  OPL
-  IPL-E
-  IPL-V
-  NFL-GCL



5 mm

Fig. IV-13. Doble marcaje inmunofluorescente con TUNEL (verde) y QH1 (rojo) de secciones paralelas a la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) de retina de codorniz E10, en el que se observan cuerpos apoptóticos TUNEL-positivos tanto en la CCG (asterisco) como en la CNI (estrella). Los precursores microgliales QH1-positivos migran tangencialmente en la capa de fibras ópticas. En **A** se muestra una región de la retina adyacente a la CNO/BP (flecha) y en **B** una zona localizada más dorsalmente. Véase como los precursores microgliales se localizan en la capa de fibras nerviosas y en el límite entre esta y la CCG, no observándose ninguno en niveles más esclerales a pesar de existir un elevado número de cuerpos apoptóticos en la CNI. Barra de escala: 150 μm .

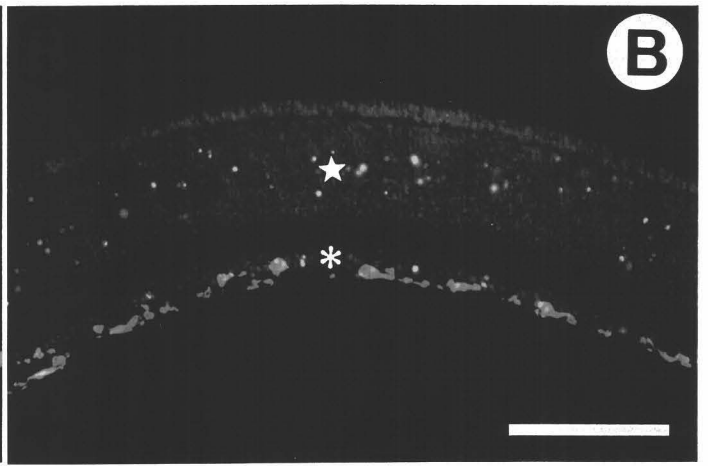
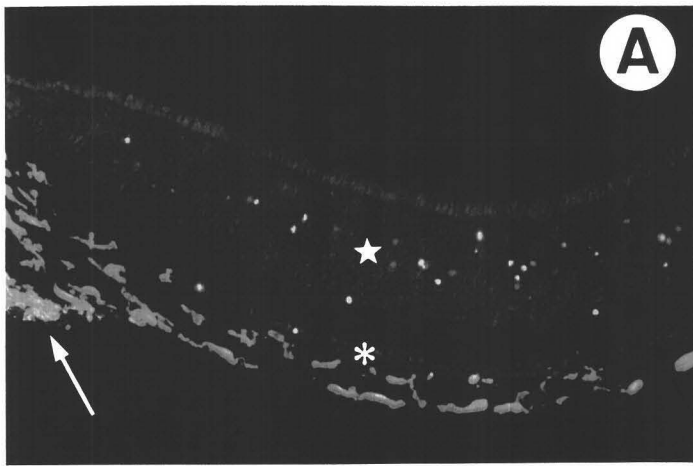


Fig. IV-14. Precursores microgliales y fragmentos apoptóticos localizados en los niveles más vítreos de la retina, observados con MEB (**A**) y con doble marcaje inmunofluorescente Hoechst/QH1 (**B**, **C**) sobre láminas MLI/PTCM de retinas de E10. **A:** Fragmento apoptótico (flecha) localizado sobre los pies terminales de las células de Müller, adyacente a una célula microglial en proceso de migración tangencial. **B**, **C:** Imágenes de un mismo campo microscópico en el que se observan dos células microgliales marcadas con QH1 (**B**), cuyos núcleos son puestos de manifiesto con Hoechst (**C**). Dos fragmentos apoptóticos intensamente marcados con Hoechst (flechas grandes en **C**) se localizan fuera de las células microgliales (flechas grandes en **B**). Otros dos pequeños fragmentos apoptóticos (flechas pequeñas) están situados dentro de una de las células microgliales. Barra de aumentos: 11 μm para **A**; 30 μm para **B** y **C**.

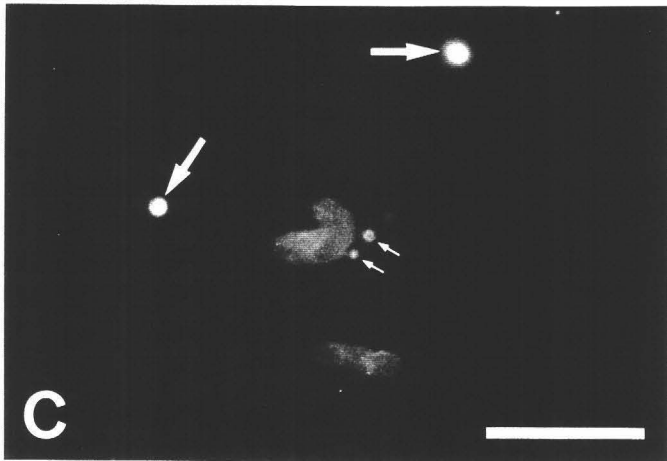
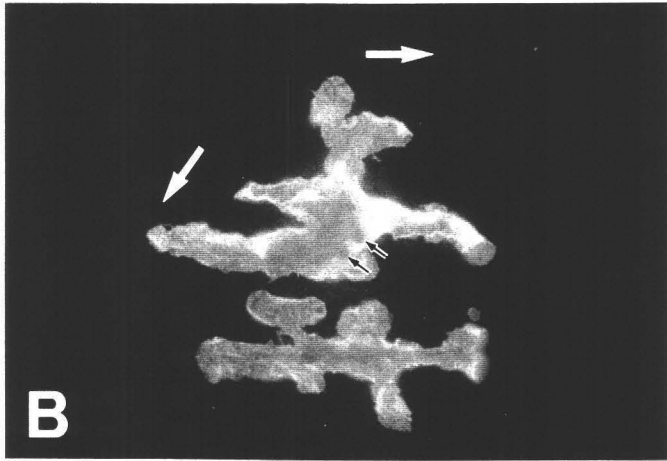
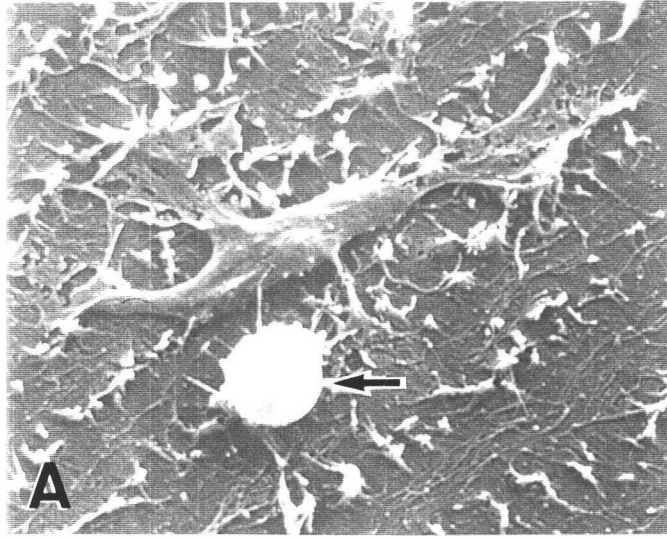


Fig. IV-15. Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por precursores microgliales en proceso de migración tangencial sobre los pies terminales de las células de Müller, observados con MEB (**A, B**) y con doble marcaje inmunofluorescente Hoechst/QH1 (**C-F**) sobre láminas MLI/PTCM de retinas de E10. **A:** Célula microglial con un lamelipodio que envuelve un fragmento apoptótico (flecha), aumentado en **B** con otra orientación. **C-F:** Imágenes de un mismo campo microscópico en el que se observan dos precursores microgliales marcados con QH1 (**C**), cuyos núcleos son puestos de manifiesto con Hoechst (**D**). Uno de los precursores microgliales muestra un fino filopodio ensanchado en su extremo (cabeza de flecha) (**C**) que engloba un fragmento apoptótico (flecha) (**D**). **E, F:** Precursor microglial QH1- positivo (**E**) que muestra un fragmento Hoechst-positivo (flecha) alojado en su citoplasma (**F**). Barra de escala: 11 μm para **A**; 2.2 μm para **B**; 30 μm para **C, D, E** y **F**.

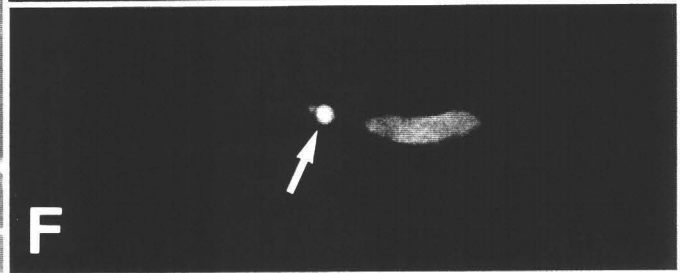
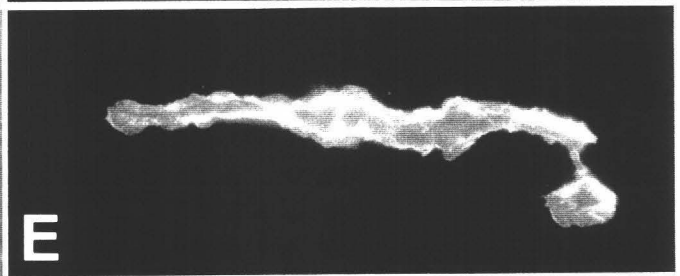
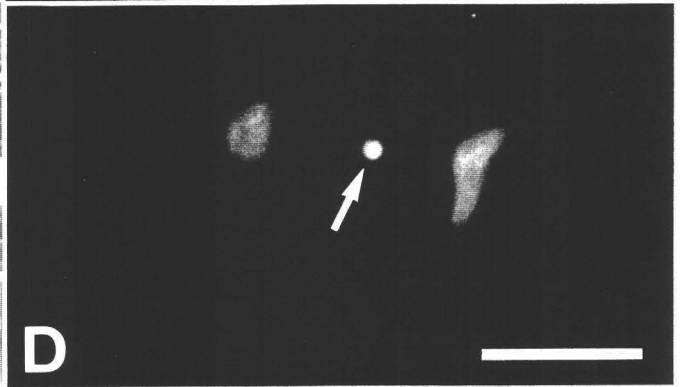
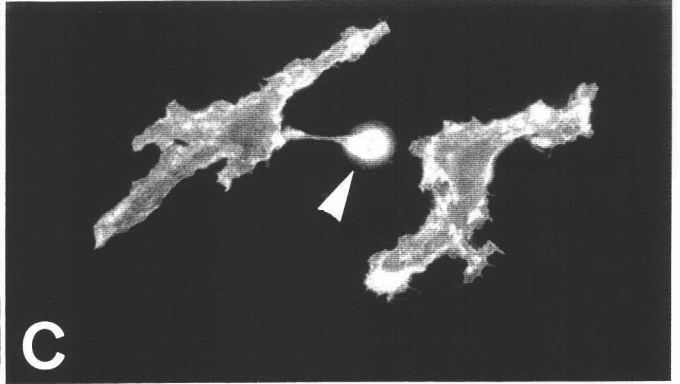
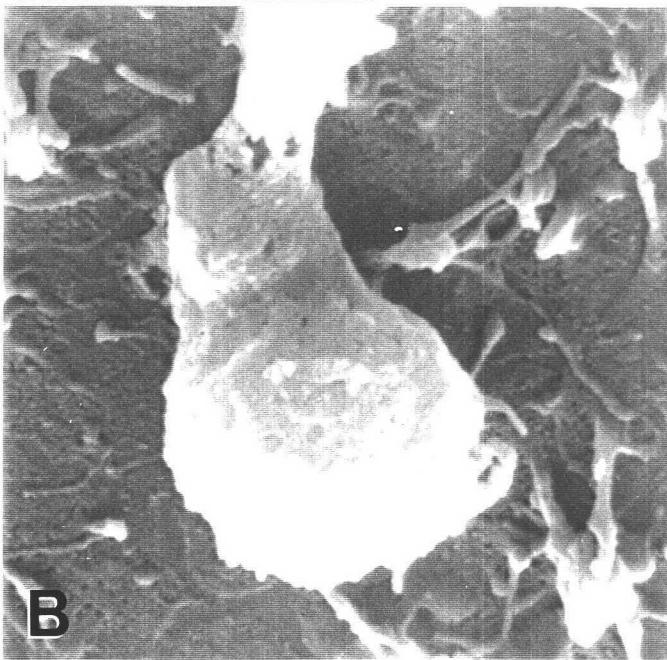
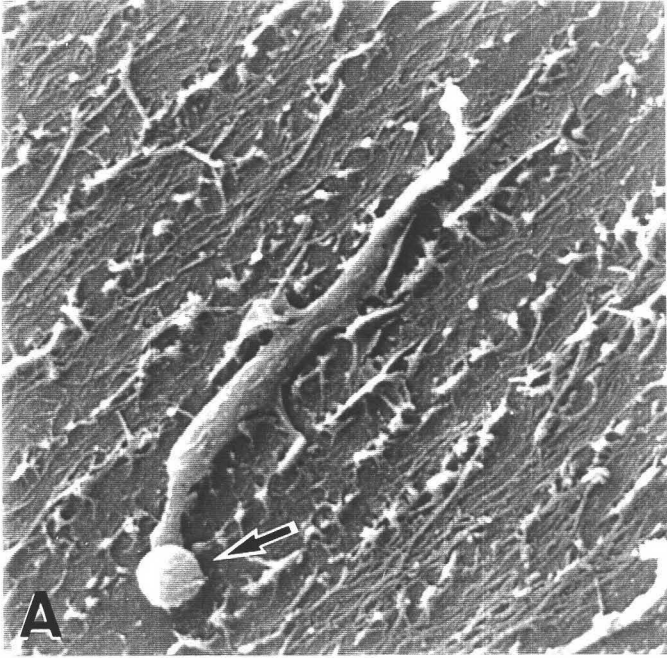


Fig. IV-16. Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por precursores microgliales localizados en el límite entre la capa de fibras ópticas y la CCG, observados en extensiones de retina de E10 tratadas con doble marcaje fluorescente con TUNEL (verde) y QH1 (rojo). Se muestran imágenes de un precursor microglial en proceso de fagocitosis de un fragmento apoptótico (A) y de otro que ya lo ha fagocitado (B). Barra de escala: 25 μ m.

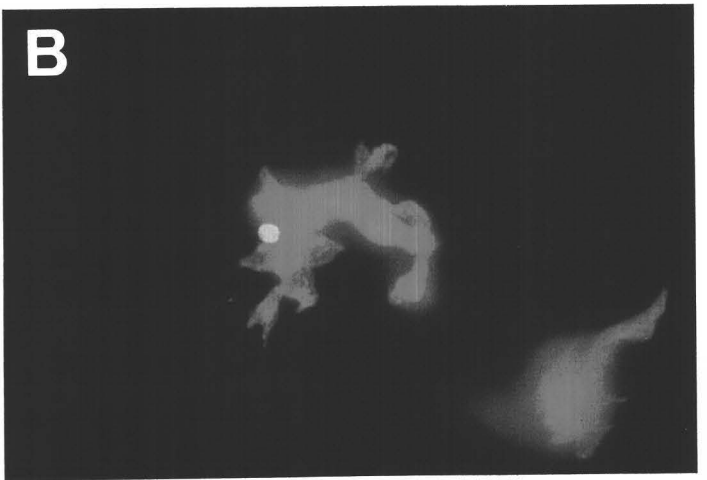
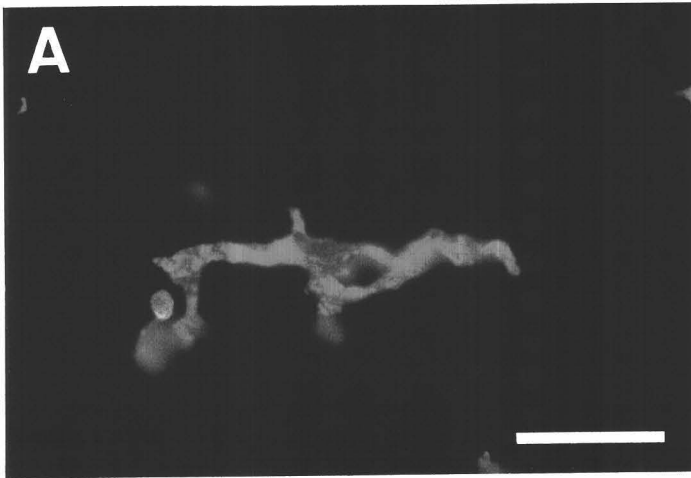


Fig. IV-17. Células de Müller en la CNI de retinas de codorniz de E10, observadas con MET. **A:** Células de Müller (asteriscos) que se distinguen de las neuronas de la CNI por poseer un núcleo ligeramente más grande y notablemente más claro, y un citoplasma también más claro. **B:** Neuronas de la CNI dispuestas en columnas rodeadas por citoplasma de las células de Müller que, como se observa en un aumento (estrella) mostrado en **C**, contiene abundantes polisomas, pequeñas vesículas de contenido claro y numerosos microtúbulos y redes filamentosas. Barra de escala: 5 μm para **A** y **B**; 0.75 μm para **C**.

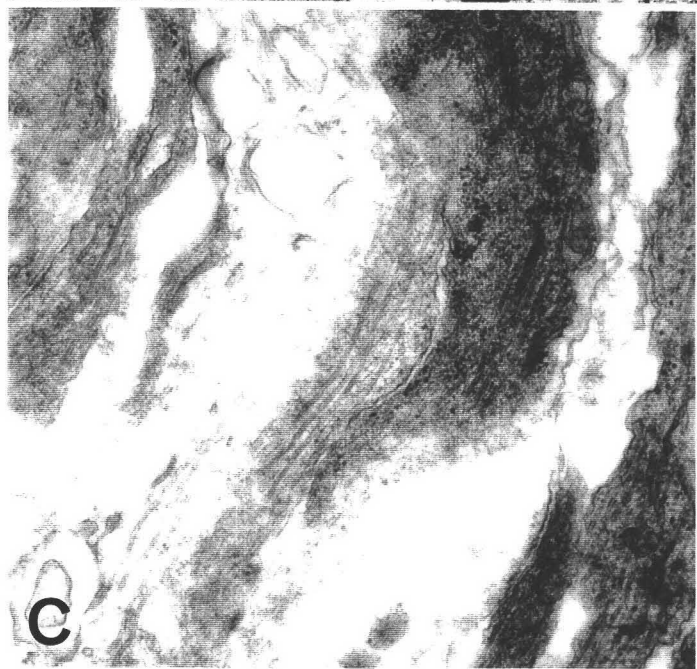
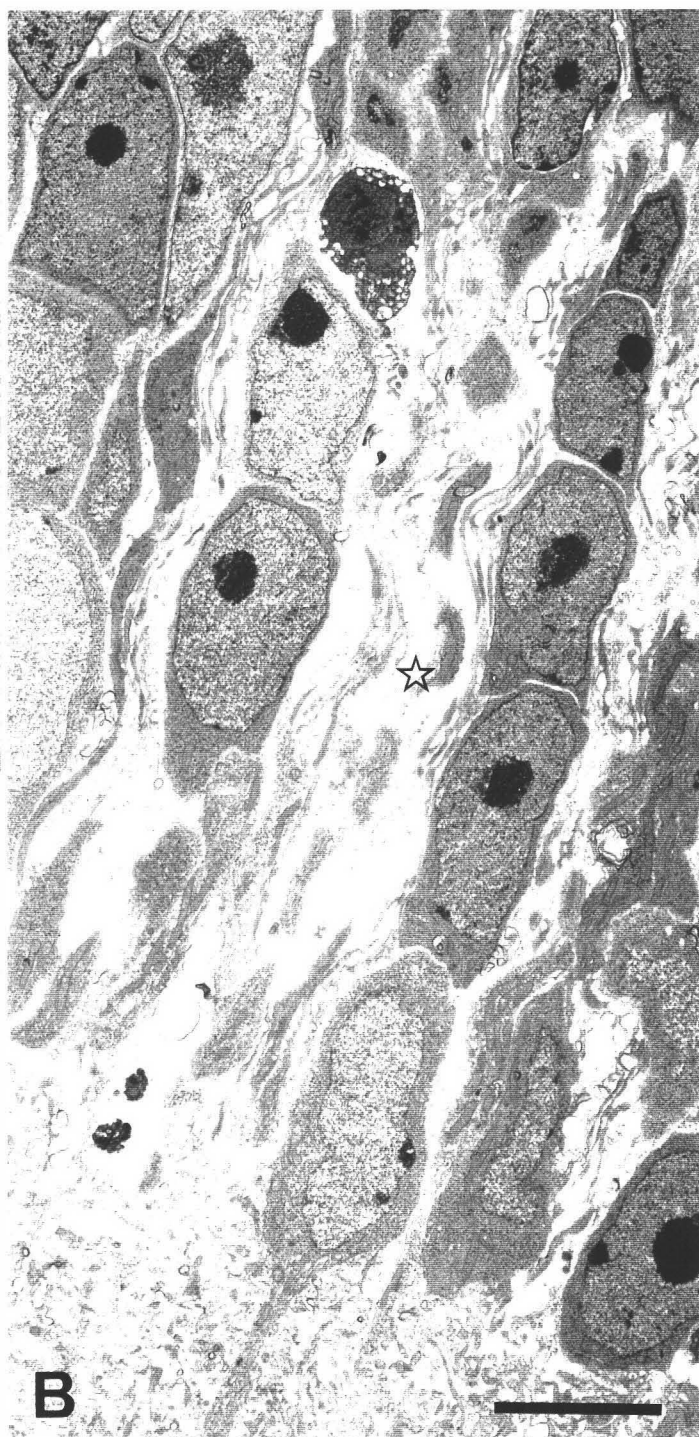


Fig. IV-18. Fagocitosis de fragmentos apoptóticos por células de Müller en la CNI de retinas de codorniz E10 observadas con MET. **A:** Neurona apoptótica (estrella) rodeada por el citoplasma de una célula de Müller (asteriscos). Se indica una zona aumentada en **B**, en la que se observa una parte del citoplasma oscuro de la neurona apoptótica (estrella) que contiene una mitocondria, rodeado por el citoplasma claro de la célula de Müller (asteriscos). **C:** Célula de Müller (asterisco) que tiene englobado en su citoplasma un fragmento apoptótico (estrella) y numerosos cuerpos densos, pequeños y heterogéneos (flechas). Barra de escala: 4 μm para **A**; 0.88 μm para **B**; 2.5 μm para **C**.

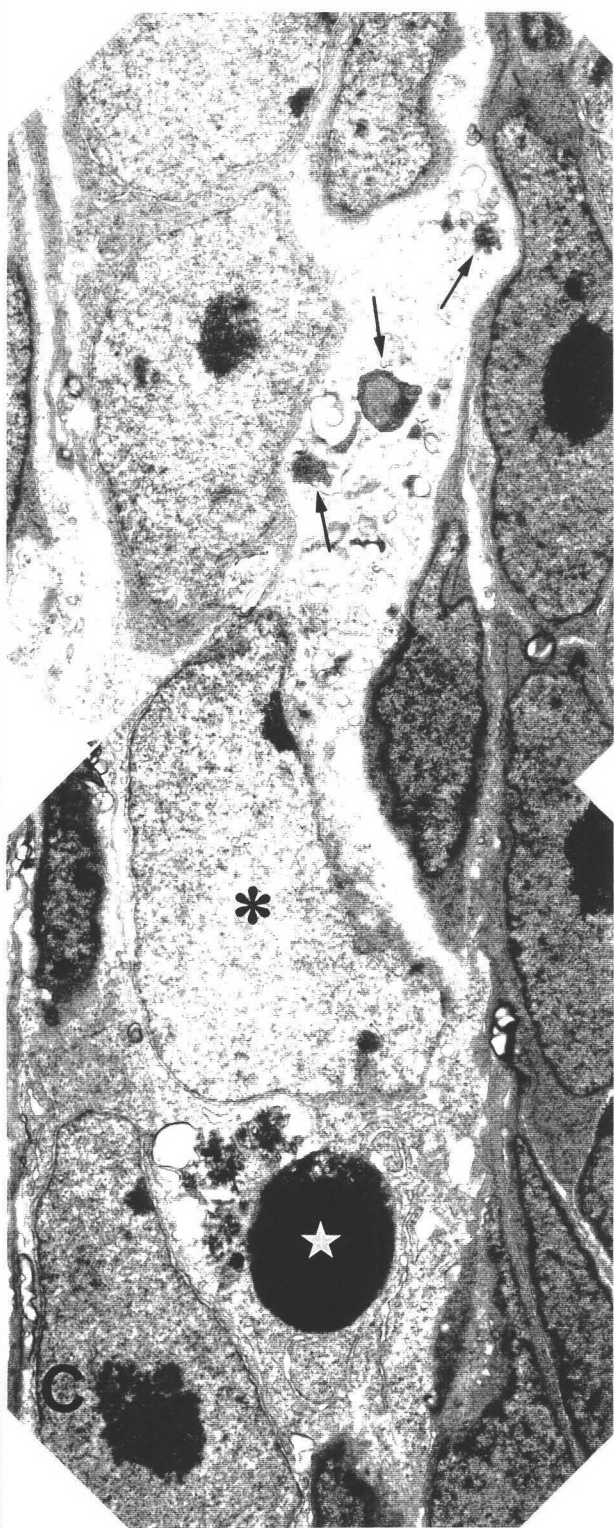
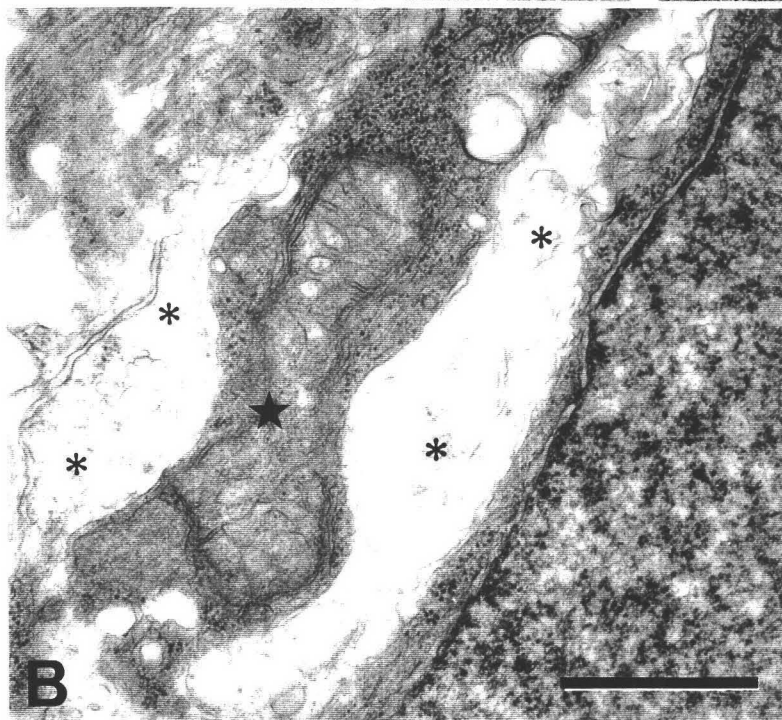
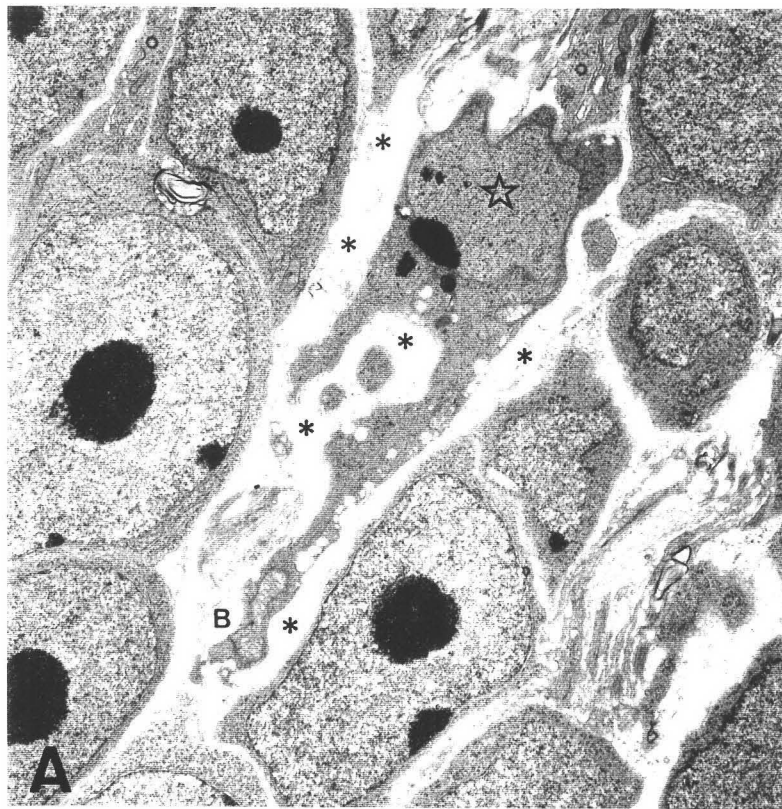


Fig. IV-19. Fragmentos apoptóticos en la capa plexiforme interna (CPI) de retinas de codorniz E10, observados en secciones de retina tratadas con TUNEL (**A**) y con MET (**B-E**). **A:** Fragmentos apoptóticos TUNEL-positivos en la CPI dispuestos en hilera radial (flechas). **B:** Fragmentos apoptóticos (flechas) localizados en el interior de una prolongación radial de una célula de Müller (puntas de flecha) que se muestran aumentados en **C**. **C:** Proceso radial de célula de Müller con dos fragmentos apoptóticos (flechas) en su interior y abundantes microtúbulos (puntas de flecha). **D:** Fragmentos apoptóticos (flechas) dentro de una prolongación radial de una célula de Müller (puntas de flechas) en el límite entre la CPI y la CCG. Se indica una zona aumentada en **E**, en la que se observa un fragmento apoptótico (flecha) en el interior de un proceso radial de una célula de Müller, que contiene numerosos microtúbulos (flechas vacías) y redes de filamentos (asteriscos). Barra de aumentos: 75 μm para **A**; 2 μm para **B**; 0.72 μm para **C** y **E**; 4.8 μm para **D**.

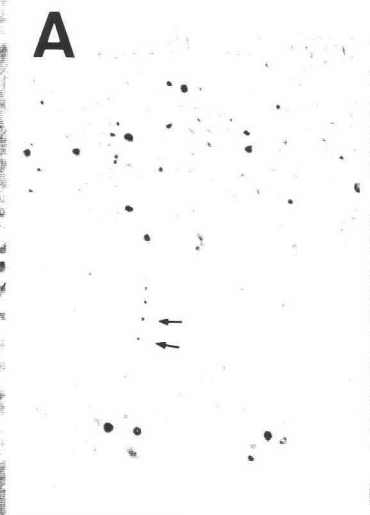
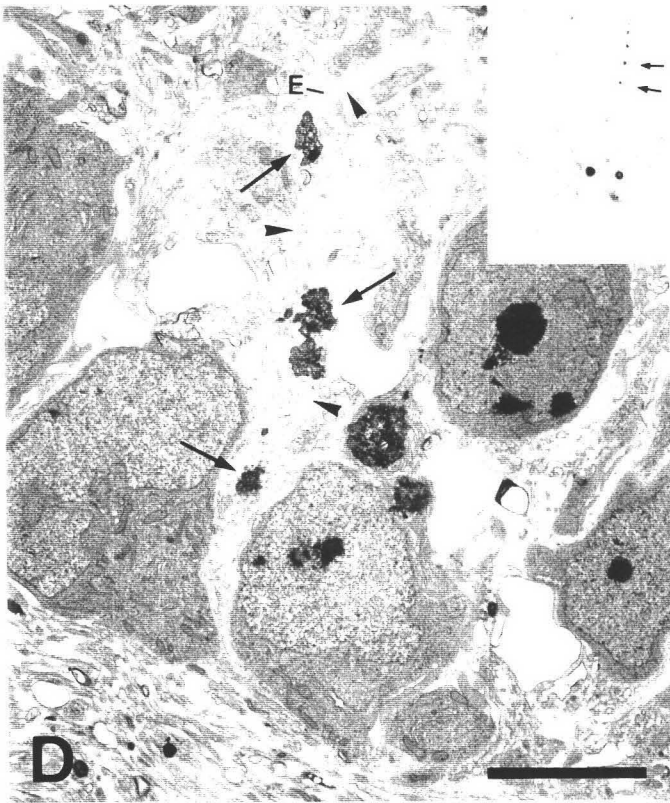
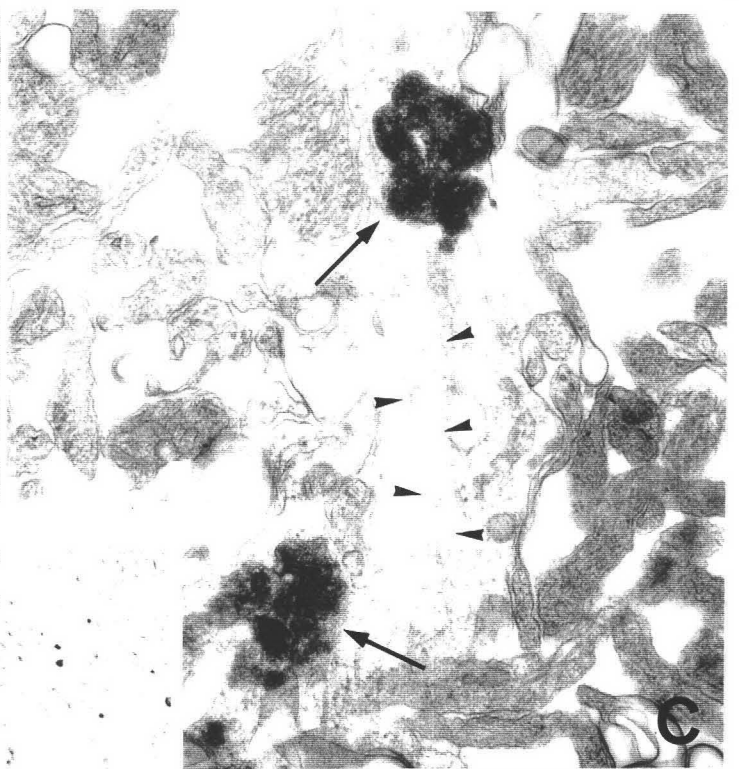
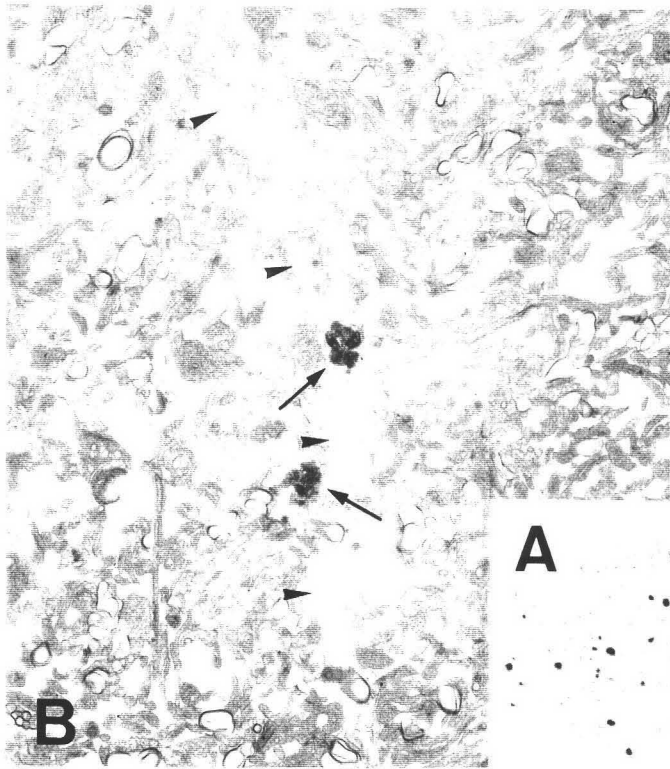
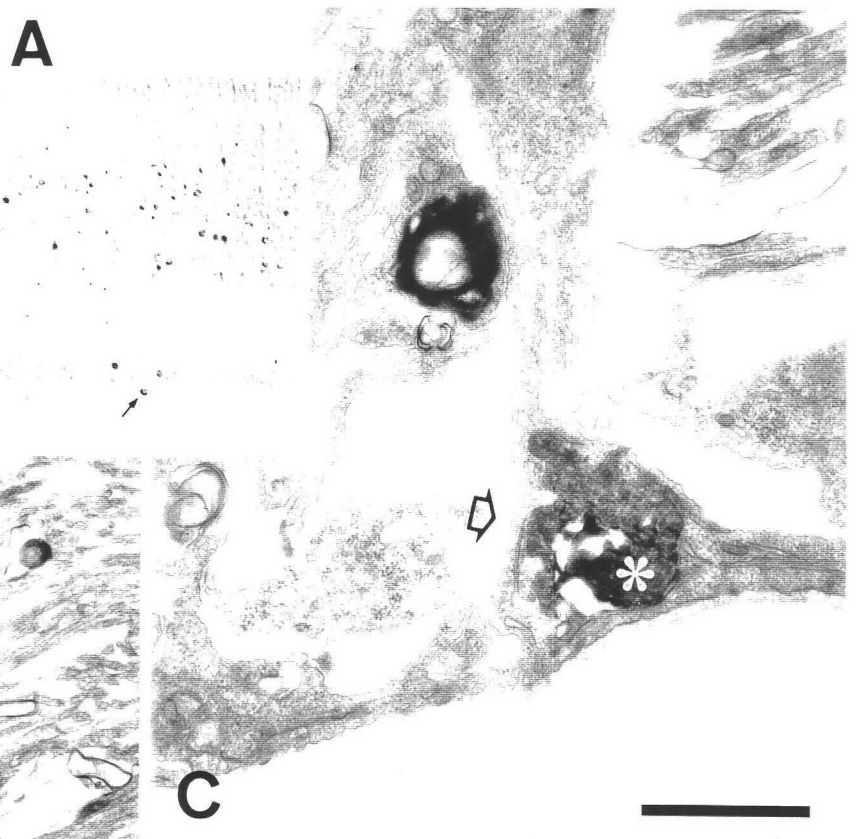
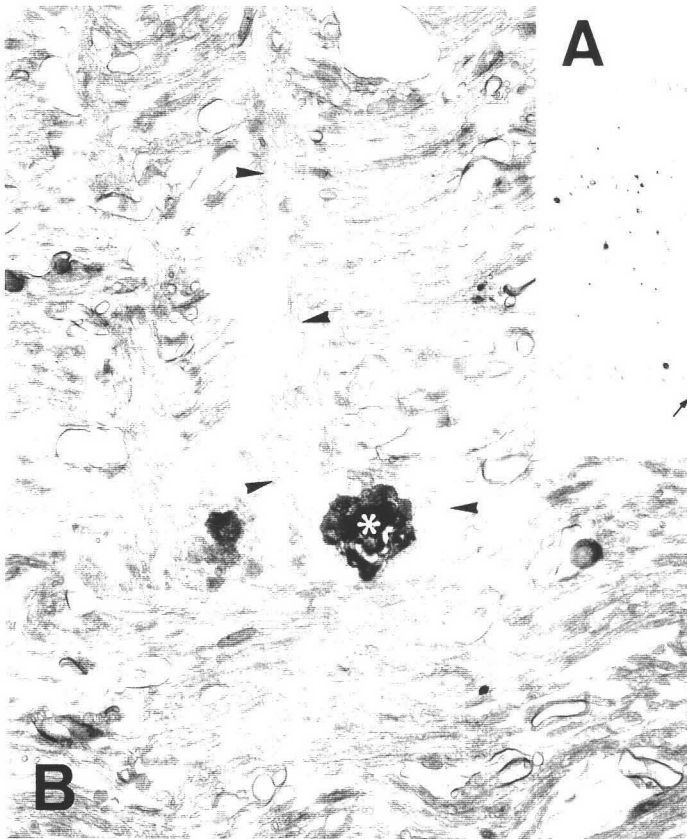


Fig. IV-20. Fragmentos apoptóticos en la capa de fibras nerviosas (CFN) de retinas de codorniz E10, observados en secciones de retina tratadas con TUNEL (**A**) y con MET (**B-C**). **A:** Fragmento apoptótico TUNEL-positivo en la CFN (flecha). **B, C:** Fragmentos apoptóticos (asteriscos) alojados en el interior de una prolongación radial (puntas de flecha) (**B**) y de un pie terminal (flecha vacía) (**C**) de células de Müller. Barra de aumentos: 100 μm para **A**; 2.1 μm para **B**; 1.2 μm para **C**.



A

DISCUSIÓN

Procedimiento técnico

En el presente trabajo hemos determinado los patrones cronotopográficos de distribución de muerte neuronal en la CCG y CNI durante el desarrollo de la retina de codorniz. Para ello hemos marcado las neuronas que mueren en ambas capas de la retina con la técnica TUNEL. Esta técnica reconoce específicamente los extremos OH-3' que surgen de la fragmentación del DNA que tiene lugar durante la muerte celular por apoptosis (Gavrieli et al., 1991). La especificidad de la técnica no parece ser completa, ya que por causas desconocidas marca el citoplasma de algunas células (Egensperger et al., 1996; Jones et al., 1997) y, en determinados sistemas, es incapaz de marcar fragmentos de núcleos aparentemente en apoptosis (Herrup & Busser, 1995). Sin embargo, el TUNEL ha sido utilizado con éxito para el marcaje de células en apoptosis durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón (Chang et al., 1993). En la retina en desarrollo de aves, el TUNEL ha sido utilizado para la detección de células apoptóticas entre E4 y E7 (Frade et al., 1996, 1997), antes de que los axones de células ganglionares establezcan contactos con sus células-destino en el techo óptico. Sin embargo, hasta ahora no se había empleado para el estudio de la muerte neuronal en la CCG y CNI, en etapas posteriores a la innervación del techo óptico. Los núcleos apoptóticos eran reconocidos en este tipo de estudios mediante tinción con colorantes básicos (Hughes & McLoon, 1979; Straznicky & Chehade, 1987) o vitales (Kobayashi, 1993), mucho menos específicos que el marcaje con TUNEL.

Nosotros hemos establecido el patrón cronotopográfico de distribución de neuronas apoptóticas en la CCG y CNI mediante la determinación de las densidades de núcleos TUNEL+ en diferentes muestras tomadas a través de toda la superficie de cada extensión de retina. En ellas se observaban cuerpos TUNEL+ de tamaños muy variables. Para obtener las densidades de núcleos apoptóticos, solamente hemos contado aquellos cuerpos TUNEL+ de mayor diámetro (4 μm o más). Teniendo en cuenta que la fragmentación nuclear es característica del proceso de apoptosis (Johnson & Deckwerth, 1993; Bredesen, 1995), este procedimiento nos permite

asegurar que solo hemos considerado núcleos apoptóticos completos o poco fragmentados, evitando una sobrevaloración del número real de células en apoptosis. Además, el número de fragmentos procedente de las neuronas apoptóticas puede no ser igual en diferentes zonas de la retina o estadios de desarrollo, por lo que la consideración de todos los cuerpos TUNEL+ podría introducir errores cuando se comparan los resultados obtenidos en distintas zonas a lo largo del desarrollo.

Los valores de densidad de células apoptóticas en la CCG encontrados en nuestro estudio son notablemente superiores a los citados por Straznicky & Chehade (1987) y considerablemente superiores a los hallados por Kobayashi (1993) en la CCG de la retina embrionaria de pollo. La densidad media máxima referida por Straznicky & Chehade (1987) era de 388/mm² en la retina periférica de E12, mientras que Kobayashi (1993) encontraba una densidad máxima en la región central de E12 equivalente a 1370/mm². La densidad máxima encontrada por nosotros en la retina de codorniz era de 800/mm² en la retina periférica del cuadrante dorsonasal de E11. Estas diferencias de densidad entre nuestro estudio y el de otros autores pueden reflejar diferencias interespecíficas entre la codorniz y el pollo, pero también podrían estar influenciadas por los distintos tratamientos técnicos empleados. Así, nosotros utilizamos la técnica TUNEL, mientras que Straznicky & Chehade (1987) empleaban tinción con violeta de cresilo y Kobayashi (1993) hacía tinción vital con azul de Nilo. Frade et al. (1997) han descrito que, durante el desarrollo temprano de la retina de pollo, el número de núcleos picnóticos contados cuando se utilizan métodos de tinción clásicos es inferior al de núcleos apoptóticos TUNEL-positivos, probablemente debido a que la fragmentación del DNA es anterior a la picnosis. Además, estas diferentes técnicas pueden afectar de distinto modo al tejido dando lugar a variaciones en la retracción del mismo, que tendrían una influencia directa sobre los valores de densidad. También podrían existir diferencias de criterio en la consideración de los cuerpos picnóticos o apoptóticos contados, ya que Straznicky & Chehade (1987) contaban "neuronas picnóticas", pero no especificaban si incluían o no cuerpos picnóticos fragmentados.

El objeto de nuestro estudio era comparar la distribución de las neuronas apoptóticas con la de los precursores microgliales en cada etapa del desarrollo de la retina. Para ello, en cada embrión utilizado, la retina derecha se marcaba con TUNEL para determinar la distribución de las neuronas apoptóticas, mientras que la

retina izquierda se marcaba con inmunocitoquímica-QH1 para determinar la distribución de los precursores microgliales. Esta forma de proceder es válida ya que la distribución de células muertas es similar en las retinas derecha e izquierda de embriones de pollo normales (Kobayashi, 1993).

Muerte neuronal en la retina de aves

Nuestros resultados demuestran la existencia de muerte celular tanto en la CCG como en la CNI de la retina de codorniz en desarrollo. Esto es semejante a lo que ha sido descrito en el embrión de pollo (Hughes & Lavelle, 1975; Yew, 1979; Kobayashi, 1993; Frade et al., 1997) y en mamíferos (Hume et al., 1983; Young, 1984; Penfold & Provis, 1986; Wong & Hughes, 1987; Horsburgh & Sefton, 1987; Voyvodic et al., 1995). En ambas capas, la muerte celular tiene lugar mediante apoptosis, ya que las células que mueren son reconocidas con TUNEL.

En la CNE de la retina de codorniz no hemos observado la presencia de células apoptóticas, a diferencia de lo descrito en retinas de diferentes especies de mamíferos, en las que existe muerte celular en la parte escleral de la capa citoblástica (presuntiva de la CNE antes de que se desarrolle la CPE) en períodos del desarrollo perinatales, hasta poco después de la apertura de los párpados y comienzo de la función visual (Young, 1984; Spira et al., 1984; Beazley et al., 1987; Robinson, 1988; Harman et al., 1989). Las células apoptóticas de la parte vítrea de la capa citoblástica parecen ser fotorreceptores, ya que éstos ocupan dicha posición antes de la aparición de la CPE, que terminará separando la CNE y la CNI. En el caso de la retina de codorniz, no parece haber muerte de fotorreceptores ya que la observación de células apoptóticas en la CNI es siempre posterior a la aparición de la CPE, y por lo tanto los fotorreceptores ya están localizados en la CPE, en la que no se advierten signos de apoptosis. No obstante, no se puede descartar que algunas células que mueren en la parte más escleral de la CNI sean fotorreceptores que no han tenido éxito en una correcta ubicación en la CNE. Esta posibilidad ha sido mencionada en la retina de mamíferos (Young, 1984; Robinson, 1988; Harman et al., 1989).

El período de tiempo en el que tiene lugar la muerte celular en la CCG de la retina de codorniz se extiende entre E7 y E13, y es básicamente similar al descrito por diferentes autores en la retina de pollo (ver Fig. 21). Como resultado de la apoptosis en la CCG, se elimina una elevada proporción de células ganglionares cuyos axones ya han alcanzado el techo óptico. Así, en el embrión de pollo, el número de dichas células disminuye desde aproximadamente cuatro millones en E10 hasta alrededor de dos millones y medio en E17-E18 (Rager & Rager, 1978; Straznicky & Chehade, 1987).

El período de muerte de células ganglionares en la retina de codorniz (E7-E13) es básicamente coincidente con el período de invasión del techo óptico por los axones de células ganglionares, que tiene lugar entre E5, cuando las primeras fibras ópticas alcanzan el techo, y E14, cuando la arborización terminal de las fibras ópticas ha adquirido su morfología madura (Senut & Alvarado-Mallart, 1986). Esta coincidencia temporal es compatible con la ampliamente aceptada hipótesis de que la muerte de células ganglionares es dependiente del destino, tal como ha sido sugerido en el pollo (Rager & Rager, 1978; Rager, 1980) y en mamíferos (ver revisión de Oppenheim, 1991). Según esta hipótesis, la regulación de la muerte de las células ganglionares estaría controlada, al menos en parte, por influencias derivadas de los destinos sinápticos de las células.

Nuestros resultados revelan que la muerte celular en la CNI de la retina de codorniz tiene lugar entre E7 y P3. Aunque no hay estudios previos que hayan determinado el período completo de muerte celular en la CNI de aves, el período determinado por nosotros es compatible con las observaciones de Yew (1979) que identifica células picnóticas en la CNI de la retina de embriones de codorniz de E8, E10 y E14. También está de acuerdo con los resultados de Hughes & Lavelle (1975) y Reuter & Zilles (1993) que detectan muerte celular en la CNI de la retina de pollo entre E10 y E15 (que equivalen a E8-E12 en la codorniz) y con la observación de Frade et al. (1997) que identifican células apoptóticas TUNEL-positivas en la CNI de embriones de pollo de E12 (E9 de la codorniz).

La muerte celular en la CNI de la retina de codorniz comienza en E7, casi simultáneamente al inicio de la muerte en la CCG. Sin embargo, la extensión de la muerte celular al resto de la retina es más lenta en la CNI que en la CCG, de manera que, en las diferentes regiones retinianas, la presencia de células

apoptóticas en la CNI siempre es posterior a la muerte celular en la CCG. En todas las áreas de la retina de codorniz, la muerte celular en la CNI siempre comienza después que ya han aparecido las capas plexiformes interna y externa (Yew, 1979; propias observaciones). Sin embargo, la formación de sinapsis entre células ganglionares y células bipolares y amacrinas en la CPI parece iniciarse con posterioridad a la aparición de células apoptóticas en la CNI. En efecto, en la retina de pollo las primeras sinapsis en la CPI no se observan hasta E12 (Hering & Kröger, 1996; Layer et al., 1997) en las zonas centrales de la retina. Este estadio del desarrollo del pollo equivale a E9 en la retina de codorniz, en la que la CNI muestra células apoptóticas en amplias zonas del cuadrante temporo-dorsal (ver Fig. 8). La aparición de muerte celular en la CNI antes del inicio de la sinaptogénesis en la CPI también ha sido descrita en mamíferos (Young, 1984; Wong & Hughes, 1987; Horsburgh & Sefton, 1987), poniendo de manifiesto que la muerte de las células de la CNI es un proceso independiente de la sinaptogénesis entre éstas y las células ganglionares. Por lo tanto, el control de la muerte celular en la CNI de aves parece ser independiente del destino, a diferencia de la muerte en la CCG. En apoyo de esta hipótesis, se ha comprobado que la intensidad y el período de muerte celular en la CNI no se ve afectado por la destrucción de las células ganglionares, tras degeneración retrógrada de las mismas conseguida experimentalmente por destrucción del techo óptico o sección del nervio óptico (Hughes & LaVelle, 1975; Beazley et al., 1987; Rehen et al., 1996).

Si la muerte celular en la CCG es dependiente de destino y la que tiene lugar en la CNI es independiente de destino, parece lógico suponer que ambos tipos de muerte celular tendrán lugar mediante mecanismos diferentes, con distinta regulación. No obstante, ambos responden al mecanismo de la apoptosis, como se deduce del marcaje con TUNEL de las células que mueren en la CCG y en la CNI. Sin embargo, este marcaje lo único que refleja es la existencia de una fragmentación del DNA, que tiene lugar en fases relativamente avanzadas del proceso de apoptosis. Pero nada indica de las vías de señalización y transducción intracelular que conducen a la fragmentación del DNA y a la muerte de la célula. Los resultados de Rehen et al. (1996) apoyan fuertemente que los mecanismos de apoptosis en la CCG y en la CNI de la retina son diferentes. Así, tanto in vitro como in vivo, la inhibición de la síntesis de

proteínas con anisomicina provoca una drástica disminución del porcentaje de células apoptóticas en la CCG y un considerable incremento de la apoptosis en la CNI de la retina de rata. Rehen et al. (1996) han sugerido que la muerte celular está regulada por un balance entre moduladores positivos y negativos de la apoptosis. En la CCG la muerte celular sería inducida por una predominancia de moduladores positivos, mientras que en la CNI habría un mecanismo latente de apoptosis que sería continuamente inhibido por moduladores negativos. Las diferentes formas de regulación de la apoptosis también dependen de la presencia en las células de diferentes receptores. Por ejemplo, se ha demostrado que el factor de crecimiento nervioso (NGF), que normalmente induce la supervivencia neuronal mediante señalización a través del receptor tirosin-kinasa A (trkA) (Oppenheim, 1991), es capaz de inducir muerte de algunas células ganglionares que acaban de abandonar el ciclo celular mediante señalización a través del receptor p75 (Frade et al., 1996; Dechant & Barde, 1997; Frade & Barde, 1998). Por lo tanto, los diferentes mecanismos de regulación de la muerte celular en la CCG y en la CNI podrían ser debidos a la presencia de diferentes receptores en las neuronas de ambas capas, que determinarían una diferente acción de idénticas moléculas reguladoras.

Gradientes de muerte neuronal en el desarrollo de la retina

Nuestros resultados demuestran que el incremento de densidad de neuronas que mueren, tanto en la CCG como en la CNI, comienza a partir de una región central de la retina, localizada ligeramente dorsal al extremo dorsal de la CNO, que parece coincidir con el area centralis (Figs. 5, 8 y 9). El area centralis de la retina de aves es una región especializada, con mayor densidad de células ganglionares que el resto de la retina (Ehrlich, 1981; Straznicky & Chehade, 1987) y que carece de bastones en la capa de fotorreceptores (Bruhn & Cepko, 1996). En mamíferos, la muerte de células ganglionares también parece iniciarse en el area centralis, desde donde se extiende centro-periféricamente al resto de la retina (Wong y Hughes, 1987; Robinson, 1988). Por otra parte, la aparición de opsinas rojas y verdes en los conos se inicia en el area centralis de embriones de pollo de E14, antes de extenderse hacia otras regiones de la retina (Bruhn & Cepko, 1996). Por lo tanto, parece que el area centralis es la zona de la

retina donde se desencadenan diferentes procesos de desarrollo y desde ella se propagan hacia el resto de la retina. Los factores existentes en el area centralis implicados en el inicio de procesos de desarrollo, como la muerte neuronal, permanecen desconocidos.

Tanto en la CCG como en la CNI, la muerte neuronal que se inicia en el area centralis se propaga hacia el resto de la retina siguiendo tres gradientes cronotopográficos: centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral. Siguiendo estos gradientes, la muerte neuronal se extiende desde el area centralis hacia el cuadrante dorso-temporal en ambas capas de la retina,. Después, se extiende progresivamente hacia regiones periféricas de este cuadrante, y hacia los cuadrantes dorso-nasal y ventro-temporal y, finalmente, al cuadrante ventro-nasal. En cada cuadrante se repite el modelo de progresión centro-periférica. Las neuronas que mueren desaparecen primero en la parte central del cuadrante dorsotemporal y esta desaparición se extiende progresivamente a otras regiones de la retina siguiendo el mismo patrón cronotopográfico, de manera que la zona más periférica del cuadrante ventronasal es la última región donde se pueden detectar neuronas que mueren (ver Figs. 5 y 8).

En la capa nuclear interna, que se localiza más escleralmente que la CCG, Los patrones de aparición, incremento de densidad y desaparición de la muerte neuronal son prácticamente idénticos en la CCG y en la CNI, aunque el patrón observado en la CNI está más retrasado que el de la CCG. Este hecho añade un cuarto gradiente a la expansión de la muerte neuronal en la retina de la codorniz: el vítreo-escleral.

En la actualidad, se tenía conocimiento de la existencia de los gradientes centro-periférico (Rager & Rager, 1978; Rager, 1980; Straznicky & Chehade, 1987) y temporo-nasal (Hughes & McLoon, 1979; Straznicky & Chehade, 1987; Kobayashi, 1993) de muerte neuronal en la CCG durante el desarrollo de la retina de aves. Por el contrario, la existencia en aves de los gradientes dorso-ventral y vítreo-escleral son descritos por primera vez en este trabajo.

Además de la muerte neuronal, otros procesos de desarrollo de la retina de aves transcurren en forma de gradientes cronotopográficos similares a los observados para la muerte neuronal en este trabajo. Así, en la retina del embrión de pollo la neurogénesis de los diferentes tipos de neuronas tiene lugar siguiendo los mismos gradientes centro-periférico, temporo-nasal, dorso-ventral y vítreo-escleral (Prada et al.,

1991). La diferenciación de neuronas (Layer & Kotz, 1983; Halfter et al., 1985; Prada et al., 1991), fotorreceptores (Bruhn & Cepko, 1996) y glía de Müller (Casado et al., 1996) también tienen lugar en forma de gradientes. Asimismo, durante el desarrollo temprano de la retina de aves, ciertos receptores de la familia Eph y sus respectivos ligandos se expresan siguiendo gradientes centro-periférico y dorso-ventral (Holash et al., 1997; Sefton et al., 1997), mientras que algunos reguladores transcripcionales como el ácido retinoico se distribuyen gradualmente a lo largo del eje dorso-ventral (Mey et al., 1997) y otros lo hacen a lo largo del eje temporo-nasal (Yuasa et al., 1996). La sensibilidad al kainato de las células ganglionares, amacrinas y bipolares, que desencadena un incremento de la muerte de estas neuronas, también avanza en la retina siguiendo un gradiente temporo-nasal (Catsicas & Clarke, 1987). Algunos de estos gradientes descritos, como los de reguladores transcripcionales o de receptores de la familia Eph, se manifiestan en etapas muy tempranas del desarrollo de la retina, mientras que otros, como la diferenciación de fotorreceptores, lo hacen en etapas muy avanzadas.

La existencia de gradientes cronotopográficos en la mayoría de los procesos de desarrollo que tienen lugar en la retina, independientemente de que estos procesos tengan lugar en etapas tempranas o avanzadas del desarrollo, sugiere que la existencia de gradientes cronotopográficos, incluyendo los de muerte neuronal, es debida a causas intrínsecas a la retina. La existencia de gradientes casi idénticos de distribución de células apoptóticas en la CCG y CNI, que muestran dos mecanismos de apoptosis diferentes, uno destino-dependiente y otro destino-independientemente (ver apartado anterior de la Discusión), también sugiere que dichos gradientes son inherentes a la retina y no dependen de factores procedentes del destino. En apoyo de esta hipótesis, Hughes & McLoon (1979) han descrito un gradiente temporo-nasal de muerte de células ganglionares en la retina de embriones de pollo, que continúa estando presente en animales a los que se les ha eliminado el techo óptico, sugiriendo que dicho gradiente es inherente a la retina.

En la mayoría de las células de la retina de aves se ha demostrado la presencia de moléculas de información posicional, las moléculas TOP, que se distribuyen formando gradientes desde el margen dorso-temporal hasta el margen ventro-nasal (Trisler et al., 1981; Trisler, 1987; Sanes, 1993). Estos gradientes están presentes desde edades tempranas del desarrollo hasta la edad adulta. Se ha demostrado que

estos marcadores de posición celular están implicados en la formación de sinapsis en la retina (Trisler, 1987). La distribución de los gradientes de moléculas TOP coincide exactamente con los gradientes de muerte neuronal encontrados por nosotros en la CCG y CNI. No obstante la relación entre ambos gradientes es desconocida.

Diferentes estudios han demostrado que la apoptosis neuronal en la retina en desarrollo es debida a una combinación de mecanismos intracelulares y señales extracelulares (revisado por Linden et al., 1996). La idea de que las señales extracelulares pueden ser proporcionadas por las células destino a través de los axones que conectan con ellas (revisado por Oppenheim, 1991) está ampliamente extendida. Pero también se ha demostrado que las células de la retina liberan proteínas neurotróficas implicadas en interacciones competitivas dentro de la retina, que controlan la supervivencia y muerte neuronal (Armson et al., 1987; Araujo & Linden, 1993; Ary-Pires et al., 1997). Las neurotrofinas de la familia del NGF, tales como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5), son capaces de estimular la supervivencia de las células ganglionares (Rodríguez-Tébar et al., 1989; De la Rosa et al., 1994; Cui & Harvey, 1994). Estas neurotrofinas son expresadas por células de la retina de embriones de pollo, con un pico entre los días 12-15 (Hallböök et al., 1996), coincidiendo con el pico de muerte de células ganglionares (ver Fig. 21). La expresión de neurotrofinas en la retina podría seguir gradientes similares a la expresión de otros factores, lo que explicaría que la muerte neuronal fuera desapareciendo siguiendo esos gradientes. En resumen, la expresión de determinados factores en forma de gradientes cronotopográficos dentro de la retina podría explicar la existencia de gradientes de aparición, incremento y desaparición de muerte neuronal en la retina de aves.

Apoptosis y entrada de precursores microgliales en la retina

Nuestros resultados demuestran que si consideramos los períodos de muerte de células ganglionares (E7-E13) y de migración de precursores microgliales (E7-E16) en el conjunto de la retina hay una coincidencia cronológica de ambos (ver Fig. 21). Esta coincidencia ha sido uno de los principales argumentos en favor de la hipótesis de que

la muerte celular es el estímulo que atrae a los precursores microgliales durante la entrada de éstos en la retina (Hume et al., 1983; Perry, 1987; Schnitzer, 1989; Pearson et al., 1993). Sin embargo, al determinar con exactitud la localización de las células apoptóticas y de las células microgliales en los diferentes estadios del desarrollo de la retina, se puede comprobar que la colocación de ambas no está tan extendida como inicialmente se pudiera pensar. En efecto, las células microgliales migran tangencialmente sobre los pies terminales de las células de Müller (capítulo I de esta tesis) y no a través de la CCG, como sería lógico si las células apoptóticas de esta capa fueran el estímulo que las atrae. Las células microgliales que migran sobre los pies terminales van a desplazarse con posterioridad en dirección vítreo-escleral, de manera que llegan a alcanzar la CCG. Así, a partir de E9 existen zonas de la retina en las que la CCG muestra colocación de células apoptóticas y células microgliales (comparar estadios E9-E11 en Figs. 5 y 12). Sin embargo, incluso en estos estadios las nuevas células microgliales que entran en la retina lo siguen haciendo sobre los pies terminales de las células de Müller. Además, en estadios en los que ya ha cesado la muerte de células ganglionares en la mayor parte de la retina (E12-E13) o en la totalidad de la misma (E14-E16) continúa habiendo entrada de precursores microgliales desde la zona de la cabeza del nervio óptico. Por lo tanto, en la retina de codorniz no parece haber una relación directa entre la muerte de células ganglionares y la entrada y migración de precursores microgliales.

También existe una coincidencia cronológica entre la muerte celular en la CNI (E7-P3) y la migración tangencial (E7-E16) y radial (E9-P3) de los precursores microgliales. Sin embargo, la falta de colocación entre las células microgliales que migran tangencialmente en la parte vítreo y las células apoptóticas de la CNI es tan evidente que no permite dudas sobre la falta de relación entre ambos procesos. Durante su migración radial, los precursores microgliales tampoco muestran colocación con las células apoptóticas de la CNI. En efecto, las células microgliales solo son capaces de acceder a la CPE atravesando la CNI después que ha cesado la muerte celular en la misma. En relación con esto, merece destacarse que durante la migración radial de la microglía existen dos fases: a) de migración a través de la CFN y la CCG, es decir hasta la parte vítreo de la CPE ; y b) de migración a través de la CPE y

de la CNI para alcanzar la CPE. La primera fase se da con relativa rapidez tras la entrada y migración tangencial de los precursores microgliales, ya que la migración tangencial comienza en E7 y en E9 ya hay algunos precursores que han alcanzado la CCG. Además, esta fase es compatible con la presencia de células ganglionares apoptóticas en el camino de las células microgliales (aunque no sean el estímulo que las atrae, como ya se ha discutido). La segunda fase de la migración tangencial tiene lugar después de una parada de varios días de los precursores microgliales en la parte más vítrea de la CPI, ya que las primeras células que atraviesan la CPI y alcanzan su borde escleral, lo hacen en E12, tres días después de que hubieran alcanzado el borde vítreo de dicha capa. Esta parada podría estar relacionada con el desarrollo de la sinaptogénesis en la CPI, ya que este proceso en la retina del pollo tiene lugar a partir de E12 (Hering & Kröger, 1996; Layer et al., 1997), que equivale a E9 en la codorniz. El paso de las células microgliales a través de la CPI podría alterar la precisión requerida en el establecimiento de contactos sinápticos en dicha capa, por lo que la retina dispondría de mecanismos que evitan el paso de la microglía a través de la CNI hasta que se ha conseguido la sinaptogénesis. Durante la parada de las células microgliales en el borde vítreo de la CPI, éstas no se ven atraídas por las numerosas células apoptóticas presentes en la CNI. Sin embargo, en los momentos finales de la presencia de células apoptóticas en la CNI, las células microgliales reanudan su migración radial, de forma que atraviesan la CNI cuando ya no hay muerte celular en la misma. Este comportamiento demuestra sin lugar a dudas que la muerte celular no es el estímulo que atrae a los precursores microgliales de la retina, sino más bien lo contrario.

Lo discutido anteriormente es compatible con la hipótesis de que el cese de la muerte celular en la CNI es la causa que dispara la reanudación de la migración radial de las células microgliales y su paso a través de la misma. Sin embargo, otra explicación posible es que la llegada de las células microgliales a las inmediaciones de la CNI dispara el cese de la muerte celular. Es decir, que las células microgliales tendrían un efecto neurotrófico sobre las células de la CNI. En favor de esta hipótesis, diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los macrófagos y células microgliales del sistema nervioso son capaces de segregar diferentes factores neurotróficos, tales como NGF (Mallat et al., 1989; Frade & Barde, 1998) y NT-3 (Elkabes et al., 1996). También se ha demostrado que el medio condicionado por

células microgliales promueve la supervivencia de algunas poblaciones neuronales (Nagata et al., 1993). Sin embargo, también hay datos en la literatura que demuestran que los macrófagos pueden llevar a cabo el efecto contrario, es decir la inducción de la muerte celular mediante la acción del NGF (Frade & Barde, 1998). La inducción de la muerte o supervivencia de las células sobre las que actúa este factor neurotrófico depende del tipo de receptores presentes en la superficie de la misma (Dechant & Barde, 1997). Por lo tanto, la posible influencia neurotrófica de factores secretados por las células microgliales sobre las células de la CNI presupondría la presencia en las mismas de los receptores adecuados para la señalización de la supervivencia celular. En este sentido, los receptores del NGF, BDNF y NT-3 (trkA, trkB, trkC) han sido demostrados en la retina de aves durante las etapas del desarrollo que coinciden con el período de muerte celular (Hallböök et al., 1996).

La conclusión obtenida en nuestro estudio de que la muerte celular no es el estímulo que atrae a las células microgliales durante el desarrollo normal está de acuerdo con la actual visión del problema del grupo de Perry, que era el principal impulsor de la hipótesis contraria (Perry et al., 1985; Perry, 1987; Perry & Gordon, 1991). En efecto, en un trabajo posterior (Perry et al., 1994) reconocía que la coincidencia entre el período de entrada y dispersión de precursores microgliales en el SNC y el período de muerte neuronal puede determinar que las células microgliales actúen como fagocitos oportunistas, aunque no fuesen directamente atraídos por las neuronas que degeneran (Perry et al., 1994).

Aunque nuestros resultados demuestran que la muerte celular no es el estímulo que dispara la entrada y migración de precursores microgliales, no es descartable la existencia de una relación indirecta entre ambos procesos. En efecto, las células que mueren en la CCG y especialmente en la CNI están en estrecho contacto con la superficie de las células de Müller, las cuales intervienen en la fagocitosis de los restos apoptóticos. Durante la apoptosis, en la superficie de las células que mueren se expresan nuevas moléculas (Fadok et al., 1992; Vermes & Haanen, 1994;) que podrían interactuar con las células de Müller, induciendo cambios en éstas que estimularan la migración de células microgliales sobre sus pies terminales. En este sentido, ha sido descrito un incremento de la expresión de la proteína bcl-2 por las células de Müller, en respuesta a la muerte de células ganglionares (Chen et al., 1994) o de fotorreceptores

(Grosche et al., 1995). También el antígeno Thy-1 es expresado por las células de Müller tras la muerte de neuronas retinianas (Dabin & Barnstable, 1995). Thy-1 es una molécula estrechamente relacionada con la migración celular, ya que liga diferentes moléculas de adhesión celular, como laminina y activador de plasminógeno (Liësi et al., 1990).

Es interesante resaltar que la muerte de neuronas no funciona como estímulo que atrae a las células microgliales solamente durante el desarrollo normal. La muerte neuronal originada como consecuencia de diversos tipos de agresiones en el SNC, ya sea en adulto o durante el desarrollo embrionario, sí estimula la llegada de células microgliales. Así, en el SNC maduro, las agresiones mecánicas, químicas o infecciosas desencadenan el proceso de activación de la microglía ramificada, que es reclutada hacia las zonas en las que hay muerte neuronal (Graeber et al., 1988; Kreutzberg et al., 1997). También la microglía en desarrollo, que normalmente no es atraída hacia zonas de muerte celular que ocurre naturalmente, es reclutada hacia zonas del SNC en las que se lleva a cabo muerte de neuronas como consecuencia de una agresión experimental. Esto ha sido demostrado en el núcleo istmo-óptico, tras eliminación de sus células destino en la retina (Cuadros, comunicación personal).

Tipos celulares responsables de la eliminación de restos apoptóticos en la retina

En el presente estudio, hemos observado que los precursores microgliales que migran tangencialmente en la superficie vítrea de la retina fagocitan cuerpos apoptóticos localizados en la CCG y sobre los pies terminales de las células de Müller. Estos últimos podrían proceder de células ganglionares que han sufrido el proceso de apoptosis y que por una retracción de su axón se desplazan hacia la capa de fibras ópticas donde quedan embebidos.

Un elevado número de autores han sugerido que la microglía ameboide posee una elevada capacidad fagocítica de restos de células muertas durante el desarrollo en diferentes regiones del sistema nervioso central de mamíferos (Perry, 1987; Perry y Gordon, 1988, 1991; Thomas, 1992; Perry et al., 1994; Ling y Wong, 1993), como cerebro de ratón (Perry et al, 1985), cerebelo de ratón (Ashwell, 1990)

y cerebro de rata (Ferrer, 1990; Ashwell, 1991), así como en la retina de rata, ratón, conejo y gato (Hume et al., 1983; Wong y Hughes, 1987; Ashwell et al., 1989; Ashwell 1989; Pearson et al., 1993; Thanos 1991, 1996; Egensperger et al., 1996). En la retina de mamíferos, también se ha demostrado que las células microgliales muestran esta capacidad fagocítica en casos de degeneración neuronal producida experimentalmente (Schnitzer y Scherer, 1990; Milligan et al., 1991b) o en patologías como la distrofia hereditaria de fotorreceptores (Thanos y Richter, 1993; Roque et al., 1996). En la retina de aves sólo existen dos trabajos, realizados en embriones de pollo, en los cuales los autores describen la fagocitosis de restos de muerte celular en la CCG por unas células de origen desconocido que migran en la capa de fibras ópticas (Hughes y McLoon, 1979) o por "células gliales" (Rager y Rager, 1978).

Sin embargo, a pesar de esta aceptada capacidad fagocítica de cuerpos apoptóticos de los precursores microgliales, en la retina de codorniz en desarrollo no existe colocalización entre estos y la muerte celular en las diferentes capas de la retina. Una muestra de ello, como se ha descrito anteriormente, sería que los precursores microgliales no migran radialmente a través de la CNV hasta E13-E14, mientras que la muerte celular en esta capa comienza en E7. En estos momentos del desarrollo en los que la microglía todavía no ha colonizado las capas de la retina en las que tiene lugar la muerte de neuronas, serían las células de Müller las encargadas de fagocitar los restos apoptóticos. La fagocitosis de cuerpos apoptóticos por las células de Müller ha sido descrita con anterioridad en la retina en desarrollo de rata, conejo y gato (Egensperger et al., 1996), pollo (Hughes y La Velle, 1975; Hughes y McLoon, 1979) y humano (Penfold and Provis, 1986). También se ha publicado que las células de Müller fagocitan las células ganglionares que degeneran cuando a embriones de pollo E3-E7 se le administra Concanavalina A, observándose una acumulación de restos celulares en sus pies basales (Meller, 1981). En estudios realizados *in vitro*, se ha observado que las células de Müller obtenidas de retina adulta de conejo (Stolzenburg et al., 1992) y humana (Mano y Puro, 1990) conservan su capacidad fagocítica, la cual puede ser demostrada añadiendo bolitas de latex o microesferas marcadas con fluoresceína al medio de cultivo. En el presente estudio, hemos observado la presencia de cuerpos

apoptóticos y de restos celulares muy fragmentados dentro del citoplasma de las células de Müller, lo que sugeriría que estas podrían englobar y digerir las neuronas apoptóticas. Además, los cuerpos apoptóticos y restos celulares se encuentran en diferentes niveles dentro de las células de Müller, desde los pies terminales hasta la CNI, lo que podría indicar que, o bien estas células fagocitan cuerpos apoptóticos en cualquier capa de la retina, o bien existe un transporte citoplasmático de cuerpos apoptóticos fagocitados y digeridos. Por lo tanto, las células de Müller podrían ser las células encargadas de fagocitar los cuerpos apoptóticos en la retina de diferentes especies de mamíferos y aves durante el desarrollo y en diferentes condiciones patológicas.

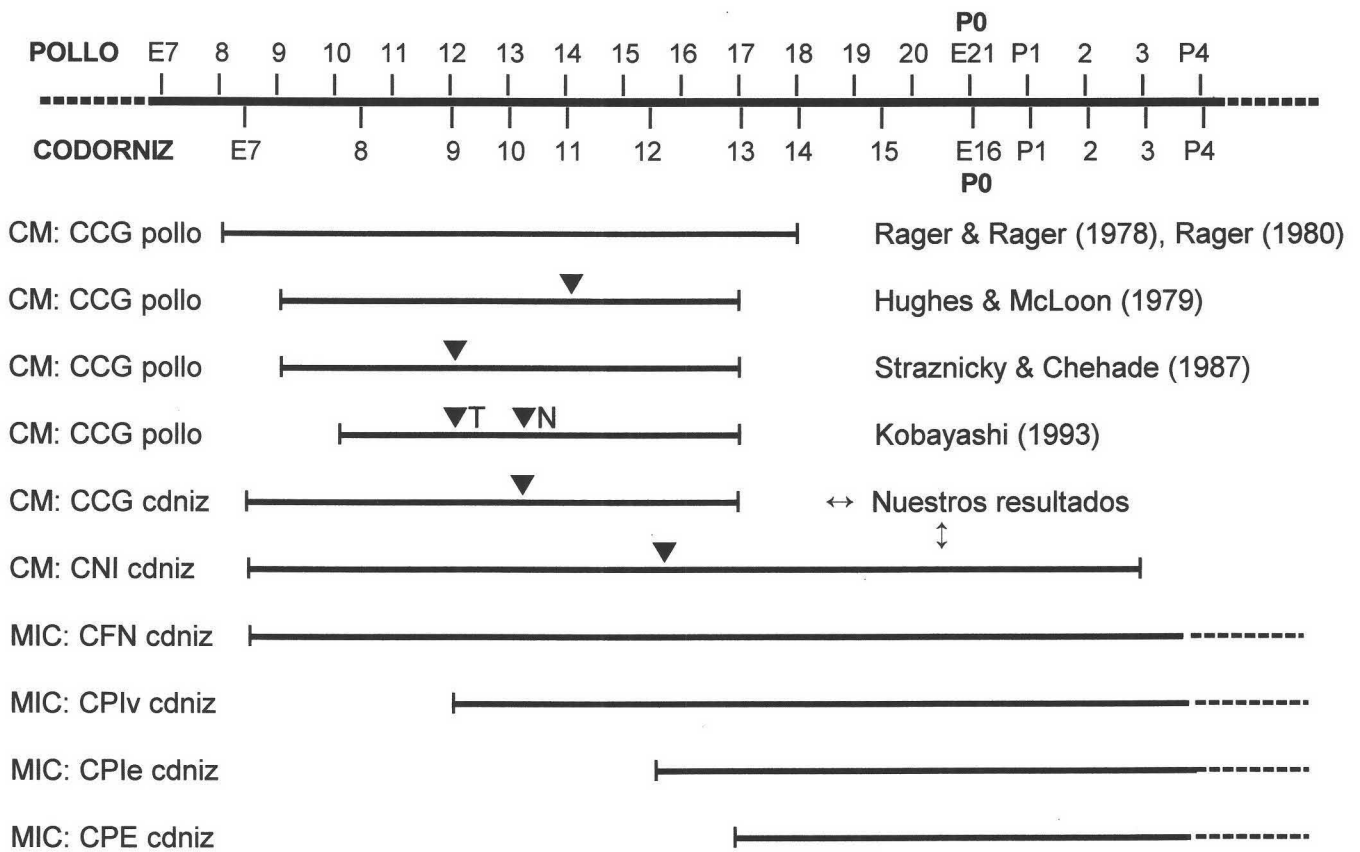
Algunos autores han sugerido que ciertas neuronas pueden fagocitar los restos de neuronas adyacentes (Penfold y Provis, 1986; Egensperger et al., 1996). En nuestro estudio hemos observado algunas imágenes de neuronas que han fagocitado restos apoptóticos, pero éstas son poco frecuentes, de manera que su contribución a la eliminación de restos celulares parece ser poco relevante.

La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos de la CNI por las células de Müller podría tener un significado durante el desarrollo de la retina. Algunos autores han propuesto que las células de Müller, cuyo soma se encuentra localizado en la CNI, forman unidades columnares físicas y funcionales constituidas por una célula de Müller que abraza mediante prolongaciones citoplasmáticas en forma de cestos un determinado número de neuronas que varía dependiendo de la especie estudiada (Meller y Tetzlaff, 1976; Reichenbach et al., 1994; Reichenbach y Robinson, 1995). Por lo tanto, se podría especular que las células de Müller podrían englobar directamente las neuronas en proceso de apoptosis albergadas entre sus prolongaciones citoplasmáticas y que los precursores microgliales no atravesarían esta capa hasta que la muerte celular ha cesado para no distorsionar estas unidades columnares. Además, la migración radial de los precursores microgliales a través de la CNI debe ser un proceso rápido ya que no se observan acumulaciones de estos en ninguna zona de la retina y muestran generalmente una orientación perpendicular en esta capa.



Fig. IV-21. Representación gráfica en la que se comparan los períodos del desarrollo en los que tiene lugar la muerte celular en la CCG y CNI y la presencia de precursores microgliales de las diferentes capas de la retina de aves. Se representan los períodos de muerte celular en la CCG descritos en la retina del pollo por diferentes autores (referidos a la derecha) y en la codorniz (nuestro estudio). Los períodos de muerte celular en la CNI o de presencia de precursores microgliales en las diferentes capas de la retina de codorniz son los descritos en el presente estudio. Con un triángulo negro se representa el estadio del desarrollo en el que hay un pico de muerte celular, ya sea en el conjunto de la retina o en las mitades temporal (T) y nasal (N). En la parte superior se representan las equivalencias entre los estadios embrionarios (E) y posteclosión (P) del desarrollo del pollo y la codorniz, según Zacchei (1961). CM: presencia de células muertas. MIC: presencia de microglía. CPIv: borde vítreo de la CPI. CPIe: borde escleral de la CPI.

PRESENCIA DE CÉLULAS MUERTAS Y MICROGLÍA EN LA RETINA EN DESARROLLO DE AVES



REFERENCIAS

- Armson, P.F., Bennett, M.R., Raju, T.R. (1987) Retinal ganglion cell survival and neurite regeneration requirements: the changes from the Müller cell dependence to superior colliculi dependence during development. *Dev. Brain Res.*, 32:207-216.
- Araujo, E.G., Linden, R. (1993) Trophic factors produced by retinal cells increase the survival of retinal ganglion cells in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, 5:1181-1188.
- Ary-Pires, R., Nakatani, M., Rehen, S.K., Linden, R. (1997) Developmentally regulated release of intraretinal neurotrophic factors in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 15:239-255.
- Ashwell, K. (1989) Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 287:286-301.
- Ashwell, K.W.S., Holländer, H., Streit, W., Stone, J. (1989) The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis. Neurosci.*, 2:437-448.
- Ashwell, K. (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.*, 55:219-230.
- Ashwell, K. (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev. Brain Res.*, 58:1-12.
- Ashwell, K.W.S., Bobryshev, Y.V. (1996) The developmental role of microglia. En: *Topical Issues in Microglial Research*. E.A. Ling, C.K. Tan, C.B.C. Tan, eds. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 65-82.
- Beazley, L.D., Perry, V.H., Baker, B., Darby, J.E. (1987) An investigation into the role of ganglion cells in the regulation of division and death of other retinal cells. *Dev. Brain Res.*, 33:169-184.
- Bredesen, D.E. (1995) Neural apoptosis. *Ann. Neurol.*, 38:839-851.
- Bruhn, S.L., Cepko, C.L. (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J. Neurosci.*, 16: 1430-1439.
- Casado, F.J., Pouponnot, C., Jeanny, J.C., Lecoq, O., Calothy, G., Pierani, A. (1996) QR1, a retina-specific gene, encodes an extracellular matrix protein

- exclusively expressed during neural retina differentiation. *Mech. Dev.*, 54:237-250.
- Catsicas, S., Clarke, P.G.H. (1987) Spatiotemporal gradients of kainate-sensitivity in the developing chicken retina. *J. Comp. Neurol.*, 262:512-522.
- Chang, G.Q., Hao, Y., Wong, F. (1993) Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, 11:595-605.
- Chen, S.T., Garey, L.J., Jen, L.S. (1994) Bcl-2 proto-oncogene protein immunoreactivity in normally developing and axotomised rat retinas. *Neurosci. Lett.*, 172:11-14.
- Clarke, P.G.H. (1994) Neuronal death in the development of the vertebrate central nervous system. *Sem. Neurosci.*, 6:291-297.
- Clarke, P.G.H., Oppenheim, R.W. (1995) Neuron death in vertebrate development: in vivo methods. *Meth. Cell Biol.*, 46:277-321.
- Cuadros, M.A., Ríos, A. (1988) Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat. Embryol.*, 178:543-551.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Martín-Partido, G., Navascués, J. (1992) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci. Lett.*, 148:11-14.
- Cuadros, M.A., Moujahid, A., Quesada, A., Navascués, J. (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J. Comp. Neurol.*, 348:207-224.
- Cuadros, M. A., Rodríguez-Ruiz, J., Calvente, R., Almendros, A., Marín-Teva, J. L., Navascués, J. (1997) Microglia development in the quail cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 389:390-401.
- Cui, Q., Harvey, A.R. (1994) NT-4/5 reduces naturally occurring retinal ganglion cell death in neonatal rats. *Neuroreport*, 5:1882-1884.
- Cunningham, T.J., Mohler, I.M., Giordano, D.L. (1982) Naturally occurring neuron death in the ganglion cell layer of the neonatal rat: morphology and evidence for regional correspondence with neuron death in superior colliculus. *Dev. Brain Res.*, 2:203-215.

- Dabin, I., Barnstable, C.J. (1995) Rat retinal Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia*, 14:23-32.
- Dalmau, I. (1997) Las células de microglía en el cerebro de la rata en desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Dechant, G., Barde, Y.A. (1997) Signalling through the neurotrophin receptor $pt5^{NTR}$. *Curr. Op. Neurobiol.*, 7:413-418.
- De la Rosa, E.J., Arribas, A., Frade, J.M., Rodríguez-Tébar, A. (1994) Role of neurotrophins in the control of neural development: neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neurosci.*, 58:347-352.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L. (1995a) Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina. *Glia*, 15:458-470.
- Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., Billson, F.A. (1995b) Development of microglial topography in human retina. *J. Comp. Neurol.*, 363:53-68.
- Dreher, B., Potts, R.A., Bennett, M.R. (1983) Evidence that the early postnatal reduction in number of rat retinal ganglion cells is due to a wave of ganglion cell death. *Neurosci. Lett.*, 36: 255-260.
- Dunlop, S.A., Beazley, L.D. (1987) Cell death in the developing retinal ganglion cell layer of the wallaby *Setonix brachyurus*. *J. Comp. Neurol.*, 264:14-23.
- Egensperger, R., Maslim, J., Bisti, S., Holländer, H., Stone, J. (1996) Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Dev. Brain Res.*, 97:1-8.
- Ehrlich, D. (1981) Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.*, 195: 643-657.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.*, 16:2508-2521.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., Henson, P.M. (1992) Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.*, 149:4029-4035.

- Fawcett, J.W., O'Leary, D.D.M., Cowan, W. (1984) Activity and the control of ganglion cell death in the rat retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:5589-5593.
- Ferrer, I., Bernet, E., Soriano, E., Del Rio, T., Fonseca, M. (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience*, 39:451-458.
- Frade, J.M., Rodríguez-Tébar, A., Barde, Y.A. (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, 383:166-168.
- Frade, J.M., Bovolenta, P., Martínez-Morales, J.R., Arribas, A., Barbas, J.A., Rodríguez-Tébar, A. (1997) Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development*, 124:3313-3320.
- Frade, J.M., Barde, Y.A. (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron*, 20:35-41.
- García-Porrero, J.A., Ojeda, J.L. (1979) Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. *Experientia*, 35:375-376.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.. *J. Cell Biol.*, 119:493-501.
- Grosche, J., Härtig, W., Reichenbach, A. (1995) Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci. Lett.*, 185:119-122.
- Halfter, W., Deiss, S., Schwarz, U. (1985) The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina. *J. Comp. Neurol.*, 232:466-480.
- Hallböök, F., Bäckström, A., Kullander, K., Ebendal, T., Carri, N.G. (1996) Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J. Comp. Neurol.*, 364:664-676.
- Harman, A.M., Snell, L.L., Beazley, L.D. (1989) Cell death in the inner and outer nuclear layers of the developing retina in the wallaby *Setonix brachyurus* (quokka). *J. Comp. Neurol.*, 289:1-10.

- Hering, H., Kröger, S. (1996) Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina. *J. Comp. Neurol.*, 375:393-405.
- Herrup, K., Busser, J.C. (1995) The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *J. Neurosci.*, 121:2385-2395.
- Holash, J.A., Soans, C., Chong, L.D., Shao, H., Dixit, V.M., Pasquale, E.B. (1995) Reciprocal expression of the Eph receptor Cek5 and its ligand(s) in the early retina. *Dev. Biol.*, 182:256-269.
- Horsburgh, G.M., Sefton, J.A. (1987) Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 263:553-566.
- Hughes, W.F., Lavelle, A. (1975) The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos. *J. Comp. Neurol.*, 163:265-284.
- Hughes, W.F., McLoon, S.C. (1979) Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction. *Exp. Neurol.*, 66:587-601.
- 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.*, 97:253-257.
- Hurley, S.D., Streit, W.J. (1996) Microglia and the mononuclear phagocyte system. En: *Topical Issues in Microglial Research*. E.A. Ling, C.K. Tan, C.B.C. Tan, eds. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 1-19.
- Jones, L.L., Banati, R.B., Graeber, M.B., Bonfanti, L., Raivich, G., G.W. Kreutzberg, G.W. (1997) Population control of microglia: does apoptosis play a role? *J. Neurocytol.*, 26:755-770.
- Johnson, E.M., Deckwerth, T.L. (1993) Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16:31-46.
- Kobayashi, T. (1993) Delay of ganglion cell death by tetrodotoxin during retinal development in chick embryos. *Neurosci. Res.*, 16:187-194.
- Layer, P.G., Kotz, S. (1983) Asymmetrical developmental pattern of uptake of Lucifer Yellow into amacrine cells in the embryonic chick retina. *Neurosci.*, 9:931-941.

- Layer, P.G., Berger, J., Kinkl, N. (1997) Cholinesterases precede "ON-OFF" channel dichotomy in the embryonic chick retina before onset of synaptogenesis. *Cell Tiss. Res.*, 288:407-416.
- Liësi, P., Salonen, E.M., Dahl, D., Vaheri, A., Richards, S.J. (1990) Thy-1 is a neuronal and glial surface antigen which interacts with matrix proteins and plasminogen activator. *Exp. Brain Res.*, 79:642-650.
- Linden, R., Rehen, S.K., Chiarini, L.B., Nakatani, M., Rocha, M., Campos, C.B.L., Borges, H.L., Varella, M.H., Freitas, F.G., Correa, D.F., Guimaraes, C.A. (1996) Death in a dish: controls of apoptosis within the developing retinal tissue. *Rev. Brasil. Biol.*, 56(Supl. 1):89-103.
- Linden, R., Perry, V.H. (1982) Ganglion cell death within the developing retina: a regulatory role for retinal dendrites. *Neuroscience*, 7:2813-2827.
- Ling, E.A., Wong, W.C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7:9-18.
- Liu, L., Layer, P.G., Gierer, A. (1983) Binding of FITC-coupled peanut-agglutinin (TITC-PNA) to embryonic chicken retinas reveals developmental spatio-temporal patterns. *Dev. Brain Res.*, 8: 223-229.
- Lo, A.C., Houenou, L.J., Oppenheim, R.W. (1995) Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention. *Arch. Histol. Cytol.*, 58:139-149.
- Mallat, M., Houlgatte, R., Brachet, P., Prochiantz, A. (1989) Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev. Biol.*, 133:309-311.
- Mano, T., Puro, D.G. (1990) Phagocytosis by human retinal glial cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31:1047-1055.
- Martín-Partido, G., Rodríguez-Gallardo, L., Alvarez, I.S., Navascués, J. (1988) Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anat. Rec.*, 222:272-281.
- Meller, K. (1981) Effects of concanavalin A on developing ganglion cells in the retina of chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, 65:27-39.
- Mey, J., McCaffery, P., Dräger, U.C. (1997) Retinoic acid synthesis in the developing chick retina. *J. Neurosci.*, 17:7441-7449.

- Milligan, C.E., Cunningham, T.J., Levitt, P. (1991a) Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 314:125-135.
- Milligan, C.E., Levitt, P., Cunningham, T.J. (1991b) Brain Macrophages and microglia respond differently to lesions of the developing and adult visual system. *J. Comp. Neurol.*, 314:136-146.
- Moujahid, A., Navascués, J., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1996) Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat. Embryol.*, 193:131-144.
- Murabe, Y., Sano, Y. (1982) Morphological studies on neuroglia. VI. Postnatal development of microglial cells. *Cell Tiss. Res.*, 225:469-485.
- Nagata, A., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H., Kohsaka, S. (1993) Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 34:357-363.
- Naruse, I., Keino, H. (1995) Apoptosis in the developing CNS. *Progr. Neurobiol.*, 47:135-155.
- Navascués, J., Moujahid, A., Almendros, A., Marín-Teva, J.L., Cuadros, M.A. (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.*, 354:209-228.
- Navascués, J., Cuadros, M.A., Almendros, A. (1996) Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En: *Topical Issues in Microglial Research*. E.A. Ling, C.K. Tan, C.B.C. Tan, eds. Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 43-64.
- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14:453-501.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lièvre, F., Buck, C.A. (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100:339-349.

- Pearson, H.E., Payne, B.R., Cunningham, T.J. (1993) Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. *Dev. Brain Res.*, 76:249-255.
- Penfold, P.L., Provis, J.M. (1986) Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 224:549-553.
- Perry, V.H. (1987) Macrophages, microglia and cell death in the developing mouse brain. *Pontif. Acad. Scient. Scripta Varia*, 59:281-295.
- Perry, V.H., Hume, D.A., Gordon, S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15:313-326.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 11:273-277.
- Perry, V.H., Gordon, S. (1991) Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, 125:203-244.
- Perry, V.H., Lawson, L.J., Reid, D.M. (1994) Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. *J. Leukoc. Biol.*, 56:399-406.
- Potts, R.A., Dreher, B., Bennett, M.R. (1982) The loss of ganglion cell in the developing retina of the rat. *Dev. Brain Res.*, 3:481-486.
- 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.
- Provis, J.M. (1987) Patterns of cell death in the ganglion cell layer of the human fetal retina. *J. Comp. Neurol.*, 259:237-246.
- Rager, G.H. (1980) Development of the retinotectal projection in the chicken. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 63:1-92.
- Rager, G., Rager, U. (1978) Systems-matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. *Exp. Brain Res.*, 33:65-78.

- Rehen, S.K., Varella, M.H., Freitas, F.G., Moraes, M.O., Linden, R. (1996) Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina. *Development*, 122:1439-1448.
- Reichenbach, A., Ziegert, M., Schnitzer, J., Pritz-Hohmeier, S., Schaaf, P., Schober, W., Schneider, H. (1994) Development of the rabbit retina. V. The question of "columnar units". *Dev. Brain Res.*, 79:72-84.
- Reichenbach, A., Robinson, S.R. (1995) Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. *Prog. Ret. Eye Res.*, 15:139-171.
- Reuter, G., Zilles, K. (1993) Reduction of naturally-occurring cell death by kainic acid in the retina of chicken embryos. *Ann. Anat.*, 175:243-251.
- Robinson, S.R. (1988) Cell death in the inner and outer nuclear layers of the developing cat retina. *J. Comp. Neurol.*, 267:507-515.
- Rodríguez-Tébar, A., Jeffrey, P.L., Thoenen, H., Barde, Y.A. (1989) The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. *Dev. Biol.*, 136:296-303.
- Roque, R.S., Imperial, C.J., Caldwell, R.B. (1996) Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37:196-203.
- Sanes, J.R. (1993) Topographic maps and molecular gradients. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 3:67-74.
- Schnitzer, J. (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 282:249-263.
- Schnitzer, J., Scherer, J. (1990) Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J. Comp. Neurol.*, 302:779-791.
- Sefton, M., Araujo, M., Nieto, M.A. (1997) Novel expression gradients of Eph-like receptor tyrosine kinases in the developing chick retina. *Dev. Biol.*, 188:363-368.
- Sengelaub, D.R., Finlay, B.L. (1982) Cell death in the mammalian visual system during normal development. I. Retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.*, 204:311-317.
- Sengelaub, D.R., Dolan, R.P., Finlay, B.L. (1986) Cell generation, death, and retinal growth in the development of the hamster retinal ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.*, 246:527-543.

- Senut, M.C., Alvarado-Mallart, R.M. (1986) Development of the retinotectal system in normal quail embryos: cytoarchitectonic development and optic fiber innervation. *Dev. Brain Res.*, 29:123-140.
- Spira, A., Hudy, S., Hannah, R. (1984) Ectopic photoreceptor cells and cell death in the developing rat retina. *Anat. Embryol.*, 169:293-301.
- Stolzenburg, J.U., Haas, J., Härtig, W., Paulke, B.R., Wolburg, H., Reichelt, W., Chao, T.I., Wolff, J.R., Reichenbach, A. (1992) Phagocytosis of latex beads by rabbit retinal Müller (glial) cells in vitro. *J. Hirnforsch.*, 33:557-564.
- Straznicky, C., Chehade, M. (1987) The formation of the area centralis of the retinal ganglion cell layer in the chick. *Development*, 100:411-420.
- Thanos, S. (1991) The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.*, 3:1189-1207.
- Thanos, S. (1992) Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res.*, 588:21-28.
- Thanos, S., Richter, W. (1993) Migration of microglia. The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int. J. Devl. Neurosci.*, 11:671-680.
- Thanos, S., Moore, S., Hong, Y. (1996) Retinal microglia. *Progr. Ret. Eye Res.*, 15:331-361.
- Theele, D.P., Streit, W.J. (1993) A chronicle of microglial ontogeny. *Glia*, 7:5-8.
- Thomas, W.E. (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Rev.*, 17:61-74.
- Trisler, D. (1987) Molecular markers of cell position in avian retina are involved in synapse formation. *Amer. Zool.*, 27:189-206.
- Trisler, G.D., Schneider, M.D., Nirenberg, M. (1981) A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2145-2149.
- Vermes, I., Haanen, C. (1994) Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv. Clin. Chem.*, 31:177-246.

- Voyvodic, J.T., Burne, J.F., Raff, M.C. (1995) Quantification of normal cell death in the rat retina: implications for clone composition in cell lineage analysis. *Eur. J. Neurosci.*, 7:2469-2478.
- Wolswijk, G. (1995) Strongly G_{D3}⁺ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. *Glia*, 13:13-26.
- Wong, R.O.L., Hughes, A. (1987) Role of cell death in the topogenesis of neuronal distributions in the developing cat retinal ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.*, 262:496-511.
- Wu, C.H., Wen, C.Y., Shieh, J.Y., Ling, E.A. (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol.*, 23:258-269.
- Yew, D.T. (1979) Cell kinetic in retinal cell morphogenesis. *Neurosci. Lett.*, 13:173-176.
- Young, R.W. (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol.*, 229:362-373.
- Yuasa, J., Hirano, S., Yamagata, M., Noda, M. (1996) Visual projection map specified by topographic expression of transcription factors in the retina. *Nature*, 382:632-635.
- Zacchei, A.M. (1961) Lo sviluppo embrionale della quaglia giapponese (*Coturnix coturnix japonica* T.e.S.). *Arch. Ital. Anat. Embryol.*, 66:36-62.



CONCLUSIONES



Primera. Las células microgliales ameboides que migran tangencialmente en la parte vítrea de la retina embrionaria de codorniz utilizan los pies terminales de las células de Müller como sustrato para su migración.

Segunda. En el mecanismo de migración de las células microgliales tiene decisiva importancia la formación de lamelipodios que se extienden en los canales flanqueados por las prolongaciones radiales de las células de Müller. La presencia de células monopolares y bipolares, algunas de ellas con delgadas prolongaciones filamentosas, así como la existencia de estrechas uniones entre las células y el sustrato revelan que este mecanismo de migración es similar al que tiene lugar durante la locomoción de fibroblastos en cultivo. Este mecanismo incluye las siguientes fases: extensión de lamelipodios en el borde delantero de la célula, fuerte anclaje de las células al sustrato, translocación del soma hacia la parte delantera, y retracción de la parte trasera de la célula.

Tercera. La presencia de células multipolares, con lamelipodios en diferentes canales adyacentes, sugiere que algunas células microgliales ameboides están en proceso de orientación para elegir la ruta de migración adecuada. Por lo tanto, durante su migración desde el centro hacia la periferia de la retina, estas células parecen alternar fases de locomoción activa con fases de orientación.

Cuarta. Algunas células microgliales bipolares muestran forma de V, con el vértice apuntando hacia la periferia o hacia el centro de la retina, lo que sugiere que la migración tangencial centro-periférica de las células microgliales no sigue una ruta rectilínea, sino que las mismas pueden girar y moverse transitoriamente hacia los lados y hacia atrás, antes de recuperar su movimiento centro-periférico.

Quinta. Algunas células microgliales que migran en la parte vítrea de la retina entran en mitosis cuando todavía están en proceso de migración activa, como se deduce de la presencia de células ameboides en profase que muestran una morfología bipolar, típica de células en proceso de migración. Esto sugiere que,

además de la migración centro-periférica, la proliferación de la microglía ameboide contribuye a su dispersión dentro de la retina.

Sexta. Todas las células microgliales que están migrando tangencialmente en la retina parecen tener capacidad proliferativa, ya que se marcan con el anticuerpo frente al antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA).

Séptima. Antes de que las células microgliales que migran centro-periféricamente alcancen el margen periférico de la retina, en el mismo se observan algunas células ameboides QH1-positivas con orientación circunferencial. Ello sugiere que una proporción de precursores microgliales migra tangencialmente en el margen periférico de la retina siguiendo un curso circunferencial, paralelo a la ora serrata. La migración circunferencial marginal de precursores microgliales se inicia en niveles temporales de la retina en E6, es decir antes de que comience la migración centro-periférica, y seguidamente avanza en dirección temporo-dorso-nasal hasta alcanzar el cuadrante naso-ventral.

Octava. Las células microgliales que migran circunferencialmente en el margen de la retina parecen entrar desde el cuerpo ciliar, como se deduce de la presencia en la ora serrata de células QH1-positivas que están parcialmente dentro de la retina y parcialmente en el cuerpo ciliar. Por lo tanto, la microglía de la retina parece tener una doble procedencia: desde la zona de la cabeza del nervio óptico y desde el cuerpo ciliar.

Novena. Los precursores microgliales que, procedentes de la cabeza del nervio óptico, migran centro-periféricamente en la retina confluyen con los que migran circunferencialmente. Esta confluencia tiene lugar primeramente en niveles temporales y avanza en dirección temporo-dorso-nasal. Una vez que ha tenido lugar dicha confluencia, algunas células que han migrado centro-periféricamente en la parte temporal de la retina parecen incorporarse a la corriente de migración circunferencial. Por el contrario, en la parte nasal, algunas células que han migrado

circunferencialmente en el margen de la retina parecen tomar una dirección periférico-central, incorporándose a zonas menos periféricas. No obstante, en el presente estudio no se ha podido determinar el destino final de estos precursores microgliales.

Décima. Las células orientadas circunferencialmente en el margen de la retina se ramifican progresivamente siguiendo un patrón cronotopográfico similar a la migración de las mismas, de forma que el proceso de ramificación en la mitad temporal tiene lugar antes que en la mitad nasal. Dicho proceso finaliza en el cuadrante naso-ventral de la retina.

Undécima. Durante el desarrollo de la retina de codorniz hay muerte celular por apoptosis en la capa de células ganglionares entre E7 y E13, con un pico en E10, y en la capa nuclear interna entre E7 y P3, con un pico en E12. La presencia de células apoptóticas en ambas capas coincide parcialmente en el tiempo con la entrada y migración tangencial y radial de precursores microgliales en la retina.

Duodécima. Tanto en la capa de células ganglionares como en la capa nuclear interna, la muerte celular comienza en una zona central y avanza siguiendo gradientes centro-periférico, temporo-nasal y dorso-ventral, para finalizar en una banda periférica del cuadrante naso-ventral.

Décimotercera. El patrón cronotopográfico de distribución de células apoptóticas en la capa de células ganglionares muestra diferencias sustanciales con el patrón de migración tangencial, sugiriendo que la muerte de células ganglionares no es el estímulo que provoca la entrada de precursores microgliales en la retina.

Décimocuarta. Entre E7 y E13 los precursores microgliales que entran en la retina no alcanzan la capa nuclear interna, a pesar de la presencia de numerosas células apoptóticas en la misma. Además, hay una evidente falta de correlación entre el patrón de distribución de muerte celular en la capa nuclear interna y los patrones de

migración tangencial o radial de los precursores microgliales, hasta el punto de que éstos solo atraviesan dicha capa de la retina cuando ya ha cesado en ella la muerte celular. Esto demuestra que la apoptosis en la capa nuclear interna tampoco es el estímulo inmediato que dispara la migración tangencial o radial de los precursores microgliales.

Décimoquinta. Aunque no hay correlación entre muerte celular y migración de células microgliales, éstas fagocitan de forma oportunista aquellos fragmentos apoptóticos que encuentran a su paso en la capa de fibras nerviosas y en la capa de células ganglionares. En la capa nuclear interna, la fagocitosis de los restos de células muertas es llevada a cabo por las células de Müller.



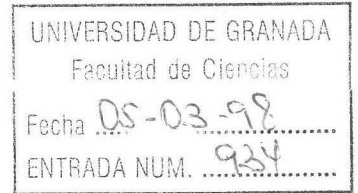
UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO

Fecha: veintiseis de Febrero de 1998
Su Ref^a.
Nuestra Ref^a.
Fecha de Salida:
Unidad de Origen: COMISIÓN DE
DOCTORADO

Destinatario:

Itmo. Sr. Decano
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA



En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Regulatoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D.JOSE LUIS MARIN TEVA titulada MUERTE CELULAR Y MIGRACION DE PRECURSORES MICROGLIALES DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE CODORNIZ y dirigida por el Profesor/es Dr/es JULIO NAVASCUES MARTINEZ, MIGUEL A. CUADROS OJEDA, ANTONIO M. ALMENDROS GALLEGO con objeto de mantenerla depositada desde el día veintiseis de Febrero de 1998 hasta el día tres de Abril de 1998 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada a veintiseis de Febrero de 1998.

EL SECRETARIO DE LA COMISION
DE DOCTORADO,



DIEGO SEVILLA MERINO
Secretario de la Comisión