

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
DEPARTAMENTO BIOLOGIA APLICADA



**CARACTERIZACIÓN
MORFOMÉTRICA Y NEUROQUÍMICA
DE CÉLULAS AMACRINAS DE
LA RETINA HUMANA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
RAQUEL CLIMENT MARTÍNEZ

DIRECTOR
Dr. EDUARDO FERNÁNDEZ JOVER

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA
UNIDAD DE NEUROPRÓTESIS Y REHABILITACIÓN VISUAL

ELCHE 2010

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas esas personas que de una manera u otra han compartido conmigo esta parte importante de mi vida. Sin vosotros hoy seguro sería diferente.

Gracias a Jose Luis Micol por darme la oportunidad de colaborar en su grupo donde descubrí que también las pequeñas cosas te hacen sentir muy orgulloso. También por su encomiable labor junto con Bernat Soria, Eugenio Vilanova, Eduardo Fernández y tantos otros, en su empeño por que este Instituto sea mejor cada día.

Gracias a todos los integrantes del Departamento de Histología por enseñarme los entresijos de la investigación neurocientífica dejándome participar en la suya. Y muy especialmente a Jaime Merchán, Antonia Angulo, Jorge Prieto, Joaquín Rueda, Lola Segura y Margarita Castro, a los que siempre guardaré especial cariño.

A Eduardo por confiar en mi y posibilitar mucho más que este trabajo haciéndome un huequito en su laboratorio, donde ha sido un lujo formarme colaborando además con grandes científicos y mejores personas. Gracias por su cercanía, su optimismo y su elocuencia, que han convertido mis momentos más bajos en todo un mundo de posibilidades. Gracias por traer el caos a mi desorden y enseñarme a ordenarlo, gracias por tu paciencia, gracias por todo.

Gracias a Helga Kolb por ofrecermé la posibilidad de conocer las células de la retina humana y sus métodos de estudio de la mano, permitiéndome además utilizar sus colecciones, sin las que no habría sido posible iniciar este trabajo. Gracias por su supervisión y el cariño de todos los suyos durante una estancia sin duda inolvidable.

Gracias a Robert Marc por sus trabajos y por facilitarnos los anticuerpos usados en este estudio.

A Olga, Eva, Laura, Susan, Nico, Jill, Vicen, Marce, Maró, Jose Manuel, Markus, Nicasio y Sonia por su apoyo técnico a esta investigación, su generosidad, y tantas otras cosas.

Gracias a todos, todos los amigos, profesores, compañeros de despacho, laboratorios, proyectos, doctorado, seminarios, congresos, facultades e institutos, por aportar ese granito de arena a esta investigación, con vuestra amistad, las charlas, la confianza, las experiencias, ese saludo en el pasillo y toda esa ilusión contagiosa. Esteis o no nombrados en estas líneas, estais seguro en mi corazón y mi memoria.

Y que decir de mi familia, cuyo ilimitado amor, apoyo y confianza incondicionales me han permitido llegar hasta aquí a pesar de todo. Os quiero, mil veces gracias.



*A mi familia
ayer, hoy, siempre.*

RESUMEN

En los últimos años hemos asistido a una gran explosión de conocimientos sobre la retina en diferentes especies de vertebrados, sin embargo la retina que la mayor parte de investigadores intentan conocer, la retina humana, ha sido hasta el momento poco estudiada y la mayor parte de nuestro conocimiento sobre la misma esta basado en estudios sobre retinas de primates. El propósito de este trabajo es introducir una metodología que combinando la caracterización morfológica y el estudio del contenido en diferentes aminoácidos en células previamente seleccionadas, ayude a la identificación de los diversos tipos celulares de la retina humana.

Para ello, células amacrinas humanas fueron teñidas con el método de Golgi y clasificadas en base a su morfología, las características de sus arborizaciones dendríticas y su estratificación dentro de la capa plexiforme interna. Tras la caracterización morfológica y la adquisición de diferentes medidas cuantitativas, la población de células seleccionadas fue re-incluida en bloques de Epon 812. A continuación se obtuvieron cortes transversales de 25 μ m. y sobre las secciones que contenían los cuerpos celulares de las células de interés se realizaron cortes semifinos seriados (0.5 μ m) que fueron procesados para detectar inmunoreactividad frente a GABA, glicina, L-glutamato y taurina con anticuerpos marcados con Cy3.

Nuestros resultados confirman la diversidad de tipos morfológicos de las células amacrinas humanas y muestran que las células de la retina, una vez caracterizadas con el método de Golgi, pueden ser estudiadas utilizando procedimientos inmunocitoquímicos.

Aunque la puesta a punto de la metodología ha supuesto un largo y arduo trabajo, la incorporación de criterios morfométricos y topológicos cuantitativos, unidos a marcadores moleculares y a los parámetros morfológicos clásicamente utilizados para caracterizar las células nerviosas, facilita la discriminación de diferentes tipos neuronales. Esta metodología puede ser útil para la caracterización e identificación de otros tipos celulares en la retina o en otras porciones del sistema nervioso central.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

En general hemos mantenido las siglas en inglés por su amplio uso y aceptación:

AA:	Aminoácido
AC:	Célula Amacrina
BC:	Célula Bipolar
CPR:	Fotorreceptor tipo Cono
E:	Glutamato
ERG:	Electroretinograma
G:	Glicina
GC:	Célula Ganglionar
G.M. :	Método de Impregnación Argétea de Golgi
HC:	Célula Horizontal
INL:	Capa Nuclear Interna
IPC:	Célula Interplexiforme
IPL:	Capa Plexiforme Interna
MB:	Amacrina Biestratificada Mediana (Medium bistratified)
MC:	Célula de Müller
ONL:	Capa Nuclear Externa
OPL:	Capa Plexiforme Externa
PB:	Solución Tampón Fosfato
PR:	Fotorreceptor
RPE:	Epitelio Pigmentario
RPR:	Fotorreceptor tipo baston
SL1:	Amacrina Semilunar Tipo 1
SNC:	Sistema Nervioso Central
SV:	Amacrina Tipo Arrosariada espinosa (Spiny varicose)
SW:	Amacrina Tipo Estrellada sinuosa (Stellate wavy)
T:	Taurina
W:	Amacrina tipo Sinuosa (wavy)
WD:	Enmarañada difusa (Wooly diffuse)
Y:	GABA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
<u>JUSTIFICACIÓN DE LA MEMORIA</u>	11
<u>LA RETINA COMO PARTE DEL CEREBRO: DESARROLLO</u>	12
Figura 1. Desarrollo del ojo.....	13
Figura 2. Partes del ojo	15
Figura.3. Desarrollo de las células de la retina.....	16
<u>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RETINA</u>	16
<u>VISIÓN MACROSCÓPICA</u>	17
Figura.4. Zonas de la retina	17
<u>ANATOMÍA MICROSCÓPICA DE LA RETINA</u>	18
Figura 5. Capas y células de la retina	18
<u>CÉLULAS DE LA RETINA</u>	19
<i>CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO</i>	19
<i>FOTORRECEPTORES</i>	19
Figura 6. Fotorreceptores	20
<i>CÉLULAS HORIZONTALES</i>	21
Figura 7. Células Horizontales	21
<i>CÉLULAS BIPOLARES</i>	22
Figura 8. Células Bipolares e Interplexiforme.....	22
<i>CÉLULAS INTERPLEXIFORMES</i>	23
<i>CÉLULAS AMACRINAS</i>	23
Figura 9. Células Amacrinas	23
<i>CÉLULAS GANGLIONARES</i>	24
Figura 10. Células Ganglionares.....	25
<i>CÉLULAS GLIALES</i>	25
Figura 11. Células Gliales y de Müller	25
<u>FISIOLOGÍA DE LA RETINA</u>	26
Figura 12. Trayectoria de la luz en el ojo	27
Figura 13. Electrofisiología de la retina	30
<u>EL PROBLEMA DE LA CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS NERVIOSAS DE LA RETINA</u> ...	30
Figura 14. Células de la retina.....	31
<u>CARACTERIZACIÓN DE TIPOS CELULARES</u>	31
Figura 15. Marcadores específicos.....	32
Figura 16. Células teñidas por inyección intracelular.....	33
Figura 17. Células teñidas por el método de Golgi	33

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	34
MATERIAL Y MÉTODOS	36
<u>OBTENCIÓN, FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS RETINAS</u>	36
GLOBOS OCULARES.....	36
DISECCIÓN Y PRETRATAMIENTO.....	36
Fig.18. Esquema del procesamiento	37
IMPREGNACIÓN DE GOLGI E INCLUSIÓN EN EXTENSIÓN	37
<u>SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE ESTUDIO</u>	38
DIBUJO Y CARACTERIZACIÓN	38
Figura 19. Caracterización Celular	39
CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA	40
Figura 20. Distribución de Segmentos Dendríticos	40
Figura 21. Tortuosidad.....	41
<u>CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS CÉLULAS IMPREGNADAS</u>	42
DISECCIÓN DE LAS CÉLULAS	42
CORTE.....	42
ELECCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS PARA REINCLUIR.....	43
IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE INTERÉS	43
Figura 22. Reconstrucción Muestras	43
REINCLUSIÓN.....	44
CORTES TRANSVERSALES	44
Figura 23. Reinclusión y Corte.....	44
REORIENTACIÓN Y CORTES SEMIFINOS.....	45
Figura 24. Cortes transversales.	45
TECNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.....	45
CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD	46
<u>PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO</u>	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO UNIVARIANTE	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE.....	47
ANÁLISIS FACTORIAL	47
ANÁLISIS DE GRUPOS O CONGLOMERADOS JERÁRQUICOS ("CLUSTER ANALYSIS").....	48
ANÁLISIS DISCRIMINANTE.	49
RESULTADOS	50
<u>MARCAJE, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS AMACRINAS</u>	50
ELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE IMPREGNACIÓN.	50
Figura 25. Retina Periférica.....	51
APARIENCIA GENERAL DEL MÉTODO DE GOLGI EN LA RETINA HUMANA	51
Figura 26. Vista General	52

Figura 27. Detalle.....	53
Figura 28. Esfericidad	53
<u>MUESTREO DE LAS CÉLULAS AMACRINAS</u>	54
IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS AMACRINAS.	54
Figura 29. Células Amacrinas	54
Figura 30. Impregnación	55
Figura 31. Excentricidad	55
Figura 32. Selección de Células Amacrinas	56
Figura 33. Solapamiento.....	57
<u>ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS AMACRINAS</u>	57
Figura 34. Clasificación Morfológica.....	58
AMACRINAS DE CAMPO DENDRÍTICO GRANDE.....	59
Figura 35. Grandes Amacrinas.....	59
AMACRINAS DE CAMPO DENDRÍTICO MEDIANO	59
<i>AMACRINA BIESTRATIFICADA MEDIANA O "MEDIUM BISTRATIFIED"</i>	59
Figura 36. Amacrina Biestratificada Mediana.....	60
AMACRINAS DE PEQUEÑO CAMPO DENDRÍTICO	61
Figura 37. Amacrinas Pequeñas.....	61
Figura 38. Diversidad Morfológica	62
<u>ESTUDIO MORFOMÉTRICO</u>	63
DATOS MORFOMÉTRICOS	63
Figura 39. Medidas Morfológicas.....	63
Figura 40. Variables Morfométricas	64
Figura 41. Cálculo Dimensión Fractal.....	65
VARIABILIDAD DE LAS MEDIDAS.....	65
Tabla 1: Variabilidad Intratipo	66
DATOS CUANTITATIVOS DE LAS CÉLULAS ESTUDIADAS	66
Tabla 2: Variabilidad Intertipo	67
Figura 42. Variabilidad Paramétrica Intertipo	68
Figura 43. Segmentos Dendríticos.....	68
Figura 44. Distribución Dendrítica	69
RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	69
<i>ANÁLISIS FACTORIAL</i>	69
Tabla 3: Matriz de Componentes Rotados	70
Tabla 4: Varianza Total Explicada	71
<i>ANÁLISIS DISCRIMINANTE</i>	71
Tabla 5: Análisis Discriminante	71
Tabla 6: Valor Predictivo	72
<u>CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA</u>	72
REINCLUSIÓN DE LAS CÉLULAS DE INTERÉS.....	72

Figura 45. Célula AII de la retina humana	73
Figura 46 Amacrina Biestratificada Mediana.....	73
ENSAYOS PREVIOS SOBRE RETINAS DE PRIMATE.....	74
IDENTIFICACIÓN DE PATRONES GENERALES DE TINCIÓN	74
<i>GABA</i>	74
<i>GLICINA</i>	75
<i>GLUTAMATO</i>	75
<i>TAURINA</i>	75
DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN RETINA HUMANA.....	76
Figura 47. Especificidad del Marcaje.....	76
Figura 48. Detección de Aminoácidos	77
Tabla 7: Distribucion del Marcaje.....	77
Figura 49. Ejemplo de Inmunotinción.	78
CUANTIFICACIÓN DE LA REACCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA	79
Tabla 8: Marcadores Predominantes.....	79
FENOTIPADO INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS AMACRINAS	80
Tabla 9: Contenido Individuallizado en Aminoacidos	80
Figura 50. Ejemplo Caracterización A2.	81
DISCUSIÓN	82
<u>ELECCIÓN DEL MÉTODO DE GOLGI</u>	82
<u>HIPÓTESIS SOBRE LA IMPREGNACIÓN DE GOLGI</u>	84
PENETRACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	84
EL PH.....	84
COMUNICACIONES INTRACELULARES	85
CAUSAS HUMANAS	85
<u>ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS AMACRINAS</u>	86
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS	87
<i>MEDIDAS DEL TAMAÑO DEL SOMA</i>	87
<i>MEDICIONES GENERALES DE LOS ÁRBOLES DENDRÍTICOS</i>	88
<i>ANÁLISIS TOPOLOGICO DE LOS SEGMENTOS DENDRÍTICOS</i>	88
<i>ANÁLISIS FRACTAL DE LA FORMA NEURONAL</i>	89
RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	90
<u>ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS RETINAS HUMANAS</u>	90
CONCLUSIONES	93
ANEXO I: MACRO.....	95
ANEXO II: APORTACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS.....	101
REFERENCIAS	103

INTRODUCCIÓN

La presente Memoria para optar al grado de Doctor representa una nueva aportación dentro de la línea de investigación del grupo de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Parte de estos resultados han sido utilizados para el diseño y desarrollo de prototipos bioinspirados de visión que están siendo implementados actualmente en hardware reconfigurable (Fernández et al. 2002; Fernández et al. 2005; Morillas et al. 2005; Ferrández et al. 2007; Merabet et al. 2007; Morillas et al. 2007; Romero et al. 2007; Fernández 2008; Bongard et al. 2009; Normann et al. 2009).

Antes de presentar la metodología empleada y los resultados obtenidos en nuestra investigación, creemos necesario abordar una serie de aspectos que sirvan de introducción al tema que nos ocupa, que podemos dividir en los siguientes apartados:

- Justificación de la Memoria
- Desarrollo de la retina
- Características generales de la retina
- Fisiología de la retina
- El problema de la clasificación de las células de la retina

JUSTIFICACIÓN DE LA MEMORIA

La retina es una estructura que contiene muchos tipos diferentes de células interconectadas con gran precisión, permitiendo un importante procesamiento y codificación de la información visual antes de que esta sea enviada a través de las fibras del nervio óptico a los centros visuales superiores. La organización básica de la circuitería retiniana fue establecida por D. Santiago Ramón y Cajal hace más de un siglo (Ramón y Cajal 1888; 1892). El procesamiento de la información tiene lugar fundamentalmente en dos capas: la plexiforme externa y la plexiforme interna, donde intervienen 70-80 tipos diferentes de células (Ramón y Cajal 1888;1892; Kolb 1991a;b; Kolb et al. 1992; Fernández et al.

1994; Kolb 1994; Masland 2001a;b; Kolb et al. 2005) que realizan un procesamiento espacial, temporal y cromático de la información visual, codificando únicamente aquellas características más relevantes de los estímulos que inciden sobre la retina (Meister 1996; Nirenberg y Latham 1998; Fernández et al. 2000; Dacey y Packer 2003).

La señal eléctrica de salida de la retina consiste en una serie de potenciales de acción que viajan a lo largo de algo más de un millón de axones en la especie humana. En la actualidad se acepta que gran parte de las respuestas que transmiten las células ganglionares se deben a sus interacciones con las células amacrinas a nivel de la capa plexiforme interna (Bloomfield 1994; Ammermüller et al. 1995; Brivanlou et al. 1998; Dacey 1999; Eglén et al. 2003), por lo que la identificación y caracterización de estas células, es fundamental para comprender el funcionamiento de la retina (Masland 1988;2003; Baccus 2007). Sin embargo, la gran diversidad morfológica, farmacológica y funcional de las células amacrinas, dificulta considerablemente su estudio (Kalloniatis et al. 1996; Kolb 1997; Kolb et al. 2001; Kolb y Marshak 2003; Sarthy et al. 2004; Gong et al. 2006). Por otro lado, aunque en los últimos años hemos asistido a una gran explosión de conocimientos sobre la retina en diferentes especies de vertebrados, la retina que la mayor parte de investigadores intentan conocer, la retina humana, ha sido hasta el momento poco estudiada.

El principal objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es identificar y estudiar la morfología y el contenido de diferentes aminoácidos en una de las poblaciones menos conocidas de la retina humana, las células amacrinas. Esta metodología puede ser útil para la caracterización e identificación de otros tipos celulares en la retina o en otras porciones del Sistema Nervioso Central (SNC) y puede servir para desarrollar modelos artificiales de retinas, que tengan en cuenta las principales características de las retinas biológicas.

LA RETINA COMO PARTE DEL CEREBRO: DESARROLLO

Durante el desarrollo las células embrionarias se van diferenciando en tres capas germinativas: una situada en la zona dorsal del embrión, llamada ectodermo, a partir de la que se forman el sistema nervioso, la piel y sus anexos; otra en la zona ventral del embrión, llamada endodermo; que forma el aparato digestivo y respiratorio; y una tercera capa, llamada mesodermo que se sitúa entre las dos anteriores y que forma entre otros, tejidos como el conectivo, muscular o esquelético.

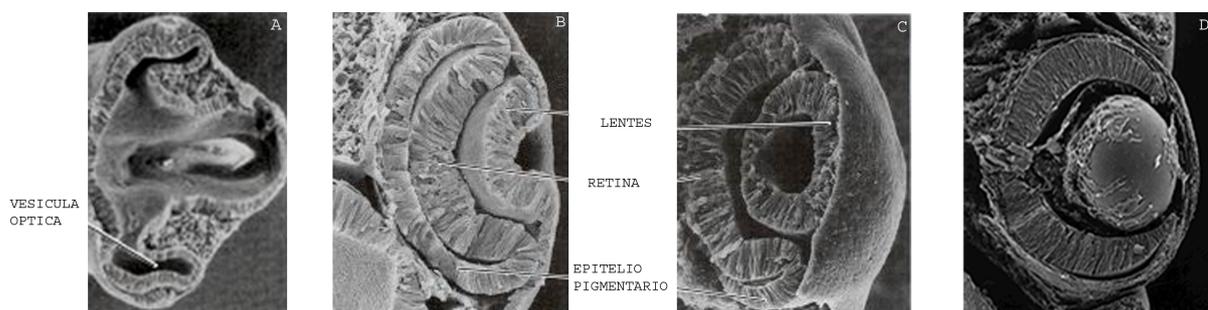
Dentro del desarrollo embrionario, el sistema nervioso es el primero que comienza a diferenciarse. Durante la tercera semana del desarrollo la capa dorsal del disco embrionario (ectodermo), se engruesa para dar origen a la placa neural, quedando la extremidad craneal más ancha que la caudal. La placa neural se invagina originando el surco neural y, a cada lado del surco, se originan los pliegues neurales, los cuales se unen en la línea media para dar origen al tubo neural.

El tubo neural queda introducido en el mesodermo, que lo rodea y por el ectodermo de revestimiento. Entre éste y el tubo neural se forma una hilera de células ectodérmicas: las células de la cresta neural, que dan origen a los ganglios de los nervios espinales y craneales, a los ganglios vegetativos, a las células de la médula suprarrenal y a los melanocitos. También origina otras estructuras de la cabeza: parte del esqueleto, iris, meninges blandas (leptomeninges), etc.

El extremo posterior del tubo neural da origen a la médula espinal. En cambio, el extremo anterior crece mucho más rápido y da origen a las tres vesículas cerebrales primitivas: anterior (prosencefalo), media o mesencefálica, y posterior (rombencéfalo).

Como otras porciones del SNC, la retina de los vertebrados deriva del tubo neural. En una fase temprana del desarrollo embrionario el tubo neural evagina para formar dos vesículas ópticas en la porción rostral del prosencefalo (Fig.1.A). Las vesículas ópticas contactan con el ectodermo de la región lateral de la cabeza, en el que inducen la formación de la placoda del cristalino.

Figura 1. Desarrollo del ojo



A) La retina se desarrolla como un saliente (protusión) del tubo neural que se invagina para formar la copa óptica. B - C) La pared de la copa óptica se diferencia en la capa interna en la retina y en la externa en el epitelio pigmentario, al tiempo que se induce la formación de las lentes. Modificado de Neurociencias 2ª ed. Purves et.al. D) El epitelio y la retina se aproximan y a falta de los músculos que controlen su curvatura, las lentes están formadas. Tomado del tutorial de Embriología de K.K. Sulik en www.med.unc.edu.

Cada vesícula óptica se invagina sobre sí misma, transformándose en una estructura con forma de copa de doble pared, llamada cáliz óptico o copa óptica (Fig.1.B). Por inducción la placoda del cristalino se invagina, se convierte en la vesícula del cristalino y posteriormente en la lente biconvexa que se sitúa en la boca del cáliz óptico: *el cristalino* (Fig.1.B-C).

El mesénquima capsular que abraza el cáliz óptico se organiza y diferencia dos túnicas: una interna vascular, y otra externa fibrosa. Esta última se abomba por delante del cristalino, formando *la córnea* (Fig.1.D).

Antes de cerrarse la fisura coroidea penetra mesénquima en el interior del cáliz óptico. Por detrás del cristalino el mesénquima se convierte en una sustancia gelatinosa, que es el llamado *humor vítreo*, el mesénquima situado por delante del cristalino experimenta un fenómeno de vacuolización, formándose así unas cámaras que se rellenan de un líquido transparente, el *humor acuoso*, segregado por unas formaciones mesenquimatosas de la túnica vascular.

El conjunto formado por el cáliz óptico, las túnicas derivadas del mesénquima capsular y su contenido, constituirán el globo ocular (Fig.2). La pared del globo ocular quedara organizada en tres capas o túnicas:

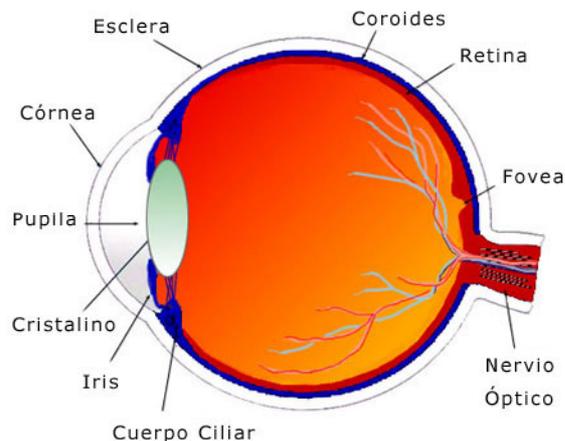
La túnica externa, fibrosa, derivada del mesénquima capsular, constituye la *esclerótica*. Es la capa protectora del globo ocular y representa la duramadre del SNC, continuándose con la pared del nervio óptico, es blanca, dura y opaca excepto en su polo anterior. Ahí forma la *córnea* que es un segmento de esfera de menor radio de curvatura que el resto y que ha de ser transparente para dejar el paso de los rayos luminosos.

La túnica media de la pared del globo ocular es la vascular, derivada del mesénquima capsular, se denomina úvea, tracto uveal o *coroides* y abraza a la retina. La pared externa del primitivo cáliz óptico, convertida en capa pigmentaria de la retina, tapiza por dentro a la coroides. En su parte anterior, la coroides se engruesa, y ese territorio engrosado es el *cuerpo ciliar* que segrega el humor acuoso. Más allá del cuerpo ciliar, la coroides se adelgaza de nuevo y forma un diafragma, orientado en un plano frontal, que está por delante del cristalino, *el iris*, en cuya parte central hay una abertura, *la pupila*, que puede variar su tamaño y, en consecuencia, controlar el paso de los rayos luminosos.

En la pared interna del cáliz óptico, el epitelio neural se divide para formar un neuroepitelio de varias capas de grosor que dará lugar a la *retina o túnica interna*, de origen ectodérmico como corresponde a una estructura procedente del prosencéfalo.

Las células neuroepiteliales o neuroblastos, que forman la retina se diferenciarán en cada uno de los tipos de células retinianas. Los axones procedentes de la retina se dirigen al diencéfalo pasando por el pedúnculo óptico.

Figura 2. Partes del ojo



Muestra un esquema de las partes de un globo ocular una vez desarrollado. Modificada de Webvision.

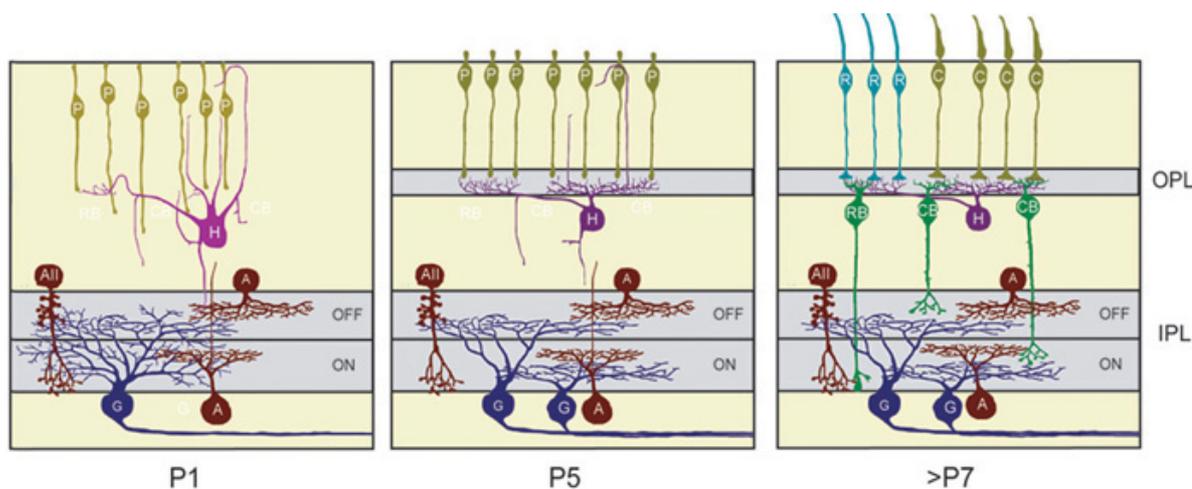
El desarrollo sensorial de la retina comienza en la fase de vesícula óptica, con la migración de núcleos celulares a la superficie interna de la retina. Se van formando nuevas capas debido a la división celular y subsiguiente migración. La retina se desarrolla de dentro a fuera: primero se forman las células ganglionares y los fotorreceptores son los últimos en terminar de desarrollarse. Este proceso podría darse también en etapas adultas según estudios recientes que apuntan a la existencia de procesos de neurogenesis en las zonas no laminadas de la retina periférica en primates adultos (Martínez-Navarrete et al. 2008).

Los siguientes cambios en la morfología de la retina se deben a la formación simultánea de múltiples y complejas conexiones intercelulares. De esta forma a los 5 meses de gestación ya se han establecido la mayor parte de las conexiones básicas de la retina (Mann 1964).

La maduración de los fotorreceptores comienza con la formación de los segmentos externos que contienen los pigmentos visuales, a partir de múltiples repliegues de la membrana plasmática de la célula. El ojo se vuelve sensible a la luz alrededor del séptimo mes de gestación.

El orden en el que se desarrollan las diferentes células que forman la retina condiciona las conexiones que se establecen entre ellas y de ese modo las particularidades de las diferentes vías de procesamiento visual.

Figura.3. Desarrollo de las células de la retina.



Esquema del desarrollo de las conexiones celulares de la retina en el ratón en los primeros días postnatales P1-7. En mamíferos la retina se desarrolla según un orden altamente conservado: primero se forman las células ganglionares seguidas en fases solapadas por las células horizontales, conos, amacrinas, bastones, bipolares y por último las células gliales de Müller. Young 1985. Tomado de Webvision.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RETINA

Como hemos expuesto previamente, la retina es esencialmente una parte del SNC que se encarga de codificar la información visual procedente del mundo exterior en trenes de impulsos nerviosos. A pesar de que todas las partes del ojo son fundamentales para percibir una buena imagen, la capa más importante para la visión es la retina.

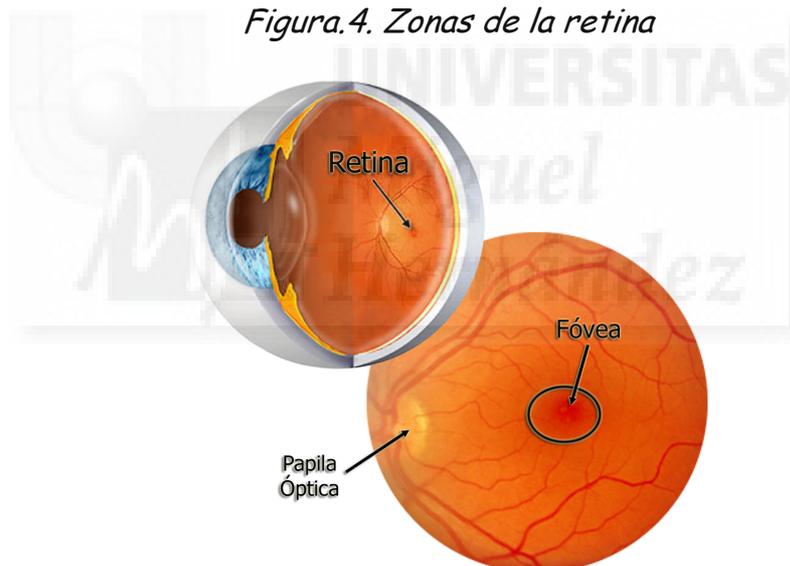
Todas las retinas de vertebrados tienen una organización anatómica similar y aunque sus células y fibras son esencialmente semejantes a las de otros centros nerviosos, están ordenadas en un patrón más regular. El limitado tamaño de sus campos dendríticos, la orientación de sus axones y la presencia de capas ordenadas expresamente para las conexiones intercelulares unido al hecho de que los neurotransmisores encontrados en otras partes del sistema nervioso central lo son también de la retina, nos ofrecen numerosas ventajas a la hora de estudiar su microcircuitaría. Por otra parte su grosor y transparencia junto a sus otras cualidades la hacen particularmente favorable para el análisis histológico (Rodieck 1973). Además una vez diseccionada del polo posterior del ojo se puede mantener viable por unas horas en un medio oxigenado. Todo ello, junto a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una "rodaja natural" del sistema nervioso central, convierte a la retina en un buen modelo para estudiar las células nerviosas (Dowling 1987).

VISIÓN MACROSCÓPICA

El lugar de la retina humana donde se enfoca la imagen es la **fóvea o mácula**. Una zona ovoidea del centro del eje visual con una coloración rojiza, que carece de vasos sanguíneos. Aquí, se inicia el procesamiento de los detalles más pequeños de las imágenes y su transmisión hacia los centros visuales superiores. En algunos vertebrados en lugar de una fóvea, existe otra especialización conocida como **franja visual** o "visual stripe".

Situada un poco más nasalmente de la fóvea, se encuentra la **Papila óptica**, un área de forma circular u oval, por donde abandonan el globo ocular los axones de las células ganglionares. Desde la porción central de la papila emergen los vasos sanguíneos que llegan a la retina (Arteria Central de la Retina) y desde allí se ramifican envolviendo la fóvea pero sin llegar a invadirla.

Figura.4. Zonas de la retina



Sección de un globo ocular con detalle de la zona central de la retina. Modificado de Webvision

Se denomina región central de la retina a la porción de retina que se encuentra alrededor de la Fóvea (unos 6 mm alrededor de la fóvea). El resto es retina periférica y llega hasta la zona de la *Ora Serrata* (que esta a unos 21 mm desde el centro de la papila).

En la fóvea existe una alta densidad de conos que se encuentran distribuidos espacialmente formando un mosaico hexagonal muy regular. Por fuera de la fóvea, la presencia de bastones desorganiza un poco este patrón hexagonal, al tiempo que la densidad de conos disminuye hasta una densidad más o menos uniforme en la retina periférica (Osterberg 1935; Curcio et al. 1987).

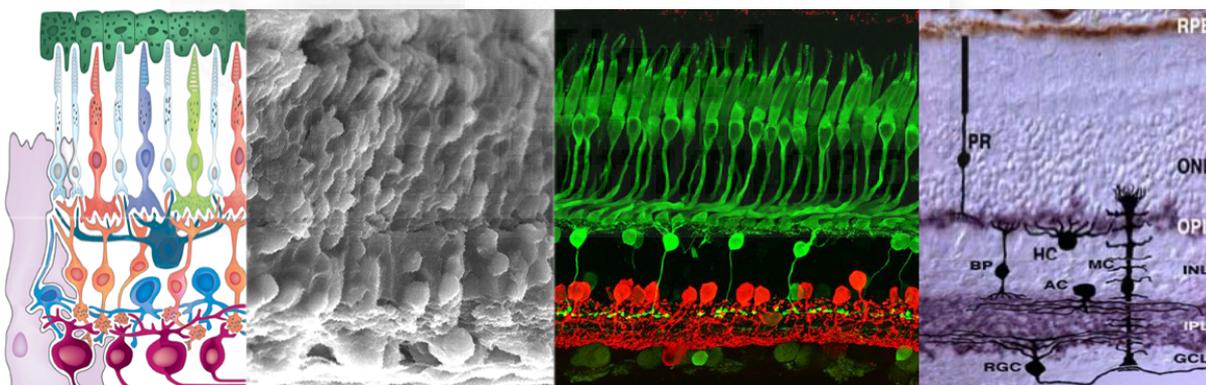
Existe también un pico de bastones alrededor de la fovea. Por el contrario, la zona de la papila (que corresponde al nervio óptico) carece de cualquier tipo de fotorreceptor ("punto ciego").

El diámetro total de la retina humana es aproximadamente de 42 mm (Polyak 1941; Van Buren 1963; Kolb y Dekorver 1991).

ANATOMÍA MICROSCÓPICA DE LA RETINA

Desde que hace más de 100 años Cajal demostrara por primera vez que las retinas de vertebrados contienen una gran diversidad de tipos celulares y patrones sinápticos funcionalmente distintos (Ramón y Cajal 1888;1892;1933), los estudios sobre la morfología y la fisiología de la retina han sido el foco de muchos trabajos. Pese a ello un sorprendente número de células de la retina, especialmente a nivel de las capas internas, permanece sin clasificar y su función es todavía mal comprendida.

Figura 5. Capas y células de la retina



A) Esquema de la organización básica de las células de la retina (© Markus Bongard). B) Imagen transversal de la retina de mamífero tomada al microscopio electrónico de barrido. C) Corte transversal de la retina vista al microscopio de fluorescencia (Cuenca N. Fotociencia2006) D) Superposición del esquema de las diferentes células de la retina en una sección transversal.

Todas las retinas de vertebrados tienen una estructura laminar muy organizada formada por siete clases de células neuronales: los fotorreceptores (PR), las horizontales (HC), las bipolares (BC), las amacrinas (AC), las interplexiformes y las ganglionares (GC); y las células gliales de Müller (MC). (Ver figs. 5-12) Estas células se alinean formando diez capas, que de la más externa (la zona cerca de la coroides) a la más interna (cercana al humor vítreo), son:

1. Epitelio pigmentario (RPE)
2. Segmentos externos e internos de los fotorreceptores
3. Membrana limitante externa

4. Cuerpos celulares de los *fotorreceptores* en la capa nuclear externa (ONL).
5. Plexiforme Externa (OPL) con axones de conos, bastones, procesos ascendentes de las células interplexiformes y dendritas de horizontales y bipolares.
6. Interneuronas *horizontales, bipolares, interplexiformes y amacrinas*, más las células gliales de *Müller* en la capa nuclear interna (INL)
7. Plexiforme interna (IPL) con axones de bipolares y amacrinas y ramificaciones de las células interplexiformes. Además de un pequeño número de amacrinas desplazadas y células ganglionares localizadas en la capa plexiforme interna.
8. Núcleos de las células *ganglionares* y amacrinas desplazadas en la capa de células ganglionares (GCL).
9. Axones de las ganglionares que transcurren por la retina para atravesarla y salir del ojo por el disco óptico.
10. Membrana limitante interna que separa la retina del vítreo.

CÉLULAS DE LA RETINA

Dentro de la aparente simplicidad de su estructura, la retina posee complejos circuitos neurales que convierten la actividad eléctrica de las células sensoriales responsables de la captación de la luz, los fotorreceptores, en potenciales de acción que viajan al cerebro por los axones, a través del nervio óptico. Las principales células que participan en este proceso son:

CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO

Forman la capa más externa de la retina. Se organizan como una sola capa de células que reposan sobre una membrana basal. Se caracterizan por la presencia de gránulos de melanina en su citoplasma, que absorben toda la luz que llega hasta su nivel.

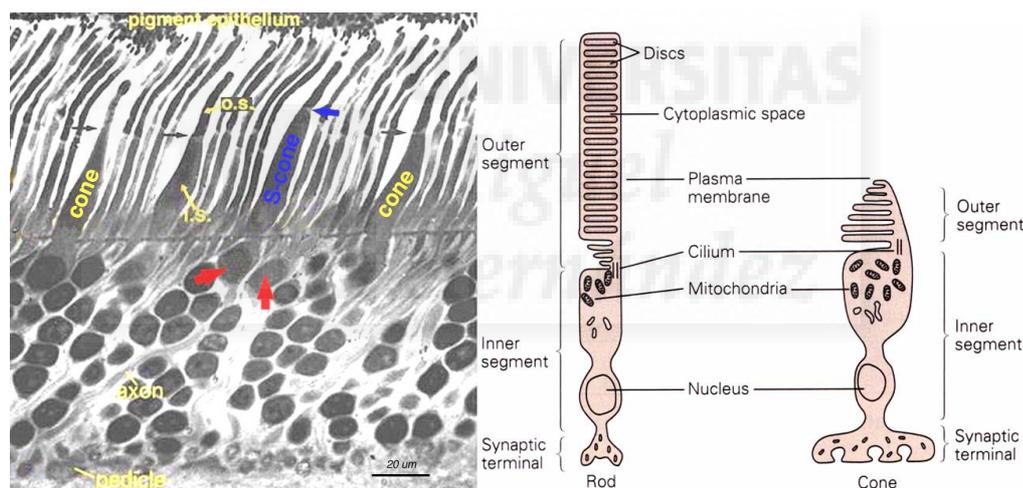
FOTORRECEPTORES

Existen principalmente dos tipos de células sensitivas o fotorreceptores: los conos y los bastones. Estas células emiten unas prolongaciones más o menos digitiformes hacia el epitelio pigmentario, denominadas segmentos externos, donde residen los ftopigmentos. Sus somas forman la capa nuclear externa y de ella salen los terminales axónicos hacia la plexiforme externa donde contactan con células bipolares y horizontales. Los dos tipos de fotorreceptores están morfológicamente bien diferenciados por su tamaño, forma de los segmentos externos, estructura interna, forma de sus terminales, contactos o distribución.

Los conos son los responsables de la agudeza visual y la detección del color en condiciones de alta luminosidad (visión fotópica). Morfológicamente se caracterizan porque son más grandes, tienen forma cónica, los repliegues de su segmento externo están unidos a la membrana circundante, sus somas forman la capa más externa de la capa nuclear y sus terminales axónicas o pedículos tienen forma triangular.

En la retina humana existen tres tipos de conos dependiendo del fotopigmento que contengan, a los que se conoce por opsinas de cono. Dependiendo de la estructura de la molécula de opsina serán más sensibles al rojo (longitudes de onda largas), verde (longitudes de onda intermedias) o azul (longitudes de onda cortas). Los conos de diferente sensibilidad y sus consiguientes patrones de conectividad al cerebro, son la base de la percepción del color.

Figura 6. Fotorreceptores



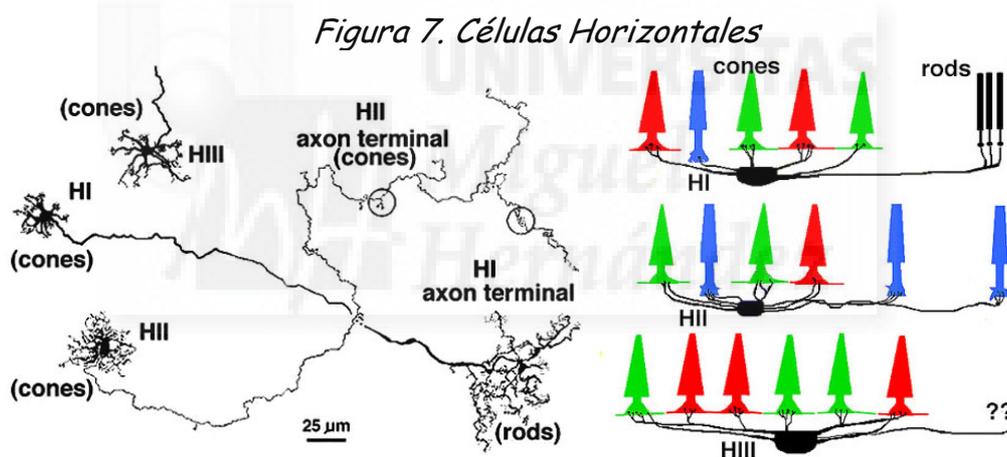
Corte semifino de retina humana mostrando las diferentes partes de los conos y bastones. os, segmento externo; is, segmento interno; s-cone, cono azul; Tomado de Webvision.

Los bastones se caracterizan porque sus segmentos externos son delgados, tienen forma alargada y se colocan ocupando los huecos entre los conos; los repliegues de su segmento externo forman discos aplanados que flotan en su interior; sus somas forman la mayor parte de la capa nuclear y sus terminales axónicas o esférulas tienen forma redondeada. Estos bastones están adaptados a la visión de bajo contraste o nocturna (visión escotópica) presentando un pico de mayor sensibilidad hacia la longitud de onda de los 500nm (luz verde azulada). El pigmento visual que se encuentra a nivel de sus segmentos externos es la rodopsina.

CÉLULAS HORIZONTALES

Las células horizontales extienden tanto sus dendritas como su terminal axónico en la capa plexiforme externa (OPL) y su núcleo se sitúa en la zona más externa de la capa nuclear interna.

Estudios combinando microscopía óptica y electrónica con el método de Golgi han demostrado que en retina humana existen tres tipos de células horizontales (Ahnelt y Kolb 1994; Kolb et al. 1994). Las células horizontales de tipo I se caracterizan por su gran campo dendrítico radial con el que contactan preferentemente con los pedículos de conos sensibles a longitudes de onda larga (rojos) y medias (verdes) aunque también contactan ocasionalmente con conos sensibles a longitudes de onda más corta (azules). Sus terminales axónicas largos y gruesos recorren largas distancias dentro de la OPL (hasta 1 mm), para formar finos terminales sinápticos de extremo engrosado, donde conectan con las esférulas de los bastones.



Dibujos de los diferentes tipos de horizontales presentes en retina de primate con su correspondiente esquema de conexiones. Tomado de Webvision.

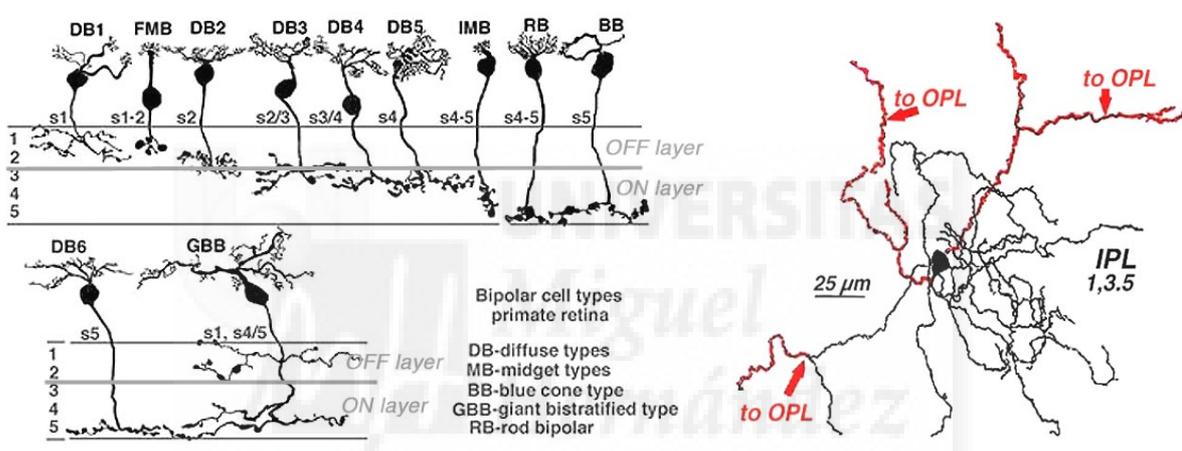
Las células horizontales de tipo II, contactan preferentemente con conos azules - pero también con otros tipos de conos - a nivel de su complicada maraña de terminaciones dendríticas. Las finas terminales axónicas de su axón, corto y curvado, contactan únicamente con conos azules.

Las células horizontales de tipo III son semejantes a las células de tipo I, aunque de mayor tamaño a cualquier excentricidad y de forma asimétrica. Sus dendritas evitan cualquier contacto con conos azules. Hasta el momento se desconoce donde contactan los terminales axónicos de las HIII pero se sospecha que será tanto en conos como en bastones (Fisher et al. 1986; Kolb et al. 1989; Ahnelt y Kolb 1992; Ahnelt y Kolb 1994; Kolb et al. 1994; Cook 2003).

CÉLULAS BIPOLARES

Las células bipolares constituyen la vía vertical de transmisión de la señal entre los fotorreceptores y las células ganglionares. Desde su cuerpo celular situado en la capa nuclear interna sale una expansión dendrítica que se dirige hacia la plexiforme externa, donde contacta con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores. También poseen una prolongación más larga o axón, que termina a nivel de la plexiforme interna haciendo sinapsis con las células ganglionares.

Figura 8. Células Bipolares e Interplexiforme



Izq.) Diferentes tipos de bipolares presentes en retina humana. Der.) Dibujo de una célula interplexiforme de retina humana vista con tinción de Golgi. Tomado de Webvision.

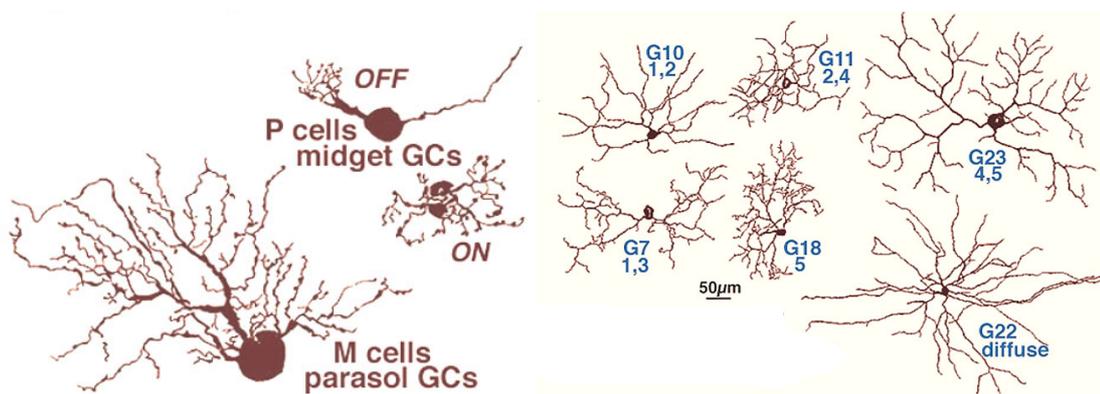
En retina humana se han descrito 11 tipos morfológicos de células bipolares (Mariani 1984a;1984b; Boycott y Wässle 1991; Kolb et al. 1992). Esta diversidad se debe a factores como su diferente conectividad con los fotorreceptores o sus distintos contactos postsinápticos. Por ejemplo, diez de estos tipos celulares corresponden a células bipolares que reciben información de los conos. Algunas de estas conectan sólo con conos rojos, verdes o azules mientras que otras no son selectivas al color. Por otro lado sólo existe un tipo de célula bipolar que recibe sinapsis de los bastones, conocida como "Rod Bipolar" (RB). Los diferentes tipos de bipolares también expresan diferentes receptores de Glutamato. Su diferente morfología y estratificación en la plexiforme interna sugiere que los diferentes tipos inervan diferentes tipos de amacrinas y ganglionares.

Desde Cajal muchos subtipos morfológicos de células amacrinas han sido y continúan siendo descritos a partir de estudios de Golgi, registros intracelulares y tinción inmunocitoquímica en diferentes especies de vertebrados (Pourcho 1980; Kolb y Nelson 1981; Kolb et al. 1981; Pourcho 1981; Pourcho y Goebel 1985; Vaney 1985; Sandell y Masland 1986; Hendrickson et al. 1988; Pourcho y Goebel 1988; Sandell y Masland 1989; Pourcho y Owczarzak 1991; Kolb et al. 1992; Dacey 1994; Goebel y Pourcho 1997; He y Masland 1997; MacNeil et al. 1999; Wright y Vaney 2000; Deng et al. 2001; Cuenca et al. 2002; Kolb et al. 2002; Vaney y Taylor 2002; Cuenca et al. 2003; Jakobs et al. 2003). Así actualmente la clasificación de células amacrinas consta de alrededor de 30-50 subtipos morfológicos diferentes según las especies (Naka y Garraway 1975; West 1976; Ammermüller y Weiler 1981; Kolb et al. 1981; Kolb 1982; Linberg et al. 1986; Kolb et al. 1988; Wagner y Wagner 1988; Kolb et al. 1992; Fernández et al. 1994; Linberg et al. 1996; MacNeil et al. 1999; Masland 2001b; Lin y Masland 2006). Se subdividen atendiendo a su particular morfología, al tamaño de su campo dendrítico, su estratificación en la plexiforme y/o su contenido en neurotransmisores, y cada uno de los tipos parece desempeñar un papel clave en la codificación de la información visual.

CÉLULAS GANGLIONARES

Las células ganglionares poseen un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinápsis a nivel de la plexiforme interna con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. En retina humana los tipos de células ganglionares se subdividen en dos grandes grupos: por un lado las células de proyección genículo-estriado específicas de primates y por otro aquellas otras equivalentes a las descritas en otros mamíferos, a los que se les ha asignado su nomenclatura numérica. Las primeras se subdividen en función de sus contactos y fisiología en ganglionares difusas grandes, ganglionares difusas pequeñas y ganglionares enanas. Otros autores simplifican esta clasificación distinguiendo sólo ganglionares pequeñas o "células de tipo P" que proyectan hacia las capas parvocelulares del cuerpo geniculado lateral y ganglionares grandes o de "tipo M" que proyectan hacia las capas magnocelulares del cuerpo geniculado lateral. Así las ganglionares de tipo P incluirían a las ganglionares enanas y a las ganglionares difusas pequeñas, mientras que la clase de células M estaría formada por las ganglionares difusas grandes (Shapley y Perry, 1986; Rodieck et al. , 1985; Dacey y Petersen, 1992; Dacey 2000; Kaplan y Benardete 2001; Dacey et al. 2003; Chalupa y Günhan 2004; Salinas-Navarro et al. 2009; Salinas-Navarro et al. 2009). A partir de tinciones de Golgi han sido descritos al menos 26 tipos morfológicos de ganglionares en retina humana (Kolb et al. 1992).

Figura 10. Células Ganglionares

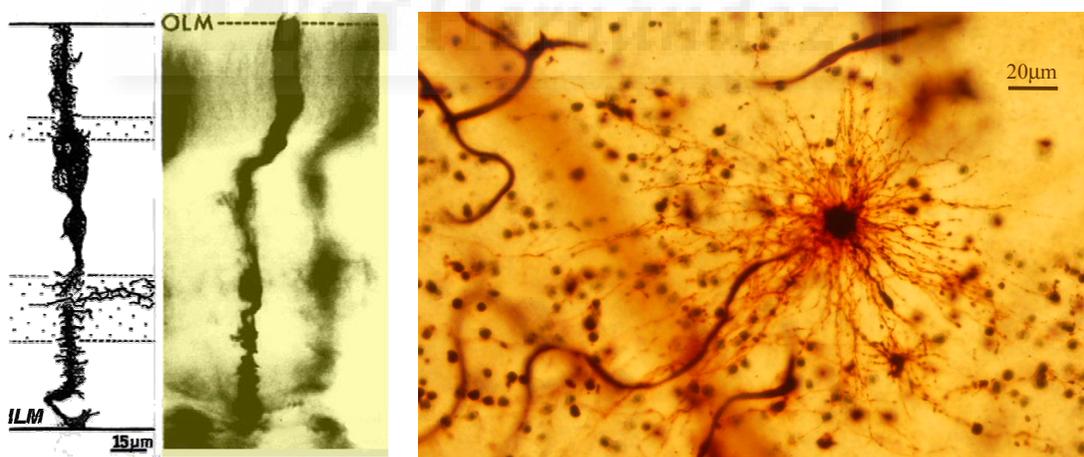


Diferentes tipos de ganglionares presentes en primates. Tomado de Webvision.

CÉLULAS GLIALES

Además de estas células nerviosas, no hay que olvidar que en la retina también existen células gliales, entre las que hay destacar a las células de Müller, los astrocitos y la microglia. Todas estas células fueron ya descritas por Cajal hace más de 100 años (1892).

Figura 11. Células Gliales y de Müller



Izq.) Célula de Müller en sección transversal. Tomado de Webvision. Der.) astrocito impregnado en la retina humana aplanada.

Las **células de Müller** representan la glía radial de la retina. Sus núcleos se sitúan en la capa nuclear interna y sus prolongaciones se extienden a través de todas las capas, desde la limitante externa a la limitante interna. Sus uniones comunicantes con los segmentos externos de los fotorreceptores forman la membrana limitante externa (OLM). A través de esta barrera, los segmentos de

los fotorreceptores proyectan al espacio subretiniano para entrar en estrecha asociación con el epitelio pigmentario. En el otro extremo, los contactos laterales de los pedículos terminales de las células de Müller y los constituyentes básicos de la membrana asociados a ellos, forman la membrana limitante interna (ILM), una barrera de difusión entre la retina y el humor vítreo.

Los **astrocitos** se caracterizan por su cuerpo celular aplanado y una serie de procesos radiales. Estos procesos están llenos de filamentos intermedios de manera que estos astrocitos se tiñen intensamente cuando se utilizan anticuerpos frente a la proteína fibrilar ácida (Schnitzer, 1988). Estos astrocitos se encuentran casi exclusivamente a nivel de la capa de fibras del nervio óptico. Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy elongados a nivel de la retina central a una morfología estrellada a nivel de la retina periférica (Schitzer, 1988). No existen astrocitos a nivel de la fovea avascular ni de la ora serrata.

Las **células microgliales** no son estrictamente células neurogliales. Penetran en la retina coincidiendo con los precursores de los vasos sanguíneos y pueden encontrarse a cualquier nivel de la retina. En las tinciones de Golgi aparecen como células multipolares, con pequeños cuerpos celulares y unos procesos irregulares y cortos. Esto hace que sea relativamente fácil confundirlas con otros tipos celulares de la retina, especialmente cuando su cuerpo celular se sitúa a nivel de una de las capas nucleares y sus procesos a nivel de una de las capas plexiformes.

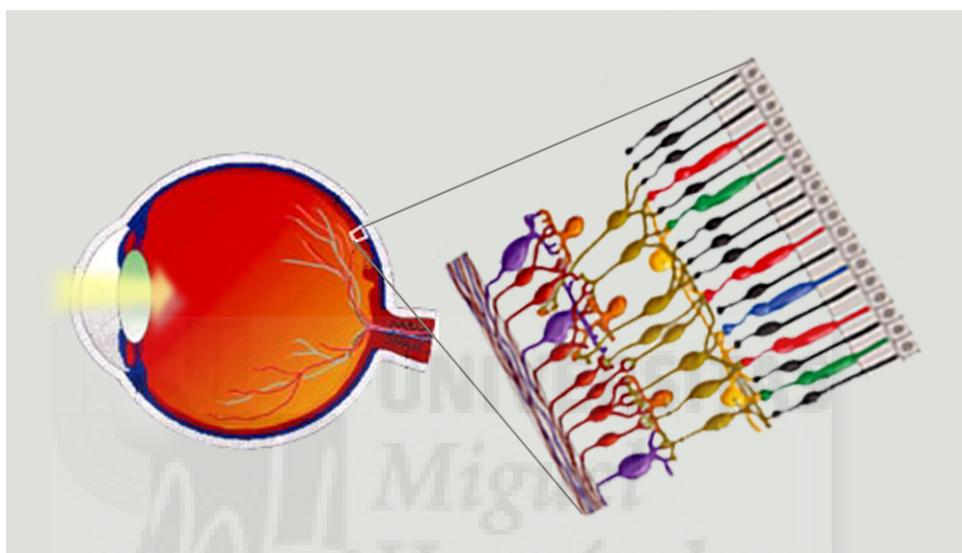
FISIOLOGÍA DE LA RETINA

La luz, antes de llegar a la retina, atraviesa los distintos componentes del aparato dióptrico del ojo (*ver Figs. 2 y 13*). La *coroides*, solamente deja pasar la luz por su parte anterior, la *córnea*, que junto con el *humor acuoso* produce la primera refracción luminosa. En la *pupila* y el *crystalino* se produce la segunda refracción, y en el *humor vítreo*, la luz se refracta por tercera vez. Una vez aquí, debe atravesar todas las capas de la retina antes de interaccionar con la porción donde se encuentra los elementos fotosensibles. El *epitelio pigmentario* y la *esclerótica* evitan que la energía lumínica que atraviesa todas las capas se disipe, absorbiéndola y dando además aporte nutricional a la retina.

La información que llega a la retina es principalmente una radiación electromagnética que varía a lo largo del espacio y tiempo. Una vez alcanza los pigmentos visuales de los fotorreceptores, la información visual fluye verticalmente desde el fotorreceptor a las células bipolares y ganglionares.

Las células horizontales y amacrinas son las responsables de las interacciones laterales dentro de la retina, que se producen a nivel de las capas plexiforme externa e interna (*Figuras 5 y 12*), las zonas donde tiene lugar fundamentalmente el procesamiento de la información visual. La señal de salida de la retina consiste en una serie de señales eléctricas (potenciales de acción) que viajan a lo largo de algo más de un millón de axones en la especie humana hacia el cuerpo geniculado lateral.

Figura 12. Trayectoria de la luz en el ojo



Esquema de un globo ocular (izq.) y de la organización de las células de la retina (der.). Según las encontraría la luz al alcanzar el ojo. Modificado de Webvision.

En líneas generales, la luz es absorbida por los fotorreceptores contenidos en los discos membranosos de los fotorreceptores, alcanza el núcleo situado en la capa nuclear externa (ONL) y es enviado a los terminales sinápticos que contactan las bipolares y horizontales en la plexiforme externa (OPL). Los cuerpos celulares de las horizontales y bipolares están junto con las amacrinas en la plexiforme interna (INL), desde allí, los procesos axonales de las bipolares y las dendritas de las células amacrinas alcanzan la plexiforme interna (IPL) para contactar los procesos dendríticos de las ganglionares de cuyo voluminoso núcleo se sitúa en la capa a la que dan nombre (GCL). Su largo axón sale de la capa de células ganglionares formando el nervio óptico, que sólo se mielinizará después de atravesar las capas del globo ocular para llevar la información al resto del sistema nervioso central.

En condiciones de oscuridad, en la retina se encuentran abiertos una serie de canales iónicos a nivel de los segmentos externos de los fotorreceptores que

permiten la entrada fundamentalmente de iones sodio (Na^+). Esta entrada de Na^+ , despolariza parcialmente a los fotorreceptores, permitiendo la liberación de neurotransmisor a nivel de sus terminales sinápticos. El transmisor liberado es Glutamato.

Cuando la luz estimula a las moléculas de opsina, se producen una serie de cambios, que van a producir el cierre de los canales iónicos permeables al Na^+ . Por tanto, cesa la entrada de Na^+ y el fotorreceptor se hiperpolariza, con lo que deja de liberar neurotransmisor (para profundizar en los mecanismos de este proceso pueden consultarse las revisiones de Stryer 1991; Kawamura 1994; Yau 1994; Lamb y Pugh 2006).

Cada fotorreceptor responde a la luz que le llega directamente, por lo que su campo receptor es muy pequeño. Con esta hiperpolarización cada uno de los fotorreceptores capta unas propiedades de la luz. Los bastones detectan los cambios lentos bajo luz tenue y los conos detectan fluctuaciones rápidas de la luz brillante.

Las células horizontales también responden a la señal de los fotorreceptores con una hiperpolarización, pero esta vez su campo receptor es más grande (varios fotorreceptores). Las horizontales contactan con las células bipolares y a la vez mantienen sinapsis recíprocas hacia los conos. Estas sinapsis hacen que las redes de células horizontales, que se encuentran extensamente acopladas a través de contactos eléctricos, realicen una suma espacial de los estímulos colaborando en la organización centro/periferia de los campos receptores de las células bipolares. Además modulan la señal de los fotorreceptores bajo diferentes condiciones de luminosidad pudiendo incluso codificar el color de la respuesta de las bipolares a través de su retroalimentación a los conos.

Las células bipolares conectan con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores y transmiten las señales hacia las células ganglionares. Esto hace que con el cese de liberación del Glutamato, dependiendo de los receptores postsinápticos que posean, algunas células bipolares se hiperpolaricen (OFF), mientras que otras se despolarizarán (ON) y además la velocidad, frecuencia y duración de esta respuesta varía de un tipo celular a otro. A estas células se les atribuye la responsabilidad del llamado procesamiento en paralelo en la retina. Así las conexiones sinápticas se segregan en distintas vías paralelas de modo que las bipolares con respuesta OFF conectan con las ganglionares OFF en la *sublámina a* (más externa) de la plexiforme interna mientras que las de tipo ON lo hacen con las ganglionares de respuesta ON en la *sublámina b* (más interna), Además, en la fóvea las células ganglionares enanas (midget) reciben la señal de

una sola bipolar específica o bipolar enana (Dacey 1993; Dacey y Lee 1994; Ghosh et al. 1997; Calkins et al. 1998; Ghosh y Grunert 1999).

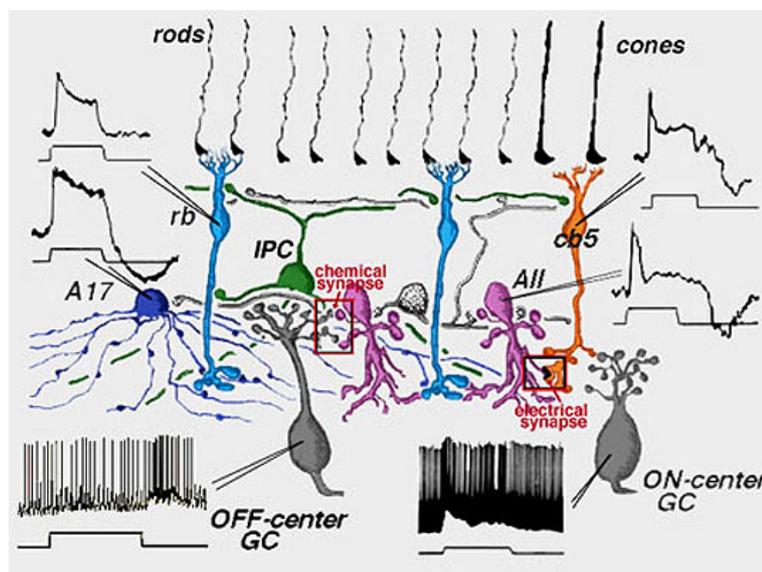
Las células amacrinas reciben conexiones de células bipolares y de otras células amacrinas, y establecen a su vez conexiones con células ganglionares retroalimentando también a las células bipolares. Cada uno de los pocos tipos específicos de células amacrinas que han sido estudiados en profundidad tiene un circuito de conexiones y una respuesta distinta a la señal que reciben. En general se admite que liberan un neurotransmisor inhibitorio (GABA o glicina), formando la vía de asociación lateral a nivel de la plexiforme interna y sirviendo para integrar, modular e introducir un dominio temporal al mensaje visual presentado a las células ganglionares.

Las células interplexiformes reciben aferencias sinápticas desde la plexiforme interna y mandan su eferencia hacia la plexiforme externa pudiendo retroalimentar las células horizontales, aunque su función es todavía incierta. Un estudio de las conexiones sinápticas de las células interplexiformes mediante microscopía electrónica de material impregnado con Golgi en el gato, muestra que en la retina del gato las células interplexiformes reciben información de las células amacrinas en la IPL y transmiten la información tanto probablemente a otras células amacrinas y bipolares en la IPL, como a otras interplexiformes y a bipolares de la vía de los conos y de bastones en la OPL (Kolb y West 1977).

Las ganglionares tienen su campo receptor organizado en forma de círculos concéntricos de respuesta antagonista, donde el límite entre centro y periferia se debe a la acción de las horizontales y es perfilado por las células amacrinas. En función de sus propiedades fisiológicas las células ganglionares se dividen en células de centro ON (responden a la luz en el centro de su campo receptor) y células de centro OFF (se inactivan cuando la luz cae en el centro de su campo receptor) Las vías ON y OFF contribuyen de diferente manera al patrón de respuesta de la retina detectable en el electroretinograma (ERG). Esta técnica es ampliamente utilizada en la detección y seguimiento de enfermedades como la hipertensión o el glaucoma que conllevan daños en las células ganglionares (Margalit y Sadda 2003; Mayor-Torroglosa et al. 2005; Miura et al. 2009; Salinas-Navarro et al. 2010).

Este esqueto esquema del funcionamiento y la circuitería de la retina sugieren un activo papel de las diferentes células de la retina en el preprocesamiento de la imagen visual antes de enviarlo al cerebro.

Figura 13. Electrofisiología de la Retina

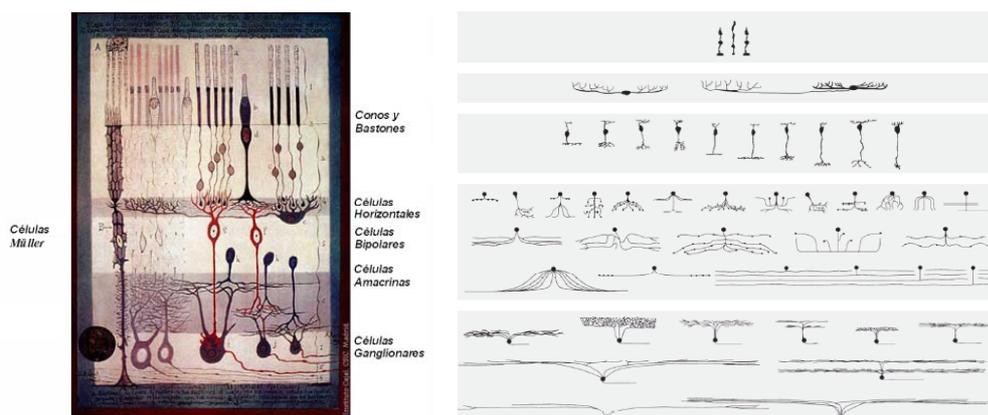


Esquema de las conexiones entre las células de la retina y su respuesta fisiológica. Tomado de Webvision

EL PROBLEMA DE LA CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS NERVIOSAS DE LA RETINA

Donde poner la línea divisoria entre lo que es un tipo celular u otro siempre ha sido un tema de discusión (Cook 1998; Masland 2001a;2004). Son muchos los autores que aun dudan que los cada vez más numerosos tipos, tengan funciones específicas y diferenciadas dentro de la retina. Sin embargo, parece que a medida que se va conociendo más de la retina se va confirmando el papel específico de muchos tipos celulares. Hoy en día se acepta que aparte de la diversificación de las células principales, las neuronas retinianas contienen diversas subclases o tipos. Estos tipos se diferencian en sus morfologías, propiedades fisiológicas y funciones. En este sentido, se acepta que hay siete "clases" básicas de neuronas en la retina, y al menos 70-80 tipos neuronales, o muchos más si se tienen en cuenta las variaciones en forma, localización topográfica y conexiones sinápticas de cada una de las células (Ramón y Cajal 1892; Vaney 1990; Vaney y Hughes 1990; Kolb 1991a;b; Kolb et al. 1992; Fernández et al. 1994; Kolb 1994;1997; MacNeil y Masland 1998; Masland y Raviola 2000; Rockhill et al. 2000; Kolb et al. 2001; Masland 2001a;b; Vaney 2002; Masland 2004; Kolb et al. 2005; Nelson et al. 2006).

Figura 14. Células de la Retina



A la izquierda se muestra un esquema de las células presentes en la retina en una ilustración de Ramón y Cajal. A la derecha una figura tomada de Masland 2001 en que se representan la mayor parte de tipos celulares de la retina de mamíferos. De arriba a bajo Fotorreceptores, Horizontales, Bipolares, Amacrinas y Células Ganglionares.

Se admite que en general el tamaño del campo dendrítico y la capa de estratificación de las células dentro de la retina, son buenos indicadores de la función específica (Nelson et al. 1975; Nelson et al. 1978; Marchiafava y Weiler 1982; Nelson 1982; Dacheux y Raviola 1986; Yang et al. 1991; Bloomfield 1992; Dacey 1994; Kolb et al. 1994; Freed et al. 1996; Menger y Wässle 2000). Se ha comprobado también que las células de la retina cambian su tamaño de una forma regular con la distancia desde la fovea (Fernández et al. 1994; Kolb et al. 1994; Dacey 2000), y que las células que se ramifican en diferentes estratos sinápticos tienen diferentes neurotransmisores, canales iónicos, receptores, etc., que pueden usarse para lograr una correcta clasificación (Kalloniatis y Tomisich 1999; Masland 2001a; Climent y Fernández 2002). Además, parece razonable pensar que una diferente estratificación implique un tamaño y patrón de ramificación dendrítica característica (Vaney 2002; Masland 2004). Por otro lado, algunos autores sostienen que será posible calcular cual es el máximo número de tipos celulares que debería existir en la retina atendiendo a su distribución y/o los distintos mosaicos celulares (Vaney 1991b; MacNeil y Masland 1998; Stevens 1998; Rockhill et al. 2000; Masland 2001a).

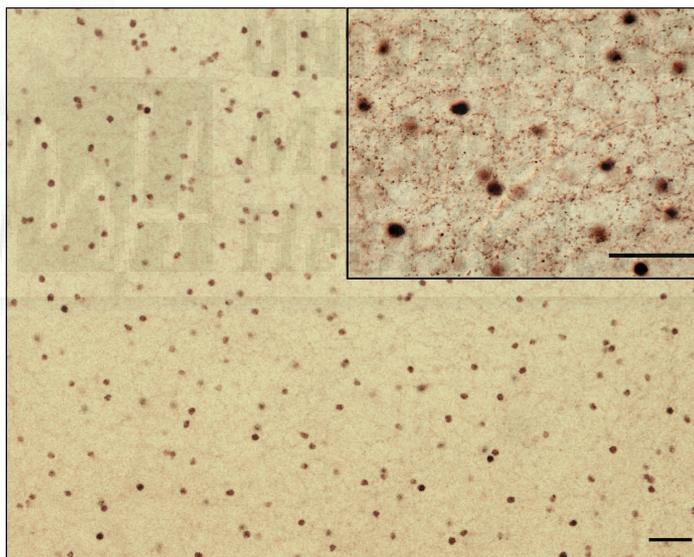
CARACTERIZACIÓN DE TIPOS CELULARES

Para estudiar el papel que cada tipo celular de la retina tiene en el procesamiento de la información visual es preciso poder diferenciarlo y caracterizarlo. En algunos casos, las células poseen **marcadores específicos** que permiten marcar histoquímicamente o inmunocitoquímicamente poblaciones enteras de tipos celulares (Ammermüller y Weiler 1988; Kolb et al. 1988; Mariani y Hokoc

1988a; Brandon y Criswell 1991; Yang et al. 1991; Zhang et al. 1992; Sherry y Yazulla 1993a; Haverkamp et al. 2000; Moraes et al. 2000; Calkins et al. 2005; Martínez-Navarrete et al. 2008).

Estos casos son relativamente pocos y en general no tiñen completamente el campo dendrítico, que a menudo se solapa con los de otras células nerviosas, haciendo difícil determinar con exactitud el tamaño y la morfología del árbol dendrítico en las neuronas individuales que forman la red (ver Fig.15). Además, dado que en la retina varios tipos neurales diferentes pueden ser teñidos con los mismos marcadores y/o anticuerpos (Kolb y Zhang 1997; Kalloniatis y Tomisich 1999; Haverkamp et al. 2000; Keyser et al. 2000; Deng et al. 2001; Cuenca et al. 2002; Jellali et al. 2002; Kolb et al. 2002; Marc y Jones 2002; Cuenca et al. 2003; Gong et al. 2006; Klump et al. 2009), es necesario un esfuerzo adicional para conocer con exactitud que tipos celulares se tiñen.

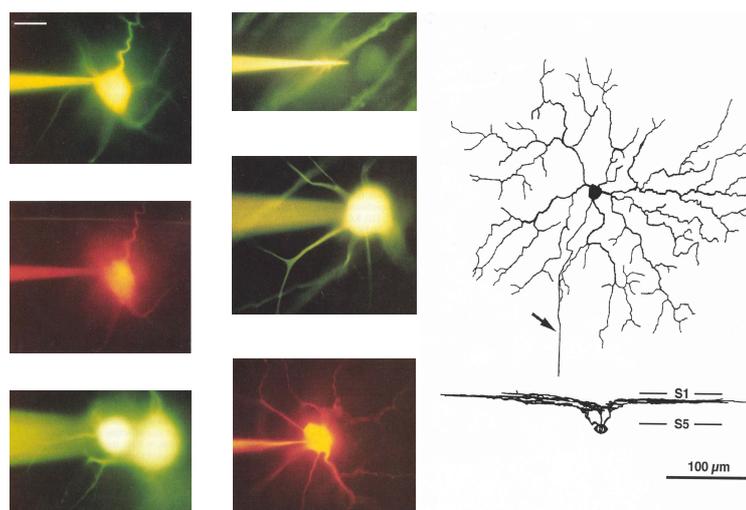
Figura 15. Marcadores específicos



Ejemplo de la distribución de las amacrinas colinérgicas en la retina en el que las células forman dos mosaicos unidos por uniones eléctricas (Climent y Fernández, 2002) Barra de calibración 50 μ m.

Los métodos tradicionales más usados para definir la forma de las neuronas de la retina incluyendo su ramificación dendrítica y axonal, han sido el **método de Golgi** (Sherry y Yazulla 1993b; Angulo et al. 1996; MacNeil et al. 1999; Moraes et al. 2000; MacNeil et al. 2004) y las **técnicas de inyección intracelular** (Wassle et al. 1987; Pu y Berson 1992; Fernández y Kolb 1993; Kao y Sterling 2003).

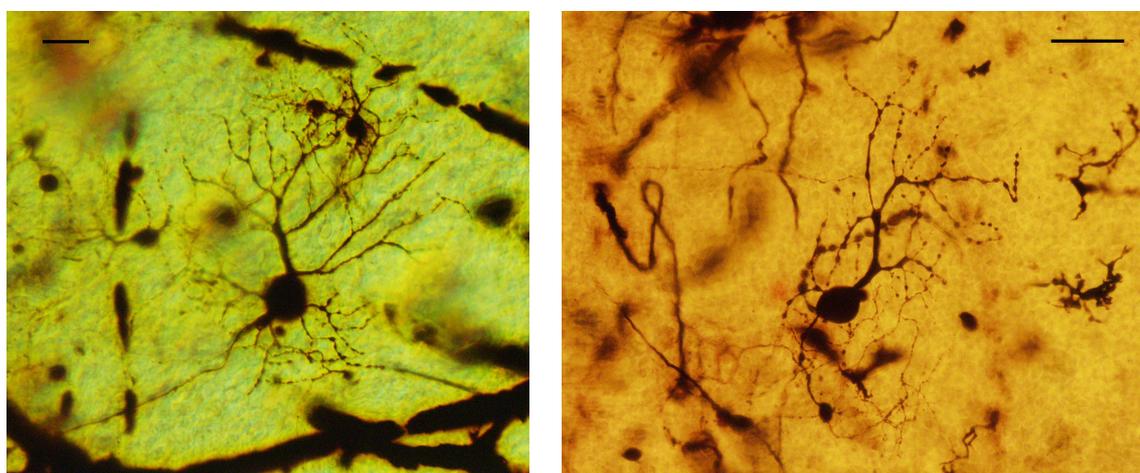
Figura 16. Células teñidas por Inyección Intracelular



Izq.) Imágenes de fluorescencia de la inyección intracelular de trazadores. Der.) dibujo de una célula ganglionar de tortuga inyectada con su correspondiente proyección.

Aunque las tinciones tras experimentos de registro intracelular son capaces de aportar gran cantidad de información sobre la fisiología, anatomía y conexiones sinápticas de los tipos celulares estudiados, por motivos obvios estas técnicas no son fáciles de utilizar en retina humana, por lo que la mayor parte de las clasificaciones actuales se basan en estudios con diferentes variaciones del método de Golgi. Este método clásico de tinción es capaz de marcar completamente las células nerviosas, desde sus finas terminaciones dendríticas hasta su terminal axónico y puede ser combinado con técnicas inmunocitoquímicas (Sherry y Yazulla 1993b; Wassle et al. 1995). Sin embargo se trata de un proceso aleatorio en el que no todas las células se tiñen, lo que exige procesar un gran número de retinas.

Figura 17. Células teñidas por el Método de Golgi



Preparaciones de Golgi en retina aplanada. Izq.) Capa ganglionar vista en contraste de fases. Der.) Foco en la IPL en campo claro. Barra de escala 25μm.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La existencia de numerosos tipos de células amacrinas (Vaney 1990; Kolb et al. 1992; Ammermüller y Kolb 1995; Kolb 1997; MacNeil y Masland 1998; Masland y Raviola 2000; Masland 2001b;2004; Kolb et al. 2005), que participan de una manera específica en la codificación de la información visual (Greschner et al. 2006; Thiel et al. 2006; Baccus 2007) está ampliamente aceptada. Sin embargo, la identificación y clasificación de estas células, no es una tarea fácil. En este sentido, la diversidad de células amacrinas en cada especie aumenta enormemente en función del grado de detalle con que sean estudiadas (Fernández et al. 1994; MacNeil y Masland 1998; Masland y Raviola 2000; Masland 2001b; Climent y Fernández 2002; Masland 2004).

En general las clasificaciones que se basan en el tamaño del cuerpo celular o del campo dendrítico presentan un importante sesgo, dado que a nivel de la retina el mismo tipo celular suele presentar un tamaño diferente dependiendo de la excentricidad (Kolb 1997). Además, aunque estudios recientes sugieren que la mayor parte de células de la retina pueden ser clasificadas en base a la coexistencia de diferentes marcadores moleculares (Kalloniatis et al. 1996; MacNeil y Masland 1998; Marc et al. 1998; Kalloniatis y Tomisich 1999; MacNeil et al. 1999; Masland 2001b; Jellali et al. 2002; Marc y Jones 2002; Masland 2003; Sun et al. 2003; Masland 2004; Jones et al. 2005; Jusuf et al. 2005; Díaz 2006; Gong et al. 2006), relativamente pocos estudios han sido capaces de establecer el contenido de neurotransmisores en células amacrinas que han sido previamente bien identificadas y clasificadas (Goebel y Pourcho 1982; Kolb et al. 1991; Sherry y Yazulla 1993b; MacNeil et al. 1999).

Todo ello, justifica la dificultad de encontrar parámetros objetivos para caracterizar los tipos celulares de la retina, y el sorprendente número de células de la retina, especialmente en las capas más internas, que todavía permanecen sin clasificar y mal comprendidas.

El principal objetivo de este trabajo es tratar de caracterizar mejor una de las poblaciones celulares menos conocidas de la retina humana, las células amacrinas. Estas células contribuyen en gran manera a modular la respuesta de

las células ganglionares (MacNeil y Masland 1998), aunque han sido hasta ahora poco estudiadas. Las preguntas concretas que pretendemos responder con esta investigación son las siguientes:

- ¿Es posible caracterizar distintas poblaciones de células amacrinas de forma objetiva?
- ¿Cuáles son las principales características morfológicas de los diferentes tipos de células amacrinas en la retina humana?
- ¿Se puede realizar un estudio de marcadores moleculares sobre células concretas, previamente impregnadas con el método de Golgi?
- Y de ser así, ¿Se puede usar la presencia y/o ausencia de un determinado marcador como parámetro para discriminar distintos tipos de células amacrinas?

Con ese fin nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar una metodología para caracterizar de forma objetiva las poblaciones de células amacrinas de la retina humana.
2. Caracterizar diversos tipos o subgrupos de células amacrinas en retina humana.
3. Realizar un estudio de marcadores moleculares sobre células amacrinas previamente caracterizadas morfológicamente.
4. Evaluar la mejor combinación de parámetros para separar distintos tipos de células amacrinas en retina humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN, FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS RETINAS.

GLOBOS OCULARES

Los globos oculares humanos fueron proporcionados por el Banco de Ojos del Hospital General Universitario de Alicante y el Hospital Universitario de San Juan. También se utilizaron colecciones de retina humana teñidas por el método de Golgi provenientes de estudios morfológicos previos (Kolb et al. 1992) que fueron generosamente proporcionadas para este trabajo por la Dra. Helga Kolb (Salt Lake City, Utah, USA). Todas las retinas procedieron de donantes de cornea exentos de patología retiniana. Los protocolos para la obtención y manejo de estos globos oculares fueron aprobados por los pertinentes comités éticos de investigación.

Con el fin de optimizar y poner a punto los procedimientos utilizados en el presente trabajo, también se utilizaron algunas retinas de primate (*Macaca fascicularis*) provenientes del estabulario de la universidad de Utah, así como retinas de tortuga (*Pseudemys scripta elegans*) que habían sido previamente utilizadas para estudios electrofisiológicos.

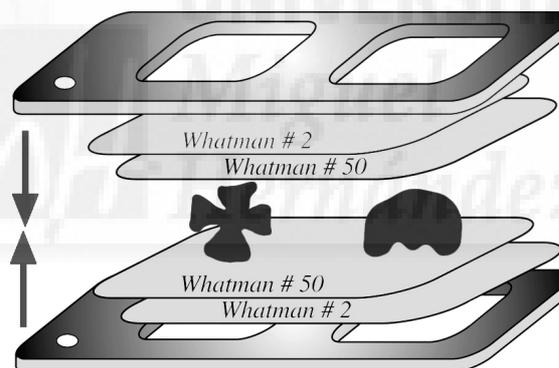
DISECCIÓN Y PRETRATAMIENTO

El procedimiento seguido para el procesamiento de todas las muestras (obtenidas de los hospitales colaboradores, pertenecientes a la colección de la profesora Helga Kolb y/o procedentes de animales de investigación) fue similar. Los técnicos de los bancos de ojos, una vez extraída la córnea, retiraron el cristalino y el vítreo para fijar la parte posterior de los globos oculares en paraformaldehído $[(CH_2O)_n]$ al 1% y glutaraldehído $[OHC(CH_2)_3CHO]$ al 1-2% disuelto en tampón fosfato (PB) 0.1M a pH 7.4 por un tiempo variable entre 4 días y varios meses. Los fijadores habían sido preparados y suministrados

previamente con el fin de pasara el mínimo tiempo posible entre la extracción de la córnea y la fijación inicial. En algunos casos, los globos oculares enteros fueron envueltos en gases con producto funguicida y enviados inmediatamente al laboratorio en medio nutritivo.

Una vez en el laboratorio las muestras se lavaron brevemente en PB 0.1M a pH 7.4 y se procedió a su disección. Las retinas fueron aisladas, separadas de la coroides y epitelio pigmentario y aplanadas sobre papeles de filtro antes de proceder a su impregnación por el método de Golgi. Básicamente, tras la limpieza del vítreo se practicaron algunas incisiones radiales sobre las retinas para facilitar aplanamiento y extensión entre filtro de papel impregnados de fijador. El procedimiento que dio mejores resultados fue la utilización de un filtro Whatman nº 50 (interior) y un filtro Whatman nº 2 (exterior), sujetos por portaobjetos atados con gomas o piezas de metacrilato, a modo de portaobjetos, confeccionadas al efecto de mantener planas las muestras dejando permear las soluciones a través de los filtros (Angulo et al. 1996).

Fig.18. Esquema del procesamiento



Esquema mostrando como se procesan las retinas aplanadas. Tomado de Angulo y col. 1996.

IMPREGNACIÓN DE GOLGI E INCLUSIÓN EN EXTENSIÓN

Se ensayaron numerosas variaciones de la tinción argéntea de Golgi en un intento de sistematizar y optimizar la técnica para su utilización en retina humana. El método final fue el resultado de aplicar los conocimientos obtenidos en el estudio de impregnación de rodajas de cerebro y retina en nuestro laboratorio (Angulo et al. 1996) a los métodos previamente usados para la impregnación de retinas humanas (Kolb et al. 1992).

Básicamente, tras el procesamiento descrito anteriormente, cada retina fue mantenida en oscuridad en una solución de glutaraldehído al 5% y dicromato

potásico [$K_2Cr_2O_7$] al 4% a $10 \pm 1^\circ C$ hasta que el pH alcanzó un valor de 5,3 (aproximadamente 7-10 días). A continuación, las retinas permanecieron en una solución al 0,75% de nitrato de plata, en oscuridad, durante 3 días a temperatura ambiente. Tras un breve lavado con agua desionizada, las retinas fueron post-fijadas en 1% OsO_4 durante una hora, deshidratadas en gradientes crecientes de alcohol e incluidas en Epon 812 entre 2 láminas de polietileno (ACLARC®) siguiendo la técnica habitual. En el paso de alcohol 70% se sacaron las retinas de entre los papeles de filtro antes de seguir con la deshidratación.

Las retinas se montaron con las células ganglionares hacia arriba sobre un portaobjetos de vidrio con una gota de EPON y cubriéndolas con una lamina de plástico o bien entre dos laminas de ACLARC®. El Epon se dejó polimerizar en la estufa a 60° durante toda la noche con algo de peso sobre la muestra.

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE ESTUDIO

Todas las retinas fueron estudiadas para determinar si habían sido correctamente impregnadas. El color del neurópilo y la apariencia de las terminaciones dendríticas se utilizaron como indicadores del proceso (Ramón y Cajal 1933; Angulo et al. 1994; Angulo et al. 1996).

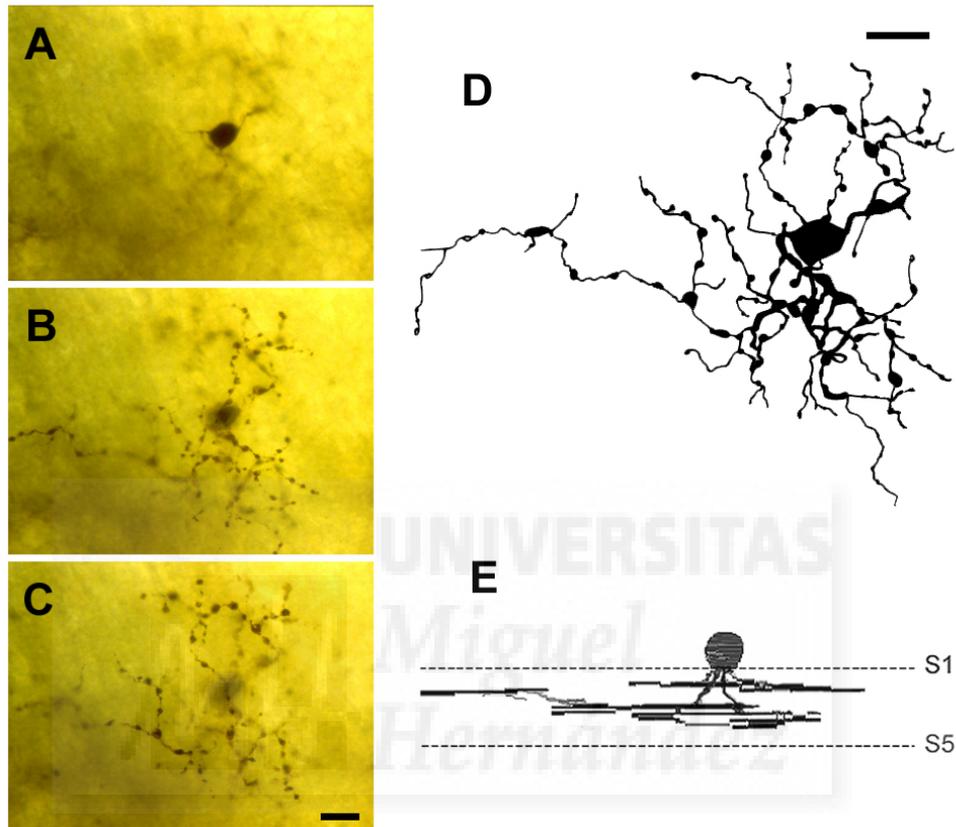
DIBUJO Y CARACTERIZACIÓN

Estos estudios se realizaron sobre retinas extendidas, para poder examinar el campo dendrítico y la estratificación de las células de interés. Seleccionamos células que resultaron impregnadas en un grado óptimo y suficientemente separadas de las demás como para poder estudiarlas sin dificultad. Las células de interés se dibujaron con la ayuda de una Cámara Lúcida acoplada a un microscopio óptico (Leica Microsystems, Deerfield, IL). Este procedimiento permite ver por los oculares la imagen superpuesta de la célula enfocada y nuestra mano sobre la mesa, con lo que el trabajo consiste en calcar el perímetro de la célula a la vez que se va enfocando en el microscopio y anotando la coordenada z del microscopio.

Se prestó especial atención a cualquier característica significativa de las células objeto del estudio (Kolb et al. 1988; Kolb et al. 1992). En particular se intentó plasmar lo mejor posible la forma, las varicosidades o espinas, el grado de entrecruzamiento, la sinuosidad o grosor de las dendritas, la forma del soma o la profundidad de éste en la capa nuclear interna o plexiforme.

Es frecuente que en una misma área del microscopio aparezcan en foco células que en realidad están a diferentes profundidades. Para facilitar esta tarea se tomó como referencia la profundidad relativa en relación al grosor del corte.

Figura 19. Caracterización Celular



Célula amacrina pequeña de la retina humana. A-C: Microfotografías tomadas en diferentes planos de foco. A) Capa nuclear interna, B) sublámina a (estratos S1-S2 de Cajal), C) sublámina b (estratos S3-S5 de Cajal). D) Dibujo de la célula con cámara lucida. E) Reconstrucción tridimensional y rotación (90 °) para ver su estratificación en la capa plexiforme interna (realizada con el programa Rotater 5.2, Craig Kloeden, <http://raru.adelaide.edu.au/rotater/>). Barra de escala 10 μ m.

Además de la escala, se tuvieron en cuenta las coordenadas Z de los límites de cada una de las capas de la retina. A partir de estos datos se calculó en que capa se encontraba el soma celular y se ramificaban cada una de las dendritas. Este procedimiento resultó especialmente útil para el estudio de ramificaciones de dudosa procedencia.

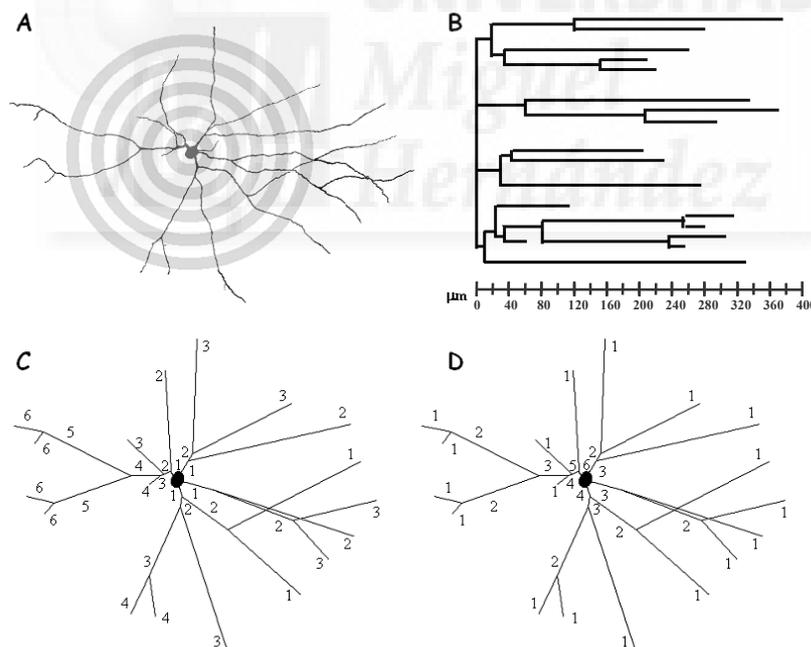
La escala de los dibujos y el tamaño del campo dendrítico se midieron con la ayuda de una gradilla en el ocular o un portaobjetos calibrado. También se tomaron fotos de las células para facilitar su reconocimiento posterior durante el procesamiento del tejido.

En todos los casos se tomó como referencia la imagen de la célula en el plano horizontal. Posteriormente se contrastó esta con su apariencia en secciones transversales (ver Fig.19).

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Las células de interés fueron seleccionadas, digitalizadas y clasificadas atendiendo a su morfología, al tamaño de su campo dendrítico y a su estratificación en la plexiforme interna siguiendo criterios ampliamente aceptados (Kolb et al. 1992). Para obtener información cuantitativa de estas células utilizamos el programa NIH Image 1.62 (desarrollado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y disponible en la siguiente dirección de internet: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Una serie de rutinas desarrolladas por nuestro grupo (Fernández et al. 1991; Fernández et al. 1994; Germain et al. 2003;2007) nos permitieron adquirir diferentes variables morfométricas de cada célula.

Figura 20. Distribución de Segmentos Dendríticos



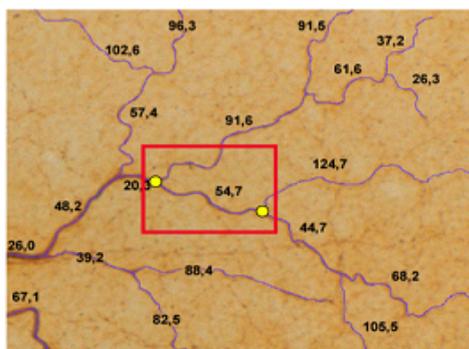
Ejemplos de métodos clásicos de determinación de la orientación y distribución de los segmentos dendríticos. A) Método de las esferas concéntricas de Sholl. El soma de la célula se centra una serie de círculos de radio ascendente y así se calculan el número de ramificaciones y terminales dendríticos así como su la distancia desde el soma. B) Método de representación gráfica de las longitudes de las ramificaciones dendríticas de la misma neurona. C) Esquema del análisis topológico de los segmentos dendríticos de la célula dibujada en A con los segmentos dendríticos ordenados y numerados en función de su distancia desde el soma (orden centrífugo) o desde su extremo terminal (orden centrípeta)(Climent y Fernández 2002).

El primer paso fue la calibración del sistema, y la adquisición de los contornos del cuerpo célula y de su árbol dendrítico (perímetro convexo del área dendrítica). A continuación cada una de las dendritas fue trazada manualmente con ayuda de una tableta digitalizadora (Calcomp, Drawing Slate II) conectada al ordenador, que registraba de forma automática las coordenadas del trazo. Cada vez que se encontraba un punto de ramificación o un extremo libre, este era marcado directamente introduciendo desde el teclado un código numérico. Este procedimiento permite digitalizar fácilmente y de forma fiable y reproducible, las coordenadas de continuación, las coordenadas de ramificación y las coordenadas de terminación de cada uno de los procesos dendríticos.

A partir de estos datos es posible calcular de forma automática el número de ramificaciones, número de bifurcaciones, número de procesos terminales, la longitud de los procesos dendríticos, las distancias y distribución de cada uno de los segmentos, así como diversos parámetros topológicos (ordenes de ramificación, grado topológico), y geométricos. Para ello utilizamos rutinas escritas y procesadas con MatLab®.

También se cuantificaron los índices de tortuosidad de cada segmento, que se definen como la razón entre la distancia en línea recta entre dos puntos de ramificación y su distancia real. Este parámetro varía entre 1 (cuando los segmentos son estrictamente lineales) y 0 (cuando los segmentos son muy sinuosos). Un ejemplo se presenta en la Figura 21. En este caso la distancia real entre los dos puntos que aparecen en el recuadro rojo (que se calcula automáticamente conforme vamos dibujando la dendrita) es de $54,7 \mu\text{m}$, mientras que la distancia lineal entre esos mismos dos puntos (calculada posteriormente, a partir de las coordenadas x,y , de los puntos) es de $49 \mu\text{m}$, por lo que el índice de tortuosidad de este segmento en concreto es de $0,899$. El programa que hemos diseñado calcula de forma automática los índices de cada segmento, así como los promedios para cada orden de ramificación.

Figura 21. Tortuosidad.



Distancia = $54,7 \mu\text{m}$
Línea Recta = $49,2 \mu\text{m}$

$$\text{Tortuosidad} = \frac{49,2}{54,7} = 0,899$$

Con el fin de comprobar la posible variabilidad y reproducibilidad de esta metodología, algunas células fueron cuantificadas por distintas personas, repetidas veces - al menos 5 cada célula- y se realizó un análisis cuantitativo de la variabilidad de las medidas obtenidas.

Como medida adicional de la complejidad del árbol dendrítico se utilizó la dimensión fractal utilizando los algoritmos de "Box-counting" y "Sand-box" (Fernández et al. 1992; Fernández et al. 1994; Jelinek y Fernández 1998; Fernández et al. 1999; Fernández y Jelinek 2001). Para confirmar la estratificación de algunas de las células, éstas fueron reconstruidas tridimensionalmente utilizando el programa Rotater 5.2 (Craig Kloeden, <http://raru.adelaide.edu.au/rotater/>) (Ver Figura 19).

CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS CÉLULAS IMPREGNADAS

Algunas de las retinas empleadas en este trabajo habían sido impregnadas por el método de Golgi e incluidas en resina epoxi hacia algún tiempo. Por todo ello una primera fase de nuestra investigación consistió en ajustar las técnicas a utilizar al caso de la retina humana y en particular al caso de las retinas incluidas con anterioridad. De una manera resumida los principales pasos fueron:

DISECCIÓN DE LAS CÉLULAS

Después de su estudio y una vez obtenidos los dibujos, con la ayuda de una lupa binocular y un bisturí oftalmológico se tallaron muestras de entre las preparaciones de Golgi de retina incluyendo las células a estudiar. Para llevar a cabo esta aparentemente sencilla operación, hubo que afrontar diversas dificultades.

Corte

Debido al reducido tamaño de la muestra y a la electricidad estática del plástico utilizado en la inclusión, algunas muestras saltaban fácilmente. Para evitarlo decidimos fijar el portaobjetos conteniendo la muestra a una placa de petri con cinta adhesiva transparente, de forma que la muestra pudiera verse a la lupa y quedara pegada. Una vez tallada sólo había que despegarla cuidadosamente.

Elección del tamaño de las muestras para reincluir

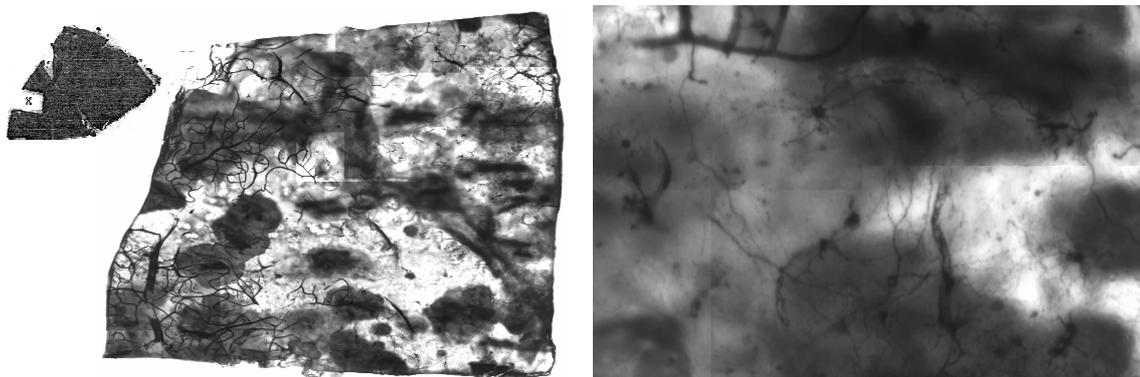
En un primer momento se pensó en restringir el tamaño de la muestra a la célula clasificada y el tejido circundante, pero con cierta frecuencia el tejido se fragmentaba separándose las capas de la retina.

Con el propósito de optimizar el procedimiento se sometieron las retinas a la temperatura de polimerización de las muestras y/o a una cámara de vacío. Sin embargo los resultados no fueron del todo satisfactorios. Tras varios intentos, se consideró aumentar el tamaño de las muestras y utilizar un bisturí oftálmico, de este modo, si se agrietaban los bordes, disminuía el riesgo de que se rompiera la célula a estudiar. Esta solución dio como resultado muestras en las cuales aparecían numerosas células teñidas y por tanto era preciso un estudio minucioso para poder identificar de nuevo y sin dudas las células de interés que habían sido previamente caracterizadas en los estudios sobre retinas aplanadas.

IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE INTERÉS

Una vez talladas las muestras se dibujaron con ayuda de la cámara clara las secciones marcando en ellas los núcleos de cada una de las células y anotando la distancia real a cada uno de los extremos. Además se hizo una reconstrucción tridimensional de cada una de las muestras a partir de imágenes tomadas secuencialmente con el microscopio, con la ayuda del programa ImageJ.

Figura 22. Reconstrucción Muestras



Diferentes niveles de detalle de la reconstrucción de las muestras de estudio. De izq. a der. Esquema de la zona de la retina donde se tomo la pieza a reincluir. Reconstrucción de la muestra mediante fotografías vista a pequeño aumento. Detalle a más aumento de la zona central.

REINCLUSIÓN

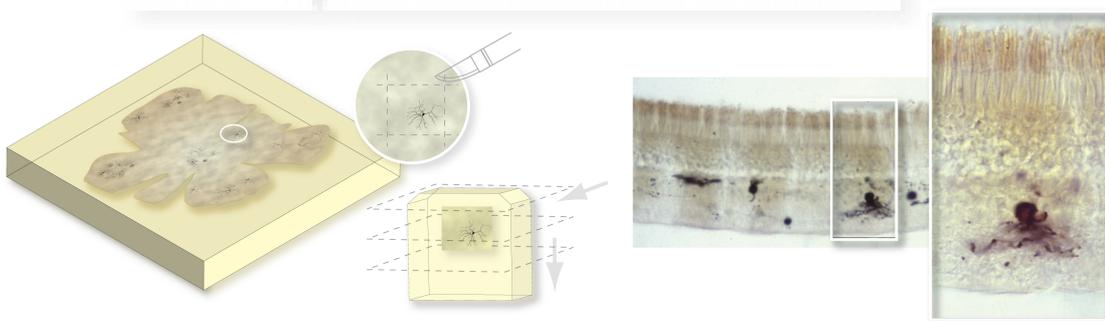
Después de talladas e identificadas, las muestras con las células de interés se pegaron sobre el lateral de un bloque de EPON en el que se había extendido una finísima capa de resina nueva con la ayuda de un palillo, dejando caer las piezas sobre el bloque con unas pinzas para evitar la formación de burbujas.

En algunos casos se utilizó pegamento de contacto en lugar de EPON. Este procedimiento presentó ciertas ventajas y algunos inconvenientes. Por ejemplo el pegamento polimeriza antes y el tejido tiene menos probabilidades de curvarse, sin embargo se crea una nueva fase entre el tejido y el bloque, que presenta una dureza distinta y que puede influir en resultado del corte posterior.

CORTES TRANSVERSALES

Tras la re-inclusión se hicieron cortes transversales de 25 micras de grosor con ayuda de un micrótomo de rotación (Micron HM360). Este grosor demostró ser el más adecuado para conseguir que el corte pudiera incluir toda o gran parte de la célula en la misma sección. A mayor grosor la dureza de la resina se volvía más frágil.

Figura 23. Reinclusión y Corte



Esquema de la identificación, reinclusión, corte grosero (25micras) y localización de una célula del estudio.

Para facilitar los cortes y evitar que se rompieran, la superficie de los bloques se calentó con una plancha especial. Posteriormente, los cortes se recogieron sobre cubres de plástico numerados, se aplanaron y se dejaron polimerizar sobre una gota de EPON812.

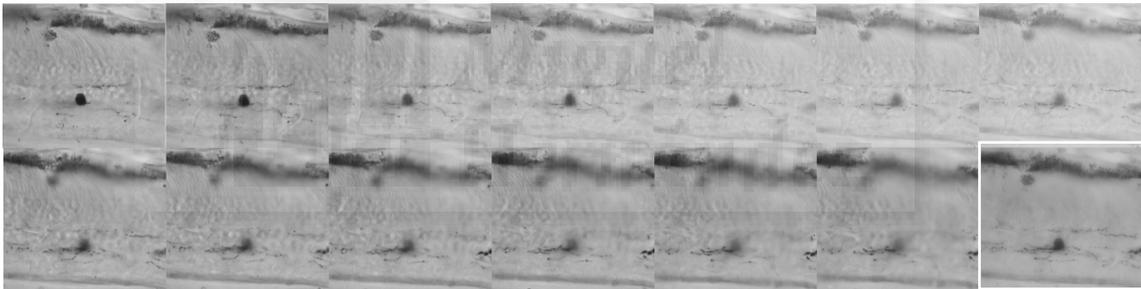
Con la ayuda de las coordenadas se calcularon que secciones debían incluir cada una de las células seleccionadas, se dibujaron y/o fotografiaron dichas

secciones y se tomaron de nuevo medidas de la distancia a los extremos. Una vez contrastadas todas las distancias y con ayuda de los dibujos y fotografías se identificaron de nuevo las células de interés y sus ramificaciones en la capa plexiforme interna.

REORIENTACIÓN Y CORTES SEMIFINOS

Las secciones que contenían las células de interés, se reincluyeron de nuevo sobre bloques de EPON812 retirando uno de los cubreobjetos y pegando la muestra a la superficie limada del bloque, por el mismo procedimiento descrito anteriormente. A continuación se obtuvieron cortes semifinos seriados (0.5 μm de espesor) de las células de interés, que fueron recogidos sobre portas especiales para técnicas inmunocitoquímicas recubiertos de Teflón (Multiwell glass Teflon[®] coated slides). Solamente aquellas secciones que contenían los cuerpos celulares de las células seleccionadas (habitualmente 10-12 secciones) fueron procesadas posteriormente.

Figura 24. Cortes transversales.



Fotografías de una célula de interés a diferentes profundidades de foco en la sección de 25 micras de grosor junto a una fusión óptica de todas ellas (enmarcado)

TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

Con el fin de eliminar el Epon 812 utilizamos una solución de Etóxido de Sodio disuelto en Alcohol absoluto (1:1). Los portaobjetos fueron mantenidos en esta solución durante 20 minutos, a temperatura ambiente, antes de someterse a varios lavados en alcohol absoluto (3 x 5 minutos). Posteriormente fueron lavados en agua desionizada y se secaron aplicándoles aire frío, tras lo que se comprobó que la resina había sido correctamente eliminada. Para reducir los posibles efectos de la osmificación sobre las reacciones inmunocitoquímicas utilizamos una solución de Metaperiodato de Sodio al 1% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Los portas fueron sumergidos en esta solución durante 20 minutos. Tras varios lavados en agua desionizada, las secciones fueron incubadas durante

1 hora en una solución conteniendo 1% de suero normal de cabra (G-9023 Sigma, MO, USA) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Esta misma solución fue utilizada para la disolución de todos los anticuerpos.

Los anticuerpos primarios fueron donados generosamente por el Dr. Robert E. Marc (John Moran Eye Center, Universidad de Utah, Salt Lake City, Estados Unidos). La incubación en los anticuerpos primarios tuvo lugar durante 18 horas a 4° C en una cámara húmeda. Secciones consecutivas fueron procesadas para cada uno de los anticuerpos primarios (anti-GABA YY100 1:1000; anti-glicina G100 1:1000, anti-L-glutamato E100 1:1000, y anti-aurina TT100 1:1000). Tras los lavados en tampón fosfato (PB) 0,1 M a pH 7,4 y Agua destilada, se secaron con aire frío y se mantuvieron en incubación en los anticuerpos secundarios (anticuerpos biotinilados anti-conejo a una dilución 1:100, de Jackson ImmunoResearch Inc.) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la visualización de la reacción, tras el lavado las secciones fueron incubadas durante 4-6 horas con anticuerpos anti-estreptoavidina marcados con Cy3 (PA 43001 Amersham, England) a una dilución 1:1000. Finalmente los portas fueron lavados de nuevo y montados en un medio de montaje adaptado para técnicas inmunofluorescentes (Shandon Immu-Mount™).

A modo de control algunos cortes fueron procesados de igual forma, pero omitiendo la incubación del primer anticuerpo. Este procedimiento eliminó toda la inmunoreactividad.

Los resultados se analizaron con la ayuda de un microscopio Confocal Leica TCS NT. Al escanear la imagen con el láser, es posible visualizar al mismo tiempo por diferentes canales la imagen de transmisión y la imagen de fluorescencia resultante de la inmunocitoquímica de esa misma sección. Superponiendo las distintas imágenes con ayuda de un programa de procesamiento de imágenes (Photoshop®) comprobamos si la célula de interés tenía o no un marcaje positivo para cada uno de los anticuerpos.

CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD

Con ayuda del NIH-image y rutinas diseñadas específicamente diseñadas por nosotros se invirtieron y normalizaron las imágenes de fluorescencia con una escala de 0-255 niveles de grises. A continuación se cuantificaron comparativamente los porcentajes de tinción con respecto del fondo para cada una de las células de estudio y todas las circundantes positivas para alguno de los anticuerpos testados. A partir de esos datos se calculó también el porcentaje de células positivas para cada aminoácido estudiado.

PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Los parámetros cuantitativos y cualitativos de cada una de las células fueron introducidos en una base de datos y procesados mediante técnicas univariantes y multivariantes (De Juan et al. 1992; Fernández et al. 1994; Kolb et al. 1994; Fernández et al. 2000) con ayuda del paquete estadístico SPSS.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO UNIVARIANTE

Con el fin de analizar los distintos parámetros obtenidos en diferentes células de la retina, tipos celulares de amacrinas o ganglionares, y diferentes especies, utilizamos técnicas estadísticas paramétricas (T -test de Student, Coeficientes de correlación, contraste Chi-cuadrado y Análisis de la varianza) y no paramétricas (Anova no paramétrico, test de Kolmogorov-Smirnoff). Dada la amplia difusión de estas técnicas pensamos que no es necesario comentar nada acerca de las mismas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Brevemente utilizamos técnicas de análisis de conglomerados jerárquico y análisis discriminante para identificar grupos relativamente homogéneos de células amacrinas.

ANÁLISIS FACTORIAL

Intenta explicar, según un modelo lineal, un conjunto extenso de variables observables mediante un número reducido de variables hipotéticas o factores. Se asume que las variables originales pueden ser expresadas como combinaciones lineales de estos factores más un coeficiente residual que expresa el modo en que la variable es independiente de las otras variables. Por ejemplo un modelo de dos factores de los datos anteriores asumiría que:

$$\begin{aligned} X_1 &= a_{11} * F_1 + a_{12} * F_2 + c_1 \\ X_2 &= a_{21} * F_1 + a_{22} * F_2 + c_2 \\ X_3 &= a_{31} * F_1 + a_{32} * F_2 + c_3 \end{aligned}$$

donde a_{ij} serían constantes, F_1 y F_2 los factores y c_i representarían la variación en X_i que es independiente de las otras variables X . Las variables observables y los factores se relacionan siempre a través de un modelo factorial *lineal*.

En el análisis factorial se parte de los siguientes supuestos:

- El número de factores obtenidos debe ser menor que el de variables observables.
- La totalidad de los $m+n$ factores son variables incorrelacionadas, pues se pretende que la parte de la variabilidad de una variables explicable por un factor, no tenga relación (en sentido lineal) con los demás factores.

Aunque el Análisis Factorial puede ser utilizado con distintos fines tales como construir índices para ser utilizados como nuevas variables en posteriores análisis, o comprobar hipótesis acerca de la estructuración de variables en un número esperado de factores, nosotros lo hemos utilizado para la exploración y detección de patrones de variables, con el objeto de descubrir posibles nuevos conceptos y obtener una reducción de los datos.

ANÁLISIS DE GRUPOS O CONGLOMERADOS JERÁRQUICOS ("CLUSTER ANALYSIS").

Este procedimiento intenta identificar grupos relativamente homogéneos de casos (o de variables) basándose en las características seleccionadas, mediante un algoritmo que comienza con cada caso (o cada variable) en un conglomerado diferente y combina los conglomerados hasta que sólo queda uno.

El análisis de conglomerados jerárquico utiliza un algoritmo que comienza con cada célula en un conglomerado diferente y posteriormente va combinando los conglomerados hasta que sólo queda uno. Las medidas de distancia o similitud se generaron preferentemente utilizando el método de Ward.

El análisis de grupos es una forma de encontrar lo que podríamos denominar grupos matemáticamente verdaderos u objetivos. A la vez también puede ser utilizado para reducir el número de datos. Por otra parte si se descubren grupos inesperados puede hacer que se encamine la investigación a un examen más exhaustivo de los mismos. En nuestro estudio hemos utilizado el *Análisis de Conglomerados Jerárquicos*, para agrupar las diferentes variables en grupos homogéneos.

ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

Resulta útil para las situaciones en las que se desea construir un modelo predictivo para pronosticar el grupo de pertenencia de un caso a partir de las características observadas de cada caso. Esto puede utilizarse por ejemplo para pronosticar el grupo de pertenencia de una determinada célula amacrina a partir de sus diferentes parámetros morfométricos y de su contenido en aminoácidos excitatorios e inhibitorios o para conocer si las diferentes células de nuestro estudio pueden separarse sobre la base de las diferentes medidas que hemos considerado.

El procedimiento genera una función discriminante (o un conjunto de funciones discriminantes, para más de dos grupos) basadas en combinaciones lineales de las variables predictoras que proporcionan la mejor discriminación posible entre los grupos (Fernández et al. 1994; Fernández et al. 2000). El objetivo matemático de este análisis es "pesar" y combinar linealmente las variables discriminantes para forzar a los grupos a ser lo más diferentes posibles. Las funciones se generan a partir de una muestra de casos para los que se conoce el grupo de pertenencia; posteriormente, las funciones pueden ser aplicadas a nuevos casos que dispongan de medidas para las variables predictoras pero de los que se desconozca el grupo de pertenencia.

Los objetivos de esta técnica son: el análisis y la clasificación. El análisis proporciona las herramientas para la interpretación de los datos y nos explica el grado de éxito con que una variable discriminante actúa discriminando cuando se combina con otras variables. La clasificación, nos permite agrupar los casos atendiendo a las características discriminantes.

RESULTADOS

De entre todas las retinas humanas procesadas por el método de Golgi (más de 50 si consideramos las obtenidas de otros estudios) se seleccionaron aquellas que habían sido mejor impregnadas. Estas retinas fueron estudiadas en busca de células amacrinas tomando como modelo, la descripción morfológica realizada por la profesora Helga Kolb (1992).

Aquellas retinas que antes del procesamiento y fijación mostraron signos patológicos o de mala conservación fueron descartadas del estudio. Aun así, algunas zonas periféricas de las retinas empleadas mostraron signos de degeneración retiniana. El método de Golgi utilizado permitió discriminar con facilidad zonas periféricas con puntos más claros, más o menos elipsoides, en las que parecen haber desaparecido parte o todas las capas de la retina (Fig. 25). En estas zonas de degeneración las células teñidas mostraron formas atípicas en las que las prolongaciones parecen dirigirse hacia las zonas no dañadas del tejido adyacente. Se conoce una degeneración similar con el nombre de "Cobblestone degeneration" y según se ha descrito, es un adelgazamiento u atrofia corioretinal primaria, frecuente (30%) una vez pasados los 20 años. Por tanto el hecho de que nuestras retinas muestren esta degeneración, no parece ser un signo indicativo del mal estado de las muestras sino un proceso normal asociado a la edad. Al escoger las células de estudio se eligieron áreas alejadas lo más posible de las zonas de degeneración.

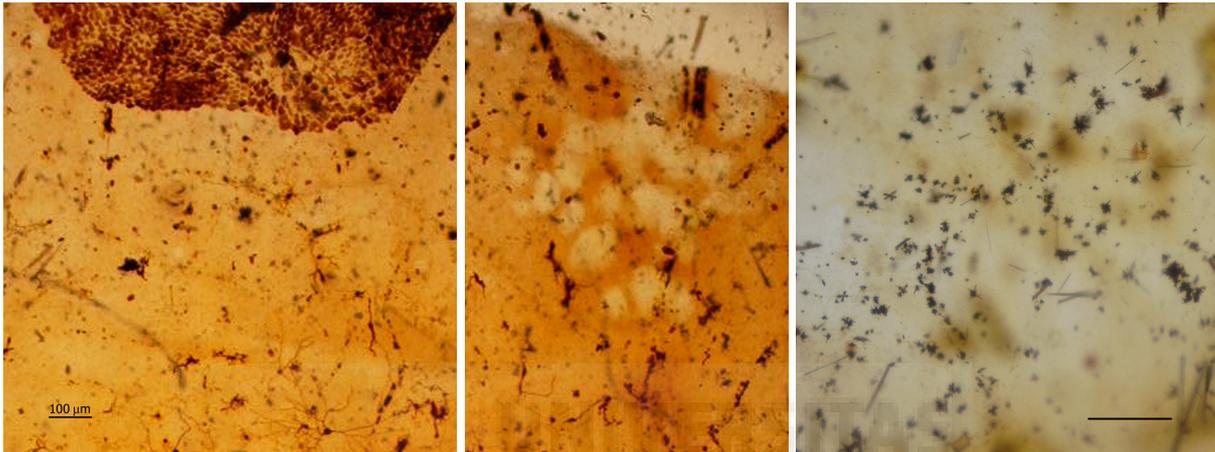
MARCAJE, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS AMACRINAS

ELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE IMPREGNACIÓN.

Procesar el tejido inmerso directamente en las soluciones de cromación e impregnación del método de Golgi, supuso una mayor exposición de las capas superficiales. Como resultado, se obtuvo una intensa tinción superficial que dificultó la observación de las capas más internas.

En el método escogido en este trabajo, el lavado con nitrato de plata antes de la impregnación del tejido permite evitar algunos de los precipitados de plata superficiales. Además, al interponer entre la solución y la muestra un par de filtros de diferente tamaño de poro (whatman #2 y #50) sujetos por portaobjetos a modo de sándwich, se consigue una impregnación más o menos uniforme de todas las capas, evitándose el oscurecimiento excesivo de las capas superficiales.

Figura 25. Retina Periférica



En la imagen de la izquierda la zona oscura es un resto de epitelio pigmentario, en la zona colindante no hay casi células impregnadas y hacia el borde inferior aparecen algunas células amacrinas. En el cuadro central se puede ver un ejemplo de degeneración periférica. La imagen de la derecha muestra un ejemplo a mayor aumento de una zona con restos de vítreo donde aparecen numerosos cristales y precipitados.

Un aspecto crítico para una correcta impregnación es eliminar, en la medida de lo posible, todos los restos de humor vítreo. En nuestras preparaciones los restos de humor vítreo aparecieron acompañados de numerosos precipitados. En estas zonas solamente se tiñeron algunas horizontales y además el número de células correctamente teñidas en las zonas adyacentes fue considerablemente menor. Por ello consideramos muy importante retirar el máximo posible de vítreo durante la disección y preparación de las retinas.

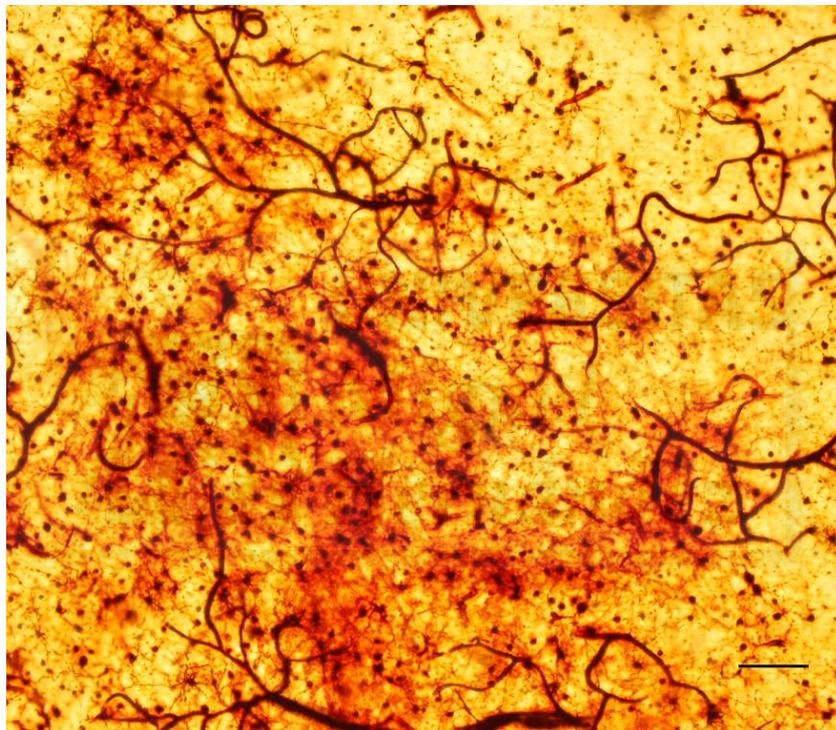
APARIENCIA GENERAL DEL MÉTODO DE GOLGI EN LA RETINA HUMANA

En las retinas correctamente impregnadas, el fondo de la preparación resulta de un color marrón amarillento cristalino en el que destacan las células teñidas oscuras, más o menos aisladas en las capas internas y como una red enmarañada a nivel de las horizontales y fotorreceptores. También se impregnan intensamente los vasos sanguíneos, sobretodo los de gran calibre. Aparecen

restos del epitelio pigmentario en las zonas más periféricas y precipitados, sobre todo donde no se pudo eliminar el vítreo por completo (ver Fig. 25).

Las retinas no fueron impregnadas de manera homogénea. En general se observaron zonas de impregnación más densa donde se tiñen sobrepuestas células de varias capas de la retina. Aunque el número y localización de esas zonas varía de una muestra a otra, no las encontramos a nivel de la fovea. En cualquier caso, el proceso por el cual el método de Golgi tiñe unas zonas y otras no, sigue siendo motivo de estudio.

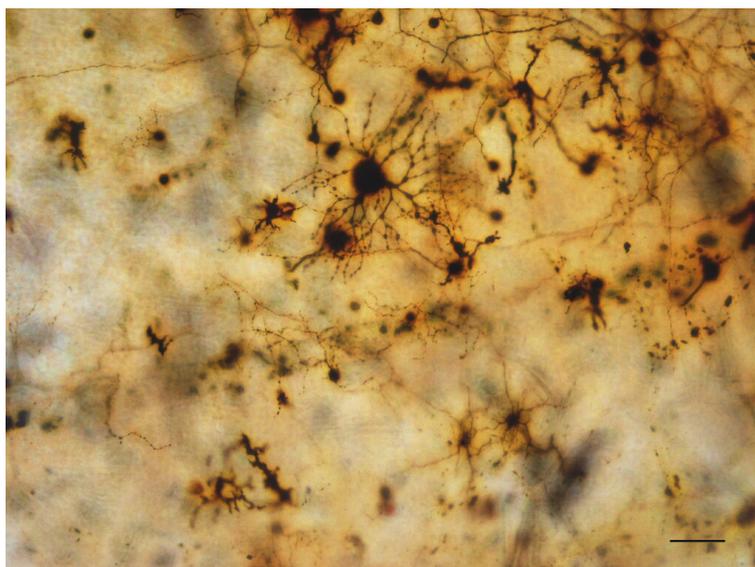
Figura 26. Vista General



Retina entera teñida con Golgi donde se ha enfocado la capa más externa de la retina. Gran parte de los vasos aparecen impregnados, así como los núcleos de muchos de los fotorreceptores, horizontales y parte del plexo de la capa plexiforme externa. A simple vista, la impregnación no es homogénea, ni sigue ningún patrón regular. Calibración 100 μ m.

Vistas a mayor aumento, las retinas fueron parcialmente transparentes y las proyecciones de las células localizadas en planos de foco próximos aparecen entremezcladas con frecuencia. Las células impregnadas correctamente se distinguen como si hubieran sido dibujadas, pudiéndose observar sus particularidades como varicosidades o espinas y seguir sus dendritas e incluso en muchos casos su axón. En la Figura 27, se muestra un ejemplo de retina humana impregnada por el método de Golgi, incluida en Epon y montada sobre un portaobjetos. Se ha realizado una superposición de varios planos de foco de la preparación para mostrar las diferentes capas de la retina.

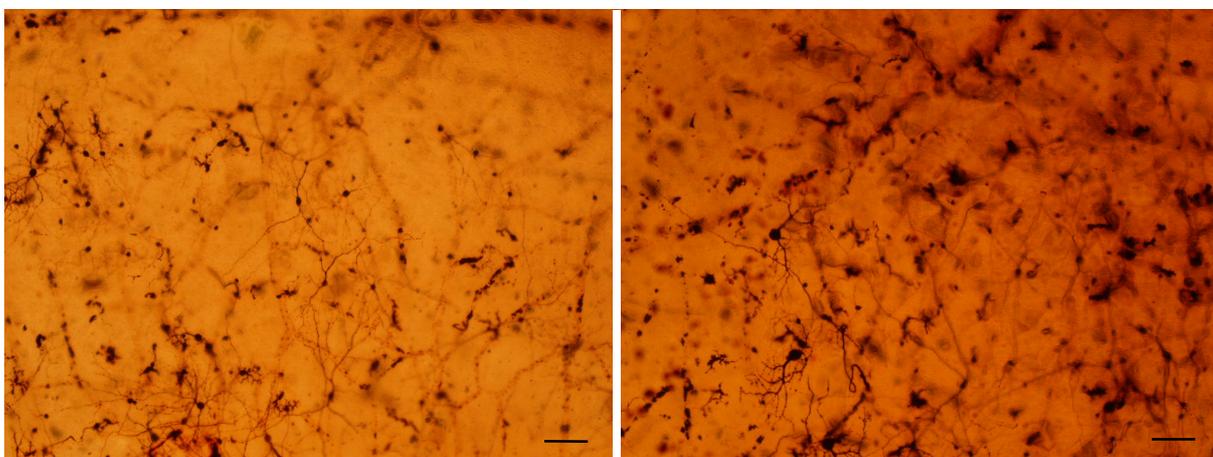
Figura 27. Detalle



Detalle del resultado de la técnica de Golgi sobre retina humana. Aparecen impregnadas una célula ganglionar, varias terminaciones de células bipolares, amacrinas y horizontales, fibras, vasos sanguíneos y hasta célula gliales. Calibración 25 μ m.

La esfericidad natural de la retina implica que aun pareciendo aplanada, cuando observamos toda la extensión de retina al microscopio podemos ver que en un campo cualquiera de la preparación pueden existir ondulaciones en el tejido, que hacen que en un mismo plano de foco puedan aparecer enfocadas dos células que en realidad están en capas separadas (Fig. 28) Estas irregularidades dificultaron en ocasiones la identificación de las células de interés. Cuantas más medidas relativas a la localización del soma y las ramificaciones se tomaron, más fácil y exacto resultó el cálculo de la estratificación dendrítica y su identificación.

Figura 28. Esfericidad



Las imágenes muestran como, a pesar de tratarse de un mismo plano de foco, sólo en algunas zonas se pueden apreciar con detalle las células amacrinas, mientras que en el resto aparecen desenfocadas. Calibración 100 μ m.

MUESTREO DE LAS CÉLULAS AMACRINAS

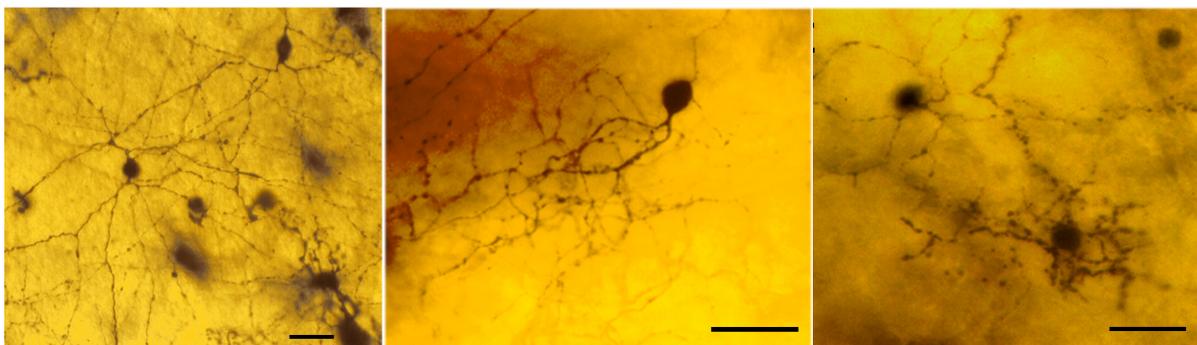
Poder observar todas las capas y células de la retina en su conjunto nos permitió utilizar estas referencias para establecer comparaciones (Fig. 27-28). Las medidas de la profundidad relativa del soma y las dendritas respecto al resto de capas de la retina en cada uno de los puntos fueron importantes para establecer el patrón de estratificación de las células estudiadas. Además, al estudiar retinas enteras y extendidas no fue necesaria la fragmentación de las muestras, lo que permitió visualizar las células completas y sin necesitar reconstrucciones posteriores.

IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS AMACRINAS

Las preparaciones en plano nos permitieron distinguir con facilidad las células amacrinas del resto de las células de la retina. Algunos ejemplos se presentan en la Figura 29. En el caso de las amacrinas desplazadas la estratificación de las dendritas respecto al soma fue fácil de reconocer en las retinas extendidas. Sin embargo, las bipolares pueden confundirse con pequeñas amacrinas, especialmente si la tinción no incluye toda la célula. Su diferenciación requirió estudiar detenidamente las características de su campo dendrítico e incluso realizar reconstrucciones tridimensionales (ver Fig. 19).

El tamaño del soma también sirvió para diferenciar las amacrinas de las otras células, sobretodo en el caso de las células ganglionares que suelen tener núcleos de mayor tamaño que las células amacrinas. Este criterio también fue útil en ocasiones para diferenciarlas de las células bipolares, que en general presentan núcleos de menor tamaño (ver Fig. 27).

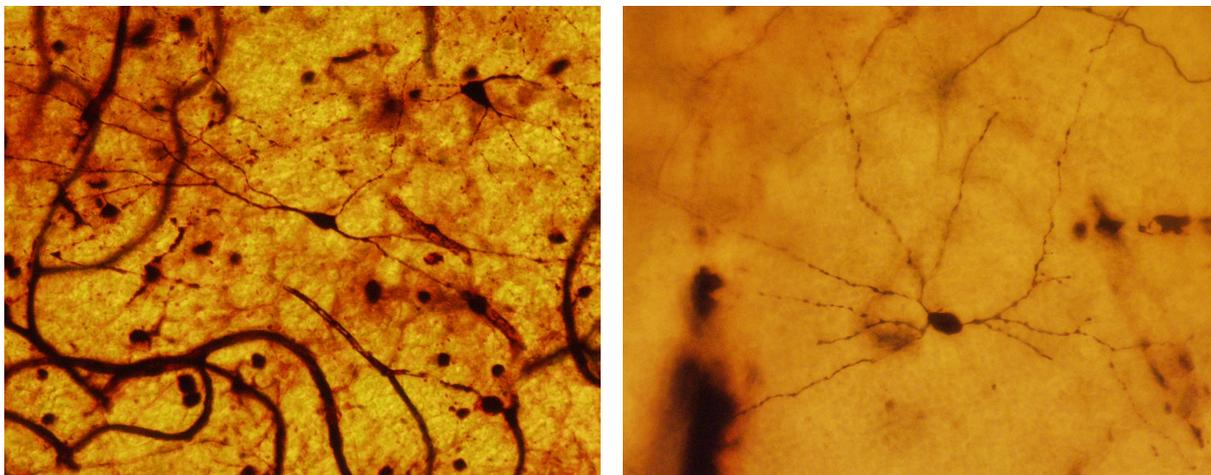
Figura 29. Células Amacrinas



Diferentes tipos de células amacrinas de la retina humana tras la impregnación con el método de Golgi. Calibración 25 μ m

El estudio de la apariencia de las ramificaciones como indicador del grado de impregnación de las amacrinas permitió elegir aquellas células que presentaron una tinción adecuada y completa en toda su extensión.

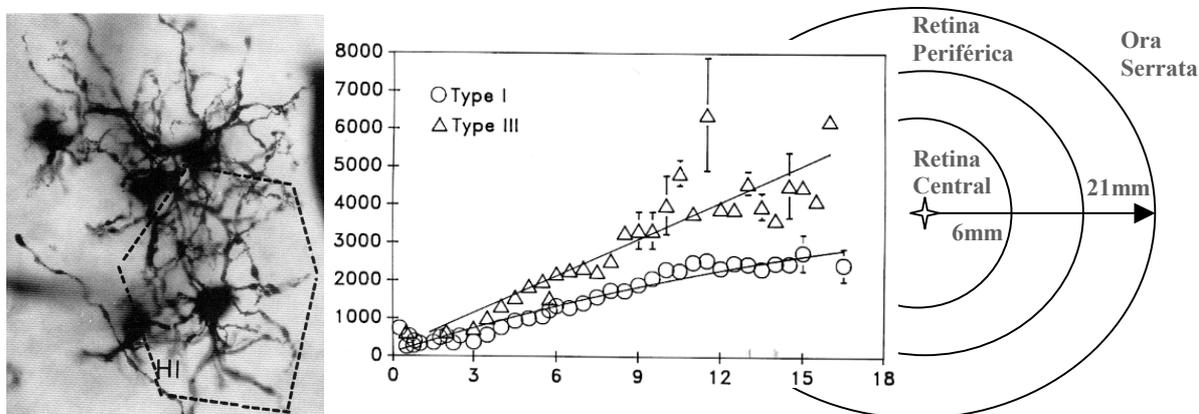
Figura 30. Impregnación



Diferentes ejemplos de impregnación por el método de Golgi.

No siempre fue posible obtener retinas completas. En estos casos, cuando se encontraron en ellas células correctamente impregnadas se utilizó el tamaño del soma y el campo dendrítico de las células horizontales para estimar la excentricidad de estas células. Las células horizontales, aparecen con frecuencia óptimamente teñidos en nuestras preparaciones gracias a ello, se pudo trazar el perímetro del campo dendrítico de la célula horizontal del tipo HI más próxima a la célula y estimar la excentricidad en base a datos previamente publicados que relacionan el incremento del área del campo dendrítico de las células horizontales con el aumento de la excentricidad (Kolb et al. 1992).

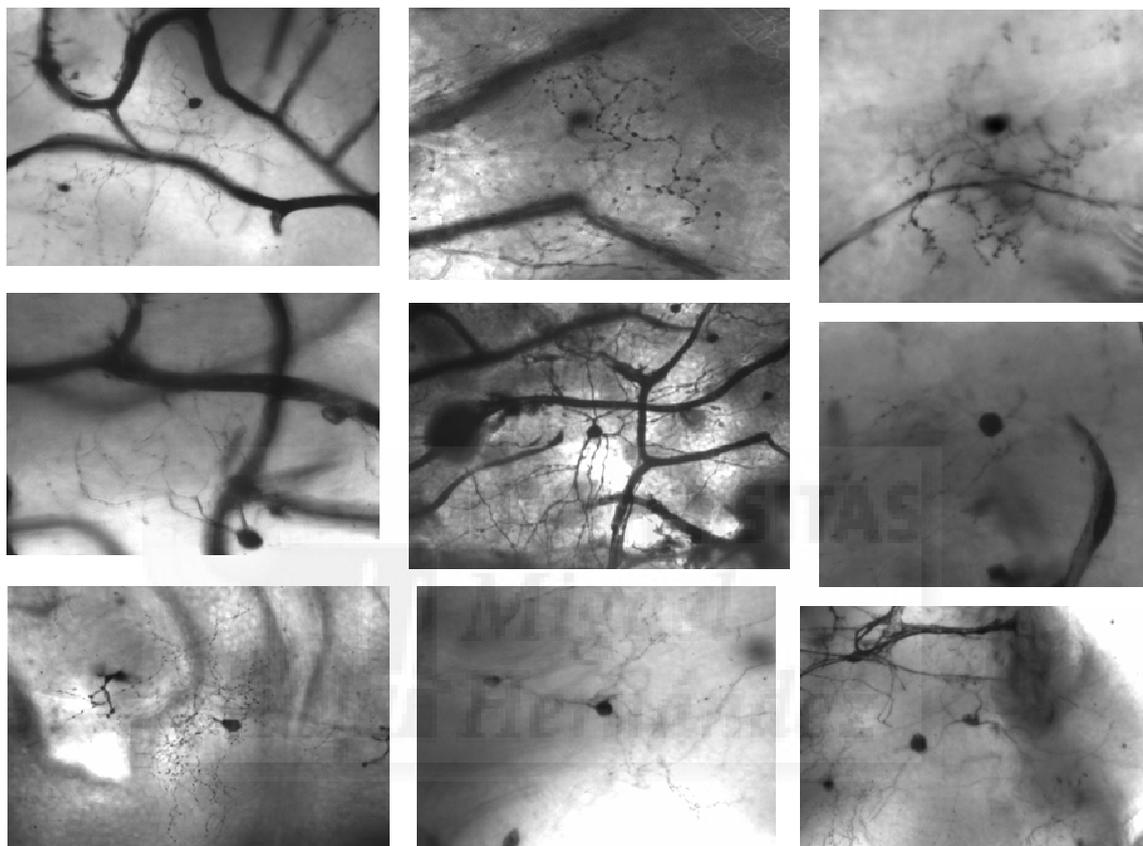
Figura 31. Excentricidad



La gráfica central relaciona el área dendrítica de dos tipos de horizontales con su excentricidad. A la izquierda se muestra un ejemplo de HI (modificadas de Kolb y cols. 1992) A la derecha se muestra un esquema de las zonas de la retina respecto a la fovea.

En general fue más fácil encontrar células correctamente teñidas a una excentricidad intermedia desde la fóvea, e incluso en la periferia. Todas las células seleccionadas en el presente estudio tuvieron una excentricidad entre 10 y 14 mm (*ver Fig. 31*).

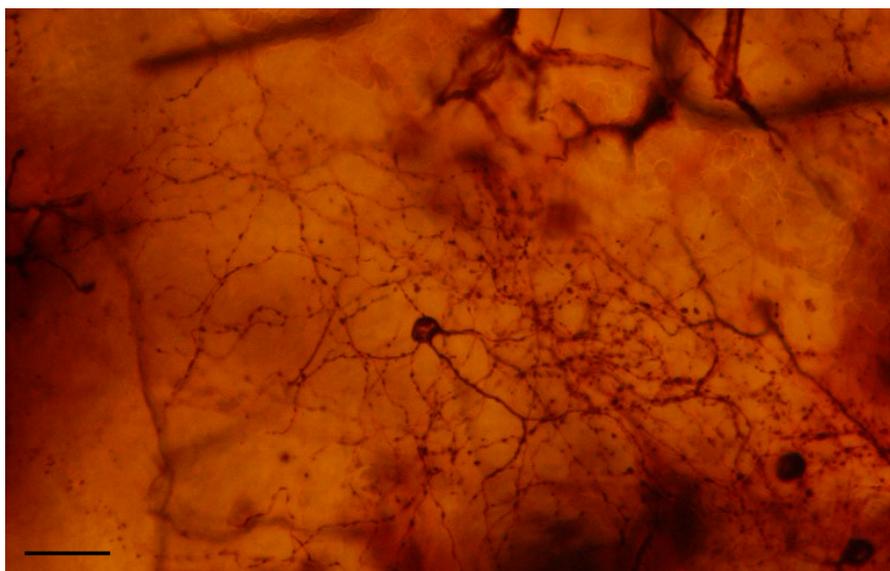
Figura 32. Selección de Células Amacrinas



Fotografías al microscopio óptico de células amacrinas encontradas en las retinas humanas a modo de ejemplo de su diversidad morfológica y dificultad de aislamiento.

A esta excentricidad intermedia, las células amacrinas teñidas mostraron cierto solapamiento entre ellas y con los vasos circundantes (Figs. 32 y 33). En este contexto se descartaron aquellas células muy próximas a una zona periférica o aquellas cuya superposición con el entorno podía suponer cierta confusión respecto a su morfología.

A pesar de haber conseguido recopilar multitud de muestras, resultó difícil encontrar células correctamente teñidas, representativas de todos los tipos de amacrinas, que tuvieran una excentricidad comparable y al mismo tiempo lo suficientemente aisladas para poder ser estudiadas. En total fueron seleccionadas y procesadas 90 células amacrinas, correctamente impregnadas y bien aisladas.

Figura 33. Solapamiento

Célula amacrina con gran nivel de entrecruzamiento dendrítico, en un área con muchas fibras y vasos teñidos. Barra calibración 50 μ m.

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS AMACRINAS

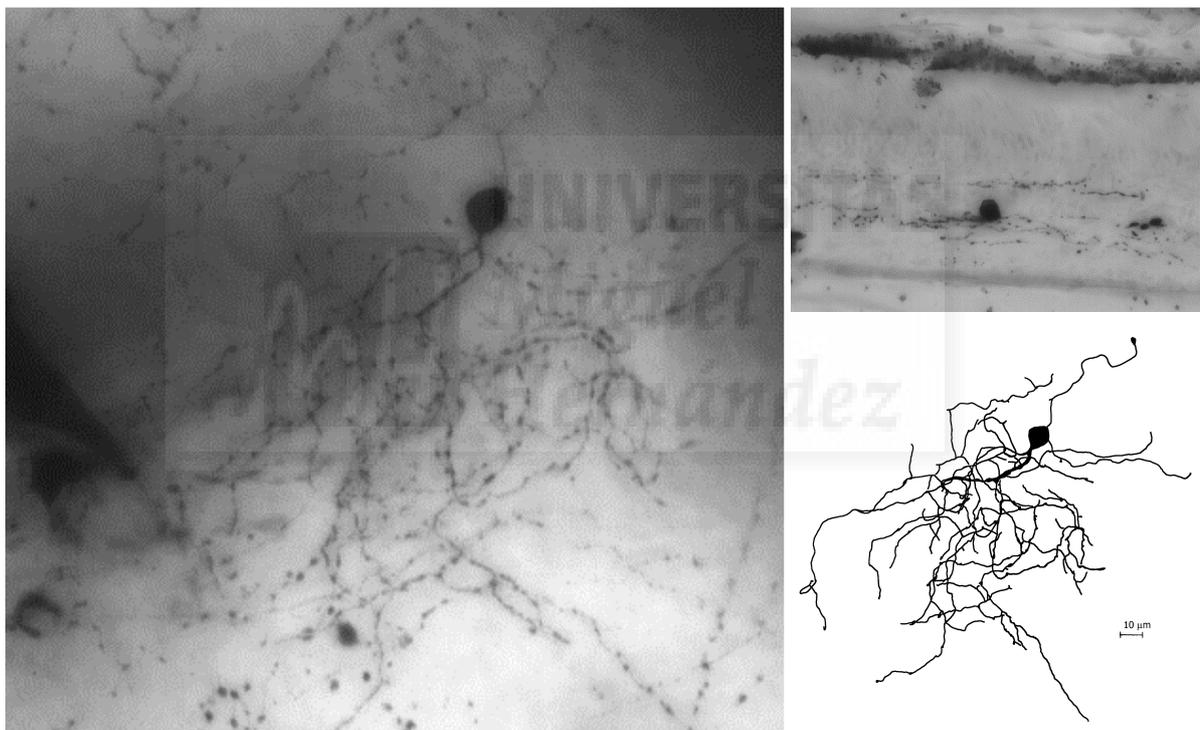
Una vez seleccionadas e identificadas como amacrinas, el primer criterio para su clasificación fue el tamaño de su campo dendrítico (Kolb, 1992). Las células amacrinas se agruparon en función del diámetro de su campo dendrítico en células de pequeño campo (small-field) 25-100 μ m, células de campo mediano (medium-field) 100-500 μ m y células de amplio campo (large-field) >500 μ m (Boycott y Kolb 1973).

Las células se clasificaron en función del estrato o estratos en el que se ramificaban mayoritariamente sus prolongaciones. En este sentido está ampliamente aceptado que la IPL puede ser dividida en cinco estratos o subcapas del mismo grosor (Famiglietti y Kolb 1976) en los cuales se ramifican los procesos de amacrinas, bipolares y ganglionares. Los dos primeros estratos 1-2, se conocen como sublámina a, mientras que los otros 3-5 forman la sublámina b. Esto divide la IPL de la retina de vertebrados en áreas de neuropilo donde células específicas se ponen en contacto y forman circuitos solamente con las células designadas para un determinado papel funcional. Así por ejemplo, la sublámina a contiene axones de bipolares que conectan con células ganglionares y dan lugar a células ganglionares de tipo centro-OFF, mientras que en la sublámina b tienen lugar las conexiones entre bipolares y ganglionares que dan lugar a células ganglionares tipo centro-ON (Nelson et al. 1978). Siguiendo este esquema muchas variedades de células amacrinas son monoestratificadas, mientras que

otras son bi- o tri- estratificadas. Cuando la amacrinas o ganglionares se ramifican a lo largo de todas las capas de la IPL, se les da el nombre de difusas. La presencia de particularidades en su estructura (varicosidades, espinas, etc.) y su apariencia general (Kolb et al. 1992), supusieron otro criterio para diferenciar un tipo de otro.

La mayor dificultad a la hora de clasificar la células amacrinas de mediano o gran campo dendrítico fue seguir sus ramificaciones a la hora de dibujarlas o cuantificarlas, ya que con frecuencia se entrecruzan unas con otras. Sin embargo el tamaño, la forma y sus estructuras dendríticas características (espinas, varicosidades, etc.) las hicieron, en general, fáciles de identificar.

Figura 34. Clasificación Morfológica



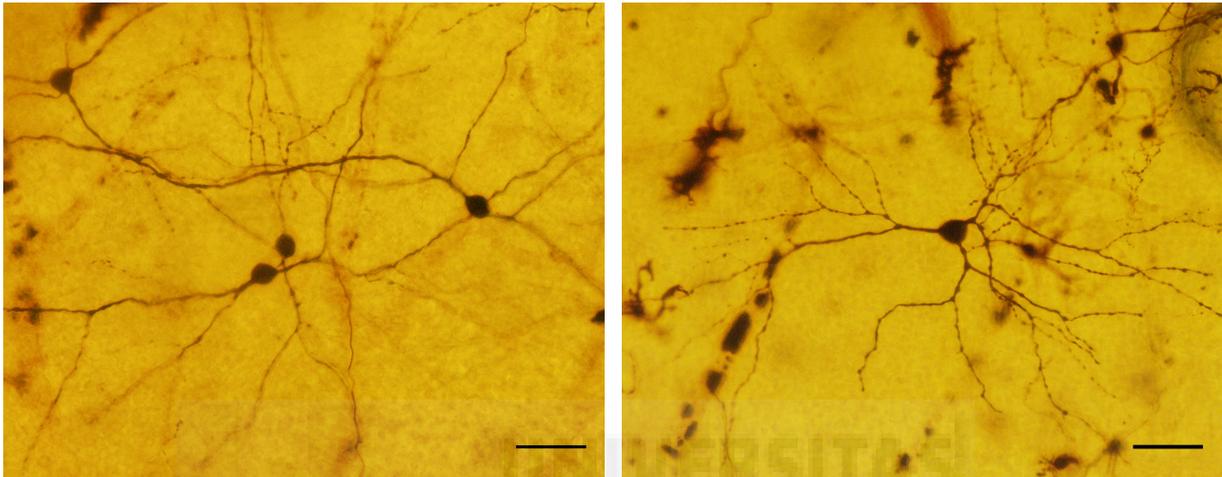
A la izquierda superposición de los planos de foco fotografiados de la preparación en plano. A la derecha arriba foto de una sección transversal a través del soma. Abajo dibujo a cámara clara de la misma célula.

Clasificar las amacrinas de pequeño campo dendrítico, presentó mayores dificultades. Se comprobó que se trataba realmente de amacrinas mediante el estudio de la profundidad relativa tanto del soma como de las dendritas en comparación con las células circundantes. Después se verificó que sus ramificaciones no terminaran bruscamente y se descartaron aquellas células en las que hubiera alguna duda.

AMACRINAS DE CAMPO DENDRÍTICO GRANDE

Se identificaron morfológicamente células de amplio campo dendrítico o "Large Field" pertenecientes a **varios tipos de Semilunar** y también células sinuosas "wavy" o **Estrelladas sinuosas "Stellate wavy"**.

Figura 35. Amacrinas Grandes y Medianas



A la izquierda varias amacrinas de campo dendrítico grande entrecruzadas correspondientes a los tipos 1 y 3 de Semilunar. A la derecha una imagen de una amacrina de campo dendrítico mediano, identificada como Arrosariada-espínosa o "spiny-varicose". Calibración 50 µm.

AMACRINAS DE CAMPO DENDRÍTICO MEDIANO

De campo mediano o "Medium Field" aparecieron algunas amacrinas, también llamadas **Supernova** (Starburst), amacrinas del tipo **Arrosariada-espínosa** (Spiny-varicose) y **Enmarañadas difusas** (Woolly diffuse).

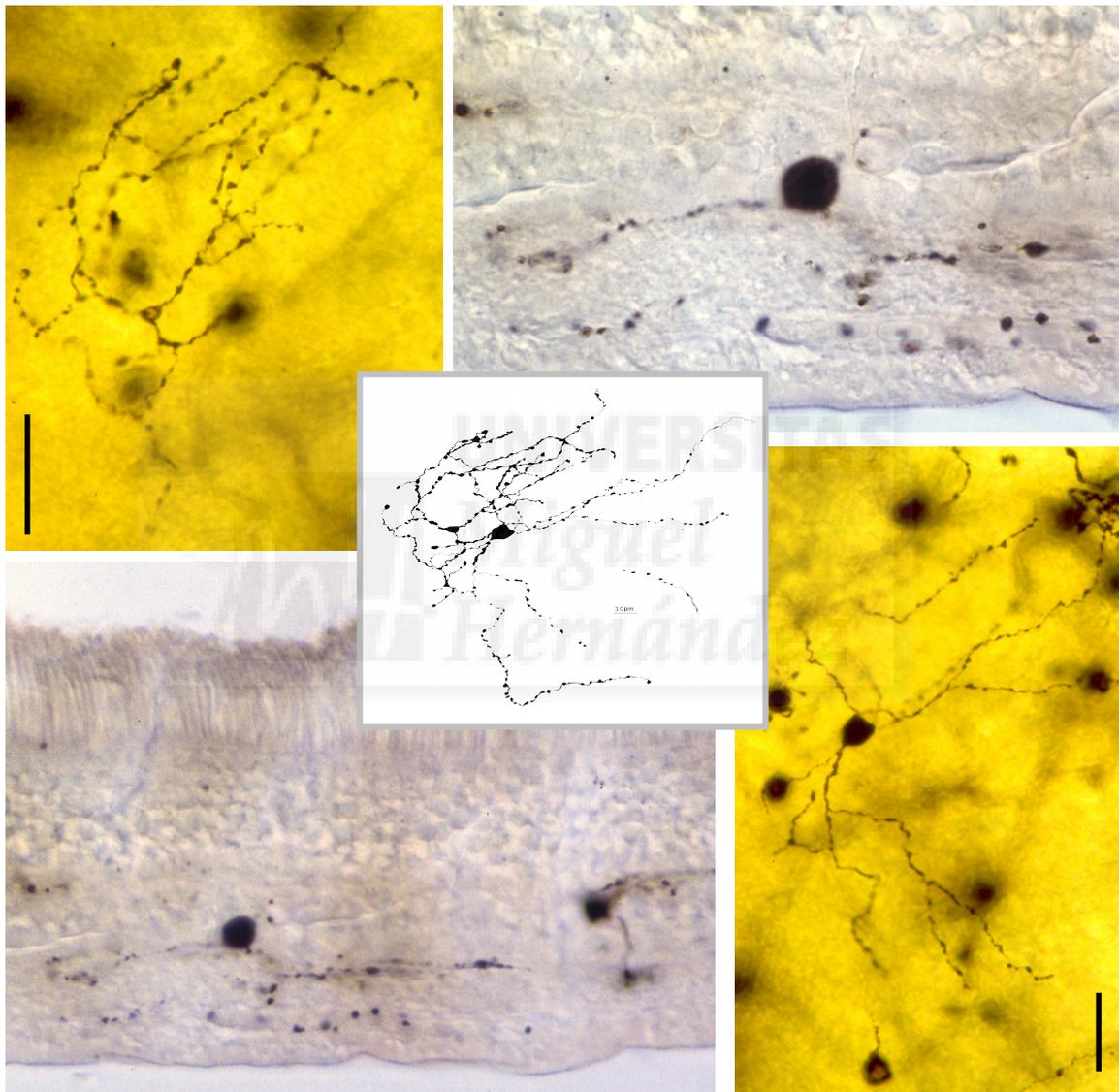
Amacrina Bistratificada Mediana o "Medium Bistratified".

Encontramos un nuevo tipo celular que no parece pertenecer a ninguno de los descritos previamente. Provisionalmente lo denominamos en base a sus características morfológicas como **Bistratificada Mediana** o "Medium bistratified".

Estas células se caracterizaron por tener un campo dendrítico de unas 130 micras y un soma de unas 9 micras a unos 10 mm de excentricidad. Del soma, situado en el borde interior de la INL, parten unas dendritas con engrosamientos regulares que se estratifican en la sublámina "a" (principalmente s2- s3) y a su

vez emiten ramificaciones que descienden hasta el límite inferior de la sublámina "b" (s4-s5). Al contrario de lo que ocurre en otros casos no existen diferencias de grosor entre unas ramificaciones y otras, aunque el plexo dendrítico de la sublámina b parece más intrincado y sus ramificaciones presentan bucles en sus extremos.

Figura 36. Amacrina Biestratificada Mediana



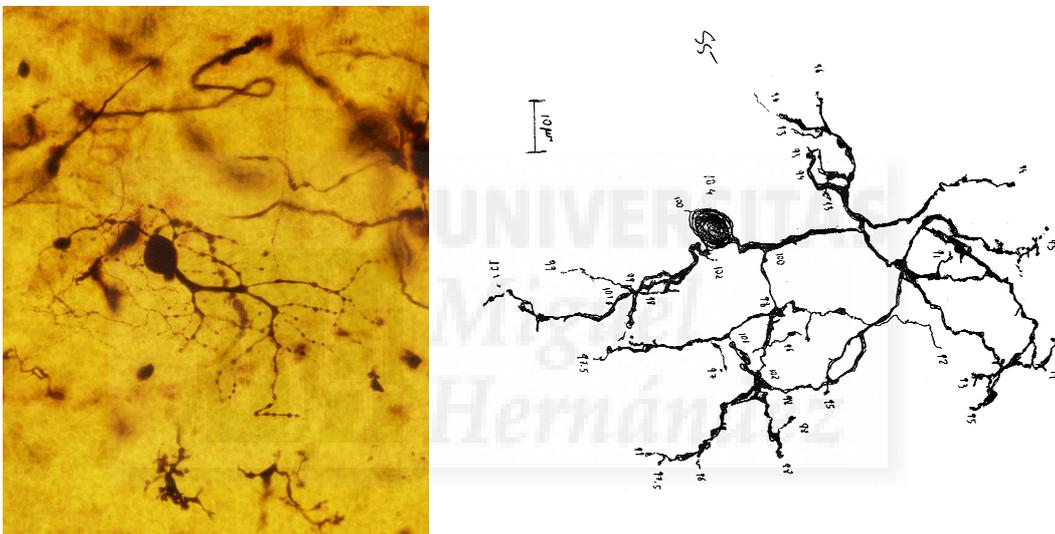
Diferentes ilustraciones de amacrinas Biestratificadas Medianas de retina humana tras la impregnación de Golgi. La imagen central corresponde al dibujo a cámara clara de una célula vista en la preparación aplanada. Las fotografías muestran los planos de foco de su estratificación interna (sup.-izq.) y externa (inf.-der.) Las otras dos imágenes muestran otra de estas células en un corte transversal de 25 micras (inf.-izq.) y un detalle a mayor aumento (sup.-der.) tal como se ve al microscopio. Calibración 20 µm.

AMACRINAS DE PEQUEÑO CAMPO DENDRÍTICO

Las células amacrinas de pequeño tamaño o "Small Field" fueron con frecuencia difíciles de asignar a un tipo celular en particular. Dado que representan más del 50% del total de células amacrinas, y que son en general mal conocidas dedicamos una especial atención a su estudio.

Encontramos varias AII, A8, A5 y varias células que fueron muy difíciles de clasificar utilizando únicamente sus características morfológicas habituales, ya que podían clasificarse indistintamente como A1, A2, A3 o A4.

Figura 37. Amacrinas Pequeñas



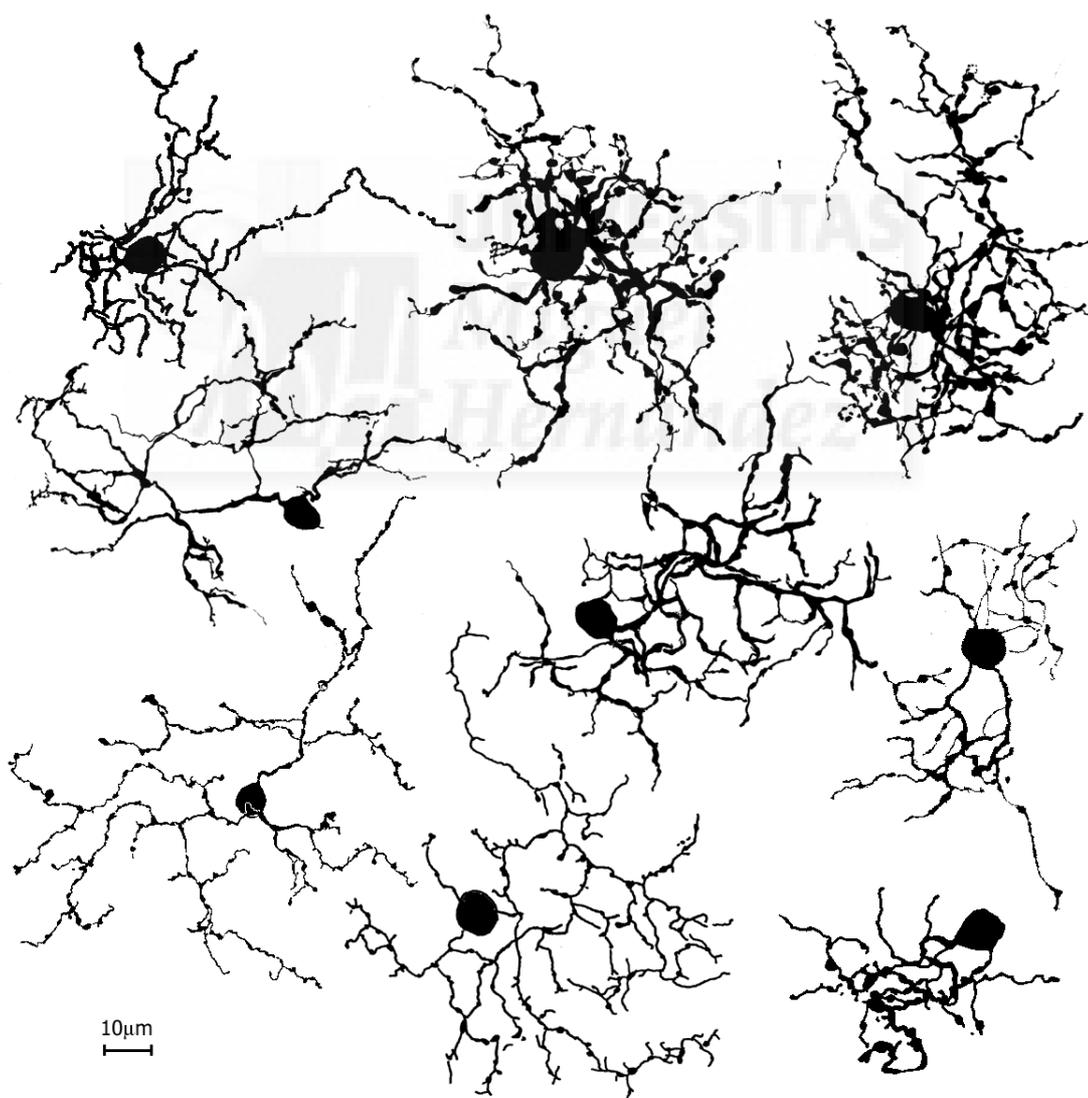
A la izquierda imagen microscópica de una amacrina de pequeño campo dendrítico. A la derecha se muestra un dibujo a cámara clara de una A5 con las anotaciones relativas a su estratificación dendrítica.

Estos tipos (A1-A4) han sido descritos en general como células amacrinas pequeñas, con una apariencia arrosariada. Se estratifican en los estratos internos de la capa plexiforme interna, de manera que las dendritas de las células de tipo A1 se sitúan en capas algo más superficiales que las de las células de tipo A2, y así hasta las células de tipo A4 (cuyas dendritas son las que se sitúan en las capas más internas). Para facilitar su clasificación, asumimos que los 5 estratos de la capa plexiforme sufrían una retracción similar y calculamos el número de dendritas que alcanzaban cada estrato. Utilizamos como criterio la mayor tendencia a alcanzar un determinado estrato. Sin embargo, encontramos que alguna de nuestras células tenían dendritas en más estratos de la plexiforme interna de los teóricamente esperables.

Para poder clasificar mejor estas células se recurrió a los estudios morfométricos e histoquímicos que se detallan más adelante. Solamente tras el estudio de los casos dudosos se contrastó el tipo propuesto por el análisis y su resultado inmunocitoquímico con su tendencia de estratificación en la IPL previamente calculada.

Finalmente en las muestras estudiadas pudimos encontrar gran parte de los tipos de células amacrinas de pequeño campo dendrítico descritas hasta el momento en la literatura, aunque en algunos casos el número de células fue muy pequeño.

Figura 38. Diversidad Morfológica



Dibujos a cámara clara de varias de las células amacrinas de pequeño tamaño dendrítico vistas en plano desde la capa ganglionar.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO

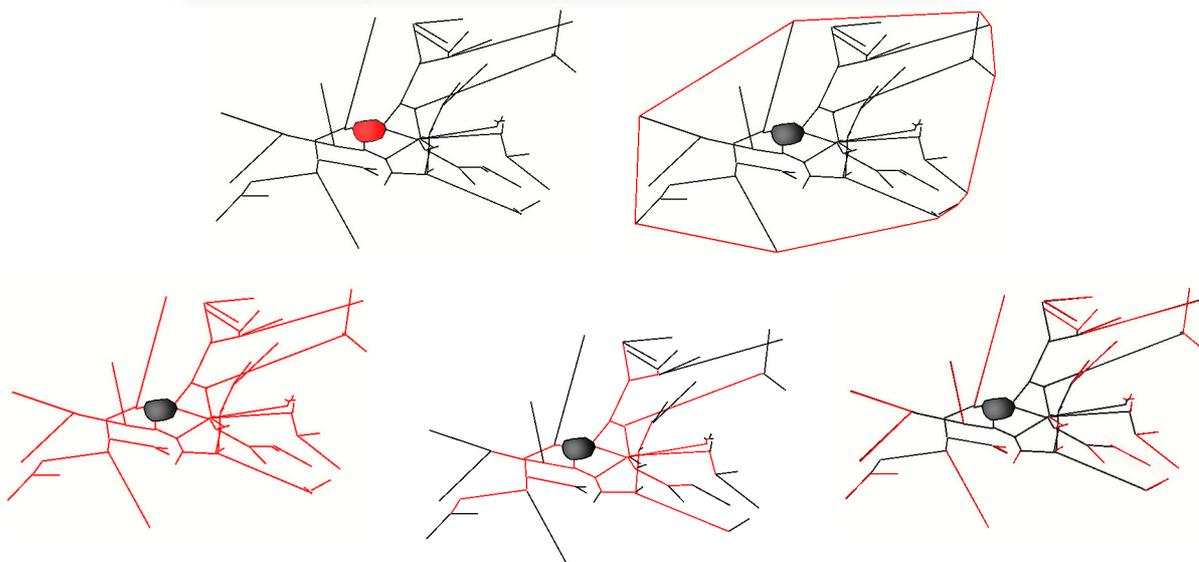
Tanto las fotos de las células a varios planos como los dibujos de las mismas a cámara clara con las anotaciones sobre la profundidad de foco, fueron de gran ayuda para los estudios posteriores (Fig. 34 y siguientes)

DATOS MORFOMÉTRICOS

Para ajustar el procedimiento de obtención y análisis de las variables morfométricas se utilizaron datos obtenidos de células amacrinas de retinas de tortuga (*Pseudemys scripta elegans*) que habían sido previamente utilizadas para estudios electrofisiológicos.

Las versión final de las rutinas de software que fueron desarrolladas por nuestro grupo de investigación específicamente para este trabajo se recogen en el Anexo I. Estas rutinas con la ayuda de los programas NIH Image 1.62 y Matlab y mediante el sencillo aunque laborioso procedimiento que se describe en la sección de Material y Métodos, nos permitieron adquirir diferentes variables morfométricas de cada una de las células de interés, por ejemplo: Perímetro, área, diámetros mayor y menor, circularidad, factores de forma tanto del soma como de la arborización dendrítica, etc.

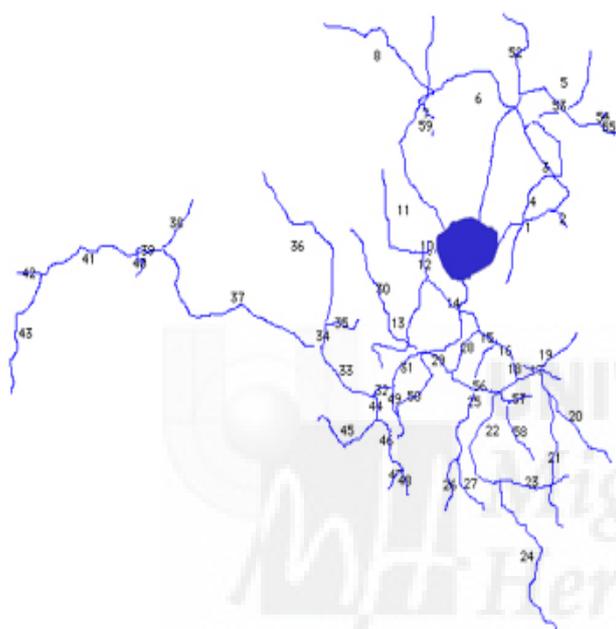
Figura 39. Medidas Morfológicas



En la figura se muestra el esquema de una célula amacrina cuantificada y en rojo la zona donde se miden los parámetros morfológicos: soma, campo dendrítico, todos los segmentos, segmentos intermedios o segmentos terminales. En la Fig.40 se muestra un ejemplo de los datos obtenidos.

Además, a partir de los datos obtenidos del trazado manual de cada una de las dendritas y con ayuda de diferentes programas diseñados específicamente por nosotros, fue posible calcular de forma automática el número de ramificaciones de cada orden (Ej., primarias, secundarias, terciarias, etc.), su longitud media, el número de bifurcaciones, etc. La Figura 40 presenta un ejemplo con algunos de estos datos.

Figura 40. Variables Morfométricas



Archivo = A4_rh27.mediciones

Dimensión Fractal = 1.434

Diámetro del soma = 8.49 μ m

Área del Soma = 55,89 μ m²

Factor de Forma del Soma = 0.870

Diámetro Árbol Dendrítico = 8.49 μ m

Área dendrítica = 5025,78 μ m²

Factor de Forma dendrítico = 0.696

Número de Segmentos (S) = 59

Número de Bifurcaciones = 27

Número de Terminales (T) = 32

Número de Raíces = 2

Índice de Ramificación (T/S) = 0.542

Longitud de los Procesos = 759 μ m

Índice de Tortuosidad = 0.552

Ramificaciones Terminales (n = 32)

Longitud Media = 13.37 μ m

Longitud Total = 427.92 μ m

Índice de Tortuosidad = 0.917

Ramificaciones No Terminales (n = 27)

Longitud Media = 12.73 μ m

Longitud Total = 331.08 μ m

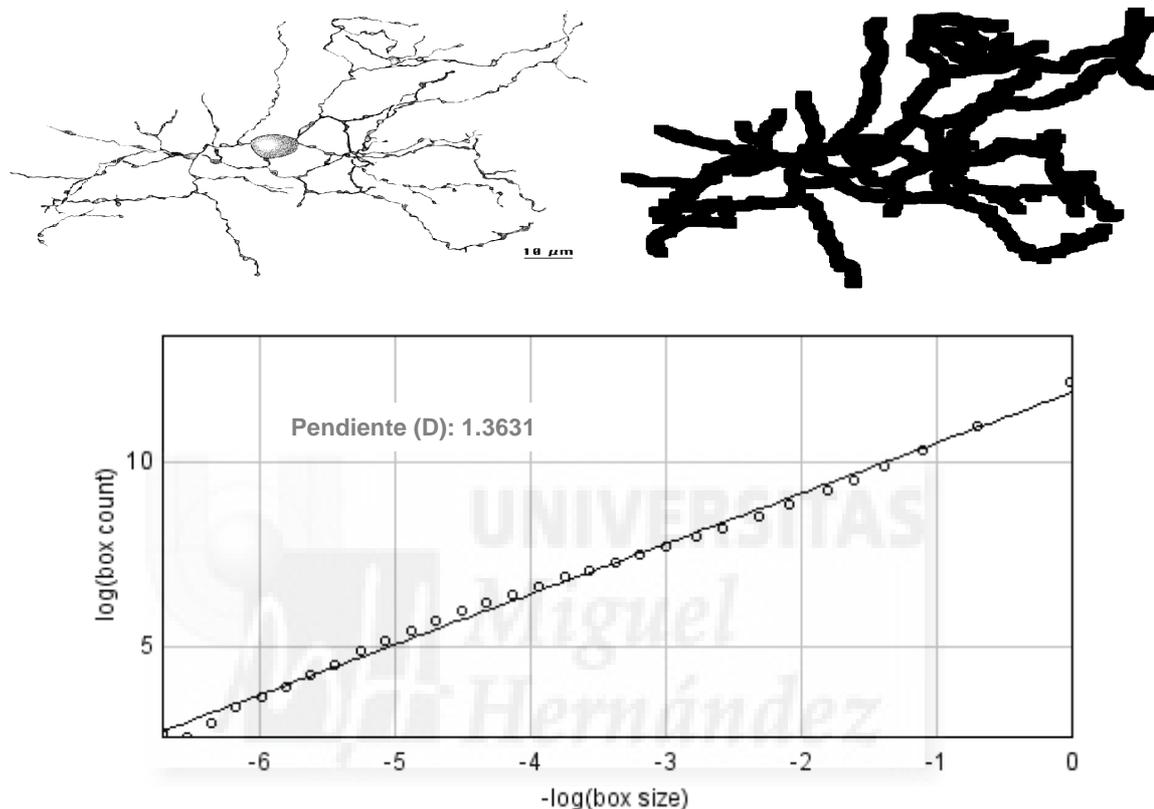
Índice de Tortuosidad = 0.949

Resultados de las medidas morfológicas para una célula amacrina clasificada como tipo A4. En azul se muestra el resultado del trazado de la célula con la numeración correspondiente a cada segmento dendrítico.

Al mismo tiempo, como descriptor general de la forma de rellenar el espacio de las células y la complejidad de su arborización dendrítica se utilizó la dimensión fractal. Aunque inicialmente utilizamos 2 algoritmos diferentes para su determinación ("Box Counting" y "Sand Box"), dado que los resultados con ambos métodos fueron similares decidimos utilizar en los estudios posteriores sólo uno de ellos, el denominado "Recuento de cajas o Box Counting", que por otra parte es uno de los algoritmos más utilizados en la literatura (Fernández et al. 1992; Fernández et al. 1994; Jelinek y Fernández 1998; Fernández et al. 1999; Fernández y Jelinek 2001).

La Figura 41 muestra un ejemplo del cálculo. El valor de la dimensión fractal ($=D$) es el resultado de la pendiente del logaritmo del tamaño de la caja (en píxeles) frente al logaritmo del espacio relleno, o lo que es lo mismo el área ocupada por la célula en función del tamaño de la caja.

Figura 41. Cálculo Dimensión Fractal



Ejemplo del cálculo de la dimensión fractal ($=D$) para una célula Biestratificada Mediana. A partir del dibujo a cámara lúcida (izq.) El algoritmo redibuja la célula utilizando cajas (boxes) progresivamente más grandes (der.) y representando logaritmo del número de cajas necesarias (ordenadas) frente al logaritmo del tamaño de la caja (abscisas).

VARIABILIDAD DE LAS MEDIDAS

Algunas células fueron cuantificadas varias veces, por diferentes personas con el fin de valorar la posible variabilidad y reproducibilidad de nuestra metodología, tal y como se ha comentado en el apartado de métodos. Los resultados de este estudio se presentan de forma resumida en la Tabla 1. Aunque la cuantificación de algunas variables, especialmente la medición de las áreas, presentó una mayor variabilidad, no encontramos diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros estudiados.

TABLA 1: VARIABILIDAD INTRATIPO

Variable	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desviación	N
Soma					
Diámetro	21,28	22,01	21,31	0,750	15
Área	319,06	378,86	354,27	24,610	15
Factor de Forma	0,60	0,92	0,82	0,057	15
Árbol Dendrítico					
Diámetro	503,85	510,96	507,89	2,610	15
Área	196730,10	202274,90	199867,80	908,500	15
Factor de Forma	0,88	0,88	0,88	0,001	15
Nº Seg.	64,00	65,00	64,80	0,440	15
Ramificaciones	28,00	29,00	28,60	0,540	15
Terminales	36,00	37,00	36,20	0,440	15
Raíces dendríticas	7,00	7,00	7,00	0,000	15
Índice Ramificación	0,55	0,57	0,56	0,000	15
Dendritas					
Longitud Total	5047,80	5106,90	5079,70	26,000	15
Índice Tortuosidad	0,93	0,93	0,93	0,003	15
Segmentos Terminales	94,53	97,34	96,38	1,120	15
Longitud Media					
Longitud Total	3467,58	3504,23	3488,77	16,960	15
Índice Tortuosidad	0,92	0,93	0,92	0,004	15
Segmentos Intermedios	54,49	57,04	55,64	0,970	15
Longitud Media					
Longitud Total	1567,54	1606,04	1590,96	16,400	15
Índice Tortuosidad	0,94	0,95	0,94	0,004	15

DATOS CUANTITATIVOS DE LAS CÉLULAS ESTUDIADAS

En la Tabla 2 se recogen los valores medios de todos estos parámetros para los tipos de células amacrinas en retina humana con mayor representación en nuestro estudio. Junto a la media se muestra la desviación estándar para cada caso.

Tomados individualmente algunos parámetros presentan una amplia variabilidad, por lo que muchas veces fue difícil clasificar una célula en base sólo a estos parámetros. La Figura 42 muestra algunos de los parámetros morfológicos de una amacrina tipo A2 frente a un A3. Los valores se muestran a la derecha de la ilustración correspondiente.

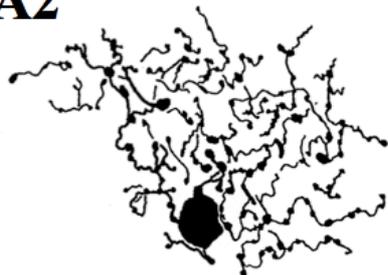
TABLA 2: VARIABILIDAD INTERTIPO

Variable	A1	A2	A3	A4
Soma				
Diámetro	7,6 ± 0,4	8,2 ± 1,1	8,7 ± 0,7	9,4 ± 0,6
Área	46,4 ± 3,5	54,1 ± 13,8	59,6 ± 8,8	69,6 ± 8,9
F. Forma	0,9 ± 0,01	0,8 ± 0,02	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,04
Árbol Dendrítico				
Diámetro	56,6 ± 2,4	48,2 ± 1,5	79,6 ± 17,7	81,0 ± 11,9
Área	2.497,7 ± 249,9	1.763,1 ± 108	5.230,1 ± 2048,6	5.118,5 ± 1594,8
F. Forma	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,01	0,9 ± 0,02	0,6 ± 0,2
Nº Segmentos	79,5 ± 3,5	79 ± 34,7	121,3 ± 50,4	66,4 ± 14,2
Ramificaciones	37 ± 2	38,7 ± 17,8	58,3 ± 24,4	30,8 ± 7,7
Terminales	42,5 ± 1,5	40,3 ± 16,9	62,3 ± 25,1	35,6 ± 6,56
Raíces dendrít.	4 ± 1,5	2,7 ± 0,4	2,7 ± 2,2	3,4 ± 1,3
I. Ramificación	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,02
Dendritas				
L. Total	557,3 ± 2,17	500,1 ± 100,1	674 ± 126,2	714,7 ± 178,9
I. Tortuosidad	0,9 ± 0,02	0,9 ± 0,01	1 ± 0,01	0,9 ± 0,01
Seg. Terminales				
L. Media	8 ± 1,2	9 ± 4,4	6,4 ± 2,8	10,9 ± 2,5
L. Total	336,5 ± 39	275,1 ± 26,6	318,7 ± 13,7	379,5 ± 90,4
I. Tortuosidad	0,9 ± 0,02	0,9 ± 0,01	1 ± 0,02	0,9 ± 0,01
Seg. Intermedios				
L. Media	5,9 ± 0,7	6,8 ± 1,8	6,7 ± 2,1	11,2 ± 2,5
L. Total	220,8 ± 36,9	225,1 ± 73,5	355,3 ± 126,24	335,2 ± 90,3
I. Tortuosidad	0,9 ± 0,03	0,9	1	0,9

Variable	A5	All	A8	Bs
Soma				
Diámetro	7,6 ± 0,6	9,5 ± 1,1	8,2 ± 0,9	9,0 ± 0,1
Área	45,15 ± 6,7	70,6 ± 15,3	51,7 ± 10,1	63,3 ± 1,3
F. Forma	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,02	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,04
Árbol Dendrítico				
Diámetro	72,1 ± 14,3	61,7 ± 22,2	59,7 ± 17,6	133,4 ± 32,2
Área	4.029,5 ± 1552,7	3.259,9 ± 2098,3	3.014,6 ± 1770,2	14.449,8 ± 6664,7
F. Forma	0,9 ± 0,01	0,8 ± 0,02	0,8 ± 0,01	0,9 ± 0,01
Nº Segmentos	124,5 ± 19,5	131 ± 47	82,3 ± 32,9	74,5 ± 16,5
Ramificaciones	60,5 ± 9,5	61 ± 22,5	39 ± 16,7	34 ± 7
Terminales	64 ± 10	68,5 ± 23,5	43,3 ± 16,2	40 ± 9
Raíces dendrít.	1,5 ± 0,5	5,2 ± 1,2	5 ± 1,3	4,5 ± 1,5
I. Ramificación	0,5	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,01
Dendritas				
L. Total	659,9 ± 90,6	763,3 ± 425,7	536,6 ± 255,1	1.240 ± 211,6
I. Tortuosidad	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,01	0,9	0,9 ± 0,02
Seg. Terminales				
L. Media	4,7 ± 1,4	5,3 ± 1,1	6,6 ± 0,8	19,3 ± 6,8
L. Total	284 ± 44,3	392 ± 201,5	290,5 ± 134,57	711,9 ± 99
I. Tortuosidad	0,9 ± 0,01	0,9	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,02
Seg. Intermedios				
L. Media	6,5 ± 1,8	5,5 ± 1,7	6,5 ± 0,9	16,9 ± 6,8
L. Total	375,9 ± 46,3	371,3 ± 224,2	246,1 ± 120,5	528,2 ± 112,5
I. Tortuosidad	1 ± 0,01	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,02	0,9 ± 0,03

Figura 42. Variabilidad Paramétrica Intertipo

A2



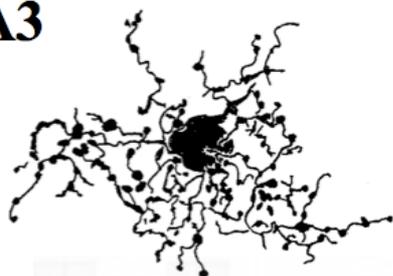
Estratificación: S2

Diámetro del soma: 7,7 μm
 Área del soma: 46,1 μm^2
 Factor de forma del soma: 0,890

Diámetro de la arborización dendrítica: 50,2 μm
 Área de la arborización dendrítica: 1902,1 μm^2
 Factor de forma del árbol dendrítico: 0,823

Número de segmentos: 121
 Número de bifurcaciones: 60
 Número de ramificaciones terminales: 61
 Número de dendritas primarias: 3

A3



Estratificación: S2 y S3

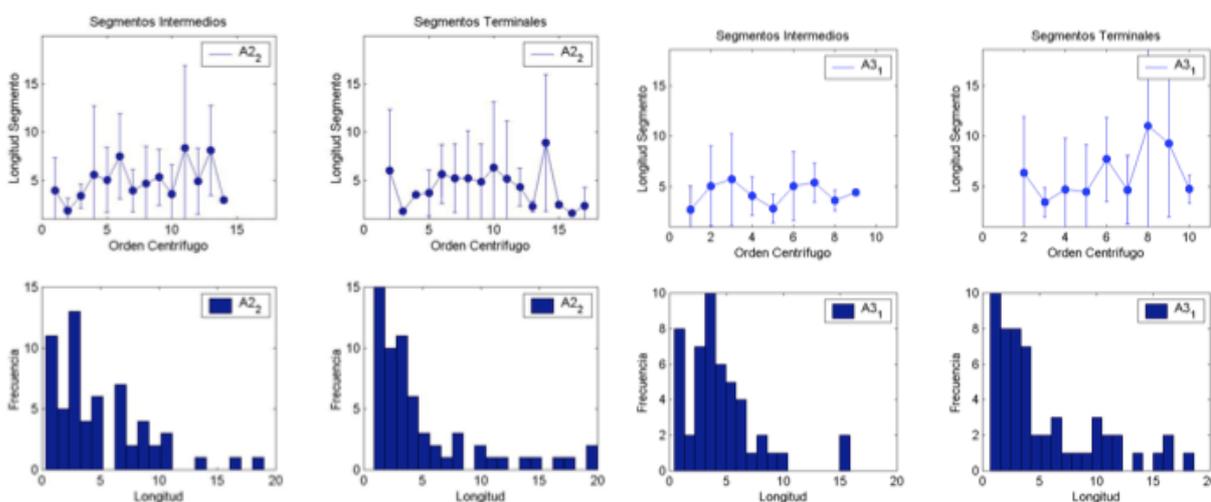
Diámetro del soma: 9,3 μm
 Área del soma: 67,8 μm^2
 Factor de forma del soma: 0,820

Diámetro de la arborización dendrítica: 52,8 μm
 Área de la arborización dendrítica: 2157,2 μm^2
 Factor de forma del árbol dendrítico: 0,840

Número de segmentos: 104
 Número de bifurcaciones: 49
 Número de ramificaciones terminales: 55
 Número de dendritas primarias: 6

En algunos de estos casos, recurrimos a un estudio detallado de cada una de las ramificaciones, teniendo en cuenta los órdenes de ramificación tal y como se presenta a continuación:

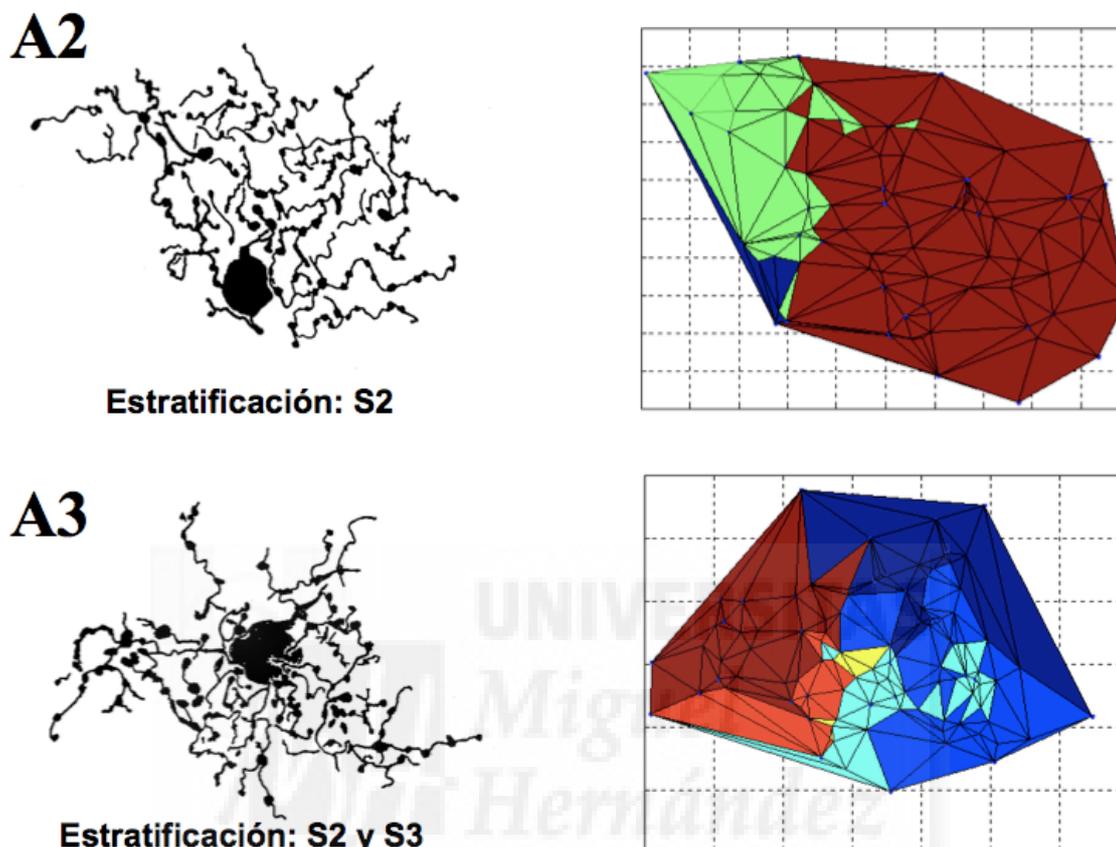
Figura 43. Segmentos Dendríticos



Se muestra la distribución de los segmentos intermedios y terminales de cada longitud respecto a su orden (líneas con barra de error) y frecuencia (gráficas de barras) para cada una de las células mostradas en la Fig. 17R.

Además también consideramos la forma de distribución de los segmentos terminales. Para ello utilizamos las coordenadas de los extremos terminales y procedimientos de teselación de Voronoi (Figura 44).

Figura 44. Distribución Dendrítica



Representación gráfica del resultado de la teselación de Voronoi para las células de las Fig. 17 y 18. Cada color representa la distribución de una dendrita terminal.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Análisis Factorial

Este análisis nos permite identificar un pequeño número de factores que pueden ser utilizados para representar e identificar las interrelaciones entre las distintas variables. En la tabla 3 se recogen los principales resultados del análisis factorial realizado con todas las variables morfométricas analizadas. Tras la aplicación del análisis se observa que todas las variables pueden ser reducidas a 6 factores:

- El primer factor (que es el más importante y capaz de explicar el 32% de la varianza observada) está relacionado con aspectos topológicos y formado por el número de segmentos, el número de bifurcaciones, el

número de extremos terminales e incluye también la dimensión fractal y el factor de forma del árbol dendrítico.

- El segundo factor, relacionado con aspectos cuantitativos de las ramificaciones dendríticas, incluye la longitud total de las dendritas, el área del árbol dendrítico, el diámetro del árbol dendrítico, y la longitud media de los segmentos intermedios.
- El tercer factor esta relacionado con el índice de tortuosidad, e incluye la tortuosidad general de todas las dendritas (dendritas principales, segmentos intermedios y segmentos terminales).
- El cuarto factor, o factor soma, incluye el tamaño del soma y el factor de forma del mismo.
- El quinto factor incluye el índice general de bifurcación y el área del soma celular.
- El sexto factor incluye el número de dendritas principales y el valor medio de la longitud de los segmentos terminales.

Los Resultados del Análisis Factorial (matriz de componentes rotados) sobre todos los parámetros cuantificados se presentan en la Tabla 3 y el porcentaje de varianza explicada por cada factor en la Tabla 4. Los valores enmarcados en cuadros representan los que están incluidos en cada factor.

TABLA 3: MATRIZ DE COMPONENTES ROTADOS

	Componentes					
	1	2	3	4	5	6
Nº Ramificaciones	,953	-,180	-,040	-,128	-,044	,056
Nº Segmentos	,951	-,187	-,045	-,133	-,030	,046
Nº Terminales dendr.	,948	-,194	-,050	-,139	-,016	,095
L. Total Seg. Interm.	,780	,362	-,165	,207	,238	-,235
SANDBOX	,667	-,181	-,223	-,227	-,134	,453
F. Forma Dendrítico	,413	-,074	-,378	,078	-,290	,328
L. Total Dendritas	,145	,952	,040	,035	,094	-,157
L. Total Seg. Termin.	-,152	,949	,113	-,044	,012	-,084
Área Árbol Dendr.	-,145	,943	,039	,058	,003	,040
Diámetro Árbol Dendr.	-,320	,887	,172	,078	,135	-,158
L. Media Seg. Interm.	-,324	,466	-,114	,403	,318	-,209
I. Tortuosidad	-,058	,233	,951	,090	,034	,050
I. Tortuos. Seg. Termin	,050	-,043	,922	,156	,79	-,016
I. Tortuos. Seg. Interm.	-,245	,068	,834	-,008	-,002	,054
Diámetro Soma	-,111	,031	,137	,939	,035	-,030
F. Forma Soma	,133	-,051	-,108	-,845	,410	,063
Área Soma	,0,94	,207	,152	-,237	,857	,040
I. Ramificación	-,605	,018	,038	,073	,658	,074
L. Media Seg. Termin	,067	-,040	,149	-,020	-,046	,820
Nº Raíces Dendr.	,035	-,379	-,128	-,121	,403	,712

Método de Extracción: Matriz de Componentes Principales.

Método de Rotación: Normalización Varimax.

TABLA 4: VARIANZA TOTAL EXPLICADA

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	6,500	32,498	32,498
2	3,468	17,340	49,838
3	2,508	12,542	62,380
4	2,280	11,400	73,779
5	1,278	6,388	80,167
6	1,227	6,135	86,302

Análisis Discriminante

Este análisis nos permite asignar cada célula a un grupo definido (variable dependiente) en función de diferentes combinaciones lineales de las variables independientes. Así, a partir de las diferentes puntuaciones discriminantes es posible obtener una regla de clasificación que permite asignar cada célula a un tipo determinado. Esta regla esta basada en la teoría de Bayes y un ejemplo para los primeros 10 casos se muestra en la tabla 5.

TABLA 5: ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Nº Caso	Grupo Real	Grupo Pronosticado 1º	P(G=g D=d)	Grupo Pronosticado 2º	P(G=g D=d)
1	1	1	,993	8**	,003
2	2	2	1,000	8**	,000
3	2	2	1,000	4**	,000
4	3	3	,777	8**	,199
5	4	4	,935	8**	,033
6	5	5	1,000	8**	,000
7	8	1**	,694	8	,299
8	8	8	,993	7**	,006
9	7	7	,743	8**	,252
10	7	7	,997	8**	,002

Cada función es óptima cuando se minimiza la probabilidad de una clasificación errónea, es decir cuando la probabilidad de que el grupo pronosticado coincida con el real sea máxima.

En nuestro caso realizamos múltiples análisis discriminantes utilizando diferentes combinaciones de variables para la clasificación. De esta manera podemos analizar cuales son las variables que contribuyen en mayor grado a discriminar los tipos celulares. De nuestros resultados se deduce que aunque cada una de las variables consideradas por separado no tiene un alto valor predictivo, cuando consideramos simultáneamente todas ellas podemos llegar a clasificar de forma correcta prácticamente el 100% de las células (Tabla 6)

TABLA 6: VALOR PREDICTIVO

Variabes incluidas en el modelo	Porcentaje
Diámetro equivalente de la arborización dendrítica	29,6
Diámetro + área + factor de forma del soma	48,1
Diámetro + área + factor de forma de la arborización dendrítica	44,4
Datos de los segmentos intermedios y terminales (número, longitud media, tortuosidad)	63,0
Tortuosidad de la segmentos intermedios y terminales	25,9
Dimensión fractal	43,8
Contenido Aminoácidos	63,0
Número segmentos + número de bifurcaciones + número terminales + número de dendritas primarias + índice de ramificación + longitud total	70,4
Número segmentos + número de bifurcaciones + número terminales + número de dendritas primarias + índice de ramificación + longitud total + Contenido Aminoácidos	77,8
Número segmentos + número de bifurcaciones + número terminales + número de dendritas primarias + índice de ramificación + longitud total + Contenido Aminoácidos Diámetro + área + factor de forma del soma	88,9
Todas las variables juntas	96,3

CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA

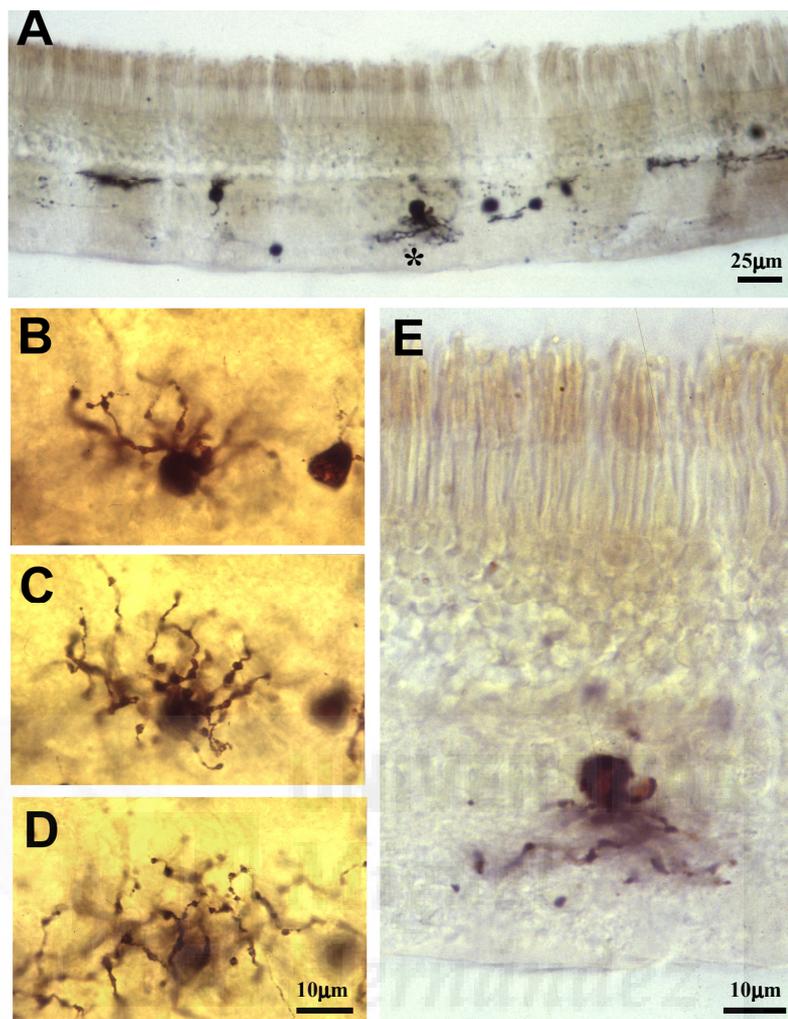
REINCLUSIÓN DE LAS CÉLULAS DE INTERÉS

Es posible tallar y reincluir muestras de retina preteñidas por el método de impregnación argénteo de Golgi, incluidas en EPON y montadas sobre portaobjetos.

Gracias a las imágenes y medidas descritas en los métodos pudimos encontrar de nuevo gran parte de las células de interés y comprobar su estratificación en las secciones transversales (Figuras 45 y 46).

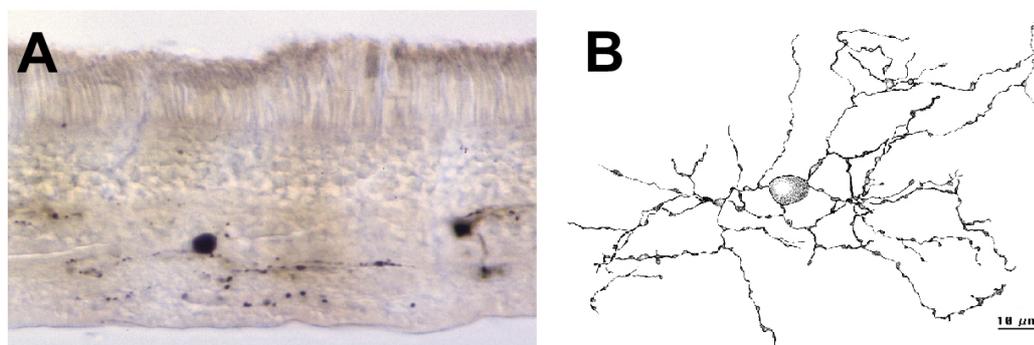
Sin embargo en estos cortes a menudo se observó más impregnación de la que se apreciaba desde la superficie y frecuentemente incluso aparecieron nuevas células teñidas, con lo que en ocasiones fue complejo encontrar de nuevo la célula de interés. Algunas células fueron descartadas del estudio al existir problemas para su correcta identificación.

Figura 45. Célula AII de la retina humana



A: Sección transversal de 25 µm de espesor para localizar la célula de interés (asterisco). B-D: Microfotografías tomadas en diferentes planos de foco. E: Detalle de la célula.

Figura 46 Amacrina Biestratificada Mediana.



Célula amacrina del tipo Biestratificada Mediana en la retina humana. A: Sección transversal de 25 mm de espesor donde se observa la amacrina en el centro y una bipolar a la derecha. En el corte se aprecia su estratificación B: Dibujo a cámara lúcida de la misma célula, vista de plano, por su cara superior. Barra de escala = 10 µm.

ENSAYOS PREVIOS SOBRE RETINAS DE PRIMATE

Se utilizaron ensayos previos sobre cortes semifinos de retina de primate, que habían sido procesadas de manera análoga a las retinas humanas (ver apartado de métodos) para ajustar las concentraciones óptimas de cada uno de los anticuerpos utilizados.

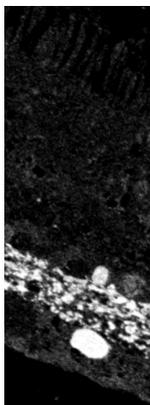
Usando retinas de primate incluidas en Epon y los anticuerpos frente a GABA y Glicina de Signature Immunologics, se comprobó que era posible detectar los aminoácidos GABA y la Glicina usando secundarios frente a conejo marcados con nanogold-gar. Dado que a las concentraciones recomendadas (1:100), obtuvimos mucho marcaje de fondo, decidimos utilizar los anticuerpos primarios a una concentración de 1:1000.

La utilización de portaobjetos multi-pocillo con un recubrimiento hidrofóbico de teflón facilitó la realización de diferentes inmunoensayos en cortes correlativos. Al sustituir los procedimientos clásicos (como el PAP PEN®) por los portaobjetos comerciales de Cel-line®, pudimos lavar y secar las muestras conjuntamente, disminuyendo el riesgo de interferencia entre muestras vecinas y reduciendo el tiempo de procesado.

IDENTIFICACIÓN DE PATRONES GENERALES DE TINCIÓN

Las señales obtenidas para todos los anticuerpos fueron similares a las obtenidas en otros mamíferos:

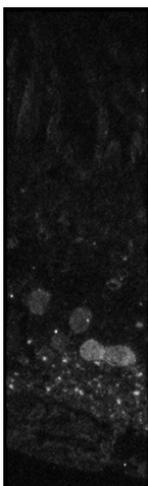
GABA



La tinción de GABA en la retina humana parece restringirse a las capas internas de la retina. Todas las capas de la plexiforme interna (IPL) se tiñen intensamente, si bien se aprecian tres líneas más intensas separadas por dos de menos tinción.

Se tiñen amacrinas tanto en la capa nuclear interna (INL) como en la capa de las ganglionares (GCL). Incluso parece haber algún soma teñido en la plexiforme interna. Unas pocas ganglionares también resultaron positivas para GABA (GABA-IR) (Ver también Fig. 48-b y 49).

Glicina

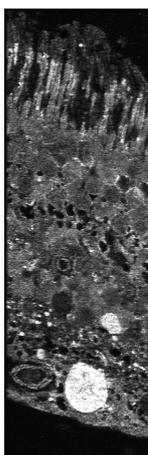


En nuestras muestras de retina humana la tinción frente a glicina (GLY-IR) parece restringirse a la mitad interna.

Se suelen teñir dos filas de células en la INL. Algunas bipolares y muchas amacrinas son positivas para GLY (GLY+) y unas pocas ganglionares también lo son. La intensidad del marcaje varía de unas células a otras.

La plexiforme interna, presenta una tinción difusa en la que aparentemente se tiñen menos fibras que en el caso de GABA. Solamente se tiñen pequeños puntos dando la impresión de ser una tinción muy específica (Fig. 48-d y 49).

Glutamato

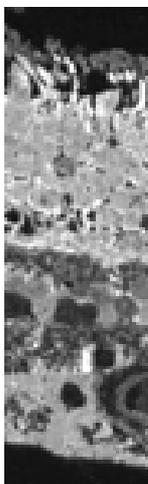


El patrón del glutamato (GLU-IR) en la retina humana abarca todas las capas. Prácticamente todas las células de la retina presentan marcaje frente al glutamato aunque con diversa intensidad.

No todos los segmentos externos de los fotorreceptores se tiñen por igual, de manera que los bastones tienden a presentar mayor inmunoreactividad.

La capa nuclear interna presenta unas pocas células fuertemente GLU+ con diferencias en la intensidad del marcaje de las amacrinas. Las ganglionares también se tiñen intensamente para GLU+ (Fig. 48-c y 49).

Taurina



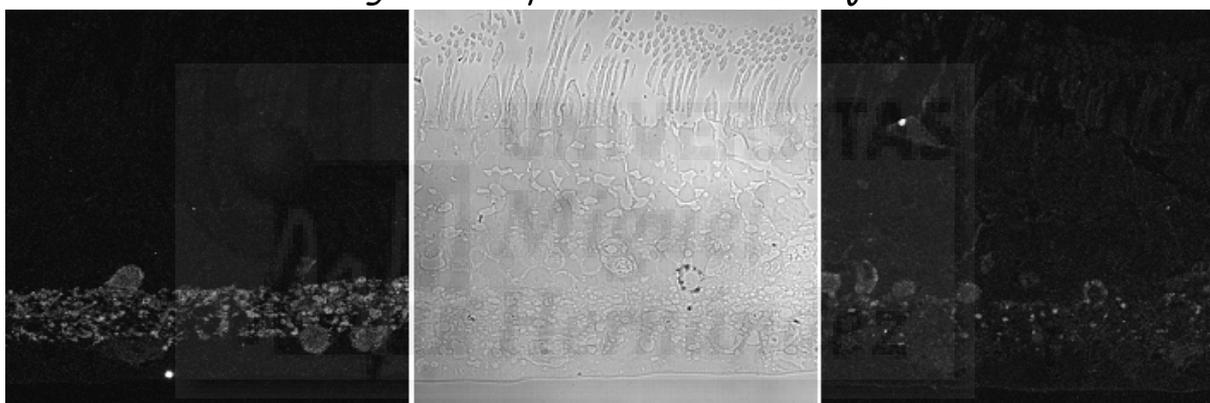
Marcada frente a Taurina la retina humana se caracteriza por una tinción masiva. La retina parece dividirse en dos zonas. En la mitad externa, la retina se tiñe casi por completo. En la mitad interna la tinción es mucho más tenue y, si bien se tiñen algunos somas, las áreas de neuropilo lo hacen más intensamente. La falta de tinción de algunas fibras de ambas plexiformes, o la diversidad de intensidades de marcaje de las capas nucleares, contrasta con la fuerte tinción del resto.

A pesar de la abundancia de células de la INL positivas para glutamato o taurina, no presentaron Taurina ni las ganglionares ni las amacrinas teñidas intensamente para Glutamato (Fig. 48-e, 49).

DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN RETINA HUMANA

Las células de interés, una vez caracterizadas en retinas enteras e identificadas en las secciones transversales, pueden ser procesadas para determinar su contenido en diversos aminoácidos excitatorios e inhibitorios. La tinción de Golgi no parece afectar la inmunoreactividad general del tejido. Las células que resultan impregnadas a menudo se fragmentan y su inmunoreactividad se concentra en zonas concretas dentro de las mismas que pueden en ocasiones coincidir con las áreas oscurecidas por la plata que suelen delimitarlas. Sin embargo, no todas las células impregnadas resultan marcadas positivamente, lo que apoya la especificidad del marcaje. La estreptoavidina marcada con Cy3 puede ser utilizada para intensificar la señal inmunocitoquímica.

Figura 47 Especificidad del marcaje.



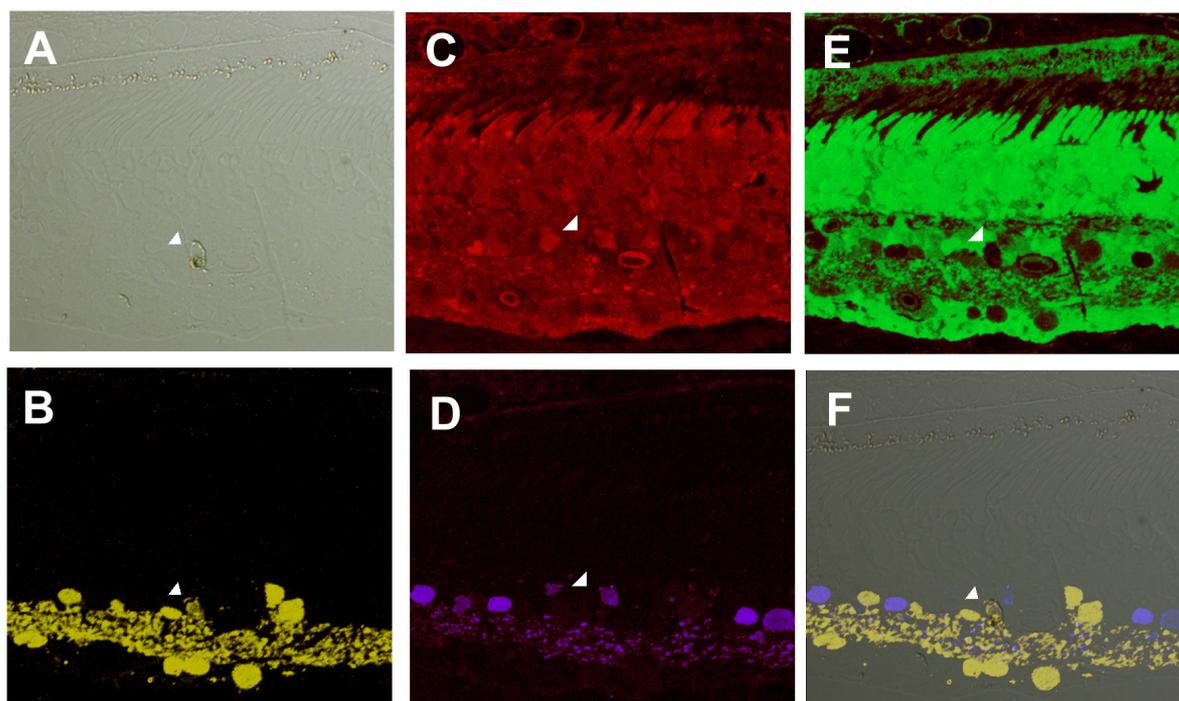
Imágenes de fluorescencia de los semifinos de una amacrina pequeña marcados frente a GABA (Izq.) y Glicina (der.) junto a la correspondiente imagen de microscopía óptica de transmisión mostrando los depósitos de plata resultado de la Técnica de Golgi.

Superponiendo las distintas imágenes localizamos la posición de la célula de interés en las imágenes de fluorescencia y comprobamos si tenía o no un marcaje positivo para cada uno de los anticuerpos (ver figuras 48 a 50).

Atendiendo a la presencia o no de marcaje frente a los diferentes aminoácidos testados obtuvimos los siguientes grupos (ver Tabla 7):

Considerando el marcaje periférico como positivo para la célula, del total de las amacrinas impregnadas la mayor parte (90%) fueron GLY+, siendo Glicina el único marcador presente en el 11% de nuestras células. El 80% de las amacrinas presentaron inmunotinción positiva para Glutamato, un 55% fueron inmunoreactivas para GABA y el 55% resultaron ser marcadas frente a TAU, si bien casi siempre asociados a otros marcadores.

Figura 48. Detección de Aminoácidos



Inmunocitoquímica post-inclusión sobre cortes semifinos consecutivos de 0.5 μm de grosor que fueron previamente impregnados por el método de Golgi. A. Imagen de contraste interferencial que muestra la célula amacrina de interés (flecha) con precipitados intracitoplásmicos de cromato de plata. B: Inmunotinción frente a GABA. C: Inmunotinción frente a L-Glutamato. D: Inmunotinción frente a Glicina. E: Inmunotinción frente a Taurina. F. Imagen de contraste interferencial con varios marcadores superpuestos: GABA y Glicina.

TABLA 7: DISTRIBUCIÓN DEL MARCAJE

	GABA ^Y	Glicina ^G	Glutamato ^E	Taurina ^T
50% YG	- Y GABA - Y - Y	Glicina ^G Glicina Glicina Glicina Glicina	- E - E Glutamato ^E Glutamato Glutamato	- T - T Taurina Taurina
78% GE	- - - - -	Glicina Glicina Glicina Glicina	Glutamato Glutamato Glutamato Glutamato	- - - -
39% YGET	GABA - - Y GABA ^Y - Y	Glicina Glicina - G - G	- - - - Glutamato - E	- - - - - T Taurina ^T
56% ET	- - Y	- G -	- - - Glutamato	- - - Taurina
	55%	90%	80%	55%

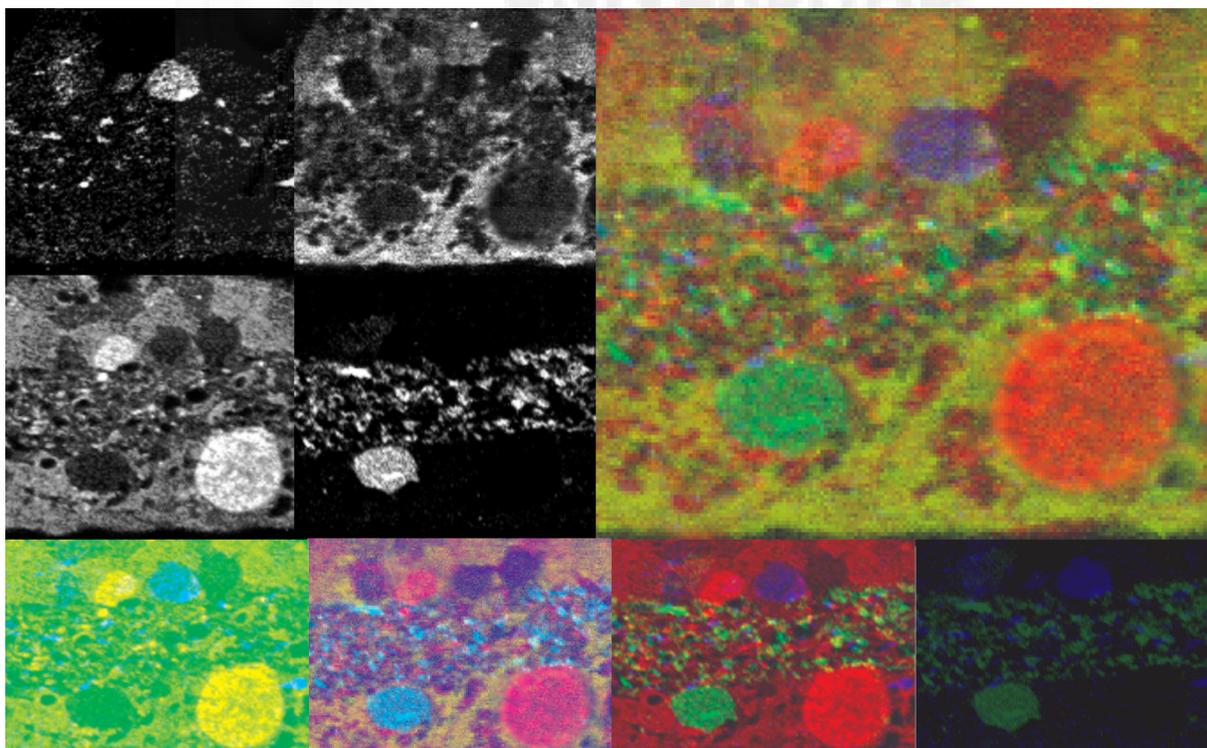
Los datos están ordenados en función de la distribución del marcaje de Glicina (G), Glutamato (E), Taurina (T) y GABA (Y). Con las iniciales en Mayúsculas Y, G, E y T se indica el marcaje diferencial en la zona periférica. En la línea inferior se indican los porcentajes para cada aminoácido y en la primera columna para cada una de las agrupaciones marcadas.

Siguiendo el mismo criterio, el 39% de las amacrinas analizadas de nuestro estudio presentaron inmunotinción positiva para todos los aminoácidos, si bien en algunos casos fue muy tenue (ver más adelante), y en un 50% lo hicieron simultáneamente para *GABA* y glicina.

Si por el contrario no consideramos el marcaje periférico los porcentajes bajan a: *G*+ 70%, *E*+ 60%, *Y*+ 20% y *T*+ 30% para los aminoácidos individualmente, y para sus diversas combinaciones resultan del 18% para las células marcadas frente a *GABA* y Glicina (*YG*), 44% para las positivas a Glicina y Glutamato (*GE*) y un 20 para las positivas a Glutamato y Taurina (*ET*). No encontrando ninguna célula marcada simultáneamente para los 4 aminoácidos testados (*YGET*).

En el ejemplo de la figura a continuación la célula impregnada sería positiva a todos los aminoácidos o solamente a *GABA* y Glicina según lo consideremos uno u otro criterio.

Figura 49. Ejemplo de Inmunotinción



*Diferentes imágenes del resultado de la inmunocitoquímica sobre semifinos de una célula impregnada de pequeño tamaño. Arriba a la derecha se muestra la superposición de las 4 imágenes de confocal mostradas a la izq. en escala de grises. De izquierda a derecha y de arriba a bajo: Inmunotinción frente a Glicina (*G*), Taurina (*T*), Glutamato (*E*) y *GABA* (*Y*). En la parte inferior se muestra una combinación de los marcajes frente a los aminoácidos *GE*; *YGT*; *YGE*; *YG*.*

CUANTIFICACIÓN DE LA REACCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA

Una vez normalizadas las imágenes de fluorescencia, se calculó la intensidad media del soma de la célula a cuantificar en cada semifino y el porcentaje que suponía esta intensidad respecto del rango de la imagen.

Para poder plasmar diferencias en tinciones a menudo no muy intensas se establecieron los siguientes rangos de inmunoreactividad:

0-5%	Imperceptible o nula	-
5-15 %	Leve	L
15-25%	Tenue	T
25-50 %	Media	M
50-75%	Intensa	I
75-100%	Muy Intensa	S

Solamente fueron cuantificadas como positivas aquellas células con valores por encima del 5%.

El enorme número de pasos realizados hasta este punto, con el consiguiente descarte de casos en cada una de las etapas, hace que llegados a este punto el tamaño de la muestra sea ya muy reducido. Esto, unido a la variabilidad encontrada en los parámetros estudiados hacen que nuestros datos sólo nos permitan obtener ciertas tendencias que deberán ser contrastadas conforme pueda aumentarse el número de casos para cada tipo.

Si agrupamos las células en función de la intensidad de marcaje de cada uno de los aminoácidos encontramos las siguientes categorías:

TABLA 8: MARCADORES PREDOMINANTES

GABA	GLICINA	GLUTAMATO
Yg	G	Eg
Yrtg	GE	
Yrgt	Gr	
Yrt	Gt	
	Gy	
	GYr	
	Gytr	
	Gty	

En la tabla se muestran en mayúsculas los aminoácidos más intensamente marcados representados por: Y, y, GABA; G,g, Glicina; E,r, Glutamato; T,t, Taurina. Se ha considerado el marcaje periférico.

FENOTIPADO INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS AMACRINAS

En la Tabla 9 se muestra un ejemplo de los datos de la cuantificación para algunas células del estudio bien caracterizadas y algunos otros casos con mayor dificultad de segregación.

TABLA 9: CONTENIDO INDIVIDUALIZADO EN AMINOÁCIDOS

REF.	TIPO	TAMAÑO	IPL	INTENSIDAD DE MARCAJE FRENTE AA			
				GABA	GLICINA	GLUTAMATO	TAURINA
139	A1/A2/A3	PEQ	s2/s3	-L	-I	-	-T
72	A1	PEQ	s2-s3	Moderado	Tenue	-	-M
77	A2	PEQ	s2-s3	Tenue ^M	-M	-T	Leve ^T
194	A3	PEQ	s2-s3	Moderado ^M	Moderado ^M	Leve	-
43	A4	PEQ	s1-s4	-	Tenue ^T	Intensa ^T	-
61	A4	PEQ	s1-s4	-	Tenue ^T	Leve ^T	-
190	A4	PEQ	s2-s4	-	Tenue	Moderado	-
24	A5	PEQ	s1-s5	-	Intenso	M Intenso	-
25	A8	PEQ	a,b	-	Moderado	Moderado	-
54	AII	PEQ	a,b	-	Tenue	Intenso	-
99	Mb	MED	a,b	-T	Tenue	Leve	-T
15	Wd	MED	s1-s5	-	Leve ^T	Leve	-
41	Wd	MED	s1-s5	-	Leve ^L	-	-L
84	Sv	MED	s3	-M	-	Leve	Leve
53	SI1	GRA	s1	-	Leve	-	-
71	W	GRA	s1	-	Tenue	-	-
13	Sw	GRA	s2-s4	-	Leve ^L	-	-

Todas las células pequeñas exceptuando las A2 mostraron marcaje frente a glicina en el interior del soma. En gran parte de ellas también se detectó glutamato. Las AII resultaron tener Glicina y glutamato, igual que las A8 y las A5 aunque en estos últimos fueron ambos marcajes más intensos.

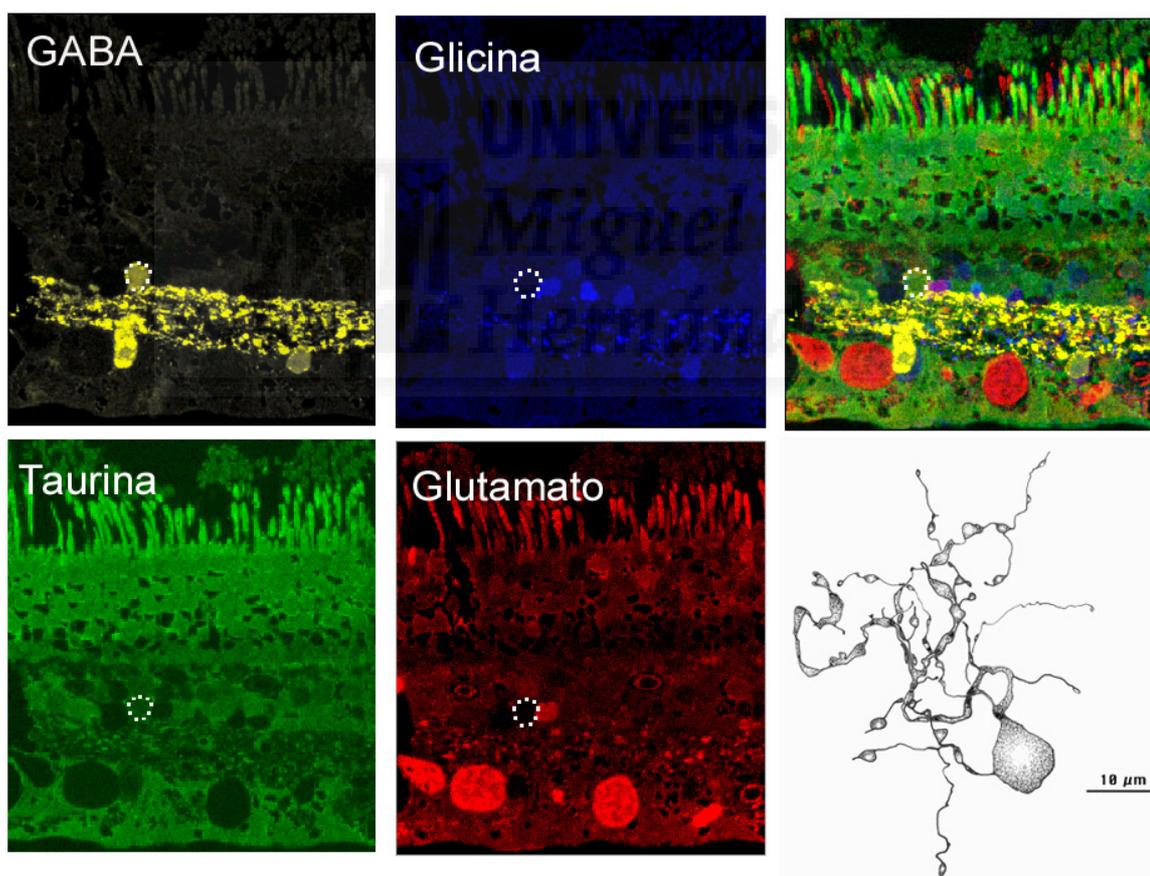
En cuanto a las células difícilmente clasificables entre A1, A2, A3 o A4 se observaron varias tendencias de impregnación que junto con el resto de parámetros estudiados, ayudaron a clasificar a alguna de ellas. Considerando el marcaje en la parte central del soma, las células se agruparon según la existencia de GABA, glicina o ambos y cada grupo se subdividió considerando la presencia o no de glutamato.

En la tabla 9 se muestran varios ejemplos de A4 en los que se aprecia diferencias de intensidad en el marcaje frente a Glicina y Glutamato así como en su predominio. En el caso de las células medianas denominadas Enmarañadas difusas (Wd) encontramos incluso variaciones en la presencia o no de marcaje frente a glutamato, si bien es cierto que su marcaje fue muy tenue (leve).

Aunque el número de células impregnadas de gran campo dendrítico sobre las que se llevo a cabo el estudio inmunocitiquímico fue muy reducido ninguna de ellas resulto marcada frente a GABA.

A continuación se muestra un ejemplo del estudio inmunocitoquímico para una célula A2.

Figura 50. Ejemplo Caracterización A2



Inmunocitoquímica post-inclusión sobre cortes semifinos consecutivos de 0.5 µm de grosor previamente impregnados por el método de Golgi. La línea punteada delimita la célula de interés. De arriba a bajo y de izquierda a derecha: Inmunotinción frente a GABA; Inmunotinción frente a Taurina; Inmunotinción frente a Glicina; Inmunotinción frente a L-Glutamato; Todos los marcadores superpuestos; Dibujo de la célula, que fue clasificada como A2 en base a su morfología, su estratificación (S2) y sus marcadores moleculares (muestra inmunoreactividad positiva frente a GABA y Taurina).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que es posible realizar un estudio neuroquímico en retinas humanas previamente teñidas con la impregnación argéntica de Golgi e incluidas en Epon 812. Además es posible realizar este estudio no solamente sobre cortes histológicos a nivel de poblaciones heterogéneas, sino también en células que han sido previamente caracterizadas y seleccionadas. En este sentido las células de interés, una vez caracterizadas en retinas enteras e identificadas en las secciones transversales, pueden ser procesadas para determinar su contenido en diversos aminoácidos excitatorios e inhibitorios. Nuestros resultados también muestran que la utilización de diferentes parámetros morfológicos y topológicos ayuda a clasificar correctamente un alto porcentaje de células amacrinas, que muchas veces son difíciles de asignar a un tipo u otro, utilizando los esquemas más habituales.

A continuación se detallan en particular algunos otros aspectos de este estudio.

ELECCIÓN DEL MÉTODO DE GOLGI

El Golgi a diferencia de otras técnicas de visualización más modernas, da como resultado una preparación permanente, lo que nos permite estudiar las preparaciones sin peligro de que desaparezca o disminuya el marcaje. Además, en cada experimento se consigue la impregnación, en general, de un elevado número de células. Esto permite seleccionar diferentes poblaciones celulares, estudiarlas y establecer comparaciones entre ellas.

Desde que Santiago Ramón y Cajal utilizó ampliamente la "reazione nera" descrita por Camilo Golgi para describir los detalles de las células nerviosas (Ramón y Cajal 1888; 1892; 1904; 1914) esta técnica ha sido un referente obligado en la mayor parte de los laboratorios de neurociencia. A lo largo de los años se han desarrollado numerosas variaciones del protocolo original de Golgi (Cox 1891; Kopsch 1896; Ramón y Cajal 1933; Colonnier 1964), y muchos autores

han hecho variaciones que incluyen por ejemplo: la introducción del microondas o el vacío (Marani et al. 1987; Zhang et al. 2003; Friedland et al. 2006), cambios en el medio de inclusión (Blackstad et al. 1984; Kolodziejczyk et al. 1990), alteraciones en el método de fijación o la composición de las disoluciones (Morest y Morest 1966; Adams 1979; Grandin et al. 1988) o el control de otros factores como el pH (Angulo et al. 1996).

Durante nuestro estudio, hemos podido comprobar que la reproducibilidad del método de Golgi en retina humana depende en gran medida de un estricto control de las variables que actúan en la fase de cromación y de la adecuada combinación de los factores que influyen la difusión de los reactivos durante la etapa de impregnación como ha sido demostrado por otros autores para las tinciones cerebrales (Angulo et al. 1994; Angulo et al. 1996). Las diferentes variaciones desarrolladas para mejorar la técnica de Golgi consiguen variar el color de fondo de la preparación de verdoso a amarillento ajustando el tiempo de impregnación, y también la relación de células de glía teñidas respecto a las neuronas suprimiendo el hidrato de cloral. El método elegido tiñe menos células pero da como resultado un fondo más limpio, menos células gliales y una impregnación más completa de las células nerviosas.

Nuestros resultados muestran que la perfusión favorece el buen resultado de la impregnación y que el tiempo transcurrido hasta la llegada de los aldehídos al tejido es importante para el resultado de la técnica. Aunque se han conseguido buenos resultados en material animal obtenido inmediatamente post mortem tras fijarlo por inmersión, lamentablemente, cuando se trata de tejido humano procedente de donaciones al banco de órganos, este periodo es ampliamente variable, lo que aumenta la dificultad de obtener un buen resultado. Estudios recientes apuntan a la importancia de utilizar diferentes métodos de Golgi en función del procedimiento y tiempo de fijación (Rosoklija et al. 2003). En ellos sólo obtienen resultados óptimos con el Golgi de aldehídos, en tejidos fijados por largos periodos de tiempo y no obtienen mejores resultados tras la fijación por perfusión por cualquiera de las variantes empleadas, si bien se plantean una posible interacción debida a una perfusión previa con sulfuro sódico 50 mM. Sin embargo todavía son necesarios más estudios en este sentido. Por otro lado existen actualmente a la venta kits de tinción de Golgi que parecen tener buenos resultados en tejido nervioso humano (Meléndez-Ferro et al. 2009). Pese a todo ello, ninguna de estas técnicas ha sido empleada en estudios similares al presentado en la presente investigación, por lo que desconocemos si con ellos es posible obtener mejores resultados en retinas humanas y si después de estos procesamientos, se mantiene la antigenicidad de las muestras.

En este trabajo hemos puesto de manifiesto que las retinas humanas impregnadas por el método de Golgi-Colonnier incluso varias décadas atrás (Linberg et al. 1986; Kolb et al. 1992), pueden ser procesadas para estudios neuroquímicos. La fuerte fijación necesaria en esta tinción parece preservar el contenido neuroquímico de las muestras impregnadas postmortem independientemente de su antigüedad. Precisamente esa fijación hace necesarios anticuerpos ligados a glutaraldehído para detectarlos y junto al factor tiempo hacen que el procesamiento necesario deba ser realizado con especial cuidado para evitar la fragmentación de las muestras. Todo ello permite la realización de técnicas inmunocitoquímicas post-inclusión sobre cortes semifinos con excelentes resultados.

HIPÓTESIS SOBRE LA IMPREGNACIÓN DE GOLGI

El proceso por el cual el método de Golgi tiñe unas zonas y otras no, sigue siendo motivo de estudio. Algunas de las posibilidades que nos hemos planteado para explicar este fenómeno han sido las siguientes:

PENETRACIÓN DE LOS REACTIVOS

El hecho de que aun protegiendo la muestra entre papeles de filtro se suelen teñir más las capas superficiales podría deberse, al menos en parte, a la libre difusión de los reactivos en el tejido. Por ello ajustando el tiempo y la concentración de la induración con dicromato potásico en función de su tamaño de las muestras es posible optimizar los resultados.

Así mismo, el vítreo, puede aglutinar la solución de dicromato potásico, dificultando su libre difusión por el resto del tejido, por lo que se recomienda eliminar la mayor cantidad posible de vítreo. La observación de que la impregnación suele ser mejor en las zonas donde el vítreo no es apreciable, parece apoyar esta idea. Sin embargo, la difusión tisular por si sola no explica porque unas células se tiñen y otras no.

EL pH

Una de las hipótesis de formación del precipitado de plata resultante del método de Golgi presupone que durante la cromación, el cromo hexavalente del dicromato potásico se reduce por efecto de los aldehídos de la solución pasando a cromo trivalente (Angulo et al. 1994). Este cromo podría unirse al grupo carboxílico de las proteínas citosólicas, produciendo un entrecruzamiento de

proteínas cargado positivamente que atraería electrostáticamente al $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ sin oxidar, y este a su vez reaccionaría con el nitrato de plata para formar depósitos de Ag_2CrO_4 en forma de criptocristales tridimensionales que le darían sus características propiedades ópticas.

Durante todo el proceso de cromación el pH aumenta conforme disminuye el CrVI y se reduce a CrIII, lo que convierte al pH en un excelente indicador de esta reacción (Angulo et al. 1994). La velocidad a que se produce esta reacción redox depende a su vez de la presencia de un fuerte reductor -en nuestro caso la concentración previa de aldehídos en el tejido- la temperatura y el pH inicial. Sin embargo, aunque controlando estos factores podemos mejorar la probabilidad de un resultado óptimo, esta teoría de formación del precipitado de plata no explica porque unas células se impregnan y otras no, o cual podría ser la causa de la apariencia de la tinción en parches observada en algunas de nuestras muestras.

Por otro lado las posibles diferencias en la concentración de aldehídos en las diferentes capas o células, debidas a sus características específicas o a la técnica de fijación utilizada podrían explicar en parte nuestros resultados.

COMUNICACIONES INTRACELULARES

Existe la posibilidad de que sutiles cambios de pH intracelular debidos proceso de cromación, pudieran alterar la permeabilidad de las comunicaciones intercelulares con otras células (Spray 1996; Vaney et al. 1998; Bloomfield y Volgyi 2009) y favorecer en ellas de algún modo la impregnación. En las retinas impregnadas observamos frecuentes agrupaciones de células horizontales teñidas. Si bien, aunque suelen aparecer varias células de la misma clase en la misma muestra, a excepción de las horizontales, estas tinciones no muestran la continuidad entre las células impregnadas que seria esperable (Vaney 1991a).

CAUSAS HUMANAS

La influencia en el resultado de diversos factores relacionados a la donación, como el mantenimiento de los globos oculares antes de la extracción y hasta la recepción en el laboratorio, o la posible diferencia en las condiciones de la tinción, tales como la temperatura, pureza de reactivos, marcas, etc., está siendo revisada. Alguno o una combinación de estos factores podría explicar porque el resultado de la tinción de Golgi mostró una mayor variabilidad en las muestras de tejido humano, que en las de otros animales procesados para este y otros estudios.

Ninguna posibilidad de las anteriormente mencionadas tiene porque estar teñida con las demás pudiendo estar relacionadas más de una de ellas con los resultados de la técnica.

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS AMACRINAS

En las retinas de vertebrados pueden existir aproximadamente 30-50 tipos de células amacrinas que participan de una manera muy importante en la codificación de la información visual, sin embargo la identificación y clasificación de estas células, no es una tarea fácil. La dificultad, de encontrar células correctamente teñidas, representativas de todos los tipos de amacrinas, con una excentricidad comparable y al mismo tiempo lo suficientemente aisladas para poder ser estudiadas, limita considerablemente estos estudios.

El método de Golgi permite diferenciar diversos tipos de células amacrinas en retina humana. Estas células pueden clasificarse atendiendo al tamaño de su campo dendrítico en pequeñas (25-100 μm de diámetro), medianas (100-500 μm de diámetro) y grandes (más de 500 μm de diámetro). En nuestro estudio pudimos identificar gran parte de los tipos de células amacrinas previamente descritos (Kolb et al. 1981; Kolb et al. 1992), concentrándonos especialmente en las que presentaron mayores dificultades de identificación, las células amacrinas de pequeño campo dendrítico. Identificamos por ejemplo, células de amplio campo dendrítico pertenecientes a varios tipos de Semilunar y Estrelladas sinuosas "Stellate wavy", algunas amacrinas de campo mediano típicamente colinérgicas que son conocidas como células supernova o "Starburst", amacrinas del tipo arrosariada-espínosa o "Spiny-varicose" y enmarañadas difusas o "Wooly diffuse", así como varias amacrinas de campo dendrítico pequeño como por ejemplo los tipos AII, A8 y A5.

Además caracterizamos un nuevo tipo celular, que no había sido descrito previamente, al que hemos propuesto denominar como célula **Biestratificada Mediana** o "Medium bistratified", en función de su patrón de estratificación. Igual que sucede con las células de los tipos AII o A8, sus dendritas de estratifican separadamente en los estratos a y b de la plexiforme. Sin embargo, en el caso de las amacrinas MB no existen diferencias de grosor entre sus ramificaciones, aunque el plexo dendrítico de la sublámina a tiene una mayor longitud y el de la sublámina b parece más intrincado y con ramificaciones que presentan bucles en sus extremos. Estas células sólo fueron inmunoreactivas frente a Glicina, aunque no descartamos que puedan contener otros neurotransmisores y/o neuropéptidos.

En ocasiones fue difícil asignar cada una de las células a un tipo celular concreto, especialmente en las células de pequeño tamaño. Para facilitar su caracterización asumimos que la capa plexiforme interna esta dividida en 5 estratos del mismo grosor e intentamos estudiar las dendritas que alcanzaban cada estrato. Sin embargo, aunque parecía existir cierta tendencia, la estratificación no siempre coincidía con la teóricamente esperable, aportando mayor variabilidad. Esto podría explicarse por variaciones en la retracción de las diferentes capas de la retina, tal como ya ha sido observado en otros estudios (Linberg et al. 1987). En cualquier caso, todavía serán necesarios muchos esfuerzos para obtener una representación completa de todos los tipos de células amacrinas presentes en la retina humana.

PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

Numerosas técnicas y medidas han sido utilizadas por otros investigadores y por nosotros mismos para caracterizar las propiedades morfológicas y geométricas de las neuronas y sus ramificaciones. Una revisión de nuestro grupo (Climent y Fernández 2002) recopila algunas de las principales medidas que de forma resumida son:

MEDIDAS DEL TAMAÑO DEL SOMA

Una de las primeras variables medida en muchos estudios morfológicos es el tamaño del soma. En este contexto el área de la superficie del soma está relacionada con las propiedades electrofisiológicas de la célula (Rall 1977) y se correlaciona positivamente con el área dendrítica, la longitud y el volumen (Kolb y Nelson 1993).

Muchos estudios cuantitativos del soma neuronal se han basado principalmente en las medidas de sus diámetros mayor y menor, sin entrar a considerar irregularidades en la forma (Mannem 1975). Los valores obtenidos siguiendo este procedimiento, aunque fáciles de calcular son en casi todo los casos aproximaciones someras. Por ello, los métodos basados en la reconstrucción, como el de nuestro estudio, parecen más apropiados para determinar la forma y dimensión real del soma neuronal (Kolb y Dekorver 1991; Kolb y Nelson 1993; Fernández et al. 1994; Guiloff y Kolb 1994; Goede y Kolb 1995).

MEDICIONES GENERALES DE LOS ÁRBOLES DENDRÍTICOS

Es evidente que la cantidad de aferencias que puede recibir una neurona va a depender en gran medida de las dimensiones de su árbol dendrítico. En un análisis métrico bidimensional el tamaño del árbol dendrítico se estima por el área circunscrita por su proyección o por el mayor diámetro del campo dendrítico (Kolb 1982; Kolb et al. 1988; Amthor et al. 1989; Kolb et al. 1992; Fernández et al. 1994). Esas medidas son apropiadas sólo cuando el plano de proyección es el óptimo (ej., el plano sagital de una célula de Purkinge del cerebelo) o el campo dendrítico es prácticamente plano (ej., las células de la retina).

Otras variables usadas frecuentemente para describir aspectos generales de los árboles dendríticos son: el número de dendritas por neurona, número de segmentos terminales por neurona, grado topológico (*topological degree*), grado de asimetría, densidad dendrítica, media de segmentos terminales por dendrita, coeficiente de tortuosidad de las dendritas, distancia radial de los segmentos terminales y las bifurcaciones al soma o la longitud total de todos los segmentos (Leontovich 1975; Rall 1977; Horwitz 1981; Mandelbrot 1982; Uylings et al. 1986; Velte y Miller 1995; Zador et al. 1995; Peterson y Dacey 1999; Fernández y Jelinek 2001; Van Pelt et al. 2001).

ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE LOS SEGMENTOS DENDRÍTICOS

En esta clase de análisis generalmente se asume que las ramificaciones nerviosas son esencialmente binarias. Eso significa que los segmentos se reducen a líneas rectas y los puntos donde los segmentos se ramifican o terminan se convierten en puntos de bifurcación o extremos terminales. A pesar de que en teoría los puntos de ramificación podrían dar lugar a más de dos subramas, esto no es muy común, y en general las ramificaciones múltiples son consideradas agregaciones de varias bifurcaciones (Glaser et al. 1979; Percheron 1979; Berry et al. 1986; Verwer y Van Pelt 1986).

Existen básicamente dos grandes esquemas para clasificar los segmentos: un sistema de ordenación centrífugo y un sistema de ordenación centrípeto (Amthor et al. 1983; MacDonald 1983; Uylings et al. 1986). El sistema centrífugo empieza con el número de orden en el origen de la dendrita y el orden se incrementa hacia la periferia (la primera bifurcación desde el origen es llamada bifurcación de primer orden, la segunda de segundo orden, etc.) Por el contrario, el sistema de orden centrípeto empieza la numeración en los segmentos terminales y aumenta el orden hacia el origen dendrítico siguiendo distintos criterios (MacDonald 1983). En nuestro caso hemos utilizado el sistema

centrifugo que tiene la ventaja frente al centrípeto de que puede ser usado incluso cuando las partes periféricas del árbol dendrítico no están completas.

Una vez se conoce la posición y el patrón de conectividad de cada punto, es posible calcular parámetros métricos como el número de segmentos terminales (grado topológico), longitud del segmento, longitud total de las dendritas, número de segmentos por neurona, ángulos de ramificación, asimetría topológica y otras medidas relacionadas (Amthor et al. 1983; Van Pelt y Verwer 1986; Uylings et al. 1989; Montague y Friedlander 1991; Van Pelt et al. 2001). Todos estos parámetros han sido tenidos en cuenta en nuestra investigación.

ANÁLISIS FRACTAL DE LA FORMA NEURONAL

A través de estudios electrofisiológicos (Horwitz 1981) y de modelos dendríticos (Miller y Jacobs 1984) se ha demostrado que las alteraciones en el patrón de ramificación de una neurona pueden alterar drásticamente sus características eléctricas sin alterar de forma significativa sus parámetros simples (extensión del campo dendrítico, área dendrítica, longitud de los segmentos, número de segmentos terminales, grado topológico, etc.). Por ello, varios estudios han tratado de encontrar otra clase de análisis que ayude a describir las propiedades geométricas de los árboles dendríticos (Fernández et al. 1994).

La dimensión fractal de Mandelbrot o D (Caserta et al. 1995), es una de las medidas de complejidad dendrítica más ampliamente usada. La dimensión fractal es simplemente un número que denota un aspecto particular de las formas geométricas. Este parámetro se llama dimensión porque proporciona una medida de en que proporción rellena el espacio un objeto y se denomina fractal porque normalmente es una fracción y no un número entero. Por ejemplo, en el espacio bidimensional una D de 1 representaría una línea unidimensional, mientras que una D de 2 representaría un plano bidimensional que cubriría completamente toda el área. Dado que las células nerviosas vistas en dos dimensiones no son líneas rectas ni cubren totalmente el área bidimensional, su valor de D esta entre 1 y 2. Las neuronas con valores bajos de D , por ejemplo 1.3 tendrán relativamente pocas ramificaciones dendríticas y cubrirán el área bidimensional en menor medida que neuronas con mayor D como 1.7.

La dimensión fractal ha probado ser una medida útil de la complejidad morfológica y ha sido aplicada como descriptor objetivo de muchas estructuras naturales y procesos de crecimiento, incluyendo neuronas adultas y en desarrollo (Schierwagen 1986; Cutting y Garvin 1987; Montague y Friedlander 1989; Morigiwa et al. 1989; Smith et al. 1989; Caserta et al. 1990; Montague y

Friedlander 1991; Porter et al. 1991; Smith et al. 1991; Fernández et al. 1992; Fernández et al. 1994; Fernández et al. 1999; Moraes et al. 2000). Por todo ello la hemos considerado en nuestro estudio. Nuestros resultados sugieren que es una medida útil para cuantificar la complejidad morfológica, que por si sola es capaz de clasificar correctamente un 44% de nuestras células (ver tabla 6).

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

La incorporación de medidas morfométricas y topológicas cuantitativas, unidas a los parámetros clásicamente utilizados para caracterizar las células de la retina, facilita la discriminación de diferentes tipos celulares. En este contexto, cada una de las medidas parece ser sensible a aspectos específicos de las células que otras técnicas pueden pasar por alto. Sin embargo ninguna medida aislada es capaz de describir completamente todos los aspectos de las células, lo que sugiere que para separar un tipo celular de otro es preciso utilizar tantas variables como sea posible. Así por ejemplo, utilizando todas las medidas disponibles, el análisis discriminante es capaz de clasificar correctamente prácticamente el 100% de las células estudiadas.

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO DE LAS RETINAS HUMANAS

El método de Golgi induce la formación de depósitos intracitoplasmáticos de cromato de plata, que generalmente no afectan al núcleo celular. Estos depósitos permiten que las células marcadas puedan ser fácilmente identificadas en secciones transversales utilizando técnicas microscópicas de campo claro. Trabajos previos que combinaron esta impregnación argéntea con los métodos inmunocitoquímicos aprovecharon esta particularidad para estudiar la presencia de marcaje en el núcleo celular (Sherry y Yazulla 1993b).

Tal y como se asume en numerosos trabajos, el contenido detectable de los diversos aminoácidos se debe a un equilibrio entre las entradas y salidas, esto es, entre el metabolismo celular de producción y degradación y el transporte o difusión de la célula de estas sustancias. Por lo tanto ya que todas estas características se consideran específicas de cada tipo celular, sería esperable que existiera un fenotipo o firma inmunológica concreta para cada tipo celular (Marc et al. 1995; Kalloniatis et al. 1996; MacNeil y Masland 1998; Marc et al. 1998; Kalloniatis y Tomisich 1999; MacNeil et al. 1999; Masland 2001b; Jellali et al. 2002; Marc y Jones 2002; Masland 2003; Sun et al. 2003; Masland 2004; Jones et al. 2005; Jusuf et al. 2005; Díaz 2006; Gong et al. 2006). Sin embargo,

la no existencia de marcaje positivo para un determinado aminoácido no implica necesariamente que este no pueda tener transportadores o enzimas que lo sinteticen, tan sólo que el nivel basal de ese aminoácido en una célula no es constante.

El patrón general de tinción con anticuerpos frente a *GABA*, *Glicina*, *Glutamato* y *Taurina* en nuestras retinas procesadas con el método de Golgi se corresponde a lo descrito en la literatura (Davanger et al. 1991; Crooks y Kolb 1992; Sherry y Yazulla 1993b; Jellali et al. 2002; Casini et al. 2006).

En la distribución del *GABA* no se distinguió marcaje alguno en las capas externas de la retina. La presencia o no de *GABA* en las células horizontales presenta diferencias interespecíficas y ha sido discutida en numerosas ocasiones. (Agardh et al. 1987; Marc et al. 1995; Cuenca et al. 2000; Cueva et al. 2002; Casini et al. 2006; Gong et al. 2006). Estas diferencias ya fueron explicadas en otras especies por un posible reservorio de *GABA* menos estable en las horizontales (Sherry y Yazulla 1993b). En humano otros estudios asocian la presencia de *GABA* en horizontales a un posible papel metabólico durante el desarrollo, lo que explicaría su indetectable concentración en la retina adulta (Nag y Wadhwa 1997).

Después de estudiar la presencia, localización e intensidad del marcaje frente a los aminoácidos testados en las células impregnadas, observamos que entre los mismos tipos existe una considerable variación, sobre todo en lo relativo al marcaje que hemos denominado "periférico". Aunque en los estudios de Sherry y Yatzulla de 1993 se hablaba de una diferencia de intensidad de marcaje menor entre el núcleo y el citoplasma de las células en preparaciones de Golgi que en las preparaciones tradicionales de inmunocitoquímica, lo cierto es que nosotros hemos detectado esas diferencias en nuestras muestras. Además debido a que las zonas impregnadas de plata presentan cierta birrefringencia no podemos asegurar que esto no interfiera con la fluorescencia en esos puntos. Por todo ello a pesar de haber considerado el marcaje periférico de las células impregnadas este no ha sido tenido en cuenta a la hora de subdividirlas en tipos celulares.

En cuanto a la relación del tamaño del campo dendrítico con la presencia de *GABA* o *Glicina*, todas las células pequeñas estudiadas excepto las del tipo A2 han resultado ser positivas frente a *glicina*, sin embargo, la correlación respecto al *GABA* no fue tan evidente.

Nuestros resultados confirman la presencia de *glicina* en los tipos A1, A3, A4, A5, AII y A8 de la retina humana, con algunas novedades: las células AII y

A8 han resultado ser positivas también para glutamato, siendo ambos neurotransmisores más intensos en las A8. Por otro lado las células A3 a pesar de contener glicina, tienen una reacción inmunocitoquímica más intensa frente al GABA y también se marcaron levemente para glutamato.

Finalmente hemos encontrado un pequeño porcentaje de células amacrinas que no parecen poseer ninguno de los aminoácidos estudiados. Este resultado ha sido descrito previamente en otras especies (Marc et al. 1995), y las explicaciones más sencillas fueron que se tratara bien de células sin un nivel basal de glutamato, GABA o glicina, o bien de células no neurales o de células necróticas aisladas. En los experimentos de puesta a punto de la técnica, observamos que las retinas impregnadas con el método de Golgi parecían presentar una menor inmunoreactividad frente a los aminoácidos usando anticuerpos secundarios marcados con diaminobenzidina (DAB). Para evitar estos efectos optimizamos la concentración de cada uno de los anticuerpos en nuestro material y utilizamos anticuerpos secundarios fluorescentes. En cualquier caso, la presencia de células amacrinas no marcadas también podría deberse a la existencia de concentraciones de aminoácido muy bajas, que no fueran detectables con las técnicas utilizadas o bien a la presencia de otros neurotransmisores y/o neuromoduladores distintos de los utilizados en este estudio. Además, la existencia de una concentración variable de los aminoácidos no principales, que pudiera llegar a ser indetectable con las técnicas aplicadas, permitiría explicar el resto de diferencias encontradas con otros patrones de tinción.

Con todo ello y a pesar de los continuos avances, todavía son necesarios más estudios para obtener la información suficiente que nos permita caracterizar de manera inequívoca todos los tipos de células amacrinas de la retina humana.

CONCLUSIONES



1. La cuantificación de medidas morfométricas y topológicas es un proceso altamente fiable y reproducible.
2. La incorporación de criterios morfométricos y topológicos cuantitativos, unidos a los parámetros morfológicos clásicamente utilizados para caracterizar las células nerviosas, facilita la discriminación de diferentes tipos neuronales en la retina humana.
3. Las células de la retina, una vez caracterizadas con el método de Golgi, pueden ser estudiadas utilizando procedimientos inmunocitoquímicos para determinar la presencia de diversos aminoácidos excitatorios e inhibitorios.
4. Es posible detectar los aminoácidos GABA, Glicina Glutamato y Taurina en cortes semifinos de retinas humanas teñidos por el método de Golgi y reincluidos en Epon, usando estreptoavidinas marcadas con fluorescencia. Las señales obtenidas para todos los anticuerpos son similares a las obtenidas en retinas de otras especies de mamíferos.
5. La determinación de diferentes marcadores moleculares puede ayudar a identificar, caracterizar y clasificar con más precisión las células de la retina humana.
6. Aunque al estudiar cada una de las variables por separado no muestran un alto valor predictivo, considerar todas ellas simultáneamente permite clasificar de forma correcta un alto porcentaje de las células de estudio.
7. Todos estos resultados sugieren que para separar un tipo celular de otro es preciso utilizar tantas variables como sea posible: variables morfológicas cualitativas (localización, forma, varicosidades, espinas, etc.), cuantitativas (tamaño, ramificación, estratificación, sinuosidad, etc) y variables funcionales (dianas de proyección, campos receptivos, neurotransmisores, receptores, tipos de respuesta, etc). Un tipo neuronal podría estar representado por las células individuales que se agrupan como elementos semejantes dentro de este espacio multidimensional.

ANEXO I

MACRO PARA EL ESTUDIO DE LA TOPOLOGÍA CELULAR:

//
NEURON TOPOLOGY MACROS v. 2.3

Basado en Neurite Macros v.1.2 (por Charles Thomas, Integrated Microscopy Resource University of Wisconsin - Madison, 1675 Observatory Drive, Madison, WI 53706 (608) 263-6288)

Modificado 8/20/95 por Eduardo Fernández, Instituto de Neurociencias University of Alicante, Apdo. Correos 374. 03008 Alicante (Spain) E-Mail: Eduardo@VM.CPD.UA.ES

Traducido y adaptado el 24/Marzo/2003 por Raquel Climent Martínez, Dpto. Histología y Anatomía Universidad Miguel Hernández, Avd. Universidad s/n Elche, Alicante (Spain)

INSTRUCCIONES:

En esta modificación, es posible medir una a una todas las ramificaciones según el siguiente esquema:

- Abre en el NIH-Image el archivo a cuantificar.
- Con la herramienta "straight line" marca la barra de calibración.
- En analyze "set scale" pon micras en unidades e introduce la distancia real de la barra de calibrado.
- Carga esta macro usando "load macros" en el menú SPECIAL.
- Pon en marcha la macro "Initialize" pulsando F1.
- Con la herramienta de "selección poligonal" delimita el campo dendrítico uniendo las zonas más distales de las neuritas con un polígono convexo y pulsa F2.
- Con la herramienta "Freehand" (seleccionando la herramienta de línea y manteniendo pulsado el botón izquierdo del ratón aparece en el menú) Bordea el cuerpo celular y pulsa F3 " la selección se marcara en verde (color 2 del "lut options")
- Pulsa F4 los resultados de estas dos mediciones se grabaran como "filename.contours".
- Redibuja las dendritas pulsando F5 en cada doble intersección y F6 en los segmentos terminales. Si hubiera alguna triple intersección pulsa F9. Un número pequeño marcará el centro de cada nuevo segmento.
- Con F12 se borra el último resultado de la tabla (no el dibujo)
- Pulsa F7 para cambiar a otra dendrita principal.
- Con F11 se puede cambiar el número de la dendrita principal
- Pulsa F8 para Grabar los datos obtenidos como "filename.measurements" y Los trazos numerados como "filename.marked"

DATOS DE LAS COLUMNAS RESULTANTES:

COLUMNA 1= Coordenada x
 COLUMNA 2= Coordenada y
 COLUMNA 3= Numero de la ramificación
 COLUMNA 4= Longitud real
 COLUMNA 5= Numero de Dendrita Principal
 COLUMNA 6= Tipo de ramificación:
 1= ramificación normal (F5)
 2= ramificación Terminal (F6)
 3= Trifurcación (F9)
 COLUMNA 7= Longitud en línea recta

\\

VAR

left,top,width,height,tortuosidad,LineaRecta: integer;
 i, SegmentType, StructureNum,scale: integer;
 x1,y1,x2,y2,LineWidth:integer;
 microns:string;
 Initialized,invertir: boolean;
 PictureName: string;
 Answer: integer;

procedure LabelNeurite;

begin

GetRoi(left,top,width,height);
 GetLine(x1,y1,x2,y2,LineWidth);
 LineaRecta:=(sqrt(sqr(width)+sqr(height)))/scale;
 rUser1[i]:=SegmentType;
 //Set User1 array position to show SegmentType\\
 rUser2[i]:=LineaRecta;
 //Set User2 array position to show LineaRecta\\
 Measure; //Do the measurement\\
 MarkSelection; //Label line with Measurement number\\
 RestoreROI;
 DrawBoundary; //Mark the line\\
 KillROI;
 rArea[i]:=x2/scale;
 rMean[i]:=y2/scale;
 rAngle[i]:=StructureNum;
 rStdDev[i]:=i;
 UpdateResults;
 i:=i+1; //Increment our counter\\
 wait(.25);
 end; //LabelNeurite\\

```

macro 'Initialize [F1]';
begin
  SetPrecision(2,10);
  ResetCounter; //Clear the old measurements\\
  invertir:=false;
  InvertY(invertir);
  KillRoi;
  ChangeValues(255, 255, 1); //Set all 255 values in image to 1 = Color Rojo\\
  SetForegroundColor(3); //Dibujar en color azul\\
  SegmentType:=1;
  StructureNum:=1;
  i:=1;
  SetUser1Label('SegmentType');
  SetUser2Label('LineaRecta');
  rUser1[1] :=SegmentType;
  rUser2[1]:=LineaRecta;
  Initialized:=True;
  PictureName:=WindowTitle;
  //Set variable PictureName to the title of the window we're working in\\
  GetScale(scale,microns);
  if scale=1 then
    PutMessage ('You have to introduce the scale and Initialize again');
    exit;
  end;
end; //Initialize\\

macro 'Measure cell contour [F2]';
begin
  GetROI(left, top, width, height);
  if width = 0 then
    PutMessage('First outline the cell contour')
  else
    SetOptions('Area, Length, Major,Minor, X-Y Center,Angle'); //Set up Measurement options\\
    Measure;
    rAngle[i]:=scale;
    i:=i+1; //Increment our counter\\
    KillRoi;
  end;

macro 'Mark Cell Body [F3]';
begin
  GetROI(left, top, width, height);
  if width = 0 then
    PutMessage('First outline the cell body')
  else

```

```

SetForegroundColor(2); //Dibujar en color verde\\
  DrawBoundary; //Mark the line\\
SetOptions('Area, Length, Major,Minor, X-Y Center,Angle'); //Set up Measurement options\\
  Measure;
rAngle[i]=scale;
i:=i+1; //Increment our counter\\
end;

macro 'Save contours [F4]';
begin
  ShowResults;
  MoveWindow(250,250); //Works OK with a 17" Monitor\\
  SelectWindow('Results'); //Choose the results window\\
  SetExport('Measurements');
  Export('Disco duro:Carpeta:Subcarpeta:',PictureName, '.Con'); //Save the measurements\\
  //Si la carpeta especificada no existe deberás crearla antes\\
  PutMessage('File: ', PictureName, '.Contours,' saved to disk'); //Tell\\
  ResetCounter;
  SegmentType:=1;
  StructureNum:=1;
  i:=1;
end; //Save the Work\\

macro 'Label Segment [F5]';
begin
  If not Initialized then
    begin
      PutMessage("Use the INITIALIZE macro first.");
      exit;
    end; //Make sure we're initialized first\\
  SetOptions('User2, Length, User1, rArea, rMean, rStd. Dev., rAngle'); //Set up Measurement
options\\
  SegmentType:=1; //Segment with a bifucation point at the end\\

  LabelNeurite; //Measure and label the traced structure\\
end; //Neurite Labelling\\

macro 'Terminal Segment [F6]';
begin
  SetOptions('User2, Length, User1, rArea, rMean, rStd. Dev., rAngle'); //Set up Measurement
options\\
  SegmentType:=2; //Terminal segment\\
  LabelNeurite; //Measure and label the traced structure\\
end; //Terminal Segment\\

```

```
macro 'New main Dendrite [F7]';
begin
  Beep;
  ChangeValues(3,3, 2); //Set all 3 values in image to 2 = Color Verde\\
  StructureNum:=StructureNum+1;
  //Increment the structure number counter\\
end; //New main Dendrite\\
```

```
Macro 'Save the Work [F8]';
begin
  ChangeValues(1, 1, 0); // Uncomment this to save only markings\\
  ChangeValues(2,2, 3); //lo vuelve todo azul\\
  SetSaveAs('PICT');
  SaveAs('Disco duro:Carpeta:Subcarpeta:',PictureName, '.marked'); //Save the marked image\\
  ShowResults;
  MoveWindow(250,250);
  SelectWindow('Results'); //Choose the results window\\
  SetExport('Measurements');
  Export('Disco duro:Carpeta:Subcarpeta:',PictureName, '.Mea'); //Save the measurements\\
  PutMessage('Files: ', PictureName, ' saved to disk'); //Tell\\
  Dispose;
end; //Save the Work\\
```

```
macro 'Trifurcation [F9]';
begin
  SetOptions('User2, Length, User1, rArea, rMean, rStd. Dev., rAngle'); //Set up Measurement
options\\
  SegmentType:=3; //Trifurcation\\
  LabelNeurite; //Measure and label the traced structure\\
end; //Trifurcation\\
```

```
macro 'Copy Scale [F10]';
begin
  SetScale (scale, 'µm');
  PutMessage('Se copio la escala del trabajo anterior');
end; //Copy Scale\\
```

```
macro 'Cambiar Dendrita Principal [F11]';
begin
  StructureNum:=GetNumber('Número Dendrita principal:',StructureNum);
end;
```

```

macro 'Delete Measurement [F12]';
begin
  SetCounter (Rcount-1);
  //SegmentType:=1;
  StructureNum:=1;\
  i:=i-1;
  SetUser1Label('SegmentType');
  SetUser2Label('LineaRecta');
  rUser1[1] :=SegmentType;
  rUser2[1]:=LineaRecta;
  GetScale(scale,microns);
  if scale=1 then
    PutMessage ('You have to introduce the scale and Initialize again');
    exit;
  end;

macro 'Delete All Measurement [F14]';
begin
  Answer:=GetNumber('Si quieres borrar todas las medida escribe 1:',Answer);
  if Answer=1 then
    SetPrecision(2,10);
    ResetCounter; //Clear the old measurements\
    invertir:=false;
    InvertY(invertir);
    KillRoi;
    ChangeValues(2, 2, 1); //Set all 2 values in image to 1 = Color Rojo\
    ChangeValues(3, 3, 1); //Set all 3 values in image to 1 = Color Rojo\
    ChangeValues(255, 255, 0); //Borra los números en negro = Color Blanco\
    SetForegroundColor(3); //Dibujar en color azul\
    SegmentType:=1;
    StructureNum:=1;
    i:=1;
    SetUser1Label('SegmentType');
    SetUser2Label('LineaRecta');
    rUser1[1] :=SegmentType;
    rUser2[1]:=LineaRecta;
    Initialized:=True;
    PictureName:=WindowTitle;
    //Set variable PictureName to the title of the window we're working in\
    GetScale(scale,microns);
    if scale=1 then
      PutMessage ('You have to introduce the scale and Initialize again');
      exit;
    end;//fin confirmación escala\
  else
    wait(.30);
    exit; end;

```

ANEXO II

APORTACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS

Artículos

STRATEGIES FOR UNDERSTANDING THE FUNCTIONAL ARCHITECTURE OF VERTEBRATE RETINA.
Raquel Climent and Eduardo Fernández.
Recent Res. Devel. Optics, 2(2002): 411-425.

MAPPING OF THE HUMAN VISUAL CORTEX USING IMAGE-GUIDED TRANSCRANIAL STIMULATION.
Fernández, E; Tormos, J.M; Alfaro, A; Martínez, M; Martínez, O; Climent, R; Pascual-Leone, A.
Brain Research Protocols 10 (2002) 115-124.

A METHOD FOR SELECTIVE IMMUNOSTAINING OF GOLGI LABELLED NEURONS IN HUMAN RETINA.
Raquel Climent-Martínez; Helga Kolb; Eduardo Fernández
Journal of Neuroscience Methods. *En revisión* (2010)

PHENOTYPING INDIVIDUAL HUMAN AMACRINE CELLS: SEARCHING FOR IN AND OUT CLUES.
Climent R., Fernández E., Kolb H.
Visual research. *En preparación*.

Participación en proyectos de investigación

DESARROLLO DE NEUROPRÓTESIS VISUALES
FINANCIACIÓN: GRB103
DURACIÓN: 2006-2009
LUGAR: UMH

OBTENCIÓN DE FOTORRECEPTORES A PARTIR DE CÉLULAS PLURIPOTENCIALES Y SU POSIBLE PAPEL EN LA TERAPIA DE ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA
FINANCIACIÓN: FUNDALUCE
DURACIÓN: 2004-2006
LUGAR: UMH

CORTICAL VISUAL NEUROPROSTHESIS FOR THE BLIND.
FINANCIACIÓN: QLK6-CT-2001-00279.
DURACIÓN: 2001-2004
LUGAR: UMH

ELECTRODOS INTRACORTICALES PARA LA ESTIMULACIÓN CONTINUA DE LA CORTEZA CEREBRAL
BIOCOMPATIBILIDAD, SEGURIDAD Y EFICACIA.
FINANCIACIÓN: MAT2000-1049
DURACIÓN: 2000-2003
LUGAR: UMH

STUDY AND MODULATION OF CROSS-MODAL PLASTICITY IN THE BLIND: NEUROSCIENTIFIC BASIS FOR THE ENHANCED ADAPTATION TO BLINDNESS AND THE DEVELOPMENT OF A VIABLE VISUAL NEUROPROSTHESIS.

FINANCIACIÓN: ONCE
DURACIÓN: 1999-2000
LUGAR: UMH

MECANISMOS DE DEGENERACIÓN, REGENERACIÓN Y REPARACIÓN E EN UN MODELO EXPERIMENTAL DEGENERATIVO.

FINANCIACIÓN: CICYT SAF98-0098-CO2-02
DURACIÓN: 1998-2001
LUGAR: UMH

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA PREVENCIÓN DE LA MUERTE CELULAR NEURONAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFERO ADULTO EN UN MODELO NEURODEGENERATIVO.

FINANCIACIÓN: FUNDACIÓN UMH-BANCAJA
DURACIÓN: 1999-2000
LUGAR: UMH

ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO Y CIRCUITOS NEURONALES EN LA PLEXIFORME INTERNA DE LA RETINA, UN ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO, MORFOLÓGICO Y DE SIMULACIÓN NEURONAL

FINANCIACIÓN: DGICYT. PB 94/1509
DURACIÓN: 1995-1998
LUGAR: UMH

Comunicaciones a Congresos

PHENOTYPING SHAPE AND NEUROSUBSTANCE CONTENT OF RETINAL NEURAL TYPES: THE HUMAN AMACRINE CELLS.

Climent Martínez R., Fernández Jover E. & Kolb H.
5th. Forum of European Neuroscience. FENS Viena, 2006

CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS Y TOPOLÓGICAS DE LAS NEURONAS

Climent, R; Bongard, M; Ferrández, JM; Ammermüller, J; Kolb, H; Fernández, E.
Rev. Neurol 2003; 37(12):1172.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y NEUROQUÍMICA DE CÉLULAS AMACRINAS Y GANGLIONARES EN RETINAS DE VERTEBRADOS

Climent, R.; Kolb, H.; Ferrández, J.M.; Fernández, E
Rev. Neurol 2001; 33(9): 885.

AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES EN CÉLULAS AMACRINAS DE LA RETINA HUMANA

Climent, R.; Kolb, H.; Fernández, E.
Rev. Neurol 2000; 30 (3): 219.

AMINO ACID TRANSMITTER CONTENT OF HUMAN AMACRINE CELLS

Climent, R; Kolb, H.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39 (4), S981, Marzo 1998.

Estancias en otros centros de investigación

OPHTHALMOLOGY DEPARTMENT, JOHN MORAN EYE CENTER, Univ de Utah, EE.UU. Un año. 1997.
Desarrollo del proyecto de investigación "Amino Acid Transmitter Content of Amacrine Cells: A Study of The Human Retina. EY03323".

REFERENCIAS

- Adams, J. C. (1979). "A fast, reliable silver-chromate Golgi method for perfusion-fixed tissue." *Stain Technol* 54(4): 225-6.
- Agardh, E., Bruun, A., Ehinger, B., Ekstrom, P., van Veen, T. and Wu, J. Y. (1987). "Gamma-aminobutyric acid- and glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neurons in the retina of different vertebrates." *J Comp Neurol* 258(4): 622-30.
- Ahnelt, P. and Kolb, H. (1994). "Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi-light microscopic study of spectral connectivity." *J Comp Neurol* 343(3): 387-405.
- Ahnelt, P. K. and Kolb, H. (1992). "Color specific weighting of horizontal cell connections in the human retina." *Invest. Ophthalm. Vis. Sci. (Suppl.)*.
- Ammermüller, J. and Kolb, H. (1995). "The organization of the turtle inner retina. I. ON- and OFF-center pathways." *J Comp Neurol* 358(1): 1-34.
- Ammermüller, J., Müller, J. F. and Kolb, H. (1995). "The organization of the turtle inner retina. II. Analysis of color-coded and directionally selective cells." *J Comp Neurol* 358(1): 35-62.
- Ammermüller, J. and Weiler, R. (1981). "The ramification pattern of amacrine cells within the inner plexiform layer of the carp retina." *Cell Tissue Res* 220(4): 699-723.
- Ammermüller, J. and Weiler, R. (1988). "Physiological and morphological characterization of OFF-center amacrine cells in the turtle retina." *J Comp Neurol* 273(2): 137-48.
- Amthor, F. R., Oyster, C. W. and Takahashi, E. S. (1983). "Quantitative morphology of rabbit retinal ganglion cells." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 217(1208): 341-55.
- Amthor, F. R., Takahashi, E. S. and Oyster, C. W. (1989). "Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields." *J Comp Neurol* 280(1): 97-121.
- Angulo, A., Fernandez, E., Merchan, J. A. and Molina, M. (1996). "A reliable method for Golgi staining of retina and brain slices." *J Neurosci Methods* 66(1): 55-9.
- Angulo, A., Merchan, J. A. and Molina, M. (1994). "Golgi-Colonnier method: correlation of the degree of chromium reduction and pH change with quality of staining." *J Histochem Cytochem* 42(3): 393-403.
- Baccus, S. A. (2007). "Timing and computation in inner retinal circuitry." *Annu Rev Physiol* 69: 271-90.

- Berry, M., Sadler, M. and Flinn, R. (1986). "Vertex analysis of neural tree structures containing trichotomous nodes." *J Neurosci Methods* 18(1-2): 167-77.
- Blackstad, T. W., Osen, K. K. and Mugnaini, E. (1984). "Pyramidal neurones of the dorsal cochlear nucleus: a Golgi and computer reconstruction study in cat." *Neuroscience* 13(3): 827-54.
- Bloomfield, S. A. (1992). "Relationship between receptive and dendritic field size of amacrine cells in the rabbit retina." *J Neurophysiol* 68(3): 711-25.
- Bloomfield, S. A. (1994). "Orientation-sensitive amacrine and ganglion cells in the rabbit retina." *J Neurophysiol* 71(5): 1672-91.
- Bloomfield, S. A. and Volgyi, B. (2009). "The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina." *J Neurophysiol* 10(7): 495-506.
- Bongard, M., J. M. Ferrandez, et al. (2009). "The neural concert of vision." *Neurocomputing* 72: 814-819.
- Boycott, B. B. and Kolb, H. (1973). "The horizontal cells of the rhesus monkey retina." *J Comp Neurol* 148(1): 115-39.
- Boycott, B. B. and Wässle, H. (1991). "Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina." *Eur J Neurosci* 3(11): 1069-1088.
- Brandon, C. and Criswell, M. H. (1991). "Antiserum to lucifer yellow: preparation, characterization, and use for immunocytochemical localization of dye-filled retinal neurons." *J Histochem Cytochem* 39(11): 1547-53.
- Brivanlou, I. H., Warland, D. K. and Meister, M. (1998). "Mechanisms of concerted firing among retinal ganglion cells." *Neuron* 20(3): 527-39.
- Calkins, D. J., Sappington, R. M. and Hendry, S. H. (2005). "Morphological identification of ganglion cells expressing the alpha subunit of type II calmodulin-dependent protein kinase in the macaque retina." *J Comp Neurol* 481(2): 194-209.
- Calkins, D. J., Tsukamoto, Y. and Sterling, P. (1998). "Microcircuitry and mosaic of a blue-yellow ganglion cell in the primate retina." *J Neurosci* 18(9): 3373-85.
- Caserta, F., Eldred, W. D., Fernandez, E., Hausman, R. E., Stanford, L. R., Buldarev, S. V., Schwarzer, S. and Stanley, H. E. (1995). "Determination of fractal dimension of physiologically characterized neurons in two and three dimensions." *J Neurosci Methods* 56(2): 133-44.
- Caserta, F., Stanley, H. E., Eldred, W. D., Daccord, G., Hausman, R. E. and Nittmann, J. (1990). "Physical mechanisms underlying neurite outgrowth: a quantitative analysis of neuronal shape." *Phys. Rev. Lett.* 64: 95-98.
- Casini, G., Rickman, D. W. and Brecha, N. C. (2006). "Expression of the γ -Aminobutyric Acid (GABA) Plasma Membrane Transporter-1 in Monkey and Human Retina." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(4): 1682-1690.
- Chalupa, L. M. and Günhan, E. (2004). "Development of On and Off retinal pathways and retinogeniculate projections." *Progress in Retinal and Eye Research* 23(1): 31-51.

- Climent, R. and Fernandez, E. (2002). Strategies for understanding the functional architecture of vertebrate retina. Recent Research Developments in Optics. Kerala, India, Research Signpost. 2: 411-425.
- Colonnier, M. (1964). "The Tangential Organization of the Visual Cortex." *J Anat* 98: 327-44.
- Cook, J. E. (1998). Getting to grips with neuronal diversity: what is a neuronal type? Development and organization of the retina. L. M. Chalupa, Finlay B. New York, Plenum Press: 91-120.
- Cook, T. (2003). "Cell diversity in the retina: more than meets the eye." *Bioessays* 25(10): 921-5.
- Cox, W. (1891). "Impragnation des centralen Nervensystems mit Quecksilbersalzen." *Arch Mikr Anat* 98: 327.
- Crooks, J. and Kolb, H. (1992). "Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina." *J Comp Neurol* 315(3): 287-302.
- Cuenca, N., Deng, P., Linberg, K. A., Fisher, S. K. and Kolb, H. (2003). "Choline acetyltransferase is expressed by non-starburst amacrine cells in the ground squirrel retina." *Brain Res* 964(1): 21-30.
- Cuenca, N., Deng, P., Linberg, K. A., Lewis, G. P., Fisher, S. K. and Kolb, H. (2002). "The neurons of the ground squirrel retina as revealed by immunostains for calcium binding proteins and neurotransmitters." *J Neurocytol* 31(8-9): 649-66.
- Cuenca, N., Haverkamp, S. and Kolb, H. (2000). "Choline acetyltransferase is found in terminals of horizontal cells that label with GABA, nitric oxide synthase and calcium binding proteins in the turtle retina." *Brain Res* 878(1-2): 228-39.
- Cueva, J. G., Haverkamp, S., Reimer, R. J., Edwards, R., Wässle, H. and Brecha, N. C. (2002). "Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells." *J Comp Neurol* 445(3): 227-37.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Packer, O., Hendrickson, A. E. and Kalina, R. E. (1987). "Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry." *Science* 236: 579-582.
- Cutting, J. E. and Garvin, J. J. (1987). "Fractal curves and complexity." *Percept Psychophys* 42(4): 365-70.
- Dacey, D. M. (1993). "The mosaic of midget ganglion cells in the human retina." *J Neurosci* 13(12): 5334-55.
- Dacey, D. M. (1994). "Physiology, morphology and spatial densities of identified ganglion cell types in primate retina." *Ciba Found Symp* 184: 12-28; discussion 28-34, 63-70.
- Dacey, D. M. (1999). "Primate retina: cell types, circuits and color opponency." *Prog Retin Eye Res* 18(6): 737-63.
- Dacey, D. M. (2000). "Parallel pathways for spectral coding in primate retina." *Annu Rev Neurosci* 23: 743-75.

- Dacey, D. M. and Lee, B. B. (1994). "The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type." *Nature* 367(6465): 731-5.
- Dacey, D. M. and Packer, O. S. (2003). "Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry." *Curr Opin Neurobiol* 13(4): 421-7.
- Dacey, D. M., Peterson, B. B., Robinson, F. R. and Gamlin, P. D. (2003). "Fireworks in the primate retina: in vitro photodynamics reveals diverse LGN-projecting ganglion cell types." *Neuron* 37(1): 15-27.
- Dacheux, R. F. and Raviola, E. (1986). "The rod pathway in the rabbit: a depolarizing bipolar and amacrine cell." *J. Neurosci.* 6:: 331-345.
- Davanger, S., Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1991). "Glutamate, GABA and glycine in the human retina: An immunocytochemical investigation." *J. Comp. Neurol.* 311: 483-494.
- De Juan, J., Cuenca, N., Iniguez, C. and Fernandez, E. (1992). "Axon types classified by morphometric and multivariate analysis in the rat optic nerve." *Brain Res* 585(1-2): 431-4.
- Deng, P., Cuenca, N., Doerr, T., Pow, D. V., Miller, R. and Kolb, H. (2001). "Localization of neurotransmitters and calcium binding proteins to neurons of salamander and mudpuppy retinas." *Vision Res* 41(14): 1771-83.
- Diaz, E. (2006). "A functional genomics guide to the galaxy of neuronal cell types." *Nat Neurosci.* 9(1): 99-107.
- Dowling, J. E. (1987). The Retina: an approachable part of the brain. Cambridge, Massachusetts, The Belknap Press, Harvard University Press.
- Eglen, S. J., Raven, M. A., Tamrazian, E. and Reese, B. E. (2003). "Dopaminergic amacrine cells in the inner nuclear layer and ganglion cell layer comprise a single functional retinal mosaic." *J Comp Neurol* 466(3): 343-55.
- Famiglietti, E. V., Jr. and Kolb, H. (1976). "Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells." *Science* 194(4261): 193-5.
- Fernandez, E. (2008). "A Cortical Visual Neuroprosthesis for the Blind." *mst news* 4(08): 8-11.
- Fernandez, E., Alfaro, A., Tormos, J. M., Climent, R., Martínez, M., Vilanova, H., Walsh, V. and Pascual-Leone, A. (2002). "Mapping of the human visual cortex using image-guided transcranial magnetic stimulation." *Brain Res. Protocols* 10: 115-124.
- Fernandez, E., Bolea, J. A., Ortega, G. and Louis, E. (1999). "Are neurons multifractals?" *J Neurosci Methods* 89(2): 151-7.
- Fernandez, E., Cuenca, N. and De Juan, J. (1991). "A useful programme in BASIC for axonal morphometry with introduction of new cytoskeletal parameters." *J Neurosci Methods* 39(3): 271-89.
- Fernandez, E., Eldred, W. D., Ammermüller, J., Block, A., von Bloh, W. and Kolb, H. (1994). "Complexity and scaling properties of amacrine, ganglion, horizontal, and bipolar cells in the turtle retina." *J Comp Neurol* 347(3): 397-408.

- Fernandez, E., Ferrandez, J., Ammermüller, J. and Normann, R. A. (2000). "Population coding in spike trains of simultaneously recorded retinal ganglion cells." *Brain Res* 887(1): 222-9.
- Fernandez, E., Guiloff, G., Kolb, H., Ammermüller, J., Zhang, D. and Eldred, W. (1992). "Fractal dimension as a useful parameter for morphological classification of retinal neurons." *Invest. Ophthalm. Vis. Sci. Suppl.* 33: 940.
- Fernandez, E. and Jelinek, H. (2001). "Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages and potential problems." *Methods* 24: 309-321.
- Fernandez, E. and Kolb, H. (1993). "A method for selective intracellular labeling of immunostained neurons in turtle retina." *J Histochem Cytochem* 41(4):635-41.
- Fernandez, E., F. Pelayo, et al. (2005). "Development of a cortical visual neuroprosthesis for the blind: the relevance of neuroplasticity." *J Neural Eng* 2(4): R1-R12.
- Ferrandez, J. M., Ammermüller, J., Normann, R. A. and Fernandez, E. (1999). "Management of color and luminance information by a network of ganglion cells in turtle retina." *Lecture Notes Computer Science* 1607: 289-298.
- Ferrandez, J. M., Bongard, M., Garcia de Quiros, F., Bolea, J. A. and Fernández, E. (2002). "Neural coding analysis in retinal ganglion cells using information theory." *Lecture Notes Computer Science* 2415: 174-180.
- Ferrandez, J. M., Liano, E., Bonomini, P., Martinez, J. J., Toledo, J. and Fernandez, E. (2007). A Customizable Multi-channel Stimulator for Cortical Neuroprosthesis. *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE.*
- Fisher, S. K., Linberg, K. A. and Kolb, H. (1986). "A Golgi study of bipolar and horizontal cells in the human retina." *Suppl. Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 27:p. 203.
- Freed, M. A., Pflug, R., Kolb, H. and Nelson, R. (1996). "ON-OFF amacrine cells in cat retina." *J Comp Neurol* 364(3): 556-566.
- Friedland, D. R., Los, J. G. and Ryugo, D. K. (2006). "A modified Golgi staining protocol for use in the human brain stem and cerebellum." *J Neurosci Methods* 150(1): 90-5.
- Gallego, A. (1971). "Células interplexiformes en la retina del gato." *Arch. Soc. Esp. Oftal.* 31: 299-304.
- Germain, F., Fernandez, E. and de la Villa, P. (2003). "Morphometrical analysis of dendritic arborization in axotomized retinal ganglion cells." *Eur J Neurosci* 18: 1103-1109.
- Germain, F., Fernandez, E. and de la Villa, P. (2007). "Morphological signs of apoptosis in axotomized ganglion cells of the rabbit retina." *Neuroscience* 144(3): 898-910.
- Ghosh, K. K. and Grunert, U. (1999). "Synaptic input to small bistratified (blue-ON) ganglion cells in the retina of a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*." *J Comp Neurol* 413(3): 417-28.

- Ghosh, K. K., Martin, P. R. and Grunert, U. (1997). "Morphological analysis of the blue cone pathway in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*." *J Comp Neurol* 379(2): 211-25.
- Glaser, E. M., Van der Loos, H. and Gissler, M. (1979). "Tangential orientation and spatial order in dendrites of cat auditory cortex: a computer microscope study of Golgi-impregnated material." *Exp Brain Res* 36(3): 411-31.
- Goebel, D. J. and Pourcho, R. G. (1982). "Morphological and neurochemical characterization of individual retinal neurons: a combined Golgi and autoradiographic technique." *J Neurosci Methods* 6(4): 295-303.
- Goebel, D. J. and Pourcho, R. G. (1997). "Calretinin in the cat retina: colocalizations with other calcium-binding proteins, GABA and glycine." *Vis Neurosci* 14(2): 311-22.
- Goede, P. and Kolb, H. (1995). "Three-dimensional reconstruction and surface rendering of the five different spectral types of cone pedicle in the turtle retina." *J Neurosci Methods* 62(1-2): 83-8.
- Gong, J., Jellali, A., Mutterer, J., Sahel, J. A., Rendon, A. and Picaud, S. (2006). "Distribution of vesicular glutamate transporters in rat and human retina." *Brain Res* 1082(1): 73-85.
- Grandin, T., Demotte, O. D., Greenough, W. T. and Curtis, S. E. (1988). "Perfusion method for preparing pig brain cortex for Golgi-Cox impregnation." *Stain Technol* 63(3): 177-81.
- Greschner, M., Thiel, A., Kretzberg, J. and Ammermuller, J. (2006). "Complex spike-event pattern of transient ON-OFF retinal ganglion cells." *J Neurophysiol* 96(6): 2845-56.
- Guiloff, G. D. and Kolb, H. (1994). "Ultrastructural and immunocytochemical analysis of the circuitry of two putative directionally selective ganglion cells in turtle retina." *J Comp Neurol* 347(3): 321-39.
- Haverkamp, S., Kolb, H. and Cuenca, N. (2000). "Morphological and neurochemical diversity of neuronal nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the turtle retina." *Cell Tissue Res* 302(1): 11-9.
- Haverkamp, S. and Wässle, H. (2004). "Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3." *J Comp Neurol* 468(2): 251-63.
- He, S. and Masland, R. H. (1997). "Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells." *Nature* 389(6649): 378-82.
- Hendrickson, A. E., Koontz, M. A., Pourcho, R. G., Sarthy, P. V. and Goebel, D. J. (1988). "Localization of glycine-containing neurons in the Macaca monkey retina." *J Comp Neurol* 273(4): 473-87.
- Horwitz, B. (1981). "Neuronal plasticity: how changes in dendritic architecture can affect the spread of postsynaptic potentials." *Brain Res* 224(2): 412-8.
- Jakobs, T. C., Ben, Y. and Masland, R. H. (2003). "CD15 immunoreactive amacrine cells in the mouse retina." *J Comp Neurol* 465(3): 361-71.

- Jelinek, H. F. and Fernandez, E. (1998). "Neurons and fractals: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions?" *J Neurosci Methods* 81(1-2): 9-18.
- Jellali, A., Stussi-Garaud, C., Gasnier, B., Rendon, A., Sahel, J. A., Dreyfus, H. and Picaud, S. (2002). "Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina." *J Comp Neurol* 449(1): 76-87.
- Jones, B. W., Watt, C. B. and Marc, R. E. (2005). "Retinal remodelling." *Clin Exp Optom* 88(5): 282-91.
- Jusuf, P. R., Haverkamp, S. and Grunert, U. (2005). "Localization of glycine receptor alpha subunits on bipolar and amacrine cells in primate retina." *J Comp Neurol* 488(2): 113-28.
- Kalloniatis, M., Marc, R. E. and Murry, R. F. (1996). "Amino acid signatures in the primate retina." *J Neurosci* 16(21): 6807-29.
- Kalloniatis, M. and Tomisich, G. (1999). "Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina." *Prog Retin Eye Res* 18(6): 811-66.
- Kao, Y. H. and Sterling, P. (2003). "Matching neural morphology to molecular expression: single cell injection following immunostaining." *J Neurocytol* 32(3): 245-51.
- Kaplan, E. and Benardete, E. (2001). "The dynamics of primate retinal ganglion cells." *Prog Brain Res* 134: 17-34.
- Kawamura, S. (1994). "Molecular mechanism of light-adaptation in retinal photoreceptors." *Keio J Med* 43(3): 149-54.
- Keyser, K. T., MacNeil, M. A., Dmitrieva, N., Wang, F., Masland, R. H. and Lindstrom, J. M. (2000). "Amacrine, ganglion, and displaced amacrine cells in the rabbit retina express nicotinic acetylcholine receptors." *Vis Neurosci* 17(5): 743-52.
- Klump, K. E., Zhang, A. J., Wu, S. M. and Marshak, D. W. (2009). "Parvalbumin-immunoreactive amacrine cells of macaque retina." *Vis Neurosci* 26(3): 287-96.
- Kolb, H. (1982). "The morphology of the bipolar cells, amacrine cells and ganglion cells in the retina of the turtle *Pseudemys scripta elegans*." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 298(1092): 355-93.
- Kolb, H. (1991a). "Anatomical pathways for color vision in the human retina." *Vis Neurosci* 7(1-2): 61-74.
- Kolb, H. (1991b). "The neural organization of the human retina." In "Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision" (Eds. Heckenlively, J. and Arden, G.) Mosby Year Book, Inc. St. Louis: pp. 25-52.
- Kolb, H. (1994). "The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(5): 2385-404.
- Kolb, H. (1997). "Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles." *Eye* 11(Pt 6): 904-23.

- Kolb, H., Ahnelt, P., Fisher, S. K., Linberg, K. A. and Keri, C. (1989). "Chromatic connectivity of the three horizontal cell types in the human retina." *Suppl. Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 30:: p. 348.
- Kolb, H., Cuenca, N. and Dekorver, L. (1991). "Postembedding immunocytochemistry for GABA and glycine reveals the synaptic relationships of the dopaminergic amacrine cell of the cat retina." *J Comp Neurol* 310(2): 267-84.
- Kolb, H. and Dekorver, L. (1991). "Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: a study by electron microscopy and serial section reconstructions." *J Comp Neurol* 303(4): 617-36.
- Kolb, H., Fernandez, E. and Nelson, R. (2005). Webvision: The Neural Organization of Retina and Visual System (available at: <http://webvision.umh.es>).
- Kolb, H., Fernandez, E., Schouten, J., Ahnelt, P., Linberg, K. A. and Fisher, S. K. (1994). "Are there three types of horizontal cell in the human retina?" *J Comp Neurol* 343(3): 370-86.
- Kolb, H., Linberg, K. A. and Fisher, S. K. (1992). "Neurons of the human retina: a Golgi study." *J Comp Neurol* 318(2): 147-87.
- Kolb, H. and Marshak, D. (2003). "The midget pathways of the primate retina." *Doc Ophthalmol* 106(1): 67-81.
- Kolb, H. and Nelson, R. (1981). "Amacrine cells of the cat retina." *Vision Res* 21(11): 1625-33.
- Kolb, H. and Nelson, R. (1993). "OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina: II. Neural circuitry as revealed by electron microscopy of HRP stains." *J Comp Neurol* 329(1): 85-110.
- Kolb, H., Nelson, R., Ahnelt, P. and Cuenca, N. (2001). "Cellular organization of the vertebrate retina." *Prog Brain Res* 131: 3-26.
- Kolb, H., Nelson, R. and Mariani, A. (1981). "Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study." *Vision Res* 21(7): 1081-1114.
- Kolb, H., Perlman, I. and Normann, R. A. (1988). "Neural organization of the retina of the turtle *Mauremys caspica*: a light microscope and Golgi study." *Vis Neurosci* 1(1): 47-72.
- Kolb, H. and West, R. W. (1977). "Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat." *J Neurocytol* 6(2): 155-70.
- Kolb, H. and Zhang, L. (1997). "Immunostaining with antibodies against protein kinase C isoforms in the fovea of the monkey retina." *Microsc Res Tech* 36(1): 57-75.
- Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L. and Cuenca, N. (2002). "A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina." *J Comp Neurol* 453(2): 168-84.
- Kolodziejczyk, E., Serrant, P. and Fernandez-Graf, M. R. (1990). "A simple rapid method to slice biological specimens: an application for non-embedded and embedded Golgi-stained tissue." *J Neurosci Methods* 31(3): 183-6.

- Kopsch, F. (1896). "Erfahrungen über die Verwendung des Formaldehyds bei der Chromsilber-Impragnation." *Anat Anz* 11: 727.
- Lamb, T. D. and Pugh, E. N., Jr (2006). "Phototransduction, Dark Adaptation, and Rhodopsin Regeneration The Proctor Lecture." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(12): 5138-5152.
- Leontovich, T. A. (1975). Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology. M. Santini. New York, Raven Press.
- Lin, B. and Masland, R. H. (2006). "Populations of wide-field amacrine cells in the mouse retina." *J Comp Neurol* 499(5): 797-809.
- Linberg, K. A., Fisher, S. K. and Kolb, H. (1986). "A Golgi study of amacrine cells in the human retina." *Suppl. Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 27: P. 203.
- Linberg, K. A., Fisher, S. K. and Kolb, H. (1987). "Are there three types of horizontal cell in the human retina?" *Suppl. Invest. Ophthalm. Vis. sci.* 28:: p. 262.
- Linberg, K. A., Suemune, S. and Fisher, S. K. (1996). "Retinal neurons of the California ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*: a Golgi study." *J Comp Neurol* 365(2): 173-216.
- MacDonald, N. (1983). Trees and Networks in Biological Models. Chichester, Wiley.
- MacNeil, M. A., Heussy, J. K., Dacheux, R. F., Raviola, E. and Masland, R. H. (1999). "The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species." *J Comp Neurol* 413(2): 305-26.
- MacNeil, M. A., Heussy, J. K., Dacheux, R. F., Raviola, E. and Masland, R. H. (2004). "The population of bipolar cells in the rabbit retina." *J Comp Neurol* 472(1): 73-86.
- MacNeil, M. A. and Masland, R. H. (1998). "Extreme diversity among amacrine cells: implications for function." *Neuron* 20(5): 971-82.
- Mandelbrot, B. (1982). "The fractal geometry of nature." W.H. Freeman, New York.
- Mann, I. (1964). The development of the human eye. New York., Grune and Stratton.
- Mannem, H. (1975). Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology. M. Santini. New York, Raven Press.
- Marani, E., Guldmond, J. M., Adriolo, P. J., Boon, M. E. and Kok, L. P. (1987). "The microwave Rio-Hortega technique: a 24 hour method." *Histochem J* 19(12): 658-64.
- Marc, R. E. and Jones, B. W. (2002). "Molecular phenotyping of retinal ganglion cells." *J Neurosci* 22(2): 413-27.
- Marc, R. E., Murry, R. F. and Basinger, S. F. (1995). "Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons." *J Neurosci* 15(7 Pt 2): 5106-29.
- Marc, R. E., Murry, R. F., Fisher, S. K., Linberg, K. A., Lewis, G. P. and Kalloniatis, M. (1998). "Amino acid signatures in the normal cat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(9): 1685-93.

- Marchiafava, P. L. and Weiler, R. (1982). "The photoresponses of structurally identified amacrine cells in the turtle retina." *Proc. R. Soc. Lond. B.* 214: 403-415.
- Margalit, E. and Saddy, S. R. (2003). "Retinal and optic nerve diseases." *Artif Organs* 27(11): 963-74.
- Mariani, A. P. (1984a). "The neuronal organization of the outer plexiform layer in the primate retina." In "International Review of Cytology" 86:: 285-320.
- Mariani, A. P. (1984b). "Bipolar cells in monkey retina selective for cones likely to be blue-sensitive." *Nature* 308:: 184-186.
- Mariani, A. P. and Hokoc, J. M. (1988a). "Two types of tyrosine hydroxylase-immunoreactive amacrine cells in the rhesus monkey." *J. Comp. Neurol.* 276: 81-91.
- Martínez-Navarrete, G. C., Angulo, A., Martín-Nieto, J. and Cuenca, N. (2008). "Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans." *The Journal of Comparative Neurology* 511(4): 557-580.
- Masland, R. H. (1988). "Amacrine Cells." *TINS* 11: 405-410.
- Masland, R. H. (2001a). "The fundamental plan of the retina." *Nat Neurosci* 4(9): 877-86.
- Masland, R. H. (2001b). "Neuronal diversity in the retina." *Curr Opin Neurobiol* 11(4): 431-6.
- Masland, R. H. (2003). "Vision: The retina's fancy tricks." *Nature* 423(6938): 387-8.
- Masland, R. H. (2004). "Neuronal cell types." *Curr Biol* 14(13): R497-500.
- Masland, R. H. and Raviola, E. (2000). "Confronting complexity: strategies for understanding the microcircuitry of the retina." *Annu Rev Neurosci* 23:249-84.
- Mayor-Torroglosa, S., De la Villa, P., Rodriguez, M. E., Lopez-Herrera, M. P. L., Aviles-Trigueros, M., Garcia-Aviles, A., Miralles de Imperial, J., Villegas-Perez, M. P. and Vidal-Sanz, M. (2005). "Ischemia Results 3 Months Later in Altered ERG, Degeneration of Inner Layers, and Deafferented Tectum: Neuroprotection with Brimonidine" *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46(10): 3825-3835.
- Meister, M. (1996). "Multineuronal codes in retinal signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 609-14.
- Melendez-Ferro, M., Perez-Costas, E. and Roberts, R. C. (2009). "A new use for long-term frozen brain tissue: golgi impregnation." *J Neurosci Methods* 176(2):72-7.
- Menger, N. and Wässle, H. (2000). "Morphological and physiological properties of the A17 amacrine cell of the rat retina." *Vis Neurosci* 17(5): 769-80.
- Merabet, L. B., J. F. Rizzo, 3rd, et al. (2007). "'Who is the ideal candidate?': decisions and issues relating to visual neuroprosthesis development, patient testing and neuroplasticity." *J Neural Eng* 4(1): S130-5.
- Miller, J. P. and Jacobs, G. A. (1984). "Relationships between neuronal structure and function." *J Exp Biol* 112: 129-45.

- Miura, G., Wang, M. H., Ivers, K. M. and Frishman, L. J. (2009). "Retinal pathway origins of the pattern ERG of the mouse." *Experimental Eye Research* 89(1): 49-62.
- Montague, P. R. and Friedlander, M. J. (1989). "Expression of an intrinsic growth strategy by mammalian retinal neurons." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7223-7227.
- Montague, P. R. and Friedlander, M. J. (1991). "Morphogenesis and territorial coverage by isolated mammalian retinal ganglion cells." *J Neurosci* 11(5): 1440-57.
- Moraes, A. M., Oliveira, M. M. and Hokoc, J. N. (2000). "Retinal ganglion cells in the South American opossum (*Didelphis aurita*)." *J Comp Neurol* 418(2): 193-216.
- Morest, D. K. and Morest, R. R. (1966). "Perfusion-fixation of the brain with chrome-osmium solutions for the rapid Golgi method." *Am J Anat* 118(3): 811-31.
- Morigiwa, K., Tauchi, M. and Fukuda, Y. (1989). "Fractal analysis of ganglion cell dendritic branching patterns of the rat and cat retinae." *Neurosci Res Suppl* 10: S131-9.
- Morillas, C., S. Romero, et al. (2005). A computational tool to test neuromorphic encoding schemes for visual neuroprosthesis. 8th International Work-Conference on Artificial Neural Networks (IWANN 2005), Barcelona.
- Morillas, C. A., S. F. Romero, et al. (2007). "A design framework to model retinas." *Biosystems* 87(2-3): 156-63.
- Nag, T. C. and Wadhwa, S. (1997). "Expression of GABA in the fetal, postnatal, and adult human retinas: an immunohistochemical study." *Vis Neurosci* 14(3): 425-32.
- Naka, K. and Garraway, N. R. (1975). "Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. I. Classical morphology." *J Neurophysiol* 38(1): 53-71.
- Nelson, R. (1982). "AII amacrine cells quicken time course of rod signals in the cat retina." *J Neurophysiol* 47(5): 928-47.
- Nelson, R., Famiglietti, E. V., Jr. and Kolb, H. (1978). "Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina." *J Neurophysiol* 41(2): 472-83.
- Nelson, R., von Litzow, A., Kolb, H. and Gouras, P. (1975). "Horizontal cells in cat retina with independent dendritic systems." *Science* 189(4197): 137-9.
- Nelson, S. B., Sugino, K. and Hempel, C. M. (2006). "The problem of neuronal cell types: a physiological genomics approach." *Trends Neurosci* 29(6): 339-45.
- Nirenberg, S. and Latham, P. E. (1998). "Population coding in the retina." *Curr Opin Neurobiol* 8(4): 488-93.
- Normann, R. A., B. A. Greger, et al. (2009). "Toward the development of a cortically based visual neuroprosthesis." *J Neural Eng* 6(3): 035001.
- Osterberg, G. (1935). "Topography of the layer of rods and cones in the human retina." *Acta Ophthal. suppl.* 6:: 1-103.

- Percheron, G. (1979). "Quantitative analysis of dendritic branching. I. Simple formulae for the quantitative analysis of dendritic branching." *Neurosci Lett* 14(2-3): 287-93.
- Peterson, B. B. and Dacey, D. M. (1999). "Morphology of wide-field, monostратified ganglion cells of the human retina." *Vis Neurosci* 16(1): 107-20.
- Polyak, S. L. (1941). The Retina. Chicago, University of Chicago Press.
- Porter, R., Ghosh, S., Lange, G. D. and Smith, T. G. (1991). "A fractal analysis of pyramidal neurons in mammalian motor cortex." *Neurosci. Lett.* 130: 112-116.
- Pourcho, R. G. (1980). "Uptake of [3H]glycine and [3H]GABA by amacrine cells in the cat retina." *Brain Res* 198(2): 33-46.
- Pourcho, R. G. (1981). "Autoradiographic localization of [3H]muscimol in the cat retina." *Brain Res* 215(1-2): 187-99.
- Pourcho, R. G. and Goebel, D. J. (1985). "A combined Golgi and autoradiographic study of (3H)glycine-accumulating amacrine cells in the cat retina." *J Comp Neurol* 233(4): 473-80.
- Pourcho, R. G. and Goebel, D. J. (1988). "Substance P-like immunoreactive amacrine cells in the cat retina." *J Comp Neurol* 275(4): 542-52.
- Pourcho, R. G. and Owczarzak, M. T. (1991). "Connectivity of glycine immunoreactive amacrine cells in the cat retina." *J Comp Neurol* 307(4): 549-61.
- Pu, M. and Berson, D. M. (1992). "A method for reliable and permanent intracellular staining of retinal ganglion cells." *J Neurosci Methods* 41(1): 45-51.
- Rall, W. (1977). *Handbook of Physiology: The Nervous System: Cellular Biology of Neurons*. Bethesda, M.D., American Physiological Society. sect 1. vol I: 39.
- Ramón y Cajal, S. (1888). "Morfología y conexiones de los elementos nerviosos de la retina de las aves." *Rev. Trimestral de Histología* 1º Mayo 1888.
- Ramón y Cajal, S. (1892). "La rétine des vertebres." *La Cellule IX*, fasc. I: 121-225.
- Ramón y Cajal, S. (1904). Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Madrid, Imprenta y librería de Nicolás Moya.
- Ramón y Cajal, S. (1914). Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid.
- Ramón y Cajal, S., y De Castro, F. (1933). Elementos de la técnica micrográfica del sistema nervioso. Barcelona, Tipografía Artística, Madrid 1972.
- Rockhill, R. L., Euler, T. and Masland, R. H. (2000). "Spatial order within but not between types of retinal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5): 2303-7.
- Rodieck, R. W. (1973). "The Vertebrate Retina: principles of structure and function."
- Romero, S., F. Pelayo, et al. (2007). Reconfigurable retina like preprocessing platform for cortical visual neuroprosthesis. *Handbook of Neural Engineering*. M. Akay, Wiley-IEEE Press: 267-279.
- Rosoklija, G., Mancevski, B., Ilievski, B., Perera, T., Lisanby, S. H., Coplan, J. D., Duma, A., Serafimova, T. and Dwork, A. J. (2003). "Optimization of Golgi

- methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys." *J Neurosci Methods* 131(1-2): 1-7.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., Jiménez-López, M., Mayor-Torroglosa, S., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P. and Vidal-Sanz, M. (2010). "Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration." *Experimental Eye Research* 90(1): 168-183.
- Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Mayor, S., Holmes, T., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P. and Vidal-Sanz, M. (2009). "Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution." *Vision Research* 49(6): 637-647.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T. M., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P. and Vidal-Sanz, M. (2009). "A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats." *Vision Research* 49(1): 115-126.
- Sandell, J. H. and Masland, R. H. (1986). "A system of indoleamine-accumulating neurons in the rabbit retina." *J Neurosci* 6(11): 3331-47.
- Sandell, J. H. and Masland, R. H. (1989). "Shape and distribution of an unusual retinal neuron." *J Comp Neurol* 280(3): 489-97.
- Sarthy, V. P., Marc, R. E., Pignataro, L. and Tanaka, K. (2004). "Contribution of a glial glutamate transporter to GABA synthesis in the retina." *Neuroreport* 15(12): 1895-8.
- Schierwagen, A. K. (1986). *Chaos in biological systems. NATO ASI Series.* H. Degn, Holden, A.V., & Olsen, L.F, Plenum Press. A138: 191.
- Sherry, D. M. and Yazulla, S. (1993a). "GABA and glycine in retinal amacrine cells: combined Golgi impregnation and immunocytochemistry." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 342(1302): 295-320.
- Sherry, D. M. and Yazulla, S. (1993b). "Immunofluorescent identification of endogenous neurotransmitter content in Golgi-impregnated neurons." *J Neurosci Methods* 46(1): 41-8.
- Smith, T. G., Behar, T. N., Lange, G. D., Marks, W. B. and Sheriff, W., H. (1991). "A fractal analysis of cultured rat optic nerve glial growth and differentiation." *Neurosci.* 41: 159-166.
- Smith, T. G., Marks, W. B., Lange, G. D., Sheriff, W. H. and Neale, E. A. (1989). "A fractal analysis of cell images." *J. Neurosci. Meth.* 27: 173-180.
- Spray, D. (1996). Physiological properties of gap junction channels in the nervous system. *Gap junctions in the nervous system.* D. R. Spray DC, eds, Austin: RG Landes.: pp 39–59.
- Stevens, C. F. (1998). "Neuronal diversity: too many cell types for comfort?" *Curr Biol* 8(20): R708-10.
- Stryer, L. (1991). "Visual excitation and recovery." *J Biol Chem* 266(17): 10711-4.

- Sun, D., Rait, J. L. and Kalloniatis, M. (2003). "Inner retinal neurons display differential responses to N-methyl-D-aspartate receptor activation." *J Comp Neurol* 465(1): 38-56.
- Thiel, A., Greschner, M. and Ammermuller, J. (2006). "The temporal structure of transient ON/OFF ganglion cell responses and its relation to intra-retinal processing." *J Comput Neurosci* 21(2): 131-51.
- Uylings, H. B., Ruiz-Marcos, A. and Van Pelt, J. (1986). "The metric analysis of three-dimensional dendritic tree patterns: a methodological review." *J Neurosci Methods* 18(1-2): 127-51.
- Uylings, H. B. M., Van Pelt, J., Verwer, R. W. H. and McConell, P. (1989). Computer Techniques in Neuroanatomy. New York, Plenum Press.
- Van Buren, J. M. (1963). The retinal ganglion cell layer. Charles C, Thomas, Springfield, Illinois.
- Van Pelt, J., van Ooyen, A. and Uylings, H. B. (2001). "The need for integrating neuronal morphology databases and computational environments in exploring neuronal structure and function." *Anat Embryol (Berl)* 204(4): 255-65.
- Van Pelt, J. and Verwer, R. W. (1986). "Topological properties of binary trees grown with order-dependent branching probabilities." *Bull Math Biol* 48(2): 197-211.
- Vaney, D. I. (1985). "The morphology and topographic distribution of AII amacrine cells in the cat retina." *Proc. R. Soc. London. B* 224: 475-488.
- Vaney, D. I. (1990). "The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina." *Prog Retin Eye Res* 9: 49-100.
- Vaney, D. I. (1991a). "Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin." *Neurosci Lett* 125(2): 187-90.
- Vaney, D. I. (1991b). "The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina." *Prog Retin Eye Res* 9: 49-100.
- Vaney, D. I. (2002). "Retinal neurons: cell types and coupled networks." *Prog Brain Res* 136: 239-54.
- Vaney, D. I. and Hughes, A. A. (1990). Is there more than meets the eye. Vision: coding and efficiency Ch. 7. C. Blakemore. Cambridge, Cambridge: University Press 1990: 74-83.
- Vaney, D. I., Nelson, J. C. and Pow, D. V. (1998). "Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina." *J Neurosci* 18(24): 10594-602.
- Vaney, D. I. and Taylor, W. R. (2002). "Direction selectivity in the retina." *Curr Opin Neurobiol* 12(4): 405-10.
- Velte, T. J. and Miller, R. F. (1995). "Dendritic integration in ganglion cells of the mudpuppy retina." *Vis Neurosci* 12(1): 165-75.
- Verwer, R. W. and Van Pelt, J. (1986). "Descriptive and comparative analysis of geometrical properties of neuronal tree structures." *J Neurosci Methods* 18(1-2): 179-206.

- Wagner, H.-j. and Wagner, E. (1988). "Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): A Golgi study." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 321: 263-324.
- Wassle, H., Grunert, U., Chun, M. H. and Boycott, B. B. (1995). "The rod pathway of the macaque monkey retina: identification of AII-amacrine cells with antibodies against calretinin." *J Comp Neurol* 361(3): 537-51.
- Wassle, H., Voigt, T. and Patel, B. (1987). "Morphological and immunocytochemical identification of indoleamine-accumulating neurons in the cat retina." *J Neurosci* 7(5): 1574-85.
- West, R. W. (1976). "Light and electron microscopy of the ground squirrel retina: functional considerations." *J Comp Neurol* 168(3): 355-77.
- Wright, L. L. and Vaney, D. I. (2000). "The fountain amacrine cells of the rabbit retina." *Vis Neurosci* 17(1): 1145R-1156R.
- Yang, C. Y., Lukasiewicz, P., Maguire, G., Werblin, F. S. and Yazulla, S. (1991). "Amacrine cells in the tiger salamander retina: morphology, physiology, and neurotransmitter identification." *J Comp Neurol* 312(1): 19-32.
- Yau, K. W. (1994). "Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(1): 9-32.
- Zador, A. M., Agmon-Snir, H. and Segev, I. (1995). "The morphoelectrotonic transform: a graphical approach to dendritic function." *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1669-82.
- Zhang, H., Weng, S. J. and Hutsler, J. J. (2003). "Does microwaving enhance the Golgi methods? A quantitative analysis of disparate staining patterns in the cerebral cortex." *J Neurosci Methods* 124(2): 145-55.
- Zhang, L., Dekorver, L. and Kolb, H. (1992). "Immunocytochemical staining with antibodies against protein kinase C and its isozymes in the turtle retina." *J Neurocytol* 21(12): 833-45.