

RELACIONES MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS DE  
CELULAS HORIZONTALES DE Cyprinus carpio.  
REGISTRO Y MARCACION INTRACELULAR *In Vivo* CON  
TRAZADORES ENZIMATICOS.

TESIS

Entregada a la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Grado de  
MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGIA  
Facultad de Ciencias

por

SANDRO BUSTAMANTE DELGADO

Agosto, 1989

PROFESOR GUIA

ORLANDO GUTIERREZ COSTA



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N

T E S I S   D E   M A G I S T E R

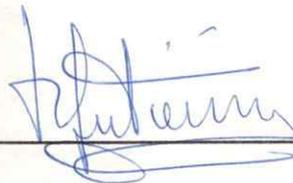
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Sandro Edgar Bustamante Delgado

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias con Mención en Biología

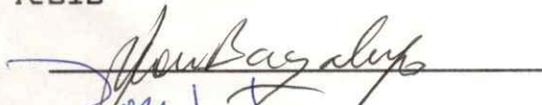
Tutor de la Tesis

Dr. Orlando Gutiérrez



Comisión Informante de Tesis

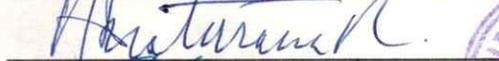
Dr. Juan Bacigalupo



Dr. Pedro Labarca



Dr. Humberto Maturana R.



Dr. Fernando Torrealba



A MIS PADRES



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Orlando Gutiérrez, mi tutor, por su guía y ayuda en mi formación profesional. Así también, extendiendo mis agradecimientos a Jorge Arroyo, por su desinteresada amistad y constante apoyo en estos años.



## INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
PROLOGO.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xiii

## INTRODUCCION

1. PREAMBULO.....	1
2. CELULAS HORIZONTALES.....	1
2.1. Morfología de las CH.....	1
2.2. Respuestas electrofisiológicas de las CH.....	6
3. RELACION FORMA-RESPUESTA.....	6
4. RETINAS IN VIVO.....	8
5. OBJETIVOS.....	9

## MATERIALES Y METODOS

1. PREPARACION DE RETINA IN VIVO.....	11
1.1. Electroretinograma.....	12
1.2. Operatoria.....	12
1.3. Registro Intracelular.....	13
1.4. Determinación de las CH.....	14
1.5. Inyección y procesamiento de la HRP.....	16
2. PREPARACION DE RETINA AISLADA.....	17



PARTE I  
REGISTRO E INYECCION INTRACELULAR CON HRP

1. REGISTROS INTRACELULARES.....	19
2. MICROINYECCIONES CON HRP.....	23
3. COMENTARIOS.....	24

PARTE II  
MARCACIONES MULTIPLES

1. MARCACIONES MULTIPLES CON UNA INYECCION UNICA DE HRP.....	28
2. COMENTARIOS.....	34

PARTE III  
MORFOLOGIA DE LAS CELULAS HORIZONTALES

1. MORFOLOGIA DE LAS CH EN RETINAS IN VIVO.....	40
2. CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS CH.....	45
3. DETERMINACION DEL AREA Y PERIMETRO CELULAR.....	46
4. TRATAMIENTO ESTADISTICO.....	47
5. EIDOMETRIA DE LAS CH.....	47
6. COMENTARIOS.....	52

PARTE IV  
RELACION FORMA-RESPUESTA

1. COINCIDENCIA DE LA RELACION FORMA-RESPUESTA.....	65
2. NO COINCIDENCIA DE LA RELACION FORMA-RESPUESTA.....	70
3. COMENTARIOS.....	75

PARTE V  
RETINA AISLADA

1. MORFOLOGIA Y RESPUESTAS DE CH EN RETINAS AISLADAS.....	79
2. COMENTARIOS.....	84

DISCUSION ..... 86  
REFERENCIAS..... 91

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Registro e Inyección Intracelular de HRP en Retinas In Vivo de Carpa ( <u>C. carpio</u> ).....	20
Tabla II. Registro e Inyección Intracelular de HRP en Retinas Aisladas de Carpa ( <u>C. carpio</u> ).....	21
Tabla III. Respuesta de CH en Retinas de Carpas Vivas Registradas Intracelularmente.....	22
Tabla IV. Valores de Perímetro, Area e Ie de 242 CH.....	49
Tabla V. Análisis de Frecuencia de Ie para 242 CH.....	53
Tabla VI. Análisis de Frecuencia Grupos I y II.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema y Corte Histológico de Retina.....	2
Figura 2. Respuestas Eléctricas de CH.....	7
Figura 3. Dibujo Composición Fotográfica Marcación Masiva...29	
Figura 4. Contacto Anatómico entre CH H2 y H3.....	32
Figura 5. Aparente Contacto entre una CH y una Célula Amacrina.....	33
Figura 6. CH Marcadas con una Inyección de HRP Extracelular Intraretiniana.....	35
Figura 7. CH's Teñidas con HRP Intracelularmente.....	41
Figura 8. Dibujo Cámara Lúcida de CH Tipos H1, H2, H3 e Intermedios.....	43
Figura 9. Histograma de Frecuencia del Ie de 242 CH.....	55
Figura 10. Valores de Ie de CH Usadas Como Prototipos.....	56
Figura 11. Histograma de Frecuencia y Ajuste de Frecuencia de CH.....	60
Figura 12. Respuestas Eléctricas de CH In Vivo con Correspondencia a su Forma.....	66
Figura 13. CH Cuyas Formas Están De Acuerdo a la Respuesta Registrada In Vivo.....	68
Figura 14. Respuestas Eléctricas de CH In Vivo sin Relación a su Forma.....	71
Figura 15. CH Cuyas Formas No se Relacionan con su Respuesta Registrada In Vivo.....	73
Figura 16. CH's Marcadas con HRP en Retina Aislada.....	80
Figura 17. Registro Electrofisiológico de CH en Retina Aislada.....	82

## PROLOGO

Muchos han sido los aportes de la fisiología de la retina al conocimiento de fenómenos fundamentales de la neurofisiología. Entre los más importantes está la identificación de los potenciales lentos y graduados como una expresión normal de actividad neuronal. En 1958, los potenciales S fueron descubiertos por MacNichol & Svaetichin en retina de teleósteos y pasaron a ser el tema dominante durante 12 años. En 1970, este interés fue transferido a las células horizontales de Cajal cuando se las identificó como generadoras de los potenciales S. Mucho se ha aprendido sobre las Células Horizontales. Sin embargo, aún hoy, permanecen rodeadas de misterio y los trabajos que sobre ellas se realizan siguen constituyendo investigaciones de frontera.

Este trabajo fue emprendido con plena conciencia de las dificultades por vencer. A la escasez de medios, se respondió con dispendio en tiempo y paciencia; se pudo explorar así alternativas omitidas por otros centros mejor dotados, pero no dispuestos a derrochar tan valiosos recursos. No puede sorprender, pues, que los resultados obtenidos aparezcan en cierto modo discordantes dentro del contexto general del tema. Esta circunstancia plantea delicados problemas de comunicación, lo cual no puede menos que reflejarse en la estructura de esta Tesis.

## RESUMEN

Las células horizontales (CH) son neuronas de segundo orden que establecen sinápsis laterales en la retina de los vertebrados. Están dispuestas tangencialmente entre las capas granular y plexiforme externas. Por razones de conveniencia, su estudio ha sido realizado de preferencia en preparaciones in vitro de retina de poiquilotermos, especialmente de teleósteos. Las CH de éstos se caracterizan por tener un axón fino y largo que termina en un ensanchamiento fusiforme. En Carassius (pez dorado) se ha clasificado a las CH en tres clases morfológicas (H1, H2 y H3), según el tamaño relativo del soma y la extensión del árbol dendrítico. Sus respuestas eléctricas así como las de CH de carpa (Cyprinus carpio) ante estímulos cromáticos también han sido clasificadas en tres tipos, sugiriéndose la existencia de una relación entre morfología y respuesta considerada válida para todos los teleósteos.

Con el propósito de obviar las limitaciones de las preparaciones aisladas, se procedió a inyectar peroxidasa de rábano (HRP) en CH identificadas por sus respuestas, en retinas de carpas vivas, paralizadas y mantenidas artificialmente en buenas condiciones fisiológicas. Después de varias horas de sobrevida, sus retinas fueron extraídas y procesadas con diaminobencidina. Se logró así, por primera

vez, obtener células marcadas completas con sus axones ensanchados. Consistentemente, las imágenes obtenidas mostraron grupos de CH de los diferentes tipos morfológicos en configuraciones múltiples, sugerentes de formas particulares de asociación entre ellas. Se evaluó la posible incidencia de artificios experimentales en la obtención de dichas configuraciones múltiples, concluyéndose que sólo es explicable mediante la existencia de algún mecanismo de paso transneuronal de la enzima. Estos resultados revelan el valor potencial de la HRP como trazador neuronal en el interior de la retina.

Se revisó la morfología de estas células por su importancia determinante en la relación forma respuesta y en la clasificación morfológica propiamente tal. Para ello se definió un índice eidométrico ( $I_e = P/2\sqrt{\pi \cdot A}$ ) que permite determinar objetiva y cuantitativamente el aspecto de una CH.

De la población de CH marcadas con HRP, 242 fueron dibujadas en cámara lúcida y sus contornos digitalizados. Se midió el perímetro P y el área A para calcular  $I_e$ . El histograma de frecuencias de  $I_e$  reveló una distribución bimodal, con un modo ajustado a una función de tipo lognormal y el otro en el límite de significación del test de Kolmogorov-Smirnov para la misma distribución. El primer grupo incluye al tipo morfológico H1 y el segundo, a H2 y H3. Estos resultados se compararon con los  $I_e$  obtenidos de micrografías

de CH de carpa y pez dorado publicadas para apoyar la clasificación vigente, encontrándose que en el caso del pez dorado la clasificación en tres clases surge de inmediato, pero para la carpa hay un estrecho acuerdo con los resultados aquí presentados. Se concluyó que en la retina de la carpa hay sólo dos poblaciones morfológicas de CH. Todo parece indicar que la morfología de estas células es especie dependiente.

Como consecuencia, fue preciso revisar la supuesta relación biunívoca entre forma y respuesta. Se encontraron suficientes ejemplos de respuestas de CH discrepantes con sus tipos morfológicos, lo que obliga a concluir que las relaciones asignadas no son definitivas y, al menos para la carpa, dichas relaciones deben ser reexaminadas.

## ABSTRACT

Horizontal cells (HC) are second order neurons establishing lateral connections in the vertebrate retina. They are tangentially disposed between the external granular and external plexiform layers. By reasons of convenience, their study has been mostly realized on in vitro preparations of poikilotherms, specially teleost retinas. A single thin and long axon ending in a fusiform expansion is a characteristic feature of the teleost's HC. In Carassius (goldfish) HC have been classified into three morphological types (H1, H2 and H3), according to the relative size of the soma and the extension of the dendritic tree. The electrical responses of carp HC to chromatic stimuli have also been classified into three kinds; hence, the existence of a relationship between morphology and responses was proposed, and has been considered valid for all teleosts.

In order to obviate the limitations of the isolated retina preparation, horseradish peroxidase (HRP) was injected into HC identified by their responses, in the retina of paralyzed and artificially maintained live carps (Cyprinus carpio). After several hours of overlife, their retinas were excised and processed by the diaminobencidine method. In this way, and for the first time, complete HRP labeling of cells with their expanded axons could be obtained. However, instead

of single isolated cells, images showed several HC of different morphological classes in varied configurations, suggesting particular forms of association among them. The possible incidence of experimental artifacts on these results was evaluated, concluding that they could be best explained by the existence of some mechanism of transneuronal migration of the enzyme. These results reveal the potential value of the HRP as a neuronal tracer within the retina.

The large population of labeled HC permitted a reevaluation on a firmer basis of their morphological distribution, of determinant importance concerning the assumed morphology-response relationship. For this purpose, an eidometric index ( $I_e = P/2\sqrt{\pi \cdot A}$ ) was defined that could objectively and quantitatively determine the aspect of an HC.

Thus, 242 HRP labeled HC were drawn by means of a camera lucida and their contour digitalized. The perimeter P and the area A were measured to calculate  $I_e$ . The frequency histogram of  $I_e$  revealed a bimodal distribution. One of the modes was closely fitted by a lognormal function, and the other mode at the significance limit given by the Kolmogorov-Smirnov test for the same distribution. The first group includes the morphological type H1 and the second, types H2 and H3. These results were compared to those obtained from micrographs of HC from both carp and goldfish, published in support of the actual classification. Goldfish data fitted the classification

onto three classes. Carp data, instead, accorded rather to the results presented here, which lead us to conclude that there are only two morphological groups in the carp retina. The morphology of these cells thus appears to be more strongly species-dependent than previously assumed.

Consequently, the assumed biunivocal relationship between morphology and responses was examined. Several examples of HC responses in discrepancy with their morphological classes were found, forcing us to conclude that the assigned relations are not definitive and, at least for the carp, should be reexamined.

## INTRODUCCION

### 1. PREAMBULO.

La visión de los vertebrados nació en el agua con algún pez ancestral, asentada en un ojo cuyos orígenes y primeros desarrollos se ignoran. El ojo de los vertebrados ha preservado con notable fijeza sus rasgos característicos a través de la radiación evolutiva, mientras exhibe una no menos notable versatilidad en sus respuestas adaptativas a las más diversas condiciones ambientales. Los ambientes acuáticos son variadísimos; lo son también los modos de vida de los peces y sus adaptaciones visuales, reconocibles no tanto por peculiares conformaciones del globo ocular, sino por la estructura y función de la retina, en especial de la retina distal. Es en esta zona donde se encuentran las células horizontales (CH), estableciendo complejos contactos laterales en relación con el primer campo sináptico de la retina.

### 2. CELULAS HORIZONTALES.

#### 2.1. Morfología de las CH.

La retina de los Teleósteos (como la de todo vertebrado) está constituida de manera tal que sus células se encuentran estratificadas en cinco zonas o capas (Figura 1). En el espesor de la retina, desde el lado corioidal hacia el vitreal, se sitúa primero la Capa Nuclear Externa, en la que

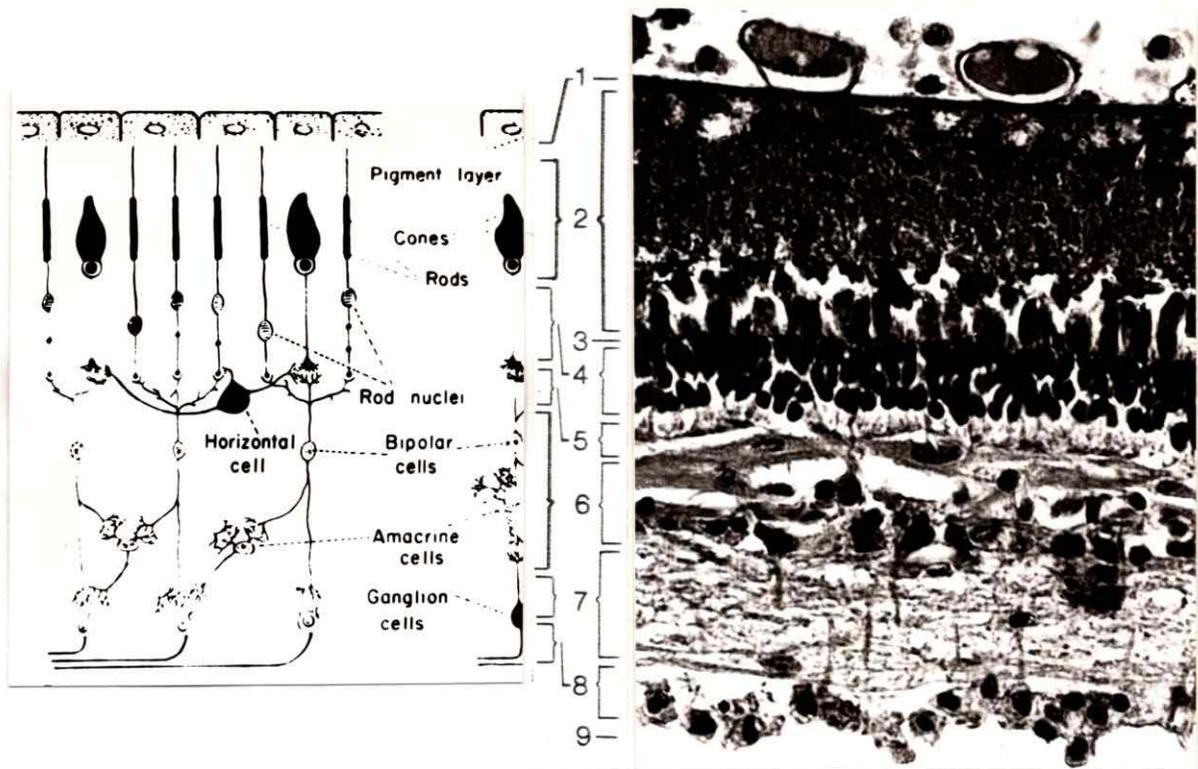


Figura 1

Izquierda: esquema de la organización neuronal de la retina de vertebrados (tomado de A.C. Guyton). Derecha: corte histológico de una retina de carpa (*C. carpio*), teñido con la técnica de Azul de Heidenhain, en el que se puede distinguir las distintas neuronas y capas que configuran la retina.

(1) Epitelio Pigmentado, (2) Capa de Conos y Bastones, (3) Membrana Limitante Externa, (4) Capa Nuclear Externa, (5) Capa Plexiforme Externa, (6) Capa Nuclear Interna, (7) Capa Plexiforme Interna, (8) Capa Ganglionar, (9) Membrana Limitante Interna.

se ubican los núcleos de los fotoreceptores; conos y bastones están en cantidades variables según la especie. La Capa Plexiforme Externa es una zona rica en contactos sinápticos entre fotoreceptores, células bipolares y CH; en la Capa Nuclear Interna se sitúan los somas de las CH, bipolares, amacrinas y células interplexiformes, además de los contactos sinápticos (químicos y eléctricos) entre éstas células. La Capa Plexiforme Interna es la segunda zona de contactos sinápticos, establecidos entre células bipolares, amacrinas, células interplexiformes y las células ganglionares. Por último, la Capa de Células Ganglionares está formada principalmente por células ganglionares, cuyos axones conforman el nervio óptico pero, según la especie, es posible encontrar algunas amacrinas desplazadas.

Así pues las CH, neuronas de segundo orden situadas en la capa nuclear interna (Ramón y Cajal, 1893; Stell, 1967), participan en la modulación de los campos receptivos de las células bipolares (Toyoda & Tonosaki, 1978; Mangel & Dowling, 1987), en la fijación de los estados de adaptación de la retina (Witkovsky et al., 1988) y, a través de ellos, en la generación de los potenciales rápidos del electroretinograma (Alcayaga et al., 1989). Estudios de microscopía fina han determinado que entre éstas y fotoreceptores y células bipolares hay sinápsis químicas (Stell, 1965, 1967; Fisher & Boycott, 1974; Ohtsuka & Kouyama, 1986; Boycott et al., 1987;

Marshak and Dowling, 1987). En retina de peces teleósteos se han distinguido tres tipos morfológicos de CH asociadas a conos, H1, H2 y H3 (Stell, 1975; Stell & Lightfoot, 1975; Weiler, 1978) y otro tipo, H4, asociado a bastones (Kaneko & Yamada, 1972; Hashimoto et al., 1976). La clasificación se basa en el tamaño y forma del soma y en la extensión y riqueza de la ramificación dendrítica, revelados por la técnica histológica de impregnación Golgi (Stell, 1975; Weiler, 1978). Stell & Lightfoot (1975) trabajando en el pez dorado, separaron a las CH entre H1 y H2 tanto en montaje plano de las retinas, como en secciones verticales. En ocasiones las células tipo H2 y H3 parecen similares en sección vertical, pero siempre se diferencian en montaje plano. Weiler (1978), usando el mismo método de montaje en retinas de carpa, realizó una clasificación morfológica similar de CH.

Las CH dependientes de conos poseen un axón largo, fino y ocasionalmente varicoso, terminado en un gran ensanchamiento fusiforme que establece sinápsis químicas con células bipolares en la capa plexiforme interna (Marshak & Dowling, 1987). No es claro que las CH dependientes de bastones tengan axones; recientemente Tsukamoto et al. (1987) han aportado algunos datos al respecto, señalando que pueden tener un axón fino y corto, sin el ensanchamiento final.

Experimentos de inyección intracelular, tanto de

corriente eléctrica como de colorantes fluorescentes, han demostrado que entre CH hay interconexiones mediadas por gap-junctions (Naka & Rushton, 1967; Kaneko, 1971; Hassin, 1979; Witkovsky et al., 1979; Kretz et al., 1982; Kaneko & Stuart, 1984; Kouyama & Watanabe, 1986). Kaneko & Stuart (1984), mostraron que el colorante fluorescente inyectado en dichas células difunde a células vecinas del mismo tipo. Marc et al. (1988) introdujeron el término acoplamiento homólogo, para señalar el hecho que en heterotermos, células retinianas de una misma categoría morfológica se conectan entre sí a través de gap-junctions. Este fenómeno no es exclusivo del soma de la neurona; se ha encontrado asimismo gap-junctions entre los terminales axonales, que mediarían una vía de información diferente (Kouyama & Watanabe, 1986; Yagi, 1986). Se ha dado el nombre de espacio S a la extensión física de CH interconectadas, las que configuran un "sincicio funcional" que hace que el campo receptivo de las CH sobrepase el tamaño físico de éstas (Naka & Rushton, 1967). Se sabe que la extensión del espacio S es modulable por dopamina y sus agonistas (Cohen & Dowling, 1983; Teranishi et al., 1984), como asimismo por los diferentes estados de adaptación a luz y oscuridad (Mangel & Dowling, 1985, 1987; Torqvist et al., 1988; Yang et al., 1988 a,b). El efecto aminérgico se manifiesta en que el colorante fluorescente inyectado permanece en la célula inyectada, sin difundir hacia las

vecinas (Teranishi et al., 1984; Negishi et al., 1984).

## 2.2. Respuestas electrofisiológicas de las CH.

Electrofisiológicamente, las CH responden ante la estimulación luminosa de los receptores con potenciales lentos y graduados, con un patrón característico de hiperpolarizaciones y despolarizaciones que permite su identificación fisiológica (MacNichol & Svaetichin, 1958; Naka & Rushton, 1966 a, b, c). De acuerdo a esto, se las clasifica en dos tipos (Figura 2): CH de tipo L, o de luminosidad, aquellas cuya respuesta es siempre una hiperpolarización, independiente de la longitud de onda de la luz de estímulo y CH de tipo C, o de cromaticidad, aquellas que responden ya sea hiperpolarizándose en la porción inferior y media y despolarizándose en la porción superior del espectro (C1), o bien hiperpolarizándose en los extremos y despolarizándose en el centro del espectro (C2) (Naka & Rushton, 1966, a, c).

## 3. RELACION FORMA-RESPUESTA.

La existencia entre CH de conos de tres categorías morfológicas y tres categorías fisiológicas, sugirió la existencia de posibles relaciones entre ellas. La información directa se buscó con experimentos de registro y marcación intracelular con colorantes fluorescentes. De este modo, se ha determinado que a las células del tipo H1 se les puede asociar una respuesta de tipo L, en tanto que a las células del tipo

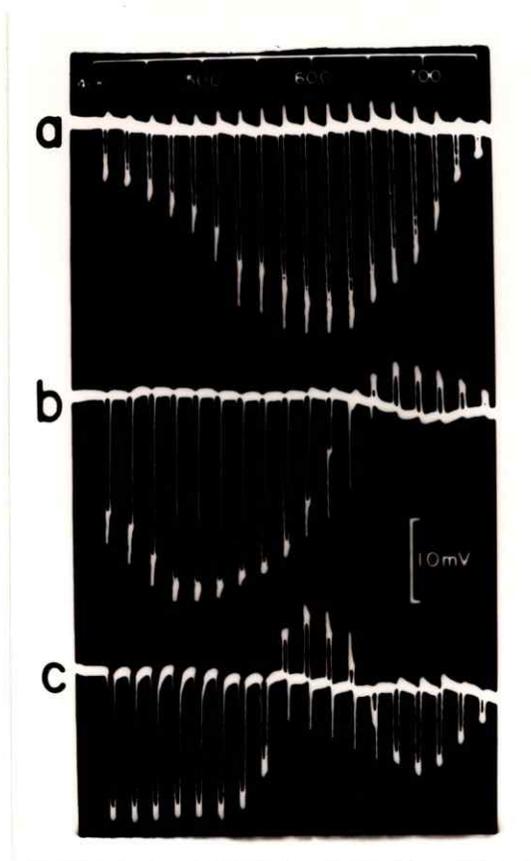


Figura 2

Registros de los tres tipos de respuesta espectral o potenciales S, generados por las células horizontales en la retina de la carpa. a: tipo L o de Luminosidad; b: tipo C1 o de Cromaticidad bifásica; c: tipo C2 o de Cromaticidad trifásica. La escala sobre los registros representa longitudes de onda del espectro visible, en nm (tomado de Tomita).

H2 y H3 se les puede asociar respuestas de tipo C. Las CH de bastón, H4, muestran respuestas similares a las de tipo L, pero con un umbral menor y con diferente sensibilidad espectral (Weiler, 1978); se las denomina respuestas de tipo L escotópicas, para diferenciarlas de las anteriores, que son respuestas de tipo L fotópicas.

En ocasiones se ha empleado como trazador la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que pese a difundir más lentamente dentro de la célula inyectada que los colorantes fluorescentes, ha mostrado tener ventajas en este tipo de experimentos (Kretz et al., 1982; Ogden et al., 1984, 1985; Djamgoz et al., 1985; Tsukamoto et al., 1987), pues se obtiene una tinción semejante al Golgi, con alta resolución de los límites de la célula inyectada.

#### 4. RETINAS IN VIVO.

Hasta la fecha, se ha trabajado en órgano aislado, una preparación experimental a la cual se le ha sacado provecho en toda su potencialidad. No obstante, una de las dificultades inherentes de la preparación es la precariedad de mantención de su estado metabólico. El método que permite obviar, hasta cierto punto, esta limitante es la utilización de la preparación de retina in vivo. Aunque no libre de dificultades técnicas, se la ha utilizado previamente con éxito en registros intracelulares en retina de carpa (Gutiérrez et al.,

1983; Yang & Kaneko, 1983; Bustamante & Gutiérrez, 1988). Nuestra preparación, en particular, presenta la ventaja adicional de permitir la recuperación integral del animal experimental.

Es así que, utilizando la preparación de retina de carpa in vivo, CH marcadas por una inyección intracelular de HRP en células previamente identificadas por sus respuestas y tras períodos prolongados de sobrevida, mostraron falta de correspondencia entre el tipo de respuesta registrada y el tipo morfológico marcado por el trazador. Más aún, se ha encontrado que en experimentos similares de larga sobrevida en retina de carpa, no se puede confinar la HRP a la célula inyectada; la enzima migra a las células en torno al punto de inyección, configurando agrupaciones de CH de varios tipos morfológicos (Gutiérrez, 1988; Bustamante et al., 1989), no posibles de mostrar con la metodología tradicional.

Finalmente, el examen fino de las CH de la carpa teñidas con HRP, muestran tipos morfológicos difíciles de clasificar en alguna de las tres categorías reconocidas, pues parecen ocupar un lugar intermedio entre éstas.

## 5. OBJETIVOS.

El objetivo general de la presente tesis consistió en reexaminar las relaciones entre los aspectos electrofisiológicos y morfológicos de las CH. Mediante la

aplicación de técnicas de registro y marcación intracelular en retinas de peces vivos, se espera contribuir con nuevos antecedentes para afinar los conceptos actuales configurados por el uso de preparaciones de retina aislada in vitro.

Los objetivos inmediatos fueron:

1º Desarrollar los procedimientos que permitieran adaptar la preparación de registros intracelulares en retinas de peces vivos, a la realización de microinyecciones de HRP.

2º Reexaminar la clasificación morfológica de CH, conocidas solo por la selectividad inespecífica de la tinción Golgi y la baja resolución de las marcas con tinte fluorescente, usando un método de clasificación cuantitativa de la forma celular.

3º Relacionar estos antecedentes con las respuestas electrofisiológicas de las CH, pues se ha propuesto una correlación entre morfología y tipo de respuesta que ignora el reducido espacio físico y alto grado de empaquetamiento celular de la retina, factor que podría jugar un rol importante en la determinación de la forma, no necesariamente ligada a las propiedades funcionales de las células.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. PREPARACION DE RETINA IN VIVO.

Los experimentos fueron realizados en 114 ejemplares adultos de carpa (Cyprinus carpio), pez teleósteo de amplia distribución geográfica, resistente a ambientes extremos, con pupila de gran tamaño e iris no reactivo a la luz. La retina de la carpa y del pez dorado (C. auratus) han sido los principales modelos usados para el estudio, tanto de las CH como de otras interneuronas retinianas de vertebrados.

Los peces fueron capturados en pozas y lagunas de la zona central y mantenidos en una pileta al aire libre. Un día antes del experimento eran trasladadas al acuario del laboratorio y se las examinaba para comprobar que estuviesen libres de heridas, hongos y parásitos; con la ayuda de un oftalmoscopio se verificaba la ausencia de descoloraciones o malformaciones en el fondo del ojo.

La preparación del animal para la sesión experimental ha sido parcialmente descrita con anterioridad (Gutiérrez et al., 1983). Esta consiste en paralizar al pez con cloruro de d-Tubocurarina (2 mg/Kg de peso corporal, intramuscular). El pez paralizado se colocó en decúbito lateral en un contenedor plástico especialmente diseñado, sujeto con una banda de goma por detrás de los opérculos y con un cepo plástico que lo inmoviliza. Esponjas empapadas permitieron mantenerlo

constantemente húmedo. Se compensó su falta de respiración natural forzando a través de las branquias agua burbujeada con mezcla de 95% oxígeno, 5% dióxido de carbono, a un flujo constante de aproximadamente 200 ml/min.

### 1.1. Electroretinograma.

Para determinar si las retinas del pez eran viables y que éstas no presentaban anomalías fisiológicas o ceguera, previo al experimento se realizó un examen electroretinográfico, verificando la presencia de los patrones de ondas características de los diferentes estados de adaptación (Ali & Muntz, 1975; Alcayaga, 1982; Alcayaga et al., 1989). Paralizado el pez, se procedió a colocar un electrodo de Ag-AgCl sobre la córnea intacta y otro similar de referencia en la región periorbital. El estímulo consistió en un haz de luz blanca de 220 ms de duración e intensidad controlada dirigido al centro del ojo a través de una fibra óptica procedente de un fotoestimulador digital. La respuesta era llevada a un preamplificador AC Grass P 15 (Grass Instruments Co.), registrada en un polígrafo Gilson, para control inmediato y grabada digitalmente en cinta de video para una eventual revisión posterior.

### 1.2. Operatoria.

El acto quirúrgico consistió en cortar el perímetro de la córnea, dejando intacto el cuarto posterior y plegando el

resto hacia atrás. Se retiró el cristalino con una pinza fina, quedando la retina de este modo accesible y protegida por el vítreo. La retina se inspeccionó nuevamente con lupa, rechazándose el pez si ésta presentaba alguna anomalía (pliegues, desprendimientos o hemorragia). Al final de la sesión experimental, la córnea se volvía a colocar en su lugar, suturándola.

### 1.3. Registro intracelular.

Los microelectrodos se confeccionaron un día antes del experimento, con capilares de vidrio de 1 mm de diámetro externo (WPI); fueron cortados en un estirador de microelectrodos horizontal de dos etapas (Industrial Science Associates, N.Y.) y llenados con KCl, 2 M. Se probaron en solución Ringer de carpa (Yamada et al., 1985), seleccionando aquellos cuya impedancia fluctuaba entre 35-50 M $\Omega$ . Luego con una microjeringa se reemplazó el electrolito por una solución de HRP (Peróxido de hidrógeno óxidoreductasa, tipo VI, Sigma Chem. Co., MO) al 4% en buffer Tris-KCl, 0,2 M, pH 7,4. Se dejaron con las puntas sumergidas en buffer Tris-KCl, 0,2 M, a 4°C por 24 Hrs. para permitir la difusión de la enzima hacia la punta de los microelectrodos. Sus impedancias en el vítreo eran del orden de los 70-150 M $\Omega$ . En ocasiones en que, durante el experimento, los microelectrodos se hacían ruidosos aumentando su impedancia, podían ser aclarados con breves

oscilaciones inducidas por la descompensación capacitiva del amplificador de registro (WPI M-707). Esto se realizaba solamente con el microelectrodo en el vítreo, nunca dentro de la retina, para evitar en ella depósitos no deseados de HRP.

Durante el transcurso del experimento el cuarto de registro estaba oscurecido y el pez era sometido a un periodo de 15 minutos de adaptación parcial a la oscuridad.

La implantación del microelectrodo en la CH se realizaba haciéndolo descender manualmente hasta tocar la superficie del vítreo. Luego se le avanzaba con un micromanipulador hidráulico (Narishige Scientific Instruments Lab.) hasta contactar la retina (lado vitreal), situación señalada por un cambio transiente de potencial en el osciloscopio. Ajustado el cero de la línea base se procedía a entregar el estímulo luminoso y se continuaba avanzando el microelectrodo hasta encontrar una célula. La penetración era facilitada por el uso de un martillo electromagnético (Gutiérrez & Salinas, 1984). La respuesta de la célula era llevada a un amplificador WPI (modelo M-707), con el pasa banda ajustado a 1 KHz, inscrita en un poligrafo (Gilson) y grabada digitalmente en cinta de video.

#### 1.4. Determinación de las células horizontales.

Las CH podían ser reconocidas por sus típicas respuestas eléctricas lentas y graduadas ante configuraciones de estímulo

de luz monocromática que permitían diferenciarlas entre CH de tipo L y de tipo C (Gutiérrez et al., 1983; Neely, 1984). En efecto, una CH de tipo C bifásica (C1), se despolariza desde el rojo cercano (600 nm) hasta el extremo rojo visible (740 nm) y una tipo C trifásica (C2), lo hace desde los 550 nm hasta los 650 nm inclusive; por tanto, una CH tipo C siempre estará despolarizada a una longitud de onda entre los 600 y 650 nm (ambos extremos incluidos). En cambio, una CH tipo L solo responde con hiperpolarizaciones, cualquiera sea la longitud de onda del estímulo. En base a esto, el fotoestimulador digital fue programado para entregar pulsos alternados de 960 ms de duración, de luz monocromática de 520 nm y 650 nm, a través de una fibra óptica que incorporaba el electrodo indiferente de Ag; ambos se introducían a través de la pupila hasta tocar el vitreo.

La posible confusión con otras células retinianas de respuesta sostenida se resuelve en base al criterio de profundidad de penetración (las CH en la carpa están entre 70 y 130  $\mu\text{m}$  del lado vitreal) y a la consideración que la penetración de fotorreceptores o de bipolares es altamente improbable por su disposición radial, paralela al eje de desplazamiento del microelectrodo. Por último, las amacrinas de respuesta sostenida, descritas en carpa (Kaneko & Hashimoto, 1969) y en pejegato (Chan & Naka, 1976) presentan actividad oscilatoria al inicio o al cese de sus respuestas.

### 1.5. Inyección y procesamiento de la HRP.

Las CH penetradas por el microelectrodo respondían con potenciales lentos de hiperpolarización o despolarización, según su tipo. Respuestas estables y un potencial de reposo de -15 a -30 mV, constituían el criterio de validación usado para decidir si se efectuaba la inyección en la célula registrada. Si el criterio no se satisfacía, el microelectrodo era retirado y se intentaba una nueva penetración en un lugar distinto, alejado del primero (2 mm, mínimo). Se realizó un máximo de cuatro penetraciones por retina.

La HRP se inyectaba iontoforéticamente mediante pulsos de corriente despolarizante de 5 a 10 Hz y de 3 a 8 nA, por tiempos de 3 a 5 minutos (traspaso de carga aproximada,  $Q \approx 270$  a 1000 nCoulombs), a través del puente de entrada del preamplificador. La corriente de inyección era controlada en un osciloscopio, junto con la impedancia del microelectrodo; el estímulo y la respuesta en otro, permitiendo así tener control total del proceso de inyección. Se daba término a la inyección de HRP si el potencial de reposo de la célula o su respuesta decaían a menos del 20% de su valor inicial durante el proceso. En la mayoría de los experimentos, sin embargo, se mantenía un registro de respuestas después del término programado de la inyección.

Se definió como tiempo de sobrevida el lapso transcurrido desde la inyección de HRP hasta la fijación histológica de la

retina. Este varió entre periodos tan cortos como 15 minutos hasta 44 horas, pero no más, por aumentar el riesgo de daño en el soma y dendritas de las neuronas (Mesulam, 1982). Una hora antes del término del tiempo de sobrevida, el pez fue adaptado a la oscuridad; luego se sacrificó, se enuclearon los ojos y las retinas se limpiaron de vitreo bajo iluminación difusa. Las retinas se llevaron a fijación en una mezcla de 1% paraformaldehído + 2% glutaraldehído en buffer fosfato, pH 7,3 por una hora a 4°C. Se procedió al revelado de la HRP de acuerdo a Mesulam (1982); el itinerario seguido fue:

- 3 lavados en buffer fosfato, pH 7,4
- Cloruro de cobalto al 5% en buffer fosfato
- 3 lavados en buffer fosfato, pH 7,4
- Solución al 0,05% de D.A.B. (tetrahidrocloruro de 3-3'-diaminobencidina) (Sigma Chem. Co.)
- Solución de D.A.B. 0,05% + peróxido de hidrógeno 0,06%
- 3 lavados en buffer fosfato, pH 7,4

Las retinas fueron impregnadas de gelatina (0,5%) y se montaron completas en portaobjetos también gelatinizados. Se dejaron secar a temperatura ambiente, se deshidrataron en alcohol, se aclararon en xilol y se cubrieron con cubreobjetos y resina histológica para su examen a microscopia óptica.

## 2. PREPARACION DE RETINA AISLADA.

Se diseñó una serie de experimentos en retina aislada, que permitieran comparar los resultados obtenidos con la

técnica de registro e inyección en la preparación in vivo, con aquellos provenientes de las preparaciones usuales in vitro.

Carpas curarizadas provenientes del mismo grupo que las usadas para registro in vivo y que pasaron los exámenes rutinarios ya descritos, se adaptaron a la oscuridad por una hora; se las anestesió con MS-222 (1%) y se procedió a enuclea el ojo. El globo ocular se abrió dejando la copa óptica, de la cual se extrajo con delicadeza la retina. Esta fue montada sobre un soporte con la parte vitreal hacia abajo y el conjunto se aseguraba mediante ganchos de plata al fondo de una cámara de registro. El proceso completo se efectuaba bajo iluminación roja difusa y no tomaba más de 90 segundos en completarse.

La cámara de registro y los sistemas de aireación y recirculación de la solución Ringer de carpa fueron contruidos según la detallada descripción de Kraft & Burkhardt (1986). Se mantuvo en la cámara un volumen constante de 30 ml; la velocidad de recambio fue de 2 ml/min.

La solución Ringer de carpa (Yamada et al., 1985), contenía (en mM): NaCl 102, NaHCO<sub>3</sub> 28, KCl 2,6, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, glucosa 5. Su pH se ajustó a 7,6.

Los procesos de registro y marcación, como el posterior procedimiento de histología fueron similares a los ya descritos.

El tiempo de sobrevida fluctuó entre 0,45 y 1,3 horas.

## PARTE I

### REGISTRO E INYECCION INTRACELULAR CON HRP

Un total de 114 carpas fueron usadas en los experimentos de registro y marcación con HRP, tanto in vivo como en retina aislada. Fueron tratadas 198 retinas (168 in vivo y 30 aisladas), que recibieron en total 407 microinyecciones (372 in vivo y 35 en retina aislada), lográndose obtener 99 retinas con marcas satisfactorias (85 in vivo y 14 aisladas). Las Tablas I y II muestran el detalle de estos resultados. Los datos consignados corresponden sólo a aquellas células que fueron inyectadas y no se consideraron los registros de CH o de otro tipo que no recibieron la microinyección de HRP.

#### 1. REGISTROS INTRACELULARES.

Las respuestas de las CH de retinas in vivo eran de gran magnitud, alrededor de 15 mV en promedio, con potenciales de reposo cercanos a los -30 mV. La frecuencia de respuestas de tipo L-fotópicas superó el 80%, varias veces más que las respuestas de los otros tipos (Tablas I y II); así la frecuencia de respuestas del tipo L-escotópicas y cromáticas no es superior al 11%. Se podría suponer que este bajo porcentaje de respuestas cromáticas se debe al hecho que los microelectrodos para HRP tienen puntas comparativamente gruesas (35 a 50  $\mu$ m, en KCl 2 M); en consecuencia, la

Tabla I

Registro e inyección intracelular de HRP en retinas in vivo de carpa (C. carpio). Células clasificadas por su tipo de respuesta.

	CANTIDAD	PORCENTAJE
RETINAS ENSAYADAS	168	100,00 %
RETINAS POSITIVAS	85	50,60 %
RETINAS NEGATIVAS (1)	83	49,40 %
INYECCIONES REALIZADAS	372	100,00 %
en cél. horizontales	298	80,11 %
en otras células	74	19,89 %
INYECCIONES en CH's	298	100,00 %
L-Fotópicas	258	86,58 %
L-Escotópicas	12	4,03 %
Cromáticas	22	7,38 %
Transiciones (2)	6	2,01 %
INyec. OTRAS CELULAS	74	100,00 %
Amacrina	1	1,35 %
Bipolar	1	1,35 %
Ganglionar	1	1,35 %
Glia	1	1,35 %
Silentes (3)	35	47,30 %
No identificadas	35	47,30 %

(1) Sin recuperación de la marca debido a malformaciones o desprendimientos de retina, muerte de los peces o fallas técnicas.

(2) Cambios en el tipo de respuesta durante el registro o inyección (ver explicación en el texto).

(3) Células que no responden al estímulo, pero detectadas por una hiperpolarización sostenida de -35 a -40 mV al ser penetradas por el microelectrodo.

Tabla II

Registro e inyección intracelular de HRP en retina aislada de carpa (C. carpio). Células clasificadas por su tipo de respuesta.

	CANTIDAD	PORCENTAJE
RETINAS ENSAYADAS	30	100,00 %
RETINAS POSITIVAS	14	46,67 %
RETINAS NEGATIVAS (1)	16	53,33 %
INYECCIONES REALIZADAS	35	100,00 %
en cél. horizontales	34	97,14 %
en otras células	1	2,86 %
INYECCIONES en CH's	34	100,00 %
L-Fotópicas	28	82,35 %
L-Escotópicas	3	8,82 %
Cromáticas	3	8,82 %
INyec. OTRAS CELULAS	1	100,00 %
Glia	1	100,00 %

(1) Sin recuperación de la marca debido a malformaciones o desprendimientos de retina, muerte de los peces o fallas técnicas.

probabilidad de penetrar las finas prolongaciones atribuidas a las células de respuesta cromática es baja en comparación con la probabilidad de penetrar aquellas más gruesas del tipo L-fotópicas. La Tabla III muestra un censo de 640 registros hechos anteriormente en el laboratorio en CH de retina de carpa, realizados con microelectrodos muy finos (150 a 200 M $\Omega$ , en KCl 2 M) durante una serie de experimentos destinados unicamente al registro intracelular de CH (Gutiérrez et al., 1983; Neely, 1984). Las frecuencias de respuestas del tipo L-fotópica y cromática son similares a las frecuencias encontradas durante los experimentos con HRP (compárense los datos de las Tablas I y II con la Tabla III). Las respuestas L-escotópicas no son comparables, pues en los registros mencionados se instaló una iluminación de fondo que anulara las respuestas de las horizontales de bastón.

Tabla III

Respuestas de CH en retinas de carpas vivas registradas intracelularmente (Gutiérrez et al., 1983; Neely, 1984).

CELULA	CANTIDAD	PORCENTAJE
L-Fotópicas	552	86,25 %
L-Escotópicas	19	2,97 %
Cromáticas	69	10,78 %
Total	640	100,00 %

Estos resultados demuestran que las características de un microelectrodo seleccionado para microinyecciones de HRP no introduce un factor de selectividad per se.

En ocasiones se registraron cambios en el tipo de respuesta durante una penetración in vivo, ya sea durante el registro o durante la inyección de la enzima, acompañados por cambios en el potencial de reposo. Es probable que tales transiciones de respuestas fueran causadas por movimientos residuales del pez no completamente paralizado, contra la punta inmóvil del microelectrodo, resultando en la penetración alternada de dos o tres prolongaciones finas de distintas células. Esta situación era frecuentemente superada dando mayor tiempo para alcanzar la completa paralización del pez o aumentando la dosis de curare. Su persistencia implicaba la suspensión del experimento. La frecuencia de estas transiciones de respuestas fue de todos modos un problema menor, con una incidencia del 6% (ver Tabla I) y fue debidamente considerada durante el análisis de los resultados.

## 2. MICROINYECCIONES CON HRP.

Se efectuó un total de 332 microinyecciones de HRP en CH con recuperación de la marca, tanto in vivo como en retina aislada; de éstas, 90 células fueron rechazadas para el análisis a causa de no poderse discernir correctamente el contorno de los límites celulares, ya sea por rupturas de la

célula por daño mecánico, o bien por el bajo contraste entre la célula marcada y el fondo de una retina excesivamente pigmentada. Las 242 células restantes fueron dibujadas en cámara lúcida para usarlas en el estudio morfológico. El porcentaje de recuperación de la marca in vivo tras el proceso de revelado con el método del D.A.B. fue bastante alto, ya que se recuperó marcaciones en el 92,47% de las inyecciones llevadas a término.

### 3. COMENTARIOS.

El alto porcentaje de recuperación es un buen indicador de la eficiencia lograda tanto en el método de inyección y revelado como en el sistema experimental mismo. El rendimiento de 9 éxitos por cada 10 microinyecciones realizadas ha sido determinante para permitir analizar estadísticamente los datos morfológicos, electrofisiológicos y la correlación entre ambos.

Según Bishop et al. (1980), sólo un 40% de las células inyectadas intracelularmente con HRP son usualmente recuperadas. Por otra parte, los fracasos en completar exitosamente el programa de inyección, aunque no fueron muy numerosos, pueden asociarse a diferentes causas:

1º Deterioro fisiológico progresivo de la preparación en el transcurso del experimento por razones difíciles de precisar, incluyendo la muerte prematura del pez durante el periodo de sobrevida.

29 La penetración del microelectrodo en el soma, dendritas o axón puede ocasionar daño celular irreversible (puntas muy gruesas). Sin embargo, esto es poco probable basado en lo discutido más arriba referente al uso de microelectrodos de puntas más finas. Más aún, no existen pulsaciones vasculares que muevan la célula penetrada contra la punta inmóvil del microelectrodo, ya que los vasos no están dentro de la retina, sino por encima y debajo de ésta, por lo que no parecen producir perturbaciones significativas.

30 Las corrientes de inyección pueden estar a un nivel dañino para la célula. Siempre al final de cada inyección se controló la respuesta de la célula para evaluar el posible trauma de la microinyección.

Las células inyectadas intracelularmente con HRP son visibles gracias a que el producto de reacción de la enzima es un precipitado coloreado (Mesulam, 1982). Ensayos bioquímicos han determinado que la HRP es una glicohemoproteína de 40.000 Daltons, constituida por alrededor de 308 residuos aminoacídicos, dependiendo del tipo de isoenzima que se trate. Su radio hidratado es de 5,34 nm (Steiner & Dunford, 1978), inhabilitándola para pasar a través de uniones celulares como las gap-junctions (Spray & Bennett, 1985). Cataliza la reacción de óxido reducción entre el peróxido de hidrógeno y un donador de hidrógenos; la formación del complejo oxidante (HRP·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) está termodinámicamente muy favorecida y se une al

cromógeno donador de hidrógenos el cual es oxidado; el producto de reacción, finalmente, es un precipitado coloreado. La oxidación espontánea del cromógeno en presencia del peróxido de hidrógeno en sitios donde no hay peróxidasa es poco probable, ya que la descomposición del peróxido de hidrógeno requiere de 18 Kcal/mol, (Mesulam, 1982).

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en los tejidos biológicos existen otras sustancias de similar aspecto al del producto de reacción de la HRP, las que pueden confundirse con las marcas. Una de las más importantes en la retina es la neuromelanina; el color del pigmento, que se encuentra en todo el sistema nervioso, es semejante a aquel del producto de reacción de HRP al emplear los métodos tradicionales de revelado. No obstante, se le puede diferenciar de un sitio de marca o de un cuerpo celular teñido con HRP debido a que el neuropigmento se encuentra en agregados amorfos. Otra fuente de confusión son las proteínas endógenas con actividad peroxidásica; se trata de proteínas con grupo hem que contienen hierro, tales como las peroxidasas endógenas, enzimas peroxisomales, citocromos mitocondriales y agregados de lipofucsina, capaces de reaccionar con el peróxido de hidrógeno para formar un producto de reacción (La Vail, 1975; Wong-Riley, 1976). Sin embargo, las peroxidasas endógenas son más activas a pH 9,0 a 9,2 (Wong-Riley, 1976) y el método de DAB utiliza un medio solo ligeramente básico (pH 7,2 a 7,4),

con la consiguiente atenuación de la actividad endógena (Straus, 1980). Por último, los precipitados no específicos del producto de reacción, resultado de la oxidación espontánea del cromógeno, son factores que pueden inducir a una interpretación ambigua de los resultados del proceso de marca. Hay que hacer notar, sin embargo, que pudiendo ser un problema al usar el TMB (tetrametilbencidina) como cromógeno, es despreciable con el uso del DAB (Mesulam, 1982).

## PARTE II

### MARCACIONES MULTIPLES

#### 1. MARCACIONES MULTIPLES CON UNA INYECCION UNICA DE HRP.

Una característica persistente de estos experimentos fue que, a pesar de penetrar e inyectar lo que todos los signos fisiológicos indicaban era una misma célula única, se obtenía un despliegue de CH marcadas alrededor del sitio de inyección (Figura 3). Ni la cantidad ni la variedad de CH fueron constantes, ya que cada caso particular presentó características diferentes. No obstante, las marcaciones múltiples muestran algunos rasgos comunes, a saber:

a) No se pudo establecer una correlación nítida entre el número de células marcadas y el tiempo de sobrevida, fuera que un despliegue más rico en células marcadas era más probable con tiempos de sobrevida de 24 horas que con tiempos breves de 1,2 ó 2,9 horas.

b) La marcación de células fue selectiva, ya que de toda la población celular de esa área de la retina, sólo se encontró el producto de reacción de la HRP en alguna de ellas; de éstas, varias tienen sus finos axones orientados hacia la zona de inyección, pero el axón de otras CH (Figura 1, flecha abajo) claramente se dirigen en direcciones que se apartan del centro de marca. Este tipo de evidencia parece indicar que la HRP ha pasado de una CH a otra, a través de prolongaciones

Figura 3



### Figura 3

Dibujo obtenido de una composición fotográfica de una marcación masiva de células, obtenida como consecuencia de una única inyección de HRP in vivo en retina de carpa. Se puede observar un despliegue de células horizontales alrededor del sitio de inyección (cuerpo central amorfo), lugar al que parecen confluir los axones de éstas células. Sin embargo, hay algunas células cuyos axones se alejan del centro de inyección (flecha, abajo) y no fue evidente algún tipo de conectividad a nivel de microscopio óptico. Entre los 12 somas de células horizontales, se puede encontrar los tres tipos morfológicos (H1, H2 y H3); en este ejemplo se observa incluso a dos horizontales H1 en contacto estrecho. Células distintas de horizontales también resultaron marcadas (flecha, arriba) en la vecindad de una CH H1 y un axón terminal. Tiempo de sobrevida: 24 hrs. Carga inyectada: 750 nC. Barra de calibración: 100  $\mu$ m.

finas, bajo el límite de resolución del microscopio óptico o, por algún otro mecanismo indirecto.

c) Muy interesante resultó la situación en la cual CH's de distinto tipo morfológico se observan en estrecho contacto (Figura 4), lo que pone en duda la realidad de las láminas de células homólogas propuestas por Kaneko & Stuart (1984).

d) También se observó la presencia de otras células marcadas distintas de las horizontales, como células amacrinas o fibras de ellas, no siempre en clara relación con el sitio de inyección, o bien bipolares en contacto con H1 (Figura 5). Al parecer, estaría en juego el mismo tipo de mecanismo de traspaso de HRP que en el caso anterior.

Una de las explicaciones tentativas para responder al fenómeno de la marcación múltiple, es que durante la inyección iontoforética haya fuga de la enzima desde la punta del microelectrodo; la HRP alcanzaría los finos procesos de otras células distintas a la registrada, siendo absorbida y transportada por éstas, marcando a más de una célula. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron inyecciones extracelulares intraretinianas. Estas consistieron en registrar una CH de acuerdo a los criterios ya establecidos, se retiraba el microelectrodo algunos micrómetros hasta que ninguna respuesta se observara y se procedía a inyectar el trazador. Se controlaron los parámetros de inyección para verificar que la cantidad de carga que se liberaba durante el proceso fuera al menos

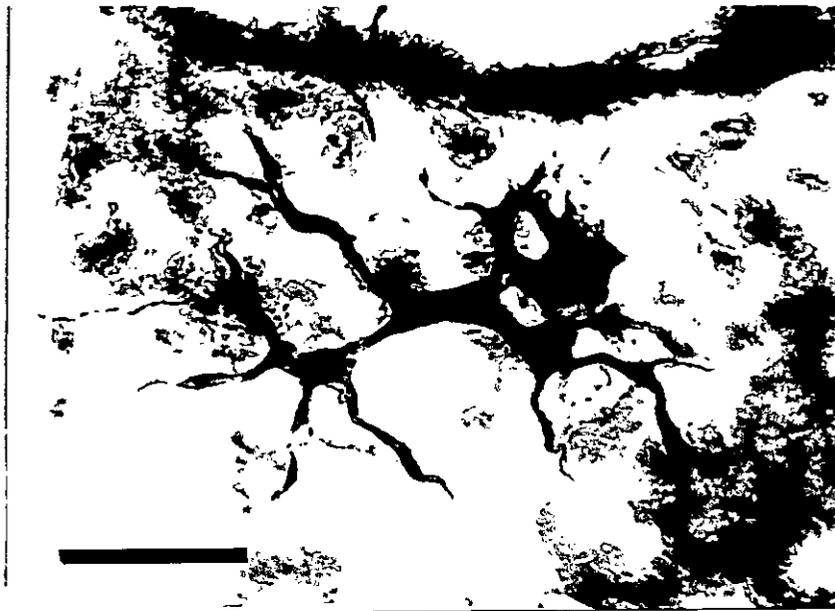


Figura 4

En desacuerdo a las láminas de células homólogas propuestas por Kaneko & Stuart (1984), en otro caso de marcación múltiple, se encontró una célula tipo H2 (derecha) que estaba en contacto estrecho y a un mismo plano focal con una célula H3 (izquierda). Tiempo de sobrevida: 24 hrs. Carga inyectada: 480 nC. Barra de calibración: 100  $\mu$ m.

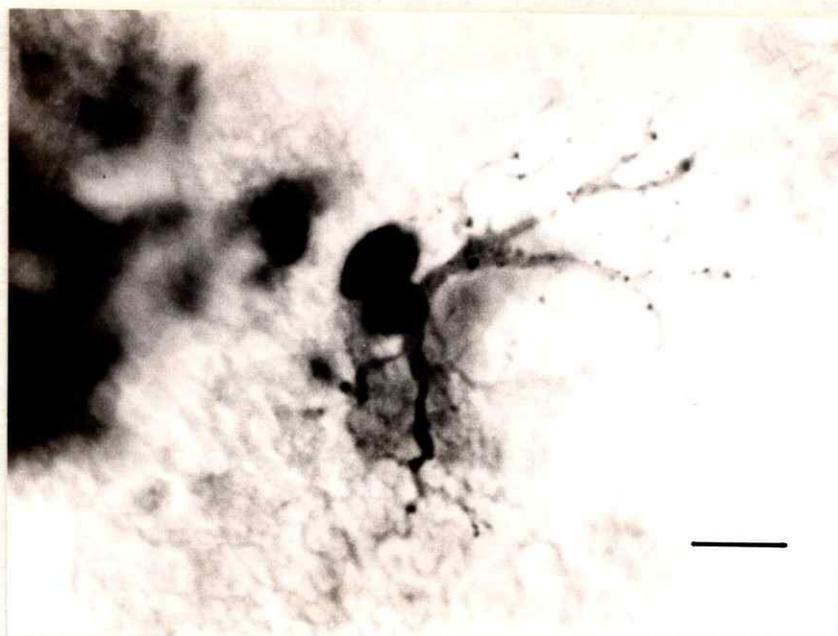


Figura 5

Microfotografía de una célula horizontal tipo H1 (desenfocada) en contacto aparente con una célula amacrina (color negro). Esta particular relación, nunca antes descrita, quedó en evidencia en una marcación masiva; la extraordinaria riqueza de botones terminales de las dendritas de la célula amacrina hacia la horizontal sugiere la posible existencia de contactos sinápticos entre ambas células. Tiempo de sobrevivida: 22 hrs. Carga inyectada: 200 nC. Barra de calibración: 10  $\mu$ m.

equivalente al de una inyección intracelular; una vez terminada, se volvía a penetrar la célula para comprobar que el microelectrodo aún se encontraba en la vecindad de la célula originalmente registrada y determinar el buen estado metabólico de ésta, juzgando por su respuesta al estímulo.

Se realizaron 13 de estos experimentos, con sobrevidas que variaron entre 12 y 24 horas. Solamente se recuperó marca en un caso (Figura 6), lo que sugiere que la probabilidad de marcar células de modo no controlado es muy baja y la explicación de la marcación múltiple debe tener relación con un fenómeno desconocido de traspaso de proteínas, de carácter específico y lento. Otras ocho células, a las cuales solamente se les registró su respuesta por 3 a 6 minutos con electrodos llenos con HRP, no proporcionaron marcas, lo que indica que el flujo espontáneo de la enzima es despreciable.

## 2. COMENTARIOS.

La baja correlación entre el tiempo de sobrevida y el despliegue de las marcas obtenidas de preparaciones in vivo, sugiere que los agrupamientos representan el sustrato morfológico de una unidad fisiológica desconocida. El fenómeno de marcación de estas agrupaciones (que recordemos son el resultado de una microinyección intracelular única, en una célula identificada por su registro electrofisiológico) es selectiva, porque sólo ha habido paso de la enzima HRP a

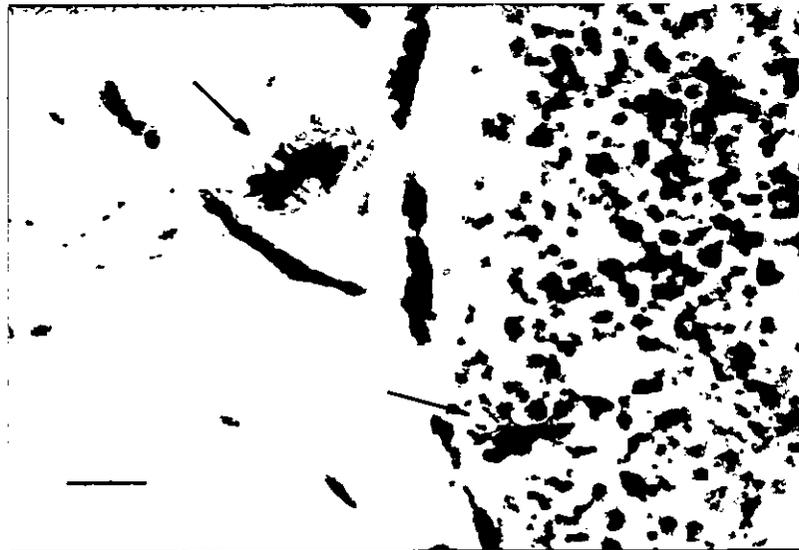


Figura 6

Microfotografía de un par de células horizontales (flechas) teñidas con HRP durante una inyección extracelular intraretiniana. Este es el único caso de trece experimentos similares en el cual se obtuvo marca. En otras ocho células en las que sólo se registró su respuesta con microelectrodos llenos con HRP por varios minutos, no se obtuvo marca. Tiempo de sobrevida: 24 hrs. Carga inyectada: 700 nC. Barra de calibración: 50  $\mu$ m.

ciertas células entre todas las que existen en torno al centro de inyección, desplegándose incluso a grandes distancias.

Una explicación válida puede radicar en la posible contaminación de varias células con fugas de trazador desde el microelectrodo al introducirse en la retina. Los experimentos realizados para evaluar la incidencia de este factor la señalan como poco probable, ya que sólo una inyección intraretiniana extracelular entre trece reportó marca. Sin embargo, hay que considerar los fenómenos de absorción de HRP, los que pueden producirse a través de dos vías: una natural por endocitosis y, otra artificial, por aplicación intracelular directa.

La absorción de la HRP por endocitosis se produce al captar la célula las pequeñas cantidades de enzima que se fugan de la punta del microelectrodo hacia el espacio intersticial y puede ocurrir en el soma, dendritas y en el axón (no mielinizado en la retina); luego es transportada en vesículas intracelularmente por las vías retrógrada y anterógrada; el transporte retrógrado puede ocurrir sin necesidad de daño mecánico en las neuronas (Mesulam, 1982) y ocurre en cuerpos membranosos grandes, incluyendo cuerpos multivesiculares y estructuras membranosas lameladas. El aspecto de somas marcados con HRP por transporte retrógrado es granulado a alto aumento, debido a las vesículas con producto de reacción de HRP (Malmgren & Olsson, 1979; Mesulam, 1982). El

transporte vesicular anterógrado, en tanto, ocurre en estructuras membranosas vesiculotubulares de 50 a 80 nm, las que tienen continuidad con el retículo endoplásmico liso y su transporte es activo, a una velocidad de 2 a 4 mm/hr (La Vail et al., 1980; Teichberg et al., 1975; Tsukita & Ishikawa, 1980).

Mesulam (1982) explica la marcación de células por absorción endocitótica de HRP mediante un proceso bifásico, en el cual las moléculas de la enzima que son incorporadas por endocitosis en el axón terminal son transportadas primero a la región perinuclear, pero pueden ser transferidas a compartimentos delimitados por membranas para transporte somatofugal, de modo que los axones colaterales y las dendritas también se marcan. De modo similar, la HRP endocitada por la membrana de dendritas y soma, podría primero ser transportada somatopetalmente en el espacio perinuclear, donde la transferencia subsecuente en canales para el transporte somatofugal puede resultar en la marcación de axones y neuronas eferentes.

Una de las formas usadas para trazar vías neuronales con HRP utiliza la absorción por endocitosis (Schacher et al., 1976; Triller & Korn, 1981). Sin embargo, la cantidad de trazador que se debe agregar es varias veces superior a las trazas de enzima que pueden fugarse del microelectrodo, por lo cual es poco probable que la endocitosis sea responsable de

las marcaciones masivas, que es un fenómeno lento. Por lo demás, nunca se observó el citoplasma finamente granulado en las células marcadas, inspeccionadas bajo inmersión en aceite.

En cambio, la HRP inyectada directamente en el soma de neuronas y procesada por el método de DAB, produce marcación no localizada, difusa, de virtualmente todo el árbol dendrítico y del segmento inicial del axón. El exámen ultraestructural indica que el producto de reacción se distribuye difusamente en el citoplasma y que delimita la membrana plasmática, el pericarion, mitocondrias y otros organelos limitados por membranas (Mesulam, 1982). El desplazamiento axonal somatofugal de la HRP se ha estimado en unos pocos milímetros por día (Mesulam, 1982), lo que hace suponer que este tipo de marcación ocurra por difusión pasiva y daría cuenta de la lentitud del proceso y homogeneidad de la tinción de las células en los despliegues masivos.

Esto hace suponer que los despliegues de marcas como el mostrado en la Figura 3 fuesen causados por sucesivas penetraciones de CH o fibras de ellas, con depósitos importantes de HRP, durante el descenso del microelectrodo o bien, durante la inyección. Ya se ha discutido que esta posibilidad es dudosa, por lo cual otra explicación podría estar en el transporte transcelular del trazador. Existe alguna evidencia de paso de HRP entre neuronas y de marcación neuronal transináptica. Grant et al. (1980), reportó haber

marcado 2 células al inyectar intracelularmente con HRP una única neurona del núcleo vestibular medial, lo que interpretó como evidencia de despliegue interneuronal. Observaciones similares han sido reportadas en otras zonas del sistema nervioso central (Baker & Grantyn, 1982; Hughes & Hall, 1986; Leeper & Charlton, 1985) y periférico (Hongo et al., 1981), en diferentes especies.

En el ejemplo de la Figura 3, se puede ver que el paso de HRP desde las células en relación directa al centro de inyección ha ocurrido no solamente entre CH, sino que también entre éstas y una célula desconocida (ver Figura 3 y leyenda), lo que sugiere que de existir una vía de paso para proteínas de gran peso molecular como la HRP, de soma a soma o de axón a axón, ésta puede darse entre células de distinto tipo, quizás transinápticamente.

### PARTE III

#### MORFOLOGIA DE LAS CELULAS HORIZONTALES

##### 1. MORFOLOGIA DE LAS CH EN RETINAS IN VIVO.

En experimentos con retinas in vivo, en general tanto el soma como el axón de las células inyectadas aparecían teñidos. Esta observación aparentemente trivial es novedosa, pues en la literatura consultada no hay ejemplos de una CH completa teñida con HRP, ya que generalmente sólo se tiñe el soma o el axón, lo cual atribuimos al corto tiempo de sobrevida que permite la preparación in vitro.

A nivel de microscopía óptica, se puede considerar que las CH han sido completamente llenadas con el producto de reacción de la HRP. La gran cantidad de detalles finos que revelan las neuronas inyectadas intracelularmente con HRP de la Figura 7, señala precisamente la capacidad de la enzima para llenar toda la célula. Esto también ya ha sido demostrado inyectando HRP en células de Purkinje y comparando su resultado con el tradicional método de impregnación Golgi (Bishop et al., 1980); los resultados muestran que la célula se puede considerar completamente llena, encontrándose el producto de reacción en el soma, dendritas, espinas dendríticas y axones colaterales finos. Resultados semejantes han sido confirmados en otras regiones del sistema nervioso central (McCrea et al., 1977; Sakai & Woody, 1978; Grofova et

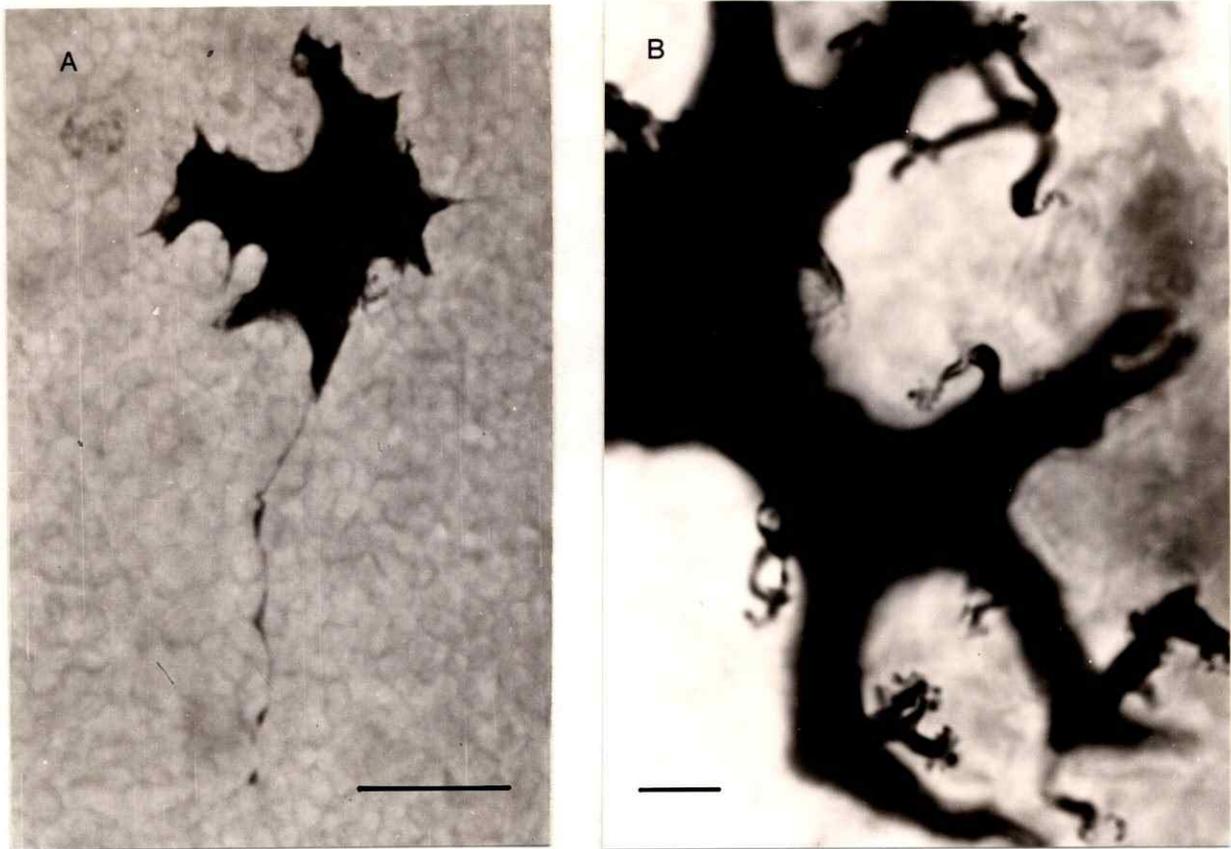


Figura 7

A. Célula horizontal tipo H1 de retina de carpa, teñida con HRP inyectada iontoforéticamente, in vivo. El producto de reacción de la enzima se encuentra en toda la célula, lo que permite visualizar el soma, dendritas y el axón. Tiempo de sobrevida: 23 hrs. Carga inyectada: 720 nC. Barra de calibración, 20  $\mu\text{m}$ . B. La gran cantidad de detalles finos posibles de observar, de modo muy similar a lo logrado con la técnica de impregnación Golgi, permite muy buena resolución de los apéndices cortos y los agrupamientos terminales dendríticos (Stell, 1975). Tiempo de sobrevida: 24 Hrs. Carga inyectada: 750 nC. Barra de calibración: 6  $\mu\text{m}$ .

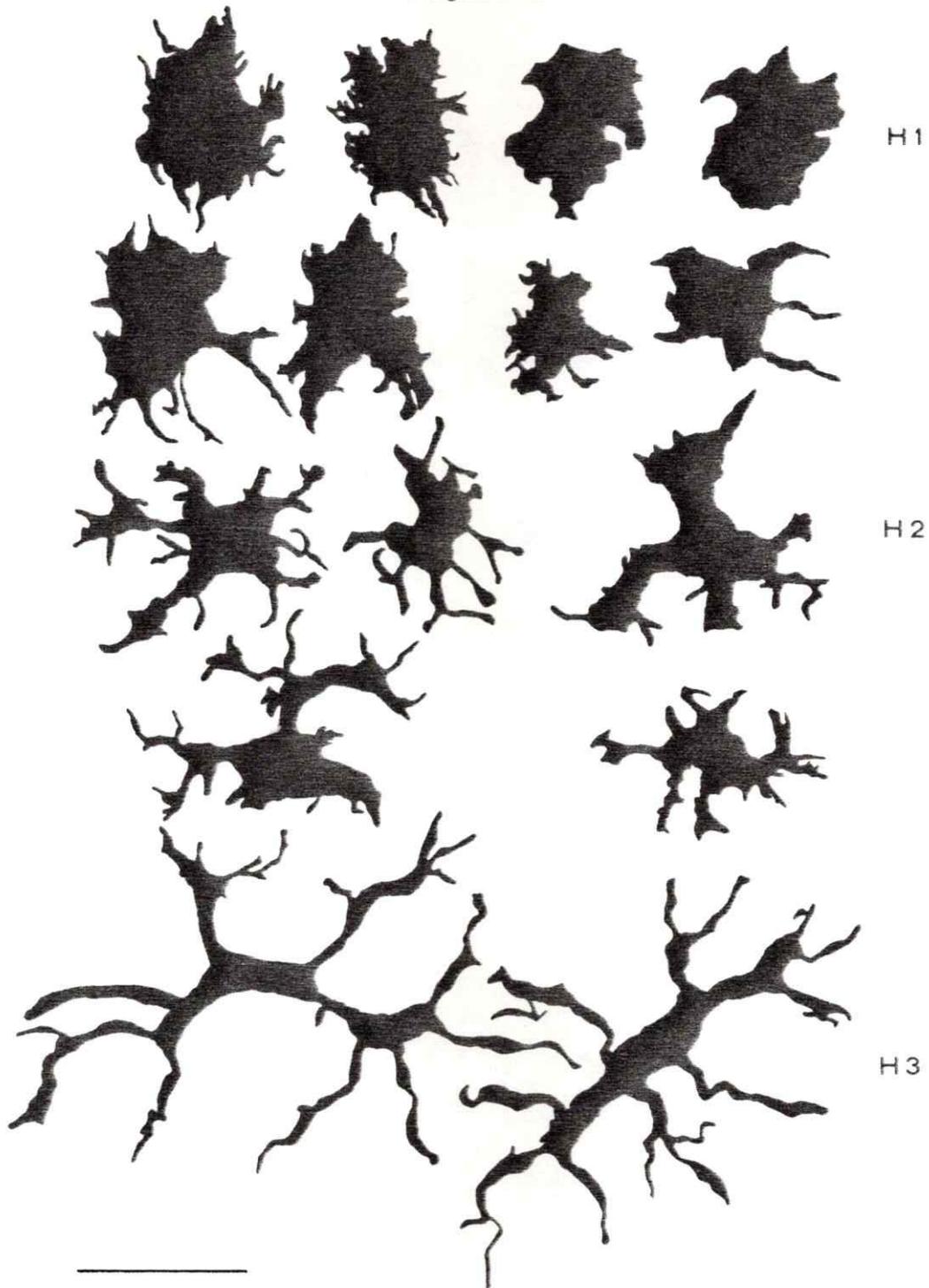
al., 1980).

No obstante, no se puede asegurar que todos los procesos celulares sean en efecto llenados tras una inyección intracelular, pero sí se puede concluir que la HRP revela tantos o más detalles que cualquier otro método empleado para ilustrar procesos morfológicos.

En efecto, fue posible seguir sin dificultad por largas distancias, cercanas a 1 mm, los finos y largos axones de las CH inyectadas con el trazador, incluso a través de distintos planos focales. Asimismo, el árbol dendrítico muestra gran cantidad de detalles finos (Figura 7B), facilitando la tarea de clasificar la célula en cuestión dentro de determinado tipo morfológico.

Pero no siempre fue sencillo clasificar las células marcadas dentro de una de las tres categorías. Varias de ellas parecían estar en una situación intermedia, ya sea porque eran muy ramificadas para ser H1 pero muy compacta para clasificarse como H2; igual ocurrió con células cuyo aspecto era intermedio a H2 y H3. La Figura 8 muestra una serie de ejemplos de CH que ocupan un lugar entre los tipos morfológicos H1, H2 y H3. Sin criterios objetivos de clasificación resultaría muy difícil determinar a cual de los tipos morfológicos corresponden las células intermedias. Sin embargo, al calcular el índice eidométrico  $I_e$  (ver Pág.45), la clasificación se puede ceñir más fielmente al criterio de

Figura 8



### Figura 8

Dibujos en cámara lúcida de células horizontales marcadas por microinyecciones iontoforéticas intracelulares de HRP en retinas de carpa in vivo. Se han dispuesto en tres filas células tipo H1, H2 y H3 típicas y, entre ellas, algunas células que no pueden ser clasificadas con certeza dentro de una categoría determinada, ya que tienen rasgos comunes a más de un tipo. Barra de calibración: 50  $\mu$ m.

relación entre las dimensiones del soma y dimensión del árbol dendrítico, independiente del tamaño de la célula.

## 2. CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS CH.

Una clasificación morfológica debe ser en lo posible independiente de criterios subjetivos de apreciación. Para enfrentar este problema se definió un índice de morfología, que llamaremos índice eidométrico o  $I_e$  (del griego eidos, apariencia, facha), que considera como parámetros el perímetro y el área de una célula; así se obtiene un método objetivo de evaluación de cualquier forma bidimensional.

Sea  $C$  una célula cuya proyección en el plano  $XY$  es un círculo de área  $A = \pi \cdot r^2$  y perímetro  $P' = 2\pi r$ . El perímetro en función del área queda expresado por la relación

$$P' = 2 \cdot \sqrt{\pi \cdot A} \quad (1)$$

Supongamos ahora que modificamos la forma de  $C$  dándole el aspecto de una figura irregular tal que su área  $A$  permanece constante, pero su perímetro aumenta de  $P'$  a  $P$ . Sea  $I_e$  la razón que mide el grado de complejidad que ha adquirido el contorno de  $C$  como consecuencia de distorsionar su forma circular original; luego, por definición

$$I_e = P/P' \quad (2)$$

Reemplazando (1) en (2),

$$I_e = P/(2 \cdot \sqrt{\pi \cdot A}) \quad (3)$$

De acuerdo a la ecuación (3),  $I_e$  es capaz de medir la

complejidad del contorno de la célula independientemente de la forma y del tamaño relativo de ésta, usando como parámetros únicos el área y perímetro celular. El valor mínimo de  $I_e$  es 1, correspondiente al círculo y crece de modo continuo y lineal a medida que aumenta el perímetro a área constante.  $I_e$  es adimensional, de modo que no depende de la escala de la figura medida.

### 3. DETERMINACION DEL AREA Y PERIMETRO CELULAR.

Las retinas montadas fueron observadas en un microscopio óptico Leitz a 400 aumentos y se proyectaron a través de una cámara lúcida (Officine Galileo di Milano). De la población de CH teñidas con HRP, se seleccionaron para dibujo sólo aquellas cuyos límites celulares estaban íntegros. Los somas fueron dibujados siguiendo el contorno de su silueta sobre un mismo plano focal, incluyendo el cono axonal. Se omitieron tanto el axón como los apéndices cortos y agrupamientos terminales dendríticos (Stell, 1975). Los prototipos de CH de conos, que sirvieron de base para la clasificación en los tipos H1, H2 y H3 en pez dorado (Stell, 1975) y en carpa (Weiler, 1978) fueron fotografiados y dibujados directamente de la proyección de los negativos, siguiendo los mismos criterios ya mencionados.

El contorno de cada una de las células dibujadas fue seguido con una sonda deslizante sobre una mesa digitalizadora

(Houston Inst. 8024); los datos fueron procesados usando el programa ARC INFO (ESRI Environmental Research Institute, U.S.A.) en un computador Acer 1100 AT lo que permitió determinar tanto el perímetro como el área de las células. Estos valores fueron introducidos en la base de datos Lotus (Lotus Development Corp.) para calcular  $I_e$ .

Para estimar el error introducido al dibujar y posteriormente digitalizar las células, se dibujó cuatro veces 18 células representativas de los tres tipos morfológicos, tomadas tanto de la muestra como de los prototipos publicados. Se calculó el índice eidométrico y su desviación estándar,  $\sigma$ , que se consideró como la medición del error de esta etapa.

#### 4. TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Los valores de  $I_e$  fueron reducidos a histogramas de frecuencia y se probó su ajuste a varias distribuciones de frecuencia conocidas. Para verificar la bondad de ajuste se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. La base del tratamiento estadístico fue el programa Statgraphic (Statistical Graphics Corp., U.S.A.) usando un computador Clone Turbo-PC.

#### 5. EIDOMETRIA DE LAS CH.

Antes de calcular el índice eidométrico, conviene aclarar ciertos puntos.  $I_e$  exige una figura bidimensional para su aplicación y, aunque las CH tienen un espesor determinado, se

justifica su uso puesto que el espesor del soma de estas células es muy inferior a su extensión (aproximadamente 1:5). Por tal motivo se puede considerar sin mucho error que la forma de una CH se aproxima a la proyección plana que supone  $I_e$ . Otro factor que se debe considerar es el error introducido por la inclinación de la CH marcada respecto del plano de su proyección al momento de dibujarla. Como ejemplo, se puede mencionar que  $I_e$  calculado para un círculo inclinado en  $30^\circ$  respecto a la horizontal, es de 1,006, sólo un 0,6% superior al original. Por complejo que sea el perfil de una célula, la incidencia de este factor no puede ser superior a este valor en más de un orden de magnitud. Sin embargo, aunque pequeña, tal variación en la práctica estaría sobreestimada, ya que la retina está montada completa y paralela al portaobjetos y las CH, por su disposición dentro de la retina, también lo están. Por lo demás, la actual clasificación de CH tampoco considera la inclinación de la preparación. No obstante ello, es necesario considerar esta clase de factores si se pretende examinar en forma crítica una clasificación ya existente.

Teniendo estos antecedentes en mente, se aplicó el cálculo del índice eidométrico  $I_e$  a la muestra de 242 CH marcadas (Tabla IV). El error debido a la etapa de dibujo y posterior digitalización (ver  $\sigma$ , pág. 47), se estimó en  $\sigma = \pm 0,0418$ . Se hizo un análisis de frecuencias dividiendo la muestra en 48 intervalos de clase cuyo ancho se fijó en cuatro

TABLA IV

CEL. #	PERIMETRO	AREA	Ie	CEL. #	PERIMETRO	AREA	Ie	CEL. #	PERIMETRO	AREA	Ie
1	13.0550	1.5730	2.9363	42	4.6350	0.4700	1.9072	83	5.4950	0.8130	1.7192
2	16.5970	1.4410	3.9002	43	5.9260	1.2390	1.5018	84	4.3790	0.7510	1.4254
3	11.3950	1.4030	2.7138	44	4.7680	0.9030	1.4154	85	6.6410	0.8450	2.0380
4	14.1180	1.6210	3.1281	45	6.8420	0.7700	2.1995	86	3.0790	0.2380	1.7804
5	11.0820	1.5700	2.4950	46	11.8300	1.4790	2.7441	87	15.5450	1.3500	3.7741
6	11.8200	1.5680	2.6646	47	10.4910	1.3300	2.5662	88	11.5700	0.9470	3.3539
7	8.9760	1.0730	2.4444	48	6.8090	1.3700	1.6410	89	27.4470	1.7140	5.9140
8	38.5260	2.3310	7.1183	49	6.3850	1.0210	1.7826	90	9.0850	1.5220	2.0774
9	12.3870	1.3690	2.9865	50	5.5870	0.7620	1.8055	91	10.3870	1.4550	2.4291
10	4.1250	0.3740	1.9028	51	7.6690	0.8300	2.3746	92	8.4480	1.3690	2.0368
11	2.2070	0.1600	1.5565	52	8.7420	0.8770	2.6333	93	13.7960	1.0960	3.7174
12	17.2520	1.6530	3.7853	53	7.1740	0.8950	2.1392	94	8.0600	1.2400	2.0418
13	11.3200	1.6290	2.5020	54	19.3490	1.1360	5.1211	95	9.0730	1.4300	2.1403
14	4.5880	0.5440	1.7548	55	4.4010	0.5110	1.7367	96	8.9680	1.2520	2.2609
15	3.2720	0.3530	1.5535	56	7.2290	0.5790	2.6800	97	10.9840	1.0650	3.0025
16	7.6820	0.6040	2.7884	57	7.5980	0.9230	2.2310	98	8.8960	1.1040	2.3884
17	4.1580	0.5530	1.5773	58	7.9010	0.5950	2.8895	99	9.3910	1.4470	2.2023
18	3.7180	0.2860	1.9612	59	9.3870	0.7040	3.1560	100	36.4030	2.1520	7.0002
19	13.4950	0.9430	3.9202	60	6.3760	0.4820	2.5907	101	6.0660	0.8690	2.0777
20	4.8710	0.5620	1.8329	61	4.4420	0.4650	1.8376	102	14.9980	1.0930	4.0469
21	4.4000	0.4310	1.8906	62	3.7970	0.5260	1.4769	103	10.3610	1.1400	2.7374
22	6.8380	0.6770	2.3444	63	6.7550	0.6770	2.3159	104	12.6240	0.8300	3.9889
23	12.3040	1.7000	2.6620	64	8.8630	0.6390	3.1277	105	29.3940	1.6200	6.5147
24	6.7620	0.6110	2.4403	65	5.6770	0.5170	2.2272	106	11.6520	1.1530	3.0611
25	8.9320	1.2940	2.2150	66	5.7450	0.9240	1.6860	107	14.9250	0.7180	4.9687
26	7.3100	0.9680	2.0959	67	6.6260	1.2140	1.6964	108	19.8450	1.4090	4.7162
27	6.4330	0.6120	2.3197	68	5.1930	0.5780	1.9269	109	8.6820	0.9200	2.5534
28	6.6250	0.5090	2.6195	69	7.5740	0.5930	2.7745	110	13.6130	0.9590	3.9214
29	6.1840	0.9590	1.7814	70	5.6800	0.6150	2.0432	111	12.8280	0.7820	4.0921
30	7.6480	0.8080	2.4001	71	11.1910	1.6040	2.4926	112	26.8090	1.5030	6.1687
31	4.6160	0.3370	2.2431	72	7.0970	0.9660	2.0369	113	15.4160	1.3000	3.8141
32	18.1450	1.0020	5.1135	73	5.8540	1.0640	1.6009	114	9.4720	1.1000	2.4598
33	8.9950	0.6320	3.1918	74	6.3580	1.0670	1.7363	115	11.3430	1.6790	2.4694
34	5.6120	0.4700	2.3092	75	9.7020	0.7530	3.1540	116	7.8500	0.7480	2.5604
35	5.9180	0.6300	2.1033	76	7.8920	1.5630	1.7807	117	8.6930	1.1570	2.2798
36	10.3760	1.0320	2.8813	77	9.8990	1.3290	2.4223	118	8.4620	1.1850	2.1928
37	21.5520	1.8880	4.4247	78	6.9140	0.6610	2.3990	119	16.2780	1.4520	3.8108
38	6.3870	0.7150	2.1308	79	5.4830	0.9470	1.5894	120	4.8100	0.8080	1.5095
39	5.3300	0.8080	1.6727	80	4.9090	0.5220	1.9167	121	9.1290	1.2850	2.2718
40	4.4070	0.4520	1.8491	81	6.2540	1.1520	1.6437	122	16.6060	1.5450	3.7687
41	7.1870	0.8610	2.1049	82	5.2290	0.9850	1.4863	123	7.7470	0.8170	2.4178

TABLA IV (Continuación)

CEL. #	PERIMETRO	AREA	Ie	CEL. #	PERIMETRO	AREA	Ie	CEL. #	PERIMETRO	AREA	Ie
124	14.7638	1.6358	3.2569	165	3.7828	0.4128	1.6621	206	4.7358	0.6888	1.6198
125	7.2688	1.2488	1.8412	166	4.8888	0.5818	1.9449	207	9.2218	0.7378	3.8388
126	7.1318	1.8148	1.9977	167	9.3688	1.8778	2.5464	208	12.3218	1.3828	2.9566
127	7.3958	1.1298	1.9633	168	6.1148	0.6148	2.2811	209	5.2678	0.5548	1.9962
128	7.3198	1.1478	1.9278	169	9.5128	0.9688	2.7273	210	9.8268	1.3748	2.1722
129	6.3948	0.8368	1.9727	170	5.3868	0.7118	1.7751	211	8.2998	1.1548	2.1793
130	8.1538	1.3768	1.9687	171	7.2288	1.8888	1.9596	212	7.7698	0.7798	2.4831
131	18.7528	1.4578	2.5128	172	4.7338	0.4648	1.9681	213	5.9288	0.6698	2.8445
132	18.5878	0.9958	2.9714	173	6.4578	0.9198	1.9881	214	5.5838	0.7988	1.7719
133	16.7588	1.2648	4.2828	174	15.2248	1.5598	3.4395	215	8.5428	0.9638	2.4555
134	12.6238	1.5688	2.8518	175	5.3558	0.5838	2.1299	216	3.6498	0.4868	1.6155
135	6.3588	1.8818	1.7984	176	6.8488	0.8888	2.8593	217	5.8988	0.7428	1.9289
136	15.1168	0.8988	4.4998	177	4.9868	0.4128	2.1913	218	7.5818	1.8258	2.8988
137	28.9398	1.4388	4.9395	178	6.8878	0.6418	2.3984	219	3.2148	0.4318	1.3818
138	24.8268	1.5548	5.4369	179	14.1798	1.8228	3.9565	220	9.5858	0.8888	2.8693
139	18.5458	1.8928	2.8466	180	7.8398	0.6788	2.4259	221	4.6448	0.5868	1.7113
140	11.7188	1.4588	2.7376	181	6.4298	0.8828	1.9311	222	5.8988	0.6158	2.1216
141	16.9658	1.2728	4.2433	182	4.2938	0.5318	1.6619	223	12.2888	1.8678	3.3536
142	9.7768	1.1878	2.6211	183	28.9888	2.8378	5.7295	224	6.8288	0.7698	2.1965
143	8.8138	1.8148	2.4689	184	7.7588	0.9448	2.2525	225	9.6798	1.2338	2.4589
144	7.6868	0.9518	2.2882	185	7.8638	1.8338	2.1824	226	5.8878	0.6568	2.8225
145	8.1238	1.1948	2.8978	186	3.9748	0.3618	1.8658	227	6.5888	0.4458	2.7859
146	8.2468	1.8178	2.3866	187	3.8718	0.3488	1.8511	228	6.7858	1.1738	1.7464
147	9.7378	0.8198	3.8351	188	17.8728	1.3868	4.2141	229	12.3858	1.4398	2.8936
148	13.1838	1.3328	3.2222	189	2.6428	0.1988	1.7898	230	6.5128	0.5288	2.5475
149	13.8618	1.4758	3.2195	190	4.8348	0.5888	1.7986	231	5.5368	0.7788	1.7785
150	9.9938	1.2748	2.4975	191	7.2838	0.9828	2.1395	232	5.9258	0.7158	1.9766
151	6.8818	0.5788	2.5532	192	7.2468	1.8388	2.8141	233	13.8928	1.6538	2.8725
152	28.9868	1.3118	5.1587	193	4.8588	0.3838	2.8796	234	5.5458	0.7528	1.8838
153	11.3398	0.6598	3.9483	194	18.3498	0.4198	4.5181	235	5.9638	0.4548	2.4965
154	6.2388	0.6858	2.1262	195	13.8448	0.9938	3.6926	236	7.1488	1.1428	1.8848
155	5.6768	0.7868	1.9856	196	5.5718	0.6358	1.9722	237	7.7998	0.7728	2.5839
156	5.9888	0.5988	2.1844	197	5.5178	0.3898	2.7997	238	5.2898	0.6488	1.8254
157	4.5638	0.5688	1.7281	198	18.8918	1.1438	2.6626	239	8.4188	1.8728	2.2914
158	5.9828	0.7768	1.8988	199	19.8838	1.6268	4.2839	240	9.8358	1.8238	2.7438
159	5.7718	0.6248	2.8689	200	26.8548	2.2748	4.8739	241	43.8698	2.3748	8.8318
160	4.1718	0.7898	1.3246	201	5.1888	0.5328	1.9756	242	4.9838	0.8528	1.4984
161	6.1688	0.6168	2.2148	202	18.9638	1.6528	4.1619				
162	13.8488	0.9468	3.7844	203	6.6138	0.8238	2.8563				
163	12.3728	0.7598	4.8868	204	6.9758	0.6498	2.4424				
164	14.3218	0.8828	4.5111	205	6.5898	0.7738	2.1141				

#### Tabla IV

Valores del perímetro, área e índice eidométrico de una muestra de 242 células horizontales registradas y marcadas iontoforéticamente con HRP en retinas in vivo y aislada de retina de carpa. La enzima se inyectó intracelularmente y se permitieron sobrevidas desde 0,3 a 30 hrs.

veces  $\sigma$  (0,167) (Tabla V). El histograma de frecuencia respectivo (Figura 9) muestra un agrupamiento principal entre 1,3 y 3,4, un segundo agrupamiento entre 3,5 y 4,5 y varios puntos dispersos desde 4,9 a 8,1.

## 6. COMENTARIOS.

Resulta tentador suponer que cada agrupamiento corresponda a uno de los tres tipos morfológicos descritos, vale decir, H1, H2 y H3. Más aún si observamos la posición que ocupan en el eje Ie los prototipos de CH de Stell (1975) para pez dorado y de Weiler (1978) para la carpa (Figura 10). Hay que mencionar tres cosas respecto de los prototipos de Stell y Weiler; primero, que sólo se marcó su posición en el eje del índice y no su frecuencia, ya que la muestra que ambos autores presentan en sus respectivos trabajos no sobrepasa las 20 CH factibles de cuantificar, en modo alguno comparable a la presente muestra de 242 células. Segundo, de mayor interés para el presente trabajo es que el índice eidométrico refleja realmente las categorías morfológicas propuestas por Stell (1975), quien trabajó con retinas de dos variedades de pez dorado (C. auratus). Su clasificación de las CH en tres tipos está claramente apoyada por Ie (compare la Figura 10A con la Figura 9). Tercero, los prototipos H3 de Weiler, quien trabajó con retina de carpa (C. carpio), exhiben valores bajos de Ie, que incluso se sobreponen a los valores para células del tipo

TABLA V

Análisis de Frecuencia de Ie

CLASS	LOWER LIMIT	UPPER LIMIT	MIDPOINT	FREQUENCY	RELATIVE FREQUENCY	CUMULATIVE FREQUENCY	CUM. REL. FREQUENCY
AT OR BELOW		.000		0	.00000	0	.00000
1	.000	.167	.0837	0	.00000	0	.00000
2	.167	.335	.2510	0	.00000	0	.00000
3	.335	.502	.4183	0	.00000	0	.00000
4	.502	.669	.5857	0	.00000	0	.00000
5	.669	.837	.7530	0	.00000	0	.00000
6	.837	1.004	.9203	0	.00000	0	.00000
7	1.004	1.171	1.0877	0	.00000	0	.00000
8	1.171	1.339	1.2550	1	.00413	1	.00413
9	1.339	1.506	1.4223	7	.02893	8	.03306
10	1.506	1.673	1.5897	13	.05372	21	.08678
11	1.673	1.841	1.7570	24	.09917	45	.18595
12	1.841	2.008	1.9243	28	.11570	73	.30165
13	2.008	2.175	2.0917	27	.11157	100	.41322
14	2.175	2.343	2.2590	25	.10331	125	.51653
15	2.343	2.510	2.4263	25	.10331	150	.61983
16	2.510	2.677	2.5937	14	.05785	164	.67769
17	2.677	2.845	2.7610	11	.04545	175	.72314
18	2.845	3.012	2.9283	12	.04959	187	.77273
19	3.012	3.179	3.0957	7	.02893	194	.80165
20	3.179	3.347	3.2630	4	.01653	198	.81818
21	3.347	3.514	3.4303	3	.01240	201	.83058
22	3.514	3.681	3.5977	0	.00000	201	.83058
23	3.681	3.849	3.7650	8	.03306	209	.86364
24	3.849	4.016	3.9323	7	.02893	216	.89256
25	4.016	4.183	4.0997	3	.01240	219	.90496
26	4.183	4.351	4.2670	4	.01653	223	.92149
27	4.351	4.518	4.4343	4	.01653	227	.93802
28	4.518	4.685	4.6017	0	.00000	227	.93802
29	4.685	4.853	4.7690	1	.00413	228	.94215
30	4.853	5.020	4.9363	3	.01240	231	.95455
31	5.020	5.187	5.1037	3	.01240	234	.96694
32	5.187	5.355	5.2710	0	.00000	234	.96694
33	5.355	5.522	5.4383	1	.00413	235	.97107
34	5.522	5.689	5.6057	0	.00000	235	.97107
35	5.689	5.857	5.7730	1	.00413	236	.97521
36	5.857	6.024	5.9403	1	.00413	237	.97934
37	6.024	6.191	6.1077	1	.00413	238	.98347
38	6.191	6.359	6.2750	0	.00000	238	.98347
39	6.359	6.526	6.4423	1	.00413	239	.98760
40	6.526	6.693	6.6097	0	.00000	239	.98760
41	6.693	6.861	6.7770	0	.00000	239	.98760
42	6.861	7.028	6.9443	1	.00413	240	.99174
43	7.028	7.195	7.1117	1	.00413	241	.99587
44	7.195	7.363	7.2790	0	.00000	241	.99587
45	7.363	7.530	7.4463	0	.00000	241	.99587
46	7.530	7.697	7.6137	0	.00000	241	.99587
47	7.697	7.865	7.7810	0	.00000	241	.99587
48	7.865	8.032	7.9483	1	.00413	242	1.00000
ABOVE	8.032			0	.00000	242	1.00000

Tabla V

Análisis de frecuencia del índice eidométrico para la muestra de 242 células listadas en la Tabla IV. Se dividió la muestra en 48 intervalos de clase con un ancho de 0,167.

### Histograma de Frecuencia

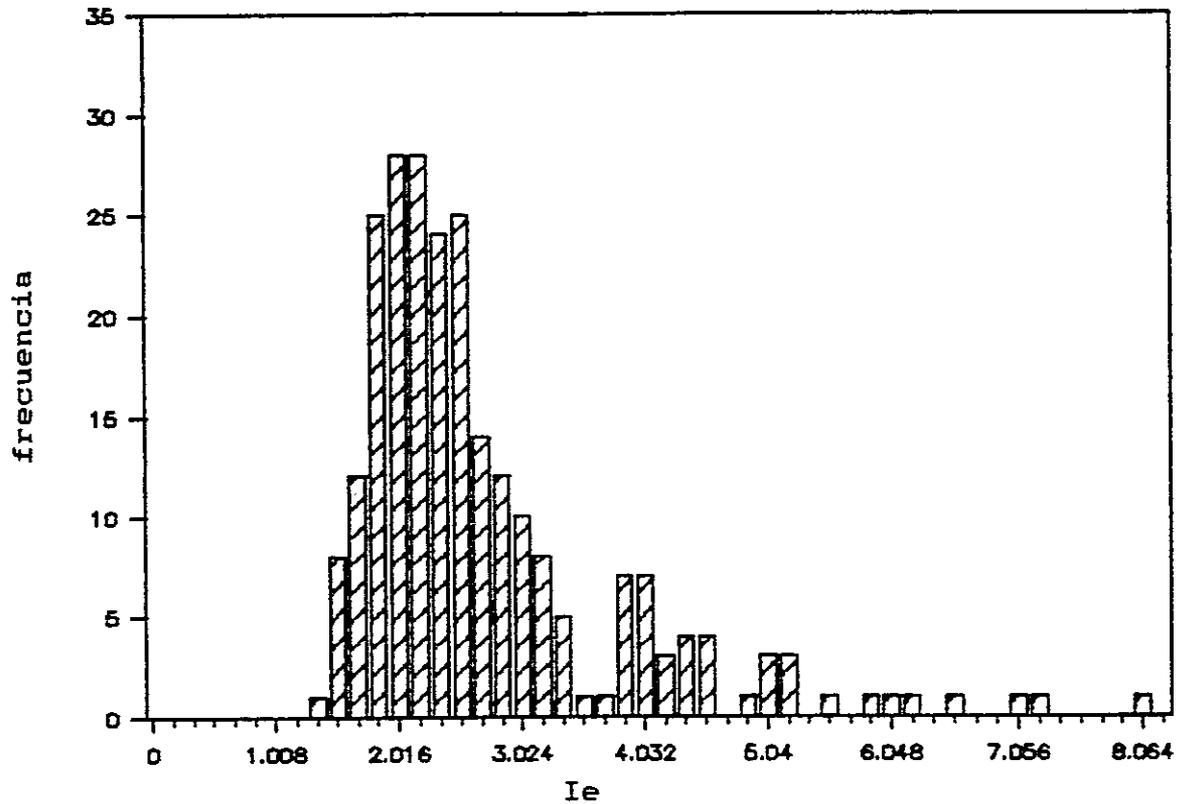


Figura 9

Histograma de frecuencia del índice eidométrico (Ie) de una muestra de 242 células horizontales de retina de carpa, tanto in vivo como en retina aislada, teñidas con HRP mediante microinyecciones intracelulares iontoforéticas de la enzima. El análisis de frecuencia de Ie está tabulado en la Tabla V. Es evidente un gran agrupamiento entre 1,3 y 3,4; un segundo grupo, pequeño, compacto, entre 3,5 y 4,5; finalmente, un tercer grupo, bastante más disperso, entre 4,9 y 8,1.

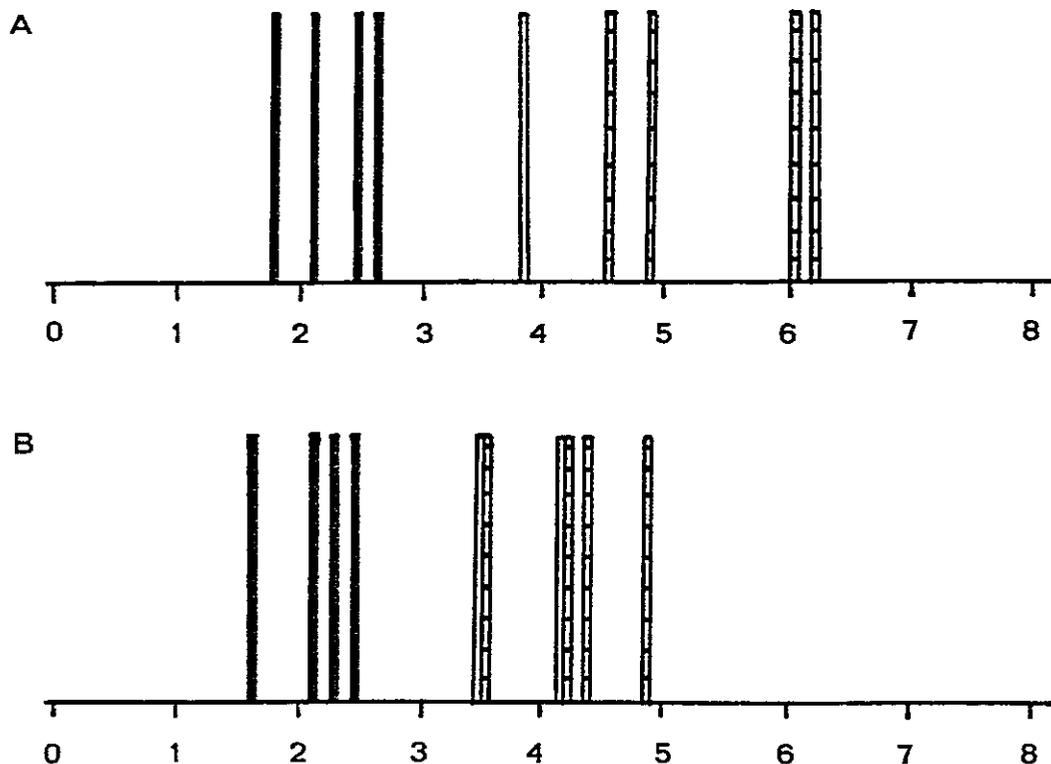


Figura 10

Posición que ocupan en el eje del índice eidométrico (Ie) las células horizontales usadas como prototipos de las clases H1, H2 y H3. A. Distribución de células de la retina de dos variedades de pez dorado, tomado de Stell (1975). B. Distribución de células de la retina de carpa, tomado de Weiler (1978). Tanto en A como en B, las células con impregnación Golgi fueron fotografiadas de los trabajos originales y la proyección del negativo se dibujó en cámara lúcida, a los cuales se les calculó Ie. Barras negras: H1, blancas: H2, achurada: H3.

H2, de modo que, según el índice, los tipos morfológicos de CH de carpa son solo dos y no tres, como propone Weiler.

Ahora bien, aplicando pruebas de ajuste de distribución de frecuencia a la muestra de 242 CH, resultó infructuoso el agrupamiento en tres categorías. Tampoco hubo un ajuste significativo al considerar toda la muestra como una población única. Pero, cuando la muestra fue dividida en dos grupos (Tabla VI), el ajuste a una distribución del tipo lognormal fue significativa para uno de los grupos y razonablemente buena para el otro (Figura 11). La bondad del ajuste de distribución se comprobó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov; para el Grupo I dió un  $D_{\text{máx}} = 0,038$  contra un valor crítico de 0,010 ( $\alpha=0,05$  y  $N=201$ ); para el Grupo II, la bondad de ajuste no fue tan bueno, con un  $D_{\text{máx}} = 0,17$  contra un valor crítico de 0,212 ( $\alpha=0,05$  y  $N=41$ ) (el ajuste es significativo para  $\alpha=0,20$ , con un valor crítico de 0,168).

Esta distribución observada de los tipos morfológicos es una propiedad de la población, puesto que la marcación de las células no se hizo a priori según su morfología, sino que estrictamente al azar, previa identificación del registro electrofisiológico de la unidad inyectada.

No hay referencias sobre las frecuencias relativas de los distintos tipos de horizontales en diferentes especies; lo más próximo se refiere a CH clasificadas de acuerdo a la capa que ellas ocupan dentro de la retina, esto es, CH

TABLA VI

A. Tabulación de Frecuencia Grupo I

CLASS	LOWER LIMIT	UPPER LIMIT	MIDPOINT	FREQUENCY	RELATIVE FREQUENCY	CUMULATIVE FREQUENCY	CUM. REL. FREQUENCY
AT OR BELOW		1.20		0	.00000	0	.00000
1	1.20	1.28	1.24	0	.00000	0	.00000
2	1.28	1.36	1.32	1	.00498	1	.00498
3	1.36	1.44	1.40	3	.01493	4	.01990
4	1.44	1.52	1.48	5	.02488	9	.04478
5	1.52	1.60	1.56	4	.01990	13	.06468
6	1.60	1.68	1.64	8	.03980	21	.10448
7	1.68	1.76	1.72	10	.04975	31	.15423
8	1.76	1.84	1.80	14	.06965	45	.22388
9	1.84	1.92	1.88	12	.05970	57	.28358
10	1.92	2.00	1.96	16	.07960	73	.36318
11	2.00	2.08	2.04	14	.06965	87	.43284
12	2.08	2.16	2.12	12	.05970	99	.49254
13	2.16	2.24	2.20	16	.07960	115	.57214
14	2.24	2.32	2.28	10	.04975	125	.62189
15	2.32	2.40	2.36	5	.02488	130	.64677
16	2.40	2.48	2.44	13	.06468	143	.71144
17	2.48	2.56	2.52	12	.05970	155	.77114
18	2.56	2.64	2.60	6	.02985	161	.80100
19	2.64	2.72	2.68	5	.02488	166	.82587
20	2.72	2.80	2.76	9	.04478	175	.87065
21	2.80	2.88	2.84	4	.01990	179	.89055
22	2.88	2.96	2.92	5	.02488	184	.91542
23	2.96	3.04	3.00	5	.02488	189	.94030
24	3.04	3.12	3.08	1	.00498	190	.94527
25	3.12	3.20	3.16	5	.02488	195	.97015
26	3.20	3.28	3.24	3	.01493	198	.98507
27	3.28	3.36	3.32	2	.00995	200	.99502
28	3.36	3.44	3.40	1	.00498	201	1.00000
29	3.44	3.52	3.48	0	.00000	201	1.00000
30	3.52	3.60	3.56	0	.00000	201	1.00000
ABOVE	3.60			0	.00000	201	1.00000

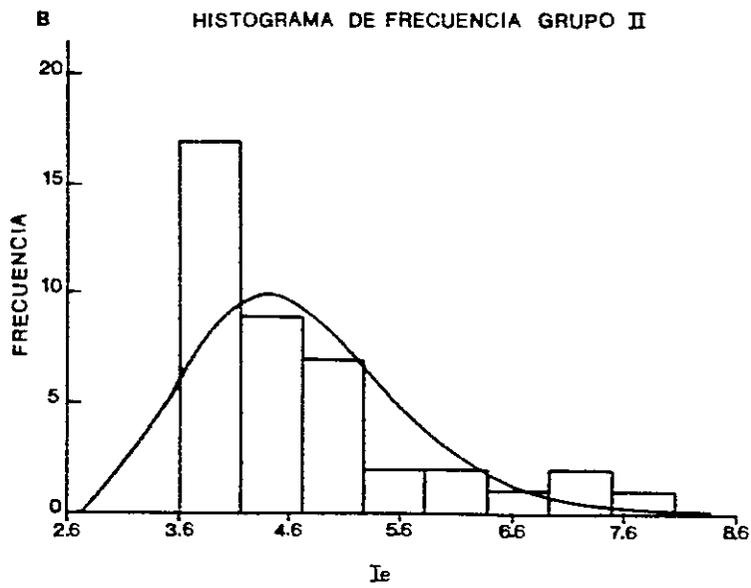
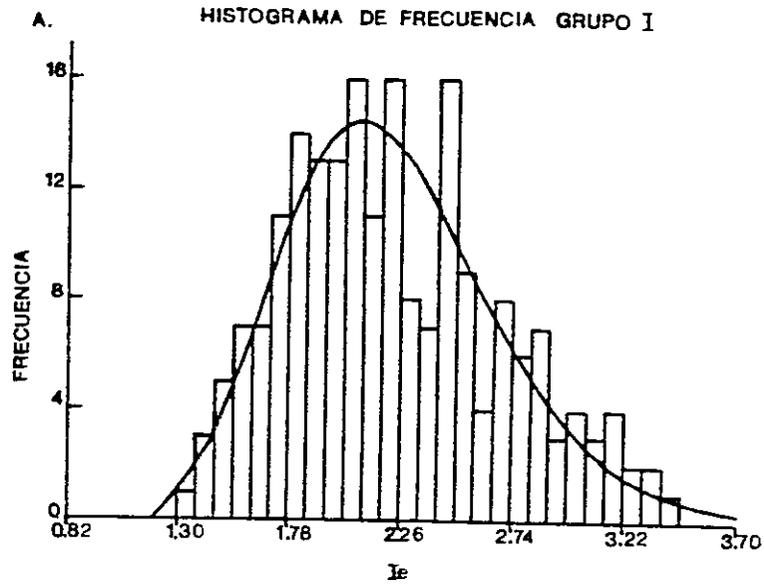
B. Tabulación de Frecuencia Grupo II

CLASS	LOWER LIMIT	UPPER LIMIT	MIDPOINT	FREQUENCY	RELATIVE FREQUENCY	CUMULATIVE FREQUENCY	CUM. REL. FREQUENCY
AT OR BELOW		3.60		0	.0000	0	.000
1	3.60	4.16	3.88	17	.4146	17	.415
2	4.16	4.71	4.43	9	.2195	26	.634
3	4.71	5.27	4.99	7	.1707	33	.805
4	5.27	5.82	5.54	2	.0488	35	.854
5	5.82	6.38	6.10	2	.0488	37	.902
6	6.38	6.93	6.66	1	.0244	38	.927
7	6.93	7.49	7.21	2	.0488	40	.976
8	7.49	8.04	7.77	1	.0244	41	1.000
9	8.04	8.60	8.32	0	.0000	41	1.000
ABOVE	8.60			0	.0000	41	1.000

### Tabla VI

Análisis de frecuencia del índice eidométrico de la muestra de 242 células listadas en la Tabla IV ahora divididas en dos conjuntos: A. Grupo I, con un rango de valores de  $I_e$  entre 1,20 y 3,60. B. Grupo II, con un rango de valores de  $I_e$  entre 3,60 y 8,60. Esta tabla es la base del histograma de frecuencia mostrado en la Figura 11.

Figura 11



### Figura 11

Histogramas de frecuencia y ajuste de distribución de los datos consignados en la Tabla VI. A. El gráfico de barras representa la distribución observada de los datos del Grupo I y la línea continua que se sobrepone a éstos es la función de distribución lognormal teórica para un conjunto de datos con igual promedio y varianza que la muestra observada. La prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov resultó significativa, con un  $D_{\text{máx}} = 0,038$  con un valor crítico de  $0,01$  ( $\alpha=0,05$ ). B. En el caso del Grupo II, el ajuste de distribución más cercano para ser significativo se obtuvo con una función de distribución lognormal (línea continua) respecto de los datos observados (barras); aquí la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov dió un  $D_{\text{máx}} = 0,17$  contra un valor crítico de  $0,212$  ( $\alpha=0,05$ ) (ver texto).

externas:medias:internas en una proporción de 4:2:1 en el pez dorado (Wagner, 1972), o bien en 4:1:1 en un teleósteo marino (Podugolnikova & Maksimov, 1973), respectivamente. Sin embargo, ninguno de estos trabajos menciona qué tipo de células correspondió a cada una de las capas. Vale hacer notar que posteriormente se determinó que la capa interna de Ramón y Cajal (1893) es la de axones ensanchados (Stell & Lightfoot, 1975).

Stell & Lightfoot (1975) usaron la razón entre las dimensiones del árbol dendrítico y del pericarion como un criterio que les permitiera discernir entre los distintos tipos morfológicos de CH. Las mediciones, basadas en reconstrucciones de cortes seriados de 1  $\mu$ m de grosor de retinas de pez dorado con impregnación Golgi y, con una muestra de solo 54 células, mostraron valores que efectivamente caracterizan a los tres tipos de CH (ver Tablas 1 y 2 en Stell & Lightfoot, 1975). Pese a ello, considerando las desviaciones del valor central tabulado, existe sobreposición entre células del tipo H1 con las de tipo H2 (Tabla 2, *ibid.*), es decir, confusión en su identificación.

Ambos autores usaron además, como criterios de clasificación, la distancia relativa de las CH respecto de la capa sináptica externa y el número de contactos sinápticos entre CH y conos. Esto último implica necesariamente el estudio de cortes seriados ultrafinos observados por

microscopía electrónica. Muchos investigadores han prescindido de este criterio para determinar el tipo morfológico de las CH, entre ellos Weiler (1978). Finalmente, aunque algunos investigadores sostienen la existencia de tres capas de CH (Kaneko & Stuart, 1984), éstas no siempre están claramente ubicadas en estratos entre ellas (Figura 1), resultando ambiguo cualquier intento de cuantificar su distancia relativa a la plexiforme externa.

El índice eidométrico, diseñado para ser aplicado en figuras de geometría plana como las CH, no da lugar a confusiones en la caracterización morfológica, debido a que sitúa a cada célula en una escala lineal a medida que éstas aumentan la complejidad de su contorno. Al calcular el  $I_e$  de las CH del pez dorado (*C. auratus*) clasificadas por Stell (1975), la agrupación de ellas en tres grupos surge de inmediato. En cambio, las H2 y H3 de carpa (*C. carpio*) mostradas por Weiler (1978) tienden a mezclarse (Figura 10B). Esta confusión ilustra las dificultades para juzgar con propiedad un factor tan elusivo como el tipo morfológico al que pertenece cierta célula en presencia de un modelo aceptado. Con una muestra de 242 células, es posible apreciar una tendencia; ésta fue manifiesta al calcular el índice eidométrico,  $I_e$ , determinando sólo dos poblaciones en la muestra. La primera (figura 11A), sigue una distribución del tipo lognormal, en tanto que la segunda población (Figura 11B)

estadísticamente no se ajusta a ninguna, pero está muy próxima a una distribución lognormal, con un  $D_{\text{máx.}}$  de 0,17 contra un valor crítico de 0,212 ( $\alpha=0,05$ ) para la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Puesto que todas las CH tienen una génesis común, no habría razón para suponer que la frecuencia de aquellas del Grupo II se distribuyera de un modo diferente a las del Grupo I, de manera que el problema de la falta de significancia podría atribuirse a otras causas.

Lo más probable, por tanto, es que morfológicamente sólo haya dos poblaciones de CH en la retina de la carpa, una de las cuales involucra a las clasificadas como H1 y la otra, agrupa un espectro morfológico más amplio, donde se incluyen los tipos H2 y H3. Estos resultados deberían conducir a una nueva nomenclatura para clasificar las CH de la carpa; sin embargo, mientras esto se resuelve, seguiré usando donde sea aplicable la nomenclatura vigente.

## PARTE IV

### RELACION FORMA-RESPUESTA

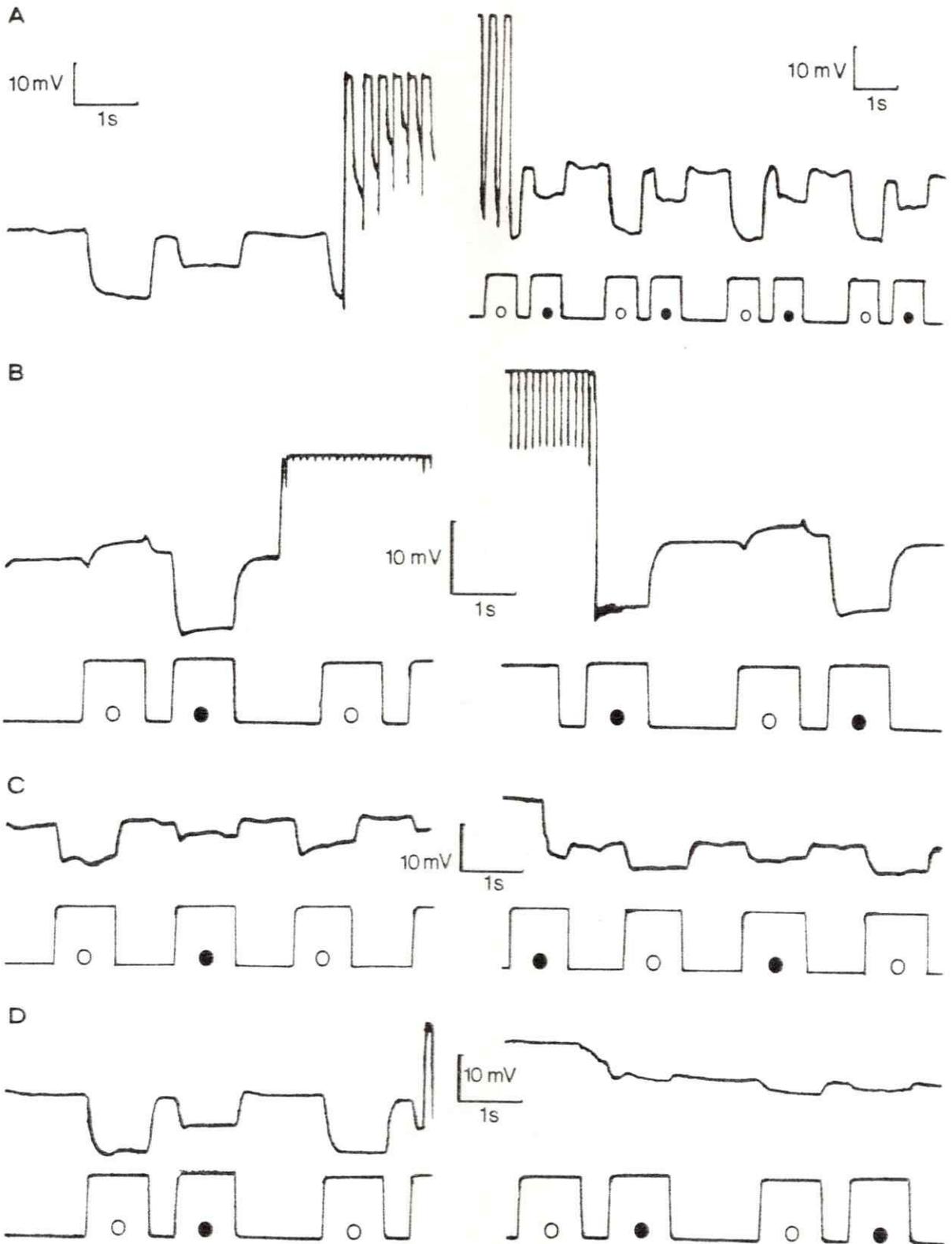
Reuniendo los datos de los registros electrofisiológicos y morfológicos, fue posible distinguir dos situaciones distintas respecto a la relación forma-respuesta.

#### 1. COINCIDENCIA DE LA RELACION FORMA-RESPUESTA.

Durante la fase experimental de registro intracelular no hay manera de determinar la forma de la célula en cuestión (excepto en células cuya morfología conocida es relativamente constante, lo que no es aplicable a las CH). Por esta razón fue muy importante reconocer sin errores la respuesta registrada con el microelectrodo antes de proceder a inyectar iontoforéticamente el trazador HRP, sabiendo así si se trataba de una horizontal de tipo L o C. La respuesta fue estrictamente controlada para detectar cualquier anomalía fisiológica o técnica durante el procedimiento de inyección.

Las Figuras 12 y 13 muestran algunos casos en los cuales la respuesta registrada correspondió a la morfología esperada. Esto es, respuestas de tipo L revelaron CH del tipo H1 (Figuras 12 y 13 A, C, D) y, respuestas de tipo C revelaron corresponder a células del tipo H2 (Figura 12 y 13 B). Como muestran los registros de cada célula marcada, las respuestas pese a sufrir un decremento apreciable en algunos casos

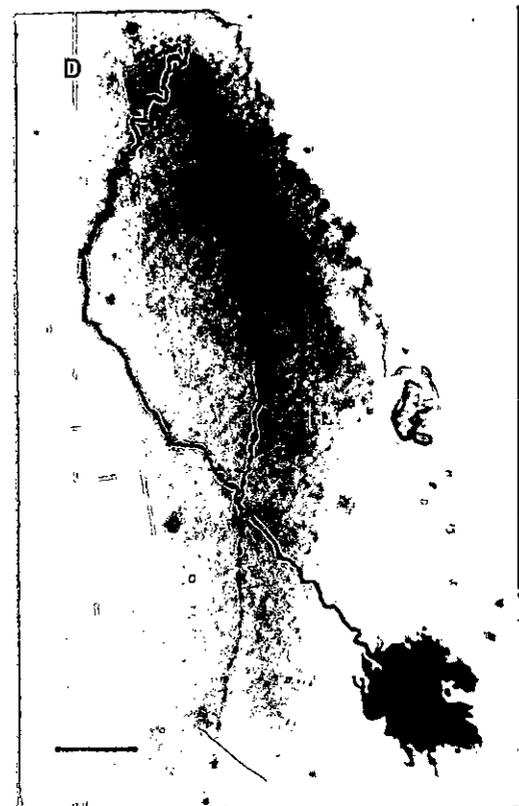
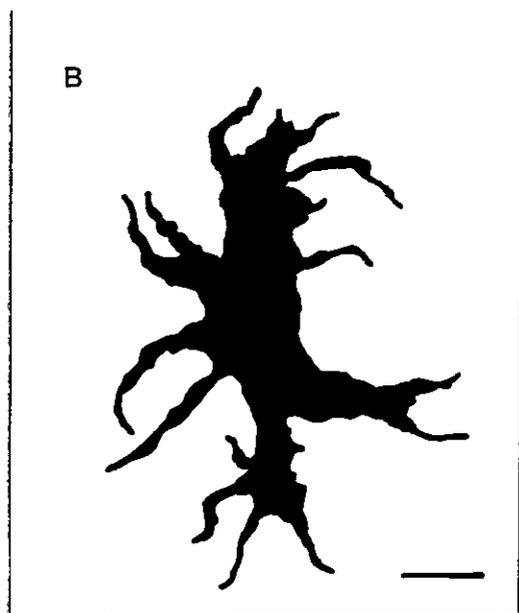
Figura 12



## Figura 12

Registros electrofisiológicos de CH de retina de carpa in vivo antes (izquierda) y después (derecha) de la inyección intracelular de HRP. Se registraron respuestas de tipo-L (A, C, D) y de tipo-C (B) ante la estimulación de la retina con pulsos alternados de luz monocromática de 650 nm (○) y 520 nm (●) y 960 ms de duración. Tras la inyección de HRP, las células revelaron corresponder con el tipo morfológico esperado; se muestran en la Fig. 13 A-D, respectivamente. En el caso del registro D, la respuesta de la célula terminó bastante depolarizada y la amplitud deprimida respecto del comienzo.

Figura 13



### Figura 13

Microfotografía de CH teñidas con HRP y cuyas respuestas se muestran en los registros de la Fig. 12. En A, C y D, células tipo H1; B, tipo H2 (dibujo). Las morfologías de las cuatro células se corresponden a las respuestas de ellas registradas (Fig. 12, A-D, respectivamente) apoyando la relación forma respuesta. A. Tiempo de sobrevida: 22 Hrs. Carga inyectada: 480 nC. B. Tiempo de sobrevida: 20 Hrs. Carga inyectada: 372 nC. C. Tiempo de sobrevida: 23 Hrs. Carga inyectada: 1215 nC. D. Tiempo de sobrevida: 23 Hrs. Carga inyectada: 720 nC. Barra de calibración: A, 20  $\mu\text{m}$ ; B y C, 10  $\mu\text{m}$ ; D, 25  $\mu\text{m}$ .

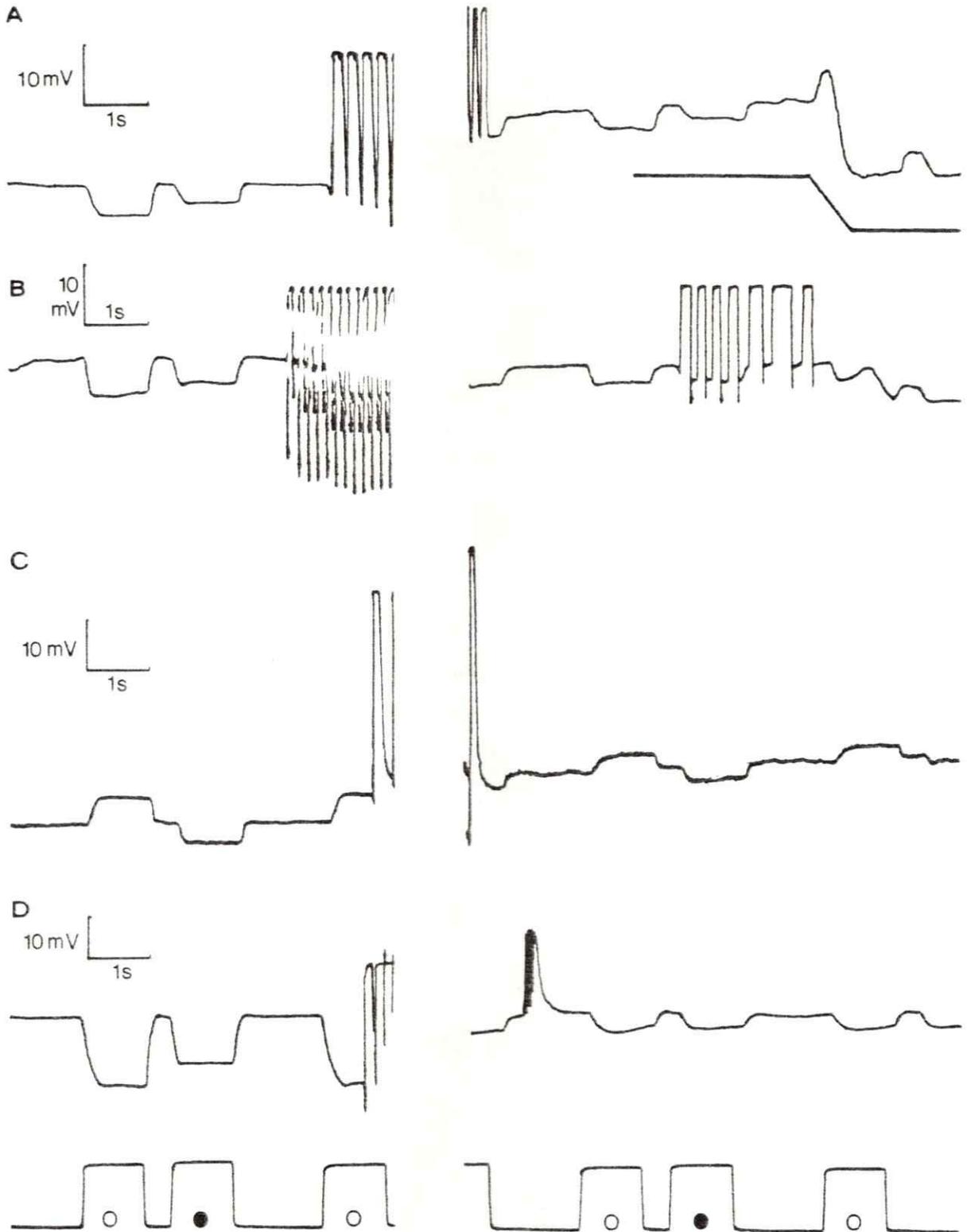
después de la inyección, mantienen las características que tenían antes de ser inyectadas.

## 2. NO COINCIDENCIA DE LA RELACION FORMA-RESPUESTA.

Se presentan cuatro ejemplos en las Figuras 14 y 15 para ilustrar situaciones en las cuales la CH registrada reveló una forma no relacionada con su respuesta. Así tenemos que una respuesta de tipo L reveló posteriormente una CH tipo H2 (Figuras 14 y 15 A, B); de modo inverso, respuestas de tipo C exhibieron formas propias de horizontales de tipo H1 (Figura 14 C). El caso más ilustrativo al respecto se muestra en la Figura 14 D, donde se registró una célula cuyo registro es de tipo L, pero cuya forma corresponde a una H3; esta célula, aunque algo dañada por la inyección, muestra los sitios de penetración del microelectrodo con HRP, localizados en sus dendritas.

Los registros son fundamentales en estos casos, pues se podría pensar que se comenzó a registrar una CH tipo H1, por ejemplo, pero que durante la inyección y, debido a movimientos residuales del pez, el microelectrodo penetró una célula tipo H2. Esto induciría a errores de interpretación. Sin embargo este no es el caso. Antes y después de la inyección, la célula penetrada mantuvo el mismo tipo de respuesta (Figura 14), a pesar de leves cambios en la línea base del registro y una disminución en la amplitud de respuesta, por lo cual se puede

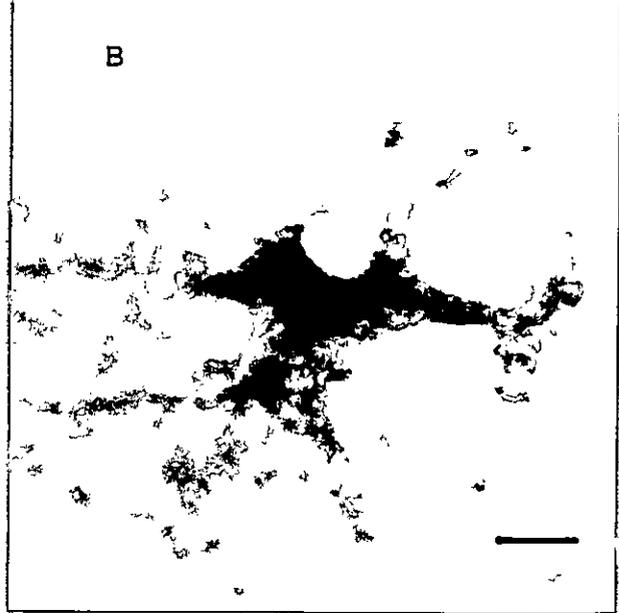
Figura 14



#### Figura 14

Registros electrofisiológicos de CH de retina de carpa in vivo antes (izquierda) y después (derecha) de la inyección intracelular de HRP. Se registraron respuesta de tipo-L (A, B, D) y de tipo-C (C) ante la estimulación de la retina con pulsos alternados de luz monocromática de 650 nm (○) y 520 nm (●) y 960 ms de duración. Tras la inyección de HRP las células registradas revelaron poseer formas no relacionadas con su respuesta (ver Fig. 15). En los cuatro registros mostrados, las respuestas mantienen sus características, pese a estar algo deprimidas en amplitud respecto del registro pre-inyección. La línea gruesa bajo la respuesta post-inyección del registro A señala el descenso manual de la línea base en el amplificador de registro.

Figura 15



### Figura 15

Microfotografías de las CH teñidas con HRP y cuyas respuestas se muestran en los registros de la Fig. 14. En A y B, CH tipo H2; C, tipo H1; D, tipo H3. Las morfologías de las células (A-D) no están relacionadas con las respuestas de ellas registradas (Fig. 14, A-D, respectivamente), en desacuerdo a la relación morfología-respuesta. La célula en D muestra los sitios de inyección en sus dendritas, evidenciando daño mecánico aparente. A. Tiempo de sobrevida: 4,5 Hrs. Carga inyectada: 688 nC. B. Tiempo de sobrevida: 4,5 Hrs. Carga inyectada: 384 nC. C. Tiempo de sobrevida: 26 Hrs. Carga inyectada: 720 nC. D. Tiempo de sobrevida: 24 Hrs. Carga inyectada: 462 nC. Barra de calibración (en  $\mu\text{m}$ ): A, C, 20; B, D, 10  $\mu\text{m}$ .

aceptar que el microelectrodo no se salió ni cambió de célula.

### 3. COMENTARIOS.

Si bien es cierto que comunmente fue posible constatar correspondencia entre las respuestas registradas y los tipos morfológicos de las células marcadas, no es menos cierto que en varias ocasiones dicha relación no se cumplió. La evidencia presentada es lo suficientemente clara al respecto (Figuras 14 y 15), puesto que respuestas de tipo L fueron registradas de células H2 y H3 y de células tipo H1 se registraron respuestas tipo C; el ejemplo más claro corresponde a una célula H3 que evidencia los sitios de penetración del microelectrodo y cuya respuesta fue L fotópica (Figuras 14 D y 15 D). Como en toda célula excitable, la actividad eléctrica de las CH depende de la activación o desactivación de canales iónicos específicos, cuya acción conjunta define una respuesta de tipo L o C. Así, la respuesta queda determinada por el tipo de señal eléctrica que la célula recibe de células presinápticas. En efecto, se ha demostrado en retina de tortuga que la fase depolarizante de la respuesta de tipo C1 (respuesta bifásica) es generada por la inhibición de conos sensibles al verde por células de respuesta de tipo L, en un proceso de retroalimentación (Fourtes & Simon, 1974). Hay indicios de que algo similar podría ocurrir en la carpa (Hedden & Dowling, 1978). Se sabe que su actividad

además depende de señales recibidas de otras CH, tanto a través de gap-junctions (Naka & Rushton, 1967; Kaneko, 1971; Hassin, 1979; Witkovsky et al., 1979; Kretz et al., 1982; Kaneko & Stuart, 1984; Kouyama & Watanabe, 1986) como de contactos sinápticos GABAérgicos (Lam, 1975; Marc et al., 1978; Yazulla & Brecha, 1980; Yazulla & Kleinschmidt, 1982; Ehinger, 1983) y de las células interplexiformes, dopaminérgicas en los ciprinidos (Dowling & Ehinger, 1978). Por tanto, la respuesta eléctrica registrada depende de los contactos sinápticos que la célula establece y, en este sentido los resultados aquí presentados parecen sugerir fuertemente que el tipo de respuesta de una CH de retina de carpa no está necesariamente ligada a su forma.

Djamgoz et al. (1985), mostraron que células tipo H2 de retina de R. rutilus (pez ciprinido) pueden dar respuestas puramente hiperpolarizantes, es decir de tipo L, si se les condiciona previamente a oscuridad, mostrando que el tipo de respuesta L o C1 depende de la condición de adaptación fótica; morfológicamente exhibe características de plasticidad, con variación en el número de espinulas entre dendritas de la CH y los pedículos del cono, sitio en el cual se supone ocurra la sinápsis de retroalimentación inhibitoria entre las horizontales y conos (Raynauld et al., 1979). La plasticidad entre los contactos de fotoreceptores y otras neuronas ya es evidente en otros sistemas de fotorecepción más primitivos;

los fotoreceptores pineales alteran la cantidad de cintas sinápticas que establecen sobre las células ganglionares pineales de acuerdo a un determinado régimen de adaptación fótica (McNulty, 1984).

Puesto que parece poco probable que las características fisiológicas de una CH determinen su forma (o vice-versa), ésta debe estar influenciada por otros factores. Uno de ellos puede ser el reducido espacio físico de la retina, en el cual se sitúan estratificadas cinco tipos diferentes de células; cada capa tiene su propia densidad celular, pero conservando un alto grado de empaquetamiento entre ellas.

Kaneko & Stuart (1984) propusieron que las CH de un mismo tipo morfológico se conectan, entre sí, estratificadas en tres capas. Las células tipo H1 ocupan el estrato más externo, las H2 el estrato medio y las H3 el interno; los axones terminales ocuparían la capa bajo las H3. Las CH más internas de la retina, deben permitir el paso de los axones de las más externas hacia la zona de los axones terminales; bajo este punto de vista, una célula de gran superficie y contorno poco sinuoso, como una H1, dificultaría severamente el paso de los axones si se ubicara en una capa interna, lo que lleva a suponer que la forma de una célula, a medida que se internaliza en la retina, facilitaría el paso de los axones si disminuyera en área y aumentara la sinuosidad de su contorno. No hay, sin embargo, evidencia anatómica de la estratificación

propuesta. Recordemos que los axones de las CH son finos y sólo se ensanchan en sus porciones terminales dentro de la capa plexiforme externa, sin ejercer demandas de espacio a los somas. Este argumento podría, a la inversa, establecer que las células más externas deberían dejar paso a las terminaciones dendríticas hacia los receptores de aquellas CH más profundas.

Un factor más decisivo para la modificación de la forma de las CH parece ser la necesidad de permitir el paso a las células bipolares y sus ramificaciones dendríticas.

## PARTE V

### RETINA AISLADA

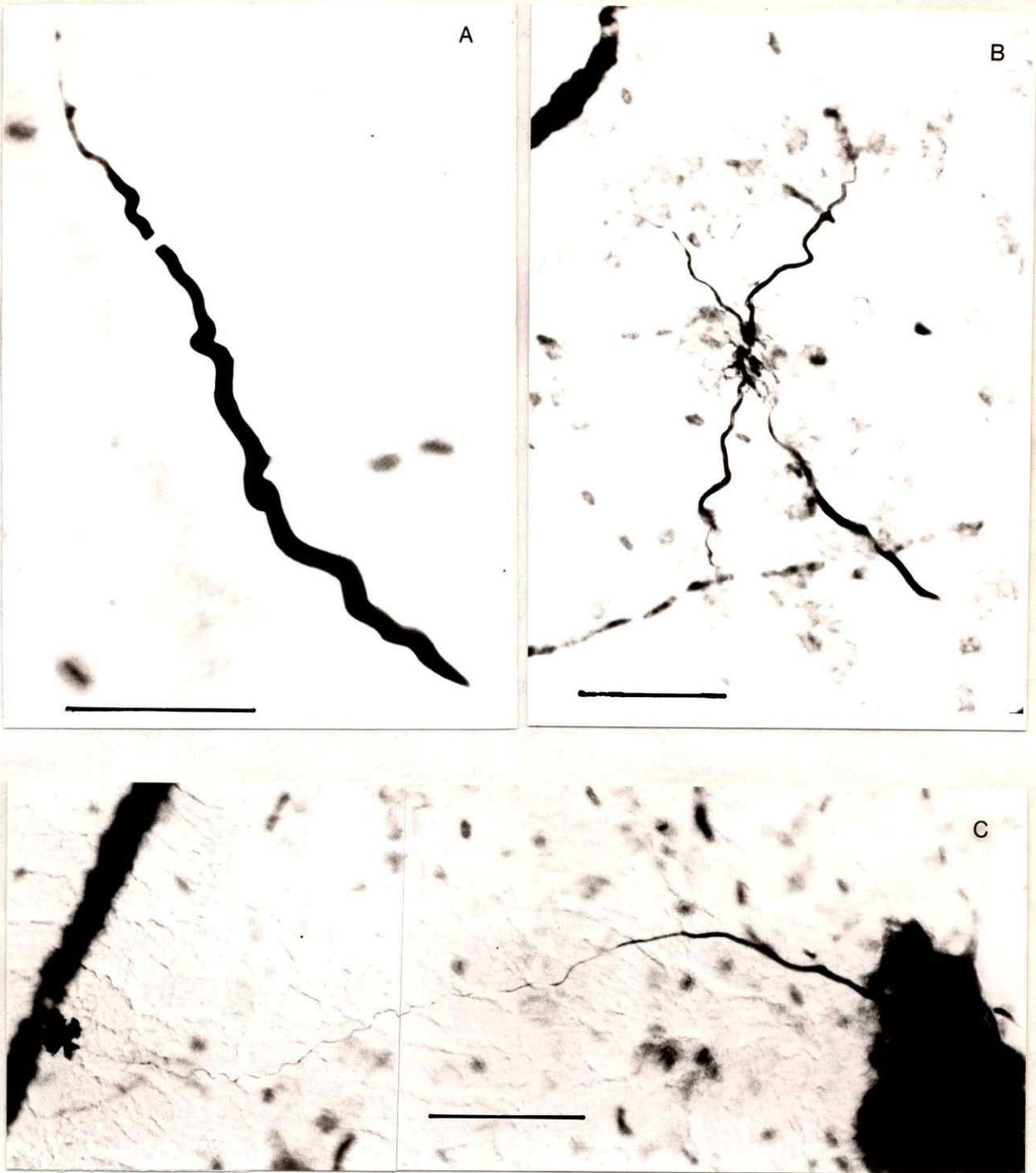
#### 1. MORFOLOGIA Y RESPUESTAS DE CH EN RETINAS AISLADAS.

Para comprobar que los despliegues de células marcadas no fuesen un artificio de técnica, se diseñó una serie de experimentos en retina aislada que permitieran comparar la preparación in vivo con la tradicional in vitro.

Se trataron 30 retinas con resultados positivos en solo 14 de ellas. La mayoría de las células inyectadas identificadas por el tipo de respuesta fueron L-fotópicas (ver Tabla II). Los potenciales de respuesta de todas las CH registradas fueron pequeños, rara vez excedieron los 8 mV y, en promedio, sus respuestas eran del orden de los 5 mV para las de tipo L y alrededor de la mitad para las respuestas de tipo C.

La marcación parcial fue predominante en esta serie de experimentos. Se obtuvieron CH incompletas, casi siempre solo fue visible el axón terminal (Figura 16A) o bien, la inyección reveló una zona de cruce de axones terminales (Figura 16B). Solo una CH fue completamente teñida (Figura 16C), que de acuerdo a la clasificación morfológica corresponde al tipo H1. Las respuestas de estas células se muestran en la Figura 17, antes y después de la inyección. El corto tiempo de sobrevida que exige esta preparación para prevenir el deterioro

Figura 16

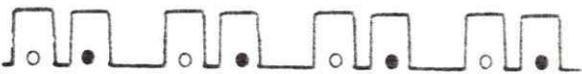
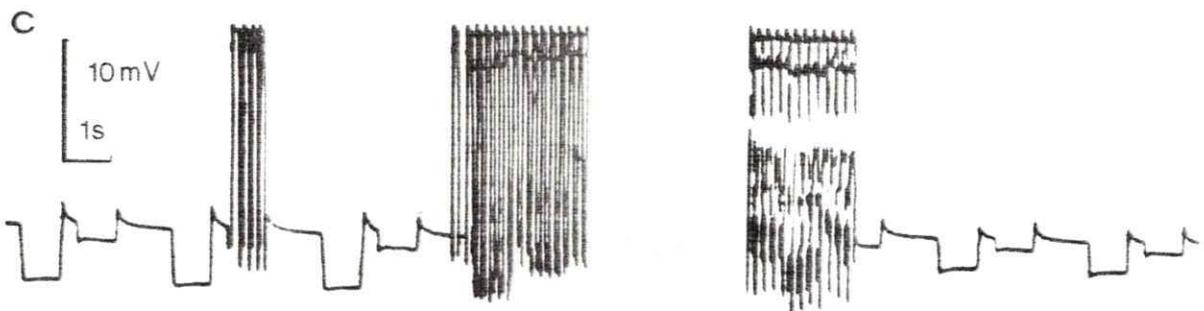
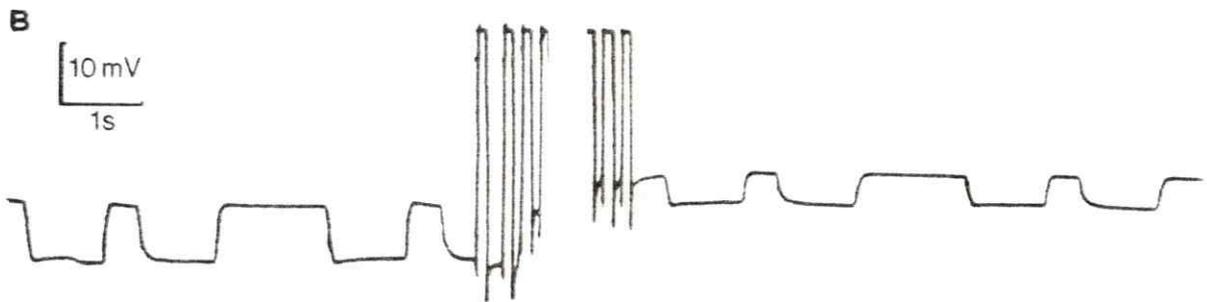
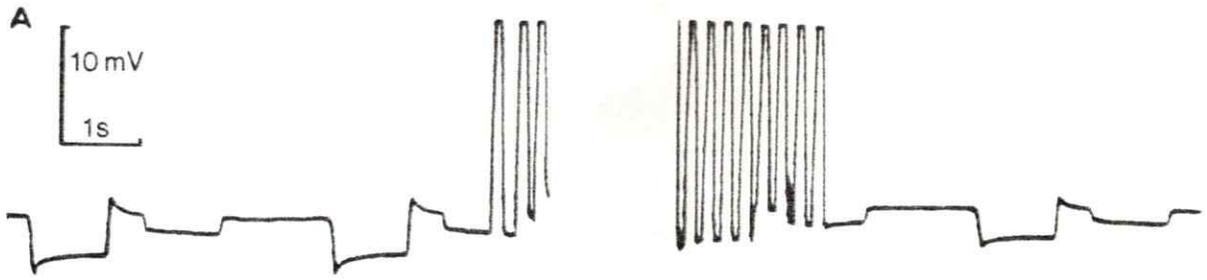


### Figura 16

Microfotografía de células horizontales registradas e inyectadas intracelularmente con HRP en retinas aisladas de carpa. A. Solamente se recuperó el axón terminal de la célula, lugar probable donde se realizó la penetración. El corte del axón puede ser consecuencia del desgarramiento del tejido durante la deshidratación. Tiempo de sobrevida: 0,8 hrs. Carga inyectada: 155 nC. B. Tres axones terminales cruzados; aún bajo inmersión en aceite, no hubo indicios de los somas. Tiempo de sobrevida: 0,3 hrs. Carga inyectada: 360 nC. C. H1 teñida completa, su soma en forma de trébol tiene un largo y fino axón terminado en un ensanchamiento fusiforme, extendiéndose por 200  $\mu\text{m}$ . Tiempo de sobrevida: 0,6 hrs. Carga inyectada: 600 nC.

Barra de calibración (en  $\mu\text{m}$ ): A, 30; B y C, 50.

Figura 17



### Figura 17

Registros electrofisiológicos de CH de retina de carpa *in vitro* antes (izquierda) y después (derecha) de la inyección intracelular de HRP. Las tres respuestas registradas (A-C) son del tipo-L y corresponden a las unidades marcadas de la Figura 5 (A-C, respectivamente). El estímulo consistió en pulsos alternados de luz monocromática de 650 nm (○) y 520 nm (●) y 960 ms de duración. Las respuestas post-inyección tienen iguales características que al comienzo, aunque ligeramente deprimidas en amplitud. Las espigas corresponden a los pulsos depolarizantes de la corriente de inyección.

metabólico de la retina, puede ser la causa de la marcación incompleta observada.

## 2. COMENTARIOS.

En estas circunstancias, no hay evidencia suficiente como para determinar si existe correspondencia o no entre la morfología y el tipo de respuesta registrada en retinas aisladas.

Hay una diferencia fundamental entre retinas in vivo y aislada en cuanto a las características cualitativas de la célula marcada. En retinas aisladas la marca del producto de reacción de la HRP se limita, en general, a parte de la célula, ya sea al axón terminal o al pericarion. En cambio, en retinas in vivo aparecen células completas marcadas, incluyendo soma y axón. La explicación de tal comportamiento parece radicar en los tiempos de sobrevida, diferentes en ambos sistemas. Tiempos de sobrevida prolongados (mayores de una hora), permitirían la marcación de una célula completa, cosa que no siempre ocurre en retinas aisladas (Figura 16). Esto se puede comprobar también en otros trabajos donde sólo se muestran ejemplos de células reconstruidas fotográficamente (Kretz et al., 1982; Ogden et al., 1984, 1985; Djamgoz et al., 1985; Tsukamoto et al., 1987). Pero el tiempo de sobrevida no parece ser el único determinante, pues en retinas in vivo, con tiempos breves cercanos a una hora, se obtienen también

marcaciones múltiples, aunque no tan complejos como con 24 horas (Figura 3). Aquí parece existir un factor fisiológico que podría estar ausente en la preparación de retina aislada.

## DISCUSION

La preparación de retina in vivo ha mostrado poseer valiosas características que compensan las dificultades inherentes a su metodología de trabajo. A diferencia de las técnicas de retinas in vitro, ésta no impone limitaciones de tiempo a las sesiones experimentales; el metabolismo de la retina parece no sufrir alteraciones importantes, a juzgar por las respuestas de las células registradas, que son de mayor amplitud en comparación con aquellas de retinas aisladas. Además, la retina in vivo es la única que permite utilizar la HRP como trazador neuronal debido, precisamente, a su independencia temporal.

Sorprendentemente, en varias ocasiones, una única inyección intracelular in vivo, en la que todos los signos electrofisiológicos indicaban era una sola CH, reveló grupos de CH marcadas en torno al centro de inyección. Estas marcaciones masivas fueron selectivas, porque solo algunas CH entre todos los tipos de células que se ubican en la vecindad de la zona de inyección fueron teñidas. Técnicamente, surge aquí una utilización novedosa de la enzima HRP, no solo como un marcador celular, sino como un trazador neuronal en una restringida área de la retina, a semejanza de los estudios de las vías neuronales en otras partes del sistema nervioso central (Hughes & Hall, 1986; Leeper & Charlton, 1985). En

los ejemplos ilustrados, se mostró que la marcación masiva y selectiva configura patrones de relaciones anatómicas entre CH de retina de carpa, sólo posibles de obtener mediante el uso de la HRP como trazador neuronal durante tiempos prolongados (aunque no fue posible establecer una correlación entre el tiempo de sobrevida y el despliegue de células marcadas). Más aún, las marcaciones masivas involucran a varios somas, axones terminales e incluso células horizontales completas, situadas lejos del sitio de inyección y sin conexión directa aparente con éste.

Ninguna de estas asociaciones entre CH han sido descritas anteriormente, revelando un tipo de interacción desconocida y selectiva que ocurre en la retina de la carpa (Bustamante et al., 1989, en preparación) y, aunque existe alguna evidencia del paso transneuronal de HRP tanto en otras zonas del sistema nervioso central (Grant et al., 1980; Baker & Grantyn, 1982; Leeper & Charlton, 1985; Hughes & Hall, 1986) como en el sistema nervioso periférico (Hongo et al., 1981), ninguna de las observaciones reportadas son de la magnitud de los despliegues celulares aquí mostrados.

No está claro cual sea el mecanismo que produce la marcación masiva; la lentitud del proceso concuerda con la observación que la HRP inyectada intracelularmente difunde en forma pasiva (Mesulam, 1982), pero el cómo y a través de qué difunde de una CH a otra es una cuestión que permanece

elusiva. Una posible explicación del paso de HRP desde el sitio de inyección hacia otras células es la existencia de un mecanismo selectivo de transporte transneuronal de proteínas, dependiente del tiempo, distinto de aquel que permite el tráfico de moléculas más livianas, que es mediado por gap-junctions (Sheridan & Atkinson, 1985; Spray & Bennett, 1985), quizás transinápticamente. Aunque nunca ha sido descrito en la retina un mecanismo semejante de transporte transneuronal, Leeper & Charlton (1985) marcaron parcialmente dos células en retina aislada de ardilla con una única inyección de HRP, aunque omitieron avanzar una explicación.

De gran interés resultó el encontrar entre las células marcadas en los despliegues masivos, asociaciones entre CH de distinto tipo morfológico en contacto aparente (Figura 4), situación no reportada antes; el paso de HRP entre ambas células revela la existencia de una vía de comunicación que contradice el supuesto que CH de un mismo tipo se unen sólo entre sí (Kaneko & Stuart, 1984). También fue aparente el contacto entre una CH de tipo H1 y una célula amacrina (Figura 5) lo cual, como en el caso anterior, no ha sido reportado antes. Estos ejemplos muestran que el flujo de información en el interior de la retina puede establecerse a través de otras vías, distintas de las ya conocidas, en la cual las CH parecen jugar un rol importante. A modo de ejemplo, recientemente Kouyama & Watanabe (1986) mostraron en

retina de carpa la existencia de una vía de conducción de señales desde el soma de una CH al axón terminal de otra CH, mediada por gap-junctions. Será necesario realizar más estudios sobre la fisiología de estas vías putativas de comunicación reveladas por la HRP.

Se consiguió por primera vez teñir una célula horizontal completa, con gran cantidad de detalles morfológicos finos y también por primera vez, se clasificó cuantitativamente la morfología de las células horizontales de la retina de la carpa (C. carpio), mediante la evaluación de la forma celular con un índice eidométrico, Ie. A juzgar por las distribuciones estadísticas, en la carpa existen sólo dos tipos morfológicos. En el primer grupo están las células horizontales de tipo H1, en tanto que el segundo grupo incluye a los tipos H2 y H3. Al calcular el Ie de las células horizontales del pez dorado (C. auratus) clasificadas por Stell (1975), confirmaron la existencia de tres grupos morfológicos. En cambio, al calcular Ie para las H2 y H3 de carpa (C. carpio) mostradas por Weiler (1978) tienden a mezclarse, configurando dos grupos morfológicos, lo que está en estricto acuerdo con los resultados aquí presentados. Esto último sugiere que la morfología de las células horizontales es especie-dependiente en un grado más estricto que lo anteriormente sospechado. Por tales razones, se propone que la actual clasificación en tres categorías morfológicas de las células horizontales (H1, H2 y

H3), debe ser revisada.

En la clasificación morfológica de las CH también se han considerado los contactos sinápticos entre éstas y los fotoreceptores (Stell & Lightfoot, 1975; Ogden et al., 1984, 1985), encontrándose que cada tipo de CH establece sinapsis con distinto número y tipo de conos. Esto ha reforzado el postulado de la relación biunívoca entre la morfología y el tipo de respuesta registrada de una CH. Aunque tal relación fue encontrada en algunas oportunidades en este estudio, hubo otras en la cual la respuesta registrada no concordó con la forma de la célula marcada. Se ha demostrado que en retina de ciprinidos las CH tipo H2 pueden ser inducidas a dar respuestas de tipo L si se les condiciona previamente a oscuridad (Djamgoz et al, 1985), lo que demuestra que el tipo de respuesta L o C1 depende de condiciones fisiológicas como la adaptación fótica más que de la forma celular. Ya que en este estudio se presenta evidencia que pone en duda la estrictez de la relación entre la forma y la respuesta de las CH de la retina de la carpa, se concluye que no debe inferirse la morfología de éstas células en base solamente a su respuesta, ni tampoco suponer que una forma específica tenga por correlato electrofisiológico una respuesta única y determinada. De estos hechos surge la necesidad de revisar la actual relación entre morfología y tipo de respuesta en las CH de la carpa.

## REFERENCIAS

- Alcayaga, J. (1982). Exploración electroretinográfica del sistema dopaminérgico de la retina de la carpa (Cyprinus carpio). Tesis de Licenciatura en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Alcayaga, J., S. Bustamante and O. Gutiérrez (1989). Fast activity and oscillatory potential of carp retina in the frequency domain. *Vision Res.*, 29: 949-955.
- Ali, M. and W. Muntz (1975). "Electroretinography as a tool for studying fish vision". In *Vision In Fishes*. M. Ali editors. pp. 159-167. Plenum Press, N. Y.
- Baker, R. and A. Grantyn (1982). Transneuronal transport of HRP following intraaxonal injection of cat vestibular neurons. *Soc. Neurosci. Abst.* 8: 787.
- Bishop, G. A., R. A. McCrea, and J. S. King (1980). An analysis of the morphology and cytology of HRP labelled Purkinje cells. *Brain Res. Bull.*, 5: 563-574.
- Boycott, B.B., J.M. Hopkins and H.G. Sperling (1987). Cone connections of the horizontal cells of the Rhesus monkey's retina. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 229: 345-379.
- Bustamante, S. and O. Gutiérrez (1988). Horizontal cells of carp retina. Intracellular injections of HRP in live fishes (Abstract). *Arch. Biol. Med. Exp.*, 21: R 490.
- Bustamante, S., J. Alcayaga and O. Gutiérrez (1989). The horizontal system of the carp retina. A tracer study with HRP. (En Preparación).
- Chan, R. Y. and K. I. Naka (1976). The amacrine cell. *Vision Res.*, 16: 1119-1129.
- Cohen, J.L. and J.E. Dowling (1983). The role of the interplexiform cell: effects of 6-hydroxydopamine on the spatial properties of the carp horizontal cells. *Brain Res.* 264: 307-310.
- Djamgoz, M. B. A., J. E. Downing and H. J. Wagner (1985). The cellular origin of an unusual type of S-potential: An intracellular horseradish peroxidase study in a cyprinid fish retina. *J. Neurocytol.*, 14: 469-489.

Dowling, J. E. and B. Ehinger (1978). The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of goldfish retina. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 201: 7-26.

Ehinger, B. (1983). Connexions between retinal neurons with identified neurotransmitters. *Vision Res.*, 23: 1281-1291.

Fisher, S.K., and B.B. Boycott (1974). Synaptic connections made by horizontal cells within the outer plexiform layer of the cat and the rabbit. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 186: 317-331.

Fourtes, M. G. F. and E. J. Simon (1974). Interactions leading to horizontal cell responses in the turtle retina. *J. Physiol.*, 240: 177-198.

Grant, K., J.P. Gueritaud, G. Horcholle-Bossavit and S. Tyc-Dumont (1980). Detailed morphology of two vestibular neurones following a single intracellular injection of HRP. *Neurosci. Lett.*, 16: 223-228.

Grofova, I., J. M. Deniau and S. T. Kitai (1980). Somadendritic morphology of the substantia nigra projection neurons intracellularly labelled with HRP. *Soc. for Neurosci. Absts.*, 6: 808.

Gutiérrez, O., A. Neely and R. Salinas (1983). The horizontal system of the carp retina. Transients reveal chromatic influences on L-units with participation of interplexiform cells. *Arch. Biol. Med. Exp.* 16: 271-281.

Gutiérrez, O. and R. Salinas (1984). A simple device to aid impalement of cells using conventional microelectrode drives. *Physiol. Behavior*, 32: 1033-1035.

Gutiérrez, O. (1988). "De cómo el manejo del tiempo puede cambiar un concepto de estructura y función en retina de peces". En *Manejo del tiempo en biología y algunas de sus ingeniosas maneras de estudiarlo*. Ed. Universitaria, pp 77-85. Santiago, Chile.

Guyton, A. C. (1987). "Receptor and neural function of the retina". En *Basic neuroscience. Anatomy and physiology*. Edited by W. B. Saunders Company, pp. 287-299. Philadelphia, PA.

Hashimoto, Y., A. Kato, M. Inokuchi & K. Watanabe (1976). Re-examination of horizontal cells in the carp retina with procion yellow electrode. *Vision Res.*, 16: 25-29.

- Hassin, G. (1979). Pikeperch horizontal cells identified by intracellular staining. *J. Comp. Neurol.*, 186: 529.
- Hedden, W. L. and J. E. Dowling (1978). The interplexiform system. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 201: 27-55.
- Hongo, T., N. Kudo, M. Yamashita, N. Ishizuka and H. Mannen (1981). Transneuronal passage of intraaxonally injected horseradish peroxidase (HRP) from group Ib and II fibers into the secondary neurons in the dorsal horn of the cat spinal cord. *Biomed. Res.* 2: 722-727.
- Hughes, T. E. and W.C. Hall (1986). The transneuronal transport of horseradish peroxidase in the visual system of the frog, Rana pipiens. *Neurosci.* 17: 507-518.
- Kaneko, A. (1971). Electrical connections between horizontal cells in the goldfish retina. *J. Physiol.* 213: 95-105.
- Kaneko, A. and A. Hashimoto (1969). Electrophysiological study of single neurons in the inner nuclear layer of the carp retina. *Vision Res.*, 9: 37-55.
- Kaneko, A. and M. Yamada (1972). S-potential in the dark adapted retina of the carp. *J. Physiol. (Lond.)*, 227: 261-273.
- Kaneko, A. and A.E. Stuart (1984). Coupling between horizontal cells in the carp retina revealed by diffusion of Lucifer Yellow. *Neurosci. Lett.* 47: 1-7.
- Kouyama, N. and K. Watanabe (1986). Gap-junctional contacts of luminosity-types horizontal cells in the carp retina: A novel pathway of signal conduction from the cell body to the axon terminal. *J. Comp. Neurol.*, 249: 404-410.
- Kraft, T. W. and D. A. Burkhardt (1986). Telodendrites of cone photoreceptors: Structure and probable function. *J. Comp. Neurol.*, 249:13-27.
- Kretz, R., A. T. Ishida and W. K. Stell (1982). Ratfish retina. Intracellular recordings and HRP injections in a isolated, superfused all-rod retina. *Vision Res.*, 22: 857-861.
- La Vail, J.H. (1975). "Retrograde cell degeneration and retrograde transport techniques". In *The Use Of Axonal Transport For Studies Of Neuronal Connectivity*. Eds. W.M. Cowan & M. Cuenod, pp 217-248, Elsevier, Amsterdam.

La Vail, J.H., S. Rapisardi and I.K. Sugin (1980). Evidence against the smooth endoplasmic reticulum as a continuous channel for the retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 191: 3-20.

Lam, D. M. K. (1975). Biosynthesis of GABA by isolated axons of cone horizontal cells in the goldfish retina. *Nature*, 254: 345-347.

Leeper, H. F. and J. S. Charlton (1985). Response properties of horizontal cells and photoreceptor cells in the retina of the tree squirrel, Sciurus carolinensis. *J. Neurophysiol.*, 54: 1157-1166.

MacNichol, E.F. and G. Svaetichin (1958). Electrical responses from the isolated retinæ of fishes. *Am. J. Ophtal.* 46: 26-40.

Malmgren, L.T. and Y. Olsson (1979). Early influx of horseradish peroxidase into axons of the hypoglossal nerve during Wallerian degeneration. *Neurosci. Lett.*, 13: 13-18.

Mangel, S. and J.E. Dowling (1985). Responsiveness and receptive field size of carp retina horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine. *Science (Wash.)*, 229: 1107-1109.

Mangel, S. and J.E. Dowling (1987). The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: effects of dopamine, light stimulation and time in the dark. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 231: 91-121.

Marc, R. E., W. K. Stell, D. Bok and D. M. K. Lam (1978). GABA-ergic pathway in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.*, 182: 221-246.

Marc, R. E., S. L. Wei-ley and J. F. Muller (1988). Gap junctions in the inner plexiform layer of the Goldfish retina. *Vision Res.*, 28: 9-24.

Marshak, D.W., and J.E. Dowling (1987). Synapses of cone horizontal cell axons in Goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 256: 430-443.

McCrea, R. A., G. A. Bishop and S. T. Kitai (1977). Morphological and electrophysiological characteristics of projection neurons in the nucleus interpositus of the cat cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 181: 379-419.

McNulty, J. A. (1984). Responses of synaptic ribbons in pineal photoreceptors under normal and experimental lighting conditions. *J. Pineal Res.*, 1: 139-147.

Mesulam, M. M. (1982). Principles of horseradish peroxidase. Neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathway-axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In *Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase*. Edited by M-M Mesulam. John Wiley & Sons Ltd. pp. 3-135.

Naka, K.I. and W.A.H. Rushton (1966,a). S-potential from colour units in the retina of fish (Ciprinidae). *J. Physiol.* 185: 536-555.

Naka, K.I. and W.A.H. Rushton (1966,b). An attempt to analyze colour reception by electrophysiology. *J. Physiol.* 185: 556-586.

Naka, K.I. and W.A.H. Rushton (1966,c). S-potential from luminosity units in the retina of fishes (Ciprinidae) *J. Physiol.* 185:587-599.

Naka, K.I. and W.A.H. Rushton (1967). The generation and spread of S-potentials in fish (Ciprinidae). *J. Physiol.* 192: 437-461.

Neely, A. (1984). Actividad cromática en la retina externa de la carpa (C. carpio). Registro de células horizontales in vivo. Tesis de Licenciatura en Ciencias con Mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Negishi, K., T. Teranishi and S. Kato (1984). Regular orientation of horizontal cells in the river lamprey retina. *Neurosci. Lett.*, 37: 261-266.

Ogden, T. E., G. G. Mascetti and R. Pierantoni (1984). The internal horizontal cell of the frog. Analysis of receptor input. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25: 1382-1394.

Ogden, T. E., G. G. Mascetti and R. Pierantoni (1985). The outer horizontal cell of the frog retina: Morphology, receptor input and function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26: 643-656.

Ohtsuka, T. and N. Kouyama (1986). Electron microscopic study of synaptic contacts between photoreceptors and HRP-filled horizontal cells in turtle retina. *J. Comp. Neurol.* 250: 141-156.

Podugolnikova, T. A. & V. V. Maksimov (1973). Регулярность пространственной структуры рецепторного нервного слоя сетчатки костистых рыб: Световая микроскопия. (Regular patterns of spatial structure in the receptor and neural layers of teleosts: Light microscopy). Zoologicheskii Zhurnal, 52: 541-551.

Ramón y Cajal, S. (1893). La rétine des vertébrés. Cellule, 9: 121-225.

Raynauld, J. P., J. R. Laviolette and H. J. Wagner (1979). Goldfish retina: A correlate between cone activity and morphology of the horizontal cell in cone pedicles. Science, N.Y., 204: 1436-1438.

Sakai, H. and C. D. Woody (1978). Sampling distribution of morphologically identified neurons of the coronal-pericruciate cortex of awake cats following intracellular injection of HRP. Brain Res., 152: 329-333.

Schacher, S., E. Holtzman and D. Hood (1976). Synaptic activity of frog retinal photoreceptor. A peroxidase uptake study. J. Cell Biol. 70: 178-192.

Sheridan, J. D. and M. M. Atkinson (1985). Physiological roles of permeable junctions: some possibilities. Ann. Rev. Physiol., 47: 337-353.

Sheridan, J. D. and M. M. Atkinson (1985). Physiological roles of permeable junctions: some possibilities. Ann. Rev. Physiol., 47: 337-353.

Spray, D. C. and M. V. L. Bennett (1985). Physiology and pharmacology of gap junctions. Ann. Rev. Physiol., 47: 281-303.

Steiner, H. and H.B. Dunford (1978). Ionic strength dependence of the oxidation of iodide and ferrocyanide by compound I of horseradish peroxidase. Eur. J. Biochem., 82: 543-549.

Stell, W.K. (1965). Correlation of the retinal cytoarchitecture and ultrastructure in Golgi preparations. Anat. Rec. 153: 389-397.

Stell, W. K. (1967). The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptors-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. Am. J. Anat. 121: 401-424.

Stell, W. K. (1975). Horizontal cell axons and axon terminal in Goldfish retina. J. Comp. Neurol., 159: 503-519.

Stell, W. K. and D. O. Lightfoot (1975). Color-Specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the Goldfish. *J. Comp. Neurol.*, 159: 473-502.

Straus, W. (1980). Factors affecting the sensitivity and specificity of the cytochemical reaction for the anti-horseradish peroxidase antibody in lymph tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 645-652.

Teichberg, S., E. Holtzman, S.M. Crain and E.R. Peterson (1975). Circulation and turnover of synaptic vesicle membrane in cultured fetal mammalian spinal cord neurons. *J. Cell Biol.*, 67: 215-230.

Teranishi, T., K. Negishi and S. Kato (1984). Regulatory effect of dopamine on spatial properties of horizontal cells in the carp retina. *J. Neurosci.* 4: 1271-1280.

Tomita, T. (1965). Electrophysiological study of mechanisms subserving color coding in the fish retina. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 30: 559.

Torqvist, K., X-L. Yang and J. E. Dowling (1988). Modulation of cone horizontal cells activity in the teleost fish retina. III. Effects of prolonged darkness and dopamine on electrical coupling between horizontal cells. *J. Neurosci.*, 8: 2279-2288.

Toyoda, J. and K. Tonosaki (1978). Effect of polarization of horizontal cells on the on-center bipolar cell of carp retina. *Nature Lond.* 276: 399-400.

Triller, A., and H. Korn (1981). Intraneuronal transfer of horseradish peroxidase associated with exo-endocytotic activity on adjacent membranes. *Exp. Brain Res.* 43: 233-236.

Tsukamoto, Y., M. Yamada and A. Kaneko (1987). Morphological and physiological studies of rod-driven horizontal cells with special reference to the question of whether they have axons and axon terminals. *J. Comp. Neurol.*, 255: 305-316.

Tsukita, S. and H. Ishikawa (1980). The movement of membranous organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. *J. Cell Biol.*, 84: 513-530.

Wagner, H. J. (1972). Vergleichenden Untersuchungen über das Muster der Sehzellen und Horizontalen in der Teleostier-Retina (Pisces). *Z. Morph. Tiere*, 72: 77-130.

Weiler, R. (1978). Horizontal cells of the carp retina: Golgi impregnation and Procion-Yellow injection. *Cell Tiss. Res.* 195: 515-526.

Witkovsky, P., D. Burkhardt and A. Nagy (1979). Synaptic connections linking cones and horizontal cells in the retina of the pikeperch (Stizostedion vitreum). *J. Comp. Neurol.*, 186: 541-560.

Witkovsky, P., S. Stone and J. C. Besharse (1988). Dopamine modifies the balance of rod and cone inputs to horizontal cells of Xenopus retina. *Brain Res.*, 499: 332-336.

Wong-Riley, M.T.T. (1976). Endogenous peroxidatic activity in brain stem neurons as demonstrated by their staining with diaminobenzidine in normal squirrel monkeys. *Brain Res.*, 108:257-277.

Yagi, T. (1986). Interaction between the soma and the axon terminal of retinal horizontal cells in C. carpio. *J. Physiol. (Lond.)*, 375: 121-135.

Yamada, M., Y. Shigematsu and M. Fuwa (1985). Latency of horizontal cell response in the carp retina. *Vision Res.*, 25: 767-774.

Yang, X-L. and A. Kaneko (1983). Convergence of signals from red-sensitive and green-sensitive cones onto L-type external horizontal cells of the goldfish retina. *Vision Res.*, 23: 371-380.

Yang, X-L. K. Torqvist and J. E. Dowling (1988,a). Modulation of cone horizontal cells activity in the teleost fish retina. I. Effects of prolonged darkness and background illumination of light responsiveness. *J. Neurosci.*, 8: 2259-2268.

Yang, X-L. K. Torqvist and J. E. Dowling (1988,b). Modulation of cone horizontal cells activity in the teleost fish retina. II. Role of interplexiform cells and dopamine in regulating light responsiveness. *J. Neurosci.*, 8: 2269-2278.

Yazulla, S. and N. Brecha (1980). Binding and uptake of the GABA analogue, 3H-muscimol, in the retinas of goldfish and chicken. *Invest. Ophthalmol.*, 19: 1415-1426.

Yazulla, S. and J. Kleinschmidt (1982). Dopamine blocks carriers mediated release of GABA from retinal horizontal cells. *Brain Res.*, 138: 45-57.