



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Estudio de la distribución de las espínulas y de las células ganglionares en retina de los teleósteos y su relación con las conductas predatorias

Bassima Boughlala



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departamento de Biotecnología

**Estudio de la distribución de las espínulas y de las
células ganglionares en retina de los teleósteos y su
relación con las conductas predatorias**

BASSIMA BOUGHLALA

**Tesis presentada para aspirar al grado de
DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE
MENCIÓN DE DOCTORA INTERNACIONAL**

Programa oficial de doctorado Biotecnología y Biomedicina, con Mención de
Calidad del Ministerio de Educación y Ciencia (Ref.: MCD2006-00402).

Dirigida por

Dr. Joaquín De Juan Herrero

Alicante, diciembre 2015

Joaquín De Juan Herrero, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Alicante

CERTIFICA,

Que Dña. Bassima Boughlala, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral titulada *Estudio de la distribución de las espínulas y de las células ganglionares en retina de los teleósteos y su relación con las conductas predatorias*.

Este trabajo de investigación, que presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad de Alicante, está dentro del Programa Oficial de Postgrado (Máster y Doctorado) de Biotecnología y Biomedicina, con Mención de Calidad del Ministerio de Educación y Ciencia (Referencia:MCD2006-00402), coordinado por el Departamento de Biotecnología.

Hallándose concluida y reuniendo las condiciones de originalidad y rigor científicos requeridos, autorizamos su presentación con el fin de que pueda ser leída y defendida ante la Comisión Evaluadora correspondiente.

Para que así conste, expide y firma el presente certificado en Alicante, a 28 de octubre de 2015.

El director

Joaquín De Juan Herrero



Extraordinario mosaico romano con vida marina, procedente de la casa del fauno, Pompeya -principios del siglo I- (museo arqueológico de Nápoles). Podemos distinguir en el mosaico *Dicentrarchus labrax* abajo en el centro y *Sparus aurata* arriba a la derecha.

DEDICATORIA



*A mis padres,
con mucho amor y cariño
les dedico todo mi esfuerzo
y trabajo puesto para
la realización de esta tesis*

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

AGRADECIMIENTOS

Especialmente y en primer lugar, sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. JOAQUIN DE JUAN HERRERO, por haberme acogido en el Departamento de Biotecnología y por haberme brindado la posibilidad de desarrollar esta tesis. Gracias, de corazón, por su constante apoyo, por recibirme siempre con una gran disposición para brindar sus conocimientos. Es imposible describir en unas breves palabras el grado de agradecimiento que siento hacia él, así como de admiración por su labor docente, investigadora y calidad humana que constituyen para mí un ejemplo.

Quiero agradecer al Dr. MOHAMED NHIRI, gran profesional y excelente persona, por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en su Laboratorio, por su confianza en mis capacidades y por su apoyo en todo momento. A él le debo mucho. Merci infiniment!

Gracias a todos los miembros del Apoyo Estadístico y del taller de imágenes del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia (www.um.es/sai), especialmente a Antonio Maurandi López y Antonio José Perán Orcajada por la gran ayuda estadística que me han prestado.

Gracias a Alicia García Alcazar del Instituto Español de Oceanografía (I.E.O), Centro oceanográfico de Mazarrón por todas las muestras procesadas en este trabajo.

Mi agradecimiento a todos los miembros del jurado, les agradezco profundamente su tiempo y dedicación para leer y evaluar esta tesis.

Quiero agradecer también, al Dr. José Manuel Romero, cuya ayuda constante y desinteresada fue crucial en mis dos primeros años en el departamento, gracias por todo lo que he aprendido de ti, por el tiempo dedicado, y por aceptar evaluar mi tesis.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Biotecnología que de alguna forma u otra han aportado conocimientos importantes para el desarrollo de esta tesis, haciendo especial mención a Vanessa Pinilla por su inestimable ayuda técnica.

Mi mayor agradecimiento se lo debo también a mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero y a terminar lo que he empezado. Agradezco el amor sincero y el cariño que mi brindan cada día y la fuerza que me transmiten desde lejos. Sin ellos nunca habría terminado esta Tesis Doctoral.

AGRADECIMIENTOS

A mi hermana Nihal, por cada consejo puntual y oportuno que has sabido darme, por tu apoyo incondicional, por ser mi amiga, mi confidente.

Y por último, quiero dar las gracias a mis amigos por estar siempre apoyándome. Gracias Laila, Zineb, Zakaria...y todos los que me habéis demostrado que merece la pena seguir luchando.

A todos, mi mayor reconocimiento y gratitud.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



ABREVIATURAS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

LISTA DE ABREVIATURAS

´arco	minutos de arco
AmC	célula amacrina
ANOVA	análisis de varianza
ANS	promedio del vecino más próximo
BC	célula bipolar
bi	bipolar invaginante
C	conos
Ca²⁺	iones de calcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico.
CE	cono simple en el centro
CO	cono simple en los bordes
CP	pedículo del cono
DC	cono doble
Dmax	densidad máxima
DMO	distancia media observada
DNP	distancia nodal posterior
DVA	agudeza visual dinámica
FAO	Organización de las Naciones unidas para la alimentación y la agricultura
fb	dendritas de la bipolar plana difusa
FBC	célula bipolar plana
FG	Fluorogold
fmB	la célula bipolar plana
FMR-amida	Neuropeptido phe-met-arg-amida
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GC	célula ganglionar
GCL	capa de las células ganglionares
GCR	células ganglionares retinianas
GnRH	la hormona liberadora de gonadotropina
HC	célula horizontal
IBC	célula bipolar invaginante

ABREVIATURAS

IC	célula interplexiforme
IGFA	La Asociación Internacional de Pesca Deportiva
imb	dendritas de la bipolar invaginante
IML	membrana limitante interna
INL	capa nuclear interna
IPL	capa plexiforme interna
ipRGC	célula ganglionar intrínsecamente fotosensible
L	crystalino
LPS	capa de los segmentos de los fotorreceptores
M	músculo retractor del cristalino
MC	Célula de Müller
min	Minutos
MR	Razón de Matthiessen
MRM	Movimientos retinomotores
NND	Distancia del vecino más próximo
NNR	índice del vecino más próximo
OML	Membrana limitante externa
ONFL	Capa de las fibras del nervio óptico
ONL	Capa nuclear externa
OPL	Capa plexiforme externa
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Epitelio pigmentario
PhC	Célula fotorreceptora
PND	distancia nodal posterior
R	Bastón
rb	bipolar invaginante en una esferula
r_c	Radio del cristalino
RMM	Movimientos retinomotores
RS	Esférula de los bastones
SC	Cono simple
SCI	Hendidura sináptica

ABREVIATURAS

SD	Desviación estándar
spin	Espinulas
SpN	Número de espinulas
sr	Cintillas sinápticas
SRN	Número de cintillas sinápticas
SVA	Agudeza visual estática
TEM	Microscopio electrónico de transmisión.
VA	Agudeza visual
VAx	Eje visual



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



RESUMEN/SUMMARY/RESUMÉ

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESUMEN

Introducción:

La visión es extremadamente importante para la supervivencia de muchas especies (De Juan y Pérez, 1997), incluidos los peces teleósteos, ya que para ellos, como para el resto de los vertebrados, el sistema visual responde a sus necesidades, cumpliendo un conjunto de actividades diversas, que van desde la obtención de alimentación, la defensa y la protección de cualquier peligro en el entorno, hasta la regulación de los ciclos circadianos y la reproducción.

Para una mejor adaptación de la visión a diferentes tipos de hábitats del medio acuático, los peces en general, los teleósteos en particular, han desarrollado variadas estrategias de carácter morfológico, intrínsecamente influenciadas por las condiciones de iluminación. Uno de los cambios más importantes, que han llamado la atención de varios investigadores, es el alto grado de plasticidad sináptica a nivel de la capa plexiforme externa, que afecta en primer lugar a las cintillas sinápticas de los pedículos de los conos y las espínulas formadas por las células horizontales.

Las espínulas, unas estructuras observadas exclusivamente en la retina de los teleósteos, son unas proyecciones digitiformes, que desde las dendritas de las células horizontales se invaginan profundamente en los pedículos de los conos. La aparición de estas espínulas ha sido correlacionada con la adaptación a la luz, con la oponencia al color en las células horizontales y ganglionares, se han considerado como sitio de doble función, pre- y post-sináptico, responsable del efecto “feedback”, entre las células horizontales y los pedículos de los conos (Raynauld et al., 1979; Wagner, 1980; Weiler y Wagner, 1984; Djamgoz, 1989; Kirsch et al., 1990). Otra posible función de las espínulas, es aumentar la señal de los bordes y mejorar el contraste de la imagen (Balboa y Grzywacz, 2000).

Por diferentes razones todos estos papeles, probablemente desempeñados para estas estructuras a nivel de la retina de los teleósteos, se han puesto en cuestión por algunos autores (De Juan et al., 1996): por una parte porque ha sido difícil demostrar un papel en el procesamiento que conduce directamente a la visión del color; de otra parte, se demostró que las espínulas no son necesarias para la discriminación de la longitud de onda ni para la transmisión de las señales fotópicas a través de la vía ON de la retina (Yazulla et al., 1996). Por lo tanto, su función en la codificación de la luminosidad y su

relación con la resolución de la imagen y la agudeza visual, queda todavía indeterminada.

Se demostró también en varios estudios (De Juan et al., 1996; De Juan y García, 1998; García y De Juan, 1999) que el número de espínulas por pedículo de cono, es un número que varía de un teleósteo a otro, esto es debido a muchos factores, principalmente, la especie al que pertenece el pez, su edad y su grado de depredación (Douglas y Wagner, 1983).

A partir de todo lo citado anteriormente y de la literatura revisada, hemos planteado una serie de hipótesis, a partir de una hipótesis principal, que es la siguiente:

Las espínulas pueden ser unos detectores biológicos, relacionados con la conducta trófica y/o predatoria de los peces teleósteos, usados por la retina periférica, para detectar cualquier movimiento y señalización en el entorno.

Esta hipótesis, fue el comienzo de la puesta en marcha de esta tesis.

Material y métodos:

En este trabajo se han utilizado dos especies diferentes de teleósteos con diferentes grados de depredación, *Dicentrarchus labrax* (n=3) y *Sparus aurata* (n=2), siendo *Dicentrarchus labrax*, la especie más piscívora. Para cada una de ellas hemos analizado cuantitativamente y topográficamente el número total de las células ganglionares, así como la densidad y la distribución de las espínulas y las cintillas sinápticas.

Para el estudio de las células ganglionares, las retinas fueron preparadas como “wholemout” según el método descrito por Stone, (1981) y teñidas con violeta de cresilo, siguiendo el método clásico de Nissl. Todas las retinas se examinaron después con microscopia óptica, se capturaron imágenes individuales de forma secuencial y no solapada comprendiendo toda la superficie de la retina, posteriormente todas las células teñidas fueron contadas manualmente con el programa Adobe® Photoshop® CC versión 14. Los datos cuantitativos obtenidos de cada retina se utilizaron para generar los correspondientes mapas de isodensidad de las GCRs con los que se ilustra su distribución topográfica en la retina. Con este fin se usó el programa estadístico SigmaPlot® 11.0 para Windows® (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EE.UU).

Para el estudio de la densidad y la distribución de las espínulas, las retinas se dividieron en cuatro cuadrantes de interés: nasal, dorsal, ventral y temporal. De cada cuadrante se seleccionaron zonas periféricas y centrales para su posterior inclusión en EPON 812 y su observación con microscopia electrónica de transmisión. Una cuarta

retina de lubina, se utilizó para ampliar el estudio de la densidad de las espínulas entre las áreas periféricas previamente estudiadas en las tres primeras retinas.

Diferentes estudios estadísticos univariantes (ANOVA) y multivariantes (clúster) se realizaron para analizar y comparar los resultados obtenidos.

Resultados:

El número promedio total de células ganglionares calculado para *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, es de 683.527 y 519.824 respectivamente. Los mapas de isodensidad construidos revelan para las dos especies, una distribución de las GCRs en zonas de máxima densidad, con un pico alto en la zona temporal especializada en la alimentación y la visión binocular (Collin y Pettigrew, 1988a). El campo visual estimado es de aproximadamente 50 grados para las dos especies estudiadas. La agudeza visual estimada para las dos especies es de aproximadamente unos 7,5 ciclos por grado para las dos especies.

El número de espínulas en las retinas adaptadas a la luz de *Dicentrarchus labrax* es de los más altos entre las especies de teleósteos estudiadas (aprox. 16 espínulas por pedículo), un valor que es el 44 % mayor que la media del número de espínulas calculado en *Sparus aurata*, que es de aproximadamente 9 espínulas por pedículo, lo que confirma que el número de espínulas aumenta con el grado de depredación.

Las espínulas se distribuyen siguiendo el mismo patrón en todas las retinas, con una densidad alta en la zona dorso-nasal, zona especializada en la percepción panorámica del entorno (Collin y Pettigrew, 1988a), que se encuentra fuera del campo visual definido para las dos especies, con umbral de visión bajo.

Hemos estudiado también en este trabajo, la distribución y la densidad de las cintillas sinápticas por diferentes cuadrantes periféricos y centrales de retinas adaptadas a la luz. Los resultados muestran que la distribución de estas estructuras es al azar, las zonas de máxima densidad son diferentes de una retina a otra y no existe correlación con su distribución y la de las espínulas.

Conclusiones:

Una comparación entre la distribución de las espínulas y de las células ganglionares se contradice con las hipótesis formuladas por diferentes autores sobre el papel desempeñado en la agudeza visual, por lo tanto, podemos decir según los resultados obtenidos, que las espínulas pueden ser efectivamente unos detectores biológicos relacionados con la conducta trófica y depredadora de los teleósteos, usados por las

RESUMEN

zonas de la retina con menos poder de resolución para detectar todo movimiento y señalización en el entorno.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SUMMARY

Introduction:

The vision is extremely important for the survival of many species, including teleost fish (De Juan y Pérez, 1997). For them, as for all the rest of the vertebrates, the visual system play a considerable role in different visual and no visual activities, such as feeding behavior, vigilance, regulation of circadian rhythms, and reproduction.

Teleosts are a highly diverse group of animals occupying all kinds of aquatic environment. All species of this group of fish undergo morphologic and physiological changes in order to adapt their vision to the conditions of the habitats in which they live. Some of the most important changes occur at the outer plexiform layer of the retina, and affect largely the morphology of synaptic elements within the cone pedicle and modulate the spatial properties of the horizontal cell receptive field. During light-adaptation, distal part of dendrites of teleost horizontal cells invaginate deeply into cone pedicles, forming finger-like processes called 'spinules'. During dark adaptation, these spinules are retracted. The formation of these spinules is paralleled by the appearance of color opponency in horizontal and ganglion cells, which led to the suggestion that these spinules are the site of the inhibitory synapses in the negative feedback loop between cones and horizontal cells (Raynauld et al, 1979; Wagner, 1980; Weiler and Wagner, 1984; Djamgoz, 1989; Kirsch et al, 1990). Another possible role is in dealing with optical blur to enhance signal edges or contours, or compute contrast in the image (Balboa and Grzywacz, 2000).

Because of different reasons, all possible roles of spinules mentioned above have been questioned by some authors (De Juan et al., 1996): first, because it has been difficult to prove their role in the processing that leads directly to color vision; and secondly, it has been proved that spinules are not required for wavelength discrimination neither for the transmission of photopics (red cone) signals through the ON pathway of the retina (Yazulla et al., 1996).

Multiple studies have also shown (De Juan et al., 1996; De Juan and Garcia 1998; Garcia and John, 1999) that the number of spinules per cone pedicle varies from one teleost to another according to fish species, age and degree of predation (Douglas and Wagner, 1983).

Based on bibliographical study and on all that have been mentioned above, several hypotheses have been proposed; the principal one was the following:

SUMMARY

Spinules could be considered as biological sensors, related to predatory behavior of teleost fish, used by regions of retina with low visual acuity to detect movement and signals in the surrounding water.

Material and methods:

The aim of this work is to analyze quantitatively and topographically the total number of retinal ganglion cells, and to study the distribution and density of synaptic ribbons and spinules of horizontal cells. Two different species of teleost have been used, *Dicentrarchus labrax* (n = 3) and *Sparus aurata* (n = 2), being *Dicentrarchus labrax*, the more piscivorous.

Quantitative and topography analyses of GCRs: retinas were prepared as flattened whole-mounts according to the method described by Stone, (1981), and then stained by the classical method of Nissl (cresyl violet). All retinas were examined under light microscopy. A series of individual successive images, with no overlap between them was captured by sweeping all retinal surface. Subsequently, all cells have been counted manually using Adobe® Photoshop® CC version 14. These quantitative data were processed with a modern statistic program SigmaPlot® 11.0 (software Systat, Inc., Richmond, CA, USA), and were translated into isodensity maps to illustrate the topographical distribution of GCRs.

Analyses of distribution and density of spinules and synaptic ribbons: retinas were divided into four quadrants: nasal, dorsal, ventral and temporal. Representative retinal areas from peripheral and central of each quadrant were embedded in EPON 812 for transmission electron microscopy study. A fourth light-adapted retina was used to amplify the study of spinules density between the peripheral areas previously studied.

For a complete analysis of results, univariate (ANOVA) and multivariate statistics (Cluster analyses) were applied.

Results:

All retinas examined revealed non-uniform distributing of ganglion cells across the retina. The average cell density estimated from the counts of cells in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* was 683.527 and 519.824 respectively. Both species reveal a peak density of ganglion cells near the temporal margin of the retina, which is specialized in alimentation and binocular vision (Collin and Pettigrew, 1988a). The estimated field of best vision, defined as the area containing ganglion cell density at

SUMMARY

75% of maximum values was at approximately 50 degrees for both species, and their visual acuity estimated was around 7.5 cycles per degree.

Dicentrarchus labrax has one of the highest number of spinules among all teleost species, it has approximately 16 spinules per pedicle, while in *Sparus aurata* the value was around nine spinules per pedicles, a difference of 44% in spinule's number between the two teleost species confirms that spinules increase with the degree of predation.

Spatial pattern of distribution of spinules was the same in all retinas, with a high density in dorso-nasal peripheral area, which has a weak resolution capacity and located outside the visual field determined for both species. This zone is principally specialized in panoramic perception of the environment (Collin and Pettigrew, 1988a).

In this work, we are also studied the distribution and density of synaptic ribbons in different areas of peripheral and central light adapted retina. The distribution was aleatory, and no correlation between the distribution of synaptic structures and spinules was revealed.

Conclusions:

A comparison between the distribution of spinules and retinal ganglion cells against the hypothesis of different authors which correlate the appearance of spinules with visual acuity. Therefore, based on the results obtained in this work, spinules could be considered as biological detectors, correlated with the

predatory behavior of teleost fish, used by the areas of the retina with weak spatial resolution to detect movements and signalizations in their entourage.

RESUMÉ

Introduction:

La vision est extrêmement importante pour la survie de nombreuses espèces (De Juan y Pérez, 1997), et compris les poissons téléostéens. Pour eux, comme pour tout le reste des vertébrés, le système visuel accomplit un ensemble d'activités de divers caractères, tel que l'alimentation, la vigilance, la régulation des rythmes circadiens, ainsi que le comportement sexuel et la reproduction.

Pour ses grandes capacités de s'adapter à des différents habitats du milieu aquatique, la vision des téléostéens est parmi les plus étudiées de toute vision chez les vertébrés. La majorité de ses adaptations sont extrêmement influencées par des conditions de luminosité qui se font surtout au niveau de la rétine, avec des changements remarquables, spécifique pour ce groupe de poissons, au niveau de la couche plexiforme externe, qui se manifestent par une plasticité élevée des rubans synaptiques et des spinules de cellules horizontales observés dans les pédicules des cônes.

Les spinules sont des expansions digitiformes de 0,3 μm de longueur sur 0,1 μm de largeur, qui invaginent profondément le pédicule du cône dans les conditions d'adaptation à la lumière pour se rétracter lorsque l'obscurité se fait. De nombreuses études des enregistrements intracellulaires ainsi que des analyses quantitatives ultrastructurales ont démontré une corrélation entre l'apparition de ces structures et une réponse oppositionnelle aux couleurs aux niveaux des cellules horizontales et ganglionnaires, comme ils ont discuté la possibilité d'un effet « feedback » produit par ces spinules entre les cônes et cellules horizontales (Raynauld et al., 1979; Wagner, 1980; Weiler y Wagner, 1984; Djamgoz, 1989; Kirsh et al., 1990). Un autre rôle possible discuté de ces structures est l'amélioration de la résolution de l'image en augmentant la netteté, la clarté et le contraste (Balboa et Grzywacz, 2000).

pour différentes raisons, tous ces rôles possibles des spinules cités ci-dessus ont été remis en question par quelques auteurs (De Juan et al., 1996): D'une part, parce qu'il était impossible de démontrer leur rôle direct dans le processus menant à la vision des couleurs; et d'autre part, il s'est justifié que leurs existences n'est pas nécessaires pour la discrimination de la longueur d'onde, ni pour la transmission des signaux de luminosité photopique à travers le canal ON de la rétine (Yazulla et al., 1996).

Il a été aussi démontré dans de nombreuses études (De Juan et al., 1996 ; De Juan et García, 1998; García et De Juan, 1999) que le nombre de spinules par pédicule du cône

RESUMÉ

varie d'un téléostéen à un autre selon plusieurs facteurs, principalement l'espèce à laquelle appartient le poisson, son âge et son degré de prédation (Douglas et Wagner, 1983).

A base de tous ce qui a été mentionné ci-dessus et de toute la bibliographie révisée, on a formulé une série des hypothèses dont la principale est la suivante :

Les spinules peuvent être considérés comme des détecteurs biologiques, liés au comportement trophique des téléostéens, utilisées par les zones de la rétine de faible acuité visuelle pour détecter tout mouvement et signalisation de l'entourage.

Cette hypothèse était le début de lancement de ce projet de recherche.

Matériel et méthodes:

Pour ce travail de recherche, on a utilisé deux espèces différentes de téléostéens, *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*, dont le degré de prédation est plus élevé chez la première. Pour chaque espèce étudiée, on a fait une analyse quantitative du nombre total des cellules ganglionnaire rétinienne ainsi qu'une étude topographique de leurs distributions, comme on a étudié la densité et la distribution des rubans synaptiques et des spinules des cellules horizontales.

L'étude des cellules ganglionnaires : les rétines des espèces étudiées ont été préparés en «Wholemout" selon la méthode décrite par Stone, 1981 ; Les corps cellulaires ont été colorés en utilisant la méthode de coloration histologique classique de Nissl à base de violet de Crésyl. Toutes les rétines colorées ont été ensuite examinées sous microscope optique, une série d'images individuelles, successives et sans chevauchement ont été capturés en balayant toute la surface rétinienne, et par la suite, toutes les cellules ont été comptées manuellement à l'aide de l'Adobe® Photoshop® CC version 14. Les données quantitatives obtenues des cellules ganglionnaires ont été ensuite représenté, grâce à un programme de statistique SigmaPlot® 11,0 (logiciel Systat, Inc., Richmond, CA, USA), en cartes d'isodensité qui illustrent leur distribution topographique rétinienne.

L'étude de la densité et la distribution des spinules et des rubans synaptique : la rétine a été divisée en quatre quadrants : nasal, dorsal, ventral et temporal. Dont chaque quadrant, des zones périphériques et centrales ont été sélectionnées, inclus par la suite en EPON 812 et étudiées sous microscope électronique à transmission. Une quatrième rétine a été utilisée pour amplifier l'étude de la densité des spinules entre les zones périphériques étudiées auparavant pour les trois premières rétines.

RESUMÉ

Pour une analyses complètes des résultats, différentes études statistiques uni (ANOVA) et multivariée (cluster) ont été réalisées.

Résultats:

Le nombre total des cellules ganglionnaires calculées chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata* est respectivement de 683.527 et 519.824. Les cartes d'isodensité construites pour les deux espèces étudiées révèlent une distribution des cellules ganglionnaire avec une zone de densité maximale au niveau du quadrant temporal périphériques spécialisée dans l'alimentation et la vision binoculaire (Collin et Pettigrew, 1988a). Le champ visuel estimé pour ses deux espèces est limité à un arc de 50 degrés, et leur acuité visuelle est d'environ 7,5 cycles par degré.

Le nombre de spinules chez *Dicentrarchus labrax* est le plus élevé parmi tous les espèces des téléostéens, il est de 16 spinules par pédicules, alors que chez *Sparus aurata* est de 9 spinules par pédicule, cette différence de valeur qui est de 44% confirme que le nombre de spinules augmente avec le degré de prédation.

Les spinules se distribuent suivant le même patron pour toutes les rétines, avec une haute densité au niveau de la zone dorso-nasale, cette dernière est en dehors du champ visuel pour les deux espèces étudiées, avec un faible pouvoir de résolution, il est spécialisée dans la perception panoramique de l'entourage (Collin et Pettigrew, 1988a).

Dans ce travail, on a également étudié, la distribution et la densité des rubans synaptiques aux niveaux des différents quadrants rétiniens périphériques et centraux adaptés à la lumière. Les résultats révèlent que la distribution est aleatoire, et qu'aucune corrélation n'existe avec sa distribution et celle des spinules.

Conclusion:

Une comparaison entre la distribution des spinules et celle des cellules ganglionnaires s'oppose avec l'hypothèse formulée par différents auteurs sur le rôle joué par les spinules dans l'acuité visuelle ; et donc, on peut dire en fonction des résultats obtenus dans ce travail, que ces structures peuvent être des détecteurs biologique, liées au comportement trophique des téléostéens, utilisées par les zones rétiniennes de faible acuité visuelle pour détecter tout mouvement et signalisation de l'entourage.



ÍNDICE

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	VI
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN/SUMMARY/RESUMÉ.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	27
1. LA RETINA DE LOS PECES TELEÓSTEOS COMO MODELO EXPERIMENTAL:	28
2. BIOLOGÍA Y HÁBITAT DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS:	29
2.1. Lubina (<i>dicentrarchus labrax</i> , linnaeus 1758).....	29
2.2. Dorada (<i>sparus aurata</i> , linnaeus 1758):.....	30
3. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL OJO DEL PEZ TELEÓSTEO:	31
4. LA ESTRUCTURA GENERAL DE LA RETINA DE LOS PECES TELEÓSTEOS:	33
5. TIPOS DE CÉLULAS DE LA RETINA Y SUS FUNCIONES:	36
5.1. Células fotorreceptoras o <i>photoreceptor cells</i> (phc):	36
5.2. Las células bipolares o <i>bipolar cells</i> (bc):.....	39
5.3. Las células horizontales o <i>horizontal cells</i> (hc):	40
5.4. Las células amacrinas o <i>amacrine cells</i> (amc):	42
5.5. Células interplexiformes o <i>interplexiforme cells</i> (ic):	43
5.6. Células ganglionareso <i>ganglion cells</i> (gc):	43
5.6.1. Clasificación morfológica de las células ganglionares:	44
5.6.2. clasificación funcional de las células ganglionares:.....	45
5.6.3. Células ganglionares de asociación:.....	46
5.6.4. Células ganglionares fotorreceptoras o células intrínsecamente fotosensibles (iprgc):	46
5.7. Las células de müller o <i>müller cells</i> (mc):	47
6. LA VISIÓN EN LOS TELEÓSTEOS, ADAPTACIÓN A LA LUZ Y OSCURIDAD:	48
6.1. Movimientos retinomotores:	48
6.2. Plasticidad sináptica:	49
6.2.1. Terminaciones sinápticas en la capa plexiforme externa:	50

ÍNDICE

6.2.2. Cintillas sinápticas o <i>synaptic ribbons</i> (sr):	51
6.2.3. Formación/disrupción de las espínulas de las células horizontales:.....	52
7. CAPACIDADES VISUALES DE LOS PECES TELEÓSTEOS:	54
7.1. Condiciones visuales en el medio acuático:	54
7.1.1. El paso de los rayos de luz a través del interfase aire/agua:.....	54
7.1.2. Absorción y dispersión de luz en el agua:.....	56
7.2. Visión monocular y visión binocular:	57
8.1. Factores que influyen en la agudeza visual:	59
8.2. Estimación de la agudeza visual:	59
II. RACIONAL	61
III. HIPÓTESIS / OBJETIVOS	64
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:	68
1.1. Animales de estudio:.....	68
1.2. Preparación de los peces de estudio:	68
1.3. Procedimiento general de extracción de las retinas:	68
1.4. Aplanamiento de la retina :	70
2. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LAS ESPÍNULAS Y DE LAS CINTILLAS SINÁPTICAS:.....	70
2.1. Muestra de estudio:	70
2.2. Fijación e inclusión en resina Epon 812:.....	71
3. EL ESTUDIO CUANTITATIVO Y TOPOGRÁFICO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES:	72
3.1. Tinción de nissl con violeta de cresilo:	72
3.2. Observación de las preparaciones al microscopio óptico: captura de las imágenes y cálculo de la densidad de las células:	73
3.3. Patrones de distribución de las células ganglionares:	76
4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ÓPTICOS DEL GLOBO OCULAR DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS:	77
5. ESTIMACIÓN DE LA AGUDEZA VISUAL:	78

ÍNDICE

IV. RESULTADOS	80
1. MEDIDAS ÓPTICAS:	81
2. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES:	81
3. ESTIMACIÓN DE LA AGUDEZA VISUAL:	84
4. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES POR DIFERENTES CUADRANTES DE LA RETINA:	86
5. DETERMINACIÓN DEL CAMPO VISUAL:	90
6. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LOS PEDICULOS DE LOS CONOS:	91
6.1. DESCRIPCIÓN DE LOS PEDICULOS DE LOS CONOS:	91
6.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPÍNULAS Y DE LAS CINTILLAS SINÁPTICAS DE LOS PEDÍCULO DE LOS CONOS Y SU Y DISTRIBUCIÓN EN LA RETINA:	92
V. DISCUSIÓN	108
1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE LAS GCRS:	109
2. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES:	111
3. EL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES:	113
4. ESTIMACIÓN DE LA AGUDEZA VISUAL:	114
5. CUANTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPÍNULAS Y DE LAS CINTILLAS SINÁPTICAS:	115
5.1. El papel desempeñado por las espínulas de los pedículos de los conos a nivel de la retina:	115
5.2. Distribución y cuantificación de las cintillas sinápticas:	118
VI. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	121
VII. ANEXO	128
VIII. BIBLIOGRAFÍA	132



I. INTRODUCCIÓN

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. La retina de los peces teleósteos como modelo experimental:

El uso de la retina de los peces teleósteos como modelo experimental se debe a muchas razones:

Primero porque los teleósteos son considerados "peces actuales" formando el subgrupo de los vertebrados más numeroso y complejo, constituyendo el 96% de los peces vivientes, reunidos en un total de 35 órdenes, 409 familias, 3.876 géneros y alrededor de 20.000 especies (Nelson, 1984; Fernald, 1989)

El sistema visual de los peces teleósteos es bastante parecido al resto de los vertebrados, por lo tanto presenta un modelo ideal para estudios neurocientíficos sin necesidad de emplear vertebrados superiores (De Juan, 1997), así como también, muchas técnicas que existen y que son vitales para nuestra comprensión del proceso visual, como por ejemplo el registro intracelular de la retina, no se pueden realizar habitualmente en los primates (Douglas, 1990).

El uso de la retina de los teleósteos como modelo experimental se debe también a dos importantes procesos que le caracterizan, que son bastante limitadas en los mamíferos (Ceverny y al., 2011):

- La neurogénesis continua a lo largo de toda la vida, que permite una proliferación de nuevas células a partir de dos poblaciones de retinoblastos: la zona periférica germinal (Müller, 1952; Meyer, 1978) que es capaz de originar todos los tipos celulares de la retina (Otteson y Hitchcock, 2003), el linaje de los progenitores de bastones (Johns, 1982) que se localizan en regiones centrales, que generan bastones a lo largo de toda la vida del animal.
- la capacidad de regenerarse íntegramente (morfológica y funcionalmente) en respuesta a un daño, independientemente de la extensión, severidad o tipo de lesión, esta capacidad se debe a las células de Müller, cuyos somas se localizan en la capa nuclear interna (Bernardos y al., 2007; Morris y Scholz, 2008).

El estudio y la comprensión de estos dos procesos son fundamentales para poder desarrollar nuevas terapias, que pueden ser usadas en humanos con patologías retinianas degenerativas (Stenkamp, 2011).

El alto grado de plasticidad retiniana, puede ser otro buen motivo para la elección de la retina de los teleósteos como modelo experimental. Esta plasticidad se caracteriza por

unos cambios de carácter morfológico, que se dan de forma exclusiva en la retina de los teleósteos, que consisten en la formación de espínulas (Wagner, 1980; De Juan y Dowling, 1987) y pequeños cuerpos electrodensos llamados “nematosomas” (De Juan et al, 1991) en las células horizontales.

2. Biología y hábitat de las especies estudiadas:

2.1. Lubina (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758)

La lubina (Figura 1) es una especie marina, que pertenece a la familia de Moronidae, orden Perciformes, se distribuye en el océano atlántico desde las costas Noruegas hasta las costas africanas de Senegal, también es muy común en el mar Mediterráneo y con menor presencia en el mar negro. Se trata de una especie eurihalina que soporta bien los cambios de salinidad, que es relativamente común en zonas litorales o cerca de la desembocadura de los ríos (Corbera et al., 2000), se suele encontrar en unas profundidades que varían de 10 a 100 metros (Frimodt, 1995).

La lubina es un pez que tiene un comportamiento estacional, se acerca mucho a la costa en los meses de calor donde se encuentra cerca de la superficie en poca profundidad, migra en el invierno a profundidades de hasta 100 metros.

Es un pez depredador nato y muy voraz que se alimenta de moluscos, crustáceos y de cualquier pez que se cruce en su camino (Tortonese, 1986), su talla media es de 32,3 cm y máxima de 103 cm (IGFA, 2001) con un peso máximo registrado de 12 Kg (Fiedler, 1991).

Hablando de su ciclo de vida, La lubina es una especie dioica, los peces se desarrollan como machos o hembras, a menos que se induzca artificialmente, no cambian de sexo durante su vida (Stickney, 2000). En el Mediterráneo la primera madurez sexual se produce generalmente entre 2 y 4 años de edad, mientras que en el Atlántico la madurez sucede un poco más tarde (machos entre 4-7 años y las hembras entre 5-8 años). El desove ocurre sólo una vez al año, en invierno, aunque en las zonas meridionales puede ocurrir en primavera. Los huevos son pelágicos, de 1,1 a 1,5 mm de diámetro con 1 o 2 gotas de grasa. El desarrollo embrionario dura unos tres días a 13-14 ° C y el desarrollo larval dura unos 40 días a 19 ° C.

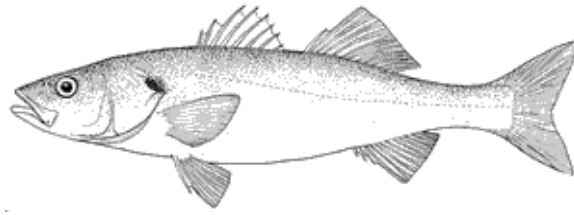


Figura 1: Dibujo de un ejemplar de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (FAO, 2015).

2.2. Dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758):

La dorada (Figura 2) es un teleósteo que pertenece al orden Perciforme y a la familia Sparidae. Es un pez común en el mar Mediterráneo, también presente en las costas atlánticas desde el estrecho de Gibraltar a cabo Verde y en los alrededores de las Islas Canarias (Bauchot y Hureau, 1990).

Debido a sus hábitos eurihalinos y euritérmicos, la especie se encuentra en ambientes marinos y salobres, tales como lagunas costeras y estuarios, en particular durante las etapas iniciales de su ciclo de vida (Girin, 1983). Se puede encontrar generalmente en poca profundidad de 1 a 30 metros (Lloris, 2005) aunque raramente los adultos pueden llegar a una profundidad de hasta 150 metros (Sola, 2006).

La dorada es un teleósteo, depredador menos piscívoro que la lubina, de una talla media de 35 cm (Bauchot y Hureau, 1986) y máxima de 70 cm (Muus y Nielsen, 1999), de un peso máximo registrado de 17,2 kg (IGFA, 2001), se alimenta al igual que la lubina, de moluscos, crustáceos y pequeños peces, excepcionalmente en épocas de escasez también puede alimentarse de algas y plantas marinas.

Hermafrodita protándrica, la mayoría de los individuos son primero machos, luego se convierten en hembras (Bauchot y Hureau, 1981), el desove ocurre en mar abierto durante los meses de octubre a diciembre, Los adultos vuelven a las zonas menos profundas después del desove, posteriormente se unen los alevines que permanecen en la zona costera hasta que alcanzan la madurez sexual (Stickney, 2000). La madurez en los machos se alcanza en 1 a 2 años (20-30 cm) y en las hembras en 2 a 3 años (33-40 cm).

Los huevos son esféricos y pelágicos, de un diámetro ligeramente inferior a 1 mm, con una única gran gota de grasa. La etapa larval planctónica dura alrededor de 50 días a 17-18 °C.

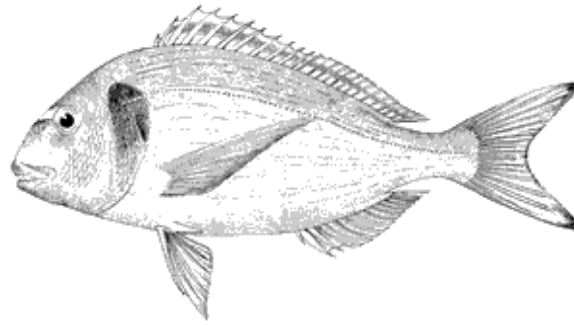


Figura 2: Dibujo de un ejemplar de dorada (*Sparus aurata*) (FAO, 2015).

3. Organización estructural del ojo del pez teleósteo:

El ojo de los peces teleósteos (Figura 4) es una estructura par, simétrica, esferoidal y ligeramente aplanada en sentido latero-medial con respecto al eje longitudinal del pez. Ambos ojos se alojan en el condrocraqueo, en una órbita cartilaginosa que les sirve como soporte mecánico.

El ojo de los peces teleósteos posee una organización con características muy parecidas a las observadas en los ojos de los vertebrados. Una de las principales diferencias está dada a nivel del cristalino, el cual es esférico en los teleósteos y ocupa prácticamente la totalidad del globo ocular. Otra diferencia importante a nivel retiniano, es la persistencia de la fisura coroidea ventral o fisura embrionaria, que en los peces teleósteos representa un área de neurogénesis postnatal y adulta.

La parte del ojo que está en contacto con el exterior se denomina córnea. La córnea es una membrana transparente, tiene una forma redondeada que actúa de manera similar a la lente convexa de una cámara, cuya función principal es refractar la luz incidente. Detrás de la córnea se encuentra un líquido claro llamado humor acuoso. A través de la córnea y el humor acuoso se observa el iris. A diferencia de los mamíferos, el iris de los peces teleósteos tiene una abertura fija incapaz de adaptarse a los distintos niveles de iluminación. Por lo tanto, los ajustes necesarios se realizan por medio de cambios morfológicos de los fotorreceptores y de los gránulos del epitelio pigmentario, que preparan el ojo para la visión fotópica y escotópica (Ali, 1975; Burnside y Nagle, 1983).

Detrás del iris se encuentra el cristalino, que consiste en muchas fibras transparentes situadas en el interior de una membrana elástica y transparente. El cristalino de los teleósteos es capaz de moverse más cerca o más lejos de la retina sensitiva (Figura 3), de hecho obtienen el mismo resultado como si fuera un lente de enfoque variable

(“zoom”). Este movimiento del cristalino se realiza por medio de un músculo llamado “retractor”, que está unido al cristalino y que lo puede tirar hacia atrás en dirección a la retina (Hueso et al., 1995).

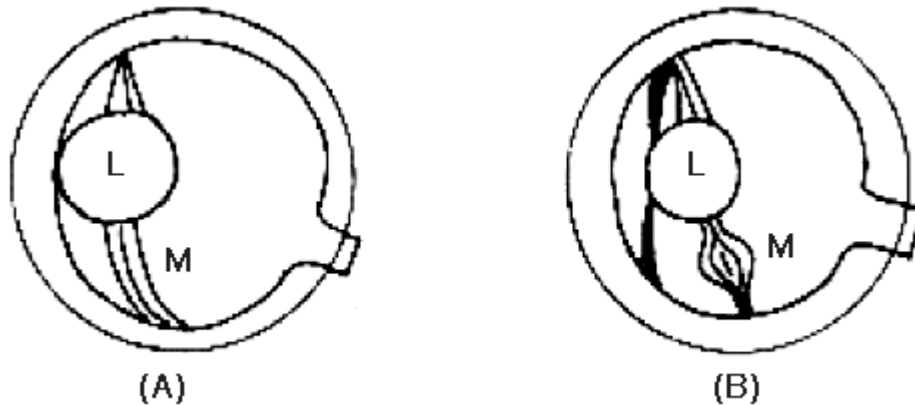


Figura 3: Representación esquemática de cómo cambia el foco del ojo de un pez. **(A)** El músculo retractor del cristalino (M) está en posición de descanso, mientras que el cristalino (L) está enfocando objetos cercanos. **(B)** El músculo se contrae atrayendo el cristalino hacia la retina, enfocando los objetos más lejanos (Roberto Petracini[©], elacuaria 2015).

La luz que atraviesa el cristalino y el medio pre-retinal, se refleja en los tejidos de la retina y la coroides (Hueso et al., 1995).

La coroides tiene una doble función, alimentar la retina y absorber o reflejar los rayos de luz incidentes hacia la retina (retina invertida).

En algunas especies encontramos una capa de tejido inmediatamente detrás de la retina, el “tapetum lucidum”, es una capa reflejante de los rayos de luz, compuesta por rectángulos granulares de lípidos, que permite a los peces incrementar la luz disponible para los fotorreceptores y mejorar la visión para localizar presas en condiciones de escasa luminosidad. (Zyznar y Ali 1975; Ali et al.; 1977; Ponset et al., 1993).

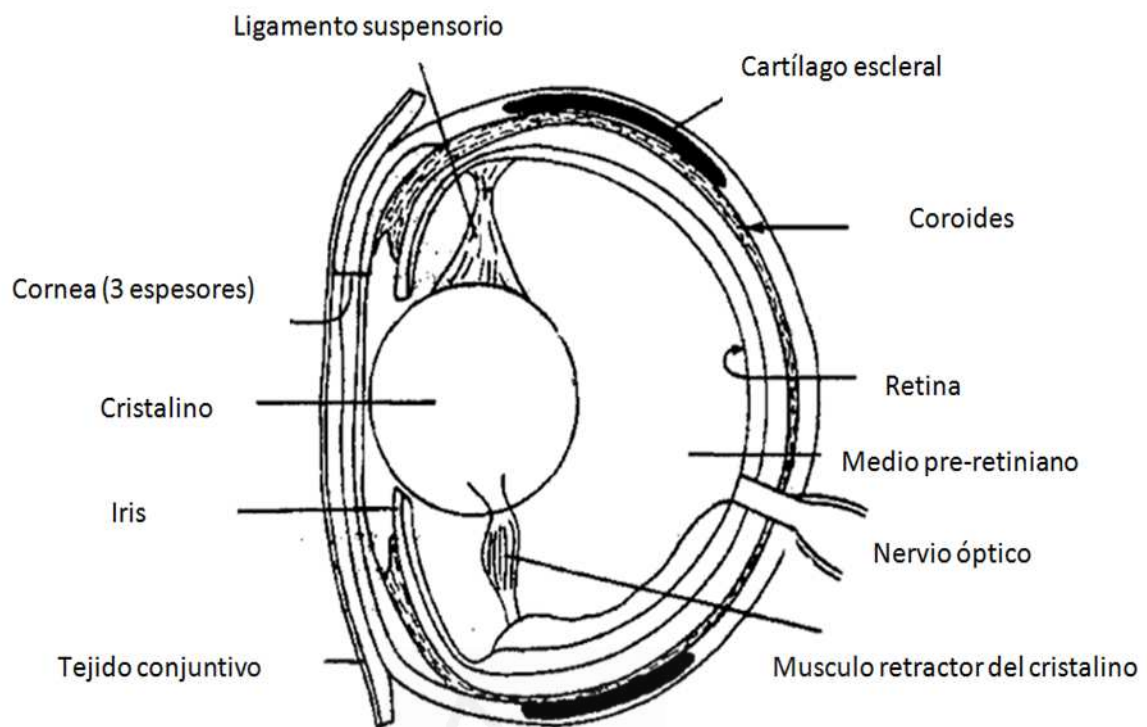


Figura 4: Representación esquemática del ojo de un pez teleosteo en sección transversal (Bone et al., 1995).

4. La estructura general de la retina de los peces teleósteos:

La retina es un tejido sensible a la luz que pertenece al sistema nervioso central, se sitúa tapizando el globo ocular por su parte interna, se encarga de la recepción y el procesamiento inicial de la información visual que se genera en los fotorreceptores tras un proceso de fototransducción, es decir la transformación del estímulo luminoso a un impulso nervioso. (Ramón y Cajal, 1892; Masland, 2001, Wässle, 2004)

El tejido retiniano neural es de origen diencefálico, está recubierto por una porción externa pigmentada llamada epitelio pigmentario, que se origina a partir de la capa externa de la copa óptica.

La retina neural de los teleósteos se desarrolla siguiendo un patrón laminar estratificado (Figura 5). Las células se disponen en grupos ordenados en estructuras geométricas, que le confieren a cada capa retiniana la capacidad de obtener una correcta representación topográfica del campo visual (Wässle y Riemann, 1978; Cameron y Carney, 2000; Rockhill y col, 2000; Fadool y col, 2003).

Desde la parte más escleral (externa) a la más vítreal (interna) encontramos las cinco siguientes capas:

Epitelio pigmentario o *pigment epithelium* (PE): Se constituye por una sola capa de células epiteliales cuboidales, la lámina basal de las cuales es parte de la membrana de Bruch, estas células están densamente cargadas con gránulos de pigmento de melanina, unidas entre sí por complejos de unión. La cara apical se caracteriza por numerosos largos procesos que se intercrucan con las microvellosidades apicales de las células de Müller, se interdigitan con los segmentos internos y externos de las células visuales.

En los teleósteos, las células del PE son generalmente mononucleares con unos orgánulos típicos e inclusiones citoplasmáticas esenciales para la relación funcional con los fotorreceptores (Kuwabara, 1979).

El PE está implicado en importantes aspectos del metabolismo de la retina: la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Beshare, 1982), la regulación de la concentración iónica en el espacio subretinal, aportación de nutrientes y oxígeno desde la circulación coroidal, también está implicado en el ciclo de la vitamina A, en la que isomeriza el todo- trans-retinol a 11-cis retinal (forma activa de la vitamina A). Esto significa que para un correcto funcionamiento de los fotorreceptores, el PE debe estar en perfecto estado.

Capa de los segmentos de los fotorreceptores o *layer photoreceptor segments* (LPS): formada por segmentos externos e internos de las células fotorreceptoras, bastones y conos. La capa de los segmentos externos es la parte fotosensible de la retina, mientras que la capa de los segmentos internos, se encarga de satisfacer las necesidades metabólicas de la fotorrecepción.

Las uniones adherentes entre los segmentos internos de los fotorreceptores y las células de Müller forman una barrera, membrana limitante externa o *outer membrane layer* (OML), entre el espacio subretinal donde se encuentran los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, de la retina neural propiamente dicha.

Capa nuclear externa o *outer nuclear layer* (ONL): es la zona que ocupan los núcleos de los fotorreceptores, conos y bastones.

Capa plexiforme externa o *outer plexiform layer* (OPL): es la capa donde se establecen conexiones sinápticas, entre los fotorreceptores, las dendritas de las interneuronas que incluyen células bipolares, interplexiformes y horizontales.

Capa nuclear interna o *inner nuclear layer* (INL): es la capa donde se localizan los somas conteniendo los núcleos de las células horizontales, bipolares, amacrinas, de las células gliales de Müller.

Capa plexiforme interna o *inner plexiform layer* (IPL): es la capa donde se establecen contactos sinápticos entre las prolongaciones de las células bipolares, amacrinas y las dendritas de las células ganglionares. Esta capa puede subdividirse a su vez en dos subláminas, una más externa en contacto con la INL donde se realizan contactos sinápticos entre las células bipolares y ganglionares OFF, una más interna en contacto con la capa de las células ganglionares donde se realizan contactos sinápticos entre las células bipolares y ganglionares ON.

Capa de las células ganglionares o *ganglion cell layer* (GCL): es la capa donde encontramos además de las células ganglionares, células amacrinas desplazadas (Draguer y Olsen, 1981; Perry, 1981; Hutchins y Hollyfield, 1987; Jeon et al., 1988).

Capa de las fibras del nervio óptico o *optic nerve fibers layer* (ONFL): neuronas de proyección cuyos axones conforman una capa de fibras nerviosas que, en contacto con el humor vítreo, convergen sobre la superficie retiniana en una zona conocida como disco óptico, luego se extienden hacia afuera del ojo formando el nervio óptico.

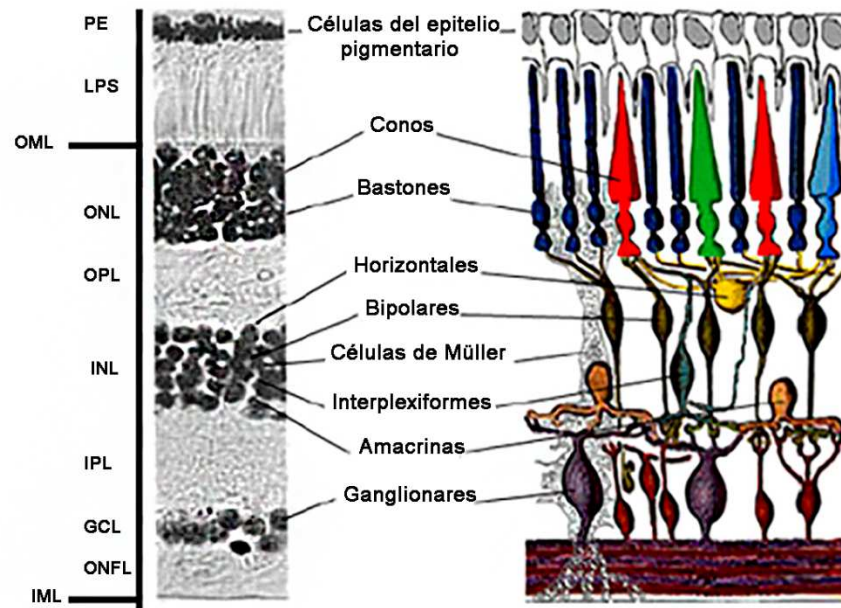


Figura 5: Estructura de la retina. Representación gráfica de las distintas capas de la retina (tomada de webvision.med.utah.edu).

5. Tipos de células de la retina y sus funciones:

La retina de los teleósteos, como todos los vertebrados, está formada por seis tipos de células neuronales y otras no neuronales.

5.1. Células fotorreceptoras o *photoreceptor cells* (PhC):

Las PhC son las primeras células neuronales de la vía óptica, encargadas de la recepción de la luz y su transformación en impulso eléctrico, fueron clasificadas por la primera vez por Müller, (1851) en dos tipos: bastones y conos.

En los teleósteos, las PhCs se disponen ordenadamente en forma de mosaico (Figura 6), disposición que si bien se insinúa en otros animales nunca se muestra tan marcada como en los peces (Hannover, 1840).

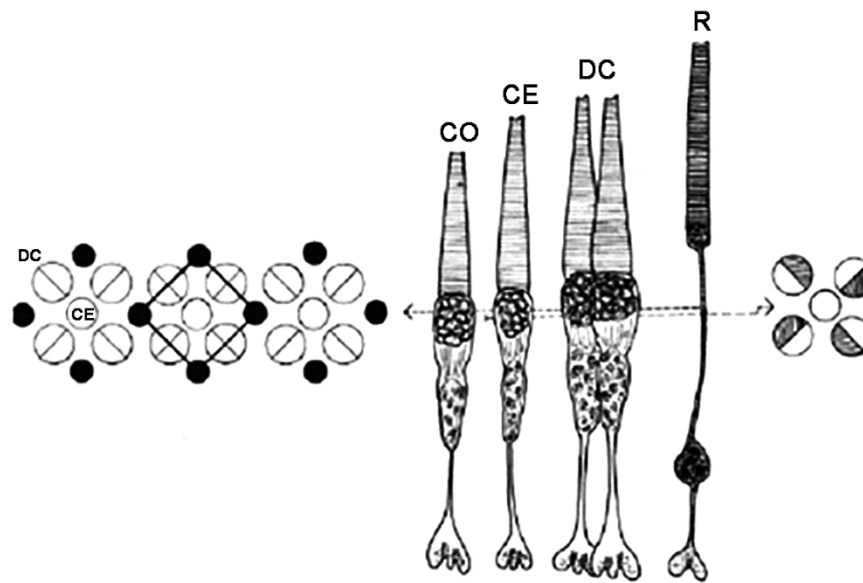


Figura 6: Centro, diagrama representando secciones radiales de células visuales de un pez teleosteo, bastón (R), un cono doble (DC) y dos tipos de conos simples (CE, CO). Izquierda, diagrama que representa una sección a través de la región del elipsoide de los segmentos externos de los conos de un teleosteo de un año de edad, mostrando el mosaico cuadrado con conos dobles que forman los lados y conos individuales en el centro (CE) y los bordes (CO). Derecha: un diagrama similar pero de un pez teleosteo con dos años de edad, los conos de la esquina están ahora ausentes, los elipsoides de los conos dobles son de unos 5µm de diámetro (Bowmaker y Kunz, 1987).

Schultze, (1866) fue el primero a establecer una relación entre la presencia de los dos tipos de fotorreceptores y la capacidad de la visión fotópica (la percepción visual que se produce con niveles de iluminación diurnos) y escotópica (percepción visual que se produce con niveles muy bajos de iluminación).

La retina de los teleosteos en general posee bastones y conos. Los conos pueden ser simples, dobles e incluso triples y cuádruples. Existen algunas especies de teleosteos cuyas retinas se consideran como puras de bastones, como en el caso de los peces abisales: *Argyropelecus* (Contino, 1939) y *Bathylagus* (Vilter, 1953), la ausencia de conos en la retina de estos peces se ha interpretado como un mecanismo de adaptación a las bajas intensidades ambientales de la luz a esas profundidades. Sin embargo, existen algunos informes referentes a peces, que al pesar de habitar aguas superficiales, tienen retinas carentes de conos como por ejemplo: *Clarias batrachus* (Verrier, 1928), *Hiodontersigus* (Moore, 1944) y el *Amphiodon alosoides* (Moore y McDouglas, 1949).

Pero en general, podemos considerar que la retina de los teleósteos posee conos y bastones.

Bastones o rods (R): En la mayoría de los vertebrados, los bastones revelan características similares básicas: son sensibles a baja intensidad de luz, poseen la esférula globular terminal, un segmento externo relativamente largo, elipsoides cortos, además de unos discos membranosos formados por repliegues apilados de la membrana plasmática (Zhang y Straznicky, 1991). En los teleósteos, se han observado variaciones substanciales sobre el tamaño absoluto de los segmentos externos de los bastones. Muchos son los autores que demostraron que en el caso de especies con un número igual de conos y bastones, estos últimos se caracterizan con un segmento externo muy fino y largo (Wagner, 1970; Ali y Anctil, 1976; Kuenzer y Wagner, 1969; Wagner, 1972). Mientras que en el caso de especies con un número de conos y bastones muy diferentes, este segmento es generalmente fino y corto (Ali y Anctil, 1976; Wagner et al., 1976).

Conos o cones (C): Los conos por su parte son menos sensibles que los bastones, requieren mayor intensidad de luz, proporcionan alta resolución, constan de dos segmentos distintos: un segmento externo y otro interno conectados entre ellos por cilios. El segmento interno contiene el núcleo y orgánulos (mitocondrias, aparato de Golgi,...etc.) esenciales para el funcionamiento de cualquier célula. En la parte más distal, de tamaño relativamente grande, el segmento interno posee varios tipos de sinapsis: sinapsis eléctricas o “gap junction”, donde la transferencia del mensaje nervioso es comparable a una simple conducción eléctrica, garantiza las relaciones entre los fotorreceptores vecinos (bastones y conos) y sinapsis químicas que permiten la transmisión del mensaje nervioso mediante un neurotransmisor, el glutamato. Las sinapsis químicas pueden ser de dos tipos: sinapsis invaginadas cuando las prolongaciones dendríticas de las células horizontales o bipolares se invaginan en la terminación axonal de los fotorreceptores, o planas, cuando las sinapsis son superficiales o basales, sus elementos pre- y post-sinápticos están en contacto por yuxtaposición. La otra parte del cono, el segmento externo, se caracteriza por su corta longitud, su forma cónica, sus discos membranosos formados por repliegues apilados de la membrana plasmática. Y es a nivel de esta parte del cono donde se produce la interacción con la luz.

Los teleósteos poseen una variedad de tipos de conos que se clasifican de acuerdo al tipo espectral de opsina en: conos rojos, verdes y azules. La mayoría de los peces poseen, además, un cuarto tipo de cono sensible a la luz ultravioleta. Por lo tanto, los conos pueden clasificarse de acuerdo a las distintas longitudes de onda a las que responden con mayor sensibilidad (Bowmaker y Hunt, 2006).

Existe gran variabilidad entre especies de peces teleósteos con respecto a los fotorreceptores de tipo conos que poseen en su retina. Hay especies que poseen conos de una sola clase espectral mientras que otras poseen las cuatro clases mencionadas. Los conos rojos y verdes constituyen los morfológicamente denominados “conos dobles”.

Tabla 1: resume las principales diferencias entre conos y bastones (Kandel et al, 2000, Principios de neurociencia, pp 509).

Diferencias funcionales entre conos y bastones	
Bastones	Conos
Gran sensibilidad a la luz, especializados en la visión nocturna	Menos sensibilidad a la luz, especializados en la visión diurna
Más fotorpigmento, capturan más luz	Menos fotorpigmento
Gran amplificación, detección de fotones únicos	Menor amplificación
Baja resolución temporal: respuesta lenta, tiempo de integración prolongado	Gran resolución temporal: respuesta rápida, tiempo de integración breve
Más sensible a la luz dispersa	Más sensible a los rayos axiales directos

5.2. Las células bipolares o *bipolar cells* (BC):

Las retinas de los teleósteos están dotadas de un conjunto altamente sofisticado de BCs en comparación con las retinas de mamíferos y primates. El cuerpo celular de estas células se encuentra en la INL, las dendritas se extienden hacia la OPL y realizan conexiones sinápticas con células fotorreceptoras, horizontales y células interplexiformes, mientras que los axones realizan conexiones sinápticas con las células ganglionares y amacrinas de la IPL.

Las BCs responden de forma diferente al glutamato liberado por las células fotorreceptoras, por lo tanto establecen dos vías de respuestas diferentes, vía ON y vía

OFF, permitiendo de esta manera la transmisión de las señales visuales entre la capa más externa de la retina y la capa más interna.

Las células bipolares se pueden clasificar en muchos tipos, teniendo en cuenta el tamaño del campo dendrítico y los tipos de fotorreceptor con que contactan.

En los teleósteos, dos tipos de estas células realizan sinapsis predominantemente con los bastones, además extienden sus procesos dendríticos hacia terminales de los conos con sensibilidad al rojo (Stell, 1967; Parthe, 1972; Scholes, 1975). Otro tipo de las células bipolares tiene sinapsis únicamente con los conos cromáticos, mientras que otras están en contacto selectivo con conos de idéntica sensibilidad espectral (Scholes, 1975).

5.3. Las células horizontales o *horizontal cells* (HC):

Las HCs son neuronas típicas de interconexiones laterales, los cuerpos de estas células nerviosas se encuentran en la capa nuclear interna, sus ramas dendríticas se encuentran en la capa plexiforme externa, realizan conexiones con fotorreceptores, células interplexiformes, células bipolares, en algunos casos con células amacrinas (Marc y Liu, 1984; Marshak y Dowling, 1987).

Müller, (1851) fue el primero a descubrir este tipo de células, que fueron recibiendo distintos nombres a lo largo del siglo pasado, Tangentialen fulcrum zellen (Müller, 1874); células basales (Ranvier, 1882); Sternformigen zellen (Dogiel, 1883); Concentrische stutzellen (Schiefferdecker, 1886); células superficiali (Tartuferi, 1887) hasta que al estudiarlas Cajal, (1892), las bautizó con el nombre de células horizontales con el que hoy en día se conocen.

La principal función de las células horizontales es la regulación de la información enviada por los fotorreceptores a las células bipolares en circuitos de retroalimentación.

Morfológicamente se dividen en función de la presencia de un axón corto o la ausencia de axón (Gallego, 1976). En los teleósteos, las células horizontales sin axón (tipo H4) son postsinápticas únicamente a los bastones (Stell, 1967). Mientras que la mayoría del resto de las células horizontales con axones (tipo H1, H2, H3) (Figura 7) constituyen sinapsis inhibitorias sobre los conos (Baylor et al., 1971; Murakami et al., 1982), contribuyen en la oponencia al color (Stell y Lighfoot, 1975).

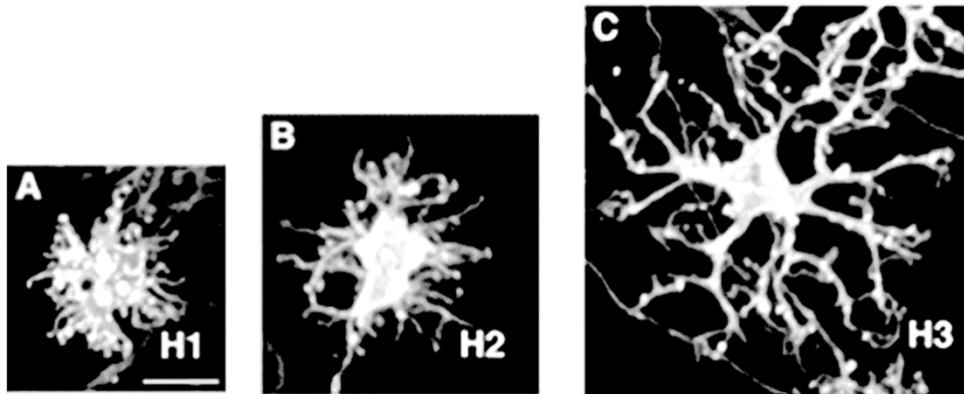


Figura 7: Diferentes tipos de células horizontales en la retina de un pez teleósteo (Zebrafish). (A) HC tipo H1; (B) HC tipo H2; (C) HC tipo H3 (Li et al., 2009).

Las HCs siempre interactúan con terminales fotorreceptoras en lo que se conoce como cintillas sinápticas (Figura 8). En la retina de los peces teleósteos se producen cambios estructurales a nivel de las células horizontales de la retina. En condiciones de luz, las dendritas de las células horizontales se invaginan profundamente en los pedículos de los conos formando espínulas que desaparecen en oscuridad (Figura 9) (Wagner, 1980). La desaparición de estas espínulas se correlaciona con la aparición a nivel del citoplasma de las células horizontales de unas inclusiones de aspecto esférico llamadas “nematosomas” (Figura 9-B), que son muy grandes en oscuridad, que reducen dramáticamente su tamaño cuando la retina está adaptada a la luz (De Juan et al., 1991; 1996).

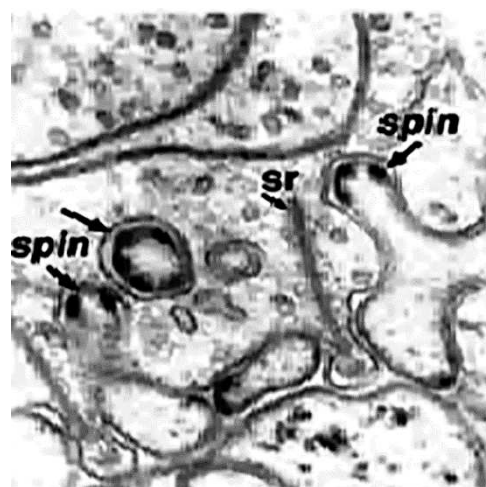


Figura 8: Micrografía electrónica de la retina de un pez teleósteo adaptado a la luz mostrando cintillas sinápticas (sr) y espínulas (spin) (De Juan y García, 2001).

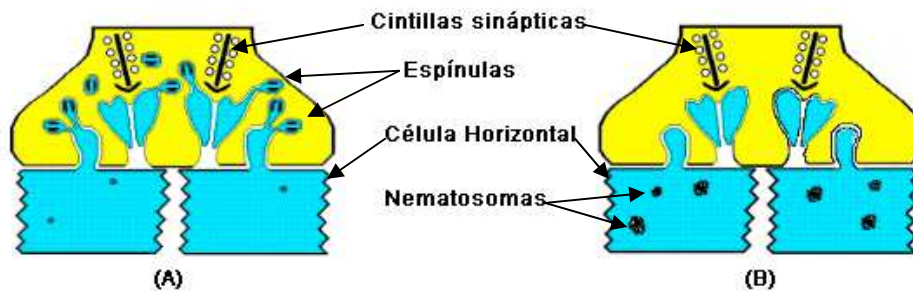


Figura 9: esquema de un pedículo de cono de una retina (A) adaptado a la luz con invaginaciones de las dendritas de las células horizontales que forman espínulas; (B) adaptada a la oscuridad, con una célula nematosomas en su citoplasma (De Juan y Pérez, 1997).

5.4. Las células amacrinas o *amacrine cells* (AmC):

Las AmCs fueron descritas por la primera vez por Dogiel, (1981), son células interneuronales de asociación horizontal que establecen sinapsis en la OPL. Los somas de estas células se localizan en la INL, aunque también existen células amacrinas desplazadas en la GCL (Hughes y Wieniawa-Narkiewicz, 1980).

Morfológicamente son las células más diversificadas de la retina donde podemos encontrar prácticamente cualquier neurotransmisor presente en el resto del sistema nervioso. Puede haber más de 20 tipos diferentes. Todas ellas tienen en común: primero su situación, con los cuerpos en la INL, sus procesos en la zona sináptica entre esa capa y GCL. Y por lo tanto, constituyen una ruta alternativa indirecta entre ellas y finalmente su carencia de axones compensada por la capacidad de sus dendritas para terminar pre-sinápticamente en otras células.

Las AmCs se pueden clasificar según muchos criterios: tamaño y localización del cuerpo celular (en la zona INL o en la GCL, denominando estas últimas, células amacrinas desplazadas), organización (difusa o estratificada), extensiones (ancho, medio o estrecho), sus árboles dendríticos.

Las células amacrinas parecen tener varias funciones diferentes, muchas de ellas son desconocidas. En los teleosteos se identificaron funcionalmente cuatro grupos:

- Células amacrinas de respuesta ON: reciben aferencias de las células bipolares ON.

- Células amacrinas de respuesta OFF: reciben aferencias de las células bipolares OFF.
- Células transitorias que responden al inicio y al final del estímulo luminoso.
- Y finalmente, células amacrinas codificadas para el color.

5.5. Células interplexiformes o *interplexiforme cells* (IC):

Descritas por la primera vez por Gallego, (1971), son células Donde el cuerpo se encuentra en la INL, sus procesos se extienden tanto por la plexiforme interna y externa, su función principal es el transporte de señales desde la IPL a la OPL. El neurotransmisor de estas células en los teleosteos es dopamina (Dowling y Ehinger, 1975).

5.6. Células ganglionares o *ganglion cells* (GC):

Las células ganglionares son células neuronales de axón mielinizado, localizadas en la superficie interna de la retina. Reciben información de los fotorreceptores mediante neuronas intermediarias: bipolares, amacrinas y horizontales. Presentan menos del 1% de la población total de las células de la retina, sus axones largos van hacia el cerebro y forman el nervio óptico.

Las GCs tienen un campo receptivo aproximadamente circular con una zona central y una zona periférica, pueden ser denominadas ON/OFF u OFF/ON (Figura 10). Las GCs con centro ON se activan cuando se ilumina sólo el centro de su campo receptivo, en cambio sí se ilumina el entorno OFF, este no se activa, a esto se la ha denominado como una respuesta inhibitoria. De tal forma, que si se iluminara todo el campo receptivo, ambas respuestas se suman sin producir cambios en la respuesta celular.

La morfología de este tipo celular es muy variable dependiendo de la especie estudiada. Las clasificaciones se basan normalmente en el tamaño del cuerpo celular y la forma del árbol dendrítico (Fukuda, 1977; Perry, 1979; Perry et al., 1983; Ni y Dreher, 1981; Dreher et al., 1985; Dann y Buhl, 1987; Peichl, 1989; Tauchi et al., 1992).

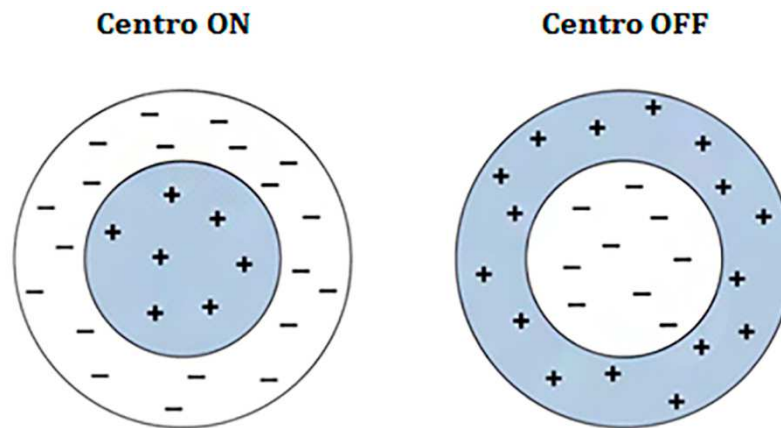


Figura 10: Los dos tipos principales de los campos receptores de las células ganglionares de la retina. (+): Regiones con respuesta ON; (-): Regiones con respuesta OFF.

5.6.1. Clasificación morfología de las células ganglionares:

Boycott y Wässle, (1974) diferenciaron dos tipos morfológicos básicos de células ganglionares en la retina del gato:

Células ganglionares α : con cuerpo neuronal grande y amplias expansiones dendríticas.

Células ganglionares β : con cuerpo neuronal pequeño y cuyas dendritas se agrupan densamente en un campo pequeño.

Un tercer tipo con cuerpo neuronal inferior al de beta, pero con expansiones dendríticas muy ramificadas, se ha subdividido en: **gamma, delta y épsilon**

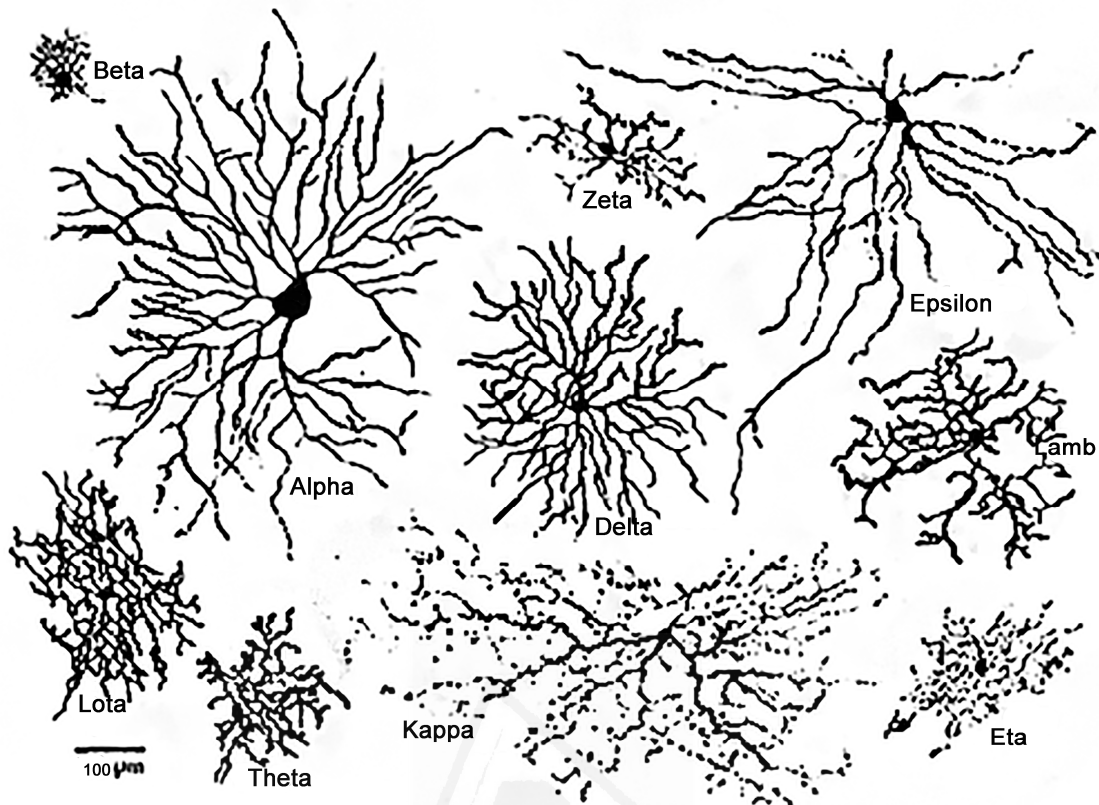


Figura 11: Diferentes tipos de células ganglionares marcados por el método de Golgi (Molina, 2007).

5.6.2. Clasificación funcional de las células ganglionares:

Según su respuesta temporal, las células ganglionares se pueden clasificar en tres tipos (Jessell, Kandel y Schwartz, 1997; Gregory, 1998):

Células ganglionares X, tónicas o sostenidas: son células de tamaño mediano entre 10 y 15 micrómetros, de una respuesta lineal de tipo ON u OFF durante todo el tiempo de iluminación retiniana, de una velocidad de conducción axonal mediana de unos 14m/s, representan aproximadamente el 55% de las células ganglionares registradas, sus campos receptores son pequeños, sus axones proyectan exclusivamente en el campo geniculado lateral, cada una de estas células recibe señales de al menos un tipo de cono, por lo que, serían responsables del inicio del procesamiento de la información cromática, responden mejor a estímulos puntuales que amplios, e intervienen en el análisis detallado de alta resolución y la discriminación cromática.

Células ganglionares Y, fásicas o transitorias (ON-OFF): representan el 5% del total de las células ganglionares. Su respuesta es no lineal, reaccionan solo de una forma muy breve. Producen una serie de descargas fásicas al comienzo y al final de la estimulación. Su velocidad de transmisión es muy rápida, alcanza a los 50 m/s, tienen un cuerpo neuronal muy grande de aproximadamente unos 30 micrómetros, unos gruesos axones que se proyectan tanto en el campo geniculado lateral como a los colículos superiores. Intervienen en el análisis inicial de la imagen, en la percepción del movimiento.

Células ganglionares W: representan el 40% de las células ganglionares de la retina, tienen un cuerpo neuronal pequeño que no exceda los 10 micrómetros, su ramificación dendrítica es muy amplia, lo que les permite tener un campo receptor muy grande. Su respuesta y velocidad de conducción son las más lentas de entre todas las ganglionares (8 m/s), pueden ser ON-OFF u ON y OFF. Sus axones proyectan exclusivamente en los colículos superiores, estarían relacionados con vías reflejas para los movimientos oculares y de la cabeza. Intervienen también en la transmisión de los mensajes de los bastones en visión escotópica.

5.6.3. Células ganglionares de asociación:

Las células ganglionares de asociación son células muy poco frecuentes en la retina (gallego y Cruz, 1965), tienen un axón que se divide en varias ramas a nivel de la plexiforme interna, pueden representar un papel de asociación entre las células ganglionares, se activan por las vías centrípetas visuales comprendidas en la superficie retiniana cubierta por sus dendritas y los impulsos de su axón, modificarán las respuestas de las células ganglionares situadas a distancia con las cuales efectuarán sinapsis sus ramas terminales.

5.6.4. Células ganglionares fotorreceptoras o células intrínsecamente fotosensibles (ipRGC):

Un subgrupo de estas células ganglionares sintetiza a la melanopsina, fotopigmento que les permite transformar a la luz en un impulso nervioso de manera homóloga a la fototransducción de los bastones y los conos. Se conoce a las células con melanopsina como células ganglionares fotorreceptoras o células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) y se ha descrito su participación en una serie de funciones

adicionales a la formación de imágenes (funciones accesorias o extravisuales de la retina), entre las que destaca la sincronización del ritmocircadiano por la luz.

5.7. Las células de Müller o *Müller cells* (MC):

Las células de Müller son un tipo específico de células gliales que atraviesa todas las capas retinianas (Figura 12) y se extiende desde la capa limitante externa (a la altura de los segmentos internos de los fotorreceptores) hasta la capa limitante interna (a la altura de la GCL). La OML está formada por prolongaciones de la membrana plasmática de las MCs, la IML por los pies de este mismo tipo glial. Los somas de estas células se encuentran en la INL (Dowling, 1979; Wässle, 2004).

En los teleósteos, las MCs tienen conexiones estrechas entre sí y con los fotorreceptores a nivel de OML (Uga Y Smelser, 1973), son considerados como soporte y aislamiento de células neuronales, tienen gran importancia en el mantenimiento de la homeostasia tisular así como el mantenimiento de la barrera hemato-retinal, una de las funciones más importantes también de estas células, es su intervención en el proceso de regeneración retiniana.

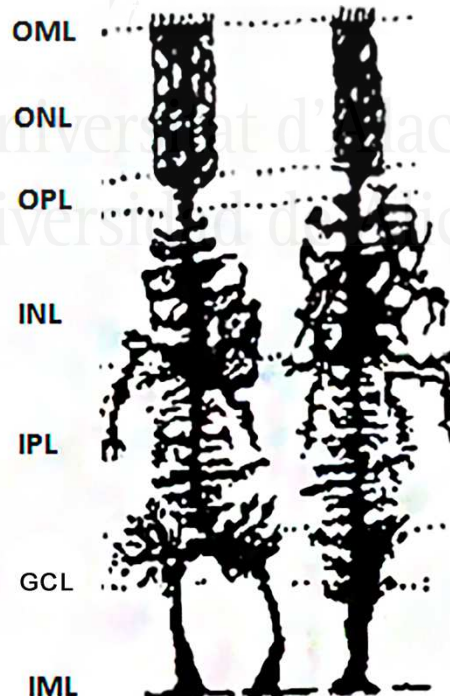


Figura 12: Dibujos de células de Müller en una especie de un pez teleosteo (*Cyprinus carpio*) (Ramón y Cajal, 1892). OML: membrana limitante externa; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de las células ganglionares; IML: membrana limitante interna.

6. La visión en los teleósteos, adaptación a la luz y oscuridad:

La visión es un sistema sensorial importante para la mayoría de las especies de peces incluidos los teleósteos. Los ojos de los teleósteos son similares a los vertebrados terrestres como aves y mamíferos, pero tienen una lente más esférica. Sus retinas generalmente están altamente especializadas en la detección y análisis de patrones de luz distribuidos en tiempo y espacio, una adaptación a la luz y a la oscuridad imprescindible para conseguir una imagen con la exposición adecuada.

Este poder de adaptación a nivel del sistema visual de los teleósteos se debe a cambios fisiológicos y morfológicos a nivel de la retina, que les permite sobrevivir en un ámbito acuático, en el que las condiciones visuales son más difíciles que el medio aéreo. Estos cambios se manifiestan con dos fenómenos principales:

- Movimientos retinomotores o *retinomotor movement* (RMM) a nivel del epitelio pigmentario y células fotorreceptoras.
- Un alto grado de plasticidad sináptica a nivel de la capa plexiforme interna y externa.

6.1. Movimientos retinomotores:

En la mayoría de los vertebrados incluidos los peces teleósteos, la retina presenta RMM dependiendo de las condiciones de iluminación. Todos estos movimientos pueden iniciarse con solo un breve pulso de exposición a la luz y están sometidos a un control circadiano endógeno (Wagner y Douglas, 1983; Dearry y Barlow, 1987; Wagner et al., 1992).

En la adaptación a la oscuridad, se produce una agregación de gránulos de melanina en la parte basal de las células del PE, los mioideos de los bastones se contraen dando lugar al movimiento de los elipsoides y segmentos exteriores hacia la membrana limitante externa, mientras que los mioideos de los conos se alargan provocando el movimiento de los elipsoides y de los segmentos externos hacia la esclera. En las retinas adaptadas a la luz, los RMM observados son los opuestos (Cavallaro y Burnside, 1988; Dearry y Barlow 1987).

El tiempo necesario para el desplazamiento del pigmento y el movimiento de las células visuales en los teleósteos es generalmente alrededor de 30 minutos para retinas adaptadas a la luz, una hora o más para las que están adaptadas a la oscuridad.

Generalmente, en la mayoría de los teleósteos, los movimientos de los bastones son menos dramáticos que los conos, pueden ser inmóviles en algunas especies (Levinson y Burnside, 1981).

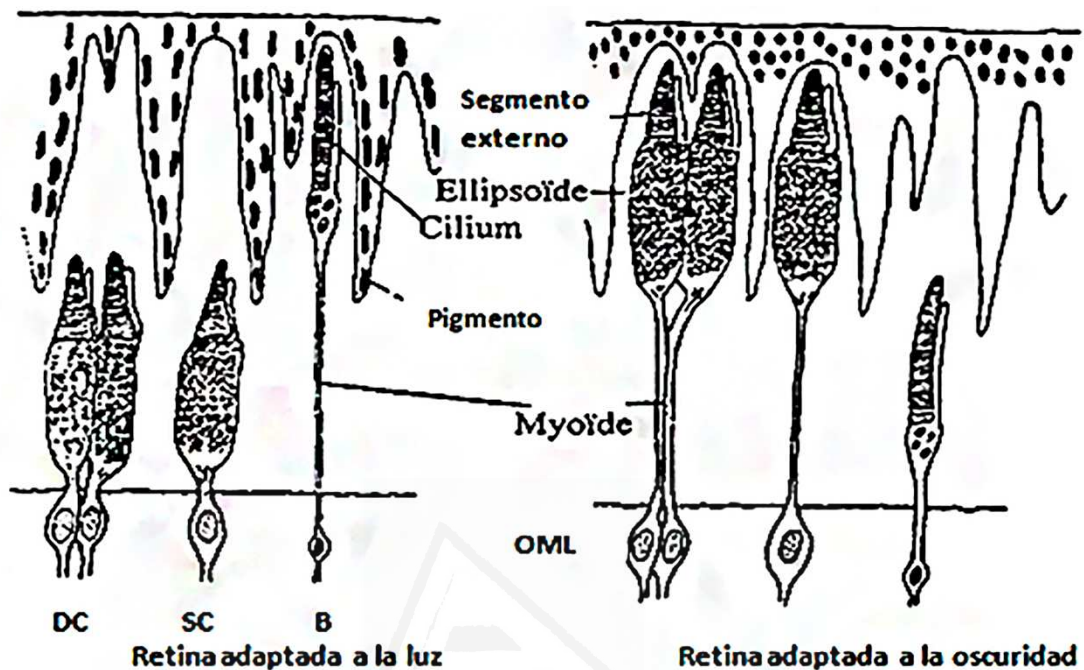


Figura 13: Representación esquemática de las respuestas retinomotoras en un pez teleósteo; (DC) cono doble; (SC) cono simple; (R) bastón; (OML): membrana limitante externa (Jobling, 1995)

6.2. Plasticidad sináptica:

La palabra y concepto "plástico" deriva del griego "plastos" que significa moldeado.

William James, (1890) fue el primero en introducir el concepto de plasticidad en la neurociencia con la publicación de su libro "The Principles of Psychology", haciendo referencia a la capacidad del ser humano de experimentar cambios.

La plasticidad sináptica se puede definir como una propiedad intrínseca de las células neuronales, que hace posible que el sistema nervioso supere las restricciones que la genética le impone, pueda adaptarse a las experiencias ambientales y a las demandas fisiológicas a lo largo de la vida (Cohen et al., 1993).

Aunque los cambios neuroplásticos se producen con mayor facilidad a nivel cerebral, estas modificaciones están también bien descritas y documentadas a nivel de la

retina de los vertebrados, precisamente en la retina de teleósteos que se caracteriza con un alto grado de plasticidad sináptica.

De todas las capas de la retina, tan solo en dos de ellas se producen contactos sinápticos: la capa plexiforme externa e interna, a continuación nos detallamos los importantes cambios que se producen a nivel de las estructuras sinápticas en la OPL, que afectan en primer lugar a las cintillas sinápticas, las esférulas de los pedículos de los conos.

6.2.1. Terminaciones sinápticas en la capa plexiforme externa:

La capa plexiforme externa es la primera capa sináptica de la retina que se puede considerar como un centro de integración primaria (Sjöstrand, 1976) donde se contactan las terminaciones sinápticas de conos y bastones con las dendritas de las células bipolares y horizontales (Kolb, 1970). Estas terminaciones se denominan pedículos en el caso de los conos, esférulas en el caso de los bastones. Ambos tipos de terminaciones están rellenas de vesículas sinápticas.

Las sinapsis entre las células horizontales y bipolares poseen unas estructuras densas llamadas cintillas sinápticas o *synaptic ribbons* (sr). A nivel de los pedículos se forman unas estructuras conocidas como tríada (Dowling y Boycott, 1966), en la que se encuentran tres procesos: dos procesos laterales que corresponden a las células horizontales, un proceso central alineado con la sinapsis en cintilla que corresponde a una célula bipolar invaginante. Además existen otros tipos de células bipolares que también contactan con el pedículo mediante contactos basales (Missotén, 1965; Dowling y Boycott, 1966; Kolb, 1970). Por su lado, las esférulas contienen dos sinapsis en cintilla, forman una estructura conocida como diada, compuesta por las terminaciones axónicas de las células horizontales (una estructura lateral) y un elemento central, compuesto por las dendritas intervaginantes de las células bipolares para los bastones. Por lo general, no existen contactos basales en las esférulas (Sharpe y Stockman, 1999).

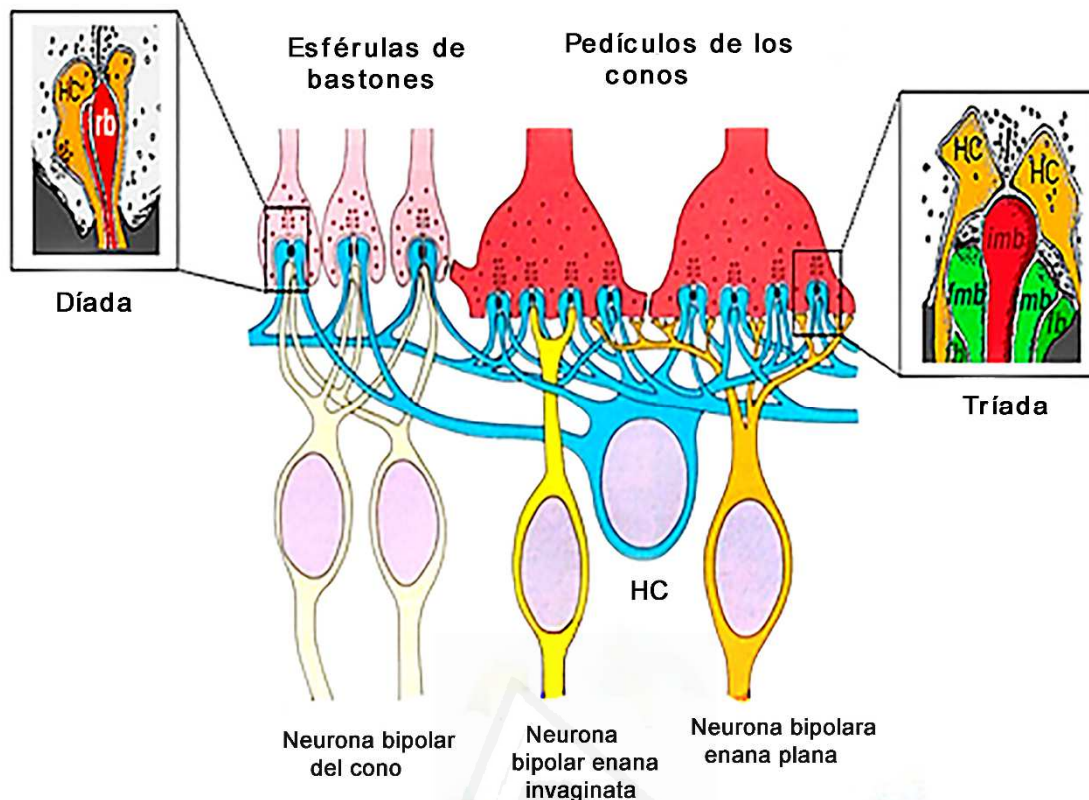


Figura 14: Dibujo esquemático de las relaciones sinápticas entre las esférulas de los bastones, los pedículos de los conos, las neuronas bipolares y las células horizontales. HC: célula horizontal; imb: dendritas de la bipolar invaginante; fmb= la bipolar plana (enana); fb: dendritas de la bipolar plana difusa; rb: bipolar invaginante en una esférula. (Hogan Alvarado y weddell, basado sobre Dowling y Boycott).

6.2.2. Cintillas sinápticas o *synaptic ribbons* (sr):

En la cavidad de las terminaciones de los fotorreceptores se observa una serie de estructuras similares a placas de aproximadamente $1 \mu\text{m}$, que se organizan en varios subcompartimentos. En secciones transversales, estas placas aparecen en forma de cintas tri- o pentalaminar, de allí viene su denominación: cintillas sinápticas. Mientras que en los bastones encontramos sólo una o dos cintillas, su número varía en gran medida en el caso de los conos. Generalmente, en los pedículos de los conos pequeños o simples se encuentra menor número de cintillas que en los pedículos de los conos largos o dobles. Así, la cantidad de cintillas puede ser utilizada para la determinación del tipo espectral del cono en algunas especies (Downing et al., 1986; Wagner, 1987).

Las cintillas sinápticas del cono se diferencian de las cintillas de los bastones por su capacidad de presentar signos de cambios morfológicos dinámicos relacionados con el

ciclo de actividad del fotorreceptor. En *Nannacara anomala*, su longitud disminuye durante la fase de oscuridad hasta tal punto que casi desaparecen (Wagner, 1973), mientras que en los Salmónidos y Ciprínidos, la reducción de tamaño es menos prominente, a menudo es más difícil de registrar (Wagner y Ali, 1977; Raynauld y Wagner, 1978). Una exposición prolongada a oscuridad y la aplicación de varios fármacos han confirmado que las cintillas sinápticas de los conos, no de los bastones, son estructuras plásticas. Los fármacos que controlan el nivel intracelular de iones de calcio (Ca^{2+}) tienen un marcado efecto en la aparición de las cintillas del cono. En las retinas adaptadas a la luz, si la concentración de Ca^{2+} se aumenta a más de 1 mmol, el tamaño y el número de las cintillas disminuye, mientras que la disminución de la concentración a menos de 10⁻⁸ mmol provoca un efecto opuesto (Schmitz et al., 1989). La aplicación de forskolina, un inhibidor de la actividad fosfodiesterasa responsable de la descomposición de cAMP provoca una disminución marcada en el tamaño de las cintillas sinápticas (Weiler et al., 1988).

La falta de pruebas sobre la composición proteica de las cintillas sinápticas significa que las interpretaciones del papel funcional de estas estructuras y de su dinámica se basan mejor en experimentos farmacológicos. Estos experimentos indican que la ausencia o la reducción del tamaño de las cintillas de los conos coinciden con una alta actividad de liberación del neurotransmisor es mediada por altos niveles de Ca^{2+} y cAMP durante la fase de oscuridad. Esto lleva a especular que las cintillas sinápticas son elementos del citoesqueleto, implicadas en el transporte de las vesículas desde el citoplasma hasta el lugar de liberación durante una estimulación intensa o artificial (Wagner, 1990).

6.2.3. Formación/disrupción de las espínulas de las células horizontales:

En secciones transversales a nivel de los pedículos de los conos de las retinas de teleósteos adaptadas a la luz (Figura 15), se puede identificar fácilmente y a primera vista unas estructuras digitiformes de 0,3 μ m de largo por 0,1 μ m de ancho, que contienen procesos electródensos justo cerca de la membrana plasmática. Estas estructuras llamadas espínulas (Wagner, 1980) se forman a partir de las terminaciones dendríticas de las células horizontales, que en condiciones de luz cambian de forma dentro de los pedículos de los conos extendiéndose y dando lugar a estas estructuras.

La formación de las espínulas está bajo control circadiano endógeno, pero es necesario un control cerebral a través de FMR-amida y GnRH (Stell et al., 1984; De

Juan y García, 2001) que actúan sobre el sistema dopaminérgico de las células interplexiformes en la retina (Zucker y Dowling, 1987). Estas espínulas, parece también que están bajo control local del ácido retinoico del ciclo visual (Weiler et al., 1998; Pottek y Weiler, 2000).



Figura 15: Micrografía electrónica de la retina de un pez teleósteo adaptado a la luz (*Micropterus salmoides*) a nivel de un pedículo del cono, mostrando varias triadas (*) inmediatamente por debajo de las cintillas sinápticas (sr), como se puede observar también varias espínulas (flechas). Barra: 0,2 μ m (De Juan et al., 1996).

En muchas especies, el curso temporal de la formación o desaparición de las espínulas es de 45 a 60 min (Wagner y Douglas, 1983). Tras una plena adaptación a la luz, la formación de espínulas puede aumentar la superficie de contacto entre las dendritas de las células horizontales y la plasmalema del cono de un 25% (Kriete et al., 1984). Se conoce muy poco acerca de los mecanismos responsables de la formación y desaparición de estas espínulas, como no está del todo muy claro si la fuerza para su movimiento hacia el pedículo se localiza en el cono o en la célula horizontal. Sin embargo, el hecho de que las espínulas presentan numerosos microfilamentos de actina por debajo de la membrana plasmática (Drenckhahn y Wagner, 1985), la presencia de microtúbulos en las dendritas de las células horizontales (Schmitz y Kohler, 1993) y la existencia de espínulas en distintos estados de formación a los 30 minutos del iniciado del estímulo luminoso (Wagner, 1980), apoya la idea a que las terminaciones dendríticas son elementos activos.

En retinas adaptadas a la luz, el número de espínulas por pedículo del cono es mayor en algunas especies que otras. Por ejemplo, *Micropterus salmoides* (De Juan et al., 1996; De Juan y García, 1998; García y De Juan, 1999) y *Roccus americana* (De Juan y Dowling, 1987; De Juan et al., 1991) tienen el doble del número de espínulas por pedículo del cono que *Carassius auratus*, *Tinca tinca* y *Cyprinus carpio* (Wagner y Douglas, 1983). También se ha demostrado que el número de espínulas aumenta con la edad y con el grado de depredación del pez teleósteo (Douglas y Wagner, 1983).

El papel que juegan estas espínulas dentro de la retina sigue siendo aún no muy claro. Sin embargo, la asociación entre el registro intracelular y los análisis cuantitativos ultraestructurales sugieren que estas estructuras pueden ser responsables de la retroalimentación negativa de las HCs sobre los conos (Raynauld et al., 1979; Wagner, 1980; Weiler y Wagner, 1984; Djamgoz, 1989; Kirsh et al., 1990).

La aparición de las espínulas se ha correlacionado también con la oponencia al color en las células horizontales y ganglionares (Raynauld et al., 1979), lo que apoya la idea de que tienen una función sináptica.

7. Capacidades visuales de los peces teleósteos:

7.1. Condiciones visuales en el medio acuático:

Los peces teleósteos viven en un medio que tiene propiedades ópticas muy diferentes del medio aéreo, su sistema óptico para el enfoque de la imagen depende esencialmente de la lente o el cristalino esférico, de la absorción y dispersión de la radiación luminosa en el agua, como depende también de la luz reflejada en el agua que añade más ruido al habitual, ruido con el que, el sistema visual de un animal acuático se tiene que enfrentar para identificar un objeto.

7.1.1. El paso de los rayos de luz a través del interfase aire/agua:

Según la ley de Snell, los rayos de luz viajan a través del aire en línea recta hasta que se encuentran con un medio más denso, entonces se refractan. El agua es un medio denso, cuando un rayo de luz llega a su superficie haciendo un ángulo θ_1 con la normal es desviado de su dirección original de tal forma que, dentro del agua hace un ángulo θ_2 con la normal (Figura 16-A). La relación entre estos ángulos está dada por la ley de Snell y se escribe como:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2.$$

Cuando los rayos de luz viajan en sentido contrario, es decir desde el agua hacia el aire, siguen los mismos caminos que en el caso aire/agua pero en sentido contrario, todos los rayos comprendidos en el arco de 97 grados salen al aire formando ángulos diferentes que se distribuyen en la superficie (Figura 16-B). Cualquier rayo de luz incidente que tenga un ángulo mayor al ángulo límite que es igual a 48,5 grados (Bunt, 1991), en lugar de refractarse, se refleja (Figura 16-B). Todo este fenómeno de reflexión y refracción de luz en el interfase aire/agua influye en la visión de los peces teleósteos.

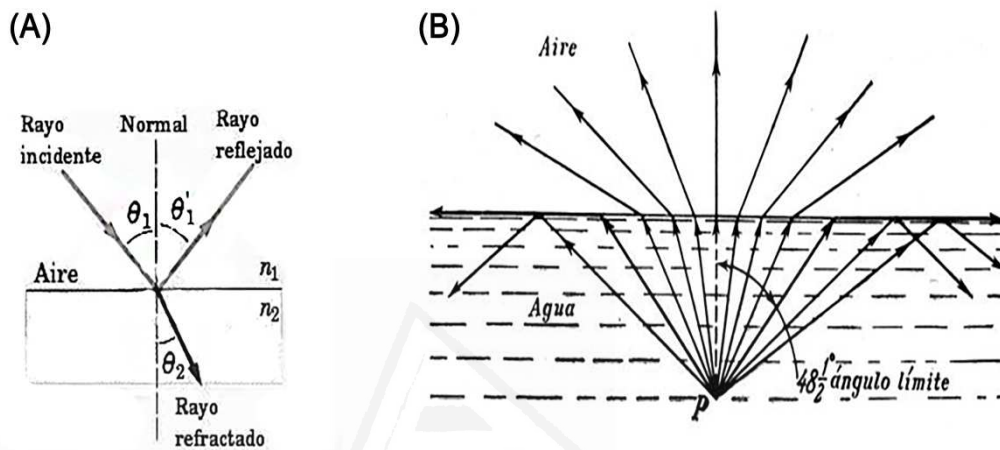


Figura 16: (A) Un rayo incidente en una interfase aire-agua (ley de Snell, 1621) n_1 es el índice de refracción del medio aéreo; n_2 es el índice de refracción del medio acuático; θ_1 y θ_1' son ángulos de incidencia; θ_2 es ángulo de refracción. (B) Varios casos de refracción de un rayo al pasar desde el agua al aire, el ángulo límite es igual a 48,5 grados, los rayos que salen del punto p formando con la perpendicular de incidencia un ángulo mayor que el límite, no salen del agua, se reflejan totalmente hacia adentro.

Los teleósteos tienen una visión del mundo aéreo que se limita a una ventana circular llamada ventana de Snell (Lythgoe, 1972; Bunt, 1991), que disminuye y aumenta de tamaño de forma cónica, a medida que el pez se acerca o se aleja de la superficie respectivamente (Figura 17-B). Esta ventana cubre un ángulo límite de 160 grados, pero este se encuentra comprimido bajo el agua en un arco de 97 grados, lo anterior debido al ángulo de refracción que se forma al paso de los rayos de luz a través de la superficie del agua (Figura 17-A).

Un hecho importante con la relación a la ventana de Snell, es que los animales transparentes que son alimento de muchos peces pelágicos, son más fáciles de detectar cuando cruzan esta línea, ya que aparecerán más claros u oscuros que el fondo (De Juan y Pérez, 1997).

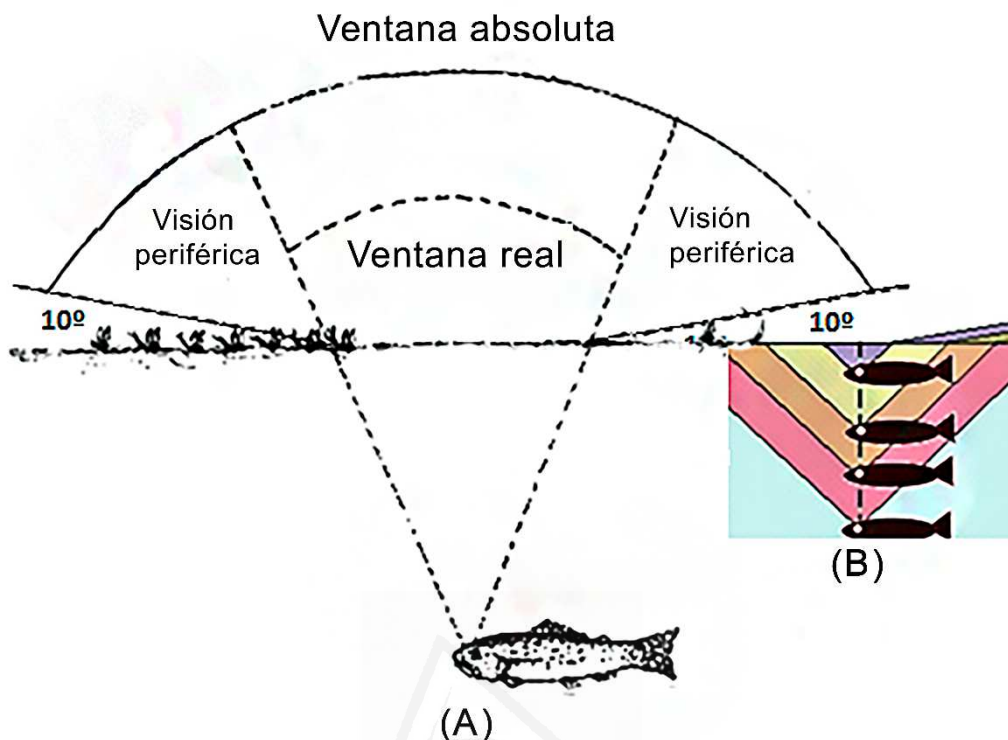


Figura 17: (A) Dibujo mostrando los ángulos de visión de un pez teleosteo. (B) Cambio en el tamaño de la ventana de Snell según la distancia que hay entre el pez y la superficie del agua.

El menor ángulo al cual un rayo de luz puede acarrear una imagen a través del agua es de 10 grados, ya que a un ángulo menor, la luz se refleja. Teóricamente, los teleosteos no pueden ver prácticamente nada de lo que sucede en ese ángulo de 10 grados (Figura 17-A).

7.1.2. Absorción y dispersión de luz en el agua:

La absorción de la luz solar incidente forma un espectro de absorción diferencial de los diferentes largos de onda que componen el espectro de la luz visible.

Las aguas puras y transparentes generalmente tienen un máximo de transmisión en la región 460nm y disminuye tanto para las longitudes de onda cortas como las largas (Loew y Mcfarnaland, 1990). Sin embargo, este máximo de transmisión puede variar con la cantidad de partículas suspendidas en el agua, las acumulaciones de fitoplancton y zooplancton que tienen un efecto de reducción de la zona iluminada, puesto que ellos mismos constituyen partículas que absorben la luz.

La intensidad de la luz disminuye también con la profundidad dependiendo de las propiedades ópticas del agua. En aguas claras con longitudes de onda de máxima transmisión la intensidad se reduce unas 0,8 unidades logarítmicas por cada 100 metros

de profundidad (Clarke y Denton, 1962), mientras que en aguas turbias, la disminución de la intensidad puede llegar hasta 10 unidades logarítmicas en una profundidad de 2 metros (Muntz, 1982). La proporción de la disminución depende del coeficiente de atenuación, que a su vez depende de las propiedades de absorción y dispersión del agua (Muntz, 1990).

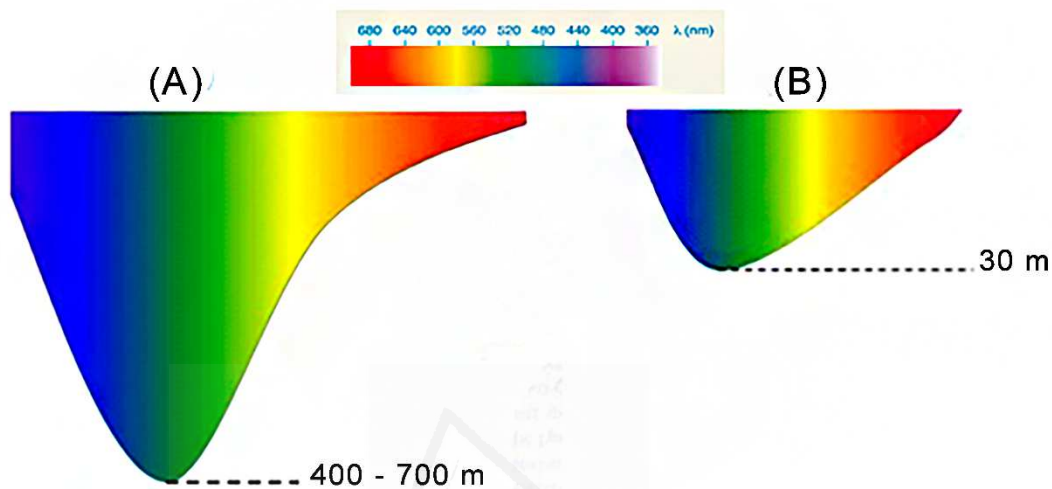


Figura 18: Transmisión de luz visible (A): en los océanos abiertos, (B): en lagos y ríos.

7.2. Visión monocular y visión binocular:

Para observar el entorno, los peces disponen de dos ojos de visión monocular (periférica), cuyo ángulo de visión es de aproximadamente unos 150 grados, esta visión monocular le proporciona una “idea” espacial de su medio, está especialmente diseñada para mejorar el contraste y la detección del movimiento (LeConte, 1897). Se trata pues, de la zona de detección de presas y predadores (Tamura y Wisby, 1963).

Generalmente, el pez depredador está dotado también de un buen ángulo de visión binocular (Tamura y Wisby, 1963). En la estrecha área en la que sus campos visuales se cruzan, que está situada en la parte frontal del pez, esta visión binocular le permite perseguir eficazmente a su presa (Figura 19).

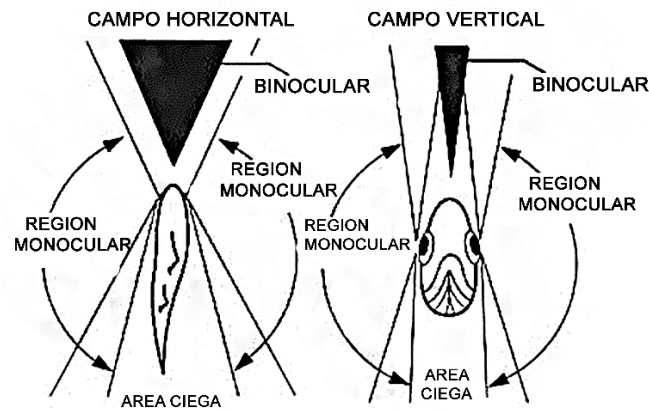


Figura 19: Vista dorsal (A) y ventral (B) del campo visual binocular y monocular de un pez, basado en la posición de los ojos.

8. Agudeza visual:

La agudeza visual o *visual acuity* (VA) es una medida de la capacidad del sistema visual para detectar, reconocer o resolver detalles espaciales. Se requiere tener una buena agudeza visual para percibir correctamente el objeto. Sin embargo, la eficacia visual no siempre está directamente relacionada con una agudeza visual perfecta (Voisin, Elliott y Regan, 1997). El sistema visual se adapta frente a estas carencias, es capaz de obtener por otros medios la información necesaria para actuar de manera adecuada.

El concepto de agudeza visual puede tener diferentes naturalezas. Se consideran al menos cuatro subcategorías (Whiting, 1969):

Agudeza visual de detección: que permite determinar si un objeto está presente en el campo visual.

Agudeza visual de reconocimiento: que permite conocer de qué objeto se trata.

Agudeza visual de resolución: que permite discriminar partes o contornos del objeto.

Agudeza visual de localización: que permite juzgar la posición de un objeto en el espacio.

Otra clasificación más común de la VA es la determinada por la situación dinámica del objeto. Hablamos, según esto, de:

La agudeza visual estática o *static visual acuity* (SVA): Está definida como la capacidad de detectar o reconocer las imágenes en detalle cuando, tanto el observador como el objeto, están en reposo (García et al., 1994).

La agudeza visual dinámica o *dynamic visual acuity* (DVA): permite la detección y el reconocimiento de objetos en movimiento, varía en función de la velocidad del desplazamiento y de la cantidad de luz.

La DVA es una habilidad visual que está estrechamente ligada con la SVA y el sistema oculomotor. Una mala SVA predice una mala DVA, pero no siempre una buena SVA va a ser predictiva de una buena DVA (Nakasuka et al., 2006; Fernández et al., 2007).

8.1. Factores que influyen en la agudeza visual:

Muchos son los factores que influyen en la VA (Collin y Pettigrew, 1989):

La iluminación: La VA es peor en condiciones extremas de iluminación. Esto es debido a que, en condiciones fotópicas actúan los conos, mientras que en condiciones escotópicas la función visual es guiada fundamentalmente por los bastones.

El contraste: la VA aumenta cuando existe una gran diferencia en el contraste entre la figura y el fondo (Casanova, Quevedo y Sinnet, 2005; Brown, 1972; Long y Garvey, 1988).

El tiempo de exposición del estímulo: A menor tiempo de exposición menor VA (Elkin, 1962; Miller, 1959).

Velocidad del desplazamiento del estímulo: La mayor efectividad se obtiene cuando se tiene algún sistema de referencia fijo dentro del campo visual. Si faltan dichos puntos de referencia, el movimiento se percibe con mayor dificultad, la evaluación del movimiento se retrasa (Ludvigh y Miller, 1958).

8.2. Estimación de la agudeza visual:

La información sobre la agudeza visual se suele calcular con un método teórico basándose en la distribución de las GCRs (Hughes, 1977), este método de estimación de la VA utiliza como parámetros, la distancia nodal posterior o *posterior nodal distance* (PND) que representa la distancia desde el centro del cristalino a la retina, el área de máxima densidad de las células ganglionares o “Dmax” que representa la máxima densidad de las células ganglionares sostenidas en un arco de grado visual. Dmax se

considera como la región de la retina de máxima VA, por lo tanto es la zona de la retina con mayor poder de resolución (Rolls y Cowey, 1970; Rodieck, 1973; Collin y Pettigrew, 1989).

El análisis cuantitativo y topográfico de las GCRs de la retina ha aportado información valiosa sobre las capacidades visuales de una variedad de especies de vertebrados e invertebrados, incluidos los teleósteos (Hironubo, 1984; Collin y Pettigrew, 1988a, b; 1989; Masakatsu, 2009), además parece existir una estrecha correlación entre la VA estimada a partir del estudio topográfico de las células ganglionares, la VA determinada por los estudios de comportamiento (Collin y Pettigrew, 1989).

Aparte de la estimación de la VA, otras de las ventajas del estudio de la distribución topográfica de las GCRs es comparar la especialización visual entre diferentes especies de teleósteos (Collin y Pettigrew, 1989; Collin y Pettigrew, 1996). Los diferentes estudios cuantitativos y topográficos de las GCRs, así como la VA, sugieren que la vista para los teleósteos juega un papel importante para su supervivencia, relacionándolos con el hábitat y el tipo de alimentación (Collin y Pettigrew, 1988; 1989).



II. RACIONAL

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Los peces teleósteos (Teleostei) o también llamados “peces óseos”, caracterizados fundamentalmente por su esqueleto óseo, forman el subgrupo más importante y extenso de todos los vertebrados, tanto por el número como por la variedad de especies que integra. Ocupan muy diversos ámbitos acuáticos de muchos aspectos diferentes, en cuanto a la salinidad, profundidad (0 a 9000 metros), temperatura (entre -18°C y $+40^{\circ}\text{C}$), claridad y color (Fernald, 1989).

Para que los peces teleósteos puedan lograr la colonización y dominio de tan diferentes ámbitos, han desarrollado variadas adaptaciones morfológicas y fisiológicas. Las más importantes son las del sistema visual, precisamente es a nivel de la retina donde se producen los cambios adaptativos más llamativos.

Dependiendo de las condiciones de luz/oscuridad, la retina de los teleósteos presenta unos cambios morfológicos llamados movimientos retinomotores, que consisten en la migración de los gránulos de melanina de las células del epitelio pigmentario, la elongación y contracción de las células fotorreceptoras (Ali, 1975; Burnside y Nagle, 1983; Navarro, 1988). Estos movimientos están presentes en otras especies de reptiles, aves, anfibios, pero en el caso de los teleósteos son más dramáticos.

En paralelo con los movimientos retinomotores, la retina de los teleósteos presenta otro cambio de carácter morfológico que se considera como característica propia y exclusiva de este grupo de peces: la plasticidad de las conexiones sinápticas de las células horizontales a nivel de los pedículos de los conos.

La plasticidad sináptica se manifiesta con la aparición/disrupción de unas estructuras llamadas “espínulas” (Wagner, 1980) durante la adaptación a la luz y a la oscuridad respectivamente. Estas estructuras se presentan en forma de unas expansiones digitiformes de un diámetro de $0,1\ \mu\text{m}$, y una longitud de $0,3\ \mu\text{m}$, proceden de las dendritas laterales de las células horizontales tipo H1 y H2 (Wagner y Speck, 1983), se invaginan profundamente en los pedículos de los conos (Wagner y Douglas, 1983; De Juan y Dowling, 1987).

Además de las espínulas, las células horizontales de los teleósteos presentan unas inclusiones citoplasmáticas llamadas nematosomas, de un tamaño (entre $0,3$ y $1,4\ \mu\text{m}$) que son más numerosas y de mayor tamaño en las retinas adaptadas a la oscuridad, número y tamaño que se reduce cuando hay un aumento en el número de espínulas, durante la adaptación a la luz. Esto sugiere una relación inversa entre ambas estructuras (De Juan y Dowling, 1987; De Juan et al., 1991 y 1996; De Juan y García, 1998).

El papel biológico desempeñado por las espínulas a nivel retiniano sigue siendo un interrogante. Muchos son los estudios que han correlacionado el número de espínulas con la respuesta bifásica de las células horizontales (Weiler y Wagner, 1984; Djamgoz et al., 1985 y 1988) y con la oponencia al color en las células ganglionares (McNichol et al., 1960; Raynauld et al., 1979), les han considerado como terminales presinápticas responsables de la retroalimentación negativa de las células horizontales sobre los conos (Kirsch et al., 1990; Wagner, 1993). Sin embargo, hay otros autores (De Juan et al., 1996) que ponen en cuestión su participación en la oponencia al color y la agudeza visual (Yazula...). Por lo cual, las espínulas y sus funciones a nivel de la retina constituyen un importante tema de investigación.

Todo lo citado anteriormente, nos permitió plantear las hipótesis del apartado siguiente, lo que justifica la realización de esta tesis.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



III. HIPÓTESIS / OBJETIVOS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

HIPÓTESIS

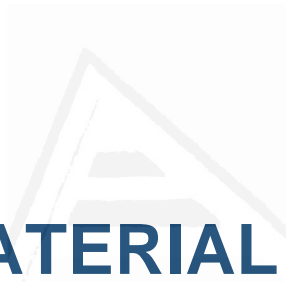
Basándonos en los antecedentes comentados en el apartado anterior y especialmente en la bibliografía más relevante, planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- Es de esperar que las células ganglionares retinianas de las dos especies estudiadas, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, se distribuyan, al igual que el resto de los peces teleósteos, en zonas de máxima densidad.
- Es de esperar que el número de espínulas por pedículo del cono sea más elevado en *Dicentrarchus labrax* que en *Sparus aurata*, ya que el primero es el más piscívoro.
- La distribución de las espínulas debe seguir un patrón que correlacione con el comportamiento depredador del pez teleósteo, siendo su densidad alta en las zonas con menor poder de resolución, estando su distribución relacionada con su conducta trófica.
- Si esta última hipótesis se confirma, las espínulas podrían ser consideradas como unos “sensores biológicos” para la visión de los teleósteos en la zona de la retina con menos agudeza visual.

OBJETIVOS

Los principales objetivos de esta tesis han sido los siguientes:

- Realizar un estudio cuantitativo de la densidad de las células ganglionares retinianas (GCRs) de dos especies diferentes de teleósteos: *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*.
- Estudiar la distribución espacial de la población de las GCRs con el fin de estimar la agudeza visual de las dos especies estudiadas.
- Estudiar la distribución y la densidad de las espínulas observadas en los pedículos de los conos en la retina de estas dos especies y compararlas con las de las GCRs.
- Relacionar la agudeza visual y el comportamiento predatorio de cada especie estudiada con la distribución de las espínulas.
- Finalmente, discutir sobre el papel desempeñado por estas espínulas a nivel de la retina de los teleósteos para establecer las correspondientes conclusiones.



III. MATERIAL Y MÉTODOS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Todos los protocolos de mantenimiento, manipulación y sacrificio de los animales se llevaron a cabo cumpliendo las directrices del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC y 2003/65/EC) y de la legislación española (RD 1201/2005 de 10 de octubre, BOE de 21 de octubre de 2005) vigentes para el uso y cuidado de animales en experimentación.

1. preparación y procesamiento de las muestras:

1.1. Animales de estudio:

Para realizar nuestro estudio hemos utilizado dos especies diferentes de teleósteos adultos: *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*. Los ejemplares utilizados eran de un peso medio de 80 gr y una talla de 25 – 35 cm de longitud total.

Todos los peces procedían del Centro Oceanográfico de Mazarrón (Murcia, España).

1.2. Preparación de los peces de estudio:

Antes de iniciar el procedimiento de la extracción de las retinas, se han determinado dos grupos de experimentación:

- Un grupo de peces adaptados a la luz, lo que nos permitió visualizar y estudiar las espínulas que se forman solo y únicamente durante la adaptación a la luz.
- Un grupo de peces adaptados a la oscuridad (≥ 3 horas en oscuridad absoluta): Por un lado, la adaptación de los ojos a oscuridad facilita del despegamiento de la retina del PE, lo que nos permitió visualizar y estudiar las GCs teñidas con el método de Nissl bajo microscopio óptico. Por otro lado, este grupo ha sido usado como control para el estudio del desarrollo de las espínulas y cintillas sinápticas.

Para que las retinas permanecieran en las mismas condiciones de oscuridad, se utilizó la luz roja de baja intensidad durante su extracción y manipulación.

1.3. Procedimiento general de extracción de las retinas:

Para aislar las retinas necesarias para el trabajo, los peces fueron anestesiados por inmersión en recipiente con agua marina que contenía aceite de clavo (30 mg/L). Los animales fueron después sacrificados mediante decapitación, el globo ocular fue separado detenidamente de la órbita, cortando con unas finas tijeras el tejido conjuntivo de la cavidad ocular y todos los músculos extrínsecos del ojo hasta llegar al nervio óptico. Los ojos fueron después hemiseccionados sobre papel de filtro, se eliminó la

porción anterior de los ojos que incluye córnea e iris, la parte posterior del ojo que contiene la retina se marcó con un corte en la parte dorsal (superior) para no perder la orientación, se procedió inmediatamente la extracción de la retina.

El procedimiento para sacar la retina de la parte posterior del ojo fue similar al descrito por Stone, (1981). Primero se separó el cristalino, luego se eliminó la mayor parte del humor vítreo usando papel filtro y pinzas. Quitar el cuerpo vítreo en esta etapa es una ventaja, porque su eliminación nos permite ver con claridad el borde de la retina (Figura 20-A). Una vez el borde está identificado, pasamos a la extracción (Figura 20-B).

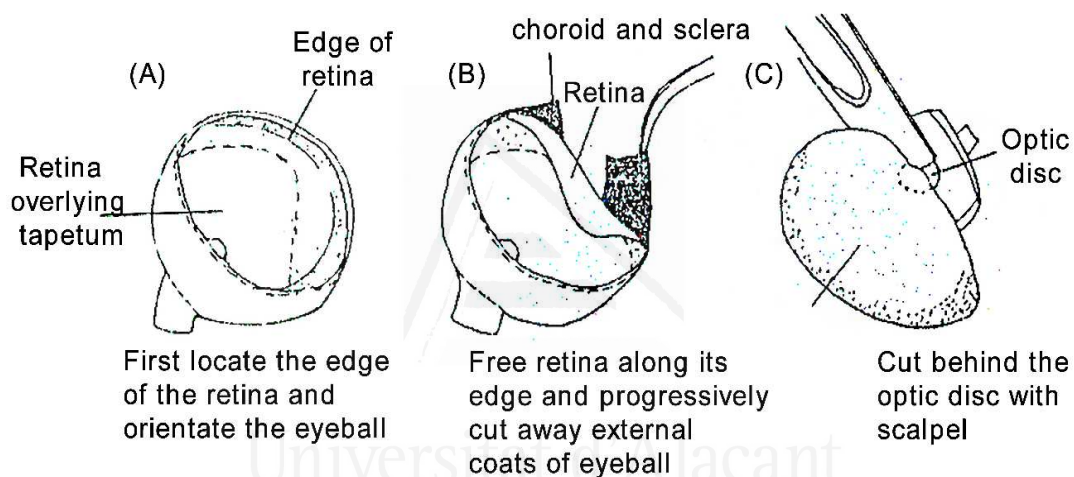


Figura 20: Método usado para la extracción de la retina de la parte posterior del globo ocular (Stone, 1981).

Trabajando bajo solución salina, en un punto del borde de la retina se introdujeron cuidadosamente unas tijeras quirúrgicas muy finas entre el PE retiniano y la coroides. A continuación, con mucho cuidado, con la ayuda de las mismas tijeras, la retina fue separada progresivamente a lo largo de todo el borde. La separación se extendió hasta llegar al nervio óptico que fue cortado y la retina extraída totalmente del globo ocular (Figura 20-C).

Después de su extracción, la retina fue colocada en una placa Petri, se limpió de todos los restos de la esclera y la coroides que quedaron pegados alrededor del nervio óptico.

En el caso de los peces que fueron adaptados a la oscuridad, el PE se separó fácilmente de las retina con la ayuda de un pincel de pelo de marta número 2.

Tras la extracción, las retinas fueron inmediatamente fijadas por inmersión en las siguientes soluciones:

- Solución de paraformaldehído al 1%; glutaraldehído al 1,26% y cloruro de calcio al 0,02% en PB (0,1M; pH 7,4), durante toda la noche a 4°C si se iban a emplear para su estudio con microscopia electrónica.
- Solución de paraformaldehído al 4% en PB (0,1M; pH 7,4) durante 2 horas, si se iban a emplear para su estudio a microscopia óptica.

1.4. Aplanamiento de la retina :

Sobre un portaobjeto no gelatinizado, se hicieron con un bisturí pequeños cortes radiales en los bordes de la retina (Cleland y Levick, 1975; Stone, 1981) (Figura 21-A), siendo más profundo el de la zona dorsal para no perder la orientación.

Una vez que los cortes están hechos, se usó un trozo de papel de filtro para extender mejor la retina y para eliminar de nuevo todo lo que quedó del humor vítreo.

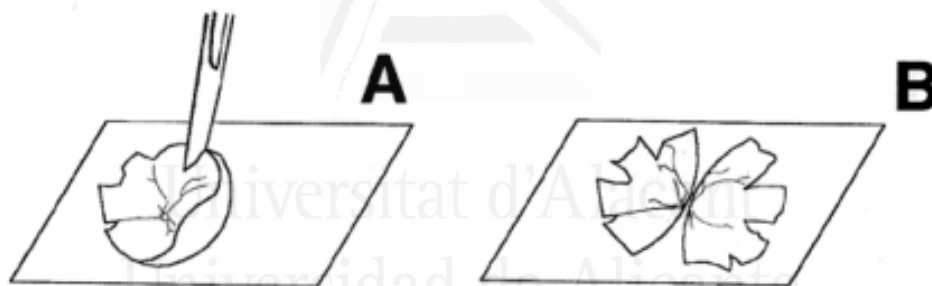


Figura 21: Método usado para extender la retina, (A) cortes radiales periféricos con un bisturí (B) retina bien plana sobre un porta.

2. Estudio morfométrico de las espínulas y las cintillas sinápticas:

2.1. Muestra de estudio:

Para este estudio hemos utilizado siete retinas en total, Cuatro de ellas eran de lubinas adaptadas a la luz, de las cuales tres de ellas se dividieron en cuatro cuadrantes: nasal, temporal, ventral y dorsal, de cada cuadrante se seleccionaron dos áreas representativas de la zona periférica y central para luego ser incluidas en resina EPON 812, observadas al microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Figura 22). La cuarta retina se utilizó para amplificar el estudio de la densidad de las espínulas entre las

áreas periféricas previamente estudiadas en las tres primeras retinas (Figura 22). Dos retinas de dorada adaptadas a la luz fueron procesadas de la misma manera que las tres primeras retinas de lubina. Finalmente, una retina de lubina adaptada a la oscuridad se usó como control.

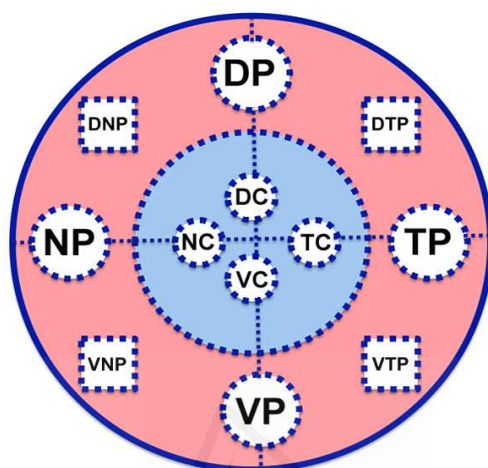


Figura 22: Representación esquemática que ilustra las diferentes áreas de la retina utilizadas para cuantificación de la densidad de las espínulas y cintillas sinápticas. Los círculos punteados, corresponden a las tres primeras retinas de lubina y a las dos retinas de dorada. Los cuadrados punteados, corresponden a la cuarta retina de lubina. El anillo de color rosa representa a la retina periférica y el círculo azul a la zona central de la retina. DC: Dorso-central; DP: Dorso-periférico; VC: Ventro-central; VP: Ventro-periférico; TC: Temporo-central; TP: Temporo-periférico; NC: Naso-central; NP: Naso-periférico; DNP: Dorso-nasal periférico; VNP: Ventro-nasal periférico, VTP: Ventro-temporal periférico and DTP: Dorso-temporal periférico.

Universidad de Alicante

Las siete retinas utilizadas para el TEM habían sido fijadas en una mezcla de paraformaldehído/glutaraldehído como se ha comentado anteriormente, fueron lavadas tres veces en PB 0,1M pH 7,5 durante 10 minutos y aplanadas siguiendo los mismos pasos explicados en el apartado anterior.

Una vez aplanadas las retinas, se seleccionaron las zonas de interés (Figura 22) y se procedió a la inclusión de las piezas.

2.2. Fijación e Inclusión en resina EPON 812:

Las piezas representativas de diferentes regiones de la retina se sometieron a una postfijación con tetróxido de osmio al 2% en PB 0,1M por una hora. Tras la

postfijación, las piezas se deshidrataron en una serie de baños de etanol de concentraciones crecientes hasta llegar a etanol absoluto.

La inclusión en EPON se realizó tras dos pasos intermedios de 15 minutos en óxido de 1,2-propileno, seguido por dos cambios sucesivos en cada una de las siguientes diluciones 1:1 y 3:1 en volumen de EPON 812 y óxido de 1,2-propileno manteniendo en el último paso los tubos en los que se realizaba la inclusión abiertos con el fin de que el óxido de 1,2-propileno se evapora lentamente durante toda la noche y favoreciese la correcta impregnación de las muestras. Por último, las muestras se colocaron en moldes de plástico, que después se rellenaron de EPON y se dejó polimerizar en una estufa a 60°C durante 24 horas.

Después de la polimerización, se tallaron los bloques, se cortaron en cortes semifinos de 1 µm de espesor utilizando el ultramicrotomo Leica Ultracut UCT®. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina al 0,5%, se observaron con el microscopio óptico (Leica DMRB).

Tras su visualización al microscopio óptico, se seleccionaron las regiones mejor orientadas de la retina para su posterior observación al TEM (JEOL modelo JEM-2010). Se identificaron los campos de interés en los bloques, utilizando el mismo ultramicrotomo se realizaron cortes ultrafinos de unos 70nm de grosor. Las secciones ultrafinas fueron después recogidas sobre rejillas de cobre, contrastadas con citrato de plomo.

3. El estudio cuantitativo y topográfico de las células ganglionares:

3.1. Tinción de Nissl con violeta de cresilo:

Para el estudio de la distribución y densidad de las células ganglionares, tres retinas de lubina y dos de dorada adaptadas a la oscuridad y fijadas en paraformaldehído al 4% en PB (0,1M; pH 7,4) durante 2 horas, se lavaron 3 veces durante 10 minutos en PB 0,1M, se montaron en plano sobre un portaobjeto gelatinizado con la capa de las células ganglionares hacia arriba, se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente para una mejor adhesión al porta.

El día siguiente, las preparaciones se lavaron con agua destilada, fueron teñidas por el método de Nissl usando el violeta de cresilo caliente al 0,5% durante 5 minutos, deshidratadas con etanol y montadas con medio de montaje Entellan® (Tabla 2).

Tabla 2: Protocolo básico usado en este trabajo para la tinción de las células ganglionares retinianas con violeta de Cresilo:

Etapa	Bandeja de tinción	Tiempo	Propósito
1	Agua destilada	2 min	rehidratación
2	Violeta de cresilo al 0,5%	5 min	Colorante
3	Agua destilada	Enjuague rápido	rehidratación
4	Etanol al 20%	30 s	deshidratación
5	Etanol al 70%	30 s	deshidratación
6	Etanol al 90%	30 s	deshidratación
7	Solución de diferenciación ¹	1 min ²	Diferenciación
8	Etanol al 100%	1 min	deshidratación
9	Etanol al 100%	1 min	deshidratación
10	Xileno al 100%	2 min	Agente aclarante
11	Xileno al 100%	2 min	Agente aclarante

¹ un ml de ácido acético glacial en 900ml de etanol 96°.

² La calidad de la tinción depende del tiempo de diferenciación, comprobar el proceso con el microscopio.

3.2. Observación de las preparaciones al microscopio óptico: captura de las imágenes y cálculo de la densidad de las células:

Para el estudio de las preparaciones teñidas con el método de Nissl, se empleó el microscopio óptico citado anteriormente y se obtuvieron fotografías con la cámara fotográfica Infinity 1 acoplada a este microscopio (Figura 23).

Se exploró la retina entera fotografiando cada campo con el objetivo (40x) que nos permitió identificar mejor las células ganglionares, se tomaron 7340 fotografías para la retina RL1, 6692 para la retina RL2, 5192 para la retina RL3, 7884 para la retina RD1 y 7115 para la retina RD2, un total de 34.223 fotografías, el área de los campos fotografiados fue determinada usando un micrómetro de objetos E. LEITZ G. M. b. H. WETZLAR.

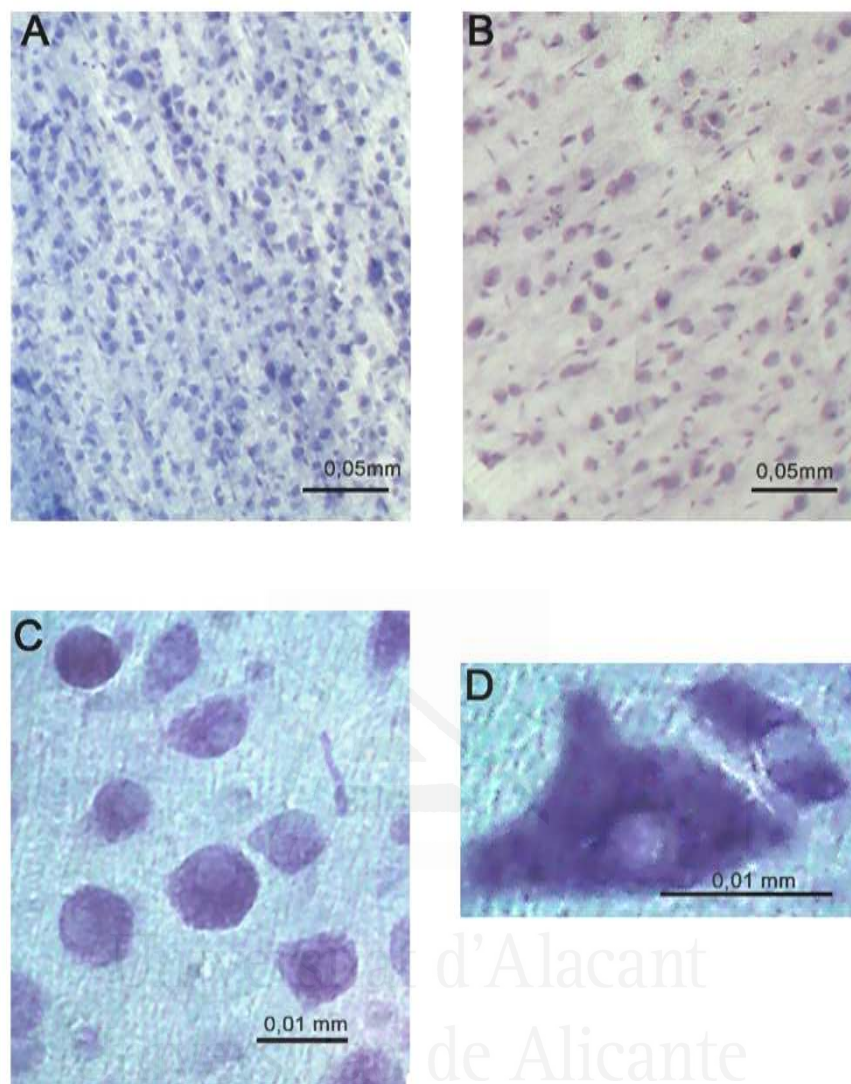


Figura 23: Imágenes de la capa de células ganglionares capturadas con el microscopio Leica DMRB con diferentes aumentos, (A) área de alta densidad celular (x40); (B) área de baja densidad celular (x40); (C) células ganglionares de diferente tamaño (x65); (D) imagen mostrando dos células ganglionares de diferente tamaño (x100)

Para hallar la densidad de las células ganglionares, se pasaron todas las fotografías al programa Adobe® Photoshop® CC versión 14 y con la herramienta recuento se contó manualmente el número de las células ganglionares en cada campo.

La retina fue después dibujada sobre un papel milimétrico con todos los detalles posibles (bordes, nervio óptico,...), el recuento de las células ganglionares fue después registrado sobre el citado dibujo de la retina. Cada número de células contado se registró en el campo que le corresponde (Figura 24).

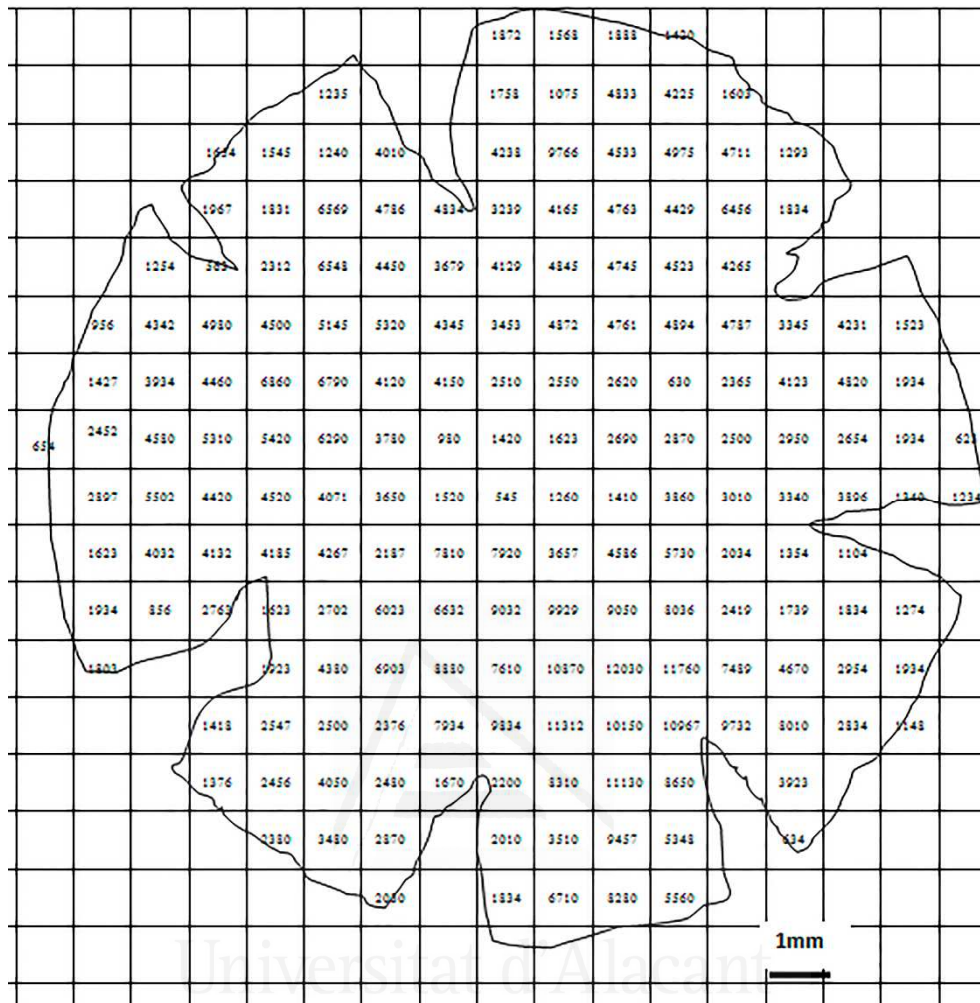


Figura 24: Esquema de una retina del ojo derecho completamente montada. Cada número representa el número de células ganglionares en un área de 1mm².

Todo éste trabajó se hizo para facilitar luego el tratamiento de los resultados. Los datos obtenidos de la densidad de las GCRs se exportaban a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2013) y finalmente, estos datos se representaron en unas gráficas de mapas de isodensidad usando el programa estadístico de representación gráfica SigmaPlot® 11.0 para Windows® (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EE.UU).

Hay que señalar que en los estudios de la distribución de las GCRs es muy importante la orientación correcta de la retina, ya que si no, obtendremos datos erróneos.

3.3. Patrones de distribución de las células ganglionares:

Con el fin de determinar el patrón de distribución de las GCRs. Se obtuvieron muestras de diferentes regiones periféricas y centrales de dos retinas de lubina y una retina de dorada (Figura 25), 24 muestras en total, de un tamaño de 0,026 mm².

Para todas las muestras y con la ayuda del software *Image J* Version 1.49, se calculó para cada célula la distancia mínima que la separa de su vecino más próximo “Nearest neighbor distance” y se exportaban los datos a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2013).

Con lo anterior, se dibujó para cada muestra con el software XLSTAT® versión 2015.4.01 para Windows® el histograma asociado a dichos datos y las funciones de densidad de la distribución de Poisson y distribución Normal que aproxima estos datos. Para dibujar la distribución de Poisson, el parámetro λ usado es justamente la media muestral del vector de datos, para dibujar la distribución normal usamos como media μ y desviación típica σ , la media muestral y desviación típica de la muestra.

Para ampliar los análisis espaciales de los datos, hemos utilizado el programa arcGIS® 10.3.1 que proporciona varios datos: Distancia media observada, Distancia media esperada, índice de vecino más próximo, puntuación Z y valor P.

Los resultados de la puntuación Z y el valor P son medidas de significancia estadística que indican si se debe rechazar o no la hipótesis nula. Para determinar el promedio de la distancia al vecino más cercano, la hipótesis nula establece que las entidades se distribuyen de forma aleatoria.

El índice del vecino más próximo se expresa como la relación entre la distancia media observada y la distancia media esperada. La distancia esperada es la distancia promedio que hay entre vecinos en una distribución hipotética aleatoria. Si el índice es menor que 1, el patrón exhibe clustering y si el índice es mayor que 1, la tendencia es la dispersión.

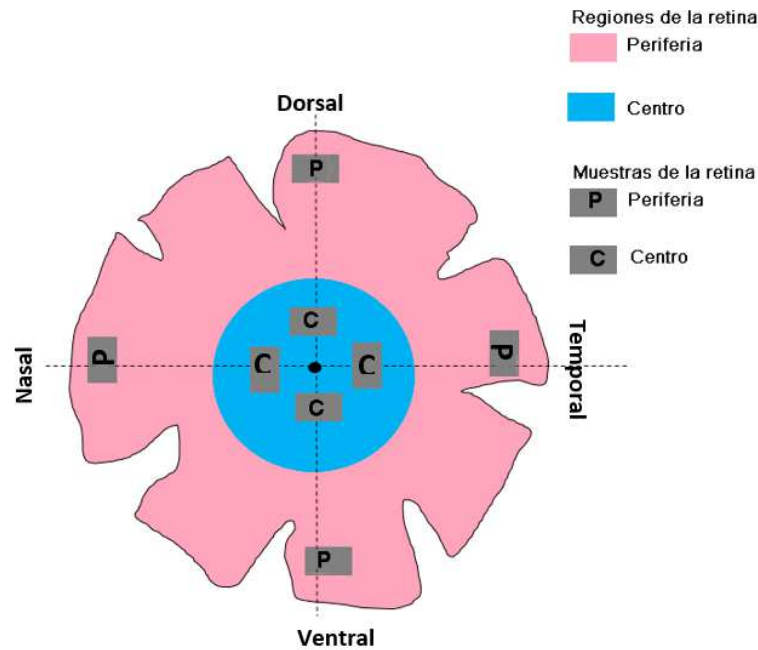


Figura 25: Representación esquemática del muestreo usado para el estudio del patrón de distribución de las GCRs en función de dos regiones: centro y periferia de cada zona: dorsal-temporal-ventral y nasal.

4. Determinación de los parámetros ópticos del globo ocular de las especies estudiadas:

Todos los globos oculares extraídos de su órbita para realizar los experimentos anteriormente citados se dividieron por la mitad según un plano sagital (Figura 26), lo que nos permitió calcular la PND y el diámetro del cristalino, dos parámetros esenciales para el cálculo de la razón de Matthiessen (RM) y por lo tanto para la estimación de la VA.

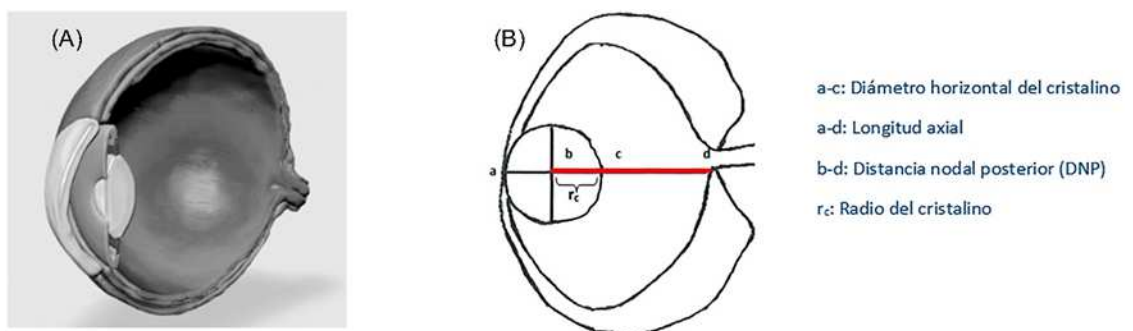


Figura 26: (A) Dibujo en 3D mostrando el corte sagital del globo ocular, (B) Esquema que representa las principales medidas ópticas obtenidas sobre el corte sagital del ojo.

La razón de Matthiessen tiene un valor constante para una misma especie y por lo tanto, una vez calculada se puede usar para determinar la PND de los ojos a partir del valor del radio del cristalino (r_c).

Muchos autores consideran que la razón de Matthiessen en los peces teleósteos es aproximadamente igual a 2,55 (Munz, 1971) y usan en sus trabajos ese valor para la estimación de la VA.

5. Estimación de la agudeza visual:

La VA se calculó obteniendo el número de las células ganglionares máximo sostenidas en un grado de arco visual (Collin y Pettigrew, 1989).

Se determinó primero la distancia nodal posterior multiplicando el radio del cristalino (mm) por la razón de Matthiessen:

$$DNP = RM \times r_c$$

Una vez calculada la distancia PND, se determinó el ángulo α que sostiene 1mm de retina, siendo:

$$Tg \alpha = 1mm/DNP$$

$$\alpha = arctg 1/DNP$$

La VA se expresó finalmente en ciclos por grado de retina (ciclos/grado), siendo:

$$ciclos/grado = \frac{1}{2} \times \frac{\sqrt{D_{max}}}{\alpha}$$

El poder de la resolución o la VA también se puede expresar en minutos de arco (´arco):

$$´arco = \alpha \times 60 \times \frac{1}{\sqrt{D_{max}}}$$

6. Análisis estadístico:

Los análisis estadístico se realizaron con el programa IBM[®] SPSS Statistics para Windows[®] versión 22 y el programa XLSTAT[®] 2015, las diferencias entre grupos analizados se consideraron estadísticamente significativas para $p \leq 0,05$.

Para comparar los datos cuantitativos del número total de las GCRs entre diferentes retinas y entre las dos especies estudiadas, se utilizó el test t-student.

Para comparaciones múltiples entre grupos se aplicó el análisis de la varianza ANOVA con el fin de identificar diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, seguido del test del Dunnett, el intervalo de confianza usado en nuestro análisis estadístico es el 95 %.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



IV. RESULTADOS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Medidas ópticas:

Como hemos explicado en el apartado material y métodos, a partir de cortes sagitales del globo ocular se tomaron todas las medidas internas que nos han permitido calcular la agudeza visual de los ojos analizados. Las medidas internas calculadas son las recojidas en la (Tabla 3):

Tabla 3: Medidas ópticas internas de los globos oculares de *Dicentrarchus Labrax* y *Sparus aurata*.

Lubina	Diámetro de la lente (mm)	DNP(mm)	Razón de Matthiessen
RL1	5,5	7	2,54
RL2	6	7,5	2,5
RL3	5,2	6,8	2,61
$\bar{X} \pm DE$	5,57±0,40	7,1±0,36	2,55±0,06
RD1	5,5	7,6	2,76
RD2	5,1	7	2,74
$\bar{X} \pm DE$	5,30±0,28	7,30±0,42	2,75±0,01

Según los resultados obtenidos, la RM para *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* es de **2,55± 0,06** y **2,75± 0,01** respectivamente.

2. Distribución espacial de las células ganglionares:

La distribución espacial de las células ganglionares en las cinco retinas fue estudiada y analizada con la construcción de mapas de isodensidad usando el Software (SigmaPlot® 11.0 para Windows®, Systat, Inc., Richmond, CA, USA).

El mapa de isodensidad se basa en la densidad de las CGRs contados manualmente en cada mm² usando el programa Adobe® Photoshop® CC versión 14. En total se contaron unas 3.090.230 células, según su valor se le asignó un color dentro de una escala que comprende un rango de valores que va desde 0 hasta 12000 células/mm² para la retina RL1, desde 0 hasta 14000 células/mm² para las retinas RL2 y RL3, desde 0 hasta 11000 células/mm² para la retina RD1, finalmente desde 0 hasta 13000 células/mm² para la retina RD2.

Estos mapas de isodensidad ilustran gráficamente en qué áreas de la retina existen mayores o menores densidades de las células ganglionares (Figura 27).

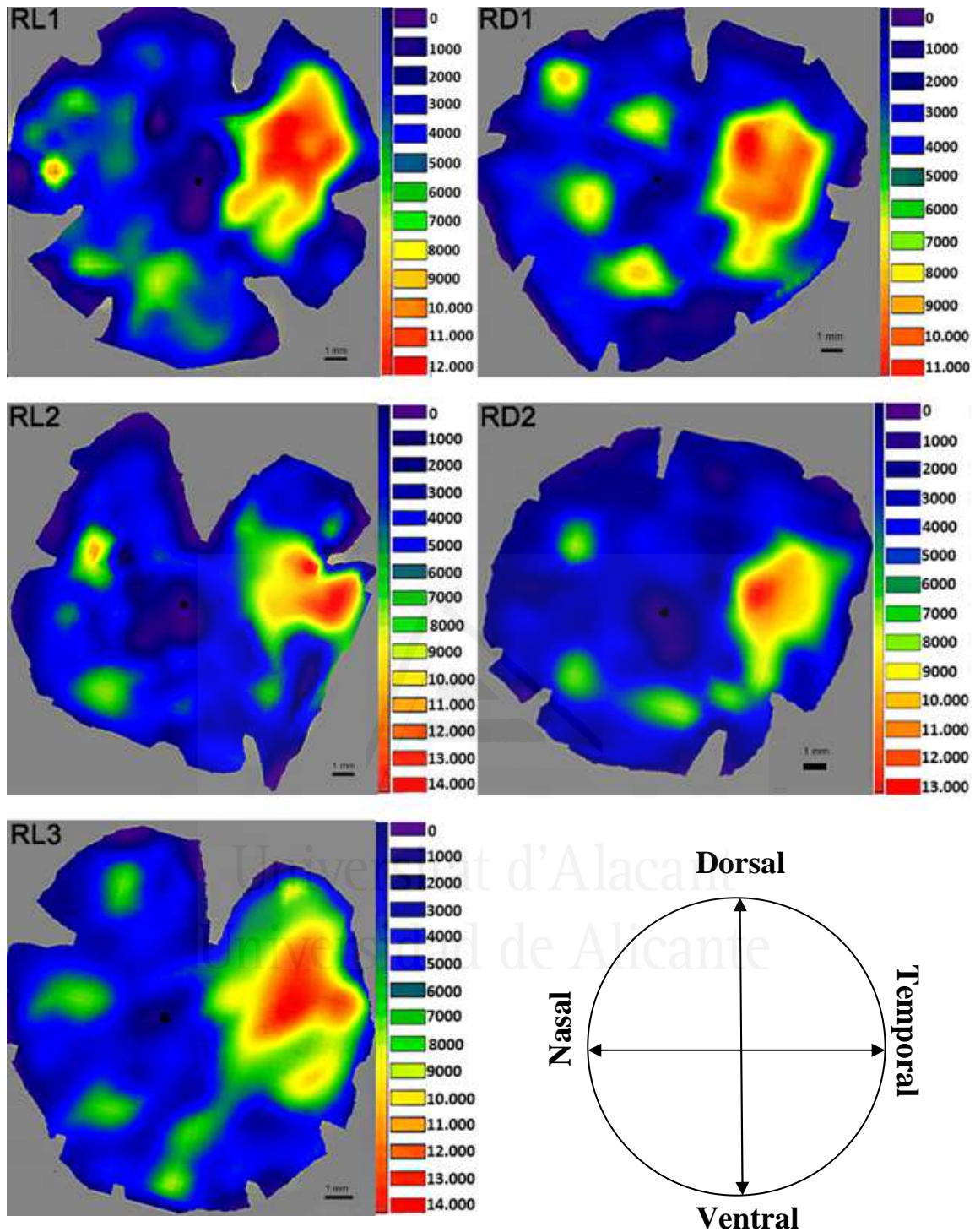


Figura 27: Mapas de isodensidad de cinco retinas derechas, tres de lubina (RL1, RL2 y RL3) y dos de dorada (RD1 y RD2). El esquema que se encuentra abajo a la derecha muestra la orientación en las cinco retinas. Estos mapas fueron generados en una escala de color, donde los colores fríos (lila-azul) corresponden a las zonas de menor densidad, y los colores cálidos (rojo-granate) a las zonas de mayor densidad. Podemos observar que en las cinco retinas, las GCRs se distribuyen en áreas de máxima densidad que se localizan en la zona Temporal. Barra 1mm

El objetivo de la construcción de los mapas de isodensidad fue estudiar la distribución topográfica de las GCRs en las cinco retinas de teleósteos e identificar las áreas de máxima densidad, por lo tanto las zonas de máxima agudeza visual.

En los mapas de distribución de las GCRs podemos observar que el mayor número de GCs en las retinas de lubina, RL1, RL2 y RL3 se encuentra concretamente en la zona temporal extendiéndose hacia la zona dorsal, con un pico máximo de 12.030 células/mm² a unos 4 mm de la periferia temporal para la retina RL1, 13.150 células/mm² a unos 2 mm de la periferia temporal para la retina RL2, 13.945 células/mm² a unos 3 mm de la periferia temporal para retina RL3.

Para las dos retinas de dorada RD1 y RD2, podemos observar que la zona de máxima densidad en las dos retinas también es la zona temporal, con un pico máximo de 10.276 células/mm² y 12.789 células/mm² respectivamente, ese pico de máxima densidad se encuentra en las dos retinas a una distancia de 4 mm de la periferia temporal.

El área de cada retina, así como el número total de las células ganglionares y los picos de máxima densidad se resumen en la tabla siguiente (Tabla 4):

Tabla 4: Resume todos los datos recogidos del área, número total estimado de las GCs, los Dmax de las retinas de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*.

retinas	Superficie de la retina (mm ²)	Nº total de las células ganglionares contadas	Dmax (células/mm ²)	Posición de la zona con (Dmax)	\bar{X} de las GCRs
RL1	191	707.815	12.030	Temporal- dorsal	683.527±44.034
RL2	174	710.070	13.150	Temporal- dorsal	
RL3	135	632.697	13.945	Temporal- dorsal	
RD1	205	536.594	10.276	Temporal	519.824± 23716
RD2	185	503.054	12.789	Temporal	

Para determinar si hay diferencia en el número total de las células ganglionares entre las diferentes retinas, se compararon primero las retinas de la misma especie entre si y después las diferencias existentes entre las retinas de ambas especies.

Al comparar entre el número total de las GCRs en las tres retinas de lubina RL1, RL2 y RL3, según el test de t-student, puesto que $t_2=26,88$; $p= 0,01$ podemos decir que

existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número total de las GCRs obtenido en las tres retinas.

Al comparar entre el número total de las GCRs en las dos retinas de dorada RD1 y RD2, según el test t-student, $t_1 = 30,99$; $p = 0,021$ y por lo tanto existen diferencias significativas entre las dos retinas de dorada.

La media del número total de las GCRs en lubina fue de 683.527 ($n=3$) y es de 24% mayor que la media del número total de las GCRs en dorada ($n=2$). Sin embargo, no existe diferencia significativa entre ambas especies puesto que $t_1 = 7,35$; $p = 0,086$.

3. Estimación de la agudeza visual:

A partir de los picos de máxima densidad de las células ganglionares obtenidos para cada retina se calculó la agudeza visual de acuerdo con el método seguido por Collin y Pettigrew, (1989) citado anteriormente.

Ejemplo para la retina RL1:

RL1 es la retina de la especie *Dicentrarchus labrax*, la razón de Matthiessen calculada para esta especie es igual a $2,55 \pm 0,06$ y el radio del cristalino es igual a 2,75 mm. A partir de la RM podemos calcular la distancia nodal posterior:

$$\text{PND} = \text{RM} \times r_c$$

$$\text{PND} = 2,55 \times 2,75$$

$$\text{PND} = 7,0125 \text{ mm}$$

A partir del PND podemos calcular el ángulo α que sostiene 1 mm de retina, siendo:

$$\alpha = \arctg \frac{1}{7,0125}$$

$$\alpha = \arctg \frac{1}{\text{PND}}$$

$$\alpha = 8,11^\circ$$

El pico de máxima densidad de las células ganglionares calculado para esta retina es de: $D_{\text{max}} = 12.030$ células / mm^2 , por lo tanto la agudeza visual en ciclos por grado de la retina es igual a:

$$\frac{\text{ciclos}}{\text{grado}} = \frac{1}{2} \times (\sqrt{D_{max}})/\alpha$$

$$\frac{\text{ciclos}}{\text{grado}} = \frac{1}{2} \times \frac{\sqrt{12.030}}{8,11}$$

$$\frac{\text{ciclos}}{\text{grado}} = 6,76$$

Y como ya hemos dicho, la VA se puede expresar también en minutos de arco, aunque la manera más usada para su expresión por diferentes autores es en (ciclos / grado):

$$\text{'arco} = \alpha \times 60 \times 1/(\sqrt{D_{max}})$$

$$\text{'arco} = 8,11 \times 60 \times \frac{1}{\sqrt{12.030}}$$

$$\text{'arco} = 4,43$$

La tabla 5 recoge los resultados obtenidos de la agudeza visual de cada una de las retinas para las dos especies estudiadas, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* respectivamente.

Tabla 5: Resume los datos obtenidos de las medidas ópticas para *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*.

	Radio del cristalino (r_c) (mm)	DNP (mm)	Angulo α (en grado)	Dmax (células/mm ²)	AV (ciclos/grado)	AV (´arco)
RL1	2,75	7	8,11	12.030	6,76	4,43
RL2	3	7,5	7,59	13.150	7,55	3,97
RL3	2,6	6,8	8,36	13.945	7,06	4,24
RD1	2,75	7,6	7,49	10.276	6,76	4,43
RD2	2,85	8	7,12	12.789	7,94	3,77

A partir de los datos de la tabla anterior podemos deducir que la VA para *Dicentrarchus labrax* es de aproximadamente $7,12 \pm 0,29$ ciclos por grado y para *Sparus aurata* es de $7,35 \pm 0,59$ ciclos por grado.

4. Patrón de distribución de las células ganglionares por diferentes cuadrantes de la retina:

Con el fin de determinar si la distribución de las células ganglionares en las retinas aplanadas es una distribución aleatoria o sigue algún patrón de distribución espacial determinado, se dividió la retina en cuatro cuadrantes: nasal, dorsal, ventral y temporal, se estudió el patrón de distribución de las GCRs de la zona periférica y central de cada cuadrante (Figura 28).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

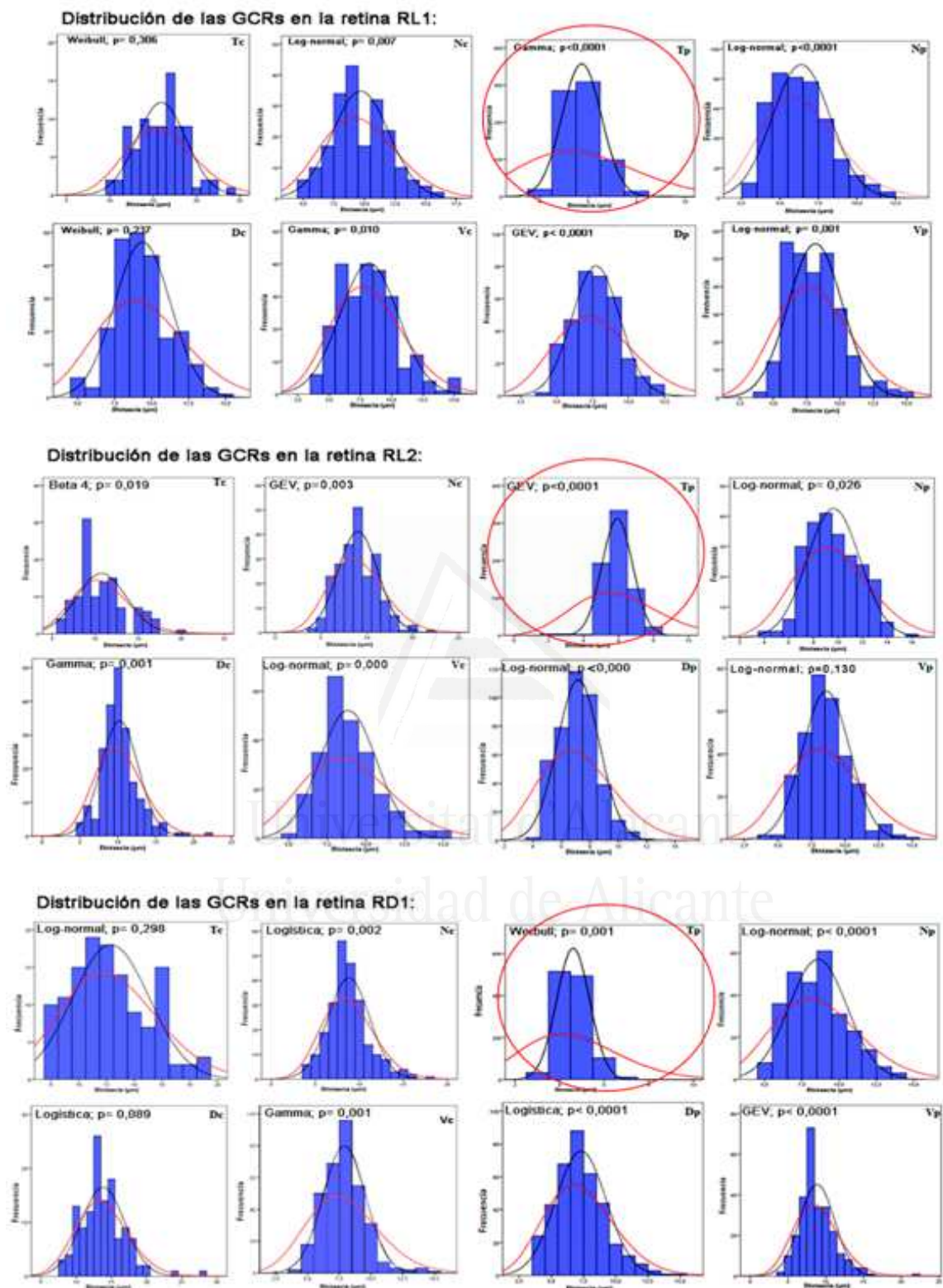


Figura 28: análisis de distancia del vecino más próximo (NND) de las células ganglionares en dos retinas de *Dicentrarchus labrax* (RL1-RL2) y una retina de *Sparus aurata* (RD1).

Se menciona arriba de cada histograma la distribución que se ajusta mejor a los datos para la prueba de bondad de ajuste dada por el programa XLSTAT[®] 2015 con su p-valor.

Los histogramas rodeados con un círculo rojo representan las zonas de alta densidad de células ganglionares, se observa que los histogramas son más anchos para estas zonas, lo que se puede interpretar con un mayor número de células ganglionares con menor distancia entre ellas que en el resto de las zonas de la retina.

Los servicios estadísticos del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia nos ayudaron para obtener los siguientes resultados del contraste K-S para comparar la distribución de las GCRs con la distribución Normal y la de Poisson en diferentes zonas periféricas y centrales de las tres retinas (Ver Anexo 1).

El hecho de que los resultados obtenidos con el test K-S son ambivalentes y no permiten determinar con certeza el patrón de distribución de las GCRs, hemos ampliado el estudio estadístico con el programa arcGIS[®] 10.3.1. La tabla 6 resume todos los resultados obtenidos del promedio del vecino más próximo o *Average Neighbour Summary* (ANS) y un ejemplo de los resultados obtenidos se representa en la figura 29.

Según la figura 29, dado que el valor de Z obtenido es igual a 13,07 y es superior a 2,58 y dado que el valor p es igual a 0,000, el patrón de distribución de las GCRs en esta zona es disperso con una probabilidad de menos del 1% de que este patrón podría ser aleatorio.

El patrón de distribución de las GCRs obtenido con el programa arcGIS[®] 10.3.1 ha dado para todas las muestras estudiadas y para las dos especies, un patrón disperso con menos de 1% de que sea aleatorio.

Tabla 4: resume los resultados obtenidos del promedio más próximo en las tres retinas:

	RL1				RL2				RD1			
	DMO (mm)	NNR	Z	P	DMO (mm)	NNR (mm)	Z	P	DMO	NNR (mm)	Z	P
Tc	0,015	1,449	13,07	0,00	0,011	1,543	14,87	0,00	0,012	1,38	13,02	0,00
Nc	0,009	1,483	14,99	0,00	0,008	1,430	13,65	0,00	0,008	1,45	14,43	0,00
Dc	0,009	1,482	13,67	0,00	0,010	1,324	9,65	0,00	0,013	1,59	7,98	0,00
Vc	0,008	1,375	6,70	0,00	0,008	1,497	12,54	0,00	0,008	1,32	12,56	0,00
Tp	0,006	1,465	15,12	0,00	0,006	1,345	14,87	0,00	0,005	1,42	14,34	0,00
Np	0,006	1,565	13,34	0,00	0,009	1,455	14,04	0,00	0,007	1,56	15,34	0,00
Dp	0,007	1,453	15,04	0,00	0,007	1,463	13,87	0,00	0,007	1,43	14,28	0,00
Vp	0,008	1,289	14,87	0,00	0,008	1,232	14,98	0,00	0,009	1,21	13,32	0,00

DMO: distancia media observada

NNR: indice del vecino más próximo

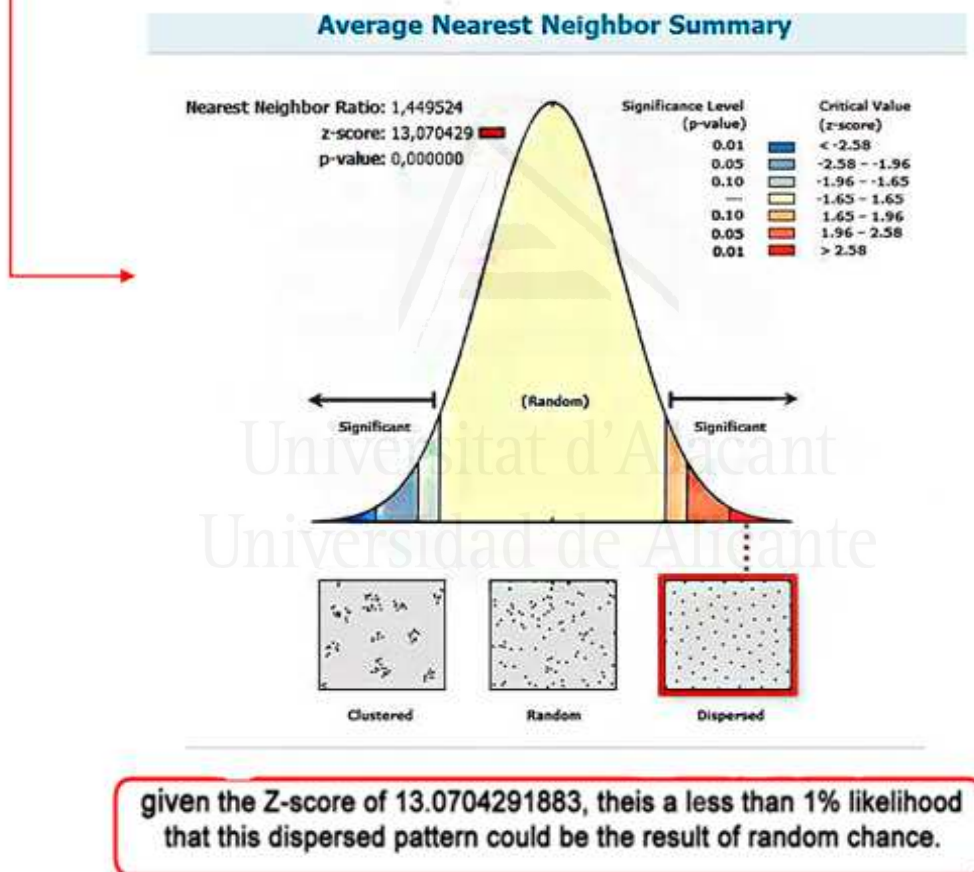


Figura 29: representa los resultados obtenidos para la zona temporal central de la retina RL1 con una explicación del significado de los resultados dados por el programa arcGIS® 10.3. 1

5. Determinación del campo visual:

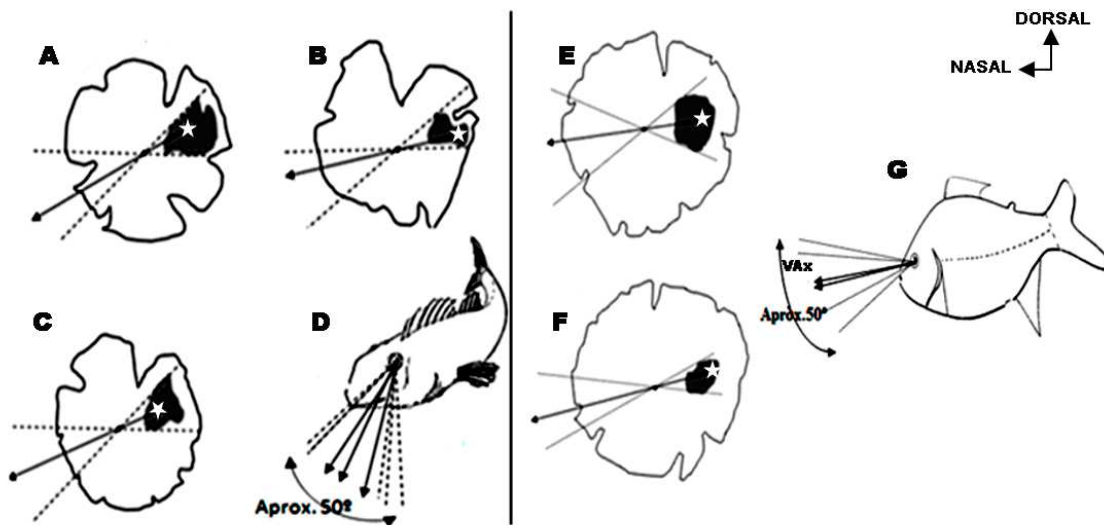


Figura 30: Diagrama esquemático del campo visual de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*. Una vista lateral del campo visual binocular basado en la distribución de las células ganglionares de la retina. Las retinas A- B- C- D y E, corresponden a las retinas RL1, RL2, RL3, RD1 y RD2 respectivamente. El área gris indica el área donde la densidad de las células ganglionares es máxima. La estrella representa el pico de máxima densidad. El eje visual (VAX.) se estimó a partir del pico de máxima densidad de las GCRs y atravesando el nervio óptico (Kino et al., 2009).

En general, el eje visual (VAX) puede definirse como la línea de visión más aguda. En los animales con fovea, el VAX es el eje que une el centro de la lente y la fovea. En los animales que carecen de fovea pero tienen un área de densidad de GCRs alta, una línea que va desde el pico de densidad más alto de las GCRs y atraviesa el centro de la lente puede considerarse VAX. Puesto que los peces examinados en este estudio no tienen fovea se aplica esta definición (Tamura, 1957; Masakatsuet al., 2009).

En el ojo “in toto” es muy difícil determinar el VAX dado que en los peces estudiados no hay fovea. Por otra parte el Dmax solo puede determinarse en retinas aplanadas, en las que ya no disponemos del cristalino, por lo tanto es difícil establecer el VAX. Para ello y a partir de las retinas aplanadas, se trazó una línea hacia el lado opuesto de la posición del pico de máxima densidad de las GCRs atravesando la cabeza del nervio óptico (Masakatsu et al., 2009). Por lo tanto, basandonos en Masakatsu, (2009), estimamos que el principal VAX sería la línea que se dirige hacia la parte frontal inferior del campo visual, formando arcos de 26, 10,4 y 22 grados por debajo de la línea horizontal de las retinas RL1, RL2 y RL3 respectivamente (Figura 30 A-B-C) y un arco

de 10 y 11 grados por debajo de la línea horizontal para la retina RD1 y RD2 (Figura 30 D-E).

Además, el campo estimado de mejor visión definido como la zona que contiene el 75% de los valores máximos de la densidad de las células ganglionares (Heffner y Heffner 1992), forma un arco de aproximadamente 50 grados para las dos especies, *Dicentrarchus labrax* (Figura 30-D) y *Sparus aurata* (Figura 30-G).

6. Características ultraestructurales de los pediculos de los conos:

Las retinas se dividieron en cuatro cuadrantes de interés: nasal, temporal, ventral y dorsal. De cada uno de ellos se procesaron varias muestras de las zonas periférica y central que tras ser procesadas se observarán con el TEM.

6.1. Descripción de los pediculos de los conos:

Los pediculos de los conos (CP) de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*; aunque poseen una estructura similar a la del resto de los vertebrados; en los teleosteos, presentan espinulas cuando los peces están adaptados a la luz, una característica exclusiva de ellos. A diferencia de las esférulas de los bastones (RS) que son de forma redondeada (Figura 31), los pediculos de los conos poseen una morfología trinagular (Figura 33A-B; 34A-B). Ambos tipos de terminaciones están rellenas de vesículas sinápticas, forman a nivel de las sinapsis con las células horizontales y bipolares estructuras densas en forma de cintas de un tamaño aproximadamente de 1 μm de longitud y que van asociadas a las invaginaciones presentes a lo largo de los pediculos y las esférulas. Estas estructuras se conocen como cintillas sinápticas (Figura 31-32-33-34). El número de estas cintillas varía de un pedicelo a otro, mientras que en las esférulas suelen ser únicas. En nuestro estudio hemos contados desde 0 hasta 8 cintillas por pedicelo para *Dicentrarchus labrax*, desde 0 hasta 6 cintillas sinápticas por pedicelo del cono en el caso de *Sparus aurata*.

Una de las estructuras que se forman a nivel de los pediculos y que se pueden ver claramente en nuestros cortes verticales de los pediculos son las triadas (Figura 32), unas estructuras en las que encontramos tres procesos, dos laterales que corresponden a la célula horizontal y uno que se invagina por el centro y que corresponde a la célula bipolar invaginante. Mientras que los pediculos presentan varias triadas, las esférulas presentan solo una estructura parecida conocida como díada en la cual penetran cuatro o más procesos (Figura 31-B).

A nivel de los pedículos de los conos en las dos especies estudiadas, justo por encima de la hendidura sináptica o *Synaptic cleft* (SCI) se observan las espinulas en las retinas adaptadas a la luz. Al igual que en el resto de los teleosteos, son estructuras digitiformes (Figura 33-34) que poseen un citoplasma claro y sin vesículas, con un tamaño de $0,3 \mu\text{m}$ de largo por $0,1 \mu\text{m}$ de ancho. Su identificación resulta fácil gracias a la presencia, en su extremo apical, de un material electrodenso subyacente a la membrana celular.

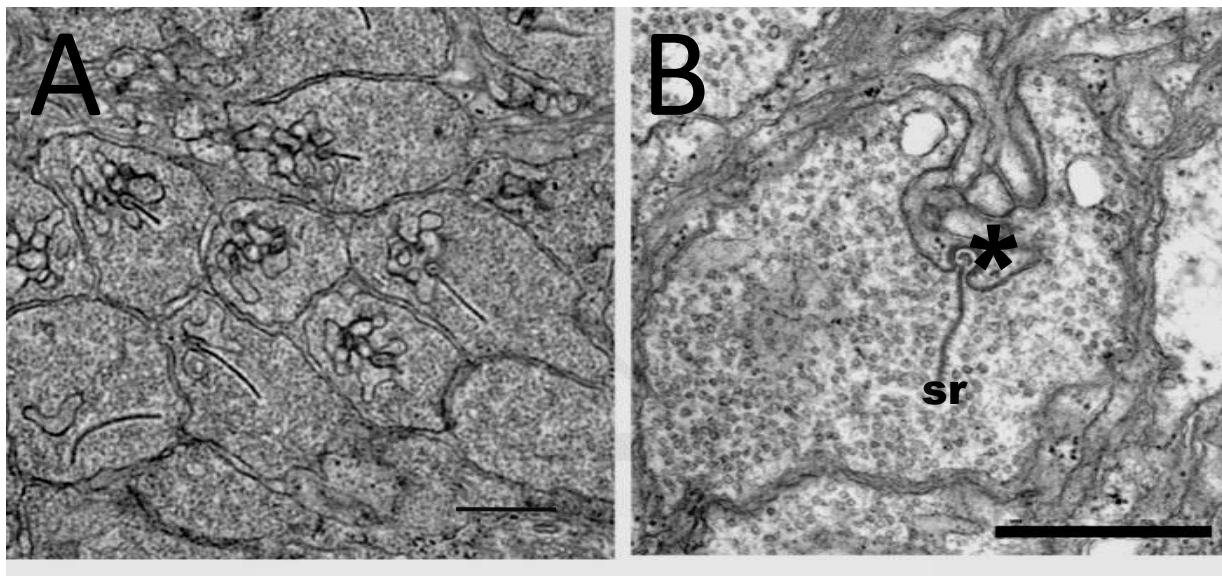


Figura 31: Micrografía electrónica de una retina adaptada a la luz de *Dicentrarchus labrax* a nivel de las esférulas de los bastones. (A) vista panorámica a nivel de las esférulas. (B) micrografía de una esférula donde se puede ver la diada (*) y una cintilla sináptica (sr). Barra $1\mu\text{m}$

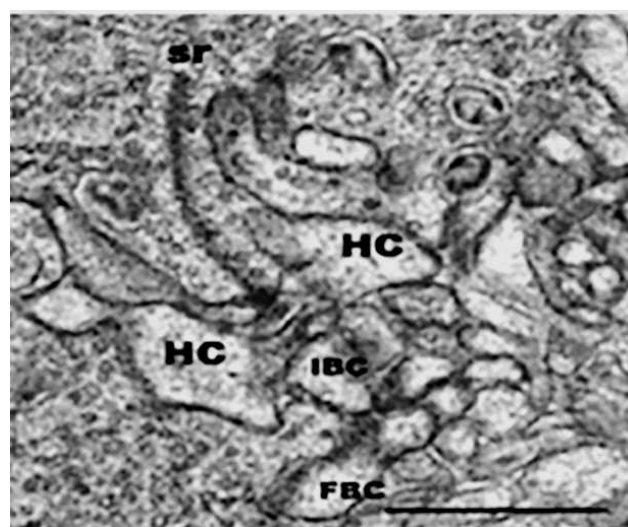


Figura 32: Micrografía electrónica de una triada a nivel de un pedículo de cono de la retina de *Sparus aurata*, con dos procesos laterales (HC) y un proceso central IBC. HC: célula horizontal; IBC: célula bipolar invaginante; FBC: célula bipolar plana. Barra $1\mu\text{m}$

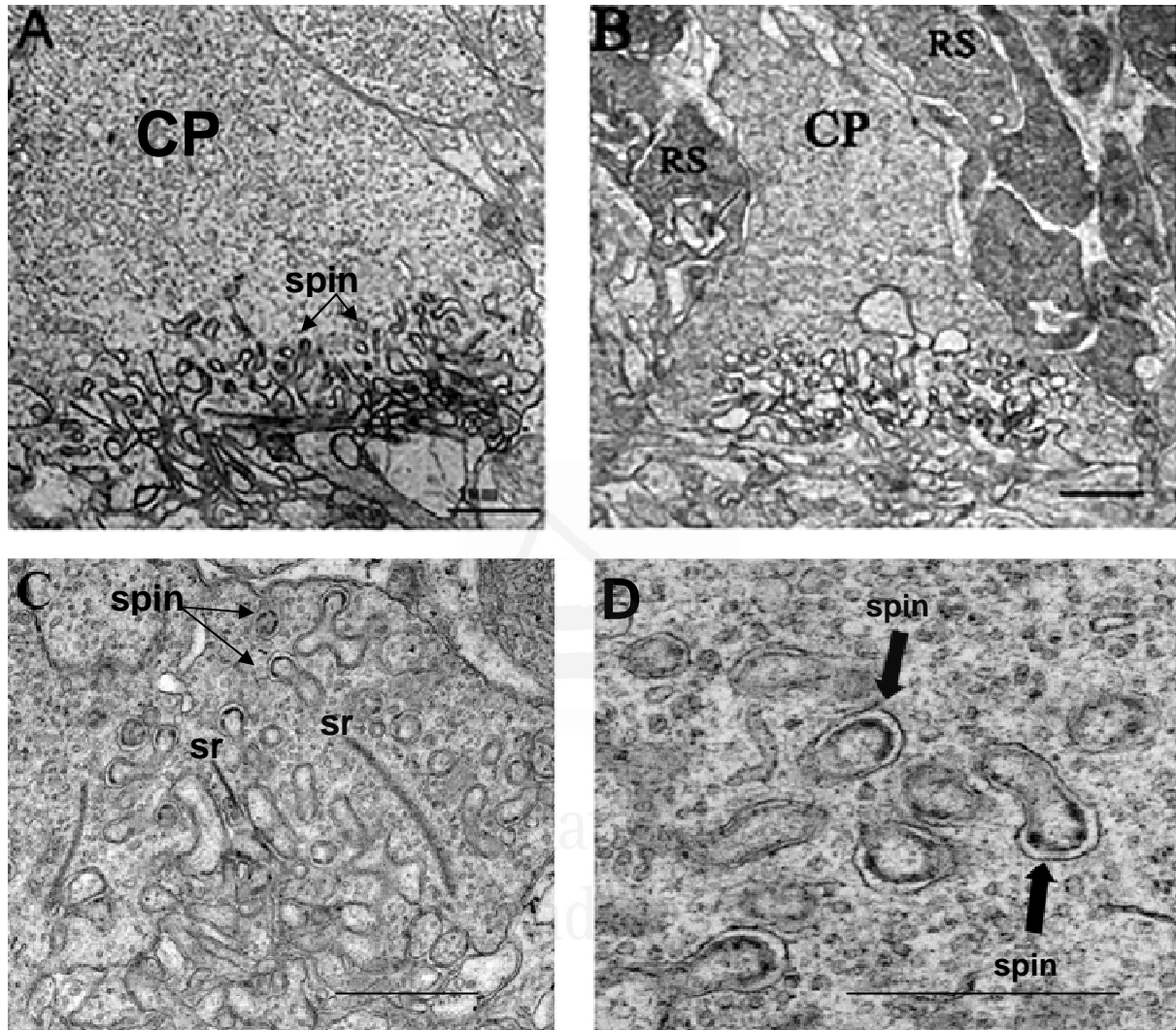


Figura 33: Micrografía electrónica de las retinas de *Dicentrarchus labrax* adaptadas a la luz a nivel del pedículo del cono. (A) pedículo de cono con alto número de espínulas, (B) terminaciones sinápticas de los conos y bastones, (C) micrografía mostrando varias espínulas y cintillas sinápticas, (D) micrografía mostrando varias espínulas. spin: espínulas; sr: cintillas sinápticas; RS; esférulas de los bastones; CP: pedículos de los conos. barra 1 μ m

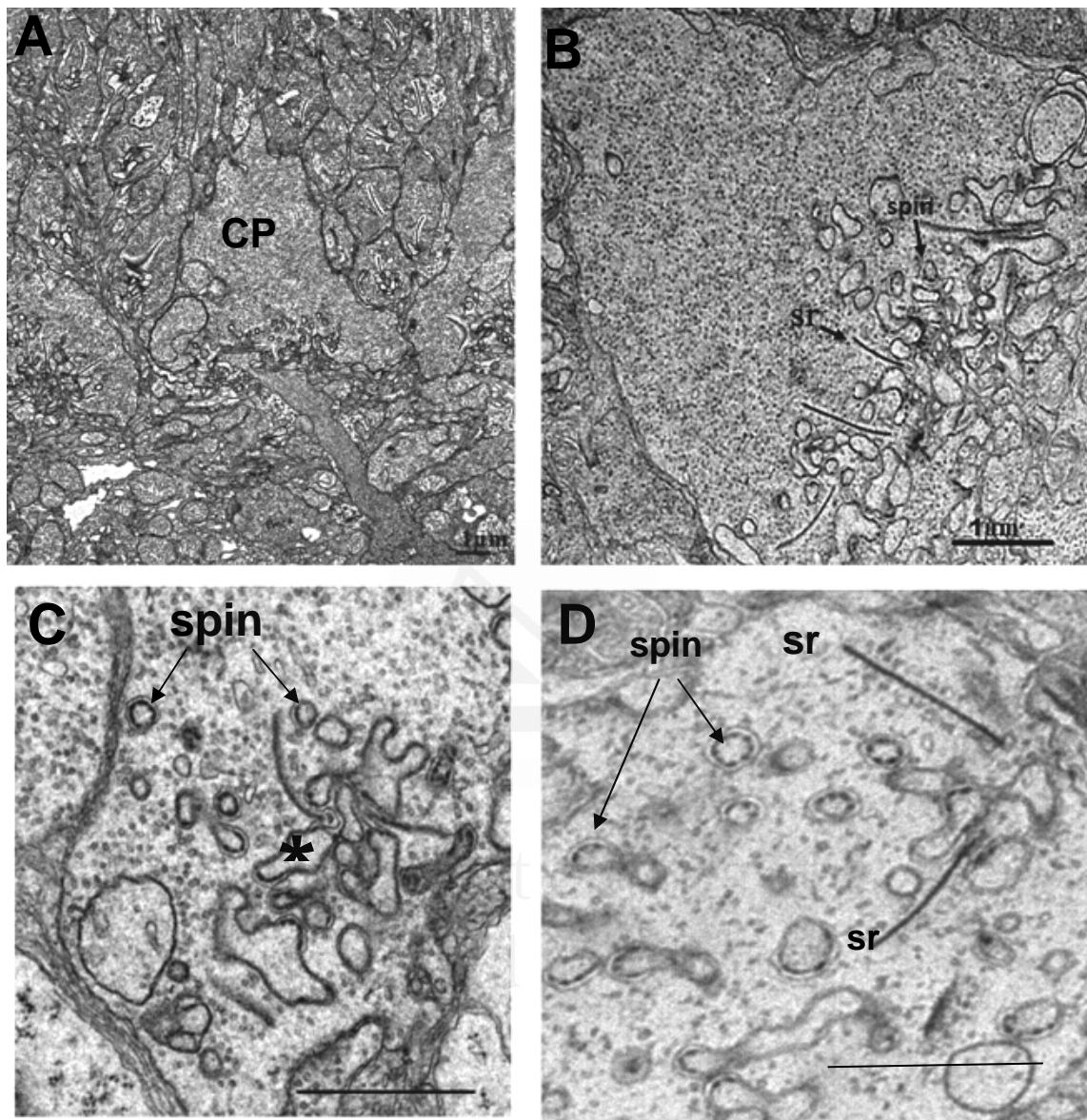


Figura 34: Micrografía electrónica de las retinas de Sparus aurata adaptadas a la luz a nivel del pedículo del cono. (A) micrografía mostrando un pedículo del cono con sus conexiones sinápticas. (B) pedículo del cono con varias espinulas y cintillas sinápticas. (C) varias espinulas y cintillas a nivel del pedículo y procesos sinápticos formando una triada (*). (D) varias espinulas y dos cintillas sinápticas a nivel del pedículo. Barra 1µm

6.2. Cuantificación de las espínulas y de las cintillas sinápticas de los pedículo de los conos y su y distribución en la retina:

Una vez cuantificado el número de espínulas y de cintillas en cada pedículo estudiado, procedimos a su análisis estadístico según la metodología señalada en el apartado de material y métodos.

En la tabla 7 y en la figura 35 recogemos los datos más relevantes sobre el número y distribución de las espínulas, en cada cuadrante de la retina de lubina. Los datos muestran claramente que en las tres retinas la densidad es similar, sin diferencias significativas en todos los cuadrantes excepto en la zona periférica del cuadrante dorso-nasal.

En la tabla 7 y en la figura 35-A, se observa que el número de espínulas contado en la retina periférica es de aproximadamente 17 espínulas por pedículo de cono, frente a las 14 espínulas por pedículo observadas en la retina central. Estos valores son más altos en la zona periférica nasal (≈ 21 espínulas / pedículo) y periférica dorsal (≈ 20 espínulas / pedículo), en relación con los valores en el resto de las zonas (≈ 14 espínulas / pedículo).

Tabla 7: tabla de las medias de espínulas y de las cintillas sinápticas por diferentes retinas, zonas y cuadrantes

	Casos	Espínulas		Cintillas sinápticas	
		Media	Error Est.	Media	Error Est.
RD1	329	9,28	0,25	2,61	0,074
RD2	278	8,22	0,27	2,57	0,081
RL1	152	19,24	0,37	3,243	0,11
RL2	187	16,55	0,33	2,78	0,099
RL3	145	14,02	0,38	3,22	0,11
Dc	152	10,44	0,46	2,73	0,11
Dp	160	16,45	0,44	3,08	0,10
Nc	96	10,92	0,58	2,50	0,14
Np	159	15,72	0,45	2,84	0,10
Tc	148	10,37	0,46	2,85	0,11
Tp	129	11,86	0,50	3,01	0,12
Vc	131	9,65	0,49	2,580	0,11
Vp	116	11,16	0,52	2,65	0,12
C	527	10,31	0,25	2,68	0,059
P	564	14,10	0,24	2,91	0,057

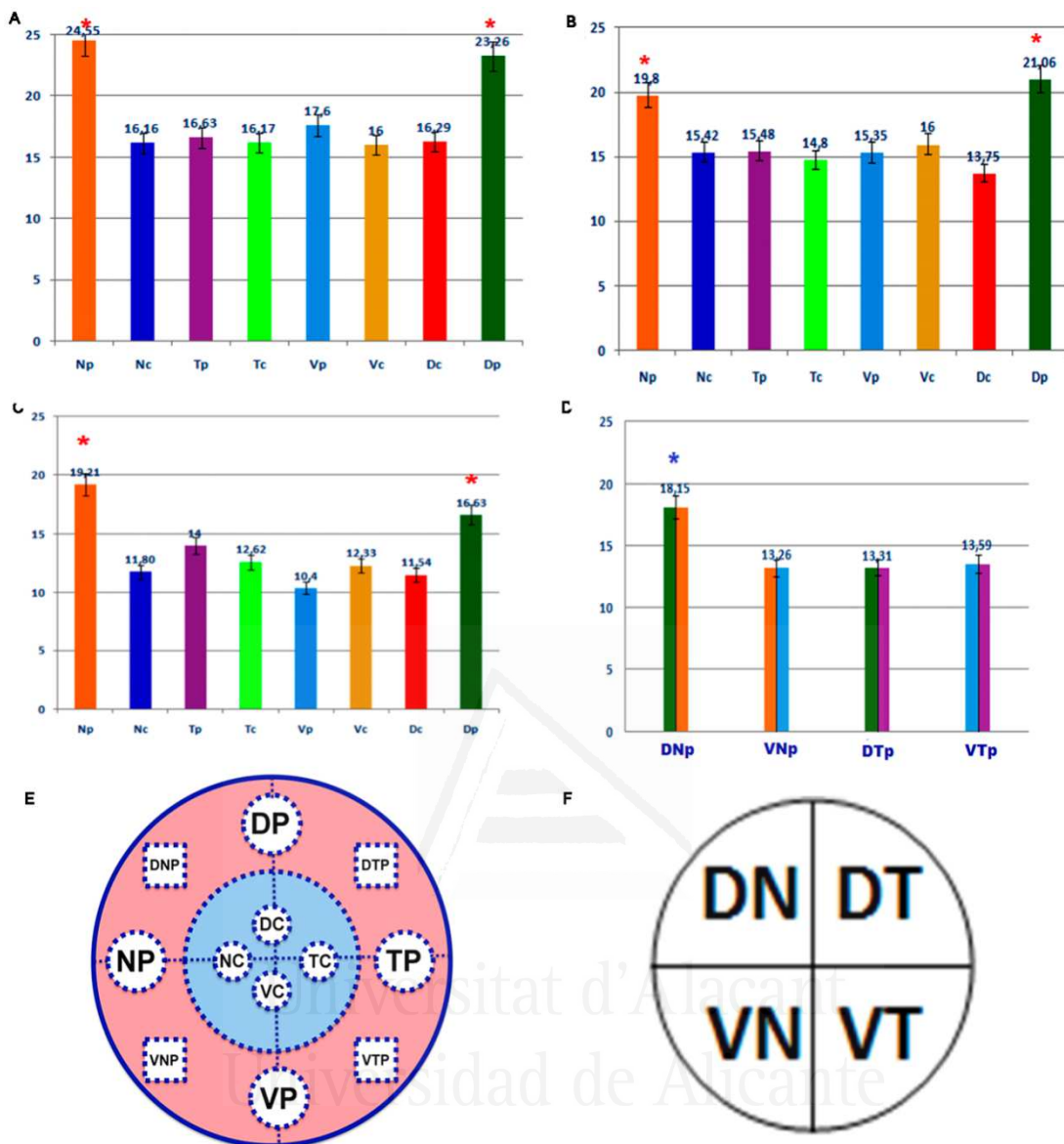


Figura 35: Representación gráfica de la distribución de las espículas por pedículo del cono por diferentes cuadrantes de las retinas de lubina (A- B- C y D). Np: nasal periférico- Nc: nasal central- Tp: temporal periférico- Tc: temporal central- Vp: ventral periférico- Vc: ventral central- Dc: dorsal central- Dp: dorsal periférico- DNp: Dorsonasal periférico- VNp: Ventronasal periférico- DTp: dorsotemporal periférico – VTP: ventrotemporal periférico

En la figura 36-B, tras realizar un análisis de clúster de doble vía aplicado a los datos obtenidos en las zonas central y periférica de cada uno de los cuatro cuadrantes de cada retina y tomando como variables clasificatorias el número de cintillas sinápticas (SRN), el número de espículas (SPN) y las zonas de la retinas analizadas, se observa que la correspondiente a los cuadrantes DP y NP forman un clúster común frente a los 6 zonas restantes. También se observa como las espículas tienen su mayor densidad en las

citadas zonas DP y NP. En cuanto a las SRN no muestran un patrón de densidad claramente definido aunque parece que su número es mayor en las zonas TC y TP.

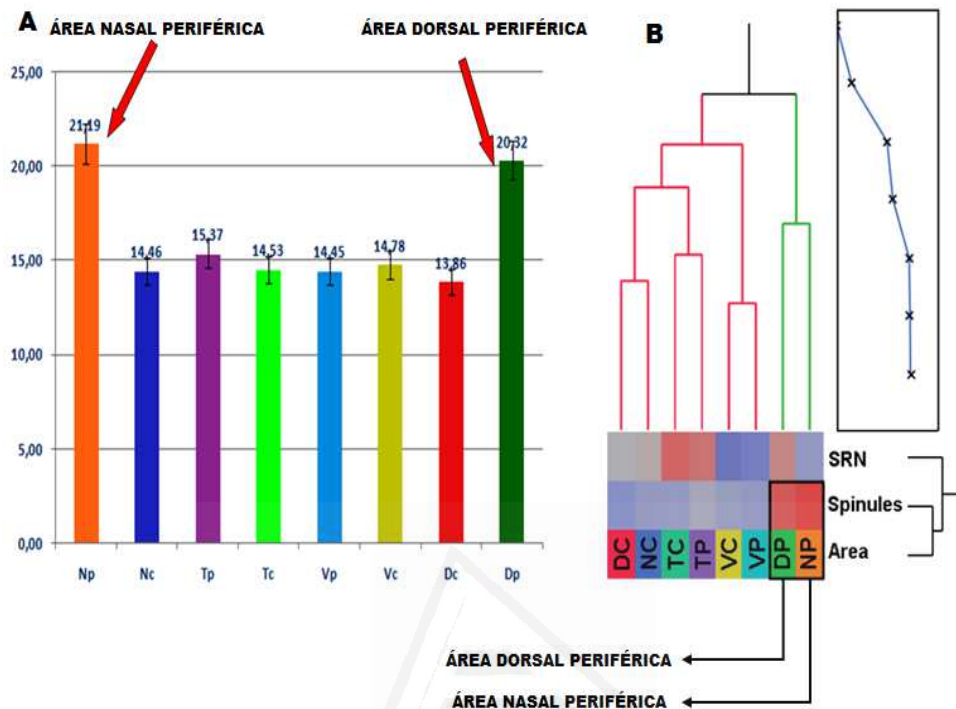


Figura 36: (A) Representación gráfica de la distribución del promedio del número de espínulas por pedículo del cono contado en las tres retinas de lubina en diferentes áreas, periféricas y centrales. (B) Dendrograma y mapa de calor del análisis de clúster de dos vías que representan la distribución de espínulas y cintillas en cada área de la retina. El valor más alto se muestra en rojo, el valor más bajo en azul. Obsérvese como las áreas de mayor densidad de espínulas (DP y NP) forman un clúster independiente.

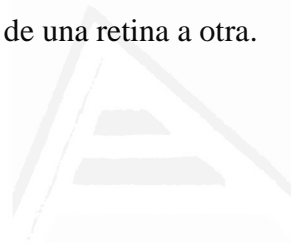
En la tabla 7 y en la figura 37 recogemos los datos más relevantes sobre el número y distribución de las espínulas en cada cuadrante de la retina de dorada. Al igual que lubina, los datos muestran claramente que en las dos retinas la densidad es similar, sin diferencias significativas en todos los cuadrantes excepto en la zona periférica del cuadrante dorso-nasal.

En la tabla 7 y en la figura 37-C, se observa que el número de espínulas contado en la retina periférica de dorada es de aproximadamente 12 espínulas por pedículo de cono, frente a las 8 espínulas por pedículo observadas en la retina central. Estos valores son más altos en la zona periférica nasal (≈ 11 espínulas / pedículo) y periférica dorsal (≈ 12 espínulas / pedículo), en relación con los valores en el resto de las zonas (≈ 7 espínulas / pedículo).

Obsérvese como en general el número de espinulas en lubina es mucho mayor que en la dorada.

En la figura 37-D, tras realizar un análisis de clúster de doble vía aplicado a los datos obtenidos en las zonas central y periférica de cada uno de los cuatro cuadrantes de cada retina y tomando como variables clasificatorias el número de cintillas sinápticas (SRN), el número de espinulas y las zonas de la retina analizadas, se observa que la correspondiente a los cuadrantes DP y NP forman un clúster común frente a los 6 zonas restantes. También se observa, al igual que en lubina, las espinulas tienen su mayor densidad en las citadas zonas DP y NP. En cuanto a las SRN no muestran un patrón de densidad claramente definido aunque parece que su número es mayor en las zonas NP, DP y VP.

Para lubina, así como para dorada, las cintillas sinápticas no siguen ningún patrón de distribución específico dentro de la retina. La distribución es al azar, ya que las zonas de máxima densidad son diferentes de una retina a otra.



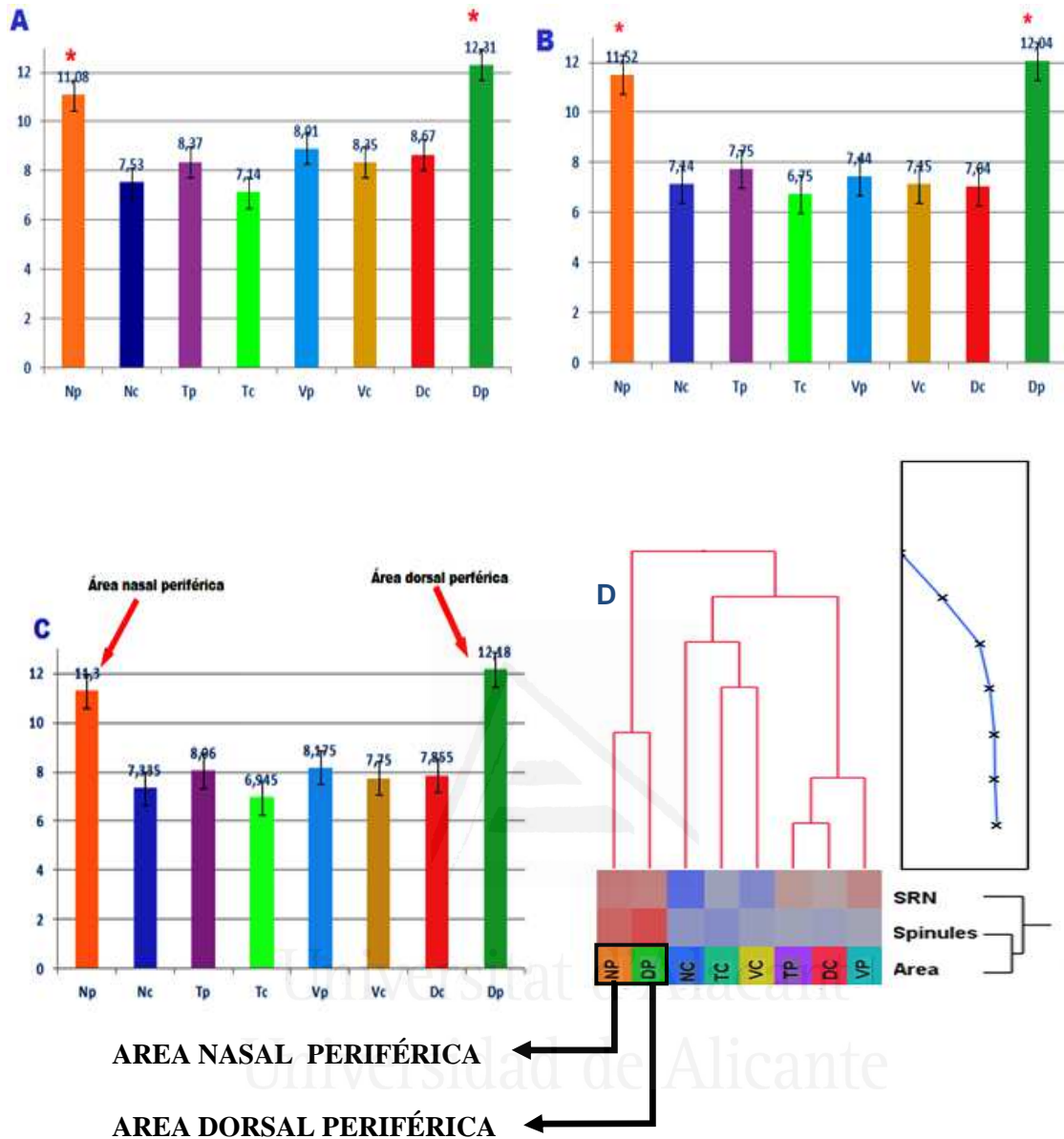


Figura 37: (A) Representación gráfica de la distribución de las espínulas por pedículo del cono por diferentes cuadrantes de la retina RD1 de dorada (*Sparus aurata*). (B) Distribución de las espínulas por pedículo del cono por diferentes cuadrantes de las retinas RD2. (C) Distribución de las medias del número de espínulas por pedículo del cono contado en las dos retinas de dorada en diferentes áreas periféricas y centrales.

Para confirmar estos resultados y saber si existe o no diferencias estadísticamente significativas en el número de espínulas y de cintillas sinápticas entre las diferentes retinas, cuadrantes y zona periférica y central de las retinas, se realizaron los correspondientes ANOVA de una y dos vías (Tablas 8-9-10) y los dos análisis de conglomerados analizado más arriba.

Los ANOVA de un factor, para comparar la densidad media de espínulas de las cinco retinas estudiadas muestran los siguientes resultados:

Las cinco retinas estudiadas presentan diferencias significativas de la media del número de espínulas (Tabla 7) entre ellas ($F_{4,1090}=218,66$; $p=0,0001$), así como entre la zona periférica y central ($F_{1,1089}=111,73$; $p=0,000$)

Las retinas de la misma especie también presentan entre ellas diferencias significativas en la media del número de espínulas (tabla 7), a saber para lubina, $F_{2,483}=33,33$; $p=0,000$ y para dorada $F_{1,605}=11,88$; $p=0,0006$ como presentan también diferencias significativas entre la retina periférica y central (lubina: $F_{1,483}=68,64$; $p=0,000$, dorada: $F_{1,606}=86,71$; $p=0,000$).

Las cinco retinas estudiadas posee diferencias significativas en la media del número de espínulas entre diferentes cuadrantes de la retina (Np, Nc, Dp, Dc, Tp, Tc, Vp, Vc), a saber $F_{7, 1090}= 30,68$; $p= 0,000$. Para determinar que medias son significativamente diferentes de otras se realizó el test de Fisher, según los resultados obtenidos con este test se comprobó que los cuadrantes Dp y Np, de máxima densidad, no presentan diferencias significativas entre ellas dos, pero si con el resto de los cuadrantes que tampoco presentan diferencias significativas entre ellos.

Un análisis de cada especie por separado también reveló que existen diferencias significativas en la media del número de espínulas entre diferentes cuadrantes de la retina, a saber para lubina $F_{7,483}=22,421$; $p= 0,0001$ y para dorada $F_{7,606}= 26,196$; $p=0,0001$. El test de Fisher para las dos especies mostro al igual que en el caso de las cinco retinas que los cuadrantes Np y Dp no presentan diferencias entre si, pero si con el resto de los cuadrantes que por su parte no muestran diferencia significativa entre ellos (Figura 36).

La media del número de cintillas sinápticas (Tabla 7) por su parte presenta diferencias significativas entre las diferentes cinco retinas estudias ($F_{4,1090}= 10,95$; $p=0,000$) sin embargo no aparecen diferencias significativas de dicha media entre las retinas de una misma especie, a saber, para lubina $F_{2,483}=4,98$; $p=0,0072$ y para dorada, $F_{1,483}=0,26$; $p=0,7712$.

La media del número de las cintillas sinápticas (Tabla 7) tampoco presenta diferencias significativas entre la retina periférica y central para las dos especies estudiadas, a saber para lubina $F_{1,483}=0,09$; $p=0,762$ y para dorada $F_{1,606}= 0,18$;

$p=0,6752$, sin embargo se observa una diferencia significativa en dicha media para las cinco retinas ($F_{4,1090}=10,95$; $p=0,000$).

La media del numero de cintillas presenta diferencias significativas entre los diferentes cuadrantes de la retina para las cinco retinas estudiadas ($F_{7,1090}=2,88$; $p=0,0055$) asi como para cada especie por separado, a saber, para lubina $F_{7,483}=3,949$; $p=0,0003$ y para dorada $F_{7,606}=3,258$; $p=0,021$.

Todos estos resultados se corroboraron utilizando el ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis.

Tabla 8: tabla ANOVA de un via de diferentes pruebas para comparar los valores medios de espinulas:

ANOVA un factor	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
espínulas*Pez (las 5 retinas)	Entre grupos	18754,441	4	4688,61	218,661	0,0001
	Intra grupos	23286,407	1086	21,442		
	Total (Corr.)	42040,849	1090			
espínulas*Pez (lubina)	Entre grupos	2026,35	2	1013,18	33,33	0,0000
	Intra grupos	14621,1	481	30,3973		
	Total (Corr.)	16647,4	483			
espínulas*Pez (dorada)	Entre grupos	170,164	1	170,164	11,88	0,0006
	Intra grupos	8665,32	605	14,3228		
	Total (Corr.)	8835,48	606			
espínulas*zona (5 retinas)	Entre grupos	3912,0	1	3912,0	111,73	0,0000
	Intra grupos	38128,8	1089	35,0127		
	Total (Corr.)	42040,8	1090			
espínulas*zona (lubina)	Entre grupos	2075,2	1	2075,2	68,64	0,0000
	Intra grupos	14572,2	482	30,2329		
	Total (Corr.)	16647,4	483			
espínulas*zona (dorada)	Entre grupos	1107,54	1	1107,54	86,71	0,0000
	Intra grupos	7727,94	605	12,7735		
	Total (Corr.)	8835,48	606			
espínulas*cuadrantes (5 retinas)	Entre grupos	6957,63	7	993,947	30,68	0,0000
	Intra grupos	35083,2	1083	32,3945		
	Total (Corr.)	42040,8	1090			
espínulas*cuadrantes (lubina)	Entre grupos	4127,894	7	589,699	22,421	0,0001
	Intra grupos	12519,553	476	26,302		
	Total (Corr.)	16647,446	483			
espínulas*cuadrantes(dorada)	Entre grupos	2070,866	7	295,838	26,196	0,0001
	Intra grupos	6764,613	599	11,293		
	Total (Corr.)	8835,479	606			

Tabla 9: Tabla ANOVA de un via de diferentes pruebas para comparar los valores medios de cintillas:

ANOVA un factor	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
cintillas*Pez (las 5 retinas)	Entre grupos	80,5971	4	20,1493	10,95	0,0000
	Intra grupos	1998,03	1086	1,83981		
	Total (Corr.)	2078,63	1090			
cintillas*Pez (lubina)	Entre grupos	22,8872	2	11,4436	4,98	0,0072
	Intra grupos	1104,38	481	2,296		
	Total (Corr.)	1127,26	483			
cintillas *Pez (dorada)	Entre grupos	0,747692	1	0,373846	0,26	0,7712
	Intra grupos	691,789	481	1,43823		
	Total (Corr.)	692,537	483			
cintillas*zona (5 retinas)	Entre grupos	80,5971	4	20,1493	10,95	0,0000
	Intra grupos	1998,03	1086	1,83981		
	Total (Corr.)	2078,63	1090			
cintillas *zona (lubina)	Entre grupos	0,213869	1	0,213869	0,09	0,7625
	Intra grupos	1127,05	482	2,33827		
	Total (Corr.)	1127,26	483			
cintillas*zona (dorada)	Entre grupos	0,259278	1	0,259278	0,18	0,6752
	Intra grupos	893,658	605	1,47712		
	Total (Corr.)	893,918	606			
cintillas*cuadrantes (5 retinas)	Entre grupos	38,0316	7	5,43309	2,88	0,0055
	Intra grupos	2040,6	1083	1,88421		
	Total (Corr.)	2078,63	1090			
cintillas*cuadrantes (lubina)	Entre grupos	61,876	7	8,839	3,949	0,0003
	Intra grupos	1065,386	476	2,238		
	Total (Corr.)	1127,262	483			
cintillas*cuadrantes (dorada)	Entre grupos	32,788	7	4,684	3,258	0,021
	Intra grupos	861,129	599	1,438		
	Total (Corr.)	893,918	606			

Al comparar entre las medias con ANOVA de dos factores se obtuvieron los siguientes resultados:

La media del numero de espinulas en las cinco retina presenta diferencias significativas entre periferia y centro respecto al pez ($F_{28,1090}=1,589$; $p= 0,027$). Sin embargo no se observa diferencia significativa en dicha media entre la zona periférica y central, respecto a las retinas de los peces de una misma especie, a saber: para lubina $F_{14,483}=0,882$; $p= 0,578$ y para dorada $F=0,568$; $p=0,451$.

La media del numero de espinulas en las cinco retina presenta diferencias significativas entre los diferentes cuadrantes de la retina respecto al pez ($F_{28,1090}=1,589$; $p= 0,027$). Sin embargo no se observa diferencia significativa en dicha media entre los diferentes cuadrantes de la retina, respecto a los peces de una misma especie, a saber: para lubina $F_{14,483}=0,882$; $p= 0,578$ y para dorada $F=0,543$; $p=0,45$.

En lubina, Las cintillas presentan diferencias significativas entre retina periférica y central respecto al pez ($F_{2,483}=1,301$; $p=0,273$, sin embargo la dorada no presenta dicha diferencia ($F_{1,606}=8,950$; $p= 0,003$).

La media del numero de cintillas en las cinco retina presenta diferencias significativas entre los diferentes cuadrantes de la retina respecto a las diferentes cinco retinas ($F_{28,1090}=1,589$; $p= 0,027$), asi como respecto al las retinas de lubina ($F=3,041$; $p=,000$). Sin embargo no se observa diferencia significativa en dicha media respecto a las diferentes retinas de dorada, respecto a los peces de una misma especie, a saber: $F_{1,606}= 8,950$; $p=0,003$.

Tabla 10: tabla ANOVA de dos via de diferentes pruebas para comparar los valores medios de espinulas

ANOVA dos factores	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Espinulas*zona*Pez (todas las retinas)	A:cuadrantes	5651,791	7	807,399	49,890	0,0000
	B:pez	13928,813	4	3482,203	215,170	0,0000
	Cuadrantes*Pez	720,056	28	25,716	1,589	0,027
	TOTAL (CORR.)	42040,8	1090			
espinulas*zona*Pez (lubina)	A:cuadrantes	3861,514	7	551,645	24,442	0,000
	B:pez	1373,046	2	686,523	30,418	0,000
	Cuadrantes*Pez	278,7780	14	19,913	0,882	0,578
	TOTAL (CORR.)	16647,446	483			
espinulas*zona*Pez (dorada)	A:cuadrantes	1026,311	1	1026,311	81,014	0,000
	B:pez	79,766	1	79,766	6,297	0,012
	Cuadrantes*Pez	7,191	1	7,191	0,568	0,451
	TOTAL (CORR.)	8835,479	606			
Espinulas*cuadrante*Pez (todas las retinas)	A:cuadrantes	5651,791	7	807,399	49,890	0,0000
	B:pez	13928,813	4	3482,203	215,170	0,0000
	Cuadrantes*Pez	720,056	28	25,716	1,589	0,027
	TOTAL (CORR.)	42040,8	1090			
espinulas*cuadrante*Pez (dorada)	A:cuadrantes	1970,25	7	272,465	24,299	0,0000
	B:pez	65,724	1	65,724	5,861	0,016
	Cuadrantes*Pez	68,365	7	9,766	0,871	0,529
	TOTAL (CORR.)	8835,48	606			

Tabla 11: Tabla ANOVA de dos via de diferentes pruebas para comparar los valores medios de cintillas:

ANOVA dos factores	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
cintillas*zona*Pez (todas las retinas)	A:cuadrantes	4,640	1	4,640	2,555	0,110
	B:pez	74,280	4	18,570	10,226	0,000
	TOTAL (CORR.)	2078,631	1090			
cintillas*zona*Pez (lubina)	A:cuadrantes	0,003	1	0,003	0,001	0,971
	B:pez	23,469	2	11,734	5,107	0,006
	Cuadrantes*Pez	5,978	2	2,989	1,301	0,273
	TOTAL (CORR.)	1127,262	483	1127,262		
cintillas*zona*Pez (dorada)	A:cuadrantes	18,661	1	18,661	13,012	0,000
	B:pez	0,016	1	0,016	,011	0,916
	Cuadrantes*Pez	12,836	1	12,836	8,950	0,003
	TOTAL (CORR.)	893,918	606			
cintillas*cuadrante*Pez (las 5 retinas)	A:cuadrantes	45,789	7	6,541	3,773	,000
	B:pez	49,453	4	12,363	7,132	,000
	Cuadrantes*Pez	147,632	28	5,273	3,041	,000
	TOTAL (CORR.)	16647,446	483			
cintillas*cuadrante*Pez (lubina)	A:cuadrantes	68,987	7	9,855	4,460	0,0000
	B:pez	21,087	2	10,543	4,772	0,009
	Cuadrantes*Pez	23,731	14	1,695	0,767	0,705

	TOTAL (CORR.)	1127,262	483			
cintillas*cuadrantes*Pez (dorada)	A:cuadrantes	18,661	1	18,661	13,012	,000
	B:pez	,016	1	,016	,011	,916
	Cuadrantes*Pez	12,836	1	12,836	8,950	,003
	TOTAL (CORR.)	893,918	606			

Tras realizar los correspondientes ANOVAS (tablas 8-9-10-11) de uno y dos factores para comparar la densidad media de espínulas de las cinco retinas estudiadas se obtuvieron los siguientes resultados:

Las cinco retinas estudiadas presentan una diferencias significativas de la media del número de espínulas (tabla 7) entre ellas ($F_{4,1090}=218,66$; $p=0,0001$), así como entre la zona periférica y central ($F_{1,1089}=111,73$; $p=0,000$)

Las retinas de la misma especie también presentan entre ellas diferencias significativas en la media del número de espínulas (tabla 9), a saber para lubina, $F_{2,483}=33,33$; $p=0,000$ y para dorada $F_{1,605}=11,88$; $p=0,0006$ como presentan también diferencias significativas entre la retina periférica y central (lubina: $F_{1,483}=68,64$; $p=0,000$, dorada: $F_{1,606}=86,71$; $p=0,000$).

Las cinco retinas estudiadas presentan diferencias significativas en la media del número de espínulas entre diferentes cuadrantes de la retina (Np, Nc, Dp, Dc, Tp, Tc, Vp, Vc), a saber $F_{7,1090}= 30,68$; $p=0,000$. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras se realizó el test de Fisher, según los resultados obtenidos con este test se comprobó que los cuadrantes Dp y Np de máxima densidad no presentan diferencias significativas entre ellas en el número de espínulas pero si con el resto de los cuadrantes que tampoco presentan diferencias significativas entre ellas.

Un análisis de cada especie por aparte también reveló que existen diferencias significativas en la media del número de espínulas entre diferentes cuadrantes de la retina, a saber para lubina $F_{7,483}=22,421$; $p= 0,0001$ y para dorada $F_{7,606}= 26,196$; $p=0,0001$, el test de Fisher para las dos especies mostro al igual que en el caso de las cinco retinas que los cuadrantes Np y Dp no presentan diferencias entre ellas pero si con el resto de los cuadrantes que por su parte no muestran diferencia significativa entre ellos (Figura 36).

La media del número de cintillas sinápticas (tabla7) por su parte presenta diferencias significativas entre las diferentes cinco retinas estudias ($F_{4,1090}= 10,95$; $p=0,000$) sin embargo no aparecen diferencias significativas de dicha media entre las retinas de una

misma especie, a saber, para lubina $F_{2,483}=4,98$; $p=0,0072$ y para dorada, $F_{1,483}=0,26$; $p=0,7712$

La media del número de las cintillas sinápticas (tabla7) tampoco presenta diferencias significativas entre la retina periférica y central para las dos especies estudiadas, a saber para lubina $F_{1,483}=0,09$; $p=0,762$ y para dorada $F_{1,606}= 0,18$; $p=0,6752$, sin embargo se observa una diferencia significativa en dicha media para las cinco retinas ($F_{4,1090}=10,95$; $p=0,000$).

La media del numero de cintillas presenta diferencias significativas entre los diferentes cuadrantes de la retina para las cinco retinas estudiadas ($F_{7,1090}=2,88$; $p=0,0055$) asi como para cada especie por aparte a saber, para lubina $F_{7,483}=3,949$; $p=0,0003$ y para dorada $F_{7,606}= 3,258$; $p= 0,021$.

Todos estos resultados obtenidos anteriormente se comprobaron utilizando el anova no paramétrico de Kruskal Wallis.

Al comparar entre las medias con anovas de dos factores se obtuvieron los siguientes resultados:

La media del numero de espinulas en las cinco retina presenta diferencias significativas entre periferia y centro respecto al pez ($F_{28,1090}=1,589$; $p= 0,027$). Sin embargo no se observa diferencia significativa en dicha media entre la zona periférica y central, respecto a las retinas de los peces de una misma especie, a saber: para lubina $F_{14,483}=0,882$; $p= 0,578$ y para dorada $F=0,568$; $p=0,451$.

La media del numero de espinulas en las cinco retina presenta diferencias significativas entre los diferentes cuadrantes de la retina respecto al pez ($F_{28,1090}=1,589$; $p= 0,027$). Sin embargo no se observa diferencia significativa en dicha media entre los diferentes cuadrantes de la retina, respecto a los peces de una misma especie, a saber: para lubina $F_{14,483}=0,882$; $p= 0,578$ y para dorada $F=0,568$; $p=0,451$.

En lubina, Las cintillas presentan diferencias significativas entre retina periférica y central respecto al pez ($F_{2,483}=1,301$; $p=0,273$, sin embargo la dorada no presenta dicha diferencia ($F_{1,606}=8,950$; $p= 0,003$).

La media del numero de cintillas en las cinco retinas presenta diferencias significativas entre los diferentes cuadrantes de la retina respecto a las diferentes cinco retinas ($F_{28,1090}=1,589$; $p= 0,027$), asi como respecto al las retinas de lubina ($F=3,041$; $p=,000$). Sin embargo no se observa diferencia significativa en dicha media respecto a

las diferentes retinas de dorada, respecto a los peces de una misma especie, a saber:
 $F_{1,606} = 8,950$; $p = 0,003$

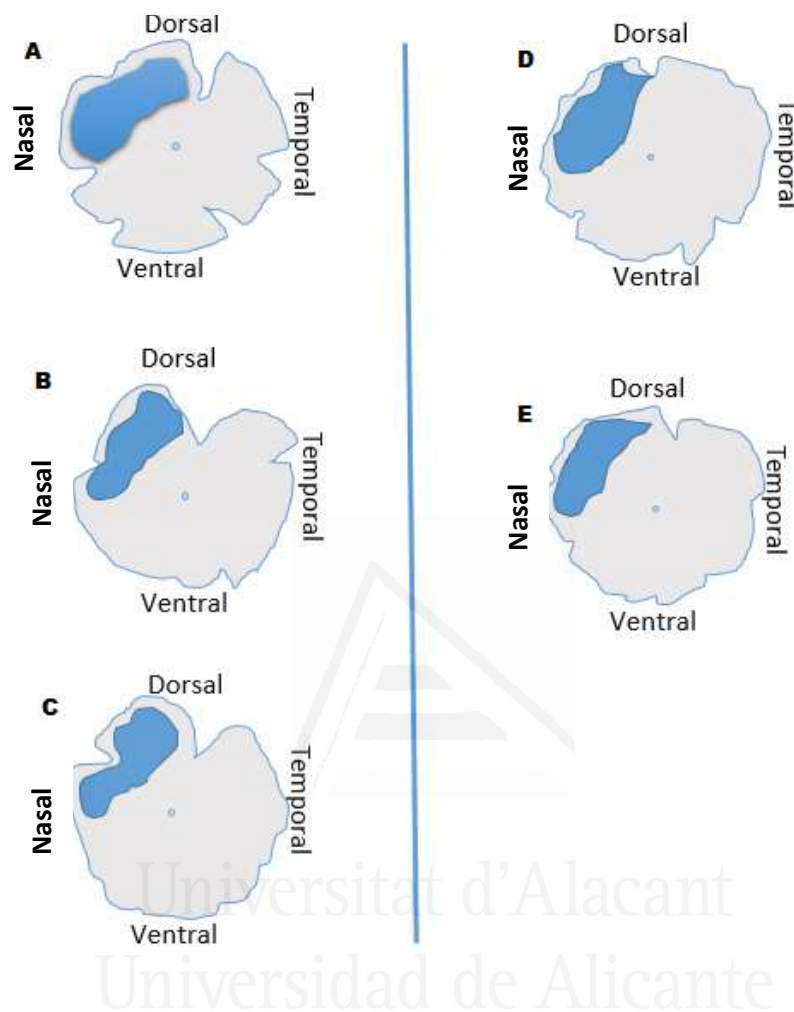


Figura 38: Esquema representativo de las zonas de alta densidad de las espínulas para las retinas derechas A, B, C que representan las retinas RL1, RL2, RL3 de *Dicentrarchus labrax* y las retinas derechas D y E, que representan las retinas RD1 y RD2 de *Sparus aurata*.

Resumiendo, existe una diferencia en la media del número de espínulas por pedículo del cono entre las diferentes retinas de la misma especie, así como entre ambas especies estudiadas, dorada y lubina, siendo esta última la más piscívora y la de mayor número de espínulas.

Existe una diferencia en la media del número de espínulas por pedículo entre la retina periférica y central, siendo la zona periférica la de mayor densidad. Se puede deducir también que hay una diferencia en la densidad entre los distintos cuadrantes de la retina, de los cuales el cuadrante dorso-nasal periférico es lo de mayor densidad en ambas especies (Figura 38).

En cuanto a las cintillas sinápticas, estas no muestran un patrón de distribución claramente definido, ya que no se deduce una diferencia en su densidad entre las diferentes retinas de lubina. Sin embargo, si existe una diferencia entre las distintas retinas de dorada así como entre las retinas de ambas especies. Por otra parte, no hay diferencia en la densidad entre la retina periférica y central, pero sí entre los diferentes cuadrantes de la retina. La distribución es al azar, aunque parece que para lubina, la densidad es mayor en las zonas Tc y Tp y para dorada la densidad es la misma por todos los cuadrantes de la retina, excepto el cuadrante nasal central la cual tiene una baja densidad a comparación con los otros.

Respecto a las GCRs, no existe diferencia en el promedio total de estas neuronas entre ambas especies pero sí entre las retinas de la misma especie. Los mapas de isodensidad revelan que para lubina como para dorada, al igual que el resto de los teleosteos, las GCRs se distribuyen en zonas de máxima densidad con un pico alto en la zona temporal periférica, su distribución no se correlaciona con la distribución de las espinulas ya que estos últimos son más abundantes en la zona dorso-nasal periférica, zona de baja agudeza visual.

V. DISCUSIÓN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Identificación y cuantificación del número total de las GCRs:

Existen Dos métodos para el conteo y la cuantificación del número total de las células ganglionares. El método indirecto, un método que parte de la premisa de que las células ganglionares tienen un único axón retinofugal, este método se basa en el conteo de los axones en secciones transversales del nervio óptico, se puede realizar contando axones en área de muestreo bajo microscopía óptica (De Juan y cols., 1978; Chauhan y cols., 2002; Aihara y cols., 2003) o electrónica (Quigley y cols., 1978). Este método tiene sus límites porque existen axones más pequeños que el límite de resolución de la microscopía óptica y por lo tanto, no se pueden identificar, otros no mielinizados que son difíciles de distinguir, así como los axones recubiertos de la vaina de mielina necesitan una gran experiencia del investigador. Con este método indirecto, tampoco se puede sacar informaciones sobre el tamaño de las GCRs ni su distribución espacial.

La cuantificación directa de las células ganglionares en retinas montadas a plano se basa en el conteo directo de las GCRs que tienen que ser previamente marcadas para poder identificarlas, muchos son los métodos utilizados para el marcaje de estas células.

La aplicación de trazadores neuronales retrógrados: Los trazadores neuronales son sustancias orgánicas, que captadas y transportadas retrógradamente por los axones de las GCRs, se acumulan en el soma y sus dendritas (Vidal-Sanz et al. 1988, 1993, 2001; PeinadoRamón et al., 1996; Sellés-Navarro et al. 1996; Wang et al. 2000; Lafuente López-Herrera et al. 2002). Es una técnica que se puede considerar fidedigna, que permite una identificación inequívoca de las células ganglionares, ya que son las únicas células de la retina que emiten un único axón retinofugal, pero esto, solo si se puede determinar con precisión el tiempo óptimo de supervivencia, el tiempo justo necesario para que llegue el trazador a todos los somas de las GCRs desde el lugar de su aplicación (puede variar desde pocos segundos a semanas o meses), en tiempos demasiado cortos el marcaje es incompleto, mientras que en tiempos demasiado largos el marcaje es inespecífico.

Los métodos más comunes para la aplicación de los trazadores son por inyección en el nervio óptico, o en forma de cristales que se ponen por encima de una incisión previamente realizada a nivel del NO. Se pueden aplicar también a nivel de las principales regiones dianas de proyección de los axones de las GCRs en el cerebro, en forma de cristal si el lugar de interés es de fácil acceso quirúrgico, o por iontoforesis o

inyección a presión, que requieren una disolución de los cristales en solventes orgánicas.

Existen diferentes tipos de trazadores, con propiedades diferentes, Algunos como la HRP (peroxidasa de rábano) tienen actividad enzimática y se detectan revelando dicha actividad; otros son fluorescentes que se visualizan directamente al microscopio de fluorescencia como: rodaminas, principalmente Fluorogold (FG) y dextrano tetrametilrodamina (DTMR); carbocianinas el más común es 1,1'- dioctadecil-3,3,3',3'- tetrametilindocarbocianinaperclorato (DiI); mientras que otros trazadores se visualizan utilizando una inmunotinción con anticuerpos dirigidos específicamente contra el trazador.

El método de la aplicación de trazadores neuronales retrógrados, a pesar de ser un método que permite unos resultados inequívocos, no se realiza por las dificultades técnicas que representa el procedimiento quirúrgico en animales pequeños, en nuestro caso, los peces, que, además de la dificultad de la técnica, se estresan y por lo tanto pueden morir antes de que se acabe el experimento.

Otro método de identificación y cuantificación de las GCRs, es mediante la detección de marcadores moleculares específicos que están capaces de marcar la gran proporción de la población de estas células. Se han detectado varias proteínas, como el Thy1 (Le Conte, 1897; Tamura y Wisby, 1963) un antígeno específico de las células ganglionares localizado en la membrana plasmática, de sus límites, su incapacidad de reconocer a todos los subtipos de las GCRs, lo que invalida su uso.

Otros marcadores de la familia de los factores de transcripción Brn3 con dominio POU al que pertenece el Brn3a, Brn3b y Brn3c, hay una gran diferencia en la expresión de las proteínas de la familia Brn3 entre especies (Schlamp et al., 2013). En retina de rata por ejemplo, el Brn3a marca aproximadamente el 90% de las GCRs, de los cuales, aproximadamente el 65% de ellas también expresan Brn3b, mientras que sólo alrededor del 7% de las células Brn3b+ no expresan el Brn3a (Nadal-Nicolás et al., 2009). Estos porcentajes parecen ser diferentes en la retina del ratón, ya que el porcentaje de las GCRs marcadas con el Brn3b es más alto que las marcadas con Brn3a (54,05% frente a 44,76%) (Schlamp et al., 2013), en los peces no existe hasta el momento ningún estudio hecho del marcaje de las GCRs usando las proteínas Brn3, pero la diferenciación en el porcentaje de expresión entre especies de mamíferos nos alejó de su uso.

El método de marcaje de las GCRs elegido en este estudio es el método clásico de Nissl con violeta de cresilo, un método sencillo y eficaz que se basa en la tinción del

cuerpo de la célula y en particular al retículo endoplasmático, este método ha sido usado por muchos autores y ha dado muy buenos resultados en teleósteos (Ito y Murakami, 1984; Collin y Pettigrew, 1987; Collin y Pettigrew, 1988; Collin y Partridge, 1996) la única desventaja de este método es que no permite distinguir la población de las GCRs de la población de células amacrinas desplazadas ya que tienen rangos de tamaños celulares que se solapan, pero hemos de tener en cuenta que la proporción verdadera de las células ganglionares contadas por el método de Nissl representa entre el 80 % (Ito y Murakami, 1984) y el 75 % (Collin y Pettigrew, 1988a) del total de las células marcadas, por lo tanto se puede estimar con este método el número total de las GCRs, también hay de saber que la VA se expresa en función de la raíz cuadrada de las densidades celulares, que los errores que se pueden producir al incluir la población de las células no ganglionares (amacrinas desplazadas o gliales) que representan aproximadamente el 20% del total de las células marcadas (Ito y Murakami, 1984; Collin y Shaun, 1988) no contribuía con más del 5% a la VA final estimada (Collin y Pettigrew, 1988c), así como la distribución topográfica y el pico más alto de la densidad de las GCRs permanece relativamente igual incluyendo o no en el conteo de las células amacrinas desplazadas (Collin, 1999).

Para evitar la pérdida de información y sesgo en la estimación que se genera por el método de muestreo, el marcaje de las GCRs se hizo en retinas montadas a plano, como no existe un método perfecto para el conteo celular (Guillery, 2002) nuestro método manual contando cada una de las células, aunque es un poco tedioso y requiero mucho tiempo, pero es más seguro que el conteo automático que puede confundir y contar un artefacto como una célula o contar varias células como una cuando están tocándose.

2. Distribución de las células ganglionares:

El número total de las retinas utilizadas para el estudio de la distribución de las GCRs en las dos especies es un número limitado, pero el hecho de que no haya diferenciación significativa entre ellas respecto a la densidad y la distribución de GCRs contadas garantiza la representatividad de los resultados.

La media del número total de la población de las GCRs obtenida en lubina fue de un 24% mayor que la media de la población de las GCRs obtenida en dorada, pero estadísticamente no existe una diferencia significativa entre ambas especies (t-student, $t_1 = 7,35$; $p = 0,086$) mientras que existe una diferencia significativa entre diferentes

retinas de la misma especie, una diferencia inter-especie en el número total de las GCRs es aceptable ya que puede ser debida a los diferentes tamaños del ojo (collin, 1989).

La utilización de mapas de isodensidad permite determinar de manera objetiva la distribución espacial de la población de las GCRs, los datos obtenidos revelan la distribución de estas células en áreas de máxima densidad en todas las retinas de lubina y dorada, con un pico de alta densidad localizado en la zona temporal periférica en ambas especies. La distribución espacial de las GCRs fue descrita en diferentes especies de teleósteos (Collin y Pettigrew, 1988a, b; Collin y Pettigrew, 1989), en la mayoría de las especies, el pico más alto se encontró en la zona temporal de la retina, también se encontraron especies con zonas duales de alta densidad que suelen ser la zona nasal y la zona temporal, aunque es esta última que suele presentar la máxima densidad. Se observó también en algunas mapas de isodensidad de algunas especies, que aparte de tener un pico más alto en la zona temporal, tienen una línea horizontal "horizontal streak" con altas densidades de células ganglionares.

Los mapas de isodensidad que ilustran las variaciones en la densidad de las GCRs a través de la retina son herramientas valiosas para comprender el significado adaptativo de la retina de los teleósteos según el hábitat y la conducta trófica, para poder entender mejor el papel ecológico y funcional de la especialización topográfica (Hughes, 1977; Collin y Pettigrew, 1988a; Collin y Pettigrew, 1988b).

La zona temporal es una zona que favorece la visión binocular de los peces teleósteos, está especializada en la alimentación, la zona nasal proporciona una información panorámica del entorno, su existencia junto a otro pico temporal permite a los predadores captar presas de movimiento rápido, la existencia de una línea horizontal con densidades altas de GCRs se relacionó con la vigilancia de los depredadores potenciales al nadar en zonas de aguas abiertas, finalmente, una alta concentración en la zona temporal que se extiende a la zona ventral (ventro-temporal) permite al pez teleósteo detectar pequeños organismos que pasan lentamente por enfrente (Collin y Pettigrew, 1988a).

En nuestro estudio, para *Dicentrarchus labrax*, los máximos valores de densidad de las células ganglionares fueron 12.030, 13.150 y 13.945 células/mm² para la retina RL1, RL2 y RL3 respectivamente, las tres se encuentran en la zona temporal periférica extendiéndose hacia la zona dorsal. De allí podemos decir que la lubina tiene una visión

binocular especializada en la alimentación y la detección de presas. Unos plots de alta densidad pero que no lleguen a la densidad del pico máxima se encuentran en la zona dorsal, nasal y ventral y que pueden ayudar a mejorar la visión panorámica del entorno.

Los máximos valores de densidad de las GCRs en *Sparus aurata* fueron 10.276 y 12.789 células /mm² en la retina RD1 y RD2 respectivamente. Los dos picos se localizan como en el caso de lubina en la zona temporal periférica. Por lo tanto podemos decir que la dorada al igual que la lubina es un pez de visión binocular especializada en la detección de alimentación y con unos plots de alta concentración que se distribuyen entre la zona dorsal y ventral, como es el caso para lubina, en dorada también estos plots pueden ayudar a mejorar la resolución del entorno.

Una diferencia en la densidad de las GCs entre áreas, se relacionó con diferencias comparables en el tamaño de los somas (Collin, 1989), lo que sugiere la existencia de diferentes subpoblaciones de células ganglionares en la retina de las dos especies estudiadas.

El campo de mejor visión (visión binocular), ha sido determinado para las dos especies en un ángulo de 50 grados, pero la no existencia de una línea horizontal de alta densidad de las células ganglionares nos lleva a pensar que fuera de este arco las dos especies tienen un umbral muy bajo para la percepción del movimiento y la señalización de cualquier presa o depredador en el entorno, lo que no coincide con el comportamiento trófico de estas especies, porque las dos son depredadores voraces, que se caracterizan por no coger indiscriminadamente cualquier tipo de alimento dentro de su gama aceptable de comida, presentando preferencia por un tipo de comida que otro. Para tener este poder de detección y elección de las presas, para poder ponerse a salvo y protegerse de otros depredadores, se necesita un amplio campo de visión y una buena percepción panorámica del entorno. Y de allí se plantea la siguiente pregunta: ¿cómo pueden estos teleósteos asegurar una protección y poder detectar movimientos y presas en el entorno con tales condiciones de visión?

3. El patrón de distribución de las células ganglionares:

Una parte de nuestro trabajo fue comprobar si la distribución de las GCRs en nuestras retinas examinadas es una distribución mosaica (agrupada), dispersa, o

aleatoria, los datos obtenidos en las dos especies revelan una distribución espacial dispersa y no aleatoria.

No se ha podido determinar un patrón claro de distribución de las GCRs, ya que es una organización espacial muy compleja, pero es importante de saber que es una distribución no aleatoria, ya que una distribución no aleatoria de las neuronas es necesaria para la formación de patrones de conectividad durante el desarrollo (Cameron y Carney, 2000, 2004; Raven et al., 2003).

4. Estimación de la agudeza visual:

El valor de la agudeza visual calculado para *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* a partir de la densidad de las GCRs y de la DNP es de $7,12 \pm 0,29$ Y $7,35 \pm 0,59$ ciclos por grado respectivamente. Este valor varía según el tamaño del ojo. Sin embargo, según Collin y Pettigrew, (1988b) la agudeza visual también depende del hábitat de cada especie, las variaciones en su valor reflejan diversas estrategias de alimentación. Generalmente, para los teleósteos de hábitats “cerrados” como cuevas y bajo salientes de coral, la resolución espacial varía entre 4 ciclos por grado (ej. *Halophryne diemensis*, *Dasson variabilis*) y 14 ciclos por grado (ej. *Cephalopholis miniatus*), para los teleósteos de aguas abiertas, la AV está comprendida entre 7 ciclos por grado (ej. *Parapercis cylindrica*) y 27 ciclos por grado (ej. *Gymnocranius bitorquatus*).

Las especies que se alimentan de organismos incrustantes (ej. *Pomacanthus semicirculatus*) o presas de movimiento lento en o cerca del sustrato (ej. *Halophryne diemensis*, *Amblyglyphidodon curacao*, *Dasson variabilis*) no requieren una alta resolución de objetos distantes, los valores de sus AV oscilan entre 3 y 8 ciclos por grado. Las especies que emboscan a sus presas (ej. *Cephalopholis miniatus*, *Balistoides conspicillum*) o flanquean otros peces como una estratagema para la captura de presas (ej. *Aulostoma chinensis*) poseen valores de AV más altas que oscilan entre 11 y 15 ciclos por grado. En las retina con más de un área de especialización, los valores de la AV varían de un área a otro, lo que puede reflejar la importancia del comportamiento de cada área (ej. *Lethrinus chrysostomus*).

Basándonos en la literatura, como ya hemos explicado anteriormente en el apartado traducción sobre el hábitat y la alimentación de las dos especies estudiadas, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, se puede decir que la AV de estas dos especies

tiene que ser incluida entre 7 y 8 ciclos por grado por dos razones, primero por el hábitat, porque son peces de aguas abiertas del mar mediterráneo y del océano atlántico y segundo por su alimentación, ya que se alimentan principalmente de crustáceos, moluscos, pulpos pequeños y algas que se pueden considerar presas pequeñas de movimiento lento que generalmente colonizan un sustrato. Por lo tanto, la AV estimada en este trabajo, que es aproximadamente unos 7,5 ciclos por grado para las dos especies no se contradice con los datos de la literatura.

5. Cuantificación y distribución de las espínulas y de las cintillas sinápticas:

5.1. El papel desempeñado por las espínulas de los pedículos de los conos a nivel de la retina:

Las espínulas, debido a su tamaño que no exceda los 0,3 micras de largo por 0,1 micras de ancho, la manera más adecuada para su visualización y cuantificación es la microscopia electrónica.

Para el análisis del número de espínulas, algunos autores utilizan la razón espínula por cintilla sináptica introducida por (Wagner, 1980), nosotros en este estudio, hemos utilizado el número de espínulas por pedículo, método usado en los trabajos de (De Juan et al., 1996; De Juan y García, 1998; García y De Juan, 1999) por considerar según Sokal y Rohlf, (1969), que el uso de razón spin/sr presenta una serie de inconvenientes: Una relativa inexactitud; Su distribución no se ajusta a una distribución normal; No aporta datos sobre las dos variables relativas.

Otro inconveniente según García et al (1998), el número de cintillas sinápticas es variable, dependiendo de la especie y de la iluminación ambiental. Por ejemplo, para *Sparus aurata* el número de cintillas sinápticas no se ve afectado por condiciones de luz, mientras que en *Dicentrarchus labrax*, las cintillas sinápticas muestran una disminución llamativa de aproximadamente 50% después de una hora de adaptación a la oscuridad (García et al., 1998), en el ejemplo de *Roccus americana*, el número de cintillas sinápticas muestra una disminución de aproximadamente 25 % después de dos horas de oscuridad, pero en el caso de *Micropterus salmoides*, no se ha demostrado ninguna diferencia en el número de cintillas sinápticas entre luz y oscuridad. Sin embargo, en las dos especies, el número de cintillas sinápticas por pedículo, se disminuye al 50 % en medianoche (García et al., 1998).

Como ya hemos señalado en el apartado introducción, las espínulas presentan una plasticidad marcada dependiendo de las condiciones de luz-oscuridad, muy prominentes en retinas adaptadas a la luz y prácticamente ausente en condiciones de oscuridad (Stell, 1964; Raynauld et al, 1979; Wagner, 1980; Weiler y Wagner, 1984; De Juan y Dowling, 1987; Dowling y Djamgoz, 1989; De Juan et al., 1991, 1996; García y De Juan, 1994; De Juan y García, 1998; De Juan y García, 2001), como también ya hemos explicado anteriormente, cuando las espínulas están ausentes en la retina, las respuestas a la oponencia al color en las células horizontales y las células ganglionares, que dependen del “feedback” de las células horizontales en los terminales del cono, también se suprimen. Existe una correlación entre las respuestas de cromaticidad de las células horizontales y el número de espínulas (Raynaud, et al., 1979; Weiler y Wagner, 1984; Djamgoz et al., 1988, 1989; Kirsh et al., 1990). Sin embargo, ha sido difícil de demostrar un papel en el procesamiento que conduce directamente a la visión del color. Las espínulas no son necesarias para la discriminación de la longitud de onda (Yazulla et al., 1996), ni son necesarias para la transmisión de los señales de luminosidad fotópica a través de la vía ON de la retina. Por lo tanto, aunque la formación de estas estructuras se correlacionó con la adaptación a la luz, su función en la codificación de luminosidad queda todavía indeterminada (Yazulla y al., 1996). Otra posible función, es ocuparse del desenfoque óptico para aumentar la señal de los bordes y contornos, mejorar el contraste de la imagen (Balboa y Grzywacz, 2000). Las espínulas en general han sido consideradas como sitios de doble función, pre- y post-sináptico entre las células horizontales y los pedículos de los conos (Dowling y Djamgoz, 1989), pero la importancia de estas estructuras sigue siendo una incógnita.

En nuestro trabajo, en los terminales sinápticos de los pedículos de los conos de las dos especies, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, la luz provoca la formación de las espínulas, mientras que la oscuridad provoca su desaparición, resultados que confirman los obtenidos por otros autores (Wagner, 1980; Wagner y Douglas, 1983; Weiler y Wagner, 1984, De Juan y Dowling, 1987; Dowling y Djamgoz, 1989).

El número de espínulas por pedículo del cono es variable de una especie a otra, como ejemplo: 5 en *Tinca tinca* y *Carassius auratus*, 6 en *Cyprinus carpio*, 8 en *Roccus americana* (De Juan et al., 1987), 9 en *Salmo gairdneri* (Wagner y Douglas, 1983), 10 en *Micropterus salmoides* (García y De Juan, 1999). En nuestro estudio, la media del número de espínulas por pedículo del cono en *Dicentrarchus labrax* es de

aproximadamente 16 espínulas por pedículo, un valor que es de 44 % mayor que la media del número de espínulas calculado en *Sparus aurata*, que es de aproximadamente unos 9 espínulas por pedículo. El número de espínulas en las retinas adaptadas a la luz de *Dicentrarchus labrax* es de los más altos entre las especies de teleósteos estudiadas hasta el momento. En general, el número de espínulas varía según el grado de depredación (De Juan y García, 1998), lo que confirma nuestros resultados, ya que *Dicentrarchus labrax*, es un pez voraz, con un grado de depredación más elevado que *Sparus aurata*.

Para comprobar si realmente las espínulas juegan un papel en la agudeza visual de los peces teleósteos, se hizo en este estudio, una comparación entre los resultados obtenidos de la distribución de las espínulas y los resultados obtenidos de la distribución de las células ganglionares, células relacionadas con la agudeza visual. Los resultados han sido sorprendentes, la zona de la retina con alta densidad de espínulas es la zona periférica dorso-nasal, zona con baja densidad de GCRs y que se encuentra fuera del campo visual definido para las dos especies, es una zona de baja agudeza visual. De allí podemos decir, que los resultados obtenidos en nuestro estudio, se contradicen con la hipótesis planteada por diferentes autores (Raynauld et al., 1979; Wagner, 1980; Weiler y Wagner, 1984; Djamgoz, 1989; Kirsh et al., 1990; Yazzula et al., 1996), una hipótesis que relaciona la formación de las espínulas con la resolución de la imagen y la agudeza visual. Y de allí, se planteó la pregunta, de porque las espínulas siguen esta distribución con densidades altas en la zona de baja agudeza visual.

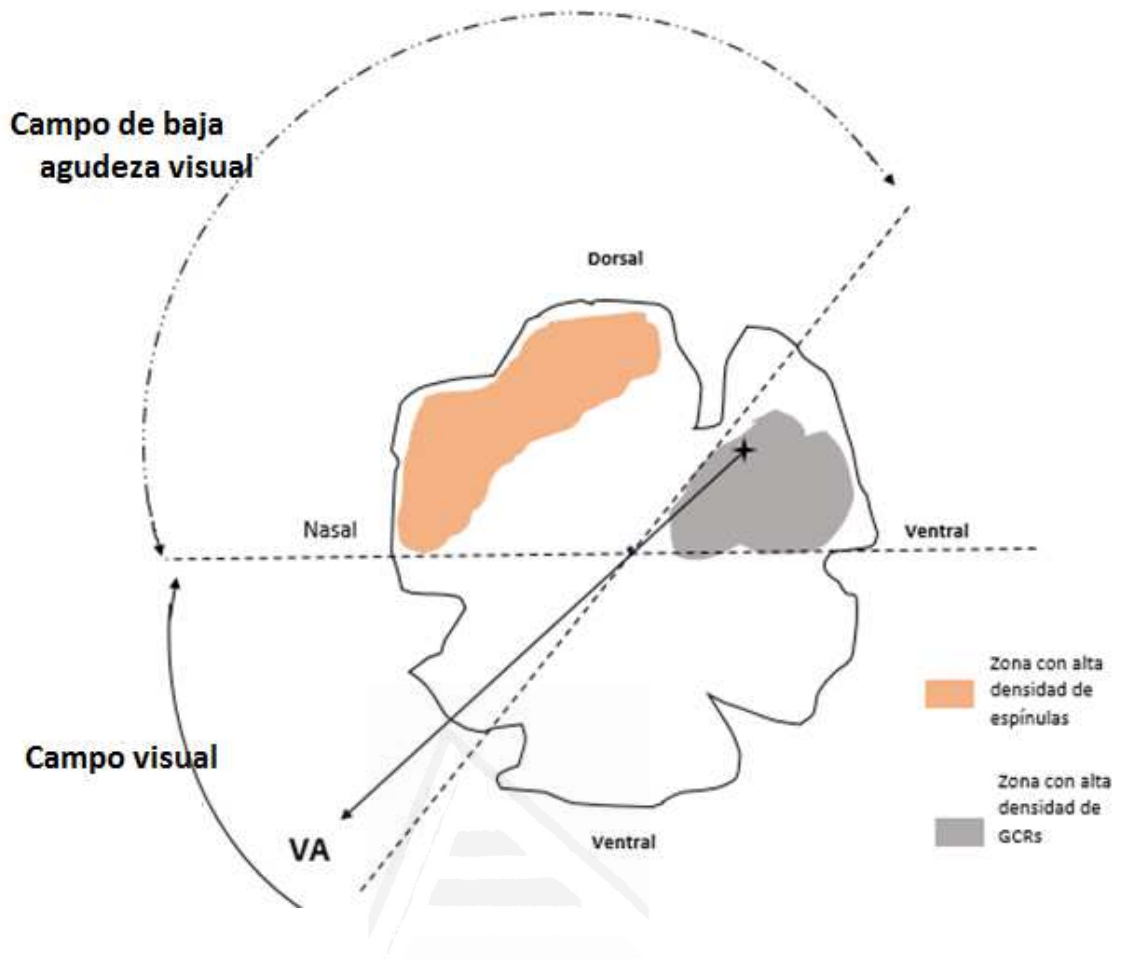


Figura 39: esquema mostrando las zonas de alta densidad de las espínulas y de las células ganglionares para *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, así como su campo de mejor visión, y su campo de baja agudeza visual.

La zona periférica dorso-nasal de la retina, es una zona especializada en la percepción panorámica, permite una visión aguda del entorno para detectar presas y depredadores (Collin y Pettigrew, 1988a). Para nuestras dos especies, esta zona según el estudio de la distribución de las GCRs, no es una zona de alto poder de resolución, pero por las habilidades que tienen estas dos especies de teleósteos para detectar a sus presas y depredadores, es una zona que sigue haciendo su función de detección de todo movimiento en el entorno a pesar de su muy baja agudeza visual. Por todas estas razones, porque la densidad de las espínulas de los pedículos es muy alta en esta zona, podemos considerar estas estructuras, como sensores biológicos de detección de todo movimiento y señalización en el entorno.

5.2. Distribución y cuantificación de las cintillas sinápticas:

Desde los primeros días de investigación usando microscopía electrónica para el estudio de la organización sináptica de los sistemas nerviosos, las grandes conspicuas

estructuras que se han observado en el dominio presináptico de ciertas células sensoriales y algunos tipos de células nerviosas, han estimulado la imaginación de muchos investigadores. Estas estructuras se presentan en diversas formas, pero comparten tres características importantes: todos ellos están rodeados por numerosas vesículas sinápticas claras, por lo general se encuentran en las proximidades de la membrana presináptica, en la mayoría de los casos, comprenden más que un solo elemento postsináptico (Wagner, 1997).

Con la ausencia de herramientas analíticas necesarias para determinar el papel funcional de estas estructuras, una serie de hipótesis se han formulado para explicar el significado de los cuerpos presinápticos en el contexto de la transmisión sináptica. Se han considerado como cintillas transportadoras “conveyor belts”, responsables de transportar las vesículas sinápticas hasta la vertiente presináptica donde liberarían el neurotransmisor (Bunt, 1971), como lugares de almacenamiento de sustancias neurotransmisoras (Osborne y Thornhill 1972), como elementos estructurales diseñados para organizar el complejo patrón de elementos pre y post-sinápticos (Bunt 1971; Gray y Pease 1971; Wagner, 1978), como reguladores de los receptores del transmisor (King y Dougherty, 1982), y finalmente, como una barrera de difusión de los iones presinápticos (Sjöstrand, 1958).

La plasticidad de las cintillas sinápticas se detectó por primera vez en cobayas (Vollrath y Huss 1973) y poco después se confirmó en los pedículos de los conos de un pez sudamericano *Nannacara anómala* (Wagner, 1973).

Posteriormente, cambios morfológicos en los cuerpos sinápticos han sido divulgados en la mayoría de los tipos de las cintillas sinápticas en muchas especies (Vollrath y Seidel 1989). Los cambios más evidentes se refieren a la forma y al tamaño de las cintillas. Sus dimensiones generales muestran diversos grados de alteración, pueden ser tan cortos y llegan a desaparecer, como pueden alargarse llegando al doble de la longitud media (Wagner 1973; Wagner y Ali 1977; Wagner et al 1992).

El número de las cintillas sinápticas también, como ya hemos explicado antes, puede variar o no según las condiciones de iluminación, según la especie. Sin embargo, el estudio de la distribución de estas estructuras en diferentes cuadrantes de la retina de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, muestra que es una distribución al azar. Lo que confirma que no hay correlación entre el número de espínulas y el número de cintillas

sinápticas, ya que un incremento en la densidad de las espínulas en ciertas zonas, no provoca ningún cambio en la densidad de las cintillas sináptica.

Y finalmente, para concluir, la formación de las espínulas implica al sistema nervioso central (Figura 40), está regulada por ritmos circadianos y por diferentes neurotransmisores y neuromoduladores, como: glutamato, dopamina, GABA, GnRH y MF-amida. Un tema donde queda mucho por investigar, como puede ser el estudio de la distribución de los neurotransmisores a nivel de la retina y su correlación con la distribución de las espínulas.

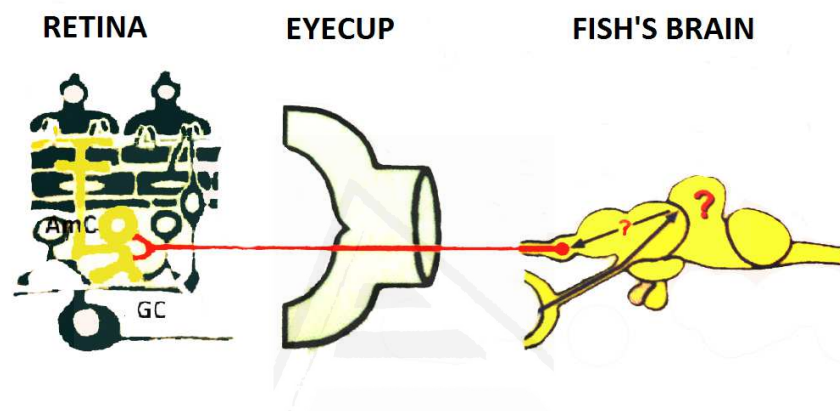


Figura 40: esquema mostrando la estrecha relación entre la retina y el cerebro. Los fotorreceptores transmiten sus señales a través de neuronas bipolares y posteriormente esas señales transitan por un subtipo de células amacrinas antes de llegar a las células ganglionares, que forman el nervio óptico, que las retransmite al cerebro. Amc: célula amacrina; GC: célula ganglionar.

IV. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES

Conclusiones relacionadas con las células ganglionares

Primera:

Las células ganglionares en *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata*, al igual que el resto de los teleósteos recogidos de la literatura, se distribuyen en zonas de máxima densidad con un pico alto en la zona temporal periférica de la retina, lo que sugeriría que estas dos especies de teleósteos tienen visión binocular lo que es una característica de los depredadores.

Segunda:

El campo visual de las dos especies, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* se limita en un arco de 50 grados. Fuera de este campo el umbral de visión es bajo y la percepción panorámica del entorno no está muy desarrollada al no tener densidades altas de células ganglionares en la zona nasal, ni altas densidades en línea horizontal (*horizontal streak*).

Tercera:

La agudeza visual de las dos especies es de aproximadamente unos 7,5 ciclos por grado, dato que no se contradice con la literatura ya que son peces de aguas abiertas, que se alimentan principalmente de crustáceos, moluscos, pequeños pulpos (animales de movimiento lento que se encuentran cerca del sustrato).

Conclusiones relacionadas con las cintillas sinápticas y las espinulas:

Nuestro trabajo es el primero que estudia la distribución de las cintillas sinápticas y de las espinulas y su correlación con la distribución de las células ganglionares retinianas y por lo tanto su correlación con la agudeza visual del pez teleósteo, lo que ha dado lugar a las siguientes conclusiones.

Cuarta:

Las cintillas sinápticas se distribuyen de forma igual entre la retina periférica y central, con diferencias aleatorias entre diferentes cuadrantes de la retina.

Quinta:

Al igual que en otros estudios de nuestro grupo de trabajo, se comprobó que el número de espinulas por pedículo del cono varía de una especie a otra según el grado de depredación.

Sexta:

El número de espínulas por pedículo del cono en *Dicentrarchus labrax* es de los más altos registrados hasta el momento, lo que le convierte en un pez ideal para el estudio de plasticidad sináptica.

Séptima:

La distribución de las espínulas de los pedículos de los conos en *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* presenta un área de alta densidad situada en la zona dorso-nasal periférica, zona de baja densidad de ganglionares y por lo tanto corresponde a zona de baja agudeza visual.

Octava:

Abundando de la conclusión anterior, la distribución de las espínulas no se correlaciona con la distribución de las células ganglionares, por lo tanto su formación no se relaciona con la agudeza visual.

Novena:

Al igual que existen peces depredadores con muy pocas espínulas que utilizan el sistema auditivo para orientarse (datos no publicados de de nuestro grupo de trabajo), es posible que *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* utilizan las espínulas como detectores biológicos en las zonas de la retina con bajo poder de resolución para poder detectar todo movimiento en el entorno, para captar presas y protegerse de los depredadores.

Finalmente, La formación de las espínulas implica al sistema nervioso central, está regulada por ritmos circadianos y por diferentes neurotransmisores y neuromoduladores, como: glutamato, dopamina, GABA, GnRH y MF-amida. Un tema donde queda mucho por investigar, como puede ser el estudio de la distribución de los neurotransmisores a nivel de la retina y su correlación con la distribución de las espínulas.

CONCLUSIONS

Conclusions liées aux cellules ganglionnaires :

Première:

Les cellules ganglionnaires chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*, comme chez tous autres téléostéens vus en littérature, se distribuent en zones de haute densité avec un pic élevé au niveau de la zone temporelle périphérique de la rétine, ce qui suggère que ces deux espèces ont une vision binoculaire, vision caractéristique des prédateurs.

Deuxième :

Le champ visuel de ces deux espèces, *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*, est limitée à un arc de 50 degrés. Hors de ce champ, le seuil de vision ainsi que la perception panoramique de l'environnement sont faibles, puisqu'elles n'ont pas une haute densité de cellules ganglionnaires ni au niveau du quadrant nasale, ni au niveau de la ligne horizontale.

Troisième:

L'acuité visuelle de *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*, est d'environ 7,5 cycles par degré, valeur qui ne contredit pas avec les données de la littérature, puisque ses deux espèces sont des poissons de mer ouverte, qui s'alimentent principalement de crustacés, de mollusques et de petits poulpes.

Conclusions liées à des rubans synaptiques et des spinules :

Notre travail est le premier qui a étudié la distribution des rubans synaptiques et des spinules et leurs corrélations avec la distribution des cellules ganglionnaires au niveau de la rétine des téléostéens, et donc leurs rôles par rapport à l'acuité visuelle chez ce groupe de poissons, ce qui a donné les résultats suivants :

Quatrième:

La densité des rubans synaptiques est la même entre la rétine centrale et la rétine périphérique, et leur distribution entre les différents quadrants de la rétine est aléatoire.

Cinquième:

Comme dans d'autres études de notre groupe de travail, il s'est vérifié que le numéro de spinules par pédicule de cône varie, selon le degré de prédation, d'une espèce à une autre.

Sixième:

Le numéro de spinules par pédicule du cône chez *Dicentrarchus labrax* est l'un des plus

hauts enregistré jusqu'au moment, ce qui rend cette espèce idéale pour les études de plasticité sinapique.

Septième:

Les spinules, chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*, se distribuent en suivant le même patron pour toutes les rétines, avec une haute densité au niveau de la zone dorso-nasale, zone de faible densité ganglionnaire et par conséquent de faible acuité visuelle.

Huitième:

À partir de la conclusion antérieure, on peut dire qu'aucun rapport n'existe entre la distribution des spinules et la distribution des cellules ganglionnaires. Et par conséquent, la formation de ses structures n'est pas liée à l'acuité visuelle.

Neuvième:

comme il existe des poissons prédateurs, avec très peu nombre de spinules, qui utilisent leur système auditif pour s'orienter (des données non publiées de notre groupe de travail), il est possible que *Dicentrarchus labrax* et *Sparus aurata*, utilisent les spinules comme biosenseur aux niveaux des zones de la rétine de faible acuité visuelle, pour pouvoir détecter tout mouvement dans leurs environnement.

Et pour conclure, la formation des spinules impliquent le système nerveux central, elle est régulée par le rythmes circadiens ainsi que par différents neurotransmetteurs et neuromodulateurs, comme : le glutamate, la dopamine, GABA, GnRH et MF-amide. C'est un sujet dont il reste beaucoup à étudier, et une distribution des neurotransmetteurs au niveau de la rétine et sa corrélation avec la distribution des spinules peut donner encore plus d'information sur le rôle joué par ses structures.

CONCLUSIONS

Conclusions related to ganglion cells:

First:

Ganglion cells in the retina of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*, As well as others teleost's data gathered from the literature, reveal increase density near the temporal margin of the retina, which suggest that these two species of teleost have a binocular vision which associated with predation.

Second:

The estimated field of best vision in, *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*, is limited to an arc of 50 degrees. Out of this field, the visual acuity and the panoramic perception of the environment are weak, because these two studied species have no high density of ganglion cells, neither at the peripheral nasal zone of the retina, nor at the horizontal streak.

Third:

The visual acuity of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*, is about 7,5 cycles per degree, this result did not contradict the literature, because this two species studied belong to fishes of the open sea, and their diet consists principally of shellfish, mollusks and small octopuses.

Conclusions related with synaptic ribbons and spinules:

Our work was the first to study the distribution of synaptic ribbons and spinules in teleost fish and their correlation with the distribution of retinal ganglion cells and visual acuity, and the following conclusions were drawn:

Fourth:

the density of synaptic ribbons varies randomly between different quadrants of the retina, but nevertheless, their distribution is the same between peripheral and central retina.

Fifth:

As in other studies of our working group, it was found that the number of spinules per cone pedicle varies from one species to another according to the degree of predation.

Sixth:

Dicentrarchus labrax has one of the highest number of spinules among all teleost species, what makes it the ideal candidate to study synaptic plasticity in fishes.

Seventh:

the pattern of spatial distribution of spinules is the same in the two species studies, *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*, with a high density in dorso-nasal peripheral area, which it is considered as a zone of poor visual acuity, because of its low density of ganglion cells.

Eighth:

From the previous conclusion, we can say that there is no correlation between the distribution of spinules and ganglion cells, and therefore, the formation of this structures is not correlated with visual acuity.

Ninth:

As there exist predatory fishes, with a small number of spinules, which use their auditory system to orient in their environment (data not published by our working group). It is possible that *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* use spinules, by the areas of the retina with weak spatial resolution, as biological sensors to detect movements and signalization in their environment.

VI. ANEXO



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

El contraste K-S para la retina RL1:

Tc: la comparación con una distribución normal de media 15.885 y varianza 2.859 ha resultado no significativo, p-valor = 0.229 ($P > 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 15.88$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.023$ ($P < 0.05$).

Nc: la comparación con una distribución normal de media 9.655 y varianza 2.329 ha resultado significativo, p-valor = 0.0001 ($P > 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 9.655$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.000$ ($P < 0.05$).

Dc: La comparación con una distribución normal de media 9.345 y varianza 1.892 ha resultado significativo, p-valor = 0.0001 ($P < 0,05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 9.345$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 2.99e^{-15}$ ($p < 0.05$).

Vc: La comparación con una distribución normal de media 8.145 y varianza 2.332 ha resultado significativo, p-valor = 0.008 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.144$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.000$ ($P < 0.05$).

Tp: La comparación con una distribución normal de media 5.735 y varianza 0.814 ha resultado significativo, p-valor = 0 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 5.735$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

Np: La comparación con una distribución normal de media 6.351 y varianza 1.89 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 6.351$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

Dp: La comparación con una distribución normal de media 7.69 y varianza 1.665 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($p < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 7.689$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

Vp: La comparación con una distribución normal de media 8.099 y varianza 2.029 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.099$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 1.66e^{-15}$ ($P < 0.05$).

El contraste K-S para la retina RL2:

Tc: La comparación con una distribución normal de media 10.678 y varianza 2.903 ha resultado significativo, p-valor = 0.001 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 10.677$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.000$ ($P < 0.05$).

Nc: La comparación con una distribución normal de media 8.956 y varianza 2.188 ha resultado significativo, p-valor = 0.0003 ($P < 0.05$). La comparación con

una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.955$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.00$ ($P < 0.05$).

Dc: La comparación con una distribución normal de media 10.167 y varianza 2.453 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 10.166$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.000$ ($P < 0.05$).

Vc: La comparación con una distribución normal de media 8.798 y varianza 1.853 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.797$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 3.108e^{-15}$ ($P < 0.05$).

Tp: La comparación con una distribución normal de media 5.921 y varianza 0.876 ha resultado significativo, p-valor = 0 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 5.921$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

Np: La comparación con una distribución normal de media 9.585 y varianza 2.148 ha resultado significativo, p-valor = 0.00123 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 9.585$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.000$ ($P < 0.05$).

Dp: La comparación con una distribución normal de media 7.69 y varianza 1.665 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 7.689$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ es ($P < 0.05$).

Vp: La comparación con una distribución normal de media 8.549 y varianza 1.759 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.549$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

El contraste K-S para la retina RD1:

Tc: La comparación con una distribución normal de media 12.272 y varianza 2.769 ha resultado significativo, p-valor = 0.0451 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 12.272$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.006$ ($P < 0.05$).

Nc: La comparación con una distribución normal de media 8.749 y varianza 2.362 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.748$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.0000$ ($P < 0.05$).

Dc: La comparación con una distribución normal de media 13.734 y varianza 3.098 ha resultado no significativo, p-valor = 0.0596 mayor que 0.05. La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 13.734$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.0009$ ($P < 0.05$).

Vc: La comparación con una distribución normal de media 8.534 y varianza 1.954 ha resultado significativo, p-valor = 0.000165817301663429 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.534$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 1.4226e^{-12}$ ($P < 0.05$).

Tp: La comparación con una distribución normal de media 4.61 y varianza 0.741 ha resultado significativo, p-valor = 0 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 4.610$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

Np: La comparación con una distribución normal de media 7.864 y varianza 1.685 ha resultado significativo, p-valor = 0.0000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 7.863$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0$ ($P < 0.05$).

Dp: La comparación con una distribución normal de media 9.585 y varianza 2.148 ha resultado significativo, p-valor = 0.0012 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 9.585$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 0.000$ ($P < 0.05$).

Vp: La comparación con una distribución normal de media 8.795 y varianza 2.327 ha resultado significativo, p-valor = 0.000 ($P < 0.05$). La comparación con una distribución Poisson de parámetro $\lambda = 8.794$ ha salido positivo, ya que el p-valor, $p = 3.542e^{-12}$ ($P < 0.05$).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

VII. BIBLIOGRAFÍA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.A. & M. Anctil. (1976). Retinas in fish: An atlas. p. 139-170. en S.P. collin & J.N. marshall (eds.). sensory springer, nueva york, EEUU. processing in aquatic environments.
- Ali, M. (1975). Retinomotor responses. *Vision in fishes* (pp. 313-355) Springer.
- Ali, M., Ryder, R., & Anctil, M. (1977). Photoreceptors and visual pigments as related to behavioral responses and preferred habitats of perches (*perca* spp.) and pikeperches (*stizostedion* spp.). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(10), 1475-1480.
- Archer, S. (1999). *Adaptive mechanisms in the ecology of vision* Springer.
- Aznar-Casanova, J. A., Quevedo, L., & Sinnett, S. (2005). The effects of drift and displacement motion on dynamic visual acuity. *Psicologica: International Journal of Methodology and Experimental Psychology*, 26(1), 105-119.
- Aznar-Casanova, J. A., Quevedo, L., & Sinnett, S. (2005). The effects of drift and displacement motion on dynamic visual acuity. *Psicologica: International Journal of Methodology and Experimental Psychology*, 26(1), 105-119.
- Balboa, R. M., & Grzywacz, N. M. (2000). The role of early retinal lateral inhibition: More than maximizing luminance information. *Visual Neuroscience*, 17(01), 77-89.
- Barnstable, C., & Dräger, U. (1984). Thy-1 antigen: A ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience*, 11(4), 847-855.
- Bauchot y Hureau, 1981 :Bauchot, M.-L. and J.-C. Hureau, 1986. Sparidae. p. 883-907. In P.J.P. Whitehead, M.-L. Bauchot, J.-C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.) Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. volume 2. UNESCO, Paris.
- Bauchot y Hureau, 1990 Bauchot, M.-L. and J.-C. Hureau, 1990. Sparidae. p. 790-812. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2.
- Baylor, D. A., Fuortes, M. G., & O'Bryan, P. M. (1971). Receptive fields of cones in the retina of the turtle. *The Journal of Physiology*, 214(2), 265-294.
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. (1998). Estructura del sistema nervioso. *Neurociencia Explorando El Cerebro*. Ed Masson. Barcelona,

- Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R., & Raymond, P. A. (2007). Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial muller glia that function as retinal stem cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(26), 7028-7040. doi:27/26/7028 [pii]
- Besharse, J. C. (1982). The daily light-dark cycle and rhythmic metabolism in the photoreceptor—Pigment epithelial complex. *Progress in Retinal Research*, 1, 81-124.
- Bowmaker, J. K., & Hunt, D. M. (2006). Evolution of vertebrate visual pigments. *Current Biology*, 16(13), R484-R489.
- Bowmaker, J., & Kunz, Y. (1987). Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*salmo trutta*): Age-dependent changes. *Vision Research*, 27(12), 2101-2108.
- Boycott, B., & Wässle, H. (1974). The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *The Journal of Physiology*, 240(2), 397-419.
- Brown, B. (1972). The effect of target contrast variation on dynamic visual acuity and eye movements. *Vision Research*, 12(7), 1213-1224.
- Bunt, S. (1991). Evolution of vision in fishes. *Vision and Visual Dysfunction (2): Evolution of the Visual System*. Edited by JR Cronly-Dillon and RL Gregory. CRC Press, Inc, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, , 398-420.
- Burnside, B., & Nagle, B. (1983). Retinomotor movements of photoreceptors and retinal pigment epithelium: Mechanisms and regulation. *Progress in Retinal Research*, 2, 67-109.
- Cameron, D. A., & Carney, L. H. (2000). Cell mosaic patterns in the native and regenerated inner retina of zebrafish: Implications for retinal assembly. *Journal of Comparative Neurology*, 416(3), 356-367.
- Cameron, D. A., & Carney, L. H. (2004). Cellular patterns in the inner retina of adult zebrafish: Quantitative analyses and a computational model of their formation. *Journal of Comparative Neurology*, 471(1), 11-25.
- Cavallaro, B. E., & Burnside, B. (1988). *Prostaglandins E1, E2, and D2 Induce Dark-Adaptive Retinomotor Movements in Teleost Retinal Cones and RPE*,
- Cervený, K. L., Varga, M., & Wilson, S. W. (2012). Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 328-345.
- Clarke, G. L., & Denton, E. (1962). Light and animal life. *The Sea*, 1, 456-468.

- Claus, F. (1995). Multilingual illustrated guide to the world's commercial warm water fish. *Fishing News Book, Cambridge*.
- Cohen, L. G., Brasil-Neto, J. P., Pascual-Leone, A., & Hallett, M. (1993). Plasticity of cortical motor output organization following deafferentation, cerebral lesions, and skill acquisition. *Advances in Neurology*, 63, 187-200.
- Collin, S. P. (1989). Topographic organization of the ganglion cell layer and intraocular vascularization in the retinae of two reef teleosts. *Vision Research*, 29(7), 765-775.
- Collin, S. P., & Pettigrew, J. D. (1988c). Retinal ganglion cell topography in teleosts: A comparison between nissl-stained material and retrograde labelling from the optic nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, 276(3), 412-422.
- Collin, S. P., & Pettigrew, J. (1988b). Retinal topography in reef teleosts. *Brain, Behavior and Evolution*, 31(5), 269-282.
- Collin, S. P., & Pettigrew, J. D. (1988a). Retinal topography in reef teleosts. II. some species with prominent horizontal streaks and high-density areas. *Brain, Behavior and Evolution*, 31(5), 283-295.
- Collin, S. P., & Pettigrew, J. D. (1989). Quantitative comparison of the limits on visual spatial resolution set by the ganglion cell layer in twelve species of reef teleosts. *Brain Behav.Evol*, 34(3), 184-192.
- Collin, S. (1999). Behavioural ecology and retinal cell topography. *Adaptive mechanisms in the ecology of vision* (pp. 509-535) Springer.
- Collin, S., & Partridge, J. (1996). Retinal specializations in the eyes of deep-sea teleosts. *Journal of Fish Biology*, 49(sA), 157-174.
- Contino, F. (1939). Das auge des argyrolepecus hemigymnus morphologie, bau, entwicklung und refraktion. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 140(2), 390-441.
- Corbera, J., Sabatés, A., & García-Rubies, A. (1996). *Peces de mar de la península ibérica* Editorial Planeta.
- Dann, J. F., & Buhl, E. H. (1987). Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 262(1), 141-158.
- Dauglas, R., & Djamgoz, B. (1990). *The visual system of fish* Chapman and Hal.
- De Juan, J., Iñiguez, C., & Dowling, J. (1990). Influence of dopamine on spinules, synaptic ribbons and nematosomes in white perch retina. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci*, 31, 333.

- De Juan, J., Romero, J., Queiroz, G., & Iñiguez, C. (2007). The size of cone and horizontal cells shows significant changes during light and dark adaptation in teleost retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(13), 52-52.
- De Juan, J., García, M., Pérez, R., & Molina, M. (2000). Influencia del sistema visual en la reproducción de los peces.
- De Juan, J., & Garcia, M. (2001). Spinules and nematosomes in retinal horizontal cells: A "thorny" issue. *Progress in Brain Research*, 131, 519-537.
- De Juan, J., & García, M. (1998). Interocular effect of actin depolymerization on spinule formation in teleost retina. *Brain Research*, 792(1), 173-177.
- De Juan, J., & Pérez, R. (1997). La visión en los peces: Fenómenos de plasticidad sináptica en la retina.
- De Juan, J., García, M., & Cuenca, N. (1996). Formation and dissolution of spinules and changes in nematosome size require optic nerve integrity in black bass (*micropterus salmoides*) retina. *Brain Research*, 707(2), 213-220.
- De Juan, J., In, C., & Dowling, J. E. (1991). Nematosomes in external horizontal cells of white perch (*roccus americana*) retina: Changes during dark and light adaptation. *Brain Research*, 546(1), 176-180.
- De Juan, J., In, C., & Dowling, J. E. (1987). Structural changes in photoreceptor terminals and horizontal cells in the white perch following prolonged dark adaptation. 1987 ARVO. Sarasota, USA.
- Deary, A., & Barlow, R. B., Jr. (1987). Circadian rhythms in the green sunfish retina. *The Journal of General Physiology*, 89(5), 745-770.
- Djamgoz, M., Downing, J., Kirsch, M., Prince, D., & Wagner, H. (1988). Plasticity of cone horizontal cell functioning in cyprinid fish retina: Effects of background illumination of moderate intensity. *Journal of Neurocytology*, 17(5), 701-710.
- Djamgoz, M., Downing, J., & Wagner, H. (1985). The cellular origin of an unusual type of S-potential: An intracellular horseradish peroxidase study in a cyprinid fish retina. *Journal of Neurocytology*, 14(3), 469-486.
- Djamgoz, M., Kirsch, M., & Wagner, H. (1989). Haloperidol suppresses light-induced spinule formation and biphasic responses of horizontal cells in fish (roach) retina. *Neuroscience Letters*, 107(1), 200-204.
- Dogiel, A. (1883). Die retina der ganoiden. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 22(1), 419-472.

- Douglas, R. H., & Hawryshyn, C. W. (1990). Behavioural studies of fish vision: An analysis of visual capabilities. *The visual system of fish* (pp. 373-418) Springer.
- Douglas, R. H., & Wagner, H. (1983). Endogenous control of spinule formation in horizontal cells of the teleost retina. *Cell and Tissue Research*, 229(2), 443-449.
- Dowling, J. (1979). Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. *The Neurosciences Fourth Study Program*, , 163-181.
- Dowling, J. E. (1986). Dopamine: A retinal modulation? *trends in neurosci.* 9:236-240.
- Dowling, J. E., & Boycott, B. B. (1966). Organization of the primate retina: Electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 166(1002), 80-111.
- Dowling, J. E., & Ehinger, B. (1975). Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and cebus monkey retinas. *Science (New York, N.Y.)*, 188(4185), 270-273.
- Downing, J., Djamgoz, M., & Bowmaker, J. (1986). Photoreceptors of a cyprinid fish, the roach: Morphological and spectral characteristics. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 159(6), 859-868.
- Drager, U. C., & Olsen, J. F. (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 20(3), 285-293.
- Dreher, B., Sefton, A. J., Ni, S., & Nisbett, G. (1985). The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats (part 1 of 3). *Brain, Behavior and Evolution*, 26(1), 10-22.
- Drenckhahn, D., & Wagner, H. J. (1985). Relation of retinomotor responses and contractile proteins in vertebrate retinas. *European Journal of Cell Biology*, 37, 156-168.
- Elkin, E. (1962). Target velocity, exposure time and anticipatory tracking time as determinants of dynamic visual-acuity (dva). *Journal of Engineering Psychology*, 1(1), 26-33.
- Fadool, J. M. (2003). Development of a rod photoreceptor mosaic revealed in transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 258(2), 277-290.
- Fiedler, K. (1991). *Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Band II: Wirbeltiere. 2. Teil: Fische.* D. Starck (ed.). Gustav Fischer Verlag, Jena. 498 p. Fischer.
- Frimodt, C. (1995). *Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish.* Fishing News Books Ltd.,.

- Fukuda, Y. (1977). A three-group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Research*, 119(2), 327-344.
- Gallego, A. (1975). Las células horizontales de la retina de los vertebrados. *Real Academia Nacional De Medicina, Instituto De España, Madrid*,
- Gallego, A. (1976). *Comparative study of the horizontal cells in the vertebrate retina: Mammals and birds* Springer.
- Gallego, A. (1971). Celulas interplexiformes en la retina del gato. *Archivos De La Sociedad Española De Oftalmología*, 31(5), 299-304.
- Gallego, A., & Cruz, J. (1965). Mammalian retina: Associational nerve cells in ganglion cell layer. *Science (New York, N.Y.)*, 150(3701), 1313-1314. doi:150/3701/1313 [pii]
- García, M., & De Juan, J. (1999). Fine structure of the retina of black bass, *micropterus salmoides*. *centrarchidae, teleostei*.
- García, M., Guardiola, J., & De Juan, J. (1998). Plasticity of synaptic ribbon and synaptic vesicle density in teleost photoreceptor terminals. *Invest Ophthal Vis Sci*, 39, S1058.
- García, M., Martín, Y., & Nieto, A. (1994). Visión deportiva. *Gaceta Optica*, 273
- Girin, M. (1983). The sparidae: A warmwater finfish family with world-wide mariculture potential. *Proc. of the Warm Water Fish Culture Workshop Spec. Publ*, 3 3-14.
- Gray, E., & Pease, H. (1971). On understanding the organisation of the retinal receptor synapses. *Brain Research*, 35(1), 1-15.
- Hannover, A. (1840). *Ueber die netzhaut und ihre gehirnschicht bei wirbelthieren, mit ausnahme des menschen*
- Heffner, H., & Heffner, R. (1992). Auditory perception. *Farm Animals and the Environment*, 159-184.
- Hughes, A., & Wieniawa-Narkiewicz, E. (1980). A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal ganglion cell layer.
- Hughes, A. (1977). *The topography of vision in mammals of contrasting life style: Comparative optics and retinal organisation* Springer.
- Hureau, J., Bauchot, M., Nielsen, J., & Tortonesi, E. (1986). *Fishes of the north-eastern atlantic and the mediterranean vol. 2* Unesco.
- Hutchins, J. B., & Hollyfield, J. G. (1987). Cholinergic neurons in the human retina. *Experimental Eye Research*, 44(3), 363-375.

- Ito, H., & Murakami, T. (1984). Retinal ganglion cells in two teleost species, *sebastiscus marmoratus* and *navodon modestus*. *Journal of Comparative Neurology*, 229(1), 80-96.
- James, W. (1890). The principles of psychology (vol. 1). *New York: Holt*,
- Jeon, C. J., Strettoi, E., & Masland, R. H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(21), 8936-8946.
- Johns, P. R. (1982). Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2(2), 178-198.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (1997). *Fundamentos da neurociência e do comportamento* Guanabara Koogan.
- Kandel, S., & Schwartz, J. Jessell (2000) principios de neurociencia. *Parte I Neurología De La Conducta. Editorial McGraw-Hill Interamericana*,
- Kino, M., Miayzaki, T., Iwami, T., & Kohbara, J. (2009). Retinal topography of ganglion cells in immature ocean sunfish, *mola mola*. *Environmental Biology of Fishes*, 85(1), 33-38.
- Kirsch, M., Djamgoz, M. B., & Wagner, H. (1990). Correlation of spinule dynamics and plasticity of the horizontal cell spectral response in cyprinid fish retina: Quantitative analysis. *Cell and Tissue Research*, 260(1), 123-130.
- Kolb, H. Midget pathways of the primate retina underly resolution.
- Kolb, H. (1995). Simple anatomy of the retina. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*,
- Kolb, H. (1970). Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: Electron microscopy of golgi-impregnated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 258(823), 261-283.
- Kriete, A., Wagner, H., Haucke, M., Gerlach, B., Harms, H., & Aus, H. (1984). Dreidimensionale rekonstruktion elektronenmikroskopischer serienschnitte zur erfassung synaptischer plastizität. *Mikroskopie (Wien)*, 41, 192-197.
- Kuenzer, D. D. P., & Wagner, H. (1969). Bau und anordnung der sehzellen und horizontalen in der retina von *nannacara anomala* (cichlidae, teleostei). *Zeitschrift Für Morphologie Der Tiere*, 65(2), 209-224.
- Kuwabara, T. (1979). Species differences in the retinal pigment epithelium. *The Retinal Pigment Epithelium*, , 58-82.

- LeConte, J. (1897). *Sight: An exposition on the principles of monocular and binocular vision*. D. Appleton.
- Leifer, D., Lipton, S. A., Barnstable, C. J., & Masland, R. H. (1984). Monoclonal antibody to thy-1 enhances regeneration of processes by rat retinal ganglion cells in culture. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4646), 303-306.
- Levinson, G., & Burnside, B. (1981). Circadian rhythms in teleost retinomotor movement. A comparison of the effects of circadian rhythm and light condition on cone length. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 20(3), 294-303.
- Li, Y. N., Matsui, J. I., & Dowling, J. E. (2009). Specificity of the horizontal cell-photoreceptor connections in the zebrafish (*danio rerio*) retina. *Journal of Comparative Neurology*, 516(5), 442-453.
- Loew, E. R., & McFarland, W. N. (1990). The underwater visual environment. *The visual system of fish* (pp. 1-43) Springer.
- Long, G. M., & Garvey, P. M. (1988). The effects of target wavelength on dynamic visual acuity under photopic and scotopic viewing. *Human Factors*, 30(1), 3-13.
- Ludvigh, E., & Miller, J. W. (1954). *An Analysis of Dynamic Visual Acuity in a Population of 200 Naval Aviation Cadets*,
- Lythgoe, J. N. (1972). The adaptation of visual pigments to the photic environment. *Photochemistry of vision* (pp. 566-603) Springer.
- Mani-Ponset, L., Diaz, J., Divanach-Kentouri, M., & Connes, R. (1993). Structure de la rétine et potentialités visuelles susceptibles d'influer sur le comportement trophique du loup (*dicentrarchus labrax* L.) adulte et an cours de développement. *European Aquaculture Society Special Publication*, 18, 359-372.
- Marc, R. E., & Liu, W. S. (1984). Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells.
- Marshak, D. W., & Dowling, J. E. (1987). Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *Journal of Comparative Neurology*, 256(3), 430-443.
- Masland, R. H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience*, 4(9), 877-886.
- Meyer, R. L. (1978). Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Experimental Neurology*, 59(1), 99-111.
- Miller, J. W. (1958). Study of visual acuity during the ocular pursuit of moving test objects. II. effects of direction of movement, relative movement, and illumination. *Josa*, 48(11), 803-806.

- Molina, R. (2007). La visión em la ballena piloto (*globicephala melas*; traill, 1809). estudio anatómico del globo ocular, análisis de la retina y implicación en la agudeza visual. departamento de biotecnología. *Departamento De Biotecnología.Tese De Doutorado Da Univerdad De Alicante*,
- Moore, G. A. (1944). The retinae of two north american teleosts, with special reference to their tapeta lucida. *Journal of Comparative Neurology*, 80(3), 369-379.
- Moore, G. A., & McDougal, R. C. (1949). Similarity in the retinae of amphiodon alosoides and hiodon tergisus. *Copeia*, , 298-298.
- Morris, A. C., Scholz, T., & Fadool, J. M. (2008). Rod progenitor cells in the mature zebrafish retina. *Recent advances in retinal degeneration* (pp. 361-368) Springer.
- Müller, H. Bau und wachstum der netzhaut des guppy. *Lebistes Reticulatus*,
- Müller, H. (1851). Zur histologie der netzhaut. *Z Wiss Zool*, 3, 234-237.
- Müller, H. (1852). Bemerkungen über den bau und die funktion der retina. *Heinrich Müller's Gesammelte Und Hinterlassene Schriften Zur Anatomie Und Physiologie Des Auges*, , 19-22.
- Müller, H. (1952). Bau und wachstum der netzhaut des guppy (*lebistes reticulatus*). *Zool.Jb*, 63, 275-324.
- Müller, W. (1874). *Über die stammesentwicklung des sehorgans der wirbelthiere*
- Muntz, W. R. (1990). Stimulus, environment and vision in fishes. *The visual system of fish* (pp. 491-511) Springer.
- Muntz, W., & Richard, D. (1982). Photomechanical movements in the trout retina following brief flashes of light. *Vision Research*, 22(5), 529-530.
- Munz, F. (1971). 1 vision: Visual pigments. *Fish Physiology*, 5, 1-32.
- Murakami, M., Yukio, S., Kei, N., Ei-ichi, M., Shu-ich, W., (1982). Gaba-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina. *the japanese journal of physiology*, 32(6), 911-926.
- Muus, B. J., Nielsen, J. G., Dahlstrøm, P., & Nyström, B. O. (1999). *Sea fish*. denmark. 340 p.: Scandinavian Fishing Year Book.
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Alburquerque-Béjar, J. J., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2012). Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats.
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., (2009). Brn3a as a marker of retinal

- ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(8), 3860-3868.
- Nakatsuka, M., Ueda, T., Nawa, Y., Yukawa, E., Hara, T., & Hara, Y. (2006). Effect of static visual acuity on dynamic visual acuity: A pilot study 1. *Perceptual and Motor Skills*, 103(1), 160-164.
- Navarro, N. C. (1988). *Plasticidad sináptica y movimientos retinomotores en los conos y células horizontales de retinas de teleosteos* Universidad de Alicante, Departamento de Ciencias Morfológicas.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world* John Wiley & Sons.
- Ni, S., & Dreher, B. (1981). Morphology of rat retinal ganglion cells projecting to the thalamus and midbrain. *Proc Aust Physiol Pharmacol Soc*, , 12(2) 97P.
- O'Daly, J. A., & Imaeda, T. (1967). Electron microscopic study of wallerian degeneration in cutaneous nerves caused by mechanical injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 17(6), 744-766.
- Otteson, D. C., & Hitchcock, P. F. (2003). Stem cells in the teleost retina: Persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Research*, 43(8), 927-936.
- Parthe, V. (1972). Horizontal, bipolar and oligopolar cells in the teleost retina. *Vision Research*, 12(3), 395-VI.
- Peichl, L. (1989). Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, 286(1), 120-139.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (1996). Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 37(4), 489-500.
- Perry, V. (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*, 6(5), 931-944.
- Perry, V., Henderson, Z., & Linden, R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *Journal of Comparative Neurology*, 219(3), 356-368.
- Perry, V. H. (1979). The ganglion cell layer of the retina of the rat: A golgi study. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 204(1156), 363-375.

- Pottek, M., & Weiler, R. (2000). Light-adaptive effects of retinoic acid on receptive field properties of retinal horizontal cells. *European Journal of Neuroscience*, 12(2), 437-445.
- Quéro, J., Hureau, J., Karrer, C., Post, A., & Saldanha, L. (1990). *Check-list of the fishes of the eastern tropical atlantic*, p. 790-812, volume 2 Junta Nacional de InvestigaçãO Científica e Tecnológica.
- Ramon Y Cajal, S. (1892). *La rétine des vertébrés. la cellule* 9, 119-257
- Ranvier, L. (1882). Sur la structure des cellules du corps muqueux de malpighi. *Compt.Rend.Acad.Sc*, 95, 1374.
- Raven, M. A., Eglén, S. J., Ohab, J. J., & Reese, B. E. (2003). Determinants of the exclusion zone in dopaminergic amacrine cell mosaics. *Journal of Comparative Neurology*, 461(1), 123-136.
- Raynauld, J. P., Laviolette, J. R., & Wagner, H. J. (1979). Goldfish retina: A correlate between cone activity and morphology of the horizontal cell in clone pedicles. *Science (New York, N.Y.)*, 204(4400), 1436-1438.
- Raynauld, J.-P. and Wagner, H.-J. (1978) Goldfish retina: synaptic ribbons and single unit activity correlates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sei.*, 18 (Supp.), 261.
- Rockhill, R. L., Euler, T., & Masland, R. H. (2000). Spatial order within but not between types of retinal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2303-2307.
- Rodieck, R. (1973). *The vertebrate retina. principle of structure and function.*
- Rolls, E., & Cowey, A. (1970). Topography of the retina and striate cortex and its relationship to visual acuity in rhesus monkeys and squirrel monkeys. *Experimental Brain Research*, 10(3), 298-310.
- Schiefferdecker, P. (1886). Studien zur vergleichenden histologie der retina. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 28(1), 305-396.
- Schlamp, C. L., Montgomery, A. D., Mac Nair, C. E., Schuart, C., Willmer, D. J., & Nickells, R. W. (2013). Evaluation of the percentage of ganglion cells in the ganglion cell layer of the rodent retina. *Molecular Vision*, 19, 1387.
- Schmitz, Y., & Kohler, K. (1993). Spinule formulation in the fish retina: Is there an involvement of actin and tubulin? an electronmicroscopic immunogold study. *Journal of Neurocytology*, 22(3), 205-214.

- Scholes, J. H. (1975). Colour receptors, and their synaptic connexions, in the retina of a cyprinid fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270(902), 61-118.
- Schultze, M. (1866). Zur anatomie und physiologie der retina. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 2(1), 175-286.
- Selles-Navarro, I., Villegas-Perez, M. P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gomez, J. M., & Vidal-Sanz, M. (1996). Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(10), 2002-2014.
- Selvi, A. (1966). Morphological studies on the horizontal and amacrine cells of the teleost retina. *Vision Research*, 6(1), 51-59.
- Sharpe, L. T., & Stockman, A. (1999). Rod pathways: The importance of seeing nothing. *Trends in Neurosciences*, 22(11), 497-504.
- Shmitz, F., Kirsch, M., & Wagner, H. (1989). Calcium modulated synaptic ribbon dynamics in cone photoreceptors: A pharmacological and electron spectroscopic study. *European Journal of Cell Biology*, 49(1), 207-212.
- Sjöstrand, F. S. (1976). The outer plexiform layer of the rabbit retina, an important data processing center. *Vision Research*, 16(1), 1-IN4.
- Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaiskou, N., Magoulas, A., Rossi, & Tsigenopoulos, C. (2006). Gilthead seabream—*Sparus aurata*. *Proceedings of the WPI Workshop on Genetics of Domestication, Breeding and Enhancement of Performance of Fish and Shellfish*, Viterbo, Italy, 12-17.
- Stell, W. K. (1967). The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. *American Journal of Anatomy*, 121(2), 401-423.
- Stell, W. K., & Hárosi, F. I. (1976). Cone structure and visual pigment content in the retina of the goldfish. *Vision Research*, 16(6), 647-IN4.
- Stell, W. K., & Lightfoot, D. O. (1975). Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *Journal of Comparative Neurology*, 159(4), 473-501.
- Stell, W. K., Walker, S. E., Chohan, K. S., & Ball, A. K. (1984). The goldfish nervus terminalis: A luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(3), 940-944.

- Stenkamp, D. L. (2011). The rod photoreceptor lineage of teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(6), 395-404.
- Stickney, H. L., Barresi, M. J., & Devoto, S. H. (2000). Somite development in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 219(3), 287-303.
- Stone, J. (1981). *The whole mount handbook: A guide to the preparation and analysis of retinal whole mounts* Maitland Publications.
- Stone, J., & Halasz, P. (1989). Topography of the retina in the elephant loxodonta africana. *Brain, Behavior and Evolution*, 34(2), 84-95.
- Tamura, T. (1957). A study of visual perception in fish, especially on resolving power and accommodation. *Bull.Jap.Sot.Sci.Fish.*22, 536557
- Tamura, T., & Wisby, W. J. (1963). The visual sense of pelagic fishes especially the visual axis and accommodation. *Bulletin of Marine Science*, 13(3), 433-448.
- Tartuferi, F. (1887). *Sulla anatomia della retina* Vincenzo Bona.
- Tauchi, M., Morigiwa, K., & Fukuda, Y. (1992). Morphological comparisons between outer and inner ramifying alpha cells of the albino rat retina. *Experimental Brain Research*, 88(1), 67-77.
- Ullmann, J. F., Moore, B. A., Temple, S. E., Fernandez-Juricic, E., & Collin, S. P. (2012). The retinal wholemount technique: A window to understanding the brain and behaviour. *Brain, Behavior and Evolution*, 79(1), 26-44. doi:10.1159/000332802 [doi]
- Verrier, M. (1928). Recherches sur les yeux et la vision des poissons.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1993). Use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols*, 3(1), 29-33.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Experimental Neurology*, 102(1), 92-101.
- Vilter, V. (1953). Existence d'une rétine à plusieurs mosaïques photoréceptrices, chez un poisson abyssal bathypelagique, bathylagus-benedicti. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, 147(23-2), 1937-1939.
- Voisin, A., Elliott, D. B., & Regan, D. (1997). Babe ruth: With vision like that, how could he hit the ball? *Optometry & Vision Science*, 74(3), 144-146.
- Wagner, H. (1990). Retinal structure of fishes. *The visual system of fish* (pp. 109-157) Springer.

- Wagner, H., & Djamgoz, M. B. (1993). Spinules: A case for retinal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 16(6), 201-206.
- Wagner, H. (1973). Darkness-induced reduction of the number of synaptic ribbons in fish retina. *Nature*, 246(150), 53-55.
- Wagner, H. (1976). Patterns of golgi-impregnated neurons in a predator-type fish retina. *Neural principles in vision* (pp. 7-25) Springer.
- Wagner, H. (1980). Light-dependent plasticity of the morphology of horizontal cell terminals in cone pedicles of fish retinas. *Journal of Neurocytology*, 9(5), 573-590.
- Wagner, H. (1997). Presynaptic bodies ("ribbons"): From ultrastructural observations to molecular perspectives. *Cell and Tissue Research*, 287(3), 435-446.
- Wagner, H., & Ali, M. (1977). Cone synaptic ribbons and retinomotor changes in the brook trout, *salvelinus fontinalis* (salmonidae, teleostei), under various experimental conditions. *Canadian Journal of Zoology*, 55(10), 1684-1691.
- Wagner, H., Behrens, U., Zaunreiter, M., & Douglas, R. (1992). The circadian component of spinule dynamics in teleost retinal horizontal cells is dependent on the dopaminergic system. *Visual Neuroscience*, 9(3-4), 345-351.
- Wagner, H., Speck, P., & Weiler, R. (1982). Computer reconstruction of HRP-injected horizontal cells reveals new connectivity patterns in fish retina. *Naturwissenschaften*, 69(3), 143-145.
- Wagner, H. J. (1978). Cell types and connectivity patterns in mosaic retinas. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 55(3), 3-81.
- Wagner, H. J., & Douglas, R. H. (1983). Morphologic changes in teleost primary and secondary retinal cells following brief exposure to light. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(1), 24-29.
- Wang, S., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Lund, R. D. (2000). Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(2), 537-545.
- Wässle, H., Levick, W., & Cleland, B. (1975). The distribution of the alpha type of ganglion cells in the cat's retina. *Journal of Comparative Neurology*, 159(3), 419-437.
- Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 747-757.

- Wassle, H., & Riemann, H. J. (1978). The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 200(1141), 441-461.
- Website Foa.org. (2015). [Http://www.fao.org/figis](http://www.fao.org/figis) - food and agriculture organization of the united nations (FAO) - fisheries global information system (FIGIS).
- website IGFA.org. (2015). [Http://www.igfa.org](http://www.igfa.org) - international game fish association.
- Weiler, R., Kohler, K., Kirsch, M., & Wagner, H. (1988). Glutamate and dopamine modulate synaptic plasticity in horizontal cell dendrites of fish retina. *Neuroscience Letters*, 87(3), 205-209.
- Weiler, R., & Wagner, H. (1984). Light-dependent change of cone-horizontal cell interactions in carp retina. *Brain Research*, 298(1), 1-9.
- Weiler, R., Schultz, K., Pottek, M., Tieding, S., & Janssen-Bienhold, U. (1998). Retinoic acid has light-adaptive effects on horizontal cells in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7139-7144.
- Whiting, H. T. A. (1969). *Acquiring ball skill: A psychological interpretation* Lea & Febiger.
- Yazulla, S., Lin, Z., & Studholme, K. M. (1996). Dopaminergic control of light-adaptive synaptic plasticity and role in goldfish visual behavior. *Vision Research*, 36(24), 4045-4057.
- Zhang, Y., & Straznicky, C. (1991). The morphology and distribution of photoreceptors in the retina of *bufo marinus*. *Anatomy and Embryology*, 183(1), 97-104.
- Zucker, C. L., & Dowling, J. E. (1987). Centrifugal fibres synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina.
- Zyznar, E., & Ali, M. (1975). An interpretative study of the organization of the visual cells and tapetum lucidum of *stizostedion*. *Canadian Journal of Zoology*, 53(2), 180-196.