



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo embrionario y postnatal de los sistemas visual y
esquelético en aves precociales y altriciales: estudio
comparado**

Guadalupe Álvarez Hernán

**Programa de doctorado en Biología Molecular y Celular, Biomedicina y
Biotecnología**

2020



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo embrionario y posnatal de los sistemas visual y esquelético
en aves precociales y altriciales: estudio comparado**

Guadalupe Álvarez Hernán

**Programa de doctorado en Biología Molecular y Celular, Biomedicina y
Biotecnología**

2020

*La conformidad de los directores de la tesis consta en el original en papel
de esta Tesis Doctoral*

Gervasio Martín Partido Javier de Francisco Morcillo

Joaquín María Rodríguez León

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la que suscribe en el Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y ha sido parcialmente financiada por los siguientes proyectos:

REFERENCIAL DEL PROYECTO: GR15158

ENTIDAD FINANCIADORA: Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional, “Una manera de hacer Europa”. Junta de Extremadura.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Matías Hidalgo Sánchez.

REFERENCIAL DEL PROYECTO: IB18113

ENTIDAD FINANCIADORA: Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional, “Una manera de hacer Europa”. Junta de Extremadura.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Javier de Francisco Morcillo.

REFERENCIA DEL PROYECTO: BFU2007-67540

ENTIDAD FINANCIADORA: Dirección General de Investigación. Ministerio de Educación y Ciencia.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Gervasio Martín Partido.

REFERENCIAL DEL PROYECTO: GR18114

ENTIDAD FINANCIADORA: Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional, “Una manera de hacer Europa”. Junta de Extremadura.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Matías Hidalgo Sánchez.



Consejería de Educación y Empleo

Agradecimientos

En esta etapa de mi vida que ha sido tan importante y enriquecedora para mí, han participado muchas personas que, de forma directa o indirecta, han tenido que sufrir mis explicaciones sobre lo que trata mi tesis o mis “¡mira qué bonita me ha quedado esta inmuno!”. A todas estas personas gracias de todo corazón sin embargo quiero destacar especialmente a algunas de ellas. Y lo haré por orden de autor (guiño guiño).

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres científicos, a Javi, Gerva y Joaquín. A Javier, por ser una persona excelente tanto a nivel académico como personal. Gracias a él he desarrollado esa pasión por la ciencia, ha sabido expresar la curiosidad que tenía dentro y la ha convertido en lo que podéis ver en este manuscrito y más allá. Me ha enseñado cómo combinar la investigación con la enseñanza, cómo motivar a los chic@s y al mismo tiempo a poner los pies sobre la tierra. Tanto él como Gervasio me han acompañado desde el inicio, dando mis primeros pasos en el laboratorio por allá en el 2011 (con mi madre científica Ruth), enseñándome a cuidar con mimo cada experimento, cada texto, cada imagen. Y así poco a poco dejaron que creciera hasta llegar al día de hoy en el que me hago un poquito “más mayor”. Gracias a Gervasio, por su humor y por enseñarme a ser exigente hasta que quede todo bien. Creo que dentro de unos pocos años tendré esa capacidad que tiene él de llegar a un sitio donde hay algo “roto”, darle a un botón y decir “ya está, arreglado”, aunque todavía tengo mucho que aprender de él. Gracias a Joaquín, que llegó en mi “adolescencia” investigadora. Gracias por esos momentazos de risa en el laboratorio (fotaza de una maratón) y otros tantos que han hecho que esto a lo que nos dedicamos sea todavía más chulo a pesar de los días difíciles que nos podemos encontrar. Muchas gracias a los tres, sinceramente podría escribir cien mil cosas sobre vosotros, pero lo quiero resumir en que en un punto de inflexión de mi vida bastante importante esta oportunidad apareció ante mí y ha sido una experiencia maravillosa bajo la dirección de unas personas maravillosas:

Si he visto más lejos, ha sido al pararme sobre los hombros de gigantes que me han guiado. Isaac Newton.

Y continuando con la familia científica, agradecer a mis hermanos científicos, José y Mariu. Gracias a ellos los días han sido más fáciles. Pobrecito José la que ha tenido que aguantar con mis maratones de música Disney y Mamma mía en el labo (karaoke incluido). Muchas gracias por escuchar mis quejas de desesperación cuando algo no salía bien. ¡MEDIA BLANCA YORK! Gracias Mariu por enseñarme truquitos del Word. Gracias a los dos. También me gustaría agradecer a los miembros del área que me han

acompañado en este camino y me han prestado su ayuda cuando lo he precisado y a Alfonso Marzal Reynolds y Eva Rico Leo por el apoyo técnico ofrecido.

Así mismo me gustaría agradecer al Doctor Vellema de la Universidad de Dinamarca por habernos suministrado los embriones e individuos postnatales para poder llevar a cabo este estudio y al servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura por su asistencia y apoyo en gran parte de la experimentación realizada.

Gracias a Ismael y a Elena por contribuir a este trabajo con el procesamiento de las muestras y la consecución de algunos experimentos.

Gracias a mis amigos que han participado de manera directa o indirecta. Gracias a Monti y Pablito por los esquemas tan chulis que me habéis hecho. Gracias a Juanqui, Carmen (mi hermana/esposa) y el resto de “*cosa nostra*” por los ánimos, por esas orejas que siempre estaban dispuestas a escuchar. Gracias a “*los dramitas de Sonia*”, ese grupito tan guay de doctorandos de diferentes disciplinas que se ha formado y que llegó en el momento oportuno y con algunas sorpresas inesperadas. Gracias a mis chic@s de “*desorden mental*” y “*donetes*” que cuando más agobiada estaba hacían una valiosa aparición dando caña a la vida. Gracias a mi “*círculo*” que aun a distancia os habéis preocupado siempre por todo. Gracias a Tere y Pascu, el gallo y sus gallinitas, porque siempre habéis estado ahí y por todo lo que me habéis dado estos años. Os quiero a todos.

Guarda a tu amigo bajo la llave de tu propia vida. William Shakespeare.

Gracias a Javi V. por las gráficas tan bonitas con temática Harry Potter (ais que cuquis) que me ha hecho en ese programa tan complicado llamado R. Gracias por tantas otras cosas y por aparecer en el momento justo ♡.

Para lo último dejo lo más importante, mi familia. Gracias, papá, mamá y gordi. No creo que pueda utilizar las palabras correctas para poder agradeceros todo lo que habéis hecho por mí. Si no me hubieseis apoyado ni siquiera hubiera podido empezar este proyecto tan importante. Habéis sido, sois y seréis los principales autores de los logros de mi vida porque sin vosotros esto no hubiera sido posible. Gracias por acompañarme en el camino de la vida, por ser un ejemplo a seguir y una inspiración y por ello me gustaría deciros:

“Si te amara menos, podría ser capaz de hablar más sobre ello”. Jane Austen.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
1. EL OJO DE LOS VERTEBRADOS	17
1.1. Anatomía	17
1.2. Adaptaciones estructurales del ojo de las aves.....	19
1.3. La retina de vertebrados.....	21
1.4. Análisis del proceso de diferenciación de la retina	28
1.5. Neurogénesis postnatal en vertebrados.....	32
1.6. La muerte celular en el desarrollo.....	35
2. ESTRUCTURA ANATÓMICA DE LAS EXTREMIDADES.....	37
2.1. Desarrollo inicial de las extremidades.....	38
3. FORMACIÓN DE LOS DÍGITOS.....	41
4. OSIFICACIÓN ENDOCONDRA.....	42
4.1. Análisis del proceso de osificación de las extremidades	44
5. LAS AVES COMO MODELO DE ESTUDIO.....	45
5.1. Filogenia de las aves	45
5.2. Espectro altricial-precocial.....	46
5.3. Especies de estudio	49
OBJETIVOS GENERALES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	57
CAPÍTULO 1	69
PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN DE LA RETINA EN AVES ALTRICIALES Y PRECOCIALES.	69
RESUMEN.....	71
INTRODUCCIÓN.....	75
OBJETIVOS.....	81
MATERIALES Y MÉTODOS	85
1. Material de estudio	87
1.1. Diamante zebra de timor (<i>Taeniopygia guttata</i>)	87
1.2. Codorniz (<i>Coturnix coturnix</i>).....	88
1.3. Gallina común.....	89
2. Procesamiento de los especímenes.....	90
2.1. Fijación	90
2.2. Western blotting.....	90
2.3. Inclusión en resina y obtención de secciones.....	91
2.4. Congelación y obtención de secciones.....	91
2.5. Tinción de secciones semifinas	92
2.6. Técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones	92
2.6.1. Inmunofluorescencia simple	93
2.6.2. Inmunofluorescencia doble.....	93
3. Observación de las secciones	95
RESULTADOS.....	97
1. Validación de anticuerpos	99
2. Estudio morfológico y neuroquímico de la retina de individuos recién eclosionados de <i>Taeniopygia guttata</i>	100
3. Estudio morfológico y neuroquímico del proceso de diferenciación de la retina de <i>Taeniopygia guttata</i>	101
4. Estudio inmunohistoquímico de la retina de <i>Coturnix coturnix</i> en individuos recién eclosionados.	103
5. Estudio inmunohistoquímico del proceso de retinogénesis en <i>Coturnix coturnix</i>	104

FIGURAS	107
DISCUSIÓN.....	163
1. Perfil neuroquímico de la retina de <i>T. guttata</i> y <i>C. coturnix</i>	165
2. Gradientes de diferenciación en la retina de aves.....	167
3. La retina de <i>T. guttata</i> y <i>C. coturnix</i> en individuos recién eclosionados	168
4. La retina en desarrollo de <i>T. guttata</i> y <i>C. coturnix</i>	169
ANEXO.....	175
BIBLIOGRAFÍA.....	183
CAPÍTULO 2	191
PATRÓN CRONOTOPOGRÁFICO DE LA ACTIVIDAD MITÓTICA Y DE MARCADORES DE CÉLULAS HORIZONTALES EN LA RETINA DE AVES ALTRICIALES Y PRECOCIALES	191
RESUMEN.....	193
INTRODUCCIÓN.....	197
OBJETIVOS.....	203
MATERIALES Y MÉTODOS	207
1. Material de estudio.....	209
2. Procesamiento de los especímenes	209
2.1. Tinción de secciones semifinas	209
2.2. Técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones.....	209
3. Observación de las secciones.....	210
4. Cuantificación de la densidad de mitosis	210
RESULTADOS.....	211
1. Análisis cualitativo de la actividad mitótica y de la génesis de células horizontales en la retina en desarrollo de <i>T. guttata</i>	213
2. Análisis cualitativo de la actividad mitótica y de la génesis de células horizontales en la retina en desarrollo de <i>C. coturnix</i>	215
3. Análisis cuantitativo de la densidad de mitosis no apicales y mitosis apicales en la retina en desarrollo de <i>T. guttata</i> y <i>C. coturnix</i>	216
FIGURAS	219
DISCUSIÓN.....	251
BIBLIOGRAFÍA.....	257
CAPÍTULO 3	261
MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN LA RETINA EN DESARROLLO DE AVES ALTRICIALES	261
RESUMEN.....	263
INTRODUCCIÓN.....	267
OBJETIVOS.....	273
MATERIALES Y MÉTODOS	277
1. Material de estudio.....	279
2. Procesamiento de los especímenes.....	279
3. Técnica de TUNEL.....	279
4. Observación de las secciones.....	280
5. Cuantificación de la densidad de núcleos TUNEL-positivos	280
RESULTADOS.....	281
1. Las células de la retina de <i>T. guttata</i> mueren por apoptosis.....	283
2. Incidencia de la muerte celular en la región central de la retina en desarrollo de <i>T. guttata</i>	283
FIGURAS	285
DISCUSIÓN.....	297
1. Muerte celular en la retina de <i>T. guttata</i>	299
2. Muerte celular durante la morfogénesis y diferenciación retiniana de <i>T. guttata</i>	299
3. Oleadas de muerte celular en la retina de vertebrados.....	300
4. Marcaje no-específico de la histoquímica de TUNEL	302
BIBLIOGRAFÍA.....	305
CAPÍTULO 4	311

RESUMEN.....	313
INTRODUCCIÓN.....	317
OBJETIVOS.....	323
MATERIALES Y MÉTODOS	327
1. <i>Material de estudio</i>	329
2. <i>Tinción de criosecciones</i>	330
2.1. <i>Tinción tricrómico de Mallory</i>	330
3. <i>Técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones</i>	330
4. <i>Medida de osificación</i>	331
5. <i>Observación de las secciones</i>	331
RESULTADOS.....	333
1. <i>Seguimiento del proceso de osificación en T. guttata</i>	335
2. <i>Seguimiento del proceso de osificación en C. coturnix</i>	336
3. <i>Seguimiento del proceso de osificación en G. gallus</i>	337
FIGURAS	339
DISCUSIÓN.....	371
1. <i>Osificación endocondral durante el desarrollo</i>	373
BIBLIOGRAFÍA.....	379
CONCLUSIONES GENERALES	383
ARTÍCULOS	387

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonuceico

AER: cresta apical ectodérmica

ANZ: zona necrótica anterior

BMP: proteína morfogenética del hueso c: central

CCG: capa de células ganglionares

CNb: capa neuroblástica

CNE: capa nuclear externa

CNI: capa nuclear interna

cp: centro-periferia

CPE: capa plexiforme externa

CPI: capa plexiforme interna

D: dorsal

DAB: diamino-benzidina

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol Dc: dorso-central

Dcp: dorso-centro-periférico

Dv: dorso-ventral

EFO: estrato de fibras ópticas

En1: *engrailed 1*

EP: epitelio pigmentario

Est: estadio

Fgf: factor de crecimiento fibroblástico

FGFR: receptor de factor de crecimiento fibroblástico

Grem1: gremlin 1

HH: Hamburger y Hamilton

IHH: indian hedgehog

INZ: zona necrótica del interdígito MEC: matriz extracelular

MLE: membrana limitante externa

MLI: membrana limitante interna

NGF: factor de crecimiento nervioso

OP: opaque patch

p: periferia

PBS: tampón fosfato salino

PBS-G-S: PBS-gelatina-sacarosa

PBS-G-T: PBS-gelatina-tritón

PBS-G-T-L: PBS-gelatina-tritón-lisina

PBS-T: PBS-tritón

PCD: muerte celular programada

PFA: paraformaldehído

PNZ: zona necrótica posterior

SHH: sonic hedgehog

SNC: sistema nervioso central

TBS: tampón tris salino

TBS-T: TBS-Tween

V: ventral

Vc: ventro-central

Vcp: ventro-centro-periférico

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

Vp: ventro-periférico

ZMP: zona marginal proliferativa

ZPA: zona de actividad polarizante

Resumen General

El desarrollo embrionario constituye una serie de procesos que han sido ampliamente estudiados tanto en invertebrados como vertebrados. El estudio de la morfogénesis y diferenciación de diferentes tejidos y órganos en las diferentes clases de vertebrados ha permitido conocer el por qué al final del desarrollo cada clase presenta unas estructuras o no. Además, el conocimiento de este proceso permite determinar el porqué de ciertas anomalías anatómicas que presentan algunos individuos al nacer e impulsar la realización de estudios para así poder mejorar la calidad de vida. Dentro de cada clase, dependiendo de la especie, también se pueden encontrar diferencias en el desarrollo. En la clase de las aves existe un espectro altricial-precocial, como ocurre en otras clases como los peces, que marca los distintos grados de maduración. Las aves precociales son aquellas que nacen con el sistema visual y esquelético desarrollados. Por otro lado, las altriciales nacen ciegas y con la capacidad locomotora en las extremidades inmadura debido a que el proceso de osificación no se ha completado en el momento de la eclosión. El grado de maduración de las diferentes estructuras está a su vez relacionado con el comportamiento de manera que, las especies precociales presentan una carga parental menor que la de las altriciales. Así mismo, dentro de las especies de aves precociales, existe un grado de precocialidad dependiendo del ambiente al que van a estar sometidos los individuos. En las aves, los estudios relacionados con la biología del desarrollo se han llevado a cabo principalmente en la gallina (*Gallus gallus*), un ave precocial. En la presente tesis hemos seleccionado como modelos de estudio un ave altricial, el diamante cebrado de Tímor, *Taeniopygia guttata* y un ave precocial, la codorniz, *Coturnix coturnix* para llevar a cabo un estudio comparativo en el que pudimos observar las diferencias existentes durante el desarrollo del sistema visual y esquelético. Ambos sistemas son de gran importancia para estas especies a la hora de relacionarse con su ambiente. Estudios llevados a cabo en otras clases de vertebrados han puesto de manifiesto que las especies altriciales presentan un desarrollo retrasado con respecto a las precociales llegando a extenderse a estadios posteriores al nacimiento. En la presente tesis se han llevado a cabo técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas utilizando marcadores de proliferación, marcadores tempranos de diferenciación, marcadores de subpoblaciones de células ya diferenciadas en la retina y de marcadores implicados en la condrogénesis y osteogénesis en las extremidades. Esto nos ha permitido determinar que tanto el desarrollo del sistema visual como el esquelético se encuentra retrasado en *T. guttata* con respecto a *C. coturnix* y a *G. gallus* (descrito en trabajos anteriores). Además de esto, se ha observado que entre las especies de ave precociales *C. coturnix* y *G. gallus* existe una ligera diferencia en la temporalidad del desarrollo de las extremidades debido posiblemente a que el grado de precocialidad de la



codorniz es menor a la de la gallina. Ya que en el diamante cebrado de Tímor su desarrollo se extiende a estadios perinatales, se ha podido observar que la actividad proliferativa es elevada en el momento de la eclosión y existe una intensa neurogénesis postnatal durante la primera semana de vida. Esto no ocurre en la codorniz ni en la gallina, que al nacer apenas tienen unas pocas células proliferativas que han quedado restringidas a la zona marginal proliferativa. Estudios previos han relacionado la maduración postnatal del sistema nervioso con el aprendizaje en estas especies. La presencia de células en diferenciación, la intensa actividad proliferativa y la detección de una elevada cantidad de muerte celular en la retina en el momento de la eclosión además de la presencia de tejido condrogénico que todavía no ha sido sustituido por tejido óseo en las extremidades postula al diamante cebrado de Tímor como un buen modelo para llevar a cabo estudios de neurogénesis postnatal

Introducción General



1. El ojo de los vertebrados

1.1. Anatomía

El ojo es el órgano fotorreceptor de los vertebrados superiores. La luz, tras atravesar una serie de tejidos especializados, acaba llegando a la región sensitiva, la retina. Allí, los estímulos luminosos son transformados en estímulos químicos que se transmiten en forma de impulsos nerviosos al cerebro. El globo ocular es una esfera que está formada por tres capas, la esclerótica, la coroides y la retina (Edward y Kaufman, 2003; Kierszenbaum y Tres, 2020) (Fig. 1).

- Esclerótica: representa la mayor parte de la capa fibrosa externa del globo ocular. Compuesta por haces de tejido conjuntivo y fibras elásticas que proporcionan una gran consistencia, lo que permite mantener la morfología del ojo. En la parte delantera se localizan las inserciones de los músculos extrínsecos del ojo, mientras que en el polo posterior se encuentra la salida del nervio óptico y los vasos que irrigan la retina. En la región anterior, la esclerótica se curva y se transparenta dando lugar a la córnea, que es la principal lente del ojo en animales terrestres.
- Coroides: capa intermedia localizada entre la esclerótica y la retina. Presenta en su estructura gran cantidad de vasos sanguíneos que le confieren un color pardusco. Su principal función consiste en hacer llegar nutrientes a la retina, el cuerpo vítreo y el cristalino. La coroides podría considerarse como la parte posterior de la úvea, formada, además, esta estructura por el iris y el cuerpo ciliar en su parte anterior. El iris se sitúa detrás de la córnea y delante del cristalino y está compuesto por tejido muscular que proporciona color a nuestros ojos. En su centro está perforado por una abertura circular que se denomina pupila. El diámetro de la pupila varía gracias a la acción del músculo esfínter de la pupila controlando así la cantidad de luz que entra en el ojo. Por otro lado, el cuerpo ciliar está formado por el proceso ciliar y el músculo ciliar. El proceso ciliar es el encargado de producir el humor acuoso para mantener la anatomía y fisiología del segmento anterior del ojo mientras que el músculo ciliar se ancla al cristalino y regula su funcionamiento.



Introducción general

- Retina: capa sensitiva más interna del ojo. Es una estructura compleja, constituida por una serie de estratos de distintos tipos celulares (ver más adelante). En la región central de la retina, situada en la cámara posterior del ojo, existe una región anatómica denominada mácula central, que presenta un menor grosor que el resto de la retina y en la que encontramos únicamente conos (ver más adelante). Su región central se denomina fovea central, donde también encontramos la foveola, el punto de máxima sensibilidad luminosa donde se procesa la visión diurna. Adyacente a la fovea encontramos el punto ciego, zona desprovista de células y que corresponde a la salida del nervio óptico, donde encontramos todos los axones que provienen de las células ganglionares (ver más adelante). La porción más anterior y periférica de la retina se denomina *ora serrata* que presenta un borde dentado y que pone en contacto la retina con el cuerpo ciliar.
- Detrás del iris, nos encontramos con el crystalino, una lente biconvexa y transparente formada por una serie de laminillas concéntricas. Se ancla a los músculos ciliares por unos filamentos. Actúa como una segunda lente situada tras la córnea, haciendo un ajuste fino del enfoque de los rayos de manera que formen la imagen sobre la mácula. La acomodación se produce debido al cambio de la morfología del cristalino por acción del músculo ciliar en vertebrados terrestres y por movimientos en el eje antero-posterior en vertebrados acuáticos.

Por otro lado, entre el cristalino y la retina nos encontramos una cámara interna que contiene el humor vítreo, de consistencia gelatinosa y que ocupa la cavidad posterior del globo ocular dándole consistencia y ayudando a mantener la morfología.

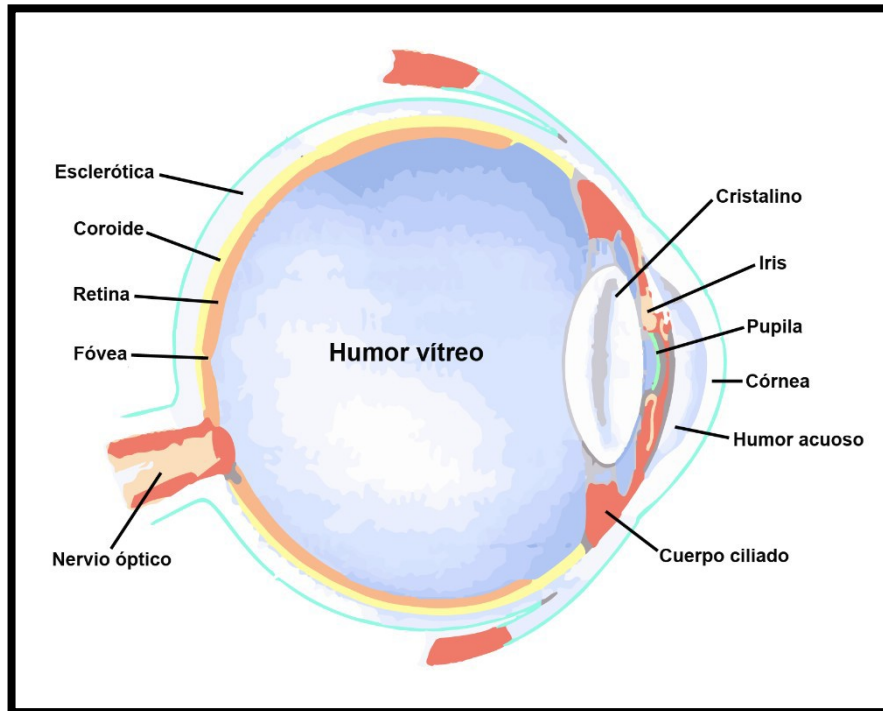


Figura 1. Esquema que muestra las estructuras anatómicas por las que está formada el ojo de vertebrados. Realizado por Pablo Pocostaes González.

1.2. Adaptaciones estructurales del ojo de las aves

La estructura anatómica general descrita en el apartado anterior para el ojo de vertebrados es prácticamente aplicable a las aves salvo en algunos aspectos. El ojo de las aves es relativamente más grande y menos esférico. Estos vertebrados giran su cuello para así poder abarcar la totalidad del campo visual, por lo que la movilidad de sus ojos está más restringida. La retina tiene una gran cantidad de conos y bastones (ver más adelante). En las aves diurnas se puede observar una retina predominante en conos, mientras que, en aves nocturnas, los bastones son más numerosos.

El pecten es una estructura anatómica exclusiva del ojo de aves, si bien en algunos reptiles existe un órgano similar denominado *conus papillaris*. Se encuentra, inmerso en el humor vítreo y cercano al nervio óptico. Esta estructura está muy vascularizada, proporcionando nutrientes y oxígeno al vítreo y por difusión a la retina. Por otra parte, para reforzar y enfocar el globo ocular, en aves aparece un anillo esclerótico que está formado por huesos laminares (Hickman, 2009).

La localización de los ojos en la cabeza de vertebrados está relacionada con la amplitud del campo de visión y la percepción de la profundidad. Cuando los ojos se sitúan lateralmente, cada uno de ellos explora parte del entorno y el campo de visión en todo



momento es muy amplio. Este tipo de visión se denomina monocular y aparece normalmente en animales presa que deben evitar a los depredadores. Por otro lado, existe la visión binocular, que es aquella en la que los campos de visión se superponen (en aves hay 70° de superposición). En este caso los ojos se dirigen hacia delante, disposición anatómica típica de animales depredadores. Además, este tipo de visión permite ver la profundidad de los objetos. Para localizar a sus presas con mayor precisión, las aves con una visión binocular tienen la fovea localizada en una profunda depresión e incluso hay algunas especies que tienen dos foveas, una central para visiones monoculares agudas y una posterior para la visión binocular.

Las aves también han especializado su sistema visual para adaptarse al medio aéreo y al medio acuático. Como sabemos, el agua contiene partículas disueltas y en suspensión que pueden impedir la transmisión de la luz. En el mar, la visión está limitada a unos 30 metros aproximadamente mientras que en aguas dulces turbias disminuye hasta 1 ó 2 metros. Esto ha llevado a que los vertebrados terrestres enfoquen mediante cambios en la forma del cristalino, lo que difiere de los peces que cambian la posición del mismo. En algunas especies de aves costeras se han desarrollado unos osículos esclerales y unos músculos ciliares especializados para así poder acomodar el cristalino permitiéndoles cazar a sus presas debajo del agua. Los músculos ciliares, excepcionalmente largos, y los elementos esclerales fuertemente osificados, forman un anillo rígido alrededor de la córnea. Por otra parte, la mayoría de las aves dominan el medio aéreo, con un índice de refracción diferentes al de los tejidos oculares, por lo que cuando la luz atraviesa la córnea se refracta de forma brusca. El cristalino juega un papel importante ya que se encarga de realizar un ajuste fino de la refracción de la luz, permitiendo un enfoque correcto de la misma sobre la retina (Kardong, 2007).

Como se ha comentado con anterioridad, las aves presentan un tamaño del ojo muy grande si lo comparamos con el tamaño de la cabeza. Mientras que en humanos los ojos ocupan aproximadamente un 5% del volumen craneal, en aves, normalmente, ocupan un 50%. Por otro lado, la morfología ocular también es muy diversa entre las diferentes especies de aves (Fig. 2). En pájaros que presentan una visión poco aguda y sólo precisan detectar la presencia de depredadores, la forma del ojo es de tipo aplanado (como en codorniz y gallina) (Fig. 2A). En aves de presa, la visión debe ser aguda y su forma ocular es globosa, lo que les permite formar una imagen más grande en la retina para poder así localizar presas pequeñas (Fig. 2B). En el caso de las aves nocturnas, la forma del ojo es tubular para poder reunir la mayor cantidad de luz en un entorno oscuro (Shimizu, 2009) (Fig. 2C).

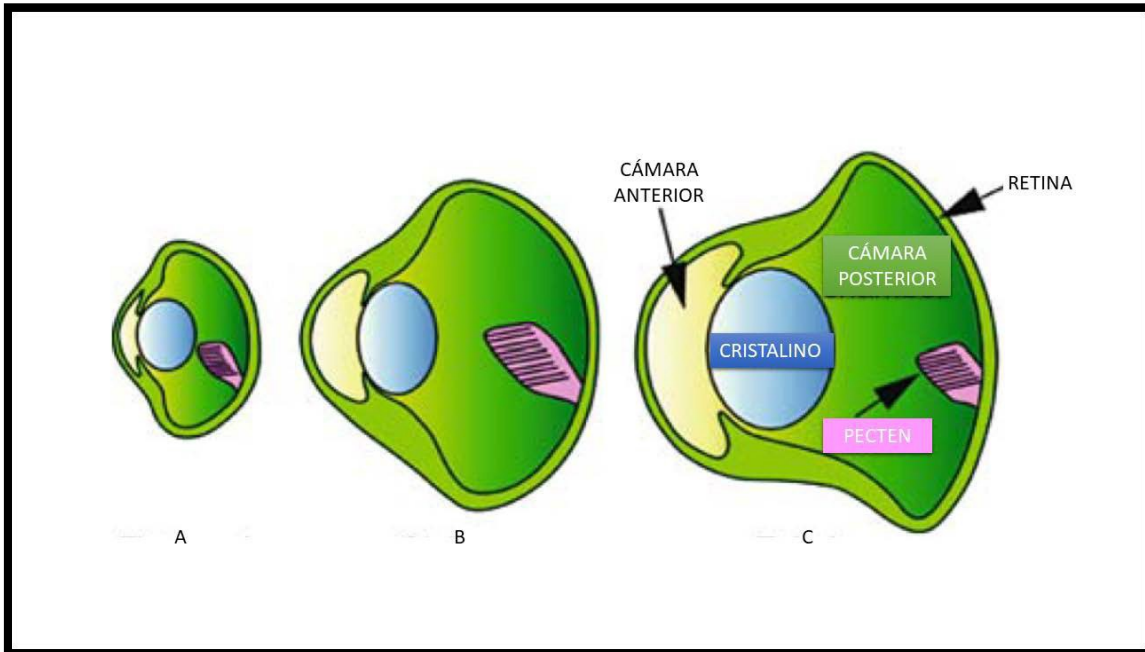


Figura 2. Esquema de los tipos de ojo en aves. **A.** Ojo aplanado propio de aves presa. **B.** Ojo globoso propio de aves depredadores. **C.** Ojo tubular propio de aves nocturnas. Adaptado de la enciclopedia de neurociencia (Shimizu et al., 2009).

1.3. La retina de vertebrados

Como se ha mencionado con anterioridad, la retina es la capa sensitiva más interna del ojo y se encarga de recibir las señales luminosas para transformarlas en impulsos nerviosos que son enviados al encéfalo donde serán procesadas. Presenta una estructura bastante conservada en vertebrados, con una disposición en capas donde se sitúan una serie de neuronas y células gliales que procesan la información captada por los fotorreceptores.

1.3.1. Histología de la retina

La retina se divide en dos capas, una más externa que constituye la retina pigmentaria, y una más interna que constituye la retina neural (Reichenbach y Bringmann, 2013; Kierszenbaum y Tres, 2020). La primera se denomina epitelio pigmentario (EP) y consiste en una capa de células cuboideas con un citoplasma que contiene una gran cantidad de vesículas que están cargadas de melanina. Sus células poseen diversas prolongaciones digitiformes en su cara interna que contactan con los fotorreceptores de la retina neural. El EP es el encargado de absorber el exceso de luz que se adentra en la cámara ocular y que no puede ser procesado por los fotorreceptores. Por su parte, la retina neural se organiza en capas histológicas en las que se distribuyen diferentes tipos celulares (Vecino et al.,



2016) que, descritas desde la región más externa (escleral) a la más interna (vítrea), son (Fig. 3):

- **Capa nuclear externa (CNE)**, en la que encontramos dos tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones. Ambos tipos celulares presentan un segmento interno constituido por el núcleo y la mayor parte de los orgánulos celulares. También presentan un segmento externo especializado que se adentra entre las prolongaciones digitiformes del EP. En los bastones, los segmentos externos son largos y cilíndricos mientras que en conos son más cortos y de morfología cónica. En la región de los bastones aparecen los denominados discos membranosos que contienen los pigmentos sensibles a la luz. Sin embargo, en los conos se observa la ausencia de estos discos, siendo sustituidos por múltiples repliegues de la membrana plasmática. Los fotorreceptores son los encargados de responder a la luz en función de los pigmentos que presenten. Los bastones tienen un pigmento llamado rodopsina que les hace responsables de la visión escotópica, es decir, la que se realiza en condiciones de baja luminosidad (Reichenbach y Bringmann, 2013). En los conos encontramos tres tipos de opsinas con mayor sensibilidad hacia longitudes de ondas largas (luz roja), medias (luz verde) y cortas (luz azul) (Kolb et al., 2001). Estos tres tipos de opsinas hacen responsables a los conos de la percepción del color en condiciones de elevada luminosidad, la denominada visión fotópica. En la transición entre el segmento interno y externo, existe una lámina continua que está formada por los pies de las células de Müller (ver más adelante) denominada membrana limitante externa (MLE) y que es considerada otro componente a tener en cuenta en la estratificación de la retina.
- **Capa plexiforme externa (CPE)**, que está constituida exclusivamente por los axones de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales y bipolares. Es una capa sin somas en la que básicamente encontramos sinapsis (Kolb et al., 2001).
- **Capa nuclear interna (CNI)**, en la que se hayan los somas de tres poblaciones de interneuronas: las células horizontales, las células bipolares y las células amacrinas. Además, esta capa también alberga los somas de las células de Müller, de naturaleza glial. Las dendritas y axones de las células horizontales, como se ha comentado con anterioridad, se ramifican sólo en la CPE. En este



tipo celular predominan las sinapsis GABAérgicas de inhibición lateral (Reichenbach y Bringmann, 2013), actuando sobre los terminales de los receptores y las dendritas de las células bipolares (Marc y Liu, 1984; Marshak y Dowling, 1987). Las células bipolares tienen una función de transmisión radial de los estímulos desde los fotorreceptores a las células ganglionares (Werblin y Dowling, 1969). Las células amacrinas presentan axones y dendritas que modulan la información cedida a las células ganglionares por parte de las células bipolares y amacrinas vecinas. Por su parte, las células de Müller son de naturaleza glial y se disponen radialmente, ocupando casi todo el espesor de la retina neural.

- **Capa plexiforme interna (CPI)**, capa desprovista de núcleos en la que encontramos los terminales axónicos de las células bipolares, las prolongaciones de las células amacrinas y las dendritas de las células ganglionares (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Capa de células ganglionares (CCG)**, que contiene los somas de las células ganglionares, las cuales reciben sinapsis excitadoras e inhibitoras de las células bipolares y sinapsis excitadoras o inhibitoras de las células amacrinas (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Estrato de fibras ópticas (EFO)**, la capa más interna de la retina, que está constituida por los axones de las células ganglionares. Estos axones se agregan para abandonar el ojo por la cabeza del nervio óptico, y formar estructuras neurales como los nervios ópticos, quiasma óptico y tractos ópticos, llevando la información del estímulo visual hasta los centros investigadores del cerebro. El EFO se separa del cuerpo vítreo por una fina lámina, la membrana limitante interna (MLI) que se forma a partir de los pies de las células de Müller (Reichenbach y Bringmann, 2013).

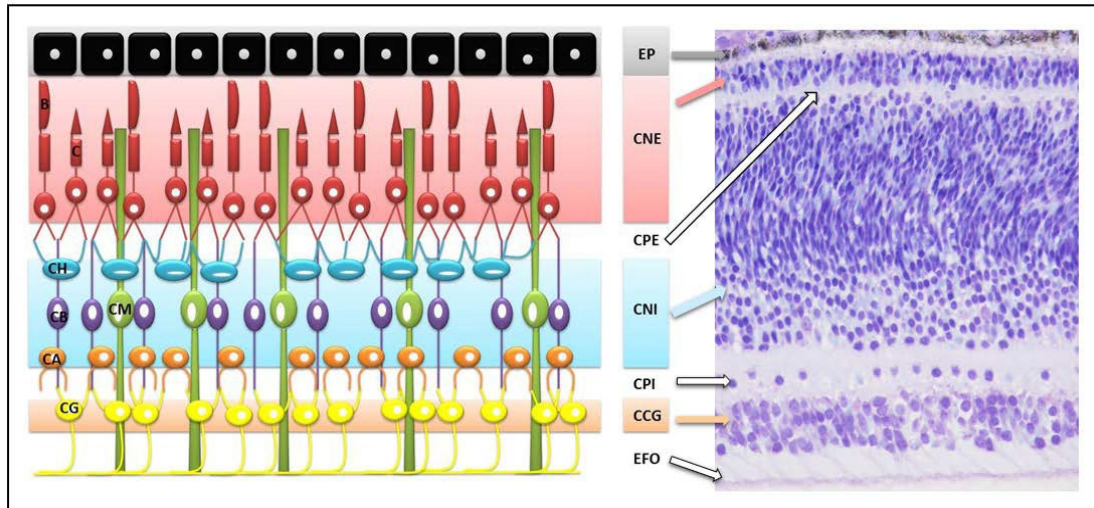


Figura 3. Organización histológica de la retina de vertebrados. A la izquierda se observa un esquema que representa las principales capas de la retina, así como los tipos celulares que encontramos en la misma. A la derecha se muestra una sección de la retina teñida con azul de toluidina en la que las diferentes capas se reconocen fácilmente. Esquema y foto realizados por Guadalupe Álvarez Hernán.

1.3.2. Desarrollo embrionario de la retina

La retina de vertebrados se desarrolla a partir de una porción del prosencéfalo que posteriormente se diferencia en diencéfalo embrionario (Heavner y Pevny, 2012). En la parte anterior ventral de esta porción del sistema nervioso central (SNC) y a cada lado de la línea media, se producen dos evaginaciones que dan lugar a las vesículas ópticas (Fig. 4A). Con el avance del desarrollo embrionario, estas vesículas establecen contacto con el ectodermo cefálico donde se induce la formación de la placoda del cristalino (Fig. 4B). La hoja más distal de la vesícula óptica sufre una invaginación secundaria y, en esta fase, el esbozo óptico pasa a denominarse copa óptica (Fig. 4C). Esta invaginación progresa hasta obliterar la cavidad que quedaba entre ambas hojas de tejido. La hoja más externa de la copa óptica no se diferencia a tejido nervioso, sino que se transforma en un epitelio conformado por células poligonales. Estas células presentan abundantes invaginaciones en su cara externa, y numerosas y largas prolongaciones en su cara interna que contactan con la retina neural. Constituirán el EP de la retina. La hoja de tejido interna de la copa óptica constituye el neuroepitelio de la retina neural (Fig. 4D) (Gilbert, 2005). Tanto la vesícula óptica como la copa óptica permanecen unidas al encéfalo por el tallo óptico, el cual se transforma en el nervio óptico cuando es invadido por los axones de las células ganglionares (Adler y Canto-Soler, 2007).

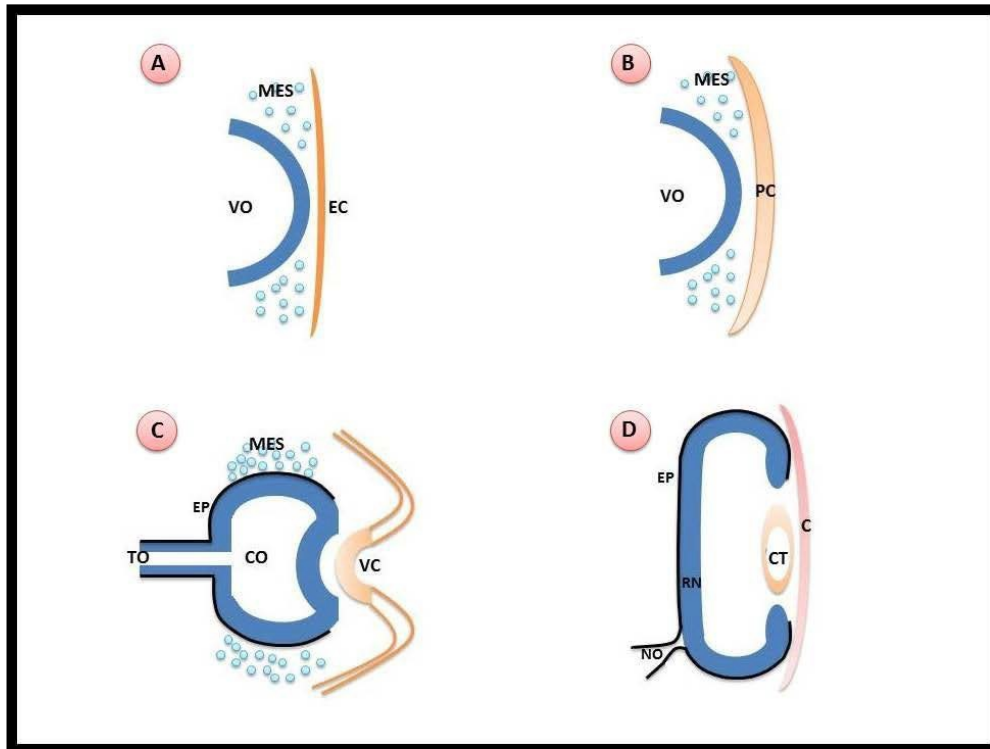


Figura 4. Esquema de las etapas del desarrollo del ojo en vertebrados en las que se observan las sucesivas apariciones de la vesícula óptica (A,B), copa óptica (C), vesícula del cristalino (C), cristalino y retina (D). C, córnea; CO, copa óptica; CT, cristalino; EC, ectodermo; EP, epitelio pigmentario; MES, mesénquima; NO, nervio óptico; PC, placoda del cristalino; RN, retina neural; VC, vesícula del cristalino; VO, vesícula óptica; TO, tallo óptico. Tomado de Álvarez-Hernán et al., 2018-libro.

1.3.3. Retinogénesis

La retina neural presuntiva está formada por un neuroepitelio pseudoestratificado de células multipotentes proliferativas que presentan prolongaciones que contactan con las caras vítrea y ventricular del epitelio. El núcleo de estas células realiza migración nuclear intercinética, un mecanismo por el que se desplaza desde la zona ventricular a la vítrea y viceversa coordinándose este desplazamiento con el ciclo celular (Fig. 5). Durante la fase de síntesis de ADN (fase S), el núcleo se sitúa en la región vítrea, mientras que en la fase de división (fase M), se localiza cercano a la superficie ventricular (Heavner y Pevny, 2012).

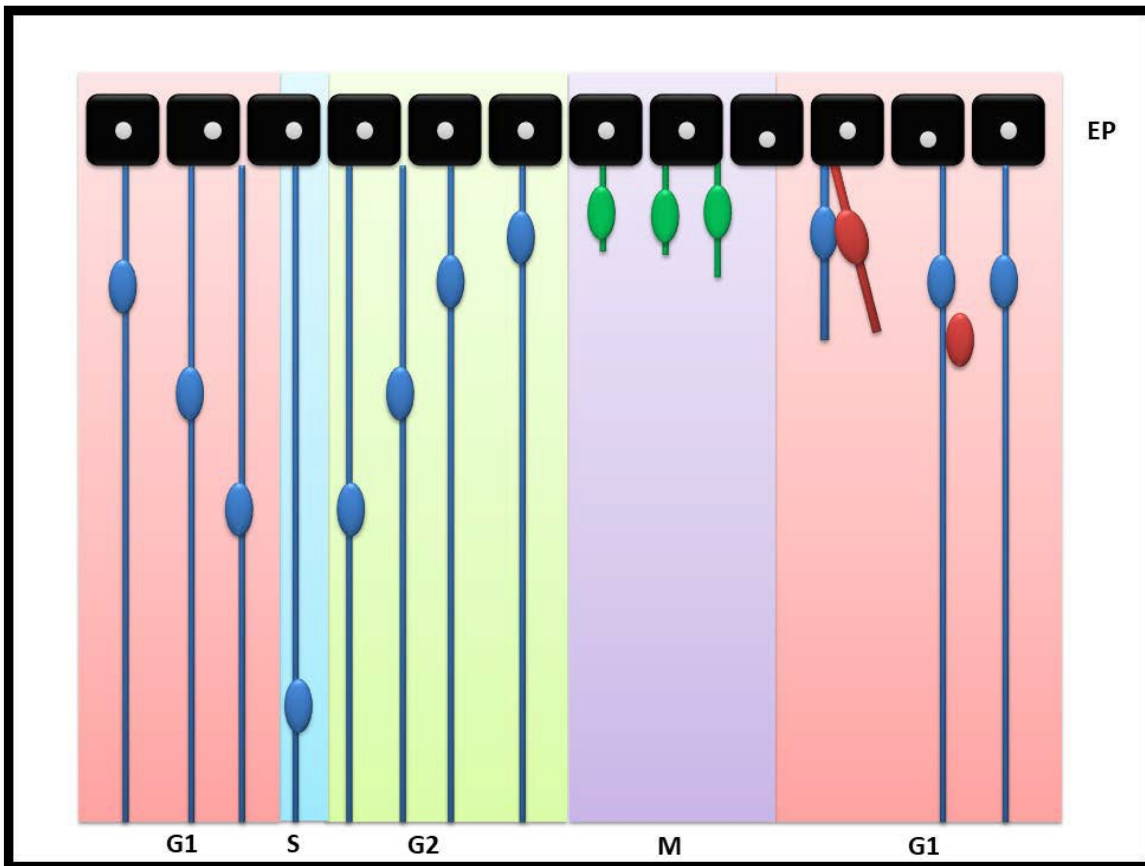


Figura 5. Esquema que representa el proceso de retinogénesis en vertebrados. Las células progenitoras presentan un movimiento nuclear intercinético, coordinado con el ciclo celular, desde la región vítrea a la región ventricular y viceversa. Así, cuando el núcleo está situado en la región vítrea, se encuentra en fase S y cuando se sitúa en la región ventricular se encuentra en fase M (verde). En G1 y G2 los núcleos tienden a situarse en posiciones intermedias del espesor de la retina presuntiva. Llegados a cierto punto del desarrollo, las células progenitoras sufren divisiones asimétricas dando lugar a un neuroblasto migratorio (rojo) y una célula progenitora (azul). Los neuroblastos migran radialmente en la retina hasta localizarse en las capas donde se diferenciarán en los diferentes tipos celulares. Esquema realizado por Guadalupe Álvarez-Hernán.

En las fases iniciales del desarrollo, las células progenitoras se dividen de forma simétrica y proliferan para aumentar el tamaño de la estructura. Cuando empieza el proceso de diferenciación celular, las células progenitoras comienzan a dividirse de forma asimétrica dando lugar a neuroblastos migratorios que migran adheridos a las prolongaciones de las células neuroepiteliales (Fig. 5) hasta localizarse en su posición definitiva en el tejido, donde completan su diferenciación morfológica dando lugar a la histología definitiva de la retina de vertebrados (Yang, 2004; Amini et al., 2017; Cardozo et al., 2020).

La diferenciación de los distintos tipos celulares de la retina se produce en un orden cronológico bastante conservado en vertebrados, siendo las células ganglionares las primeras en abandonar el ciclo seguidas de las células amacrinas, conos, células



horizontales, bastones, células bipolares y, por último, las células de Müller (Young, 1985; Turner y Cepko, 1987; Rapaport et al., 2004; Lamb et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012a; Amini et al., 2018). Este proceso de diferenciación se extiende a todo el tejido retiniano en forma de gradientes, iniciándose en el polo posterior de la retina. El gradiente centro-periférico de diferenciación es el más conservado a lo largo de la filogenia de vertebrados (Sharma y Ungar, 1980; Young, 1985; Prada et al., 1991; Hu y Easter, 1999; Francisco-Morcillo et al., 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012a; Álvarez-Hernán et al., 2013; Pavón-Muñoz et al., 2016). Se han descrito otros gradientes como el dorso-ventral y el temporo-nasal (Holt et al., 1988; Prada et al., 1991; Reese et al., 1996; Francisco-Morcillo et al., 2006). Por último, algunos autores identifican un cuarto gradiente vítreo-escleral en la histogénesis y diferenciación celular retiniana en algunas especies de peces (Bejarano-Escobar et al., 2012a), aves (Drenhaus et al., 2007) y mamíferos (Young, 1985; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004). Este gradiente es apreciable durante el proceso de histogénesis en aves, donde la CPI se establece en estadios embrionarios anteriores a la CPE (Fig.6)

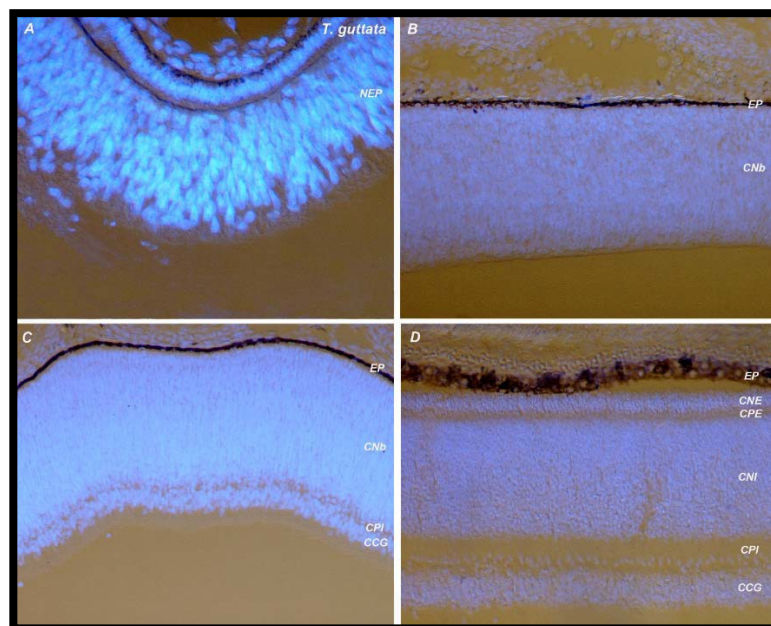


Figura 6. Secciones histológicas de la retina de *T. guttata* teñidas con DAPI y observadas con Nomarski y fluorescencia en diferentes estadios, mostrando el patrón de diferenciación conservado en vertebrados. **A.** La retina indiferenciada consiste en un neuroepitelio pseudoestratificado en el que las células sufren divisiones mitóticas simétricas en la región escleral. **B.** Durante el inicio de la diferenciación la retina está formada por una capa neuroblástica en la que se destaca la presencia de neuroblastos migratorios que darán lugar a los distintos tipos celulares de este tejido. **C.** Aparición de la CCG y la CPI indicando el avance de la diferenciación de la retina. **D.** Retina madura con las capas típicas de este tejido. CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; EP, epitelio pigmentario; NEP, neuroepitelio. Imágenes obtenidas por Guadalupe Álvarez-Hernán.



1.4. Análisis del proceso de diferenciación de la retina

A medida que las células retinianas se diferencian, van adquiriendo una serie de antígenos específicos que permiten caracterizarlas mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas (revisado en Bejarano-Escobar et al., 2014). Así, el análisis del proceso de diferenciación de la retina puede realizarse mediante la monitorización de la actividad proliferativa, la aparición de las capas plexiformes, el establecimiento de sinapsis funcionales en ellas y la presencia de proteínas implicadas en procesos de morfogénesis y diferenciación. Todos estos eventos pueden identificarse gracias al uso de una batería de anticuerpos que muestran un patrón de marcaje similar en las retinas de vertebrados analizadas (revisado en Bejarano-Escobar et al., 2014).

1.4.1. Marcadores de proliferación y mitosis en la retina

Como se ha comentado con anterioridad, las células progenitoras de la retina presentan una intensa actividad proliferativa. A medida que el proceso de diferenciación avanza, la actividad proliferativa desaparece de forma progresiva siguiendo los gradientes de diferenciación celular. Por tanto, el uso de marcadores inmunohistoquímicos de proliferación y mitosis permiten identificar el patrón cronotopográfico de diferenciación celular. Entre los marcadores de células que se encuentran en fase S encontramos el anticuerpo frente al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Este antígeno corresponde a la subunidad δ de la ADN-polimerasa y se localiza en el núcleo de las células que se encuentran replicando su genoma en la fase S. Por lo tanto, puede ser detectado en todas las fases del ciclo celular excepto en G1, y en menor proporción en células en mitosis. Este marcador se ha identificado en la retina de todos los vertebrados analizados (Mack y Fernald, 1997; Fischer y Reh, 2000; Velasco et al., 2001; Cid et al., 2002; Kubota et al., 2002; Candal et al., 2005a; Bernardos et al., 2007; Barton et al., 2008; Ábalo et al., 2008; Ghai et al., 2008; Thummel et al., 2008; Ferreiro-Galve et al., 2010a; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012b; 2014; Pavón-Muñoz et al., 2016; Todd et al., 2016; Shi et al., 2017; Langhe et al., 2017; Gorsuch et al., 2017; Álvarez-Hernán et al., 2018-libro; 2019).

Para la detección de las células retinianas que se encuentran en fase M, el marcador más recurrente es la histona H3 fosforilada (pHisH3) (Hendzel et al., 1997; McManus y Hendzel, 2006; Carney et al., 2007; Barton et al., 2008; Ferreiro-Galve et al., 2010a). Tanto la PCNA como la pHisH3 permiten identificar los nichos de células



indiferenciadas que provocan el crecimiento de la retina durante el periodo embrionario o incluso en estadios posteriores a la eclosión/nacimiento (Fischer y Reh, 2000; Godinho et al., 2007; Boije et al., 2009, 2016; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Fischer et al., 2014; Pavón-Muñoz et al., 2016; Álvarez-Hernán et al., 2018-libro; 2019).

1.4.2. Tubulina β clase III y Tubulina α acetilada

Para determinar el inicio del proceso de diferenciación, se utilizan marcadores tempranos del proceso de neurogénesis como los anticuerpos frente a la tubulina β clase III (TUJ1) o la tubulina α acetilada (α -Tub). La tubulina β clase III forma parte de los microtúbulos de las neuronas y su expresión está asociada a su diferenciación temprana (Snow y Robson, 1994, 1995; Sharma y Ehinger, 1997; Molea et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2005; Sagawa et al., 2007). En el tejido retiniano aparece en neuroblastos migratorios de células ganglionares justo después de su última división (Snow y Robson, 1995; Sharma y Ehinger, 1997; Francisco-Morcillo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2012a). La expresión de TUJ1 se mantiene en tipos celulares ya diferenciados, así como en células amacrinas, horizontales y fotorreceptores (Sharma et al., 2003; Sharma y Netland, 2007; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Kim y Sun, 2012). El patrón de expresión de la α -Tub en la retina indiferenciada es similar al de TUJ1 localizándose en los primeros neuroblastos que se diferencian. En la retina madura se localiza en los somas y los axones de las células ganglionares, así como en las células amacrinas y las capas plexiformes (Senut et al., 2004; Fausett y Goldman, 2006).

1.4.3. Islet1 (Isl1)

Isl1 es un factor de transcripción, perteneciente a la familia LIM-HD, que se expresa en diversos tejidos a lo largo del desarrollo (Thor et al., 1991; Pfaff et al., 1996; Ahlgren et al., 1997; Cai et al., 2003; Narkis et al., 2012; Pandur et al., 2013; Zhuang et al., 2013). En el caso del sistema visual muestra un patrón muy conservado en todos los vertebrados, tanto en retina indiferenciada como en el tejido maduro (revisado en Bejarano-Escobar et al., 2015). Así, se localiza en el núcleo de neuroblastos de células ganglionares que acaban de diferenciarse (Francisco-Morcillo et al., 2005; 2006; Elshatory et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012a; Álvarez-Hernán et al., 2013). En estadios más avanzados del desarrollo también se detecta en células ganglionares y subpoblaciones de células amacrinas, bipolares y horizontales (Galli-Resta et al., 1996; Shkumatava et al., 2004; Edqvist et al., 2006, 2008; Francisco-Morcillo et



al., 2006; Elshatory et al., 2007a; Fischer et al., 2007; Boije et al., 2008; Stanke et al., 2008; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2010, 2012a, 2015; Guduric-Fuchs et al., 2009; Álvarez-Hernán et al., 2013). La expresión de este factor de transcripción en neuroblastos tempranos suele estar retrasada con respecto a la aparición de TUJ1 y α -Tub (Bejarano-Escobar et al., 2012a).

1.4.4. Visinina

La visinina es una proteína de unión a calcio de 24kDa, homóloga de la S-modulina/recoverina y que está presente en conos de la retina de aves (Yamagata et al., 1990; Bruhn y Cepko, 1996; Fintz et al., 2003; Fischer et al., 2008). Se ha utilizado para determinar el inicio de la diferenciación de este tipo celular en la retina a lo largo del desarrollo, así como para establecer su grado de maduración ya que el marcaje permite distinguir la morfología de los fotorreceptores que la expresan (Fischer et al., 2008, 2011; Schick et al., 2019).

1.4.5. Prox1

Prox1 es un factor de transcripción que se encarga de controlar la proliferación de las células progenitoras retinianas y ejerce un papel primordial en la diferenciación de las células horizontales de vertebrados, considerándose un pan-marcador de este tipo celular (Dyer et al., 2003; Edqvist y Hallböök, 2004; Fischer et al., 2007; Boije et al., 2009). Presenta un patrón de marcaje tremendamente cambiante a lo largo del proceso de retinogénesis ya que se detecta en el núcleo de neuroblastos migratorios que todavía no han alcanzado su destino definitivo (Edqvist et al., 2006; Fischer et al., 2007; Boije et al., 2008, 2016).

1.4.6. Proteínas de unión a calcio: calretinina (CR) y parvalbúmina (PV)

Las proteínas calretinina (CR) y parvalbúmina (PV) participan en la homeostasis del calcio en algunas poblaciones neuronales y se han utilizado en numerosos estudios de diferenciación de la retina (Bainbridge et al., 1992; Sanna et al., 1993; Casini et al., 1995; Cuenca et al., 2000; Weruaga et al., 2000; Kolb et al., 2002; Loeliger y Rees, 2005; Francisco-Morcillo et al., 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012a; Álvarez-Hernán et al., 2013; 2019; Pavón-Muñoz et al., 2016; de Mera-Rodríguez et al., 2019). La CR se expresa en diferentes tipos celulares de la retina de vertebrados, principalmente



en células ganglionares y amacrinas (Hamano et al., 1990; Pasteels et al., 1990; Ellis et al., 1991; Vecino et al., 1993; Doldán et al., 1999; Weruaga et al., 2000; Francisco-Morcillo et al., 2006; Hendrickson et al., 2007; Pavón-Muñoz et al., 2016; de Mera-Rodríguez et al., 2019). La PV está presente principalmente en subpoblaciones de células amacrinas en peces (Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010), aves (Sanna et al., 1992) y en mamíferos puede aparecer en algunas células ganglionares e, incluso, en horizontales (Hendrickson et al., 2007; Yi et al., 2012; Lee et al., 2013). A pesar de que estos marcadores son tardíos, su uso permite, mediante técnicas inmunohistoquímicas de co-localización, identificar con mayor certeza aquellas poblaciones celulares que han sido marcadas con otros anticuerpos no tan específicos.

1.4.7. Glutamina sintetasa (GS)

La GS es una enzima que se localiza en diferentes poblaciones de células gliales del SNC (Norenberg, 1979; Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Roots, 1981; Patel et al., 1983; Mearow et al., 1990). En lo que respecta a la retina de vertebrados, se ha descrito su expresión en células de Müller, la glía radial que encontramos en este tejido (Linser y Moscona, 1979; Mack et al., 1998; Peterson et al., 2001; Lillo et al., 2002; Thummel et al., 2008). Suele tratarse de un marcador tardío, aunque puede servir para monitorizar el proceso de diferenciación de estas células, principalmente en la retina de peces (revisado en Bejarano-Escobar et al., 2014).

1.4.8. Proteína de vesículas sinápticas (SV2)

Uno de los principales indicadores morfológicos del grado de diferenciación de la retina es la aparición de las capas plexiformes. En algunos vertebrados, la formación de CPI precede a la de la CPE (Vecino et al., 1993; Francisco-Morcillo et al., 2006; Harahush et al., 2009; Bejarano-Escobar et al., 2012a), aunque en otros se ha descrito una aparición simultánea de las mismas (Young, 1985a; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004; Drenhaus et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010). Para seguir el proceso de maduración en las capas plexiformes, aparte de los criterios estrictamente histológicos, la aparición de sinapsis funcionales también puede analizarse con el uso de marcadores. Así, la detección inmunohistoquímica de la proteína de vesículas sinápticas 2 (SV2), una glicoproteína transmembrana que está presente en las vesículas sinápticas de vertebrados (Bajjalieh et al., 1994; Bergman et al., 1999; Janz y Südhof, 1999; Chen et al., 2000;



Sherry et al., 2003; Blanchart et al., 2008; Talbot y Kubilus, 2018), resulta ser una herramienta muy eficaz para identificar sinapsis funcionales en la retina de vertebrados (Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012a; Álvarez-Hernán et al., 2013; 2019; Pavón-Muñoz et al., 2016).

Por tanto, la utilización de las técnicas inmunohistoquímicas es fundamental y muy útil para establecer el patrón cronotopográfico de la retinogénesis en los vertebrados. A pesar de que este proceso tiene principalmente lugar durante el desarrollo embrionario, existen especies de vertebrados en las que la retinogénesis se sigue produciendo incluso después de la eclosión o nacimiento del individuo.

1.5. Neurogénesis postnatal en vertebrados

Se han descrito regiones proliferativas en el SNC de vertebrados que son capaces de generar neuronas que se diferencian e integran incluso en el tejido nervioso maduro. Sin embargo, esta capacidad varía entre las diferentes especies que se han analizado. En el caso de la retina madura existe una región, constituida por un anillo de células indiferenciadas, situada en la región más periférica de la misma denominada zona marginal proliferativa (ZMP). Esta región, no pigmentada, deriva de la copa óptica y contiene células madre y progenitoras que generan los diferentes tipos celulares (neuronas y células de Müller) presentes en la retina adulta. Dependiendo del grupo de vertebrados, la ZMP, presente incluso en estadios embrionarios, tiene una mayor o menor participación en la formación y/o crecimiento de la retina (Fig. 7). En peces y anfibios se observa que gran parte de la retina deriva de la ZMP. Por el contrario, en reptiles y aves dicha aportación es mínima (Fischer et al., 2014). En el caso de los mamíferos, debido a que en el margen periférico se diferencia el proceso ciliar, esta región se encuentra ausente.

La neurogénesis, en peces y anfibios, no cesa tras la etapa embrionaria, sino que continua a lo largo de la vida del animal. Existe un gradiente espacial de diferenciación de manera que, en el límite periférico más extremo se localizan las células madre retinianas y en la región adyacente, las células progenitoras retinianas, que son las que darán lugar a los neuroblastos y precursores gliales (Amato et al., 2004). Además, cuando la retina de anamniotas sufre algún tipo de daño, la ZMP participa en el proceso de regeneración, siendo las células progenitoras retinianas las que se diferencian en los distintos tipos celulares para recomponer los estratos del epitelio retiniano (Fischer et al., 2014). La presencia de la ZMP en reptiles ha sido demostrada recientemente (Todd et al.,



2016), comprobándose que mientras en serpientes y lagartos no existe evidencia de neurogénesis postnatal, en tortugas, esta región tiene una actividad mitótica muy similar a la de aves.

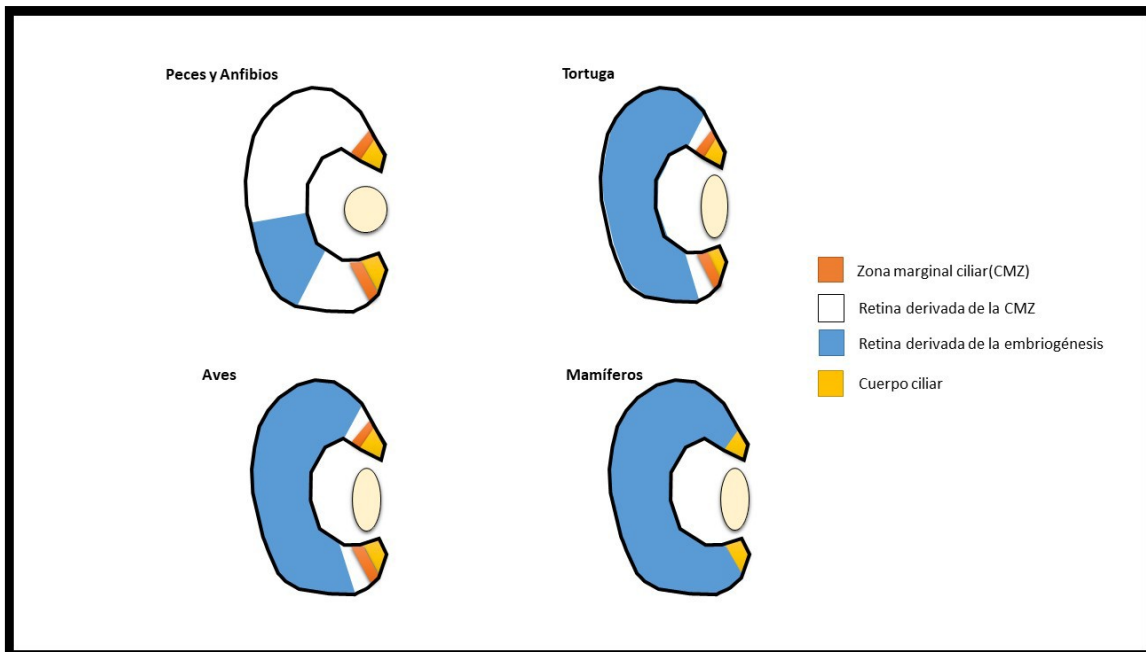


Figura 7. Representación esquemática de la participación de la ZMP (*CMZ, ciliary marginal zone*) en la neurogénesis de la retina en vertebrados. Como se puede observar, en peces y anfibios la retina neural derivada de la zona marginal ciliar es considerable mientras que en tortugas y aves es mucho menor y en mamíferos inexistente. Tomado de Álvarez-Hernán et al., 2018-libro.

Tras el periodo embrionario, los ojos de las aves van creciendo en concordancia con el cuerpo (Amato et al., 2004). Sin embargo, a pesar de que presentan en el momento de la eclosión una ZMP activa, se ha comprobado que el tejido retiniano crece por estiramiento sin existir ningún tipo de neurogénesis en individuos adultos. No obstante, aunque en el momento de la eclosión la retina de gallina ya es funcional, Fisher y Reh (2000) determinaron que, en esta especie, la ZMP es capaz de producir neuronas durante un corto periodo de tiempo que se restringe a semanas. Sin embargo, la generación de neuronas está limitada a células amacrinas y bipolares. A diferencia de peces y anfibios, no existe respuesta al daño de forma natural, sino que es necesaria la estimulación exógena para generar proliferación en la retina, aunque las células producidas no restablecen del todo los estratos del tejido retiniano dañado (Fischer, 2005). Como se ha comentado con anterioridad, en mamíferos no existe evidencia de una ZMP, ni de proliferación en la periferia de una retina neural. Sin embargo, Kubota et al. (2002) mostraron evidencias de que en marsupiales jóvenes aparecían neuronas retinianas procedentes de células proliferativas de la periferia. En los peces adultos se identificó una ZMP que contenía la principal actividad proliferativa de la retina, así como células de



Müller proliferativas en la CNI (Amato et al., 2004; Raymond, 2006; Reichenbach y Bringmann, 2013; Gallina et al., 2014). En la retina sana las células de Müller se comportan como glía radial. Sin embargo, estudios previos han demostrado que éstas son capaces de generar otros tipos celulares, tanto en retinas sanas (Bernardos et al., 2007) como en retinas dañadas de teleósteos (Fausset y Goldman, 2006). Por lo tanto, en la retina sana de peces adultos, las células de Müller se continúan dividiendo, aunque de forma más lenta para dar lugar a células progenitoras de bastones que se localizan en la CNI alineándose en columnas radiales. Estas células progenitoras de bastones migran a la CNE en la que se dividen para dar lugar a nuevos bastones (Julian et al., 1998; Bernardos et al., 2007). Cuando la retina sufre algún tipo de daño, las células de Müller tienen la capacidad de generar otros tipos celulares. Las células de Müller entran de nuevo en un ciclo, presentando una migración nuclear intercinética, que es similar al de las células progenitoras del neuroepitelio retiniano. Ésta derivará en una única división asimétrica dando lugar a una célula de Müller y a un progenitor retiniano proliferativo (Nagashima et al., 2013). Estos progenitores se dividen rápidamente y, dependiendo de los tipos celulares que hayan sufrido daño, van a generar fotorreceptores para la CNE (Vihtelic y Hyde, 2000) o van a reemplazar a las células amacrinas o ganglionares que sean necesarias en la CNI (Fimbel et al., 2007).

Aunque en otras clases de vertebrados esta actividad proliferativa no ha sido descrita de una manera tan acusada, sí es remarcable el hecho de que aquellas especies de vertebrados que son altriciales, muestran una intensa neurogénesis postnatal debido a que en el momento de la eclosión los individuos todavía presentan importantes signos de indiferenciación. En la retina de peces altriciales, esta situación es notable, presentando una indiferenciación extrema tras la eclosión con una capa neuroblástica (CNb) como tejido retiniano (Evans y Bowman, 2004; Álvarez-Hernán et al., 2019). De esta manera, la retinogénesis se produce en los primeros días tras la eclosión del individuo, como en el caso de la tenca o la dorada, que tiene lugar en los primeros 5 días (Bejarano-Escobar et al., 2009; Pavón- Muñoz et al., 2015) o en los 4 primeros en el caso de especies de pleuronéctidos (Doldán et al., 1999; Bejarano-Escobar et al., 2010).

Por el contrario, en especies precociales de peces, el proceso de neurogénesis queda restringido a la actividad mitótica que se detecta en las células de Müller y en la ZMP, como hemos descrito con anterioridad (Candal et al., 2005; 2008; Ferreiro-Galve et al., 2010; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Álvarez-Hernán et al., 2019).



1.6. La muerte celular en el desarrollo

La muerte celular es un evento que se puede producir como respuesta a un daño o como parte de la homeostasis de un tejido. Este proceso degenerativo es conocido como muerte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*) y transcurre de forma activa en la célula, obedeciendo a una serie de factores extracelulares que activan una respuesta intracelular que desencadena la PCD. Durante el desarrollo embrionario, la PCD adquiere un papel relevante en la eliminación de tejidos innecesarios, el modelaje de determinadas estructuras, en la génesis y control del número de células que se producen o la eliminación de células con algún tipo de anormalidad en su función y que por tanto pueden resultar dañinas para el individuo (Jacobson et al., 1997). En el caso de la eliminación de estructuras, actúa sobre aquellas que se denominan vestigiales, que son precisas de forma transitoria durante el desarrollo o que sólo necesita uno de los sexos. Resulta muy llamativa la eliminación masiva de células por PCD que tiene lugar en la cola de anfibios en el proceso de metamorfosis de renacuajo a rana. Así mismo, participa en la eliminación de los conductos de Müller o paramesonéfricos en individuos XY de mamíferos durante el desarrollo embrionario del sistema urogenital. Estos mismos conductos no son eliminados en individuos XX y permanecen para dar lugar a estructuras como los oviductos o el útero. También resulta muy llamativa su participación en la formación de los dedos, eliminando el tejido interdigital de aquellas especies que presentan los dedos libres (Jacobson et al., 1997; Fuchs y Steller, 2011; Kristiansen y Ham, 2014; Yamaguchi y Miura, 2015a).

No menos importante es su papel en el desarrollo y la homeostasis del sistema nervioso central (SNC). Esta muerte celular puede afectar a los primeros neuroblastos que se diferencian en el SNC. La desregulación de este proceso acarrea defectos en el tamaño y la correcta morfología del encéfalo (Buss et al., 2006). Por otra parte, durante el proceso de sinaptogénesis, las neuronas postmitóticas contribuyen mediante moléculas solubles a la supervivencia de las neuronas presinápticas que se están diferenciando y, además, ayudan al proceso de conducción axónica hasta su destino definitivo. De esta manera, las células que no concretan una determinada conexión sináptica, degeneran por PCD (Frade y Barde, 1999). Esta muerte celular no queda restringida únicamente al periodo embrionario, y en el SNC adulto ha de estar estrictamente regulada pues puede conducir a estados patológicos. En el caso de aves altriciales, se ha comprobado, que la muerte celular inducida en determinadas poblaciones neuronales como las que regulan el canto en especies cantoras, estimula la neurogénesis postnatal que reestablece las neuronas que han degenerado (Nottebohm, 2004). Esto ha convertido a estas especies altriciales de aves



en interesantes modelos para el estudio de procesos degenerativos y de neurogénesis postnatal (Charvet y Striedter, 2009; 2011). Por otra parte, el estudio de la PCD en el SNC adulto de mamíferos ha adquirido una gran relevancia en los últimos años pues se está comprobando que la desregulación de los mecanismos que gobiernan este proceso provoca importantes enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Bredesen et al., 2006).

La muerte celular durante el desarrollo también afecta a los órganos de los sentidos. La formación del sistema auditivo de vertebrados conlleva una serie de oleadas de muerte celular reguladas por diferentes factores de crecimiento (Frago et al., 2003) que van a tener una relevancia esencial durante el proceso de morfogénesis (Álvarez y Navascués, 1990; Fekete et al., 1997) y de diferenciación y establecimiento de sinapsis (León et al., 2004). En el caso del sistema visual, el proceso apoptótico adquiere una especial relevancia en el correcto desarrollo de estructuras y en el proceso de diferenciación celular y sinaptogénesis. Así, durante el proceso de separación que ocurre entre la vesícula del cristalino y el ectodermo, una intensa oleada de muerte celular ocurre en la zona de transición entre ambas estructuras (Nishitani y Sasaki, 2006; Bejarano-Escobar et al., 2011; 2013). La fisura ventral es una estructura transitoria que se localiza en la región ventral de la copa óptica. Esta región de intensa actividad morfogenética sufre procesos degenerativos esenciales para el correcto cierre del rudimento ocular (Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Morcillo et al., 2006). La zona dorsal de la copa óptica también se ve afectada por una intensa oleada de muerte celular causada por una elevada expresión de la proteína morfogenética de hueso 4 (*bone morphogenetic protein 4*, BMP4) en esa región (Trousse et al., 2001; Morcillo et al., 2006). En el caso del tallo óptico, las células neuroepiteliales comienzan a degenerar en estadios en los que la invasión de axones procedentes de las células ganglionares es intensa (Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Hidalgo-Sánchez et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2013). Por otro lado, en la zona de inserción de los nervios ópticos con la base del diencefalo, se originan unos focos de PCD intensa que se denominan centros necróticos subópticos, donde la muerte es intensa durante estadios tempranos del desarrollo (Navascués y Martín-Partido, 1990; Bejarano-Escobar et al., 2011). Estas zonas están relacionadas con la facilitación de la conducción axónica.

Pero es en la retina donde este proceso de PCD adquiere un especial protagonismo, pues afecta a las poblaciones celulares en forma de oleadas (Francisco-Morcillo et al., 2014). Estas oleadas se han descrito total o parcialmente en peces (Candal et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2010; 2013), anfibios (Hutson y Bothwell, 2001), reptiles (Francisco-



Morcillo et al., 2004) y mamíferos (Young, 1985; Pequignot et al., 2003; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Morcillo et al., 2006; Bejarano-Escobar et al., 2011). La muerte celular en aves altriciales, hasta la fecha, no ha sido descrita en la bibliografía y la mayor parte de los datos existentes al respecto se circunscriben a estudios realizados en especies precociales como la gallina (Martín-Partido et al., 1988; Cook et al., 1998; Mayordomo et al., 2003) y la codorniz (Marín-Teva et al., 1999).

2. Estructura anatómica de las extremidades

En vertebrados existe un alto grado de homología en cuanto a la estructura básica de las extremidades. Sin embargo, las aves son el grupo que presenta mayor diferencia morfológica. A pesar de ello, los elementos óseos de las aves son equiparables a los del resto de vertebrados, de manera que podemos dividir las extremidades en 3 segmentos (Fig. 8):

1. Estilopodio: se corresponde con húmero o fémur.
2. Zeugopodio: se corresponde con cúbito/radio o tibia peroné.
3. Autopodio: se corresponde con carpo/metacarpo/falanges o tarso/metatarso/falanges.

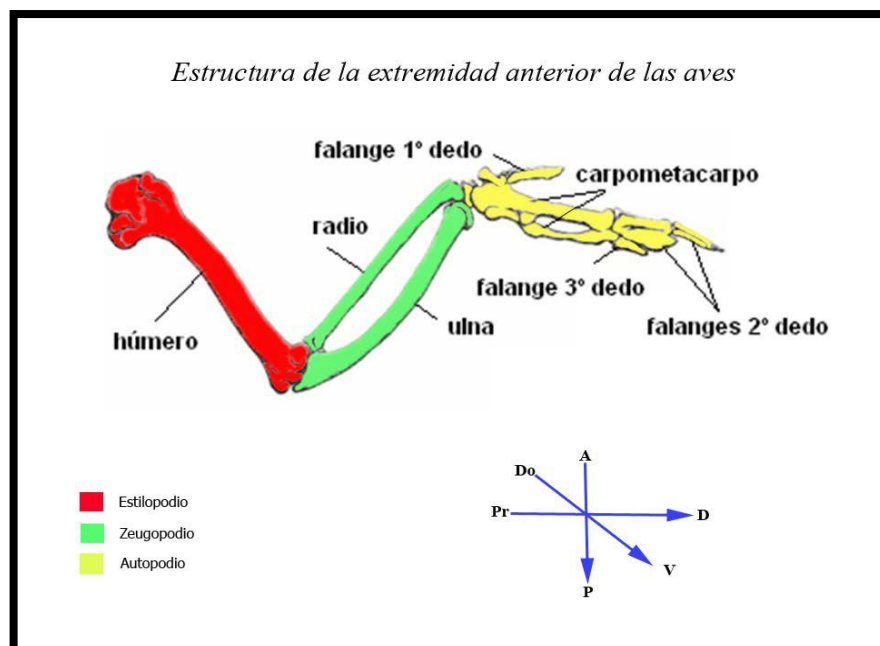


Figura 8. Representación de las distintas partes de la extremidad anterior de las aves y los ejes espaciales. Esquema realizado por Guadalupe Álvarez Hernán.

Además, otra característica a destacar es el número de dedos que presentan los miembros en este grupo de vertebrados. A diferencia de los mamíferos, las aves muestran



en sus extremidades superiores tres dedos y en las inferiores cuatro. Desde el dedo de la región más anterior (pulgares en mamíferos), los dedos se nombran con números sucesivos. Así, en el ala, el dedo más anterior sería el 1 y el más posterior sería el 3, mientras que en la extremidad inferior se numeran del 1 al 4. En cuanto a las falanges, su número es distinto en cada dedo. Teniendo en cuenta cómo se nombran los dedos, en el miembro superior, la fórmula del número de falanges es 2-2-1 mientras que para el miembro inferior es 2-3-4-5. Asimismo, durante la formación de los dedos, se produce una regresión de la membrana interdigital mediante el proceso de apoptosis en las especies con dedos libres, mientras que en las especies con dedos palmados o lobulados las áreas apoptóticas están restringidas a la región central y/o distal del interdígito (Lorda-Díez et al., 2015; Montero et al., 2020). Teniendo en cuenta la asimetría existente en las extremidades de las aves, no sólo entre dedos, sino a nivel de las tres dimensiones, nos vamos a encontrar tres ejes espaciales de desarrollo (Fig. 8):

1. Próximo-Distal: el estilopodio se localiza en la región más proximal mientras que el autopodio en la más distal.
2. Antero-Posterior: el dedo 1 (equivalente al pulgar) se localizaría en la región más anterior mientras que los dedos 3 (ala) y 4 (pata) se encontrarían en la región más posterior.
3. Dorso-Ventral: la parte que corresponde a la palma se encuentra en la región más ventral mientras que el dorso (donde se ubican los nudillos en humanos) aparece localizado en la región más dorsal.

El establecimiento de estos ejes va a permitir la constitución de una información posicional que será crucial durante el desarrollo de la extremidad.

2.1. Desarrollo inicial de las extremidades

Las extremidades se forman en las regiones laterales del tronco a partir de células del epitelio celómico que sufren una transición epitelio mesénquima (Gros y Tabin, 2014). Así, estas células formarán los progenitores mesenquimales de la extremidad e invadirán la lámina mesodérmica lateral en los flancos del embrión. Estas células mesenquimales van a proliferar para dar lugar al esbozo de la extremidad. El progreso del esbozo de la extremidad y su morfología a lo largo del desarrollo está controlado en los tres ejes espaciales mencionados anteriormente, gracias a tres centros de señalización que interactúan entre sí: la cresta apical ectodérmica (*Apical Ectodermal Ridge*, AER), que es



necesaria para el desarrollo en el eje próximo-distal; la zona de actividad polarizante (*Zone of polarizing activity, ZPA*), que se encarga de regular el desarrollo en el eje antero-posterior y el ectodermo dorsal y ventral que dirigen el desarrollo en el plano dorso-ventral. La actividad de cada uno de estos centros de señalización no es independiente y para que se dé un correcto desarrollo de la extremidad es necesario que exista interacción entre ellos.

Como mencionamos anteriormente, el eje próximo-distal está controlado por la AER que consiste en un engrosamiento de epitelio que se forma, a lo largo del eje dorso-ventral, en el borde del extremo distal del esbozo de la extremidad. La morfología de esta estructura es dinámica de manera que, en los primeros estadios de desarrollo, las células presentan una forma columnar y con el avance del mismo, se forma un epitelio pseudoestratificado. Esta estructura sufre un proceso de regresión hasta desaparecer cuando las últimas falanges se establecen (Fernández-Terán y Ros, 2008). Uno de los primeros genes que se expresan en este centro de señalización y que se considera como un marcador de la aparición del mismo, pertenece a la familia de genes de factores de crecimiento fibroblástico (Fgfs), *Fgf8* (Fig. 9). La inducción de la AER está controlada por la interacción entre las vías de señalización FGF, Bone morphogenetic protein (BMP) y Wnt/ β -catenina. La vía Wnt/ β -catenina activa en el mesodermo lateral, en las zonas de aparición de las extremidades, es necesaria para que se restrinja la expresión de *Fgf10* en esas áreas. A su vez, FGF10 activa *Wnt3a* en el ectodermo, el cual, a su vez, actúa a través de la vía β -catenina para inducir la expresión de *Fgf8* en el ectodermo que mantiene la expresión de *Fgf10* en el mesodermo lateral, estableciéndose así un circuito de retroalimentación entre estos genes (Kawakami et al., 2001). Para la maduración de la AER es fundamental que se defina el límite dorso-ventral mediante la señalización por BMPs (Pizzete et al., 2001) y engrailed-1 (*En1*) (Altabef et al., 2000). Éste se expresa en el ectodermo ventral del esbozo de la extremidad restringiendo la expresión de *Wnt7a* al ectodermo dorsal (Parr y McMahon, 1995).

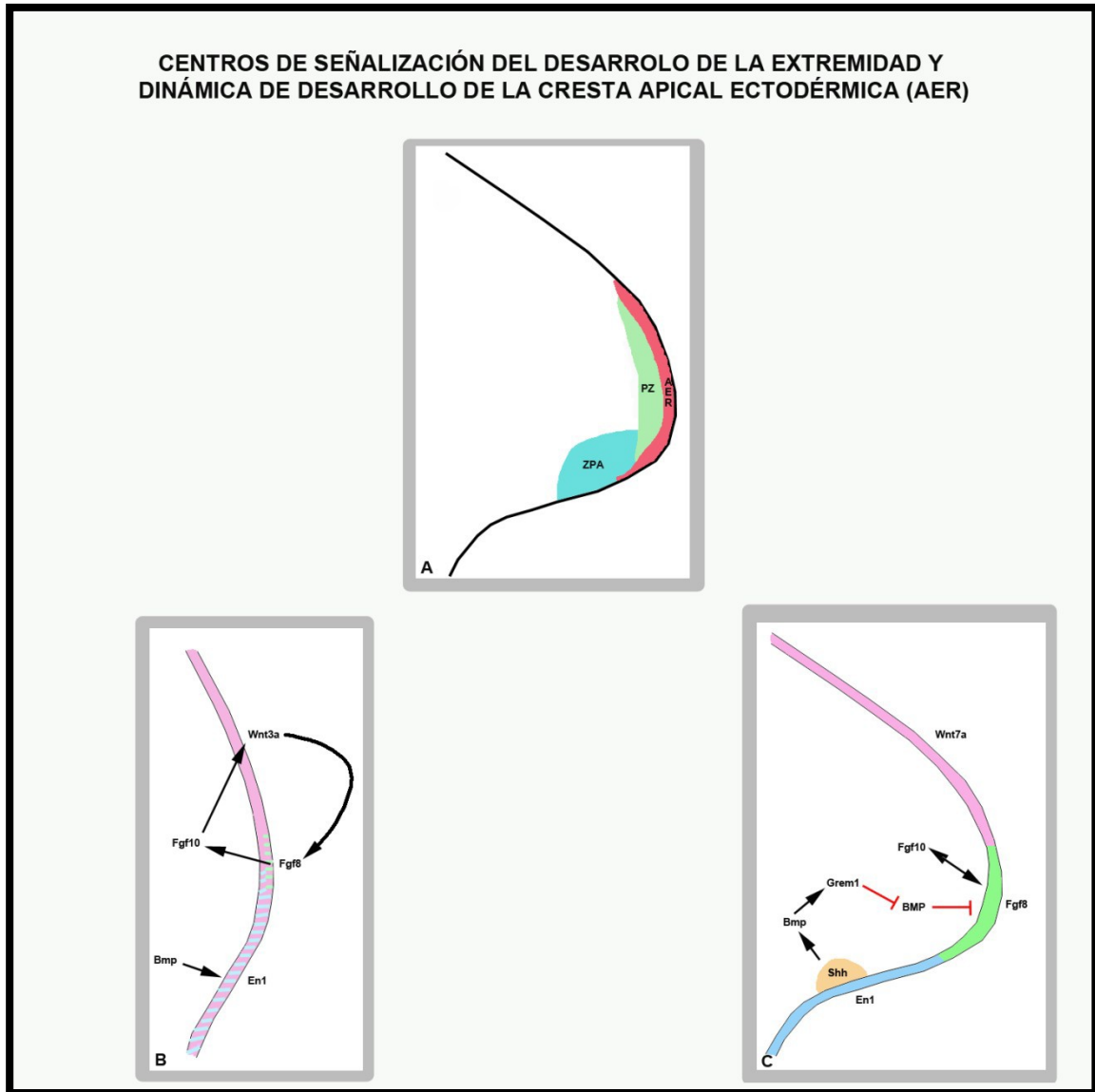


Figura 9. Representación de los centros de señalización implicados en el desarrollo de la AER y de la interacción entre ellos. Esquema realizado por Guadalupe Álvarez Hernán.

La señalización por BMP, también es esencial en el establecimiento de la AER, como muestran experimentos de pérdida y Ganancia de función (Pizette et al., 2001). Una vez que se ha formado este centro de señalización, debe mantenerse durante el desarrollo. En esta etapa, el gen *Gremlin1* (*Grem1*) juega un papel esencial como antagonista de BMP favoreciendo así mantenimiento del circuito de retroalimentación positivo *Fgf8-Fgf10* y estableciendo un bucle mesenquimal entre Sonic hedgehog (SHH), *Grem1* y FGF (SHH-*Grem1*-FGF). A medida que la extremidad va creciendo, las células que se encuentran más proximales salen de la influencia de la AER y comienza la diferenciación del cartílago. Por último, tiene lugar la regresión de la AER que se inicia con la interrupción del bucle SHH-*Grem1*-FGF (Verheyden y Sun, 2008).

La disrupción de la expresión de *Grem1* por SHH hace que las BMP ya no estén bajo regulación negativa del primero, disminuyendo así la señalización de los genes de la



familia FGF (Scherz et al., 2004). Así pues, el papel de las BMPs varía dependiendo del punto del desarrollo, participando en la inducción de la AER y posteriormente en su regresión (Wang et al, 2004; Zuzarte-Luis y Hurlé, 2005; Fernández-Terán y Ros, 2008; Rodríguez-León et al., 2013). Además, se ha observado que la regresión ocurre por primera vez en los interdígitos donde hay más de actividad de BMPs (Gañán et al., 1996; Pizette y Niswander, 1999; Merino et al., 1999).

3. Formación de los dígitos

Durante el desarrollo, además de la proliferación y diferenciación celular, participa otro mecanismo que permite esculpir la morfología de los diferentes órganos y tejidos e, incluso, eliminar aquellos que tienen una función transitoria. Este proceso es la PCD, la cual ha sido bien caracterizada a lo largo del desarrollo de la extremidad. Se han identificado tres áreas de apoptosis principales: la zona necrótica anterior (*Anterior Necrotic Zone*, ANZ), la zona necrótica posterior (*Posterior Necrotic Zone*, PNZ) y la “masa opaca” (*Opaque Patch*, OP) (revisado en Montero et al., 2020). Tanto la ANZ como la PNZ parecen estar implicados en la limitación de células mesenquimales para la formación del dígito mientras que la OP, que se localiza entre las piezas del zeugópodo, se encarga de la formación de esbozos independientes en esta región (Merino et al., 1999). La formación del autopodio y los interdígitos genera la aparición de una cuarta área denominada zona de necrosis interdigital (*Interdigital Necrosis Zone*, INZ) que, como su nombre indica, es la encargada de eliminar las células mesenquimáticas que se localizan entre los dígitos de las especies que presentan dedos libres. Este proceso, ampliamente conocido en *G. gallus*, se inicia con la apoptosis de las células mesenquimales localizadas en los interdígitos, seguido de la regresión de los vasos sanguíneos interdigitales y la disgregación de la matriz extracelular de los mismos (Montero y Hurlé, 2010). En esta etapa, las proteínas BMP, además de estar implicadas en la regresión de la AER, también participan en la inducción de la apoptosis en estas regiones de muerte celular (Merino et al., 1999). En concreto, BMP2, BMP4 Y BMP7, se localizan en el mesodermo interdigital, en la ANZ y la PNZ (Macías et al., 1997; Montero et al., 2001; Zuzarte-Luis y Hurlé, 2005; Montero y Hurlé, 2010). Su expresión queda restringida a estas áreas gracias a la modulación por antagonistas como Grem, la propia matriz extracelular (Merino et al., 1999; Zuzarte-Luis y Hurlé, 2005) o el posible papel que puede desempeñar DKK-1 en la activación de la cascada de muerte celular programada (Grotewold y Rüther, 2002). Sin embargo, estas proteínas presentan otras funciones. Ya que, recientemente se ha postulado que la expresión de *Grem1* podría contribuir a establecer los diferentes patrones de los



dígitos entre las distintas especies de aves (Kawahata et al., 2019). Durante este periodo existe relación entre las proteínas BMP y la señalización por FGF, de manera que, las primeras a través de sus receptores (como BMPRI1A) son capaces de inhibir a FGF8 (que actúa como factor de supervivencia en la región interdigital) interrumpiendo el bucle SHH-GREMLIN1-FGF en estas áreas (Pajni- Underwood et al., 2007).

4. Osificación endocondral

Durante el desarrollo embrionario, la condrogénesis es el proceso que da lugar a los cartílagos definitivos que aparecen en el adulto y, además, generar un esqueleto primigenio, que servirá como molde para la formación del esqueleto óseo.

La condrogénesis se inicia con la agregación de células mesenquimáticas multipotentes que forman unas condensaciones precondrogénicas (Fig. 10A). Las células presentes en estas condensaciones tienen mayor capacidad de adhesión y también son las encargadas de comenzar a sintetizar las moléculas que forman parte de la matriz extracelular (MEC). Cuando se alcanza un determinado nivel de condensación, se favorece la diferenciación condrogénica permitiendo la síntesis de la matriz del cartílago y dando lugar a un primordio cartilaginoso que será el molde del futuro hueso. Las células de la periferia de la condensación van a dar lugar al pericondrio que rodea a los condroblastos o condrocitos (Fig. 10B). En esta región periférica, las células sintetizan colágeno tipo I, mientras que las moléculas que se sintetizan en la matriz del cartílago incluyen las del colágeno tipo II, IX y XI y agreganos (Goldring et al., 2006). La síntesis del colágeno tipo II está regulada por la expresión de Sox9 junto con Sox5 y Sox6 (Healy et al., 1999; Chimal-Monroy et al., 2003), la cual a su vez va a ser dependiente de la señalización por BMPs (Goldring et al., 2006). Asimismo, se ha determinado que este trío de factores de transcripción de la familia SOX es fundamental para la diferenciación condrocítica (Long y Ornitz, 2013). Una vez diferenciados, los condrocitos pasan por etapas de proliferación, maduración e hipertrofia. La etapa de proliferación está controlada por un balance entre la señalización por BMP y FGF, de manera que, mientras BMP7 promueve la proliferación, la señalización a través del receptor 3 de FGFs (FGFR3) actúa como un inhibidor de ésta (Zuzarte-Luis et al., 2004). FGF18 y FGF9 se expresan en el pericondrio inhibiendo la proliferación vía FGFR3 y también en zonas de hipertrofia interactuando con FGFR1 (Yoon y Lyons, 2004; Goldring et al., 2006; Mackie et al., 2008). Cuando el esbozo de cartílago se ha formado completamente, en la región central del mismo, los condrocitos dejan de proliferar y entran en una fase de pre- hipertrofia seguida de una de hipertrofia. En esta última, los marcadores más destacados son el colágeno tipo X, la fosfatasa alcalina



y el factor de transcripción RUNX2 (Stricker et al., 2002). Por tanto, los primeros condrocitos en hipertrofiarse serán los del centro del esbozo (diáfisis) y a medida que nos desplazamos hacia los extremos (epífisis) este tipo celular se encuentra en fases más tempranas de maduración como pre-hipertrofia y proliferación (Fig. 10C). En esta etapa, los condrocitos hipertróficos comienzan a expresar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) induciendo la angiogénesis y la proliferación y diferenciación de osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras del pericondrio que pasa a denominarse periostio. Existen numerosas señales implicadas en el proceso de diferenciación de osteoblastos como es el caso de Indian hedgehog (IHH), las proteínas WNT o la señalización por BMPs. Sin embargo, los factores de transcripción RUNX2 y OSX juegan un papel fundamental en este proceso, por lo que su delección trae como consecuencia una completa ausencia de osteoblastos (Stricker et al. 2002; Yoshida et al., 2004; Long y Ornitz, 2013). Cuando los condrocitos hipertróficos mueren y la matriz del cartílago se degrada, se favorece la invasión de ese espacio por vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos, formándose así el centro de osificación primario en la diáfisis (Fig. 10D) (Mackie et al., 2008). A medida que avanza el desarrollo, en las epífisis se forman los centros de osificación secundarios de la misma manera que en el primario, muriendo en primer lugar los condrocitos hipertróficos, seguido de la degradación de la matriz del cartílago y la llegada de los vasos sanguíneos, de los osteoblastos y osteoclastos (Fig. 10E).

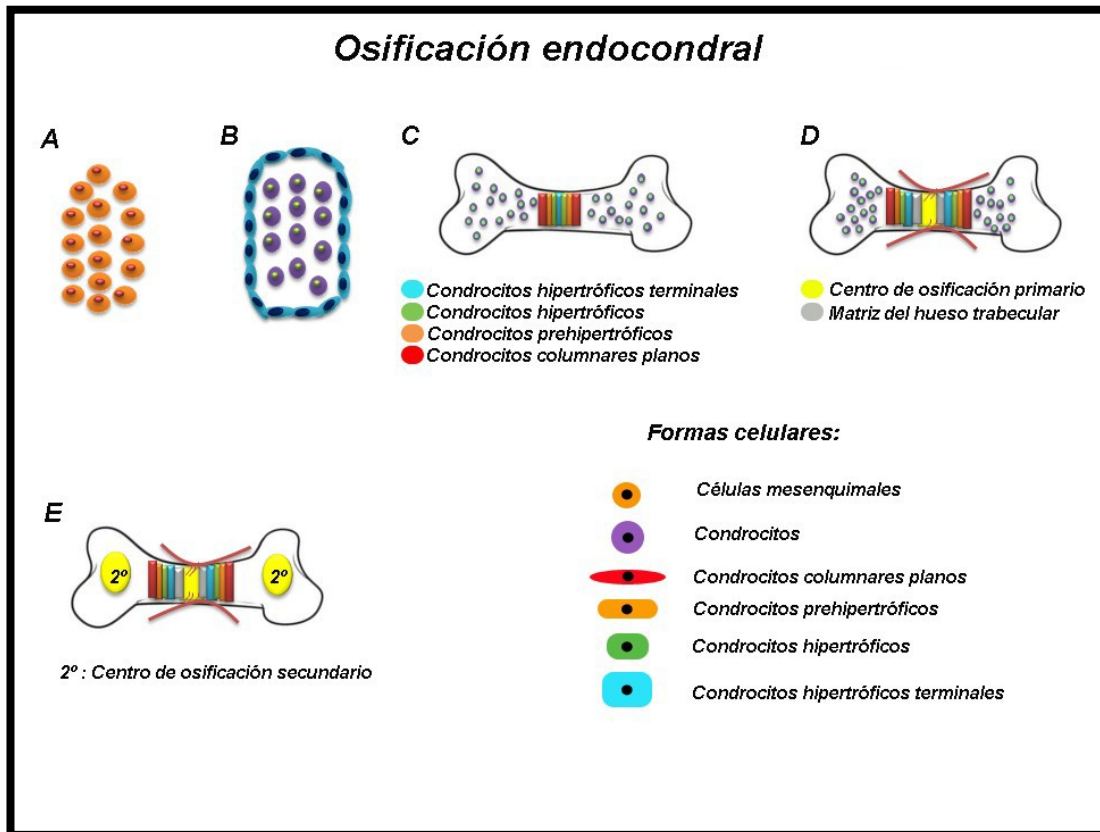


Figura 10. Proceso de osificación endocondral. Esuqema realizado por Guadalupe Álvarez Hernán.

4.1. Análisis del proceso de osificación de las extremidades

Al igual que en el sistema visual, las técnicas inmunohistoquímicas son muy útiles para detectar el inicio y el avance del proceso de osificación. Por este motivo, seleccionamos tres marcadores que se unen a moléculas que son relevantes durante este periodo.

4.1.1. Colágeno tipo II

El colágeno tipo II es el componente fibrilar principal del cartílago. Sox9 induce la expresión de Col2A1 (marcador de condrocitos proliferativos) y durante la condrogénesis este colágeno es sintetizado y depositado por los condroblastos (Shimizu et al., 2007). El marcador que utilizamos en el presente estudio es específico de esta molécula, anti- Col2A1, por lo que la ausencia de inmunorreactividad de éste va a ser un indicador del inicio de la osificación.

4.1.2. Runx2

Runx2 es un factor de transcripción de la familia Runx que se expresa en osteoblastos y en sus células progenitoras siendo, por tanto, una de las proteínas implicadas en la osteogénesis temprana (Komori et al., 2018; Kawane et al., 2018). Para identificar el estadio en el que comienza este proceso se ha utilizado un anticuerpo frente a este factor de transcripción.



4.1.3. Osteocalcina

La osteocalcina es un producto restringido de los osteoblastos ya diferenciados necesario para que se produzca la mineralización ósea, por lo tanto, es un componente que está presente en etapas más avanzadas en el proceso de osificación (Kierszenbaum y Tres, 2020). El uso de un marcador frente a esta proteína secretora, nos va a permitir realizar una comparativa entre las especies precociales y altriciales en cuanto al grado de osificación.

5. Las aves como modelo de estudio

5.1. Filogenia de las aves

Dentro de los vertebrados, las aves están incluidas en la superclase Tetrapoda y se dividen en dos subclases: Arqueognites y Neornites (Tabla 1). El grupo de los Arqueognites incluye a las aves extinguidas y parecidas a reptiles del Jurásico y Cretácico temprano. Los neornites agrupan a todas las aves con representantes actuales y algunas extintas, que se caracterizan por presentar un esternón bien desarrollado. Los neornites se dividen a su vez en dos Superórdenes: Paleognadas y Neognadas. Las aves paleognadas constituyen un grupo de 50 especies adaptadas en su mayoría (aunque no en su totalidad) a una locomoción terrestre, mientras que las neognadas incluyen órdenes de aves voladoras.

Subfilo	Superclase	Clase	Subclase
VERTEBRADOS	Agnatha		
	Gnathostomata		
	Tetrapoda	Aves	Archaeornithes † (aves primitivas)
			Neornithes (aves modernas)

Tabla 1. Clasificación taxonómica actual del grupo de las aves.



Las especies empleadas en el presente estudio pertenecen al Superorden Neognatas. La gallina y la codorniz pertenecen al Orden Galliformes y el diamante zebra de Timor al Orden Paseriformes (Fig. 11).

- Orden Galliformes: incluye pavos, gallinas, perdices, faisanes y codornices, entre otras especies. Son aves vegetarianas con picos y patas robustas. Por lo general, los machos tienen una coloración más llamativa que las hembras y la nidificación es en tierra.
- Orden Paseriformes: es el orden más numeroso de aves. Son cosmopolitas y su tamaño es pequeño. Incluye a todas las aves cantoras, que presentan las siringes bien desarrolladas. Sus patas están adaptadas para posarse sobre las ramas y el suelo con tres dedos dirigidos hacia adelante y uno hacia atrás.

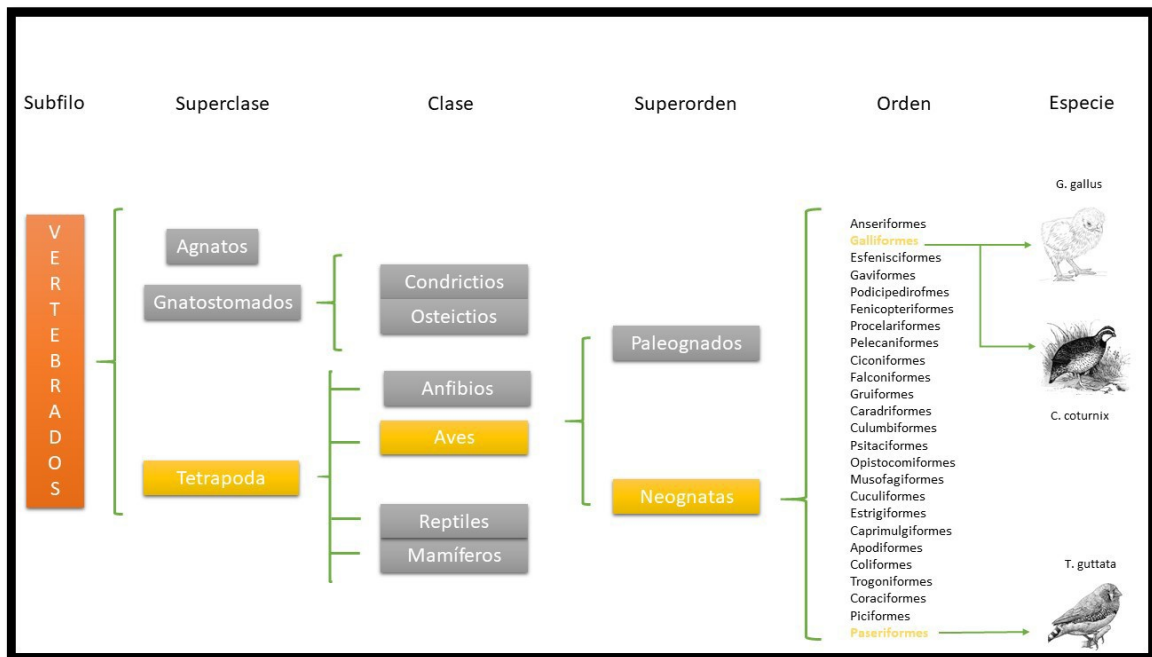


Figura 11. Diagrama que muestra la posición filogenética que ocupan las especies seleccionadas para nuestro estudio.

5.2. Espectro altricial-precocial

Existen diferentes aspectos del comportamiento, fisiología y anatomía en las diferentes especies de aves, que marcan distintos grados de maduración. Estas variaciones han llevado a los ornitólogos a clasificar las aves dentro de un espectro altricial-precocial. Los términos precocial y altricial fueron introducidos por Sundeval en 1836. En un principio, el uso de la palabra precocial era sinónimo de nidífugo y altricial de nidícola. Sin embargo, actualmente se tienen en cuenta más aspectos del desarrollo y comportamiento del animal. Actualmente, se denomina precocial a



aqueellos animales que en el momento de nacer tienen la capacidad visual y locomotora desarrolladas y pueden buscar alimento por ellos mismos, mientras que los animales altriciales son aquellos que nacen ciegos, desnudos y permanecen en el nido para ser alimentados (Starck y Ricklefs, 1998). Otro rasgo que permite diferenciar estas clases de aves es el comportamiento durante la incubación, siendo parcial en precociales hasta que la puesta es completa e íntegra en altriciales desde la puesta del primer huevo. A pesar de ello, existen especies de altriciales que se asemejan a las primeras (Loos y Rohwer, 2004; Wang y Beissinger, 2009, 2011; Svobodová et al., 2019). Sin embargo, no podemos clasificar exclusivamente en altricial o precocial ya que hay especies que presentan características de ambos y por ello se desarrolló un espectro altricial-precocial en función del comportamiento, las relaciones parentales y la anatomía (Tabla 2).

Portmann (1935)	Nice (1962)	Skutch (1976)	Otros autores	J.M.Starck (1993)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	Ejemplos	
Grupo 1	Precocial 1	Superprecocial	Precocial	Superprecocial												Megapodiidae (talévalo)	
Grupo 2	Precocial 2	Precocial		Precocial 1													Anatidae (patos)
	Precocial 3			Precocial 2													Rheidae (ñandú)
	Precocial 4	Subprecocial		Precocial 3													Gruidae (grulla)
Grupo 3	Semiprecocial	Semialtricial	Semiprecocial	Semiprecocial												Laridae (gaviota)	
Grupo 4	Semialtricial 1	Altricial	Semialtricial	Semialtricial												Ciconiidae (cigüeña)	
Grupo 5	Semialtricial 2		Altricial 1													Columbidae (paloma)	
Grupo 6 y 7	Altricial		Altricial 2													Passeriformes (diamante zebra de timor)	

Tabla 2. Sinónimos utilizados normalmente para el espectro altricial-precocial. Adaptación del libro *Avian Growth and Development* (Starck y Ricklefs, 1998). Se muestran la clasificación según diferentes autores en función de la presencia/ausencia de las siguientes características: 1, *cría con plumaje suave*; 2, *actividad motora*; 3, *actividad locomotora*; 4, *cría sigue a los parentales*; 5, *búsqueda de comida y alimentación por sí mismo*; 6, *juvenil alimentado por parentales*; 7, *estancia en el nido*; 8, *ojos cerrados al nacer*; 9, *sin plumas al nacer*; A, *sin interacción parental*; B, *plumaje al nacer*. En amarillo claro se marcan las características que están bien definidas para cada grupo mientras que en amarillo oscuro se marcan aquellas en las que existe cierta controversia (en algunas especies sí aparecen y en otras no).



En el extremo precocial del espectro (superprecociales), nos encontramos los megápodos, aves cuyos juveniles son totalmente independientes de los parentales y que, en algunas especies, pueden volar desde el primer día de la vida postnatal. En el extremo altricial nos encontramos a los passeriformes, aves que nacen ciegas y precisan de la alimentación parental.

El espectro altricial-precocial también ha sido ampliamente estudiado en mamíferos, relacionando el tamaño del neonato con esta condición como en el caso de los monotremas y marsupiales, que se localizan en el extremo más altricial siendo sus neonatos relativamente pequeños. Por otro lado, se ha sugerido que tanto la evolución del desarrollo fetal como un mayor tamaño del neonato podrían estar unidos a la condición precocial. Además, se ha visto que este espectro aparece en otros taxones como peces (Bejarano-Escobar et al., 2010; Álvarez-Hernán et al., 2019) e insectos.

En nuestro estudio, nos centramos en el desarrollo del sistema visual y locomotor en aves altriciales y precociales. La habilidad de permanecer de pie y caminar va ligada a la función del esqueleto en aves recién eclosionadas, consistente en dar soporte, resistencia a fuerzas mecánicas de locomoción y crecimiento (Muir, 2000; Dial y Carrier, 2012). Mientras que en aves precociales el esqueleto provee al animal de estas tres funciones, en altriciales sólo aporta la función de soporte. Esto puede ser debido a que en altriciales, el esqueleto está formado por más cartílago que hueso. En el momento de la eclosión, la osificación en aves precociales es más avanzada que en altriciales (Mitgutsch et al., 2011), lo cual explica que la locomoción esté retrasada en este último grupo (Starck y Ricklefs, 1998).

La mayor diferencia que se encuentra entre estos dos grupos es la apertura (precociales) o no apertura (altriciales) de los ojos y oídos al nacer. La apertura de los ojos se considera un evento importante en el desarrollo postnatal. Se establece una relación entre el momento en que se abren los ojos con la respuesta neuronal en el telencéfalo y el comportamiento mecánico (Starck y Ricklefs, 1998). En otro estudio, Blom y Lilja (2005), demostraron que el rudimento de la cabeza, ojos y cerebro se desarrollan antes en la codorniz (precocial) que en el zorzal (altricial) mientras que el intestino lo hace antes en este último. Otro de los órganos sensitivos más analizados, el oído, ha sido utilizado como modelo para determinar cómo se produce el desarrollo en la lechuza común, un ave altricial (Köppl y Nickel, 2007). Los resultados mostraron que el desarrollo del oído se completa tras la eclosión, llegando a ser sorda las dos primeras semanas desde este evento. Debido a que el desarrollo neural en altriciales está retrasado con respecto a los precociales, se pensó que podría afectar a las relaciones sociales de estas especies. Así,



Scheiber et al. (2017) sugirieron que, desde el punto de vista cualitativo, las capacidades cognitivas y la complejidad social podrían verse afectada por el tipo de desarrollo, pero deberían llevarse a cabo estudios más exhaustivos a nivel cuantitativo para corroborar esta posible relación.

5.3. Especies de estudio

En el presente trabajo se han seleccionado tres especies de aves para realizar el estudio comparativo entre aves precociales y altriciales. Como aves precociales hemos elegido la gallina y la codorniz y como ave altricial el diamante cebrado de Tímor. La gallina ha sido siempre un buen modelo de estudio dentro de las aves precociales. Sin embargo, actualmente, la codorniz está tomando impulso dentro de la investigación en biología del desarrollo, pudiendo llegar a ser también un gran modelo. Por otro lado, en aves altriciales existen pocos estudios realizados en el ámbito del desarrollo embrionario y el diamante cebrado de Tímor es una de las especies que más se postula como modelo de esta clase de aves.

5.3.1. La gallina común

La gallina común (*Gallus gallus*) fue descrita por primera vez por Linneo en 1758. Es un ave del Orden Galliformes que ha sido utilizado como el principal modelo de estudio dentro del grupo de las aves. En 1951 Hamburger y Hamilton llevaron a cabo un estudio en el que se recopilaban los estadios de desarrollo de esta especie y los eventos más importantes que tenían lugar en cada uno de ellos.

La gallina presenta un gran dimorfismo sexual. Los machos son más grandes (50cm) y pesan hasta 4 Kg. En la cabeza se puede observar una gran cresta de color rojizo y a ambos lados de la misma, hay dos manchas blancas que permiten distinguirlos de otras especies cercanas. En algunas razas las patas están provistas de espolones. Las hembras son más pequeñas (hasta 40 cm) y pesan hasta 2 Kg. Su coloración es menos llamativa que la de los machos y los apéndices carnosos de la cabeza también son menos prominentes. Esta especie de ave es la más numerosa del planeta y prácticamente han perdido la capacidad de vuelo. Tienen un sistema social que se rige por un orden jerárquico en el que hay un macho dominante sobre todos los demás.



Figura 12. Ejemplar recién nacido de gallina común (*Gallus gallus*).
Imagen tomada por Guadalupe Álvarez Hernán.

En la época reproductiva, la hembra realiza una puesta de un huevo por día durante 8 o 10 días. A los 5 meses tras la eclosión, los individuos alcanzan la madurez sexual.

5.3.2. La codorniz

La codorniz común (*Coturnix coturnix*) fue descrita por primera vez por Linneo en 1758. Se trata de un ave del Orden Galliformes y se ha utilizado como modelo debido a su fácil adquisición y tratamiento y a su alta capacidad reproductiva, llegando a realizar puestas de hasta 12 huevos. Su distribución es mundial y es la única especie de gallináceas que es migratoria. Habita en toda Europa, excepto al norte de Inglaterra, Escandinavia e Islandia. En África la encontramos en el Sahara occidental, Marruecos, Túnez, el norte de Argelia y la franja norte de Egipto, llegando incluso hasta oriente medio.



Figura 13. Ejemplares de codorniz común (*Coturnix coturnix*).

En cuanto a las características morfológicas, presenta entre 16-19 cm de longitud y un peso que varía entre 70 y 130 gramos. En la región dorsal y lateral de su cuerpo, se observa una coloración arenosa con franjas amarillentas y negras. El macho adulto puede presentar una mancha oscura en la garganta con forma de ancla (no en machos juveniles) que se acentúa en la época de celo. Por otro lado, las hembras tienen los colores más apagados que el macho y también el plumaje del pecho moteado. Podríamos decir que existe un ligero dimorfismo sexual.

En el ámbito reproductivo, la primera cría se produce un año después de la eclosión. El cuidado parental es muy asimétrico ya que el macho solo contribuye con la fecundación mientras que la hembra se encarga de construir el nido, incubar los huevos y criar a los pollos. Existe un comportamiento atípico reproductivo en el que el 72% de las hembras se aparean con distintos machos de forma secuencial en el tiempo, de manera que, en un mismo nido nos podemos encontrar con crías de diferentes padres. Estudios que analizaban la condición física de cada macho, determinaron que la nueva pareja de la hembra, presentaba unas mejores condiciones físicas que la anterior (Almañac, 2012).

5.3.3. El diamante cebrado de Tímor

El diamante cebrado de Timor (*Taeniopygia guttata*) fue descrita por primera vez por Vieillot en 1816. Se trata de un ave del Orden Passeriformes. Es autóctona de Australia y su distribución dentro de ésta se centra en las islas de la Sonda, Tímor, Sumba y Flores.



Posee un plumaje con una coloración crema suave y su pico y patas presentan un color rojizo. Presenta entre 10-11 cm de longitud y pesa aproximadamente 12 gramos.



Figura 14. Ejemplar de diamante zebra de tímor (*Taeniopygia guttata*).

Existe un marcado dimorfismo sexual, los machos tienen en la cabeza, el cuello y la parte superior del pecho una coloración azul grisácea mientras que en el dorso y las alas poseen un color castaño. También presentan una banda característica de color negro en los flancos y su pico se encuentra bordeado por una pequeña franja de plumas negras. Por otro lado, las hembras tienen un pico con una coloración más suave que la de los machos y no presentan esas bandas negras en los flancos.

En esta especie, al contrario que en la codorniz, tanto el macho como la hembra se encargan de la incubación de los huevos. Las puestas suelen ser de entre 3 y 12 huevos. En el momento de la eclosión, los polluelos son dependientes de sus padres. 70 días después de la eclosión los machos ya son capaces de reproducirse mientras que las hembras lo hacen 100 días después de la eclosión (Swaddle, 2019).

Objetivos Generales

1. Describir diferentes aspectos del desarrollo embrionario y postnatal de la retina y las extremidades de una especie de ave altricial, el diamante cebrado de Tímor, *Taeniopygia guttata*.
2. Describir diferentes aspectos del desarrollo embrionario de la retina y las extremidades de una especie de ave precocial, la codorniz, *Coturnix coturnix*.
3. Comparar los resultados obtenidos para encontrar posibles diferencias cronológicas en la diferenciación de estas estructuras en el espectro altricial-precocial.
4. Comparar estos resultados con los descritos en la bibliografía para otras aves y el resto de vertebrados.

Bibliografía

- Ábalo XM, Villar-Cervino V, Villar-Cheda B, Anadon R, Rodicio MC (2008) Neurochemical differentiation of horizontal and amacrine cells during transformation of the sea lamprey retina. *J Chem Neuroanat* 35 (2):225-232
- Adler R, Canto-Soler MV (2007) Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol* 305 (1):1-13. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.045
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385 (6613):257-260. doi:10.1038/385257a0
- Alamañac Orduna FJ (2012) Aproximación al estudio del hábitat de la codorniz (*Coturnix c. coturnix*) en la isla de Tenerife.
- Altabef M, Logan C, Tickle C, Lumsden A (2000) Engrailed-1 misexpression in chick embryos prevents apical ridge formation but preserves segregation of dorsal and ventral ectodermal compartments. *Developmental biology* 222 (2):307-316
- Alvarez IS, Navascués J (1990) Shaping, invagination, and closure of the chick embryo otic vesicle: Scanning electron microscopic and quantitative study. *Anatomical Record* 228:315-326
- Álvarez-Hernán G, Andade JP, Escarabaja-Blázquez L, Blasco M, Solana-Fajardo J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2019) Retinal differentiation in syngnathids: comparison in the developmental rate and acquisition of retinal structures in altricial and precocial fish species. *Zoomorphology* 138:14. doi:10.1007/s00435-019-00447-3
- Álvarez-Hernán G, Bejarano-Escobar R, Morona R, González A, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2013) Islet-1 immunoreactivity in the developing retina of *Xenopus laevis*. *ScientificWorldJournal* 2013:740420. doi:10.1155/2013/740420
- Álvarez-Hernán G, S-LI, Bejarano-Escobar R, Pavón-Muñoz T, Rodríguez-León J., Martín-Partido G., Francisco-Morcillo F. (2018) Teleosts: Physiology, Evolution and Classification. *Marine and Freshwater Biology*.
- Amato MA, Arnault E, Perron M (2004) Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences. *Int J Dev Biol* 48 (8-9):993-1001. doi:10.1387/ijdb.041879ma
- Amini R, Rocha-Martíns M, Norden C (2017) Neuronal Migration and Lamination in the Vertebrate Retina. *Frontiers in neuroscience* 11:742. doi:10.3389/fnins.2017.00742
- Baimbridge K, Celio M, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in neurosciences* 15 (8):303-308
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15 (8):303-308
- Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH (1994) Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci* 14 (9):5223-5235
- Barton KM, Levine EM (2008) Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (3):672-682
- Bejarano-Escobar R, Álvarez-Hernán G, Morona R, González A, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2015) Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor *Islet-1* in the developing and mature vertebrate retina. *Exp Eye Res* 138:22-31. doi:10.1016/j.exer.2015.06.021
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2009) Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneo 1758). *Exp Eye Res* 89 (3):398-415. doi:10.1016/j.exer.2009.04.007
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Oyola-Velasco JA, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2010) Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314 (7):580-605. doi:10.1002/jez.b.21363
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2013) Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 223 (2):171-184. doi:10.1111/joa.12071
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, Rodríguez C, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2012) Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 220 (4):318-335. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01480.x
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2014) Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. *Rev Fish Biol Fisheries* 24:127-158
- Bejarano-Escobar R, Holguín-Arévalo MS, Montero JA, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2011) Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Dev Dyn* 240 (7):1841-1855. doi:10.1002/dvdy.22673



- Bergmann M, Grabs D, Rager G (1999) Developmental expression of dynamin in the chick retinotectal system. *J Histochem Cytochem* 47 (10):1297-1306. doi:10.1177/002215549904701009
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27 (26):7028-7040
- Blom J, Lilja C (2005) A comparative study of embryonic development of some bird species with different patterns of postnatal growth. *Zoology* 108 (2):81-95
- Boije H, Edqvist PH, Hallbook F (2008) Temporal and spatial expression of transcription factors FoxN4, Ptf1a, Prox1, Isl1 and Lim1 mRNA in the developing chick retina. *Gene Expr Patterns* 8 (2):117-123. doi:10.1016/j.modgep.2007.09.004
- Boije H, Edqvist PH, Hallbook F (2009) Horizontal cell progenitors arrest in G2-phase and undergo terminal mitosis on the vitreal side of the chick retina. *Dev Biol* 330 (1):105-113. doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.013
- Boije H, Shirazi Fard S, Edqvist P-H, Hallböök F (2016) Horizontal cells, the odd ones out in the retina, give insights into development and disease. *Frontiers in neuroanatomy* 10:77
- Boije H, Shirazi Fard S, Ring H, Hallbook F (2013) Forkheadbox N4 (FoxN4) triggers context-dependent differentiation in the developing chick retina and neural tube. *Differentiation* 85 (1-2):11-19. doi:10.1016/j.diff.2012.12.002
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* 443 (7113):796-802. doi:nature05293 [pii] 10.1038/nature05293
- Buss RR, Sun W, Oppenheim RW (2006) Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 29:1-35. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800
- Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S (2003) Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5 (6):877-889
- Candal E, Anadon R, DeGrip WJ, Rodríguez-Moldes I (2005) Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* 154 (1):101-119. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.10.008
- Cardozo MJ, Almuedo-Castillo M, Bovolenta P (2020) Patterning the Vertebrate Retina with Morphogenetic Signaling Pathways. *Neuroscientist* 26 (2):185-196. doi:10.1177/1073858419874016
- Carney RS, Bystron I, López-Bendito G, Molnár Z (2007) Comparative analysis of extra-ventricular mitoses at early stages of cortical development in rat and human. *Brain Structure and Function* 212 (1):37-54
- Casini G, Rickman DW, Brecha NC (1995) All amacrine cell population in the rabbit retina: identification by parvalbumin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 356 (1):132-142
- Charvet CJ, Striedter GF (2009) Developmental origins of mosaic brain evolution: Morphometric analysis of the developing zebra finch brain. *J Comp Neurol* 514 (2):203-213. doi:10.1002/cne.22005
- Charvet CJ, Striedter GF (2011) Developmental Modes and Developmental Mechanisms can Channel Brain Evolution. *Front Neuroanat* 5:4. doi:10.3389/fnana.2011.00004
- Chen X, Wikler KC, MacLeish PR (2000) Cone properties of retinal margin cells in the monkey (*Macaca mulatta*). *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (8):2019-2022
- Chimal-Monroy J, Rodríguez-León J, Montero JA, Gañán Y, Macías D, Merino R, Hurlé JM (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 257 (2):292-301
- Cid E, Velasco A, Ciudad J, Orfao A, Aijon J, Lara JM (2002) Quantitative evaluation of the distribution of proliferating cells in the adult retina in three cyprinid species. *Cell Tissue Res* 308 (1):47-59
- Clint SC, Zupanc GK (2001) Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia. *Brain Res Dev Brain Res* 130 (1):15-23. doi:S0165380601001936 [pii]
- Cook B, Portera-Cailliau C, Adler R (1998) Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J Comp Neurol* 396 (1):12-19
- Craig SE, Calinescu AA, Hitchcock PF (2008) Identification of the molecular signatures integral to regenerating photoreceptors in the retina of the zebra fish. *J Ocul Biol Dis Infor* 1 (2-4):73-84. doi:10.1007/s12177-008-9011-5
- Cuenca N, Deng P, Linberg KA, Lewis GP, Fisher SK, Kolb H (2002) The neurons of the ground squirrel retina as revealed by immunostains for calcium binding proteins and neurotransmitters. *J Neurocytol* 31 (8-9):649-666
- Cuenca N, Haverkamp S, Kolb H (2000) Choline acetyltransferase is found in terminals of horizontal cells that 1a with GABA, nitric oxide synthase and calcium binding proteins in the tu retina. *Brain Research* 878:228-239
- de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J (2019) Senescence-Associated beta-Galactosidase (SA-beta-GAL) Activity in the Developing Avian Retina. *Dev Dyn*. doi:10.1002/dvdy.74

- Dial TR, Carrier DR (2012) Precocial hindlimbs and altricial forelimbs: partitioning ontogenetic strategies in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Experimental Biology* 215 (21):3703-3710
- Doldan MJ, Prego B, de Miguel Villegas E (1999) Immunochemical localization of calretinin in the retina of the turbot (*Psetta maxima*) during development. *J Comp Neurol* 406 (4):425-432
- Drenhaus U, Voigt T, Rager G (2007) Onset of synaptogenesis in the plexiform layers of the chick retina: a transmission electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 70 (4):329-335. doi:10.1002/jemt.20414
- Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G (2003) Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* 34 (1):53-58
- Edqvist PH, Lek M, Boije H, Lindback SM, Hallbook F (2008) Axon-bearing and axon-less horizontal cell subtypes are generated consecutively during chick retinal development from progenitors that are sensitive to follistatin. *BMC Dev Biol* 8:46. doi:10.1186/1471-213X-8-46
- Edqvist PH, Myers SM, Hallbook F (2006) Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10. *Eur J Histochem* 50 (2):147-154
- Edward DP, Kaufman LM (2003) Anatomy, development, and physiology of the visual system. *Pediatr Clin North Am* 50 (1):1-23. doi:10.1016/s0031-3955(02)00132-3
- Ellis JH, Richards DE, Rogers JH (1991) Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell Tissue Res* 264 (2):197-208
- Elshatory Y, Deng M, Xie X, Gan L (2007) Expression of the LIM-homeodomain protein Isl1 in the developing and mature mouse retina. *J Comp Neurol* 503 (1):182-197. doi:10.1002/cne.21390
- Evans B, Browman H Variation in the development of the fish retina. In: *Development of form and function in fishes and the question of larval adaptation*, Bergen, Norway, 2004. AMERICAN FISHERIES SOCIETY SYMPOSIUM. pp 145-166
- Fausett BV, Goldman D (2006) A role for $\alpha 1$ tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *Journal of Neuroscience* 26 (23):6303-6313
- Fekete DM, Homburger SA, Waring MT, Riedl AE, Garcia LF (1997) Involvement of programmed cell death in morphogenesis of the vertebrate inner ear. *Development* 124 (12):2451-2461
- Fernández-Terán M, Ros MA (2008) The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* 52 (7):857-871. doi:10.1387/ijdb.072416mf
- Ferreiro-Galve S, Rodríguez-Moldes I, Anadon R, Candal E (2010) Patterns of cell proliferation and rod photoreceptor differentiation in shark retinas. *J Chem Neuroanat* 39 (1):1-14. doi:10.1016/j.jchemneu.2009.10.001
- Fimbel SM, Montgomery JE, Burket CT, Hyde DR (2007) Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci* 27 (7):1712-1724
- Fintz A-C, Audo I, Hicks D, Mohand-Said S, Léveillard T, Sahel J (2003) Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (2):818-825
- Fischer AJ (2005) Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res* 24 (2):161-182. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.07.003
- Fischer AJ, Bongini R, Bastaki N, Sherwood P (2011) The maturation of photoreceptors in the avian retina is stimulated by thyroid hormone. *Neuroscience* 178:250-260
- Fischer AJ, Bosse JL, El-Hodiri HM (2014) Reprint of: the ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Exp Eye Res* 123:115-120. doi:10.1016/j.exer.2014.04.019
- Fischer AJ, Foster S, Scott MA, Sherwood P (2008) Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina. *J Comp Neurol* 506 (4):584-603. doi:10.1002/cne.21578
- Fischer AJ, Reh TA (2000) Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Developmental biology* 220 (2):197-210
- Fischer AJ, Stanke JJ, Aloisio G, Hoy H, Stell WK (2007) Heterogeneity of horizontal cells in the chicken retina. *J Comp Neurol* 500 (6):1154-1171
- Frade JM, Barde YA (1999) Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126 (4):683-690
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2004) Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. *Anat Embryol (Berl)* 208 (4):289-299
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2006) Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res* 1103 (1):32-48. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.052



- Fuchs Y, Steller H (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147 (4):742-758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033
- Gallina D, Todd L, Fischer AJ (2014) A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Exp Eye Res* 123:121-130. doi:10.1016/j.exer.2013.06.019
- Galli-Resta L, Ensigni M (1996) An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J Neurosci* 16 (7):2318-2324
- Ganán Y, Macías D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurlé JM (1996) Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122 (8):2349-2357
- Ghai K, Stanke JJ, Fischer AJ (2008) Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain research* 1192:76-89
- Gilbert SF (2005) *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana,
- Godinho L, Williams PR, Claassen Y, Provost E, Leach SD, Kamermans M, Wong RO (2007) Nonapical symmetric divisions underlie horizontal cell layer formation in the developing retina in vivo. *Neuron* 56 (4):597-603. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.036
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97 (1):33-44. doi:10.1002/jcb.20652
- Gorsuch RA, Lahne M, Yarka CE, Petravick ME, Li J, Hyde DR (2017) Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a. *Exp Eye Res* 161:174-192. doi:10.1016/j.exer.2017.05.012
- Gros J, Tabin CJ (2014) Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science* 343 (6176):1253-1256
- Grotewold L, Ruther U (2002) Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol* 46 (7):943-947
- Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, Dellett M, Archer DB, Cogliati T (2009) Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol Vis* 15:1915-1928
- Hamano K, Kiyama H, Emson PC, Manabe R, Nakauchi M, Tohyama M (1990) Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 302 (2):417-424
- Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT (1999) Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn* 215 (1):69-78. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199905)215:1<69::AID-DVDY8>3.0.CO;2-N
- Heavner W, Pevny L (2012) Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (12). doi:10.1101/cshperspect.a008391
- Hendrickson A, Yan YH, Erickson A, Possin D, Pow D (2007) Expression patterns of calretinin, calbindin and parvalbumin and their colocalization in neurons during development of Macaca monkey retina. *Exp Eye Res* 85 (5):587-601. doi:10.1016/j.exer.2007.07.011
- Henzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley B, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106 (6):348-360
- Hickman CPJ (2009) *Principios Integrales de Zoología*. 14 edn.,
- Hidalgo-Sánchez M, Francisco-Morcillo J, Navascués J, Martín-Partido G (2007) Early development of the optic nerve in the turtle *Mauremys leprosa*. *Brain Res* 1137 (1):35-49
- Hitchcock PF, Macdonald RE, VanDeRyt JT, Wilson SW (1996) Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J Neurobiol* 29 (3):399-413
- Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM, Harris WA (1988) Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* 1 (1):15-26
- Hu M, Easter SS (1999) Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol* 207 (2):309-321
- Huesa G, Yanez J, Anadon R (2002) Calbindin and calretinin immunoreactivities in the retina of a chondrosteian, *Acipenser baeri*. *Cell Tissue Res* 309 (3):355-360
- Hutson LD, Bothwell M (2001) Expression and function of *Xenopus laevis* p75(NTR) suggest evolution of developmental regulatory mechanisms. *J Neurobiol* 49 (2):79-98
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354
- Janz R, Südhof T (1999) SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94 (4):1279-1290

- Jayaram H, Jones MF, Eastlake K, Cottrill PB, Becker S, Wiseman J, Khaw PT, Limb GA (2014) Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat. *Stem cells translational medicine* 3 (3):323-333
- Jeon MH, Jeon CJ (1998) Immunocytochemical localization of calretinin containing neurons in retina from rabbit, cat, and dog. *Neurosci Res* 32 (1):75-84
- Julian D, Ennis K, Korenbrot JI (1998) Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol* 394 (3):271-282
- KARDONG K (2007) Vertebrados: anatomía comparada, función y evolución.
- Kawahata K, Cordeiro IR, Ueda S, Sheng G, Moriyama Y, Nishimori C, Yu R, Koizumi M, Okabe M, Tanaka M (2019) Evolution of the avian digital pattern. *Scientific reports* 9 (1):8560
- Kawakami Y, Capdevila J, Buscher D, Itoh T, Rodríguez Esteban C, Izpisua Belmonte JC (2001) WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104 (6):891-900
- Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, dos Santos Matsuura-Kawata VK, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K (2018) Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific reports* 8 (1):1-17
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2012) *Histología y biología celular: Introducción a la Anatomía Patológica*.
- Kim Y-H, Sun W (2012) Distribution of doublecortin immunoreactivities in developing chick retina. *Applied Microscopy* 42 (3):142-146
- Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N (2001) Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res* 131:3-26
- Kolb H, Zhang L, Dekorver L, Cuenca N (2002) A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J Comp Neurol* 453 (2):168-184
- Komori T (2018) Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and cell biology* 149 (4):313-323
- Köppl C, Nickel R (2007) Prolonged maturation of cochlear function in the barn owl after hatching. *Journal of Comparative Physiology A* 193 (6):613-624
- Kristiansen M, Ham J (2014) Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. *Cell Death & Differentiation* 21 (7):1025-1035
- Lamb TD, Collin SP, Pugh EN, Jr. (2007) Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci* 8 (12):960-976. doi:nrn2283 [pii] 10.1038/nrn2283
- Langhe R, Chesneau A, Colozza G, Hidalgo M, Ail D, Locker M, Perron M (2017) Müller glial cell reactivation in *Xenopus* models of retinal degeneration. *Glia* 65 (8):1333-1349. doi:10.1002/glia.23165
- Lee E-S, Kim T-J, Jeon C-J (2013) Identification of parvalbumin-containing retinal ganglion cells in rabbit. *Experimental eye research* 110:113-124
- León Y, Sánchez-Galiano S, Gorospe I (2004) Programmed cell death in the development of the vertebrate inner ear. *Apoptosis* 9 (3):255-264
- Lillo C, Velasco A, Jimeno D, Cid E, Lara JM, Aijón J (2002) The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem* 50 (10):1289-1302
- Linser P, Moscona AA (1979) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (12):6476-6480
- Loeliger M, Rees S (2005) Immunocytochemical development of the guinea pig retina. *Exp Eye Res* 80 (1):9-21. doi:10.1016/j.exer.2004.08.003
- Long F, Ornitz DM (2013) Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (1):a008334. doi:10.1101/cshperspect.a008334
- Loos ER, Rohwer FC (2004) Laying-stage nest attendance and onset of incubation in prairie nesting ducks. *The Auk* 121 (2):587-599
- Lorda-Diez CI, Garcia-Riart B, Montero JA, Rodríguez-León J, Garcia-Porrero JA, Hurlé JM (2015) Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging* 7 (11):974-985. doi:10.18632/aging.100844
- Mack AF, Fernald RD (1997) Cell movement and cell cycle dynamics in the retina of the adult teleost *Haplochromis burtoni*. *J Comp Neurol* 388 (3):435-443
- Mack AF, Germer A, Janke C, Reichenbach A (1998) Müller (glial) cells in the teleost retina: consequences of continuous growth. *Glia* 22 (3):306-313
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M (2008) Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (1):46-62. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009



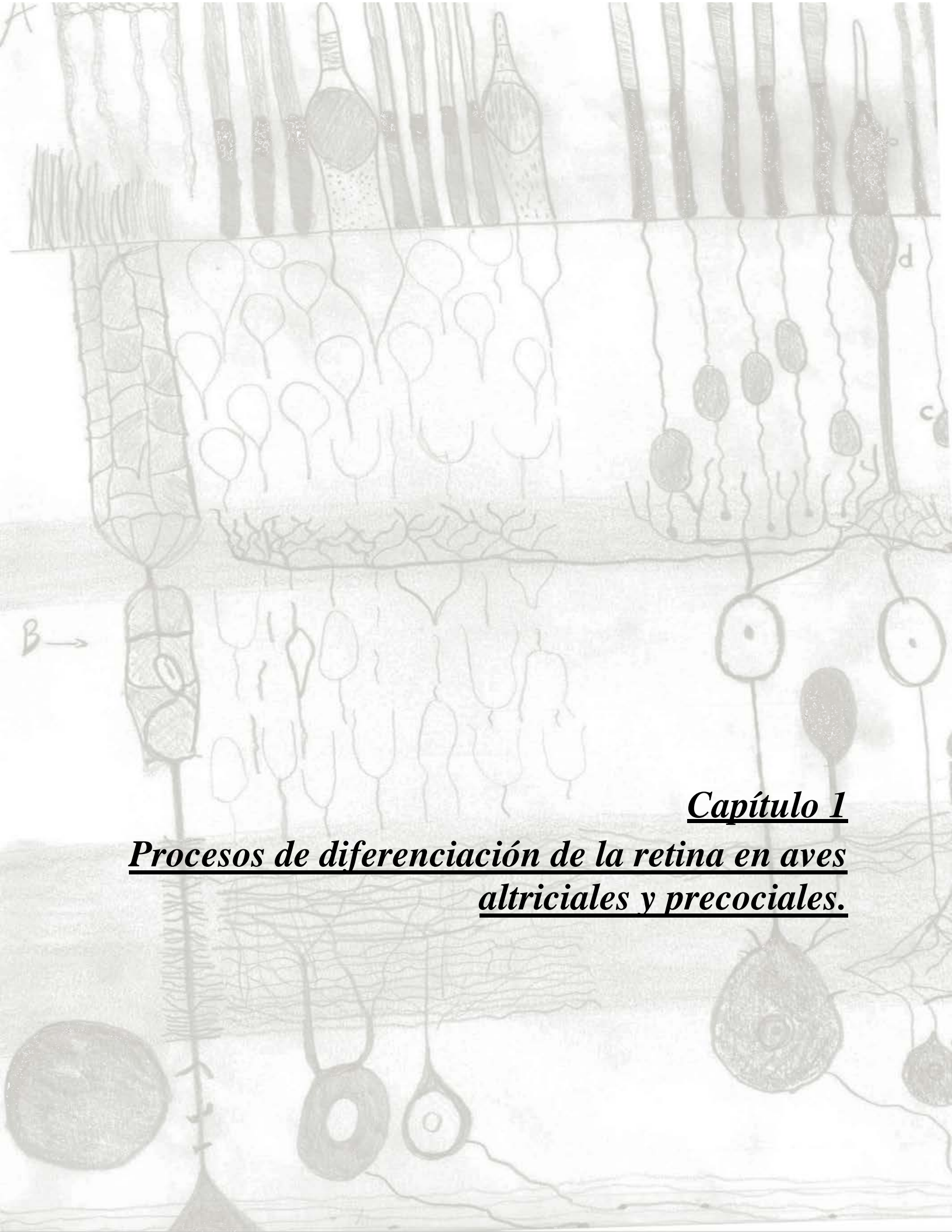
- Marc RE, Liu WL (1984) Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells. *Nature* 312 (5991):266-269
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J (1999) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412 (2):255-275
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, Van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41 (4):535-547
- Marshak DW, Dowling JE (1987) Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *J Comp Neurol* 256 (3):430-443
- Martín-Partido G, Rodríguez-Gallardo L, Álvarez IS, Navascués J (1988) Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anatomical Record* 222:272-281
- Mayordomo R, Valenciano AI, de la Rosa EJ, Hallböök F (2003) Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur J Neurosci* 18:1744-1750
- McManus KJ, Hendzel MJ (2006) The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle. *Biochemistry and cell biology* 84 (4):640-657
- Mearow KM, Mill JF, Freese E (1990) Neuron–glial interactions involved in the regulation of glutamine synthetase. *Glia* 3 (5):385-392
- Merino R, Gañán Y, Macías D, Rodríguez-León J, Hurlé JM (1999) Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* 887:120-132
- Merino R, Macías D, Gañán Y, Rodríguez-León J, Economides AN, Rodríguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC, Hurlé JM (1999) Control of digit formation by activin signalling. *Development* 126 (10):2161-2170
- Mitgutsch C, Wimmer C, Sánchez-Villagra MR, Hahnloser R, Schneider RA (2011) Timing of ossification in duck, quail, and zebra finch: intraspecific variation, heterochronies, and life history evolution. *Zoolog Sci* 28 (7):491-500. doi:10.2108/zsj.28.491
- Molea D, Stone JS, Rubel EW (1999) Class III β -tubulin expression in sensory and nonsensory regions of the developing avian inner ear. *Journal of Comparative Neurology* 406 (2):183-198
- Montero JA, Lorda-Diez CI, Certal AC, Moreno N, Rodríguez-León J, Torriglia A, Hurlé JM (2010) Coordinated and sequential activation of neutral and acidic DNases during interdigital cell death in the embryonic limb. *Apoptosis* 15 (10):1197-1210. doi:10.1007/s10495-010-0523-7
- Montero JA, Lorda-Diez CI, Hurlé JM (2020) Confluence of Cellular Degradation Pathways During Interdigital Tissue Remodeling in Embryonic Tetrapods. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (1217). doi:10.3389/fcell.2020.593761
- Morcillo J, Martínez-Morales JR, Trousse F, Fermin Y, Sowden JC, Bovolenta P (2006) Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* 133 (16):3179-3190. doi:10.1242/dev.02493
- Muir GD (2000) Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain research bulletin* 53 (5):719-726
- Nagashima M, Barthel LK, Raymond PA (2013) A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development* 140 (22):4510-4521. doi:10.1242/dev.090738
- Narkis G, Tzchori I, Cohen T, Holtz A, Wier E, Westphal H (2012) *Isl1* and *Ldb* co-regulators of transcription are essential early determinants of mouse limb development. *Dev Dyn* 241 (4):787-791. doi:10.1002/dvdy.23761
- Navascués J, Martín-Partido G (1990) Glial cells in the optic chiasm arise from the suboptic necrotic centers of the diencephalon floor: morphological evidence in the chick embryo. *Neuroscience Letters* 120:62-65
- Nishitani K, Sasaki K (2006) Macrophage localization in the developing lens primordium of the mouse embryo - an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 83 (1):223-228. doi:S0014-4835(06)00125-4 [pii] 10.1016/j.exer.2005.12.008
- Norenberg MD (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 27 (3):756-762
- Norenberg MD, Martínez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain research* 161 (2):303-310
- NOTTEBOHM F (2004) The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann NY Acad Sci* 1016 (1):628-658
- Pajni-Underwood S, Wilson CP, Elder C, Mishina Y, Lewandoski M (2007) BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development* 134 (12):2359-2368. doi:10.1242/dev.001677
- Pandur P, Sirbu IO, Kuhl SJ, Philipp M, Kuhl M (2013) *Islet1*-expressing cardiac progenitor cells: a comparison across species. *Dev Genes Evol* 223 (1-2):117-129. doi:10.1007/s00427-012-0400-1
- Parr BA, McMahon AP (1995) Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D–V and A–P axes of mouse limb. *Nature* 374 (6520):350-353

- Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R (1990) Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci* 5 (1):1-16
- Patel A, Hunt A, Tahourdin C (1983) Regional development of glutamine synthetase activity in the rat brain and its association with the differentiation of astrocytes. *Developmental Brain Research* 8 (1):31-37
- Pavón-Muñoz T, Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2016) Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* 88 (2):492-507. doi:10.1111/jfb.12802
- Pequignot M, Provost A, Salle S, Taupin P, Sainton K, Marchant D, Martinou J, Ameisen J, Jais JP, Abitbol M (2003) Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 228 (2):231-238
- Peterson RE, Fadool JM, McClintock J, Linser PJ (2001) Müller cell differentiation in the zebrafish neural retina: evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J Comp Neurol* 429 (4):530-540
- Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM (1996) Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84 (2):309-320
- Pizette S, Abate-Shen C, Niswander L (2001) BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128 (22):4463-4474
- Pizette S, Niswander L (1999) BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126 (5):883-894
- Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez, Ramirez G (1991) Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* 3 (11):1187
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474 (2):304-324. doi:10.1002/cne.20134
- Reese BE, Johnson PT, Baker GE (1996) Maturation gradients in the retina of the ferret. *J Comp Neurol* 375 (2):252-273. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<AID-CNE6>3.0.CO;2-1
- Reichenbach A, Bringmann A (2013) New functions of Müller cells. *Glia* 61 (5):651-678. doi:10.1002/glia.22477
- Rodríguez-Gallardo L, Lineros-Dominguez Mdel C, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2005) Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: relationship to cell death and optic fibres. *Anat Embryol (Berl)* 210 (4):303-316. doi:10.1007/s00429-005-0051-3
- Rodríguez-León J, Tomas AR, Johnson A, Kawakami Y (2013) Recent advances in the study of limb development: the emergence and function of the apical ectodermal ridge. *Journal of stem cells* 8 (2):79-98. doi:jsc.2014.8.2.79
- Roots BI (1981) Comparative studies on glial markers. *Journal of Experimental Biology* 95 (1):167-180
- Sagawa H, Terasaki H, Nakamura M, Ichikawa M, Yata T, Tokita Y, Watanabe M (2007) A novel ROCK inhibitor, Y-39983, promotes regeneration of crushed axons of retinal ganglion cells into the optic nerve of adult cats. *Experimental neurology* 205 (1):230-240
- Sanna PP, Keyser KT, Celio MR, Karten HJ, Bloom FE (1993) Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the vertebrate retina. *Brain Res* 600 (1):141-150
- Sanna PP, Keyser KT, Deerink TJ, Ellisman MH, Karten HJ, Bloom FE (1992) Distribution and ontogeny of parvalbumin immunoreactivity in the chicken retina. *Neuroscience* 47 (3):745-751
- Scheiber IB, Weiß BM, Kingma SA, Komdeur J (2017) The importance of the altricial-precocial spectrum for social complexity in mammals and birds—a review. *Frontiers in zoology* 14 (1):3
- Scherz PJ, Harfe BD, McMahon AP, Tabin CJ (2004) The limb bud *Shh*-*Fgf* feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* 305 (5682):396-399
- Schick E, McCaffery SD, Keblish EE, Thakurdin C, Emerson MM (2019) Lineage tracing analysis of cone photoreceptor associated cis-regulatory elements in the developing chicken retina. *Scientific reports* 9 (1):1-14
- Senut MC, Gulati-Leekha A, Goldman D (2004) An element in the alpha1-tubulin promoter is necessary for retinal expression during optic nerve regeneration but not after eye injury in the adult zebrafish. *J Neurosci* 24 (35):7663-7673
- Sharma RK, Ehinger B (1997) Mitosis in developing rabbit retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 64 (1):97-106. doi:10.1006/exer.1996.0189
- Sharma RK, Netland PA (2007) Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res* 1176:11-17. doi:S0006-8993(07)01637-X [pii] 10.1016/j.brainres.2007.07.090
- Sharma RK, O'Leary TE, Fields CM, Johnson DA (2003) Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 145 (1):93-105
- Sharma SC, Ungar F (1980) Histogenesis of the goldfish retina. *J Comp Neurol* 191 (3):373-382



- Sherry DM, Wang MM, Frishman LJ (2003) Differential distribution of vesicle associated membrane protein isoforms in the mouse retina. *Mol Vis* 9:673-688
- Shi W, Wang R, Niu S, Li Y, Ma C, Zhang G, Cong B (2017) Dynamic changes of proliferation and apoptosis in rat retina development. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY* 10 (12):11679-11684
- Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H (2007) Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Development, growth & differentiation* 49 (6):449-454
- Shkumatava A, Fischer S, Müller F, Strahle U, Neumann CJ (2004) Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* 131 (16):3849-3858
- Snow RL, Robson JA (1994) Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience* 58 (2):399-409
- Snow RL, Robson JA (1995) Migration and differentiation of neurons in the retina and optic tectum of the chick. *Exp Neurol* 134 (1):13-24. doi:10.1006/exnr.1995.1032
- Stanke JJ, Lehman B, Fischer AJ (2008) Muscarinic signaling influences the patterning and phenotype of cholinergic amacrine cells in the developing chick retina. *BMC Dev Biol* 8:13
- Starck JM, Ricklefs RE (1998) Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum. vol 8. Oxford University Press on Demand,
- Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S (2002) Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 245 (1):95-108. doi:10.1006/dbio.2002.0640
- Sudarov A, Joyner AL (2007) Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural development* 2 (1):26
- Svobodová J, Šmídová L, Javůrková VG (2019) Different incubation patterns affect selective antimicrobial properties of the egg interior: experimental evidence from eggs of precocial and altricial birds. *Journal of Experimental Biology* 222 (6):jeb201442
- Swaddle JP (2019) Zebra Finches\$. Academic Press Oxford,
- T. Shimizu TBP, G. Szafranski, A. B. Butler (2009) Evolution of the Visual System in Reptiles and Birds. *Neuroscience Encyclopedia*.
- Talbot CJ, Kubilus JK (2018) Developmental analysis of SV2 in the embryonic chicken corneal epithelium. *Experimental eye research* 172:137-143
- Thor S, Ericson J, Brannstrom T, Edlund T (1991) The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* 7 (6):881-889
- Thummel R, Kassen SC, Enright JM, Nelson CM, Montgomery JE, Hyde DR (2008) Characterization of Müller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp Eye Res* 87 (5):433-444
- Todd L, Suarez L, Squires N, Zelinka CP, Gribbins K, Fischer AJ (2016) Comparative analysis of glucagonergic cells, glia, and the circumferential marginal zone in the reptilian retina. *Journal of Comparative Neurology* 524 (1):74-89
- Trousse F, Esteve P, Bovolenta P (2001) Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* 21 (4):1292-1301
- Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina later in the development. *Nature* 328 (6126):131-136
- Valentino KL, Winter J, Reichardt LF (1985) Applications of monoclonal antibodies to neuroscience research. *Annual review of neuroscience* 8 (1):199-232
- Vecino E, García-Briñón J, Velasco A, Caminos E, Lara J (1993) Calbindin D-28K distribution in the retina of the developing trout (*Salmo fario* L.). *Neurosci Lett* 152:291-295
- Vecino E, Rodríguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC (2016) Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 51:1-40. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.003
- Velasco A, Cid E, Ciudad J, Orfao A, Aijon J, Lara JM (2001) Temperature induces variations in the retinal cell proliferation rate in a cyprinid. *Brain Res* 913 (2):190-194
- Verheyden JM, Sun X (2008) An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* 454 (7204):638-641
- Vihhtelic TS, Hyde DR (2000) Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J Neurobiol* 44 (3):289-307
- Wang CK, Omi M, Ferrari D, Cheng HC, Lizarraga G, Chin HJ, Upholt WB, Dealy CN, Kosher RA (2004) Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb. *Dev Biol* 269 (1):109-122. doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.016
- Wang JM, Beissinger SR (2009) Variation in the onset of incubation and its influence on avian hatching success and asynchrony. *Animal behaviour* 78 (3):601-613

- Wang JM, Beissinger SR (2011) Partial incubation in birds: its occurrence, function, and quantification. *The Auk* 128 (3):454-466
- Werblin FS, Dowling JE (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *Journal of Neurophysiology* 32 (3):339-355. doi:10.1152/jn.1969.32.3.339
- Weruaga E, Velasco A, Briñón JG, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR (2000) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the retina of two teleosts. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19:1-15
- Yamagata K, Goto K, Kuo C-H, Kondo H, Miki N (1990) Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 4 (3):469-476
- Yamaguchi Y, Miura M (2015) Programmed cell death in neurodevelopment. *Developmental cell* 32 (4):478-490
- Yang XJ (2004) Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 15 (1):91-103
- Yi C-W, Yu S-H, Lee E-S, Lee J-G, Jeon C-J (2012) Types of parvalbumin-containing retinotectal ganglion cells in mouse. *Acta histochemica et cytochemica*:11061
- Yoon BS, Lyons KM (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93 (1):93-103. doi:10.1002/jcb.20211
- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18 (8):952-963. doi:10.1101/gad.1174704
- Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212 (2):199-205. doi:10.1002/ar.1092120215
- Zhuang S, Zhang Q, Zhuang T, Evans SM, Liang X, Sun Y (2013) Expression of *Isl1* during mouse development. *Gene Expr Patterns* 13 (8):407-412. doi:10.1016/j.gep.2013.07.001
- Zuzarte-Luis V, Hurlé JM (2005) Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2):261-269. doi:10.1016/j.semcdb.2004.12.004



Capítulo 1
Procesos de diferenciación de la retina en aves
altriciales y precociales.

Resumen

La retina de aves ofrece un excelente modelo de estudio para la investigación de los mecanismos que coordinan la morfogénesis, histogénesis y diferenciación de las células neuronales y gliales. La mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo en la una especie precocial, la gallina (*G. gallus*). Sin embargo, poco se conoce de estos procesos en otras aves precociales como la codorniz (*Coturnix coturnix*), especie utilizada recurrentemente como modelo en biología del desarrollo. En el caso de las especies altriciales de aves, estos mecanismos de diferenciación retiniana casi no han sido explorados. Por ello, el propósito del presente capítulo fue determinar cómo se produce la morfogénesis del sistema visual y detallar el proceso de retinogénesis de la especie altricial de ave *T. guttata* y comparar estos resultados con los obtenidos en *C. coturnix* y los ya descritos en *G. gallus*. Para ello, se utilizaron técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que permitieron detectar los eventos clave del desarrollo del sistema visual. De los resultados obtenidos se ha comprobado que estos procesos ontogénéticos ocurren en estadios del desarrollo más avanzados en especies altriciales que precociales. Así, eventos como la morfogénesis de la vesícula y la copa óptica, la aparición de las primeras neuronas diferenciadas o la aparición de las capas plexiformes, ocurren en estadios embrionarios más tardíos en *T. guttata* que en *C. coturnix* y en *G. gallus*. Así mismo, en estadios perinatales, aunque la retina de la especie altricial presenta una citoarquitectura de aspecto maduro, se siguen observando características inmaduras como la presencia de varias capas de células ganglionares, unas capas plexiformes poco desarrolladas o unos fotorreceptores con morfología inmadura. El uso de marcadores tempranos de diferenciación como TUJ1 e Isl1 ha demostrado que los primeros neuroblastos que comienzan a diferenciarse en la retina de la codorniz se detectan en estadios más incipientes del desarrollo que en el diamante, coincidiendo con los primeros núcleos PCNA-negativos. Este retraso en el proceso de diferenciación celular en la especie altricial también se ha comprobado utilizando los marcadores específicos de fotorreceptores (visinina) y de células horizontales (Prox1). Finalmente, mientras que la retina de codorniz está plenamente diferenciada en el momento de la eclosión, la retina de *T. guttata* todavía presenta una elevada actividad proliferativa y un patrón indiferenciado de inmunorreactividad para todos los marcadores utilizados en regiones periféricas. Por tanto, los eventos histogénéticos del sistema visual y la diferenciación de las poblaciones celulares de la retina de especies altriciales se inicia más tarde y se extiende durante más tiempo que en especies precociales. La neurogénesis es intensa en estadios perinatales en la retina de *T. guttata* por lo que este modelo podría ser de enorme utilidad en el estudio de la neurogénesis posnatal.

Introducción



El desarrollo embrionario de aves ha sido ampliamente descrito en la gallina (Hamburger y Hamilton, 1951) ya que es una de las especies modelo por excelencia dentro del campo de la Biología del Desarrollo. Otra especie modelo es la codorniz, donde también se han caracterizado diferentes estadios embrionarios basados en características morfológicas (Ainsworth et al., 2010). Estos estudios en ambas especies precociales han sido esenciales para datar el momento exacto del desarrollo en el que ocurren los principales eventos ontogenéticos en ambas especies. También existen estudios de estadiaje embrionario en especies altriciales, como el capuchino del Japón (*Lonchura striata* Linnaeus, 1766) (Yamasaki y Tonosaki, 1988), la lechuza común (*Tyto alba*, Scopoli, 1769) (Köppl et al., 2005) o la paloma bravía, (*Columba livia* Gmelin, 1789) (Olea y Sandoval, 2012), aunque el número de trabajos posteriores que utilizan estas tablas de desarrollo y que versan sobre eventos ontogenéticos en estas especies es muy escaso. Al revisar todos estos estudios, se comprueba que los eventos ontogenéticos que se suceden en unas especies y otras son similares, si bien la temporalidad con la que ocurren los mismos difiere bastante. Además, el grado de maduración de los individuos recién nacidos de especies altriciales y precociales varía considerablemente.

La mayoría de los estudios de carácter comparado entre especies de aves altriciales y precociales hace hincapié en el estado de madurez de los diferentes tejidos en el momento de la eclosión. Quizás los sistemas nervioso y músculo-esquelético son los que más datos pueden aportar en este sentido (Nice, 1962; Stark y Ricklefs, 1998; Rojas et al., 2007; de Almeida et al., 2015). Si nos centramos en la maduración del sistema nervioso, las especies precociales presentan el sistema nervioso totalmente maduro en el momento de la eclosión, lo que les permite interactuar con el entorno desde el momento que abandonan el huevo (Stark y Ricklefs, 1998; Rojas et al., 2007; Sanders et al., 2010). En cambio, las aves altriciales presentan un sistema nervioso indiferenciado en el momento de la eclosión, finalizando la diferenciación del mismo incluso en estadios post-natales, lo que sugiere un proceso de neurogénesis post-natal muy intenso (Stark y Ricklefs, 1998; Rojas et al., 2007; Charvet y Striedter, 2011). En los órganos de los sentidos, y más concretamente en el sistema visual de especies altriciales, la retina de *C. livia* tiene fotorreceptores que presentan una morfología inmadura en el momento de la eclosión (Rojas et al., 2007). Tanto la diferenciación morfológica como la funcionalidad tienen lugar durante las dos primeras semanas de vida (Bagnoli et al., 1985; Rojas et al., 2007). Esta diferenciación de los fotorreceptores, y más concretamente de su segmento externo, provoca una diferenciación en paralelo del epitelio pigmentario (Porciatti

et al., 1985). En cambio, la diferenciación morfológica de los fotorreceptores en especies precociales es completa en la codorniz y en la gallina (Fischer y Reh, 2000; Rojas et al., 2007). Además, en estas especies, la retina al completo ya es funcional y todas sus células se encuentran diferenciadas y, por lo tanto, son post-mitóticas, con la única excepción de un pequeño grupo de células que se sitúa en la región más periférica de la retina, en la denominada ZMP (Fischer y Reh, 2000; Kubota et al., 2002; Ghai et al., 2008).

Otros autores han desarrollado estudios de embriología comparada. Estos trabajos han demostrado que gran parte de los eventos ontogenéticos que ocurren durante el desarrollo embrionario (formación de la línea primitiva, inicio de la formación del tubo neural y plegamiento del mismo, aparición de las extremidades y crecimiento de las mismas, entre otros) se encuentran ralentizados en especies altriciales con respecto a las precociales, principalmente en estadios iniciales e intermedios (Yamasaki y Tonosaki, 1988; Lilja et al., 2001; Olea y Sandoval, 2012; Murray et al., 2013; Olea et al., 2016). Así, los últimos estadios del desarrollo de especies precociales se caracterizan por el crecimiento somático, estando la mayoría de los tejidos ya completamente diferenciados (Hamburger y Hamilton, 1951; Ainsworth et al., 2010), lo que explica el alto grado de independencia que muestran estas especies al eclosionar.

Para completar este tipo de comparativa entre un modelo de desarrollo y otro, consideramos que el sistema visual constituye un excelente modelo. Por un lado, es un perfecto indicador del estado de maduración del sistema nervioso central en el momento de la eclosión (Evans y Browmann, 2004; Vergara y Canto-Soler, 2012; Álvarez-Hernán et al., 2019), y, por otro, los principales eventos morfogénéticos, histogénéticos y de diferenciación celular están perfectamente datados en *G. gallus*, por lo que se puede establecer un calendario comparativo con otras especies de ave. Así, existen numerosos estudios en los que se demuestra que la retina de *G. gallus* se diferencia completamente durante estadios embrionarios (Kahn, 1973; Prada et al., 1991; Snow y Robson, 1994; Bruhn y Cepko, 1996; McCabe et al., 1999; Drenhaus et al., 2003, 2007; Francisco-Morcillo et al., 2005; Rojas et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2015; de Mera-Rodríguez et al., 2019). Los primeros neuroblastos se diferencian en la región central de la retina entre los estadios (Ests) de Hamburger y Hamilton (1951) 13 (HH13) y HH16 (48-56 h) (Prada et al., 1991; McCabe et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2005). Desde este punto, el proceso de diferenciación celular se extiende al resto de la retina siguiendo una serie de gradientes centro-periférico, dorso-ventral y vítreo- escleral (Prada et al., 1991; Francisco-Morcillo et al., 2005; Drenhaus et al., 2007). Por otro lado,



la CPI se hace visible en el día embrionario 7 (E7) y la CPE en E8 (Drenhaus et al., 2007). La aparición de las capas plexiformes es el evento histogénético más llamativo del tejido retiniano. Este proceso de neurogénesis concluye aproximadamente en E12, cuando células localizadas en la capa de células bipolares/Müller abandonan el ciclo celular (Prada et al., 1991). Como hemos comentado, el proceso de retinogénesis e histogénesis de este tejido ha sido ampliamente descrito en *G. gallus*. Resulta llamativo que estos mismos eventos no hayan sido descritos con anterioridad en otra especie modelo en el campo de la biología del desarrollo como es la codorniz. Los escasos estudios sobre el desarrollo del sistema visual de esta especie se centran en el proceso de muerte celular (Marín-Teva et al., 1999c) (ver capítulo 3), o bien en el estudio de la invasión microglial en la retina (Marín-Teva et al., 1998, 1999a,b; Sánchez-López et al., 2004; 2005). Por otra parte, en los últimos años, la especie altricial *T. guttata* se ha convertido en un modelo de referencia en diferentes campos científicos relacionados con el sistema nervioso, como el de la memoria y el aprendizaje (Moorman et al., 2011), neuroanatomía (Vargha-Khadem et al., 2005) o el de la neurogénesis y la regeneración (Dewulf y Bottjer, 2005; Charvet y Striedter, 2008, 2011; Striedter y Charvet, 2008). Más recientemente, Murray et al. (2013) han descrito los estadios embrionarios de *T. guttata*, lo que ha facilitado el abordaje de estudios de biología del desarrollo en esta especie. Por tanto, con el objetivo de determinar si existen diferencias en la temporalidad de los eventos de formación del sistema visual entre especies altriciales y precociales de aves, se han utilizado embriones e individuos recién eclosionados de *T. guttata* (especie altricial) y de *C. coturnix* (especie precocial). En ambas especies, mediante técnicas de histología básica e inmunohistoquímicas, se han descrito los principales eventos morfogenéticos, histogénéticos y de diferenciación celular con el fin de comparar dichos eventos con los que ocurren en *G. gallus*. Además, mediante estas técnicas, se permite comprobar el estado de maduración del tejido retiniano en ambas especies en el momento de la eclosión y durante los primeros días de vida post-eclosión.

Objetivos

1. Analizar el proceso de morfogénesis y diferenciación celular de la retina de una especie de ave altricial y otra precocial mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, utilizando marcadores de proliferación, marcadores tempranos de diferenciación y marcadores específicos de subpoblaciones celulares ya diferenciadas.
2. Caracterizar las poblaciones celulares en la retina de ambas especies detectadas inmunohistoquímicamente.
3. Comparar los resultados obtenidos en ambas especies y compararlos también con los ya descritos en *G. gallus* y otras clases de vertebrados.

Materiales y Métodos



1. Material de estudio

En el presente estudio se han utilizado individuos en estadios embrionarios y recién nacidos pertenecientes a tres especies de aves diferentes, *Taeniopygia guttata*, *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*. Los individuos fueron procesados de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y del gobierno de España (Real decreto 53/2013). El uso de los embriones y postnatales de estas especies para la experimentación en la presente tesis ha sido aprobado por el Comité de Bioética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (Anexo).

Tras su fijación (ver más adelante), los individuos fueron observados en un microscopio estereoscópico SMZ-1000 (Nikon) y las imágenes se adquirieron con una cámara digital DS-5Mc (Nikon) que posteriormente fueron procesadas con el programa Adobe PhotoShop CS4.

1.1. *Diamante zebra de timor (Taeniopygia guttata)*

Para la realización de esta tesis se utilizaron un total de 112 individuos (Tabla 3). Tanto los embriones como los postnatales de esta especie fueron suministrados por el Dr. Vellema de la Universidad del sur de Dinamarca, de manera que el tratamiento de los animales fue el descrito por él. Los parentales se distribuyeron en dos aviarios de 1x3x2m hechos de madera contrachapada con techos de malla y paneles frontales que permitían el contacto acústico, pero no visual entre animales de aviarios adyacentes. La temperatura era de entre 19°C y 35°C. Las aves se mantuvieron en condiciones de alimentación ad libitum. Cada día eran alimentados con semillas de mijo rojo, plata y Senegal tanto secas como germinadas, y agua fresca (con vitaminas tres veces a la semana). El aviario estaba equipado con 12 cajas-nido de madera (12,5x12x14 cm) con fibra de coco como material de anidación antes de la introducción de los individuos. Los huevos fueron retirados el día de la puesta y se introdujeron en una incubadora a 37,5°C y una humedad del 80-95%, en la cual se mantuvieron un tiempo variable para obtener embriones desde el Est11 hasta el Est46(P0) de acuerdo con Murray et al. (2013) (Fig. 15).



Estadio	Tiempo incubación	n
Est11	54h	2
Est15	66h	2
Est16	72h	2
Est 19	84h	2
Est24	104h	5
Est25	114h	5
Est27	126h	5
Est28	132h	4
Est30	E6	10
Est32	E6,5	4
Est34	E7,5-8	14
Est36	E7,5-8	8
Est37	E8	3
Est38	E8-9	6
Est39	E8-9	11
Est41	E10	13
Est42	E10	2
Est44	E12	1
Est45	E13	7
Est46 (postnatal día 0, P0)	E14	1
P1		1
P5		1
P8		1

Tabla 3. Relación de estadios y número de individuos de *T. guttata* por estadios utilizados.

1.2. Codorniz (*Coturnix coturnix*)

Se han utilizado un total de (Tabla 4) 50 individuos de codorniz para la presente tesis. Los huevos fueron suministrados por la Granja Santa Isabel (S.A. Selección Avícola, Córdoba, España). Los huevos obtenidos se incubaron a un tiempo variable para obtener especímenes de estadios comprendidos entre el 21-22 y el 46, según lo descrito por Ainsworth et al. (2010) (Fig. 15). Las imágenes de embriones pertenecientes a estadios previos al 21-22 presentados en la Fig. 15 se obtuvieron de un archivo de laboratorio de controles.

Estadio	Tiempo incubación	n
Est 21-22	84h	3
Est24-25	108h	3
Est27	120h	4
Est28	132h	4
Est30	E6	5
Est31	E6,5	4
Est34	E7,5-8	5
Est35	E8	4
Est36-37	E8-9	4
Est37	E8-9	4
Est38	E10	4
Est40	E11	2
Est42	E13	2
Est45	E16	1
Est46 (postnatal día 0, P0)	E17	1

Tabla 4. Relación de estadios y número de individuos de *C. coturnix* utilizados.

1.3. Gallina común

En el presente estudio no se han utilizado embriones de gallina. Las fotos presentadas en la Fig. 15 se obtuvieron de un archivo de laboratorio de controles para observar la diferencia morfológica entre las especies en los distintos días de incubación seleccionados. Las patas que se utilizaron para llevar a cabo los experimentos del capítulo 4 de la presente tesis, se tomaron de piezas que habían sido congeladas y almacenadas con anterioridad.



Figura 15. Embriones de *C. coturnix*, *T. guttata* y *G. gallus* de diferentes estadios de desarrollo seleccionados para el presente estudio.



2. *Procesamiento de los especímenes*

2.1. *Fijación*

Una vez alcanzado el estadio de desarrollo deseado, los embriones se extrajeron del huevo y se pasaron a una placa Petri con tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) en la cual se retiraron las membranas con unas pinzas de disección. Posteriormente se procedió a fijar los embriones mediante inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% diluido en PBS durante 24 horas a 4°C. En el caso de los individuos postnatales, éstos fueron sometidos a un procedimiento de eutanasia por decapitación según lo indicado en el Real decreto 53/2013. En cuanto a los embriones y postnatales de la especie *T. guttata*, los individuos fueron fijados por el Dr. Vellema siguiendo el mismo procedimiento y fueron enviados a nuestro laboratorio.

El análisis morfológico del proceso de diferenciación celular en la retina de las tres especies se realizó sobre secciones semifinas, previa inclusión en resina Spurr. Por otro lado, para el análisis inmunohistoquímico se procedió a la obtención de criosecciones, previa congelación.

2.2. *Western blotting*

Las diluciones y proveedores de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el presente estudio están recogidos en la tabla 5. El ojo del individuo recién eclosionado de *T. guttata* se homogeneizó en un tampón de lisis (80mM Tris-HCl pH 7,5; 2mM EDTA; 2mM EGTA; 0,27M Sacarosa; 10mM 162 A-glicolfosfato; 5mM pirofosfato de sodio; 50mM fluoruro de sodio; 1% Triton; 163 0,1mM Vanadato de sodio). La concentración de proteínas se midió mediante un ensayo de proteínas Bradford. Las alícuotas de las muestras del tejido que correspondía a 30µg de proteína total se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida del 7%, 8,5%, 10%, 11% y 12%. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa en un tampón de Tris-glicina-metanol. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con el colorante Ponceau 1 minuto. Posteriormente se lavaron varias veces en agua destilada y tampón tris salino con Tween al 0,2% (TBS-T) hasta que desapareció la tinción y luego se bloquearon en leche en polvo al 5% y TBS-T a temperatura ambiente 1 hora. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron varias veces en TBS-T al 0,2% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. El blot se lavó varias veces en TBS-Tween al 0,2% y luego en TBS 1x. Las membranas se procesaron para el

análisis utilizando un kit de detección quimioluminiscencia (Clarity™ Western ECL Substrate, BIO-RAD).

2.3. Inclusión en resina y obtención de secciones

Tras la fijación, los individuos se lavaron repetidamente en PBS y se procedió a su deshidratación en soluciones de acetona de concentración creciente como se detalla a continuación:

- Acetona 30% 30 min
- Acetona 50% 30 min
- Acetona 70% 30 min
- Acetona 90% 30 min
- Acetona 100% (x3) 30 min
- Acetona: óxido de propileno (1:1) 15 min
- Óxido de propileno (x3) 10 min
- Óxido de propileno : resina (1:1)..... 60 min
- Resina (4°C) Toda la noche

Al día siguiente los individuos fueron transferidos a moldes de silicona con resina pura donde fueron orientados. Posteriormente se introdujeron en el interior de una estufa a 70°C durante al menos 8 horas para conseguir la polimerización de la resina.

Con el uso de un microtomo *Reicher Jung* se obtuvieron secciones semifinas de 3µm de grosor que fueron transferidas a gotas de agua sobre un portaobjetos en una placa calefactora a 90°C.

2.4. Congelación y obtención de secciones

Las muestras fijadas se lavaron en PBS y fueron crioprotegidas en PBS-sacarosa (15%) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente los especímenes se introdujeron en una estufa a 37°C 20 minutos en una solución de PBS-gelatina (15%)-sacarosa (15%) (PBS-G-S). Durante este periodo, se añadieron 5ml de PBS-G-S a unas bandejas de plástico de 5x5 cm que fueron introducidas a 4°C para la formación de una base ya gelatinizada que sirva de soporte. Transcurridos los 20 minutos, los especímenes se pasaron a las bandejas con la base gelatinizada, añadiéndose más solución líquida de PBS- G-S hasta



cubrirlos totalmente. Tras colocar dichos especímenes en la orientación apropiada, volvieron a introducirse en el frigorífico a 4°C durante, al menos, 15 minutos para su gelatinización.

Por último, bajo la lupa y con la ayuda del bisturí se procedió a tallar bloques con la orientación deseada del espécimen.

Los bloques se pegaron con Tissue-Tek a una pequeña lámina de corcho y se sumergieron, con la lámina de corcho hacia arriba, durante 3 minutos en una mezcla de alcohol isopropílico (2-propanol) y nieve carbónica (hielo seco) a -75°C. La muestra congelada fue secada con papel absorbente con objeto de eliminar el exceso de alcohol. A continuación, el bloque pegado al corcho, se envolvió en papel de aluminio identificado con una etiqueta y se almacenó en un arcón a -80°C hasta el momento de cortar la pieza.

De los especímenes congelados se obtuvieron secciones frontales de 20µm de grosor con el uso de un microtomo criostático (MICROM HM 550). Estas secciones fueron recogidas en portaobjetos Superfrost®Plus (Menzel-Glasser, Alemania). Los portaobjetos se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento inmunohistoquímico.

2.5. Tinción de secciones semifinas

Para realizar el análisis morfológico de la histogénesis retiniana, las secciones semifinas fueron teñidas con una solución acuosa de azul de toluidina al 0,5% y tetraborato sódico al 0,5%. Para ello, una vez secos los portaobjetos con las secciones adheridas, se aplicó el colorante durante 45 segundos sobre una placa calefactora a 90°C. Transcurrido este tiempo se procedió a lavar el portaobjetos con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Por último, se dejaron secar los mismos en la plancha y se procedió al montaje con Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania).

2.6. Técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones

Para el análisis de la presencia de diferentes antígenos en la retina de las tres especies de aves descritas anteriormente se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia simple e inmunofluorescencia doble. En el caso de esta última, nos permitió analizar posibles colocalizaciones de distintos antígenos. Los portaobjetos con las secciones se extrajeron del congelador de -20°C y se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir que el tejido se atempere y quede bien adherido a los portaobjetos. Previo al inicio de las técnicas de inmunofluorescencia, se llevó a cabo un protocolo de rescate antigénico. Para ello, los portaobjetos se sumergieron en tampón citrato a pH 6 al baño maría (90°C) durante media hora. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar sumergidos en el tampón



citrato a temperatura ambiente durante 20 minutos. A partir de este punto se inició el protocolo de inmunofluorescencia.

2.6.1. Inmunofluorescencia simple

Para el análisis del proceso de diferenciación celular se realizaron técnicas de inmunofluorescencia simple. Así, tras realizar el protocolo de recuperación antigénica, las secciones se lavaron en PBS-Triton X-100 al 0,05% (PBS-T) durante 10 minutos y dos veces en PBS con gelatina (2 g/litro) y Triton X-100 (0,25%) (PBS-G-T) 10 minutos cada lavado. Posteriormente, se incubaron en PBS-G-T con lisina 1M (PBS-G-T-L) durante, al menos, 1 hora para bloquear los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos. A continuación, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario diluido en PBS-G-T-L en una cámara húmeda y a temperatura ambiente durante toda la noche. Pasado este tiempo, se realizaron 2 lavados en PBS-T de 5 minutos cada uno y un lavado en PBS-G-T de 5 minutos. Seguidamente, se procedió a incubar las secciones con el anticuerpo secundario diluido en PBS-G-T en la cámara húmeda durante 2 horas. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 2 lavados en PBS-T de 10 minutos cada uno y un lavado en PBS-G-T durante 10 minutos en oscuridad. Para conseguir una mejor distinción de las capas nucleares y plexiformes, las secciones se incubaron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, Sigma) a una concentración de 2 μ M 15 minutos en oscuridad en una cámara húmeda y posteriormente se lavaron para eliminar el exceso del colorante en PBS en oscuridad. A continuación, se procedió al montaje de las secciones en moviol (MKBD8495V, SIGMA), un medio de montaje acuoso. Las secciones se mantuvieron a 4°C hasta su observación posterior.

2.6.2. Inmunofluorescencia doble

Con el objetivo de analizar la existencia de posible co-localización de distintos antígenos y observar el patrón de proliferación y la actividad de la ZMP, se realizaron estudios de doble marcaje. El protocolo que se siguió fue fundamentalmente el mismo que para una inmunofluorescencia simple. Sin embargo, en lo que respecta a los anticuerpos primarios, se seleccionó la combinación de un anticuerpo monoclonal y otro policlonal, desarrollados en diferentes especies, para evitar interferencia. Por tanto, el suero primario estaba conformado por una mezcla al 50% de los dos anticuerpos utilizados, diluidos en PBS-G-T. Igualmente, se utilizó una mezcla al 50% de los dos anticuerpos secundarios. Los anticuerpos utilizados en la presente tesis tanto para la inmunofluorescencias simples como para la dobles, están recogidos en la tabla 5.



Anticuerpos primarios	Dilución (Inmunohistoquímica)	Dilución (Western blot)	Proveedor
Anticuerpo monoclonal anti- α tubulina acetilada desarrollado en ratón	1:200		Santa Cruz Biotechnology (Ref. sc-23950)
Anticuerpo monoclonal anti- β tubulina clase III (Tuj1) desarrollado en ratón	1:200	1:1000	Abcam (Ref. ab14545)
Anticuerpo monoclonal anti-glutamina sintetasa desarrollado en ratón	1:200		Millipore (Ref. MAB302)
Anticuerpo monoclonal anti-Islet 1 desarrollado en ratón (clon 40.2D.6)	1:200	1:30	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB).
Anticuerpo monoclonal anti-Parvalbúmina desarrollado en ratón	1:200		Chemicon
Anticuerpo monoclonal anti-PCNA desarrollado en ratón (clon PC10)	1:200	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Ref. sc-56)
Anticuerpo monoclonal anti-vesículas sinápticas (SV2) desarrollado en ratón	1:200		Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Anticuerpo monoclonal anti-visinina desarrollado en ratón (clon 7G4)	1:200	1:30	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB).
Anticuerpo policlonal anti-calretinina desarrollado en conejo	1:500	1:1000	Swant (Ref. 7697)
Anticuerpo policlonal anti-fosfohistona H3 desarrollado en conejo	1:200	1:1000	Millipore (Ref. 06-570)
Anticuerpo policlonal anti-Prox1 desarrollado en conejo	1:200	1:1000	Millipore (Ref. 07-634)
Anticuerpos secundarios	Dilución (Inmunohistoquímica)	Dilución (Western blot)	Proveedor
Alexa Fluor 488 IgG anti-conejo desarrollado en cabra	1:200		Molecular Probes (Ref. A11008)
Alexa fluor 594 IgG anti-ratón desarrollado en cabra	1:200		Molecular Probes (Ref. A11032)
Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón desarrollado en cabra	1:200		Molecular Probes (Ref. A11029)
Alexa fluor 594 IgG anti-conejo desarrollado en cabra	1:200		Molecular Probes (Ref. A11037)
Donkey anti-mouse IgG (H+L)		1:500	ThermoFisher (Ref. SA1-100)
Donkey anti-rabbit IgG		1:500	ThermoFisher (Ref. SA1-200)

Tabla 5. Relación de anticuerpos utilizados en el presente estudio.

3. Observación de las secciones

La observación de las secciones semifinas teñidas con azul de toluidina y de las criosecciones sometidas a las técnicas de inmunofluorescencia se realizó en un fotomicroscopio Nikon Eclipse 80i, obteniendo las imágenes digitales con una cámara Nikon digital camera DXM1200F acoplada al mismo. Las imágenes fueron tratadas con el software Adobe PhotoShop (versión CS4).

Resultados



En el presente apartado describimos el proceso de histogénesis del sistema visual, así como el de diferenciación celular de la retina de una especie altricial (*Taeniopygia guttata*) y otra precocial (*Coturnix coturnix*), con el objeto de realizar una comparación de estos eventos ontogénicos en ambas especies. Para ello, hemos empleado tanto técnicas de histología básica como inmunohistoquímicas. Los anticuerpos elegidos se han empleado con anterioridad en numerosos estudios desarrollados en retina y muestran unos patrones de inmunorreactividad bastante conservados en la filogenia de vertebrados. Para la detección del inicio de la retinogénesis se han seleccionado marcadores tempranos de diferenciación neuronal como son α -Tub, TUJ1 e Isl1. Los resultados obtenidos son expuestos a continuación.

1. Validación de anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en el presente estudio han sido ampliamente usados en estudios inmunohistoquímicos para realizar el seguimiento de la actividad proliferativa y la caracterización celular así como su diferenciación en diferentes grupos de vertebrados. La mayoría de los anticuerpos utilizados en el presente capítulo (Tabla 5 de materiales y métodos) fueron detectados mediante western blot partiendo de una muestra de ojo de un individuo recién nacido de *T. guttata* (Fig. 16) mostrando un peso molecular similar al obtenido para los mismos antígenos en otras especies. No se ha detectado la presencia de las bandas de proteínas Prox1 y pHisH3. Ambos anticuerpos han sido ampliamente utilizados en estudios de neuroanatomía y desarrollo en la retina de peces (Alunni et al., 2007; Cid et al., 2010; Bejarano-Escobar et al., 2012a, 2014) anfibios (Perry et al., 2010), aves (Fischer y Reh, 2000; Edqvist et al., 2006, 2008; Boije et al., 2009) y mamíferos (Dyer et al., 2003; Barton et al., 2008). En el caso de Prox1, fue validado por los proveedores para su uso en inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en diferentes especies, sin embargo, no era adecuado para su uso en western blot (Millipore: AB5475). Por otro lado, encontramos que el patrón que presenta en el presente capítulo, ha sido descrito previamente en la retina de *G. gallus* (Edqvist et al., 2006, 2008) y *Mus musculus* (Dyer et al., 2003). En el caso de pHisH3, los proveedores validaron su uso para western blot, inmunoprecipitación e inmunohistoquímica (Millipore: 06-570). Sorprendentemente, no encontramos la banda inmunorreactiva que cabría observar utilizando el tejido de *T. guttata*. Sin embargo, el estudio inmunohistoquímico ha dado como resultado la detección de abundantes mitosis apicales y no apicales en la retina de esta especie (capítulo dos de la presente tesis) de acuerdo con lo descrito en la retina en

diferenciación de peces (Godinho et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Pavón-Muñoz et al., 2016), gallina (Boije et al., 2009) y ratón (Barton y Levine, 2008). Todos estos datos sugieren una conservación interespecífica correspondiente a los epítomos para Prox1 y pHisH3.

2. Estudio morfológico y neuroquímico de la retina de individuos recién eclosionados de *Taeniopygia guttata*.

El análisis de la retina de individuos recién eclosionados (día posnatal 0, P0) muestra, en secciones semi-finas teñidas con azul de toluidina, la típica estratificación en capas que se aprecia en la retina de vertebrados, principalmente en la región central y centro-periférica (Fig. 17 A,C). También se aprecia una prominente cabeza del nervio óptico que alberga una elevada cantidad de axones (Fig. 17 A), al igual que el resto de la longitud del nervio óptico (Fig. 17 B). No obstante, todavía se aprecian signos de inmadurez en la retina como la ausencia de segmentos externos en los fotorreceptores situados en la CNE (Fig. 17E), signo de que la diferenciación morfológica de los fotorreceptores todavía no ha tenido lugar. Por otro lado, las capas plexiformes también se encuentran muy poco desarrolladas y la CCG presenta varios estratos de células (Fig. 17 A,C). Además, la región periférica todavía permanece indiferenciada y está constituida por una CNb (Fig. 17D), lo que sugiere que todavía está desarrollándose.

Estos signos de inmadurez también se aprecian con el uso de técnicas inmunohistoquímicas. El empleo de anticuerpos frente a PCNA muestra abundante actividad proliferativa en toda la extensión de la retina (Fig. 18A-C). En las regiones central y centro-periférica, la actividad proliferativa se concentra principalmente en la capa donde se localizan los somas de las células bipolares y de Müller (Fig. 18A-F). La región periférica, por el contrario, muestra abundante inmunoreactividad en la región de la ZMC (Fig. 18A-C, G-I). Por otra parte, se encuentran abundantes figuras mitóticas inmunorreactivas frente a pHisH3 en toda la superficie escleral de la retina (Fig. 19A-I), siendo especialmente abundantes en la región periférica (Fig. 19G-I). En este estadio, también se detectan mitosis extra-ventriculares en la región periférica de la retina (Fig. 19B,C). Otro de los rasgos característicos de la retina madura es la presencia de las capas plexiformes, las cuales aparecen bien conformadas en las regiones central y centro-periférica (Fig. 17A) pero no así en la periferia (Fig. 17D). La actividad sináptica está presente en estas capas plexiformes al ser puesta de manifiesto con anticuerpos frente a



SV2 (Fig. 19J-L).

Las distintas poblaciones de células retinianas son identificadas con diferentes anticuerpos. Así, anticuerpos anti-Isl1 ponen de manifiesto sub-poblaciones de células ganglionares, amacrinas y horizontales (Fig. 20A-C), al igual que el anticuerpo anti-CR (Fig. 20D-F). Por su parte, el anticuerpo anti-Prox1 identifica núcleos de células dispuestas en la capa de células horizontales y, además, otros núcleos con morfología ovoidea, localizados en regiones más internas de la retina (Fig. 20G-I). La inmunorreactividad frente a visinina es intensa en la CNE mostrando unos fotorreceptores que todavía no son maduros del todo (Fig. 20J-L, K', L').

3. Estudio morfológico y neuroquímico del proceso de diferenciación de la retina de *Taeniopygia guttata*.

Las vesículas ópticas, formadas por un neuroepitelio, con mitosis situadas en la región ventricular, son distinguibles en el Est11 (Fig. 21A,B). En el Est15 se produce la invaginación de estas estructuras para formar las copas ópticas (Fig. 21C,D). En este estadio se observan cuerpos picnóticos en el neuroepitelio (Fig. 21C,D). El proceso de invaginación se muestra más avanzado en el Est16, con abundantes espacios extracelulares presentes en la región vítrea de la retina y observándose la vesícula del cristalino claramente definida (Fig. 21E,F). Una situación similar se aprecia en el Est19 (Fig. 21G,H). Durante todo este periodo embrionario temprano, se observan figuras mitóticas en la región escleral de la retina (Fig. 21B,D,F,H).

En el Est24 el cristalino está completamente independizado del ectodermo y algunos núcleos, con morfología alargada, se sitúan en regiones cercanas a la superficie vítrea (Fig. 22A). En esa zona se distinguen los primeros núcleos PCNA-negativos (Fig. 22B-D), coincidiendo con el inicio de la inmunorreactividad frente a TUJ1 en axones que cursan paralelos a la superficie vítrea, en somas neuronales cercanos a la misma y en prolongaciones radiales en todo el espesor de la CNb ((Fig. 22E-G).

En el Est25 la retina sigue estando formada por una CNb (Fig. 23A,B) en la que se aprecian abundantes mitosis en la región escleral (Fig. 23B) fuertemente inmunorreactivas frente a pHisH3 (Fig. 23D,F,H,J). Además, en este estadio detectamos, por primera vez, inmunorreactividad frente a Isl1 en somas redondeados localizados cerca de la superficie vítrea y en somas ovoideos situados en regiones más externas de la CNb (Fig. 23E,F,I,J).

En el Est27 existe un incremento en el tamaño del ojo y en el espesor de la CNb (Fig. 24A,B). Las mitosis siguen presentes en la región escleral y los núcleos, con

morfología esférica, se distinguen en mayor número en la superficie vítrea (Fig. 24A,B). Además, un importante número de axones comienza a detectarse en la región ventral del nervio óptico (Fig. 24C). Estos axones presentan una inmunorreactividad intensa frente a TUJ1, como puede apreciarse en la superficie vítrea de la retina (Fig. 25B,C,E,F), en la región ventral y lateral del nervio óptico (Fig. 25H,I) y en el quiasma y tractos ópticos (Fig. 25K,L). Este anticuerpo marca en la retina abundantes somas neuronales, unos redondeados y otros alargados en el sentido vítreo-escleral (Fig. 25E,F).

En el Es28 se detecta un aumento en el número de somas PCNA-negativos situados en la región vítrea (Fig. 26A-C), coincidiendo topográficamente con los núcleos Isl1-positivos (Fig. 26D-G). Las figuras mitóticas pHisH3-positivas siguen estando muy presentes en la región escleral de la retina (Fig. 26D-G). En esta región es donde se detectan, además, los primeros somas visinina-inmunorreactivos (Figura 26H-J).

En el Est32 el grosor de la retina central es ligeramente mayor que el de la periférica (Fig. 27A-C) y, por primera vez, se observan figuras mitóticas extra-ventriculares, alejadas de la superficie escleral de la retina (Fig. 27B,B'). El patrón de inmunorreactividad frente a TUJ1 también pone de manifiesto estas diferencias entre la retina central y la periférica. Así, los neuroblastos migratorios muestran prolongaciones más alargadas en la región central (Fig. 27D-F) que en la periférica (Figura 27G-I).

En el Est34 las figuras mitóticas extra-ventriculares se observan en la región central (Fig. 28B) y en la periférica (Fig. 28C), si bien son más numerosas en la región central (Ver capítulo 2). En este estadio se detectan los primeros núcleos Prox1- inmunorreactivos, que se localizan en la mitad vítrea de la retina (Fig. 28D-F). y abundantes células visinina-positivas se concentran en la región escleral de la retina (Figura 28G-I).

En el Est38 las células PCNA-negativas se concentran principalmente en la región vítrea de la retina, aunque también existen núcleos negativos frente a este marcaje cerca de la superficie escleral (Fig. 29A-C). En este estadio, comienza a distinguirse una discontinuidad entre las células ganglionares que se están diferenciando en la región vítrea y el resto de la retina, coincidiendo con un aumento, en la misma región, de la inmunorreactividad frente a SV2 (Fig. 29D-F). Coincidiendo con este evento histogenético, se detectan las primeras células TUJ1-positivas en la capa presuntiva de células amacrinas (Fig. 29G-I). La región más periférica sigue mostrando un patrón de inmunorreactividad frente a TUJ1 similar al detectado en estadios en los que la retina estaba completamente indiferenciada (Fig. 29J-L). La inmunorreactividad de Isl1 en este estadio se localiza en numerosos núcleos de la retina (Fig. 30A-D). Las mitosis pHisH3-positivas siguen estando presentes tanto en la región escleral como en la mitad vítrea



(Fig. 30A- D). Los núcleos de células Prox1-positivos se observan en regiones más esclerales, incluso en la capa presuntiva de células horizontales (Fig. 30E-G). Un gran número de fotorreceptores expresan visinina (Fig. 30H-J).

En el Est41 el tamaño del ojo es considerablemente mayor que en estadios anteriores (Fig. 31A). La región central presenta la típica estratificación en capas de la retina de vertebrados (Fig. 31B). En la región centro-periférica, aunque se observa la CPI, la CPE está todavía ausente (Fig. 31C). La región periférica presenta una retina totalmente indiferenciada (Fig. 31D). La inmunorreactividad de TUJ1 en la región central muestra un intenso marcaje en el EFO, en un notable número de somas en la CCG y en unos pocos somas localizados en la capa de células amacrinas (Fig. 32A-C). En el caso de Isl1, la inmunorreactividad se localiza en un gran número de células ganglionares, una subpoblación de células amacrinas, en una subpoblación de células horizontales y en unos pocos somas de células que se sitúan en regiones intermedias de la CNI (Fig. 32D-F). Por su parte, los núcleos Prox1-inmunorreactivos se localizan principalmente en la capa de células horizontales, aunque algunos de ellos todavía se sitúan en regiones más vítreas de la retina (Fig. 32G-I). Por tanto, en estadios perinatales, a pesar de que existe un elevado grado de diferenciación en la región central de la retina, todavía hay signos de inmadurez en las regiones periféricas, tanto en la formación de las capas como en el patrón de células inmunorreactivas frente a los diferentes marcadores empleados. Tomando los anteriores resultados en conjunto, se observa que el proceso de diferenciación celular en *T. guttata* comienza en el Est24 y, desde ese momento, parece seguir un patrón de diferenciación similar al descrito en otros vertebrados.

4. Estudio inmunohistoquímico de la retina de *Coturnix coturnix* en individuos recién eclosionados.

Para conocer el grado de diferenciación de la retina de *C. coturnix* en el momento de la eclosión, analizamos con DAPI y con marcadores inmunohistoquímicos su estructura. Se puede observar que tanto la región central (Fig. 33A) como la región periférica (Fig. 33B) presentan las capas típicas de la retina de vertebrados. La actividad mitótica, identificada con anticuerpos anti-pHisH3, está ausente en la región central de la retina y únicamente se observa en unas pocas células localizadas en la región escleral de la retina más periférica y en células situadas en la *pars plana* (Fig. 33A,B), lugar donde se sitúan la mayor parte de células PCNA-positivas (no mostrado). Por ello, se deduce que tanto la actividad mitótica como la actividad proliferativa están prácticamente ausentes en el tejido retiniano de

individuos recién eclosionados.

El resto de marcadores utilizados muestra un patrón de expresión similar al observado en otros vertebrados. Así, parvalbúmina (PV) se expresa en células amacrinas que sitúan su soma a diferentes alturas y que, además, proyectan sus prolongaciones en 5 sub-láminas de la CPI (Fig. 33C-E, C', D'). Por otra parte, la inmunorreactividad frente a Prox1 se concentra, con mayor intensidad, en la capa de células horizontales (Fig. 33F- H, F'-H'). La actividad sináptica tanto en la CPE como en la CPI es intensa, como muestra el anticuerpo anti-SV2 (Fig. 33I-K). De manera ocasional, el soma de células situadas en la capa de células amacrinas aparece ligeramente marcado (Fig. 33I-K). Un gran número de fotorreceptores es fuertemente inmunorreactivo frente a anticuerpos anti-visinina (Fig. 33L-N). Estas células muestran un segmento externo muy desarrollado (Fig. 33L'-N'). Las células de Müller también expresan fuertemente GS (Fig. 33O-Q). La inmunorreactividad se hace especialmente intensa en la región medial de la CNI, donde se localiza el soma de estas células gliales, pero también en la superficie vítrea de la retina, donde las finas expansiones se engrosan formando un pie (Fig. 33O-Q). Por tanto, los patrones de inmunorreactividad en la retina de individuos recién eclosionados de *C. coturnix* son similares a los descritos en la retina de otras especies de vertebrados. Además, la histología y la morfología de las células muestran signos de retina totalmente madura. En el presente estadio no se han incluido figuras relativas a ensayos con TUJ1 e Isl1 ya que el patrón que presenta es similar al de estadios previos a la eclosión y resulta redundante.

Una vez analizada la histología de la retina madura, se procedió a llevar a cabo el estudio del proceso de diferenciación de la misma.

5. Estudio inmunohistoquímico del proceso de retinogénesis en *Coturnix coturnix*.

La retina de la codorniz, en los primeros estadios de desarrollo analizados en el presente estudio, muestra un neuroepitelio indiferenciado sin inmunorreactividad frente a marcadores de diferenciación (no mostrado). Es en el Est21-22 cuando comienzan a detectarse en la región vítrea, gracias al uso de anticuerpos frente a α TubAc, los axones de las primeras células ganglionares que se diferencian (Fig. 34B,D,F,H). En este estadio, la actividad mitótica detectada en la región escleral de la retina con el anticuerpo anti-pHisH3 es intensa (Fig. 34C,D,G,H). Además, se detectan los primeros núcleos Isl1-positivos cercanos a la superficie vítrea de la retina (Fig. 34J,K,M,N). En el Est24-25 se aprecian núcleos PCNA-negativos en la superficie vítrea de la retina (Fig. 35A-C),



coincidiendo con un aumento de los axones de células ganglionares α TubAc-positivos (Fig. 35D-G).. En la misma región es posible detectar un notable número de núcleos Isl1-positivos (Fig. 35H-J) y de somas TUJ1-inmunorreactivos (Fig. 35K-M). No obstante, son menos numerosos en la región periférica (Fig. 35N-P).

En el Est28, los núcleos PCNA-negativos se concentran principalmente en la superficie vítrea de la retina (Fig. 36A-C), coincidiendo topográficamente con un aumento en el número de células α TubAc- (Fig. 36D-G), Isl1- (Fig. 36H-J), CR- y TUJ1-inmunorreactivas (Fig. 36K-N, K'-N'). En la misma región es posible encontrar las primeras células Prox1-positivas (Fig. 36O-Q). Por otra parte, la actividad mitótica, puesta de manifiesto con anticuerpos anti-pHisH3, sigue siendo intensa en la región escleral de la retina (Fig. 36D-G). En este mismo estadio, se detectan los primeros núcleos PCNA-negativos en la misma región (Fig. 36A-C), así como las primeras células visinina-inmunorreactivas (Fig. 36R-T).

En el Est31 comienza a apreciarse una ligera discontinuidad por encima de la CCG presuntiva (Fig. 37E,H). El número de células localizadas en la región vítrea de la retina que son TUJ1-positivas y que además expresan CR aumenta (Fig. 37A-D). Algunos neuroblastos TUJ1-inmunorreactivos se sitúan todavía en regiones externas de la retina (Fig. 37C-D). Así mismo se puede observar una intensificación en el marcaje de Prox1 que se comienza a desplazar a la región más interna de la futura CNI (Fig. 37E-G). La inmunoreactividad frente a visinina se ha incrementado considerablemente en la superficie escleral de la retina y la morfología de las células que la expresan ha cambiado, apareciendo un segmento externo bastante prominente en las mismas (Fig. 37H-J, H'-J'). La inmunoreactividad frente a Isl1, en el Est32-33, también se distribuye en numerosos núcleos situados en la CCG presuntiva y en regiones esclerales a la incipiente CPI que empieza a distinguirse (Fig. 37K-M). En este estadio, comienza a detectarse por primera vez marcaje con el anticuerpo anti-SV2 en la CPI que está emergiendo (Fig. 37N-P).

En el Est35 la actividad proliferativa es todavía intensa en la mitad escleral de la CNI (Fig. 38B,D). En cambio, la actividad mitótica es bastante escasa y se restringe a unas pocas células pHisH3-positivas localizadas en la parte externa de la CNI y en la CNE (Fig. 38C,D). La CR se detecta principalmente en células ganglionares, aunque también se observa en una sub-población de células amacrinas y en algunas células aisladas situadas en regiones más externas de la CNI (Fig. 38E-H). Algunas de las células ganglionares que expresan CR también expresan TUJ1, aunque no todas las que expresan TUJ1 expresan CR (Fig. 38E-H, E'-H'). Isl1 se expresa en células ganglionares, y subpoblaciones de células amacrinas y horizontales (Fig. 38I-L). Las células horizontales

expresan Prox1 y algunas de ellas, también expresan Isl1 (Fig. 38I-L, I'-L'). En el Est35 la inmunorreactividad frente a SV2 es intensa en la CPE y en la CPI (Fig. 39A-C). La CNE está poblada por abundantes fotorreceptores que expresan fuertemente visinina (Fig. 39D-F, D'-F') con segmentos externos mucho más estilizados que en estadios anteriores. Por otra parte, el uso de anticuerpos frente a GS muestra somas muy alargados en el sentido vítreo-escleral que ocupan todo el espesor de la retina (Fig. 39G-I).

En el Est37 las capas plexiformes presentan un mayor grosor que en estadios anteriores, aunque la CCG muestra un espesor importante, mostrando somas en diferentes estratos (Fig. 40A). El estudio de co-expresión entre CR y TUJ1 muestra solo co-localización en las células ganglionares (Fig. 40B-D; B'-D'). CR además se expresa en células amacrinas y en células situadas en regiones más externas de la CNI (Fig. 40B,D) y TUJ1, por su parte, se expresa también fuertemente en el EFO, en la CPI, en algunos somas de células amacrinas y, de forma menos intensa, en la CPE (Fig. 40C,D). Isl1 se expresa fuertemente en células ganglionares, amacrinas, bipolares y horizontales (Fig. 40E-G). Prox1 se expresa en todas las células horizontales y en algunos pocos somas situados en regiones más internas de la CNI (Fig. 40H-J). La inmunorreactividad frente a SV2 se afianza en las capas plexiformes aunque también se detecta en unos pocos somas de células amacrinas (Fig. 41A-C). Los fotorreceptores visinina-positivos en la CNE presentan una morfología bastante diferenciada (Fig. 41D-F, D'-F') y las células GS-positivas muestran una mayor inmunorreactividad en la porción escleral de las mismas (Fig. 41G-I).

En el Est42 las capas plexiformes aumentan de tamaño y la CCG no se presenta tan gruesa, con menor número de estratos de células (Fig. 42A,E,I,L). Por otra parte, la inmunorreactividad frente a todos los marcadores descritos con anterioridad es idéntica (Fig. 42) y muy similar a la descrita en la retina de individuos recién eclosionados. Estas observaciones indican que, como en otras especies precociales de aves, la retina ya está diferenciada incluso en estadios cercanos a la eclosión.

Figuras

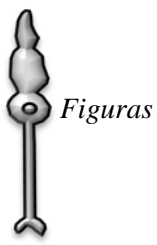
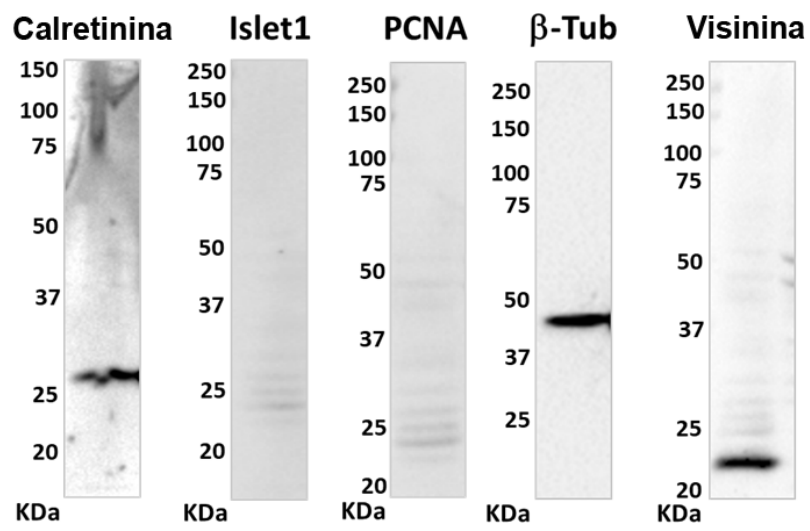


Figura 16. Inmunoblot en gel de acrilamida del extracto de proteínas del ojo de un individuo recién eclosionado de *T. guttata* incubado con los anticuerpos anti- β -tubulina (TUJ1), PCNA, CR, visinina e Isl1 que demuestra la presencia de estas proteínas en el tejido. Estos anticuerpos reconocen bandas únicas cuyos pesos moleculares son similares a los descritos previamente para otros vertebrados. β -Tub, \approx 50KDa; PCNA, 29-30KDa; CR, 31KDa; Visinina, 23KDa; Isl1, \approx 25KDa.



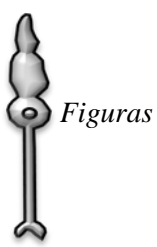
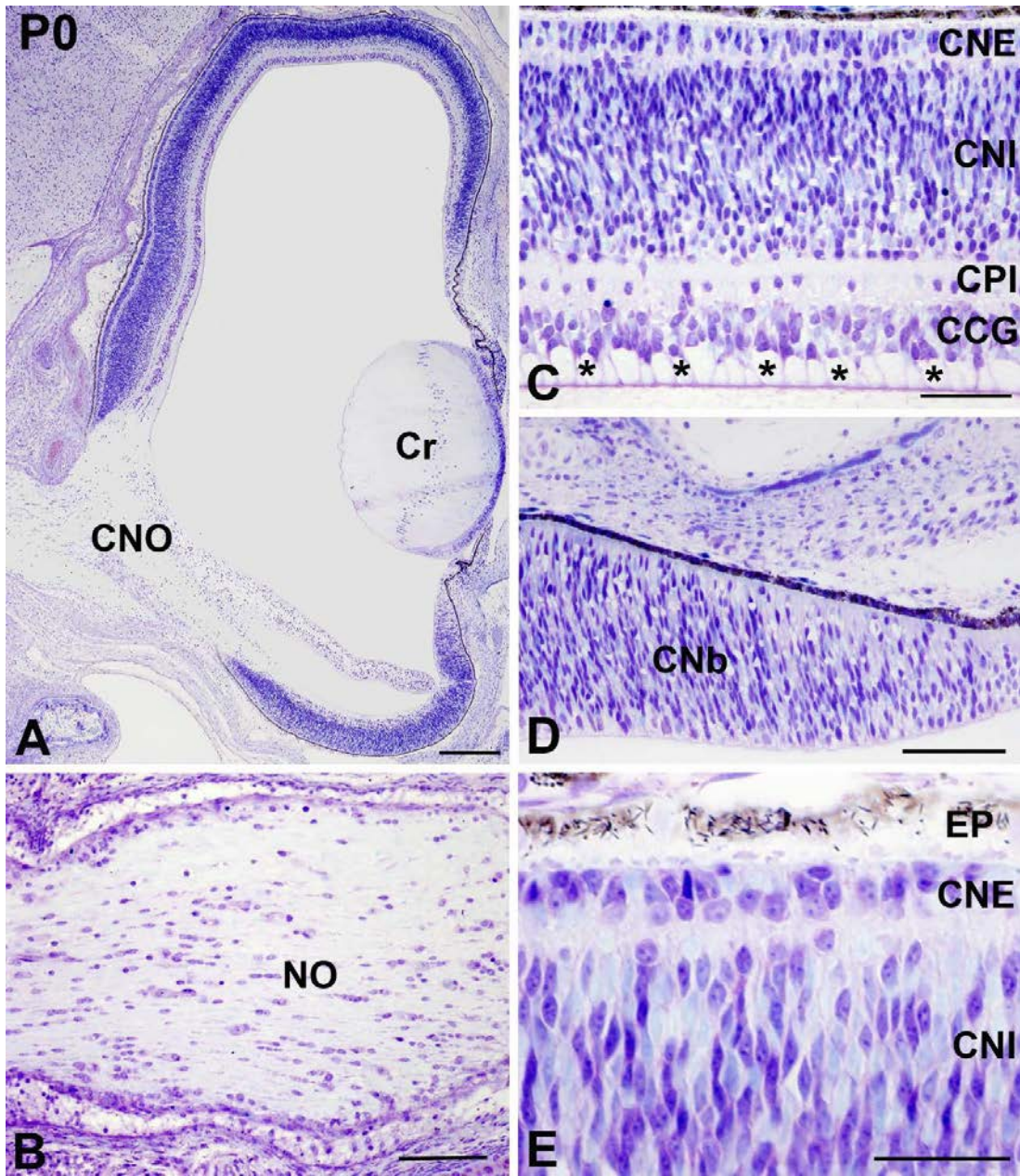


Figura 17. Secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el momento de la eclosión teñidas con azul de toluidina. Se observa la típica retina de vertebrados multiestratificada (A,C) y la presencia de una gran cabeza del nervio óptico (A). El número de axones se ha incrementado tanto en el EFO (asteriscos en C) como en el nervio óptico (B). Se puede observar que los fotorreceptores no presentan segmento externo (C,E) y que la periferia todavía presenta un aspecto indiferenciado compuesto por una capa neuroblástica (D). CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CNO, cabeza del nervio óptico; CPI, capa plexiforme interna; Cr, cristalino; EP, epitelio pigmentario; NO, nervio óptico. Barra de aumentos: 200 μ m (A); 100 μ m (B-E).



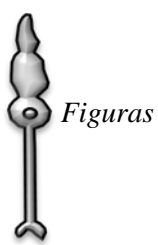
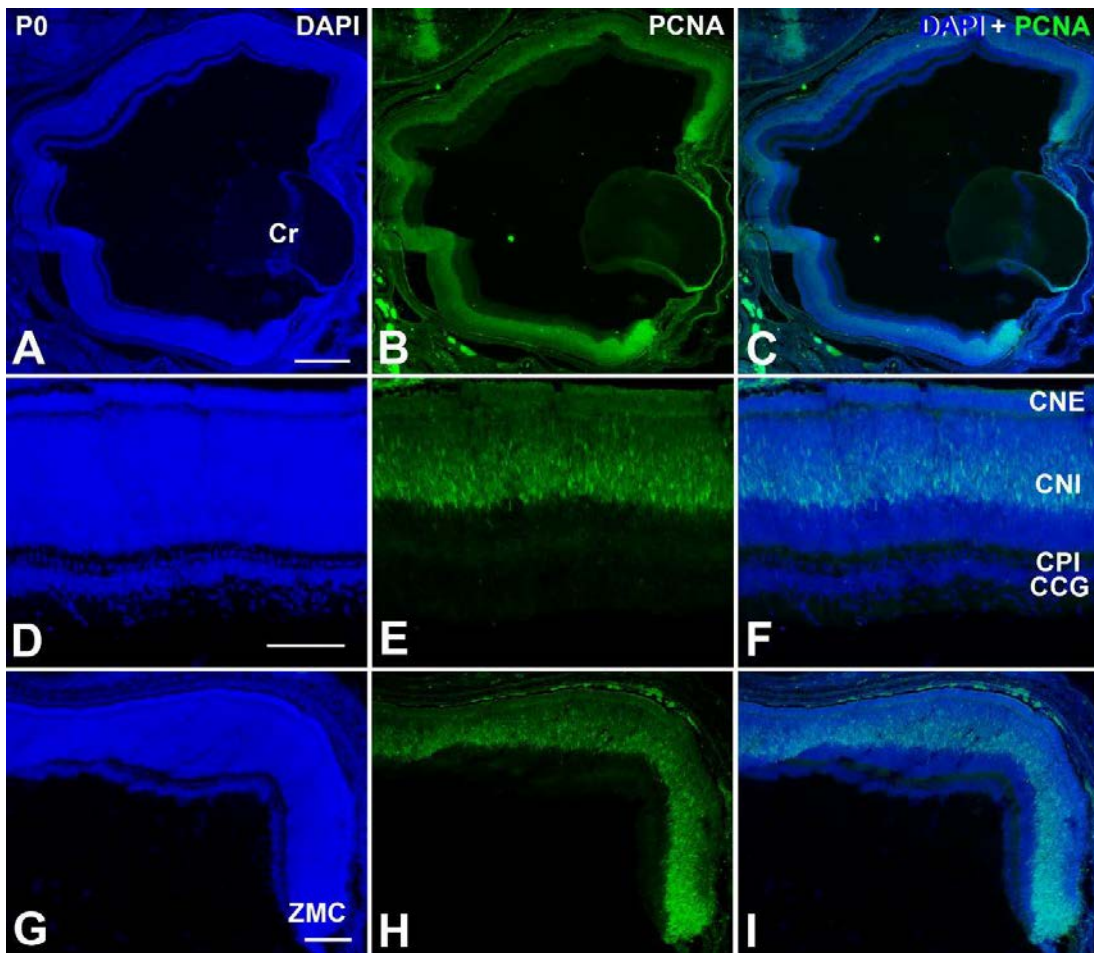


Figura 18. Detección de la expresión de PCNA en la retina de *T. guttata* en el momento de la eclosión. Se pueden observar numerosos núcleos PCNA-positivos en toda la extensión de la retina (A-C) localizándose en la región central principalmente en la CNI (D-F) mientras que en la zona marginal ciliar es donde se detecta mayor inmunorreactividad (G-I). CCG, *capa de células ganglionares*; CNE, *capa nuclear externa*; CNI, *capa nuclear interna*; CPI, *capa plexiforme interna*; Cr, *crystalino*; ZMC, *zona marginal ciliar*. Barra de aumentos: 200 μ m (A-C); 100 μ m (D-I).



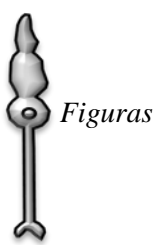
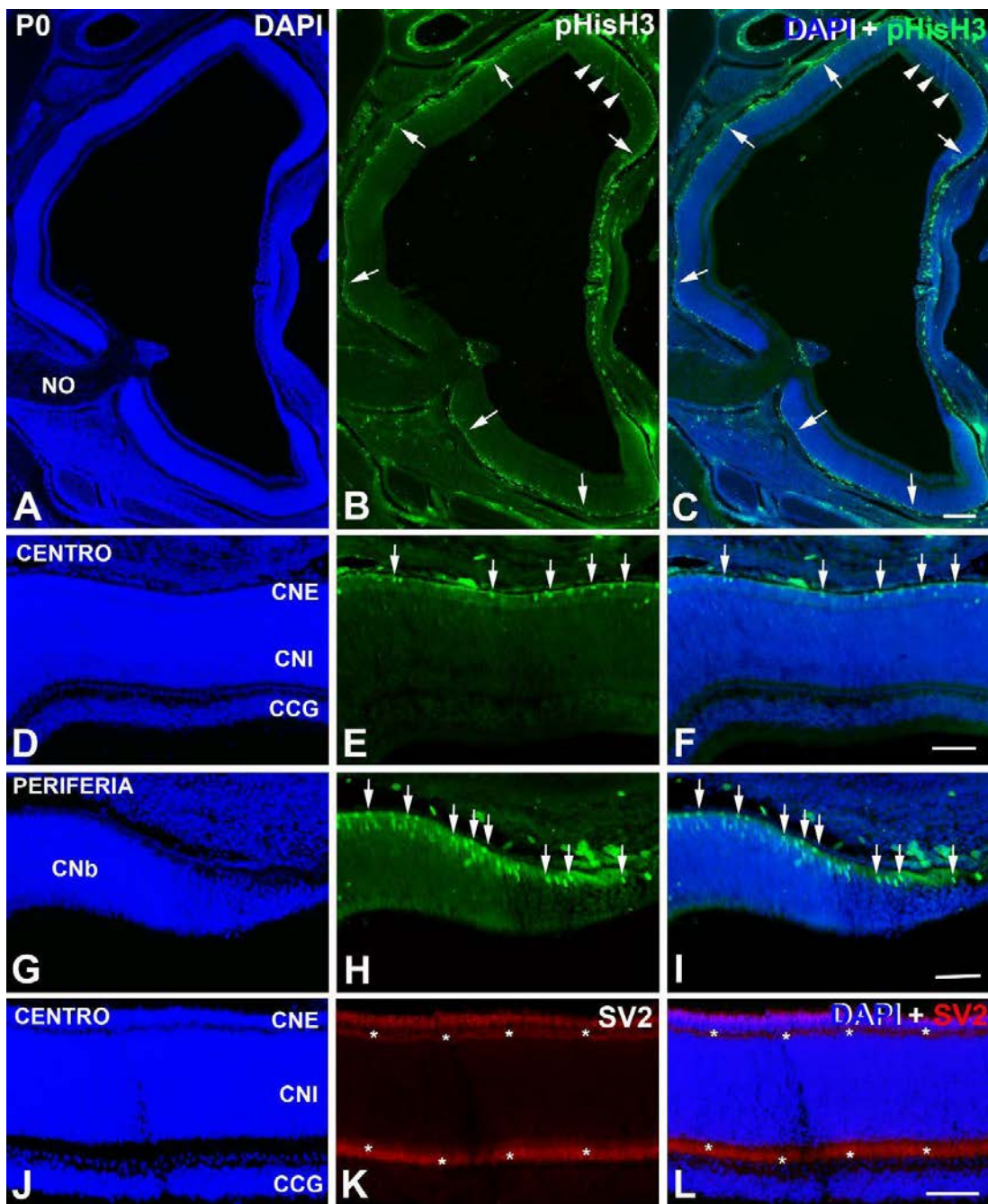


Figura 19. Detección de la expresión de pHisH3 (A-I) y SV2 (J-L) en la retina de *T. guttata* en el momento de la eclosión. En P0 todavía pueden observarse mitosis en toda la retina (flechas en B-C) localizándose en la región escleral en la región central (flechas en E-F) y periférica (flechas en H-I). En regiones cercanas a la periferia también se detectan algunas mitosis ectópicas (puntas de flecha en B-C). Las capas plexiformes aparecen marcadas fuertemente con SV2 (asteriscos en K-L). *CCG*, capa de células ganglionares; *CNb*, capa neuroblástica; *CNE*, capa nuclear externa; *CNI*, capa nuclear interna; *NO*, nervio óptico. Barra de aumentos: 200 μ m (A-C); 100 μ m (D-L).



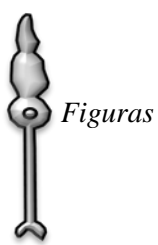
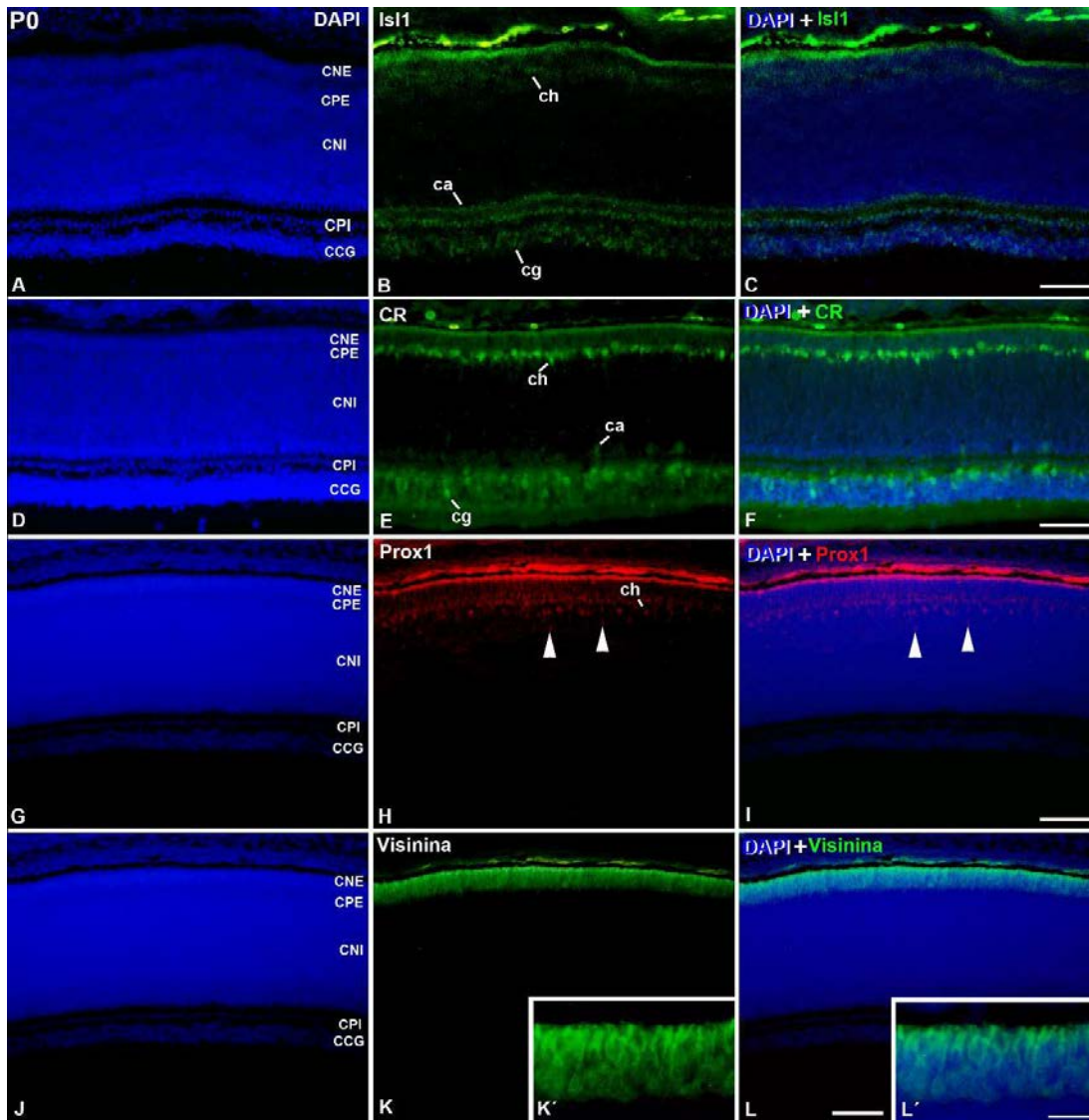


Figura 20. Detección inmunohistoquímica de diferentes marcadores celulares en la retina de *T. guttata* en el momento de la eclosión. La expresión de Isl1 se localiza en los núcleos de células ganglionares, amacrinas y horizontales (B-C) al igual que la de calretinina (E-F). Las células horizontales fueron Prox1-positivas pero también se detectó su expresión en núcleos de células localizados en posiciones más internas (puntas de flecha en H-I). La expresión de visinina se detecta en los fotorreceptores en la CNE (K-L) y su morfología se puede observar a mayores aumentos (k'-L'). *ca*, célula amacrina; *CCG*, capa de células ganglionares; *cg*, célula ganglionar; *ch*, célula horizontal; *CNE*, capa nuclear externa; *CNI*, capa nuclear interna; *CPE*, capa plexiforme externa; *CPI*, capa plexiforme interna. Barra de aumentos: 50 μ m A-L; 30 μ m K'-L'.



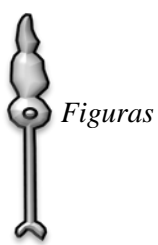
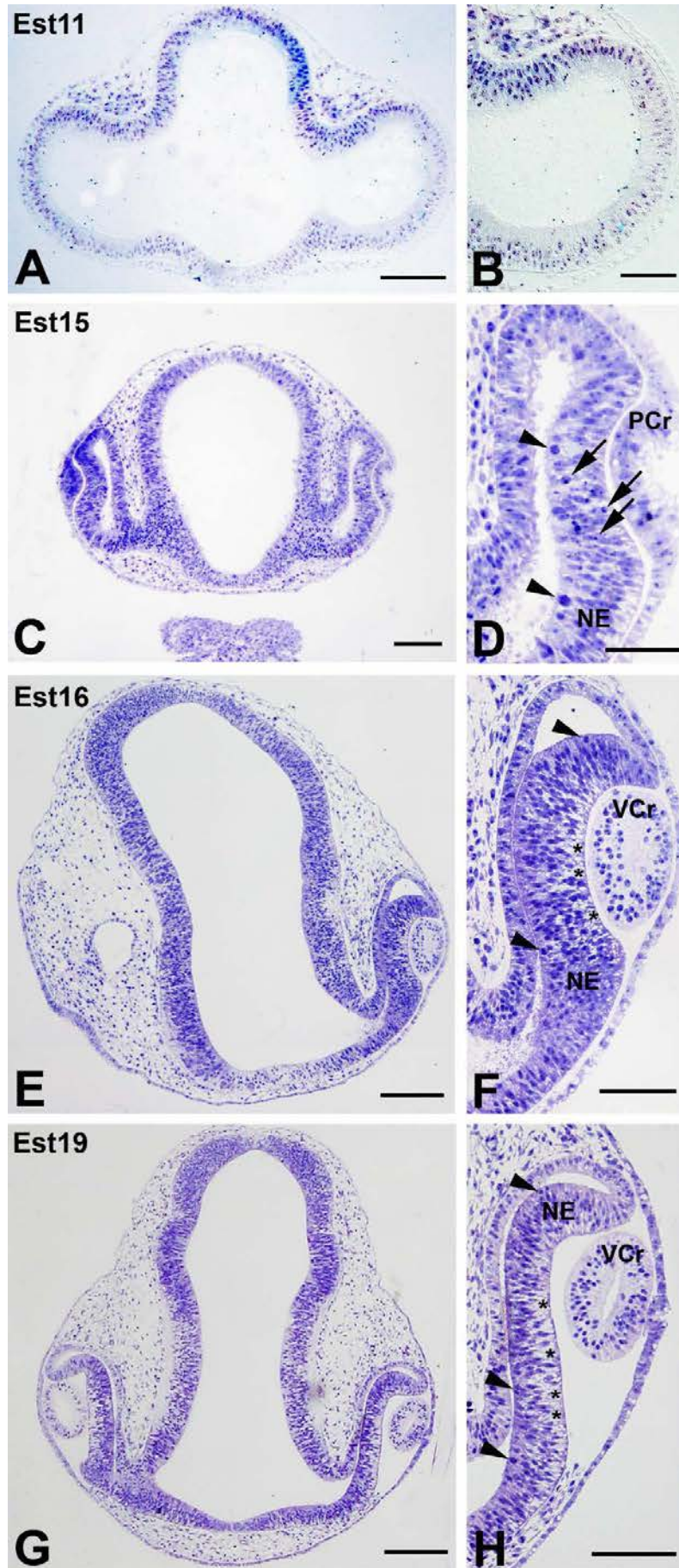


Figura 21. Secciones semifinas de estadios embrionarios tempranos de *T. guttata* teñidos con azul de toluidina. Las vesículas ópticas están constituidas por un neuroepitelio delgado en el Est11 (A, B). En el Est15 (C, D) emerge la placoda del cristalino y en el neuroepitelio de la futura retina se observan células en mitosis (puntas de flecha) y diversos núcleos picnóticos (flechas). La vesícula del cristalino aparece en el Est16 (E,F) y se separa completamente del neuroepitelio en el Est19 (G, H). Las células en mitosis se continúan detectando en ambos estadios (puntas de flecha en F, H). *NE*, neuroepitelio; *PCr*, placoda del cristalino; *VCr*, vesícula del cristalino. Barra de aumentos: 100 μ m.



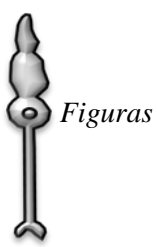
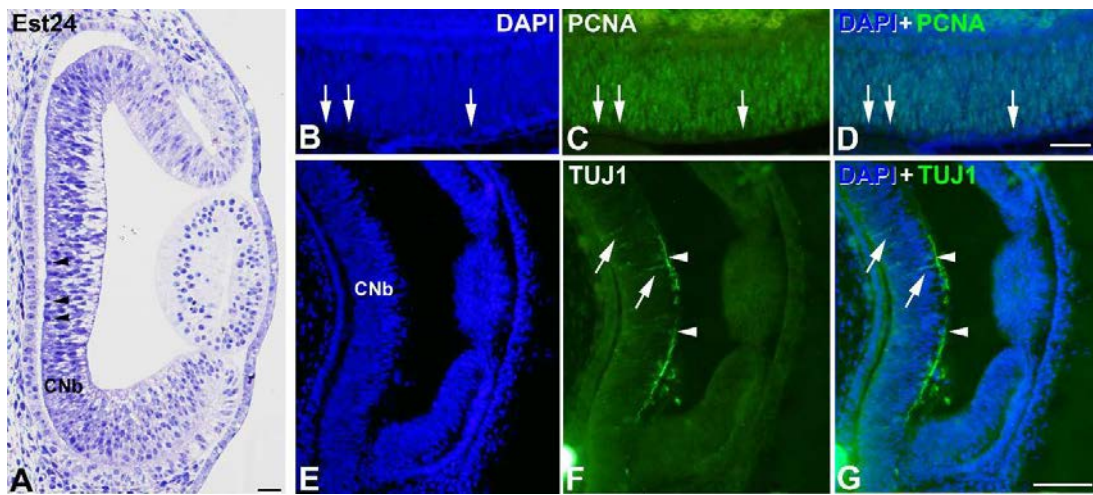


Figura 22. La tinción con azul de toluidina de secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el Est23 (A) muestra el típico neuroepitelio indiferenciado de los Ests tempranos de desarrollo. El análisis inmunohistoquímico mostró que las primeras células PCNA-negativas (flechas en B-D) comienzan a detectarse en el Est24 (B-G) indicando el inicio de la diferenciación y coincidiendo con la expresión de Tuj1 (E-G) en las primeras células ganglionares (puntas de flecha en F, G). También se observaron neuroblastos migratorios TUJ1-positivos (flechas en F, G). *CNb*, *capa neuroblástica*. *Barra de aumentos: 25 μ m (B-D); 50 μ m (A, E-G).*



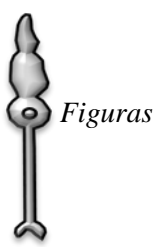
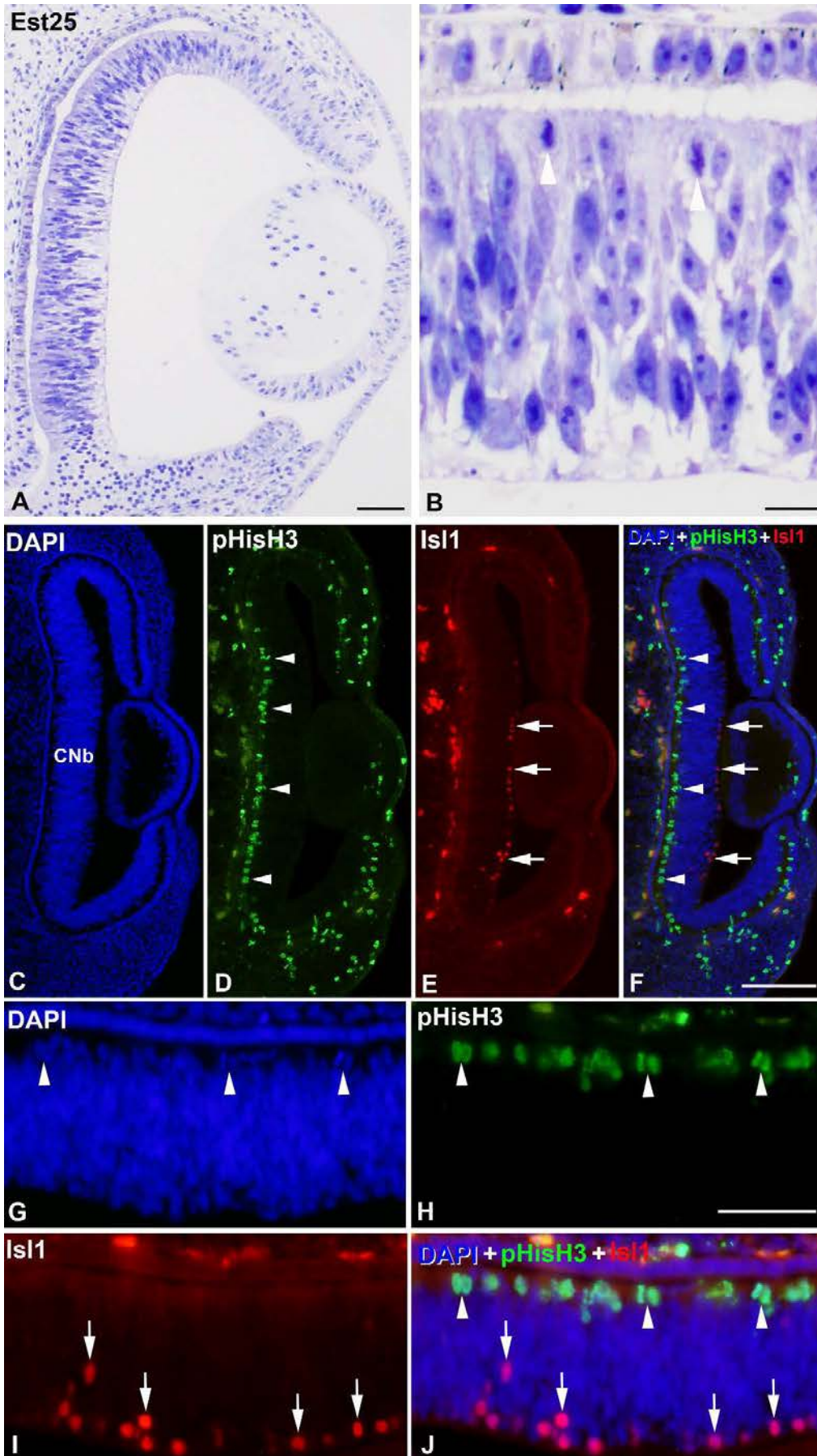


Figura 23. Secciones semifinas del estadio embrionario 25 de *T. guttata* teñidas con azul de toluidina (A-B) y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas (C-J). El neuroepitelio ha aumentado de grosor (A) y se pueden observar mitosis en la región escleral (puntas de flecha en B). El doble inmunomarcaje de pHisH3/Isl1 (C-J) muestra a pocos aumentos (C-F) que las células pHisH3-positivas (D, F) se localizan en la región central de la retina (puntas de flecha) y las células que expresan Isl1 se ubican en la región donde se localizarán las células ganglionares (flechas en E-F). A mayores aumentos (G-J), se puede observar que las mitosis detectadas con DAPI (G), son coincidentes con aquellas que expresan pHisH3 (puntas de flecha en G,H, J). Los núcleos de neuroblastos migratorios también son detectados por la expresión de Isl1 (flechas en I, J). *CNb*, capa neuroblástica. Barra de aumentos: 100 μ m (A, C-J); 30 μ m (B).



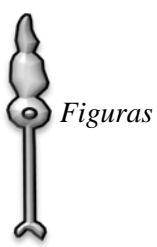
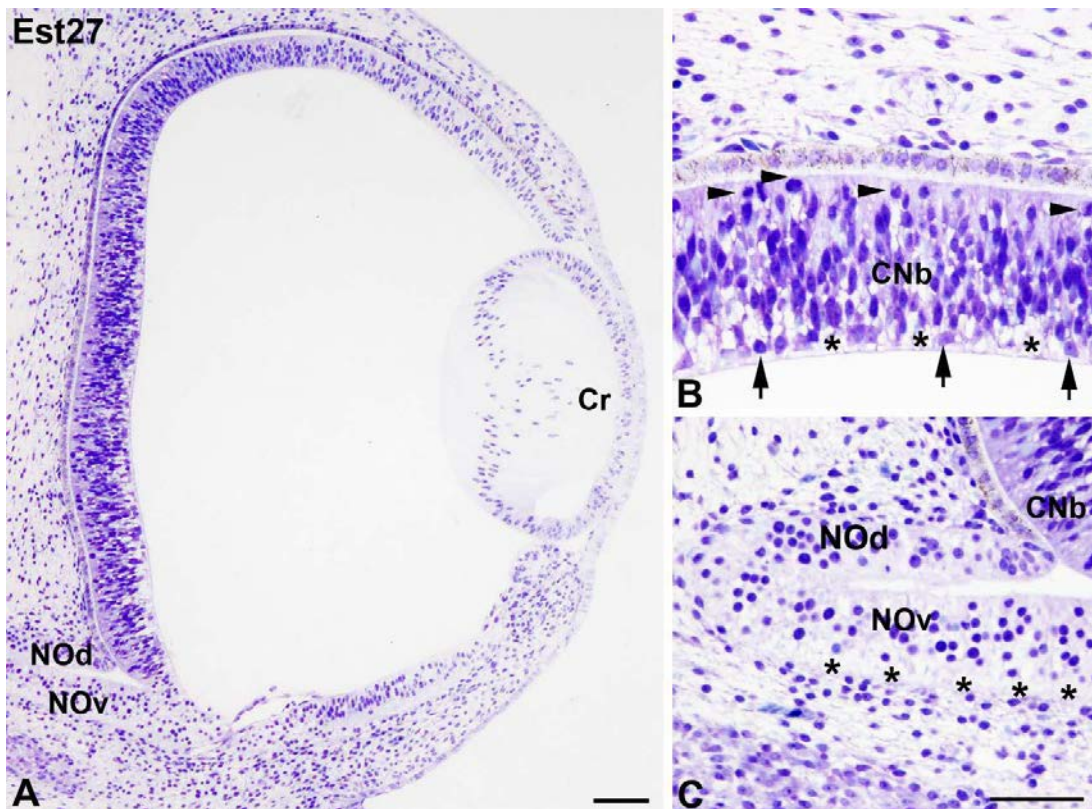


Figura 24. Tinción con azul de toluidina de secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el Est27 de desarrollo (A-C). En este estadio las mitosis localizadas en la región escleral se continúan detectando (puntas de flecha en B) y el número de neuroblastos que se diferencian cercanos a la región vítrea pueden observarse (flechas en B) así como espacios extracelulares (asteriscos en B) en la misma zona. En la región ventral del nervio óptico aparecen los axones de las células ganglionares (asteriscos en C) que ya se han diferenciado en este estadio. *CNb*, capa neuroblástica; *NOd*, nervio óptico dorsal; *Nov*, nervio óptico ventral. Barra de aumentos: 100 μ m (A-C).



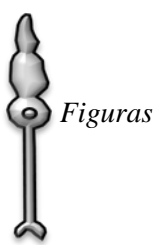
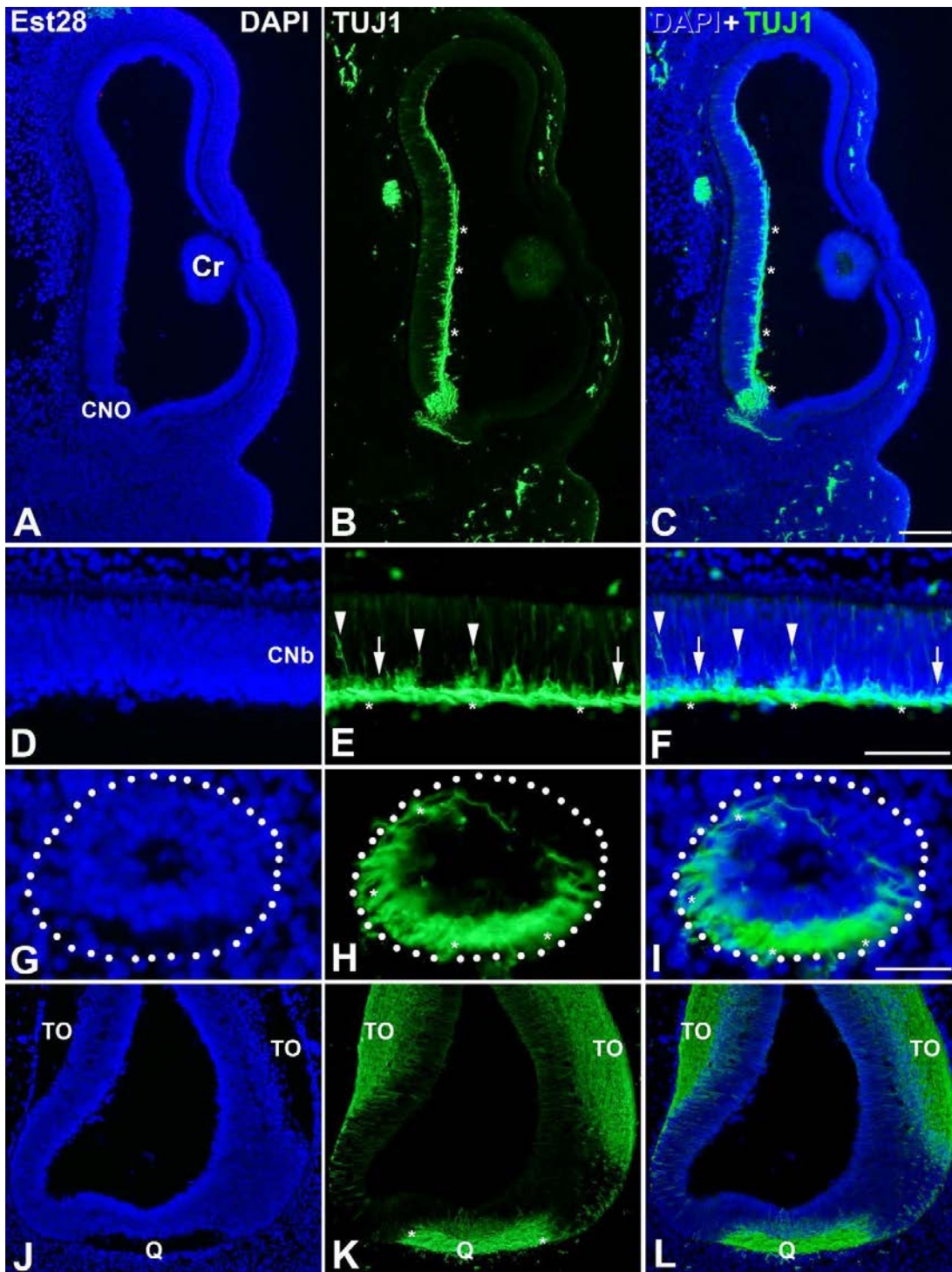


Figura 25. Detección de la expresión de TUJ1 en la retina de *T. guttata* en el Est28 de desarrollo en secciones semifinas. El proceso de diferenciación se extiende hacia la periferia siguiendo el gradiente centro-periférico (B, C) y se puede observar cómo los axones de las células ganglionares (asteriscos en B, C) se agrupan para salir por el nervio óptico. A mayores aumentos (D-F) detectamos la expresión de TUJ1 tanto en células ganglionares ya diferenciadas (flechas en E, F) como en neuroblastos migratorios (puntas de flecha en E, F). Así mismo detectamos expresión en las regiones lateral y ventral del nervio óptico (H-I) y en el quiasma óptico (K-L). *CNb*, capa neuroblástica; *CON*, cabeza del nervio óptico; *Cr*, cristalino; *Q*, quiasma óptico; *TO*, tracto óptico. Barra de aumentos: 200 μ m (A-C; J-L); 50 μ m (D-F); 25 μ m (G-I).



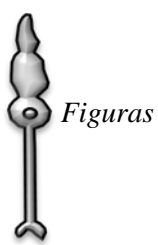
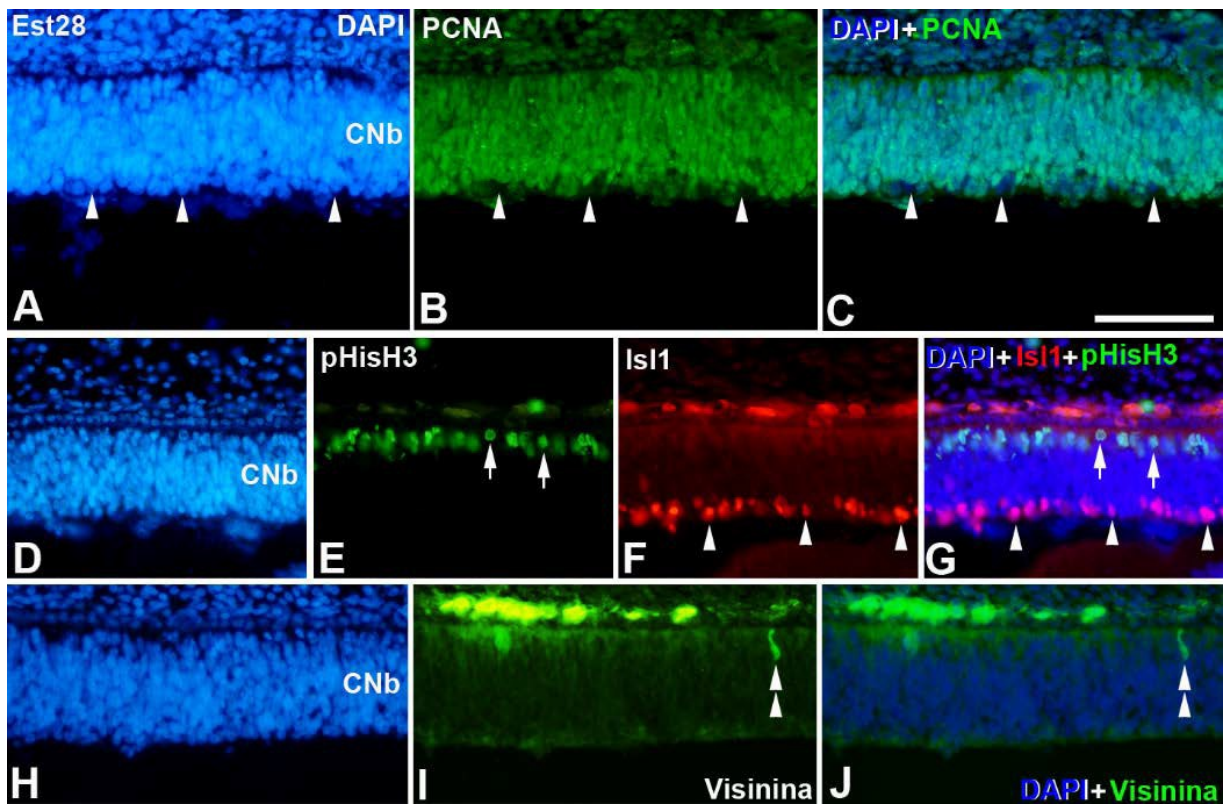


Figura 26. Inmunorreactividad frente a diferentes anticuerpos en el Est28 de desarrollo de la retina de *T. guttata*. El número de núcleos PCNA-negativos ha aumentado considerablemente en la región vítrea (puntas de flecha en B-C) coincidiendo con el incremento de núcleos Isl1-positivos (puntas de flecha en F-G) mientras que en la región escleral se detecta mayor número de mitosis (flechas en E,G). Se observan por primera vez algunas células visinina-positivas (doble punta de flecha en I-J). *CNb*, *capa neuroblástica*. Barra de aumentos: 50 μ m.



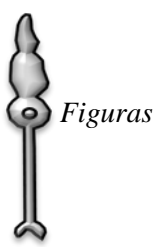
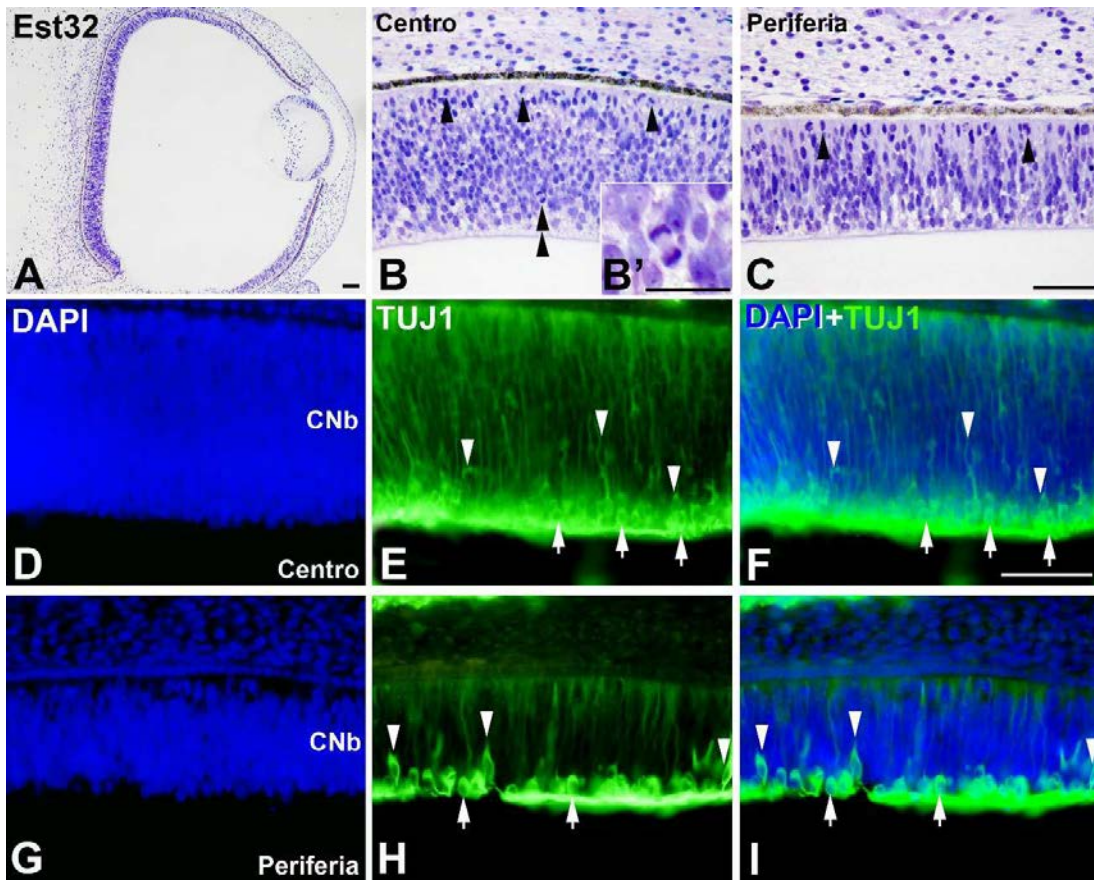


Figura 27. Secciones semifinas de la retina de *T. guttata* del Est32 de desarrollo teñidas con azul de toluidina (A-C) y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas para la detección de la expresión de TUJ1 (D-I). Debido al gradiente centro-periférico de diferenciación, se puede observar que en la región central del tejido el grosor es mayor (B) que en la región periférica (C). Las mitosis son abundantes en ambas regiones (puntas de flecha en B-C) y se detectan en la región central las primeras mitosis ectópicas (doble punta de flecha; aumentos en B'). La cantidad de células ganglionares diferenciadas se ha incrementado (flechas en E-F) y se continúan detectando neuroblastos migratorios (puntas de flecha en E-F). En la periferia la inmunorreactividad de TUJ1 es menor que en la región central pero se detecta tanto en células ganglionares (flechas en H-I) como en neuroblastos migratorios (puntas de flecha en H-I). *CNb*, capa neuroblástica. Barra de aumentos: 100 μ m (A-C); 50 μ m (B', D-I).



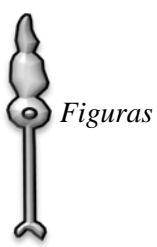
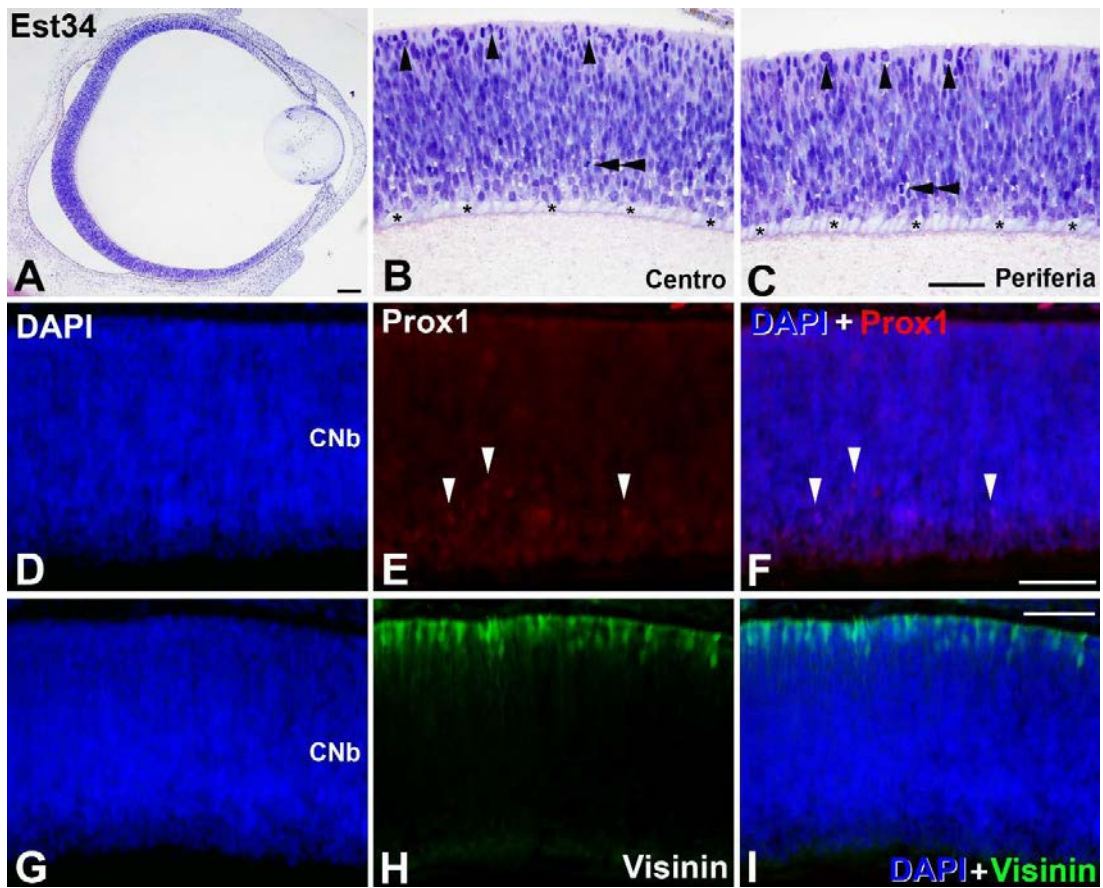


Figura 28. Secciones semifinas del Est34 de desarrollo de la retina de *T. guttata* teñidas con azul de toluidina (A-C) y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas (D-I). Abundantes mitosis se detectan tanto en la región central (puntas de flecha en B) como en la periferia (puntas de flecha en C) así como mitosis ectópicas (dobles puntas de flecha en B-C). Se pueden distinguir los axones de las células ganglionares (asteriscos en B-C). Aparecen los primeros núcleos Prox1-inmunorreactivos cercanos a la región vítrea (puntas de flecha en E-F) y el número de células visinina-positivas ha aumentado en la zona escleral (H-I). CNb, capa neuroblástica. Barra de aumentos: 150 μ m (A); 100 μ (B-I).



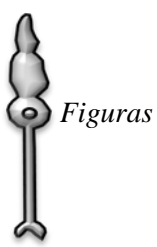
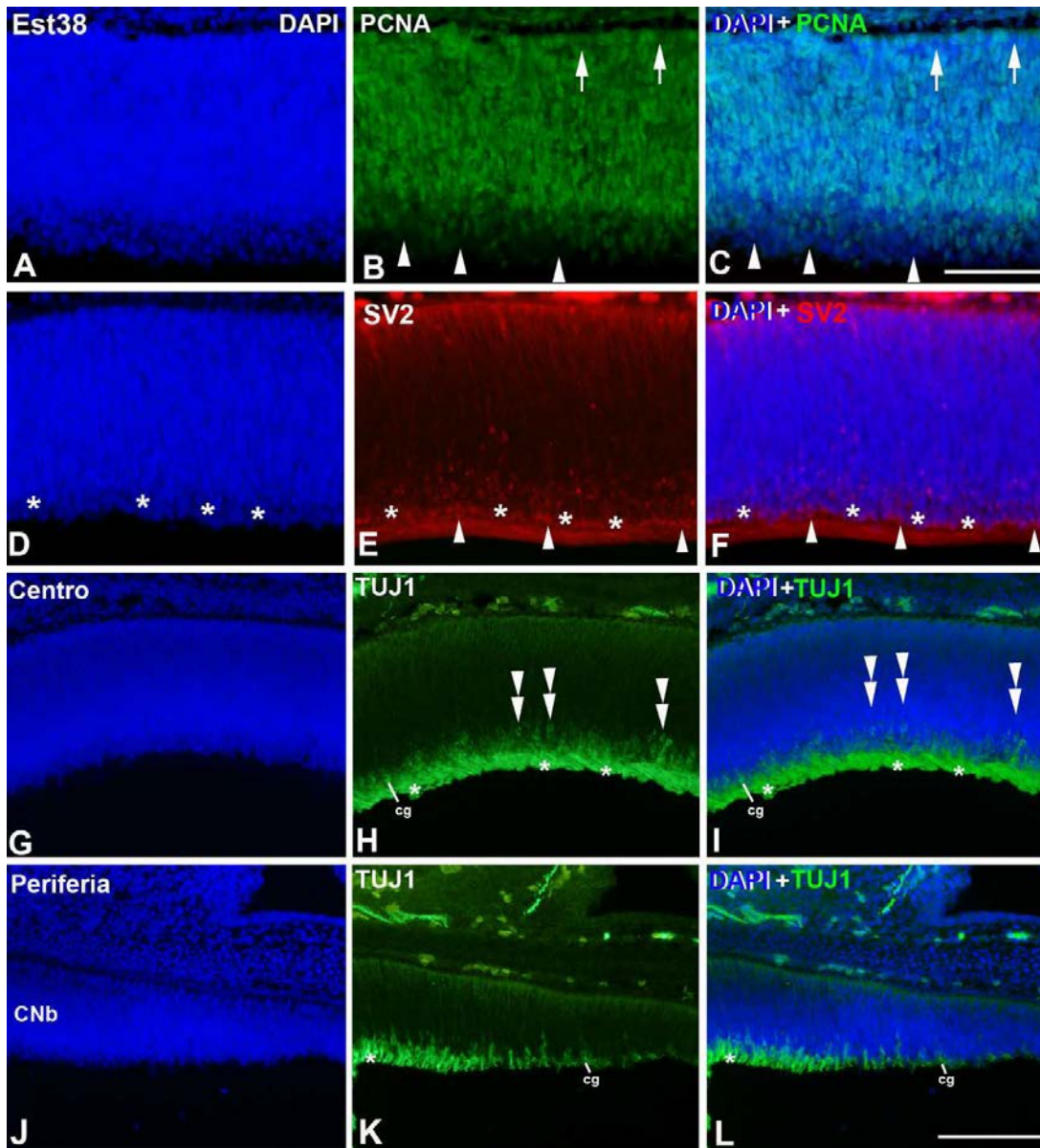
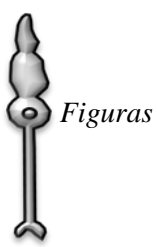


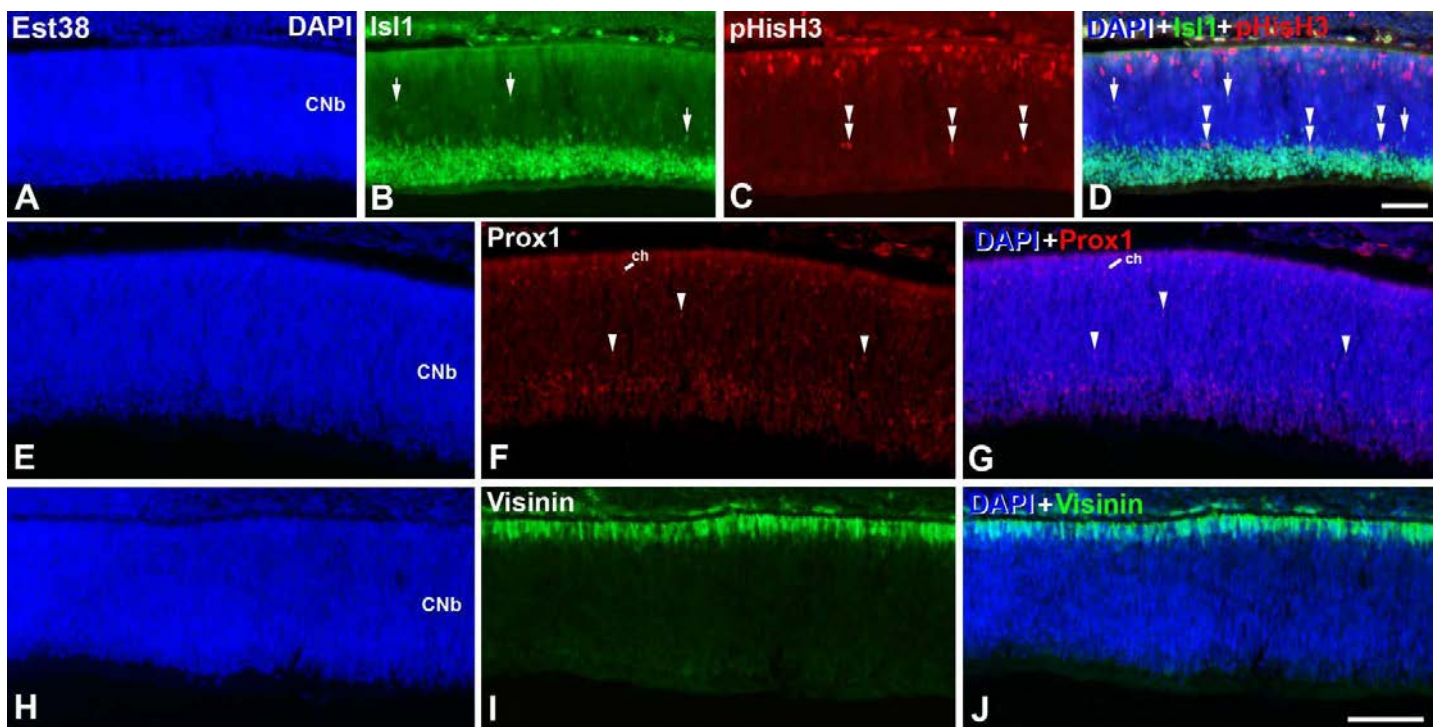
Figura 29. Detección inmunohistoquímica de diferentes marcadores en secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el Est38 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,D,G,J). Además de incrementarse el número de núcleos PCNA-negativos en la región vítrea (puntas de flecha en B-C), también se observan en la CNE presuntiva (flechas en B-C). En este estadio, se detecta la emergencia de la CPI mediante una débil inmunorreactividad frente a SV2 (asteriscos en E-F). El marcaje de este anticuerpo se extiende a células ganglionares dispersas (puntas de flecha en E-F). Tanto los somas (dobles puntas de flecha en H-I) como axones (asteriscos en H-I) de las células ganglionares presentan una fuerte inmunorreactividad frente a TUJ1 tanto en la región central (G-I) como en la periferia (J-L). *cg*, célula ganglionar; *CNb*, capaneuroblástica. Barra de aumentos: 100 μ m.





Figuras

Figura 30. Detección inmunohistoquímica de diferentes marcadores en secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el Est38 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,E,H). Numerosos núcleos localizados en la CCG presuntiva son Isl1-inmunorreactivos (B,D) así como neuroblastos migratorios (flechas en B,D). Las mitosis en la región escleral también son numerosas y algunas mitosis ectópicas más cercanas a la región vítrea son fácilmente distinguibles (dobles puntas de flecha en C-D). La expresión de Prox1 se localiza en núcleos de células horizontales localizados en la capa de células horizontales presuntivas y en neuroblastos migratorios (puntas de flecha en F-G). En la CNE presuntiva se detectan numerosos fotorreceptores visinina-positivos (H-J). *ch*, célula horizontal; *CNb*, capa neuroblástica. Barra de aumentos: 50 μ m(A-D); 100 μ m (E-J).



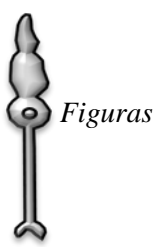
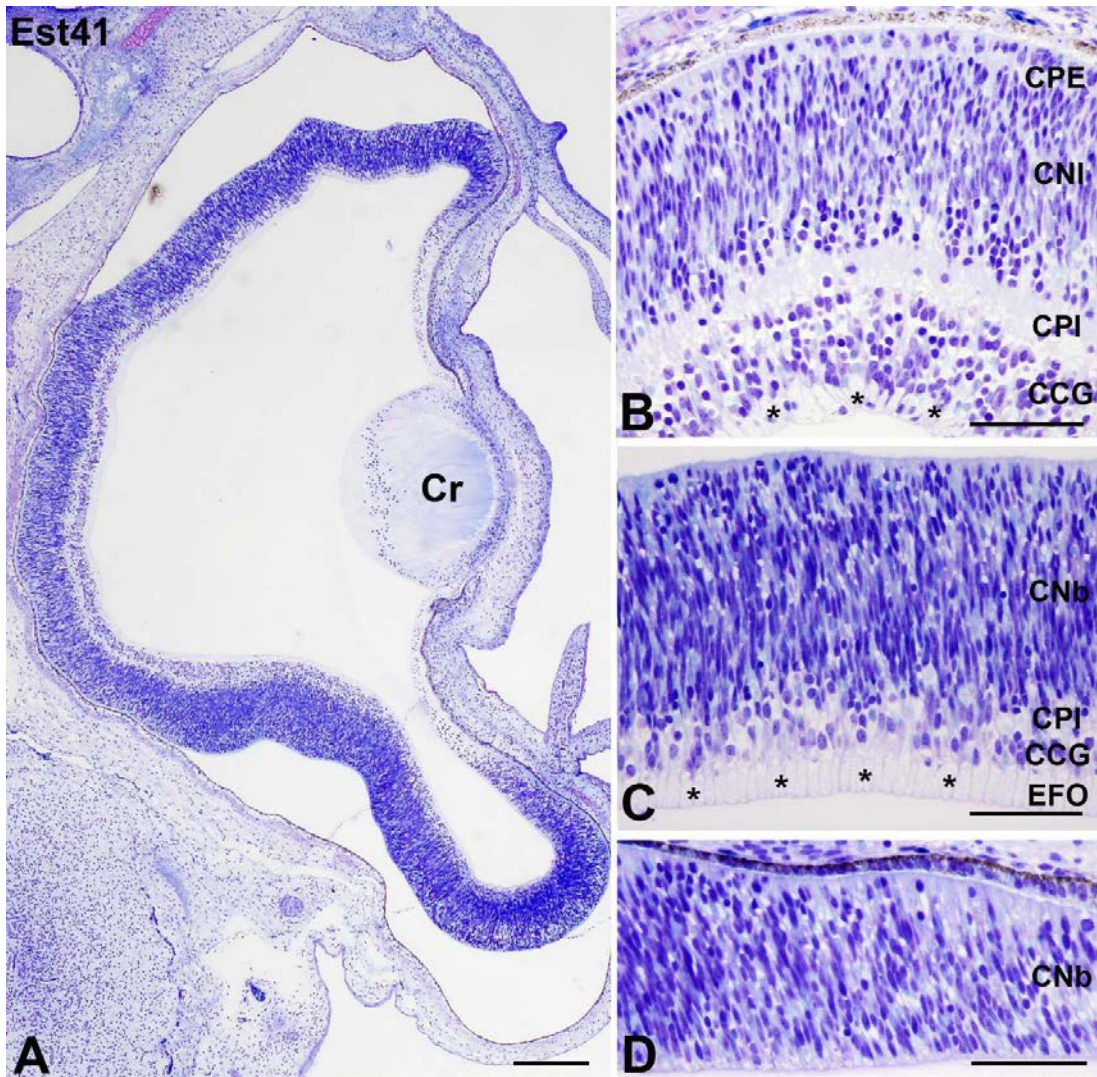


Figura 31. Secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el Est41 de desarrollo teñidas con azul de toluidina. Los aumentos muestran la región central (B), centro-periférica (C) y periférica (D). Los axones de las células ganglionares se distinguen claramente localizados en el EFO (asteriscos en B-C). Mientras que en la región central ya se observa la estratificación típica de la retina de vertebrados, en la centro-periférica se percibe la emergencia de la CPI y la periférica mantiene un aspecto indiferenciado. *CCG*, capa de células ganglionares; *CNI*, capa nuclear interna; *CPE*, capa plexiforme externa; *CPI*, capa plexiforme interna; *CNb*, capa neuroblástica; *EFO*; estrato de fibras ópticas. Barra de aumentos: 200 μ m(A); 100 μ m (B-D)



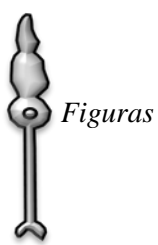


Figura 32. Detección inmunohistoquímica de diferentes marcadores en secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en el Est41 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,D,G). La expresión de TUJ1 se localiza en el soma de células amacrinas y ganglionares así como en los axones de las células ganglionares situados en el EFO (asteriscos B-C). Los núcleos de las células ganglionares, amacrinas y horizontales presentan inmunorreactividad frente a Isl1 (E-F). Los núcleos Prox1- positivos se detectan principalmente en la capa de células horizontales pero también en células horizontales presuntivas (puntas de flecha en H-I). *ca*, célula amacrina; *CCG*, capa de células ganglionares; *cg*, célula ganglionar; *ch*, célula horizontal; *CNI*, capa nuclear interna; *CPI*, capa plexiforme interna. Barra de aumentos: 100 μ m.

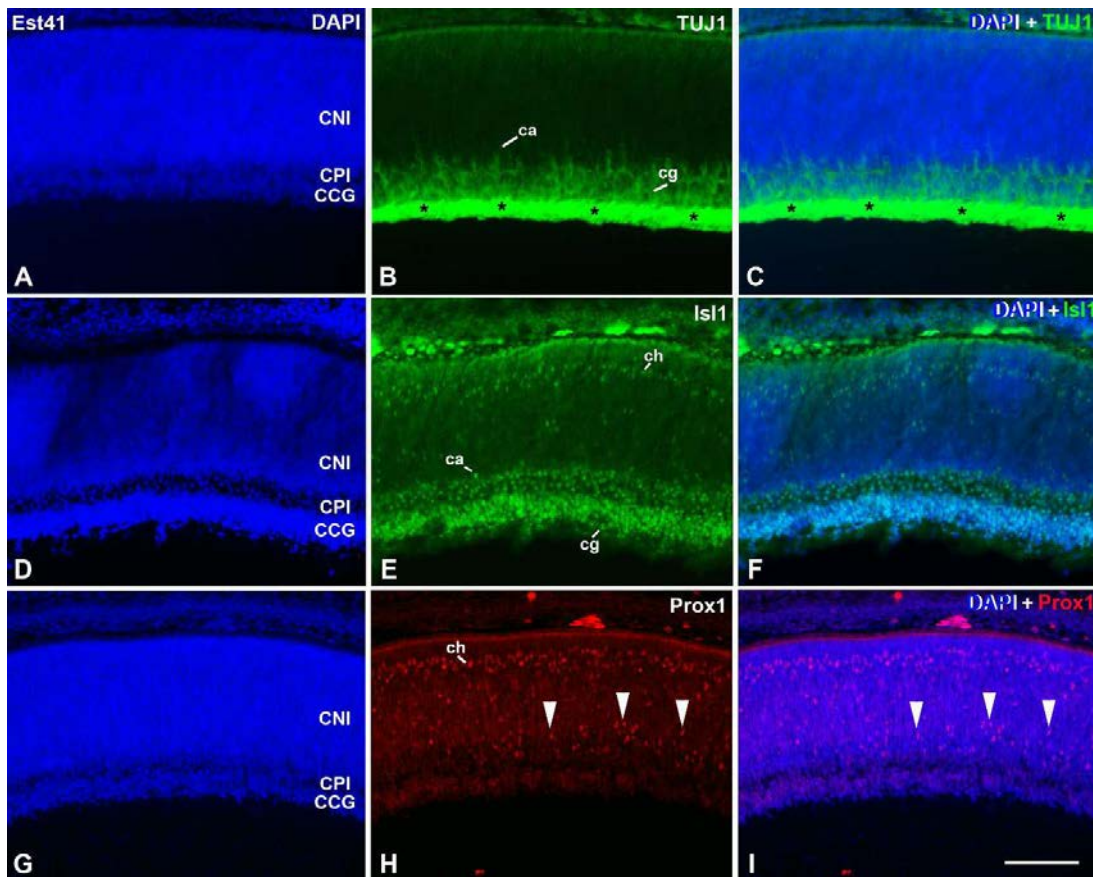
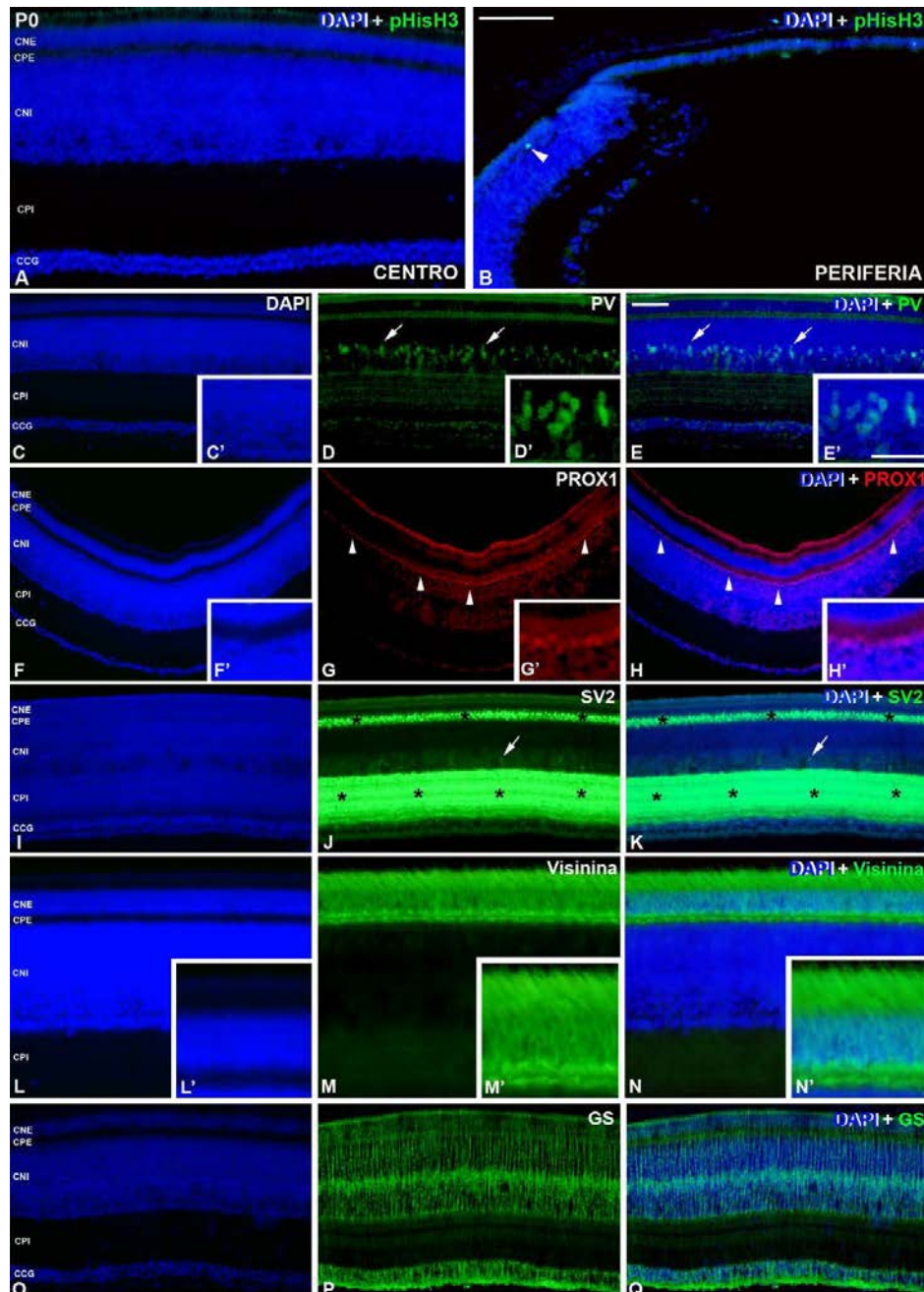


Figura 33. Detección de diferentes marcadores celulares en la retina de *C. coturnix* en el momento de la eclosión. En P0 no se observan mitosis en la región central (A) y sólo alguna célula aislada en la ZMC en la periferia son pHisH3-positivas (punta de flecha en B). El tejido maduro presenta el típico aspecto multilaminar (DAPI en A,C,F,I,L,O) albergando los somas de células amacrinas inmunorreactivas a PV (D-E,D'-E'), células horizontales Prox1-positivas (G-H; G'-H'), fotorreceptores cuya presencia se detecta con visinina (M-N) y células de Müller GS-positivas (P-Q). A mayores aumentos, los fotorreceptores muestran una morfología madura (M'-N'). Las capas plexiformes son detectadas mediante inmunorreactividad frente a SV2 (asteriscos en J-K) la cual se extiende a los somas de las células amacrinas (flechas en H-I). CCG, *capa de células ganglionares*; CNE, *capa nuclear externa*; CNI, *capa nuclear interna*; CPE, *capa plexiforme externa*; CPI, *capa plexiforme interna*. Barras de aumento: 100µm en A y Q; 50µm en C'-E.



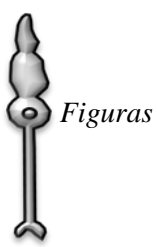
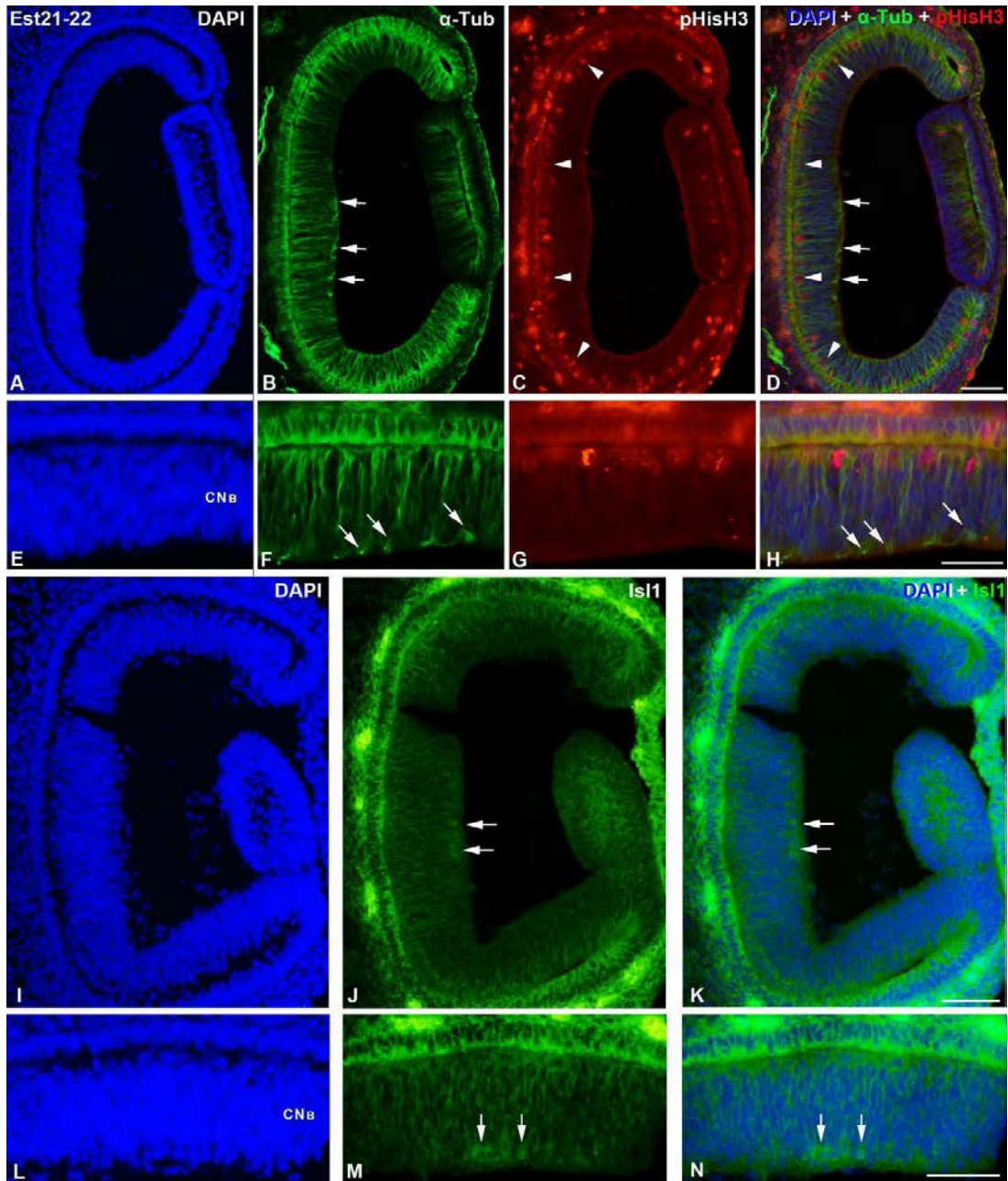


Figura 34. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est21-22 de desarrollo. Todas las secciones fueron contrateñidas con DAPI (A,E,I,L). Numerosas mitosis se detectan en el centro y periferia de la retina (puntas de flecha en C-D) así como las primeras células α -Tub-positivas (flechas en B, D). A mayores aumentos, se pueden observar las primeras células ganglionares diferenciándose que son inmunorreactivas a α -Tub (flechas en F, H). Islet1 también se expresa en las células ganglionares que comienzan a diferenciarse (flechas en J-K, M-N). *CNb*, capa neuroblástica; *Cr*, cristalino. Barras de aumento: 100 μ m.



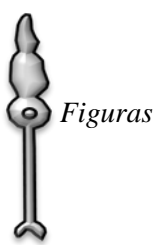


Figura 35. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est24-25 de desarrollo. El tejido está compuesto por una capa neuroblástica que se pone de manifiesto con DAPI (A,D,H,K,N). Los núcleos de células PCNA-negativos señalan aquellas células que han entrado en el proceso de diferenciación (flechas en A-C). La actividad mitótica continúa siendo abundante en la región central de la retina (puntas de flecha en F-G) y se detectan neuroblastos migratorios α -Tub-positivos (flechas en E,G) así como axones inmunoreactivos (asteriscos en E,G). La expresión de *Islet1* se localiza en los núcleos de las células ganglionares en diferenciación (flechas en I-J). En la región central, se detectó una fuerte señal de TUJ1 tanto en neuroblastos migratorios (puntas de flecha en L-M) como en células ganglionares (flechas en L-M) mientras que en la periferia es menor (O-P). *CNb*, capa neuroblástica. Barras de aumento: $100\mu\text{m}$.

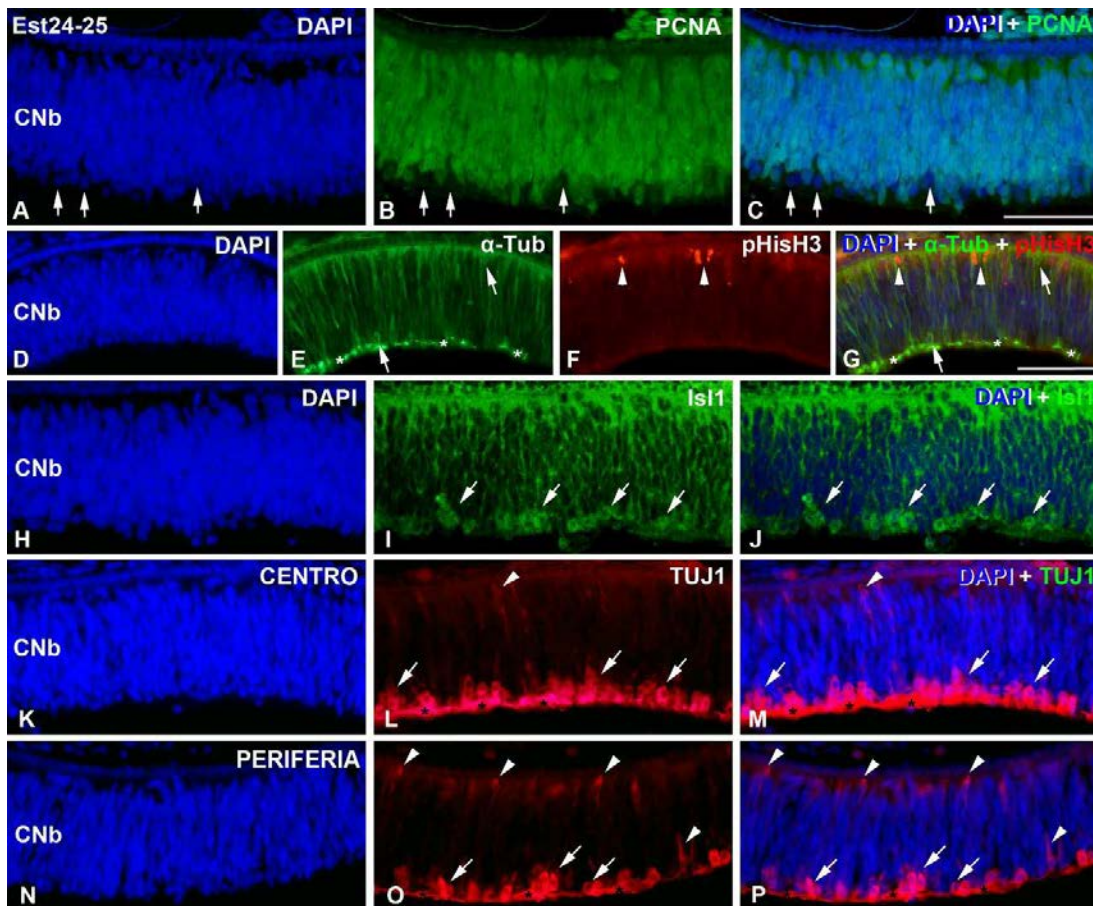
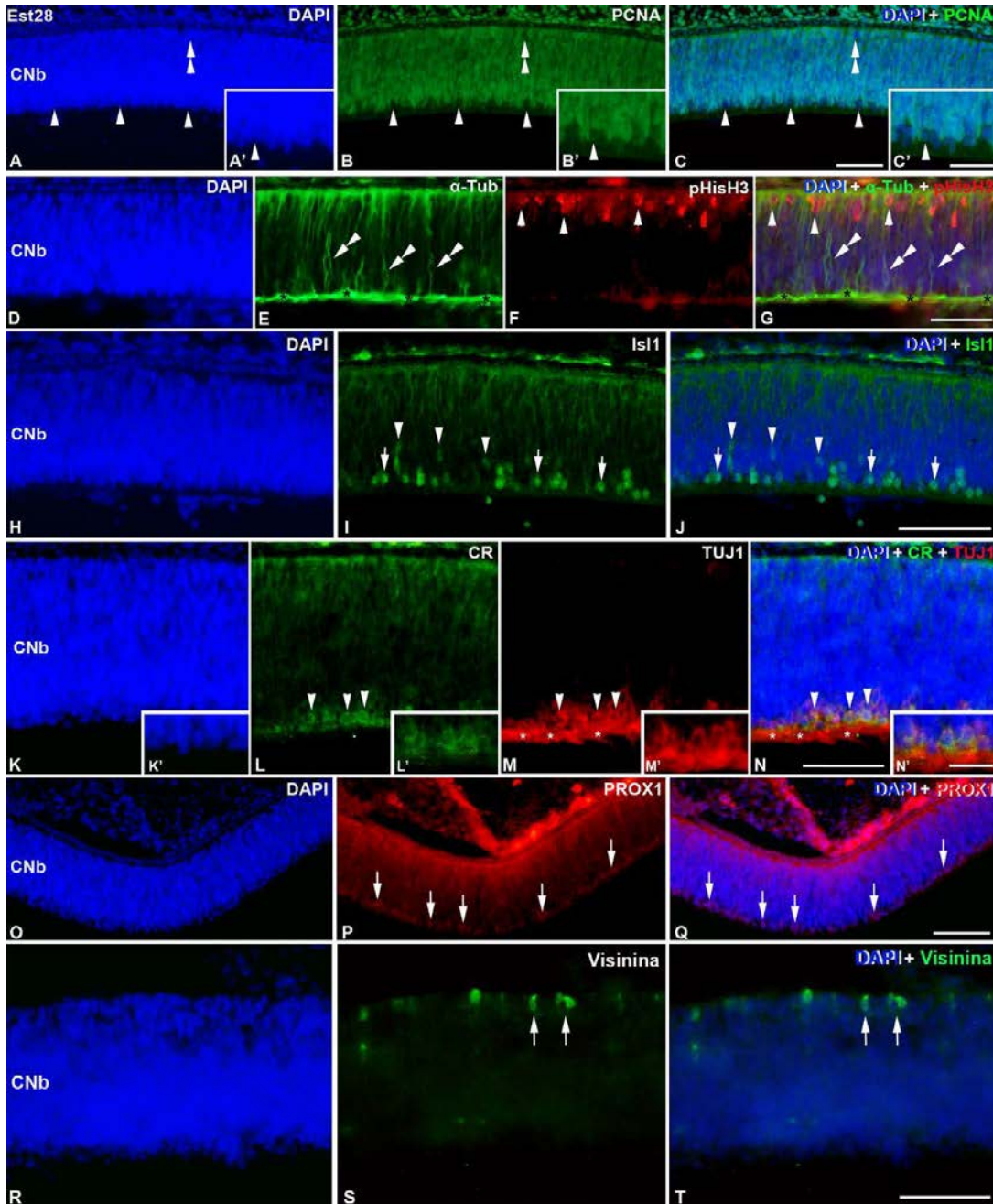


Figura 36. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est28 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,A',D,H,K,K',O,R). El número de núcleos PCNA-negativos se han incrementado en la región vítrea (puntas de flecha en A-C y A'-C') y comienzan a aparecer los primeros en la región escleral (doble punta de flecha en A-C). La actividad mitótica ha aumentado (puntas de flecha en F-G) y se detectan neuroblastos migratorios (doble punta de flecha en E,G) y axones (asteriscos en E,G) inmunoreactivos a α -Tub. La inmunoseñal de Islet1 se localiza tanto en núcleos de neuroblastos migratorios (puntas de flecha en I-J) como en células ganglionares (flechas en I-J). El doble inmunomarcaje con CR y TUJ1 (K-N) pone de manifiesto la diferenciación de las células ganglionares (puntas de flechas en L-N) colocalizando en algunas de ellas (L'-N'). Se detecta por primera vez la expresión de Prox1 cercana a la región vítrea (flechas en P-Q) en neuroblastos precursores de células horizontales y la de visinina en los primeros fotorreceptores en diferenciación (flechas en S-T). *CNb*, capa neuroblástica. Barras de aumento: 100 μ m en A-T; 30 μ m en K'-N'.



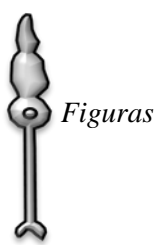
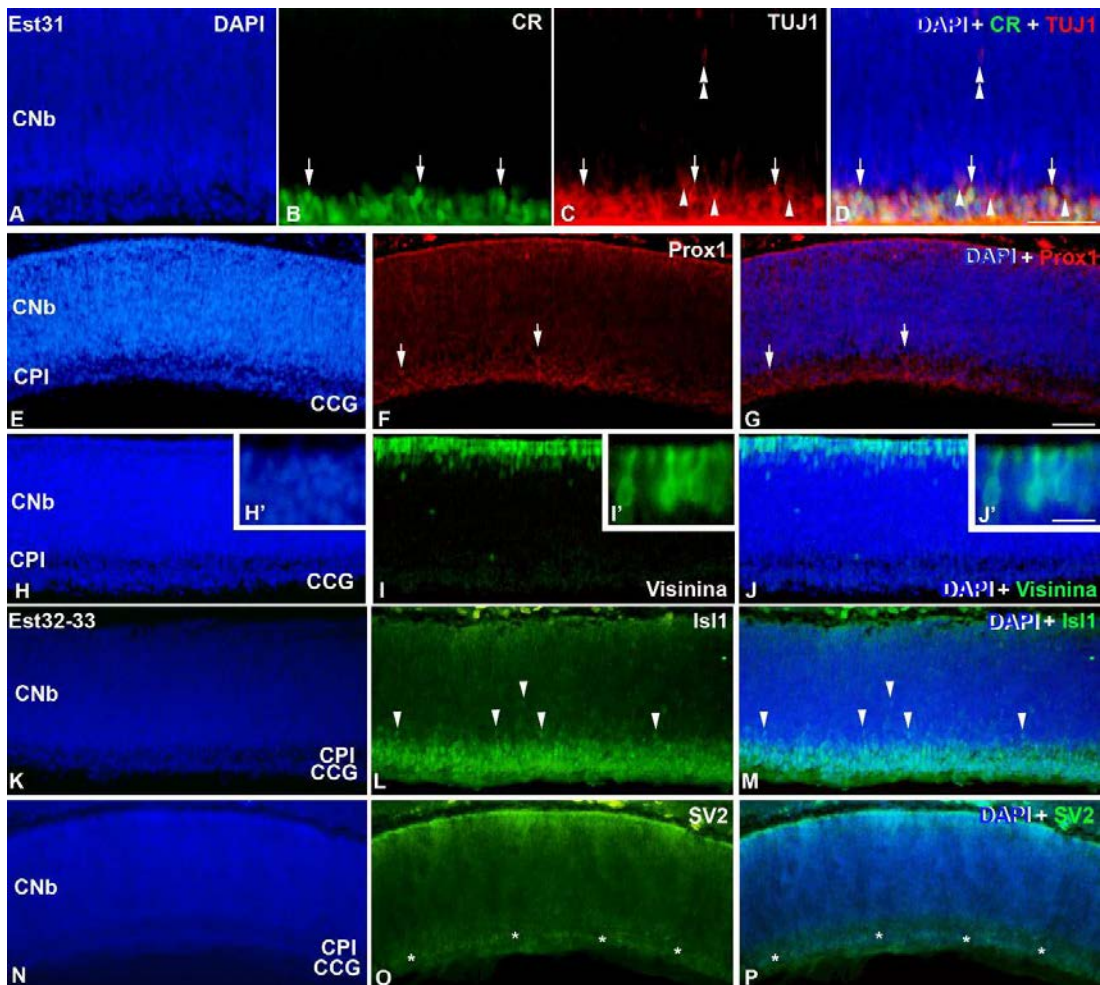


Figura 37. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en los Est 31 (A-G) y 32-33 (K-P) de desarrollo. Todas las secciones fueron contrateñidas con DAPI (A,E,H,H',K,N). El número de células ganglionares CR-positivas (B,D) y TUJ1-inmunoreactivas (C-D) se ha incrementado considerablemente y aunque se puede observar co-expresión de estos dos marcadores en algunas de ellas (flechas en B-D) hay otras células TUJ1-positivas que no expresan CR (puntas de flecha en C-D). Todavía se detecta algún neuroblasto migratorio (doble punta de flecha en C-D). El marcaje de Prox1 comienza a localizarse en la región más interna de la CNb (flechas en F-G). La inmunoseñal de visinina pone de manifiesto el incremento del número de fotorreceptores (I-J) que presentan un aspecto inmaduro (I'-J'). En el Est32-33 se pueden observar varias filas de células ganglionares Islet1-positivas, así como neuroblastos migratorios (puntas de flecha en L-M). La emergencia de la CPI es detectada por un débil marcaje con SV2 (asteriscos en O-P). CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CPI, capa plexiforme interna. Barras de aumento: 100 μ m A-p; 30 μ m en H'-J'.



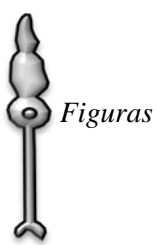
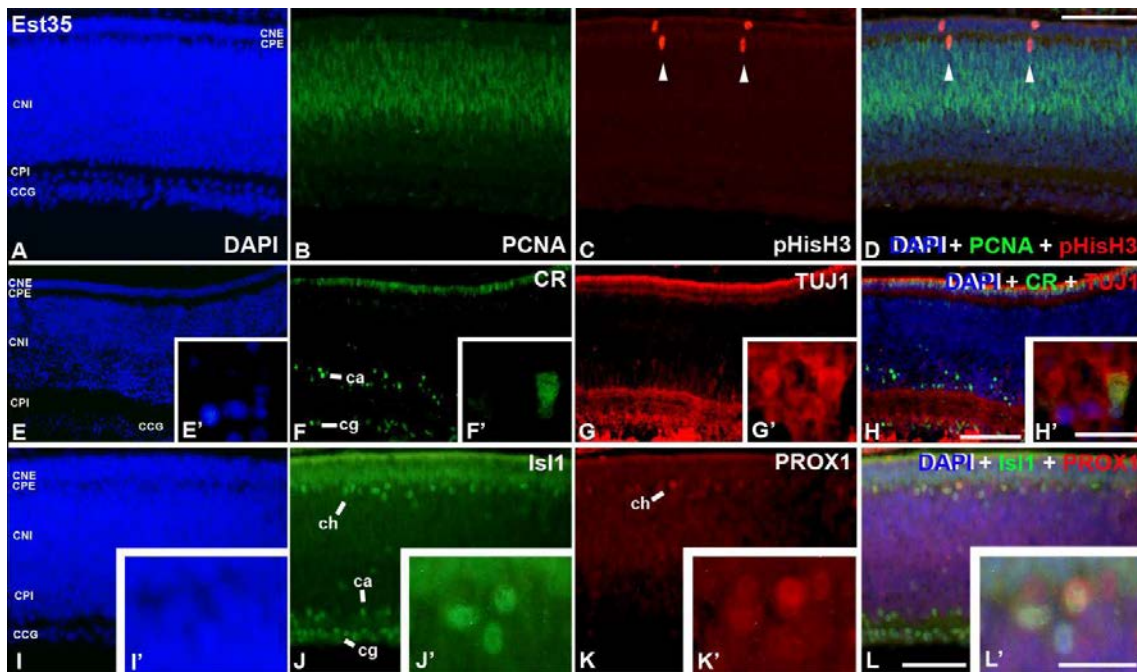


Figura 38. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est35 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,E,E',I,I'). Los núcleos de células PCNA-positivas se restringen a la CNI (B,D) y el número de mitosis ha disminuido notablemente (puntas de flecha en C-D). La expresión de CR y Tuj1 se extiende a células amacrinas (F-H) pero sólo se detecta co-expresión en células ganglionares (F'-H'). Detectamos inmunoreactividad frente a Islet1 en células ganglionares, amacrinas y horizontales (J,L). Se observan núcleos Prox1-positivos en la capa de células horizontales presuntiva (K-L) y algunos de estos co-expresan con Islet1 (J'-L'). *CCG*, capa de células ganglionares; *CNE*, capa nuclear externa; *CNI*, capa nuclear interna; *CPE*, capa plexiforme externa; *CPI*, capa plexiforme interna. Barras de aumento: 100 μ m e A-D, I-L; 150 μ m en E-H; 30 μ m en E'-L'.



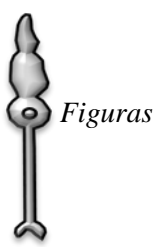
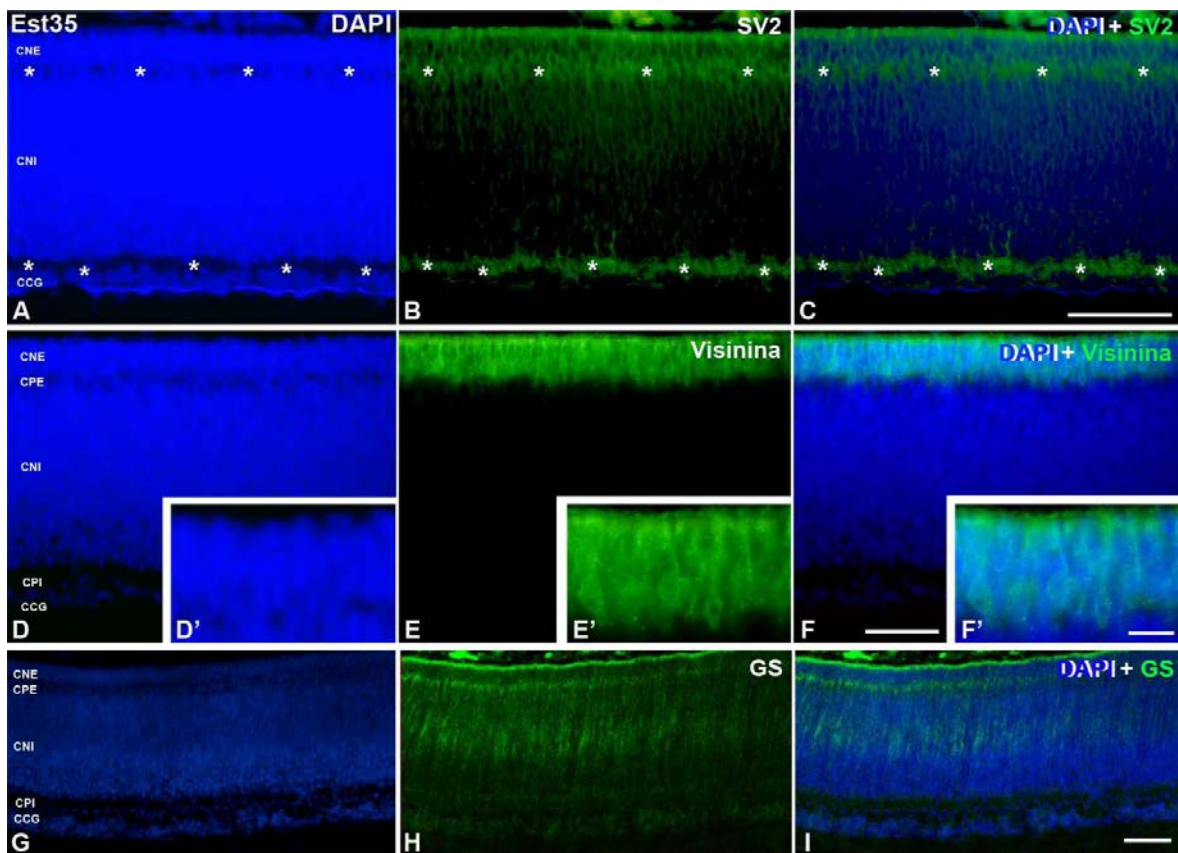


Figura 39. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est35 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,D,D',G). La CPE ha emergido y tanto esta como la CPI son SV2-inmunopositivas (asteriscos A-C). El número de fotorreceptores visinina-positivos ha aumentado en este estadio (E-F, E'-F'). Por primera vez se detecta la presencia de células de Müller GS-positivas (H-I). CCG, *capa de células ganglionares*; CNE, *capa nuclear externa*; CNI, *capa nuclear interna*; CPE, *capa plexiforme externa*; CPI, *capa plexiforme interna*. Barras de aumento: 100 μ m en A-I; 30 μ m en D'-F'.



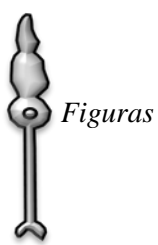
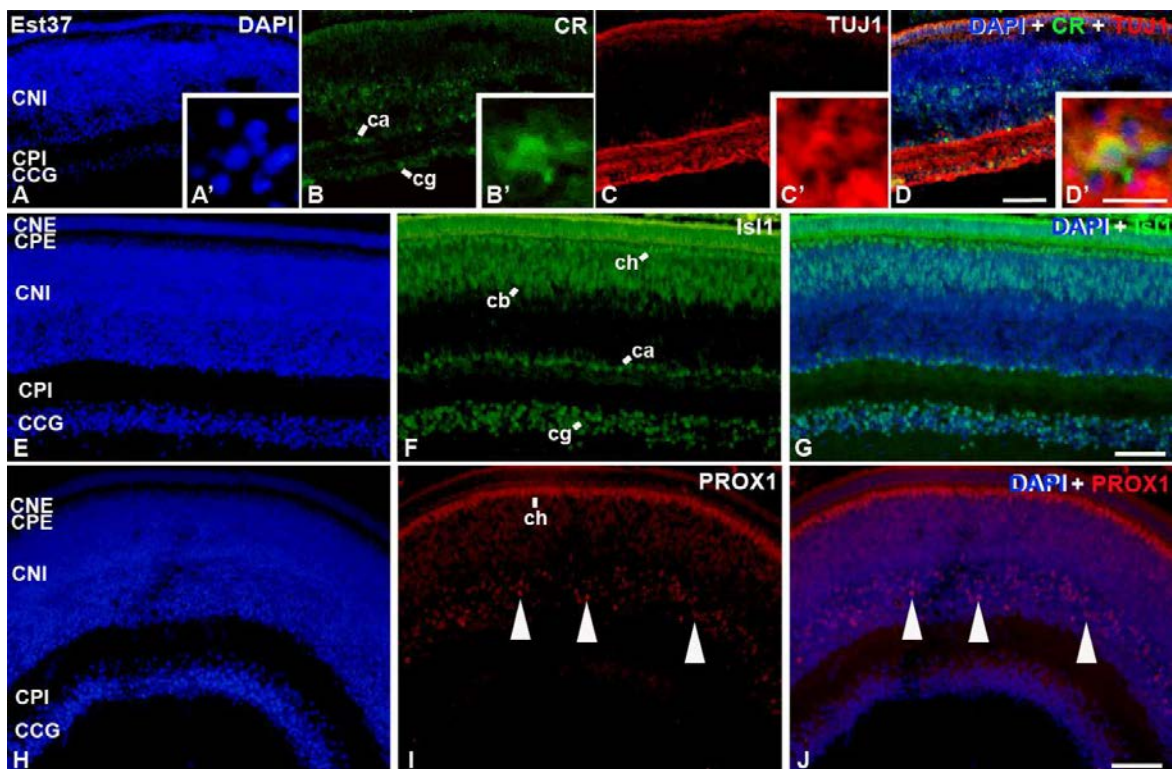


Figura 40. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est37 de desarrollo. Todas las secciones fueron contrateñidas con DAPI (A,A',E,H). El número de células amacrinas CR-positivas y TUJ1-positivas ha aumentado (B-D), sin embargo, la co-expresión de estos dos marcadores se sigue localizando en células ganglionares (A'-D'). La expresión de Islet1 aparece en células ganglionares, células amacrinas, células bipolares y células horizontales (F-G). Tanto las células horizontales situadas en la capa de células horizontales como las células destinadas a ser horizontales son Prox1-positivos (puntas de flecha en I-J). ca, célula amacrina; cb, célula bipolar; CCG, capa de células ganglionares; cg, célula ganglionar; ch, célula horizontal; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna. Barras de aumento: 150 μ m en A-D; 100 μ m en E-J; 30 μ en A'-D'.



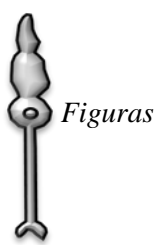
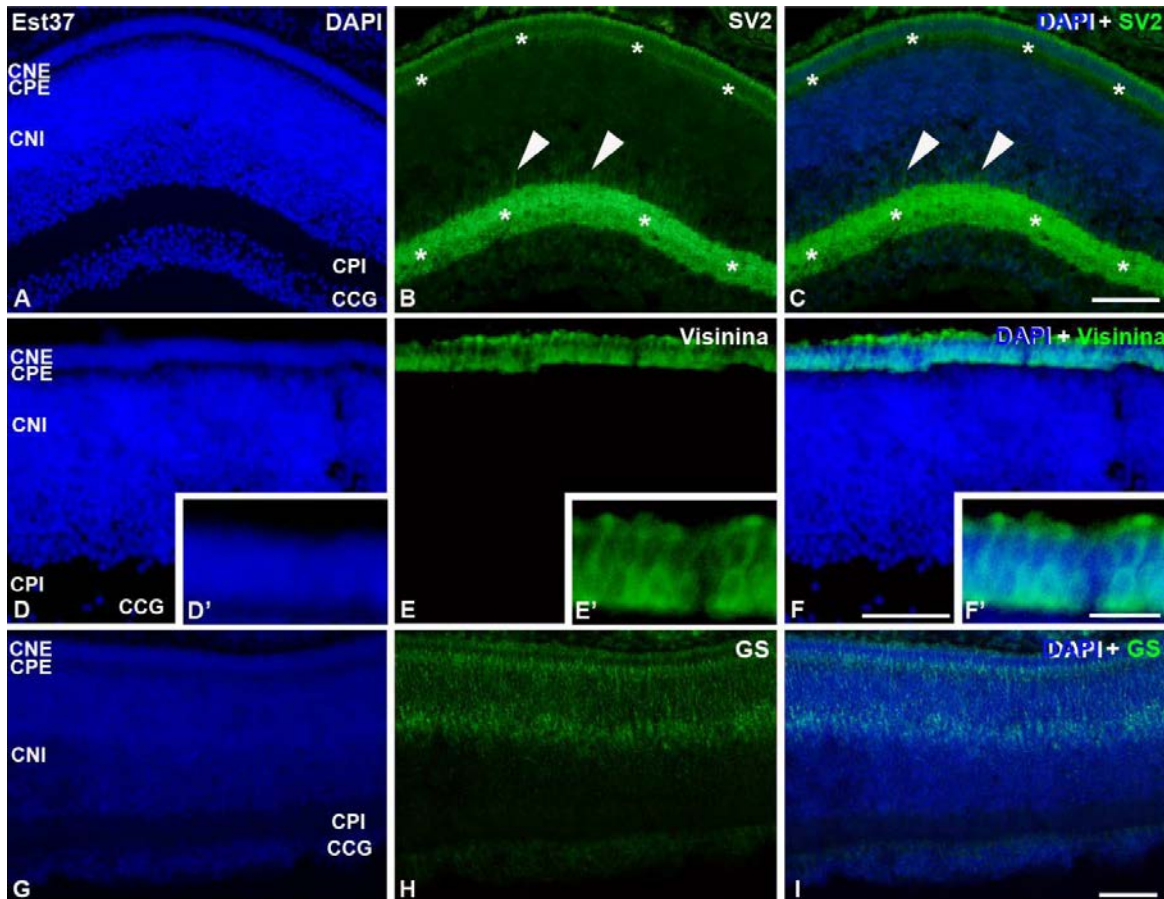


Figura 41. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est37 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,D,D',G). Se detectó un fuerte marcaje de SV2 en las capas plexiformes (asteriscos en B-C) así como en algunos somas de células amacrinas (puntas de flecha en B-C). Los fotorreceptores visinina-inmunorreactivos son numerosos en la retina central (E-F) de aspecto inmaduro (E'-F'). Se observó un incremento de la expresión de GS en las células de Müller (H-I). *CCG*, capa de células ganglionares; *CNE*, capa nuclear externa; *CNI*, capa nuclear interna; *CPE*, capa plexiforme externa; *CPI*, capa plexiforme interna. Barras de aumento: 100 μ m en A-I; 30 μ m en D'-F'.



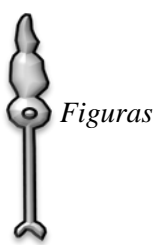
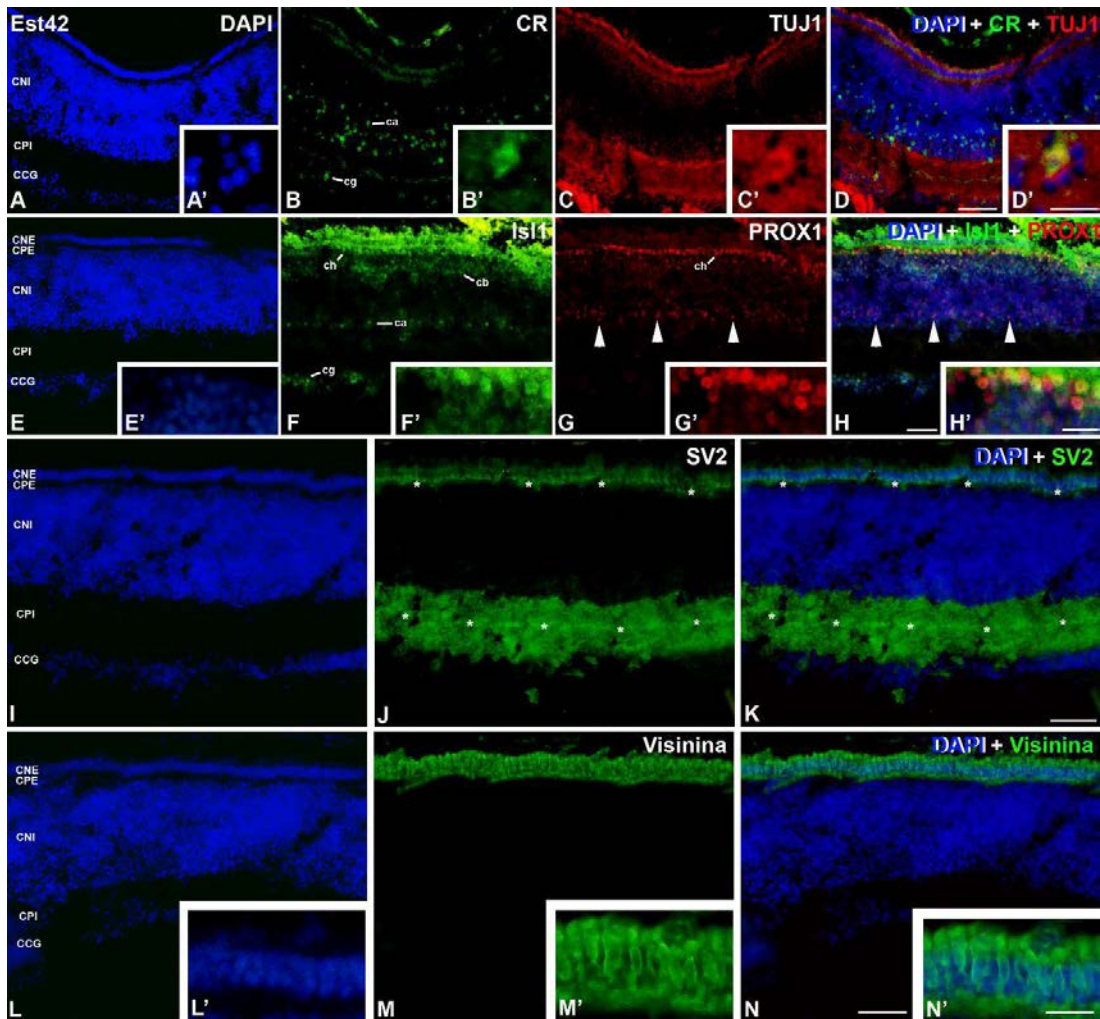


Figura 42. Detección de diferentes marcadores en criosecciones de la retina de *C. coturnix* en el Est42 de desarrollo. Todas las secciones fueron teñidas con DAPI (A,A',E,E',I,L,L'). Se detectaron células amacrinas tanto CR-inmuno-reactivas como TUJ1-positivas (B-D), observando co-localización de estos dos en las células ganglionares (B'-D'). La expresión de Islet1 se sitúa en los núcleos de células ganglionares, amacrinas, bipolares y horizontales (F,H) mientras que la de Prox1 en células horizontales y en algunas células destinadas a ser horizontales (puntas de flecha en G-H). Existe co-expresión de Islet1 y Prox1 en algunos subtipos de células horizontales (F'-H'). Se detectó una fuerte inmunoseñal de SV2 en las capas plexiformes (asteriscos en J-K). Se observó una intensa señal de visinina en los fotorreceptores (M-N) los cuales presentaban un aspecto más maduro que en los anteriores estadios (M'-N'). *CCG, capa de células ganglionares; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna.* Barras de aumento: 100 μ m en A-N; 30 μ m en A'-H', L'-N'.





Figuras

Discusión



1. Perfil neuroquímico de la retina de *T. guttata* y *C. coturnix*

En el presente estudio hemos utilizado una serie de marcadores inmunohistoquímicos que han sido ampliamente testados con anterioridad en la retina de vertebrados. El patrón de localización de estos marcadores suele estar muy conservado en este tejido (Bejarano-Escobar et al., 2014). Así, los anticuerpos frente a PCNA y pHisH3 se han utilizado ampliamente para identificar células proliferativas y en mitosis en numerosos estudios de desarrollo y regeneración retiniana en aves (Fischer y Reh, 2000; Ghai et al., 2008), pero también en peces (Bernardos et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012a; 2012b; 2014; Ferreiro-Galve et al., 2010; Pavón-Muñoz et al., 2016; Sánchez-Farías y Candal, 2016), anfibios (Yoshii et al., 2007), reptiles (Todd et al., 2016) y mamíferos (Barton y Levine, 2008). Son dos marcadores esenciales para identificar gradientes de diferenciación (ver más adelante) y, en el caso de la pHisH3, para monitorizar el proceso de diferenciación de las células horizontales (Capítulo 2 de la presente tesis).

TUJ1 es una proteína del citoesqueleto e Isl1 es un factor de transcripción. Están considerados como marcadores tempranos de retinogénesis al expresarse en neuroblastos que acaban de diferenciarse en la región escleral de la retina y se desplazan hasta su localización definitiva en el tejido (Snow y Robson, 1994, 1995, Elshatory et al., 2007; Sharma y Netland, 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012; 2014; 2015; Álvarez-Hernán et al., 2013; Martín-Partido y Francisco-Morcillo, 2015). En el presente estudio también hemos utilizado anticuerpos frente a la α -TubAc, que identifica los axones emergentes de las primeras neuronas que se diferencian en la retina de peces, las células ganglionares (Laessing y Stuermer, 1996). Hemos identificado un patrón de marcaje similar en la retina en diferenciación de *C. coturnix* (Fig.33). En estadios más avanzados, el patrón de marcaje de todos estos marcadores tempranos es idéntico al descrito en otras especies de vertebrados, si bien el marcaje de Isl1 en las células bipolares de la retina de *T. guttata* es muy débil o está casi ausente (Fig. 19).

La visinina es una proteína de unión a calcio presente en los conos en la retina madura y en desarrollo de *G. gallus* (Yamagata et al., 1990; Brunh y Cepko, 1996; Toy et al., 2002; Fischer et al., 2008). Hasta la fecha no se había estudiado su expresión en otras especies, pero en el presente estudio hemos comprobado que esta proteína se encuentra presente en fotorreceptores la retina en desarrollo de *T. guttata* (Figs. 20K, 26I) y de *C. coturnix* (Figs. 36S, 41E) incluso desde los primeros estadios de diferenciación



de estas células. Por tanto, puede ser considerado un excelente marcador de fotorreceptores indiferenciados y diferenciados en la retina de aves.

El factor de transcripción Prox1 juega un papel esencial en la regulación de la diferenciación de células amacrinas, bipolares y, principalmente, horizontales (Dyer et al., 2003; Edqvist y Hallböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016; Pérez de Sevilla Müller et al., 2017). La inmunorreactividad de Prox1 en la retina de las dos especies modelo seleccionadas en el presente estudio es altamente dinámica y similar al patrón que se describió en *G. gallus*, donde se utilizó como marcador de células horizontales (Edqvist y Hallböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016). En los estadios iniciales de diferenciación, la inmunorreactividad se localiza en núcleos situados cercanos a la superficie vítrea de la retina (Figs. 28E, 36P). Posteriormente, los núcleos Prox1-positivos se disponen en diferentes alturas de la CNI (Figs. 30F, 38K). Finalmente, en la retina laminada se expresa en sub-poblaciones de células amacrinas, bipolares y en todas las células horizontales (Fig. 20H, 33G), es decir, el mismo patrón de expresión descrito en la retina en desarrollo de *G. gallus* (Edqvist et al., 2006). La detección de los primeros núcleos Prox1-inmunorreactivos en las regiones externas de la CNb coincide con el inicio de la aparición de las mitosis no-apicales en la retina en desarrollo de *T. guttata*. Los neuroblastos dispersos en la CNb que son Prox1-positivos podrían estar involucrados en una migración masiva para generar la población de células horizontales como ocurre en la gallina (Edqvist y Hallböök, 2004; Boije et al., 2009; 2016). Esta coincidencia en la expresión de Prox1 y el inicio de las mitosis ectópicas será abordada en el capítulo 2 de la presente Tesis doctoral.

La CR es una proteína de unión a calcio que se expresa en varias subpoblaciones celulares de la retina en desarrollo y madura de vertebrados incluyendo ganglionares, amacrinas, bipolares y horizontales (Ellis et al., 1991; Cuenca et al., 2000; Loeliger y Rees, 2005; Francisco-Morcillo et al., 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2010, 2014). En la retina de *T. guttata* y *C. coturnix*, la expresión de CR se concentra principalmente en la CCG y en la capa de células horizontales. Algunas células amacrinas y bipolares dispersas también eran inmunorreactivas (Fig. 20E, 42B) mostrando un patrón similar al descrito para la retina de *G. gallus* (Ellis et al., 1991).

La PV es una proteína citosólica de unión a calcio esencial para el mantenimiento de la homeostasis del mismo. Parece que su expresión en la retina de aves y peces está altamente conservada y restringida a una subpoblación de células amacrinas (Sanna et al., 1992; Bejarano-Escobar et al., 2014) mientras que en mamíferos aparece también en



células ganglionares y horizontales (Hendrickson et al., 2007; Yi et al., 2012; Lee et al., 2013). En la retina madura de *C. coturnix* la inmunorreactividad se detecta en subpoblaciones de células amacrinas (Fig. 33D) al igual que lo descrito anteriormente en *G. gallus* (Sanna et al., 1992).

La GS es una enzima que en la retina se localiza exclusivamente en las células de Müller de vertebrados (Linser y Moscona, 1979; Prada et al., 1998; Mack et al., 1998; Peterson et al., 2001; Lillo et al., 2002; Thummel et al., 2008; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2010, 2012a, 2014). Esta expresión es idéntica a la descrita en la retina de codorniz (Figs. 33O-P y 39H).

2. Gradientes de diferenciación en la retina de aves

Todos los eventos analizados en el presente estudio, tanto histogenéticos como de diferenciación celular en la retina de *T. guttata* y *C. coturnix*, siguen los gradientes típicos de diferenciación descritos para la retina de vertebrados y analizados con anterioridad en la retina de *G. gallus* (Prada et al., 1991). El más evidente es el gradiente centro- periférico, observado tanto en peces (Vecino et al., 1993; Candal et al., 2005; Bejarano- Escobar et al., 2009; 2010; 2012; Pavón-Muñoz et al., 2016), anfibios (Álvarez-Hernán et al., 2013), reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2006) y mamíferos (Young, 1985; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004).

Otro gradiente que se aprecia durante la diferenciación de la retina de aves es el vítreo-escleral, de forma muy evidente en la aparición de las capas plexiformes. La CPI aparece antes que la plexiforme externa tanto en la especie *T. guttata* (Fig. 29), como en *C. coturnix* (Fig. 36), como en *G. gallus* (Drenhaus et al., 2007) (Tabla 6). Este retardo en la aparición de la CPE se ha descrito también en peces condriictios (Harahush et al., 2009; Ferreiro-Galve et al., 2010; Bejarano-Escobar et al., 2012) y en diferentes especies de mamíferos (Young, 1985; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004). En cambio, en numerosas especies de osteíctios (Vecino et al., 1993; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; Pavón-Muñoz et al., 2016) y en galápagos (Francisco-Morcillo et al., 2006) ambas capas se desarrollan en paralelo.

Por otra parte, los patrones de expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos también reflejan este gradiente vítreo-escleral. Se hace especialmente evidente con marcadores como TUJ1, que comienza expresándose en células ganglionares y posteriormente en células amacrinas (Figs. 22, 29, 32) o Isl1 que comienza expresándose en células ganglionares y su distribución se extiende con posterioridad a células amacrinas, horizontales y bipolares (Figs. 20, 40).



3. La retina de *T. guttata* y *C. coturnix* en individuos recién eclosionados

Se ha descrito que diversas especies precociales de vertebrados nacen con una retina totalmente diferenciada y preparada para procesar estímulos nerviosos. Esto se ha descrito en peces (Evans y Browman, 2004; Candal et al., 2005, 2008; Harahush et al., 2009; Ferreiro-Galve et al., 2010; Bejarano-Escobar et al., 2012, 2013; 2014; Álvarez- Hernán et al., 2019) reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2006) y mamíferos (Sharma y Ehinger, 1997; Loeliger y Rees, 2005; Nag y Wadhwa, 2007; Guduric-Fuchs et al., 2009). En el caso de las aves, casi todos los estudios de retinogénesis han utilizado como modelo la gallina, *G. gallus*, especie precocial que, al igual que el resto de vertebrados anteriormente descritos, poseen una retina con las capas plenamente establecidas y las células totalmente diferenciadas en el momento de la eclosión (Prada et al., 1991; Drenhaus et al., 2007; Rojas et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2015). De la misma forma, la codorniz, *C. coturnix*, especie empleada en el presente estudio como modelo de especie precocial, presenta una retina plenamente estratificada en el momento del nacimiento (Fig. 33). Además, no se detectan indicios de actividad proliferativa salvo unas pocas figuras mitóticas residuales en la región periférica de la retina (Fig. 33A-B).

Estudios similares en la retina de especies altriciales son muy escasos. El presente estudio muestra que la retina de *T. guttata*, una especie de ave altricial, en el momento de la eclosión presenta estratificación únicamente en las regiones central y centro-periférica, estando indiferenciada en la región periférica, donde se observa una ZMP carente de capas plexiformes. Por otra parte, en la retina de *T. guttata* se aprecian otros signos de inmadurez. Así, los fotorreceptores presentan una morfología inmadura, con un soma poligonal y carente de segmentos externos, como previamente había sido descrito en la paloma, *Columba livia* (Rojas et al., 2007), otra ave altricial. Otro signo de inmadurez evidente es la multiestratificación de la CCG (Fig. 20). Además, las capas plexiformes no muestran el grosor típico que adquieren cuando el tejido es maduro como aparecen en *G. gallus* (Bergmann et al., 1999) o en la codorniz (Fig. 33J-K). Los resultados obtenidos en el estudio morfológico en *T. guttata* coinciden parcialmente con lo descrito en otras clases de vertebrados. Así, en especies altriciales de peces y anfibios, la retina se muestra totalmente indiferenciada en el momento de la eclosión, formada por una capa neuroblástica carente de capas plexiformes (Evans y Browman, 2004; Bejarano-Escobar



et al., 2009; 2010; 2014; Álvarez-Hernán et al., 2013; 2019; Pavón-Muñoz et al., 2016). Resultados similares han sido descritos en mamíferos altriciales en los que la diferenciación de las capas plexiformes no se produce hasta después del nacimiento (Reese et al., 1996; Sharma et al., 2003; Diao et al., 2004; Bytyqi y Layer, 2005).

El estudio inmunohistoquímico corrobora el estado de inmadurez en el que se encuentra la retina de *T. guttata* en el momento de la eclosión. En especies precociales como *C. coturnix*, las células proliferativas son muy escasas y quedan restringidas a la ZMP o a la *pars plana* (Fig. 33), como ocurre en *G. gallus* (Fischer y Reh, 2000; Ghai et al., 2008). En cambio, en *T. guttata* se detecta una gran cantidad de núcleos PCNA-positivos en la mitad escleral de la CNI, mientras que la región más periférica de la retina presenta una ZMP totalmente indiferenciada con prácticamente todas las células en proliferación (Fig. 19). Es una situación similar a la observada en el Est35 de *C. coturnix* (Fig. 38B,D), es decir en el día embrionario 8, 10 días antes de la eclosión. La actividad mitótica, detectada con anticuerpos anti-pHisH3, es intensa en toda la superficie escleral de la retina de *T. guttata* (Fig. 19), estando prácticamente ausente en la retina de codorniz (Fig. 33). En este sentido, resulta llamativo que se aprecien mitosis pHisH3-positivas en la región escleral de la región central de la retina de *T. guttata* cuando el tejido ya presenta estratificación, ya que se ha descrito la desaparición de esta actividad mitótica coincidiendo con la emergencia de las capas plexiformes en diferentes especies de peces (Bejarano-Escobar et al., 2012; Pavón-Muñoz et al., 2016) y mamíferos (Robinson et al., 1985; Stone et al., 1985). Por otra parte, en el momento de la eclosión se aprecian en la región periférica mitosis extra-ventriculares, lo que es un signo de indiferenciación al estarse todavía diferenciando células horizontales (ver capítulo 2).

Por lo tanto, según los resultados del presente trabajo y lo descrito para otras especies, parece ser que en *T. guttata* los eventos de neurogénesis continúan en la vida posnatal del individuo hasta alcanzar la completa madurez, no así para *C. coturnix* que nace con la retina completamente desarrollada y diferenciada.

4. La retina en desarrollo de *T. guttata* y *C. coturnix*

Existen varios eventos morfogenéticos, histogenéticos y de diferenciación celular en el desarrollo embrionario del sistema visual de aves. Los resultados obtenidos en *T. guttata* y *C. coturnix* nos permite compararlos con lo descrito en *G. gallus*, la especie modelo más utilizada en aves (Tabla 6). Se puede comprobar que todos los eventos



ontogénicos considerados ocurren en estadios de diferenciación más tempranos en las especies precociales que en la altricial. A continuación, discutiremos cada uno de ellos.

La primera diferencia importante que existe entre las tres especies de aves es el periodo de incubación: 16,5 días en la codorniz, 21 días en la gallina y 14 días en el pinzón. Podría pensarse que, debido a que las especies precociales tienen un periodo embrionario más prolongado, sus tejidos presentan un estadio más avanzado de maduración en el momento del nacimiento. Se ha demostrado que esto no es así, ya que los últimos días del periodo embrionario en especies precociales están caracterizados por el crecimiento de los individuos (Ainsworth et al., 2010; Hamburger y Hamilton, 1951), no por maduración de estructuras. En cambio, las especies altriciales continúan con el proceso de maduración de los tejidos incluso después de la eclosión (Murray et al., 2013). Por tanto, hay un retraso en la diferenciación de tejidos en especies de aves altriciales con respecto a precociales. Este retraso en el desarrollo embrionario se hace más patente cuando comparamos diversos eventos ontogénicos. Se ha comprobado que ambas especies de aves precociales, *G. gallus* y *C. coturnix*, durante los primeros estadios de desarrollo (desde el Est4 hasta el Est28, HH4-HH28) presentan un desarrollo casi en paralelo. A partir de este Est28, la maduración de los tejidos de *C. coturnix* se acelera con respecto a la que se observa en la gallina (Ainsworth et al., 2010).

Si comparamos dichos eventos con *T. guttata*, el desarrollo acelerado de especies precociales se hace muy evidente. Así, la aparición de la línea primitiva o el proceso de neurulación se alcanza en menos horas en *G. gallus* que en *T. guttata* (Murray et al., 2013). Si atendemos a la formación del sistema visual, los principales eventos morfogenéticos tempranos como la formación de las vesículas ópticas y las copas ópticas ocurre más tempranamente en *G. gallus* y *C. coturnix* que en *T. guttata* (Tabla 6).

El proceso de diferenciación celular es detectado gracias a técnicas que identifican la proliferación celular. Los primeros núcleos PCNA-negativos se detectan en el Est24 en *T. guttata* (108 h), mientras que en *C. coturnix* en el Est21-22 (96 h). En *G. gallus* las primeras células que no aparecen marcadas con timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ - timidina) son identificadas en HH13 (48 h) (Prada et al., 1991). Lo que sí que se conserva es que las primeras células no marcadas se sitúan en la región vítrea de la retina, justo donde se diferencian las primeras células ganglionares (Prada et al., 1991; McCabe et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2005; 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012; Álvarez-Hernán et al., 2013; 2019; de Mera-Rodríguez et al., 2019). Estos primeros núcleos PCNA-negativos coinciden topográficamente con el inicio de expresión de



marcadores tempranos de diferenciación neuronal, como TUJ1 en el Est24 (108 h) en *T. guttata*, mientras que dicha expresión se detecta por primera vez en HH16 (51-56 h) en la gallina (Snow y Robson, 1994) y en el Est22 (96 h) en la codorniz (Espanel et al., 1997). No obstante, en el presente estudio, utilizando anticuerpos frente a α -TubAc, que identifica los axones que emergen de las primeras células ganglionares que se están diferenciando en la retina (Laessing y Stuermer, 1996), detectamos que dicha diferenciación ya se está produciendo en la retina de *C. coturnix* en el Est21 (84 h).

Isl1 es un factor de transcripción que se expresa en los primeros neuroblastos que se diferencian en la retina de vertebrados (Bejarano-Escobar et al., 2015; Martín-Partido y Francisco-Morcillo, 2015), pero su expresión se retrasa con respecto a TUJ1 en la retina de peces (Bejarano-Escobar et al., 2012). Este retraso también se aprecia en la retina de aves, tanto en *T. guttata* (Fig. 22) como en *C. coturnix* (Fig. 34) (Tabla 6).

La diferenciación de los primeros fotorreceptores, monitorizada con anticuerpos anti-visinina como se ha descrito en la retina de *G. gallus* (Bruhn y Cepko, 1996), también está retrasada en la retina de especies altriciales con respecto a las precociales (Tabla 6).

Prox1 es un factor de transcripción implicado en la diferenciación de células horizontales, amacrinas y bipolares (Dyer et al., 2003; Edqvist y Halböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016; Pérez de Sevilla Müller et al., 2017). En la retina de *G. gallus*, se ha utilizado su patrón de expresión para describir el proceso de diferenciación de las células horizontales (Edqvist y Halböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016), al ser considerado un *pan-marcador* de este tipo celular. A lo largo del desarrollo, la expresión de Prox1 es muy dinámica, iniciándose en la región más vítrea de la CNb. En *T. guttata*, el inicio de la expresión de Prox1 se detecta en el Est34 (E7,5), muy posterior al estadio en el que se detecta en *C. coturnix* (Est28; E5,5; Fig. 35P) y en *G. gallus* (Est29; E6; Edqvist y Halböök, 2004; Edqvist et al., 2006). Los núcleos Prox1-positivos comienzan a dispersarse a lo largo de toda la CNb, localizándose de manera progresiva en regiones más esclerales, hasta alinearse en la capa de células horizontales (Figs. 29F y 37K). Este patrón dinámico responde al proceso de migración bidireccional que sufren los neuroblastos de células horizontales, situándose en un principio en la capa de células amacrinas y posteriormente, migrando hacia la capa de células horizontales situada en una región más escleral (Edqvist y Halböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016). Por último, mientras que en estadios perinatales el patrón de expresión de Prox1 se restringe a las células horizontales en las especies precociales (Fig. 32G; Edqvist y Halböök, 2004), en la retina de *T. guttata* todavía existen núcleos migrando vítreo-escleralmente, en



Discusión

consonancia con el retraso en los procesos de diferenciación que existen en la retina de *T. guttata*. El patrón de expresión de Isl1 también se muestra más inmaduro en la retina de *T. guttata* (Fig. 20B) que en *C. coturnix* (Fig. 42F) o en *G. gallus* (Bejarano-Escobar et al., 2015).

La aparición de las capas plexiformes quizás sea el evento histogenético más reseñable de la retina, pues es un indicador del establecimiento de sinapsis entre las diferentes neuronas que componen este tejido. La presencia de sinapsis funcionales podemos monitorizarla gracias al uso de anticuerpos anti-SV2, como anteriormente se ha descrito en peces (Bejarano-Escobar et al., 2010; 2012; Pavón-Muñoz et al., 2016; Álvarez-Hernán et al., 2019), anfibios (Álvarez-Hernán et al., 2013), aves (Bergmann et al., 1999) y mamíferos (Okada et al., 1994). Tanto las técnicas histológicas con el uso de secciones semi-finas, como las inmunohistoquímicas sobre secciones de congelación, nos muestran que la aparición de las capas plexiformes se retrasa en el desarrollo embrionario en especies altriciales con respecto a especies precociales (Tabla 6).



<i>Eventos</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Gallus gallus</i>	Referencias
<i>Vesícula óptica</i>	Inicio: Est9 (42h)	Est9	HH9 (29-33h)	Murray et al. (2013) y Hamburger y Hamilton (1951) Ainsworth et al. (2010)
<i>Copa óptica</i>	Inicio: Est14 (108h)	Est15 (50-55h)	HH15 (50-55h)	Hamburger y Hamilton (1951) Ainsworth et al. (2010)
<i>Diferenciación de células ganglionares</i>	Primeros núcleos PCNA-negativos: Est24 (108h)	Est21-22 (96h)	[³ H]timidina: HH13 (48h)	Prada et al. (1991)
	Expresión de TUJ1: Est24 (108h)	Expresión de α -Tub: Est21 (96h)	Expresión de TUJ1: HH16 (51-56h)	Snow y Robson (1994)
	Expresión de Isl1: Est25 (120h)	Est22 (96h)	HH19-20 (72h)	Sakagami et al. (2003) Bejarano-Escobar et al. (2015)
<i>Diferenciación de células amacrinas</i>	Expresión de TUJ1: Est41 (E10)	Expresión de TUJ1: Est35 (E8)	Expresión de TUJ1: HH34 (E8)	
	Expresión de Isl1: Est41 (E10)	Expresión de Isl1: Est35 (E8)	Expresión de Isl1: HH34 (E8)	Edqvist et al. (2006)
		Expresión de CR: Est35 (E8)	Expresión de CR: HH36 (E10) HH31 (E7)*	Ellis et al. (1991)
<i>Diferenciación de fotorreceptores</i>	Núcleos PCNA-negativos: Est28 (132h)	Est28 (132h)	[³ H]timidina: HH24 (96h)	Prada et al. (1991)
	Expresión de visinina: Est28 (132h)	Est28 (132h)	HH27 (120h)	Bradford et al. (2005)
<i>Diferenciación de células horizontales</i>	Expresión de Prox1: Est34 (174h)	Est28 (132h)	HH30 (156h)-HH32 (174h)	Edqvist y Halböök (2004)
<i>Histogénesis de la CPI</i>	Expresión de SV2: Est38 (E8,5)	Est31 (156h)	HH31 (E7)	Drenhaus et al. (2007)
<i>Histogénesis de la CPE</i>	Expresión de SV2: Est39 (E9)	Est35 (E8)	HH34 (E8)	Drenhaus et al. (2007)

Tabla 6. Principales eventos implicados en la morfogénesis e histogénesis de la retina en las tres especies de estudio.



En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que existen importantes diferencias cronológicas en el desarrollo embrionario de aves precociales y altriciales (Hamburger y Hamilton, 1951; Stark y Ricklefs, 1998; Murray et al., 2013). Concretamente, la morfogénesis de la vesícula y la copa óptica, el inicio de la diferenciación celular y el proceso de histogénesis tienen lugar en etapas de desarrollo más tardías en *T. guttata* que en *C. coturnix* y *G. gallus*.

Por otro lado, analizando la actividad mitótica y la génesis de nuevos tipos celulares tras la eclosión de los individuos de las dos especies, se ha comprobado que la actividad proliferativa y mitótica en la codorniz está prácticamente ausente, similar a lo observado en *G. gallus*, mientras que en *T. guttata* existe una ZMP prominente con una intensa actividad mitótica en la región escleral, sugiriendo que esta especie altricial podría ser un buen modelo para llevar a cabo estudios de neurogénesis postnatal como ha sido empleada anteriormente para el estudio de neurogénesis adulta en el SNC (Charvet y Striedter, 2011). La duración de la neurogénesis postnatal en *T. guttata* y los factores involucrados en estos mecanismos pueden ser objeto de estudio en el futuro.

La presencia de nichos de células madre puede incidir directamente sobre la capacidad regenerativa del tejido retiniano, como se ha visto en peces (Álvarez- Hernán, 2018-libro). Así, en *G. gallus*, las células de Müller tienen la capacidad de convertirse en células progenitoras por una estimulación por daño y generar nuevos tipos celulares (Fischer y Reh, 2001; Fischer et al., 2014; Gallina et al., 2014). Por tanto, la elevada actividad mitótica de los individuos de *T. guttata* recién eclosionados convierte a esta especie en una posible poderosa herramienta para abordar estudios de regeneración neuronal en aves.

Anexo

SOLUCIONES:• **Tampón citrato**

✓ Solución A: ácido cítrico 0'1M

para 1 L → 21 gr

para 0'5 L → 10'5 gr

para 25'5 mL → 0'5355 gr

✓ Solución B: citrato sódico (H₅C₆O₇Na₃·2H₂O) 0'1M

para 1 L → 29'41 gr

para 0'5 L → 14'7 gr

para 124'5 mL → 3'6615 gr

Para 100 ml de volumen final:

Sol. A Sol.B pH

46'53'5..... 3.0

43'76'33.2

31'518'54.2

20'529'55.0

13'736'35.6

8'541'56.0

*Para 300 mL: 25'5 mL Sol. A + 124'5 mL Sol. B + 150 mL H₂O_d**Para 500 mL a pH6: 2'5 mL A + 207'5 mL B + 150 mL H₂O_d*• **Azul de toluidina**

Compuesto	Cantidad
Toluidina	0,5 g
Tetraborato sódico	0,5 g

Disolver ambos productos en 100ml de agua destilada.

- **PBS 10x**

Para 1L:

Compuesto	Cantidad
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Todos estos compuestos se disuelven en el litro de agua destilada que se encontrará en agitación.

El **PBS 1x** (PBS) fue obtenido añadiendo un volumen de solución concentrada de PBS 10x a 9 volúmenes de agua destilada y ajustando el pH a 7,4.

- **PBS-Gelatina 15%-Sacarosa 15%**

Para 1 litro:

Compuesto	Cantidad
Gelatina	150 g
Sacarosa	150 g

Calentar 800 mililitros de agua destilada hasta ebullición. Dejar enfriar un poco y añadir la gelatina con agitación rápida. Dejar en agitación hasta que la solución adquiera una tonalidad amarillenta y transparente. Después, añadir la sacarosa hasta su disolución. Posteriormente enrasar con agua hasta 900 mililitros y finalmente añadir 100 mililitros de PBS 10x. Dejar enfriar la mezcla y alicuotar en envases de 100 mililitros, que se almacenarán en el congelador. Para su utilización, estos envases serán descongelados en el microondas.

- **PBS-Gelatina-Tritón (PBS-G-T)**

Para 1 litro:

Compuesto	Cantidad
Gelatina	2 g
Tritón X-100	2500 µl

Calentar 1 litro de PBS. Dejar enfriar un poco y añadir la gelatina con agitación rápida. Dejar en agitación hasta que la solución transparente. Después, añadir el tritón hasta su disolución.

- **PBS-Gelatina-Tritón-Lisina 1M (PBS-G-T-L)**

Para preparar 100 ml de lisina 1M se disuelven 18,865gr de lisina en 100 ml de agua destilada. Para preparar la solución PBS-G-T-L, se toma 1 ml de la solución de lisina 1M preparada y se le añaden 9 ml de PBS-G-T.

- **PBS-Tritón (PBS-T)**

Para preparar esta solución disolver 500 µl de Triton X-100 en 1 litro de la solución de PBS.

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN,
TRANSFERENCIA E INNOVACIÓN**

NºRegistro: 264//2019

Campus Universitario
Avdº de Elvas s/nº
06071 BADAJOZ

Tel.: 924 28 93 05
Fax: 924 27 29 83

**D^a MARÍA REYES PANADERO, SECRETARIA DEL COMITÉ DE ÉTICA DE
EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.**

INFORMA: Que una vez evaluada por este Comité la solicitud del Proyecto de Tesis titulado "**Desarrollo embrionario y posnatal de los sistemas visual y esquelético en aves precociales y altriciales: estudio comparado**", cuya responsable es Dña. Guadalupe Álvarez Hernán, y tras considerar su valor científico, su conformidad con los requisitos de reemplazo, refinamiento y reducción, teniendo en cuenta las consideraciones éticas que se ajustan a la normativa vigente al efecto, y de tal manera considerar clasificado con *grado de severidad sin recuperación* el procedimiento, y sin que sea necesario llevar a cabo una evaluación retrospectiva del mismo, este Comité ha decidido evaluar positivamente la precitada práctica docente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente informe en Badajoz a 29 de junio de 2020.

VºBº

Fdo.: Javier de Francisco
Presidente por delegación del
Comité de Ética de
Experimentación animal

Days of incubation	Chick	Quail	Zebra finch
E3	HH19-HH21	St19	St16
E3,5-4	HH23	St20-21	St17-21
E4	HH24	St22-24	St22
E4,5-5	HH25-HH26	St25-26	St23-25
E5	HH27	St27	St26
E5,5	HH28	St28-29	St27-29
E6	HH29	St30	St30
E6,5	HH30	St31	St31-32
E7	HH31	St32-33	St33
E7,5-E8	HH32-HH33	St34	St34-36
E8	HH34	St35	St37
E8-9	HH35	St36-37	St38-40
E10	HH36	St38	St41-42
E11	HH37	St39-41	St43
E12	HH38	St42	St44
E13	HH39	St42	St45
E14	HH40	St43	
E15	HH41	St44	
E16	HH42	St44-45	
E17	HH43	St45	
E18	HH44		
E19-20	HH45		
E21			
E32			

Bibliografía

- Álvarez-Hernán G, S-LI, Bejarano-Escobar R., Pavón-Muñoz T., Rodríguez-León J., Martín-Partido G., Francisco-Morcillo F. (2018) Teleosts: Physiology, Evolution and Classification. *Marine and Freshwater Biology*.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2009) Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneo 1758). *Exp Eye Res* 89 (3):398-415. doi:10.1016/j.exer.2009.04.007
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Oyola-Velasco JA, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2010) Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314 (7):580-605. doi:10.1002/jez.b.21363
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Oyola-Velasco JA, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2010) Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314 (7):580-605. doi:10.1002/jez.b.21363
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2013) Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 223 (2):171-184. doi:10.1111/joa.12071
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, Rodríguez C, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2012) Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 220 (4):318-335. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01480.x
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2012) Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthonic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death. *J Exp Biol*. doi:jeb.072124 [pii] 10.1242/jeb.072124
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2014) Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. *Rev Fish Biol Fisheries* 24:127-158
- Bergmann M, Grabs D, Rager G (1999) Developmental expression of dynamin in the chick retinotectal system. *J Histochem Cytochem* 47 (10):1297-1306. doi:10.1177/002215549904701009
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27 (26):7028-7040
- Boije H, Edqvist PH, Hallböök F (2009) Horizontal cell progenitors arrest in G2-phase and undergo terminal mitosis on the vitreal side of the chick retina. *Dev Biol* 330 (1):105-113. doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.013
- Boije H, Shirazi Fard S, Edqvist P-H, Hallböök F (2016) Horizontal cells, the odd ones out in the retina, give insights into development and disease. *Frontiers in neuroanatomy* 10:77
- Bradford RL, Wang C, Zack DJ, Adler R (2005) Roles of cell-intrinsic and microenvironmental factors in photoreceptor cell differentiation. *Dev Biol* 286 (1):31-45. doi:10.1016/j.ydbio.2005.07.002
- Bruhn SL, Cepko CL (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J Neurosci* 16 (4):1430-1439
- Bytyqi AH, Layer PG (2005) Lamina formation in the Mongolian gerbil retina (*Meriones unguiculatus*). *Anat Embryol (Berl)* 209 (3):217-225. doi:10.1007/s00429-004-0443-9
- Candal E, Anadon R, DeGrip WJ, Rodríguez-Moldes I (2005) Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* 154 (1):101-119. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.10.008
- Candal E, Ferreiro-Galve S, Anadon R, Rodríguez-Moldes I (2008) Morphogenesis in the retina of a slow-developing teleost: emergence of the GABAergic system in relation to cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 1194:21-27. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.065
- Charvet CJ, Striedter GF (2008) Developmental species differences in brain cell cycle rates between northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*) and parakeets (*Melopsittacus undulatus*): implications for mosaic brain evolution. *Brain Behav Evol* 72 (4):295-306. doi:000184744 [pii] 10.1159/000184744
- Charvet CJ, Striedter GF (2011) Developmental Modes and Developmental Mechanisms can Channel Brain Evolution. *Front Neuroanat* 5:4. doi:10.3389/fnana.2011.00004
- Cuenca N, Haverkamp S, Kolb H (2000) Choline acetyltransferase is found in terminals of horizontal cells that 1a with GABA, nitric oxide synthase and calcium binding proteins in the tu retina. *Brain Research* 878:228-239



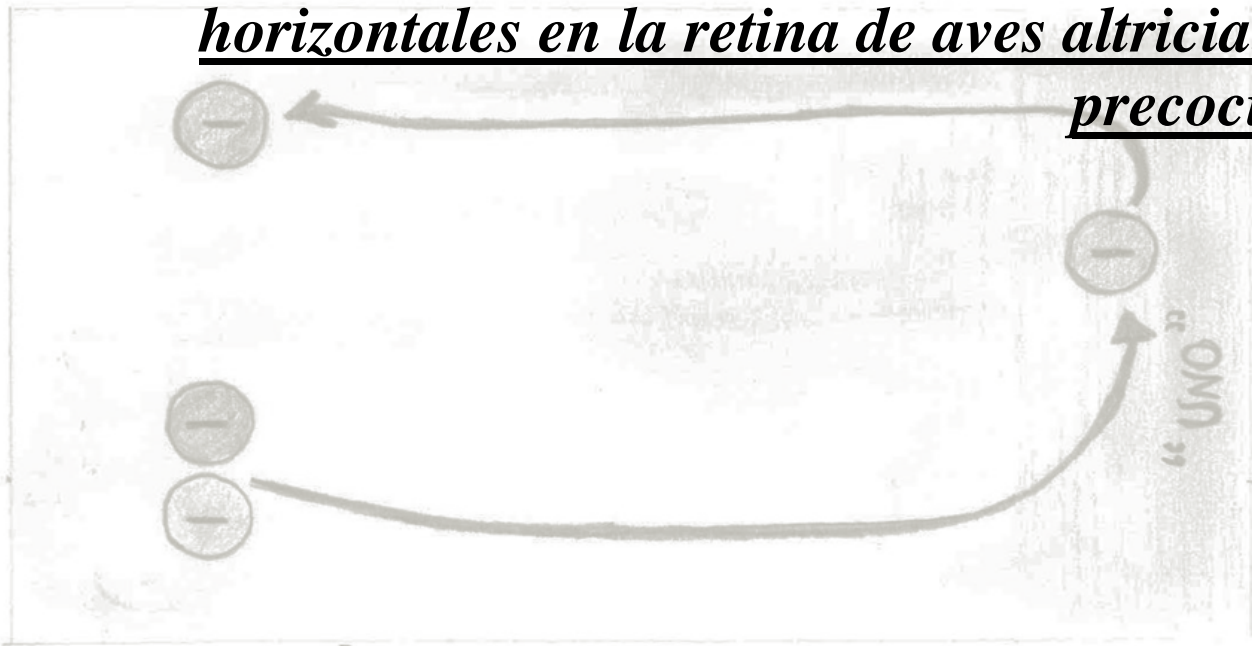
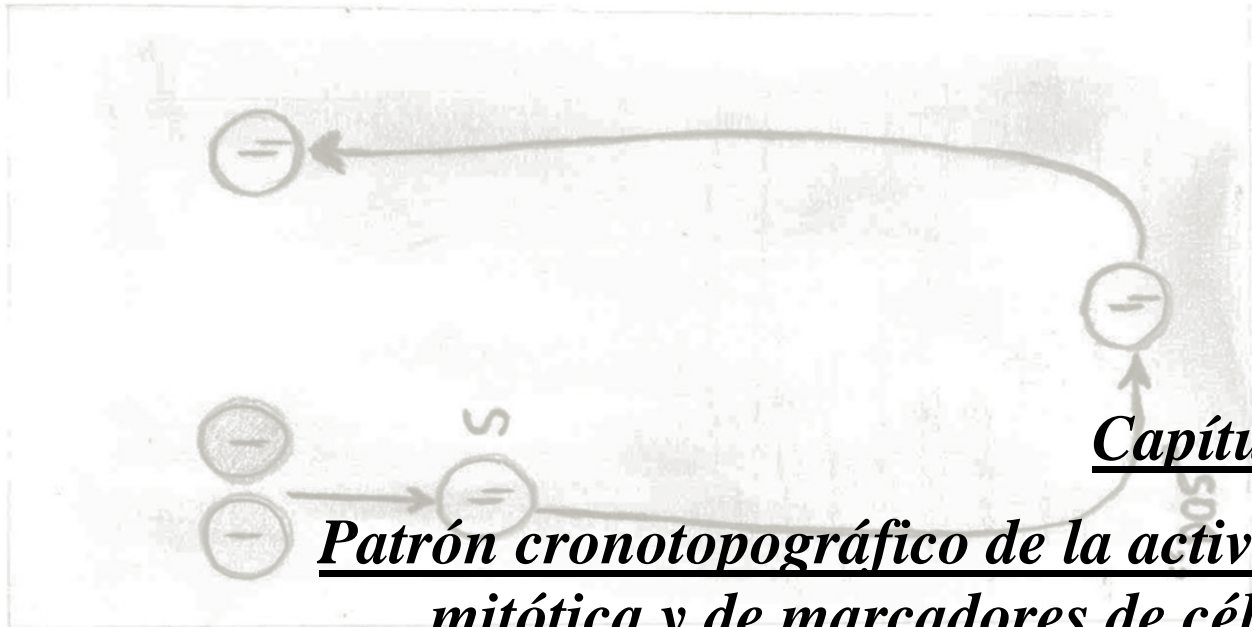
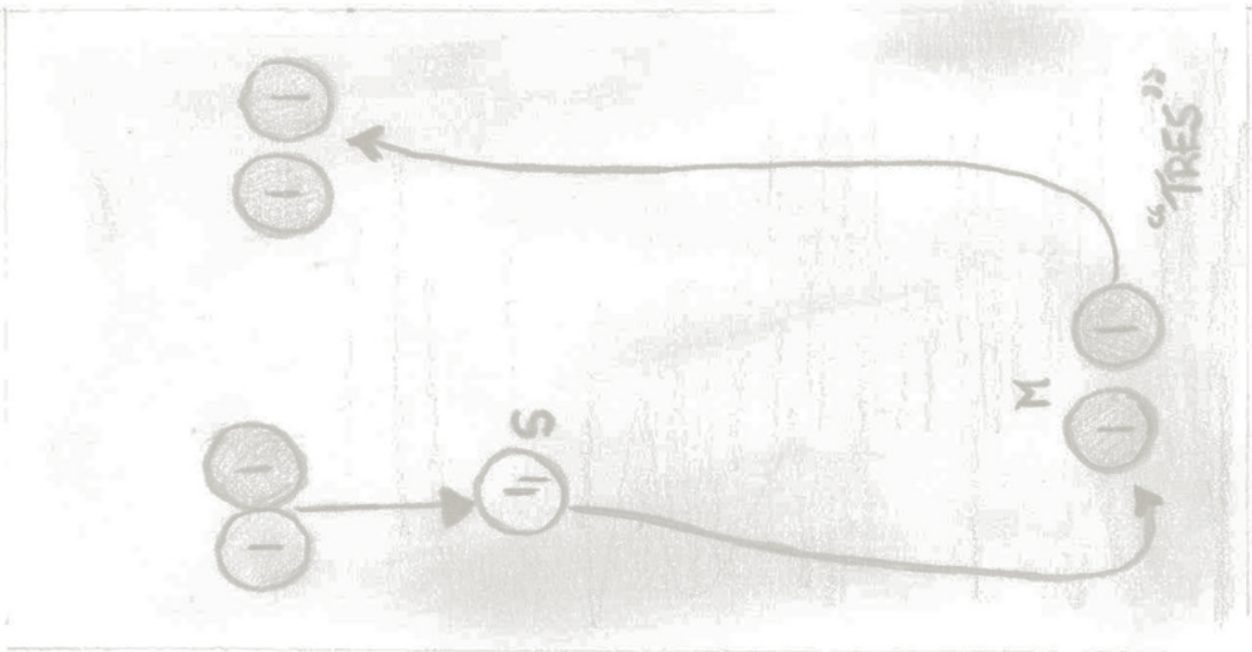
- de Almeida HM, Sousa RP, Bezerra DO, Olivindo RF, das Neves Diniz A, de Oliveira SC, Feitosa ML, de Moura Fortes EA, Ferraz MS, de Carvalho YK, de Menezes DJ, de Carvalho MA (2015) Greater rhea (*Rhea americana*) external morphology at different stages of embryonic and fetal development. *Anim Reprod Sci* 162:43-51. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.09.007
- de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J (2019) Senescence-Associated beta-Galactosidase (SA-beta-GAL) Activity in the Developing Avian Retina. *Dev Dyn*. doi:10.1002/dvdy.74
- Dewulf V, Bottjer SW (2005) Neurogenesis within the juvenile zebra finch telencephalic ventricular zone: a map of proliferative activity. *J Comp Neurol* 481 (1):70-83. doi:10.1002/cne.20352
- Diao L, Sun W, Deng Q, He S (2004) Development of the mouse retina: emerging morphological diversity of the ganglion cells. *J Neurobiol* 61 (2):236-249. doi:10.1002/neu.20041
- Drenhaus U, Morino P, Veh RW (2003) On the development of the stratification of the inner plexiform layer in the chick retina. *J Comp Neurol* 460 (1):1-12
- Drenhaus U, Voigt T, Rager G (2007) Onset of synaptogenesis in the plexiform layers of the chick retina: a transmission electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 70 (4):329-335. doi:10.1002/jemt.20414
- Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G (2003) Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* 34 (1):53-58
- Edqvist PH, Hallböök F (2004) Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131 (6):1343-1351. doi:10.1242/dev.01018
- Edqvist PH, Myers SM, Hallböök F (2006) Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10. *Eur J Histochem* 50 (2):147-154
- Ellis JH, Richards DE, Rogers JH (1991) Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell Tissue Res* 264 (2):197-208
- Elshatory Y, Deng M, Xie X, Gan L (2007) Expression of the LIM-homeodomain protein Isl1 in the developing and mature mouse retina. *J Comp Neurol* 503 (1):182-197. doi:10.1002/cne.21390
- Espanel X, Kastner A, Stettler O, Tavitian B, Brun G, Gillet G (1997) p34(cdc2) and mitotic cyclin expression in the developing quail neuroretina. *International Journal of Developmental Biology* 41 (3):469-476
- Evans B, Browman H Variation in the development of the fish retina. In: *Development of form and function in fishes and the question of larval adaptation*, Bergen, Norway, 2004. AMERICAN FISHERIES SOCIETY SYMPOSIUM. pp 145-166
- Ferreiro-Galve S, Rodríguez-Moldes I, Anadon R, Candal E (2010) Patterns of cell proliferation and rod photoreceptor differentiation in shark retinas. *J Chem Neuroanat* 39 (1):1-14. doi:10.1016/j.jchemneu.2009.10.001
- Fischer AJ, Foster S, Scott MA, Sherwood P (2008) Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina. *J Comp Neurol* 506 (4):584-603. doi:10.1002/cne.21578
- Fischer AJ, Reh TA (2000) Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Developmental biology* 220 (2):197-210
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2006) Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res* 1103 (1):32-48. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.052
- Francisco-Morcillo J, Sánchez-Calderon H, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2005) Expression of Fgf19 in the developing chick eye. *Brain Res Dev Brain Res* 156 (1):104-109. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.12.011
- Ghai K, Stanke JJ, Fischer AJ (2008) Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain research* 1192:76-89
- Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, Dellelt M, Archer DB, Cogliati T (2009) Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol Vis* 15:1915-1928
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88 (1):49-92
- Harahush BK, Hart NS, Green K, Collin SP (2009) Retinal neurogenesis and ontogenetic changes in the visual system of the brown banded bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum* (Hemiscyllidae, Elasmobranchii). *J Comp Neurol* 513 (1):83-97. doi:10.1002/cne.21953
- Hendrickson A, Yan YH, Erickson A, Possin D, Pow D (2007) Expression patterns of calretinin, calbindin and parvalbumin and their colocalization in neurons during development of Macaca monkey retina. *Exp Eye Res* 85 (5):587-601. doi:10.1016/j.exer.2007.07.011

- Kahn AJ (1973) Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res* 63:285-290
- Koppl C, Futterer E, Nieder B, Sistermann R, Wagner H (2005) Embryonic and posthatching development of the barn owl (*Tyto alba*): reference data for age determination. *Dev Dyn* 233 (4):1248-1260. doi:10.1002/dvdy.20394
- Kubota R, Hokoc J, Moshiri A, McGuire C, Reh T (2002) A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Developmental brain research* 134 (1-2):31-41
- Laessing U, Stuermer CAO (1996) Spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation revealed by the expression of neurodin in embryonic zebrafish. *Journal of Neurobiology* 29 (1):65-74
- Lee E-S, Kim T-J, Jeon C-J (2013) Identification of parvalbumin-containing retinal ganglion cells in rabbit. *Experimental eye research* 110:113-124
- Lilja C, Blom J, Marks HL (2001) A comparative study of embryonic development of Japanese quail selected for different patterns of postnatal growth. *Zoology* 104 (2):115-122
- Lillo C, Velasco A, Jimeno D, Cid E, Lara JM, Aijon J (2002) The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem* 50 (10):1289-1302
- Linser P, Moscona AA (1979) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (12):6476-6480
- Loeliger M, Rees S (2005) Immunocytochemical development of the guinea pig retina. *Exp Eye Res* 80 (1):9-21. doi:10.1016/j.exer.2004.08.003
- Mack AF, Germer A, Janke C, Reichenbach A (1998) Müller (glial) cells in the teleost retina: consequences of continuous growth. *Glia* 22:306-313
- Matín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J (1998) Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22 (1):31-52
- Matín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J (1999) Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol (Berl)* 200 (3):289-300
- Marín-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, Almendros A, Navascués J (1999) Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia* 27:226-238
- Matín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J (1999) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412 (2):255-275
- Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2015) The role of Islet-1 in cell specification, differentiation, and maintenance of phenotypes in the vertebrate neural retina. *Neural regeneration research* 10 (12):1951-1952. doi:10.4103/1673-5374.165301
- McCabe KL, Gunther EC, Reh TA (1999) The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* 126 (24):5713-5724
- Moorman S, Mello CV, Bolhuis JJ (2011) From songs to synapses: Molecular mechanisms of birdsong memory: Molecular mechanisms of auditory learning in songbirds involve immediate early genes, including *zenk* and *arc*, the ERK/MAPK pathway and synapsins. *Bioessays* 33 (5):377-385
- Murray JR, Varian-Ramos CW, Welch ZS, Saha MS (2013) Embryological staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *J Morphol* 274 (10):1090-1110. doi:10.1002/jmor.20165
- Nag TC, Wadhwa S (2007) Morphological and neurochemical development of the human neural retina. *Neuroembryology and Aging* 4:19-30
- Nice MM (1962) Development of behavior in precocial birds. In, vol 8. *Trans Linn Soc N.Y.*, pp 1-211
- Okada M, Erickson A, Hendrickson A (1994) Light and electron microscopic analysis of synaptic development in Macaca monkey retina as detected by immunocytochemical labeling for the synaptic vesicle protein, SV2. *J Comp Neurol* 339 (4):535-558. doi:10.1002/cne.903390406
- Olea GB, Hernando AB, Lombardo DM (2016) Heterochronic events in the ontogeny of *Columba livia*, *Coturnix coturnix*, and *Gallus gallus domesticus*. *Rev Colomb Cienc Pecu* 29:274-282
- Olea GB, Sandoval MT (2012) Embryonic development of *Columba livia* (Aves: Columbiformes) from an altricial-precocial perspective. *Rev Colomb Cienc Pecu* 25:3-13
- Pavón-Muñoz T, Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2016) Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* 88 (2):492-507. doi:10.1111/jfb.12802
- Pérez de Sevilla Müller L, Azar SS, de los Santos J, Brecha NC (2017) Prox1 is a marker for All amacrine cells in the mouse retina. *Frontiers in neuroanatomy* 11:39
- Peterson RE, Fadool JM, McClintock J, Linser PJ (2001) Müller cell differentiation in the zebrafish neural retina: evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J Comp Neurol* 429 (4):530-540



- Porciatti V, Bagnoli P, Lanfranchi A, Bedini C (1985) Interaction between photoreceptors and pigment epithelium in developing pigeon retina: an electrophysiological and ultrastructural study. *Doc Ophthalmol* 60 (4):413-419
- Prada C, Puga J, Pérez-Méndez L, López, Ramírez G (1991) Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* 3 (11):1187
- Prada FA, Quesada A, Dorado ME, Chmielewski C, Prada C (1998) Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia* 22 (3):221-236
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474 (2):304-324. doi:10.1002/cne.20134
- Reese BE, Johnson PT, Baker GE (1996) Maturation gradients in the retina of the ferret. *J Comp Neurol* 375 (2):252-273. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<AID-CNE6>3.0.CO;2-1
- Robinson SR, Rapaport DH, Stone J (1985) Cell division in the developing cat retina occurs in two zones. *Brain Res* 351 (1):101-109
- Rojas LM, Mitchell MA, Ramírez YM, Mcneil R (2007) Comparative analysis of retina structure and photopic electroretinograms in developing altricial pigeons (*Columba livia*) and precocial japanese quails (*Coturnix japonica japonica*). *Ornitologia neotropical* 18:503-518
- Sakagami K, Ishii A, Shimada N, Yasuda K (2003) RaxL regulates chick ganglion cell development. *Mech Dev* 120 (8):881-895
- Sánchez-Farías N, Candal E (2016) Identification of Radial Glia Progenitors in the Developing and Adult Retina of Sharks. *Front Neuroanat* 10:65. doi:10.3389/fnana.2016.00065
- Sánchez-López A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Matín-Teva JL, Navascués J (2004) Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46 (3):261-273
- Sánchez-López AM, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Matín-Teva JL, Navascués J (2005) Activation of immature microglia in response to stab wound in embryonic quail retina. *J Comp Neurol* 492 (1):20-33. doi:10.1002/cne.20676
- Sanna PP, Keyser KT, Deerink TJ, Ellisman MH, Karten HJ, Bloom FE (1992) Distribution and ontogeny of parvalbumin immunoreactivity in the chicken retina. *Neuroscience* 47 (3):745-751
- Sharma RK, Ehinger B (1997) Mitosis in developing rabbit retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 64 (1):97-106. doi:10.1006/exer.1996.0189
- Sharma RK, Netland PA (2007) Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res* 1176:11-17. doi:S0006-8993(07)01637-X [pii] 10.1016/j.brainres.2007.07.090
- Snow RL, Robson JA (1994) Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience* 58 (2):399-409
- Stark JM, Ricklefs RE (1998) Avian growth and development. In. Oxford University Press, New York, pp 3-30
- Stone J, Egan M, Rapaport DH (1985) The site of commencement of retinal maturation in the rabbit. *Vision Res* 25 (3):309-317
- Striedter GF, Charvet CJ (2008) Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virginianus*). *J Comp Neurol* 507 (5):1663-1675. doi:10.1002/cne.21640
- Thummel R, Kassen SC, Enright JM, Nelson CM, Montgomery JE, Hyde DR (2008) Characterization of Müller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp Eye Res* 87 (5):433-444
- Todd L, Suarez L, Squires N, Zelinka CP, Gribbins K, Fischer AJ (2016) Comparative analysis of glucagonergic cells, glia, and the circumferential marginal zone in the reptilian retina. *J Comp Neurol* 524 (1):74-89. doi:10.1002/cne.23823
- Toy J, Norton JS, Jibodh SR, Adler R (2002) Effects of homeobox genes on the differentiation of photoreceptor and nonphotoreceptor neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (11):3522-3529
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Copp A, Mishkin M (2005) FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nature Reviews Neuroscience* 6 (2):131-138
- Vecino E, García-Briñón J, Velasco A, Caminos E, Lara J (1993) Calbindin D-28K distribution in the retina of the developing trout (*Salmo fario* L.). *Neurosci Lett* 152:291-295
- Vergara MN, Canto-Soler MV (2012) Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev* 7:22. doi:10.1186/1749-8104-7-22
- Yamagata K, Goto K, Kuo C-H, Kondo H, Miki N (1990) Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 4 (3):469-476

- YAMASAKI M, TONOSAKI A (1988) Developmental Stages of the Society Finch, *Lonchura striata* var. *dornestica*. (society finch/developmental stages/morphogenesis/laboratory animal). *Development, growth & differentiation* 30 (5):515-542
- Yi C-W, Yu S-H, Lee E-S, Lee J-G, Jeon C-J (2012) Types of parvalbumin-containing retinotectal ganglion cells in mouse. *Acta histochemica et cytochemica*:11061
- Yoshii C, Ueda Y, Okamoto M, Araki M (2007) Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. *Dev Biol* 303 (1):45-56
- Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212 (2):199-205. doi:10.1002/ar.1092120215
10.1002/ar.1092120215



Capítulo 2

Patrón cronotopográfico de la actividad mitótica y de marcadores de células horizontales en la retina de aves altriciales y precociales

BASAL

Resumen



La actividad proliferativa en la retina de vertebrados es intensa durante el proceso de retinogénesis y varía en su distribución a medida que avanza el desarrollo embrionario. Estas mitosis se distribuyen principalmente en dos regiones. Por un lado, la mayor parte de la actividad mitótica se detecta en la superficie externa o escleral de la retina, lugar donde se dividen simétrica o asimétricamente los núcleos de células neuroepiteliales. De esta forma aumenta el número de células neuroepiteliales en estadios iniciales del desarrollo y, además, se generan los neuroblastos que se diferenciarán a la mayor parte de los tipos celulares que encontramos en la retina adulta. Estas son las denominadas mitosis apicales o ventriculares. Por otro lado, existe una población de precursores indiferenciados que se divide en regiones más internas de la retina y que va a generar principalmente células horizontales. Los precursores migratorios generados se desplazan vítreo-escleralmente hasta alcanzar su emplazamiento definitivo en regiones externas de la retina. Esta segunda población se conoce como mitosis no-apicales, extraventriculares o ectópicas y se han descrito en todas las retinas de vertebrados estudiadas. Se ha comprobado que la retina de aves, debido a su lento desarrollo y a su notable tamaño, constituye un modelo ideal para el estudio de estas mitosis no apicales. Además, el seguimiento del patrón espaciotemporal de la actividad mitótica es un fiel reflejo del proceso de diferenciación celular.

En el capítulo 2 nos propusimos describir el patrón de distribución de la actividad mitótica a lo largo del desarrollo de la retina de *T. guttata* (ave altricial) y *C. coturnix* (ave precocial) mediante el uso de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, intentando relacionar dicha actividad mitótica con el proceso de diferenciación de células horizontales. Así mismo, comparamos los resultados obtenidos con los descritos para *G. gallus*. Los resultados obtenidos muestran que la aparición de mitosis pHisH3-positivas no apicales se produce en estadios más tempranos en la codorniz que en el diamante cebra de Tímor y que en ambas especies, su localización progresa de regiones dorsales a ventrales. La actividad proliferativa continúa presente en la retina de *T. guttata* incluso en estadios perinatales. En el caso de la codorniz, la actividad proliferativa se detiene en E10, cuando la retina presenta un aspecto maduro. El uso de técnicas inmunohistoquímicas específicas para la detección de células horizontales, ha permitido poner de manifiesto en ambas especies que la aparición de mitosis no apicales está ligada al inicio de la expresión de precursores de células horizontales identificados con los marcadores Prox1 e Isl1. Por tanto, estos resultados muestran que la retina de aves altriciales y precociales constituye un modelo de enorme utilidad para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de células horizontales, y que este proceso en aves altriciales puede detectarse incluso en individuos recién eclosionados.

Introducción



La retina de vertebrados, como se ha comentado con anterioridad, se diferencia a partir de un tejido formado por células neuroepiteliales indiferenciadas que, en un principio, proliferan de forma simétrica, para más tarde comenzar a dividirse de forma asimétrica, generando neuroblastos migratorios, precursores de la mayor parte de las células que encontramos en la retina madura (ver introducción general). El ciclo celular de estas células está vinculado al movimiento, acompasado al ciclo celular, del núcleo dentro de la célula, que se desplaza en el eje radial de la retina en ambos sentidos. Así, cuando el núcleo está próximo a la superficie escleral, es decir, en la parte apical (ventricular) de la célula, ésta entra en mitosis (ver introducción general). A medida que el proceso de retinogénesis se va completando y se van estableciendo los diferentes tipos celulares de la retina, esta actividad mitótica cesa y es un fiel reflejo de que el proceso de diferenciación celular ha finalizado (Bejarano-Escobar et al., 2012). Por tanto, durante el desarrollo retiniano de vertebrados, la mayor parte de las figuras mitóticas presentes en el tejido se sitúan en la superficie escleral.

Sin embargo, Johns (1982) describió en la retina de la carpa dorada una actividad mitótica localizada en regiones vítreas de la retina de la carpa dorada. Tras esa actividad mitótica, se demostró que se generaban fotorreceptores que se integraban en la CNE en estados larvarios de la vida del animal y, con menor incidencia, en la retina adulta del mismo. Años más tarde, diferentes estudios han demostrado que esa actividad mitótica es recurrente en la retina de peces y corresponde a células de Müller que tienen capacidad mitótica y que pueden generar bastones durante toda la vida del animal (Julian et al., 1998; Raymond et al., 2006; Bernardos et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2014; Álvarez-Hernán et al., 2018-libro). Sin embargo, más recientemente, en la retina del pez cebra, se ha demostrado que algunas divisiones mitóticas tienen lugar en precursores postmitóticos que expresan marcadores típicos de células horizontales antes de esa última división (Godinho et al., 2007; Weber et al., 2014). Divisiones similares a las descritas en el pez cebra también se han descrito en condriactos (Bejarano-Escobar et al., 2012). A estas divisiones, debido a su localización anómala, se les denomina divisiones ectópicas, no apicales, o extra-ventriculares.

En lo que respecta a la retina de mamíferos, Rapaport et al. (1984, 1985) definieron, además de la zona ventricular con abundante actividad mitótica en la retina de gato, una región sub-ventricular con mitosis mucho menos numerosas en la CNI. También se encontró actividad mitótica en el EFO de la retina de conejo, persistente hasta 4 semanas después del nacimiento y que se atribuyó a divisiones que sufrían los astrocitos presentes

en esa capa (Schnitzer 1988, 1990). Estos resultados en la retina de conejo fueron corroborados años más tarde mediante inmunohistoquímica por Sharma y Ehinger (1997), detectando proliferación en células que morfológicamente era posible identificar como células de Müller. Por tanto, las divisiones mitóticas que ocurren durante el desarrollo de la retina de mamíferos pueden estar vinculadas a mitosis de células de Müller o de otros tipos celulares accesorios.

Más recientemente, también se ha descrito la existencia de una notable cantidad de mitosis no apicales durante el desarrollo embrionario de la retina de aves (Edqvist y Hallböök, 2004; Edqvist et al., 2008; Boije et al., 2009; 2016; Shirazi-Fard et al., 2013; 2014). En este modelo se demostró que los precursores de células horizontales siguen un modelo de migración bidireccional (Edqvist y Hallböök, 2004). Así, estos precursores viajan hasta regiones basales (vítreas) en un estado semi-diferenciado, se detienen y sufren mitosis no apicales que generan precursores neuronales que viajan de nuevo en sentido vítreo-escleral hasta alcanzar su destino definitivo en el tejido retiniano (Boije et al., 2009). Estos estudios han podido determinar que estos neuroblastos generan los diferentes subtipos de células horizontales que existen y que éstos pueden ser identificados dependiendo de los factores de transcripción que expresen. Así, se ha comprobado que Pax6 y Prox1 se expresan en todas las células horizontales, mientras que Lhx1 (Lim1) e Isl1 se expresan en dos poblaciones de células horizontales diferentes sin llegar a co- expresar (Edqvist et al., 2006; 2008; Fischer et al., 2007). Así, las células horizontales *axon bearing* (*brush-shaped*) expresan Lhx1 o el factor de crecimiento fibroblástico 19 (Fgf19) (Francisco-Morcillo et al., 2005; Okamoto et al., 2009), al igual que calretinina (CR). En cambio, las células horizontales *axon-less* no expresan estos marcadores, pero sí Isl1 (Edqvist et al., 2008). Dentro del subtipo *axon-less* podemos destacar entre H2 (*stellate*) y H3 (*candelabrum*) dependiendo de su expresión de GABA y del receptor tirosín-kinasa del factor de crecimiento nervioso (NGF) TrkA, respectivamente (Karlsson et al., 1998; Edqvist y Hallböök, 2004; Boije et al., 2008) (Fig. 43).

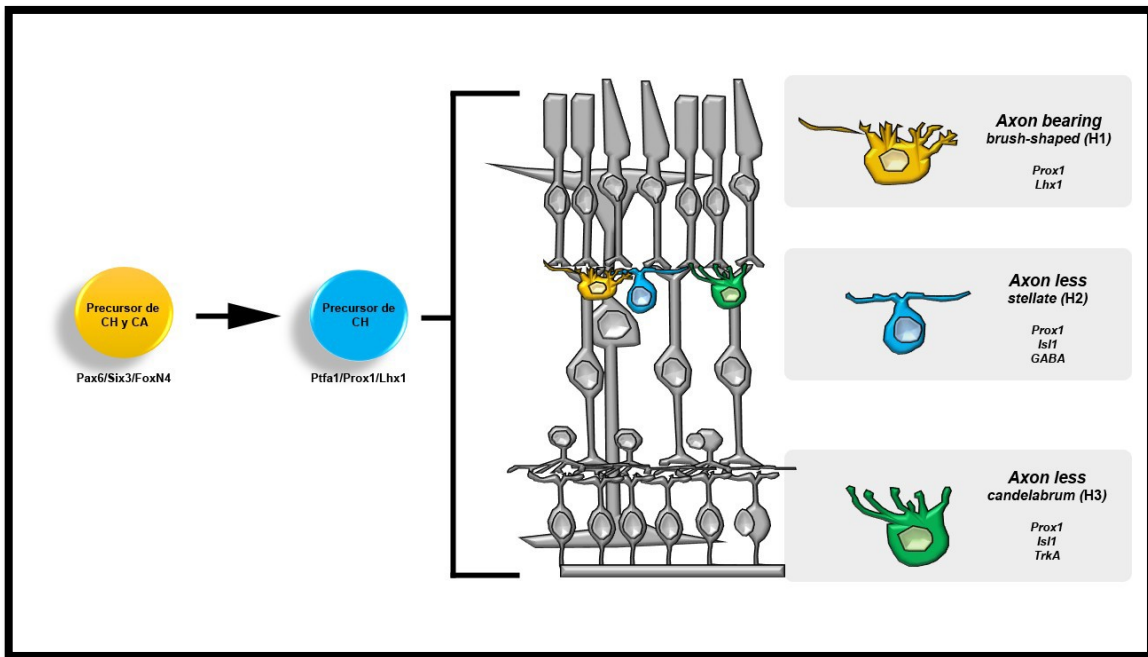


Figura 43. Subpoblaciones de células horizontales y factores de transcripción implicados en su diferenciación.

Por tanto, estudios en los que se combinen marcadores de actividad mitótica con marcadores de diferenciación de células horizontales pueden dar una idea aproximada del patrón de diferenciación de las células horizontales en la retina de vertebrados.

Durante el análisis del proceso de diferenciación celular en la retina de la especie altricial *T. guttata* (capítulo 1 de esta tesis doctoral, Figs. 17-32) y de la especie precocial *C. coturnix* (capítulo 1 de esta tesis doctoral, Figs. 33-42) hemos observado la presencia de abundantes mitosis apicales y no apicales.

Objetivos



1. Describir cualitativamente el patrón cronotopográfico de la actividad mitótica en la retina de una especie de ave altricial y otra precocial mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, utilizando marcadores de proliferación y marcadores tempranos de diferenciación.
2. Establecer un paralelismo entre la actividad mitótica detectada en regiones no apicales y la aparición de marcadores de diferenciación de células horizontales.
3. Describir cuantitativamente la actividad mitótica en la retina en desarrollo de ambas especies en términos de densidad.
4. Comparar los resultados obtenidos con los descritos otras aves y en el resto de vertebrados.

Materiales y Métodos



1. Material de estudio

En el presente estudio se han utilizado individuos en estadios embrionarios de la especie altricial *Taeniopygia guttata* y *Coturnix coturnix*. Los individuos fueron procesados de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y del gobierno de España (Real decreto 53/2013). El uso de los embriones de estas especies para la experimentación en la presente tesis ha sido aprobado por el Comité de Bioética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (Anexo del capítulo 1).

El número de individuos utilizado en el presente capítulo queda recogido en las tablas 3 y 4 (ver materiales y métodos, capítulo 1).

Tras su fijación, los individuos fueron observados en un microscopio estereoscópico SMZ-1000 (Nikon) y las imágenes se adquirieron con una cámara digital DS-5Mc (Nikon) que luego fueron procesadas con el programa Adobe PhotoShop CS4.

2. Procesamiento de los especímenes

Tanto el proceso de fijación como de congelación, inclusión en resina y obtención de secciones se llevaron a cabo siguiendo los mismos pasos que en el estudio de diferenciación (ver capítulo 1).

2.1. Tinción de secciones semifinas

Para determinar la presencia de mitosis mediante técnicas histológicas, las secciones semifinas fueron teñidas con una solución acuosa de azul de toluidina siguiendo el procedimiento que se describió en el capítulo 1 (ver materiales y métodos del capítulo 1).

2.2. Técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones

Para la determinación de la presencia de actividad mitótica en la región interna de la retina y la génesis de las células horizontales se ha utilizado la técnica de inmunofluorescencia simple descrita previamente en el capítulo 1. Los anticuerpos utilizados en el presente capítulo quedan recogidos en la tabla 5 (ver materiales y métodos, capítulo 1).



3. Observación de las secciones

La observación de las secciones semifinas teñidas con azul de toluidina y de las crio secciones sometidas a las técnicas de inmunofluorescencia se realizó en un fotomicroscopio Nikon Eclipse 80i, obteniendo las imágenes digitales con una cámara Nikon digital camera DXM1200F acoplada al mismo. Las imágenes fueron optimizadas con el software Adobe PhotoShop (versión CS4).

4. Cuantificación de la densidad mitosis

Para realizar la cuantificación de mitosis no apicales y apicales en las retinas de ambas especies se siguió el mismo proceso en todos los estadios. Se utilizó un aumento de 20x y se distinguió entre la región dorsal (D) y la ventral (V) debido a que la primera presenta un desarrollo más avanzado que la última (Francisco-Morcillo et al., 2005). Estas regiones a su vez se subdividieron en zonas enumeradas desde la más central de la retina (cercana a la salida del nervio óptico) a la más periférica (cercana al cristalino). Para que la representación fuese lo más simple posible se establecieron tres regiones, la central (c), la centro-periférica (cp) y la periférica (p) en cada estadio tanto para *T. guttata* como para *C. coturnix*.

El programa informático ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) nos permitió determinar la densidad de células mitóticas en las secciones de retina. Para el cálculo de la media de densidades en los diferentes estadios de desarrollo y el análisis estadístico se empleó el programa Excel. Los gráficos se obtuvieron mediante la utilización del programa R.

Resultados



En el presente capítulo se describe un estudio cualitativo y cuantitativo del patrón cronotopográfico de la actividad mitótica durante el desarrollo retiniano de dos especies de aves, una altricial (*T. guttata*) y otra precocial (*C. coturnix*). En dicho análisis se hace especial hincapié en la localización de mitosis no apicales (extra-ventriculares) implicadas en la génesis de células horizontales. Para ello hemos utilizado técnicas de histología básica, principalmente secciones semi-finas teñidas con azul de toluidina, y técnicas inmunohistoquímicas sobre criosecciones, utilizando anticuerpos que nos han permitido localizar la actividad mitótica y el proceso de diferenciación de las células horizontales. Estos anticuerpos han sido el anti-pHisH3 para la detección de células en fase M, anti-Prox1, que identifica toda la población de células horizontales, y anti-Isl1, que identifica una sub-población de las mismas. Como se ha comentado en materiales y métodos, para demostrar la progresión de la actividad mitótica, hemos dividido la retina en región D y V teniendo como referencia el nervio óptico, y estas dos mitades, a su vez, han sido divididas en regiones c, cp y p.

1. Análisis cualitativo de la actividad mitótica y de la génesis de células horizontales en la retina en desarrollo de *T. guttata*

Las primeras mitosis no apicales en la retina de esta especie altricial de ave son detectadas en E6 (Est30, según Murray et al., 2013) (Fig. 44). En este estadio, la retina está formada por una CNb con abundantes mitosis apicales en toda la superficie escleral del tejido retiniano, tal como se aprecia en secciones semi-finas (Fig. 44A-C) y en criosecciones procesadas con técnicas inmunohistoquímicas (Fig. 44D-F). Conviene resaltar que, en estadios previos, se ha iniciado el proceso de diferenciación de las células ganglionares y fotorreceptores, como se describió en el capítulo 1 del presente trabajo. En lo que respecta a las mitosis no apicales, son escasas y se concentran principalmente en la región D (Fig. 44D-E). Todavía no se observan mitosis no apicales en la región V (no mostrado).

En E7,5-8 (Est34) la retina ha incrementado su grosor y diámetro, aunque no muestra signos de estratificación (Fig. 45A). Las mitosis siguen siendo abundantes en la región escleral (Fig. 45B-F) y escasas en la región no apical (Fig. 45B,D-F), estando estas últimas principalmente concentradas en la región Dc (Fig. 45E) y menos abundantes en la Dcp (Fig. 45D, E). Además, en este estadio se observan en algunas secciones mitosis no apicales en la región Vc (no mostrado). El aumento en el número de este tipo de mitosis



en la región Dc coincide cronotopográficamente con el inicio de la inmunorreactividad frente al factor de transcripción Prox1 en la región vítrea de la CNb (Fig. 45G) (ver capítulo 1).

El diámetro de la retina se sigue incrementando en E8-9 (Est39) (Fig. 46A,D) y comienzan a verse las diferentes capas de la retina en la región Dc (Fig. 46A,H). Sin embargo, la región V presenta un retraso en la aparición de dichas capas (Fig. 46A,B,I,J). No obstante, la presencia de mitosis no apicales en dicha región se hace más patente, principalmente en las regiones Vc y Vcp (Fig. 46B-F), aunque en la región periférica ya se aprecian algunas de forma esporádica (no mostrado). La expresión de Prox1 en la región Dc comienza a presentar un patrón diferente, al localizarse este factor de transcripción en somas de células localizados en la capa presuntiva de células horizontales y en la zona más interna de la CNI coincidiendo espacialmente con las mitosis no apicales detectadas (Fig. 46H). Por otro lado, en la región V el patrón de Prox1 refleja un mayor grado de indiferenciación (no mostrado), al igual que la inmunorreactividad frente a Isl1, que se localiza principalmente en células ganglionares localizadas en la región vítrea, en neuroblastos migratorios, y en el núcleo de algunas células horizontales en la región Vc (Fig. 46I). Núcleos de células horizontales Isl1-positivos no se aprecian en la retina Vp (Fig. 46J).

En E10 (Est41) la estructura multilaminar se observa en todas las regiones de la retina (47A,B,D-I), con excepción de las regiones Dp y Vp, donde todavía es visible la CNb (Fig. 47A,C,D,G,J). En este estadio, las mitosis apicales se muestran más espaciadas en las regiones Dc, Dcp y Vc (Fig. 47A,B,D), mientras que en las regiones Dp, Vcp y Vp siguen siendo numerosas (Fig. 47A,C,D,F,G). La expresión de Prox1 muestra un patrón similar al observado en la retina del individuo recién eclosionado (ver Capítulo 1) en las regiones Dc, Dcp y Vc (Fig. 47H), con abundante inmunorreactividad localizada principalmente en la capa de células horizontales, aunque todavía puede verse algún neuroblasto migratorio en regiones más internas (Fig. 47H). Las regiones Vcp y Vp muestran todavía un patrón de expresión de este factor de transcripción similar al observado en estadios más indiferenciados (Fig. 47I,J).

El día previo a la eclosión (E13, Est45) la estratificación de la retina es visible excepto en el anillo de tejido más periférico, donde sigue observándose una CNb (Fig. 48A-C). La progresiva desaparición de las mitosis apicales se hace más patente en las regiones Dc, Dcp y Vc (Fig. 48D,E) y las escasas mitosis no apicales quedan restringidas a la región V (Fig. 48E-G). La presencia de mitosis tanto apicales como no apicales en E13 sugiere



que el proceso de retinogénesis y más concretamente el de génesis de células horizontales debe continuar tras la eclosión, como se describió previamente en el capítulo 1 para el resto de los tipos celulares.

2. Análisis cualitativo de la actividad mitótica y de la génesis de células horizontales en la retina en desarrollo de *C. coturnix*

En E5 (Est27, según Ainsworth et al., 2010) la retina de la codorniz se encuentra formada por una CNb en su totalidad y la inmunorreactividad frente a pHisH3 es intensa y uniforme en región escleral (Fig. 49A). En este estadio, las mitosis no apicales pHisH3-positivas se localizan principalmente en las regiones Dc y Dcp (Fig. 49A,B), siendo muy escasas en la Dp (Fig. 49C). Existe una coincidencia cronotopográfica de la inmunorreactividad frente a pHisH3 y de las inmunorreactividades frente a Prox1 (Fig. 49D) e Isl1 (Fig. 49E). En la región V, las escasas mitosis se situaron en la región Vc (no mostrado).

Con la aparición de la CPI en E6 (Est30, ver capítulo 1) las mitosis apicales siguen siendo abundantes en todas las zonas estudiadas (Fig. 50A-C). La inmunorreactividad frente a pHisH3 en zonas internas de la retina se concentra principalmente en regiones cercanas a la CPI (Fig. 50A). Las mitosis no apicales se concentran principalmente en las regiones Dc y Dcp (Fig. 50A-C) y en menor medida en la Dp (no mostrado). También se detectan por primera vez mitosis no apicales pHisH3-inmunorreactivas en las regiones Vcp y Vp (Fig. 50A). Paralelamente, la inmunorreactividad frente a Prox1 (Fig. 50D) e Isl1 (Fig. 50E) se intensifica en la región donde se sitúan estas mitosis no apicales, aunque ambos factores de transcripción también se detectan en la CCG.

En E7,5-8 (Est34) es posible observar la CPI y la CPE en la mayor parte de la extensión de la retina (Fig. 51A,D,E), así como una gran cantidad de mitosis no apicales (Fig. 51A), estando principalmente distribuidas por toda la región D y en las regiones Vc principalmente (Fig. 51A-C). En cuanto al marcaje con Prox1, en la región Dc se localiza principalmente en la capa de células horizontales, aunque todavía se expresa en núcleos de células distribuidas por regiones más internas de la CNI (Fig. 51D). Por su parte, en esa misma región, Isl1 identifica una subpoblación de células ganglionares y amacrinas. Adicionalmente, su expresión se observa en la capa de células horizontales y en núcleos de células localizadas a diferentes alturas en el espesor de la CNI (Fig. 51E).

En E8-9 (Est36-37), con una retina totalmente estratificada en la mayoría de las



regiones (Fig. 52), las mitosis no apicales no se observan en las regiones Dc (Fig. 52A,B), Dcp, Vc y Vcp, siendo únicamente observables en las regiones Dp y Vp (Fig. 52A,C). Las mitosis apicales son muy escasas en las regiones Dc (Fig. 52A,B) y Vc, aunque todavía son numerosas en las regiones periféricas (Fig. 52A,C). En estos estadios, la expresión de Prox1 en la región Dc se localiza principalmente en núcleos de células horizontales y en subpoblaciones de células amacrinas y ganglionares (Fig. 52D). Por su parte, Isl1 se localiza en subpoblaciones de células ganglionares, amacrinas, bipolares y en una sub-población de células horizontales (Fig. 52E). Ambos factores de transcripción, en la región Dp, donde todavía encontramos una retina no establecida en capas, presentan un patrón de expresión similar al descrito en estadios anteriores (Fig. 52F,G).

A partir de este estadio, las mitosis no apicales desaparecen por completo de la retina (no mostrado), mientras que las apicales quedan progresivamente relegadas a las regiones más periféricas.

El análisis cualitativo de los patrones de marcaje de pHisH3 y de Prox1 e Isl1 en ambas especies muestra unos gradientes centro-periférico y dorso-ventral de diferenciación celular, acorde con lo descrito en el capítulo 1.

3. Análisis cuantitativo de la densidad de mitosis no apicales y mitosis apicales en la retina en desarrollo de *T. guttata* y *C. coturnix*

Con el fin de corroborar los datos cualitativos obtenidos con anterioridad, realizamos un análisis cuantitativo de la evolución, a lo largo del tiempo, de la densidad de mitosis en la retina de *T. guttata* (tablas 7 y 8) y *C. coturnix* (tablas 9 y 10) dividiendo estos datos en densidades de mitosis no apicales (Fig. 53) y apicales (Fig. 54) en las diferentes regiones de retina establecidas.

Lo primero que conviene reseñar es que mientras que en *T. guttata* las primeras mitosis no apicales se detectan en la región D de la retina en E6, siendo su densidad más notable en la región Dcp (Fig. 53B), en *C. coturnix*, ya en E5, dichas mitosis están ampliamente distribuidas por la región D (Fig. 53A) y aparecen por primera vez en la región Vc (Fig. 53A'). Por otra parte, mientras que las mitosis no apicales se siguen detectando en la región ventral de la retina de *T. guttata* en estadios cercanos a la eclosión (E13) (Fig. 53F'), dichas mitosis prácticamente desaparecen en la retina de *C. coturnix* en E10 (Fig. 53E,E').

Estos datos muestran que el inicio de las mitosis no apicales en la retina de la especie precocial está adelantado con respecto a la altricial, mientras que la presencia de estas



mitosis se prolonga más en el tiempo en la especie altricial.

El patrón cronotopográfico de las mitosis no apicales muestran un gradiente dorso-ventral muy acusado en la retina de *T. guttata*, de manera que la detección de éstas se produce en primer lugar en la región D en E6 (Fig. 53B) alcanzando un máximo de densidad en esta región cuando se detectan las primeras mitosis en la región V (E7.5-8; Fig. 53C,I). Por otro lado, cuando la densidad cae a niveles cercanos a cero en la región D (E8-9; Fig. 53D), en la V se observa una elevada densidad de mitosis no-apicales (Fig 53J). Dicho gradiente dorso-ventral también es detectable, aunque no de manera tan patente, en *C. coturnix*. Así, en regiones D cuando la densidad de mitosis es elevada (Fig 53A',B'), en la región V estos niveles son menores (Fig 53G',H').

El análisis de mitosis apicales en *T. guttata* mostró este tipo de mitosis en todas las regiones de la retina hasta estadios cercanos a la eclosión, lo que incide en la idea de una neurogénesis posnatal persistente en estadios perinatales. Por otra parte, se apreció una progresiva desaparición de las mismas a medida que el desarrollo embrionario avanzó, conservando siempre valores de densidad más altos en regiones periféricas tanto en la región D (Fig. 54A) como en la V (Fig. 54B). Los datos obtenidos sugieren en E13 valores superiores de densidad en las regiones Vc, Vcp y Vp que en las regiones Dc, Dcp y Dp, respectivamente, lo que pone de manifiesto un posible gradiente dorso-ventral de desaparición de dichas mitosis.

En lo que respecta a *C. cotturnix*, los valores de densidad se aproximan a 0 en todas las regiones en E10 (Fig. 54C,D), lo que denota una pronta desaparición de la neurogénesis en la retina embrionaria de la codorniz. Conviene reseñar que los valores de las regiones Dp (Fig. 54C) y Vp (Fig. 54D), son significativamente más altos que los encontrados en las regiones Dc y Dcp (Fig. 54C) y en las regiones Vc y Vcp (Fig. 54D) respectivamente, lo que denota un gradiente centro-periférico acusado de desaparición de mitosis apicales en esta especie.

Figuras

Figura 44. Tinción con azul de toluidina e inmunomarcaje con pHisH3 en secciones seminifas de la retina de *T. guttata* en E6. La retina está constituida en este estadio por un neuropitelio (A) en el que se detectan mitosis apicales con el colorante azul de toluidina en la región Dc (puntas de flecha en B, B') y Dp (puntas de flecha en C, C'). Las primeras mitosis no apicales se detectan con el anticuerpo anti-pHisH3 en la región Dcp (doble punta de flecha en E) mientras que en la Cp todavía están ausentes (F). *CNb*, capa neuroblástica; *Dc*, dorso-central; *Dcp*, dorso-centro-periferia; *Dp*, dorso-periferia. Barras de aumento: 150 μ m (A, D); 100 μ m (B, C, E, F); 30 μ m (B', C').

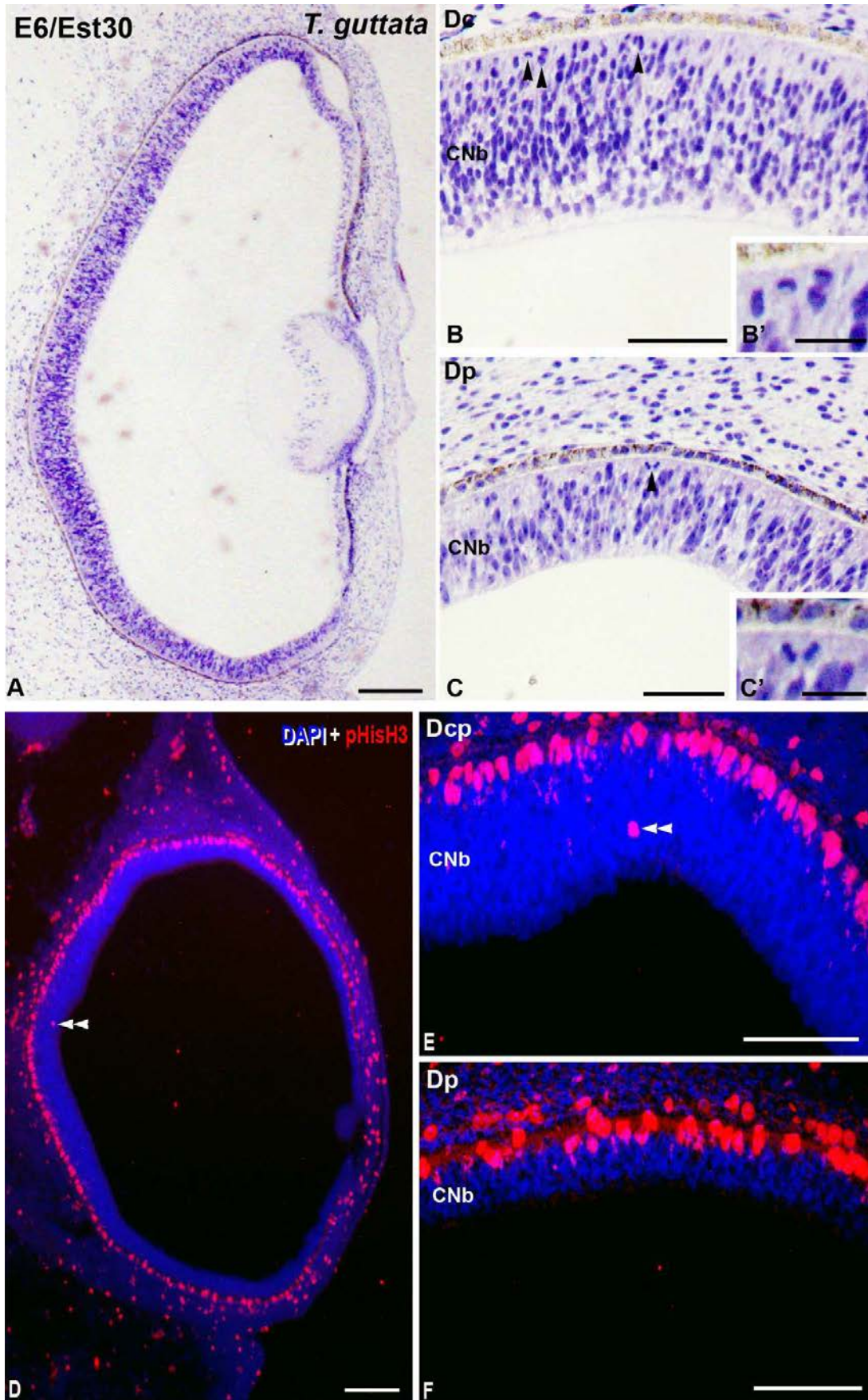


Figura 45. Secciones seminifas de la retina de *T. guttata* en E7.5-8 teñidas con azul de toluidina (A-C, B'-C') e inmunomarcadas con el anticuerpo anti-pHisH3 (D-F) y Prox1 (G). Se detectan las primeras mitosis no apicales en la región Dc en las secciones teñidas (dobles puntas de flecha en B, B') mientras que en la Dp sólo aparecen apicales (C, C'). El número de mitosis no apicales se incrementó en la región Dc (dobles puntas de flecha en D-E) mientras que en el Dcp se mantiene (F). Prox1 se detecta por primera vez en este estadio en las mismas regiones (flechas en G). CNb, capa neuroblástica; Dc, dorso-central; Dcp, dorso-centro-periferia; Dp, dorso-periferia. Barras de aumento: 150 μ m (A, D); 100 μ m (B, C, E, F, G); 30 μ m (B', C').

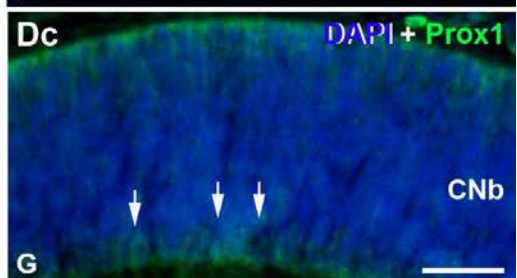
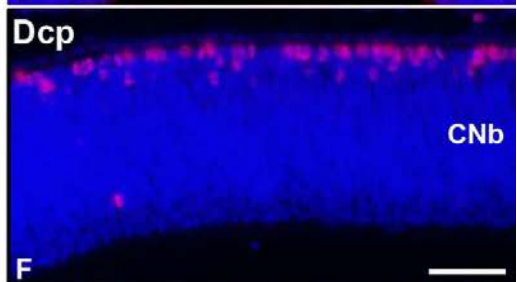
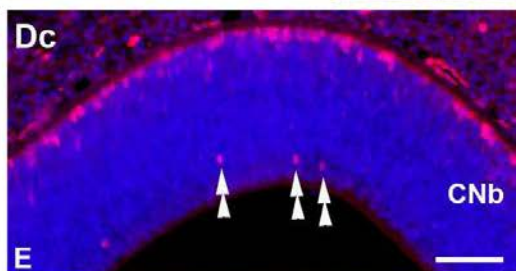
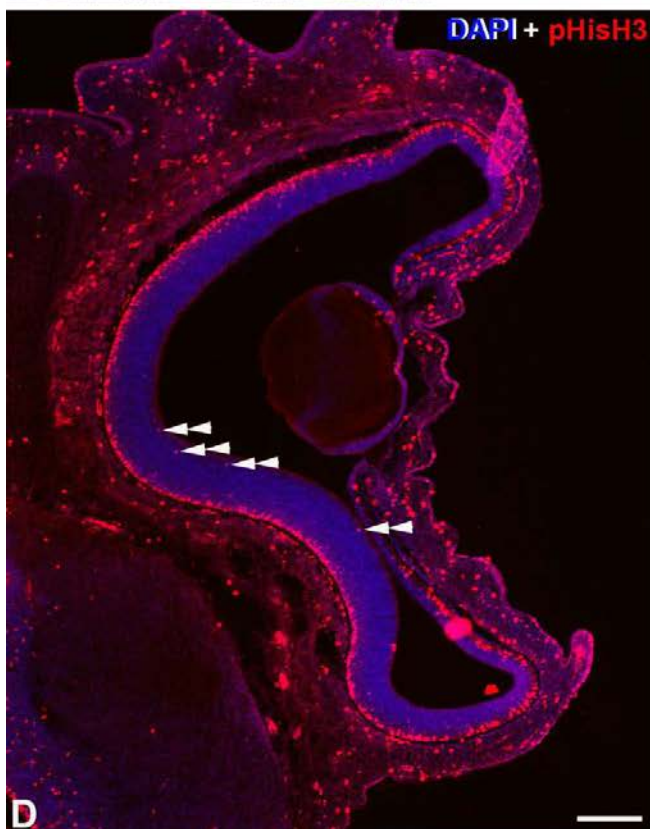
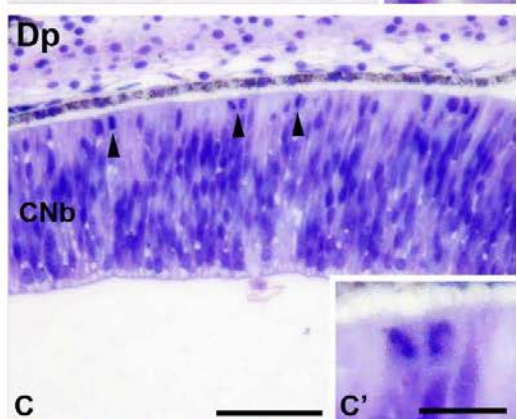
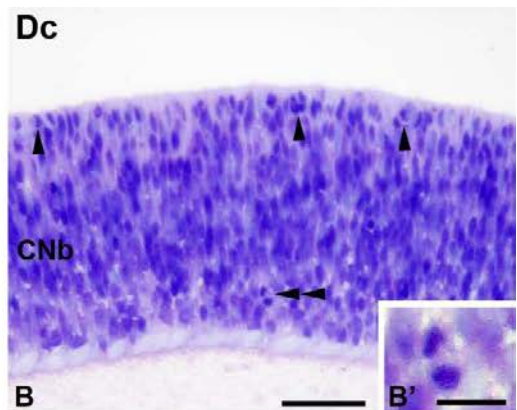
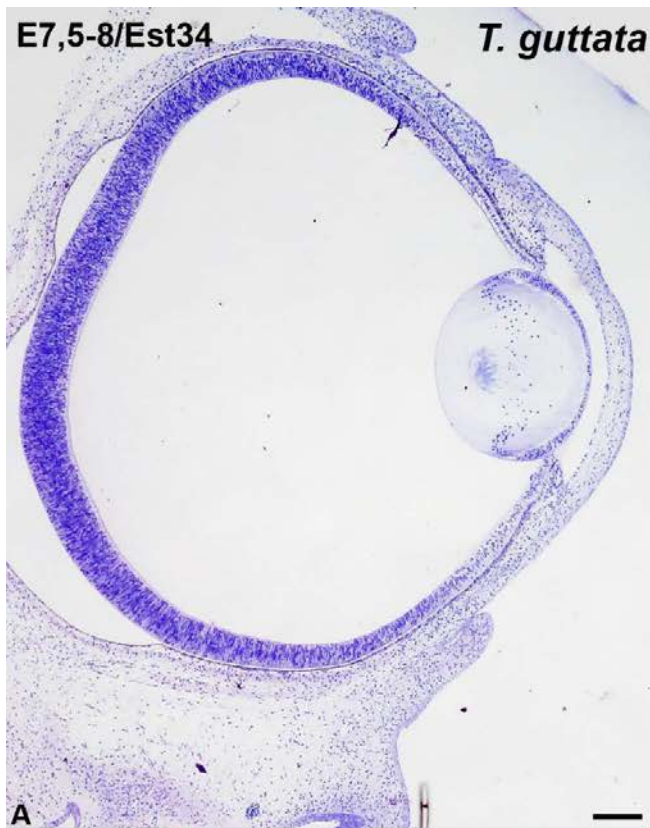


Figura 46. Tinción con azul de toluidina (A-B, B'-C') y detección inmunohistoquímica de pHisH3 (D-G), Prox1 (H) e Isl1 (I-J) en secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en E8-9. Las mitosis no apicales ya se detectan en la región ventral de la retina tanto en las secciones teñidas (dobles puntas de flecha en B) como en las tratadas con técnicas inmunohistoquímicas (dobles puntas de flecha en D-G). La expresión de Prox1 se localiza en la región Dc tanto en la capa de células horizontales presuntiva (puntas de flecha en H) como en la zona de mitosis no apicales (dobles puntas de flechas H) al igual que la de Isl1 en Vc (dobles puntas de flechas en I) mientras que en Vp se ubica en regiones similares a estadios indiferenciados (J). CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CPI, capa plexiforme interna; Dc, dorso-central; Vc, ventro-central; Vcp, ventro-centro-periferia; Vp, ventro-periferia. Barras de aumento: 150 μ m (A, D, E); 100 μ m (B, C, F, G, H, I, J); 30 μ m (B', C').

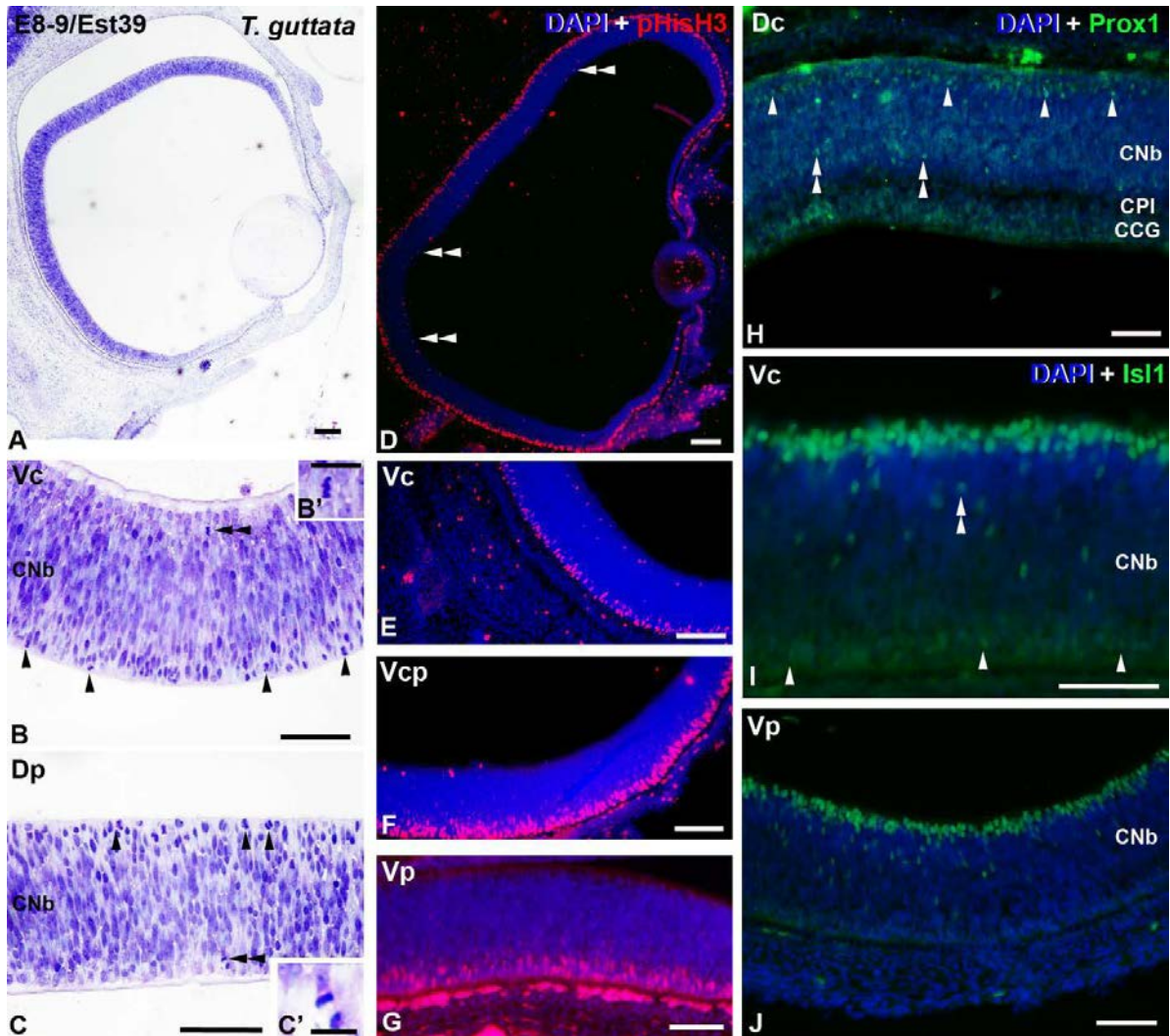


Figura 47. Secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en E10 teñidas con azul de toluidina (A-C) e inmunomarcadas con pHisH3 (D-G) y Prox1 (H-J). El centro de la retina presenta la típica estructura multilaminar (A-B, D) mientras que la periferia todavía presenta un aspecto indiferenciado y con dispersas mitosis no apicales (doble punta de flecha en C-C'). El número de mitosis disminuye en la región Vc (E) y Vcp (F) mientras que en la Vp están ausentes (G). El patrón de Prox1 se localiza tanto en la región Vc como Vcp en la capa de células horizontales presuntivas (puntas de flecha en H-I) y en la zona donde se ubican las mitosis no apicales (dobles puntas de flecha en H-I). En la Vp Prox1 aparece en la capa más interna del neuroepitelio (dobles puntas de flecha en J). CCG, *capa de células ganglionares*; CNE, *capa nuclear externa*; CNI, *capa nuclear interna*; CPE, *capa plexiforme externa*; CPI, *capa plexiforme interna*; Dc, *dorso-central*; Dp, *dorso-periferia*; Vc, *ventro-central*; Vcp, *ventro-centro-periferia*; Vp, *ventro-periferia*. Barras de aumento: 150 μ m (A, D); 100 μ m (B, C, E, F, G, H, I, J); 30 μ m (C').

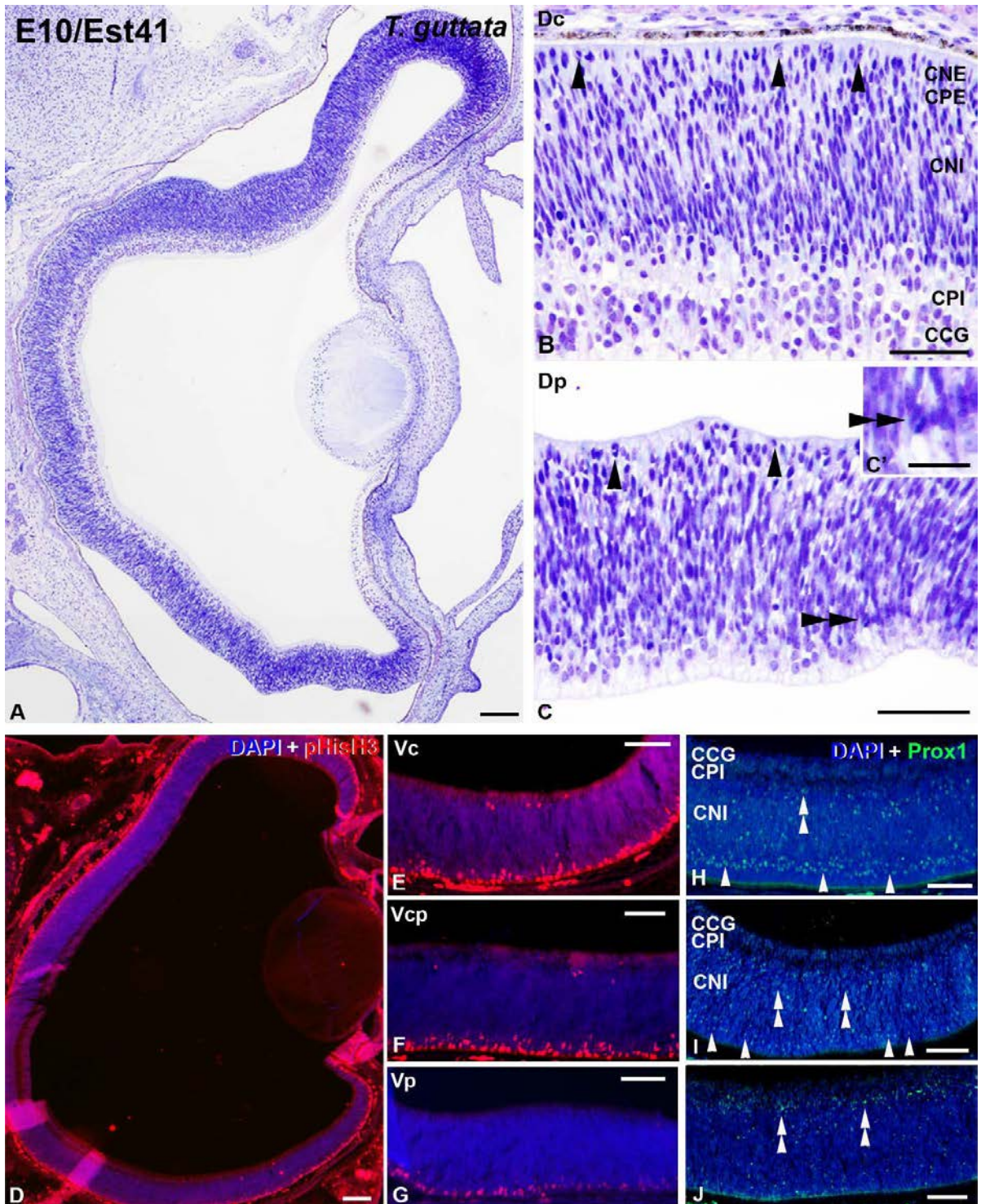


Figura 48. Tinción con azul de toluidina (A-C) y marcaje con pHisH3 (D-G) de secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en E13. La región ventral de la retina no está completamente diferenciada (A). Mitosis dispersas se detectan en la región Vc y en la Vcp (doble punta de flecha en E-F) mientras que en la Vp están ausentes (G). CCG, capa de células ganglionares; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; Dc, dorso-central; Dp, dorso-periferia; Vc, ventro-central; Vcp, ventro-centro-periferia; Vp, ventro-periferia. Barras de aumento: 150 μ m (A, D); 100 μ m (B, C, E, F, G).

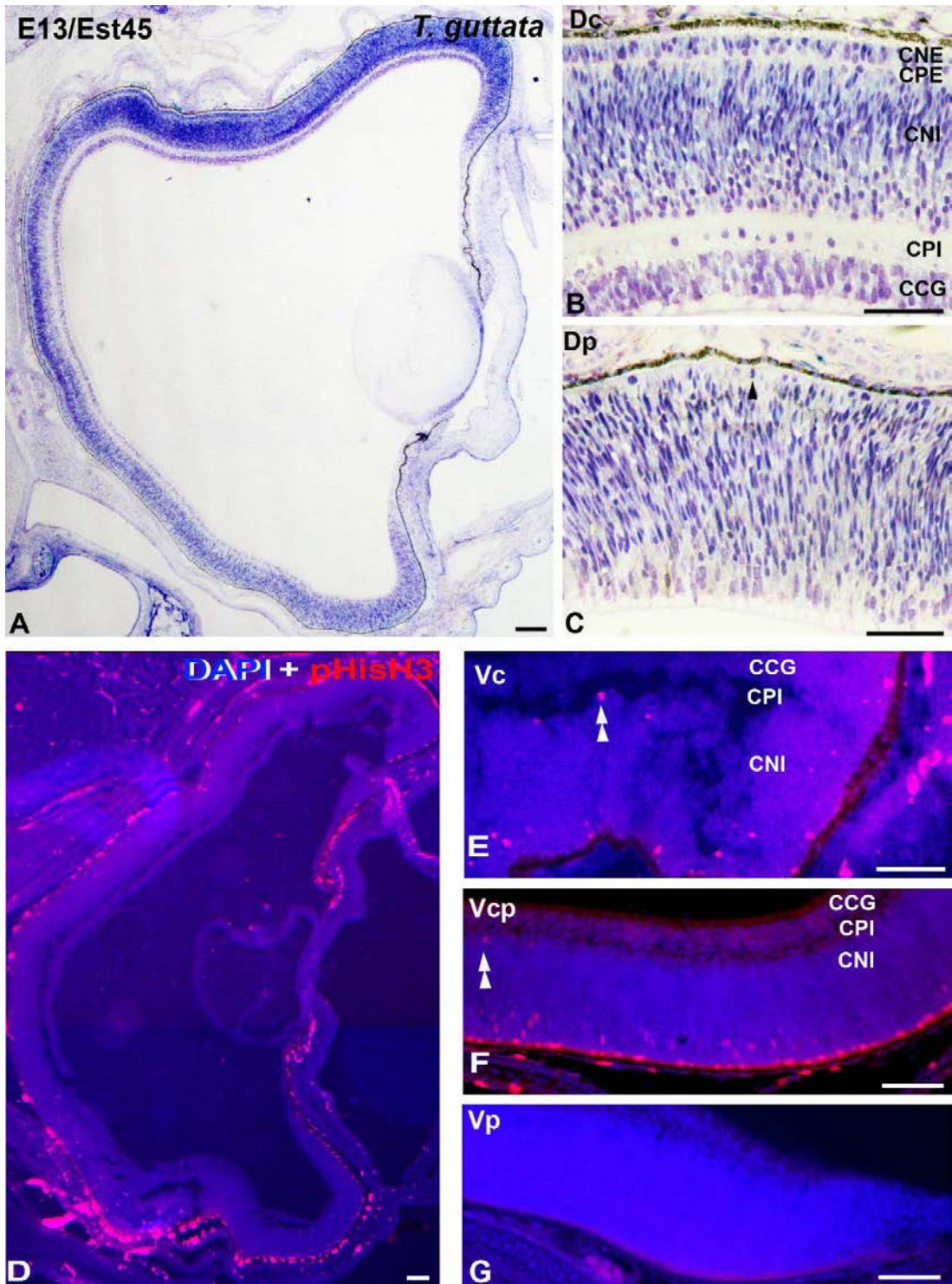


Figura 49. Detección inmunohistoquímica de pHisH3 (A-C), Prox1 (D) e Isl1 (E) en la retina de *C. coturnix* en E5. Las primeras mitosis no apicales se localizan en la región Dcp y en laDp (dobles puntas de flecha en A-C). Prox1 comienza a expresarse en la región más interna del neuroepitelio (flechas en D) así como Isl1 (E) de la Dcp. CNb, capa neuroblástica; Dcp, dorso-centro-periferia; Dp, dorso-periferia. Barras de aumento: 150 μ m.

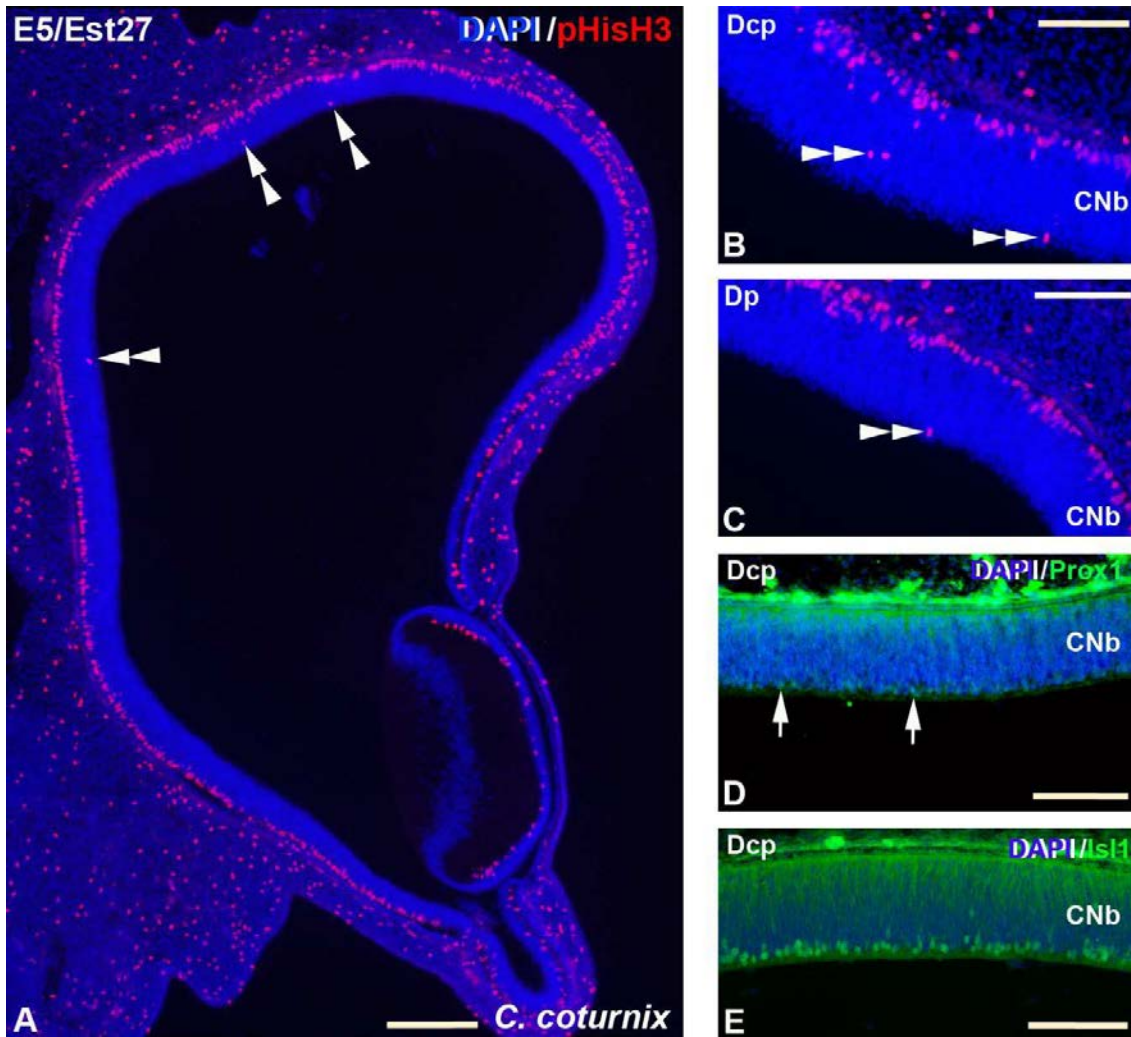


Figura 50. Inmunoexpresión de pHisH3 (A-C), Prox1 (D) e Isl1 (E) en la retina de *C. coturnix* en E6. Se detectan abundantes mitosis en toda la extensión de la retina (puntas de flecha en A). El número de mitosis no apicales se incrementó en la región Dc y en la Dcp (dobles puntas de flecha en B-C). La expresión de Prox1 (flechas en D) aumentó en la zona más interna del centro de la retina así como la de Isl1 (E) en la zona Dc. CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CPI, capa plexiforme interna; Dc, dorso-central; Dcp, dorso-centro-periferia. Barras de aumento: 150 μ m (A); 100 μ m (B-E)

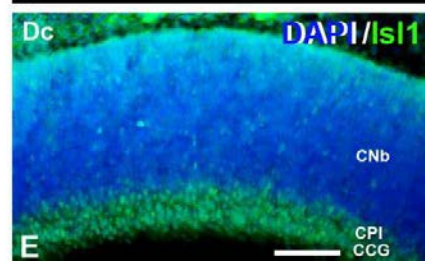
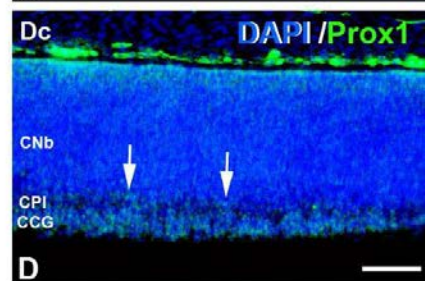
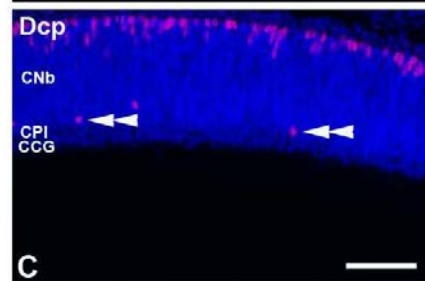
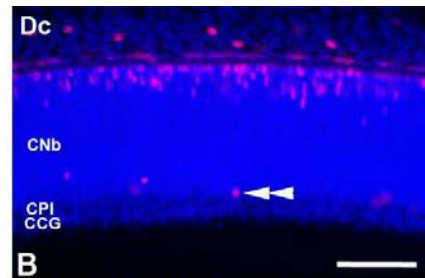
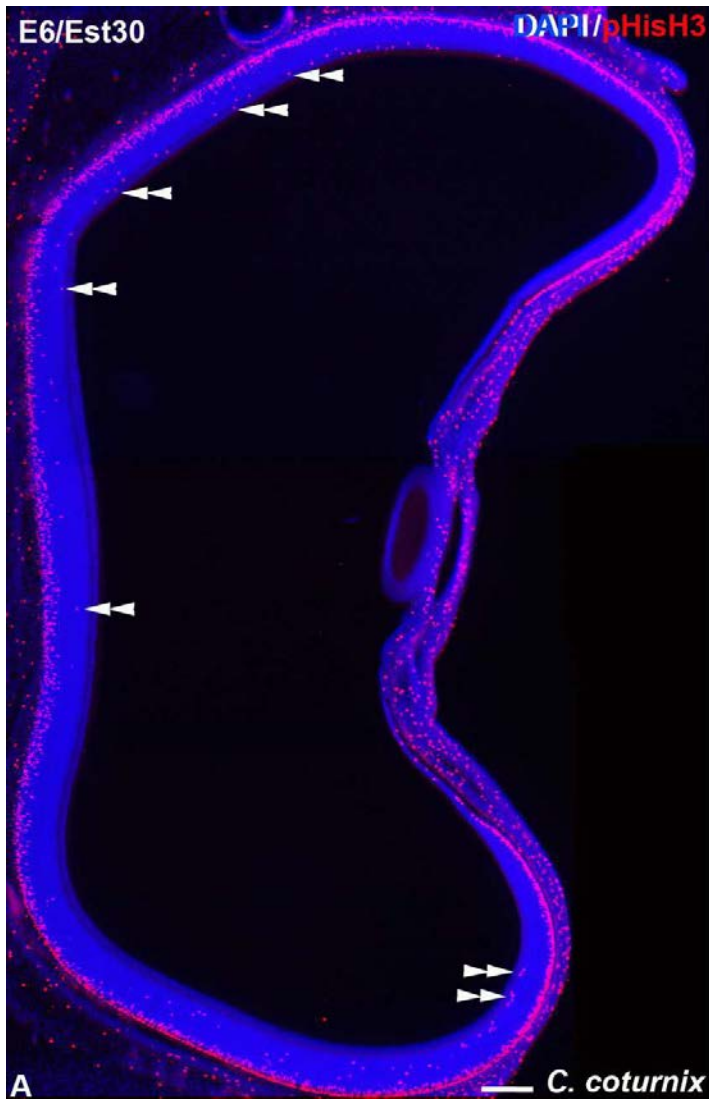


Figura 51. Expresión de pHisH3 (A-C), Prox1 (D) e Isl1 (E) en la retina de *C. coturnix* en E7.5-8. El número de mitosis no apicales se incrementó notablemente en toda la extensión de la retina (puntas de flecha en A) concretamente en la zona central de la retina tanto en la región dorsal (puntas de flechas en B) como en la ventral (C). Se detectó inmunorreactividad frente a Prox1 en la capa de células horizontales presuntiva y en la región más interna de la retina Dc (flechas en D). La expresión de Isl1 se localizó en células ganglionares, células amacrinas y la capa de células horizontales presuntiva (E). CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; Dc, dorso-central; Vc, ventro-central. Barras de aumento: 150 μ m (A); 100 μ m (B-E).

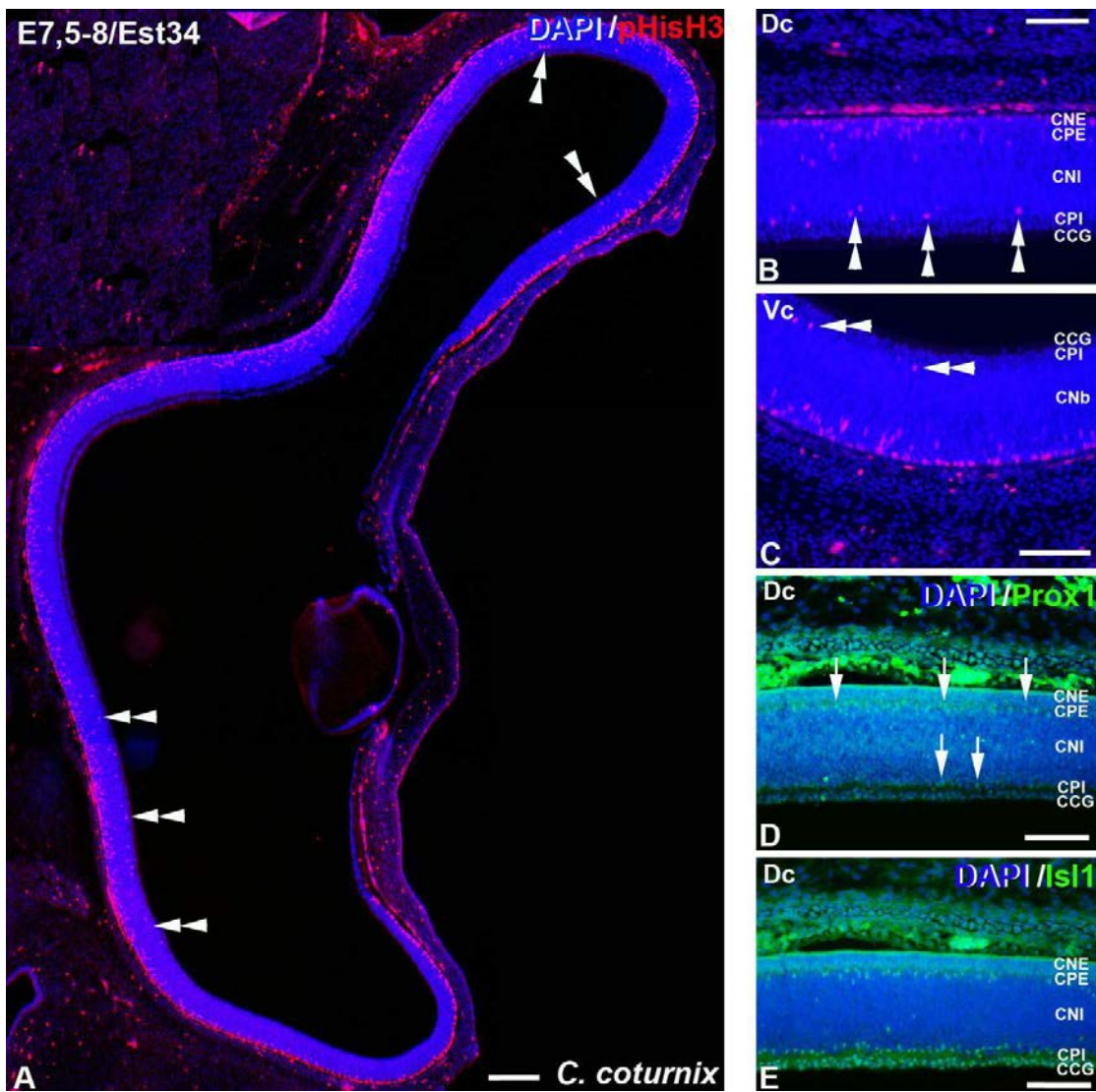




Figura 52. Inmunolocalización de pHisH3 (B-C), Prox1 (D-E) e Isl1 (F-G) en la retina de *C. coturnix* en E8-9. Las mitosis no apicales quedaron restringidas a la periferia tanto en la región dorsal como ventral (puntas de flecha en A, C). En la zona Dc se detectaron dispersas mitosis apicales (B) mientras que en la Dp aparecen abundantes mitosis apicales y no apicales (puntas de flecha en C). La expresión de Prox1 se ubica en la zona Dc de la retina en la capa de células horizontales y en la capa más interna de la CNI (flechas en D). En la Dp Prox1 se localiza en la capa de células horizontales presuntiva y en la capa más interna del neuroepitelio (flechas en E). El patrón de Isl1 en este estadio en la región Dc se extiende desde las células ganglionares a las amacrinas, bipolares y horizontales (F). En la Dp se observó un patrón más indiferenciado con algunas células horizontales Isl1-positivas en la capa de células horizontales presuntivas (G). CCG, capa de células ganglionares; CNb, capa neuroblástica; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; Dc, dorso-central; Dp, dorso-periferia. Barras de aumento: 150 μ m.

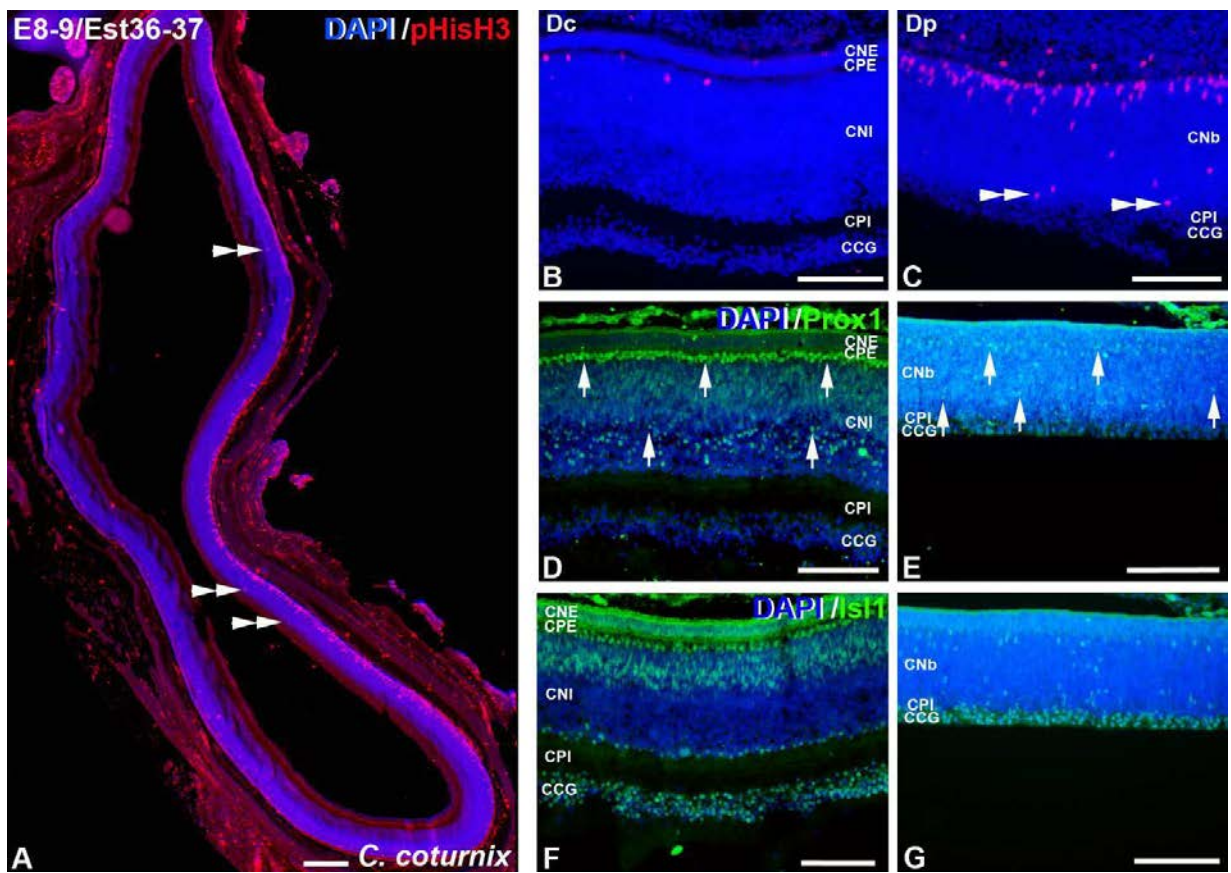




Tabla 7. Densidad de mitosis no apicales y apicales en la región dorsal de la retina en desarrollo de *T. guttata* en el c (blanco), cp (gris claro) y p (gris oscuro.)



T. guttata: densidad de mitosis no apicales en mm² (región dorsal)																															
Est	Centro					Centro-Periferia					Periferia																				
E6	0					1,46					0																				
E7,5-8	1,38					2,24					1,09			2,85																	
E8-9	0,52					0					0					0,45		2,17													
E10	1,83		0,32		0		0		0,60		5,74					3,31		1,58													
E13	0		0		0		0		0		0					0		0													
T. guttata: densidad de mitosis apicales en mm² (región dorsal)																															
Est	Centro					Centro-Periferia					Periferia																				
E6	76,36					75,26					73,08			96,24																	
E7,5-8	75,57					71,60					63,48			66,59																	
E8-9	40,06					36,47					22,04					14,14		9,73		12,32		12,40		12,05		13,33		36,07		65,15	
E10	18,33		15,75		13,32		15,68		14,09		24,17					37,31		49,22		43,42											
E13	0,90		6,04		3,31		6,41		5,54		1,68		11,86		12,13		7,16		6,07		5,49		10,98		9,51		24,66				



Tabla 8. Densidad de mitosis no apicales y apicales en la región ventral de la retina en desarrollo de *T. guttata* en el c (blanco), cp (gris claro) y p (gris oscuro.)



T. guttata: densidad de mitosis no apicales en mitosis/mm² (región ventral)			
Est	Centro	Centro-Periferia	Periferia
E6	0	x	0
E7,5-8	1,35	x	0
E8-9	3,95	4,43	0
E10	3,39	2,35	0
E13	4,24	0,79	0
T. guttata: densidad de mitosis apicales en mitosis/mm² (región ventral)			
Est	Centro	Centro-Periferia	Periferia
E6	88,58	x	48,23
E7,5-8	69,63	x	65,04
E8-9	46,03	43,87	60,15
E10	25,90	30,62	54,21
E13	13,56	23,91	35,97



Tabla 9. Densidad de mitosis no apicales y apicales en la región dorsal de la retina en desarrollo de *C. coturnix* en el c (blanco), cp (gris claro) y p (gris oscuro.)



Tabla 10. Densidad de mitosis no apicales y apicales en la región ventral de la retina en desarrollo de *C. coturnix* en el c (blanco), cp (gris claro) y p (gris oscuro.)



C. coturnix: densidad de mitosis no apicales en mitosis/mm ² (región ventral)													
Est	Centro				Centro-Periferia				Periferia				
E5	0,75				X				0				
E6	1,24		1,77		1,15				2,01	2,38			
E7,5-8	2,97		1,18		0				0	0			
E8-9	0,23		0		0,24	0,24	0	0	0	1,81	2,57	0,60	5,42
E10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
E13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
C. coturnix: densidad de mitosis apicales en mitosis/mm² (región ventral)													
Est	Centro				Centro-Periferia				Periferia				
E5	98,01				X				89,02				
E6	46,77		44,51		50,41				60,04	80,95			
E7,5-8	61,08		65,31		66,74				69,94	69,24			
E8-9	6,70		8,42		11,65	13,25	16,76	25,76	44,32	47,09	49,34	55,58	
E10	0,67	1,10	0,54	1,47	4,068	4,09	5,57		8,94	17,22			
E13	0	0	0	0	0	0	0	0	6,18				

Figura 53. Representación gráfica de la densidad de mitosis no apicales en regiones D y V de la retina de *T. guttata* (rojo) y *C. coturnix* (verde) durante el desarrollo en las tres zonas principales del tejido: *C*, central; *CP*, centro-periferia; *P*, periferia. Las primeras mitosis no apicales se detectaron en E5 en codorniz con densidades por debajo de 1 mitosis/mm² (A',G'). En E6 se alcanza el máximo pico de mitosis no apicales en CP y C en la región D de la retina de *C. coturnix* (B') llegando a una densidad de 4 mitosis/mm² mientras que en *T. guttata* están restringidas a la CP de la región D (B). La densidad se incrementó en la retina de *T. guttata* en las regiones D (C) y V (I). Se alcanzó el pico máximo en la zona central de la retina de *C. coturnix* tanto en la región D (C') como V (I') en E7.5-8. En E8-9 las mitosis no apicales se restringen en ambas especies a la periferia en la región D (D). *T. guttata* alcanza el máximo pico en CP en la región ventral (J) mientras que en *C. coturnix* quedan restringidas a la P (J'). La densidad de mitosis no apicales cae en la región D en ambas especies desde E10 (E,E',F,F') y en la ventral en *C. coturnix* (K', L'). En E13 se alcanza la máxima densidad de mitosis en C en la región V de la retina de *T. guttata* (L). *C*, central; *CP*, centro-periferia; *P*, periferia.

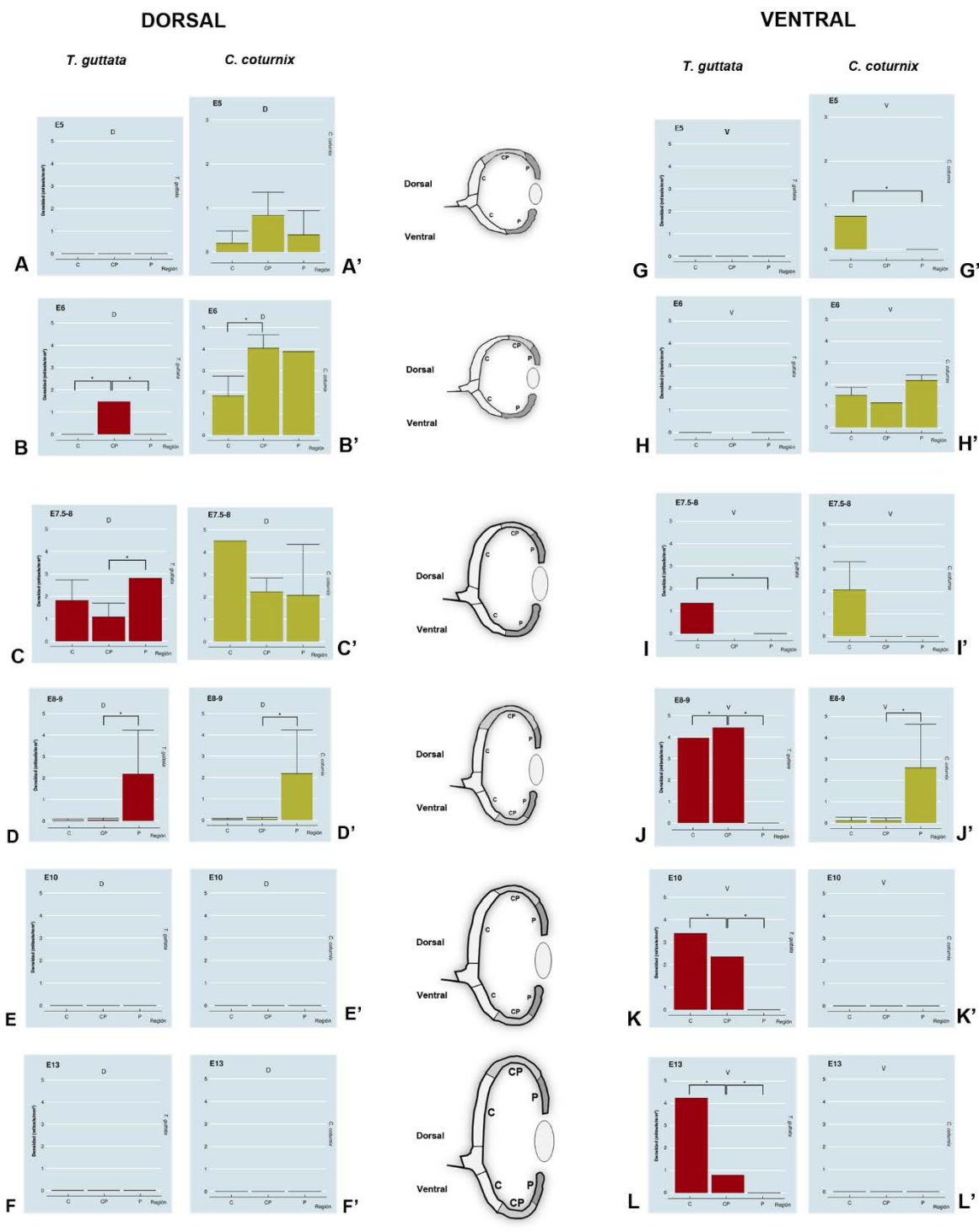
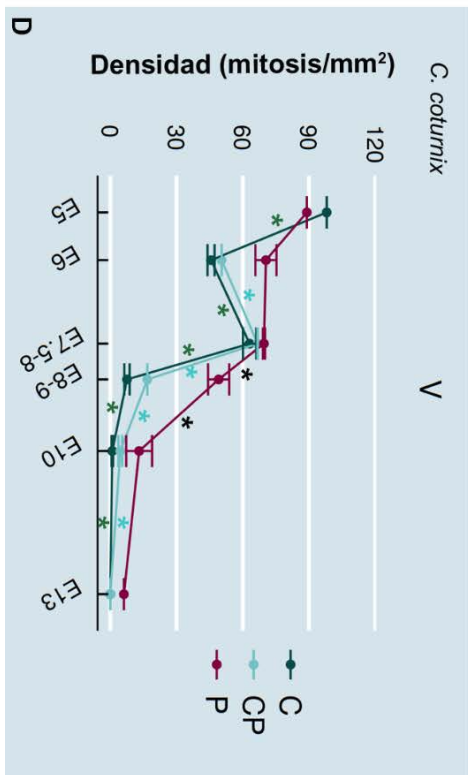
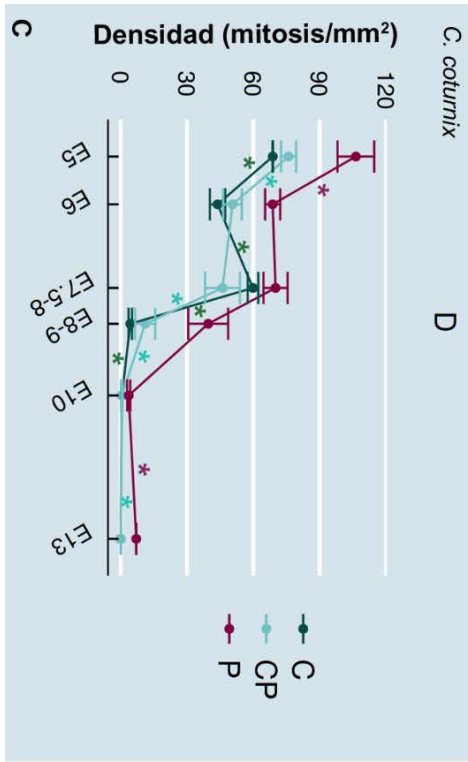
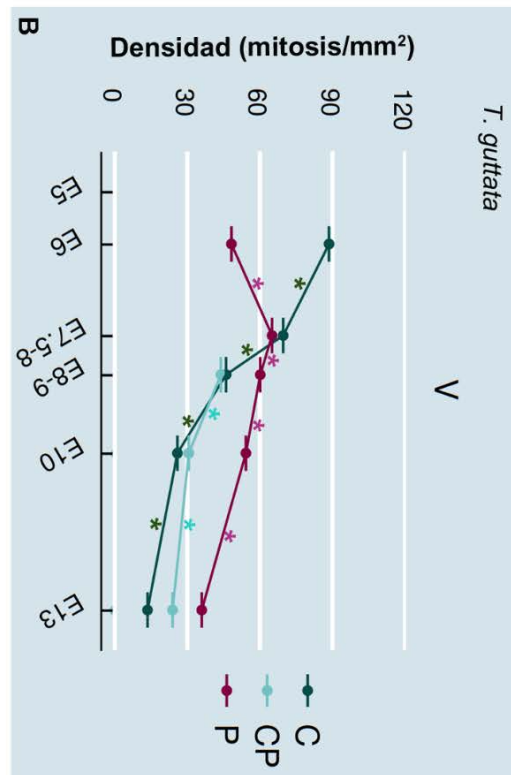
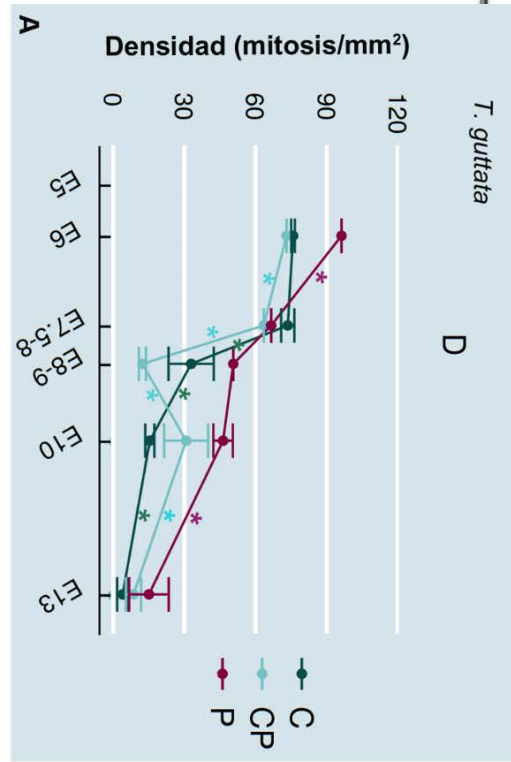




Figura 54. Representación gráfica de la densidad de mitosis apicales en la retina de *T. guttata* (A,B) y *C. coturnix* (C,D) en las regiones D y V en las tres zonas principales del tejido: *C*, central (verde); *CP*, centro-periferia (azul); *P*, periferia (morado). En ambas especies tanto en región dorsal como ventral se observa una elevada densidad de mitosis al inicio del desarrollo que va disminuyendo en estadios más avanzados. *C*, central; *CP*, centro-periferia; *P*, periferia.



Discusión

Como se refirió en el capítulo 1, la mayoría de los estudios sobre retinogénesis concernientes a las aves, se centran en el orden Galliformes ya que las dos especies modelo más utilizadas en el campo de la biología del desarrollo, la gallina (*G. gallus*) y la codorniz (*C. coturnix*) pertenecen al mismo. Estas especies son precociales, es decir, nacen con el cuerpo cubierto de plumas, el sistema músculo-esquelético bien desarrollado y tienen la capacidad de alimentarse por sí solas. Este comportamiento está asociado a la presencia de un sistema nervioso completamente desarrollado permitiendo al individuo interactuar con el ambiente que le rodea. Por otro lado, las especies altriciales como el diamante cebra de timor (*T. guttata*) nacen desnudas, con el sistema locomotor inmaduro y para su alimentación dependen del cuidado parental. Así pues, esta conducta parece estar asociada a un sistema nervioso no maduro en el momento de la eclosión como muestra también la fusión de los párpados y por tanto la ceguera de los individuos al nacer (Murray et al., 2013). A pesar de que existen estudios de retinogénesis en especies altriciales, la mayoría se han llevado a cabo en estadios posnatales como en el caso de *Columba livia* (Rojas et al., 2007). El análisis de este proceso durante los estadios prenatales queda plasmado en el capítulo 1, sin embargo, se pretendió profundizar en la génesis de las células horizontales y en su relación con las mitosis no apicales. Se ha demostrado, que este tipo de proceso se produce en precursores de células horizontales (Edqvist y Halböök, 2004), sin embargo, determinados estudios desarrollados en peces han evidenciado que algunas de estas mitosis podrían originar otro tipo celular como las bipolares (Godinho et al., 2007; Weber et al., 2014) a pesar de que su producto principal sean las horizontales. La génesis de células horizontales ha sido descrita a través de la detección de células que se encontraban en fase M en la retina en desarrollo (Godinho et al., 2007; Boije et al., 2009; Bejarano-Escobar et al., 2012; Pavón-Muñoz et al., 2016) y en concreto para la detección las mitosis no apicales en el pez cebra (Godinho et al., 2007; Weber et al., 2014), pintarroja (Bejarano-Escobar et al., 2012), pollo (Edqvist et al., 2004; Boije et al., 2009; Shirazi Fard et al., 2014), gato (Rapaport et al., 1985; Robinson et al., 1985), y humano (Smirnov y Puchkov, 2004). Esto, ha demostrado que no todos los tipos celulares proceden de progenitores que se dividen en regiones apicales. Además, el uso de marcadores específicos de este tipo celular permite establecer una relación entre las mitosis no apicales detectadas y la diferenciación de las células horizontales. En el presente capítulo, utilizamos Prox1 para revelar la presencia de todos los tipos de células horizontales que se estaban originando e Isl1 para localizar a aquellas que pertenecían al

tipo *axon-less* que parecen diferenciarse un día después que el tipo *axon-bearing* (Edqvist et al., 2008).

En nuestra especie altricial de estudio, las primeras mitosis no apicales se detectaron en la región central de la retina en E6 (Est30) alcanzando el máximo pico en E8-9 (Est39) en la misma zona. Estos datos son muy diferentes a los descritos para *C. coturnix* en el presente capítulo y los aportados por Boije et al. (2009) en los que se muestra que la aparición de éstas se producía en ambas especies en E5 (Est27 y HH27 respectivamente) y alcanzaban su mayor densidad entre E7-E8 (Est32-34 y HH31-HH33). Así pues, cuando en el diamante cebrado de Tímor comienzan a detectarse las primeras mitosis no apicales, en la codorniz y la gallina ya casi se ha alcanzado su máximo pico sugiriendo de nuevo y reforzando la idea de que el desarrollo en esta especie altricial se encuentra retrasado considerablemente en contraposición de las especies precociales. En las tres especies, se ha observado que al alcanzar la mayor densidad de mitosis apicales en la región central, también empiezan a manifestarse células en fase M cercanas a la región externa en la periferia del tejido sugiriendo la existencia de un gradiente centro-periférico como ocurre con el proceso de diferenciación de los distintos tipos celulares (Sharma y Ungar, 1980; Holt, 1988; Vecino et al., 1993; Reese 1996; Candal et al., 2005; 2008; Francisco-Morcillo et al., 2005; 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009; 2010; 2012; Álvarez- Hernán et al., 2013; Pavón-Muñoz y cols., 2016). Además, se ha observado que tanto en *C. coturnix* como en *G. gallus* las mitosis comienzan a ser escasas y son relegadas a la periferia más extrema en E8-9 (Est36-37 y HH35), en el mismo periodo de incubación en el que la región central de la retina de *T. guttata* alcanza la mayor densidad de células en fase M (Fig. 54). En la región periférica, los picos más altos de densidad se generan en E8-9 de la retina del diamante, codorniz y la gallina (Est38-49, Est36-37 y HH35 respectivamente). En el caso del diamante cebrado de Tímor es en el E13 (Est45), el día previo a la eclosión, cuando las mitosis no apicales desaparecen del centro del tejido, pero a pesar de ello, su presencia no ha quedado todavía tan estrictamente alojada en la periferia del mismo. Los días 8-9 de incubación en las especies precociales son los últimos en los que se detectan mitosis no apicales, a partir de aquí, no se han identificado ni contabilizado este tipo de evento lo cual evidencia que en estos estadios se alcanza una madurez de tejido propia en estas especies. Por otro lado, el hecho de que en *T. guttata* se continúen sucediendo de forma intensa, sugiere de nuevo que el proceso de desarrollo se extiende a etapas posnatales del individuo haciendo que sea un modelo ideal para el estudio de regeneración y neurogénesis posnatal.

En cuanto a la posible relación existente entre la génesis de las células horizontales y las mitosis no apicales, el estudio inmunohistoquímico con marcadores específicos nos permitió establecerla y poner de manifiesto ciertos comportamientos de este tipo celular que ya habían sido descritos anteriormente en otras especies (Edqvist y Halböök, 2004; Boije et al., 2009, 2016; Shirazi Fard et al., 2013, 2014). En primer lugar, la inmunoreactividad de Prox1 en la retina de *T. guttata* mostró la existencia de migración bidireccional de las células horizontales desde la región más ventricular del neuroepitelio hasta la más vítrea (cerca a la CCG) desde donde se desplazarían de nuevo hasta alcanzar su posición final en la capa de células horizontales situadas en la parte más externa de la CNI, como describieron previamente Edqvist y Halböök (2004) en *G. gallus*. En el diamante cebrado de Tímor, el inicio de esta migración se produce en E7,5-8 (Est34), encontrando la señal de este marcador en la región más vítrea del tejido como ocurre en la codorniz en E5,5 (Est28) y en la gallina en E4,5-5 (HH25-26) (Edqvist et al., 2006) y coincidiendo medio día de incubación después de que se produjera la aparición de las primeras mitosis no apicales en estas especies. Esta observación planteó así, que estas divisiones no apicales las podrían sufrir las células progenitoras horizontales como ya habían descrito anteriormente otros trabajos en los que llevaron a cabo técnicas de doble inmunomarcaje para este propósito (Boije et al., 2009). Sin embargo, la mayor evidencia de migración bidireccional se pone de manifiesto en el momento en el que la expresión de Prox1 se ubica tanto en células horizontales ya situadas en su localización final como en aquellas que se encuentran a diferentes alturas del tejido. Esto ocurre en *T. guttata* en el E8-9 (Est38-39) y continúa hasta el momento de la eclosión y posiblemente en estadios perinatales mientras que en *C. coturnix* y *G. gallus* este comportamiento es observable en E8 (Est35) y E7,5-8 (HH33) respectivamente. En la retina de *G. gallus*, en E8-9 (HH35), la expresión de este marcador se encuentra ya recluida en la parte más externa de la CNI (Edqvist y Halböök, 2004; Edqvist et al., 2008) y sin embargo, en *C. coturnix*, la expresión de este marcador todavía se observa en regiones interna de la CNI en estadios cercanos a la eclosión como en E13 (Est42) según se describió en el capítulo 1 (Fig. 41) de la presente tesis. Esto podría deberse a que dentro de las especies que denominamos precociales existen diferentes rangos de precocidad dependiendo del cuidado parental y otras características asociadas (Starck y Ricklefs, 1998). En este caso, *G. gallus* es una especie con un mayor grado de precocidad que *C. coturnix* y ello podría explicar el hecho de que las células horizontales todavía continúen migrando en estadios previos a la eclosión. Estos estadios en los que se visualizan con mayor facilidad el comportamiento bidireccional de las células, también son aquellos en los que se produce el pico más alto

de densidad de mitosis no apicales en la región central de la retina tanto en la especie altricial de estudio como en la codorniz y la gallina (Edqvist y Halböök, 2004; Edqvist et al., 2008; Boije et al., 2009) reforzando el planteamiento de la relación existente entre la génesis de las células horizontales y la presencia de mitosis no apicales.

En segundo lugar, gracias al seguimiento de la inmunorreactividad de Islet1, que marca el tipo de células horizontales sin axón, hemos podido comprobar que el nacimiento de las células horizontales con axón se produce aproximadamente un día antes que el de las células horizontales sin axón al igual que lo descrito por Edqvist et al. (2008) en *G. gallus*. La señal de Prox1 se localiza en todos los tipos de células horizontales en la parte más externa de la CNI en E8 (Est38) en *T. guttata* y por lo tanto sería previsible encontrarse inmunomarcaje de Islet1 en la misma región, sin embargo, no es hasta el E8,5 (Est39) en que se produce este evento. Por tanto, en *T. guttata* al igual que en *G. gallus* el nacimiento de las células horizontales sin axón se produce más tarde que el de las células horizontales con axón.

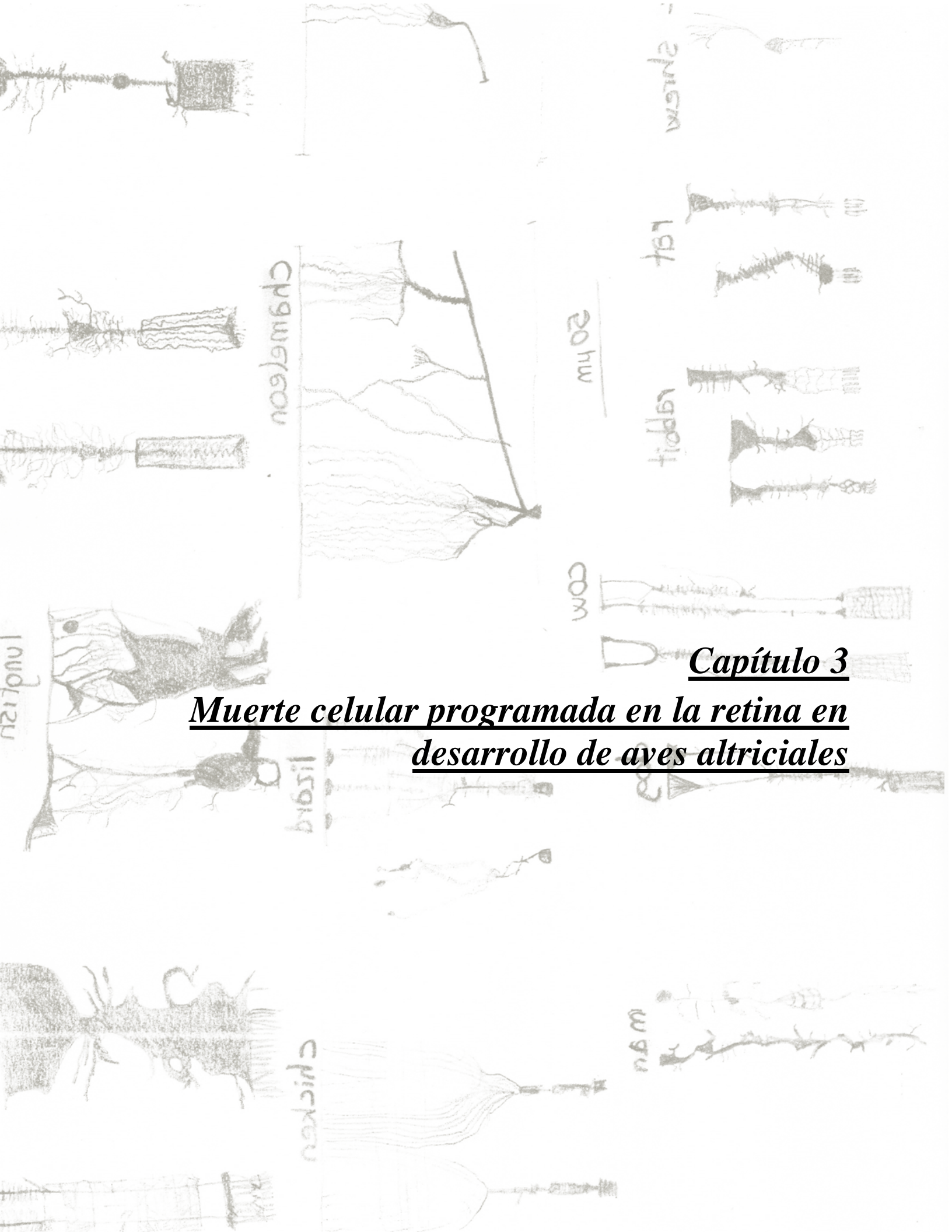
Los resultados presentados en el presente capítulo, por tanto, sugieren y refuerzan el concepto de retraso en la diferenciación de la retina y en concreto de las células horizontales de la retina de *T. guttata* con respecto a los modelos precociales más utilizados (*C. coturnix* y *G. gallus*). También se ha podido poner de manifiesto la existencia de una relación estrecha entre la aparición de mitosis no apicales y el inicio de expresión de marcadores específicos de estas células, así como el temprano nacimiento de las células horizontales con axón con respecto a las células horizontales sin axón. Debido a la continuación de la diferenciación en estadios perinatales como al elevado número de mitosis no apicales, parece ser que esta especie podría constituir un buen modelo para llevar a cabo estudios relacionados con procesos de neurogénesis de este tipo celular.

Bibliografía

- Álvarez-Hernán G, S-LI, Bejarano-Escobar R, Pavón-Muñoz T, Rodríguez-León J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo F. (2018) Teleosts: Physiology, Evolution and Classification. *Marine and Freshwater Biology*.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2009) Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneo 1758). *Exp Eye Res* 89 (3):398-415. doi:10.1016/j.exer.2009.04.007
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Oyola-Velasco JA, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2010) Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314 (7):580-605. doi:10.1002/jezb.21363
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, Rodríguez C, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2012) Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 220 (4):318-335. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01480.x
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2014) Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. *Rev Fish Biol Fisheries* 24:127-158
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27 (26):7028-7040
- Boije H, Edqvist PH, Hallböök F (2009) Horizontal cell progenitors arrest in G2-phase and undergo terminal mitosis on the vitreal side of the chick retina. *Dev Biol* 330 (1):105-113. doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.013
- Boije H, Shirazi Fard S, Edqvist P-H, Hallböök F (2016) Horizontal cells, the odd ones out in the retina, give insights into development and disease. *Frontiers in neuroanatomy* 10:77
- Candal E, Ferreiro-Galve S, Anadon R, Rodríguez-Moldes I (2008) Morphogenesis in the retina of a slow-developing teleost: emergence of the GABAergic system in relation to cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 1194:21-27. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.065
- Candal EM, Caruncho HJ, Sueiro C, Anadon R, Rodríguez-Moldes I (2005) Reelin expression in the retina and optic tectum of developing common brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* 154 (2):187-197
- Edqvist PH, Hallböök F (2004) Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131 (6):1343-1351. doi:10.1242/dev.01018
- Edqvist PH, Lek M, Boije H, Lindback SM, Hallböök F (2008) Axon-bearing and axon-less horizontal cell subtypes are generated consecutively during chick retinal development from progenitors that are sensitive to follistatin. *BMC Dev Biol* 8:46. doi:10.1186/1471-213X-8-46
- Edqvist PH, Myers SM, Hallböök F (2006) Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10. *Eur J Histochem* 50 (2):147-154
- Fischer AJ, Stanke JJ, Aloisio G, Hoy H, Stell WK (2007) Heterogeneity of horizontal cells in the chicken retina. *J Comp Neurol* 500 (6):1154-1171
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2006) Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res* 1103 (1):32-48. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.052
- Francisco-Morcillo J, Sánchez-Calderon H, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2005) Expression of Fgf19 in the developing chick eye. *Brain Res Dev Brain Res* 156 (1):104-109. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.12.011
- Godinho L, Williams PR, Claassen Y, Provost E, Leach SD, Kamermans M, Wong RO (2007) Nonapical symmetric divisions underlie horizontal cell layer formation in the developing retina in vivo. *Neuron* 56 (4):597-603. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.036
- Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM, Harris WA (1988) Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* 1 (1):15-26
- Julian D, Ennis K, Korenbrot JI (1998) Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol* 394 (3):271-282
- Karlsson M, Clary DO, Lefcort FB, Reichardt LF, Karten HJ, Hallböök F (1998) Nerve growth factor receptor TrkA is expressed by horizontal and amacrine cells during chicken retinal development. *J Comp Neurol* 400 (3):408-416
- Murray JR, Varian-Ramos CW, Welch ZS, Saha MS (2013) Embryological staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *J Morphol* 274 (10):1090-1110. doi:10.1002/jmor.20165
- Okamoto M, Bito T, Noji S, Ohuchi H (2009) Subtype-specific expression of Fgf19 during horizontal cell development of the chicken retina. *Gene Expr Patterns* 9 (5):306-313. doi:10.1016/j.gep.2009.02.007
- Pavón-Muñoz T, Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2016) Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* 88 (2):492-507. doi:10.1111/jfb.12802
- Rapaport DH, Robinson SR, Stone J (1985) Cytogenesis in the developing retina of the cat. *Aust N Z J Ophthalmol* 13 (2):113-124



- Rapaport DH, Stone J (1984) The area centralis of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. *Neuroscience* 11 (2):289-301
- Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, Perkowski JJ (2006) Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 6:36
- Robinson SR, Rapaport DH, Stone J (1985) Cell division in the developing cat retina occurs in two zones. *Brain Res* 351 (1):101-109
- Rojas LM, Mitchell MA, Ramírez YM, Mcneil R (2007) Comparative analysis of retina structure and photopic electroretinograms in developing altricial pigeons (*Columba livia*) and precocial japanese quails (*Coturnix japonica japonica*). *Ornitologia neotropical* 18:503-518
- Schnitzer J (1988) The development of astrocytes and blood vessels in the postnatal rabbit retina. *J Neurocytol* 17 (4):433-449
- Schnitzer J (1990) Postnatal gliogenesis in the nerve fiber layer of the rabbit retina: an autoradiographic study. *J Comp Neurol* 292 (4):551-562
- Sharma RK, Ehinger B (1997) Mitosis in developing rabbit retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 64 (1):97-106. doi:10.1006/exer.1996.0189
- Sharma SC, Ungar F (1980) Histogenesis of the goldfish retina. *J Comp Neurol* 191 (3):373-382
- Shirazi Fard S, All-Ericsson C, Hallböök F (2014) The heterogenic final cell cycle of chicken retinal Lim1 horizontal cells is not regulated by the DNA damage response pathway. *Cell Cycle* 13 (3):408-417. doi:10.4161/cc.27200
- Shirazi Fard S, Jarrin M, Boije H, Fillon V, All-Eriksson C, Hallböök F (2013) Heterogenic final cell cycle by chicken retinal Lim1 horizontal progenitor cells leads to heteroploid cells with a remaining replicated genome. *PLoS One* 8 (3):e59133. doi:10.1371/journal.pone.0059133
- Smirnov EB, Puchkov VF (2004) Characteristics of cellular proliferation in the developing human retina. *Neurosci Behav Physiol* 34 (6):643-648
- Starck JM, Ricklefs RE (1998) Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum. vol 8. Oxford University Press on Demand,
- Vecino E, García-Briñón J, Velasco A, Caminos E, Lara J (1993) Calbindin D-28K distribution in the retina of the developing trout (*Salmo fario* L.). *Neurosci Lett* 152:291-295
- Weber IP, Ramos AP, Strzyz PJ, Leung LC, Young S, Norden C (2014) Mitotic position and morphology of committed precursor cells in the zebrafish retina adapt to architectural changes upon tissue maturation. *Cell reports* 7 (2):386-397. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.014



Muerte celular programada en la retina en desarrollo de aves altriciales

Capítulo 3

Resumen

La muerte celular programada (*programmed cell death*, PCD) juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario del sistema nervioso central. Más concretamente, participa de forma muy activa en el proceso de morfogénesis del sistema visual y en el de retinogénesis. Este proceso ha sido descrito en todas las clases de vertebrados. En el caso de las aves, se ha comprobado que existen 3 oleadas de PCD: 1) una oleada afecta a determinadas regiones del esbozo ocular y estaría en relación directa con el proceso de morfogénesis; 2) la segunda oleada provoca la eliminación de neuroblastos recién diferenciados, permitiendo la creación de espacios para el tránsito de axones en crecimiento, y 3) la tercera oleada se detecta durante la formación de conexiones sinápticas entre neuronas retinianas y entre las células ganglionares y el techo óptico. Estos estudios se han desarrollado en las aves precociales *G. gallus* y *C. coturnix* y se ha comprobado que todas las oleadas tienen lugar durante la etapa embrionaria temprana-media. El propósito de este capítulo fue describir el proceso de PCD en la retina en desarrollo de *T. guttata*, un ave altricial, y comparar los resultados obtenidos con los descritos anteriormente en las especies anteriormente citadas. La técnica histoquímica de TUNEL nos ha permitido comprobar que el proceso de muerte celular en la retina de esta especie se extiende durante varios días después de la eclosión, hecho que se describe por primera vez en aves. Por otra parte, se ha comprobado que la tercera oleada de muerte celular progresa a lo largo de la retina de manera análoga al proceso de diferenciación celular. Además de los núcleos apoptóticos, la técnica de TUNEL pone de manifiesto células alargadas orientadas radialmente que corresponde a células de Müller que están fagocitando restos de células que han degenerado anteriormente. Finalmente, como en el resto de especies de aves analizadas, la PCD parece no afectar a los fotorreceptores.

Introducción



La PCD, como la proliferación, diferenciación o migración celular, tiene un papel relevante en el desarrollo embrionario del SNC (Oppenheim, 1991; Bredesen et al., 2006; Buss et al., 2006). Entre la proliferación y la PCD debe existir un equilibrio para así dar lugar a un tamaño y citoarquitectura adecuados de los tejidos. Más concretamente, en el sistema visual también realiza una función esencial durante el proceso de morfogénesis y en el establecimiento correcto de conexiones sinápticas.

La muerte celular ontogenética ha sido descrita en la retina de todos los vertebrados (revisado en Vecino et al., 2004; Valenciano et al., 2009; Francisco-Morcillo et al., 2014). Así, mientras en especies altriciales de peces la muerte celular programada es esporádica y sin seguir un patrón determinado (Hoke y Fernald, 1998; Bejarano-Escobar et al., 2010), en la retina de especies precociales se advierten una serie de gradientes y etapas bien definidas (ver más adelante) (Candal et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2013). Estas etapas también han sido definidas en la retina de anfibios (Gaze y Grant, 1992; Hensey y Gautier, 1998; Hutson y Bothwell, 2001), reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2004; Hidalgo-Sánchez et al., 2006; 2007), aves (García-Porrero et al., 1984; Martín-Partido et al., 1988; 1991; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Trousse et al., 2001; Mayordomo et al., 2003) y mamíferos (Young, 1984; Egensperger et al., 1996; Knabe y Kuhn, 1998; Pequignot et al., 2003; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2011).

Una primera fase de muerte celular afecta principalmente a células neuroepiteliales y tiene un papel relevante en la formación de estructuras como la copa óptica, por lo que es denominada muerte celular morfogenética (García-Porrero et al., 1984; Trousse et al., 2001; Bejarano-Escobar et al., 2013). Durante la formación del cristalino, esta oleada de muerte celular también se detecta en las células presentes en la unión entre el ectodermo y la vesícula del cristalino, justo en el momento en el que se separan ambas estructuras (Cuadros et al., 1991; Knabe y Kuhn, 1998; Nishitani y Sasaki, 2006; Bejarano-Escobar et al., 2011; 2013).

La segunda oleada de muerte celular afecta, en estadios iniciales de la retinogénesis, a algunos neuroblastos recién diferenciados, por lo que ha sido denominada muerte celular neural temprana. Afecta principalmente a los precursores de células ganglionares en estadios en los que los primeros axones están comenzando a avanzar hacia la salida del nervio óptico (Martín-Partido et al., 1988; Mayordomo et al., 2003; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Chavarría et al., 2007; 2013; Valenciano et al., 2009). Se ha argumentado que esta muerte celular puede estar implicada en la creación de espacios para facilitar el avance de los axones de las células ganglionares (Martín-Partido et al.,



1988; Rodríguez-Gallardo et al., 2005).

La tercera oleada hace referencia al periodo en el que se están formando las conexiones sinápticas entre las diferentes neuronas, por lo que se denomina muerte celular neurotrófica. Únicamente aquellas neuronas que establecen conexión con sus células diana van a subsistir, mientras que las que no consiguen establecer sinapsis degeneran. Es la oleada que más se extiende en el tiempo debido a que el periodo de sinaptogénesis en el que se establecen las sinapsis de las células ganglionares con las células del techo óptico, en el caso de los vertebrados no mamíferos, y con las células del núcleo geniculado lateral en mamíferos. Además, también afecta al resto de neuronas de la retina, que también tienen que establecer conexiones entre sí (Young, 1984; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Pequignot et al., 2003; Francisco-Morcillo et al., 2004; 2014; Bejarano-Escobar et al., 2013). El patrón cronotopográfico de la muerte celular que ocurre en esta tercera fase sigue una serie de gradientes paralelos a los gradientes de diferenciación neuronal. El gradiente centro-periférico, iniciándose en regiones cercanas a la salida del nervio óptico y extendiéndose hacia regiones periféricas, se ha descrito en todas las especies estudiadas (Young, 1984; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Pequignot et al., 2003; Francisco-Morcillo et al., 2004; Candal et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2013). El gradiente temporo-nasal y el gradiente dorso-ventral también se ha descrito en la retina de reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2004) y aves (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999). Por último, el gradiente vítreo-escleral, comenzando en regiones internas y finalizando por las regiones externas de la retina, también ha sido descrito en algunos vertebrados (Young, 1984; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Bejarano-Escobar et al., 2013).

Centrándonos en el sistema visual de aves, la bibliografía que aborda diferentes aspectos de la muerte celular que ocurre durante el periodo embrionario es abundante (Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Navascués et al., 1988; Mouhajid et al., 1996; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Trousse et al., 2001; Mayordomo et al., 2003; Chavarría et al., 2007; 2013). Todos estos estudios describen el proceso de muerte celular en la retina en desarrollo tanto en la gallina (*G. gallus*) como en la codorniz (*C. coturnix*), dos especies precociales utilizadas como modelo en biología del desarrollo de forma recurrente. En ellos se describe que la muerte celular en la ontogenia de la retina de estas aves transcurre íntegramente en el periodo embrionario. Todas las oleadas como gradientes se han descrito en la retina de aves, pero como peculiaridad conviene destacar que no se ha observado degeneración de los fotorreceptores durante el desarrollo

embrionario de estos vertebrados (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999). Se ha sugerido que quizás el epitelio pigmentario o las células de Müller sean fuente de factores neurotróficos que promueven la supervivencia de los fotorreceptores en las aves (Cook et al., 1998).

Como hemos mencionado con anterioridad (Introducción General de esta tesis doctoral) *T. guttata* es una especie de ave altricial que presenta un desarrollo retardado con respecto a las especies precociales (Murray et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que su retina en estadios perinatales presenta claros signos de indiferenciación (capítulos 1 y 2 de esta tesis doctoral). Por tanto, la retina de *T. guttata* constituye un excelente modelo para realizar un estudio comparado del proceso de muerte celular durante el desarrollo y establecer diferencias tanto con otras especies de aves como con otras clases de vertebrados.

Objetivos

1. Describir el proceso de muerte celular en la retina en desarrollo de *T. guttata*.
2. Comparar los resultados obtenidos con los descritos en otras aves y en el resto de vertebrados.

Materiales y Métodos



1. Material de estudio

En el presente estudio se han utilizado individuos en estadios embrionarios y postnatales de la especie altricial *Taeniopygia guttata*. Los individuos que se usaron en el presente capítulo son los mismos que se muestran en la tabla 3 (ver materiales y métodos, capítulo 1).

Los especímenes fueron procesados de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE).

2. Procesamiento de los especímenes

Los procesos de fijación, congelación, inclusión en resina y obtención de secciones se llevaron a cabo siguiendo los mismos pasos que en el estudio de diferenciación (ver capítulo 1).

3. Técnica de TUNEL

La técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*), descrita por Gavrieli et al. (1992), es en la actualidad una de las técnicas histoquímicas más utilizadas para detectar núcleos apoptóticos. Consiste en la incubación de las muestras con una solución de nucleótidos marcados que son incorporados a monohebras de ADN gracias a la adición del enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), también presente en la solución. Estos fragmentos monohebra surgen por la acción de endonucleasas que se activan de forma específica durante el proceso apoptótico. Esta herramienta ha sido ampliamente utilizada en el estudio del proceso apoptótico tanto en secciones de parafina y criosecciones en la retina de peces (Bejarano-Escobar et al., 2010; 2013), anfibios (Hensey y Gautier, 1998; Hutzon y Bothwell, 2001), reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2004; Hidalgo-Sánchez et al., 2006), aves (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999) y mamíferos (Bejarano-Escobar et al., 2011). Para utilizar esta técnica en criosecciones de retina de *T. guttata*, en primer lugar, los portaobjetos se sumergieron en PBS a 40°C durante 15 minutos para eliminar la gelatina y posteriormente se realizaron dos lavados en la misma solución a temperatura ambiente. El tejido se incubó en 10µg/ml de proteinasa K en PBS de 10 minutos a 21°C y se post fijaron con PFA 4% durante 10 minutos. Tras dos lavados en PBS, las secciones se incubaron de 15 minutos, a



temperatura ambiente, en una solución de bloqueo (3% H₂O₂ en PBS), para inactivar la peroxidasa endógena y, a continuación, se procedió al lavado en PBS. Posteriormente, el área alrededor de las secciones se secó, se añadieron entre 50 y 100µl de la solución mezcla de reacción de TUNEL, se cubrieron con *parafilm* los portaobjetos para evitar la evaporación y se incubaron entre 60 y 90 minutos en una cámara húmeda a 37°C. Seguidamente, las secciones se lavaron en PBS tres veces, se procedió a añadir 200µl de anticuerpo anti-fluoresceína unido a peroxidasa y se cubrieron las secciones de nuevo con *parafilm* para evitar la evaporación dejándose en incubación a 37°C durante 30 minutos. Tras 3 lavados en PBS se añadió a los portaobjetos una solución de DAB (3,3'-Diaminobenzidine) con una concentración de 500µg/ml y H₂O₂ al 0,03% en PBS y se incubó hasta la aparición de la coloración deseada. Para parar la reacción se sumergieron los portaobjetos en PBS y se lavaron en la misma solución hasta 3 veces. Finalmente, las secciones se deshidrataron en soluciones de etanol de concentración creciente, se aclararon con xileno y se montaron con Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania).

4. Observación de las secciones

La observación de las criosecciones sometidas a la técnica de TUNEL se realizó en un fotomicroscopio Nikon Eclipse 80i, obteniendo las imágenes digitales con una cámara Nikon digital camera DXM1200F acoplada al mismo. Las imágenes fueron optimizadas con el software Adobe PhotoShop (versión CS4).

5. Cuantificación de la densidad de núcleos TUNEL-positivos

En el análisis cuantitativo utilizamos la densidad de núcleos TUNEL-positivos para comparar los diferentes estadios. Examinamos ambas retinas de tres especímenes por cada etapa de desarrollo. Se obtuvieron imágenes de la retina central de una de cada 2 secciones, para evitar que los núcleos TUNEL-positivos fueran contados doblemente. Se midió la superficie de la retina contenida en cada micrografía utilizando el software gratuito ImageJ. Los perfiles de densidad se expresaron como la media del número de núcleos TUNEL-positivos (NT+) ± error estándar de la media, tanto en la CCG como en la CNI. Se han descrito en la literatura procedimientos similares (Cook et al., 1998; Mayordomo et al., 2003; Francisco-Morcillo et al., 2004; Santos et al., 2010). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias entre estadios se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

Resultados



1. Las células de la retina de *T. guttata* mueren por apoptosis

La presencia de cuerpos apoptóticos en la retina en desarrollo de *T. guttata* se analizó mediante técnicas de histología básica e histoquímicas, que identifican células que mueren por apoptosis en la retina de vertebrados (revisado en Francisco-Morcillo et al., 2014). Así, en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina, se hacen evidentes los cuerpos picnóticos resultantes de la fragmentación celular, que contienen cromatina condensada y que se tiñen intensamente con este colorante básico (Fig. 55A, A'). La muerte celular por apoptosis también puede ser detectada en criosecciones teñidas con el colorante nuclear DAPI que, al unirse de forma específica al DNA, también permite identificar núcleos apoptóticos en los que el material genético esté más condensado (Fig. 55B, B'). Sin embargo, es la técnica histoquímica de TUNEL (Gavrieli et al., 1992) la más utilizada para identificar células que degeneran por apoptosis (Francisco-Morcillo et al., 2004; Bejarano-Escobar et al., 2010; 2013). En *T. guttata* se aprecian núcleos TUNEL-positivos en diferentes capas de la retina (Fig. 55C) y en otras regiones del sistema visual como el cristalino (Fig. 55D), donde abundantes células degeneran durante el proceso de diferenciación de este tejido (Nishitani y Sasaki, 2006; Bejarano-Escobar et al., 2013). Por tanto, el proceso de muerte celular programada juega un papel muy importante en el desarrollo de la retina de *T. guttata*.

2. Incidencia de la muerte celular en la región central de la retina en desarrollo de *T. guttata*

El análisis de la muerte celular en estadios tempranos de diferenciación lo hemos realizado sobre secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. En la etapa de copa óptica, es decir, en E2 (Est15) y E3 (Est16) (Fig. 56A-D) la muerte se concentra principalmente en la región central del neuroepitelio (Fig. 56B,D), correspondiente a la zona invaginada. Los cuerpos picnóticos no se vuelven a detectar en la retina neural hasta E4,5-5 (Est24), donde aparecen de forma esporádica (Fig. 56E,F).

El análisis cuantitativo de la muerte celular durante la histogénesis retiniana de *T. guttata* se ha centrado en la región central de la retina, situada dorsalmente al nervio óptico. Los primeros núcleos TUNEL-positivos se detectan en E8 (Est37) (Fig. 57A), estadio en el que la retina todavía no presenta la típica estratificación en capas y está compuesta por una capa neuroblástica (ver también el capítulo 1). Estos núcleos TUNEL- positivos son escasos (6,40 núcleos TUNEL-positivos/mm²) y se distribuyen a diferentes



alturas del espesor retiniano, (Fig. 57A). En E10 (Est42), cuando las capas de la retina ya están totalmente establecidas, la muerte celular todavía es escasa (Figs. 57B,58) y se sitúa indistintamente en la CCG (32,58 núcleos TUNEL-positivos/mm²) y en la CNI (54,30 núcleos TUNEL-positivos/mm²). Sin embargo, a partir de E12 (Est44) (dos días antes de la eclosión), la muerte celular se localiza principalmente en la CCG (Fig. 57C) mostrando unos valores bastante elevados (400,2 núcleos TUNEL-positivos/mm²) (Fig. 58). En lo que respecta a la CNI, los cuerpos TUNEL-positivos menos abundantes que en la CCG (144,30 núcleos TUNEL-positivos/mm²) (Fig. 58) y, además, se sitúan principalmente en la región más interna de esta capa (Fig. 57C). En el momento de la eclosión, la muerte celular sigue presente tanto en la CCG como en la CNI (Fig. 57D), aunque aumenta significativamente en la CNI (827,38 núcleos TUNEL-positivos/mm²), con respecto a E12 (Est44) (Fig. 58). En los siguientes estadios post-eclosión, la muerte en la retina de *T. guttata* es intensa en la CNI, si bien con el avance de los días, la muerte se sitúa en regiones progresivamente más esclerales (Fig. 57E-G). Por su parte, en la etapa postnatal, la densidad de núcleos apoptóticos en la CCG disminuye progresivamente hasta (26,17 núcleos TUNEL-positivos/mm² en P8 (Fig. 58).

Por otra parte, tanto en estadios embrionarios (Fig. 59A,B) como en etapas posnatales (Fig. 59C-E), además de los cuerpos TUNEL-positivos, hemos observado células marcadas, con morfología alargada en el sentido vítreo-escleral, situados en la CNI (Fig. 59A,C-E), con finas prolongaciones radiales que se dirigen tanto hacia la región escleral como a la vítrea (Fig. 59). En algunas ocasiones, dichas prolongaciones TUNEL-positivas finalizan en la región vítrea formando un engrosamiento a modo de pie (Fig. 59B).

En resumen, la muerte celular en la retina de *T. guttata* muestra dos oleadas. La primera ocurre durante la morgogénesis ocular y la segunda en el periodo de diferenciación que se extiende más de una semana después de la eclosión. En la segunda etapa, la densidad de la muerte celular en la CCG alcanza su valor máximo en estadios embrionarios próximos a la eclosión (E12/Est44), mientras que dicho máximo se alcanza en la CNI en estadios post-eclosión (P5). En nuestro estudio nunca hemos localizado cuerpos TUNEL-positivos en la capa de fotorreceptores. Además, en algunas ocasiones aparecen marcadas con la histoquímica de TUNEL somas y prolongaciones finas de células que se distribuyen de forma radial; es decir, se marcan las células de Müller.

Figuras



Figura 55: Secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en P0 sometidas a diferentes técnicas para la detección de muerte celular. Las secciones teñidas con el colorante nuclear azul de toluidina muestran la presencia de cuerpos picnóticos en la CCG (puntas de flecha en A, A') mientras que el tratamiento con DAPI nos permite detectarlos también en la CNI (puntas de flecha en B, B'). La técnica de TUNEL pone de manifiesto aquellas células que están sufriendo apoptosis tanto en la CCG como en la CNI de la retina (C) y en otras estructuras del sistema visual como es el cristalino (D). CCG, capa de células ganglionares; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna. Barra de aumentos: 100 μ m (A-D); 30 μ m (A', B').

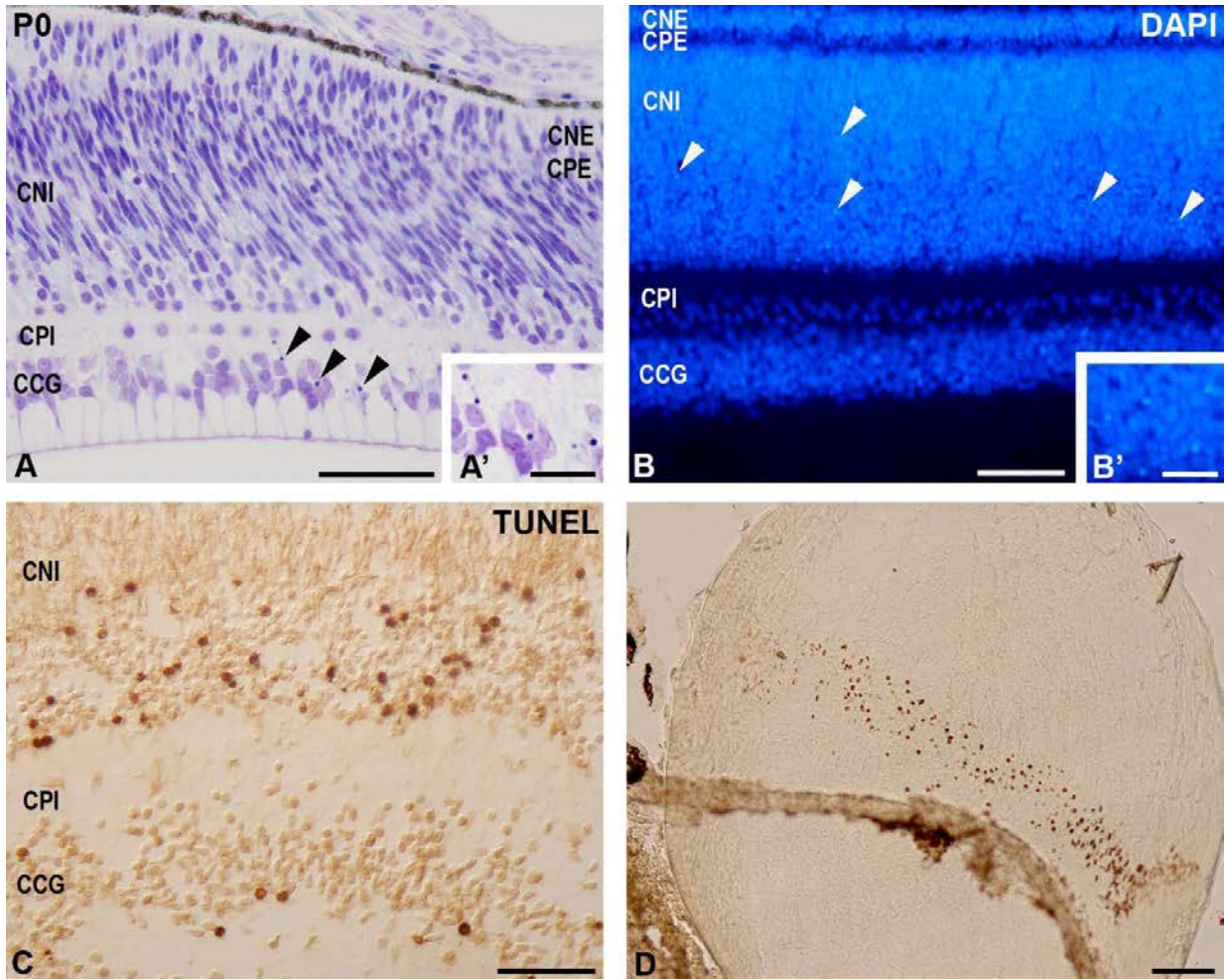




Figura 56. Secciones semifinas de la retina de *T. guttata* en estadios tempranos de desarrollo. Se observan numerosos núcleos apoptóticos en la región central del neuroepitelio de la copa óptica en E2 y E3 (Est15 y Est16) (flechas en B, D). En E4,5-5 (Est24), la retina presenta un aspecto indiferenciado (E) con dispersos núcleos apoptóticos (flecha en F). *CNb*, capa neuroblástica; *Cr*, cristalino; *PlCr*, placoda del cristalino. Barra de aumentos: 150 μ m (A, C); 100 μ m (B, D, E, F).

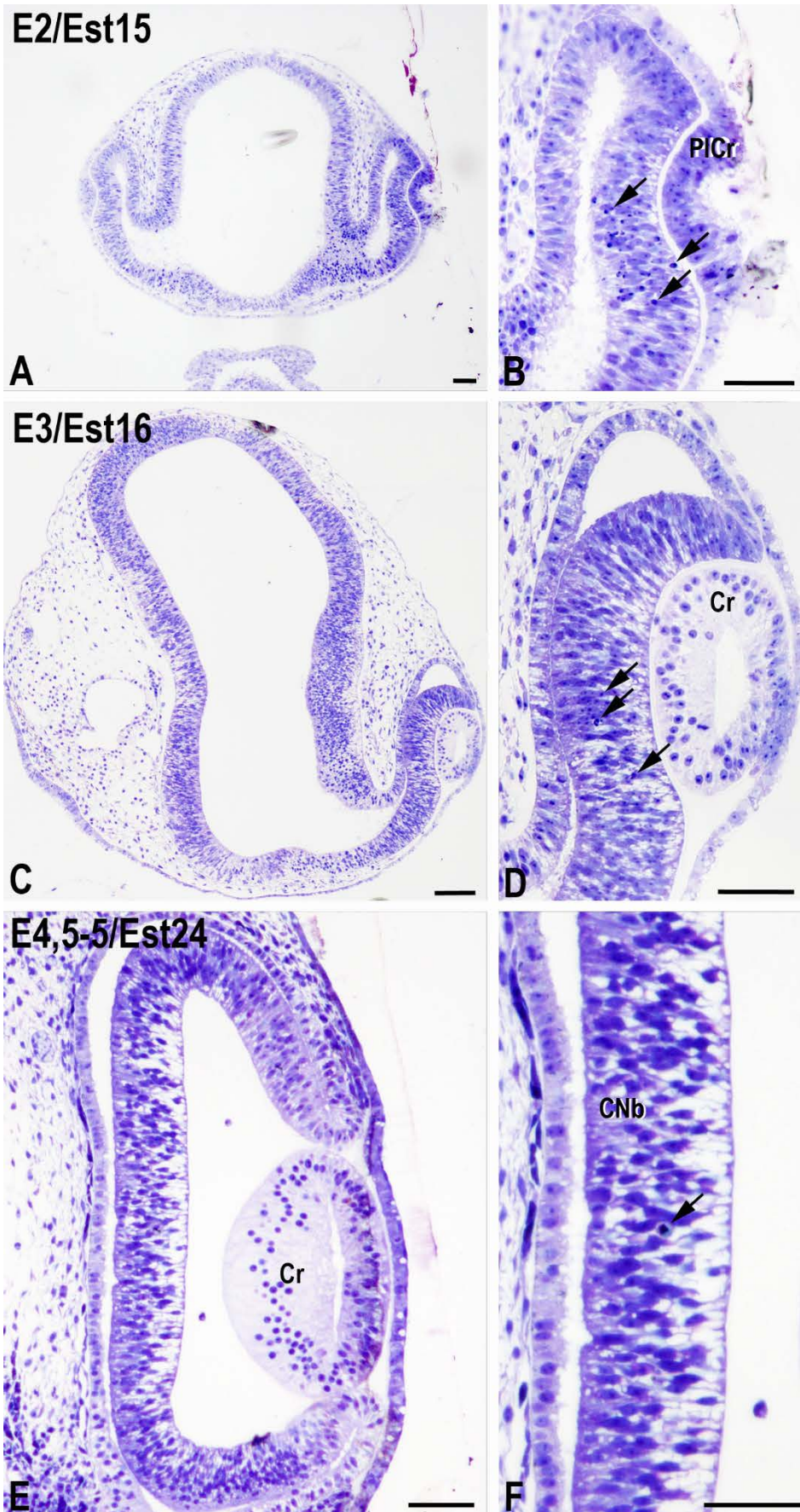




Figura 57. Criosecciones de la retina de *T. guttata* de diferentes estadios de desarrollo y posnatales sometidas a la técnica de TUNEL. En E8 (Est37) aparecen células dispersas marcadas mediante esta técnica en la región central de la CNb (A). Se detectan unas pocas tanto en la CCG (puntas de flecha en B) como en la CNI en E10 (Est42) (dobles puntas de flecha en B) cuyo número se ve incrementado en ambas capas en E12 (Est44) (puntas y dobles puntas de flecha en C). Tanto en el estadio P0 (D) como en P1 (E) se produce un aumento de la muerte celular en la CNI y comienza a disminuir en la CCG. En P5 apenas se detecta muerte celular en la CCG mientras que en la CNI todavía se observan numerosas (F) y en P8 se ha visto reducido en la CNI (G). *CNb*, capa neuroblástica; *CCG*, capa de células ganglionares; *CNE*, capa nuclear externa; *CNI*, capa nuclear interna; *CPE*, capa plexiforme externa; *CPI*, capa plexiforme interna. Barra de aumentos: 100µm.

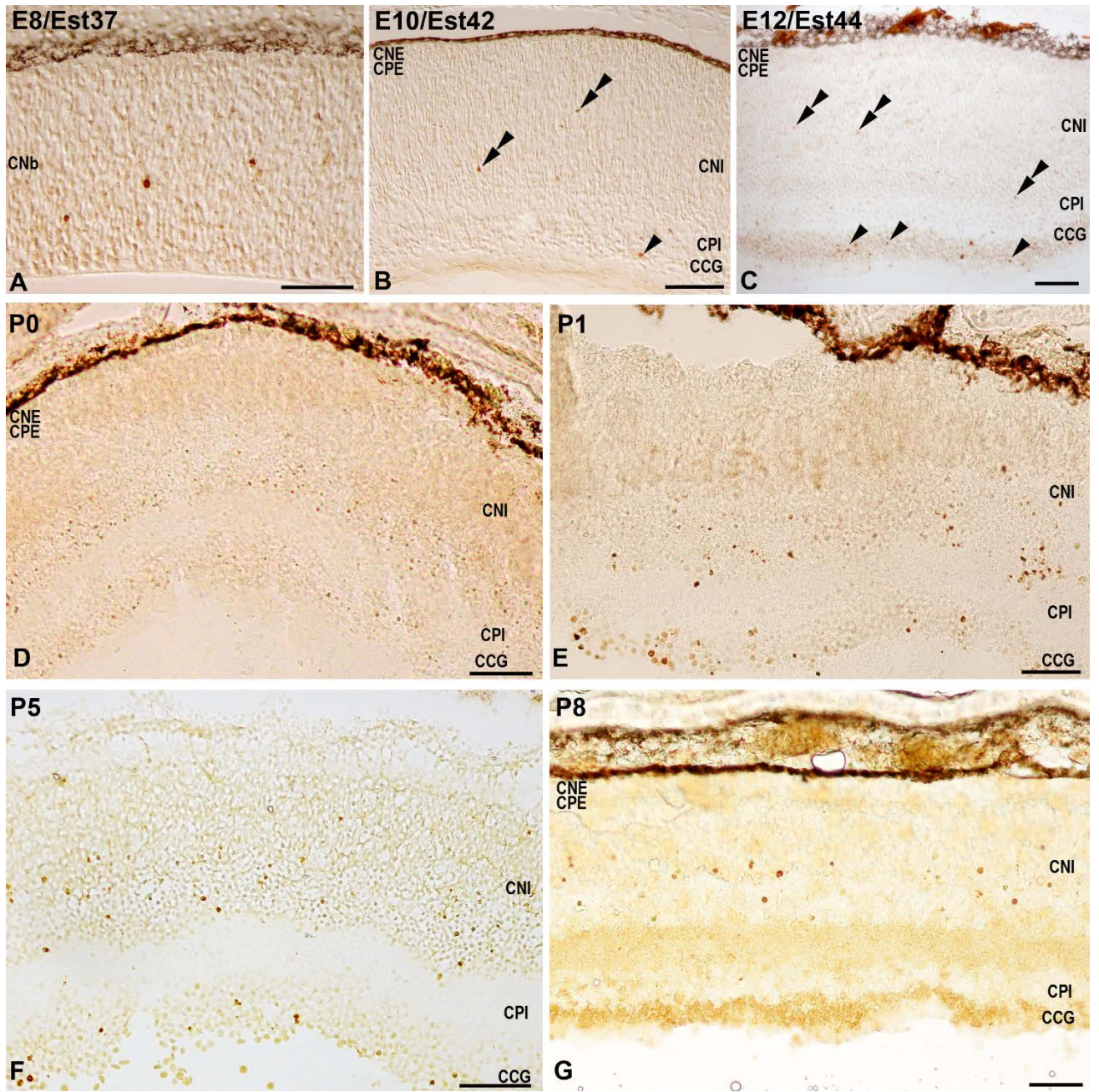




Figura 58. Gráfico representativo de la densidad de muerte celular (núcleos TUNEL-positivos/mm²) en los diferentes estadios de desarrollo y postnatales en la retina de *T. guttata*. Se muestra que la CCG alcanza el pico más alto de muerte celular (Est44) en estadios más tempranos que la CNI (P5). Así mismo, la densidad todavía es elevada en P8 en la CNI (A, B) Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas de densidad entre los diferentes estadios (*p<0,05).

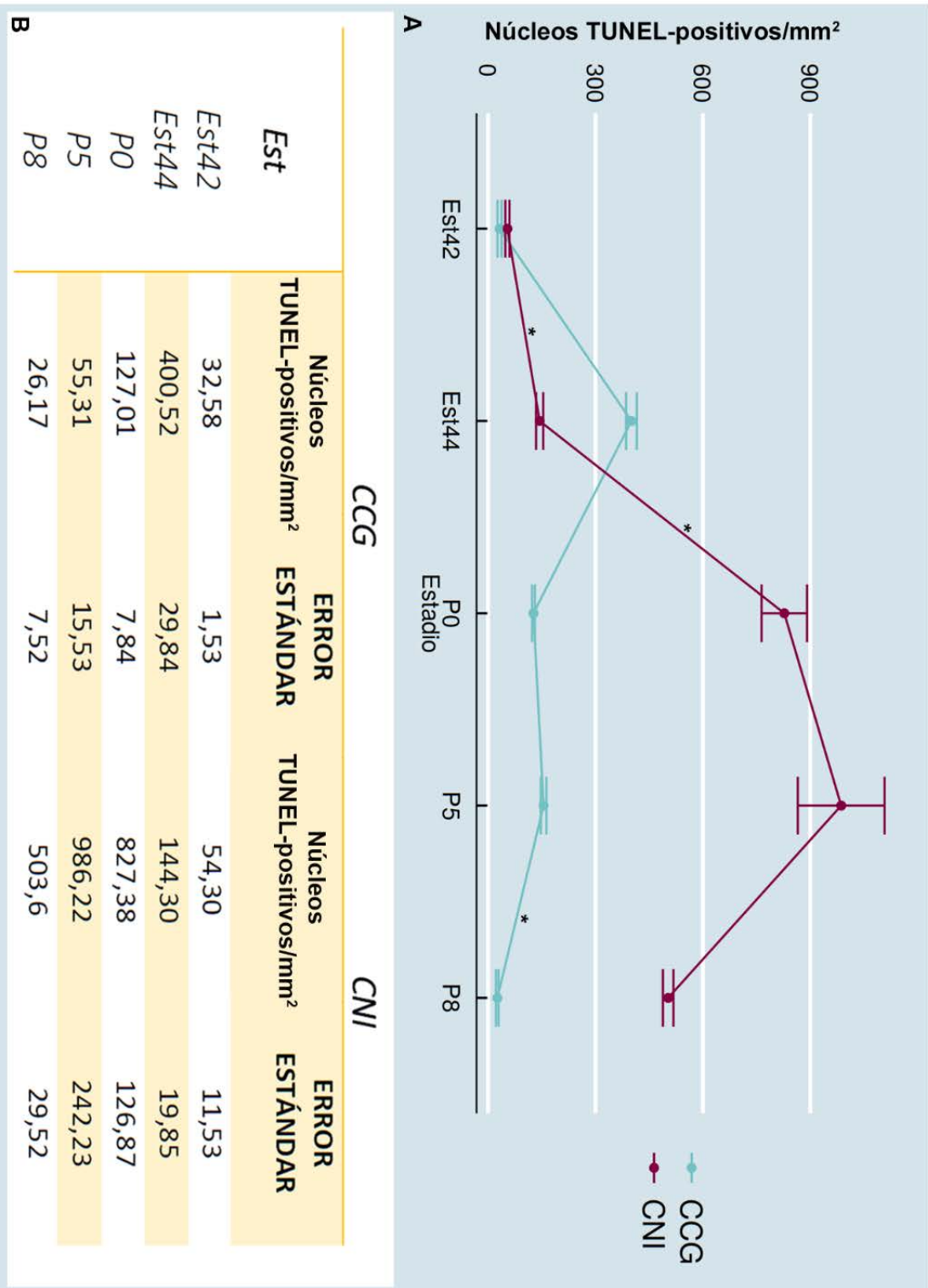
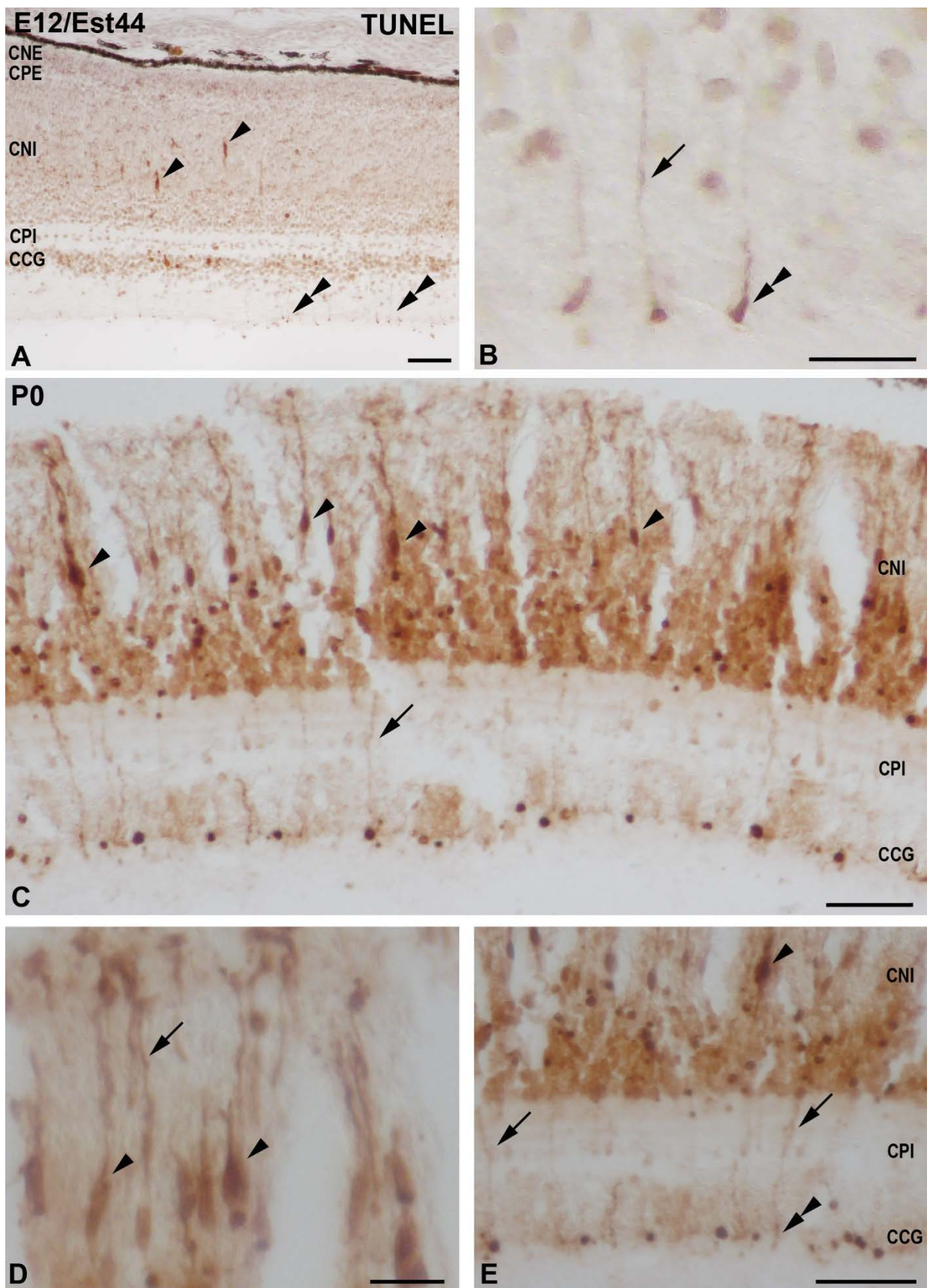




Figura 59. Criosecciones de la retina de *T. guttata* en E12 (Est 44) y P0 sometidas a la técnica de TUNEL. En E12 (Est44) se pueden observar los somas de células de Müller (puntas de flecha en A) así como los pies (doble punta de flecha en A y B) y las prolongaciones (flecha en B) de las mismas (B corresponde a aumentos de A). En P0 el marcaje de este tipo celular se ve aumentado apareciendo en sus somas (puntas de flecha en C-E), prolongaciones (flechas en C-E) y sus pies (doble punta de flecha en E). D y E son aumentos de C. CCG, *capa de células ganglionares*; CNE, *capa nuclear externa*; CNI, *capa nuclear interna*; CPE, *capa plexiforme externa*; CPI, *capa plexiforme interna*. Barra de aumentos: 100 μ m (A, C, E); 30 μ m (B, D).



Discusión



1. Muerte celular en la retina de *T. guttata*

El presente estudio analiza el proceso de muerte celular que afecta a diferentes poblaciones de células en la retina en desarrollo de una especie de ave altricial, *T. guttata*. La muerte celular ha sido detectada mediante una técnica de histología básica utilizando secciones semi-finas teñidas con azul de toluidina. Esta técnica se ha empleado en estudios que versaban sobre apoptosis en retina (Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Knabe et al., 2000; Francisco-Morcillo et al., 2004; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2010). Además, se ha utilizado la técnica de histoquímica de TUNEL sobre criosecciones, que identifica fragmentos de ADN que se originan durante el proceso apoptótico. Esta técnica marca, por tanto, núcleos y fragmentos nucleares de células muertas o en proceso de muerte (Francisco-Morcillo et al., 2004; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2010, 2011). Tanto el tamaño como la morfología de los cuerpos picnóticos y de los núcleos TUNEL-positivos, coinciden con los descritos en otras especies de vertebrados.

2. Muerte celular durante la morfogénesis y diferenciación retiniana de *T. guttata*

Como se ha comentado con anterioridad, la muerte celular ontogenética en la retina ha sido descrita en la retina de todas las clases de vertebrados (revisado en Valenciano et al., 2009; Francisco-Morcillo et al., 2014). En el caso de las aves, los diversos estudios existentes se han centrado tanto en estadios de morfogénesis ocular (Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Mouhajid et al., 1996; Trousse et al., 2001; Mayordomo et al., 2003; Chavarría et al., 2007; 2013), como en estadios en los que tiene lugar la diferenciación de la retina (Navascués et al., 1988; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999). Todos estos estudios describen el proceso de muerte celular en la retina en desarrollo de la gallina (*G. gallus*) y de la codorniz (*C. coturnix*), dos especies de aves precociales. En ellos se describe que la muerte celular en la ontogenia de la retina transcurre íntegramente durante el periodo embrionario. En el presente estudio se ha demostrado que en la especie altricial *T. guttata*, la retina presenta abundante muerte celular, tras la eclosión, extendiéndose, al menos, hasta P8, que ha sido el último estadio analizado. Por tanto, estas observaciones inciden en lo descrito en capítulos anteriores de



esta tesis doctoral, en los que se muestra que el proceso de retinogénesis se completa en estadios postnatales. En especies altriciales de peces, como el lenguado senegalés (Bejarano-Escobar et al., 2010), e incluso alguna precocial, como la trucha común (Candal et al., 2005), se ha descrito muerte celular en la retina de individuos larvarios y alevines, principalmente en relación con el proceso de sinaptogénesis (ver más adelante). En cambio, en especies precociales de condriactos, la muerte celular se circunscribe únicamente al periodo embrionario (Bejarano-Escobar et al., 2013). De igual forma, en el galápago leproso, una especie precocial de reptiles, la muerte celular en la retina es únicamente detectada en el periodo embrionario (Francisco-Morcillo et al., 2004). En la mayoría de los mamíferos estudiados, el proceso de muerte celular se extiende desde estadios embrionarios hasta el periodo postnatal (Young, 1984; Pequignot et al., 2003; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2011), debido a que completan el desarrollo de su retina durante el periodo postnatal temprano. Así, la mayor parte de los modelos utilizados de mamíferos son considerados como semi-altriciales

El presente estudio constituye la primera referencia en la que analiza la muerte celular en la retina de un ave altricial y que muestra que la oleada de muerte celular que coincide con la sinaptogénesis de la retina en el techo óptico se extiende a lo largo de un notable número de días de la etapa postnatal.

3. Oleadas de muerte celular en la retina de vertebrados

Como se ha expuesto en la introducción del presente capítulo, son tres las oleadas de muerte celular descritas en aves. La primera, denominada muerte celular morfogénica, tiene lugar durante la formación de las copas ópticas y de la fisura óptica. En el presente estudio también mostramos que en *T. guttata* la presencia de abundantes cuerpos picnóticos en el polo posterior de la retina durante el proceso de morfogénesis ocular. Estas observaciones coinciden con lo descrito en peces condriactos (Bejarano-Escobar et al., 2013), reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2004), aves (Martín-Partido et al., 1988; Trousse et al., 2001) y mamíferos (Silver y Hughes, 1973; Rodríguez-Gallardo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2011). Por otra parte, en el presente análisis no se ha detectado una región de degeneración en la región dorsal de la copa óptica durante la morfogénesis ocular, como se ha demostrado con anterioridad en peces condriactos (Bejarano-Escobar et al., 2013) y aves (García-Porrero et al., 1984; Trousse et al., 2001), coincidiendo con una alta concentración de la proteína BMP4 en la misma región (Trousse et al., 2001).



La segunda oleada de muerte celular en la retina de aves, que afecta principalmente a neuroblastos recién diferenciados (Cuadros y Ríos, 1988; Martín-Partido et al., 1988; Mayordomo et al., 2003; Chavarría et al., 2007, 2013), en la retina de *T. guttata* apenas está presente y se limita a algunos cuerpos apoptóticos esparcidos por la región central de la retina en estadios que coinciden con la aparición de los primeros precursores de células ganglionares (E4,5-5/Est24-25).

Finalmente, es la tercera oleada de muerte celular neurotrófica la que más claramente se detecta en la retina de *T. guttata*. Afecta, por tanto, a células ya diferenciadas y presenta una serie de aspectos llamativos. En efecto, la densidad de células que degeneran siempre es mayor en la CNI que en la CCG, coincidiendo con lo descrito en *G. gallus* (Cook et al., 1998) y *C. coturnix* (Marín-Teva et al., 1999). Otro aspecto que es muy llamativo en la retina de aves y que también coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, es que esta muerte celular no afecta a los fotorreceptores (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999). En la retina de vertebrados se han descrito tres gradientes de muerte celular: centro-periférico, dorso-central y vítreo- escleral (Young, 1984; Hoke y Fernald, 1988; Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Pequignot et al., 2003; Francisco-Morcillo et al., 2004; Candal et al., 2005; Bejarano- Escobar et al., 2013). Nuestro estudio ha analizado la muerte celular en la retina central de la retina de *T. guttata*. Por ello, no ha sido posible conocer si existen o no los gradientes centro-periférico y dorso-central. No obstante, nuestro estudio muestra un gradiente vítreo-escleral en la retina de *T. guttata*, ya que los valores de densidad de núcleos TUNEL-positivos alcanza el máximo en la CCG antes que en la CNI, como también ha sido descrito en *G. gallus* (Cook et al., 1998) y en *C. coturnix* (Marín-Teva et al., 1999). Otro resultado que emerge del presente estudio es que la oleada de muerte celular neurotrófica en la retina de esta especie altricial se registra en estadios más tardíos si lo comparamos con lo que conocemos en especies precociales (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999). Así, la muerte celular en la CCG y en la CNI (Fig. 57) se observó por primera vez en la retina de *T. guttata* en E10 (Est41-42) mientras que en *G. gallus* y *C. coturnix* en E8 (HH34) y E7 (Est32-33), respectivamente (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999). Por otro lado, tanto en *G. gallus* como en *C. coturnix*, el pico más alto de muerte celular en la CCG se alcanza en E10 (HH36 y Est38 respectivamente) mientras que en *T. guttata* en E12 (Est44).

Por otra parte, en la CNI se alcanza el máximo en E11 (HH37) en *G. gallus* y en E12 (Est42) para *C. coturnix*, mientras que en *T. guttata*, el pico de muerte celular en esta capa se produce en el día 5 tras la eclosión (P5) (Tabla 11). A pesar de que el grueso de la muerte celular en codorniz se produce durante los estadios embrionarios, este proceso se extiende



Discusión

hasta el día 3 tras la eclosión (Marín-Teva et al., 1999) mientras que en *T. guttata* parece que se extiende más allá de P8. Por tanto, los resultados de esta tesis doctoral muestran claramente que los procesos de diferenciación y muerte celular en la retina de *T. guttata* se extienden más de una semana de la vida postnatal, asemejándose más a lo que ocurre en mamíferos (Young, 1984; Pequignot et al., 2003) que a lo que acontece en aves precociales (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999)

Capas	Presente tesis <i>T. guttata</i>		Marín-Teva et al., 1999, <i>C. coturnix</i>		Cook et al., 1998 <i>G. gallus</i>	
	CCG	CNI	CCG	CNI	CCG	CNI
Inicio de la muerte celular	E10 (Est41-42)	E10 (Est41-42)	E7 (Est32-33)	E7 (Est32-33)	E8 (HH34)	E8 (HH34)
Pico de muerte celular	E12 (Est44)	P5	E10 (Est38)	E12 (Est42)	E10 (HH36)	E11 (HH37)
Fin de muerte celular	>P8	>P8	E15 (Est44)	P3	~ E19 (HH45)	~ E19 (HH45)

Tabla 11. Estadios en los que se produce el inicio, el pico y el fin de la muerte celular en la retina de las tres especies de estudio.

4. Marcaje no-específico de la histoquímica de TUNEL

Con la técnica de TUNEL aparecen marcados difusamente los somas y prolongaciones finas de células muy alargadas en sentido vítreo-escleral. Además, estas células TUNEL-positivas presentan un engrosamiento a modo de pie cuando contactan con la superficie vítreo de la retina. Todas estas características morfológicas indican que, además de los núcleos apoptóticos, son células de Müller las que se marcan con esta técnica histoquímica. Un patrón similar se ha descrito con anterioridad en la retina en desarrollo de reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2004), aves (Marín-Teva et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2014; Bejarano-Escobar et al., 2017) y mamíferos (Egensperger et al., 1996). Este marcaje se hace más evidente en retina de peces en los que se indujo la degeneración de los fotorreceptores por diferentes tratamientos (Morris et al., 2005; Bailey et al., 2010; Bejarano-Escobar et al., 2012b). Algunos autores piensan que este marcaje se debe a que las células de Müller también degeneran en todos estos casos



(Thummel et al., 2008). Se ha descrito que cuando una célula degenera por apoptosis sufre una serie de cambios morfológicos, como retracción de las prolongaciones y fragmentación celular. En el caso de las células de Müller marcadas con la técnica de TUNEL, éstas parecen poseer una morfología “normal”, por lo que es poco probable que estén degenerando. La hipótesis más aceptada para explicar el marcaje de células de Müller con la histoquímica de TUNEL es que estas células presentan una elevada actividad fagocítica, tanto durante el desarrollo como en condiciones de degeneración neuronal (Bejarano-Escobar et al., 2017). Hay que reseñar que la histoquímica de TUNEL pone de manifiesto DNA fragmentado que se origina mediante la acción de las endonucleasas que se activan en el proceso apoptótico. Si este DNA es endocitado por células con la capacidad de fagocitar desechos celulares, el citoplasma de las mismas puede aparecer teñido con esta técnica (Egensperger et al., 1996; Bejarano-Escobar et al., 2017). La adquisición de la capacidad fagocítica por células neuroepiteliales, consideradas fagocitos no especializados, también se ha observado durante el desarrollo de la retina (Francisco-Morcillo et al., 2004, 2014; Bejarano-Escobar et al., 2011, 2017).

Bibliografía



- Bailey TJ, Fossum SL, Fimbel SM, Montgomery JE, Hyde DR (2010) The inhibitor of phagocytosis, O-phospho-L-serine, suppresses Müller glia proliferation and cone cell regeneration in the light-damaged zebrafish retina. *Exp Eye Res* 91 (5):601-612. doi:S0014-4835(10)00241-1 [pii]
10.1016/j.exer.2010.07.017
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2009) Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneo 1758). *Exp Eye Res* 89 (3):398-415. doi:10.1016/j.exer.2009.04.007
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, Oyola-Velasco JA, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2010) Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314 (7):580-605. doi:10.1002/jez.b.21363
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2013) Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 223 (2):171-184. doi:10.1111/joa.12071
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2012) Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthonic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death. *J Exp Biol*. doi:jeb.072124 [pii]
10.1242/jeb.072124
- Bejarano-Escobar R, Holguín-Arévalo MS, Montero JA, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2011) Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Dev Dyn* 240 (7):1841-1855. doi:10.1002/dvdy.22673
- Bejarano-Escobar R, Sánchez-Calderon H, Otero-Arenas J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2017) Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *J Anat*. doi:10.1111/joa.12653
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27 (26):7028-7040
- Biehlermaier O, Neuhaus SC, Kohler K (2001) Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. *Cell Tissue Res* 306 (2):199-207
- Candal E, Anadon R, DeGrip WJ, Rodríguez-Moldes I (2005) Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* 154 (1):101-119. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.10.008
- Chavarría T, Baleriola J, Mayordomo R, de Pablo F, de la Rosa EJ (2013) Early neural cell death is an extensive, dynamic process in the embryonic chick and mouse retina. *ScientificWorldJournal* 2013:627240. doi:10.1155/2013/627240
- Chavarría T, Valenciano AI, Mayordomo R, Egea J, Comella JX, Hallbook F, de Pablo F, de la Rosa EJ (2007) Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. *Dev Neurobiol* 67 (13):1777-1788. doi:10.1002/dneu.20554
- Cole LK, Ross LS (2001) Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* 240 (1):123-142
- Cook B, Portera-Cailliau C, Adler R (1998) Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J Comp Neurol* 396 (1):12-19
- Cuadros MA, Martín C, Ríos A, Martín-Partido G, Navascués J (1991) Macrophages of hemangioblastic lineage invade the lens vesicle ectoderm interspace during closure and detachment of the avian embryonic lens. *Cell Tissue Res* 266:117-127
- Cuadros MA, Ríos A (1988) Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat Embryol (Berl)* 178 (6):543-551
- Das AV, Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, Hegde GV, Ahmad I (2006) Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 299 (1):283-302
- de la Rosa EJ, de Pablo F (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* 23 (10):454-458
- Egensperger R, Maslim J, Bisti S, Hollander H, Stone J (1996) Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Brain Res Dev Brain Res* 97 (1):1-8
- Fausett BV, Goldman D (2006) A role for $\alpha 1$ tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *Journal of Neuroscience* 26 (23):6303-6313
- Fausett BV, Gumerson JD, Goldman D (2008) The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. *J Neurosci* 28 (5):1109-1117. doi:28/5/1109 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.4853-07.2008
- Fischer AJ, Reh TA (2001) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4 (3):247-252. doi:10.1038/85090

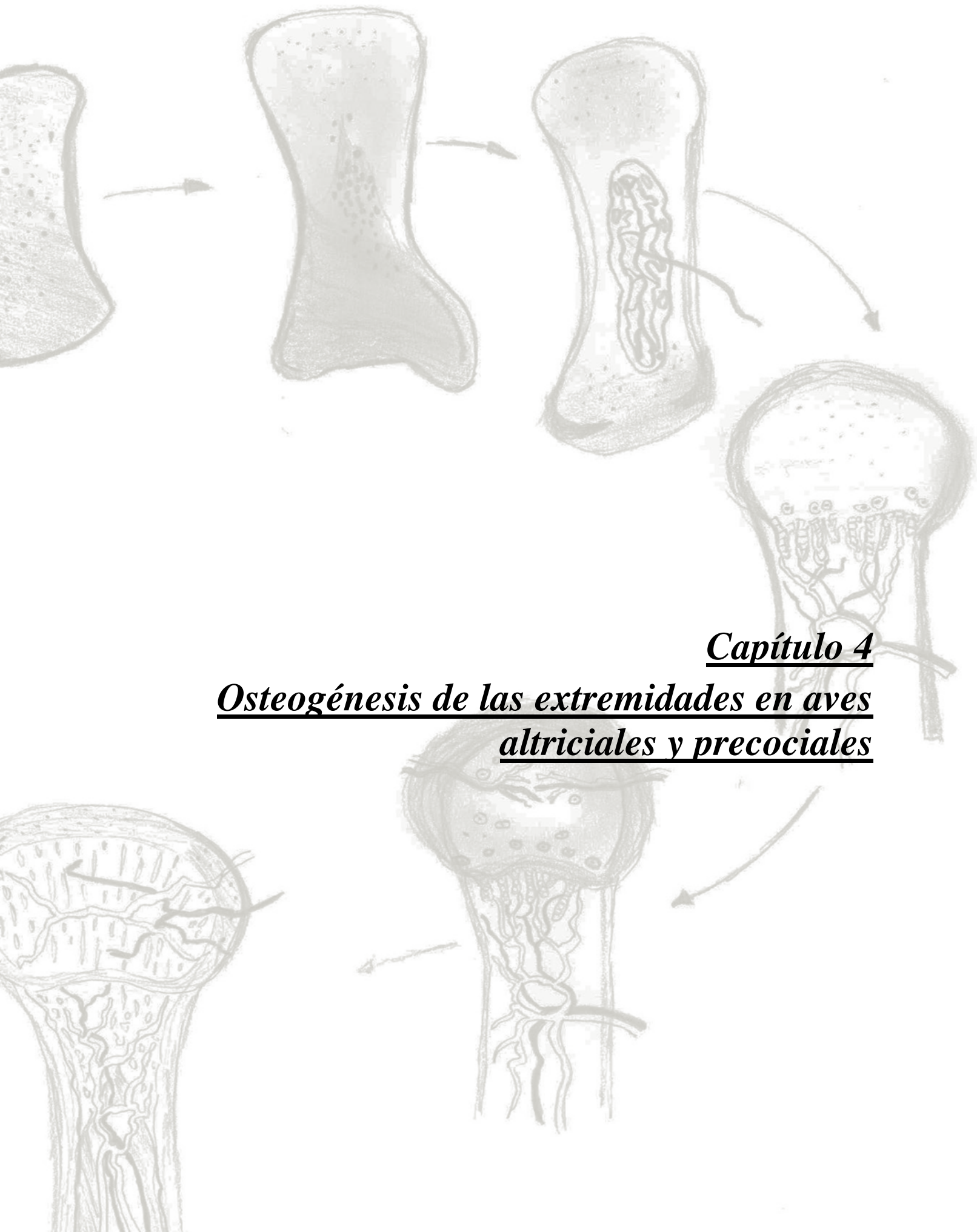


Bibliografía

- Francisco-Morcillo J, Bejarano-Escobar R, Rodríguez-León J, Navascués J, Martín-Partido G (2014) Ontogenetic Cell Death and Phagocytosis in the Visual System of Vertebrates. *Dev Dyn*. doi:10.1002/dvdy.24174
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2004) Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. *Anat Embryol (Berl)* 208 (4):289-299
- Gallina D, Todd L, Fischer AJ (2014) A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Exp Eye Res* 123:121-130. doi:10.1016/j.exer.2013.06.019
- García-Porrero JA, Ojeda, J.L. (1979) Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study *Experientia* 35:375-376
- García-Porrero JA, Colvee E, Ojeda JL (1984) Cell death in the dorsal part of the chick optic cup. Evidence for a new necrotic area. *Journal Embryology and Experimental Morphology* 80:241-249
- Georges P, Madigan MC, Provis JM (1999) Apoptosis during development of the human retina: relationship to foveal development and retinal synaptogenesis. *J Comp Neurol* 413 (2):198-208
- Harahush BK, Hart NS, Green K, Collin SP (2009) Retinal neurogenesis and ontogenetic changes in the visual system of the brown banded bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum* (Hemiscyllidae, Elasmobranchii). *J Comp Neurol* 513 (1):83-97. doi:10.1002/cne.21953
- Hensey C, Gautier J (1998) Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. *Developmental Biology* 203:36-48
- Hidalgo-Sánchez M, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2007) Changes in fiber arrangement in the retinofugal pathway of the turtle *Mauremys leprosa*: an evolutionarily conserved mechanism. *Brain Res* 1186:124-128
- Hidalgo-Sánchez M, Francisco-Morcillo J, Navascués J, Martín-Partido G (2006) Developmental changes in the fibre population of the optic nerve follow an avian/mammalian-like pattern in the turtle *Mauremys leprosa*. *Brain Res* 1113 (1):74-85
- Hoke KL, Fernald RD (1998) Cell death precedes rod neurogenesis in embryonic teleost retinal development. *Brain Res Dev Brain Res* 111 (1):143-146
- Hughes WF, McLoon SC (1979) Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destructions. *Exp Neurol* 66:587-601
- Hutson LD, Bothwell M (2001) Expression and function of *Xenopus laevis* p75(NTR) suggest evolution of developmental regulatory mechanisms. *J Neurobiol* 49 (2):79-98
- Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA (2008) Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (49):19508-19513. doi:0807453105 [pii] 10.1073/pnas.0807453105
- Knabe W, Kuhn HJ (1998) Pattern of cell death during optic cup formation in the tree shrew *Tupaia belangeri*. *J Comp Neurol* 401 (3):352-366. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981123)401:3<352::AID-CNE4>3.0.CO;2-A [pii]
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94:325-337
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan CY, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368-372
- Kuwabara T, Weidman TA (1974) Development of the prenatal rat retina. *Invest Ophthalmol* 13 (10):725-739
- Laemle LK, Puzkarczuk M, Feinberg RN (1999) Apoptosis in early ocular morphogenesis in the mouse. *Developmental Brain Research* 112:129-133
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J (1999) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412 (2):255-275
- Martín-Partido G, Rodríguez-Gallardo L, Álvarez IS, Navascués J (1988) Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anatomical Record* 222:272-281
- Mayordomo R, Valenciano AI, de la Rosa EJ, Hallböök F (2003) Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur J Neurosci* 18:1744-1750
- Morris AC, Schroeter EH, Bilotta J, Wong RO, Fadool JM (2005) Cone survival despite rod degeneration in XOPS-mCFP transgenic zebrafish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (12):4762-4771
- Moujahid A, Navascués J, Marín-Teva JL, Cuadros MA (1996) Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat Embryol (Berl)* 193 (2):131-144. doi:10.1007/BF00214704
- Navascués J, Martín-Partido G, Álvarez IS, Rodríguez-Gallardo L (1988) Cell death in suboptic necrotic centers of chick embryo diencephalon and their topographic relationship with the earliest optic fiber fascicles. *Journal of Comparative Neurology* 278:34-46
- Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, Takahashi M (2004) Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (37):13654-13659



- Pavón-Muñoz T, Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2016) Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* 88 (2):492-507. doi:10.1111/jfb.12802
- Penfold PL, Provis JM (1986) Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224 (6):549-553
- Pequignot M, Provost A, Salle S, Taupin P, Sainton K, Marchant D, Martinou J, Ameisen J, Jais JP, Abitbol M (2003) Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 228 (2):231-238
- Rodríguez-Gallardo L, Lineros-Domínguez Mdel C, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2005) Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: relationship to cell death and optic fibres. *Anat Embryol (Berl)* 210 (4):303-316. doi:10.1007/s00429-005-0051-3
- Sánchez-Farías N, Candal E (2016) Identification of Radial Glia Progenitors in the Developing and Adult Retina of Sharks. *Front Neuroanat* 10:65. doi:10.3389/fnana.2016.00065
- Silver J, Hughes FW (1973) The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J Morphol* 140:159-170
- Thummel R, Kassen SC, Montgomery JE, Enright JM, Hyde DR (2008) Inhibition of Müller glial cell division blocks regeneration of the light-damaged zebrafish retina. *Dev Neurobiol* 68 (3):392-408. doi:10.1002/dneu.20596
- Todd L, Fischer AJ (2015) Hedgehog signaling stimulates the formation of proliferating Müller glia-derived progenitor cells in the chick retina. *Development* 142 (15):2610-2622
- Trousse F, Esteve P, Bovolenta P (2001) Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* 21 (4):1292-1301
- Valenciano AI, Boya P, de la Rosa EJ (2009) Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int J Dev Biol* 53 (8-10):1515-1528
- Vecino E, Hernández M, García M (2004) Cell death in the developing vertebrate retina. *Int J Dev Biol* 48 (8-9):965-974
- Xiang M (2013) Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70 (14):2519-2532. doi:10.1007/s00018-012-1183-2
- Young RW (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229 (3):362-373



Capítulo 4
Osteogénesis de las extremidades en aves
altriciales y precociales

Resumen

La osificación endocondral es un proceso por el cual se sustituye un molde de tejido cartilaginoso por tejido óseo. El modelo experimental más utilizado para estudiar este proceso es la extremidad de vertebrados durante el desarrollo embrionario. En lo que respecta a las aves, todos los datos existentes a nivel histológico y molecular están referenciados a la gallina. En el presente capítulo se describe el proceso de osificación endocondral en *T. guttata* como modelo altricial y en *C. coturnix* como modelo precocial de aves. Para ello, se han utilizado técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas con marcadores condrogénicos y osteogénicos como Col2A1 y RUNX2 y osteocalcina respectivamente. Estas técnicas han puesto de manifiesto que el proceso de osificación se completa antes en la especie precocial que en la altricial. En el caso de la codorniz, la osificación tiene lugar en estadios similares a los de la gallina mientras que en la especie altricial se extiende hasta estadios postnatales. Esto da idea del estado de inmadurez que presenta el aparato locomotor de estas aves en el momento de la eclosión haciendo que se restrinja la movilidad de estas especies en individuos recién eclosionados y haciéndolas dependientes de un mayor cuidado parental.

Introducción



Uno de los sistemas que mejor ha sido caracterizado en vertebrados es la extremidad. Debido a esto ha sido utilizado en numerosos estudios con el fin de determinar los mecanismos moleculares que controlan su formación, el papel que juegan diversas proteínas en el desarrollo de la extremidad como las BMPs y FGFs, cómo tienen lugar la condrogénesis y osteogénesis y qué moléculas participan en estos procesos o la formación de los dígitos asociada a la PCD (Healy et al., 1999; Stricker et al., 2002; Yoon y Lyons, 2004; Yoshida et al., 2004; Goldring et al., 2006; Kawakami et al., 2006; Mackie et al., 2008; Long y Ornitz, 2013). En las extremidades al igual que en las vértebras y las costillas, el proceso de formación de hueso que se produce es el de osificación endocondral que a diferencia de la osificación intramembranosa, el mesénquima se diferencia en cartílago, el cual va a generar un molde que será posteriormente reemplazado por hueso.

Los condrocitos son las células que aparecen en el cartílago ocupando unas cavidades de la matriz denominadas condroplastos o lagunas. Este tipo celular procede de células madre mesenquimales y su proliferación es la causante del crecimiento longitudinal del hueso (Ducy, 2000). Además se encargan de sintetizar la matriz del cartílago siendo el componente fibrilar predominante el colágeno tipo IIa1 (Col2A1) (Mackie et al., 2008). Se puede hacer una distinción entre condroblastos (condrocitos jóvenes) y condrocitos, presentando los primeros una elevada actividad productora de matriz mientras que los segundos muestran una escasa actividad productora. Rodeando al cartílago existe una capa que actúa como transición hacia el tejido conjuntivo denominado pericondrio y que está constituido por dos capas, una más externa y una más interna. La primera se denomina capa fibrosa externa y está constituida esencialmente por capilares y fibras de colágeno mientras que la segunda, denominada capa condrogénica interna, presenta una serie de células mesenquimales indiferenciadas, que posteriormente pasan a convertirse en condroblastos, y muy pocas fibras (Kierszenbaum y Tres, 2016). El Col2A1 pertenece a aquellos colágenos que forman fibrillas; está constituido por dos cadenas $\alpha 1$ e interacciona con las células a través de receptores de colágeno de la familia de las integrinas y no-integrinas. Es un componente fundamental de la MEC junto con agreganos y su expresión viene regulada por Sox9 junto con L-Sox5 y Sox6 (Chimal-Monroy et al., 2003; Mackie et al., 2008; Gudman y Karsdal, 2016). Este componente se produce en la etapa de diferenciación de la condrogénesis como se describió en la introducción general, por lo tanto puede ser utilizado como un buen marcador de condrogénesis tardía.

En el tejido óseo nos vamos a encontrar diferentes tipos celulares, entre ellos células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los tres primeros tipos celulares pertenecen a la denominada estirpe osteoblástica mientras que los osteoclastos a la osteoclástica. Las células osteoprogenitoras proceden de células mesenquimales y tienen la capacidad de proliferar



y diferenciarse en osteoblastos. Aparecen recubriendo el hueso en las capas más internas del periostio y del endostio y permanecen durante la vida posnatal. Los osteoblastos son células de origen mesenquimal y son los encargados de sintetizar la matriz del hueso, regular la diferenciación de osteoclastos y participan en la homeostasis del calcio en la sangre (Nakashima y Crombrugge, 2003). Los osteoblastos forman una monocapa en las zonas donde la formación del hueso es más activa y presenta como productos el colágeno tipo I, la osteocalcina, la osteopontina y sialoproteína ósea (Kierszenbaum y Tres, 2016). Cuando la formación del hueso se completa, los osteoblastos se van a diferenciar a osteocitos, los cuales quedan alojados en las lagunas de la matriz ósea, presentando un aspecto ramificado y con capacidad de proliferación restringida, dirigiendo la mineralización y el mantenimiento del tejido óseo (Shao et al., 2018). Del proceso de reabsorción de la matriz mineralizada se encargan los osteoclastos. Estos proceden de la estirpe de células progenitoras de monocitos que se encuentran en la sangre y migran a los diferentes tejidos. Cuando llegan al hueso se fusionan formando células multinucleadas dando lugar a los osteoclastos que se unen a la matriz del hueso creando un ambiente ácido favoreciendo así la resorción ósea (Kierszenbaum y Tres, 2016; Katagiri y Takahashi, 2002).

La diferenciación de los osteoblastos está regulada por una serie de factores de transcripción, entre ellos, RUNX2 es fundamental para que se lleve a cabo este proceso (Fig. 58). Para que su expresión se active en las células mesenquimales y se induzca la diferenciación a células progenitoras de osteoblastos es preciso la presencia de *Ihh* y posteriormente, junto a *Sp7* estimula la diferenciación a osteoblastos inmaduros. Además de estos factores de transcripción, las BMPs juegan un importante papel interactuando con RUNX2 durante estos procesos. La expresión de *Runx2* va a estar restringida a las células de la periferia (Ducy, 2000; Katagiri y Takahashi, 2002; Chen et al., 2012; Komori, 2006, 2018; Kawane et al., 2018) y entre sus funciones también va a estar implicado en la activación del promotor de la osteocalcina (Ducy, 2000). La osteocalcina es un elemento fundamental de la MEC que puede ser utilizado como marcador del hueso en formación ya que se ha demostrado que promueve la formación del hueso y la mejora de las propiedades mecánicas así como la determinación del tamaño, la forma del mismo y dureza. Se ha considerado la osteocalcina como un marcador tardío de las fases más tardías de la osificación endocondral ya que se expresa únicamente en los osteoblastos maduros (Li et al., 2016; Bailey et al., 2018; Moser y van der Eerden, 2019). Pero estudios recientes han demostrado que la osteocalcina está implicada en otros procesos como la regulación de la secreción de insulina, el desarrollo del cerebro y la función cognitiva, la fertilidad masculina o la adaptación al ejercicio (Li et al., 2016; Moser y van der Eerden, 2019).

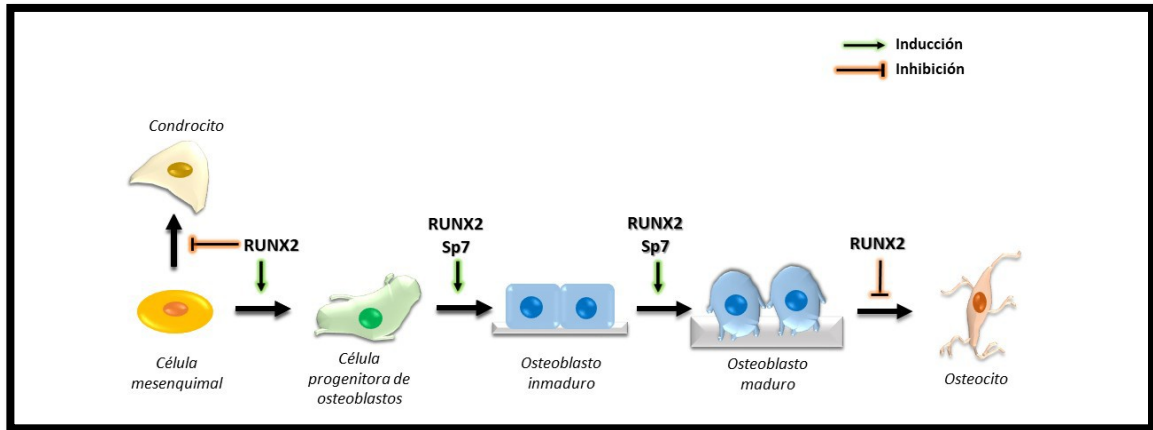


Figura 58. Proceso de diferenciación de los osteoblastos en el que RUNX2 juega un papel fundamental.

Adaptado de Komori et al., 2018.

El último paso en la diferenciación de las células de la estirpe osteoblástica consiste en la transformación de los osteoblastos a osteocitos. Uno de los marcadores que se expresan de manera temprana en este tipo celular es E11, el cual está regulado por Notch, un receptor transmembrana que permite la interacción célula-célula (Shao et al., 2018). En etapas tardías de diferenciación existen otras moléculas que nos van a permitir detectarlos como son Notch1, Jag1, DMP1 o Dkk1 y Dkk2 que son antagonistas de la vía Wnt (Kogianni y Noble, 2007; Shao et al., 2018). Cuando los osteocitos envían señales de Notch a los osteoblastos que están destinados a ser osteocitos, se estimula la expresión de E11 a través de la acción de Hes1 induciendo a su vez la expresión de *Dkk1* (Fig. 59). Recientemente se han encontrado evidencias de que los osteocitos tienen acción mecanostática de manera que pueden responder a cargas mecánicas y controlar la actividad de los osteoblastos y osteoclastos enviando diferentes señales además de remodelar su propio entorno perilagunar (Paic et al., 2009; O'Brien et al., 2013; Prideaux et al., 2016; Shao et al., 2018).

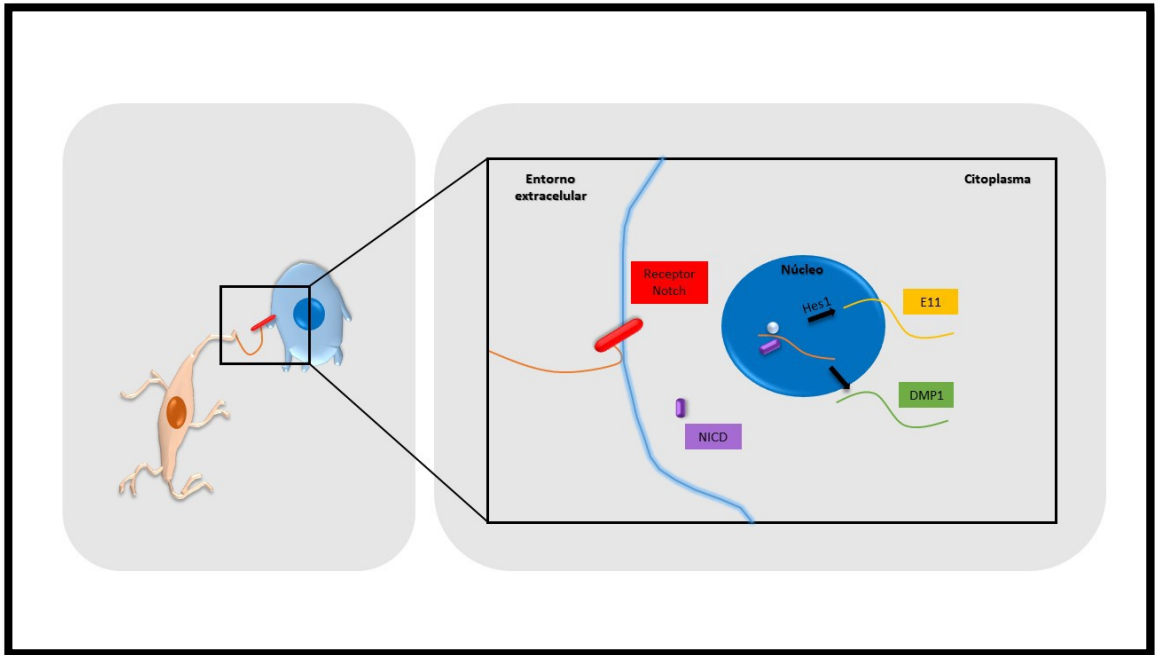


Figura 59. Esquema representando la interacción del receptor Notch con un osteocito induciendo así la diferenciación de osteoblastos.

Con el objetivo de determinar si existe diferencia en el proceso de osificación de las extremidades entre aves precociales y altriciales, se pretende detectar los principales factores implicados en el proceso y establecer una relación cuantitativa entre el estadio de desarrollo y el grado de osificación y, de esta manera, comparar los resultados obtenidos con los ya conocidos en un modelo ampliamente estudiado como la gallina común.

Objetivos

1. Describir el proceso de osificación endocondral en las extremidades inferiores de *T. guttata*.
2. Describir el proceso de osificación endocondral en las extremidades inferiores de *C. coturnix*.
3. Comparar los resultados obtenidos en ambas especies con los descritos en la bibliografía para otras aves.

Materiales y Métodos



1. Material de estudio

En el presente estudio se han utilizado individuos en estadios embrionarios y recién nacidos pertenecientes a tres especies de aves diferentes, *Taeniopygia guttata* (Vieillot, 1817), *Coturnix coturnix* (Linneo, 1758) y *Gallus gallus* (Linneo, 1758) (Fig. 60). Los individuos fueron procesados de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y del gobierno de España (Real decreto 53/2013). El número de individuos incluidos en el presente capítulo viene recogido en las tablas 3 y 4 (ver materiales y métodos, capítulo 1).

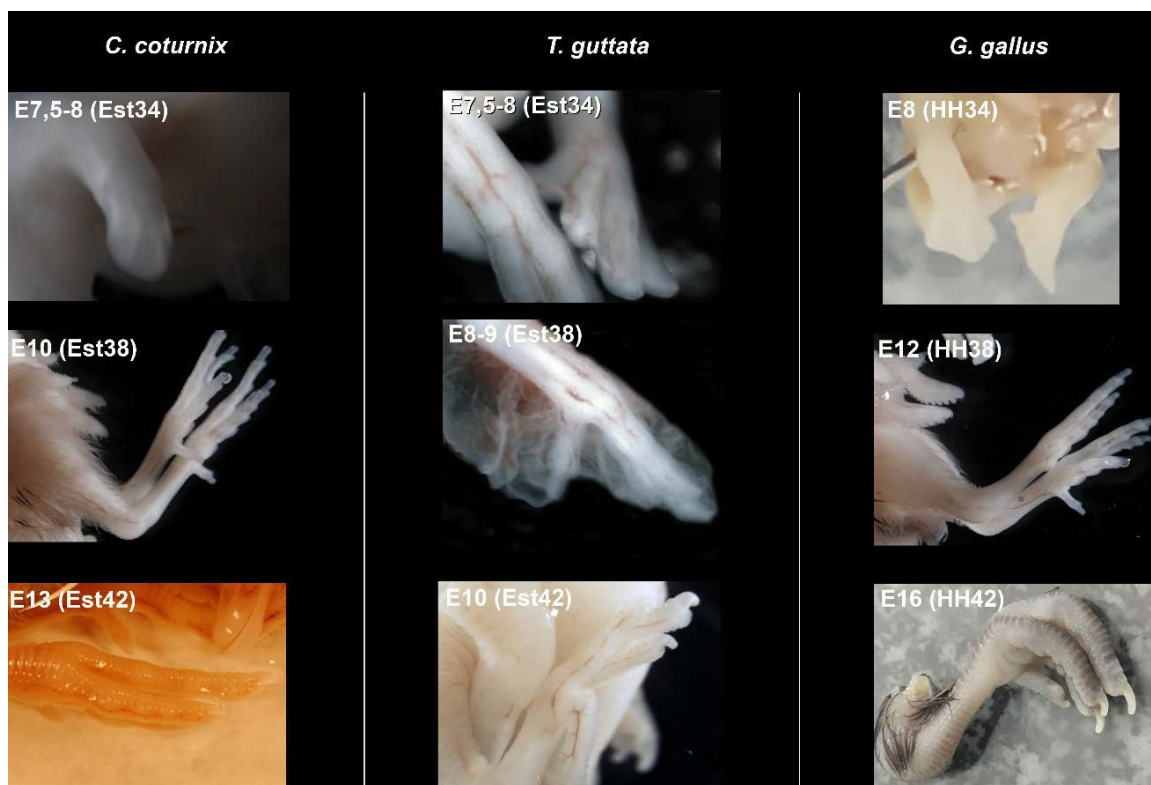


Figura 60. Extremidades inferiores de los estadios seleccionados para el presente estudio de *C. coturnix*, *T. guttata* y *G. gallus*.

Tras su fijación, los individuos fueron observados en un microscopio estereoscópico SMZ-1000 (Nikon) y las imágenes se adquirieron con una cámara digital DS-5Mc (Nikon) que luego fueron procesadas con el programa Adobe PhotoShop CS4.

El proceso de incubación, extracción, fijación, inclusión y obtención de secciones de las extremidades inferiores de los individuos se llevó a cabo como se describió en el capítulo 1.



2. Tinción de criosecciones

2.1. Tinción tricrómico de Mallory

Para el estudio morfológico del proceso de osteogénesis, las criosecciones fueron sumergidas en PBS a 40°C para eliminar la gelatina que rodeaba el tejido durante 15 minutos. Posteriormente fueron expuestas a HgCl₂ en horizontal 10 minutos y pasado este tiempo los portaobjetos se cubrieron con Licor de Lugol 10 minutos. El Lugol se retira mediante inmersión de las secciones en agua y a continuación se procede a la decoloración con tiosulfato de sodio al 5%. Se retira el tiosulfato de sodio con agua destilada y tras varios lavados se cubren las secciones con el colorante Mallory I durante un minuto. Se lavan los cortes y se cubren con ácido fosfomolibdico 3 minutos y se proceden a lavar en agua destilada. Se añade el colorante Mallory II 30 segundos y de nuevo se elimina el exceso de colorante en agua destilada. Para su montaje las secciones se deshidratan en concentraciones crecientes de etanol y xilol de un minuto y 30 segundos de duración cada paso y finalmente se procede al montaje con Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania).

3. Técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones

Para llevar a cabo el seguimiento del proceso de osificación endocondral de las tres especies de aves descritas anteriormente se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia simple siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1. Los anticuerpos utilizados en el presente estudio se detallan en la tabla 12.

Anticuerpos primarios	Dilución	Proveedor
Anticuerpo monoclonal anti-RUNX2 desarrollado en ratón	1:200	Santa cruz Biotechnology (sc-101145)
Anticuerpo monoclonal anti-osteocalcina (C-8) desarrollado en ratón	1:20	Santa cruz Biotechnology (sc-74495)
Anticuerpo monoclonal anti-COL2A1 (M2139) desarrollado en ratón	1:500	Santa cruz Biotechnology (sc-52658)
Anticuerpos secundarios	Dilución	Proveedor
Alexa Fluor 594 IgG anti-ratón desarrollado en cabra	1:200	Molecular Probes (Ref. A11032)
Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón desarrollado en cabra	1:200	Molecular Probes (Ref. A11029)

Tabla 12. Relación de anticuerpos utilizados en el presente capítulo.



4. Medida de osificación

Para llevar a cabo el estudio cuantitativo, se utilizaron embriones de las tres especies con días de incubación E8, E8-9, E10, E12, E16 y además, P1 y P5 en *T. guttata*. Se seleccionaron imágenes de los dígitos de diferentes individuos de cada estadio que fueron tratadas previamente con técnicas de inmunofluorescencia usando como anticuerpo Col2A1. En primer lugar, con el software ImageJ, se midió la longitud del elemento esquelético y posteriormente la longitud del tejido óseo que no presentaba marcaje. A continuación, con el software Excel, se procedió a calcular el porcentaje de osificación dividiendo la longitud de la región con ausencia de marcaje entre la longitud total y multiplicando este resultado por 100, tomando como medida para la representación la media. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias entre estadios se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Por último, la representación de los datos en gráfica se llevó a cabo con el programa R.

5. Observación de las secciones

La observación de las criosecciones sometidas a las técnicas de inmunofluorescencia y tinción de Mallory se realizó en un fotomicroscopio Nikon Eclipse 80i, obteniendo las imágenes digitales con una cámara Nikon digital camera DXM1200F acoplada al mismo. Las imágenes fueron optimizadas con el software Adobe PhotoShop versión CS4).

Resultados



Como hemos descrito en los capítulos previos, el desarrollo del sistema visual en aves altriciales se encuentra retrasado con respecto al de aves precociales. La permanencia en el nido desde la eclosión y la incapacidad de desplazarse de las especies altriciales plantea que tal vez las extremidades no se encuentren completamente desarrolladas tras este evento. Por tanto, nos propusimos llevar a cabo el seguimiento del proceso de osificación en las extremidades inferiores en las tres especies en estadios embrionarios y además, en estadios perinatales en la especie altricial.

1. Seguimiento del proceso de osificación en *T. guttata*

Para el seguimiento del proceso de osificación se analizaron los dígitos de las extremidades inferiores y se utilizaron técnicas de tinción histológicas, en concreto el tricrómico de Mallory, y técnicas de inmunohistoquímica para la detección de Col2A1, Runx2 y osteocalcina.

En los estadios tempranos de desarrollo el molde del futuro hueso estaba casi completamente formado por tejido condrogénico como mostró la tinción en E7,5-8 (Est34) (Fig. 61A-B) y la detección inmunohistoquímica de Col2A1 (Fig. 63A-F) cuya intensidad era un poco más débil en la región de la diáfisis. La tinción con el tricrómico de Mallory parece mostrar que la zona de hipertrofia emergió en la misma región donde el marcaje con Col2A1 era más tenue y se corresponde con la aparición de RUNX2 en la capa más externa del futuro hueso (Fig. 65A-F) aunque el porcentaje de osificación en este estadio era prácticamente de 0 (Fig. 75A). La zona de hipertrofia pareció extenderse un poco más hacia los extremos en E8 (Est36) (Fig. 61C-D) así como el marcaje de RUNX2 (Fig. 65G-I) pero hasta E8-9 (Est38) no se hizo más evidente el avance de este proceso en los dígitos más proximales como puso de manifiesto la ausencia de señal de Col2A1 (Fig. 63G-L) y el inicio de expresión de osteocalcina (Fig. 66A-B) indicando que la osificación en esta región se encontraba en una etapa tardía alcanzando un porcentaje de casi el 20% (Fig. 75). En los dígitos más distales no es hasta E10 (Est42) cuando se encuentran los condrocitos hipertróficos en la región de la diáfisis hacia los extremos (Fig. 61E-F). En este estadio la osificación sobrepasó el 30% (Fig. 75A) que a nivel inmunohistoquímico se observó en un incremento de la falta de marcaje de Col2A1 (Fig. 63M-O) y la extensión de la inmunoseñal de RUNX2 hacia los extremos de la estructura en la capa más externa (Fig. 65J-O). En los estadios previos a la eclosión las extremidades no habían finalizado su desarrollo y por ello llevamos a cabo el seguimiento de la osificación endocondral en estadios perinatales.

A nivel histológico, se observó que en P1 la zona de proliferación quedaba entre las epífisis y la diáfisis y se producía la invasión de los vasos por esta última (Fig. 62A-B) y en P5 la

proliferación había quedado reducida a unas pocas filas de células (Fig. 62C-D). En cuanto al análisis inmunohistoquímico, el primer día tras la eclosión todavía se detectó marcaje de Col2A1 en las estructuras más distales (Fig. 64A-C) a pesar de que se produjo un incremento en los depósitos de osteocalcina (Fig. 66D-F, D'F'). No es hasta P1, momento en el que la osificación alcanzó el 60% (Fig. 75), cuando la señal de Col2A1 desaparecía de los dígitos más proximales permaneciendo en los más distales, aunque más débilmente (Fig. 64D-I) y los depósitos de osteocalcina se liberaban no sólo en la región de la diáfisis sino también en regiones más extremas de la estructura (Fig. 66G-I). Coincidente con lo descrito para el análisis histológico, la detección de Col2A1 en P5 quedaba casi restringida a unas pequeñas bandas entre las epífisis y la diáfisis, la metáfisis (Fig. 64J-O), y la señal de osteocalcina ocupaba casi toda la extensión del hueso en la capa más externa pues en este punto, el nivel de osificación rozaba el 80% (Fig. 75).

El análisis de los estadios embrionarios y perinatales hasta P5 en el que la osificación no es completa nos mostró por tanto que este proceso debe completarse tras la eclosión como ocurre en el sistema visual descrito en el capítulo 1.

2. Seguimiento del proceso de osificación en *C. coturnix*

Una de las especies precociales seleccionadas para llevar a cabo la comparación del proceso de osificación es la codorniz común. El seguimiento de este proceso se realizó en estadios embrionarios ya que en los días previos a la eclosión la formación del hueso era casi completa.

El primer signo de osificación se detectó en los primeros estadios de desarrollo en los que la tinción con el tricrómico de Mallory puso de manifiesto la presencia de una pequeña zona de hipertrofia en la región de la diáfisis en E6 y E7,5-8 (Est30 y 34) (Fig. 67A-B), la señal de Col2A1 era débil en las regiones más centrales (Fig. 68A-C) y RUNX2 comenzó a expresarse en la capa más externa del hueso (Fig. 69A-C). En E7,5-8 (Est34) se cuantificó que la osificación había alcanzado un porcentaje de aproximadamente el 16% y los primeros depósitos de osteocalcina se detectaron en E8-9 (Est36) (Fig. 70A-C, A'-C') en la capa más externa de la región de la diáfisis. Las estructuras más proximales en E10 (Est38) mostraban que la zona de hipertrofia se había desplazado ligeramente hacia las epífisis aunque la zona proliferativa todavía ocupaba gran parte de la superficie (Fig. 67C).



Además, se pudo observar una caída acusada en el marcaje de Col2A1 en la región de la diáfisis de los dígitos (Fig. 68D-I) con respecto a los estadios anteriores y un incremento de la señal de RUNX2 que se extendía hacia las epífisis en la capa más externa (Fig. 69D-I) y de osteocalcina, la cual todavía se encontraba restringida a la región de la diáfisis (Fig. 70D-F) coincidiendo con el análisis cuantitativo que mostraba un porcentaje de casi el 50% de osificación.

En los estadios previos a la eclosión, la inmunoseñal de Col2A1 era cada vez más débil como ocurre en E12-13 (Est42) incluso en las estructuras más distales (Fig. 68J-L), el marcaje con anti-RUNX2 abarca toda la longitud del hueso en la capa más externa (Fig. 69J-O) y los depósitos de osteocalcina se detectan hasta en las regiones más extremas del hueso (Fig. 70G-I, G'-I') alcanzando el 65% de la osificación en este estadio (Fig. 75B). El análisis histológico de la extremidad en el día previo a la eclosión muestra un tejido constituido casi completamente por zonas de hipertrofia e invasión de los vasos (Fig. 67D, D').

3. Seguimiento del proceso de osificación en *G. gallus*

El ave precocial modelo por excelencia en estudios de desarrollo es la gallina común y por ello fue seleccionada para llevar a cabo el estudio comparativo del proceso de osificación.

Los dígitos en E6,5 (HH30) ya presentaban la zona de hipertrofia en la región de la diáfisis como mostró la tinción de Mallory (Fig. 71A) y el débil marcaje de Col2A1 en la misma zona en los dígitos más proximales (Fig. 72A-F). En cortes transversales de la diáfisis en estas mismas estructuras se pudo detectar la señal de RUNX2 en la capa más externa del futuro hueso (Fig. 73A-C). Un patrón similar presentó en E8 (HH34) tanto en la tinción con el tricrómico de Mallory (Fig. 71B) como en el inmunomarcaje de Col2A1 (Fig. 72G-I) sin embargo, la expresión de RUNX2 se había desplazado ligeramente hacia las epífisis (Fig. 73D-I) y el análisis cuantitativo mostró un porcentaje de osificación de aproximadamente el 22% (Fig. 75). No fue hasta E10 (HH36) cuando se observó la presencia de los primeros depósitos de osteocalcina (Fig. 74A-C, A'-C') en la región de la diáfisis. En E12 (HH38) la zona de proliferación e hipertrofia se desplazaron a una zona entre las epífisis y la diáfisis y en esta última parecía emerger la zona de invasión vascular (Fig. 71C) cuando la osificación había alcanzado aproximadamente el 52% (Fig. 75). A nivel inmunohistoquímico se observó una notable ausencia de expresión de Col2A1 tanto en la diáfisis como en las epífisis (Fig. 72J-L), en los dígitos más distales la señal de RuNX2 ya se estaba extendiendo hacia las regiones más extremas de la estructura (Fig. 73J-O) y se había producido un incremento considerable de los depósitos de osteocalcina en la diáfisis (Fig. 74D-F).

En los estadios cercanos a la eclosión, concretamente en E16 (HH42), cuando la osificación era del 80% (Fig. 75), se pudo observar cómo ya se había producido la invasión vascular (Fig. 71D) y el marcaje de Col2A1 había quedado relegado a una pequeña franja entre las epífisis y la diáfisis (Fig. 72M-O). El análisis de la expresión de RUNX2 mostró que en los dígitos más distales ocupaba casi toda la longitud de la estructura (Fig. 73P-U) y los depósitos de osteocalcina habían alcanzado las epífisis (Fig. 74G-I, G'-I').

Figuras

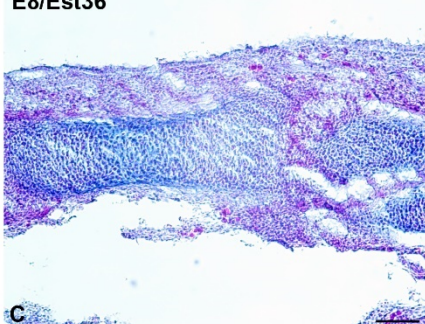
Figura 61. Criosecciones teñidas con el tricrómico de Mallory de la extremidad inferior de *T. guttata* en estadios embrionarios. En el E7,5-8 (A-B) la estructura está formada por fibras de colágeno como pone de manifiesto el colorante azul que se une específicamente a éstas (B). Se observa la tinción de los primeros núcleos en E8 en el centro de osificación primario (C-D). El número de núcleos teñidos aumenta en E10 y parece extenderse del centro a los extremos (E-F).
Barra de aumentos: 100µm.

E7,5-8/Est34



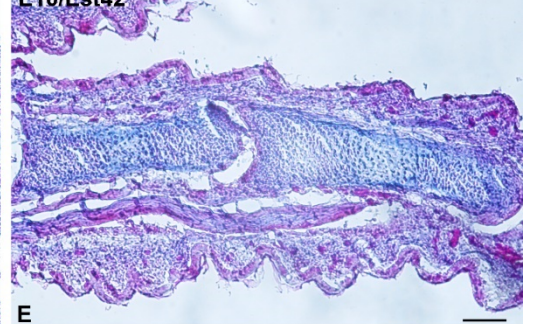
A

E8/Est36

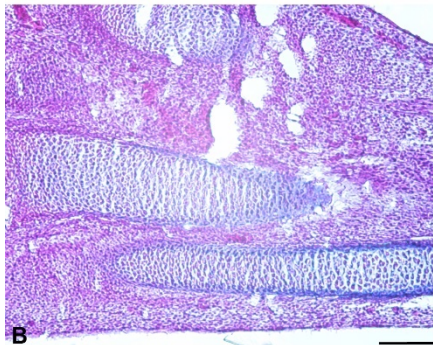


C

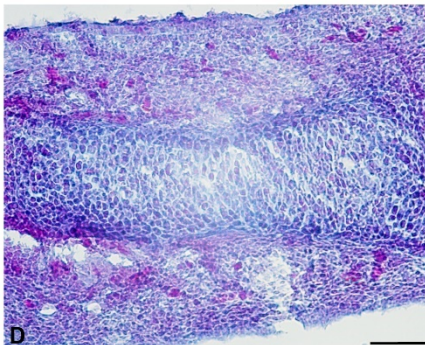
E10/Est42



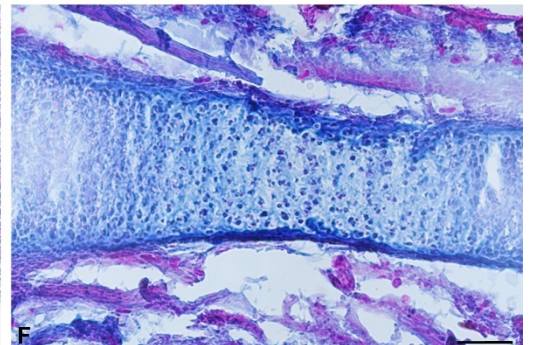
E



B



D



F

Figura 62. Criosecciones teñidas con el tricrómico de Mallory de la extremidad inferior de *T. guttata* en estadios perinatales. Se observa una mejor definición en la estructura de las células de la matriz ósea en el centro primario de osificación en P1 además de la entrada de glóbulos rojos al mismo (A-B). En P5 El número de núcleos teñidos aumenta en el centro de osificación primario extendiéndose a los extremos (C-D). *Barra de aumentos: 100μm.*

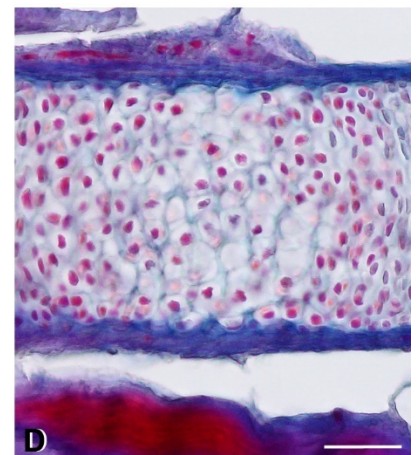
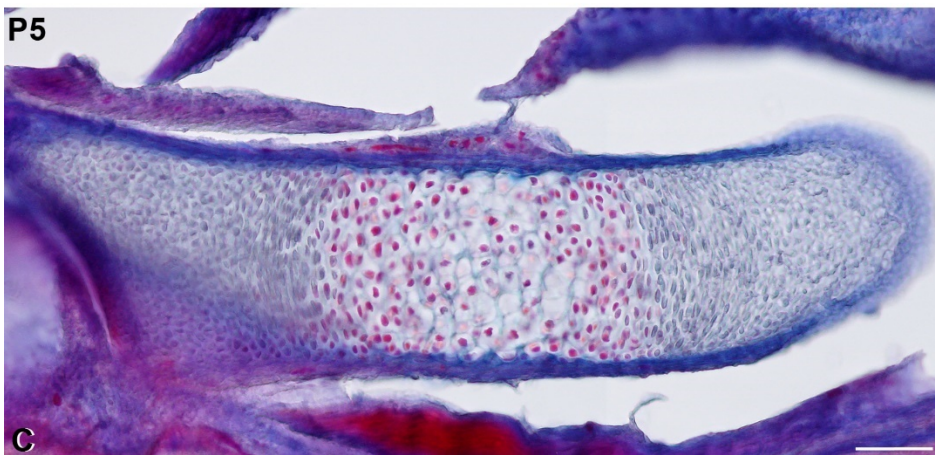
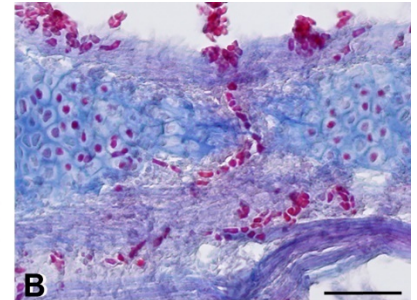
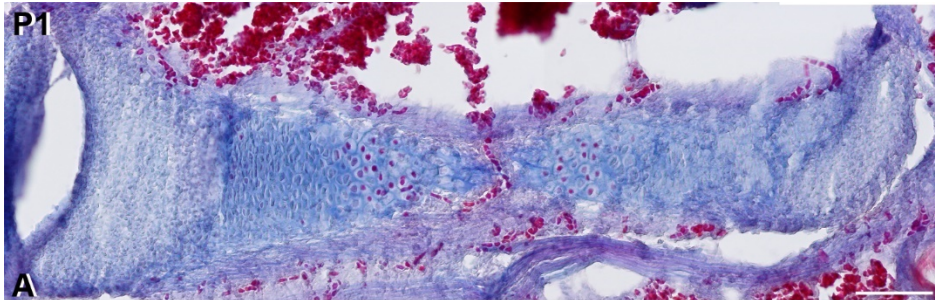


Figura 63. Inmunodetección de Col2A1 en la extremidad inferior de individuos de *T. guttata* en estadios embrionarios. La inmunoseñal de Col2A1 en E7,5-8 ocupa la totalidad del molde de la extremidad (A-F). En E8-9 (G-L) se puede detectar la primera región Col2A1-negativa (corchetes en K-L). Esta ausencia de inmunomarcage de Col2A1 se extiende ligeramente en E10 (corchete M-O). *Barra de aumentos: 100μm.*

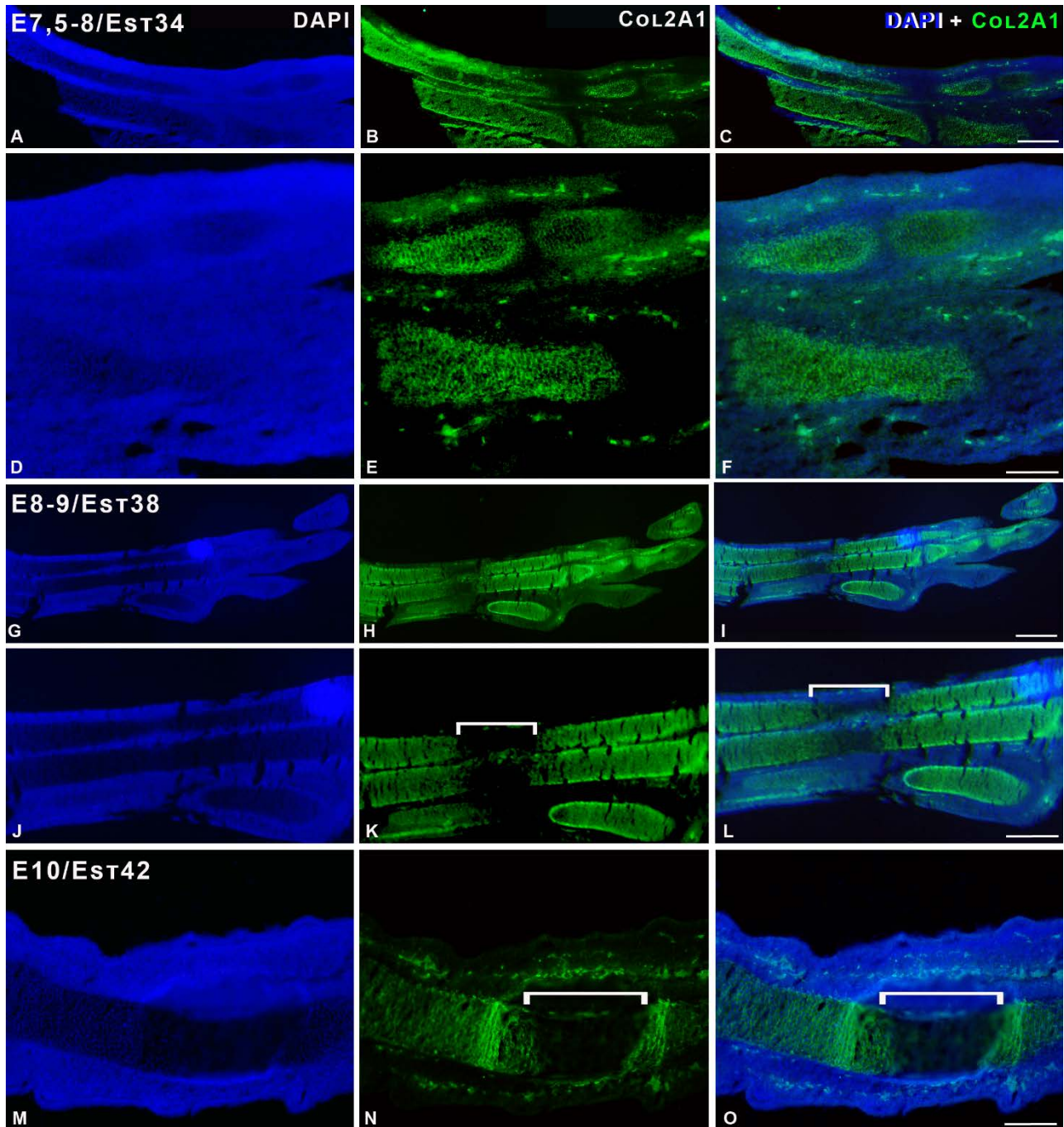


Figura 64. Inmunodetección de Col2A1 en la extremidad inferior de individuos de *T. guttata* en estadios perinatales. El día de la eclosión (A-C) el marcaje de Col2A1 queda restringido a las regiones más distales y las zonas Col2A1-negativas se han extendido (corchetes B-C). En P1 (D-I) las estructuras más proximales están completamente osificadas y las más distales todavía presentan pequeñas regiones no inmunorreactivas a Col2A1 (corchetes E-F). La ausencia de marcaje en las estructuras más distales (corchetes K-L) se extiende en P5 (J-O). *Barra de aumentos: 100µm.*

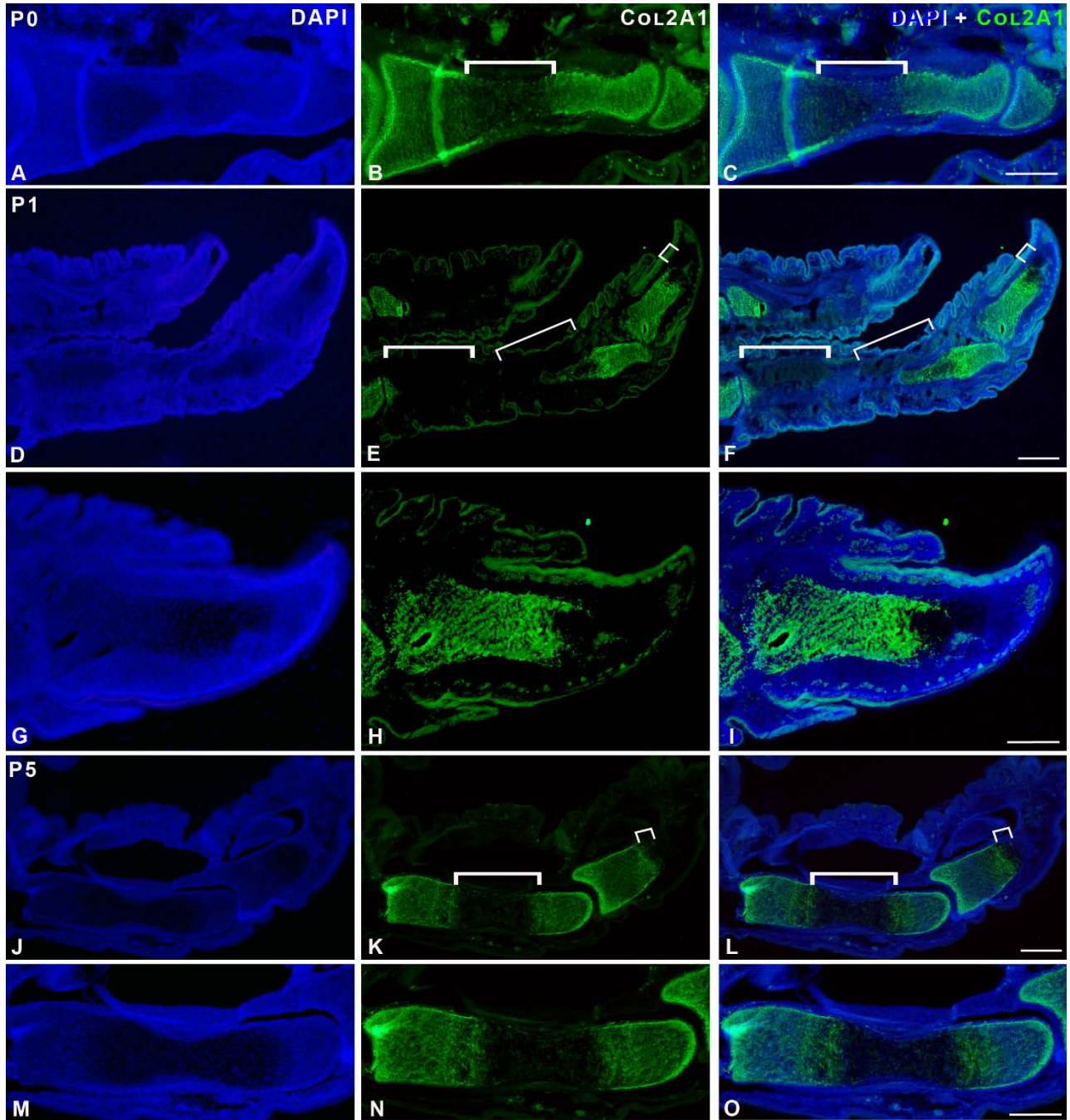


Figura 65. Expresión de RUNX2 en las extremidades inferiores de *T. guttata* en distintos estadios embrionarios. La inmunoseñal de Runx2 en E7,5-8 (A-F) se detecta fuertemente en las estructuras más proximales (B-C) en las capas más externas del hueso (E-F). En E8 (G-I) el marcaje se mantiene en las mismas regiones. Las estructuras más distales son RUNX2 en sus capas más externas en E10 (J-O). *Barra de aumentos: 100µm en A-O; 30µm en I'.*

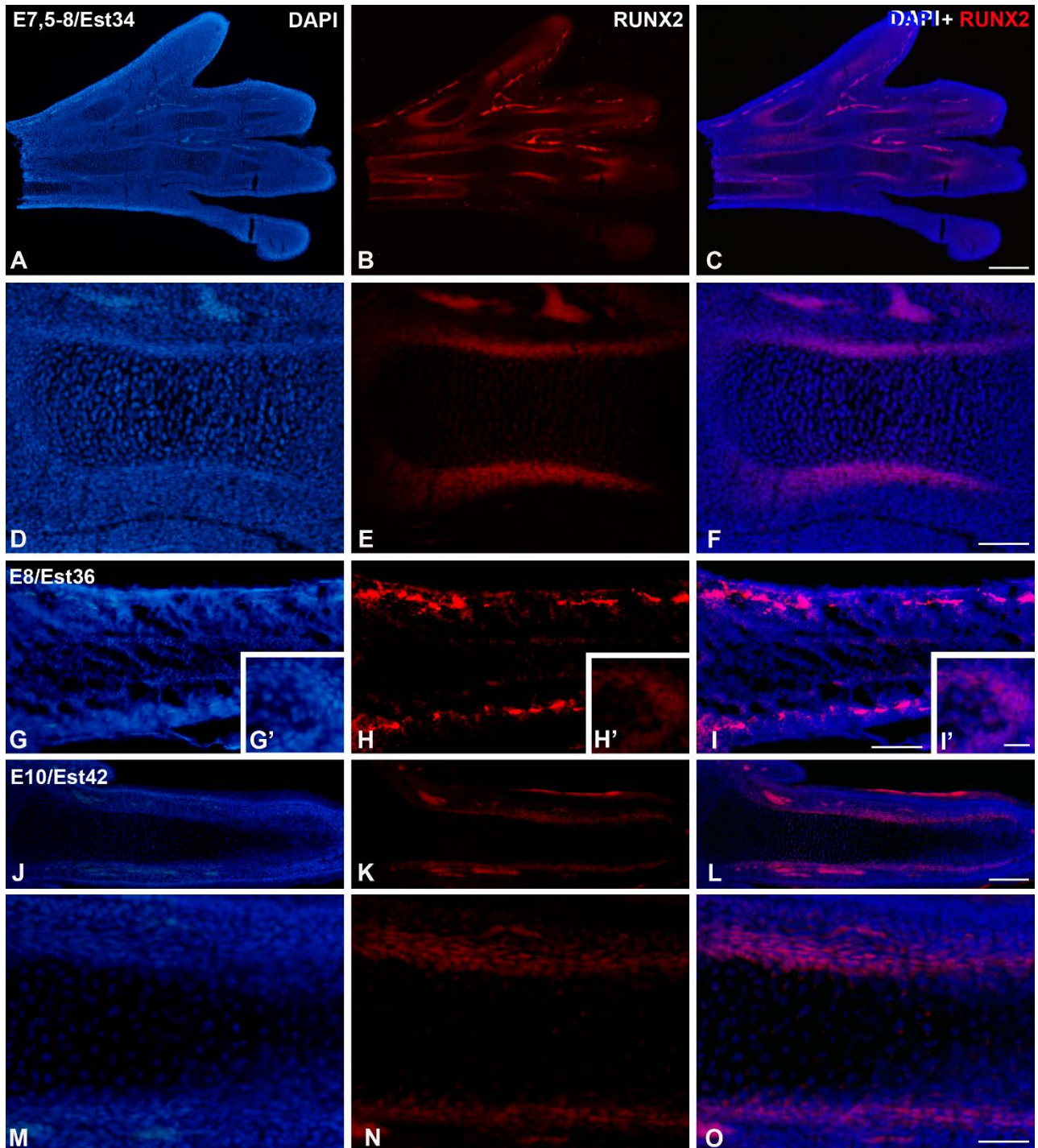


Figura 66. Detección de osteocalcina en las extremidades inferiores de *T. guttata* en E8-9 (A-C), P0 (D-F, D'-F'), P1 (G-I) y P5 (J-O). La inmunoseñal de osteocalcina se localiza en la región central del hueso en las capas más externas en E8-9 (B-C). En P0 se extiende a los extremos (E-F) y a mayores aumentos se pueden observar los depósitos de osteocalcina con mayor claridad (E'-F'). En P1 (G-I) y P5 (J-O) el inmunomarcage puede observarse en toda la longitud de la estructura siendo los depósitos más abundantes en P5 (N-O). *Barra de aumentos: 100 μ m en A-O; 30 μ m en D'-F'.*

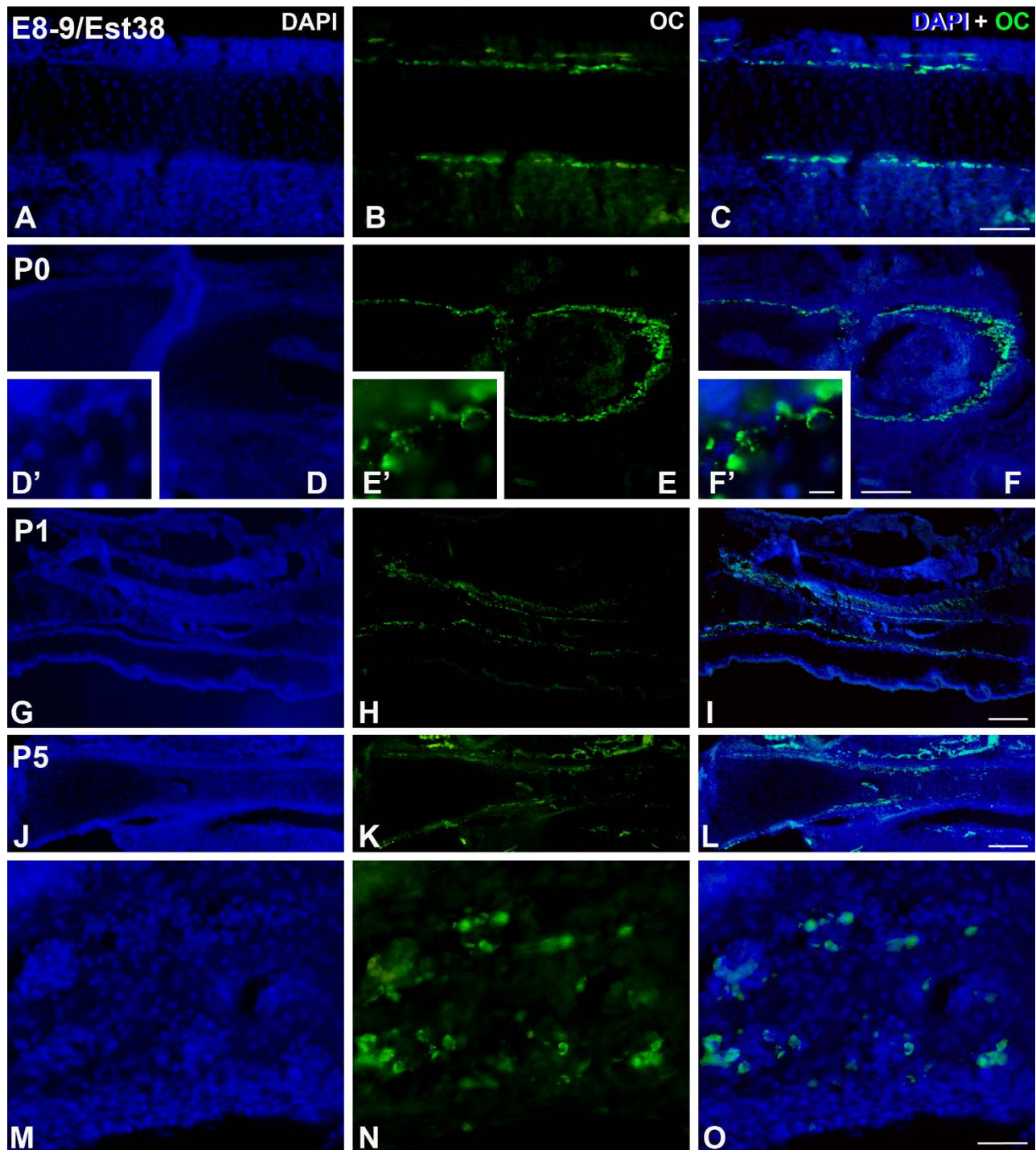


Figura 67. Tinción de Mallory sobre criosecciones de las extremidades inferiores de *C. coturnix* en estadios embrionarios. En el E10 (C) ya se puede observar la transición de zona proliferativa-zona de hipertrofia en las regiones más cercanas a las epífisis mientras que en la diáfisis ya encontramos una entre zona de hipertrofia y la de invasión vascular (C'). Las zonas de proliferación e hipertrofia quedan relegadas a las epífisis en E16 (D,D'). *Barra de aumentos: 100 μ m en A-D; 30 μ m en C',D'.*

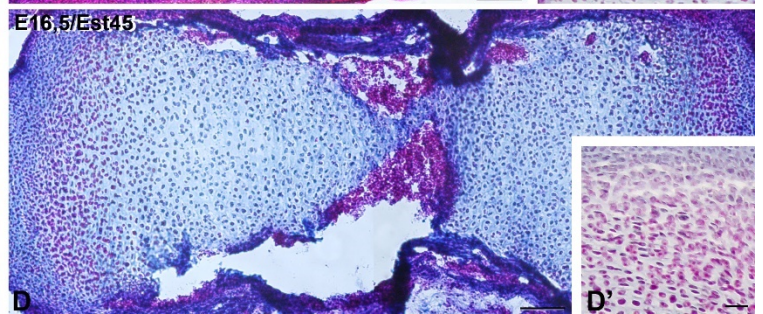
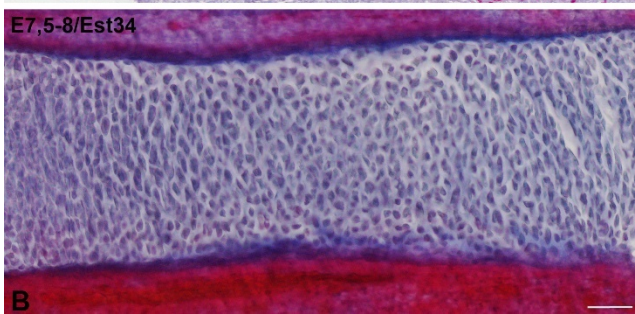
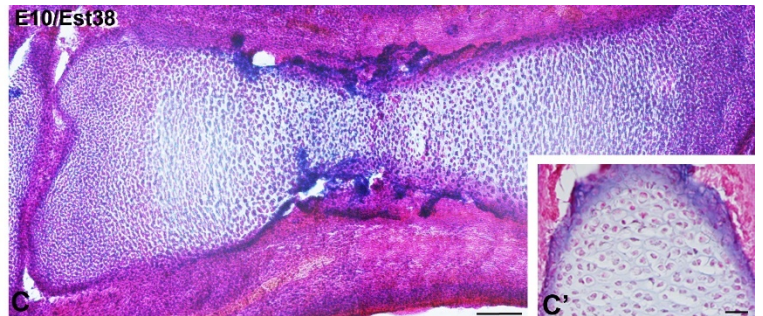
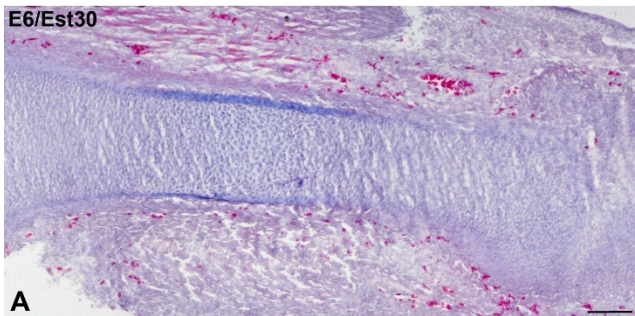


Figura 68. Inmunomarcage de Col2A1 en las extremidades inferiores de *C. coturnix* en estadios embrionarios. La expresión de Col2A1 aparece débil en E7,5-8 (B-C) mientras que en E10 (D-I) ya aparece la región de la diáfisis como Col2A1 negativa (corchetes en E-F y H-I). La ausencia de inmunoseñal se extiende hacia las epífisis en E12-13 (corchetes en K-L) en las estructuras más distales. *Barra de aumentos: 100µm.*

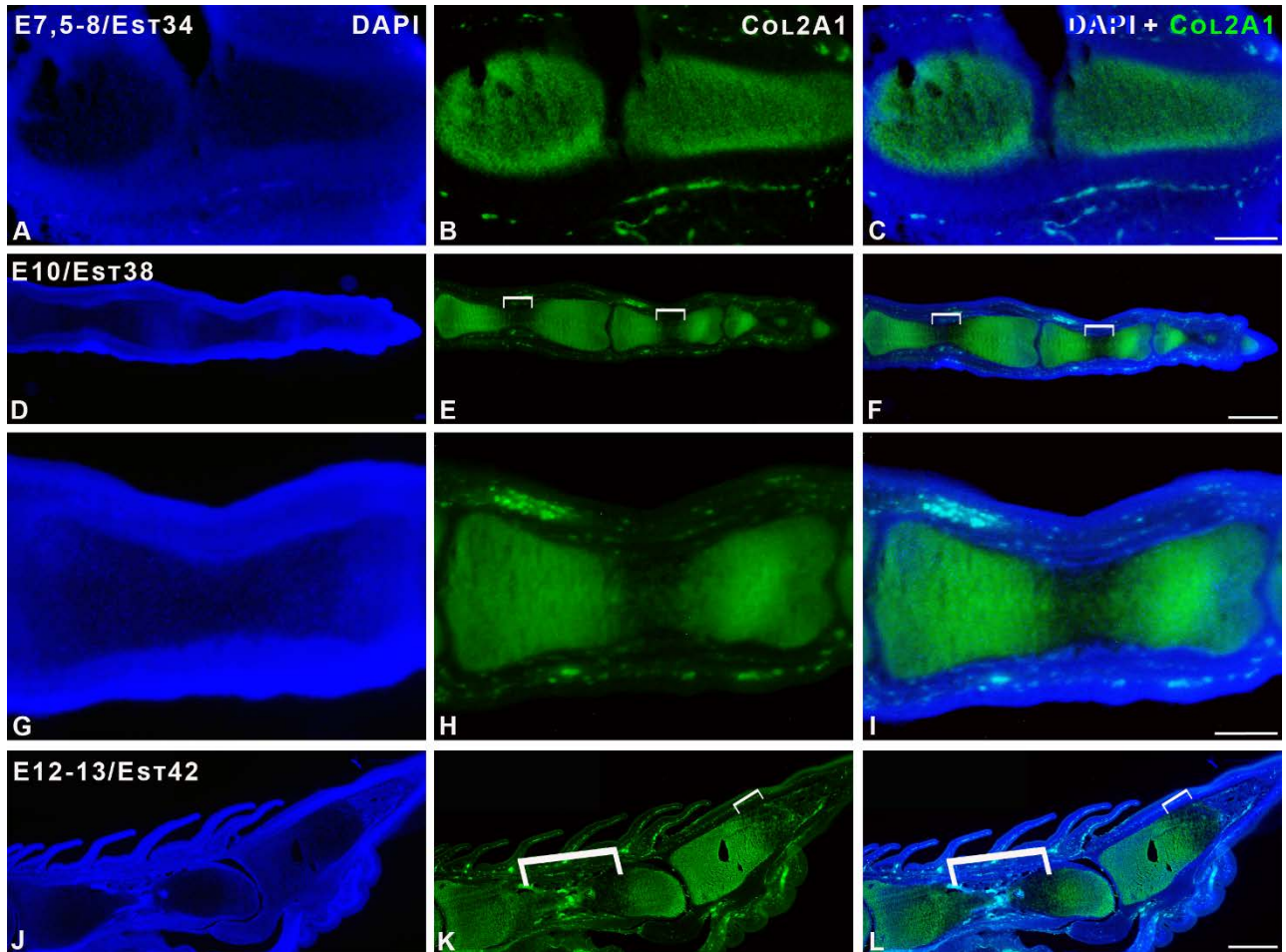


Figura 69. Detección de RUNX2 en las extremidades inferiores de *C. coturnix* en estadios embrionarios. RUNX2 se localiza en las estructuras más proximales en el E6 (B-C). En E10 (D-I) ya aparece tanto en las estructuras proximales como distales en las capas más externas del hueso cercanas a la zona de la diáfisis (corchetes en E-F). La inmunoseñal se extiende hacia las epífisis en las capas más externas del hueso (corchetes K-L) en E11 (J-O). *Barra de aumentos: 100μm.*

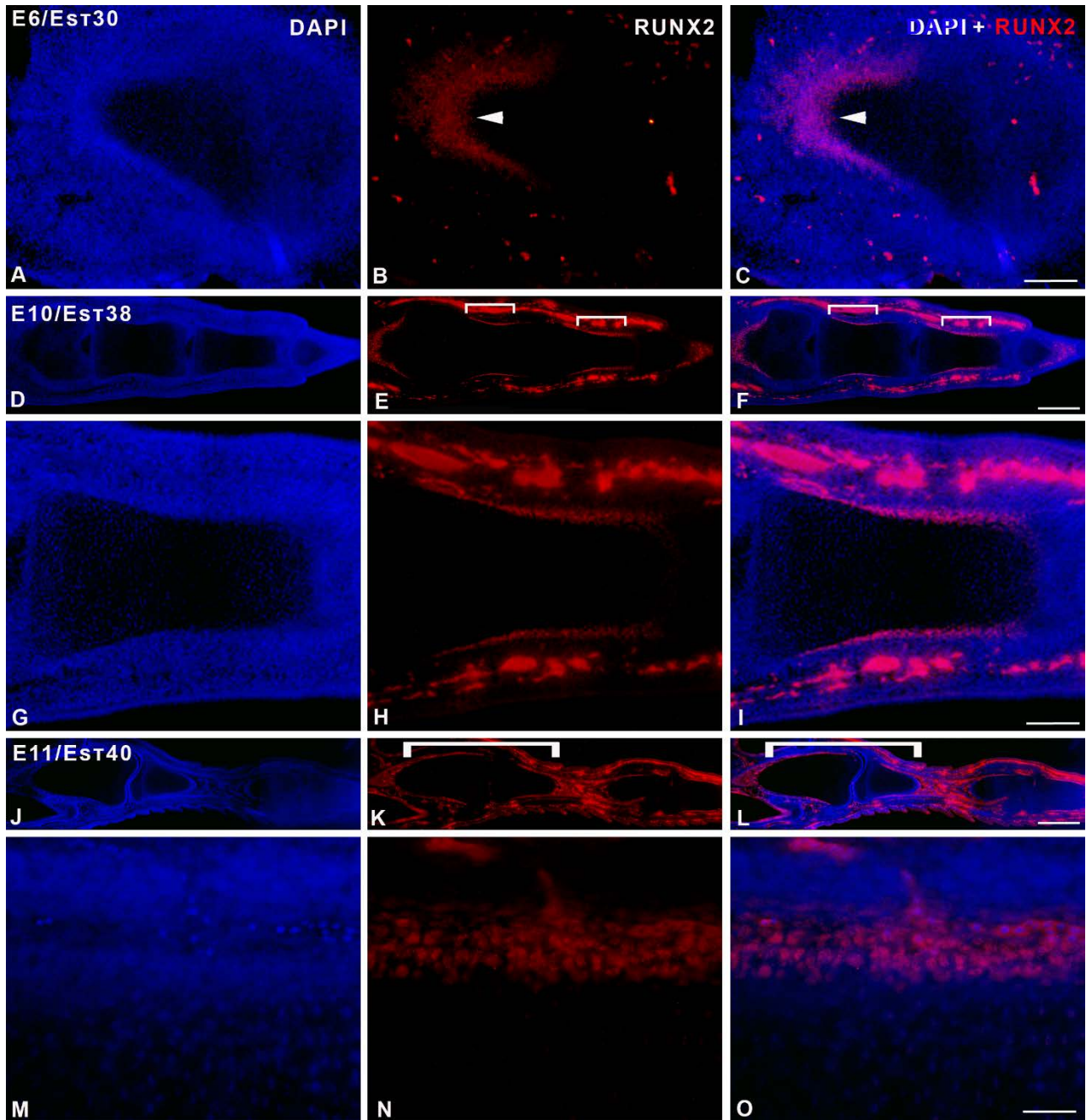


Figura 70. Expresión de osteocalcina en las extremidades inferiores de *C. coturnix* en estadios embrionarios. Se detectan depósitos de osteocalcina en la región de la diáfisis en la capa más externa del hueso (flechas en B-C, aumentos B'-C') en E8-9. En E10 (D-F, D'-F') se observa un incremento de los depósitos de osteocalcina (flechas en E-F). En secciones transversales más distales de la extremidad en E12-13 (G-I, G'-I') la detección de osteocalcina es más débil que en regiones más centrales (flechas en H-I). *Barra de aumentos: 100 μ m en A-I; 30 μ m en A'-I'.*

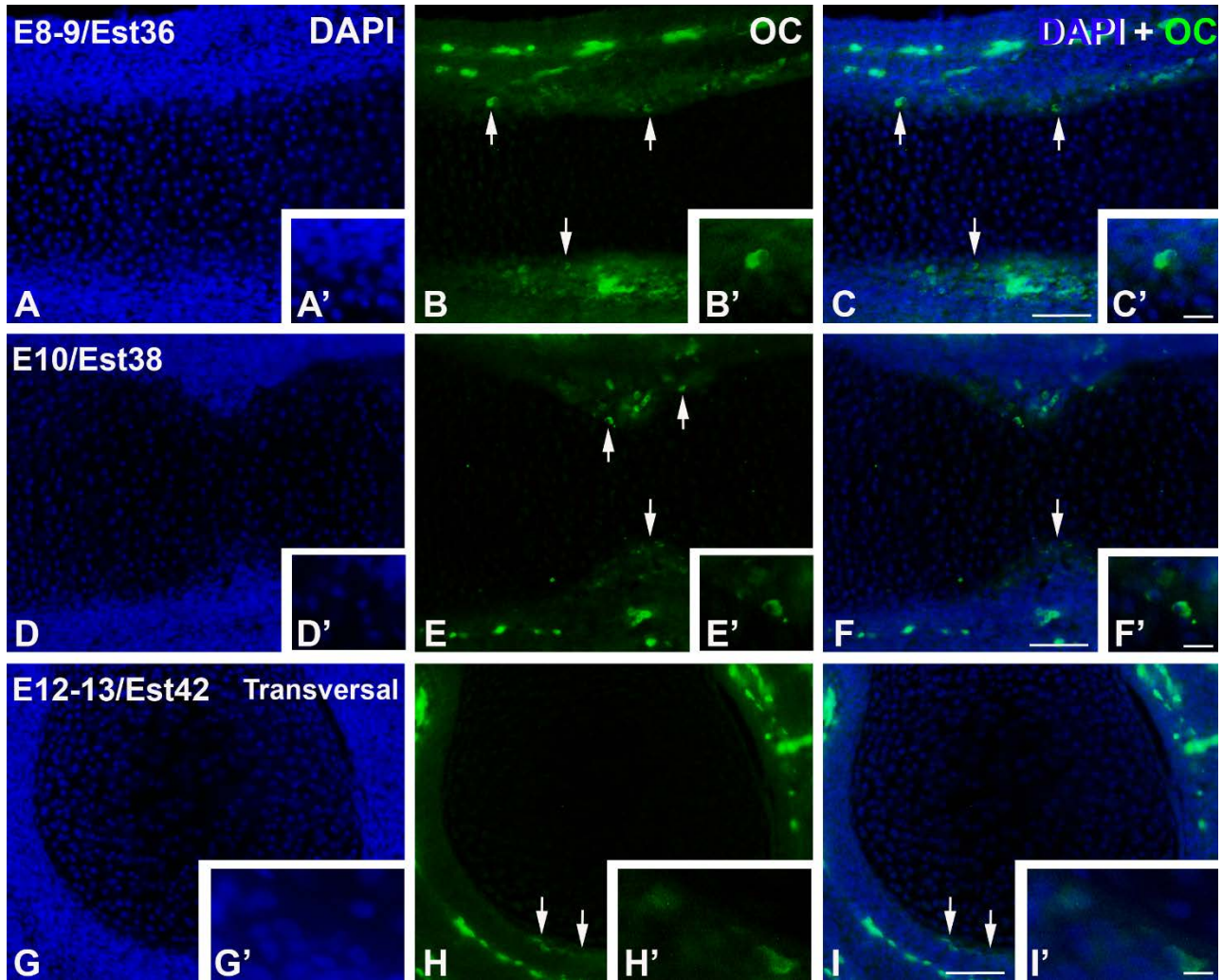


Figura 71. Criosecciones de las extremidades inferiores de *G. gallus* sometidas a la tinción de Mallory en estadios embrionarios. Tanto en E6,5 (A) como en E8 (B) se pueden observar las fibras de colágeno marcadas en azul. En E6,5 ya se detecta la zona de hipertrofia en la diáfisis. La zona de proliferación se traslada a regiones más extremas en E12 (C) y queda relegada a las epífisis en E16 (D). *Barra de aumentos: 100μm.*

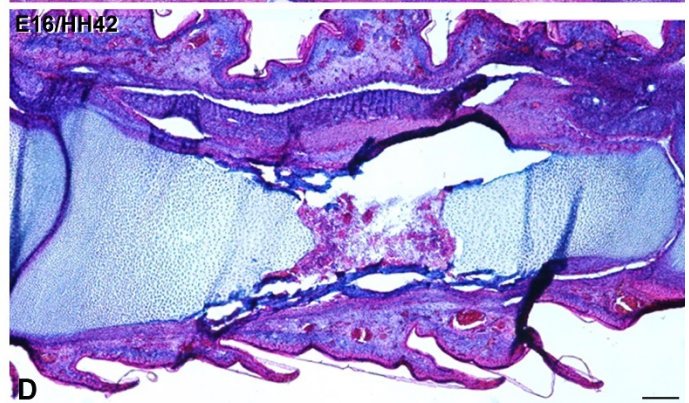
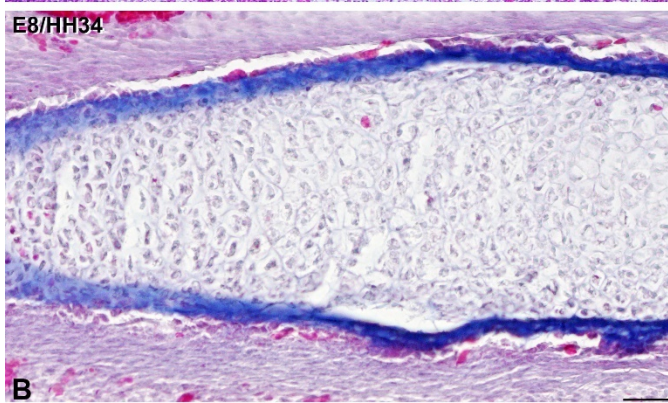
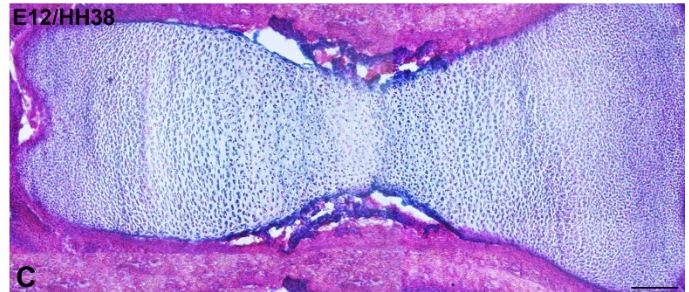
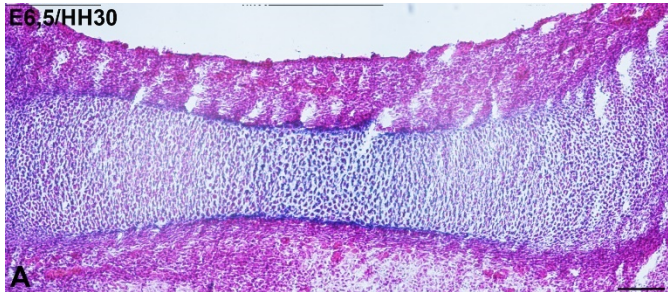


Figura 72. Detección de la expresión de Col2A1 en las extremidades inferiores de *G. gallus* en estadios embrionarios. La ausencia de marcaje de Col2A1 aparece en la región de la diáfisis en E6,5 (A-F) en las estructuras más proximales (corchetes en B-C) al igual que ocurre en E8 (G-I). En E12 (J-L) la señal de Col2A1 queda localizada entre la diáfisis y las epífisis en las cuales no se detecta (corchetes en K-L). La falta de marcaje de Col2A1 en E16 es casi completa en toda la extensión del hueso (corchetes en N-O). *Barra de aumentos: 100µm.*

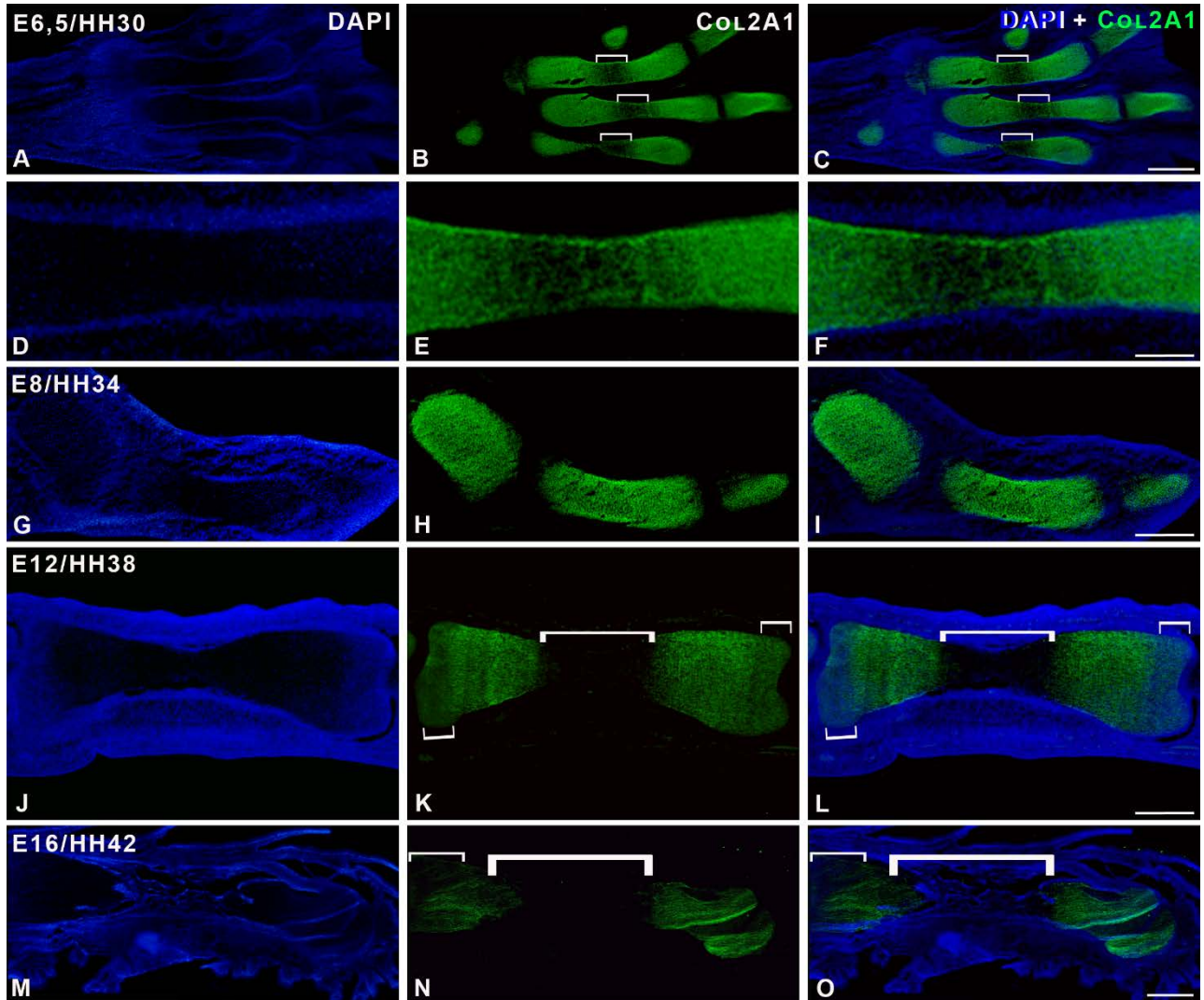


Figura 73. Localización de RUNX2 en criosecciones de las extremidades inferiores de *G. gallus* en estadios embrionarios. En E6,5 se detecta la primera señal de RUNX2 en la capa más externa del hueso (A-C). La expresión de RUNX2 se localiza en E8 (D-I) en la región de la diáfisis en la capa más externa (corchetes en E-F). En E12 (J-O) la inmunoseñal se extiende a las estructuras más distales localizándose en la diáfisis hacia las epífisis (corchetes en K-L). La porción más distal de la estructura presenta inmunorreactividad a RUNX2 (corchetes en Q-R) en E16 (P-U). *Barra de aumentos: 100µm.*

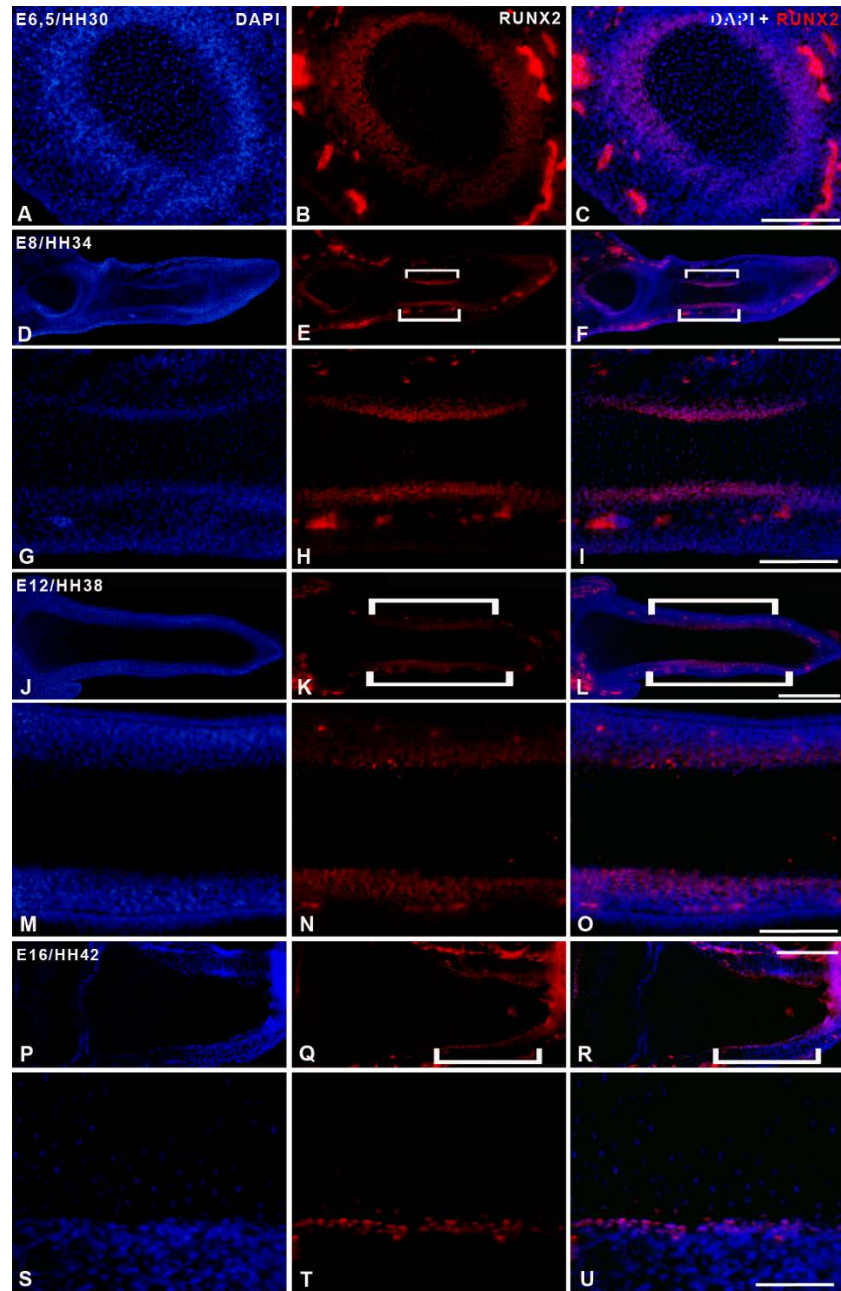


Figura 74. Inmunodetección de osteocalcina en criosecciones de las extremidades inferiores de *G. gallus* en estadios embrionarios. En E10 (A-C, A'-C') se localizan los primeros depósitos de osteocalcina (flechas en B-C, aumentos B'-C'). Estos depósitos son más numerosos en E12 (D-F) en la región de la diáfisis. La liberación de osteocalcina se extiende en E16 (G-I, G'-I') hacia las epífisis (flechas en H-I, aumentos H'-I'). *Barra de aumentos: 100 μ m en A-I; 30 μ m en A'-C', G'-I'.*

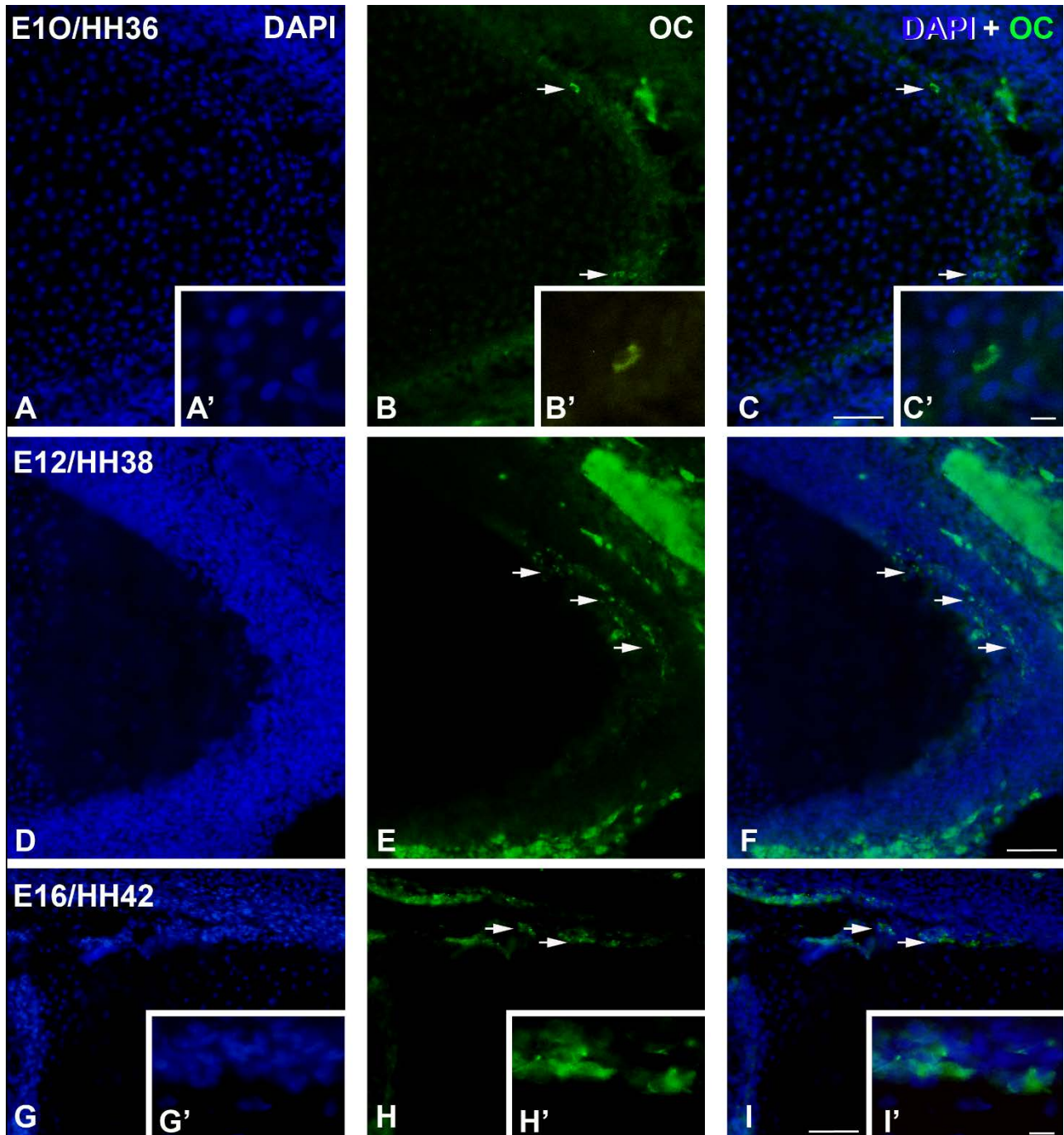
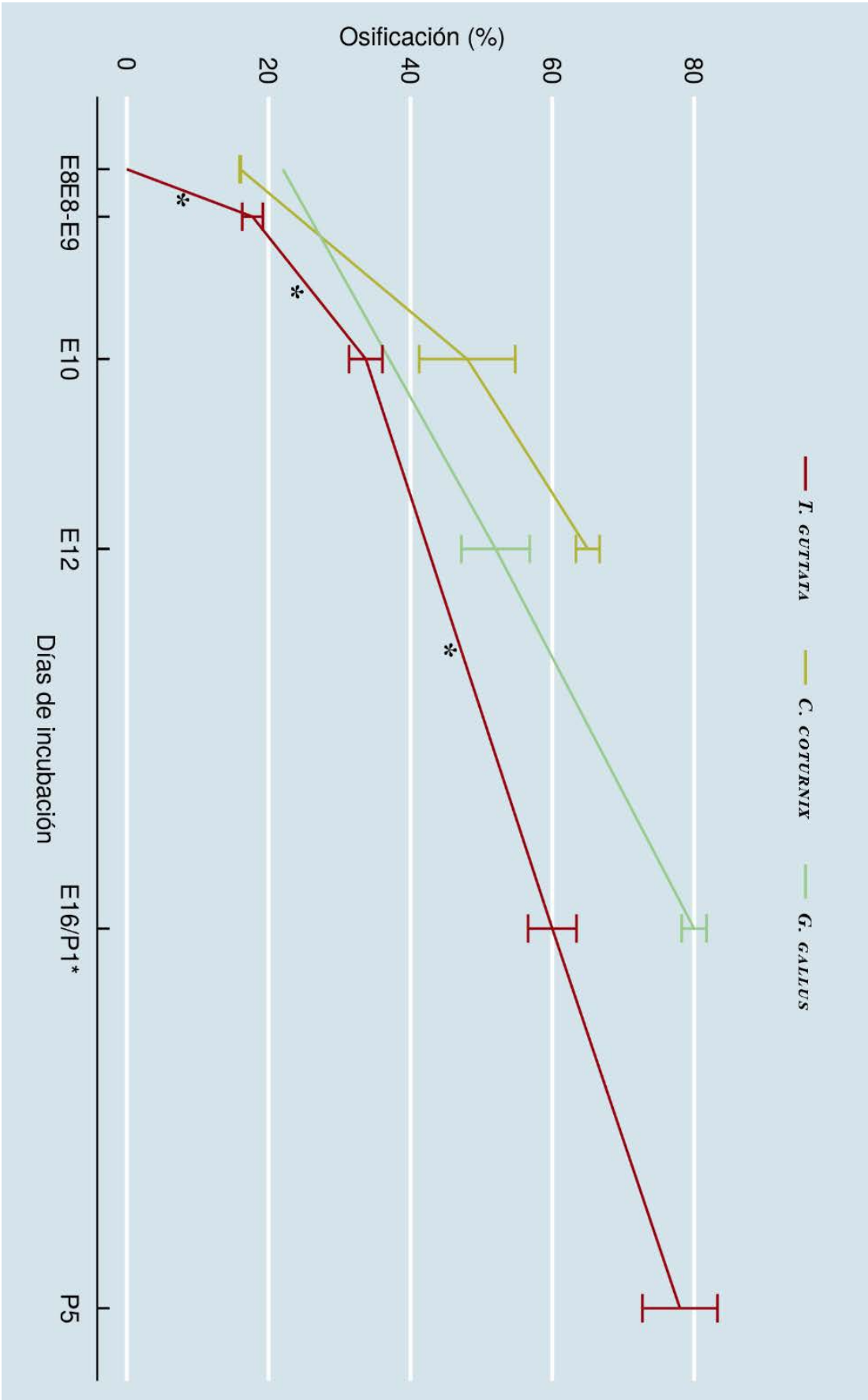


Figura 75. Representación gráfica del porcentaje de osificación de las extremidades inferiores en *T. guttata* (A), *C. coturnix* (B) y *G. gallus* (C) en la que se observa que la osificación se inicia antes en las especies precociales de estudio y continúa en estadios perinatales en *T. guttata*. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre estadios (pvalor<0,05).



Discusión



El espectro altricial-precocial abarca desde aves cantoras que nacen en un estado similar al embrionario hasta megápodos que se parecen más a los adultos e incluso pueden volar el día después de la eclosión. En este espectro nos encontramos características que nos permiten identificar el grado de precocialidad de la especie (ver introducción general) como la apertura de los ojos, el plumaje o el cuidado parental. Todas ellas se encuentran íntimamente relacionadas, ya que las aves altriciales nacen desnudas o casi desnudas posiblemente debido a que a lo largo de la evolución, el cuidado parental es más sofisticado con respecto al que reciben las precociales y el calor es aportado por los nidos construidos y por los individuos parentales (Blom y Lilja, 2005; Chen et al., 2016; Chen et al., 2019). El plumaje juega un papel fundamental en el equilibrio y la dirección del vuelo y a su vez parece estar relacionado paralelamente con el desarrollo del esqueleto. Por otro lado, como vimos en el capítulo 1, el desarrollo del sistema nervioso, en concreto el sistema visual, se termina de completar en estadios perinatales en especies altriciales mientras que en las precociales alcanza la madurez en estadios embrionarios previos a la eclosión. En este capítulo nos centramos en el aparato locomotor, concretamente en el proceso de osificación endocondral de los dígitos comparando *T. guttata* (altricial) con dos especies de estudio recurrentes en la biología del desarrollo, *C. coturnix* y *G. gallus* (precociales). A pesar de que la mayoría de los estudios sobre desarrollo se han llevado a cabo en especies precociales, muy pocos son los que han seguido la temporalización de la aparición de la condrogénesis y osificación en los mismos y aquellos que se han centrado en estos procesos han utilizado principalmente técnicas de tinción y no de detección con marcadores específicos (Osdoby y Caplan, 1981; Pourlis et al., 1998; Nakane y Tsudzuki, 1999).

1. Osificación endocondral durante el desarrollo

El esqueleto tiene entre sus funciones principales actuar como soporte, participar en el crecimiento y resistir a las fuerzas mecánicas del movimiento. Cuando un individuo de una especie precocial eclosiona, el esqueleto debe ser capaz de llevar a cabo estas tres funciones por lo que se encuentra mayor cantidad de hueso que cartílago. Por otro lado, en las aves altriciales el esqueleto sólo aporta la función de soporte en el momento de la eclosión y se encuentra más cartílago y menos hueso que en las precociales (Starck y Ricklefs, 1998). Además, se ha observado que tanto los elementos neurales como musculares que son necesarios para la locomoción se han terminado de desarrollar durante el periodo embrionario en especies precociales (Muir, 2000). El hecho de que el desarrollo se

produzca de una manera u otra está relacionado con diferentes aspectos del comportamiento y el ambiente que rodea a los individuos. Como se mostró en los resultados, el diamante cebra de Tímor presenta una osificación retrasada con respecto a la codorniz y a la gallina extendiéndose el proceso hasta estadios posnatales. Esto se puede relacionar con el cuidado parental, la vulnerabilidad ante los depredadores y si el ave es terrestre (Dial y Carrier, 2012). Las aves precociales se caracterizan por un cuidado parental simple reduciéndose principalmente al periodo de incubación lo cual implica que, desde que nacen, los individuos están expuestos a los depredadores y deben poseer unas extremidades robustas para escapar de ellos mientras que las aves altriciales poseen un cuidado parental más sofisticado con una construcción de nidos más compleja como en el caso de los passeriformes (Dial, 2003; Wei y Zhang, 2019).

La osificación de huesos largos consta de una etapa en la que se genera una estructura de cartílago que servirá de molde para los elementos óseos finales (Ng et al., 1997; Franssen et al., 2005; Goldring et al., 2006; Mackie et al., 2008; Long y Ornitz, 2013). Como se describió anteriormente, existen diferentes fases por las que pasan los condrocitos durante este proceso (ver introducción general) y cada una de ellas se caracteriza por la expresión de un factor de transcripción o la síntesis de una molécula que facilita la identificación del momento en el que se encuentra este. En el presente estudio hemos analizado la expresión de Col2A1, el gen que se encarga de que los condroblastos sintetizen y depositen el colágeno tipo II. A diferencia de Sox9, que se expresa en condrocitos proliferativos y por tanto es el factor de transcripción más temprano que se conoce para condrogénesis (Kulyk et al., 2000; Long y Ornitz, 2013), Col2A1 puede ser utilizado como un marcador tardío del mismo proceso indicando cuándo se produce el inicio de la hipertrofia o como indicador del comienzo de la osificación mediante la observación de la ausencia de dicha expresión. La degradación de estas fibras de colágeno tipo II produce la liberación de un péptido que induce la hipertrofia de los condrocitos (Mackie et al., 2008). El inicio de la hipertrofia en la región de la diáfisis mostrado por las secciones teñidas con el tricrómico de Mallory en las tres especies (Figs. 61A-B, 67A, 71A), coincide con la desaparición de la señal de Col2A1 (Figs. 63B, 68B, 72B) en la misma región. Así pues, podemos decir que el inicio de la osificación de los dígitos se produce en el diamante cebra de Tímor aproximadamente a los 7,5-8 días de incubación mientras que en codorniz y gallina a los 6-6,5 días. Esto concuerda con los resultados presentados por Osdoby y Caplan (1981) que observaron en la gallina común que el inicio de la hipertrofia de los condrocitos se producía en E6-6,5(HH30). Aun así, vemos que este inicio se encuentra retrasado aproximadamente un día en la especie altricial de estudio. Pero este desfase no se ve solo en el comienzo de la



detección de la ausencia de marcaje. Como mencionamos en la introducción general, la osificación endocondral está coordinada bajo un sistema próximo-distal (PD) siendo las estructuras más cercanas al flanco (estilopodio) las primeras en diferenciarse y las más distales (autopodio) las últimas (Saunders, 1948; Summerbell, 1974; Lewis 1975; Summerbell, 1976; Sato et al., 2007; Mariani et al., 2008; Cooper et al., 2011; Gilbert y Barresi, 2018). Sin embargo, se ha observado que en el autopodio también se establece un eje PD que hace que las estructuras más cercanas al zeugopodio se desarrollen antes que las más distales (Sato et al., 2007). Esto se observa también en el presente estudio de manera que tanto en codorniz como en gallina la ausencia de señal en las estructuras más distales comienza a observarse en E8 (Figs. 68B, 72H) mientras que en el diamante cebra de timor no ocurre hasta E10 (Fig. 63N), dos días después, remarcando el hecho de que el desarrollo en la especie altricial se encuentra retrasado con respecto a las precociales.

Al igual que Sox9 (Long y Ornitz, 2013), existe un factor de transcripción, RUNX2, que se expresa en etapas muy tempranas de la osteogénesis, concretamente en condrocitos maduros y osteoblastos (Komori, 2018, 2019; Kawane et al., 2018). Esta coincide temporalmente con la degradación de las primeras fibras de colágeno tipo II siendo en *T. guttata* en E7,5-8 (Fig. 65B) y en *C. coturnix* y *G. gallus* en E6-6,5 (Figs. 69B, 73B) y posterior a la detección de las primeras fibras de colágeno tipo I que en *G. gallus* aparecen en E5,5 (Osdoby y Caplan, 1981). Este patrón sugiere por tanto que el comienzo de la diferenciación de los osteoblastos en osteocitos maduros se produciría de forma retardada en la especie altricial de estudio con respecto a las especies precociales modelo en un día aproximadamente. Esta expresión es más acusada en los dígitos proximales mientras que en los más distales se observa una señal más débil sugiriendo de nuevo, como en el caso del marcaje con Col2A1, que se establecería un eje PD en el mismo autopodio como describió previamente Sato et al. (2007). A pesar de esto, parece ser que a medida que avanza el desarrollo, la expresión de este factor de transcripción se extiende hacia los extremos y ocupa toda la estructura antes en *T. guttata* (E8 y E10 respectivamente) que en *C. coturnix* (E11) y *G. gallus* (E12 y E16). Este sorprendente cambio en el patrón de desarrollo también se ve reflejado en la síntesis de osteocalcina en osteoblastos, es decir, al acelerarse el proceso de expresión de RUNX2 en el diamante cebra de timor en los diferentes elementos del autopodio, cabría esperar que la detección de los depósitos de osteocalcina se haya adelantado en esta especie con respecto a las precociales. Esto se refleja en los resultados del presente capítulo dándose en la especie altricial de estudio y en la codorniz en E8-9 (Figs. 66B, 70B) mientras que en la gallina común no se produce hasta E10 (Fig. 74B). Estudios previos realizados en codorniz corroboran nuestros resultados mediante la técnica

de tinción azul alcian y rojo alizarina en la que este último colorante se une a estos depósitos (Pourlis et al., 1998; Nakane y Tsudzuki, 1999). Sin embargo, a pesar de lo mencionado anteriormente, la extensión de los depósitos de osteocalcina hacia los extremos y en los elementos más distales se alcanza antes de la eclosión en las especies precociales mientras que en la altricial se alarga hasta estadios perinatales. El estudio cuantitativo que mide el porcentaje de osificación a lo largo del desarrollo refuerza el hecho de que este proceso de osificación se encuentra retrasado en *T. guttata* que se extiende hasta estadios posteriores a la eclosión (Fig. 75). Hay por tanto una diferencia entre la velocidad y el porcentaje de osificación de manera que la velocidad es relativamente similar a la de las especies precociales mientras que el porcentaje de osificación se encuentra considerablemente retrasado (Fig. 75, tabla 13). Estos resultados podrían deberse a los factores comportamentales dentro del rango precocial, en concreto a dos motivos principales, el primero el tiempo de incubación y el segundo, el cuidado parental que a su vez están relacionados. El tiempo de incubación es esencial, los individuos de la especie *T. guttata* eclosionan en E13 (Murray et al., 2013) mientras que los de *C. coturnix* en E16,5 (Ainsworth et al., 2010) y *G. gallus* en E20 (Hamburger y Hamilton, 1951). Así pues, los embriones de la gallina cuentan con más tiempo de incubación para que el desarrollo se complete antes de la eclosión posiblemente debido a los factores que hemos mencionado anteriormente.

Por otro lado, en lo referente al cuidado parental, sabemos que la carga es mayor en las especies altriciales que precociales. Esto también está relacionado con la vulnerabilidad frente a predadores. Las codornices tienen la capacidad de volar, es importante que el desarrollo se lleve a cabo totalmente tanto en extremidades anteriores como posteriores, sin embargo, las gallinas han perdido esta capacidad y son terrestres, más vulnerables a la hora de enfrentarse a un depredador, por lo que las extremidades inferiores deben estar bien desarrolladas y ser robustas en el momento de la eclosión (Dial, 2003; Dial y Carrier, 2012; Wei y Zhang, 2019). Los individuos recién nacidos de *T. guttata* no abandonan el nido hasta las 3-4 semanas desde el nacimiento, lo cual podría también estar implicado con el desarrollo de la extremidad. Como observamos en la tabla 13, para *G. gallus* en E16 (4 días antes de la eclosión) se ha alcanzado el 80% de la osificación, mientras que para *T. guttata* en P5, que correspondería a E20 en la gallina, está todavía un poco por debajo sugiriendo que el desarrollo se completa en esas semanas en las que se encuentran bajo el cuidado parental como ocurre en el caso de la paloma, otro ave altricial (Wei y Zhang, 2019).



Según los resultados obtenidos en la presente tesis, parece ser que tanto el desarrollo del sistema visual como el proceso de osificación endocondral en las extremidades se encuentra retrasado en *T. guttata* con respecto a *C. coturnix* y *G. gallus*. Además, en el caso del desarrollo de los dígitos se ha podido comprobar que, aunque alguno de los factores determinantes para el mismo se exprese de manera temprana, esta se extiende hasta estadios perinatales siendo así el porcentaje de osificación menor que en especies precociales. Ambos sistemas son de vital importancia para los individuos en el momento de la eclosión, lo cual sugiere que el desarrollo de los mismos esté íntimamente relacionado con el cuidado parental, la exposición a los depredadores y otros factores que les rodean.

Evento	<i>T. guttata</i>	<i>C. coturnix</i>	<i>G. gallus</i>	Referencia
Ausencia de señal de Col2A1	Est34 (E7,5-E8)	Est30 (E6)	HH30 (E6,5)	Osdoby y Caplan, 1981 (gallina)
Inicio de expresión de Runx2	Est34 (E7,5-8)	Est30 (E6)	HH30 (E6,5)	
Inicio de expresión de osteocalcina	Est38 (E8-E9)	Est36 (E8-9)	HH36 (E10)	Pourlis et al., 1998; Nakane y Tsudzuki, 1999 (codorniz)
Porcentaje de osificación	0% (E7,5-8, Est34)	16% (E7,5-8, Est34)		
	17,73% (E8-E9, Est38)		22% (E8, HH34)	
	33,7% (E10, Est 42)	48% (E10, Est38)		
		65% (E12-13, Est42)	52% (E12, HH38)	
	60% (P1)		80% (E16, HH42)	
	78% (P5)			

Tabla 13. Tabla resumen de los principales eventos de osificación durante el desarrollo, así como el porcentaje de osificación en los diferentes estadios de las especies de estudio.

Bibliografía

- Ainsworth SJ, Stanley RL, Evans DJ (2010) Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy* 216 (1):3-15
- Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D (2017) Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci* 1409 (1):79-84. doi:10.1111/nyas.13470
- Blom J, Lilja C (2005) A comparative study of embryonic development of some bird species with different patterns of postnatal growth. *Zoology (Jena)* 108 (2):81-95. doi:10.1016/j.zool.2005.02.001
- Chen CK, Chuang HF, Wu SM, Li WH (2019) Feather Evolution from Precocial to Altricial Birds. *Zoological studies* 58:e24. doi:10.6620/ZS.2019.58-24
- Chen CK, Ng CS, Wu SM, Chen JJ, Cheng PL, Wu P, Lu MY, Chen DR, Chuong CM, Cheng HC, Ting CT, Li WH (2016) Regulatory Differences in Natal Down Development between Altricial Zebra Finch and Precocial Chicken. *Mol Biol Evol* 33 (8):2030-2043. doi:10.1093/molbev/msw085
- Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* 8 (2):272-288. doi:10.7150/ijbs.2929
- Chimal-Monroy J, Rodríguez-León J, Montero JA, Gañán Y, Macías D, Merino R, Hurlé JM (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 257 (2):292-301
- Cooper KL, Hu JK, ten Berge D, Fernández-Terán M, Ros MA, Tabin CJ (2011) Initiation of proximal-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science* 332 (6033):1083-1086. doi:10.1126/science.1199499
- Dial KP (2003) Evolution of avian locomotion: correlates of flight style, locomotor modules, nesting biology, body size, development, and the origin of flapping flight. *The Auk* 120 (4):941-952
- Dial KP (2003) Wing-assisted incline running and the evolution of flight. *Science* 299 (5605):402-404. doi:10.1126/science.1078237
- Dial TR, Carrier DR (2012) Precocial hindlimbs and altricial forelimbs: partitioning ontogenetic strategies in mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Exp Biol* 215 (Pt 21):3703-3710. doi:10.1242/jeb.057380
- Ducy P (2000) Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219 (4):461-471. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1074>3.0.CO;2-C
- Franssen RA, Marks S, Wake D, Shubin N (2005) Limb chondrogenesis of the seepage salamander, *Desmognathus aeneus* (amphibia: plethodontidae). *J Morphol* 265 (1):87-101. doi:10.1002/jmor.10339
- Gilbert SF (2005) *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana,
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97 (1):33-44. doi:10.1002/jcb.20652
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88 (1):49-92
- Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT (1999) Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn* 215 (1):69-78. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199905)215:1<69::AID-DVDY8>3.0.CO;2-N
- Katagiri T, Takahashi N (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral diseases* 8 (3):147-159. doi:10.1034/j.1601-0825.2002.01829.x
- Kawakami Y, Rodríguez-León J, Belmonte JCI (2006) The role of TGF beta s and Sox9 during limb chondrogenesis. *Current opinion in cell biology* 18 (6):723-729
- Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, dos Santos Matsuura-Kawata VK, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K (2018) Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific reports* 8 (1):1-17
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2012) *Histología y biología celular: Introducción a la Anatomía Patológica*.
- Kogianni G, Noble BS (2007) The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep* 5 (2):81-86. doi:10.1007/s11914-007-0007-z
- Komori T (2006) [Mechanism of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts]. *Clin Calcium* 16 (5):801-807. doi:CliCa0605801807
- Komori T (2018) Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and cell biology* 149 (4):313-323
- Kulyk WM, Franklin JL, Hoffman LM (2000) Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp Cell Res* 255 (2):327-332. doi:10.1006/excr.1999.4784
- Li J, Zhang H, Yang C, Li Y, Dai Z (2016) An overview of osteocalcin progress. *J Bone Miner Metab* 34 (4):367-379. doi:10.1007/s00774-015-0734-7
- Long F, Ornitz DM (2013) Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (1):a008334. doi:10.1101/cshperspect.a008334
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M (2008) Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (1):46-62. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009




- Mariani FV, Ahn CP, Martín GR (2008) Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* 453 (7193):401-405. doi:10.1038/nature06876
- Moser SC, van der Eerden BCJ (2018) Osteocalcin-A Versatile Bone-Derived Hormone. *Frontiers in endocrinology* 9:794. doi:10.3389/fendo.2018.00794
- Muir GD (2000) Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain research bulletin* 53 (5):719-726
- Murray JR, Varian-Ramos CW, Welch ZS, Saha MS (2013) Embryological staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *J Morphol* 274 (10):1090-1110. doi:10.1002/jmor.20165
- Nakane Y, Tsudzuki M (1999) Development of the skeleton in Japanese quail embryos. *Dev Growth Differ* 41 (5):523-534. doi:10.1046/j.1440-169x.1999.00454.x
- Nakashima K, de Crombrughe B (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *TRENDS in Genetics* 19 (8):458-466
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GEO, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E (1997) SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology* 183:108-121
- O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H (2013) Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* 54 (2):258-263. doi:10.1016/j.bone.2012.08.121
- Osdoby P, Caplan AI (1981) First bone formation in the developing chick limb. *Dev Biol* 86 (1):147-156. doi:10.1016/0012-1606(81)90325-0
- Paic F, Igwe JC, Nori R, Kronenberg MS, Franceschetti T, Harrington P, Kuo L, Shin DG, Rowe DW, Harris SE, Kalajzic I (2009) Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* 45 (4):682-692. doi:10.1016/j.bone.2009.06.010
- Pourlis AF, Magras IN, Petridis D (1998) Ossification and growth rates of the limb long bones during the prehatching period in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat Histol Embryol* 27 (1):61-63. doi:10.1111/j.1439-0264.1998.tb00157.x
- Prideaux M, Findlay DM, Atkins GJ (2016) Osteocytes: The master cells in bone remodelling. *Current opinion in pharmacology* 28:24-30. doi:10.1016/j.coph.2016.02.003
- Sato K, Koizumi Y, Takahashi M, Kuroiwa A, Tamura K (2007) Specification of cell fate along the proximal-distal axis in the developing chick limb bud. *Development* 134 (7):1397-1406. doi:10.1242/dev.02822
- Saunders JW, Jr. (1948) The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* 108 (3):363-403. doi:10.1002/jez.1401080304
- Shao J, Zhou Y, Xiao Y (2018) The regulatory roles of Notch in osteocyte differentiation via the crosstalk with canonical Wnt pathways during the transition of osteoblasts to osteocytes. *Bone* 108:165-178. doi:10.1016/j.bone.2018.01.010
- Starck JM, Ricklefs RE (1998) Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum. vol 8. Oxford University Press on Demand,
- Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S (2002) Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 245 (1):95-108. doi:10.1006/dbio.2002.0640
- Summerbell D (1974) A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *Development* 32 (3):651-660
- Summerbell D (1976) A descriptive study of the rate of elongation and differentiation of the skeleton of the developing chick wing. *Development* 35 (2):241-260
- Wei X, Zhang Z (2019) Ontogenetic changes of geometrical and mechanical characteristics of the avian femur: a comparison between precocial and altricial birds. *Journal of anatomy* 235 (5):903-911
- Yoon BS, Lyons KM (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93 (1):93-103. doi:10.1002/jcb.20211
- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18 (8):952-963. doi:10.1101/gad.1174704

Conclusiones generales

1. Los eventos morfogenéticos, histogenéticos y de diferenciación celular del sistema visual ocurren en estadios del desarrollo embrionario más tempranos en especies de aves precociales que altriciales.
2. El desarrollo del sistema visual en *C. coturnix* es similar cronológicamente al descrito en *G. gallus*.
3. El proceso de retinogénesis continúa activo en estadios perinatales y post-eclosión en *T. guttata*.
4. Existe una relación temporal entre la aparición de mitosis no apicales y el inicio de la expresión de marcadores de células horizontales en la retina de *T. guttata* y *C. coturnix*.
5. En la retina de *T. guttata* se detectan, al menos, una oleada de muerte celular neurogénica y otra sinaptogénica. Esta última oleada se extiende hasta estadios post-natales.
6. El patrón de marcaje obtenido con la técnica de TUNEL sugiere que las células de Müller podrían presentar actividad fagocítica durante el desarrollo de la retina de *T. guttata*.
7. El proceso de osificación endocontral en las extremidades inferiores de *T. guttata* se encuentra retrasado con respecto a las especies precociales estudiadas.
8. La especie altricial *T. guttata* es un buen modelo para llevar a cabo estudios de neurogénesis y osificación endocondral postnatales, con una posible utilidad en el campo de la biología regenerativa.

Artículos

Retinal histogenesis in an altricial avian species, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817)

Guadalupe Álvarez-Hernán, ^{1,*} Elena Sánchez-Resino, ^{1,*} Ismael Hernández-Núñez, ¹ Alfonso Marzal, ² Joaquín Rodríguez-León, ³ Gervasio Martín-Partido ¹ and Javier Francisco-Morcillo ¹ 

¹Área de Biología Celular, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

²Área de Zoología, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

³Área de Anatomía Humana, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

Abstract

Comparative developmental studies have shown that the retina of altricial fish and mammals is incompletely developed at birth, and that, during the first days of life, maturation proceeds rapidly. In contrast, precocial fish and mammals are born with fully differentiated retinas. Concerning birds, knowledge about retinal development is generally restricted to a single order of precocial birds, Galliformes, due to the fact that both the chicken and the Japanese quail are considered model systems. However, comparison of embryonic pre-hatchling retinal development between altricial and precocial birds has been poorly explored. The purpose of this study was to examine the morphogenesis and histogenesis of the retina in the altricial zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817) and compare the results with those from previous studies in the precocial chicken. Several maturational features (morphogenesis of the optic vesicle and optic cup, appearance of the first differentiated neurons, the period in which the non-apical cell divisions are observable, and the emergence of the plexiform layers) were found to occur at later stages in the zebra finch than in the chicken. At hatching, the retina of *T. guttata* showed the typical cytoarchitecture of the mature tissue, although features of immaturity were still observable, such as a ganglion cell layer containing many thick cells, very thin plexiform layers, and poorly developed photoreceptors. Moreover, abundant mitotic activity was detected in the entire retina, even in the regions where the layering was complete. The circumferential marginal zone was very prominent and showed abundant mitotic activity. The partially undifferentiated stage of maturation at hatching makes the *T. guttata* retina an appropriate model with which to study avian postnatal retinal neurogenesis.

Key words: altricial; birds; development; histogenesis; morphogenesis; precocial; retina.

Introduction

Birds show a wide range of variation in functional maturity at hatching and dependence on parental care. In accordance with these differences, birds are separated into precocial and altricial species. The incubation period is longer in precocial birds than in altricial ones. Precocial

hatchlings are covered with feathers, have open eyes, a well-developed muscular-skeletal system, and are able to feed on their own. Altricial birds, on the other hand, are born naked, blind, with less developed locomotion organs, and are completely dependent on their parents for feeding (Nice, 1962; Stark & Ricklefs, 1998).

In comparative embryological studies of birds, although the ontogenetic sequence events remained the same, the onset and offset times show variations and present different durations between altricial and precocial development (Köppl et al. 2005; Olea & Sandoval, 2012; Murray et al. 2013; de Almeida et al. 2015; Olea et al. 2016). As a general rule, those works have shown that precocial species reach the early stages of development in less time than altricial species. In the latter stages, these differences become striking, as the last stages of precocial species are characterized

Correspondence

Javier Francisco-Morcillo, Área de Biología Celular, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz, Spain. E: morcillo@unex.es

*These authors contribute equally to this work.

Accepted for publication 27 February 2018

Article published online 26 March 2018

by growth (Hamburger & Hamilton, 1951), whereas in altricial species, still-maturing structures are present (Murray et al. 2013). Therefore, the last stages of development prior to hatching may explain the increased maturation of tissues observable in precocial species at hatching day compared with altricial species.

Important differences in the degree of maturation have also been found at birth in the retina of other classes of vertebrates. Thus, altricial fish species have shorter incubation times and hatch with a relatively simple retina and do not complete retinal development until late in larval life (Bejarano-Escobar et al. 2009, 2010, 2014, 2015; Pavón-Muñoz et al. 2016). In contrast, precocial fish species, with a major embryological development, complete retinal maturation before hatching (Candal et al. 2005, 2008; Harahush et al. 2009; Ferreiro-Galve et al. 2010; Bejarano-Escobar et al. 2012, 2013, 2014, 2015). In most species of mammals, including the mouse and the rat, the retina is incompletely developed at birth, and maturation proceeds rapidly during the first weeks of life (Young, 1985ab; Rapaport et al. 2004; Bejarano-Escobar et al. 2011). In the guinea pig, pig, and human, the retina is well developed at birth (Loeliger & Rees, 2005; Hendrickson et al. 2007; Nag & Wadhwa, 2007; Guduric-Fuchs et al. 2009). Data concerning ontogeny of the visual system in precocial bird species such as the chicken (*Gallus gallus* Linnaeus 1758) (Prada et al. 1991; Bruhn & Cepko, 1996; Francisco-Morcillo et al. 2005; Bejarano-Escobar et al. 2015) and Japanese quail (*Coturnix japonica*, Temminck and Schlegel 1849) (Marín-Teva et al. 1999a,b,c; Kubota et al. 2002) are also abundant. These species hatch with a completely mature retina. However, it has been described that endogenous stem cells located in the peripheral-most region of the retina, called the circumferential marginal zone (CMZ), add new neurons to the retinal tissue during the first postnatal weeks (Fischer & Reh, 2000; Kubota et al. 2002).

Despite their importance, reports covering embryonic visual system development in altricial birds are rare, probably owing to the difficulty in accessing embryonic specimens due to the dependence on parental care and the low reproduction rates of altricial forms. The zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817) is well known for its vocal learning abilities. These abilities depend on progenitor cells located in the ventricular zone of the telencephalon that give rise to song-control neurons that contribute to the construction of brain areas important for song-learning (Dewulf & Bottjer, 2005; Charvet & Striedter, 2008, 2011). Therefore, *T. guttata* is considered an excellent model with which to study postnatal neurogenesis in the central nervous system. However, very little is known about the visual system neurogenesis of this altricial species. We used classical histological and immunohistochemical methods: (i) to carry out a detailed chronological description of the most relevant morphogenetic and histogenetic events during retinal development in *T. guttata*; (ii) to determine the

degree of maturation of the retina in hatchlings; (iii) to compare our results with those described in *G. gallus* in order to identify possible differences in development between precocial and altricial bird species.

Material and methods

Animals and tissue processing

All animals were treated according to the regulations and laws of the European Union (EU Directive 2010/63/EU) and Spain (Royal Decree 53/2013). A total of unrelated 12 zebra finch pairs were obtained from a local pet shop and distributed in two indoor aviaries (1 × 3 × 2 m). The aviaries were made of plywood with mesh wire roofs and front panels, thus allowing acoustic but not visual contact between animals in adjacent aviaries. Aviaries had air temperatures of 19–35 °C. Birds were kept in *ad libitum* feeding conditions throughout the experiment. They were supplied daily with Senegal, plata, and red millet seeds both dried and germinated, and fresh water (with vitamins added three times a week). Each aviary was equipped with 12 wooden nest-boxes (12.5 × 12 × 14 cm) and with coconut fibre as nesting material put on the floor before the birds were introduced.

Captive zebra finches usually lay one egg per day. All eggs were collected approximately 5 h after lights came on in the morning. Upon collection, eggs were placed within a rotating egg incubator designed for chicken eggs (Masallés S.A.). The incubator was maintained at 37.5 ± 1 °C and 80–90% humidity. The eggs were placed in a small padded dish on the rotating bars of the incubator. They roll within the dish, preventing embryo adhesion to the shell interior. At this temperature the average time of incubation was 14 days, similar to the length of time required for a zebra finch egg to hatch under natural incubation. A total of 31 embryos and one hatchling were included in the present study (Table 1). The degree of development of the *T. guttata* embryos was estimated according to the stages (St) established by Murray et al. (2013). These stages are based on external anatomical features, and numbered from 1 (pre-streak stage) to 46 (postnatal day 0, P0, newly hatched chick). The embryos included in the present study ranged from St11 to St45 (Table 1). Figure 1 shows embryos belonging to several

Table 1 Staging according to Murray et al. (2013) of the *Taeniopygia guttata* embryos included in the present study.

Stages	<i>n</i>	Incubation time (approximate)
St11	2	54 h
St15	2	66 h
St16	2	72 h
St19	2	84 h
St23	2	104 h
St25	2	114 h
St27	2	126 h
St32	3	6 days and 18 h
St33	3	7 days
St34	3	7 days and 6 h
St38	3	8 days and 12 h
St41	3	10 days
St45	2	13 days
St46 (postnatal day 0, P0)	1	14 days

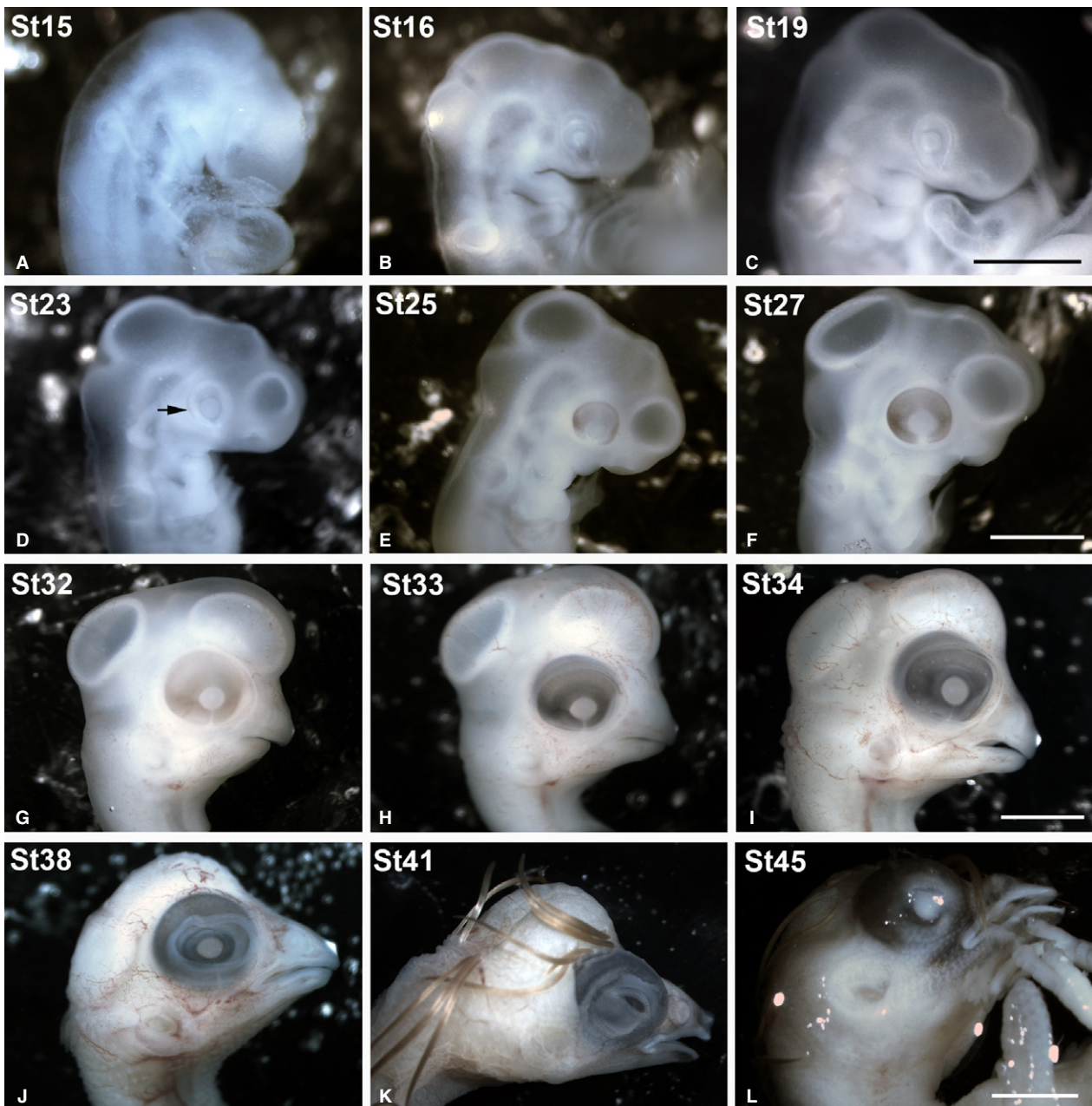


Fig. 1 Stereomicroscope images of some of the embryos included in the present study showing the external gross anatomical changes of the eye. The *Taeniopygia guttata* embryos were staged according developmental stages (St) established by Murray et al. (2013). The optic cup was clearly distinguishable between St15 and St23 (A–D). A faint pigmentation in the RPE was first observed at St23 in the caudal region of the optic cup (arrow in D). At St27, the eye was completely pigmented (F). From St38 until perinatal stages, the eyelids progressively covered the eye (I,K,L). RPE, retinal pigment epithelium. Scale bars: 2 mm (A–D); 4 mm (E,F); 6 mm (G); 7 mm (H); 10 mm (I–K).

developmental stages. All embryos were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% in phosphate-buffered solution (PBS) (0.1 M, pH 7.4) overnight at 4 °C. For morphological analysis, some fixed embryos were dehydrated in a graded series of acetone and propylene oxide, and embedded in Spurr's resin. Serial frontal 3- μ m sections were cut in a Reichert Jung microtome. For immunohistochemical analysis, tissues were rinsed in PBS, then cryoprotected, soaked in embedding medium and frozen. Cryostat sections, 18 μ m thick,

were thaw-mounted on SuperFrost Plus slides, air-dried and stored at –80 °C.

Toluidine-blue staining

Morphological analysis of development of the visual system was done on resin sections, stained with a toluidine blue 0.5% and sodium tetraborate 0.5% solution. To do the staining, the slides

were put with the colourant at 90 °C for 45 s and then rinsed with water. Slides were mounted with Eukitt® (Orsa Tec).

Immunohistochemistry

Cryostat sections were washed several times in 0.1% Triton-X-100 in PBS (PBS-T) and then pre-blocked in 0.2% gelatin, 0.25% Triton X-100, Lys 0.1 M in PBS (PBS-G-T-L) for 1 h. Sections were incubated overnight with mouse anti-SV2 monoclonal antibody (1 : 100; Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse anti-PCNA monoclonal antibody (1 : 200; Abcam, PC10, Ab29) or rabbit anti-phospho-Histone H3 (pHisH3) polyclonal antibody (1 : 500; Millipore, Ref. 06-570) in a humidified chamber at room temperature (RT). On the second day, slides were washed twice in PBS-T and once more in PBS-G-T, and then incubated in Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (1 : 200; Molecular Probes, the Netherlands; Ref. A11032) or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG secondary antibody solution (1 : 200; Molecular Probes; Ref. A11008), respectively, for 2 h. Sections were then washed twice in PBS-T and incubated with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) for 10 min at room temperature. Next, the slides were washed in PBS and mounted with Mowiol (polyvinyl alcohol 40-88, Fluka, Ref. 81386).

Image acquisition and processing

Digital images of the *T. guttata* specimens were captured with a DS-5Mc (Nikon) digital camera attached to an SMZ-1000 (Nikon) stereoscopic microscope. Toluidine-blue stained sections and immunofluorescence were observed with a bright field and epifluorescence Nikon Eclipse 80i microscope, and photographed using an ultra-high-definition Nikon DXM1200F digital camera. Graphical enhancement was performed in Adobe PHOTOSHOP CS4.

Results

Retinal histogenesis was examined carefully from St11 to St46 (P0) using the toluidine-blue-stained semi-thin sections. We also labelled the cryosections immunohistochemically with antibodies against the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an endogenous marker for cells in the S-phase that has been used to identify precursor cells in developing and mature vertebrate retina (Candal et al. 2005; Villar-Cheda et al. 2008; Bejarano-Escobar et al. 2009, 2010). Antibodies against phosphohistone H3 (pHisH3) were also used to detect cells in the M-phase, as has been used in other studies of retinogenesis in different classes of vertebrates (Ferreiro-Galve et al. 2010; Bejarano-Escobar et al. 2012, 2014; Pavón-Muñoz et al. 2016). Additionally, to detect the onset of the emergence of plexiform layers, we used antibodies against the transmembrane synaptic vesicle glycoprotein SV2. This has been used previously to address the onset of synaptogenesis in different regions of the central nervous system of other classes of vertebrates (Bergmann et al. 1999; Blanchart et al. 2008) and also in the developing retina of fish (Bejarano-Escobar et al. 2010, 2012, 2014; Pavón-Muñoz et al. 2016), amphibians (Álvarez-Hernán et al. 2013), chick (Bergmann et al. 1999), and mammals (Okada et al. 1994). We did not find changes in the

ontogenetic features analyzed between embryos at the same embryological stage.

Retinal cytoarchitecture in *T. guttata* hatchlings

Hatchlings showed abundant ganglion cell axons in the optic nerve head (Fig. 2A) and optic nerve (Fig. 2B). The central region of the *T. guttata* retina showed the typical multi-layered structure (Fig. 2A,C). However, features of immaturity, such as ganglion cell layers (GCL) two to three cells deep, and poorly developed plexiform layers (Fig. 2A, C) were clearly distinguishable in this region. Furthermore, the somata of developing photoreceptors were arranged in two to three rows in the outer nuclear layer (ONL); outer segments were absent at this stage (Fig. 2C,E). In contrast, a neuroblastic layer (NBL) was present in the peripheral region. Immunohistochemical analysis showed abundant PCNA-immunoreactivity in the external half of the neural retina in the central and mid-peripheral regions (Fig. 3A–F). Abundant immunoreactive nuclei were also detected in the peripheral-most retina (Fig. 3A–C,G–I). Furthermore, abundant pHisH3-immunoreactive cells were detected in the ventricular surface in both the central (Fig. 4A–C,D–F) and the peripheral retina (Fig. 4A–C,G–I). Some non-apical mitoses were also distinguished in the dorso-peripheral retina (Fig. 4A–C). The strong SV2-immunoreactivity detected in both the outer plexiform layer (OPL) and the inner plexiform layer (IPL) revealed numerous synapses in the central region of the retina (Fig. 4J–L). In sum, therefore, several features of immaturity were found in the retina of hatchlings, although functional synapses were present in the plexiform layers.

Retinal development in *T. guttata*

Murray et al. (2013) have shown that optic vesicles are clearly distinguishable between St9 and St13. Histological sections of the St11 prosencephalon showed that optic vesicles expand laterally until they make contact head ectoderm (Fig. 5A,B). These paired diverticula were composed of neuroepithelial cells (Fig. 5B). At St15, the optic cup was formed and the lens placode was clearly observable (Fig. 5C,D). Mitotic figures were present in the ventricular region of the presumptive neural retina (apical mitotic divisions) (Fig. 5D). Optic cup invagination progressed between St16 and St19 (Fig. 5E–H). The lens vesicle was fully developed at St16 (Fig. 5F) and was almost entirely independent of the cephalic ectoderm at St19 (Fig. 5H). By these stages, intense mitotic activity was observed in the ventricular surface of the presumptive neural retina, and abundant extracellular spaces appeared in the vitreal region (Fig. 5F,H). The lumen of the neural tube was still connected with the lumen of the optic cup (Fig. 5E,G).

Eye morphogenesis progressed between St23 and St27. By these stages the neural retina still showed an

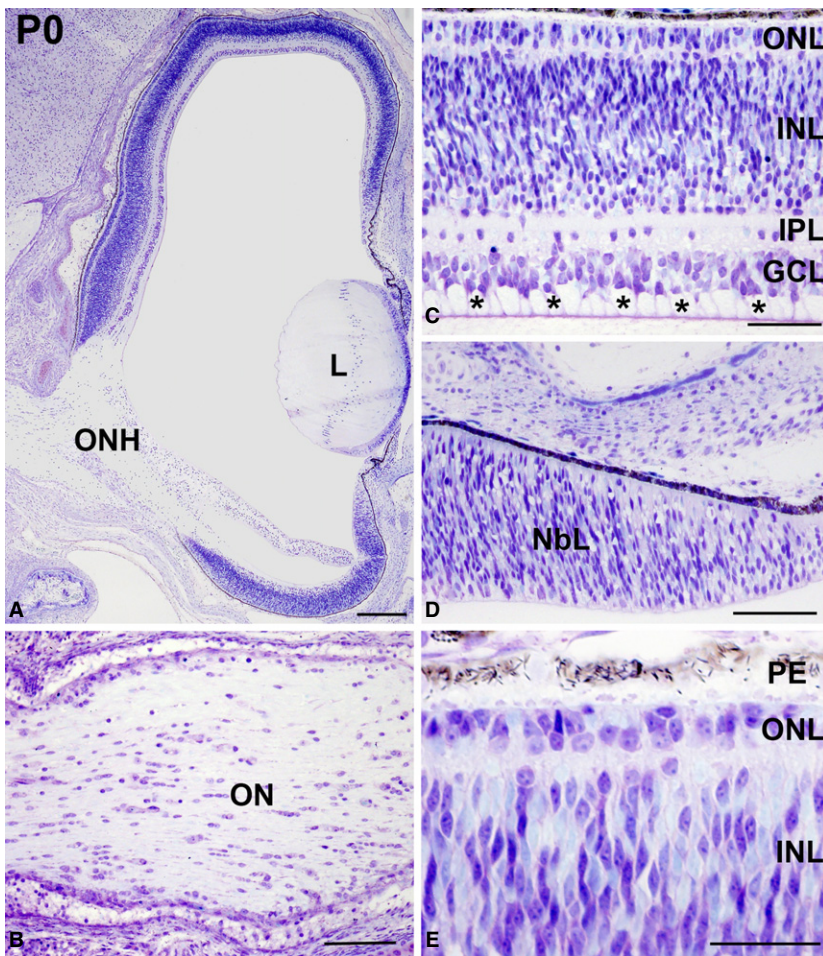


Fig. 2 Toluidine blue-stained semi-thin sections showing the retinal cytoarchitecture of *Taeniopygia guttata* hatchlings. The optic nerve head was prominent (A) and abundant ganglion cell axons were observed in the OFL (asterisks in C) and in the optic nerve (B). The layering was complete in the central retina (C). Photoreceptors were devoid of outer segments in the central retina (C,E). The peripheral retina was composed of an NbL (D). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; NbL, neuroblastic layer; OFL, optic fibre layer; ON, optic nerve; ONH, optic nerve head; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; PE, pigment epithelium. Scale bars: 200 μm (A); 100 μm (B–E).

undifferentiated aspect (Fig. 6). However, the first differentiating neuroblasts were morphologically distinguished in the vitreal region of the neuroblastic layer (NbL) at St25 (Fig. 6C). Furthermore, axon bundles in close contact with the vitreal surface appeared in the differentiating neural retina by this stage (Fig. 6C). Additionally, at St25 the first signs of pigmentation appeared in the pigment epithelium (Fig. 6C). At St27 the eye increased in size considerably (Fig. 6D) and the number of differentiated neuroblasts, mitotic figures located in the scleral retina, and fibre bundles near the vitreal surface increased notably (Fig. 6E). Optic axon bundles were also abundant in the ventral region of the distal optic stalk (Fig. 6F). The size of the eye increased progressively between St32 and St38 (Fig. 7A,D,G). The optic fibre layer (OFL) became progressively thicker (Fig. 7B,E,H). Abundant mitoses were observed in the scleral surface (Fig. 7B,C,E,F,H,I), but sparse non-apical mitoses, located vitreally in the undifferentiated retina, were also detected in the central region of the retina at St32 (Fig. 7B, B') and in the central and peripheral retina at St34 (Fig. 7E, F) and St38 (Fig. 7H,I). These non-apical divisions were frequently vertically oriented (with the mitotic spindle aligned perpendicular to the vitreal surface) (Fig. 7B,B'), and the

vitreal mitoses were pH3H3-immunoreactive (Fig. 8A–C). At St38, the IPL became recognizable as a thin acellular region near the presumptive ganglion cell layer (GCL) in the central region of the retina (Fig. 8A,C,D,F). At this stage, SV2-immunoreactivity was detected in the OFL and ganglion cell somata, and became concentrated near the emerging IPL (Fig. 8E,F). The emergence of the outer plexiform layer (OPL) occurred at St39 in the central region of the developing retina (Fig. 8G,I); at this stage, the OPL showed faint immunoreactivity against SV2 antisera (Fig. 8H,I). Strong SV2-immunolabelling was also detected in the IPL, optic nerve head, optic nerve, and optic chiasm (Fig. 8H,I,K,L,N,O). The central-to-peripheral gradient of histogenesis and cell differentiation was clearly observed in the St41 retina: the central was divided in the three typical nuclear layers (Fig. 9A,B), the OPL was lost in the mid-peripheral retina (Fig. 9A,C), and the peripheral retina still showed a neuroepithelial organization (Fig. 9A,D). At St45, the retinal cytoarchitecture was very similar to that found in the P0 retina (not shown).

Our findings indicate that retinal maturational events appear progressively following a central-to-peripheral gradient. The emergence of the OPL was delayed with respect

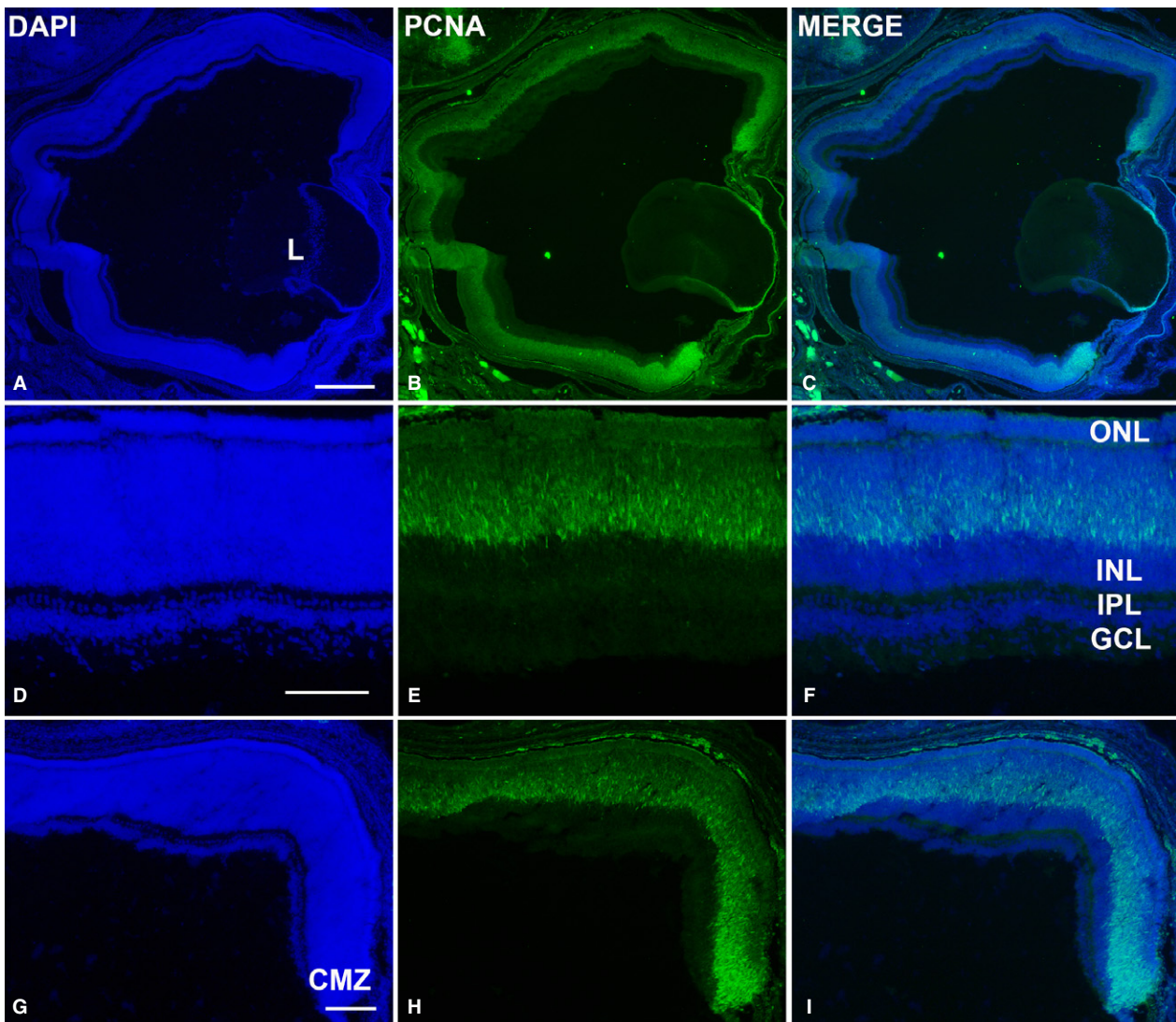


Fig. 3 PCNA-immunoreactivity in the retina of *Taeniopygia guttata* hatchlings. Abundant PCNA-positive nuclei were observed throughout the entire retina (A–C). They were restricted to the outer INL in the central retina (D–H). Proliferative activity was intense in the peripheral-most retina (G–I). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; L, lens; ONL, outer nuclear layer. Scale bars: 200 μm (A–C); 100 μm (D–I).

to the IPL, suggesting an additional vitreal-to-scleral gradient. Furthermore, the typical cytoarchitecture of the vertebrate retina was observed in almost the entire perinatal retina, but evident morphological features of immaturity were still found.

Discussion

Retinal maturity at hatching in *T. guttata*

The retina of precocial bird species such as chicken, duck or quail already has all its layers at birth and shows differentiated cells (Prada et al. 1991; Drenhaus et al. 2007; Rojas et al. 2007; Bejarano-Escobar et al. 2015). The present study

has shown that, at hatching, the layering was complete at central and mid-peripheral regions of the zebra finch retina. However, features of immaturity were still observable: ganglion cell bodies were arranged in two or three rows and the plexiform layers were poorly developed. Furthermore, photoreceptors are still undifferentiated as has been described in other altricial birds such as the pigeon (*Columba livia*) (Rojas et al. 2007) in which photoreceptor maturation extends over the first two postnatal weeks of life. Additionally, PCNA-immunoreactivity was abundant in cells located in the *T. guttata* peripheral-most retina. The number of PCNA-positive nuclei decreased progressively in cells in the INL that were located away from the retinal margin, but they were still abundant in the differentiated

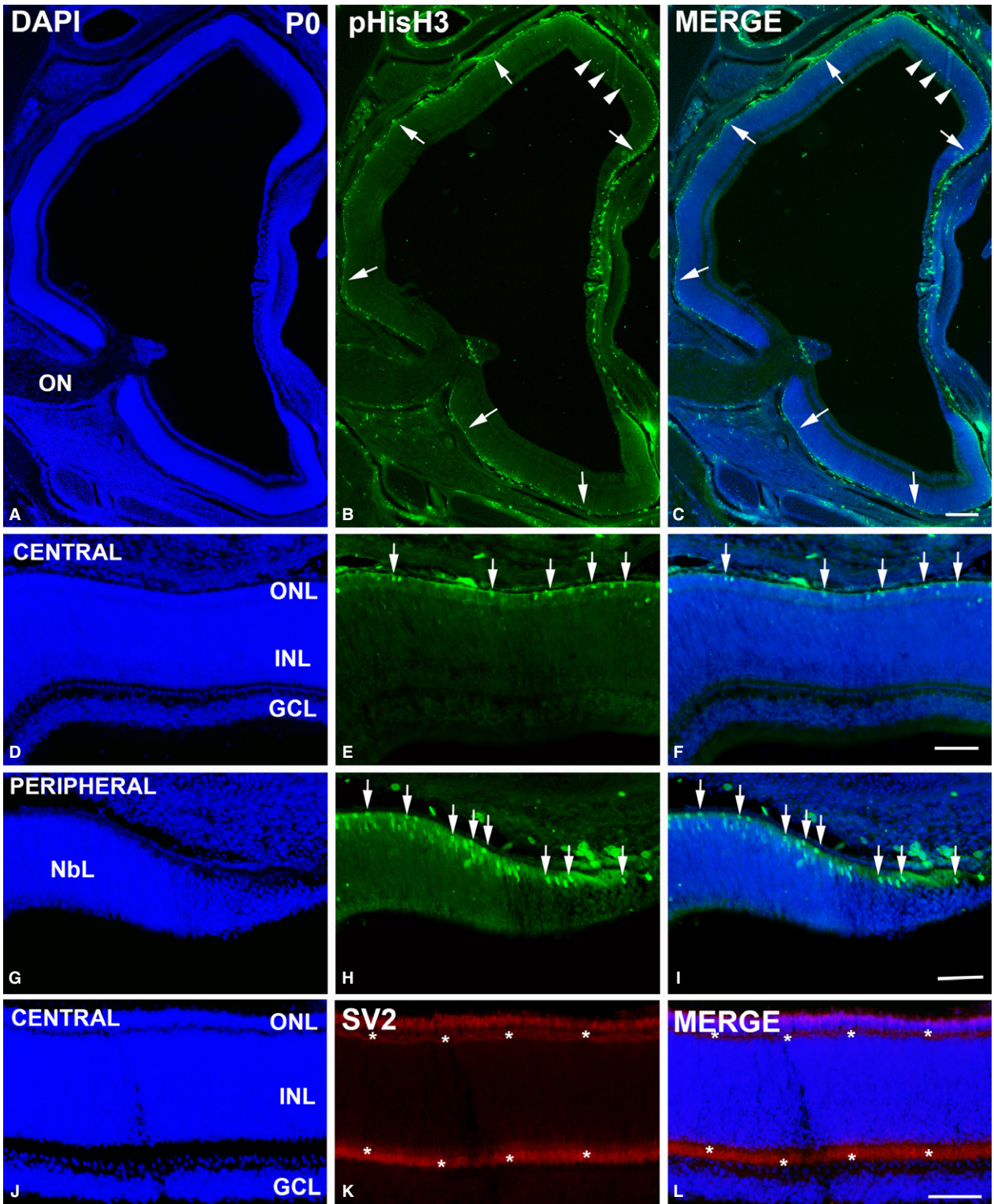


Fig. 4 pHisH3- (A–I) and SV2-immunoreactivities (J–L) in the *Taeniopygia guttata* retina at the hatching day. Apical mitoses located in the scleral surface were clearly observable in both the central and the peripheral retina (arrows in B,C,E,F,H,I). Immunoreactive non-apical mitoses were also detected in the peripheral retina (arrowheads in B,C). Plexiform layers showed no DAPI staining (A,C,D,F,J,L) but strong SV2-immunoreactivity (asterisks in K,L). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; NbL, neuroblastic layer; ON, optic nerve; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bars: 200 μ m (A–C); 100 μ m (D–L).

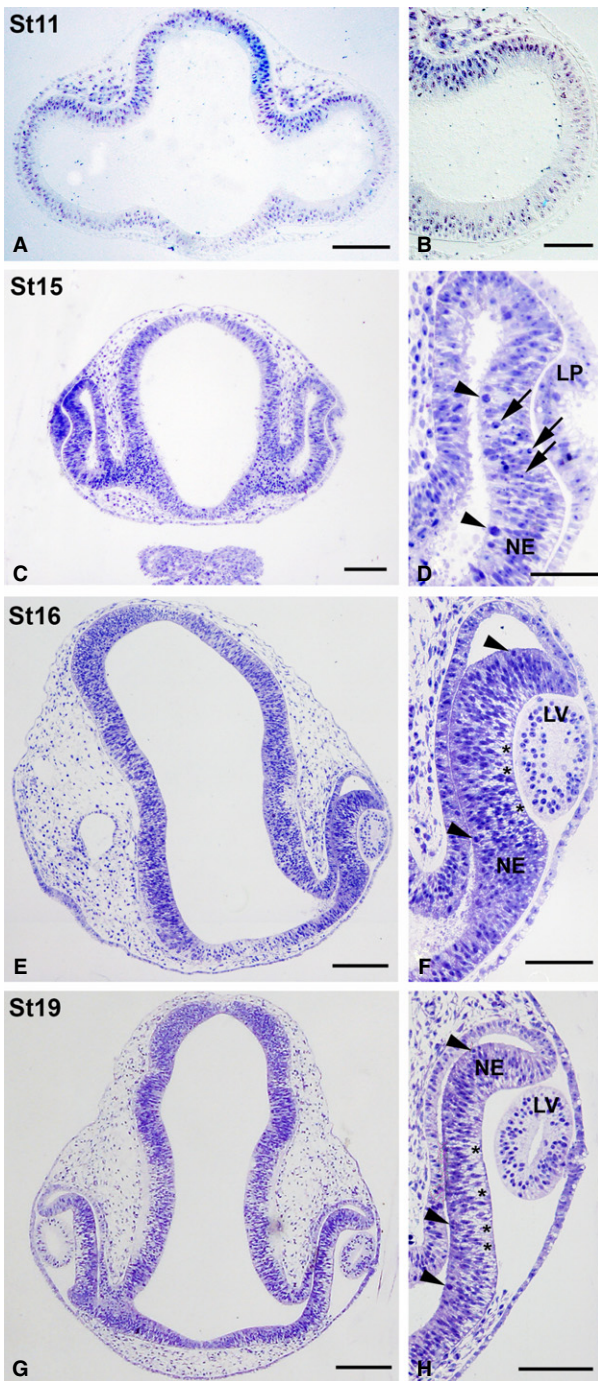


Fig. 5 Toluidine blue-stained semi-thin sections showing early stages of development of the eye rudiment in *Taeniopygia guttata*. Optic vesicles were composed of an undifferentiated neuroepithelium at St11 (A, B). Progressive invagination of the distal optic vesicle resulted in the formation of the optic cup (C–H). Many mitotic figures were seen in the scleral surface of the presumptive neural retina by these stages (arrowheads in D, F, H). The lens placode was present at St15 (C, D) and the lens vesicle could be observed by St16–St17 (E–H). Abundant pyknotic bodies (arrows in D) and extracellular spaces near the vitreal surface were clearly distinguishable by St16–St17 (asterisks in F, H). LP, lens placode; LV, lens vesicle; NE, neuroepithelium. Scale bars: 100 μm (A–H).

retina. PCNA-immunoreactive nuclei were mainly located in the outer INL. Abundant apical (also known as 'scleral' or 'ventricular') mitoses were observed in the laminated central and mid-peripheral *T. guttata* retina. It has been described that the cessation of cytogenesis, monitored by the disappearance of mitotic figures in the ventricular surface of the retina, is closely coincident in space and time with the development of the OPL in fish (Bejarano-Escobar et al. 2012; Pavón-Muñoz et al. 2016) and some mammals (Robinson et al. 1985; Stone et al. 1985). However, the OPL was clearly developed in *T. guttata* hatchlings and we found mitotic activity in the ventricular surface of the laminated retina. These data coincide with results obtained in the rabbit, where apical mitoses have been found in retinal regions with developed plexiform layers (Sharma & Ehinger, 1997). Abundant apical mitoses were also detected in the CMZ of hatchlings. These results showed important differences with those described for the chicken retina (Fischer & Reh, 2000). These authors have found no cells in the central retinal regions that were labelled for pHisH3, and only a few of them in the retinal margin of hatched chickens. Furthermore, the same authors also showed that PCNA was absent, except for low levels in the nuclei of photoreceptors in the central retina of postnatal chicks. They also found a small cluster of PCNA-immunolabelled nuclei at the margin of the retina. Immunoreactivity for PCNA progressively decreased in cells in the INL that were located away from the peripheral-most retina (Fischer & Reh, 2000). Therefore, the proliferative activity in the retina of *T. guttata* hatchlings is greater than that observed in hatched *G. gallus*. Moreover, the CMZ is more prominent in altricial bird species than that described for precocial birds. Therefore, in contrast to *G. gallus* where retinal neurogenesis takes place nearly exclusively during embryogenesis, abundant retinal neurons seem to be generated in *T. guttata* during post-hatch development.

Comparing these results with those found in other vertebrates, no layering was observed in the retina of altricial fish species at hatching (Evans & Browman, 2004; Bejarano-Escobar et al. 2009, 2010, 2014; Pavón-Muñoz et al. 2016). In these species, retinal histogenesis proceeded rapidly during the first 3–5 days of life. These results are in agreement with those observed in the retina of some mammals like the mouse (Sharma et al. 2003; Diao et al. 2004), albino rat (Weidman & Kuwabara, 1968), ferret (Reese et al. 1996), and gerbil (Bytyqi & Layer, 2005), where the histological evidence for the differentiation of the plexiform layers, or at least one of them, is delayed until the postnatal period. In the case of precocial species of vertebrates, the retina is fully differentiated at the time of hatching/birth in fish (Candal et al. 2005, 2008; Harahush et al. 2009; Ferreiro-Galve et al. 2010; Bejarano-Escobar et al. 2012, 2013), reptiles (Francisco-Morcillo et al. 2006), and mammals (Sharma & Ehinger, 1997; Loeliger & Rees, 2005; Nag & Wadhwa, 2007; Guduric-Fuchs et al. 2009).

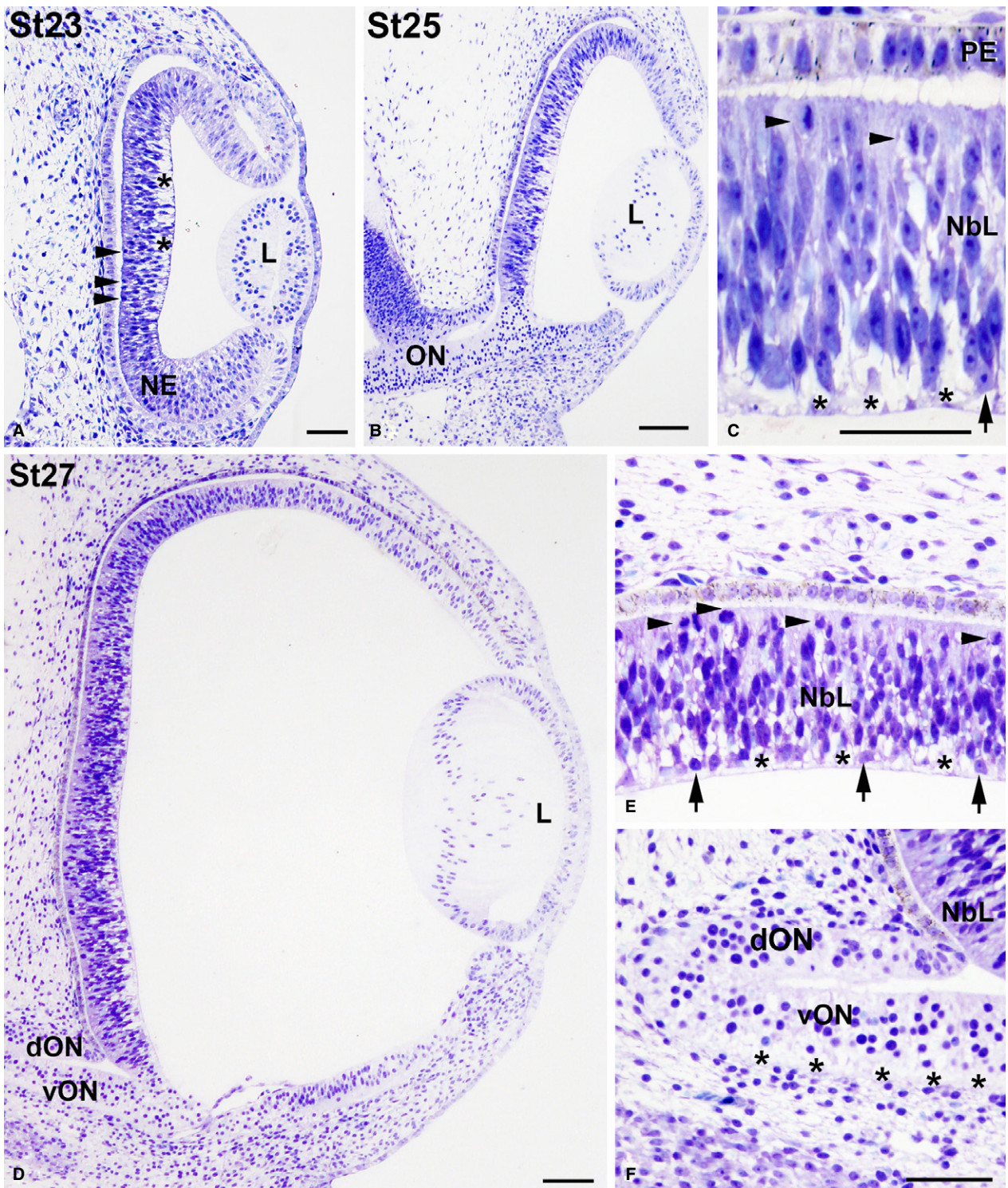


Fig. 6 Toluidine blue-stained transverse sections of the undifferentiated *Taeniopygia guttata* retina. Magnification of (B) is shown in (C), and magnifications of (D) are shown in (E,F). Lamination was absent in the developing retina between St23 and St27 (A–E). Abundant ventricular mitosis (arrowheads in A,C,E) and extracellular spaces located near the vitreal surface (asterisks in A,C,E) were observed. The neural retina is composed of NE at St23 and the first differentiated neuroblasts were observed in the vitreal region of the retina at St25 (arrow in C), increasing in number at St27 (arrows in E). Ganglion cell axons were detected in the ventral region of the ON (asterisks in F). Note that faint pigmentation was first observed in the PE at St25. dON, dorsal optic nerve; L, lens; NbL, neuroblastic layer; NE, neuroepithelium; PE, pigment epithelium; vON, ventral optic nerve. Scale bars: 100 μ m (A–F).

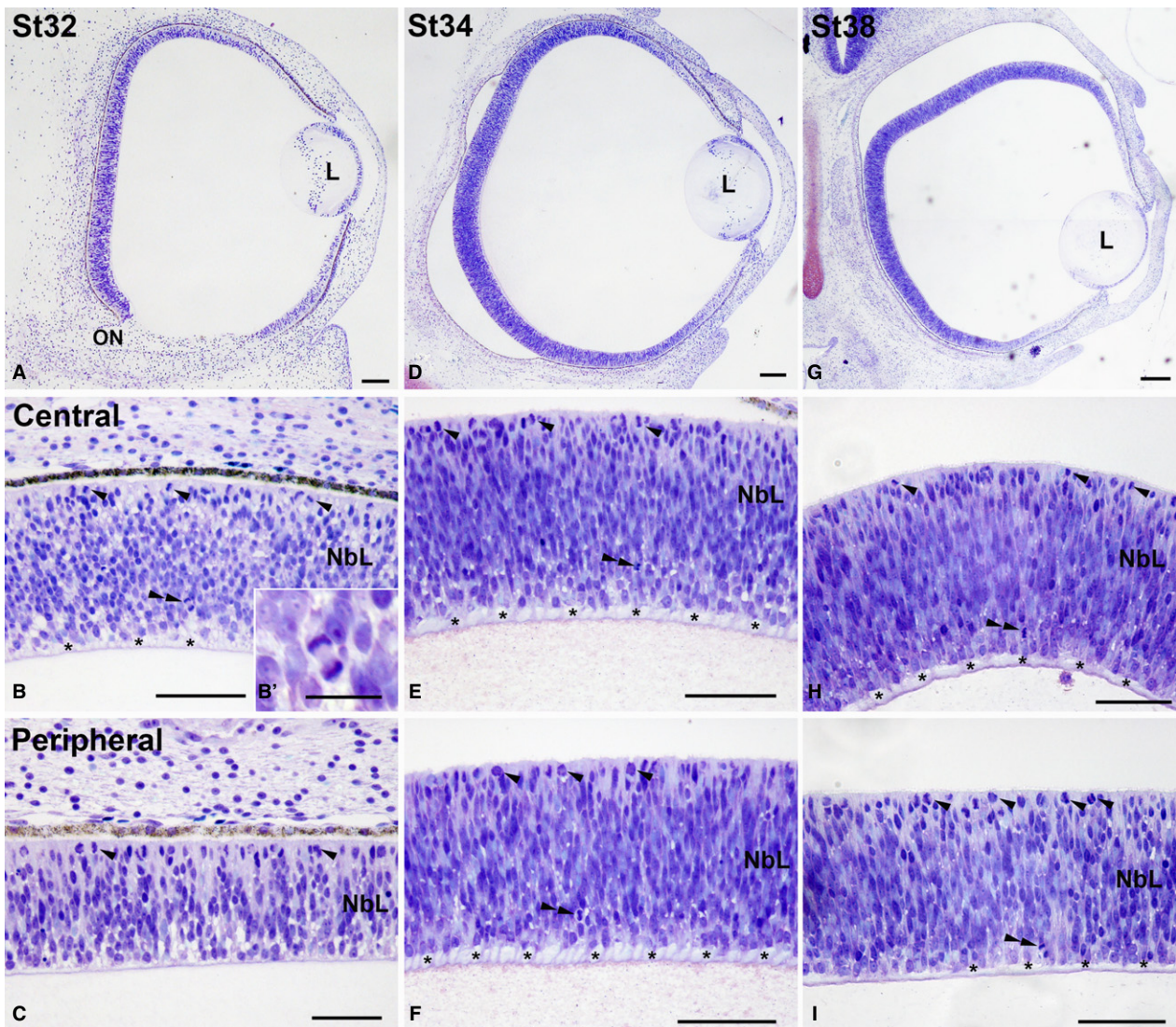


Fig. 7 Toluidine blue-stained transverse sections of *Taeniopygia guttata* developing retina. Micrographs showing the entire retina (A,D,G) and magnifications of the central (B,B',E,H) and peripheral regions (C,F,I) are shown. Abundant apical mitoses (arrowheads in B,C,E,F,H,I) and ganglion cell axons located in the vitreal surface (asterisks in B,E,F,H,I) were distinguished. Non-apical mitoses appeared in the vitreal region (double arrowheads in B,E,F,H,I). The mitotic spindle in non-apical mitoses was usually aligned perpendicular to the vitreal surface (B'). L, lens; NbL, neuroblastic layer. Scale bars: 100 μm (A–H); 30 μm (B').

Retinal morphogenesis and histogenesis in *T. guttata*

The first differentiated neuroblasts in *T. guttata* appeared in the vitreal-most region of the central retina at St24 (108 h). These early-born neurons are identified in the present paper by morphological criteria, but we have also identified them immunohistochemically with Tuj-1 antibody raised against class III β -tubulin (unpublished observations, Javier Francisco-Morcillo, JFM). The first undifferentiated neuroblasts in the chick retina have also been labelled with Tuj-1 antibody in the developing retina of the chick at stage 16 of Hamburger & Hamilton (1951) (HH16, 51–56 h, see Table 2) (Snow & Robson, 1994, 1995; Francisco-Morcillo et al. 2005).

Later in development, abundant non-apical mitoses were observed localized in the inner region of the undifferentiated *T. guttata* retina. These non-apical mitotic figures (also called 'ectopic' or 'basal' mitoses) have also been described during retinogenesis in zebrafish (Godinho et al. 2007; Weber et al. 2014), small-spotted catshark (Bejarano-Escobar et al. 2012), chick (Edqvist & Hallböök, 2004; Boije et al. 2009; Shirazi Fard et al. 2014), cat (Rapaport et al. 1985; Robinson et al. 1985), and human (Smirnov & Puchkov, 2004). Edqvist & Hallböök (2004) have shown that basal mitosis occurs in the chicken between HH24 (E4.5) and HH35 (E8–9). In the present study, non-apical mitoses were observed in the retina of *T. guttata* from St34 to St44 (E7.25–E12), later

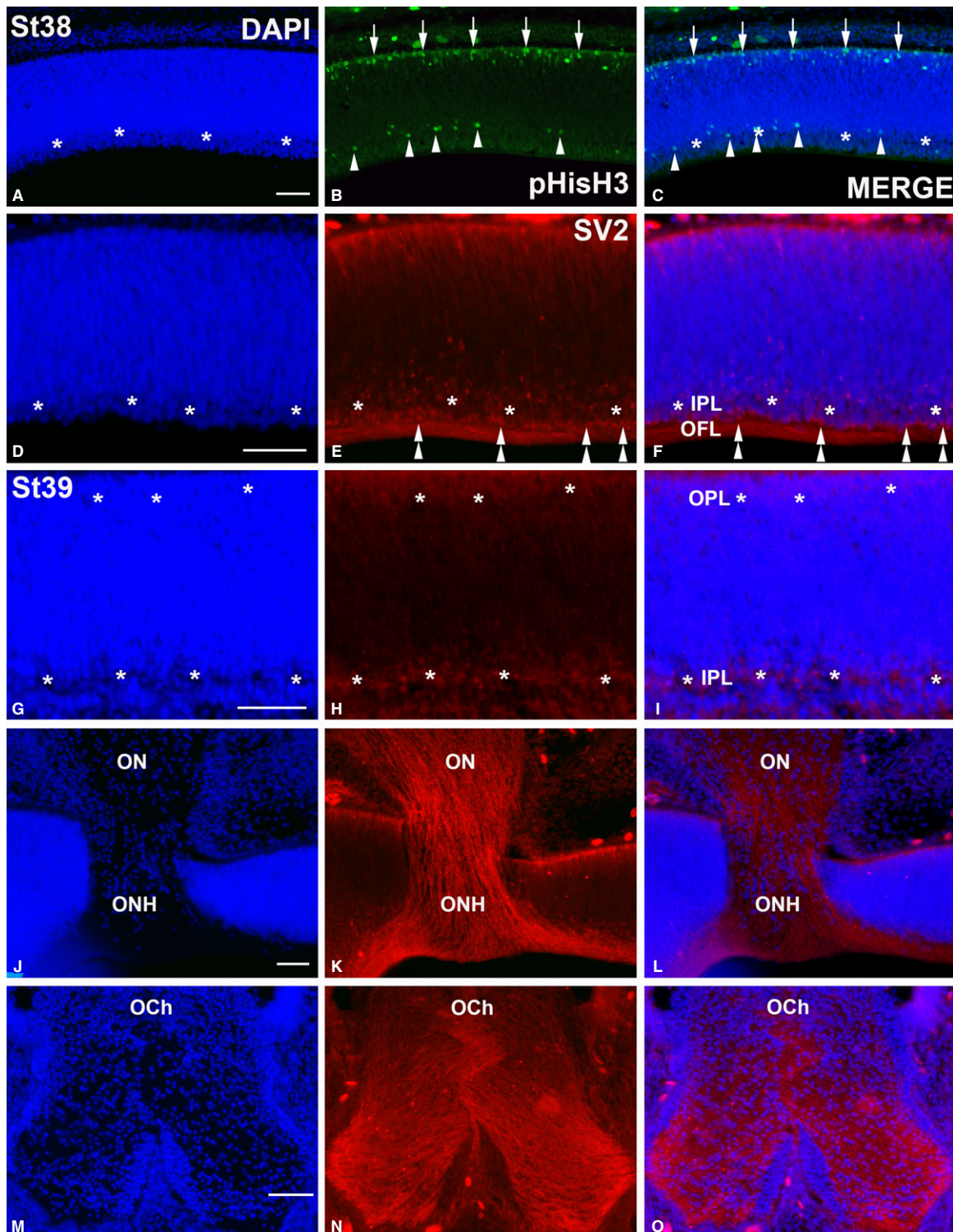
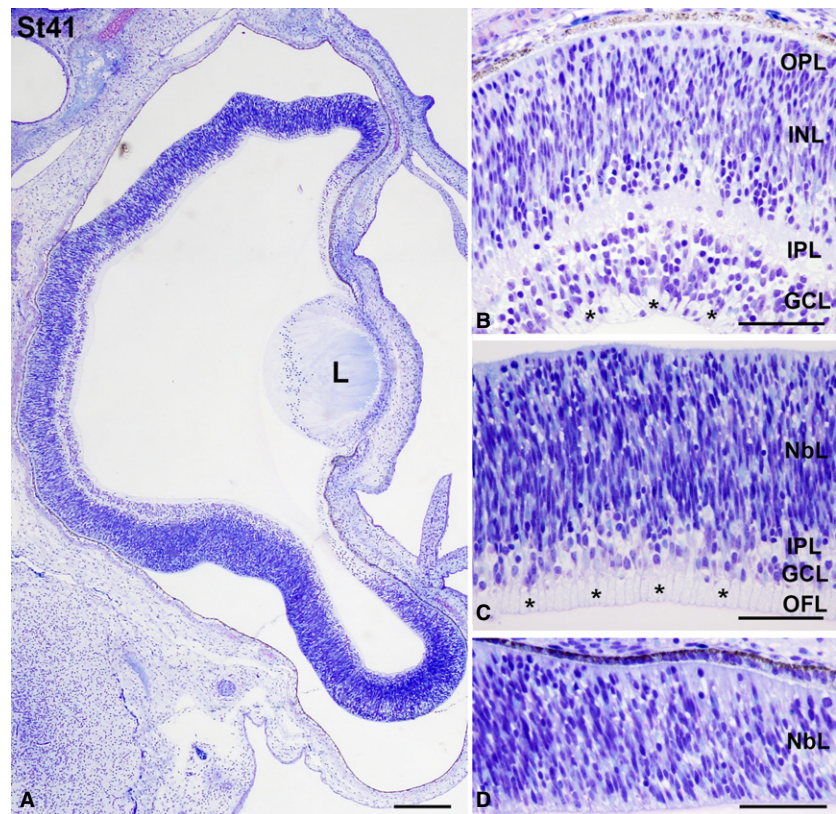


Fig. 8 pHisH3- (A–C) and SV2-immunoreactivities (D–O) in the *Taeniopygia guttata* retina and optic pathways at St38 (A–F) and St39 (G–O). Sections were counterstained with DAPI. pHisH3-immunopositive mitoses were detected in both the scleral (arrows in B,C) and vitreal regions (arrowheads in B, C). At St38, the IPL could be recognized as a DAPI-negative layer devoid of cell nuclei in the central retina (asterisks in A,C,D,F) that was faintly labelled with anti-SV2 antibody (asterisks in E,F). SV2-immunoreactivity was also detected in sparse ganglion cell perikarya (double arrowheads in E,F) and in the optic fibre layer. A poorly developed SV2-immunoreactive OPL emerged at St39 in the outer retina, whereas the IPL increased in size (asterisks in G–I). Ganglion cell axons were strongly labelled with the SV2 antisera in both the optic nerve (G–I) and optic chiasm (J–L). IPL, inner plexiform layer; OCh, optic chiasm; OFL, optic fibre layer; ON, optic nerve; ONH, optic nerve head; OPL, outer plexiform layer. Scale bars: 100 μ m (A–O).

Fig. 9 Toluidine blue-stained transverse sections at St41 *Taeniopygia guttata* retina. Magnifications of the central (B), mid-peripheral (C), and peripheral (D) retina are shown. Abundant ganglion cell axons were observed in the OFL (asterisks in B,C). While retinal lamination was complete in the central retina (A,B), the OPL was absent in the mid-peripheral retina (A,C). The peripheral retina showed an undifferentiated aspect (A, D). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; L, lens; NbL, neuroblastic layer; OFL, optic fibre layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bars: 200 μm (A); 100 μm (B–D).



than in the chick (Table 2) (see below). During these stages, an obvious central-to-peripheral change in the pattern of appearance of mitotic figures was seen, as has been observed in the chicken (Boije et al. 2009). This coincides with the central-to-peripheral gradient of cell differentiation described for the rest of the vertebrates (Prada et al. 1991; Candal et al. 2005; Francisco-Morcillo et al. 2005, 2006; Bejarano-Escobar et al. 2009, 2010, 2012; Álvarez-Hernán et al. 2013; Pavón-Muñoz et al. 2016). Edqvist & Hallböök (2004) have also demonstrated that non-apical mitoses correspond to terminal basal mitoses undergone by horizontal cell precursors. In agreement with these results, Godinho et al. (2007) showed that these basal divisions give rise mainly to horizontal cells in the retina of teleost. However, other retinal cell types may have also been produced from these mitoses in zebrafish. Therefore, the numerous non-apical mitoses make the developing retina of *T. guttata* a pre-eminent system for studying the development of horizontal cells.

In addition to the central-to-peripheral gradient, the present paper has also shown that histogenesis progressed in a vitreal-to-scleral manner. Thus, the OPL evolved later than the IPL (Table 2), as has previously been described in the developing retina of the chick (Drenhaus et al. 2007). This delay in the OPL formation with respect to the IPL has been also detected in the retina of sharks (Harahush et al. 2009; Ferreiro-Galve et al. 2010; Bejarano-Escobar et al. 2012) and mammal species (Young, 1985a,b; Reese

et al. 1996; Rapaport et al. 2004). In contrast, the emergence of both plexiform layers occurs simultaneously in the retina of different fish species (Kitambi & Malicki, 2008; Bejarano-Escobar et al. 2009, 2010; Pavón-Muñoz et al. 2016) and turtles (Francisco-Morcillo et al. 2006). The delay of emergence between the IPL and the OPL in *T. guttata* was also monitored immunohistochemically using antibodies against SV2, which has become a powerful tool in retinogenesis studies.

Delayed visual system morphogenesis and retinal maturation in altricial species

The zebra finch is classified as an altricial bird species. The results of the present study showed that many of the morphological features that occur during visual system development, such as the formation of the optic vesicle, formation of the optic cup, early differentiation of ganglion cells, onset of appearance of non-apical mitosis, and emergence of the plexiform layers, begins earlier in *G. gallus* than in *T. guttata* (Table 2). These results are in agreement with the observations of Murray et al. (2013), which provided a detailed description of embryological development of *T. guttata* and compared developmental differences with *G. gallus*. Those workers showed that, although the total incubation time for *T. guttata* is substantially shorter than the incubation time for *G. gallus* (14 vs. 21 days, respectively), the chicken showed faster development in the early

Table 2 Chronology of different features of morphogenesis, histogenesis, and cell differentiation in the developing and hatched retina of zebra finch and chicken. St, stage (Murray et al. 2013). HH, stages of Hamburger & Hamilton (1951).

	Event	<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>Gallus gallus</i>	References
Embryonic retina	Optic vesicle	Onset: St9 (42 h)	HH9 (29–33 h)	Murray et al. (2013) and Hamburger & Hamilton, (1951)
	Optic cup	Onset: St14 (64 h)	HH15 (50–55 h)	Hamburger & Hamilton, (1951)
	Differentiating ganglion cells	Onset: St24 (108 h)	HH16 (51–56 h)	Snow & Robson, (1994)
	Non-apical divisions	Onset: St34 (E7.25) Offset: St44 (E12)	Onset: HH24 (E4) Offset: HH35 (E8–9)	Edqvist & Hallböök, (2004) and Boije et al. (2009)
	Emergence IPL Emergence OPL	St38 (E8.5) St39 (E9)	HH31 (E7) HH34 (E8)	Drenhaus et al. (2007)
Hatched retina	Proliferative activity	Abundant PCNA-positive nuclei both in the CMZ and outer region of the INL in the central and mid-peripheral retina	Sparse PCNA-positive nuclei in the CMZ. A few PCNA-immunopositive nuclei in the ONL of the central and mid-peripheral retina	Fischer & Reh, (2000)
		Abundant pHisH3-positive cells both in the CMZ and scleral surface of the central and mid-peripheral retina	Sparse pHisH3-positive cells restricted to the CMZ	

stages than the zebra finch did. Blom & Lilja (2005) also demonstrated that 'demand' organs such as the nervous system, muscles or skeleton develop later in altricial species compared with 'supply' organs such as the digestive organs. In contrast, precocial species exhibit slower early development of 'supply' organs and more rapid early development of 'demand' organs. Therefore, the onset and the offset of the visual system development in *T. guttata* is delayed relative to precocial bird species, such as the chicken, in both the embryonic and the postnatal period.

Conclusions and future perspectives

In young fish and amphibians, most retinal growth arises from the continuous development of new retinal tissue in a region located at the periphery of the mature tissue, the CMZ. However, the addition of new neurons from stem cell niches is diminished in postnatal birds compared with that in fish and amphibians (Amato et al. 2004; Centanin & Witbrodt, 2014; Ail & Perron, 2017). This postnatal neurogenesis in the chicken is exclusively effected by progenitors located in the CMZ. These progenitors are restricted to producing primarily amacrine and bipolar cells (Fischer & Reh, 2000). In the present study, we have shown the existence of a prominent CMZ with abundant mitotic activity in the retina of *T. guttata* hatchlings. Furthermore, abundant mitoses were also detected in the scleral region of the laminated retina. Therefore, our findings suggest that neurogenic process in the postnatal *T. guttata* retina is intense. This partially undifferentiated stage of maturation at hatching makes the postnatal *T. guttata* retina an appropriate

model with which to study avian retinal postnatal neurogenesis. Indeed, *T. guttata* is considered to be an exceptional model with which to study adult neurogenesis in the central nervous system (for a review, see Charvet & Striedter, 2011). Thus, the major period of telencephalic neurogenesis ends approximately 1 week after hatching, although a limited amount of telencephalic neurogenesis is detected in the adult tissue (Dewulf & Bottjer, 2005; Charvet & Striedter, 2008, 2011; Striedter & Charvet, 2008). Moreover, this species also contains undifferentiated progenitor cells that contribute to an overall greater number of neurons in song-control nuclei (Dewulf & Bottjer, 2005), even during the juvenile period. The incidence and the duration of neurogenesis in post-hatched retina in *T. guttata* specimens and the factors involved in these mechanisms are subjects for future study.

Finally, the presence of stem cell niches is closely related to the regenerative capacity of the tissue. In the chicken retina, Müller glia have the potential to become progenitor cells in the avian retina (Gallina et al. 2014) and, after damage or growth-factor stimulation, an important subset of these cells can be stimulated to regenerate the adult tissue (Fischer & Reh, 2001; Fischer et al. 2014). These results make the chicken retina an excellent model for the study of regenerative processes and hence are critical to vision research in the study of human retinal pathologies. The fact that *T. guttata* is an altricial bird species allows manipulations and treatments to be performed postnatally. Our findings show that *T. guttata* is an appropriate alternative model system for the study of the mechanisms responsible for retinal regeneration.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to M. S. Holguín-Arévalo for her excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2007-67540), Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2015-6465P) and Junta de Extremadura (PRI06A195, IB16121, GR15158).

Author contributions

G.A.H., E.S.R., and I.H.N. performed histological and immunohistochemical assays. A.M. participated in acquisition of data and critical revision of the manuscript. J.R.L., G.M.P., and J.F.M. conceived and designed the experiments and constructed figures. J.F.M. wrote the paper.

References

- Ail D, Perron M (2017) Retinal degeneration and regeneration – lessons from fishes and amphibians. *Curr Pathobiol Rep* 5, 67–78.
- de Almeida HM, Sousa RP, Bezerra DO, et al. (2015) Greater rhea (*Rhea americana*) external morphology at different stages of embryonic and fetal development. *Anim Reprod Sci* 162, 43–51.
- Álvarez-Hernán G, Bejarano-Escobar R, Morona R, et al. (2013) Islet-1 immunoreactivity in the developing retina of *Xenopus laevis*. *Sci World J* 2013, 740420.
- Amato MA, Arnault E, Perron M (2004) Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences. *Int J Dev Biol* 48, 993–1001.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, et al. (2009) Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneus 1758). *Exp Eye Res* 89, 398–415.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, DeGrip WJ, et al. (2010) Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314, 580–605.
- Bejarano-Escobar R, Holguín-Arévalo MS, Montero JA, et al. (2011) Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Dev Dyn* 240, 1841–1855.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Duran AC, et al. (2012) Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 220, 318–335.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Durán AC, et al. (2013) Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 223, 171–184.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, et al. (2014) Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. *Rev Fish Biol Fisheries* 24, 127–158.
- Bejarano-Escobar R, Álvarez-Hernán G, Morona R, et al. (2015) Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor Islet-1 in the developing and mature vertebrate retina. *Exp Eye Res* 138, 22–31.
- Bergmann M, Grabs D, Rager G (1999) Developmental expression of dynamin in the chick retinotectal system. *J Histochem Cytochem* 47, 1297–1306.
- Blanchart A, Romaguera M, García-Verdugo JM, et al. (2008) Synaptogenesis in the mouse olfactory bulb during glomerulus development. *Eur J Neurosci* 27, 2838–2846.
- Blom J, Lilja C (2005) A comparative study of embryonic development of some bird species with different patterns of postnatal growth. *Zoology (Jena)* 108, 81–95.
- Boije H, Edqvist PH, Hallböök F (2009) Horizontal cell progenitors arrest in G2-phase and undergo terminal mitosis on the vitreal side of the chick retina. *Dev Biol* 330, 105–113.
- Bruhn SL, Cepko CL (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J Neurosci* 16, 1430–1439.
- Bytyqi AH, Layer PG (2005) Lamina formation in the Mongolian gerbil retina (*Meriones unguiculatus*). *Anat Embryol (Berl)* 209, 217–225.
- Candal E, Anadón R, DeGrip WJ, et al. (2005) Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res Dev Brain Res* 154, 101–119.
- Candal E, Ferreiro-Galve S, Anadón R, et al. (2008) Morphogenesis in the retina of a slow-developing teleost: emergence of the GABAergic system in relation to cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 1194, 21–27.
- Centanin L, Wittbrodt J (2014) Retinal neurogenesis. *Development* 141, 241–244.
- Charvet CJ, Striedter GF (2008) Spatiotemporal clustering of cell death in the avian forebrain proliferative zone. *Int J Dev Biol* 52, 345–352.
- Charvet CJ, Striedter GF (2011) Developmental modes and developmental mechanisms can channel brain evolution. *Front Neuroanat* 5, 4.
- Dewulf V, Bottjer SW (2005) Neurogenesis within the juvenile zebra finch telencephalic ventricular zone: a map of proliferative activity. *J Comp Neurol* 481, 70–83.
- Diao L, Sun W, Deng Q, et al. (2004) Development of the mouse retina: emerging morphological diversity of the ganglion cells. *J Neurobiol* 61, 236–249.
- Drenhaus U, Voigt T, Rager G (2007) Onset of synaptogenesis in the plexiform layers of the chick retina: a transmission electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 70, 329–335.
- Edqvist PH, Hallböök F (2004) Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131, 1343–1351.
- Evans BI, Browman HI (2004) Variation in the development of the fish retina. *American Fisheries Society Symposium* 40, 145–166.
- Ferreiro-Galve S, Rodríguez-Moldes I, Anadón R, et al. (2010) Patterns of cell proliferation and rod photoreceptor differentiation in shark retinas. *J Chem Neuroanat* 39, 1–14.
- Fischer AJ, Reh TA (2000) Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220, 197–210.
- Fischer AJ, Reh TA (2001) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4, 247–252.
- Fischer AJ, Zelinka C, Gallina D, et al. (2014) Reactive microglia and macrophage facilitate the formation of Müller glia-derived retinal progenitors. *Glia* 62, 1608–1628.
- Francisco-Morcillo J, Sánchez-Calderón H, Kawakami Y, et al. (2005) Expression of Fgf19 in the developing chick eye. *Brain Res Dev Brain Res* 156, 104–109.
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2006) Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res* 1103, 32–48.

- Gallina D, Todd L, Fischer AJ (2014) A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Exp Eye Res* **123**, 121–130.
- Godinho L, Williams PR, Claassen Y, et al. (2007) Non-apical symmetric divisions underlie horizontal cell layer formation in the developing retina in vivo. *Neuron* **56**, 597–603.
- Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, et al. (2009) Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol Vis* **15**, 1915–1928.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88**, 49–92.
- Harahush BK, Hart NS, Green K, et al. (2009) Retinal neurogenesis and ontogenetic changes in the visual system of the brown banded bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum* (Hemiscyllidae, Elasmobranchii). *J Comp Neurol* **513**, 83–97.
- Hendrickson A, Yan YH, Erickson A, et al. (2007) Expression patterns of calretinin, calbindin and parvalbumin and their colocalization in neurons during development of Macaca monkey retina. *Exp Eye Res* **85**, 587–601.
- Kitambi SS, Malicki JJ (2008) Spatiotemporal features of neurogenesis in the retina of medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Dyn* **237**, 3870–3881.
- Köpl C, Futterer E, Nieder B, et al. (2005) Embryonic and posthatching development of the barn owl (*Tyto alba*): reference data for age determination. *Dev Dyn* **233**, 1248–1260.
- Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, et al. (2002) A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res* **134**, 31–41.
- Loeliger M, Rees S (2005) Immunocytochemical development of the guinea pig retina. *Exp Eye Res* **80**, 9–21.
- Marin-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, et al. (1999a) Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia* **27**, 226–238.
- Marin-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, et al. (1999b) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* **412**, 255–275.
- Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, et al. (1999c) Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol (Berl)* **200**, 289–300.
- Murray JR, Varian-Ramos CW, Welch ZS, et al. (2013) Embryological staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *J Morphol* **274**, 1090–1110.
- Nag TC, Wadhwa S (2007) Morphological and neurochemical development of the human neural retina. *Neuroembryol Aging* **4**, 19–30.
- Nice MM (1962) Development of behavior in precocial birds. pp 1–211. New York:Transactions Linnean Society of New York.
- Okada M, Erickson A, Hendrickson A (1994) Light and electron microscopic analysis of synaptic development in Macaca monkey retina as detected by immunocytochemical labeling for the synaptic vesicle protein, SV2. *J Comp Neurol* **339**, 535–558.
- Olea GB, Sandoval MT (2012) Embryonic development of *Columba livia* (Aves: Columbiformes) from an altricial-precocial perspective. *Rev Colomb Cienc Pecu* **25**, 3–13.
- Olea GB, Hernando AB, Lombardo DM (2016) Heterochronic events in the ontogeny of *Columba livia*, *Coturnix coturnix*, and *Gallus gallus domesticus*. *Rev Colomb Cienc Pecu* **29**, 274–282.
- Pavón-Muñoz T, Bejarano-Escobar R, Blasco M, et al. (2016) Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* **88**, 492–507.
- Prada C, Puga J, Pérez-Méndez L, et al. (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur J Neurosci* **3**, 1187.
- Rapaport DH, Robinson SR, Stone J (1985) Cytogenesis in the developing retina of the cat. *Aust NZ J Ophthalmol* **13**, 113–124.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, et al. (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* **474**, 304–324.
- Reese BE, Johnson PT, Baker GE (1996) Maturation gradients in the retina of the ferret. *J Comp Neurol* **375**, 252–273.
- Robinson SR, Rapaport DH, Stone J (1985) Cell division in the developing cat retina occurs in two zones. *Brain Res* **351**, 101–109.
- Rojas LM, Mitchell MA, Ramírez YM, et al. (2007) Comparative analysis of retina structure and photopic electroretinograms in developing altricial pigeons (*Columba livia*) and precocial Japanese quails (*Coturnix japonica japonica*). *Ornitol Neotrop* **18**, 503–518.
- Sharma RK, Ehinger B (1997) Mitosis in developing rabbit retina: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res* **64**, 97–106.
- Sharma RK, O'Leary TE, Fields CM, et al. (2003) Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* **145**, 93–105.
- Shirazi Fard S, All-Ericsson C, Hallböök F (2014) The heterogenic final cell cycle of chicken retinal Lim1 horizontal cells is not regulated by the DNA damage response pathway. *Cell Cycle* **13**, 408–417.
- Smirnov EB, Puchkov VF (2004) Characteristics of cellular proliferation in the developing human retina. *Neurosci Behav Physiol* **34**, 643–648.
- Snow RL, Robson JA (1994) Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience* **58**, 399–409.
- Snow RL, Robson JA (1995) Migration and differentiation of neurons in the retina and optic tectum of the chick. *Exp Neurol* **134**, 13–24.
- Stark JM, Ricklefs RE (1998) *Avian Growth and Development*. New York: Oxford University Press. pp. 3–30.
- Stone J, Egan M, Rapaport DH (1985) The site of commencement of retinal maturation in the rabbit. *Vision Res* **25**, 309–317.
- Striedter GF, Charvet CJ (2008) Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virginianus*). *J Comp Neurol* **507**, 1663–1675.
- Villar-Cheda B, Abalo XM, Villar-Cervino V, et al. (2008) Late proliferation and photoreceptor differentiation in the transforming lamprey retina. *Brain Res* **1201**, 60–67.
- Weber IP, Ramos AP, Strzyz PJ, et al. (2014) Mitotic position and morphology of committed precursor cells in the zebrafish retina adapt to architectural changes upon tissue maturation. *Cell Rep* **7**, 386–397.
- Weidman TA, Kuwabara T (1968) Postnatal development of the rat retina. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* **79**, 470–484.
- Young RW (1985a) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res* **353**, 229–239.
- Young RW (1985b) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* **212**, 199–205.



Retinal differentiation in an altricial bird species, *Taeniopygia guttata*: An immunohistochemical study

Guadalupe Álvarez-Hernán^{a,1}, Ismael Hernández-Núñez^{a,1}, Eva María Rico-Leo^b, Alfonso Marzal^c, José Antonio de Mera-Rodríguez^d, Joaquín Rodríguez-León^d, Gervasio Martín-Partido^a, Javier Francisco-Morcillo^{a,*}

^a Área de Biología Celular, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006, Badajoz, Spain

^b Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006, Badajoz, Spain

^c Área de Zoología, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006, Badajoz, Spain

^d Área de Anatomía Humana y Embriología, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, 06006, Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Altricial
Birds
Development
Histogenesis
Retina
Taeniopygia guttata
Precocial

ABSTRACT

The bird retina offers an excellent model to investigate the mechanisms that coordinate the morphogenesis, histogenesis, and differentiation of neuron and glial cells. Although these developmental features have been intensively studied in the chicken (*Gallus gallus*, Linnaeus 1758), a precocial bird species, little is known about retinogenesis in altricial birds. The purpose of this study was to examine the differentiation of retinal cells in the altricial zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot, 1817) and compare the results with those from previous studies in *G. gallus*. By using immunohistochemical techniques, the first differentiated TUJ1-/Isl1-positive neuroblasts were detected in the vitreal surface of the neuroblastic layer at later incubation times in *T. guttata* than in *G. gallus* (108 h vs 55 h). The immunoreactivity of these early differentiation markers coincided temporally with the appearance of the first PCNA-negative nuclei. Furthermore, the first visinin-positive photoreceptors (132 h vs 120 h) and the first Prox-1-immunoreactive neuroblasts (embryonic day 7.25 (E7.25) vs E6.5) were also detected at later embryonic stages in the retina of *T. guttata* than in the retina of *G. gallus*. At E13, one day before hatching, abundant PCNA- and pHisH3-immunoreactivities were detected in the *T. guttata* retina, while proliferation was almost absent in the *G. gallus* retina at perinatal stages. Therefore, these results suggest that cell differentiation in the retina is delayed in the altricial bird compared to precocial birds. Furthermore, the *T. guttata* retina was not completely developed at hatching, and abundant mitotically active precursor cells of retinal neurons were found, suggesting that retinal neurogenesis was intense at perinatal stages.

1. Introduction

There is extensive information about embryological features in precocial birds that are considered as model organisms, such as the chicken, *Gallus gallus* (Hamburger and Hamilton, 1951), or the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, (Ainsworth et al., 2010). There have also been studies describing the embryonic ontogeny of altricial bird species such as the society finch, *Lonchura striata* (Yamasaki and Tonosaki, 1988), the barn owl, *Tyto alba* (Köppl et al., 2005), or the feral pigeon, *Columba livia* (Olea and Sandoval, 2012), although only

partial information about specific features of their embryonic ontogeny is currently available. A few comparative studies have shown that there are substantial differences in embryological development between precocial and altricial birds. Altricial birds show less advanced growth at the early-to-middle stages of development than the precocial birds (Yamasaki and Tonosaki, 1988; Olea and Sandoval, 2012). The late embryonic stages in precocial bird species are primarily characterized by growth (Hamburger and Hamilton, 1951; Ainsworth et al., 2010) which could explain the increased tissue maturation observed at hatching in precocial bird species in comparison with altricial birds.

Abbreviations: ac, amacrine cell; gc, ganglion cell; GCL, ganglion cell layer; hc, horizontal cell; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; L, lens; NbL, neuroblastic layer; ON, optic nerve; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; Q, optic chiasm; V, vesicle.

* Corresponding author.

E-mail address: morcillo@unex.es (J. Francisco-Morcillo).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107869>

Received 7 May 2019; Received in revised form 3 November 2019; Accepted 4 November 2019

Available online 06 November 2019

0014-4835/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Most of the studies describing the morphological and physiological maturation of elements in specific tissues in altricial birds are related to the status of the chicks at hatching. With respect to the degree of maturation of the central nervous system and sensory systems in altricial hatchlings, these bird species delay many aspects of their brain and sensory organ maturation to the post-hatching period, contrary to precocial bird species (Stark and Ricklefs, 1998; Rojas et al., 2007; Charvet and Striedter, 2011). The retina of the altricial hatchlings of the pigeon, *Columba livia*, has no morphologically differentiated photoreceptors (Rojas et al., 2007). The morphological differentiation of the photoreceptors in this species occurs mainly during the first two weeks after hatching (Bagnoli et al., 1985; Rojas et al., 2007), much later than the other retinal cell types. It has also been shown that maturation of the retinal pigment epithelium (RPE) in newly hatched pigeons courses in parallel with photoreceptor outer segment differentiation (Porciatti et al., 1985). In contrast, photoreceptor differentiation is complete in quail hatchlings (Rojas et al., 2007). Furthermore, at the time of hatching, the precocial bird retina is functional and seems to be post-mitotic, with the exception of some proliferating cells located in the extreme periphery of the postnatal retina, in the ciliary marginal zone (CMZ) (Fischer and Reh, 2000; Kubota et al., 2002; Ghai et al., 2008). In conclusion, retinal differentiation occurs later in altricial than in precocial bird species.

During the embryonic period, the chicken retina serves as an excellent model to study vertebrate central nervous system development (Vergara and Canto-Soler, 2012). The retinal development of *G. gallus* is complete very early in its embryonic life (Kahn, 1973; Prada et al., 1991; Snow and Robson, 1994; Bruhn and Cepko, 1996; McCabe et al., 1999; Drenhaus et al., 2003, 2007; Francisco-Morcillo et al., 2005; Rojas et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2015). The first differentiating neuroblasts are observed near the posterior pole of the chicken retina from Hamburger and Hamilton (1951) Stage 13, HH13 (48 h), to HH16 (51–56 h) (Prada et al., 1991; McCabe et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2005). From this point onwards, cell differentiation extends to the rest of the retina following central-to-peripheral, dorsal-to-ventral, and vitreal-to-scleral gradients (Prada et al., 1991; Francisco-Morcillo et al., 2005; Drenhaus et al., 2007). Neurogenesis in the chicken retina ends at E12, when the last bipolar cells exit the cell cycle (Prada et al., 1991). Indeed therefore, the main events during the chicken visual system morphogenesis, histogenesis, and onset of cell differentiation have been well identified histochemically and immunohistochemically.

In recent years, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817), an altricial bird species, has become a choice experimental model bird species to address questions in a wide variety of fields, including memory and learning (Moorman et al., 2011), neuroanatomy (Vargha-Khadem et al., 2005), and postnatal neurogenesis (Dewulf and Bottjer, 2005; Charvet and Striedter, 2008, 2011; Striedter and Charvet, 2008). More recently, Murray et al. (2013) have described the embryological staging of this altricial bird species, finding that it takes more time to reach each developmental stage than *G. gallus*. Furthermore, in a recent morphological study conducted in our laboratory, we obtained some interesting results concerning the *T. guttata* embryonic retina (Álvarez-Hernán et al., 2018). First, we detected intense proliferative activity at the hatching stage, whereas in the chicken, only sparse mitotic cells restricted to the CMZ are observed at this stage. Second, various maturational features of the visual system (morphogenesis of the optic vesicle and optic cup, appearance of the first differentiated neurons, and emergence of the plexiform layers) occurred at later stages than in the chicken. Third, at hatching, some features characteristic of immaturity were still detected in the *T. guttata* retina, such as very thin plexiform layers and poorly developed photoreceptors.

In the present study, we analysed immunohistochemically the retinal maturation of *T. guttata* in order to detect the onset of three processes: (i) the cessation of proliferation, (ii) neurogenesis, by using early post-mitotic markers that are expressed by neuroblasts shortly after the

last mitotic division, and (iii) cell differentiation, by using cell-specific markers. We discuss the results together with those obtained in other bird species, mainly in *G. gallus*, to compare the variability in the chronology of specific developmental features during bird ontogeny.

2. Material and methods

2.1. Animals and tissue processing

All animals were treated according to the regulations and laws of the European Union (EU Directive, 2010/63/EU) and Spain (Royal Decree 53/2013). A total of 25 unrelated zebra finch pairs were used in the study. Parental birds were distributed into two indoor aviaries (1 × 3 × 2 m). The aviaries were made of plywood with wire mesh roofs and front panels so as to allow acoustic but not visual contact between animals in adjacent aviaries. The aviaries had air temperatures of 19–35 °C. The birds were kept under ad libitum feeding conditions. They were supplied daily with Senegal, plata, and red millet seeds, both dried and germinated, and fresh water (with vitamins added thrice weekly). Each aviary was equipped with 12 wooden nest-boxes (12.5 × 12 × 14 cm), with coconut fibre placed on the floor as nesting material before the birds were introduced. The eggs were collected 5 h after lights came on in the morning.

After collection the eggs were placed within a rotating egg incubator designed for chicken eggs (Masalles S.A.). The incubator was maintained at 37.5 °C and 80–90% humidity. The eggs were laid in a small padded dish on the rotating bars of the incubator. They rolled within the dish, preventing embryo adhesion to the shell interior.

At this temperature the average time of incubation was 14 days, similar to the length of time required for a zebra finch egg to hatch under natural incubation conditions. A total of 31 embryos (Table 1) were included in the present study. To establish the degree of development of the *T. guttata* embryos, we took as referents the stages (St) described by Murray et al. (2013). These stages are based on external anatomical features, and number from 1 (pre-streak stage) to 46 (postnatal day 0, P0, newly hatched chick). All embryos were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% in phosphate-buffered solution (PBS) (0.1 M, pH 7.4) overnight at 4 °C. For the immunohistochemical analysis, samples were rinsed in phosphate-buffered solution (PBS; 0.1 M, pH 7.4) and then cryoprotected with PBS-sucrose (10%) overnight at 4 °C, soaked in embedding medium, frozen onto sectioning blocks, and stored at –80 °C. Cryostat sections 18 µm thick were cut in frontal and horizontal plans, thaw-mounted on Superfrost® Plus slides (Menzel-Glässer, Germany), air dried, and stored at –20 °C.

2.2. Western blotting

Working dilutions and sources of primary and secondary antibodies used in the present study are summarized in Table 2. The eye of a *T. guttata* hatchling was homogenized in lysis buffer (80 mM Tris-HCl pH 7.5; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0.27 M sucrose; 50 mM β-glycerol

Table 1
Staging according to Murray et al. (2013) of the *T. guttata* embryos included in the present study.

Stages	n	Incubation time (approx.) Murray et al. (2013)
St24	5	108 h
St25	5	114 h
St28	4	132 h
St32	4	6 days 18 h
St34	4	7 days 6 h
St38	3	8 days 12 h
St41	3	10 days
St45	3	13 days
	n = 31	

Table 2
Immunoreagents, working dilutions, and sources of antibodies used in the present study of *T. guttata* retinal ontogeny. Selected references are provided that describe the immunochemical profiles of these antibodies in the retina of birds.

Primary antibody	Working dilution (immunochemistry)	Working dilution (western blot)	Antibody suppliers	Immunochemical profiles and selected references
Mouse anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody (clone PC10)	1:200	1:1000	Abcam (Ref. ab29)	Proliferating nuclei in the developing and mature retina of birds (Fischer and Reh, 2000, 2001)
Mouse anti- β -tubulin class III (TuJ1) monoclonal antibody	1:200	1:1000	Abcam (Ref. ab14545)	Labels migratory neuroblasts, ganglion and amacrine cells in the developing and mature retina of birds (Snow and Robson, 1994)
Mouse anti-visinin (clone 7G4) monoclonal antibody	1:200	1:30	Sigma-Aldrich (Ref. P0089)	Labels photoreceptors in the developing and mature retina of birds (Yamagata et al., 1990)
Mouse anti-calretinin (clone 6B8.2) monoclonal antibody	1:200	1:1000	Millipore (Ref. MAB1568)	Subsets of ganglion, amacrine, horizontal, and bipolar cells in the developing and mature retina (Ellis et al., 1991)
Mouse anti-islet1 (clone 40.2D.6) monoclonal antibody	1:200	1:30	DSHB	Labels sub-populations of ganglion, amacrine, horizontal, and bipolar cells of the developing and mature retina of birds (Edqvist et al., 2006)
Mouse anti-prox1 polyclonal antibody	1:200	1:1000	Millipore (Ref. ABS-475)	Labels horizontal cells in the developing and mature retina of birds (Edqvist et al., 2006, 2008; Boije et al., 2008)
Rabbit anti-phospho-Histone H3 polyclonal antibody	1:200	1:1000	Millipore (Ref. 06-570)	Labels M-phase cells in the developing and mature retina of birds (Fischer and Reh, 2000, 2001; Álvarez-Hernán et al., 2018)
Secondary Antibody	Working dilution (immunochemistry)	Working dilution (Western blot)	Antibody suppliers	
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	1:200		Molecular Probes (Ref. A11029)	
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG	1:200		Molecular Probes (Ref. A11032)	
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	1:200		Molecular Probes (Ref. A11008)	
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG	1:200		Molecular Probes (Ref. A11037)	
Donkey anti-mouse IgG (H + L)		1:5000	ThermoFisher (Ref. SA1-100)	
Donkey anti-rabbit IgG		1:5000	ThermoFisher (Ref. SA1-200)	

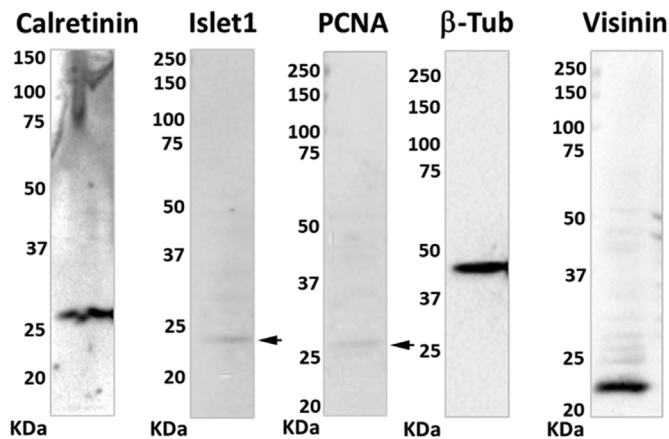


Fig. 1. Immunoblot of acrylamide gels of *T. guttata* adult eye protein extract incubated with antibodies against anti- β -tubulin (TUJ1), PCNA, CR, visinin (7G4), and Isl1 antibodies demonstrated the presence of those proteins in the tissue. The antibodies recognized a single protein band of an apparent molecular weight similar to that described in other species of vertebrates: CR, 31 Kd; Isl1, \approx 25 Kd; PCNA, 29–30 Kd; β -Tub, \approx 50Kd; Visinin, 23 Kd.

phosphate; 5 mM sodium pyrophosphate; 50 mM sodium fluoride; 1% Triton X-100; 0.1 mM sodium vanadate, beta-mercaptoethanol 1%, and cComplete™ 4 μ g/mL, a mix of protease inhibitors, Roche). Protein concentrations were measured by Bradford protein assay. Aliquots of tissue samples corresponding to 40 μ g of total protein were heated at 95 °C for 5 min. Samples were loaded onto 7.5% and 9.5% acrylamide gels. Proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane in Tris-glycine-methanol buffer. To verify the transfer efficiency, membranes were stained with Ponceau solution for 1 min. Membranes were washed several times in 0.5% TBS-Tween until the stain disappeared, blocked in 5% non-fat dry milk and 0.2% TBS-Tween at room temperature (RT) for 1 h, and incubated with the primary antibody at 4 °C overnight. They were then rinsed several times in 0.2% TBS-Tween, and incubated with the secondary antibody for 1 h at RT. The blot was rinsed several times in 0.2% TBS-Tween and then in 1 \times TBS. Membranes were processed for analysis using a chemiluminescence detection kit (Clarity™ Western ECL Substrate, BIO-RAD).

2.3. Immunohistochemistry

The dilutions and sources of primary and secondary antibodies used in the present study are listed in Table 2. Samples were subjected to an antigen retrieval process with citrate buffer (pH 6) at 90 °C for 30 min. Then the slides were allowed to cool at RT for 20 min. Cryostat sections were washed several times in 0.1% Triton-X-100 in PBS (PBS-T) and then pre-blocked in 0.2% gelatin, 0.25% Triton-X-100, Lys 0.1 M in PBS (PBS-G-T-L) for 1 h. Sections were incubated with the primary antibody in a humidified chamber at RT overnight. On the second day, slides were rinsed twice in PBS-T and once more in PBS-G-T, and then incubated with the secondary antibody for 2 h at RT in a humidified chamber. Then the sections were rinsed twice in PBS-T in darkness and incubated with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) for 15 min at RT followed by two rinses in PBS in darkness. Finally, the slides were mounted with Mowiol (polyvinyl alcohol 40–88, Fluka).

2.4. Image acquisition and processing

Immunolabeled sections of embryo and adult *T. guttata* were observed under an epifluorescence, bright field Nikon Eclipse 80i microscope, and photographed using an ultra-high-definition Nikon digital camera DXM1200F. Graphical enhancement and preparation for publication were performed in Adobe Photoshop (v.CS4). Immunoblot images were taken with a Molecular Imager ChemicDoc XRS (Bio-Rad)

and processed in Image Lab 5.1. Quantitative analysis of the density of mitosis during the development was carried out using Excel software. The surface of each section was measured on digital microphotographs using ImageJ free software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The density profiles were expressed as the mean \pm s.d. number of pHisH3-immunoreactive figures (mitotic cells, mc) per square millimetre (mc mm²). Statistical analyses were performed using Student's two-tailed *t*-test. Differences between groups were considered as significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Antibody validation

Retinal histogenesis in *T. guttata* embryos was carefully examined from St24, the stage at which the first postmitotic neuroblasts had previously been morphologically distinguished (Álvarez-Hernán et al., 2018), to St45, one day before hatching. The antibodies tested in the present work have been widely used in immunohistochemical studies of the developing and mature retina of different groups of vertebrates in order to monitor various aspects of proliferative activity and cellular characterization and differentiation. In the western blots, most of the antibodies used in the present study (see Table 2) recognized a single protein band in the eye samples of *T. guttata* (Fig. 1), which is in accordance with the predicted molecular weight of those same antigens in other species. We did not detect the presence of Prox1 and pHisH3 protein bands. Both of these antibodies have been widely used in neuroanatomical and developmental studies in the retina of fish (Alunni et al., 2007; Cid et al., 2010; Bejarano-Escobar et al., 2012a, 2014), amphibians (Perry et al., 2010), birds (Fischer and Reh, 2000; Edqvist et al., 2006, 2008; Boije et al., 2009; Álvarez-Hernán et al., 2018), and mammals (Dyer et al., 2003; Barton and Levine, 2008). In the case of Prox1 antibody, it has been validated by the suppliers for its use in immunohistochemistry and immunocytochemistry on different species, but was not suitable for Western blot analysis (Millipore: Ref. AB5475). However, we found that previous studies performed on the developing retina of *G. gallus* (Edqvist et al., 2006, 2008) and *Mus musculus* (Dyer et al., 2003) showed a similar expression pattern for Prox1 to that found in the present results (see below). In the case of pHisH3 antibody, it has been validated by the suppliers (Millipore: Ref. 06–570) for its use in Western blot, immunoprecipitation, and immunocytochemistry. We did not find an immunoreactive band in the Western blot analysis using the *T. guttata* embryonic tissue. However, we detected abundant apical and non-apical mitotic figures in the differentiating *T. guttata* retina (Álvarez-Hernán et al., 2018; present study). This is in concordance with previous studies performed on the differentiating retina of fish (Godinho et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Pavón-Muñoz et al., 2016), chicken (Boije et al., 2009), and mouse (Barton and Levine, 2008). All these data suggest an interspecific conservation of the corresponding epitopes for Prox1 and pHisH3.

3.2. Neurochemical study in the St45 *T. guttata* retina

The layering was complete in the central region of the St45 *T. guttata* retina (Fig. 2A,D,G). The patterns of staining for the different cell markers in this region were determined first so as to establish a set of referents with which to compare early embryonic stages. At this stage, we detected abundant PCNA-positive cells, mainly in the inner nuclear layer (INL) (Fig. 2B and C). Furthermore, we observed many pHisH3-positive mitotic figures mainly in the outer nuclear layer (ONL) (Fig. 2E and F). Proliferative and mitotic activities increased in a central-to-peripheral gradient (not shown). Similar results have been found previously in the retina of *T. guttata* hatchlings (Álvarez-Hernán et al., 2018).

The central-to-peripheral gradient of retinal maturation was also evident with the expression patterns of the cell differentiation markers

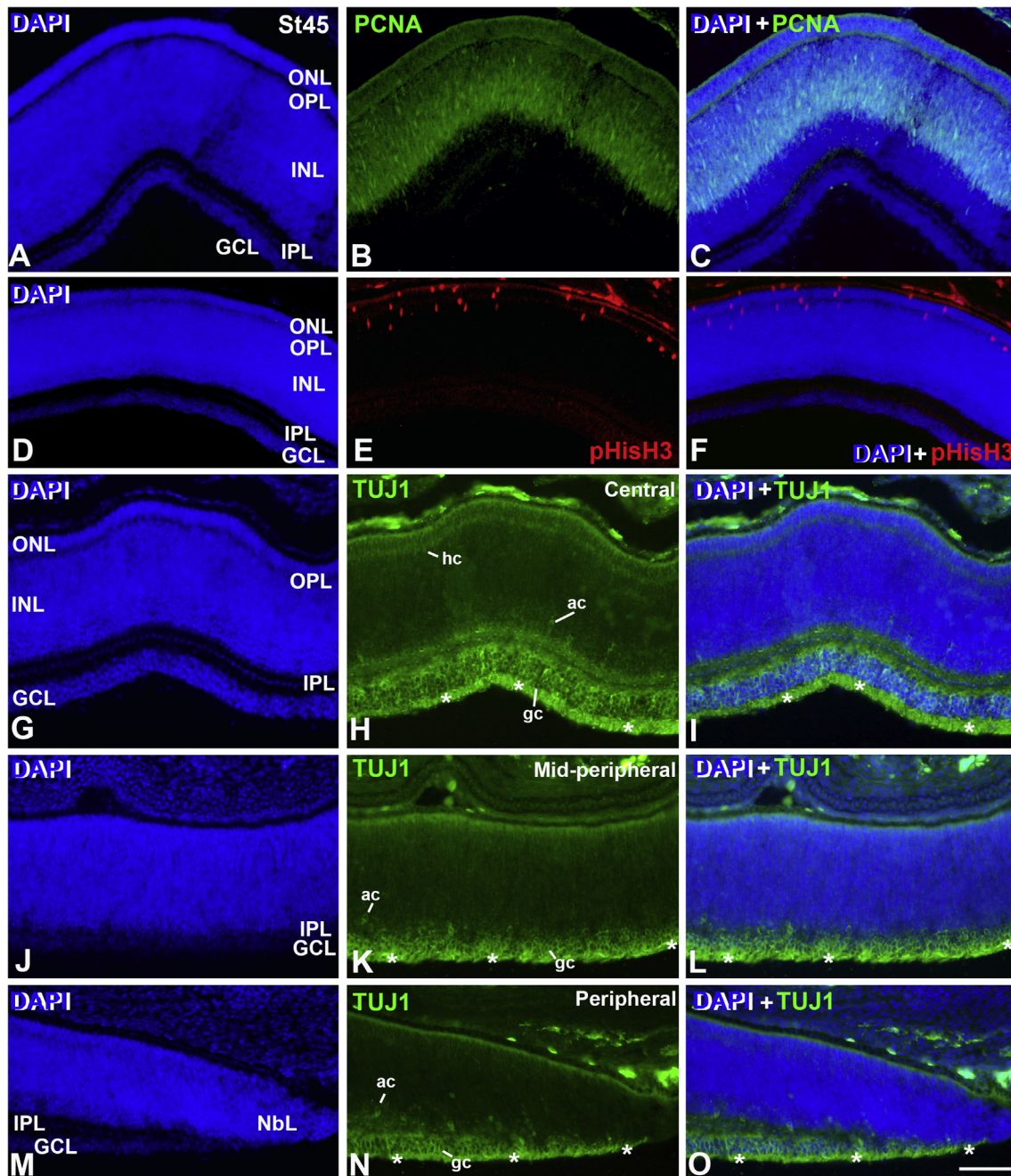


Fig. 2. Patterns of PCNA- (A–C), pHisH3- (D–F), and TUJ1- (G–O) immunoreactivities in the embryonic retina of *T. guttata* at St45. Sections were counterstained with DAPI. PCNA-immunoreactivity (B,C) was localized in the abundant nuclei mainly located in the INL of the central retina. pHisH3-positive mitoses (E,F) were detected in the ONL and outer surface of the INL. TUJ1-immunoreactivity in the central retina (H,I) allowed ganglion cell somata and axons (asterisks), and sparse amacrine cells to be identified. In the mid-peripheral (J–L) and peripheral (M–O) retina, DAPI staining showed an immature retina where ganglion and amacrine cells and axons (asterisks) were TUJ1-positive (K,N). *ac*, amacrine cell; *gc*, ganglion cell; *GCL*, ganglion cell layer; *INL*, inner nuclear layer; *IPL*, inner plexiform layer; *NbL*, neuroblastic layer; *ONL*, outer nuclear layer; *OPL*, outer plexiform layer. Scale bar: 50 μ m.

used in the present study. At St45, strong TUJ1 immunoreactivity was detected in the optic fibre layer (OFL), in the ganglion cell layer (GCL), and in the inner plexiform layer (IPL) (Fig. 2H and I) of the central retina. Sparse immunoreactive cell somata were observed in the amacrine cell layer (Fig. 2H and I). Furthermore, many immunopositive elements were also found in the horizontal cell layer (Fig. 2H and I). The outer plexiform layer (OPL) was absent in both the mid-peripheral (Fig. 2J) and the peripheral retina (Fig. 2M). TUJ1 immunoreactivity was restricted to the OFL, GCL, IPL, and to sparse cell somata located in the amacrine cell layer (Fig. 2K,L,N,O). The central retina showed subpopulations of ganglion, amacrine, and horizontal cells that were

immunoreactive against Islet-1 (Isl1) (Fig. 3B and C) and calretinin (CR) (Fig. 3E and F). Prox1 was mainly expressed in cells located in the horizontal cell layer, but also in a few nuclei displaced slightly to more internal regions of the INL (Fig. 3H and I). Abundant photoreceptors were also observed in the ONL with antibodies against visinin (Fig. 3K and L). The outer segments of the visinin-positive photoreceptors were either absent (not shown) or poorly developed at this stage (Fig. 3K',L'). Therefore, although the central retina of the St45 *T. guttata* retina showed several features of immaturity (such as intense proliferative activity or morphologically immature photoreceptors), differentiated cells could nevertheless be observed with the immunochemical markers

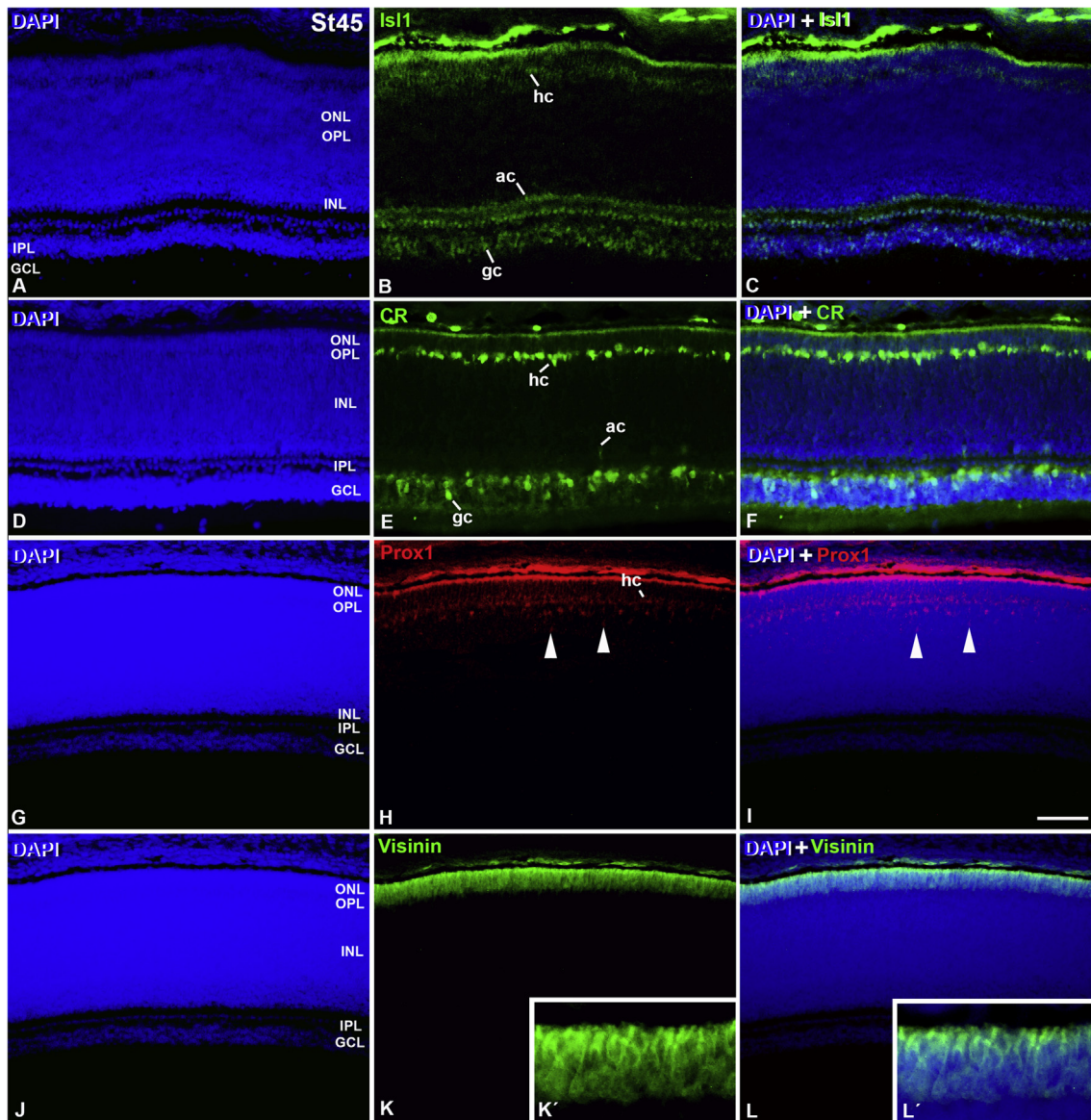


Fig. 3. Expression of cell markers in the embryonic retina of *T. guttata* at St45. Sections were counterstained with DAPI. Isl1-immunoreactivity was detected in the nuclei of ganglion, amacrine, and bipolar cells (B,C). CR immunoreactivity identified subpopulations of ganglion, amacrine, and horizontal cells (E,F). Horizontal cells in the INL were Prox1-positive (H,I), but this antibody recognized nuclei located in more internal regions of the INL (arrowheads in H,I). Abundant visinin-immunoreactive elements were restricted to the ONL (K,L). K' and L' are magnifications of K,L respectively. ac, amacrine cell; gc, ganglion cell; GCL, ganglion cell layer; hc, horizontal cell; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer. Scale bar: 50 μ m.

selected in the present study.

3.3. Neurochemical study in the differentiating retina (St24–St41)

A previous study conducted in our laboratory showed that the first differentiated neuroblasts could be morphologically distinguished in the posterior pole of the developing retina of *T. guttata* at St25 (Álvarez-Hernán et al., 2018). In the present study, we detected the first PCNA-negative (non-proliferative) cells in the vitreal-most region of the posterior pole of the retina at St24 (Fig. 4A–C), coinciding chronotopographically with the first TUJ1 immunoreactive elements in the vitreal-most region of the neuroblastic layer (NbL) (Fig. 4D–F). TUJ1 immunohistochemistry revealed round somata located near the vitreal region in close relationship with immunopositive axons that run parallel to the vitreal surface of the NbL. Furthermore, we observed sparse, bipolar in shape, TUJ1-immunoreactive cells at this stage (Fig. 4D–F). These bipolar cells showed ovoid somata located at various depths, and

radially oriented processes spanning the NbL (Fig. 4D–F). At St25, abundant pHisH3 mitotic figures were detected in the scleral surface of the NbL (Fig. 4H,J,L,N). Isl1-expression was first detected at this stage in some nuclei located in the vitreal-most region of the retina and in sparse ovoid nuclei dispersed throughout the NbL (Fig. 4I,J,M,N).

At St28, TUJ1 immunoreactivity increased in the vitreal surface of the retina and extended to the mid-peripheral regions in the dorsal retina (Fig. 5A–C). It is notable that the optic nerve head (ONH) presented strong immunoreactivity, and that the ventral and peripheral retina was devoid of TUJ1 immunoreactivity (Fig. 5A–C). Magnifications of the central retina clearly showed intense immunosignal in the OFL and abundant bipolar-shaped cells with vitreo-scleral processes spanning the NbL (Fig. 5D–F). The developing optic nerves (Fig. 5G–I), the optic chiasm, and the optic tracts (Fig. 5J–L) showed abundant TUJ1-immunoreactive retinal axons. At this stage, the number of PCNA-negative neuroblasts abutting the vitreal surface of the NbL increased (Fig. 6A–C), but a few PCNA-negative cells also appeared in the scleral

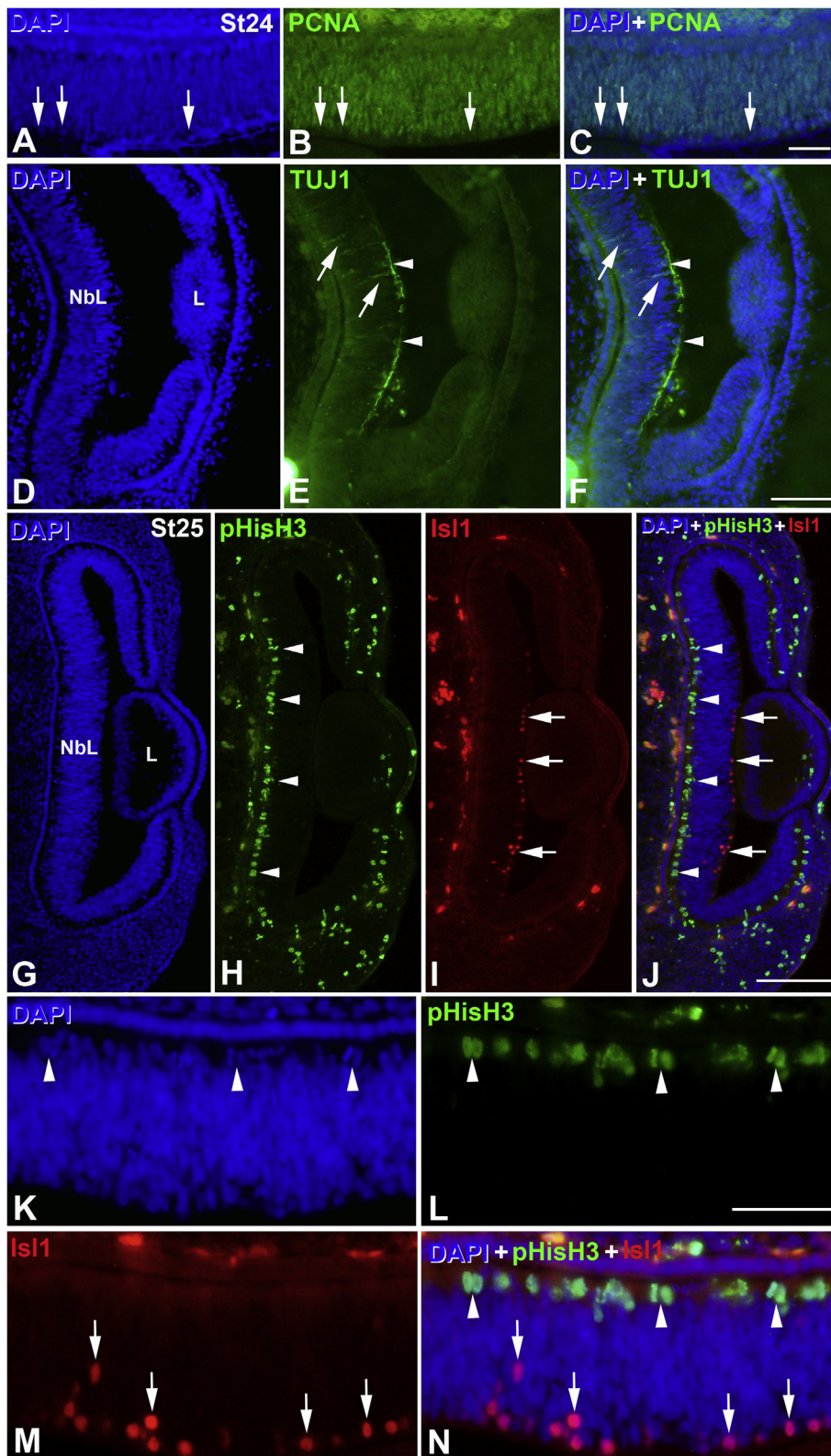


Fig. 4. Expression of cell markers in the embryonic retina of *T. guttata* at St24 (A–F) and St25 (G–N). Sections were counterstained with DAPI, showing that, by these stages, the retina was composed of an NbL. K–N are magnifications of G–J. At St24, most of the cells in the NbL were PCNA-positive (B,C), but a few of them located near the vitreal surface were not immunoreactive (arrows in A–C). PCNA-negative cells coincided topographically with the first TUJ1-immunoreactive cells (E,F). This antibody identified migratory neuroblasts (arrows in E,F) and the first differentiated ganglion cells (arrowheads in E,F). At St25, pHisH3-immunoreactivity showed abundant mitoses located in the scleral surface of the NbL (arrowheads in H,J,L,N). The presence of migratory neuroblasts and differentiated ganglion cells was detected with the anti-Isl1 antibody (arrows in I,J,M,N). L, lens; NbL, neuroblastic layer. Scale bars: 25 μ m in A–C, K–N; 50 μ m in D–F; 100 μ m in G–J.

surface (not shown). The number of pHisH3-positive mitotic figures and Isl1-immunoreactive nuclei increased by this stage (Fig. 6D–G; 7). The first post-mitotic visinin-positive photoreceptors showing features of morphological immaturity were detected in the scleral region of the St28 retina (Fig. 6H–J).

At St32 the retina was still devoid of plexiform layers (Fig. 8A–F). The width and the number of TUJ1-immunoreactive elements increased

in the central NbL (Fig. 8A–C). However, the peripheral retina resembled the expression patterns described for earlier stages (Fig. 8D–F). At St34, sparse Prox-1 immunoreactive nuclei were mainly detected near the vitreal surface of the NbL, in the presumptive GCL (Fig. 8G–I). Some of these Prox-1 positive nuclei were detected in more external regions of the NbL (Fig. 8G–I). Visinin-immunoreactivity became stronger in the scleral region of the NbL (Fig. 8J–L).

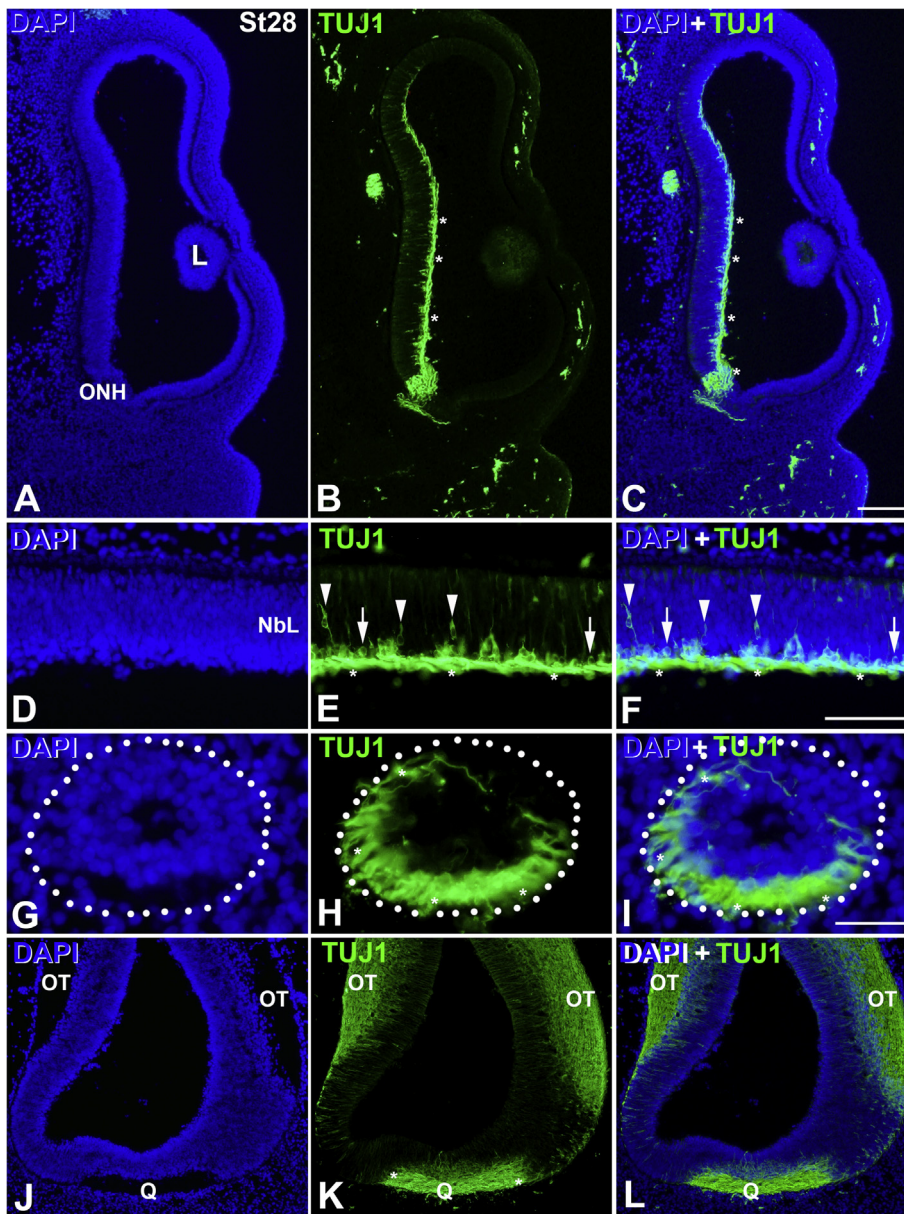


Fig. 5. TUJ1-immunoreactivity in sections of *T. guttata* retina at St28 of development. All sections were stained with DAPI (A,D,G,J). TUJ1 immunoreactivity was detected in ganglion cell axons located in the vitreal surface of the retina (asterisks in A-F), in the optic nerve head (A–C), in the ventral and lateral regions of the optic nerve (asterisks in G-I), and in the optic chiasm (asterisks in J-L) and optic tracts (J–L). TUJ1 immunoreactivity was also detected in ganglion cell somata (arrows in E,F) and in migrating neuroblasts (arrowheads in E,F). *L*, lens; *NbL*, neuroblastic layer; *ON*, optic nerve; *Q*, optic chiasm; *V*, vesicle. Scale bars: 200 μ m in A-C, J-L; 50 μ m in D-F; 25 μ m in G-I.

At St38, PCNA-immunonegative nuclei detected in the vitreal region of the NbL coincided chronotopographically with the intense TUJ1-immunoreactive elements (Fig. 9A–F). PCNA-immunoreactivity was also absent from nuclei located close to the scleral surface (Fig. 9A–C). At this stage, we had detected the first signs of emergence of the IPL. Indeed, the first TUJ1 immunoreactive elements located in the amacrine cell layer were distinguishable in the central retina (Fig. 9D–F). However, the peripheral-most retina was still poorly developed at this stage (Fig. 9G–I). At St38, *Isl1* expression was mainly detected in abundant nuclei located near the inner surface of the *T. guttata* retina, but also in the nuclei of migratory neuroblasts dispersed throughout the retinal tissue (Fig. 10B,D). At this stage, pHisH3 immunoreactivity was mainly detected in the ventricular surface of the retina, but some non-apical mitoses were also distinguished by this stage (Fig. 10C and D). *Prox1* immunoreactivity was detected in abundant nuclei of cells scattered throughout the neuroepithelium, but most of them were aligned next to the putative GCL (Fig. 10E–G). Other *Prox1*-immunoreactive nuclei were arranged in the presumptive horizontal cell layer (Fig. 10E–G). *Visinin*-positive photoreceptors seemed to be morphologically undifferentiated (Fig. 10H–J). From St38 onwards, pHisH3-

immunoreactivity progressively diminished (Fig. 7).

At St41, strong TUJ1-immunoreactivity was detected in the OFL, and in cell somata located in the presumptive GCL and amacrine cell layer (Fig. 11A–C). *Isl1* immunoreactivity was mainly detected in the nuclei of abundant ganglion and amacrine cells, and in some horizontal cells (Fig. 11D–F). Abundant *Prox1* immunoreactive nuclei became aligned in the future horizontal cell layer, but also outside this layer at various positions in the INL (Fig. 11G and H).

4. Discussion

The neurochemical markers used in the present study are clearly powerful tools with which to follow retinal differentiation in the altricial bird *T. guttata*. Although the central retina showed the typical cytoarchitecture of the mature retina and the main retinal cell types could be neurochemically identified, we found features of immaturity in the mid-peripheral and peripheral retina at perinatal stages (at St45, in particular). TUJ1 and *Isl1* could be regarded as early markers of neurogenesis in this altricial species. The first *visinin*-positive photoreceptors were found at early stages of development. *Prox1*

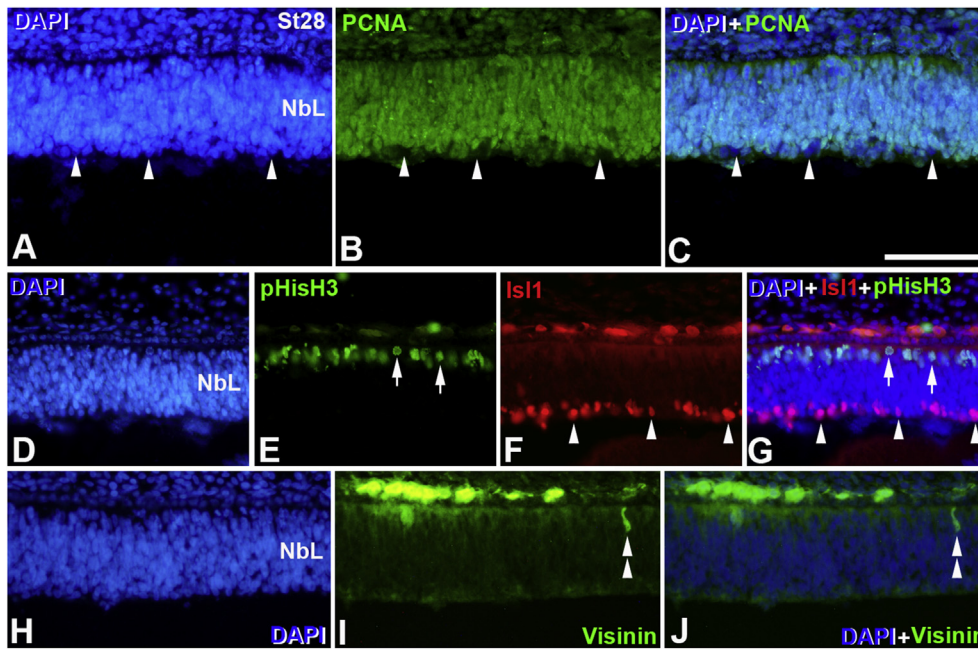


Fig. 6. Different immunoreactivities in the St28 embryonic retina of *T. guttata*. All sections were counterstained with DAPI. Many PCNA-negative nuclei were detected in the vitreal surface of the NbL (arrowheads in A-C). Abundant mitotic activity was detected in the scleral surface of the NbL (arrows in E,G). Is1 immunoreactive nuclei were detected in the vitreal surface of the NbL (arrowheads in F,G). A few visinin immunopositive cells were observed in the scleral region of the NbL (double arrowhead in I,J). NbL, neuroblastic layer. Scale bar: 50 μ m.

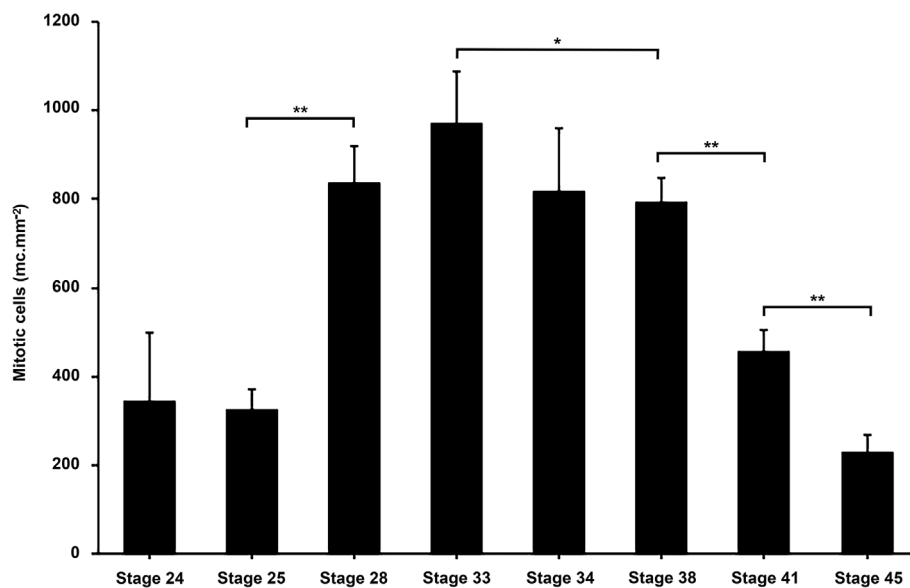


Fig. 7. Quantitative analysis of the density of pHisH3-immunoreactive mitotic figures in the retina of zebra finch during development. Data are expressed as means \pm sem. Statistical significance is indicated by asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$) mitotic cells per square millimetre.

immunoreactivity demonstrated that horizontal cell differentiation extended until late stages of development. Below, we shall discuss these results and compare them with those reported previously in precocial bird species and other vertebrates.

4.1. Neurochemical profiles in the developing and mature *T. guttata* retina

The immunohistochemical analysis of the developing and mature *T. guttata* retina showed staining patterns similar to those described for other vertebrates. PCNA and pHisH3 have been used to identify proliferating and dividing cells, respectively, in the developing and mature avian retina (Fischer and Reh, 2000; Ghai et al., 2008; Álvarez-Hernán et al., 2018), but also in the mature, developing, and regenerating retina in fish (Bernardos et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2010; 2012a, 2012b; 2014; Ferreiro-Galve et al., 2010; Pavón-Muñoz et al., 2016; Sánchez-Farias and Candal, 2016), amphibians (Yoshii et al.,

2007), reptiles (Todd et al., 2016), and mammals (Barton and Levine, 2008).

The expression patterns of the cell differentiation markers used in the present study followed a central-to-peripheral gradient and a vitreal-to-scleral gradient of appearance, in concordance with the gradients of histogenesis described in this altricial bird species (Álvarez-Hernán et al., 2018). Similar gradients of retinogenesis have previously been described in the developing chicken retina (Prada et al., 1991; Francisco-Morcillo et al., 2005; Drenhaus et al., 2007).

TUJ1, which recognizes a neuronal specific form of β -tubulin (Trimmer et al., 1986), labels early developing ganglion cells in the *T. guttata* retina at St24, even during their migration from the scleral to the vitreal surface (Fig. 4). The TUJ1 staining pattern is very similar to that described in the HH16 chicken retina (Snow and Robson, 1994; Francisco-Morcillo et al., 2005; Kim and Sun, 2012). It has also been used to detect early neurogenesis in the fish (Bejarano-Escobar et al.,

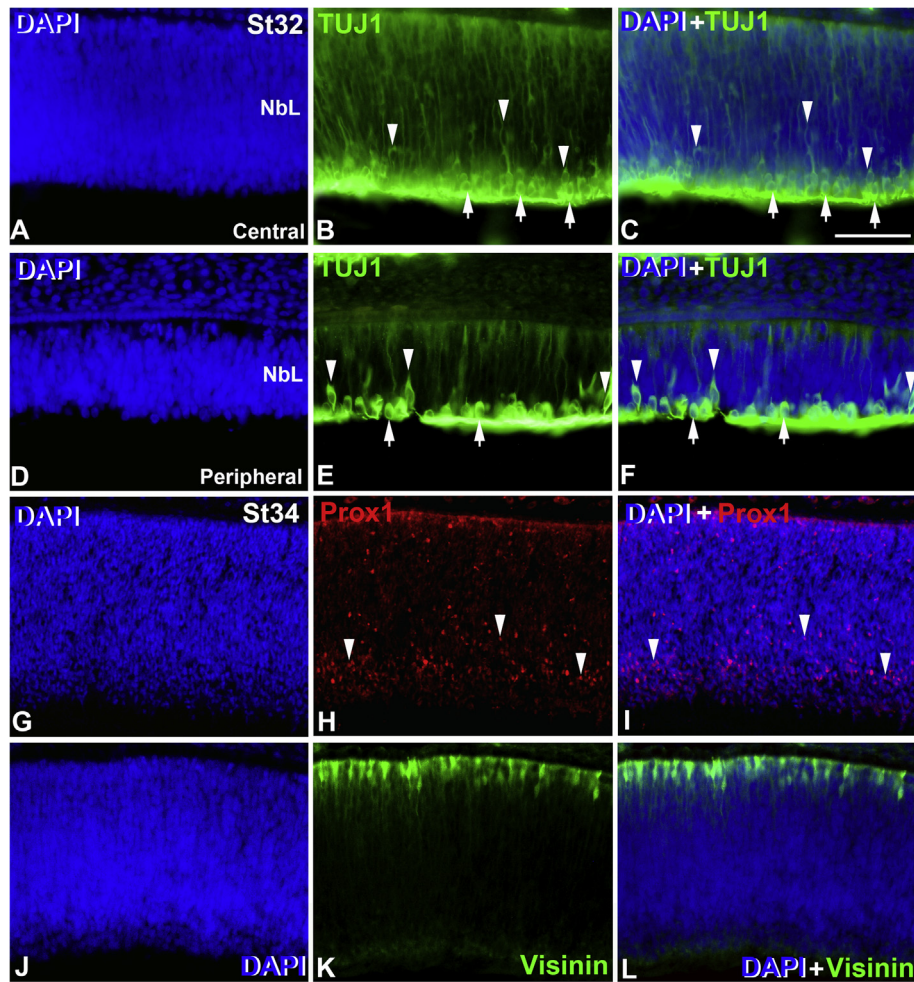


Fig. 8. Expression of cell markers in the *T. guttata* embryonic retina at St32 (A–F) and St34 (G–L). All sections were also stained with DAPI. At St32, migratory neuroblasts (arrowheads in B,C,E,F) and presumptive ganglion cells (arrows in B,C,E,F) were strongly immunoreactive when using anti-TUJ1 antibody. At St34, faint staining was detected with the anti-Prox1 antibody in many nuclei located in the presumptive GCL, but also in sparse nuclei located in more external regions (arrowheads in H,I). Abundant visinin-immunoreactive cells were restricted to the scleral surface of the NbL (K,L). NbL, neuroblastic layer. Scale bar: 50 μ m.

2012a) and mammalian retina (Sharma et al., 2003; Sharma and Netland, 2007). With regard in particular to the mature retinal tissue, strong TUJ1 immunoreactivity was detected both in the GCL and IPL, and in sparse amacrine cells (Fig. 2). Horizontal cells were faintly labeled. This is an identical staining pattern to that previously described in the retina of mammals (Sharma et al., 2003; Sharma and Netland, 2007). It is also similar to the staining pattern described in the retina of the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). However, in this fish species, the TUJ1 immunoreactivity in the amacrine and horizontal cell layers was more intense and a greater population of cells were labeled (Bejarano-Escobar et al., 2012a). Retinal ganglion cell axons appear strongly labeled in the *T. guttata* developing optic pathways.

Isl1 is also an early marker of cell neurogenesis and also labels subpopulations of ganglion, amacrine, and horizontal cells in the mature *T. guttata* retina, as occurs in the rest of vertebrates studied (Figs. 3 and 4) (Francisco-Morcillo et al., 2006; Elshatory et al., 2007; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2010; 2012a, 2014; 2015; Guduric-Fuchs et al., 2009; Álvarez-Hernán et al., 2013; Martín-Partido and Francisco-Morcillo, 2015).

Visinin, a cone homologue of S-modulin/recoverin, is a calcium binding protein expressed in retinal cone cells in the developing and mature chicken retina (Yamagata et al., 1990; Bruhn and Cepko, 1996; Toy et al., 2002; Fischer et al., 2008). As we have shown, antibodies against visinin recognize photoreceptor cells in the developing *T. guttata* retina, even at early stages of cell differentiation (Figs. 3 and 6).

Therefore, it is an excellent marker of undifferentiated and differentiated photoreceptor cells in the avian retina.

The transcription factor Prox1 regulates proliferation of progenitor cells in the retina and is required for horizontal cell development, and for amacrine and bipolar cell differentiation (Dyer et al., 2003; Edqvist and Hallböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016; Pérez de Sevilla Müller et al., 2017). Prox1 immunoreactivity in the *T. guttata* retina is highly dynamic, and is similar to the expression pattern described in the chicken where it is used as a marker of horizontal cell development (Edqvist and Hallböök, 2004; Edqvist et al., 2006; Boije et al., 2009, 2016). Indeed, in the laminated retina, Prox1 is strongly expressed in the horizontal cell layer (Fig. 3). The detection of the first Prox-1-immunoreactive nuclei in external regions of the NbL coincides with the onset of the appearance of non-apical mitotic figures in the developing retina of *T. guttata* (Álvarez-Hernán et al., 2018). These Prox-1-expressing neuroblasts scattered throughout the NbL could be involved in a massive ventricle-directed migration to generate the population of horizontal cells, as occurs in the chicken (Edqvist and Hallböök, 2004; Boije et al., 2009, 2016).

CR is a calcium binding protein that is expressed by several subpopulations of developing and mature retinal cells, including ganglion, amacrine, bipolar, and horizontal cells (Ellis et al., 1991; Cuenca et al., 2000; Loeliger and Rees, 2005; Francisco-Morcillo et al., 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2010; 2014). In the *T. guttata* retina, CR-expression was mainly concentrated in the GCL and in the horizontal

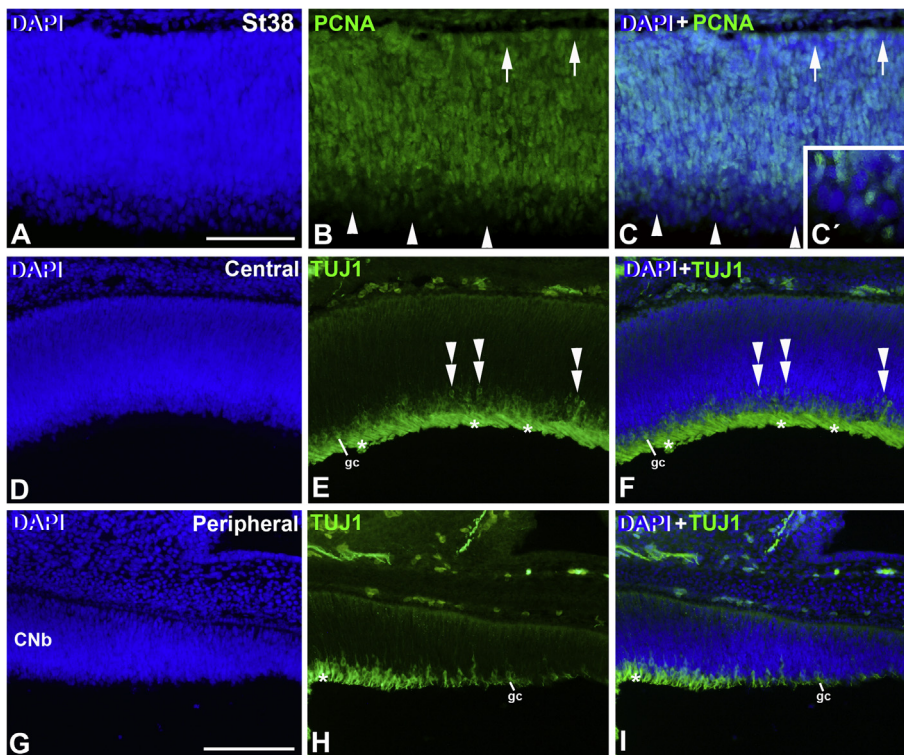


Fig. 9. Patterns of cell proliferation (A–C) and TUJ1 immunoreactive elements (D–I) in the embryonic retina of *T. guttata* at St38. Sections were counterstained with DAPI. Abundant PCNA-negative nuclei were detected in the presumptive GCL (arrowheads in B,C). PCNA was also disappearing from the presumptive ONL (arrows in B,C). Strong TUJ1-immunoreactivity was detected in the cell somata and the axons (asterisks in E,F,H,I) of differentiating ganglion cells, both in the central (D–F) and in the peripheral (G–I) retina. TUJ1 immunoreactivity was also observed in the somata of cells located externally to the presumptive GCL in the central retina (double arrowheads in E,F). C' is a magnification of C. *NbL*, neuroblastic layer. Scale bars: 50 μ m in A–C; 100 μ m in D–I.

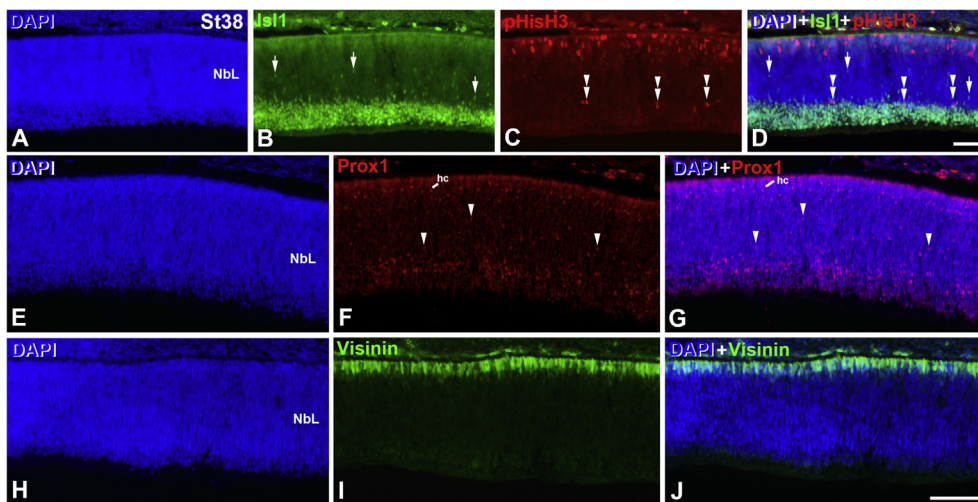


Fig. 10. Expression of cell markers in the *T. guttata* embryonic retina at St38. All sections were counterstained with DAPI. Abundant IsI1 immunoreactive nuclei were observed in the presumptive GCL and in sparse migratory neuroblasts (arrows in B,D). Abundant pHisH3-immunoreactive mitoses were found in the scleral region of the NbL, but also in sparse ectopic mitoses located in more internal regions (double arrowheads in C,D). Prox1-immunoreactivity was mainly detected in nuclei located adjacent to the presumptive GCL, but also in migratory neuroblasts (arrowheads in F,G), and in nuclei located in the presumptive horizontal cell layer (F,G). Abundant visinin-immunoreactive photoreceptors were detected in the presumptive ONL (I,J). Scale bars: 50 μ m in A–C; 100 μ m in E–J.

cell layer. Sparse amacrine and bipolar cells were also immunoreactive (Fig. 3), similar to the expression pattern described in the chicken retina (Ellis et al., 1991).

The neurochemical markers used in the present study labeled the most important retinal cell types of the *T. guttata* retina, and their expression patterns are highly conserved across vertebrate species. Some of them allowed us to identify the onset of differentiation of several cell types.

4.2. Comparison of cell differentiation between altricial and precocial bird species

A previous study conducted in our laboratory showed that the morphogenesis and histogenesis of the *T. guttata* visual system is delayed compared to precocial bird species (Álvarez-Hernán et al., 2018). The formation of the optic vesicles and optic cups, the onset of ganglion cell differentiation, and the emergence of the plexiform layers occur

later in development in *T. guttata* than in *G. gallus*. In the present study, we showed that the onset of expression of different cell markers and cell differentiation begin later in *T. guttata* than in *G. gallus*. Thus, the first PCNA-negative cells appeared at St24 (108 h) in the vitreal region of the NbL in a region located in the posterior pole of the retina, coinciding topographically with the first TUJ1-positive post-mitotic neuroblasts. Prada et al. (1991) detected the first differentiating ganglion cells at HH13 (48–52 h) in tissue section autoradiographs after *in ovo* injection of [3 H]thymidine. The onset of TUJ1 immunoreactivity in the developing chicken retina occurs at HH16 (51–56 h) (Snow and Robson, 1994), coinciding with the expression of *Fgf19* transcripts in the first cell type that becomes post-mitotic (Francisco-Morcillo et al., 2005). The onset of expression of IsI1 in the chicken retina is found between HH20 (72 h) and HH22 (84 h) in early differentiated ganglion cell neuroblasts (Sakagami et al., 2003; Bejarano-Escobar et al., 2015). In our study, the first differentiating IsI1-positive cells in the *T. guttata* retina were found at St25 (114 h). In both bird species the onset of TUJ1

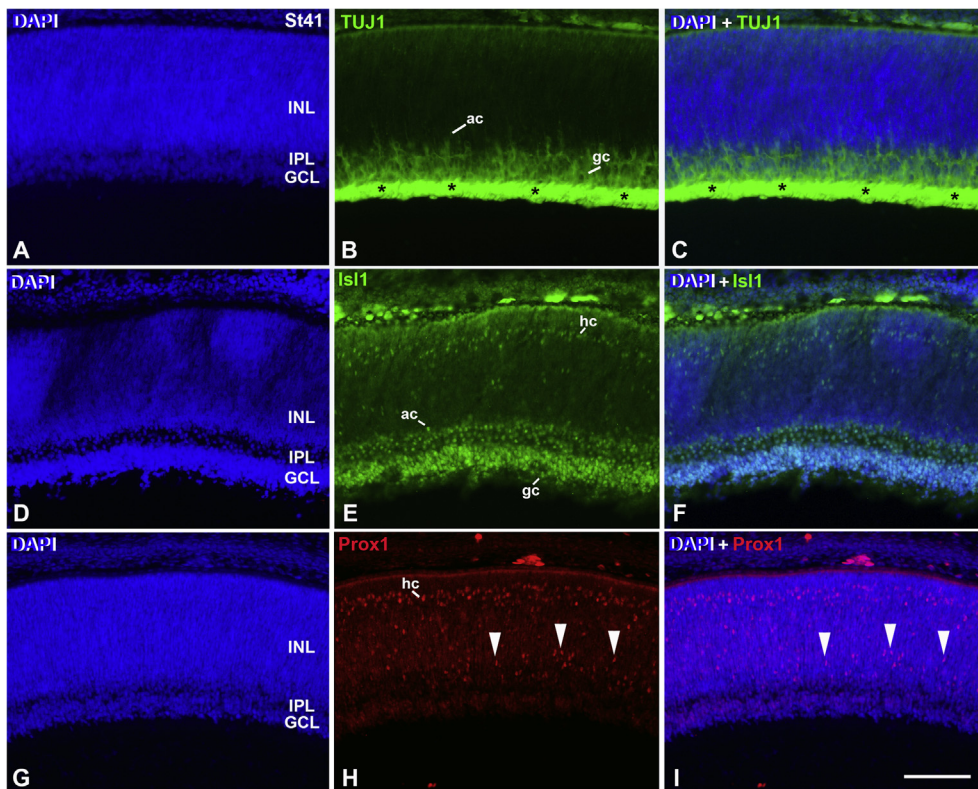


Fig. 11. Expression of cell markers in the *T. guttata* embryonic retina at St41. All sections were counterstained with DAPI. TUJ1-immunostaining (B,C) was detected in the somata of ganglion and amacrine cells, but also in the OFL (asterisks in B,C). Subpopulations of ganglion, amacrine, and horizontal cells were Isl1-positive (E,F). Prox1-immunoreactivity (H,I) was mainly detected in the horizontal cell layer, but also in migrating neuroblasts (arrowheads in H,I). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Scale bar: 100 μ m.

Table 3

Chronology of different features of morphogenesis, histogenesis, and cell differentiation in the developing and hatched retina of zebra finch and chicken. St, stage (Murray et al., 2013). HH, stages of Hamburger and Hamilton (1951).

Event	<i>T. guttata</i>	<i>G. gallus</i>	Bibliography
Ganglion cell differentiation	First post-mitotic cells (PCNA-negative): St24 (108 h) Onset of TUJ1 expression: St24 (108 h) Onset of Isl1 expression: St25 (114 h)	HH13 (48 h) [3 H]thymidine Onset of TUJ1 expression: HH16 (51–56 h) Onset of Isl1 expression: HH22 (84 h)	Prada et al. (1991) Snow & Robson (1994) Sakagami et al. (2003) Prada et al. (1991)
Photoreceptor differentiation	First post-mitotic cells (PCNA-negative): St28 (132 h) Onset of visinin expression: St28 (132 h)	HH24 (96 h) [3 H]thymidine Onset of visinin expression: HH27 (120 h)	Prada et al. (1991) Bradford et al. (2005)
Horizontal cell differentiation	Onset of detection of Prox-1 migrating neuroblasts: St34 (E7.25)	Onset of detection of Prox-1 migrating neuroblasts: HH30 (E6.5)-HH32 (E7.5)	Edqvist & Hallböök (2004)

expression precedes the onset of the detection of Isl1-positive nuclei.

We first observed the appearance of PCNA-negative cells in the scleral surface of the NbL in *T. guttata* at St28 (132 h), coinciding with the first detected visinin-immunoreactive photoreceptors. The first post-mitotic photoreceptors in the developing chicken retina, showing morphological evidence of undifferentiation, appear at HH24 (96 h) (Prada et al., 1991), and the onset of visinin expression in the chicken retina has been described at HH27 (120 h) (Bruhn and Cepko, 1996; Bradford et al., 2005). Therefore, visinin is expressed during early stages of photoreceptor differentiation in *T. guttata*, in concordance with previous results obtained in the chicken retina (Bradford et al., 2005). As a whole, these results indicate that visinin is an excellent photoreceptor marker even at later stages of *T. guttata* retinal development. The immature morphology of visinin-positive photoreceptors corroborated the data presented in a previous morphological study at perinatal stages (Álvarez-Hernán et al., 2018).

Prox1 immunoreactivity was mainly located in the nuclei of abundant cells located in the *T. guttata* presumptive GCL by St38 (embryonic day 8.5; E8.5) and in some migrating neuroblasts detected in more external regions of the NbL. Similar results have been found in the chicken retina by HH29 (E6) (Edqvist and Hallböök, 2004; Edqvist

et al., 2006). Prox1-immunoreactivity by these stages has mainly been detected in horizontal progenitor cells that undergo vitreal mitoses (Edqvist and Hallböök, 2004; Boije et al., 2009). At St41 (E10), abundant Prox1-immunopositive nuclei were detected in the presumptive horizontal cell layer of the *T. guttata* retina, but many migrating Prox1-positive neuroblasts were observed in the INL. A similar staining pattern was found in the chicken retina by HH31 (E7) - HH32 (E7.5). Finally, Prox-1 immunoreactivity was almost exclusively restricted to the horizontal cell layer at St45 (E13), similar to the staining observed in the HH33 (E7.5-8) chicken retina. Therefore the horizontal cell differentiation was clearly delayed in this altricial bird species and extended over more days with respect to the precocial chicken. This hypothesis was also supported by the data obtained in our previous study, where the onset and offset of the appearance of non-apical divisions (in close relationship with horizontal cell differentiation) in the *T. guttata* retina occurred later than in the *G. gallus* retina (Álvarez-Hernán et al., 2018). The comparison of the chronology of cell differentiation during retinogenesis between *T. guttata* and *G. gallus* is presented in Table 3.

5. Conclusions

We have shown that there are substantial differences in embryological development between altricial and precocial bird species (Hamburger and Hamilton, 1951; Murray et al., 2013). The acquisition of several embryological features is delayed in the altricial bird compared to precocial birds. This delay in the maturation of embryonic structures causes altricial species to hatch in an almost embryo-like state (Stark and Ricklefs, 1998). The central nervous system (Charvet and Striedter, 2008, 2011) and the sense organs (Rojas et al., 2007; Álvarez-Hernán et al., 2018) are also less developed in altricial hatchlings.

We also showed that several maturational features of the visual system, such as morphogenesis of the optic vesicle and optic cup, the onset of retinogenesis monitored by the appearance of the first PCNA-negative cells, the onset of cell differentiation in the GCL and ONL, and the emergence of the retinal plexiform layers occur at later stages of development in *T. guttata* than in *G. gallus* (Álvarez-Hernán et al., 2018; present paper). We detected abundant cell proliferative activity in the retina of *T. guttata* hatchlings, suggesting that postnatal neurogenesis is intense in the retina of this altricial bird species. The *G. gallus* retina is, however, almost fully differentiated at hatching. Therefore the timing in the acquisition of embryonic structures and the degree of maturity of the visual system differ markedly between different species of birds. Consequently, the results obtained from developmental studies on *G. gallus* cannot be extrapolated to other bird species, to altricial birds in particular. Finally, because of the intense proliferative activity detected in the retina of *T. guttata* hatchlings, we propose that the postnatal retina of *T. guttata* could be a powerful model system in which to study different aspects of neural development and regeneration in birds.

Funding

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2007-67540), Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2015-64650P), Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2017-85547-P), and Junta de Extremadura (PRI06A195, IB16121, GR15158, IB18113).

Author contributions statement

G.A.H, I.H.N., E.M.R.L, and J.A.M.R performed the histological, immunohistochemical, and Western blot analyses. A.M participated in acquisition of data and critical revision of the manuscript. J.R.L., G.M.P., and J.F.M conceived and designed the experiments and constructed figures. J.F.M. wrote the paper.

Declaration of competing interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to M.S. Holguín-Arévalo for her excellent technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107869>.

References

Ainsworth, S.J., Stanley, R.L., Evans, D.J., 2010. Developmental stages of the Japanese

- quail. *J. Anat.* 216, 3–15.
- Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Penigault, J.B., Jeffery, W.R., Retaux, S., 2007. Developmental Mechanisms for Retinal Degeneration in the Blind Cavefish *Astyanax mexicanus*. *The Journal of Comparative Neurology* 505, 221–233.
- Álvarez-Hernán, G., Bejarano-Escobar, R., Morona, R., González, A., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2013. Islet-1 immunoreactivity in the developing retina of *Xenopus laevis*. *Sci. World J.* 2013, 740420.
- Álvarez-Hernán, G., Sánchez-Resino, E., Hernández-Núñez, I., Marzal, A., Rodríguez-León, J., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2018. Retinal histogenesis in an altricial avian species, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817). *J. Anat.* 233, 106–120.
- Bagnoli, P., Porciatti, V., Lanfranchi, A., Bedini, C., 1985. Developing pigeon retina: light-evoked responses and ultrastructure of outer segments and synapses. *The Journal of Comparative Neurology* 235, 384–394.
- Barton, K.M., Levine, E.M., 2008. Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Dev. Dynam.* 237, 672–682.
- Bejarano-Escobar, R., Álvarez-Hernán, G., Morona, R., González, A., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2015. Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor Islet-1 in the developing and mature vertebrate retina. *Exp. Eye Res.* 138, 22–31.
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., DeGrip, W.J., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2009. Cell differentiation in the retina of an epibenthic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneo 1758). *Exp. Eye Res.* 89, 398–415.
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., DeGrip, W.J., Oyola-Velasco, J.A., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2010. Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 314, 580–605.
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Durán, A.C., Rodríguez, C., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2012a. Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J. Anat.* 220, 318–335.
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2012b. Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death. *J. Exp. Biol.* 215, 3799–3812.
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2014. Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. *Rev. Fish Biol. Fish.* 24, 127–158.
- 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. *J. Neurosci.* 27, 7028–7040.
- Boije, H., Edqvist, P.H., Hallböök, F., 2008. Temporal and spatial expression of transcription factors FoxN4, Ptf1a, Prox1, Isl1 and Lim1 mRNA in the developing chick retina. *Gene Expr. Patterns* 8, 117–123.
- Boije, H., Edqvist, P.H., Hallböök, F., 2009. Horizontal cell progenitors arrest in G2-phase and undergo terminal mitosis on the vitreal side of the chick retina. *Dev. Biol.* 330, 105–113.
- Boije, H., Shirazi Fard, S., Edqvist, P.H., Hallböök, F., 2016. Horizontal cells, the odd ones out in the retina, give insights into development and disease. *Front. Neuroanat.* 10, 77.
- Bradford, R.L., Wang, C., Zack, D.J., Adler, R., 2005. Roles of cell-intrinsic and micro-environmental factors in photoreceptor cell differentiation. *Dev. Biol.* 286, 31–45.
- Bruhn, S.L., Cepko, C.L., 1996. Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J. Neurosci.* 16, 1430–1439.
- Cid, E., Santos-Ledo, A., Parrilla-Monge, M., Lillo, C., Arévalo, R., Lara, J.M., Aijón, J., Velasco, A., 2010. Prox1 expression in rod precursors and Müller cells. *Experimental Eye Research* 90, 267–276.
- Charvet, C.J., Striedter, G.F., 2008. Spatiotemporal clustering of cell death in the avian forebrain proliferative zone. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 345–352.
- Charvet, C.J., Striedter, G.F., 2011. Developmental modes and developmental mechanisms can channel brain evolution. *Front. Neuroanat.* 5, 4.
- Cuenca, N., Haverkamp, S., Kolb, H., 2000. Choline acetyltransferase is found in terminals of horizontal cells that 1a with GABA, nitric oxide synthase and calcium binding proteins in the tu retina. *Brain Res.* 878, 228–239.
- Dewulf, V., Bottjer, S.W., 2005. Neurogenesis within the juvenile zebra finch telencephalic ventricular zone: a map of proliferative activity. *J. Comp. Neurol.* 481, 70–83.
- Drenhaus, U., Morino, P., Veh, R.W., 2003. On the development of the stratification of the inner plexiform layer in the chick retina. *J. Comp. Neurol.* 460, 1–12.
- Drenhaus, U., Voigt, T., Rager, G., 2007. Onset of synaptogenesis in the plexiform layers of the chick retina: a transmission electron microscopic study. *Microsc. Res. Tech.* 70, 329–335.
- Dyer, M.A., Livesey, F.J., Cepko, C.L., Oliver, G., 2003. Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat. Genet.* 34, 53–58.
- Edqvist, P.H., Hallböök, F., 2004. Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131, 1343–1351.
- Edqvist, P.H., Lek, M., Boije, H., Lindback, S.M., Hallböök, F., 2008. Axon-bearing and axon-less horizontal cell subtypes are generated consecutively during chick retinal development from progenitors that are sensitive to follistatin. *BMC Dev. Biol.* 8, 46.
- Edqvist, P.H., Myers, S.M., Hallböök, F., 2006. Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10. *Eur. J. Histochem.* 50, 147–154.
- Ellis, J.H., Richards, D.E., Rogers, J.H., 1991. Calretinin and calbindin in the retina of the

- developing chick. *Cell Tissue Res.* 264, 197–208.
- Elshatory, Y., Deng, M., Xie, X., Gan, L., 2007. Expression of the LIM-homeodomain protein *Isl1* in the developing and mature mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 503, 182–197.
- Ferreiro-Galve, S., Rodríguez-Moldes, I., Anadon, R., Candal, E., 2010. Patterns of cell proliferation and rod photoreceptor differentiation in shark retinas. *J. Chem. Neuroanat.* 39, 1–14.
- Fischer, A.J., Foster, S., Scott, M.A., Sherwood, P., 2008. Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina. *J. Comp. Neurol.* 506, 584–603.
- Fischer, A.J., Reh, T.A., 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev. Biol.* 220, 197–210.
- Fischer, A.J., Reh, T.A., 2001. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat. Neurosci.* 4, 247–252.
- Francisco-Morcillo, J., Hidalgo-Sánchez, M., Martín-Partido, G., 2006. Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res.* 1103, 32–48.
- Francisco-Morcillo, J., Sánchez-Calderón, H., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J.C., Hidalgo-Sánchez, M., Martín-Partido, G., 2005. Expression of *Fgf19* in the developing chick eye. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156, 104–109.
- Ghai, K., Stanke, J.J., Fischer, A.J., 2008. Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain Res.* 1192, 76–89.
- Godinho, L., Williams, P.R., Claassen, Y., Provost, E., Leach, S.D., Kamermans, M., Wong, R.O.L., 2007. Nonapical Symmetric Divisions Underlie Horizontal Cell Layer Formation in the Developing Retina In Vivo. *Neuron* 56, 597–603.
- Guduric-Fuchs, J., Ringland, L.J., Gu, P., Delleit, M., Archer, D.B., Cogliati, T., 2009. Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol. Vis.* 15, 1915–1928.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92.
- Kahn, A.J., 1973. Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res.* 63, 285–290.
- Kim, Y., Sun, W., 2012. Distribution of doublecortin immunoreactivities in developing chick retina. *Appl. Microsc.* 42, 142–146.
- Köppl, C., Futterer, E., Nieder, B., Siermann, R., Wagner, H., 2005. Embryonic and posthatching development of the barn owl (*Tyto alba*): reference data for age determination. *Dev. Dynam.* 233, 1248–1260.
- Kubota, R., Hokoc, J.N., Moshiri, A., McGuire, C., Reh, T.A., 2002. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 134, 31–41.
- Loeliger, M., Rees, S., 2005. Immunocytochemical development of the Guinea pig retina. *Exp. Eye Res.* 80, 9–21.
- Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2015. The role of *Isl1* in cell specification, differentiation, and maintenance of phenotypes in the vertebrate neural retina. *Neural Regen. Res.* 10, 1951–1952.
- McCabe, K.L., Gunther, E.C., Reh, T.A., 1999. The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* 126, 5713–5724.
- Moorman, S., Mello, C.V., Bolhuis, J.J., 2011. From songs to synapses: molecular mechanisms of birdsong memory. Molecular mechanisms of auditory learning in songbirds involve immediate early genes, including *zenk* and *arc*, the ERK/MAPK pathway and synapsins. *Bioessays* 33, 377–385.
- Murray, J.R., Varian-Ramos, C.W., Welch, Z.S., Saha, M.S., 2013. Embryological staging of the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *J. Morphol.* 274, 1090–1110.
- Olea, G.B., Sandoval, M.T., 2012. Embryonic development of *Columba livia* (Aves: columbiformes) from an altricial-precocial perspective. *Rev. Colombiana Ciencias Pecuarias* 25, 3–13.
- Pavón-Muñoz, T., Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Martín-Partido, G., Francisco-Morcillo, J., 2016. Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* 88, 492–507.
- Perry, K.J., Johnson, V.R., Malloch, E.L., Fukui, L., Wever, J., Thomas, A.G., Hamilton, P.W., Henry, J.J., 2010. The G-protein-coupled receptor, GPR84, is important for eye development in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 239, 3024–3037.
- Pérez de Sevilla Müller, L., Azar, S.S., de los Santos, J., Brecha, N.C., 2017. Prox1 is a marker for AII amacrine cells in the mouse retina. *Front. Neuroanat.* 11.
- Porciatti, V., Bagnoli, P., Lanfranchi, A., Bedini, C., 1985. Interaction between photoreceptors and pigment epithelium in developing pigeon retina: an electrophysiological and ultrastructural study. *Doc. Ophthalmol.* 60, 413–419.
- Prada, C., Puga, J., Pérez-Méndez, L., López, Ramírez, G., 1991. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 1187.
- Rojas, L.M., Mitchell, M.A., Ramírez, Y.M., Mcneil, R., 2007. Comparative analysis of retina structure and photopic electroretinograms in developing altricial pigeons (*Columba livia*) and precocial Japanese quails (*Coturnix japonica japonica*). *Ornitol. Neotrop.* 18, 503–518.
- Sakagami, K., Ishii, A., Shimada, N., Yasuda, K., 2003. *RaxL* regulates chick ganglion cell development. *Mech. Dev.* 120, 881–895.
- Sánchez-Farías, N., Candal, E., 2016. Identification of radial glia progenitors in the developing and adult retina of sharks. *Front. Neuroanat.* 10, 65.
- Sharma, R.K., Netland, P.A., 2007. Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res.* 1176, 11–17.
- Sharma, R.K., O'Leary, T.E., Fields, C.M., Johnson, D.A., 2003. Development of the outer retina in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 145, 93–105.
- Snow, R.L., Robson, J.A., 1994. Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience* 58, 399–409.
- Stark, J.M., Ricklefs, R.E., 1998. *Avian Growth and Development*. Oxford University Press, New York, pp. 3–30.
- Striedter, G.F., Charvet, C.J., 2008. Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virginianus*). *J. Comp. Neurol.* 507, 1663–1675.
- Todd, L., Suárez, L., Squires, N., Zelinka, C.P., Gribbins, K., Fischer, A.J., 2016. Comparative analysis of glucagonergic cells, glia, and the circumferential marginal zone in the reptilian retina. *J. Comp. Neurol.* 524, 74–89.
- Toy, J., Norton, J.S., Jibodh, S.R., Adler, R., 2002. Effects of homeobox genes on the differentiation of photoreceptor and nonphotoreceptor neurons. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3522–3529.
- Trimmer, P., Frankfurter, A., Rebhun, L., 1986. Immunocytochemical staining of neural cultures with a novel beta-tubulin monoclonal antibody. *J. Cell Biol.* 103, 273a (Abstract).
- Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Copp, A., Mishkin, M., 2005. FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 131–138.
- Vergara, M.N., Canto-Soler, M.V., 2012. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev.* 7, 22.
- Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.H., Kondo, H., Miki, N., 1990. Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 4, 469–476.
- Yamasaki, M., Tonosaki, A., 1988. Developmental stages of the society finch, *Lonchura striata var. domestica*. *Dev. Growth Differ.* 30, 515–542.
- Yoshii, C., Ueda, Y., Okamoto, M., Araki, M., 2007. Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. *Dev. Biol.* 303, 45–56.

Development and postnatal neurogenesis in the retina: a comparison between altricial and precocial bird species

<https://doi.org/10.4103/1673-5374.286947>

Received: February 29, 2020

Peer review started: March 14, 2020

Accepted: April 7, 2020

Published online: August 10, 2020

Guadalupe Álvarez-Hernán¹, José Antonio de Mera-Rodríguez², Yolanda Gañán², Jorge Solana-Fajardo³, Gervasio Martín-Partido¹, Joaquín Rodríguez-León², Javier Francisco-Morcillo^{1,*}

Abstract

The visual system is affected by neurodegenerative diseases caused by the degeneration of specific retinal neurons, the leading cause of irreversible blindness in humans. Throughout vertebrate phylogeny, the retina has two kinds of specialized niches of constitutive neurogenesis: the retinal progenitors located in the circumferential marginal zone and Müller glia. The proliferative activity in the retinal progenitors located in the circumferential marginal zone in precocial birds such as the chicken, the commonest bird model used in developmental and regenerative studies, is very low. This region adds only a few retinal cells to the peripheral edge of the retina during several months after hatching, but does not seem to be involved in retinal regeneration. Müller cells in the chicken retina are not proliferative under physiological conditions, but after acute damage some of them undergo a reprogramming event, dedifferentiating into retinal stem cells and generating new retinal neurons. Therefore, regenerative response after injury occurs with low efficiency in the precocial avian retina. In contrast, it has recently been shown that neurogenesis is intense in the retina of altricial birds at hatching. In particular, abundant proliferative activity is detected both in the circumferential marginal zone and in the outer half of the inner nuclear layer. Therefore, stem cell niches are very active in the retina of altricial birds. Although more extensive research is needed to assess the potential of proliferating cells in the adult retina of altricial birds, it emerges as an attractive model for studying different aspects of neurogenesis and neural regeneration in vertebrates.

Key Words: altricial; birds; circumferential marginal zone; Müller glia; postnatal neurogenesis; precocial regeneration; retinogenesis

Introduction

Birds are categorized along a precocial-to-altricial spectrum depending on behavioural and morphological maturation of hatchlings. At hatching, precocial birds are covered with down that is soon replaced by adult feathers. They also have open eyes and a well-developed musculoskeletal system (**Figure 1A**). In contrast, altricial hatchlings have little or no downy plumage on their skin, are blind, have less developed locomotion organs, and are highly reliant on parental care (Nice, 1962; **Figure 1B**).

Embryological studies have also confirmed substantial developmental differences between altricial and precocial birds (Murray et al., 2013; de Almeida et al., 2015). Precocial birds seem to reach early stages in development in less time than altricial birds (Hamburger and Hamilton, 1951; Murray et al., 2013). Furthermore, several maturational features

occur at later stages in the altricial birds than in the precocial birds (Murray et al., 2013; de Almeida et al., 2015; Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020), and, while different tissues mature at later stages of development in altricial embryos, this period is primarily characterized by growth in precocial birds (Hamburger and Hamilton, 1951; Murray et al., 2013).

Precocial birds also differ from altricial birds in the timing of brain structures differentiation (Charvet and Striedter, 2011). Thus, several brain regions in altricial birds are relatively immature at hatching (Striedter and Charvet, 2008). Therefore, altricial birds exhibit a great post-hatching brain growth associated with intense neurogenesis in certain brain regions such as the telencephalon (DeWulf and Bottjer, 2005; Striedter and Charvet, 2008; Charvet and Striedter, 2009, 2011). Neurogenesis is intense in *T. guttata* chicks during the first week of life, but this process persists even into adulthood (DeWulf and Bottjer, 2005; Charvet and Striedter, 2009).

¹Área de Biología Celular, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain; ²Área de Anatomía Humana, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain; ³Servicio de Oftalmología, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, Spain

*Correspondence to: Javier Francisco-Morcillo, PhD, morcillo@unex.es.

<https://orcid.org/0000-0002-1100-3878> (Javier Francisco-Morcillo)

Funding: GAH was a recipient of a Fellowship from the Universidad de Extremadura. This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2007-67540), Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2015-64650P), Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2017-85547-P), and Junta de Extremadura, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, "Una manera de hacer Europa" (GR15158, GR18114, IB18113).

How to cite this article: Álvarez-Hernán G, de Mera-Rodríguez JA, Gañán Y, Solana-Fajardo J, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J (2021) Development and postnatal neurogenesis in the retina: a comparison between altricial and precocial bird species. *Neural Regen Res* 16(1):16-20.

Those authors conclude that postnatal maturation of brain structures facilitates learning in altricial birds. Therefore, the brain of altricial birds emerged as an influential model for the study of adult neurogenesis.

The visual system is a powerful model for advancing in knowledge about ontogenetic differences among vertebrates. Visual system morphogenesis and retinogenesis are well conserved throughout the vertebrate phylogeny (see below). However, while most of these developmental features occur during the embryonic period in precocial birds, some of these species complete retinal development during postnatal life. In precocial Chondrichthyes (Bejarano-Escobar et al., 2013; Sánchez-Farías and Candal, 2015, 2016), Osteichthyes (Candal et al., 2005, 2008; Álvarez-Hernán et al., 2019), reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2006), and mammals (Loeliger and Rees, 2005; Gudurich-Fuchs et al., 2009), retinogenesis is completed during embryological stages. In contrast, in altricial fish (Doldán et al., 1999; Pavón-Muñoz et al., 2016; Álvarez-Hernán et al., 2019) and mammals (Rapaport et al., 2004; Bejarano-Escobar et al., 2011), retinal development occurs postnatally.

Regarding avian retinal development, it is well known that events such as cell differentiation (Prada et al., 1991; Martín-Partido and Francisco-Morcillo, 2015; de Mera Rodríguez et al., 2019) and cell death (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2014) within the precocial retina occur embryonically. At birth, the layers of the retina of precocial birds are clearly distinguished and shows differentiated cells (Prada et al., 1991; Rojas et al., 2007; de Mera-Rodríguez et al., 2019). Neurogenesis is almost absent in the chicken retina, and is restricted to a few cells located in the circumferential marginal zone (CMZ) (Fischer and Reh, 2000). In contrast, many features of immaturity have been described in the retina of newly hatched altricial birds (Bagnoli et al., 1985; Rojas et al., 2007; Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020). Recent studies conducted in our laboratory have shown that neurogenesis is intense in the retina of newly hatched altricial birds (zebra finch, *Taeniopygia guttata* Vieillot 1817) (Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020).

In this review, we shall describe the variation in the developmental timetable of visual system ontogeny from the altricial/precocial perspective. We shall also highlight the remarkable variation in proliferative activity of avian cell progenitors in the retina of altricial and precocial birds at hatching and during the first postnatal days.

Search Strategy and Selection Criteria

Studies cited in this review were found on the PubMed database, between December 2019 and February 2020, using the search terms: adult neurogenesis, retinogenesis, visual system development, altricial birds, precocial birds, retinal progenitors, retinal regeneration, altricial development, precocial development, and various combinations of the above terms.

Morphogenesis, Histogenesis, and Cell Differentiation in the Vertebrate Retina

The vertebrate retina is formed embryonically from the brain and plays a key role in vision. This sensory tissue consists of several layers of neurons with two neuropils where synaptic contacts occur. There are three layers of cell somata which contain the cell nuclei: outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer, and ganglion cell layer; there are also two layers that contain synaptic connections between axons and dendrites: outer plexiform layer and inner plexiform

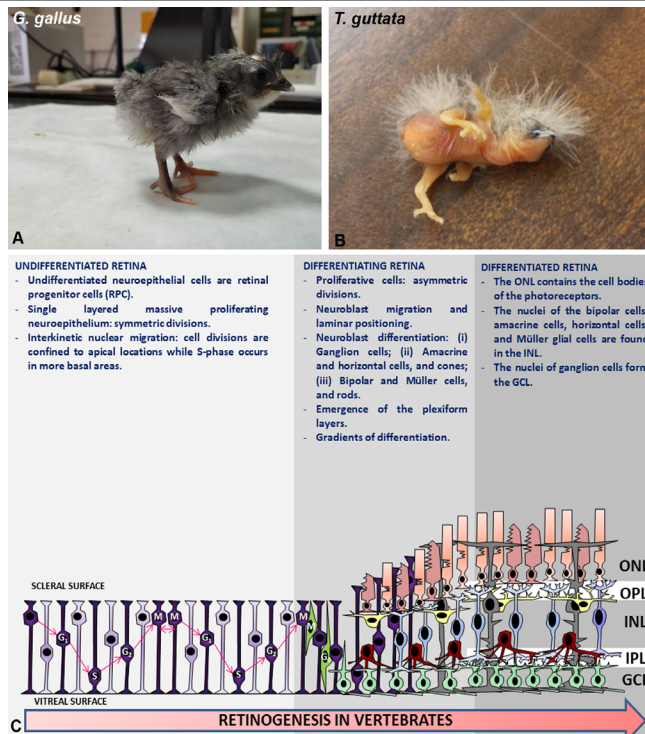


Figure 1 | Precocial species are independent at hatching with functional visual and locomotor systems in contrast to those of altricial species.

G. gallus (A) and *T. guttata* (B) newly hatched animals. Schematic representation of the vertebrate retinogenesis process showing the most important events of cell differentiation and histogenesis (C). During the first stage of retinal development, this tissue is composed of neuroepithelial cells that undergo both symmetric and asymmetric divisions. Neuroblasts produced by neuroepithelial cells migrate to different sites before their differentiation (C). Figure 1 is sourced from our laboratory (unpublished). GCL: Ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer.

layer (Figure 1C). The retina consists of six major types of neurons that include the rod and cone photoreceptors, the horizontal, bipolar, and amacrine cell interneurons, and the retinal ganglion cells (Figure 1C). Furthermore, Müller cells are considered the main type of glia in the vertebrate retina. These cells are radially oriented and span the entire thickness of the retina (Figure 1C).

During early stages of neurulation, the retina originates from a bilateral evagination of diencephalon that gives rise to optic vesicles. Inductive signals from the ectoderm control invagination of the optic vesicles, resulting in the formation of double-layered, cup-shaped structures – the optic cups (Chow and Lang, 2001). The external layer of the optic cup forms the retinal pigment epithelium, whereas the internal sheet of cells forms the pseudostratified retinal neuroepithelium. These neuroepithelial cells proliferate in a peculiar manner: with their cytoplasmic processes extending from the internal limiting membrane to the pigment epithelial end, the nuclei of these retinal cell progenitors engage in a vitreal-to-scleral movement, undergoing, at specific depths within the neuroepithelium, different phases of the cell cycle (Figure 1C). This nuclear movement is called interkinetic nuclear migration. In the undifferentiated retina, mitosis (M-phase) occurs in the scleral surface, near the presumptive retinal pigment epithelium. During the period of symmetric cell division, each neuroepithelial cell divides to produce two daughter cells that extend a process toward the opposing vitreal surface while maintaining contact with the scleral surface. Then, asymmetric cell division generates daughter cells that either re-enter the cell cycle or leave it to become post-mitotic migrating neuroblasts that differentiate into

Review

one of seven classes of retinal cells. This process of cell determination and differentiation is termed retinogenesis (Xiang, 2013; Amini et al., 2018) (Figure 1C).

Timing Differences during Visual System

Development in Altricial and Precocial Birds

Many of the developmental events that occur during visual system embryogenesis in birds begin earlier in the retina of precocial species than in altricial species. Thus, the optic vesicle and optic cup formation and the emergence of the plexiform layers occur at later stages in the *T. guttata* retina (Álvarez-Hernán et al., 2018) than in the chicken (Hamburger and Hamilton, 1951). Furthermore, the first differentiating ganglion cells are detected in the *G. gallus* retina at HH13 (48–52 hours of incubation) (Prada et al., 1991; Snow and Robson, 1994), while in the *T. guttata* retina, the first ganglion cells become post-mitotic at St24 (108 hours) (Álvarez-Hernán et al., 2020). The onset of visinin expression, an early marker of photoreceptor differentiation, in the chicken ONL occurs at HH27 (120 hours) (Bruhn and Cepko, 1996; Bradford et al., 2005), while in the *T. guttata* retina it is first detected at St28 (132 hours) (Álvarez-Hernán et al., 2020). Finally, the onset of expression of Prox1, a transcription factor that is expressed during early horizontal cell differentiation, is detected in the *T. guttata* retina at St34 (172 hours) (Álvarez-Hernán et al., 2020), while the first Prox1-immunoreactive progenitors in the chicken retina are detected at HH30 (156 hours) (Edqvist and Hallböök, 2004). Thus, morphogenesis, histogenesis, and cell differentiation in the developing *T. guttata* retina are delayed with respect to *G. gallus*, a precocial bird species.

Retinal Maturity at Hatching

Precocial birds hatch with a fully differentiated and functional retina (Fischer and Reh, 2000; Kubota et al., 2002). Mitotic figures, detected with antibodies against phospho-histone H3, were absent in the central retina of newly hatched individuals in the chicken (Figure 2A) and in the quail (Figure 2C). However, sparse phospho-histone H3-immunoreactive mitotic figures are found in the CMZ in both precocial species (Figure 2B and D). This proliferative activity in the peripheral-most region of the retina in hatchlings and adults of these birds suggests on-going growth of the retina during postnatal life (Fischer et al., 2014). These proliferative cells also express retinal progenitor markers. Intra-ocular injections of different growth factors can greatly enhance the proliferative activity in the CMZ (Fischer and Reh, 2003). Furthermore, a subpopulation of cells located in a specific region of the ciliary body also have neurogenic potential and can be stimulated by several growth factors to proliferate and differentiate into retinal neurons (Fischer and Reh, 2003).

Müller glia plays an essential role in the maintenance of the retinal structure and participates in essential homeostatic processes in the developing and mature retinal tissue (Bejarano-Escobar et al., 2017). These cells have a significant proliferative and neurogenic capacity under physiological (Julian et al., 1998; Pavón-Muñoz et al., 2016) and experimental conditions (Bernardos et al., 2007) in the fish retina. However, Müller glia are not proliferative in the healthy bird retina at hatching. Avian Müller cells can exhibit neurogenic properties under the effect of acute damage or by the addition of specific growth factors in the uninjured chicken retina (Fischer and Reh, 2000). These stimuli induce proliferation of Müller cells and re-initiation of the expression of retinal progenitor markers (Fischer and Reh, 2000). Therefore, Müller glia need to be stimulated to acquire the proliferative phenotype in precocial birds.

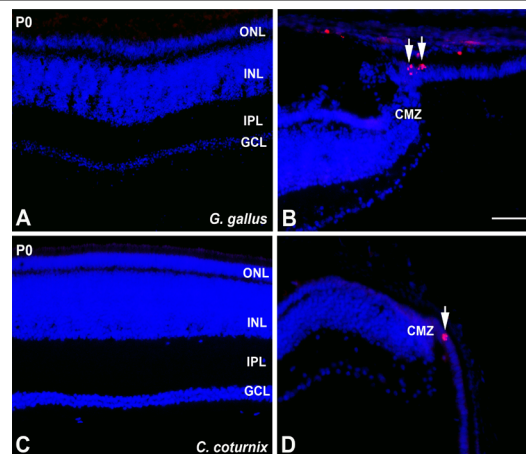


Figure 2 | Immunodetection of pHisH3 in *G. gallus* (A, B) and *C. coturnix* (C, D) in the retina of newly hatched animals.

pHisH3 immunoreactivity is absent in the central retina in both species (A, C). Sparse immunoreactive mitotic figures are observed in the most peripheral retina (arrows in B, D). CMZ: Circumferential marginal zone; GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; ONL: outer nuclear layer. Scale bar: 50 μ m. Figure 2 is sourced from our laboratory (unpublished).

At hatching, the central retina of altricial birds such as the zebra finch (*T. guttata*) shows the typical layering of the mature tissue. However, signs of immaturity are found such as an increased thickness of the ganglion cell layer, very thin plexiform layers, and photoreceptors displaying immature morphology (Rojas et al., 2007; Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020). Nevertheless, the main feature of immaturity is that neurogenesis is intense in the altricial retina in newly hatched animals (Figure 3). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed by retinal progenitors in the avian retina (Fischer and Reh, 2000; Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020). Thus, on hatching day (post-hatching day 0, P0), abundant PCNA-immunoreactive nuclei are detected in the outer half of the inner nuclear layer, the region where the bipolar/Müller cell bodies are located (Figure 3A and B). Bipolar and Müller cells are the last cell types that exit the cell cycle in the developing retina (Amini et al., 2018). It has been described that strong expression of PCNA is detected in early degenerating cells (Borges et al., 2004). During perinatal stages, sparse pyknotic nuclei are detected in the inner nuclear layer of altricial birds (unpublished data) and therefore, some of the PCNA-positive nuclei could correspond to apoptotic cells.

Furthermore, the peripheral-most retina shows abundant PCNA immunoreactive nuclei (Figure 3A and C), suggesting that the altricial retina is still undergoing intense growth via the addition and integration of concentric rings of newly generated cells. The PCNA immunostaining observed in the P0 *T. guttata* retina is similar to that described in the E12 *G. gallus* retina, about nine days before hatching (Ghai et al., 2008).

Also, abundant mitotic activity is found in the ventricular retinal surface in both the central (Figure 3D) and peripheral (Figure 3E) retina of newborn *T. guttata*, but also in hatchling chicks (P5) (Figure 3F and G), showing that neurogenesis is intense in the altricial retina after hatching (Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020).

Conclusion

The neural retina has been the tissue of choice to study the main aspects of embryonic and postnatal neurogenesis. Current research in teleost fish and amphibians demonstrates that adult neural stem cells exist in the retina of these species (Araki, 2014; Pavón-Muñoz et al., 2016; Madelaine and

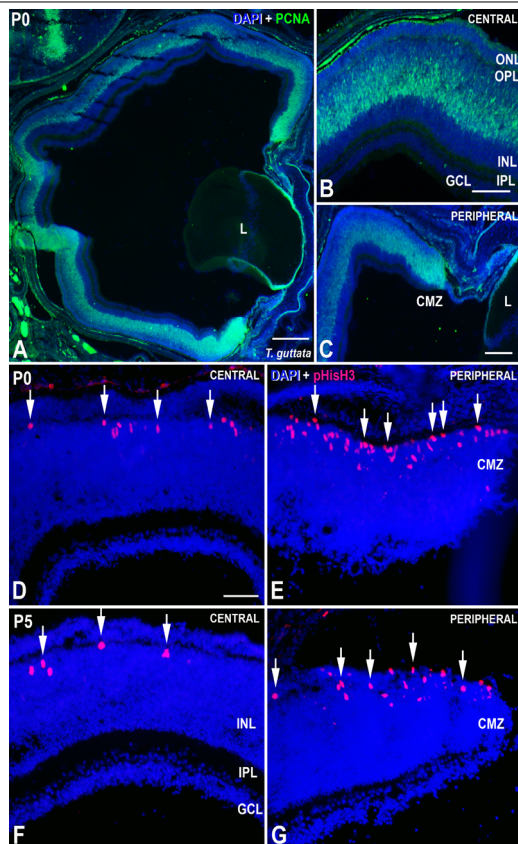


Figure 3 | PCNA (A–C) and pHisH3 (D–G) immunoreactivity in the P0 (A–E) and P5 (F, G) *T. guttata* retina.

Abundant PCNA-positive nuclei are detected in the bipolar/Müller cell layer (A–C) and in the CMZ (A, C). Abundant pHisH3-positive cells are found in the vitreal surface of the central (D, F) and peripheral (E, G) retina. CMZ: Circumferential marginal zone; GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; L: lens; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer. Scale bars: 500 μ m in A; 100 μ m in B and C; 50 μ m in D–G. Figure 3 is sourced from our laboratory (unpublished).

Mourrain, 2017). These populations of cells are crucial to the function of this region of the visual system, since they can both permit physiological cellular turnover and replace cells lost from injury or disease. Proliferating cells within the mature retina are also present in other vertebrates, including reptiles (Todd et al., 2015; Eymann et al., 2019) and birds (Fischer and Reh, 2000). These non-mammalian species provide excellent comparative models for examining the molecular and cellular mechanisms of adult retinal stem cell maintenance and fate. Precocial birds such as the chicken or quail generate most retinal neurons prenatally, and neurogenesis in their post-hatching retina is restricted to a few progenitor cells located at the peripheral retinal margin (Fischer and Reh, 2000). Müller cells are considered to be astrocyte-related cells that acquire retinal stem cells characteristics after injury (Hoang et al., 2020). In our current work (Álvarez-Hernán et al., 2018, 2020), we have shown that the patterns of proliferation reveal that neurogenesis is intense in the retinas of altricial birds at hatching and even at early stages post-hatching. Strong proliferative activity is detected in both the CMZ and the bipolar/Müller cell layer. Therefore, the altricial retina continues to grow during post-embryonic stages, even until day 5 after hatching. Furthermore, the differentiation of bipolar and Müller cells extends into the post-hatching period.

It is necessary to determine whether neurogenesis is still detected in the retina of juveniles or adult altricial birds, but long-life neurogenesis in the retina of altricial birds opens up an additional field beyond developmental neurogenesis. It could constitute a powerful tool to determining how post-

embryonic neurogenesis is regulated under physiological and regenerative conditions. The understanding of the molecular mechanisms involved in neurogenesis could have crucial implications for regenerative therapies. In conclusion, the retina of altricial birds such as canaries or zebra finches, models used for the study of brain plasticity, may constitute a useful model system for eye research, both in development and, given its postnatal neurogenic activity, regeneration research.

Author contributions: GAH, JAMR, YG, JSF, GMP, JRL and JFM wrote and critically reviewed the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Financial support: GAH was a recipient of a Fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2007-67540), Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2015-64650P), Dirección General de Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2017-85547-P), and Junta de Extremadura, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, “Una manera de hacer Europa” (GR15158, GR18114, IB18113).

Copyright license agreement: The Copyright License Agreement has been signed by all authors before publication.

Plagiarism check: Checked twice by iThenticate.

Peer review: Externally peer reviewed.

Open access statement: This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

References

- Álvarez-Hernán G, Sánchez-Resino E, Hernández-Nuñez I, Marzal A, Rodríguez-León J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2018) Retinal histogenesis in an altricial avian species, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817). *J Anat* 233:106-120
- Álvarez-Hernán G, Hernández-Nuñez I, Rico-Leo EM, Marzal A, de Mera-Rodríguez JA, Rodríguez-León J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2020) Retinal differentiation in an altricial bird species, *Taeniopygia guttata*: An immunohistochemical study. *Exp Eye Res* 190:107869.
- Álvarez-Hernán G, Andade JP, Escarabaja-Blázquez L, Blasco M, Solana-Fajardo J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2019) Retinal differentiation in syngnathids: Comparison in the developmental rate and acquisition of retinal structures in altricial and precocial fish species. *Zoomorph* 138:14.
- Amini R, Rocha-Martins M, Norden C (2017) Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina. *Front Neurosci* 11:742.
- Araki M (2014) A novel mode of retinal regeneration: The merit of a new *Xenopus* model. *Neural Regen Res* 9:2125-2127.
- Bagnoli P, Porciatti V, Lanfranchi A, Bedini C (1985) Developing pigeon retina: Light-evoked responses and ultrastructure of outer segments and synapses. *J Comp Neurol* 235:384-394.
- Bejarano-Escobar R, Holguin-Arévalo MS, Montero JA, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2011) Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of cathepsins B and D. *Dev Dyn* 240:1841-1855.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Durán AC, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2013) Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat* 223:171-184.
- Bejarano-Escobar R, Sánchez-Calderón H, Otero-Arenas J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2017) Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *J Anat* 231:471-483.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27:7028-7040.
- Borges HL, Chao C, Xu Y, Linden R, Wang JYJ (2004) Radiation-induced apoptosis in developing mouse retina exhibits dose-dependent requirement for ATM phosphorylation of p53. *Cell Death Diff* 11:494-502.

Review

- Bradford RL, Wang C, Zack DJ, Adler R (2005) Roles of cell-intrinsic and microenvironmental factors in photoreceptor cell differentiation. *Dev Biol* 286:31-45.
- Bruhn SL, Cepko CL (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J Neurosci* 16:1430-1439.
- Candal E, Anadon R, Bourrat F, Rodríguez-Moldes I (2005) Cell proliferation in the developing and adult hindbrain and midbrain of trout and medaka (teleosts): A segmental approach. *Brain Res Dev Brain Res* 160:157-175.
- Candal E, Ferreiro-Galve S, Anadon R, Rodríguez-Moldes I (2008) Morphogenesis in the retina of a slow-developing teleost: emergence of the GABAergic system in relation to cell proliferation and differentiation. *Brain Res* 1194:21-27.
- Charvet CJ, Striedter GF (2009) Developmental basis for telencephalon expansion in waterfowl: Enlargement prior to neurogenesis. *Proc Biol Sci* 276:3421-3427.
- Charvet CJ, Striedter GF (2011) Developmental modes and developmental mechanisms can channel brain evolution. *Front Neuroanat* 5:4.
- Chow RL, Lang RA (2001) Early eye development in vertebrates. *Ann Rev Cell Dev Biol* 17:255-296.
- Cook B, Portera-Cailliau C, Adler R (1998) Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J Comp Neurol* 396:12-19.
- de Almeida HM, Sousa RP, Bezerra DO, Olivindo RF, das Neves Diniz A, de Oliveira SC, Feitosa ML, de Moura Fortes EA, Ferraz MS, de Carvalho YK, de Menezes DJ, de Carvalho MA (2015) Greater rhea (*Rhea americana*) external morphology at different stages of embryonic and fetal development. *Anim Reprod Sci* 162:43-51.
- de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañan Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J (2019) Senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-GAL) activity in the developing avian retina. *Dev Dyn* 248:850-865.
- Dewulf V, Bottjer SW (2005) Neurogenesis within the juvenile zebra finch telencephalic ventricular zone: A map of proliferative activity. *J Comp Neurol* 481:70-83.
- Doldán MJ, Prego B, de Miguel Villegas E (1999) Immunohistochemical localization of calretinin in the retina of the turbot (*Psetta maxima*) during development. *J Comp Neurol* 406:425-432.
- Edqvist PH, Hallböök F (2004) Newborn horizontal cells migrate bi-directionally across the neuroepithelium during retinal development. *Development* 131:1343-1351.
- Eymann J, Salomies L, Macri S, Di-Poi N (2019) Variations in the proliferative activity of the peripheral retina correlate with postnatal ocular growth in squamate reptiles. *J Comp Neurol* 527:2356-2370.
- Fischer AJ, Bosse JL, El-Hodiri HM (2014) Reprint of: The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Exp Eye Res* 123:115-120.
- Fischer AJ, Reh TA (2000) Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220:197-210.
- Fischer AJ, Reh TA (2003) Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev Biol* 259:225-240.
- Francisco-Morcillo J, Bejarano-Escobar R, Rodríguez-León J, Navascués J, Martín-Partido G (2014) Ontogenetic cell death and phagocytosis in the visual system of vertebrates. *Dev Dyn* 243:1203-1225.
- Francisco-Morcillo J, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2006) Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res* 1103:32-48.
- Francisco-Morcillo J, Sánchez-Calderón H, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Hidalgo-Sánchez M, Martín-Partido G (2005) Expression of FGF19 in the developing chick eye. *Brain Res Dev Brain Res* 156:104-109.
- Ghai K, Stanke JJ, Fischer AJ (2008) Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain Res* 1192:76-89.
- Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, Dellett M, Archer DB, Cogliati T (2009) Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol Vis* 15:1915-1928.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Harahush BK, Hart NS, Green K, Collin SP (2009) Retinal neurogenesis and ontogenetic changes in the visual system of the brown banded bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum* (Hemiscyllidae, Elasmobranchii). *J Comp Neurol* 513:83-97.
- Hoang T, Wang J, Boyd P, Wang F, Santiago C, Jiang L, Lahne M, Todd LJ, Saez C, Yoo S, Keuthan C, Palazzo I, Squires N, Campbell WA, Jia M, Rajaii F, Payail T, Wang G, Ash J, Fischer AJ, Hyde DR, Qian J, Blackshaw S (2020) Comparative transcriptomic and epigenomic analysis identifies key regulators of injury response and neurogenic competence in retinal glia. *bioRxiv* doi: 10.1101/717876.
- Julian D, Ennis K, Korenbrot JJ (1998) Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol* 394:271-282.
- Kubota R, Hোক JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA (2002) A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res* 134:31-41.
- Loeliger M, Rees S (2005) Immunocytochemical development of the guinea pig retina. *Exp Eye Res* 80:9-21.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Madelaine R, Mourrain P (2017) Endogenous retinal neural stem cell reprogramming for neuronal regeneration. *Neural Regen Res* 12:1765-1767.
- Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2015) The role of Islet-1 in cell specification, differentiation, and maintenance of phenotypes in the vertebrate neural retina. *Neural Regen Res* 10:1951-1952.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J (1999) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412:255-275.
- Murray JR, Varian-Ramos CV, Welch ZS, Saha MS (2013) Embryological staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *J Morphol* 274:1090-1110.
- Nice MM (1962) Development of behavior in precocial birds. *Trans Linn Soc (NY)* 8:1-211.
- Pavón-Muñoz T, Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J (2016) Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* 88:492-507.
- Prada C, Puga J, Pérez-Méndez L, López, Ramírez G (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur J Neurosci* 3:1187.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474:304-324.
- Rojas LM, Mitchell MA, Ramírez YM, Mcneil R (2007) Comparative analysis of retina structure and photopic electroretinograms in developing altricial pigeons (*Columba livia*) and precocial Japanese quails (*Coturnix japonica japonica*). *Brain Behav Evol* 18:503-518.
- Sánchez-Farías N, Candal E (2015) Doublecortin is widely expressed in the developing and adult retina of sharks. *Exp Eye Res* 134:90-100.
- Sánchez-Farías N, Candal E (2016) Identification of radial glia progenitors in the developing and adult retina of sharks. *Front Neuroanat* 10:65.
- Snow RL, Robson JA (1994) Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience* 58:399-409.
- Striedter GF, Charvet CJ (2008) Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: Morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virginianus*). *J Comp Neurol* 507:1663-1675.
- Todd L, Suárez L, Squires N, Zelinka CP, Gribbins K, Fischer AJ (2016) Comparative analysis of glucagonergic cells, glia, and the circumferential marginal zone in the reptilian retina. *J Comp Neurol* 524:74-89.
- Vergara MN, Canto-Soler MV (2012) Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev* 7:22.
- Xiang M (2013) Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70:2519-2532.
- Young RW (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229:362-373.
- Young RW (1985) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res* 353:229-239.