

R.24363

T/37

**INSTITUTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

***PAPEL MORFÓGENO DEL GABA DURANTE EL
DESARROLLO DE LA RETINA DEL POLLO***

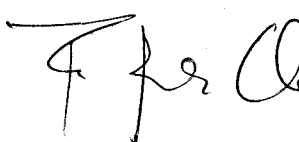
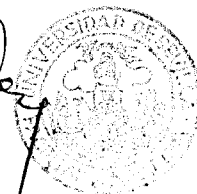
Trabajo que para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía
presenta la Licenciada Araceli Trueba Lawand.

Sevilla, 1995

DR.D. FRANCISCO ANDRES PRADA ELENA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "PAPEL MORFOGENO DEL GABA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DEL POLLO" ha sido realizado en éste Departamento por D^a. Araceli Trueba Lawand bajo mi dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Sevilla a veinte de diciembre de mil novecientos noventa y cinco.

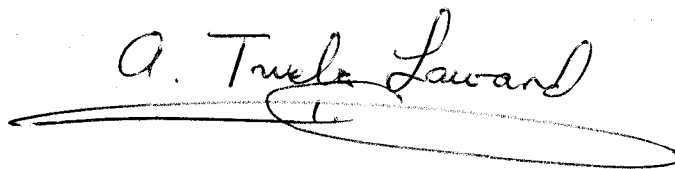
DPTO. CIENCIAS MORFOLOGICAS

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**


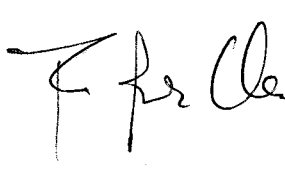
AVDA/SÁNCHEZ PIZJUAN Nº 4 41009-SEVILLA.SPAIN
TELEFONOS:95-4552865;95-4552866.FAX: 4381662

**"PAPEL MORFOGENO DEL GABA DURANTE EL
DESARROLLO DE LA RETINA DEL POLLO"**

Trabajo presentado por la Licenciada D^a Araceli Trueba Lawand, para optar al grado de Doctora por el programa de doctorado "Nuevas Perspectivas en Morfología" del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla.



Fdo.: Araceli Trueba Lawand



DPTO. CIENCIAS MORFOLOGICAS

**Dr.D. Francisco A. Prada Elena
Profesor Titular y Director del
Departamento de Ciencias Morfológicas
Universidad de Sevilla**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 231 número 48 del libro
correspondiente. 1985

Sevilla, _____

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvaro Caffre

ÍNDICE

	PÁG.
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	38
MATERIAL Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	47
ICONOGRAFÍA	69
DISCUSIÓN	98
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	114

RESUMEN

Aunque la distribución de las células que contienen GABA en la retina del pollo, durante el desarrollo, ha sido estudiada por algunos investigadores, los patrones de expresión GABAérgica en los estadios iniciales del desarrollo, no han sido demostrados. En este trabajo de investigación que presentamos como Tesis Doctoral, estudiamos inmunohistoquímicamente el desarrollo del GABA, utilizando anticuerpos poli y monoclonales y prestandole especial atención a los estadios del desarrollo en los que las interneuronas (células horizontales y células amacrinas) migran y se diferencian (estadios E-6 a E-18).

Nuestros resultados demuestran que el GABA está presente en las interneuronas antes mencionadas a partir del momento en que las células se sueltan de la superficie ventricular. El GABA aparece en la retina antes que la enzima de síntesis acetilcolina (colinacetil transferasa, ChAT) y ambas sustancias las hemos colocalizado en las mismas neuronas amacrinas durante el desarrollo. Aportamos evidencias de que el GABA es necesario para el normal desarrollo de las células horizontales y amacrinas. También se observa que existen dos etapas distintas en la expresión GABAérgica de la retina del pollo. La primera, transcurre entre E-6 y E-12 y en ella todas las interneuronas que migran contienen GABA. Estos datos

son soportados por el estudio comparativo que hacemos de nuestras preparaciones, a través de las técnicas inmunohistoquímicas y los métodos de tinción con plata (método de Golgi). Durante este periodo, las células no contienen la enzima de la síntesis del GABA y es la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Hockoc y col., 1990). La segunda abarca desde E-12 hasta E-20, en este periodo las células no migran y el contenido de GABA se reduce progresivamente, quedando éste circunscrito a las poblaciones y subpoblaciones de neuronas que utilizarán el GABA como neurotransmisor.

Por lo tanto nosotros sugerimos y discutimos sobre el papel morfógeno del GABA durante el desarrollo de la retina.

Nuestras conclusiones son además reforzadas por los hallazgos experimentales empleando agonistas del GABA, como el Muscimol o el Acido amino-oxiacético, y antagonistas de los receptores como la Bicuculina y el Phaclofen.

INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN DEL TÉRMINO MORFÓGENO. PASADO Y PRESENTE

En el desarrollo de cualquier embrión concurren una serie de movimientos celulares y otros múltiples procesos morfogenéticos que siguen ciertos patrones, según cada especie, para alcanzar una forma y funciones definitivas. Uno de los primeros en señalar la relevancia de estos procesos morfogenéticos, fue *Vogt* en 1929, el cual observó los complejos movimientos de las células durante la gastrulación. Desde entonces, se han realizado múltiples estudios que han subrayado el interés de estos procesos en el desarrollo embriológico en general (*Holtfreter, 1968; Gustafson y Toneby, 1971*). Pero solamente en los últimos años se ha comenzado a trabajar sobre los posibles factores que pudieran controlar o incidir en estos procesos, fueran intrínsecos (genéticos) o extrínsecos.

En el sistema nervioso maduro se sabe que funcionan unas moléculas, los neurotransmisores, que proporcionan una señalización intercelular discreta que media la comunicación entre células dentro de circuitos neuronales complejos (*Lauder, 1988*) o, en otras palabras, que median la codificación de información a nivel transináptico (*Lipton y Kater, 1989*).

Se ha sugerido que varios neurotransmisores tienen funciones en el

sistema nervioso en desarrollo que difieren del papel clásico que juegan en la transmisión sináptica. Estudios recientes han descrito efectos "neurotróficos" de diversos neurotransmisores tales como la serotonina, la dopamina, la noradrenalina, el neurotransmisor inhibitor ácido gamma-aminobutírico (**GABA**) (*Lipton y Kater, 1989; Lauder, 1988*).

En organismos primitivos estas moléculas actúan como señalizadores intra e intercelulares, aún sin la presencia de sistema nervioso (*McMahon, 1974; Roth et al, 1982*). Sustancias como noradrenalina, serotonina, acetilcolina y ácido gamma-aminobutírico (**GABA**) participan en hechos tales como la actividad ciliar o la motilidad (*Lauder, 1988*).

Durante el desarrollo embrionario se encuentra que los neurotransmisores involucrados o presentes actúan como señales tanto inter como intracelulares, con influencia directa en procesos morfogenéticos tan importantes como la gastrulación, la neurulación y la formación de tejidos. **Concretamente, los neurotransmisores pueden inducir una serie de efectos sobre la citoarquitectura neuronal, comportamiento del cono de crecimiento, elaboración y regeneración de la morfología neurítica, sinaptogénesis; todo como parte de un proceso fisiológico normal, el cual incluye también la degeneración y muerte celular. En muchos de estos procesos la actuación de estas moléculas guarda gran similitud con lo observado en organismos más primitivos.**

La palabra " **MORFOGENO** " fue utilizada por primera vez por *Turing*, en 1952 (citado por *Lauder*, 1988), en su modelo matemático de morfogénesis. **Un morfógeno es una sustancia señalizadora o inductora que se emite a partir de una fuente, la cual se difunde en un espacio y se encuentra en distintas concentraciones a lo largo de éste (*Crick*, 1970).**

Este término ha sido utilizado para describir sustancias involucradas en la formación de patrones, tanto en embriones vertebrados como invertebrados, así como en organismos primitivos.

Actualmente, el uso del término " morfógeno " se hace en el contexto de los neurotransmisores como reguladores de procesos morfogénéticos.

1.A.ORGANISMOS PRIMITIVOS

Sustancias neurotransmisoras, tales como catecolaminas, serotonina, acetilcolina y GABA, se han hallado en una variedad de organismos primitivos y organismos invertebrados tempranos sin sistema nervioso. Parecen actuar, en estas circunstancias, como señales tanto intra- como intercelulares, involucradas en el control de la proliferación celular, la actividad ciliar, la motilidad, cambios en la forma celular y movimientos

celulares morfogenéticos.

Las monoaminas (norepinefrina, epinefrina, dopamina y serotonina (5-HT), y la acetilcolina , se encuentran en muchos protozoos (*Buznikov, 1984*). En la **TETRAHYMENA** se han observado fluctuaciones intracelulares de algunas de estas sustancias durante el ciclo de división celular (*Sullivan y Sullivan, 1964*), observándose variaciones inversas entre la 5-HT y la dopamina durante las fases de crecimiento de sus células (*Goldman et al, 1981*). La secreción al espacio extracelular durante algunas de estas fases podría indicar una función de señalización intercelular. **Tambien se ha sugerido una función del GABA en el control del crecimiento celular de la Tetrahymena, al documentar una estimulación en su crecimiento mediante las benzodiazepinas** (*Darvas et al, 1985*).

En otros organismos primitivos, como es la **PLANARIA**, los procesos de regeneración, de síntesis de RNA y DNA, así como actividades correspondientes a la adenil-ciclase y proteínquinasa calcio-dependiente, son todos estimulados por las catecolaminas y la 5-HT (*Franquinet y Martelly, 1981*). En los **TREMATODOS** y **CESTODOS** parasitarios, la 5-HT procedente del huésped estimula la motilidad celular a través de receptores específicos unidos a la adenil-ciclase de alta respuesta (*Kasschou y Mansour, 1982*). De forma similar, el GABA actúa sobre la motilidad, capacidad de asentamiento y metamorfosis de la **LARVA**

PLANCTONICA ABALONE (*Morse et al, 1979*). La falta del enzima acetilcolintransferasa en **NEMATODOS** mutantes es tambien causa de una alteración importante en el crecimiento (*Rand y Russell, 1984*), mientras que, tanto la acetilcolina como la 5-HT, afectan la morfogénesis regional de la **HYDRA** (*Muller et al, 1977*).

Parece, por tanto, que los neurotransmisores tienen efectos sobre algunos procesos del desarrollo en los organismos primitivos, tales como son la motilidad, el crecimiento o la morfogénesis.

1.B. EMBRIONES INVERTEBRADOS TEMPRANOS O PRIMITIVOS

Los neurotransmisores tambien parecen influir en la regulación de ciertas funciones básicas en el desarrollo de estos embriones. Se sabe que las monoaminas y la acetilcolina influyen sobre las divisiones iniciales y la gastrulación en el embrión del erizo de mar, la estrella de mar y los peces. Los datos se basan en la presencia, durante el desarrollo, de sustancias controladas temporalmente y la interrupción de sus efectos por otras sustancias farmacológicamente relacionadas.

Se ha podido medir sustancias como acetilcolina, dopamina, 5-HT, triptamina y 5-metoxitriptamina en estos invertebrados, encontrándose cantidades variables de cada, segun el número de la división de

blastómeros y la fase del ciclo celular (*Buznikov, 1984*). **El tratamiento de los embriones de estrella y erizo de mar con las monoaminas citadas o con antagonistas de sus receptores, produce defectos especialmente en la fase de divisiones iniciales y, en menor grado, en fases subsiguientes** (*Buznikov et al, 1970, 1984*). Los defectos producidos por los antagonistas de los receptores de acetilcolina, dopamina o 5-HT se pueden reparar añadiendo los neurotransmisores citados (*Buznikov et al, 1970*), lo cual indica que son sucesos mediados por receptores específicos.

La estimulación de la actividad ciliar en la blástula del erizo de mar ocurre en respuesta a 5-HT, dopamina, acetilcolina y GABA. Estos efectos también parecen mediados por receptores y, en el caso de las monoaminas, por la adenilciclase y calcio intracelular (*Sherif, 1983*). La adición de 5-HT a un medio de crecimiento inhibe la eclosión en el erizo de mar (*Deeb, 1972*). Es posible que participe en más aspectos del proceso de fertilización, ya que tanto la motilidad espermática como la fertilización del huevo de erizo de mar son inhibidas por el antagonista metergolina (*Parisi et al, 1984*). **En la gastrulación, la 5-HT inhibe la migración del mesénquima primario, dando lugar a defectos esqueléticos** (*Toneby, 1977*), mientras que la acetilcolina afecta la invaginación del arquenteron. Esto produce malformaciones del intestino (*Gustafson y Toneby, 1970; Toneby, 1977*).

1.C. VERTEBRADOS

Neurotransmisores tales como las catecolaminas y la 5-HT están presentes durante la embriogénesis de aves y anfibios (*Baker, 1965; Lauder y Krebs, 1984*) y se ha sugerido que tienen influencia sobre el desarrollo del sistema nervioso y estructuras asociadas.

En el embrión de **POLLO** se ha podido medir cantidades de 5-HT incluso en el primer día de incubación (*Ignarro y Shideman, 1968*). La 5-HT también se localiza en células de la línea primitiva, durante la gastrulación y tras incubación con 5-hidroxitriptófano marcado (*Emanuelsson, 1976*). **Durante la neurulación, tanto el tubo neural como la notocorda de los embriones de POLLO y ANFIBIO son capaces de captar 5-HT y/o catecolaminas en sitios específicos de su territorio rostrocaudal** (*Newgreen et al, 1981; Godin y Gipouloux, 1986*). La notocorda podría ser sitio de síntesis de catecolaminas y de 5-HT en estos embriones (*Godin y Gipouloux, 1986; Wallace et al, 1982*).

Es importante tener en cuenta que todas estas áreas de localización de neurotransmisores en el tubo neural y la notocorda son transitorias, y que su expresión se correlaciona temporalmente con el cierre del tubo neural. Así mismo, se conoce una serie de sustancias neuroquímicas, tales como serotonina, 5-metil-triptamina y prometazina, que

interfieren con mecanismos relacionados con 5-HT, catecolaminas y acetilcolina, produciendo efectos teratogénicos en el embrión de pollo (Lawrence y Burden, 1973; Landauer, 1975, 1976; Palen et al, 1979). Estas anomalías comprenden alteraciones en el crecimiento y la extensión del blastodermo, la formación de la línea primitiva, la somitogénesis, malformaciones cerebrales y de la espina dorsal. Por tanto, lugares de captación y síntesis de 5-HT y de catecolaminas podrían ser importantes en la regulación de movimientos celulares morfogenéticos durante la neurulación en los embriones de pollo y de anfibio.

Hace muy poco tiempo existían pocos datos disponibles sobre la captación o síntesis de neurotransmisores en regiones de morfogénesis de embriones de mamíferos.

Cambios en niveles de serotonina, catecolaminas y GABA se han hallado en diferentes fases de la formación del paladar del ratón (Zimmerman, 1981; Pisano y Green, 1985; Wee, 1986). También se ha visto que la 5-HT y la acetilcolina estimulan la reorientación de la cresta palatina en cultivo in toto de embriones. El GABA ejerce un efecto inhibitorio y el tratamiento de ratones gestantes con diazepam produce hendidura palatina en la prole (Wee et al, 1979, 1980; Wee y Zimmerman, 1983; Zimmerman y Wee, 1984).

La importancia de los neurotransmisores para la regulación de la embriogénesis en los mamíferos se deduce, nuevamente, de los resultados de varios estudios farmacológicos. Algunos de ellos muestran que la 5-HT, L-triptófano y antidepresivos tricíclicos pueden causar malformaciones del cráneo, cerebro, médula espinal o columna vertebral en los roedores y humanos (*Guram et al,1982; Jurand,1980*). Esto indica la posible participación de las monoaminas en la morfogénesis del sistema nervioso y algunos componentes del sistema esquelético en los embriones de mamíferos.

2.GABA COMO MORFOGENO EN LA FORMACION DEL SISTEMA NERVIOSO

2.A.GENERALIDADES DE LA MORFOGENESIS

Resulta, por tanto, evidente que existen algunos neurotransmisores que tienen funciones en el sistema nervioso en desarrollo que difieren de su función tradicionalmente conocida en la transmisión sináptica. Así, sabemos que el sistema nervioso maduro presenta una organización estructural y funcional de muy alto grado. Sin embargo, en etapas tempranas de su embriogénesis, las células del tubo neural no parecen tener un orden estructural.

A nivel del neurotubo, se puede considerar el desarrollo de las neuronas individuales en 3 fases: proliferación, migración y diferenciación. La célula glial, madura en general, en estadios ontogenéticos más tardíos (*Schousboe, 1972; Ling y Leblond, 1973*).

Durante la fase de **PROLIFERACION** se genera un exceso de neuronas que necesitan, a su vez, un proceso de "poda", lo cual reduce el número de neuronas en aproximadamente un 50% (*Cowen et al, 1984; Clarke, 1987*). No se conoce el mecanismo por el que se produce esta muerte neuronal natural, pero se piensa que los aminoácidos excitatorios pueden jugar un papel importante. Se ha visto que el glutamato, procedente de explantes corticales, causa la inhibición de las expansiones dendríticas y la promoción de la sinaptogénesis en jóvenes neuronas piramidales del hipocampo (*Mattson, 1989*). La eliminación de neuronas, lo cual parece fundamental en el desarrollo y la modelación del sistema nervioso, se podría alcanzar mediante la exposición al glutamato u otros aminoácidos excitatorios que, a concentraciones más altas o en células más sensibles, se hace neurotóxico.

Después de la **MIGRACION** es cuando tiene lugar el desarrollo de funciones de transmisión, tales como la presencia de enzimas sintetizadoras

de neurotransmisores, mecanismos de secreción y captación y receptores específicos. En la **DIFERENCIACION** las células adquieren su fenotipo neuronal y empiezan a formar contactos interneuronales definitivos.

Todos estos procesos de desarrollo están obviamente controlados e influenciados por una gran variedad de factores genéticos y epigenéticos, lo cual incluye hormonas de crecimiento y de diferenciación como el factor de crecimiento neuronal, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento fibroblástico y el factor neurotrófico ciliar. En la última década, han aparecido abundantes evidencias experimentales que indican que los neurotransmisores también participan activamente en estos procesos. Así, *Lauder, 1988; Lipton y Kater, 1989; Redburn y Schousboe, 1987* han descrito efectos neurotróficos en el sistema nervioso producidos por la glutamina, la serotonina, la dopamina, la noradrenalina y el GABA.

2.B. EL GABA COMO MORFOGENO: ESTUDIOS IN VITRO

Ya se conocía alguna información sobre el efecto de GABA en el desarrollo neuronal. Wolff y colaboradores demostraron que la aplicación de GABA al ganglio cervical superior y a la corteza cerebral de la rata facilitaba la sinaptogénesis (*Wolff y col, 1978, 1979*).

Se identificó claramente el papel de GABA como factor neurotrófico in vitro cuando éste se aplicó a una línea celular neuronal (células de neuroblastoma murino) que había fracasado previamente en formar sinapsis o revelar signos tempranos de sinaptogénesis activa (Spoerri et al, 1980). La presencia del GABA aumentó el crecimiento neurítico, promovió la diferenciación de ensanchamientos terminales e indujo la proliferación de vesículas de núcleo claro y denso.

Posteriormente, se observó que la adición de GABA exógeno a cultivos de cerebelo de rata neonatal estimuló el crecimiento neurítico en las células grano del cerebelo (Hansen, 1984). A nivel ultraestructural, el tratamiento con GABA llevó a un aumento en la densidad de los neurotúbulos, el retículo endoplásmico rugoso, el aparato de Golgi y vesículas cubiertas y no cubiertas. Lo mismo observó Spoerri (1988), a nivel ultraestructural y con microscopía óptica, al incubar neuronas corticales y de la retina de embriones de pollo en cultivo con GABA.

Meier y cols. (1985) utilizando agonistas de los receptores GABA A como el (THIP) y antagonistas como la Bicuculina han podido imitar y bloquear, respectivamente, la acción del GABA (Meier et al, 1985). **Parece ser, por tanto, que los receptores GABA se encuentran involucrados en el mecanismo molecular de sinaptogénesis y crecimiento neurítico.**

Michler-Stuke y Wolff (1987) observaron en cultivos, que el GABA estimulaba el crecimiento neurítico de células tectales del embrión de pollo. Este efecto fue intensificado mediante la adición de NGF (factor de crecimiento neuronal) y de calcio y, sin embargo, inhibido en medio N2 y, en menor grado, por la adición de potasio. Además de estos efectos sobre la morfología neuronal, el GABA influencia la expresión de receptores GABA (*Meier y col., 1984*) y ciertas proteínas neuronales (*Meier y Jorgensen, 1986*) en células grano del cerebelo. Estas células, en medio standard, presentan receptores GABA con una sola zona de unión, de alta afinidad (*Meier y Schousboe, 1982*). Sin embargo, en el cerebelo y otras áreas del cerebro existen zonas de unión tanto de alta como de baja afinidad para el GABA. La presencia de GABA en el medio de cultivo indujo la formación de receptores GABA-A, de baja afinidad (*Meier y col, 1984*), imitando la situación in vivo. Este efecto es mediado por los receptores de alta afinidad, ya que el agonista THIP podía imitarlo, mientras que la bicuculina podía, a su vez, bloquear el efecto del agonista (*Belhage y col, '86*).

Es importante considerar que la capacidad del GABA y de los agonistas de receptores GABA-A (en células grano de cerebelo) parece limitarse a estadios tempranos del desarrollo ya que, en los estudios de *Belhage (1987)* y *Hansen (1988)*, estos efectos fueron observados solamente en células cultivadas durante una semana o menos, correspondiendo a una edad postnatal de menos de 14 días .

2.C. EL GABA COMO MORFOGENO: ESTUDIOS IN VIVO.

Se han mencionado una serie de trabajos que constatan el posible papel morfógeno de GABA en la formación neuronal. Esta evidencia se ha observado en experiencias in vitro. Hasta el presente, existen pocos estudios in vivo que describan la presencia de GABA en el periodo de desarrollo prenatal, no siempre pudiendo aclarar que con su presencia, permanente o transitoria, se pudiera deducir un posible papel morfógeno.

Uno de los trabajos de referencia más interesantes ha sido el de *Araki y Kimura (1991)*, mostrando la inmunorreactividad GABA en la retina del pollo en desarrollo. Esta inmunorreactividad es visible ya en E9 (9º día de incubación), en células horizontales. Algunas células, distintas a las horizontales, muestran inmunorreactividad en E13, en la capa nuclear interna. En días siguientes (E17) se observa una inmunorreactividad muy desarrollada en la capa plexiforme externa, con algunas imágenes curvas, sugiriendo claros contactos entre células horizontales y fotorreceptores.

Existen otros autores en la literatura que estudian esta inmunorreactividad GABA durante el desarrollo del pollo, con claras implicaciones morfógenas. Así, *Code et al(1989)* estudian el desarrollo de la inmunorreactividad GABA en los núcleos auditivos del tronco del encéfalo del pollo. *Von Bartheld y Rubel (1989)* analizan la inmunorreactividad GABA

transitoria de los nervios craneales en el embrión de pollo. Según estos autores, existe una fracción de fibras nerviosas GABA positivo que aparece de forma transitoria, en todos los nervios motores craneales y en el nervio vestibular embrionarios. Los primeros estudios que expresan marcaje GABA corresponden a los nervios motores craneales entre E4 y E11, incluyendo placas neuromusculares de E8 a E11. Existe una inmunorreactividad de GABA entre E4 y E10 en una subpoblación de las células ganglionares vestibulares. Se encuentran algunas fibras GABA positivo después de E5 en el nervio olfatorio y después de E9.5 en el nervio óptico.

Según *Von Bartheld y Rubel (1989)*, la duración de la expresión de GABA podría ser muy corta debido a un cambio en el fenotipo neuronal. Por el contrario, es posible que una sola subpoblación de neuronas motoras exprese GABA y que esta población sea eliminada por una muerte celular embrionaria.

La inmunorreactividad para el GABA esta presente en fibras de todos los nervios motores craneales del embrión de pollo. La mayor parte de esta expresión transitoria coincide con la formación de los contactos sinápticos de estos nervios craneales. Los nervios motores que inervan a la musculatura esquelética no parecen utilizar el GABA como neurotransmisor. Tampoco parece ser que el sistema nervioso vertebrado embrionario y adulto sean sensibles al GABA (*Obata et al, 1978*). Parece, por tanto,

improbable que los nervios motores embrionarios utilicen el GABA para la transmisión sináptica de información (*Von Bartheld y Rubel, 1989*).

El GABA también interacciona con sistemas colinérgicos. Coexiste con acetilcolina en algunas neuronas motoras del nervio hipogloso (*Davidoff y Schulze, 1988*) y, posiblemente en algunas terminaciones nerviosas del hipocampo (*Bonnano y Raiteri, 1986*). El GABA también modula la liberación de acetilcolina (*Bonnano y Raiteri, 1986; Farkas, 1986*), incrementa el número de receptores nicotínicos de acetilcolina (*Kasa et al, 1985*), y es necesario para la formación de contactos sinápticos tras la implantación del nervio hipogloso en el ganglio cervical superior (*Wolff et al, 1987*). Otra posible función de la expresión transitoria de GABA en las neuronas motoras podría involucrar la agregación de receptores colinérgicos (*Von Bartheld y Rubel, 1989*). Se piensa que el ácido ascórbico pudiera aumentar el número de estos receptores en la placa neuromuscular en desarrollo (*Knaack et al, 1986*). Como el GABA induce la secreción de ácido ascórbico en tejido cerebral (*Bigelow et al, 1984*) y el ácido ascórbico se sintetiza en el cerebro del embrión de pollo hasta el séptimo día de incubación (*Fabro y Rinaldini, 1965*), es posible que el GABA participe en la regulación de la agregación de receptores colinérgicos en la placa neuromuscular en desarrollo.

Lo cierto es que, sin conocer la función transitoria de la expresión

GABA, hay evidencia que sugiere funciones neurotróficas de GABA en los nervios craneales en desarrollo o en sus tejidos diana.

3. SISTEMA GABAERGICO

Se conoce la existencia del GABA en el tejido cerebral desde 1950, mediante estudios cromatográficos llevados a cabo por *Roberts y Frankel*.

Existen altas concentraciones del aminoácido en el SNC del mamífero, con una distribución amplia por casi todas las áreas cerebrales. Algunos trabajos han mostrado que el GABA tiene efectos sobre casi todos los elementos neuronales dentro del SNC vertebrado, aceptándose hoy como el neurotransmisor inhibitorio principal del cerebro. Los niveles de GABA en la periferia son, sin embargo, muy bajos, aunque afecte a una gran variedad de tejidos.

Se han utilizado múltiples técnicas para estudiar la distribución de neuronas GABAérgicas, así como sus proyecciones y, aunque se ha descrito un gran número de proyecciones GABAérgicas en el cerebro, el GABA parece modular la actividad neuronal principalmente a nivel local, mediante su liberación desde **interneuronas** (*Roberts, 1989*).

Metabolismo:

La glucosa, el piruvato y otros aminoácidos, a través del ciclo de Krebs, forman el sustrato metabólico para la formación de GABA. Procedente de este ciclo, el ácido alfa-cetoglutarato pasa a ácido glutámico mediante el enzima glutámico deshidrogenasa (GDH). Este es decarboxilado mediante el enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD), piridoxal fosfato-dependiente, produciendo el GABA. El proceso de producción del GABA parece localizarse solamente en terminaciones nerviosas GABAérgicas, ya que es donde se ha demostrado, inmunohistoquímicamente, una concentración predominante del GAD.

El GABA se **almacena** en las terminaciones nerviosas, donde puede estar libre o unido a vesículas sinápticas, pero también se puede hallar en las células gliales y, durante algún tiempo, en el espacio extracelular.

Puede ser **liberado** tanto desde la glía como desde las células neuronales. En las células gliales no hay evidencia de liberación vesicular, mientras que en las neuronas ésta ocurre desde depósitos localizados en las terminaciones presinápticas. Este proceso es dependiente del sodio y está el calcio y estimulado por potasio.

El GABA es posteriormente **recaptado** por la misma terminación

nerviosa, desde el espacio sináptico o espacios intersticiales, mediante sistemas de transporte específicos o inespecíficos. Esta recaptación también se lleva a cabo en la glía.

Tras ser captado por las células nerviosas o gliales, el GABA es **degradado** en las mitocondrias de ambas. En primer lugar, sufre una transaminación, mediante el GABA-alfa-cetoglutarato-transaminasa, pasando a semialdehído succínico. La transaminación ocurre con la aceptación simultánea del grupo amino, por parte del ácido alfa-cetoglutarato, transformándolo en ácido glutámico, precursor, a su vez, del GABA. El semialdehído succínico es posteriormente oxidado mediante semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH), pasando a ácido succínico, el cual se reincorpora al ciclo de Krebs (*Bradford, 1988*).

Receptores y Mecanismo de Acción:

Receptor GABA-A:

Los receptores GABA-A median los efectos sinápticos rápidos del neurotransmisor inhibitorio ácido gamma-aminobutírico en el SNC. Este receptor está compuesto de cinco subunidades relacionadas estructuralmente, formando un poro o canal conductor de cloro.

La activación del receptor A por un agonista produce un incremento en la conductancia del cloro a través del canal iónico que regula el receptor. Como resultado, se produce una hiperpolarización localizada de la membrana neuronal, dando lugar a un incremento en el umbral necesario para que los neurotransmisores excitadores despolaricen la membrana, generando un potencial de acción. Esta disminución en la excitabilidad de la membrana neuronal resulta en las acciones inhibitorias del GABA (Macdonald y Twyman, 1991). Esto se traduce en una **inhibición presináptica**.

Actualmente se piensa que el receptor GABA-A es una glicoproteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kDa. **Existen 5 subunidades polipeptídicas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \rho$), con múltiples isoformas cada una.** Hasta la presente, se han clonificado 6 α , 4 β , 3 γ y una subunidad δ . (Seeburg et al, 1990; Wisden y Seeburg, 1992). En el SNC, la diversidad funcional de los receptores depende principalmente de la combinación de las diferentes subunidades y de sus isoformas. Las variantes de la subunidad alfa determinan las diferencias farmacológicas principales con respecto a la sensibilidad del receptor a las benzodiazepinas, mientras que la zona de unión del GABA mismo se encontraría en la subunidad beta (Olsen y Tobin, 1990). Las subunidades gamma son precisas para la potenciación alostérica de los complejos alfa-beta mediante las benzodiazepinas (Wisden y Seeburg, 1992). El significado funcional de la subunidad delta no se conoce.

Aunque no se conoce la **composición** exacta de las subunidades, esta **varía entre las diferentes regiones cerebrales, incluso entre neuronas de una misma región.**

Son pocos los estudios que existen sobre la distribución de los receptores GABA sinápticos en la retina. Yazulla et al, 1989, utilizan, con este objetivo, un anticuerpo monoclonal específico contra el receptor-A en las retinas del pez dorado y el pollo adulto. Inmunorreactividad del receptor se objetivó en la capa plexiforme externa (CPE) de ambas especies, en 3 bandas de la capa plexiforme interna (CPI) del pez dorado y en 7 bandas de la misma capa del pollo. En la CPE del pez dorado, el marcaje es predominantemente en conos; un pequeño porcentaje de células amacrinas del pollo también eran inmunorreactivas. Los receptores GABA-A se han localizado en la retina de especies mamíferas utilizando anticuerpos específicos para las subunidades α -1 y β 2 y 3. Se ha encontrado positividad para el receptor GABA-A en células bipolares, amacrinas y ganglionares (*Mariani et al, 1987; Brecha y Weigmann, 1991; Vardi et al, 1992*). *Greferath et al, 1995*, estudiaron la distribución de 9 subunidades diferentes del receptor GABA-A en la retina de la rata. Cada subunidad se expresó en estratos característicos de la CPI, algunas con una distribución más ubícu, y otras más restringidas en su distribución. Mediante doble marcaje, Greferath reveló la colocalización de subunidades en neuronas individuales, como son las amacrinas colinérgicas o dopaminérgicas.

El **muscimol**, un análogo del GABA aislado de la *Amanita muscaria*, es uno de los agonistas más potentes y selectivos del receptor GABA. La **bicuculina** es el antagonista competitivo prototipo, compitiendo directamente con GABA para la unión al complejo del receptor. Reduce la frecuencia y el tiempo de apertura del canal del cloro. La **picrotoxina** y otros convulsivantes potentes son antagonistas no competitivos; no compiten directamente con GABA por su zona de reconocimiento, sino que se unen a una zona de reconocimiento diferente, asociada al complejo receptor.

Receptor GABA-B:

El receptor GABA-B es un receptor metabotrópico que actúa a través de un sistema de segundo mensajero, unido a las proteínas G, para alterar indirectamente la permeabilidad iónica de la membrana y la excitabilidad neuronal. Es insensible a muchos agonistas del receptor A y a la bicuculina.

Este receptor media una **inhibición postsináptica**, mediante una hiperpolarización producida por un aumento en la conductancia a potasio, **habitualmente sobre terminaciones postsinápticas no GABAérgicas.**

Media, con más frecuencia, una **inhibición presináptica**. Se localiza en las terminaciones presinápticas, y la estimulación reduce la conductancia

para el calcio (*Dutar y Nicoll, 1988*). Esto conlleva una **disminución en la liberación del neurotransmisor**, sea GABA u otro, según su localización.

Dos clases de análogos al GABA activan selectivamente al receptor B. La primera clase es la de los análogos beta-clorofenilo, siendo **baclofen** el agonista más potente; el **ácido fosfínico 3- amino-propilo** pertenece a los análogos ácido fosfínico (*Hill y Bowery, 1980; Hill et al, 1989*).

No ha sido identificado un antagonista potente aun. *Kerr et al, 1989*, modificaron la estructura de baclofen, sintetizando varios antagonistas: **phaclofen** (sustituyendo el grupo carboxilo con un fosfato), **saclofen** (sustituyendo el grupo carboxilo con un sulfato) y **2-hidroxi-saclofen** (añadiendo también un grupo hidróxilo). Son competitivos pero, sin embargo, débiles y con efectos inconsistentes entre los tejidos. *Bittinger et al, 1990*, modificaron el otro agonista selectivo, el ácido fosfínico 3-aminopropilo. Uno de los antagonistas resultantes es el **CGP35348**, más eficaz y con efectos más ubícuos, pero siendo de débil afinidad hacia el receptor B.

Varios agonistas y antagonistas del receptor GABA-B actúan solamente en algunos lugares donde el baclofen muestra eficacia, por lo que se piensa que existen al menos 2 subtipos de receptor B. *Dutar y Nicoll, 1988*, propusieron que los receptores B presinápticos y postsinápticos son

farmacológicamente diferentes. En 1993, *Bonanno y Raiteri* hicieron una clasificación más compleja basada en la diferente sensibilidad a los agonistas y los antagonistas, proponiendo así 4 receptores distintos.

Estudios sobre los receptores GABA-B en la retina se encuentran solo muy recientemente en la literatura. *Slaughter*, en 1995, hace una recopilación de los trabajos más relevantes sobre este receptor en la retina del vertebrado. Indican que el baclofen afecta a casi todas las clases de neuronas retinianas. Los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares poseen canales de calcio voltaje-dependientes que sufren una regulación " a la baja " tras la activación de los receptores GABA-B. Las células amacrinas y las ganglionares parecen tener canales de potasio que son activados por receptores GABA-B. De modo muy general, se sabe que los receptores GABA-B modulan el balance entre las señales sostenidas y transitorias de la retina, pero que la diversidad de receptores y su repercusión funcional es un trabajo aun en progreso.

Receptor GABA-C:

Existe un tercer receptor para el GABA, insensible al bloqueo por la bicuculina y el phaclofen, llamado receptor C. El **ácido cis-amino-crotónico** (CACA) es **agonista**.

4. RETINA:

4.A. ORGANIZACION GENERAL DE LA RETINA

La retina de los vertebrados se encuentra formada por seis tipos neuronales: fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células interplexiformes y células ganglionares. Las células de Müller son el elemento glial que soportan, nutren y aíslan a las neuronas aunque, también forma parte de la glia de la retina, los astrocitos y oligodendrocitos.

Estas células se disponen en tres capas nucleares:

- **Capa Nuclear Externa:** con los núcleos de los fotorreceptores.
- **Capa Nuclear Interna:** con los núcleos de las células horizontales, bipolares y amacrinas e interplexiformes.
- **Capa de Células Ganglionares.**

Entre estas capas nucleares existen dos zonas sinápticas, llamadas:

- **Capa Plexiforme Externa:** donde interactúan sinápticamente las prolongaciones de los fotorreceptores, las células horizontales y las ramificaciones externas de las células bipolares e interplexiformes.
- **Capa Plexiforme Interna:** donde sinaptan las ramificaciones internas de las células bipolares e interplexiformes, las células amacrinas y las

células ganglionares.

Finalmente, existe la capa de fibras del nervio óptico formada por los axones de las células ganglionares.

4.B. EMBRIOGENESIS DE LA RETINA

Inicialmente, la retina de los vertebrados se evagina desde el tubo neural para formar una vesícula óptica primitiva. Las paredes de esta vesícula se encuentran tapizadas por una capa de células epiteliales pseudoestratificadas, o células ventriculares, precursores de la retina neural. Son células multipotenciales, capaces de dar origen a los diferentes tipos celulares de la retina. En íntima relación con la evolución de la retina, se desarrolla el cristalino, así como las restantes partes y membranas del globo ocular (*Génis Galvez, 1970; Cook et al, 1991*).

Los procesos de estas células ventriculares se extienden a través de todo el grosor de la retina, contactando con las membranas limitantes de las superficies externa e interna retinianas.

Las células sintetizan ADN cuando están en contacto con la superficie vítrea o interna. La mitosis ocurre cuando las células ventriculares pierden esta unión interna, permitiendo una migración de sus cuerpos

celulares hacia la superficie externa. Las células hijas vuelven a sintetizar ADN cuando sus procesos reestablecen contacto nuevamente con la superficie vítrea, repitiendo, así, el ciclo de proliferación (*Fujita y Horii, 1963; Sidman y Rakic, 1973; Khan, 1974; Pra da y col., 1991*).

Es posible que la falta de reestablecimiento de contacto con la superficie interna, tras la citoquinesis, sea un primer paso hacia la diferenciación neuronal (*Redburn et al, 1987*).

Lo anteriormente referido podría ser la base de una hipótesis que, aunque simplista, explicaría la disposición de la **vía retiniana directa o vertical**. Esta vía comprende las proyecciones desde las células fotorreceptoras a bipolares y a ganglionares, transmitiendo el estímulo visual directamente a centros superiores.

Las células que van migrando a la superficie externa de la retina, durante la interfase, dejan el ciclo mitótico en distintos puntos y momentos de la migración. Las células ganglionares dejan de migrar primero, localizándose en el punto mas lejano, o interno, de la capa germinal. Las células bipolares forman la capa inmediatamente adyacente y los fotorreceptores dejan el ciclo mitótico en la superficie mas externa. (*Carter-Dawson y LaVail, 1979; Rapaport y Stone, 1983*).

No obstante, esta teoría no explica la formación de las sinapsis entre estos tipos celulares, las cuales maduran en otra secuencia. Aparecen primero las dendritas de las células ganglionares y terminales de los fotorreceptores, uniéndose subsecuentemente por la inserción posterior de axones y dendritas bipolares (*Maslim y Stone, 1986; McArdle y col., 1977*).

Esta teoría tampoco considera el momento de aparición de los diferentes subtipos de estas células y como se organizan para formar circuitos visuales correctos. No obstante, diversos estudios autorradiográficos han aclarado la secuencia cronológica de aparición de los distintos tipos de células de la retina (*Prada y col., 1991*).

Otro tema diferente es el de las **vías retinianas laterales u horizontales**. Son las células horizontales y las amacrinas las que, dispuestas en las dos capas plexiformes y con una organización funcional de sus procesos perpendicular a los procesos de las demás células, las que participan en la integración horizontal de la información procedente de la vía vertical. (*Redburn et al, 1987*) La disposición funcional de estas neuronas no puede ser explicada por el orden en que las neuronas dejan el ciclo mitótico o, por la formación de conexiones sinápticas basado en la velocidad de crecimiento de las neuritas. Las redes laterales deben seleccionar puntos de sinapsis mediante un proceso que distinga entre elementos en el entorno inmediato. Parece improbable que la competición espacial o temporal sean

factores suficientes para el desarrollo de una disposición apropiada de estas células.

Diferentes clases de **células horizontales** buscan conexiones sinápticas dentro de subpoblaciones específicas de conos, bastones o ambos. Provocan un ambiente de feedback inhibitorio para cada unidad de la vía vertical. Estas células presentan una unión " **eléctrica** " mediante gap junctions, pudiendo ser esto un motivo de desarrollo coordinado de todas las células horizontales en una población homogénea. Posteriormente, se diferencian en distintos tipos celulares (*Redburn et al, 1987; Stell, 1967*). En el embrión de pollo, en particular, se desarrollan los siguientes subtipos: **tipo I** o célula horizontal " **en brocha** ", con axon; **tipo II** o célula horizontal " **estrellada** " y el **tipo III** o célula horizontal " **en candelabro** ". Los ramilletes dendríticos de estos subtipos se disponen también en diferentes estratos funcionales dentro de la capa plexiforme externa (*Génis y col, 1979*).

Las **células amacrinas**, por el contrario, no se encuentran dispuestas estrictamente en capas funcionales. Diferentes clases de amacrinas pueden hallarse en contacto lateral (*Kolb y Nelson, 1985*). Sus terminales, sin embargo, forman bandas horizontales a través de la capa plexiforme interna. La mayoría de las células amacrinas dejan el ciclo mitótico después de las

células ganglionares, pero antes de las células bipolares (Prada y col, 1991). Sin embargo, este gradiente temporoespacial de maduración no es suficiente para explicar la complejidad de las subclases de amacrinas, la complejidad de sus contactos sinápticos y la precisión en la disposición de sus procesos. La sinaptogénesis y el crecimiento neurítico han de seguir la influencia de unos factores de desarrollo muy diferentes.

Por último, las **células interplexiformes** representan otra clase de interneuronas con dendritas en la capa plexiforme interna y axones en la capa plexiforme externa. Se piensa que ejercen una función de feedback sobre las células horizontales, participando, así, en respuestas de adaptación a la luz (*Dowling y Ehinger, 1978*).

5.EL GABA COMO MORFOGENO EN LA RETINA DEL POLLO EN DESARROLLO.

Al-Bahech (1991) realizan un interesante estudio inmunohistoquímico de las células GABAérgicas de la retina del pollo durante el desarrollo. Según este autor, el GABA comienza a expresarse en la incipiente capa plexiforme externa de la retina entre E7 y E8. En E9, las células horizontales se encuentran, en su mayoría, localizadas en su posición definitiva, formando una hilera en el borde externo de la capa nuclear interna. En este estadio, la inmunorreactividad para el GABA es evidente en todos los

pericarios de las células horizontales. Al mismo tiempo, comienza a expresarse GABA en algunas células localizadas en el tercio interno de la capa nuclear interna y en la capa plexiforme interna. Estas últimas poblaciones celulares son células amacrinas, probablemente colinérgicas, según sus características morfológicas y ubicación (*Spira, 1987*).

Entre E9 y E12, la mayor intensidad de expresión GABA se observa en todas las células horizontales y amacrinas desplazadas. Entre E12 y E17 se configura el patrón definitivo de inmunorreactividad para el GABA, que expresará la retina adulta del pollo. **El hecho más significativo de estos estadios del desarrollo es la pérdida de inmunorreactividad GABA que manifiestan algunas células horizontales.**

Los resultados sugieren que al menos el tipo I de células horizontales, las cuales poseen axón, son reactivas a GABA. El autor de esta tesis (*Al-Bahech, 1991*), señala que el hecho de que el GABA se exprese en la retina cuando aún no se han formado las sinápsis, no pudiendo, por consiguiente, realizar su papel clásico como neurotransmisor, indica que, al menos en este período, su función está más en relación con el papel morfógeno que se le viene atribuyendo a algunos neurotransmisores.

PLANTEAMIENTO
Y
JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre el desarrollo de la retina como un modelo cortical (localizado a nivel periférico) ha constituido el objetivo básico de los trabajos de investigación que se han desarrollado en los últimos 20 años en nuestro laboratorio.

Los procesos de producción celular, migración neuronal y diferenciación han sido la base de la mayoría de los estudios que se han llevado a cabo. Desde hace 7 años se ha venido trabajando sobre los patrones de diferenciación morfológica que expresan las células GABAérgicas de la retina. Los primeros hallazgos de interés fueron recogidos y comunicados a través de la tesis Doctoral del Dr. Alí Albahech. Aquel trabajo abrió numerosas incógnitas sobre la diferenciación de las células GABAérgicas y, sobre todo, planteó la necesidad de estudiar el papel del GABA como morfógeno durante el desarrollo de la retina.

Basado en el criterio de la continuidad científica sobre los temas y para tratar siempre de resolver las cuestiones pendientes, surgen los objetivos de esta tesis:

1. Conocer la expresión GABA de las poblaciones y subpoblaciones

GABAérgicas y acetilcolinérgicas durante la migración y diferenciación celular.

2. Analizar la correlación de estos patrones con la expresión de acetilcolintransferasa.

3. Comprobar la variabilidad temporoespacial de las mismas.

4. Analizar la correlación que existe en la expresión GABA durante el desarrollo y la expresión de este neurotransmisor cuando el animal tiene un mes de vida. Comprobar si existe expresión de GABA transitorio.

5. Comprobar si el patrón GABAérgico de la retina adulta es idéntico en las distintas zonas de la retina (dorsal, ventral, temporal, nasal, central, periférica, papila, etc.).

6. Para analizar el papel morfógeno del GABA, hemos suministrado, durante el desarrollo, sustancias agonistas y antagonistas de los receptores de este neurotransmisor y hemos estudiado el efecto que tienen estas sustancias sobre las poblaciones celulares GABAérgicas y acetilcolinérgicas en un intento de conocer el efecto neurotrófico del mismo.

MATERIAL

Y

MÉTODOS

Huevos de pollo fertilizados (White Leghorn) fueron incubados a 37.5°C en una incubadora con humedad controlada. Se utilizaron embriones en estadíos entre E-2 y E-20 y retinas de pollo adulto.

Los anticuerpos utilizados contra GABA fueron un anticuerpo policlonal (Sigma A2052) y un anticuerpo monoclonal (Sigma A0310). Los anticuerpos utilizados contra ChAT fueron uno monoclonal (Chemicon MAB-305) y uno policlonal de Johnson y Epstein (1986). Los anticuerpos secundarios fueron anti-IgG conjugado con isotiocianato fluoresceína, rodamina o peroxidasa de Sigma .

Preparaciones de Golgi

Las preparaciones de Golgi utilizadas en este estudio proceden de nuestra colección de embriones teñidos con dos métodos: el método Colonnier (1964) y una variación de esta, de Stensaas (1967). Se estudiaron un total de 55 retinas en estadíos entre E-7 y E-20 teñidos con éxito. Se utilizó el microscopio de transmisión de luz para la observación de formas

celulares, y el microscopio de contraste interferencial de Nomarsky para la localización de células no teñidas en la CPI, así como para hallar la posición exacta de las células teñidas en la CPI.

Inmunohistoquímica de GABA y ChAT

Se utilizaron embriones de pollo de edades diferentes de E-2 a adulto. Las cabezas fueron seccionadas y sumergidas en paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato al 0.1M y con un pH de 7.6. Las córneas de ambos ojos fueron extirpadas inmediatamente y los tejidos se fijaron durante 1-2 días a temperatura ambiente (22°C). Después de la fijación, los tejidos fueron crioprotectados, embebidos en medio *tissue-tek* (Laboratorios Miles) y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido. Se realizaron secciones de criostato, de grosor 10-20µm, en dos planos, para cada estadio: el plano transversal, útil para el estudio de los gradientes central a periférico y dorsal a ventral, y el plano perpendicular a éste, tal como se indica en la Fig. 11B, para el estudio de los gradientes central a periférica y temporal a nasal. Secciones pasando por diferentes áreas retinales se montaron sobre portas recubiertas de gelatin y se almacenaron a -60°C hasta el momento de la inmunorreacción.

Marcaje sencillo se realizó utilizando tanto anticuerpos policlonales como

monoclonales contra GABA o ChAT (no hubo diferencias en los patrones de tinción con anticuerpos policlonales o monoclonales). Las secciones fueron incubadas en suero de pollo al 10% en PBS con Triton X-100 al 0.25% durante 30 minutos. Fueron entonces incubadas con el primer anticuerpo diluído en PBS con Triton X-100 al 0.1% y suero de pollo al 1% (las diluciones se llevaron a cabo según las especificaciones de los suministradores) y lavadas 3 veces durante 15 min. en PBS con Triton X-100 al 0.1% y suero de pollo al 1%. Las secciones fueron entonces incubadas con el segundo anticuerpo, marcado con fluoresceína o inmunoperoxidasa (ambos diluídos a 1:50). Los tiempos de incubación variaban según el tipo de anticuerpo, de 1 a 48 hs. Las secciones se lavaron entonces 3 veces durante 10 min. en PBS con Triton X-100 al 0.1% y enjuagado finalmente en PBS antes de la colocación del cubreporta. Para la tinción con inmunoperoxidasa, tras la incubación con el segundo anticuerpo se lavaron las secciones en PBS y se desarrolló la peroxidasa utilizando el procedimiento standard de 3,3'-diaminobenzidina. Las secciones fueron entonces lavadas en PBS, deshidratadas, aclaradas en xileno y montadas con el medio DPX.

Se realizó marcaje doble utilizando como anticuerpos primarios o un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal, o ambos anticuerpos monoclonales. No hubo diferencia entre los patrones de tinción, aunque se obtuvo mayor intensidad de tinción usando el anticuerpo monoclonal anti-GABA con el anticuerpo policlonal anti-ChAT de Johnson y Epstein (1986).

Las secciones fueron incubadas primero con un anticuerpo primario contra GABA, luego lavadas, según lo referido anteriormente, para inmunotinción simple, e incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con isotiocianato fluoresceína o rodamina. Se lavaron nuevamente y se incubaron con un anticuerpo primario contra ChAT, seguido de lavado e incubación con el segundo anticuerpo. Algunas secciones se incubaron primero con anti-ChAT y luego con anti-GABA. Los pasos siguientes fueron iguales que para la inmunotinción simple.

Se procesaron secciones de control tanto para los experimentos de marcaje simple como doble. La solución utilizada para bloquear la tinción no específica sustituyó tanto los anticuerpos primarios como los secundarios.

Procedimiento Experimental

Cinco tandas de 20 huevos, fueron procesadas experimentalmente con sustancias agonistas (Muscimol, Acido amino-oxiacético) del GABA y el propio GABA, así como con antagonistas de sus receptores como la Bicuculina y el Phaclofen. Se procedió de la siguiente forma: Los embriones fueron para cada sustancia utilizada, inyectados en E-5, E-6 y en E-8, E-9 con dosis de 60 a 100 μ l. 10 nM en saco vitelino o 10 a 20 μ l. 10 nM en globo ocular. El motivo de elegir estos estadios del desarrollo, es porque en esta edad las interneuronas de la retina, han nacido pero no han migrado (caso de E-5, E-6) y no se han diferenciado (Caso de E-8, E-9). Una vez

inyectados los embriones fueron puestos de nuevo a incubar y se sacrificaron en diferentes estadios del desarrollo desde E-9 a E-20.

Con cada tanda de embriones experimentales se procesaron paralelamente 10 embriones control a los que se les inyectó la misma cantidad de suero fisiológico.

A partir del sacrificio, se procedió metodológicamente con los mismos criterios y pautas empleados para el estudio inmunohistoquímico del desarrollo normal del GABA.

RESULTADOS

PATRÓN DE EXPRESIÓN GABAÉRGICO EN LA RETINA DEL POLLO RECIÉN NACIDO.

La retina del pollo contiene células inmunorreactivas para el GABA en la capa nuclear interna (Fig. 1a-INL) y en la capa de células ganglionares (Fig. 1a-GCL). Numerosos trabajos, los cuales han sido comentados en la introducción, han demostrado que en la retina del pollo las células GABA inmunorreactivas corresponden fundamentalmente a las interneuronas (células horizontales y células amacrinas). Algunos estudios (Mosinger y col., 1986) sugieren que algunas células ganglionares, también expresan GABA.

La Figura 1a que corresponde a una retina de pollo recién nacido muestra somas GABAérgicos en la zona mas externa de la capa nuclear interna. Estos somas son de células horizontales (Fig. 1a-Hc). También en la misma capa se observan distribuidos por su mitad interna numerosas células GABAérgicas. La ubicación de estos somas sugiere que mayoritariamente se trata de células amacrinas (Fig. 1a-Ac). A nivel de la capa de células ganglionares algunos somas expresan GABA (Fig 1a); la posición de éstos y el hecho de que ninguna de estas células muestre su axon marcado nos hace pensar que corresponden a células amacrinas desplazadas las cuales fueron descritas por primera vez por Cajal (1892).

CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES Y CITOLÓGICAS RELACIONADAS CON LAS CELULAS GABAÉRGICAS.

La retina del pollo recién nacido muestra tres niveles o estratos sinápticos a nivel de la capa plexiforme externa (Fig. 1c OPL). Estos tres niveles aparecen marcados por la existencia de sinapsis en barra localizados en los pedículos de los fotorreceptores (Fig. 1c, opl, flechas horizontales). La zona marcada con un asterisco en la figura 1c, se recoge ampliada en la figura 2b donde se aprecian con detalle los niveles antes mencionados. La capa nuclear interna (INL) muestra cuatro poblaciones de células claramente diferentes a la vista de su ultraestructura. En la parte más externa de esta capa se observa una hilera de pericarios (Fig. 1c-Hc; Fig. 3-Hc) cuyo tamaño es mayor que el de las células subyacentes. Estos constituyen la población de neuronas horizontales de la retina; las cuales muestran además, menor electron-densidad que las células bipolares (Fig. 1c). La retina del pollo posee tres tipos de células horizontales que se pueden caracterizar morfológicamente tiñéndolas con el método de Golgi. Así las figuras 1d, 1e, 1f, 2a, 2c y 4 recogen los tres tipos de las neuronas citadas.

El primero de ellos fué descrito por Cajal (1892) se llama por su forma, célula horizontal en brocha y tiene axon (Fig. 1d, 4c, 4b, 4d). Las dendritas de estas células se ramifican por los distintos estratos de la capa plexiforme externa, aunque principalmente alcanzan elmas externo. Su axxon se arboriza en el estrato intermedio de la citada capa sináptica (Fig. 4d, flecha curva). Este es el único tipo de neurona horizontal que tiene axon en la retina del pollo. El segundo tipo de célula horizontal también fué observada por primera vez por Ramón y Cajal (1892). Este autor la denominó célula estrellada, fue redescubierta por Mariani y Leure du-Pree en 1978. La citada interneurona, muestra un pericario mas redondo que el anterior tipo, y su ramillete dentrítico es mas amplio. Se arboriza en el estrato sináptico mas interno de la capa plexiforme externa (Fig. 1c,2c,4c, y 4c).

El tercer tipo de neurona horizontal tiene el cuerpo ligeramente mas pequeño que el de los tipos anteriores, muestra sólo 12 a 16 prolongaciones dentríticas las cuales después de un recorrido arqueado a modo de los brazos de un candelabro, finalizan en el estrato sináptico más externo de la capa plexiforme externa (Fig. 1f,2a,4f,y 4g).

Los somas de las células gliales de Müller se localizan mas o menos alineados en la mitad de la capa nuclear interna (Fig. 1c-Mc y 1b, cabeza de flecha). Los cuerpos de éstas células separan topográficamente las neuronas bipolares de las amacrinas. Las neuronas bipolares ocupan la

mitad externa de la capa nuclear interna, tienen el pericario de menor tamaño que las células horizontales y amacrinas y presentan mayor electrondensidad que el resto de las neuronas de la retina (Fig. 1c-Bc). En las figuras 1f y 4f, se observan al lado de una célula horizontal tipo 3 (Hc) una célula bipolar (Bc) con su morfología típica, la cual posee además maza de Landoit (flecha). También en la figura 1e se aprecia la mitad externa de otra neurona bipolar que muestra la particularidad de poseer una prolongación accesoria (flecha), la cual finaliza en el estrato sináptico interno de la capa plexiforme externa. Tanto en la figura 1e como en la 1f y 2a el ramillete dendrítico de estas neuronas bipolares alcanza el estrato sináptico mas externo de la capa plexiforme externa.

Por dentro de la línea que imaginariamente delimitan los somas de las células de Müller (figura 1b , 1c flecha horizontal), se localizan los pericarios de las neuronas amacrinas. Estas células en general muestran menor electrondensidad que el resto de las neuronas de la retina. Su forma es variada y se caracteriza por poseer el soma ubicado en la capa nuclear interna del cual parte una única prolongación que termina ramificándose en uno o varios estratos de la capa plexiforme interna. En la figura 1g la metodología de Golgi nos ofrece uno de los tipos de células amacrinas biestratificadas. El tamaño de los pericarios de las células amacrinas es variable, los hay pequeños y muy grandes. Sus ramilletes dendríticos también pueden ser de campo pequeño o coger una superficie amplia de la

capa plexiforme interna. Ninguna célula amacrina presenta axon.

Entre los distintos tipos de células amacrinas que tiene la retina de pollo, existe uno que por su expresión GABA durante el desarrollo, resulta particularmente importante en nuestro estudio. Se trata de las neuronas amacrinas colinérgicas tipo I y tipo II. Las células amacrinas colinérgicas tipo I en general tienen el pericario ubicado en la hilera de células mas profunda o interna de la capa nuclear interna (fig. 6 e flechas curvas). El polo vítreo del cuerpo de la célula, se ramifica en un conjunto de prolongaciones dendríticas con disposición radial y simétricas, que alcanzan el primer estrato de la capa plexiforme interna (Fig.6 e,f,g cabezas de flecha). Cuando la localización del pericario de algunas de éstas células, está por fuera de la primera hilera de células anteriormente señalada, existe una prolongación citoplásmica entre el ramillete dendrítico y el cuerpo de la célula (Fig. 6h flecha).

Las células colinérgicas tipo II, son morfológicamente un calco de las tipo I sólo que invertidas y con el pericario localizado en la capa de células ganglionares. Las figuras 6e-i y 6m-i muestran tres células de este tipo durante el desarrollo, migrando y atravesando la capa plexiforme interna de la retina para situarse posteriormente en la zona mas externa de la capa de células ganglionares (Fig. 6p). La Fig. 6q muestra una de éstas células observadas después de montar en plano la retina. El hecho de que la

población de células colinérgicas tipo II se halla desplazada, respecto al resto de las células amacrinas, en la capa de células ganglionares ha servido para que ésta subpoblación neuronal se le conozca como "células amacrinas desplazadas".

PATRONES DE EXPRESION DEL GABA DURANTE EL DESARROLLO:

A partir de E-6½, las zonas mas internas de la retina del pollo, muestran numerosísimas células que contienen GABA (Fig.5a). El resto del neuroepitelio de la retina, presenta una imagen en la que se alternan grandes zonas carentes de inmunorreactividad para el GABA junto con numerosas células que comienzan a expresarlo y algunas que manifiestan intenso marcaje (Fig. 5a cabezas de flecha).

El patrón de expresión de GABA señalado en E 6½, se hace cada vez mas evidente durante E 7 y E 7½ (Fig. 5b,c). En la retina central de E 7 comienzan a aparecer marcadas algunas células con formas más o menos redondas en la incipiente capa plexiforme externa (Fig. 5b y c flechas).

Durante E 8 la retina central ventral del embrión de pollo muestra dos importantes zonas de inmunorreactividad para el GABA. Una de ellas, la que ofrece el marcaje mas intenso, corresponde a la zona mas profunda de la capa nuclear interna donde se están acumulando las células amacrinas

después de finalizar su proceso migratorio (Fig. 5 d flechas largas horizontales). La otra zona presenta menor inmunorreactividad y se localiza en la parte mas externa de la capa nuclear interna (Fig. 5d flechas cortas horizontales). En este estadio y en este nivel, muchas células horizontales están migrando y colocándose en su capa. Otras, las que migraron primero, desarrollan su árbol dendrítico y conjuntamente con la diferenciación dendrítica de las células bipolares, determinan la aparición de la capa plexiforme externa a la que posteriormente se suman las células fotorreceptoras con sus pedículos entre las zonas de ubicación definitiva de las células amacrinas y horizontales la capa nuclear interna muestra durante E 8 a E 11 numerosas células que expresan inmunorreactividad para el GABA (Fig. 5 y 7 flechas gruesas).

La morfología que presentan estas células es similar a la que muestran los neuroblastos de las células amacrinas, durante su migración, después de ser teñidas con el método de Golgi. Compárese las células señaladas con flechas gruesas en las figuras 5 g,5i,5j,5k y 7e (que corresponden a detalles de las zonas enmarcadas en las figuras 5d,5e,5f y 7c), con las células señaladas con flechas gruesas en las series a₁-a₉ y r₁-r₉ de la Fig. 6.

En la retina central dorsal, próxima a la cabeza del nervio óptico, de un embrión en E-8, muestra una capa de células horizontales está claramente definida y todas sus células contienen GABA (Fig. 5e). En la

parte interna de la retina las células amacrinas colinérgicas tipo II están migrando a través de la todavía estrecha capa plexiforme interna (Fig. 5e, flechas pequeñas). Este hecho se hace muy evidente en estadios posteriores E 8½ (Fig. 5f flechas pequeñas) y E 9 (Fig. 7a y 7b, flechas pequeñas). En E 10½-11 las células amacrinas desplazadas o colinérgicas tipo II, están alineadas en la capa plexiforme interna, pero con sus pericanos muy próximos a las células ganglionares (Fig. 8 a, b y d, CGL). Durante los estadios iniciales del desarrollo, siempre hemos observado, una correlación muy estrecha entre la expresión morfológica de la migración y diferenciación inicial de las células horizontales y amacrinas y los patrones de inmunorreactividad para el GABA que expresa la retina. Este grado de correlación se puede apreciar en la Fig. 7d que corresponde a la retina periférica de un pollo en E 9, el cual no muestra inmunotinción para células horizontales y la capa plexiforme interna no se ha formado; o en la figura 7f que corresponde a una retina ventral en E 10 en la que las células horizontales se muestran poco organizadas y en general retrasadas con respecto a la retina central dorsal.

A partir de E 11½ las células localizadas en los dos tercios más externos de la capa nuclear interna dejan de expresar GABA (Fig. 8c, 8e). Este hecho coincide con el final de la migración de las células amacrinas.

De este modo, el patrón GABAérgico de la retina en E 12 muestra

una capa compacta de neuronas horizontales en la que toda la hilera de células contiene GABA (fig. 8c, 8f, flechas); y una zona interna de la retina en la que principalmente existen dos hileras de células que expresan GABA y que corresponden a las células colinérgicas tipo I y II (fig. 8c, 8e; a-I y a-II).

Entre E 13 y E 15, algunas células horizontales dejan de expresar inmunorreactividad para el GABA y como consecuencia de ello la hilera de células horizontales muestra espacios carentes de tinción (Fig. 8h, flechas largas pequeñas). Este hecho se manifiesta cada vez mas marcado en estudios posteriores y despues del nacimiento del pollo (Fig. 9a flechas largas).

Al contrario que las células horizontales, las células amacrinas localizadas en la capa nuclear interna muestran a partir de E 13 mayor inmunoreactividad para el GABA de esta forma el incremento de pericarios marcados en esta capa es evidente (Fig. 8g, h, i). La capa plexiforme interna ya no posee células amacrinas colinérgicas tipo II. Todas ellas se localizan marcadas a nivel de la capa de células ganglionares. La retina central del pollo recién nacido, confirma el patrón de inmunotinción que se observa a partir de E 14. El número de células amacrinas GABAérgicas de la capa nuclear interna (INL) es mayor, muchas de ellas poseen un pericario de gran tamaño (Fig. 9 a flecha gruesa). Al contrario que en E 14 el número de células que expresan GABA en la capa de células ganglionares es menor,

sólo se ven marcados algunos pericarios pequeños (Fig. 9 a cabezas de flecha pequeñas) que posiblemente pertenecen a células amacrinas desplazadas. Además algunos pericarios de gran tamaño también expresan inmunorreactividad para el GABA (Fig. 9a cabezas de flecha grandes).

PATRON DE EXPRESION GABAERGICO DE LA RETINA DEL POLLO ADULTO.

El patrón de células que contienen GABA en la retina del pollo adulto, tiene diferencias importantes con el del pollo recién nacido. Estas diferencias se acentúan más o menos dependiendo de la zona de la retina que se estudie. En general el número de células horizontales que contienen GABA es menor en el pollo adulto (comparese la Fig. 9a con la 9d y e). Esta disminución se hace más pronunciada si observamos la retina ventral (Fig. 9b,c y d). En el pollo adulto el número de las células horizontales que contienen GABA en la retina ventral es muy escaso (obsérvese la Fig. 9d que corresponde a la zona marcada con asterisco de la Fig. 9b).

En ésta misma fig. 9b se puede observar en la imagen principal que corresponde a una sección vertical de la retina central ventral, ausencia de células horizontales, mientras que en el ángulo superior izquierdo que corresponde a un trozo de retina central dorsal, se aprecia la hilera de neuronas horizontales (Hc).

La capa nuclear interna de la retina central dorsal del pollo adulto, muestra un patrón GABAérgico muy parecido al del pollo recién nacido (compare la Fig 9a y 9e). Sin embargo la retina periférica muestra una evidente disminución de células GABA positivo (Fig. 9f, h, i).

Es importante que resaltemos que en el pollo adulto, existen muchas células amacrinas gigantes que son GABAérgicas (fig.9c y f, flecha). También, y sobre todo, en la retina periférica las células ganglionares desplazadas muestran que su pericario contiene GABA (Fig. 9h, i, flecha).

La capa de células ganglionares de la retina del pollo adulto, también muestra importantes variaciones respecto al pollo recién nacido. El número de células que contiene GABA en esta capa es muy pequeño en la retina central ventral, (Fig. 9b y c), casi inexistente a la retina central dorsal (fig. 9e) y existe ausencia de células GABAérgicas en la retina periférica (fig. 9f, h, i). La figura 9f sirve de control a efecto de demostrar que la capa de células ganglionares sí tiene células aunque éstas no expresen GABA.

COLOCALIZACIÓN DE GABA Y COLIN-ACETILTRANSFERASA DURANTE EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS COLINÉRGICAS TIPO I Y II

La inmunotinción con anticuerpos aplicados sucesivamente contra colin- acetiltransferasa (ChAT) y GABA, sobre secciones de retina de E-75 a E-11 revela que todas las células localizadas en la capa plexiforme interna son doblemente inmunorreactivas (Fig. 10) coincidiendo la distribución del marcaje con el patrón morfogenético observado en las preparaciones de Golgi (Fig. 6).

Las preparaciones de E-7½-8 observadas por contraste de Nomarski demuestran que la población completa de células intraplexiformes del área dorsocentral de la retina temporal está intensamente marcada para ambos GABA (Fig. 10A, 1y 2) Y ChAT (Fig. 10B, 1y 2).

Las células doblemente marcadas en éstos estadíos están distribuidas irregularmente a través de la capa plexiforme interna (fig. 10 A2 y B2) mostrando un patrón comparable al que se observa por microscopía de contraste de Nomarsky en las preparaciones de Golgi. Por lo tanto, toda la población de células de la capa plexiforme interna observada en estos estadíos contienen ChAT y GABA. En estos mismos estadíos, las células localizadas en los sectores periféricos de la retina temporal no son

inmunorreactivas o lo son débilmente. Este gradiente de tinción de central a la periferia es imitado por los gradientes de tinción de la retina dorsal a la ventral y de la temporal a la nasal.

El anticuerpo anti colin-acetiltransferasa no marca células de la retina en estadíos iniciales y las células de la capa plexiforme interna en E 7½-8 son los únicos tipos de células inmunorreactivas para ChAT vistos. Estos datos estan en concordancia con los resultados previamente obtenidos por Spira y col. (1987). Sin embargo, el anticuerpo anti- GABA, como hemos mostrado en este trabajo, marca células esparcidas en varias posiciones entre la superficie ventricular y la incipiente capa plexiforme interna, la cual comienza a desarrollarse a partir de E-7½. Este hecho está en concordancia con resultados previamente obtenidos por Hokoc y col. (1990).

En E-9, las células doblemente marcadas en el área dorsocentral de la retina temporal forman 2 hileras de células espaciadas regularmente con aproximadamente el mismo número relativo de células en cada hilera (fig. 10, A3 y B3). Una hilera de células está localizada en la posición mas interna de la capa nuclear interna y la otra dentro de la capa plexiforme interna. En este estadío las células de la capa plexiforme interna muestran también un patrón de marcaje que va de central a la periferia, de dorsal a ventral y de temporal a nasal y además su posición relativa dentro de la capa plexiforme interna varía de acuerdo a estos gradientes. Esto es, en el área dorsocentral de la retina temporal las células intraplexiformes estan

internamente marcadas y alineadas en una hilera (Fig. 4, A3 y B3). Cuando uno pasa de éste área hacia la retina periférica dorsal, ventral y nasal, las dos hileras de células inmunorreactivas progresivamente comienzan a aparecer irregularmente distribuidas por la capa plexiforme interna en un patrón similar a el mostrado en E 7½-8. Al mismo tiempo la intensidad del marcaje desciende, llegando a ser inexistente en la retina periférica. En la retina temporal dorsocentral la hilera de células marcada en la capa plexiforme interna, está separada de la capa de células ganglionares por una prominente banda de inmunorreactividad negativa (Fig. 10 A₃ y B₃ flechas). Esta banda no marcada se estrecha también progresivamente de la retina central a la periferia, de la dorsal a la ventral y de la temporal a la nasal, desapareciendo completamente en la retina periférica. Esta banda se observa entre E-8½ y E-10 y corresponde a los árboles dentríticos de las células ganglionares, las cuales se desarrollan siguiendo los mismos tres gradientes anteriormente comentados.

Entre E-10 y E-15 la hilera de células marcadas en la capa plexiforme interna (DAcs) se desplaza progresivamente hacia la capa de células ganglionares (Fig. 11 C y D), alcanzando su posición definitiva en la capa de células ganglionares, primero en la retina dorsotemporal en E-11 y mas tarde en la retina ventronasal en E-15. La Figura 11 muestra que el gradiente de inmunorreactividad temporonasal y la posición de las células intraplexiformes se observa todavía en E-14 (Fig. 11D).

En E-11 el área ecuatorial y la mayor parte del área periférica de la retina temporal muestra ambas poblaciones separadas de células amacrinas, con la hilera de células de la capa plexiforme interna próximas a la capa de células ganglionares (Fig. 11 C₂). Sólo una pequeña porción de la retina temporal mas periférica (Fig. 11A, porción f) muestra que la inmunorreactividad GABA en la capa plexiforme interna corresponde a una población de células irregularmente distribuida (Fig. 11 C₁).

En cambio, la retina nasal tiene una gran porción de retina periférica (Fig. 11A, porción a) donde la población de células intraplexiformes todavía no muestran inmunorreactividad para el GABA (Fig. 11 C₅). Estos resultados muestran por primera vez el gradiente temporonasal de diferenciación de la retina del pollo y evidencian que la diferenciación de las células es mas rápida en la retina temporal que en la retina nasal.

En E-14, en la zona ecuatorial periférica de la retina temporal (Fig. 11 D₂), la hilera de células intraplexiformes (células amacrinas desplazadas), la cual es observada en E-11 cerca de la capa de células ganglionares, está ahora prácticamente incluida en esta capa (compárese la Fig. 11 D₂ con C₂). En cambio la retina nasal-ecuatorial (Fig. 11 D₄) tiene todavía esta hilera de células amacrinas desplazadas (DAcs) dentro de la capa plexiforme interna; siendo comparable esta imagen con la que muestra la retina temporal ecuatorial en E-11 (Fig. 11 C₂). En la porción más periférica de ambas retina

temporal y nasal hay una hilera de células muy inmunopositivas en la mitad de la capa plexiforme interna (Fig. 11 D, 1 y 5, flecha). Todos estos resultados refuerzan la existencia de un gradiente temporal- nasal y muestran que la morfogénesis de ambas poblaciones de células, células colinérgicas amacrinas convencionales y desplazadas, ocurre aproximadamente en todas las retinas en éstos estadios.

ALTERACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE LOS PATRONES GABAERGICOS POR EL EFECTO DE SUSTANCIAS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DEL GABA.

Los estudios realizados hasta ahora en cultivos de neuronas han sugerido, y ya es admitido, que el GABA actúa como agente neurotrófico promoviendo el crecimiento neurítico y la diferenciación (Meier y cols. 1991; Messermith y Redbuern, 1993).

Por ello, teniendo como base los resultados que hemos obtenido sobre el desarrollo del GABA en la retina del pollo, hemos suministrado entre el 5º y 8º día de incubación diversas sustancias antagonistas de receptores del GABA como la Bicuculina y el Bhaclofen o agonistas como el Muscimol. También en relación con este último grupo hemos empleado GABA y el ácido Amino-oxiacético que por su efecto sobre la enzima GABA-T incrementa la concentración de este neurotransmisor.

1.- Efecto del GABA, Muscimol y Ac. Amino-oxiacético.

La presencia e incremento de la concentración de GABA o sus agonistas en la retina cuando sus células se están diferenciando, no produce ninguna alteración. Aparentemente el patrón de inmunorreactividad para el GABA, se registra en las mismas células en las que normalmente se expresa (Fig. 12) esto es células horizontales y células amacrinas. No obstante si nos fijamos de una manera objetiva en la Fig. 12a y b, podemos apreciar que la retina del pollo recién nacido sometida al efecto del GABA (Fig. 12a) o del ácido amino oxiacético(Fig. 12b) muestra que los pedículos de los fotorreceptores contienen GABA. La Fig. 12 b es la más evidente a este respecto y así las flechas señalan la delimitación externa de algunos de estos pedículos, los cuales tienen un grosor similar a los pericarios de las células horizontales.

Otra modificación al patrón normal de expresión de inmunorreactividad para el GABA, la constituye el hecho de que pocas células horizontales dejan de contener GABA. Tanto en el desarrollo (Fig. 12c,d) como en el animal adulto (fig. 12 a ,b) apenas existen espacios sin tinción en la hilera de células horizontales.

2.- Efectos del Phaclofen.

El Phaclofen es un antagonista selectivo de los receptores GABA-B. La presencia del mismo durante el desarrollo de la retina a partir de E-5 y/o E-8 produce una falta de expresión de GABA en las células horizontales (Fig. 13). Esta falta de inmunorreactividad se mantiene durante todo el desarrollo (Fig. 13 a,b y e) e incluso en el pollo recién nacido (Fig. 13 d) y adulto (Fig. 13 f).

Si comparamos las retinas embrionarias control (Fig. 13b) con las tratadas (Fig. 13 a, c y e) se puede observar que las únicas células que contienen GABA son las que en el pollo adulto y en condiciones normales contienen Acetil Colina, esto es, las células amacrinas colinérgicas tipo I (Fig. 13 a y c flecha) y las células amacrinas desplazadas a la capa de células ganglionares o colinérgicas tipo II (Fig. 13 a y c cabezas de flecha).

En el pollo recién nacido, las células amacrinas de las retinas tratadas con phaclofen muestran inmunorreactividad para el GABA con un patrón parecido al normal (Fig. 13 d). En el pollo de un mes post-natal se vuelve a observar una clara disminución de la expresión de GABA por parte de las células amacrinas (Fig. 13 f). Esta disminución es absolutamente evidente en la capa de células horizontales y en la capa de células ganglionares (Fig. 13 f-Hc y GC).

3.- Efecto de la Bicuculina

La Bicuculina es un antagonista selectivo de receptores GABA-A. La presencia del mismo durante el desarrollo de la retina a partir de E-5 y/o E-8 produce una falta de expresión de GABA en las células amacrinas (Fig. 14). Esta falta de inmunorreactividad GABA se mantiene durante todo el desarrollo. No obstante precisaremos a continuación dos efectos de éste antagonista en función de la dosis inyectada y el día del desarrollo en que se efectúa.

Las figuras 14 a,b y c presentan el patrón de inmunorreactividad para el GABA que muestra la retina nasal-periférica en (a), nasal-ecuatorial en (b) y temporal-central en (c) de un embrión en E-16, el cual fué inyectado intraocularmente con 10µl de Bicuculina 10nM durante E-8. Se puede observar, si comparamos con la fotografía control (Fig 14 d), que existe una gran alteración del patrón Gabaérgico. Las células horizontales de la retina periférica y ecuatorial no forman una hilera celular (Fig. 14 a y b) y existe disminución del número de pericarios. En la retina central el patrón de inmunorreactividad se muestra mas normal pero con frecuencia aparecen pericarios marcados en la capa de fotorreceptores. En general el grosor de la retina parece disminuir y las capas mas afectadas son la nuclear interna, a nivel de su tercio mas interno (donde se localizan las células amacrinas) ,y la capa de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico.

Estas últimas muestran una falta de desarrollo considerable (Fig. 14c GC.). Los fotorreceptores de estas retinas experimentales, muestran una falta de desarrollo a nivel de sus segmentos interno y externo.

Cuando la inyección de bicuculina se realiza con 100 μ l en el saco vitelino del pollo durante E-5, los efectos estructurales sobre el desarrollo de las distintas capas de la retina son aparentemente inapreciables.

No obstante, el patrón de inmunorreactividad GABA, también queda restringido a la capa de células horizontales, (compárese las Fig. 14 e, f, retina experimental en E-17 con la 14 g, retina control en E-15). La capa nuclear externa (ONL) es menos gruesa que la del embrión control y los segmentos de los fotorreceptores son hipoplásicos. También la capa de células ganglionares y la capa de fibras del nervio óptico muestran importantes alteraciones, que recuerdan a las que produce el alcohol durante el desarrollo.

Finalmente, si la inyección de Bicuculina la realiza intraocularmente con 20 μ l, 10nM durante E-5, el efecto neurotóxico de este inhibidor de receptores GABA-A, se hace muy evidente (Fig. 14 i). La retina se desarrollo con grandes alteraciones de su estructura y morfología celular. Las capas internas de la retina estan atroficas (Fig. 14 h), el patrón de inmunorreactividad para el GABA no se expresa y es frecuente observar

pliegues (Fig. 14 i cabezas de flecha), rosetas (Fig. 14 i, flecha grande), tunelizaciones (Fig. 14 i asterisco) y en general alteraciones que recuerdan a las que producen sustancias como el Levamisol, el Acido α -aminoadipídico o incluso las radiaciones ionizantes a altas dosis. En estos embriones, solo la parte mas periférica de la retina muestra células inmunorreactivas al anticuerpo contra GABA (Fig. 14 i estrella). Estas células se encuentran en la parte mas interna de la misma y por su localización pueden corresponder a células amacrinas (Fig. 14 J flechas).

ICONOGRAFÍA

FIGURA 1

a: Sección vertical de retina de pollo recién nacido, procesada inmunohistoquímicamente con un anticuerpo contra GABA. Hc, células horizontales; INL, capa nuclear interna; Ac, células amacrinas; Gc, células ganglionares. Las flechas muestran células que contienen GABA en la capa de células ganglionares. X 400. b: Sección vertical de retina central de pollo recién nacido procesada con el método de Golgi. La cabeza de flecha muestra el cuerpo de una célula de Müller. La flecha horizontal marca el límite externo de la ubicación de los pericarios de las células amacrinas. c: Montaje ultraestructural de una panorámica externa de la retina del pollo. Las flechas horizontales (pequeñas) señalan los tres estratos sinápticos de la capa plexiforme externa. OPL, capa plexiforme externa; Bc, células bipolares; Mc, células de Müller. La flecha horizontal (grande) muestra un cuerpo de una célula de Müller. X 5000. d: Célula horizontal en brocha, método de Golgi. X 400; e: Célula horizontal estrellada y la parte externa de una célula bipolar (flecha). X 400; f: Célula horizontal en candelabro (Hc) y célula bipolar (Bc). X 400; g: Célula amacrina triestratificada. X 400.

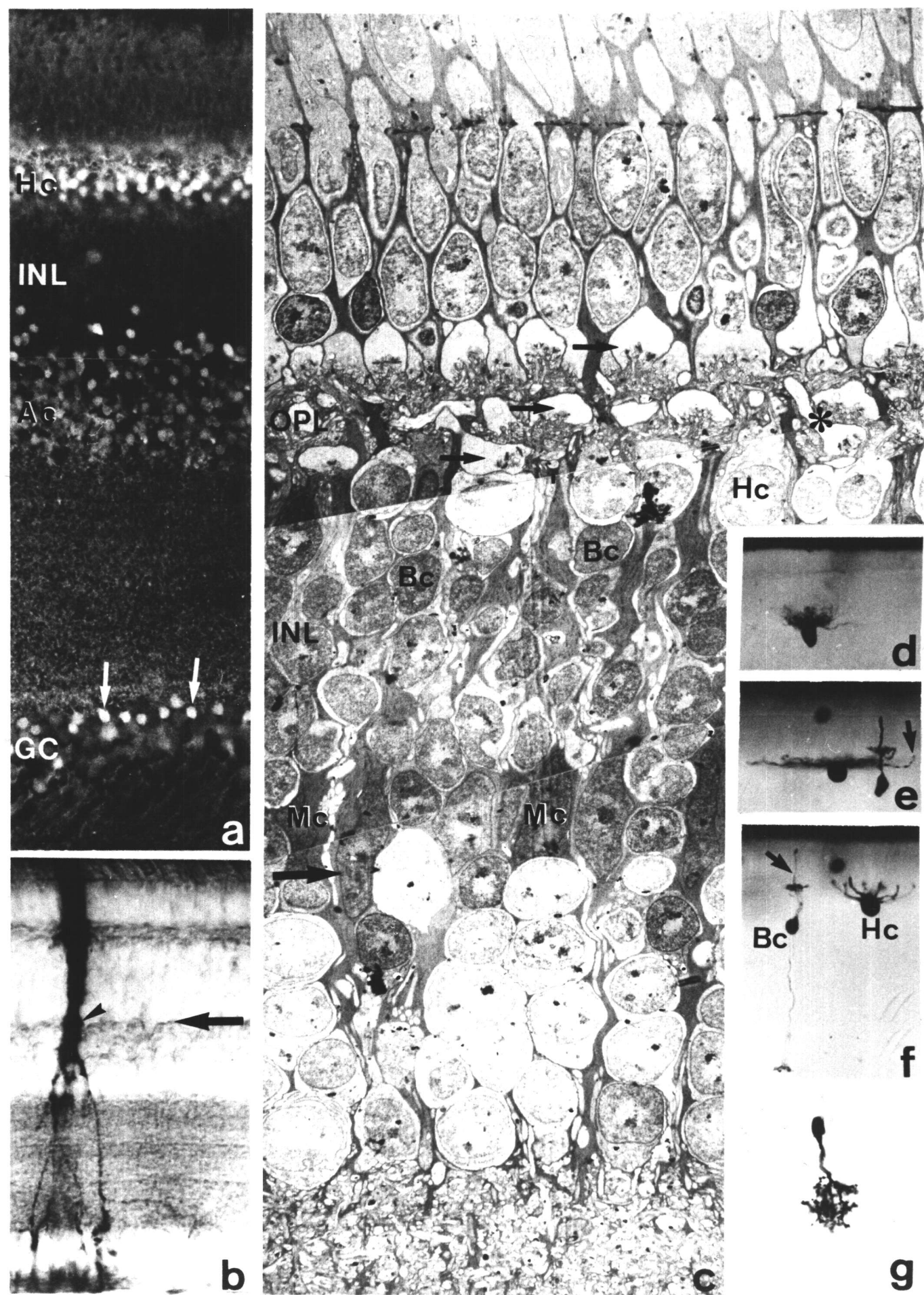


FIGURA 1

FIGURA 2

a: Célula horizontal en candelabro y tres fotorreceptores, método de Golgi. X 400; b: Ampliación de la zona marcada con un asterisco en la Fig. 1c. X 12000; c: Célula horizontal estrellada. X 400. Método de Golgi.

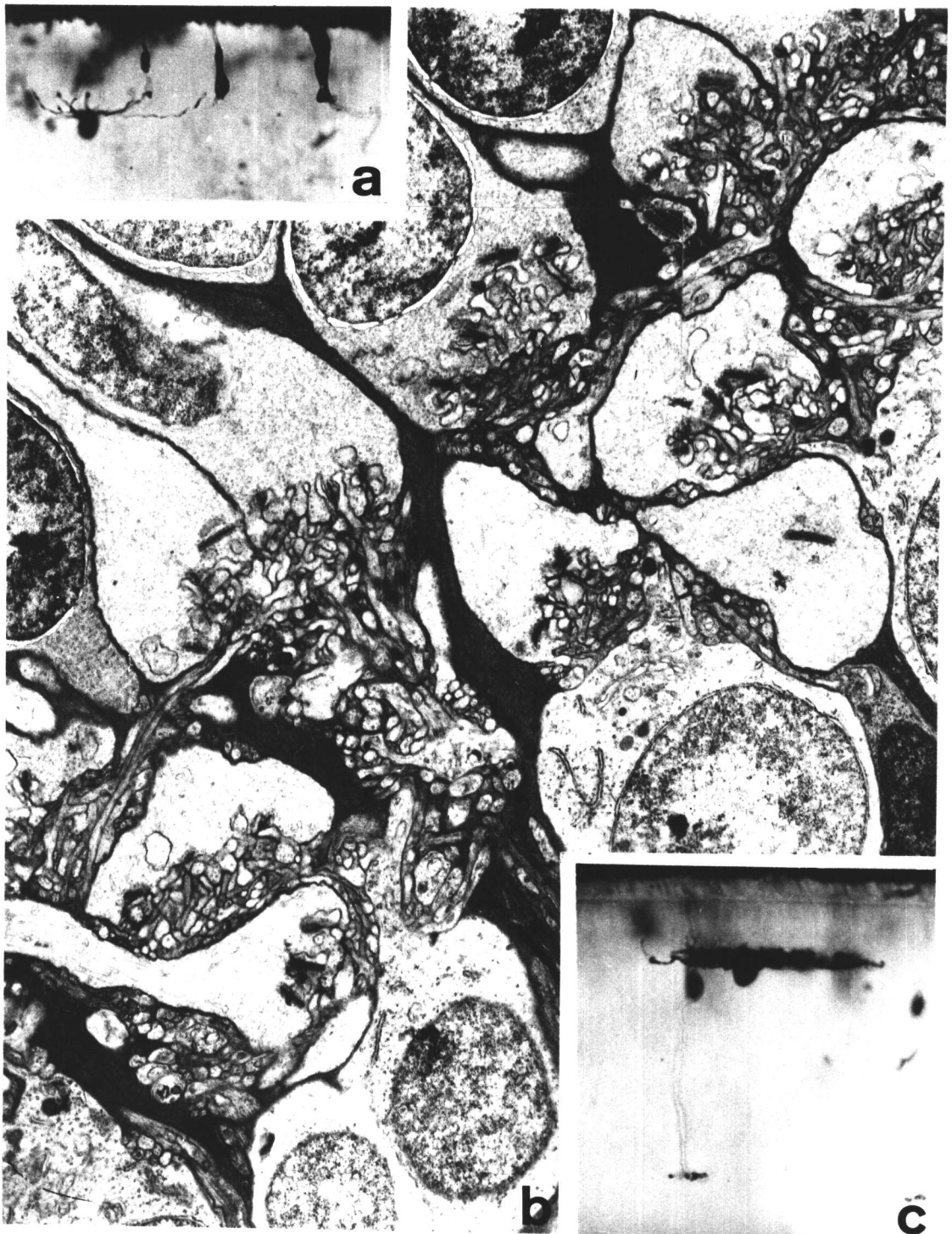


FIGURA 2

FIGURA 3

Panorámica ultraestructural de las capas externas de la retina. Obsérvese que las células horizontales se encuentran formando una hilera (Hc). X 6600.



FIGURA 3

FIGURA 4

Distintas secciones verticales de retina (a, b, c y f) mostrando los tres tipos de células horizontales. X 400. d, e y g recogen vistas en plano de estas células. En la figura 4d, la flecha curva muestra la terminal axónica de una célula tipo I o en brocha. X 1000. Método de Golgi.

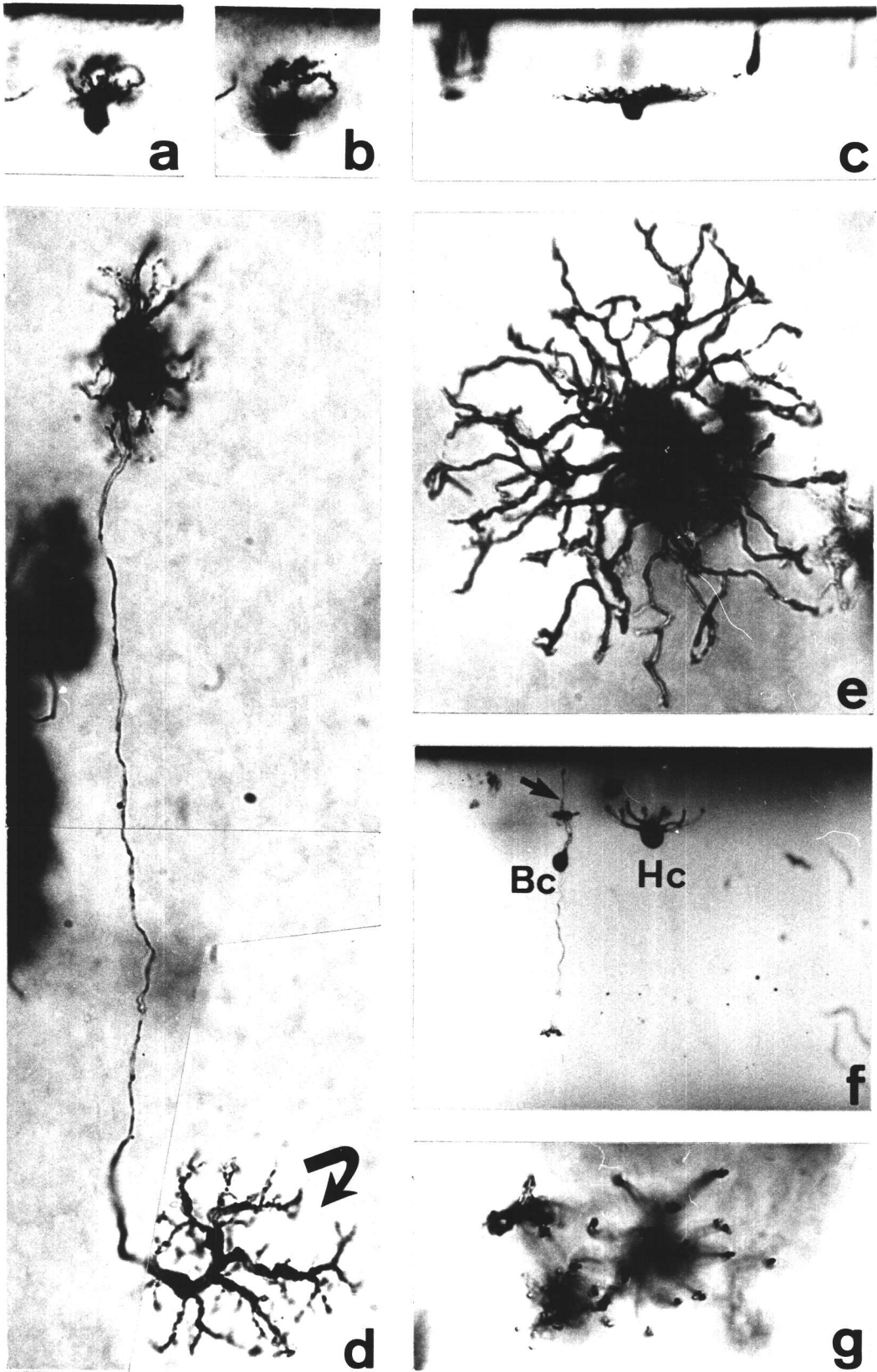


FIGURA 4

FIGURA 5

Secciones verticales de retina procesadas inmunohistoquímicamente con un anticuerpo contra GABA. Retina de 6 días (a); 7 días (b); 7,5 días (c); 8 días (d y e); 8,5 días (f). Las cabezas de flecha y las flechas señalan neuroblastos de células amacrinas y horizontales migrando. g, h, i, j, k corresponden a ampliaciones de las zonas marcadas con un asterisco en d, e, f. Las fotografías d, e, f corresponden a un aumento X 200, el resto X 400.

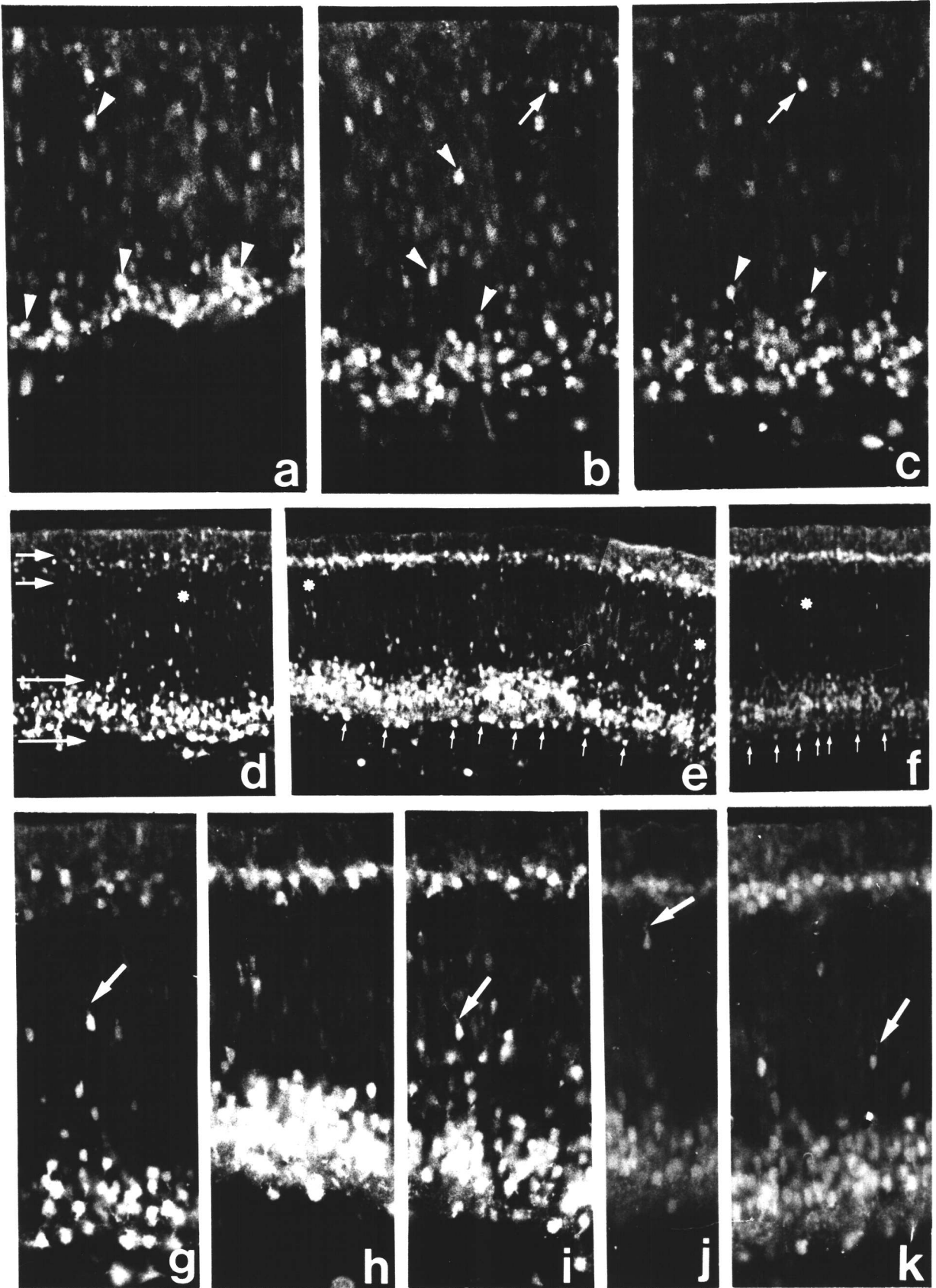


FIGURA 5

FIGURA 6

Muestra numerosas imágenes de secciones verticales de retina teñidas con el método de Golgi, de embriones de pollo de E-7 a E-9. Las flechas grandes señalan distintas secuencias de células amacrinas migrando, series a₁- a₉ y r₁- r₉ . Las fotografías b-q y s-v corresponden a células amacrinas colinérgicas tipo I y II. X 400.

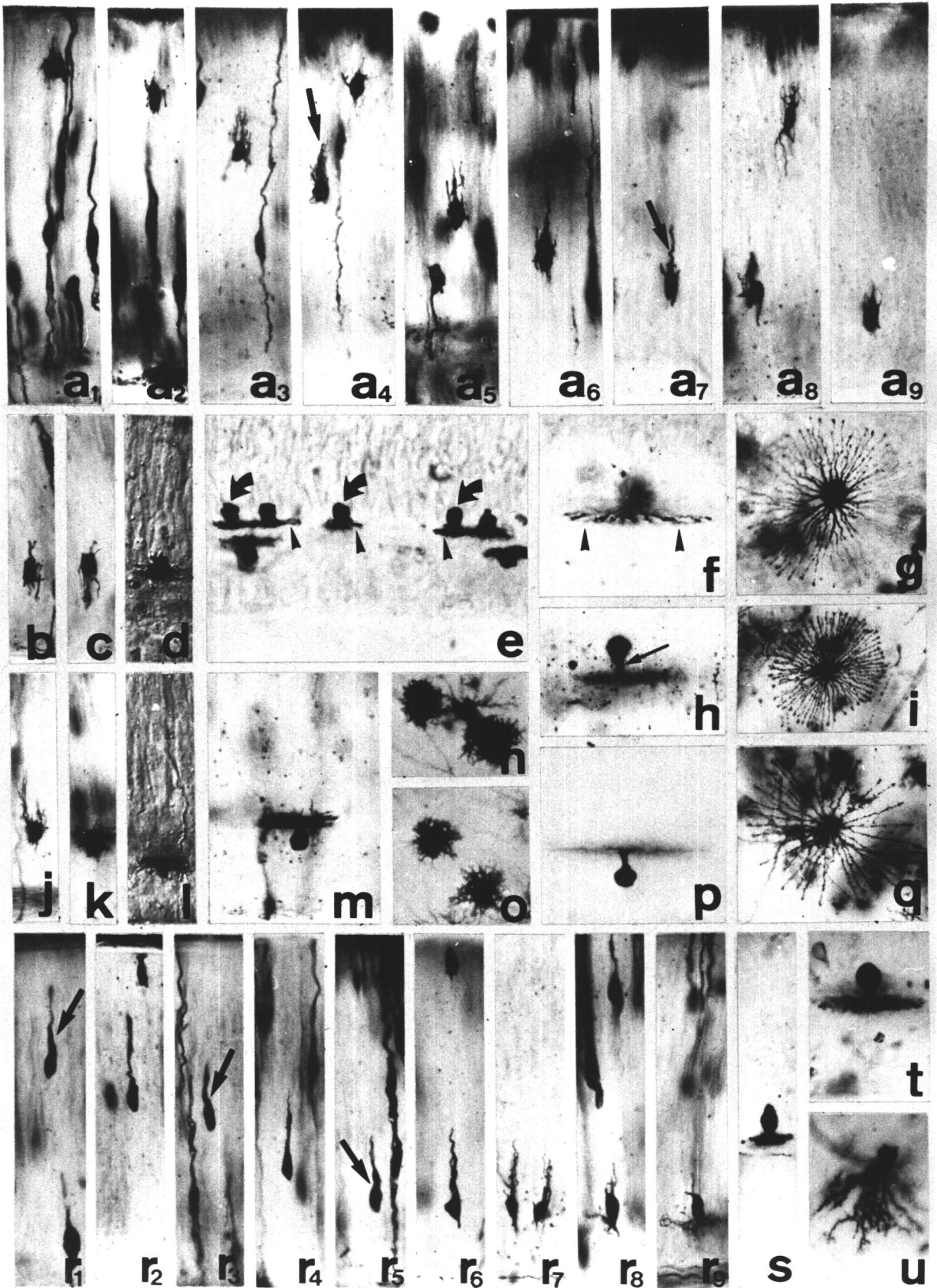


FIGURA 6

FIGURA 7

Secciones inmunohistoquímicas verticales de retina central de 9 días (a, b, c, e) y de 10 días (f), teñidas con un anticuerpo contra GABA. La fotografía (d) corresponde a una zona periférica de retina en E-9. Las flechas grandes muestran células todavía migrando. Las flechas pequeñas señalan la hilera de células amacrinas desplazadas migrando por la capa plexiforme interna. a, c y d X 200. b, e, f X 400.

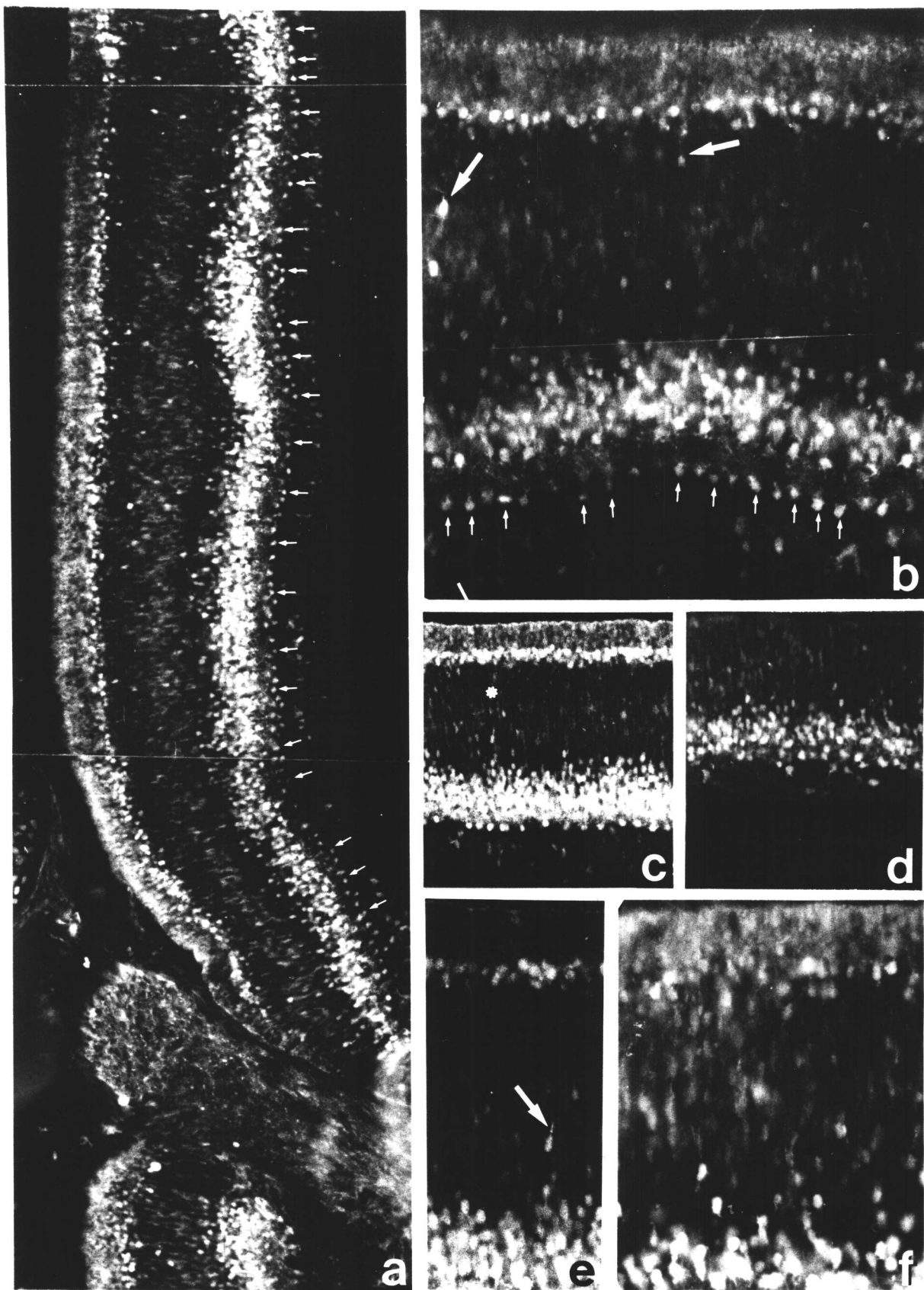


FIGURA 7

FIGURA 8

Secciones inmunohistoquímicas verticales y tangencial (c) de retina en E-10,5, E-11 (a, b, d) en E-11,5 (c, e) en E-12 (f), en E-14 (g, h, i). h, i corresponden a las zonas marcadas con asterisco en g. Las flechas gruesas señalan las células horizontales de la retina. a I y a II marcan las células amacrinas colinérgicas. a, b, c, e, h, i X 200. d X 400. g X 100.

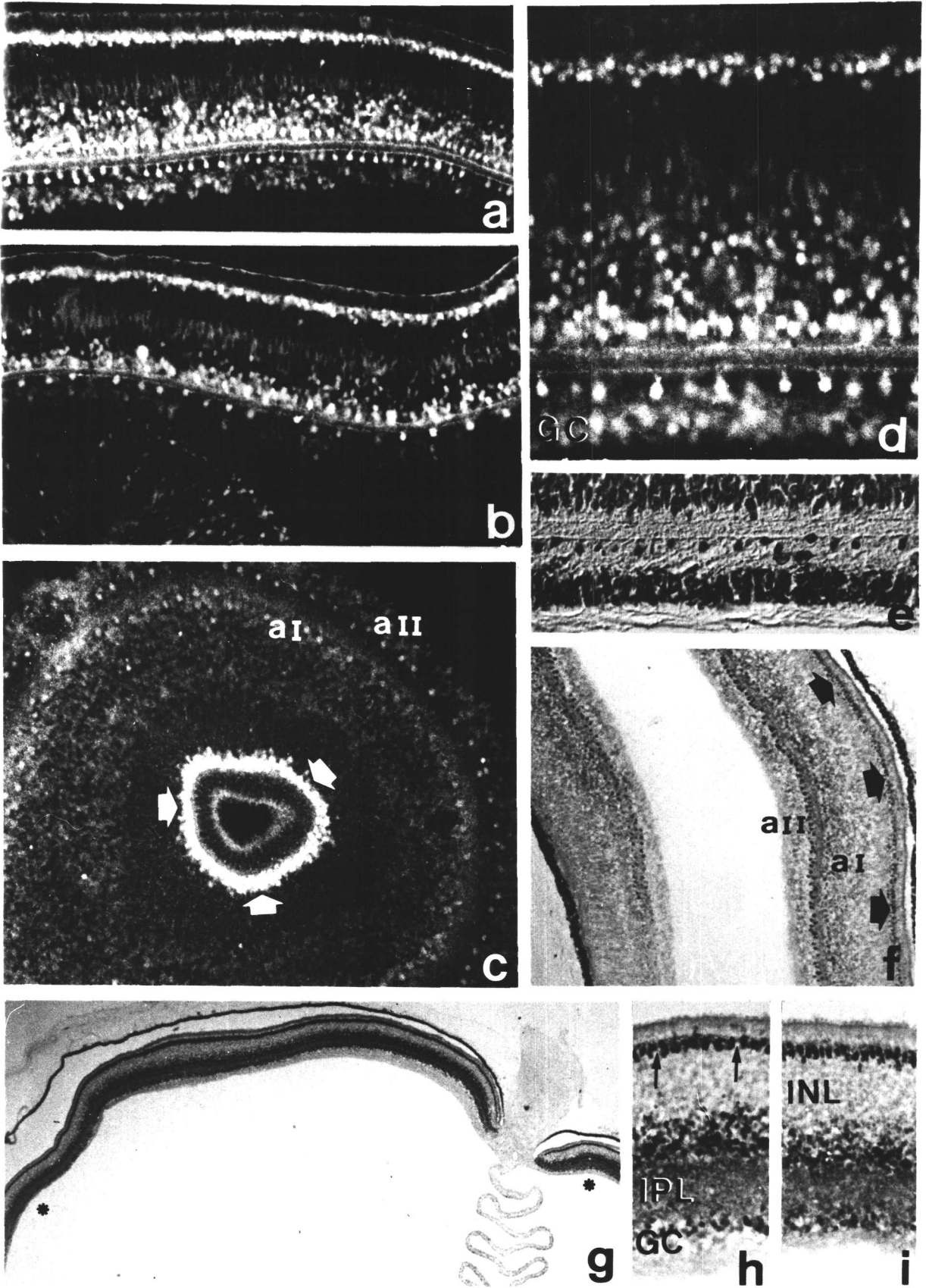


FIGURA 8

FIGURA 9

Muestra distintos aspectos de la expresión de GABA que presenta la retina central (a-e) y periférica (f-i) del pollo recién nacido (a) y del adulto (b-i). Las flechas finas en (a) muestran en la capa de células horizontales, espacios sin inmunorreactividad GABA. Las flechas grandes (a, c, f) señalan células amacrinas grandes. Las cabezas de flecha pequeñas en (a) señalan células amacrinas desplazadas. La cabeza de flecha grande en (a) muestra una posible célula ganglionar. Las flechas en (h, i) señalan posibles células ganglionares desplazadas. a, c, d, f, h, i X 400. b, e, g X 200.

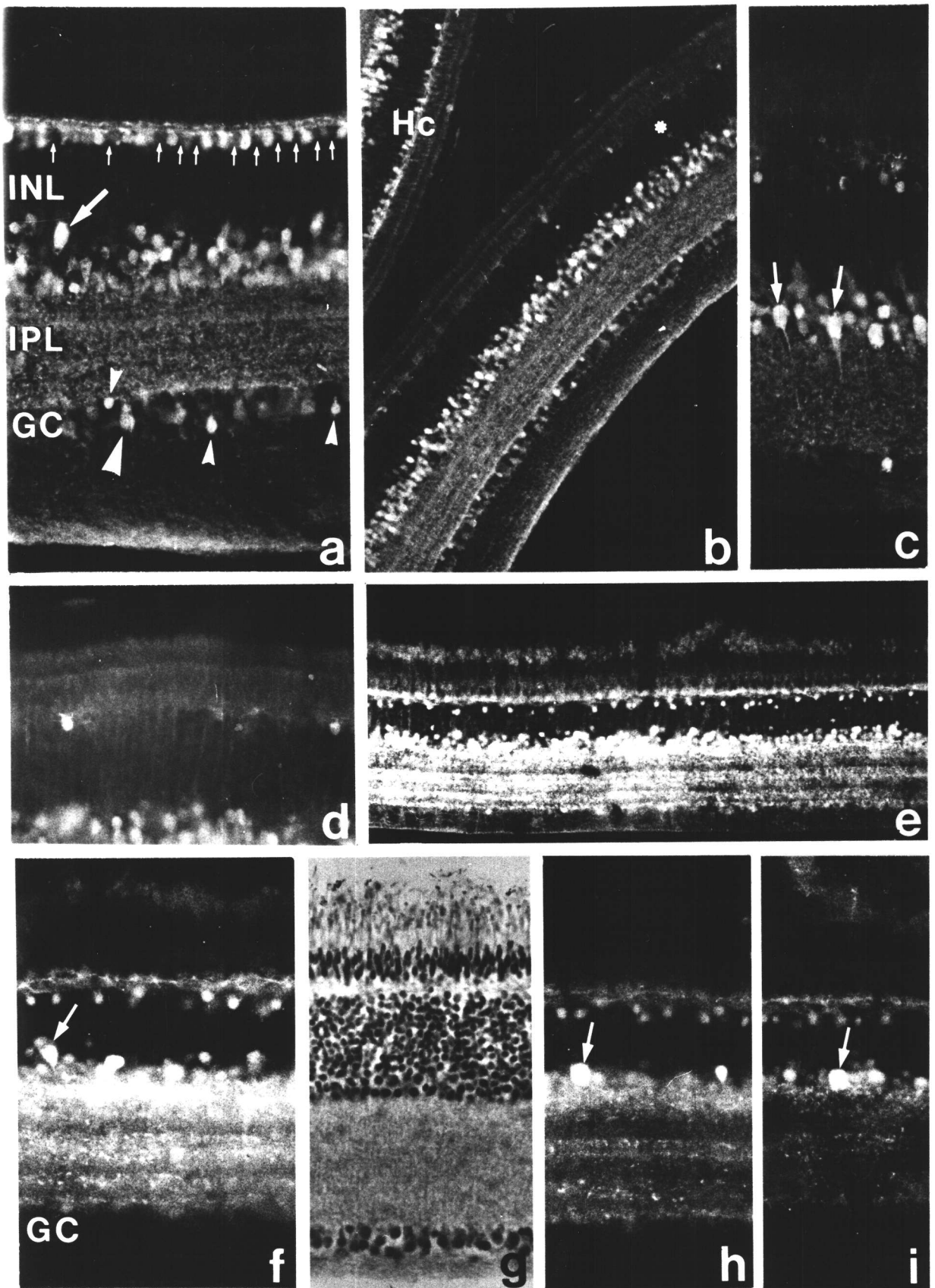


FIGURA 9

FIGURA 10

Colocalización de GABA (A) y ChAT (B) en retinas en E-7 a E-10. La serie A₁- A₄, corresponden a secciones tangencial (A₁) y verticales (A₂- A₄) de retina de pollo en las que se observa las poblaciones de células que contienen GABA. En la serie B₁- B₄ se aprecia la inmunotinción para ChAT. X 200.

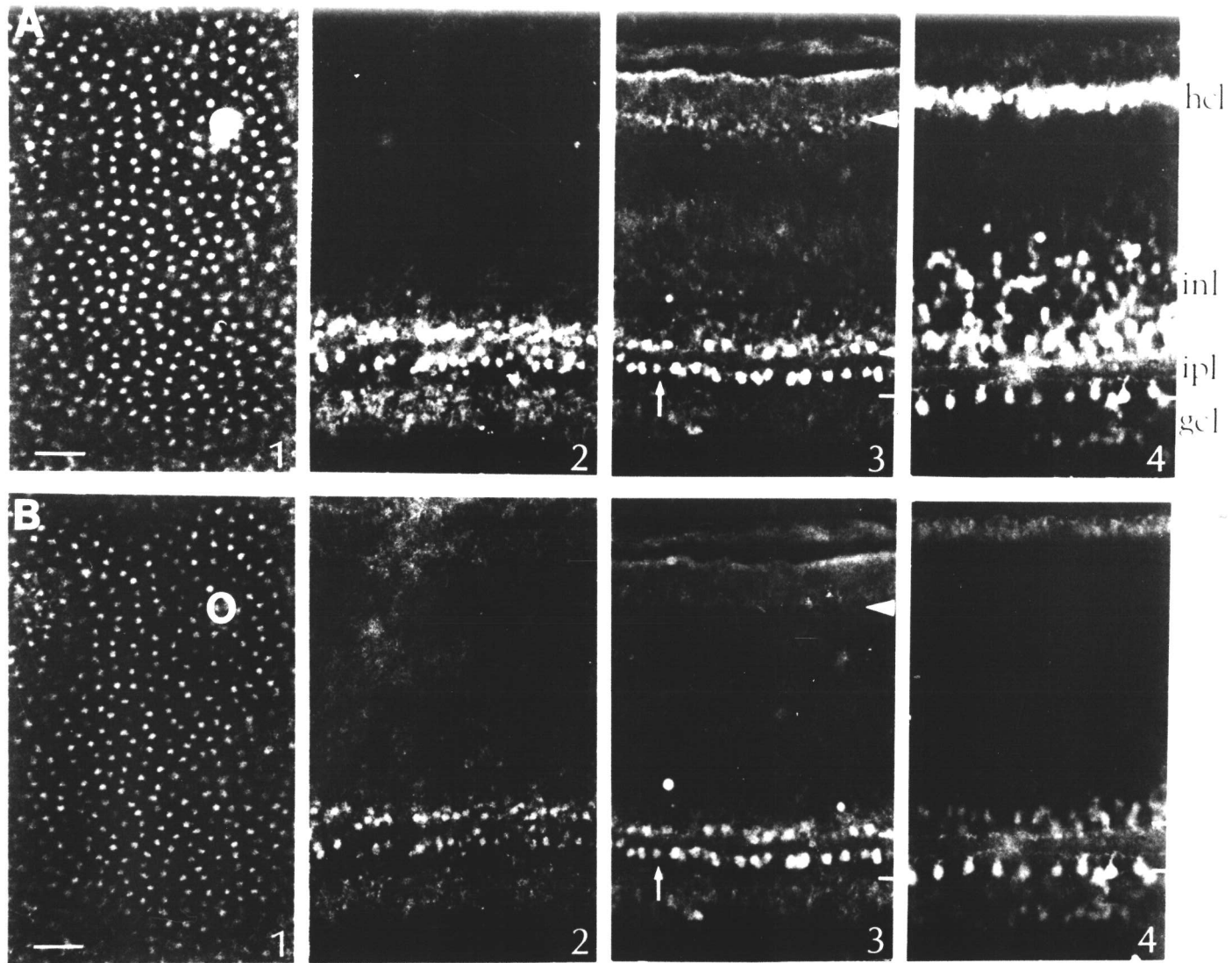


FIGURA 10

FIGURA 11

A: Panorámica de una sección de retina dorso-ventral y naso-temporal de un embrión de pollo en E-11,5. B: El esquema orienta el tipo y la disposición del corte. C₁ a C₅: muestra ampliaciones de las zonas encuadradas en A con los números 1 a 5. D₁ a D₅ corresponde a ampliaciones de zonas de una retina de E-14/E-15 tomadas en los mismos sitios en que se enmarca la retina de la figura 11-A. Todas las secciones (A, C, D) han sido procesadas inmunohistoquímicamente con un anticuerpo contra GABA y teñidas con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. A su vez las imágenes han sido tomadas con un microscopio dotado con contraste interferencial de Nomarsky. A X 50. C y D X 200.

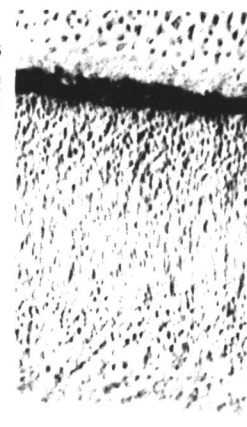
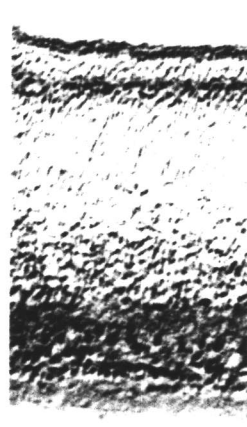
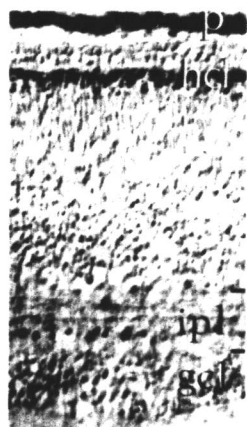
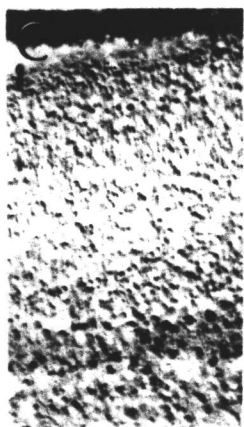
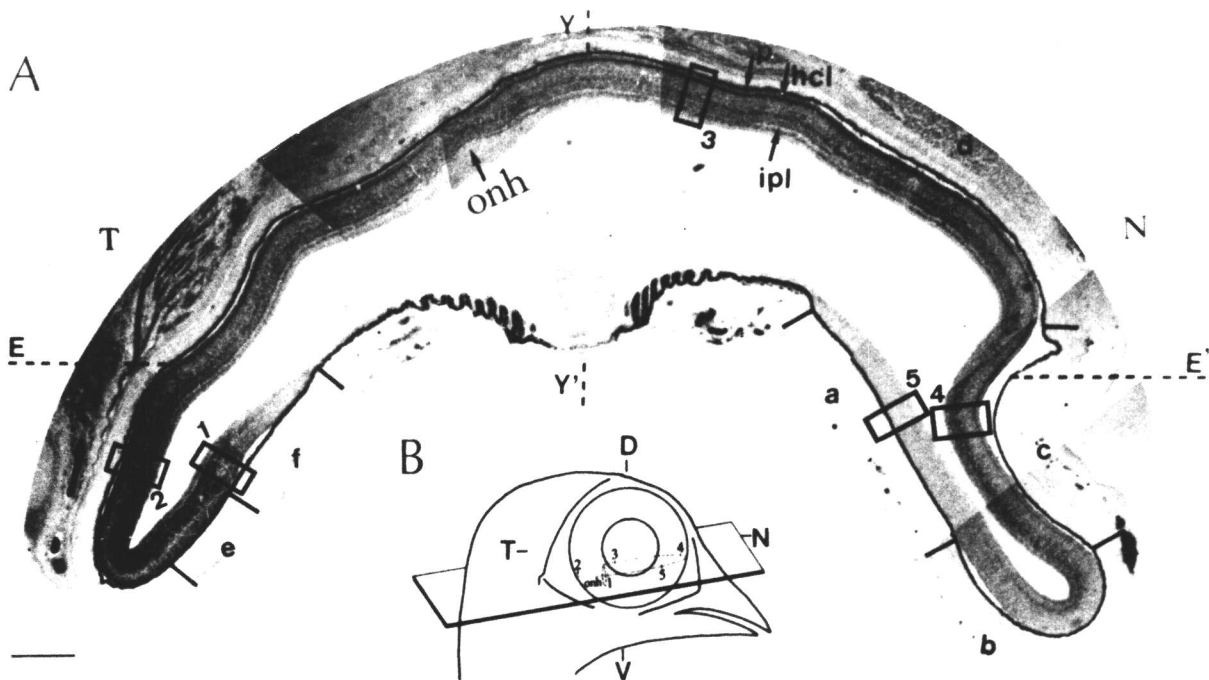


FIGURA 11

FIGURA 12

Secciones verticales de retina de pollo tratadas con GABA (a), ácido amino-oxiacético (b) y Muscimol (c, d). a y b corresponden a retinas de pollo recién nacidos; c y d corresponden a retinas de pollo durante el desarrollo. c (E-11) y d (E-17). Las flechas señalan en (b), los pedículos de los fotorreceptores con GABA. a y b X 400. c y d X 200.

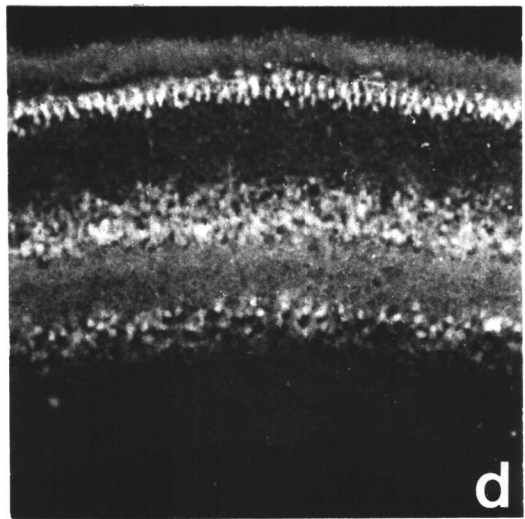
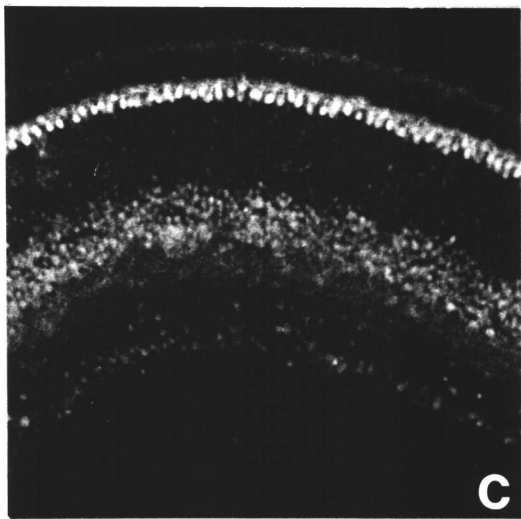
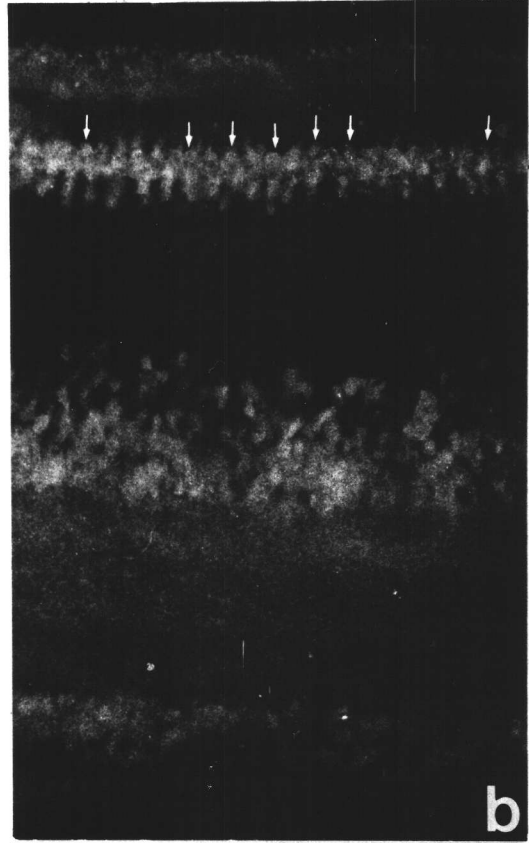
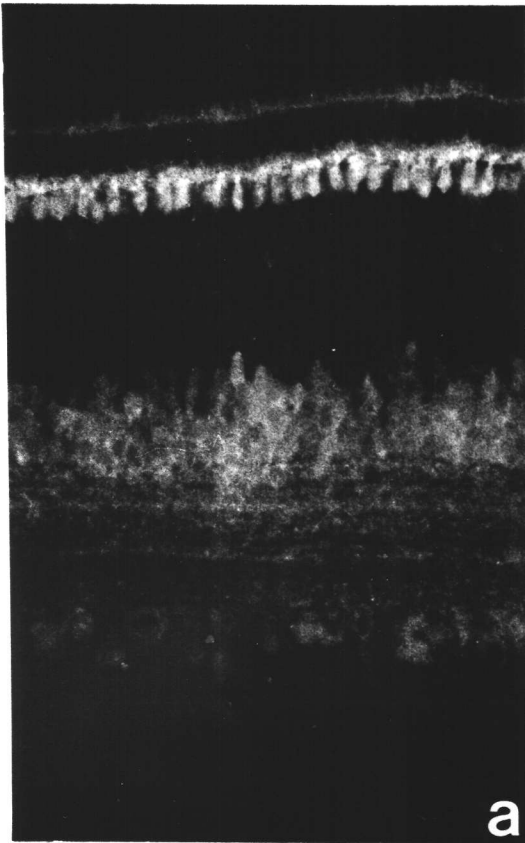


FIGURA 12

FIGURA 13

La figura muestra distintas panorámicas de la expresión de GABA en secciones verticales de retina de pollo, tratadas entre E-5 y E-8 con Phaclofen (a, c, d, e, f) y retinas de pollo control (b y g). Retina en E-6 (a y b); en E-14 (c y e); pollo recién nacido (d) y adulto (f, g). Las flechas señalan células amacrinas colinérgicas tipo I. Las cabezas de flecha muestran células amacrinas desplazadas o colinérgicas tipo II. Todas X 200, excepto e que es X 400.

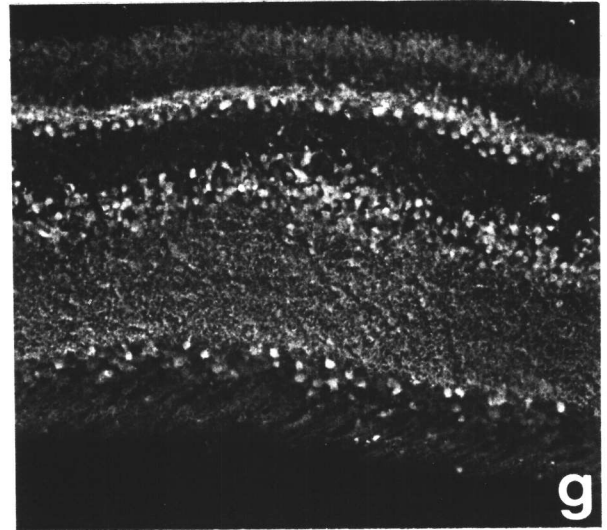
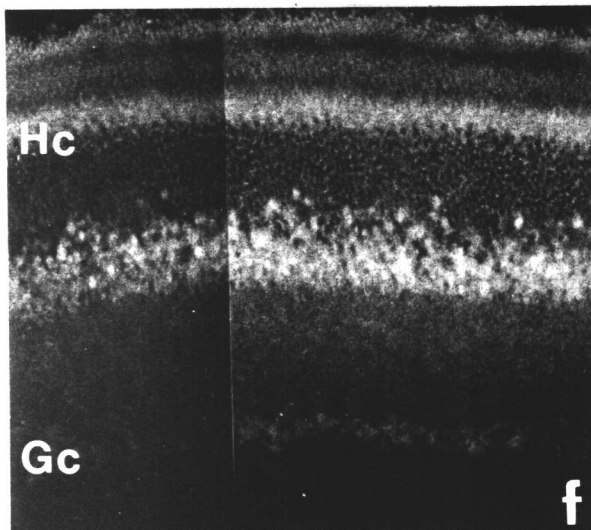
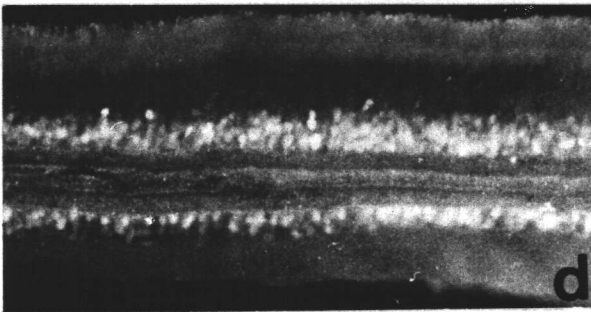
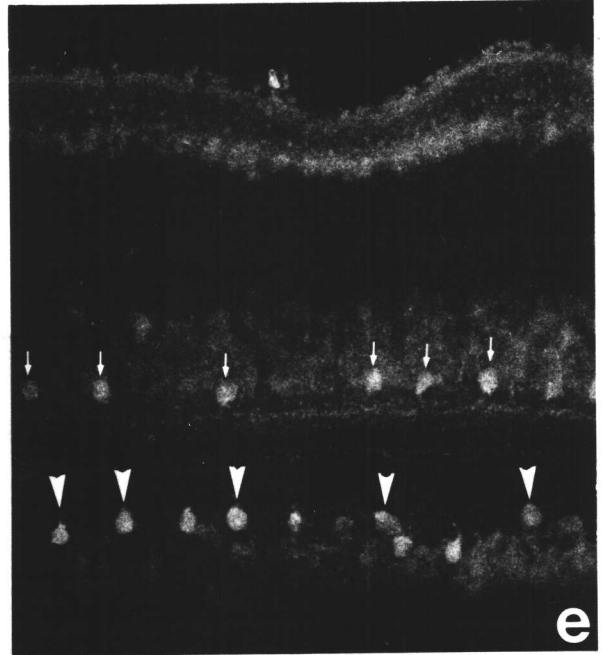
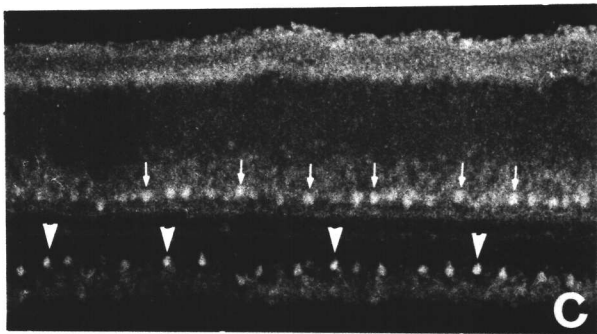
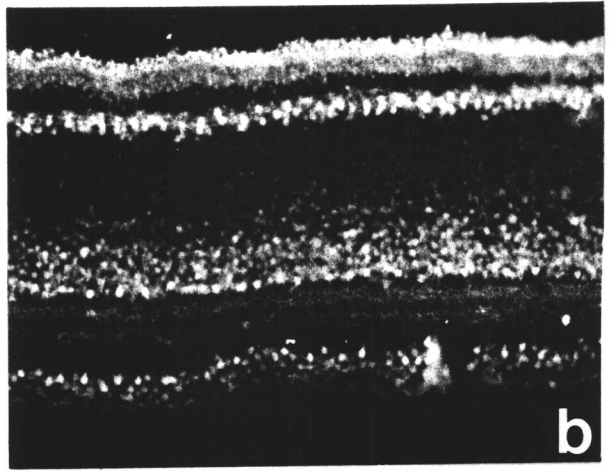
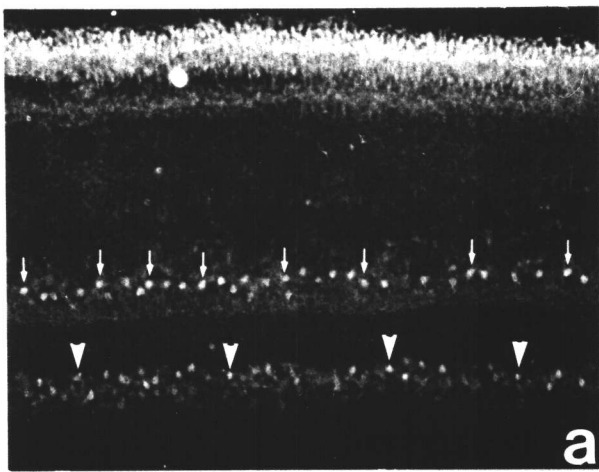


FIGURA 13

FIGURA 14

La figura recoge la expresión de GABA en la retina durante el desarrollo cuando el pollo es inyectado con Bibiculina en saco vitelino durante E-8 (a, b, c, e, f) y en globo ocular durante E-5 (h, i, j). d y g son secciones de retina de embriones control. a, b, c (E-16) X 400. d (E-16) X 200. e, f (E-17) X 400. g (E-15) X 400. i (E-16-17) X 100. h, i, j corresponden a las zonas marcadas en i con la flecha grande y con la estrella respectivamente. X 400. En j las flechas señalan las únicas células de la retina que contienen GABA.

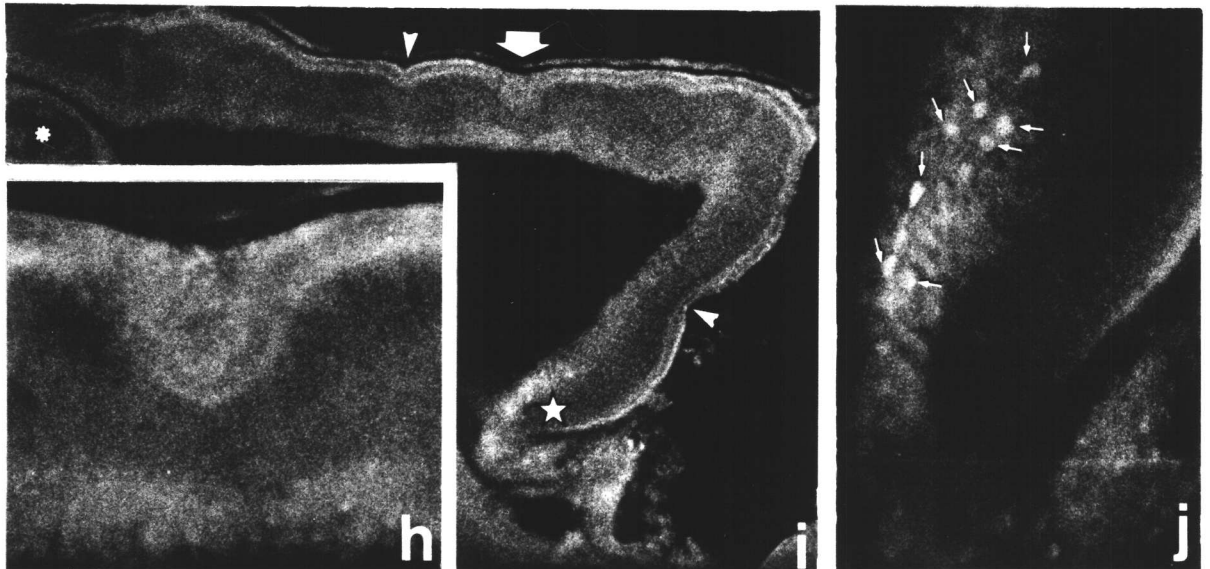
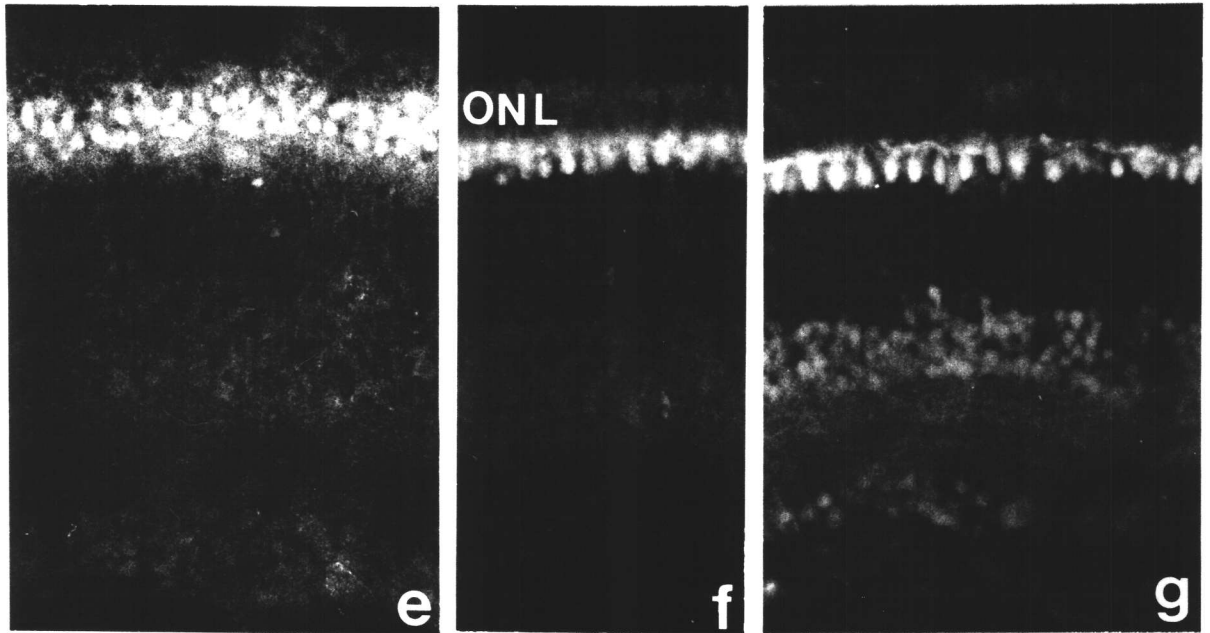
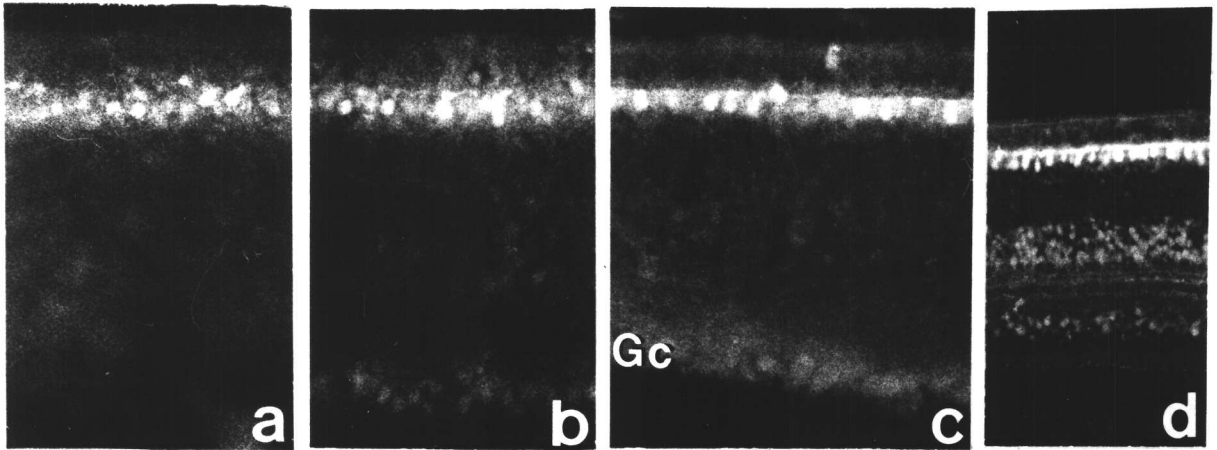


FIGURA 14

DISCUSIÓN

Aunque se han realizado muchos estudios sobre la expresión inmunohistoquímica del GABA en la retina de los vertebrados, especialmente en la Rata, el Conejo y el Pollo, existen pocos trabajos que hagan referencia al desarrollo de éste neurotransmisor. En el Pollo hemos encontrado dos trabajos que han analizado la inmunoreactividad para el GABA durante el desarrollo. El primero de ellos (Araki y Kimura, 1991) hace un estudio muy incompleto sobre la expresión de GABA, fundamentalmente en relación con las células horizontales. Sus resultados están basados sobre tres estadios del desarrollo. El segundo describe la inmunoreactividad del GABA y del GAD durante el desarrollo (Hokoc y cols. 1990) . Este trabajo es más completo que el anterior pero tiene múltiples lagunas relacionadas con la expresión del GABA durante la migración celular; la existencia de gradientes y la variación de expresión cuando la retina se hace funcional.

Nuestros resultados coinciden con los de Hokoc y cols. (1990) sobre la fecha en que el GABA comienza a observarse inmunohistoquímicamente. En la retina central-dorsal de E-6/6.5 comienzan a aparecer células marcadas por todo el neuroepitelio, que pronto se acumulan en las zonas más internas de la retina. Las imágenes obtenidas de éstas células sugieren que se trata fundamentalmente

de células amacrinas, porque entre E-8 y E-8.5 el acúmulo de células antes citado aparece separado de la capa de células ganglionares mediante la capa plexiforme interna. No obstante no podemos descartar, que algunas de las células que inicialmente aparecen marcadas en la futura capa de células ganglionares, sean neuronas de éste tipo. A favor de ésta interpretación está la localización que ocupan. En contra, se puede argumentar que nunca hemos detectado axones de células ganglionares marcadas. También se podría sugerir que sólo expresan GABA mientras no han emitido el axón. Sin embargo, ésta es una posibilidad muy remota, pues las células ganglionares en su mayoría comienzan a emitir el axón antes de que finalice la migración (Prada y cols. 1981). Cuando alcanzan la capa de células ganglionares son muy pocas las que no tienen axón. Se han descrito algunas células ganglionares inmunoreactivas para el GABA en las que se ha observado tinción en su axón (Mosinger y cols. 1986; Yu y cols. 1988), pero corresponde a retinas de animales adultos. En retinas embrionarias, sólo el estudio de Versaux-Botteri y cols. 1994) en la tortuga, señala como "presumibles" células ganglionares, neuronas ubicadas en el interior de la capa plexiforme interna. La posición y morfología de éstas células, así como el estadio en que se muestran nos hacen pensar que se trata claramente de células amacrinas que se están desplazando hacia la capa de células ganglionares. También se podría pensar que las células que comparten posición con las neuronas ganglionares en E-6.5 y E-7.5 sean células amacrinas desplazadas. Las células amacrinas desplazadas en E-6.5 ya han nacido (Prada y cols. 1991), y aunque su migración se reconoce más tardía por oleadas a través

de la capa plexiforme interna (entre E-7.5 y E-11.5, Genis y cols 1977); ello no descarta que las primeras migren al unísono con las últimas ganglionares. Es más, porque no pensar en una primera oleada de células, cuando no existe capa plexiforme interna, que marca la ruta de migración del resto de las células amacrinas desplazadas.

Los patrones de expresión de inmunoreactividad que hemos observado entre E.6.5 y E-11.5 demuestran que el GABA se expresa primero en células amacrinas y después en células horizontales. Estos patrones son totalmente superponibles con los que se observa mediante la técnica de Golgi (Stensaas, 1967) durante la migración y diferenciación inicial de éstas células. También el desarrollo del GABA coincide con los gradientes descritos por Shen, Greenfield y Boell (1956) y por Prada y cols. (1991). El GABA aparece primero en la retina central, después en la retina periférica; se expresa antes en la retina dorsal que en la ventral y también lo hace primero en la retina temporal y después en la nasal. Por lo tanto sigue los gradientes de "Central a Periférica" de "Interno a Externo" de "Dorsal a Ventral" y de "Temporal a Nasal".

Las imágenes que hemos recogido durante E-6.5 a E-11 parecen dejar claro que en el momento que las células se sueltan del ventrículo y comienzan a migrar, contienen GABA. Existe un período entre E-7 y E-9 en el que se observa una gran cantidad de células cuyas formas son idénticas a las que muestran las jóvenes neuronas amacrinas que migran a través de la capa nuclear interna. Este

hecho que es demostrado por primera vez en nuestro estudio, plantea una cuestión a la vez que parece responder a otra. La cuestión es ¿qué papel juega el GABA durante la migración celular y durante su diferenciación inicial antes de que se realice la sinaptogénesis?. Lo que parece más probable es que el GABA es necesario durante la migración, al menos el contenido de él en la célula así lo sugiere. Aunque no se puede descartar que el GABA actúe como una molécula señalizadora de la migración, nosotros nos inclinamos por pensar que juega su papel como sustancia trófica facilitando el crecimiento de procesos citoplásmicos (Filopodios, Lamelipodios,...), necesarios para el desplazamiento y el reconocimiento celular. En experimentos realizados con cultivos neuronales (revisado por Meier y cols. 1991) se ha demostrado que el GABA activa el crecimiento de expansiones y de dendritas.

La hipótesis que acabamos de plantear toma más fuerza si observamos que el GABA se expresa cuando ha finalizado la migración, en todas las células que van a desarrollar sus ramilletes dendríticos. Así, entre E-10 y E-13 todas las células horizontales de la retina del Pollo contienen GABA. En éste período se diferencian los ramilletes dendríticos y durante ésta fase de crecimiento y diferenciación dendrítica, se generan prolongaciones transitorias, o sea, que crecen y desaparecen, son previas a las definitivas y sirven de guía para que se establezca la sinaptogénesis. Cuando en la retina se diferencian los tres tipos de células horizontales (E-14 a E-17) y la capa plexiforme externa muestra las primeras sinapsis, entonces se observa que muchas células horizontales dejan

de contener GABA. También a las células amacrinas le ocurre algo parecido; en los primeros estadios de su diferenciación E-8 a E-10, parece como si todas ellas contuvieran GABA (Figs. 5, 7 y 8, INL), luego hay una disminución del número de las que contienen GABA. Este hecho coincide con que las células amacrinas se diferencian antes que las horizontales y la plexiforme interna desarrolla sus sinapsis antes que la externa.

Los argumentos que hemos expuesto anteriormente parecen sugerir que el GABA tiene un papel morfógeno durante la migración y diferenciación de las células amacrinas y horizontales. La coincidente necesidad de expresarse en ambos procesos y en ambas poblaciones celulares nos hacen buscar nexos durante su morfohistogénesis, así las células horizontales y amacrinas migran libremente, esto es sin permanecer unidas a algunas de las membranas limitantes de la retina. Su mecanismo migratorio es la emisión de prolongaciones citoplásmicas que guían y movilizan las células mediante el alargamiento y el acortamiento de las mismas. Cuando esto ocurre tanto las neuronas amacrinas como las horizontales tienen un alto contenido de GABA. En estos estadios del desarrollo quizás ésta es la principal diferencia que mantienen con otras células de la retina, como son las ganglionares, las células bipolares o los fotorreceptores. Por lo tanto pensamos que el GABA actúa en células que migran libremente y además coinciden con que generalmente son interneuronas o neuronas de asociación. Podríamos citar otros ejemplos de interneuronas que contienen GABA durante el desarrollo como son las células grano del cerebelo y los neuroblastos

tipo II del tectum óptico.

Después de la migración y antes de la sinaptogénesis el GABA puede que actúe como molécula estimuladora de receptores, bien para el mismo o bien para que se puedan formar receptores de otros neurotransmisores.

Este hecho explicaría la colocación de GABA y Acetil-colintransferasa en neuronas colinérgicas tipo I y II, que nosotros observamos en la retina durante E-9 y E-12. Los patrones de inmunorreactividad para el GABA que nosotros encontramos en la capa plexiforme interna son totalmente superponibles por los descritos también en el pollo por Spira y col. (1987) en relación con la Acetil-colintransferasa. La coexistencia de ambos neurotransmisores también ha sido demostrada en la retina adulta del conejo (Vaney y Young, 1988) en algunas neuronas motoras del nervio hipogloso (Davidoff y Schulze, 1988) y en algunas terminales nerviosas del hipocampo (Bonnano y Raiteri, 1986). Entonces nos debemos preguntar que significado tiene la presencia de GABA antes que la enzima de síntesis de la Acetil-Colina. Es conocido que el GABA modula la liberación de Acetil-Colina (Bonnano y Raiteri, 1986; Farkas y cols. 1986), incrementando el número de receptores nicotínicos y de Acetil-Colina (Kasa y cols. 1985) y que es necesario para la formación de contactos sinápticos (Dames y cols. 1985; Wolff y Kasa, 1987). Por lo tanto, éstos datos sugieren que el GABA podría participar en la regulación y /o modulación de la sinaptogénesis de la capa plexiforme interna de la retina. No olvidemos que el GABA está presente en

células amacrinas antes de que comience a desarrollarse la sinapsis en la capa plexiforme interna.

Otra interesante característica y posible función del contenido del GABA por células colinérgicas durante el desarrollo es la relacionada con los receptores de Acetil-Colina. Así, se ha sugerido que el ácido Ascórbico es un factor que incrementa los receptores para la Acetil-Colina en la unión neuromuscular en desarrollo (Knaack y Podleski, 1985; Knaack y cols. 1986; Salpeter, 1987; Schuetze y Role, 1987). Como el GABA induce la liberación de ácido ascórbico en el tejido cerebral (Bigelow y cols. 1984) y el ácido ascórbico es sintetizado en el cerebro del embrión de pollo a partir del séptimo día de incubación (Fabro y Rinaldini, 1965), es posible que el GABA también esté implicado en la regulación de los receptores para la Acetil-Colina en la capa plexiforme interna de la retina. En nuestro estudio hemos empleado experimentalmente un antagonista de receptores GABA-A como es la Bicuculina, los cuales se distribuyen en el pollo en células amacrinas y por todos los estratos de la capa plexiforme interna (Yazulla y cols., 1989; Greferath y cols., 1995) y hemos comprobado que cuando se administra éste antagonista durante el desarrollo la capa plexiforme interna se hace hipoplásica, no se desarrolla adecuadamente y no hay contenido de GABA ni de Acetil-Colitransferasa en las capas internas de la retina.

Los patrones de expresión del GABA durante el desarrollo parecen sugerir dos actuaciones o papeles distintos de este neurotransmisor, con mecanismos

moleculares diferentes. Estas dos funciones diferentes del GABA se correlacionan con períodos del desarrollo bien definidos morfológicamente. El primero de ellos se extiende desde E-6 y alcanza hasta E-10-E-11, período de migración de las interneuronas de la retina. En éste período no se ha detectado en la retina la enzima de síntesis del GABA, o sea, la glutamato decarboxilasa (GAD) (Hokoc y cols. 1990). Lo cual plantea que entre E-6 y E-11 el GABA se forma por una vía distinta a la que tiene lugar entre el estadio E-12 y E-20, cuando ya existen sinapsis. En cultivos de células de retina de pollo, la presencia de GABA en el medio de cultivo inhibe complementamente la expresión de la actividad GAD durante el desarrollo. Este efecto parece estar mediado por los receptores para el GABA. Las primeras neuronas positivas para GAD aparecen entre E-10 y E-12 cuando comienzan a formarse la sinapsis en la capa plexiforme interna. En éste segundo período la presencia de inmunoreactividad para la GAD es superponible con la de GABA (Hokoc y col., 1990). Es posible que el GABA se forme en los estadios iniciales del desarrollo a partir de la Putrescina, pues ésta sustancia parece estar altamente concentrada en los embriones de seis días y disminuye en los tejidos diferenciados (Hokoc y cols. 1990).

El segundo período es durante la sinaptogénesis; ésta tiene lugar en la capa plexiforme interna a partir de E-10, mientras que en la externa el proceso se realiza más tardíamente y va de E-12/13 hasta E-18/20. Durante éste período del desarrollo y a partir de él la síntesis de GABA podría estar en relación con la actividad de GAD.

El contenido de la inmunoreactividad GABA en la retina adulta ha sido estudiada en distintos animales vertebrados (Mosinger y cols, 1986; Yu y cols, 1988) observándose la expresión GABA en las células amacrinas y ganglionares. Las aves, reptiles y peces lo expresan además en células horizontales (Mosinger y cols. 1986). Entre los mamíferos sólo el Gato parece tener inmunoreactividad a nivel de las células horizontales. Nosotros no hemos detectado inmunoreactividad para el GABA en las células ganglionares y por lo tanto coincidimos con Von Bartheld and Rubel (1989) al sugerir que las fibras gabaérgicas en el nervio óptico posiblemente se originan de neuronas localizadas en el tracto óptico o a partir de otras áreas del cerebro, pero no de células ganglionares gabaérgicas de la retina. Además de las tipologías gabaérgicas señaladas Chun y Wassle (1989b) indican que el GABA también se expresa en algunas células bipolares de la retina del gato. En muy aisladas ocasiones hemos podido confirmar éste hecho aunque no lo hemos ilustrado. Las escasas células que se han marcado correspondían a bipolares cuyos pericarios se localizaban en la zona subyacente a la hilera de células horizontales.

Los resultados que hemos obtenidos sobre la inmunoreactividad para el GABA en las distintas poblaciones de la retina adulta del Pollo coinciden en líneas generales con lo descrito por otros autores. Sin embargo, pensamos que lo más interesante es demostrar qué tipo de células horizontales y amacrinas son gabaérgicas y cual es su distribución topográfica por las distintas zonas de la retina. Chun y Wassle (1989b) describen inmunorreactividad GABA en dos tipos

de neuronas horizontales del Gato. El tipo A y el tipo B, éste último posee un axón. Por otro lado, Vaney y Young (1988) describen mediante doble marcaje, inmunorreactividad para el GABA en células amacrinas colinérgicas.

Nosotros hemos comprobado que no todas las células horizontales de la retina adulta del Pollo contienen GABA. Con las técnicas que hemos empleado no podemos pronunciarnos sobre el tipo de células horizontales que contiene GABA con excepción del tipo I cuyo axón hemos observado que aparece marcado (Al-bahech, 1991), al igual que ocurría en el Gato con el tipo B de células horizontales (Chun y Wassle, 1989b). Comparativamente con lo que ocurre en otras especies animales el tipo II también sería inmunoreactivo al GABA, sin embargo ésta es una hipótesis que no podemos confirmar. En cualquier caso, el hecho de que no todas las células horizontales en el pollo sean GABAérgicas es muy importante para comprender los distintos circuitos neuronales a nivel de capa plexiforme externa y la participación de los mismos en la detección del movimiento visual (Egelhaaf y cols., 1990).

La expresión de inmunorreactividad para el GABA como hemos mostrado en los resultados cambia desde el momento del nacimiento del pollo hasta que éste es adulto, aproximadamente un mes después de la eclosión. Sin embargo, las variaciones sobre el contenido del GABA que muestra las células de la retina adulta del pollo aunque no tenemos capacidad para interpretarlas pensamos que están exclusivamente en relación con las necesidades funcionales que requieren

los circuitos de inhibición de la retina y el cerebro.

CONCLUSIONES

1. El GABA comienza a observarse inmunohistoquímicamente en la retina central-dorsal de los embriones de pollo de 6 días de incubación.
2. Las interneuronas de la retina (células horizontales y células amacrinas), expresan GABA desde el momento en que se sueltan de la superficie ventricular.
3. Entre E-6 y E-11,5, todas las células amacrinas colinérgicas que migran a través del neuroepitelio de la retina y/o de las capas nuclear interna y plexiforme interna, muestran contenido de GABA. Cuando finaliza el proceso de migración neuronal (E-12), la expresión de GABA se reduce considerablemente.
4. Las células primero contienen GABA y las mismas expresan después ChAT. La colocalización de ambas sustancias en estas fases iniciales del desarrollo, sugieren para el GABA un importante papel regulador de los receptores de acetil-colina.
5. El desarrollo del GABA y de la ChAT en la retina del pollo sigue los gradientes generales de neurogénesis y diferenciación descritos: temporal-nasal, dorsal-ventral, central-periférica, interno-externo.
6. A partir de E-13/14, que es cuando las células horizontales se diferencian

en los tres tipos que posee la retina del pollo, sólo algunas de estas interneuronas contienen GABA. Las uniones sinápticas que realizan las neuronas, determinan en patrón de expresión definitivo del GABA en la retina.

7. La retina del pollo adulto de un mes muestra un contenido de GABA muy distinto al que presenta durante los estadios finales del desarrollo o en el pollo recién nacido. Así, en muchas zonas de la retina ventral nasal, las células horizontales no contienen GABA. Tampoco las células amacrinas desplazadas de la retina periférica lo expresan. Los cambios definitivos sobre el patrón de expresión de GABA en la retina adulta, interpretamos que están relacionados con la maduración funcional de las capas plexiforme interna y externa de la retina.

8. Nuestros resultados demuestran claramente que el GABA juega un importante papel como morfógeno durante el desarrollo de la retina. Posiblemente activando y regulando la formación de filopodios y lamelipodios durante el proceso de migración celular y facilitando el crecimiento y los contactos sinápticos en la fase de diferenciación.

9. Cuando inhibimos durante el desarrollo, los receptores GABA-A con Bicuculina, las capas internas de la retina no se desarrollan normalmente. Aparece una disminución del número de células y del grosor de las capas.

Tampoco hay expresión de GABA en la mitad interna de la capa nuclear interna y en la capa de células ganglionares.

10. La inhibición con Phaclofen de los receptores GABA-B durante el desarrollo, no produce grandes alteraciones en la morfología celular ni en la estructura de la retina. No obstante, desaparece la expresión de GABA en las células horizontales y en algunas subpoblaciones de células amacrinas. Las únicas células que contienen GABA son las amacrinas colinérgicas tipo I y II.

11. La inyección durante el desarrollo de agonistas del GABA o del propio GABA, no altera ni modifica el desarrollo de la retina ni su expresión GABAérgica.

BIBLIOGRAFÍA

AL-BAHECH, A. (1991) *Patrones de inmunorreactividad GABA durante el desarrollo de la retina del pollo. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.*

ARAKI, M. and KIMURA, H. (1991) *GABA-like immunoreactivity in the developing chick retina: differentiation of GABAergic horizontal cell and its possible contacts with photoreceptors. Journal of Neurocytology 20, pp. 345-355.*

BAKER, P.C. (1965) *Changing serotonin levels in developing Xenopus laevis. Acta Embryol. Morph. Exp., 8: 197-204.*

BAKER, P.C. and QUAY, W.C. (1969) *5-OH-Tryptamine metabolism in early embryogenesis, and the development of brain and retinal tissues. Brain Res 12:273-295.*

BELHAGE, B., HANSEN, G. H., MEIER, E. and SCHOUSBOE, A. (1986b) *Effect of inhibitors of protein synthesis and axonal transport on THIP-induced development of GABA receptors in cultured cerebellar granule cells. In: Molecular Basis on Neural Function (Tucek, C., Stipek, S., Stastny, F. and Krivanek, J., eds.), European Society of Neurochemistry, Prague, p. 207.*

BELHAGE, B. HANSEN, G.H., SCHOUSBOE, A. And MEIER, E. (1987) *GABA agonist promoted formation of low affinity GABA receptors on cerebellar granule cells is restricted to early development. Int. J. Dev. Neurosci., 6: 125-128.*

BIGELOW, J.C., BROWN, D.C. and WIGHTMAN, R.M. (1984) *Gamma-aminobutyric acid stimulates the release of endogenous ascorbic acid from rat striatal tissue. J. Neurochem. 42:412-419.*

- BITTINGER, H., FROESTL, W., HALL, R., KARLSSON, G., KLEBS, K., OLPE, H.R., POZZA, M.F., STEINMANN, M.W. and VAN RIEZEN, H. (1990)** *Biochemistry, electrophysiology and pharmacology of a new GABA_B antagonist: CGP 35348. In: GABA_B Receptors in Mammalian Function (N.G. Bowerly, H. Bittinger and H.R. Olpe, eds.), p. 47-60. John Wiley, New York.*
- BONANNO, G. and RAITERI, M. (1986)** *GABA enhances acetylcholine release from hippocampal nerve endings through a mechanism blocked by a GABA uptake inhibitor. Neurosci. Lett. 70:360-363.*
- BONANNO, G. and RAITERI, M. (1993b)** *Multiple GABA_B receptors. TIPS 14: 259-261.*
- BRADFORD, H.F. (1988)** *Fundamentos de Neuroquímica. Editorial Labor, S.A. Barcelona. P. 218-222.*
- BRECHA, N.C. and WEIGMANN, C. (1991)** *GABA-A receptor subunit immunoreactivities in the rabbit retina. Invest. Ophthalmol. Vis Sci. (Suppl.) 32: 1189.*
- BUZNIKOV, G.A., KOST, A.N., KUCHEROVA, N.F., MNDZHOYAN, A.L., SUVOROV, N.N., BERDYSHEVA, L.V. (1978)** *The role of neurohumours in early embryogenesis III. Pharmacological analysis of the role of neurohumours in cleavage divisions. J. Embryol. Exp. Morph. 23:549-569.*
- BUZNIKOV, G.A. (1984)** *The action of neurotransmitters and related substances in early embryogenesis. Pharmac. Ther. 25: 23-59.*
- CHUN, M.H. and WASSLE, H. (1989)** *GABA-like immunoreactivity in the cat retina: electron microscopy. J. Comp. Neurol., 279: 55-67.*

CLARKE, P. G. H. (1985) *Neuronal death in the development of the vertebral nervous system. Trends Neurosci.* 8: 345-349.

CODE, R.A., BURD, G.D. and RUBEL, E.W. (1989) *Development of GABA-immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of the chick: Ontogeny of gradients in terminal staining. J. Comp. Neurol.*

COWAN, W.M., FAWCETT, J.W., O'LEARY, D.D.M. and STANFIELD, B.B. (1984) *Regressive events in neurogenesis. Science,* 225: 1258-1265.

CRICK, F. (1970) *Diffusion in embryogenesis. Nature,* 225: 420-422.

DAMES, W., JOO, F., FEHER, O., TOLDI, J. and Wloff, J.R. (1985) *Gamma-aminobutyric acid enables synaptogenesis in the intact superior cervical ganglion of the adult rat. Neurosci. Lett.* 54: 159-164.

DARVAS, Z., SWYDAN, R: and CSABA,G. (1985) *Influence of benzodiazepine (diazepam) by single and repeated treatment on the growth of Tetrahymena. Biomed. Biochim. Acta,* 11/12 (Suppl.): 1725-1728.

DAVIDOFF, M.S. and SCHULZE, W. (1988) *Coexistence of GABA- and choline acetyltransferase (ChAT)-like immunoreactivity in the hypoglossal nucleus of the rat. Histochemistry,* 89: 25-33.

DEEB,S.S. (1972) *Inhibition of cleavage and hatching of sea urchin embryos by serotonin. J. Exp. Zool.,* 181: 79-87.

DUTAR, P. and NICOLL, R.A. (1988b) *Pre- and postsynaptic GABA-B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. Neuron,* 1: 585-591.

EGELHAAF, M., BORST, A. and PILZ, B. (1990) *The role of GABA in*

detecting visual motion. Brain Res., 509: 156-160.

EMANUELSSON, H. (1976) *Serotonin in chick embryo cells during early embryogenesis. J. Cell Biol., 70: 131a.*

FABRO, S.F. and RINALDINI, L.M. (1965) *Loss of ascorbic acid synthesis in embryonic development. Dev. Biol., 11: 468-488.*

FARKAS, Z., KASA, P., BALCAR, V.J., JOO, F. And WOLFF, J.R. (1986) *Type A and type B GABA receptors mediate inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerve terminals in the superior cervical ganglion of rat. Neurochem. Int., 8:565-572.*

FRANQUINET, R. and MARTELLY, I. (1985) *Effects of serotonin and catecholamines on RNA synthesis in planarians; in vitro and in vivo studies. Cell Differentiation, 10: 201-209.*

GENIS-GALVEZ, J.M., PUELL, L. and PRADA, C. (1977) *Inverted (displaced) retinal amacrine cells and their embryonic development in the chick. Experimental Neurology, 56: 151-157.*

GODIN, L. And GIPOULOUX, J.D. (1986) *Notochordal catecholamines in exogastrulated Xenopus embryos. Dev. Growth Diff., 28: 137-142.*

GOLDMAN, M.E., GUNDERSON, R.E., ERICKSON, C.K. and THOMPSON, G.A. (1981) *High-performance liquid chromatographic analysis of catecholamines in growing and non-growing Tetrahymena pyriformis. Biochim. Biophys. Acta, 676: 221-225.*

GREFERATH, U., GRÜNERT, U., FRITSCHY, J.M., STEPHENSON, A., MÖHLER, H. and WÄSSLE, H. (1995) *GABA-A receptor subunits have*

differential distributions in the rat retina: in situ hybridization and immunohistochemistry. J. Comp. Neurol., 353: 553-571.

GURAM, M.S., GILL, T.S. and GEBER, W.F. (1982) Comparative teratogenicity of clordiazepoxide, amitriptyline and a combination of the two compounds in the fetal hamster. *Neurotoxicology, 3: 83-90.*

GUSTAFSON, T. and TONEBY, M. (1970) On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis. *Exp. Cell. Res., 62: 102-117.*

GUSTAFSON, T. and TONEBY, M. (1971) How genes control morphogenesis. *Am. Sci., 59:452-462.*

HANSEN, H. G., MEIER, E. and SCHOUSBOE, A. (1984) GABA influences the ultrastructure composition of cerebellar granule cells during development in culture. *Int. J. Devl. Neuroscience, 2: 247-257.*

HANSEN, H.G., BELHAGE, B., SCHOUSBOE, A. And Meier, F. (1988) Gamma-aminobutyric acid agonist-induced alterations in the ultrastructure of cultured cerebellar granule cells is restricted to early development. *J. Neurochem., 51: 243-245.*

HILL, D.R. and BOWERY, N.G. (1986) GABA-receptor -mediated functional responses in peripheral tissues. S.L. Erdo and N.G. Bowery (Eds.): *GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery. Raven Press, New York, p. 87-97.*

HILLS. J.M., DINGS DALE, R.A. and HOWSON, E. (1989) 3-Aminopropylphosphinic acid inhibits the cholinergic twitch in the guinea-pig ileum through GABA-B receptor agonist action. *Br. J. Pharmacol. 96: 51p.*

HOKOÇ, J.N., VENTURA, A.L.M., GARDINO, P. and DeMELLO, F.G. (1990) *Developmental immunoreactivity for GABA and GAD in the avian retina: possible alternative pathway for GABA synthesis. Brain Res., 532: 197-202.*

HOLTFRETER, J. (1968) *On mesenchyme and epithelia in inductive and morphogenetic processes. In R. Fleischmajer and R.E. Billingham (Eds.) Epithelial-Mesenchymal Interactions, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 1-30.*

IGNARRO, L. J. and SHIDEMAN, F. E. (1968a) *Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in embryonic and developing chick. J. Pharmacol. Exp. Ther., 159: 49-58.*

JURAND, A. (1980) *Malformations of the central nervous system induced by neurotropic drugs in mouse embryos. Dev. Growth Diff., 22: 61-78.*

KASA, P., DAMES, W., RAKONCZAY, Z., GULYA, K., JOO, F. and WOLFF, J.R. (1985) *Modulation of the acetylcholine system in the superior cervical ganglion of rat: effects of GABA and hypoglossal nerve implantation after in vivo GABA treatment. J. Neurochem., 44: 1363- 1372.*

KASSCHOU, M.R. and MANSOUR, T.E. (1982) *Serotonin-activated adenylate cyclase during early development of Schistosoma mansoni. Nature, 296: 66-68.*

KERR, D.I., ONG, J., PRAGER, R.H., GYNTHNER, B.D. and CURTIS, D.R. (1987) *Phaclofen: A peripheral and central baclofen antagonist. Brain Res. 405: 150-154.*

KERR, D.I., ONG, J., JOHNSTON, G.A.R., ABBENANTE, J. and PRAGER,

- R.** (1989a) Antagonism at GABA_B receptors by saclofen and related sulphonic analogs of baclofen and GABA. *Neurosci. Lett.* 107: 239-244.
- KNAACK, D., SHEN, I., SALPETER, M.M. and PODLESKI, T.R.** (1986) Selective effects of ascorbic acid on acetylcholine receptor number and distribution. *J. Cell. Biol.*, 102: 795-802.
- LANDAUER, W.** (1975) Cholinomimetic teratogens: studies with chick embryos. *Teratology.* 12: 125-146.
- LANDAUER, W.** (1976) Cholinomimetic teratogens III. Interaction with aminoacids known as neurotransmitters. *Teratology* 13: 41-46.
- LAUDER, J. M.** (1988) Neurotransmitters as morphogens. In G.J. Boer, M.G.P. Feenstra, M. Mirmiran, D.F. Swaab and F. Van Haaren (Eds.) *Progress in Brain Research, Elsevier Science Publishers B.V., Vol. 73: 364-387.*
- LAUDER, J.M. and KREBS, H.** (1984) Humoral influences on brain development. *Adv. Cell. Neurobiol.*, 5:3-51.
- LAWRENCE, L.E.,Jr. And BURDEN, H.W.** (1973) Catecholamines and morphogenesis of the chick neural tube and notochord. *Am. J. Anat.*, 137: 199-208.
- LING, E.A. and LeBLOND, C.P.** (1973) Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *J. Comp. Neurol.*, 149: 73-82.
- LIPTON, S.A. and KATER, S.B.** (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends in Neurosciences*, 12(7):

265-270.

MACDONALD, R.L. and TWYMAN, R.E. (1991) *Biophysical properties and regulation of GABA-A receptor channels. Semin Neurosci, 3: 219-230.*

MANSOUR, T.E. (1983) *Serotonin receptors in trematodes: characterization and function. In T.P. Singer, T.E. Mansour and R.N. Ondarza (Eds.). Mechanism of Drug Action, Academic Press, New York, pp. 197-205.*

MARIANI, A.P., COSENZA-MURPHY, D. and BARKER, J.L. (1987) *GABAergic synapses and benzodiazepine receptors are not identically distributed in the primate retina. Brain Res. 415: 153-157.*

MARIANI, A. and LEURE du-PREE, A. (1977) *Horizontal cells of the pigeon retina. J. Comp. Neurol., 175, 13.*

MATTSON, M. P., DOU, P. and Kater, S.B. (1988) *Outgrowth regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. J. Neurosci. 8: 2087-2100.*

McMAHON, D. (1974) *Chemical messengers in development: a hypothesis. Science, 185: 1012-1021.*

MEIER, E., DREJER, J. and SCHOUSBOE, A. (1984) *GABA induces functionally active low-affinity GABA receptors on cultured cerebellar granule cells. J. Neurochem., 43: 1737-1744.*

MEIER, E., HANSEN, G. H. and SCHOUSBOE, A. (1985) *The trophic effect of GABA on cerebellar granule cells is mediated by GABA-receptors. Int. J. Devl. Neurosci., 3: 401-407.*

MEIER, E., HERTZ, L. and SCHOUSBOE, A. (1991) *Neurotransmitters as*

developmental signals. Neurochem. Int., Vol.19, no.12, pp. 1-15.

MEIER, E. AND JORGENSEN, O.S. (1986) *Gamma-aminobutyric acid affects the developmental expression of neuron-associated proteins in cerebellar granule cell cultures. J. Neurochem., 46: 1256-1262.*

MEIER, E. and SCHOUSBOE, A. (1982) *Differences between Gaba receptor binding to membranes from cerebellum during postnatal development and from cultured cerebellar granule cells. Dev. Neurosci., 5: 546-553.*

MESSERSMITH, E.K. and REDBURN, A.D. (1993) *The role of GABA during development of the outer retina in the rabbit. Neurochemical Res., 18-4, 463-470.*

MICHLER-STUKE, A. and WOLFF, J. R. (1987) *Facilitation and inhibition of neurite elongation by GABA in chick tectal neurons. In: Neurotrophic Activity of GABA during Development (Redburn, D. A. and schousboe, A., eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 253-266.*

MORSE, D.E., HOOKER, N. DUNCAN, H: and JENSEN, L. (1979) *Gamma-amino-butinic acid, a neurotransmitter, induces plactonic abalonae larvae to settle and begin metamorphosis. Science, 204: 407-410.*

MOSINGER, J.L., YAZULLA, S. and STUDHOLME, K.M. (1986) *GABA-like immunoreactivity in the vertebrate retina: a species comparison. Exp. Eye Res., 42: 631-644.*

MÜLLER, W.A., MITZE, A., WICKHORST, J.P. and MEIER-MENGE, H.M. (1977) *Polar morphogenesis in early hydroid development: action of caesium, of neurotransmitters and of an intrinsic head activator on pattern formation.*

W. Roux's Arch., 182: 311-328.

NEWGREEN, D. F., ALLAN; I. J., YOUNG, H. M. and SOUTHWELL, B. R.

(1981) *Accumulation of exogenous catecholamines in the neural tube and non-neural tissues of the early fowl embryo. Correlation with morphogenetic movements. W. Roux's Arch.*, 190: 320-330.

OBATA, K., OIDE, M. And TANAKA, H. (1978) *Excitatory and inhibitory*

action of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture.

Brain Res., 144: 179-184.

OLSEN, R.W. and TOBIN, A.J. (1990) *Molecular biology of GABA-B*

receptors. FASEB J, 4: 1469-1480.

PALEN, K., THORNEBY, L. and EMANUELSSON, H. (1979) *Effects of*

serotonin and serotonin antagonists in chick embryogenesis. W. Roux's

Arch., 187: 89-103.

PARISI, E., De PRISCO, P., CAPASSO, A. and DEL PRETE, M. (1984)

Serotonin and sperm motility. Cell Biol. Int. Rep., 8: 95.

PISANO, M. M. and GREENE, R. M. (1985) *Hormone and growth factor*

involvement in craniofacial development. IRCS Med. Sci., 14: 635-640.

PATTERSON, P.H.(1988) *Neuron*,1: 263-267.

PRADA ,F., PUELLES, L. and GENIS-GALVEZ, J.M. (1981) *A Golgi study*

on the early sequence o differentiation of ganglion cells in the chick embryo

retina. Anat. Embryol., 161: 305-317.

PRADA, C., PUGA, J, PEREZ-MENDEZ, L., LOPEZ, R. and RAMIREZ, G.

(1991) *Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina.*

European Journal of Neuroscience, 3: 559-569.

RAMON Y CAJAL, S. (1892) *La rétine des vertébrés. La Cellule*, 9, 119.

RAND, J.B. and RUSSELL, R.L. (1984) Choline acetyltransferase-dependent mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 106: 227-248.

REDBURN, D.A. and SCHOUSBOE, A. (Eds.) (1987) Neurotrophic activity of GABA during development, p. 1-277. Alan R. Liss, New York.

ROBERTS, E. (1986) GABA: the road to neurotransmitter status In: Olsen, R.W. and Venter, C.J. (Eds.). *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: structural and functional properties*. New York: Alan R. Liss, p. 1-39.

ROBERTS, E. And FRANKEL, S. (1950) Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.*, 187: 55-63.

ROTH, J., LE ROITH, D., SHILOACH, J., ROSENWEIG, J.L., LESNIAK, M.A. and HAVRANKOVA, J. (1982) The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, biology. *N. Engl. J. Med.*, 306: 523-527.

SALPETER, M.M. (1987) Development and neural control of the neuromuscular junction and of the junctional acetylcholine receptor. *Neurol. Neurobiol.*, 23: 55-115.

SCHOUSBOE, A. (1972) Development of potassium effects on ion concentrations and indicator spaces in rat brain-cortex slices during postnatal development. *Expl. Brain Res.*, 15: 521-531.

SCHUETZE, S.M. and ROLE, L.W. (1987) Developmental regulation of

nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* , 10: 403-457.

SEEBURG, P., WISDEN, W., VERDOORN, T.A., PRITCHETT, D.B., WERNER, P., HERB, A., LÜDDENS, H., SPRENGEL, R. and SAKMANN, B. (1990) *The GABA-A receptor family: Molecular and functional diversity.* Cold Spring Harb. Quant. Biol. 55: 29-40.

SHEN, S.C., GREENFIELD, D. and BOELL, E. (1956) *Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogenesis.* *J. Comp. Neurol.*, 106: 433-463.

SHERIF, S. (1983) *Pharmacological control of ciliary activity in the young sea urchin larva. Cholinergic and monoaminergic effects and the role of calcium and cyclic nucleotides,* Wenner-Gren Inst., Stockholm.

SLAUGHTER, M.M. (1995) *GABA_B receptors in the Vertebrate Retina.* In: *Progress in Retinal and Eye Research.* Elsevier Science Ltd. (Eds.), Great Britain, Vol. 14(1): 293-312.

SPIRA, A.W., MILLAR, T.J., ISHIMOTO, I., EPSTEIN, M.L., JOHNSON, C.D., DAHL, J.L. and MORGAN, I.G. (1987) *Localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the embryonic chick retina.* *J. Comp. Neurol.*, 260: 526-538.

SPOERRI, P. E., GLEES, P. and DRESP, W. (1980b) *The time course of synapse formation of mouse neuroblastoma cells in monolayer cultures.* *Cell Tissue Res.*, 205: 411-421.

SPOERRI, P. E. (1988) *Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina.* *Synapse*, 2: 11-22.

STENSAAS, L. (1967) *The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of cerebral hemisphere in fetal rabbits.* J. Comp. Neurol., 129, 59.

SULLIVAN, W.D. and SULLIVAN, C.F. (1964) *The acetylcholine content and the effects of hexamethonium on this compound at various phases of division of tetrahymena pyriformis Broteria.* Cienc. Natur., 33: 17-33.

TONEY, M. (1977) *Functional aspects of 5-hydroxy-tryptamine in early embryogenesis of the sea urchin Paracentrotus lividus.* W. Roux's Arch., 181: 247-259.

TURING, A.M. (1952) *The chemical basis of morphogenesis.* Trans. R. Soc. Lond., Ser. B, 237: 37-72.

VANEY, D.I. and YOUNG, H.M. (1988) *GABA-like immunoreactivity in cholinergic amacrine cells of the rabbit retina.* Brain Res., 438: 369-373.

VARDI, N., MASARCHIA, P. and STERLING, P. (1992) *Immunoreactivity to GABA-A receptor in the outer plexiform layer of the cat retina.* J Comp. Neurol. 320: 394-397.

VERSAUX-BOTTERI, C., HERGUETA, S., PIEAU, C., WASOWICZ, M., DALIL-THINEY, N. and NGUYEN-LEGROS, J. (1994) *Early Development of GABA-like immunoreactive cells in the retina of turtle embryos.* Dev. Brain Res., 83: 125-131.

VOGT, W. (1929) *Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung.* Roux' Arch. Entw.-Mech., 120: 384-706.

VON BARTHELD, C. S. and RUBEL, E. W. (1989) *Transient GABA*

immunoreactivity in cranial nerves of the chick embryo. J. Comp. Neurol., 286: 456-471.

WALLACE, J.A., PETRUSZ, P. And LAUDER, J.M. (1982) Serotonin immunocytochemistry in the adult and developing rat brain: methodological and pharmacological considerations. *Brain Res. Bull., 9: 117-129.*

WEE, E.L., BABIARZ, B.S., ZIMMERMAN, S. And ZIMMERMAN, E.F. (1979) Palate morphogenesis IV. Effects of serotonin and its antagonists on rotation in embryo culture. *J. Embryol. Exp. Morph., 53: 75-90.*

WEE, E.L., PHILLIPS; N.J., BABIARZ, B.S. and ZIMMERMAN, E.F. (1980) Palate morphogenesis V: Effects of cholinergic agonists and antagonists on rotation in embryo culture. *J. Embryol. Exp. Morph., 58: 177-193.*

WEE, E.L. and ZIMMERMAN, E.F. (1983) Involvement of GABA in palate morphogenesis and its relation to diazepam teratogenesis in two mouse strains. *Teratology, 28: 15-22.*

WEE, E.L., NORMAN, E.J. and ZIMMERMAN, E.F. (1986) Presence of gamma-aminobutyric acid in embryonic palates of AK and SWV mouse strains. *J. Craniofacial Genet. Dev. Biol., 6: 53-61.*

WISDEN, W. and SEEBURG, P.H. (1992) GABA-A receptor channels : From subunits to functional entities. *Corr. Op. Neurobiol., 2: 263-269.*

WOLFF, J. R., JOO and F. DAMES, W. (1978) Plasticity in dendrites shown by continuous GABA administration in superior cervical ganglion of adult rat. *Nature, 274: 72-74.*

WOLFF, J. R., JOO, F., DAMES, W. and FEHER, O. (1979) Induction and

maintenance of free postsynaptic membrane thickenings in the adult superior cervical ganglion. J. Neurocytol., 8: 549-563.

WOLFF, J.R., JOO, F. And KASA, P. (1987) *Synaptic , metabolic and morphogenetic effects of GABA in the superior cervical ganglion of rats. In D.A. Redburn and A. Schousboe (eds.): Neurotrophic Activity of GABA during Development. Neurol. Neurobiol., Vol. 32. New york: Alan R. Liss, Inc., p. 221-252.*

YAZULLA, S., STUDHOLME, K.M., VITORICA, J. and DeBLAS, A.L. (1989) *Immunocytochemical localization of GABA-A receptors in goldfish and chicken retinas. J. Comp. Neurol. 280: 15-26.*

YU, B.C.Y., WATT, C.B., LAM, D.M.K. and FRY, K.R. (1988) *GABAergic ganglion cells in the rabbit retina. Brain Res., 439: 376-382.*

ZIMMERMAN, E.F., WEE, E.L., PHILLIPS, N. And ROBERTS, N. (1981) *Presence of serotonin in the palate just prior to shelf elevation. J. Embryol. Exp. Morphol., 64: 233-250.*

ZIMMERMAN, E. F. and WEE, E. L. (1984) *Role of neurotransmitters in palate development. In Zimmerman, E. F. (Ed.), Current Topics in Developmental Biology: Vol. 19, Palate Development, Academic Press, New York, pp. 37-63.*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal designado por sus señores Excmos. Presidentes en el día de la fecha, para juzgar el Tesis Doctoral de

DE ARACELI TRUEBA LAVAND
Título: Papel Morfológico del Galá durante el desarrollo de la retina del pollo,

se acordó otorgarle la calificación de APTO - CUM LAUDE

Sevilla, 15 de Octubre 1966

El Vocal,

Verano Juan-Luis

El Vocal,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]

Araceli Trueba Lavand