## FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

# ANALISIS EXPERIMENTAL DE HETEROINJERTOS DE VESICULA OPTICA EN EMBRIONES DE AVE

TESIS DOCTORAL



#### UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS
MADRID

DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO DE ANATOMIA
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

I N F O R M A: Que el trabajo titulado: "ANALISIS EXPERIMENTAL

DE HETEROINJERTOS DE VESICULA OPTICA EN EM-
BRIONES DE AVE" ha sido realizado por Don

Manuel Riaño Granero, bajo mi dirección du-
rante los años 1983-1990, en los laborato--
rios de Embriología del Departamento de Cien

cias Morfológicas, reuniendo todos los requi
sitos para ser presentado y defendido como -
Tesis Doctoral.

Madrid, 15 de abril de 1991

do.: Prot. Dr. A.J. Puerta

Catedrático de Anatomía.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ACULTAD DE MEDICINA
RTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

MADRID

DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO-DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD DE MEDI-CINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

I N F O R M A:Que el trabajo titulado: "ANALISIS EXPERIMENTAL

DE HETEROINJERTOS DE VESICULA OPTICA EN EMBRIO
NES DE AVE " presentado por Don Manuel Riaño 
Granero reune las condiciones para ser presenta

do y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, 15 de abril de 1991

Prof. Dr. A.J. Puerta Fonollá

tedrático-Director Departamento.

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Prof. J. PUERTA FONOLLA

ANALISIS EXPERIMENTAL DE HETEROINJERTOS DE VESICULA OPTICA EN EMBRIONES DE AVE

Trabajo de investigación para optar al grado de Doctor.

Presentado por: MANUEL RIAÑO GRANERO



#### **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. J. Puerta Fonollá, Director de esta Tesis Doctoral, son muchas las cosas que debo agradecerle; tanto la confianza que puso en mi cuando entré en la Cátedra I de Anatomía y su amistad personal, como la facilidad que tiene para enseñar e inculcar su entusiasmo por la Embriología y la Investigación.

Con el ejemplo del Prof. L. Fernandez-Vega Sanz, aprendí que la dedicación, la constancia y el trabajo diarios, son fundamentales para cualquier proyecto. Las facilidades que me ha dado, su comprensión y apoyo han contribuído a facilitar el trabajo de investigación.

Sólo con palabras no se puede expresar el agradecimiento y admiración que siento por José Alfonso; sus consejos. ayuda, dedicación y sobre todo su amistad inquebrantable a lo largo de los años, hace que esta Tesis Doctoral sea tan suya como mía.

A Carmen Benito y Alicia Cerro por la perfecta labor Histológica. Especialmente a Carmen, pues como profesional su presencia en el Laboratorio da la confianza del trabajo bien hecho y porque, a pesar de la dura prueba que atravesó, como persona siempre ha tenido una palabra de ánimo y el tiempo necesario para atendernos a todos; gracias.

A todo el personal de la Cátedra I de Anatomía por el grato ambiente de trabajo y en especial a los Dres. Angel Peña, Mercedes Martínez, Juan Carlos Prados, Julia Pérez, Rosario Benítez y su esposo Miguel Amorós, Milagros del Rio, Fermín Viejo y Concepción Martínez.

A mis compañeros del Hospital General de Asturias, José Alfonso, Manuel Franco, Begoña Baamonde, Mª Angeles Santiago, Joaquín Castro, Javier Nicieza, Manuel Rodríguez, Tomás Parra, Beatriz Cabo, Ana García y Juan Carlos Gómez, por realizar el trabajo asistencial mientras realizaba la Tesis.

Por último quiero agradecer a Mª Antonia Martínez Vieira, no sólo su labor mecanográfica, sino de forma muy especial la infinita paciencia.

### INDICE

INTRODUCCION
1. Desarrollo del Globo Ocular de las Aves
1.1.Organogénesis Ocular
1.2. Vesicula Optica (Retina y Epitelio Pigmentado)
1.3.Cuerpo Vítreo
1.4.Cristalino
1.5.Córnea y Cámara Anterior
"
1.7.1ris y Cuerpo Ciliar
3. Métodos de Embriología Experimental
3.1.Cultivos y Cuerpos Extraños
3.2.Transplantes
3.3. Injertos
4. Justificación o Hipótesis de Trabajo 7:
The day of the state of the sta
MATERIAL Y METODOS 7:
RESULTADOS
1. Controles de Codorniz 90
2. Injertos 243
2.1.Método A 24
2.2.Método B 318
2.3.Método C 33
DISCUSION
1. Embrión de Codorniz
2. Injertos. Generalidades
2.1.Método A 400
Córnea 400 Cristalino 410
Retina y Epitelio Pigmentado
2.2.Método B 44
Córnea
Cristalino
Retina y Epitelio Pigmentado
2.3.Método C
Embrión 0-213 450
Cristalino 45
Retina y Epitelio Pigmentado 459
Embriones 0-227 y 0-230 $464$
<u>CONCLUSIONES</u>
BIBLIOGRAFIA

# **INTRODUCCION**

#### 1. DESARROLLO DEL GLOBO OCULAR DE LAS AVES.

#### 1.1. ORGANOGENESIS OCULAR.

La primera publicación que conocemos sobre los territorios prospectivos oculares de las aves data de 1.817, donde PANDER afirma que en los embriones de pollo, las vesículas ópticas se forman a partir de unas evaginaciones laterales del tubo neural.

HUNT (1931) y STEIN (1933), obtienen esbozos oculares al injertar, en corioalantoides, tejido de la zona media adyacente al nódulo de Hensen y de la región más anterior de la prolongación cefálica, procedentes de un embrión de pollo en estadío de línea primitiva.

En las aves la placa precordal induce la formación de los esbozos oculares. Este dato es demostrado por ORTS LLORCA y NAVARRINA (1969), al obtener sinoftalmías tras extirpar parte de la placa precordal en embriones de pollo.

Para BALINSKI (1958), en los anfibios la placa precordal es también la responsable de regular el tamaño del globo ocular.

Actualmente se admite que en las aves, los territorios prospectivos oculares, se encuentran a ambos lados de la zona más anterior de la placa neural, detrás del pliegue neural transverso y muy cerca de la línea primitiva (BALINSKI, 1961).

Las vesículas ópticas surgen como dos evaginaciones en las partes laterales del futuro Prosencéfalo antes de que éste se divida en Telencéfalo y Diencéfalo, en el estadio de 5 pares de somitos (ALEXANDER, 1937). Las evaginaciones crecen

lateralmente, transformandose en vesículas ópticas primarias (estadío 9 HH, 7 pares de somitos, 30 horas de incubación), (HAMILTON, 1952; HILFER, 1983).

Debido al crecimiento lateral de las vesículas ópticas primarias, éstas alcanzan el ectodermo suprayacente por lo que ambas estructuras se ponen en íntimo contacto separadas solamente por sus respectivas membranas basales, cuando el embrión tiene entre 10 y 18 pares de somitos (ALEXANDER, 1937; REDSLOB, 1935; WEISS y JACKSON, 1961).

A partir de ese momento, las vesículas ópticas primarias inducen, en el ectodermo superficial, la formación de la placoda cristaliniana (ALEXANDER, 1937; AMPRIMO, 1949; McKEEHAN, 1951).

Los pedículos ópticos situados en la base de las vesículas ópticas, con el crecimiento se alargan, disminuyen de calibre y se incurvan para quedar completamente formados en fases posteriores del desarrollo (estadío 12 HH, 16 pares de somitos). A través de los pedículos ópticos salen las fibras ópticas, formadas por los axones de las células ganglionares. Los primeros axones llegan al pedículo óptico entre el 3º y 5º día de incubación (ROGERS, 1957; KISTLER y LA VAIL, 1979).

Las vesículas ópticas primarias presentan en su interior un espacio hueco denominado ventrículo óptico, que se comunica con el ventrículo diencefálico a través de la luz de los pedículos ópticos.

#### 1.2. VESICULA OPTICA. (RETINA Y EPITELIO PIGMENTADO)

La vesícula óptica primaria presenta una pared proximal y otra distal. Cuando la pared distal se pone en contacto con el ectodermo superficial, induce la formación de la placoda cristaliniana y después ambas estructuras comienzan a invaginarse. A partir de ese momento hablamos ya de vesícula óptica secundaria y vesícula cristaliniana.

La firme unión entre las membranas basales de la pared distal de la vesícula óptica primaria y de la placoda cristaliniana, parece ser esencial para la invaginación normal de ambas estructuras (LOPASHOV, 1963).

La muerte celular es uno de los mecanismos básicos del desarrollo. Aparece durante la invaginación, fusión y separación de los esbozos embrionarios (GLÜCKSMANN, 1951).

Existen algunos experimentos sugerentes de que durante el desarrollo de los tejidos, las áreas necróticas son reguladas por factores intrínsecos y/o extrínsecos (HINCHLIFFE, 1981; BEAULATON y LOCKSHIN, 1982)

En mamíferos, SILVER y HUGHES (1973) observaron que durante la invaginación de la placoda cristaliniana y de la vesícula óptica primaria, la degeneración celular es máxima en la parte ventral de estos esbozos. Esto parece demostrar que para la morfogénesis normal del ojo, es necesaria una relación temporo-espacial entre las áreas necróticas de la retina y del cristalino.

En los embriones de pollo SCHOOK (1980a y b), encontró dos áreas de muerte celular durante la formación de la vesícula óptica secundaria y de la fisura óptica (estadíos

13-18 HH). Ambas están localizadas en la parte ventral de la pared externa de la vesícula óptica y en la zona de inserción del pedículo óptico en el diencéfalo. Sin embargo, GARCIA-PORRERO y OJEDA (1979) y GARCIA-PORRERO y cols. (1984), describen otra zona de muerte celular que se localiza en la parte dorsal de la vesícula óptica secundaria; es decir, en el esbozo de la retina.

La invaginación de la vesícula óptica primaria comienza cuando el embrión de pollo tiene entre 20 y 21 pares de somitos (McKEEHAN, 1951; O'RAHILLY y MEYER, 1955; HILFER, 1983) o entre 21 y 25 (RABL, 1889) y finaliza cuando se oblitera la luz del ventrículo óptico por contacto de ambas capas de la vesícula óptica secundaria (30 pares de somitos, estadío 17 HH) (O'RAHILLY y MEYER, 1955).

En la región ventro-caudal de la vesícula óptica secundaria aparece una pequeña depresión que aumenta de tamaño con el crecimiento de la vesícula óptica. Esta depresión que conocemos como fisura óptica (fisura coroidea o hendidura coroidea), se extiende desde el borde de la vesícula óptica hasta el pedículo óptico y tiene una importancia fundamental, pues es el camino que van a seguir las fibras ópticas para introducirse en el pedículo óptico y alcanzar el sistema nervioso central (tectum óptico).

Debido a la presencia de la fisura óptica, la vesícula óptica secundaria crece al principio de forma irregular; pero una vez que se ha cerrado, la región ventral crece rápidamente y a partir de ese momento mantiene un desarrollo uniforme.

La vesícula óptica secundaria presenta dos capas, una externa (antigua pared proximal de la vesícula óptica primaria) que dará lugar al epitelio pigmentado y otra interna (antigua pared distal de la vesícula óptica primaria) de donde se van a diferenciar la retina neurosensorial (pars optica retinae) y la retina ciega (pars caeca retinae) que no guarda relación directa con la visión.

El desarrollo de la retina se inicia cuando la vesícula óptica primaria comienza a invaginarse (estadío 14 HH, 22 pares de somitos) para formar la vesícula óptica secundaria. En ese momento se observa un aumento del espesor de la capa interna de la vesícula óptica. El crecimiento, debido al incremento en el número de mitosis, comienza en la zona central y se extiende hacia la perifería. (WEYSSE Y BURGESS, 1906).

Todos los autores coinciden en afirmar que existen tres fases en el desarrollo histológico de la retina del embrión de pollo.

- F1.- Fase exponencial: La curva de crecimiento celular es lineal.
- F2.- Fase de diferenciación: Comienza la diferenciación celular específica.
  - F3.- Fase final: E1 número de células ya no varía.

Las discrepancias surgen cuando se delimita la duración de las fases. Para WEYSSE y BURGESS (1906), la F1 comprende entre el  $2^{\circ}$  y el  $8^{\circ}$  día; la F2 entre el  $8^{\circ}$  y  $10^{\circ}$  día y la F3 desde el  $10^{\circ}$  al final de la incubación (día 21); en cambio, para MORRIS y COWAN (1984), la F1 (3° y 5° día), la F2 (5° y

 $10^{\circ}$  día) y 1a F3 ( $10^{\circ}$  y  $14^{\circ}$  día).

La retina de las aves adultas está formada por una cadena de tres células: Fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares (RAMON y CAJAL, 1888). Existen además otras células que regulan las sinapsis; así las células horizontales regulan las sinapsis entre los fotorreceptores y las bipolares y las células amacrinas lo hacen entre las bipolares y las ganglionares. Por último, existen las células de Müller que constituyen el elemento glial de la retina.

Normalmente hay dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones. A pesar de que estas células son el primer eslabón de la cadena no son consideradas como neuronas, por lo tanto la primera neurona de la vía óptica son las células bipolares y la segunda las células ganglionares.

En los primeros estadíos del desarrollo, la capa interna de la vesícula óptica presenta un solo tipo celular, los neuroblastos, a partir de ellos se van a diferenciar todas las células de la retina.

Las células ganglionares son las primeras que aparecen en tercer día de incubación (18-19 HH) (RAMON y CAJAL, FUJITA y HORII, 1963; KAHN, 1973) y dos o tres días después completan su actividad mitótica. Algo más retrasadas que células ganglionares, aunque también en el tercer día (20 HH), aparecen células horizontales. las amacrinas los fotorreceptores (KAHN, 1974). Las neuronas de asociación finalizan 1as mitosis hacia el octavo día de incubación (34 HH) (FUJITA y HORII, 1963) y los fotorreceptores en el séptimo (30-31 HH).

Las células bipolares son las últimas que aparecen en el sexto día (28-29 HH), completando sus mitosis hacia el noveno día (35 HH) (KAHN, 1974).

Capítulo aparte merece la delimitación de las capas de la retina. Si dejamos aparte la capa pigmentada que aparece durante el 4º día (22-23 HH) y de la que nos ocuparemos más tarde, en el tercer día vemos la capa de células ganglionares y una capa de fibras ópticas (HUGHES y LAVELLE, 1975). En el 4º día se añaden dos capas de neuroblastos.

En el 5º día (25-27 HH) podemos distinguir ya cinco capas (limitante externa, neuroblastos de fotorreceptores, neuroblastos de horizontales y amacrinas, células ganglionares y capa de fibras ópticas) (O'RAHILLY y MEYER, 1959). En el 6º día (28-29 HH) aparecen las células bipolares, mientras que las ganglionares se han extendido ya, por toda la retina (COULOMBRE, 1955).

Las células horizontales y amacrinas se diferencian en el séptimo día (30-31 HH), a partir de los neuroblastos comunes, últimas distribuvendo estas sus ramificaciones en 1a plexiforme interna hacia el 8º día (33-34 HH) (HUGHES y LAVELLE, 1974). En el 9º día (35 HH) aparece la plexiforme externa (HUGHES y LAVELLE, 1975). Finalmente en el 10º día de incubación (36 HH) se pueden delimitar todas las capas de retina, aunque haya células que no están completamente diferenciadas, como ocurre con los fotorreceptores, que en el día sobrepasan la limitante externa y en el 10º día comienzan a diferenciarse los artículos externos.

En relación con las sinapsis, parece ser, que no se establecen funcionalmente en la retina hasta los días 13 y 14 de incubación (39-40 HH) y son las que tienen lugar entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares en la capa plexiforme interna (SHEFFIELD y FISCHMAN, 1970; HUGHES y LAVELLE, 1974; HORDER y MASHKAS, 1982).

Las células ganglionares mandan los primeros axones al pedículo óptico entre el 3º y 5º día de incubación (ROGERS, 1957; KISTLER y LA VAIL, 1979).

Hemos visto que la capa interna de la vesícula óptica secundaria da lugar a la retina neurosensorial (pars optica retinae) y a la retina ciega (pars caeca retinae). La retina ciega es la continuación, hacia delante, de la retina neurosensorial y tapiza por dentro al epitelio pigmentado de la región anterior de la coroides (pars plana retinae), del cuerpo ciliar (pars ciliaris retinae) y del iris (pars iridae retinae).

La transición entre las retinas visual y ciega se conoce como *pars terminalis retinae* y no como *ora serrata* de los mamíferos, ya que en las aves no tiene forma de sierra.

La retina de las aves adultas, presenta una organización similar a la del resto de vertebrados, aunque debemos matizar que es más gruesa que la de muchos animales y que sus estratos están definidos con más perfección que en otros vertebrados (WOOD, 1917).

Respecto a diferencias con los mamíferos, la más importante es la avascularidad de la retina de las aves, existiendo en su lugar el pecten, una estructura vascularizada

que desde la linea de cierre de la fisura óptica, se introduce en el espesor del cuerpo vitreo.

Entre las distintas especies de aves también existen diferencias; destacamos la presencia de más de una fóvea, especialmente en las aves de presa (ROMANOFF, 1960; PEARSON, 1972).

Desde que se inicia la invaginación de la vesícula óptica, comienzan a verse algunas diferencias entre las células de la capa interna y externa. Las células de la capa externa (esbozo del epitelio pigmentado) presentan núcleos más grandes y menor volumen citoplasmático que las células de la capa interna (esbozo de la retina). Estas últimas, sin embargo, presentan mayor número de mitosis.

Entre el tercer y cuarto día de incubación (18-22 HH), la región central de la capa externa, presenta una sola hilera de células cúbicas; mientras que en los bordes, la vesícula es más gruesa y existen dos hileras de células que mantienen la actividad mitótica hasta que finaliza el crecimiento del globo ocular. (WEYSSE y BURGESS, 1906).

En trabajos realizados por HARRISON (1952), se ha demostrado que *in vitro* las células procedentes de la capa externa de vesículas ópticas derechas de embriones de pollo, presentan una tendencia inherente a pigmentarse antes que las células que proceden de las vesículas ópticas izquierdas.

En el embrión de pollo los primeros granos de pigmento en la capa externa de la vesícula óptica, se observan entre las 64 y 72 horas de incubación (KEIBEL y ABRAHAM, 1900; TELLO, 1923; KUSAGAWA, 1927); aunque otros autores sitúan la

pigmentación en estadíos posteriores del desarrollo (KESSLER, 1877; WEYSSE y BURGESS, 1906; O'RAHILLY y MEYER, 1959). Cuando se inicia la pigmentación las células pierden la forma cúbica y se van aplanando (SMITH, 1929).

La pigmentación es visible macroscópicamente en los estadios 21-22 HH (HAMILTON, 1952) y 23 HH (O'RAHILLY y MEYER, 1955).

La localización de los primeros granos de pigmento y su extensión varía. Para SLONAKER (1921), en el gorríon la pigmentación progresa desde los bordes de la vesícula óptica hasta la región central; mientras que en el embrión de pollo tiene lugar en dirección opuesta; es decir del fondo a los bordes de la vesícula óptica (LEPLAT, 1914; HAMILTON, 1952).

La mayor parte de los autores están de acuerdo 1a los granos de pigmento en el interior situación de de 1as células. En los bordes de la vesícula óptica el pigmento en la superficie interna de las células; mientras que localiza en la zona central se encuentran en la superficie externa de las células. (SLONAKER, 1921; O'RAHILLY y MEYER, 1959).

El pecten es una estructura en forma de "abanico" que se proyecta en el interior del globo ocular de las aves.

La base del pecten se sitúa en la línea de cierre de la fisura óptica. El primer pliegue se localiza en la cabeza del nervio óptico (SZILY, 1922). En la mayoría de las especies, su longitud es igual a la mitad del diámetro horizontal del globo ocular, aunque en algunos casos llega a contactar con la cápsula posterior del cristalino (PEARSON, 1972).

El borde libre del pecten aparece muy plegado pues es mucho más largo que la base.

El número de pliegues varía entre 3 y 30, pero el pollo adulto presenta aproximadamente entre 17 y 18 pliegues (MANN, 1924; HAMILTON y HAMBURGER, 1951).

Las primeras observaciones sobre el pecten fueron hechas por PETIT (1735).

El detalle histológico más importante del pecten es la rica red vascular que presenta. Los vasos sanguíneos transcurren a través de un armazón de tejido pigmentado. Los vasos y el pigmento están rodeados por una membrana que se continúa con la limitante interna de la retina, en la base del pecten (MANN, 1924a).

El origen embriológico del tejido que sirve de soporte a los vasos ha sido un tema de controversia. SLONAKER (1921), publicó que el pecten en el gorrión (passer domesticus), está asociado con la coroides y es de origen mesodérmico. BACHSICH y GELLERT (1935), piensan son células del tejido que conjuntivo, como aventuró KESSLER en 1877. BLOCHMANN y HUSEN (1911), defienden que las células pigmentadas son derivados gliales, opinión descartada por RAVIOLA y RAVIOLA (1967), al encontrar que tenían características diferentes a las células gliales del sistema nervioso central. SZILY (1922), LINDAHL y JOKL (1922) y MANN (1924a), aseguran que tienen un origen ectodérmico. O'RAHILLY y MEYER (1961), afirman que el del pollo adulto está formado por una red de vasos sanguíneos especializados y células pigmentadas que representan restos del primitivo ectodermo.

La función del pecten, es otra cuestión que ha planteado discusiones. Está claro que su misión fundamental es 1a la retina por difusión a través del nutrición de cuerpo vitreo. Esta función se ve facilitada porque e1 pecten presenta una serie de características como son: La gran cantidad de vasos sanguíneos y de pliegues y la existencia de estructuras semejantes a las "microvellosidades", que unas ofrecen una gran superficie de contacto con el vitreo (SLONAKER, 1918; MANN, 1924; WALL, 1942; DUKE-ELDER, 1958).

Para BACHSICH y GELLERT (1935), el pecten también se encarga de mantener la temperatura del globo ocular, actuando como un elemento de regulación térmica en el ojo de las aves.

KAUTH y SOMMER (1953), establecen que debido a la riqueza en anhidrasa carbónica, el pecten es un órgano respiratorio dentro del ojo.

Otros investigadores afirman que esta estructura aumenta la sensibilidad a pequeños movimientos en la oscuridad (PEARSON, 1972). Finalmente debemos mencionar el discutido papel que puede jugar en la acomodación (RABL, 1889).

El desarrollo cronológico del pecten comienza aproximadamente a los dos días y medio de incubación (17 HH), cuando aparece un vaso sanguíneo, la arteria cupulae opticae, que hace protusión dentro de la cavidad vítrea a través de la fisura óptica (O'RAHILLY y MEYER, 1959).

En el estadío 26 HH (5 días de incubación), puede observarse como se proyectan un grupo de células, como una pequeña cresta, al interior del globo ocular a lo largo de la línea de fusión de la fisura óptica (SZILY, 1922; ROMANOFF,

1960). Para O'RAHILLY y MEYER (1955), el pecten se reconoce en el estadio 28 HH (5 días y medio de incubación). Esta cresta que presenta un vaso sanguíneo en su base va creciendo y aproximadamente en el noveno día de incubación (35 HH) comienza a plegarse; un día después aparecen los primeros granos de pigmento (36 HH).

A partir del estadío 37 HH (11 días de incubación) la morfología del pecten no difiere mucho de la del pollo adulto (MANN, 1924a), pero el pigmento no se distribuye completamente hasta el estadío 40 HH (14 días de incubación) (O'RAHILLY y MEYER, 1955).

Parece ser que los territorios prospectivos de la retina y del epitelio pigmentado no están determinados en los estadíos de vesícula óptica primaria cuando no contacta con el ectodermo superficial cefálico. Su determinación parece que depende de la relación o el contacto que tiene con las estructuras vecinas, fundamentalmente con el ectodermo superficial.

La vesícula óptica primaria y el ectodermo superficial cefálico mantienen entre si una serie de inducciones. DORRIS (1938a) y GAYER (1942), demuestran en sus trabajos que es necesario el contacto entre ambas estructuras, no sólo para que se invaginen, sino para que se diferencie la retina a partir de la capa interna de la vesícula óptica.

Algunos autores han visto que en anfibios, la ausencia del ectodermo superficial provoca una disminución en el número de células de la retina y su transformación en epitelio pigmentado (LOPASHOV, 1960).

Durante el desarrollo, en los anfibios (LOPASHOV, 1948 y 1960), aves (ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960a) y mamíferos (STROEVA, 1956), el epitelio pigmentado se diferencia a partir de la capa que está en contacto con el mesénquima periocular (capa externa); mientras que la capa aislada del mesénquima (capa interna) se transforma en retina.

Aunque la presencia del mesénquima periocular es fundamental para la diferenciación del epitelio pigmentado, hay otros factores que son necesarios para que la capa externa de la vesícula óptica se pigmente. Estos factores son los procesos oxidativos (REINBOLD, 1954) y la entrada de vasos sanguineos en la capa mesenquimatosa que rodea a la vesícula óptica (DABAGHIAN, 1958; JIMENEZ COLLADO y cols., 1978).

Por su parte la capa interna de la vesícula óptica ejerce una inhibición sobre la capa externa, impidiendo que ésta pueda transformarse en retina (ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960a; MURILLO FERROL, 1964a; COULOMBRE y COULOMBRE, 1965).

Ambas capas de la vesícula óptica poseen la capacidad de diferenciarse, indistintamente, tanto en retina como en epitelio pigmentado. Esta reversibilidad ha sido demostrada en anfibios (LOPASHOV, 1960 y 1963) y en embriones de pollo hasta el estadio de 36 somitos (18 HH) (ALEXANDER, 1937; DORRIS, 1938a; REINBOLD, 1958; COULOMBRE y COULOMBRE, 1965).

La capa interna adquiere mucho antes que la externa la determinación; es decir, que pierde antes la capacidad de transformarse en otra estructura que no sea retina (DRAGOMIROW, 1932; JOHNSON, 1935).

Ya hemos visto que en los anfibios la retina puede transformarse en epitelio pigmentado (LOPASHOV, 1960).

El caso contrario, es decir la transformación del epitelio pigmentado en retina ha sido descrita por varios autores en diversas especies de animales y utilizando diferentes experimentos (IKEDA, 1938; STONE 1950a y b; STROEVA, 1956; ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960a; MURILLO FERROL, 1964b; JIMENEZ COLLADO y cols., 1978).

Para la "diferenciación" expecífica de cada capa de la vesícula óptica no es necesaria la normal diferenciación de la otra (JOHNSON, 1935; ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960b; MURILLO FERROL, 1964a). Sin embargo, para que la retina alcance un perfecto desarrollo histológico necesita el soporte del epitelio pigmentado (COULOMBRE, 1955).

Estos hechos quedan demostrados por varios experimentos. FUJISAWA (1971) y FUJISAWA y cols. (1974), injertan en corioalantoides células aisladas de retina neurosensorial de un embrión de pollo de 6 días y medio de incubación. Estas células se organizan y dan lugar a una retina en la que se observan dos detalles interesantes; no existen fotorreceptores, al no haber epitelio pigmentado y las células ganglionares están alteradas, pues sus axones carecen de órgano diana.

Parecidos resultados se obtienen cuando se provoca la disminución de la presión intraocular durante el desarrollo embrionario (WEISS y AMPRINO, 1940; COULOMBRE, 1956a; JIMENEZ COLLADO, 1977). En estos experimentos se vió que, si bien el globo ocular detenía su crecimiento, la retina continuaba

desarrollándose por lo que se plegaba hacia la cavidad vítrea. Al estudiar los pliegues se comprobó que existían una serie de alteraciones histológicas debidas a la falta de contacto con el epitelio pigmentado.

Los pliegues en la retina se forman porque casi toda la capa interna de la vesícula óptica mantiene la actividad mitótica hasta el día 15 de incubación; mientras que, como en la mayor parte de la capa externa las mitosis cesan en el 4º día de incubación, el epitelio pigmentado no presenta pliegues (COULOMBRE, 1955).

Se sabe que el esbozo ocular izquierdo es más susceptible de alterar su morfogénesis que el derecho (MURILLO FERROL, 1965; BENITEZ RUBIO, 1986).

LLORCA y cols. (1959 y 1960a y b), RYCHTER (1963) y RYCHTER Y LEMEZ (1963), demuestran la influencia que tiene factor vascular en el desarrollo y diferenciación del ocular y en especial de la retina. La hipoxia origina un déficit en la formación del vítreo por lo que la vesícula cristaliniana v la capa interna de 1a vesícula óptica permanecen unidas e impiden que ésta se ponga en contacto con la capa externa.

#### 1.3. CUERPO VITREO.

El cuerpo vitreo es una estructura gelatinosa y transparente compuesta por una red fibrosa que llena completamene la cámara vitrea.

La cámara vítrea aparece en el tercer día de incubación como un espacio entre la vesícula óptica secundaria y la vesícula cristaliniana, cuando ésta aún no se ha separado completamente del ectodermo superficial. Desde el principio la cámara vítrea está ocupada por fibras muy finas (KNAPE, 1909; LAGUESSE, 1926).

BRINI y cols. (1962) y PORTE y cols. (1965a), observan que en los estadios 16-17 HH (51-64 horas de incubación) existe una membrana acelular formada por material fibroso que se sitúa entre la vesícula óptica primaria y la placoda cristaliniana.

Estos autores confirman, en estudios con microscopía electrónica en embriones de pollo de tres días de incubación, la presencia de un material fibroso que rodea la vesícula cristaliniana y que es más abundante entre ella y la vesícula Este material está formado por finos filamentos de óptica. menos de 100A de diámetro y por fibras de 200A de diámetro y con un periodo entre 200 y 220A. Estas fibras y filamentos forman acúmulos incluídos en una sustancia granular que desaparecen gradualmente durante el desarrollo (BRINI y cols., 1965; PORTE y cols., 1965a).

Aproximadamente en el 5º día de incubación la futura cámara anterior es invadida por células mesodérmicas que emigran desde el borde de la vesícula óptica. Estas células

limpian el material fibroso que existe en la cámara anterior y forman el esbozo del endotelio corneal (PORTE y cols., 1965b). Sin embargo, no se observan cambios en la estructura de las fibras del cuerpo vítreo.

A partir del  $7^{\circ}$  día de incubación existe un patrón definido, pues las fibras surgen desde el esbozo del pecten irradiandose en todas direcciones.

Las fibras que se originan en los procesos ciliares se dirigen al ecuador del cristalino y constituyen las fibras zonulares. Estas fibras acaban por fundirse a la cápsula cristaliniana y a los procesos ciliares (ROMANOFF, 1960).

Para KESSLER (1877), el cuerpo vítreo se origina por transudación a partir de los vasos sanguíneos situados en la fisura óptica.

El material fibroso que da origen al estroma primario de la córnea y al vítreo primitivo se origina a partir de prolongaciones citoplasmáticas de las células del epitelio cristaliniano y de la capa interna de la vesícula óptica (STUDNICKA, 1911; HAGEDOORN, 1928; HAMILTON, 1952).

Para DEJEAN y cols. (1958), el cuerpo vítreo está formado por delaminaciones continuas de las membranas basales del cristalino y la retina.

Parece ser que la capa interna de la vesícula óptica es la primera estructura que participa en la formación del cuerpo vítreo primario. Pero una vez que el cristalino se va diferenciando, la actividad retiniana disminuye y la mayor parte de las fibras del vítreo están formadas por el cristalino (PORTE y cols., 1965a).

Cuando el pecten comienza a formarse puede jugar un papel importante en la formación del cuerpo vítreo (HAMILTON, 1952).

Debido al origen común que tienen el cuerpo vítreo y el estroma primario de la córnea, parece seguro que el colágeno juega un papel fundamental en la formación del cuerpo vítreo (DEJEAN y cols., 1958; PORTE y cols., 1965a; BRINI y cols., 1966).

las funciones más importantes del vítreo durante el periodo embrionario es el crecimiento en volumen del globo Esta característica fué analizada y comprobada por ocular. COULOMBRE (1956), pues al extraer vitreo en embriones de cuatro días de incubación, vió que el globo ocular intervenido tenía un ritmo de crecimiento muy inferior al ojo contralateral. Como la retina era la única estructura que continuaba creciendo, casi a ritmo normal, se plegaba en el interior del globo ocular.

#### 1.4. CRISTALINO.

El cristalino es una estructura transparente del globo ocular de las aves adultas.

HUSCHKE en 1832 publicó que: "El cristalino surge de la piel".

NUSSBAUM (1908), observó que a partir del ectodermo superficial se formaban las células y fibras del cristalino.

Hoy se sabe que el cristalino deriva del ectodermo superficial cefálico que está en íntimo contacto con la vesícula óptica primaria y que ambas estructuras mantienen una serie de interacciones recíprocas, como veremos posteriormente.

En el embrión de pollo, la vesícula óptica primaria entra en contacto con el ectodermo superficial, aproximadamente en el estadío de 9 pares de somitos (10 HH) (McKEEHAN, 1951).

La primera señal del esbozo cristaliniano comienza con un engrosamiento del ectodermo superficial que está fuertemente adherido a la pared distal de la vesícula óptica primaria. Este engrosamiento representa el esbozo de la placoda cristaliniana y en el embrión de pollo tiene lugar entre los estadíos 12HH (TELLO, 1923; O'RAHILLY y MEYER, 1955) y el 13HH (LILLIE, 1919; McKEEHAN, 1951; HAMBURGER y HAMILTON, 1951).

Inicialmente hay un aumento en la densidad de las células cúbicas del ectodermo que se concentran en la placoda cristaliniana, por lo que esta estructura presenta dos o tres capas celulares que contrastan con la única capa que observa en el resto del ectodermo (McKEEHAM, 1951). las células se alargan perpendicularmente en relación a 1a superficie aumentando volumen su número. su no pero

Posteriormente la placoda cristaliniana sufre un engrosamiento notable, debido a la aposición de mitosis celulares (ZWAAN e IKEDA, 1969).

Durante el periodo entre 16 y 20 somitos, los cambios en las células de la placoda cristaliniana consisten en una pérdida de vacuolas del citoplasma, reorientación de los núcleos respecto a la superficie de contacto con la vesícula óptica, elongación de núcleos y citoplasma y mitosis (ZWAAN e IKEDA, 1969).

Ya hemos comentado que cuando el embrión de pollo tiene entre 20 y 21 pares de somitos (McKEEHAN, 1951; O'RAHILLY y MEYER, 1955; HILFER, 1983) o entre 21 y 25 (RABL, 1889), aparece una pequeña depresión en el centro de la placoda cristaliniana que acompaña la invaginación de la vesícula óptica. Ambas estructuras continúan fuertemente unidas y a partir de ese momento se habla de fosa cristaliniana y vesícula óptica secundaria.

Durante la invaginación de la placoda cristaliniana existe un proceso de muerte celular que se inicia y alcanza la máxima intensidad en la parte dorsal de la placoda (SCHOOK, 1980c; GARCIA-PORRERO y cols., 1983).

En esta fase existe una orientación de las células en el mismo sentido de las células de la capa interna de la vesícula óptica secundaria (RABL, 1889; McKEEHAN, 1951).

La fosa cristaliniana continúa profundizando hasta que sus bordes externos se acercan, de manera que únicamente delimitan un pequeño orificio que es visible en la superficie externa del embrión durante un corto periodo de tiempo.

La fosa cristaliniana se cierra completamente por fusión de sus bordes y se desprende del ectodermo entre los estadios 17-18HH (RABL, 1889; SLONAKER, 1921; TELLO, 1923; O'RAHILLY y MEYER, 1955; HAY y REVEL, 1969). Una vez que se ha separado del ectodermo se denomina vesícula cristaliniana.

Entre la vesícula cristaliniana y el ectodermo que la cubre, aparecen unas células que KESSLER (1877) llamó "linsenstielreste", LAGUESSE (1926) "merocitos" o células errantes "comedoras" con núcleo picnótico y gotas lipídicas y BIANCHI (1932) células mesenquimales.

Actualmente se sabe que la separación de la vesícula cristaliniana del ectodermo se debe a un doble proceso. En primer lugar se oblitera la luz del pedículo cristaliniano y en segundo lugar aparecen macrófagos cuya función es fagocitar los detritus celulares originados de la separación entre la vesícula cristaliniana y el ectodermo (COHEN, 1961; SCHOOK, 1980c; GARCIA-PORRERO y cols., 1979).

Cuando la vesícula cristaliniana se separa del ectodermo, está rodeada por una material fibroso compuesto por fibras y filamentos inmersos en una sustancia granular (BRINI y cols., 1965; PORTE y cols., 1965a)

Entre el ecuador de la vesícula cristaliniana y los bordes de la vesícula óptica queda un espacio por donde penetra tejido mesodérmico (DEJEAN y cols., 1958).

En el interior de la vesícula cristaliniana existen elementos celulares a los que en un principio se los relacionó con la formación de las fibras cristalinianas (HUSCHKE, 1832). Sin embargo, ya a finales de siglo pasado se vió que ésto no

era cierto y que las fibras cristalinianas, como veremos después, se originaban a partir de las células de la pared posterior (SLONAKER, 1921; O'RAHILLY y MEYER, 1955)

MANN (1928), estudiando embriones humanos descubre la existencia de una capa epitelial, menos uniforme que el ectodermo superficial sobre el que se asienta. Esta capa, ausente en peces y aves, está destinada a desaparecer; pero durante la invaginación y cierre de la fosa cristaliniana algunas células de la capa epitelial se introducen en la luz de la vesícula cristaliniana. Finalmente estos elementos celulares degeneran y desaparecen en el periodo embrionario.

la fusión de los bordes de Poco antes de la fosa cristaliniana. la pared proximal que permanece en contacto con de de vesicula 1a capa interna óptica, inicia un engrosamiento. Por 10 tanto. desde este momento **e**1 comportamiento de las células de las paredes proximal y distal de la vesícula cristaliniana va a ser muy diferente.

Las células de la pared distal, orientadas hacia la superficie, permanecen prácticamente inactivas conservando su forma cuboidea y constituyen el epitelio anterior del cristalino (GENIS GALVEZ y cols., 1968)

Sin embargo, las células de la pared proximal o medial de la vesícula cristaliniana, aumentan en número y se elongan, sobre todo las situadas axialmente. Sus núcleos también se elongan y emigran hacia la zona media de la célula. (ZWAAN e IKEDA, 1969).

Con la elongación celular, la superficie distal de la pared proximal se proyecta en la luz de la vesícula cristaliniana hasta que contacta con el epitelio anterior y oblitera su luz. Esto ocurre entre el 4º día (KESSLER, 1877) y 5º día de incubación (FRORIEP, 1906; SLONAKER, 1921; HAMILTON, 1952).

Al principio la oclusión no es completa, ya que durante algún tiempo, debajo de la perifería del epitelio anterior queda un anillo (cámara cristaliniana), que rodea la porción lenticular del cristalino. Esta cámara contiene secreciones celulares que al ocluirse la luz quedan comprimidas en esa zona. Finalmente se reabsorben y desaparece por completo la luz (SLONAKER, 1921; HAMILTON, 1952).

A la vez que las células de la pared medial se elongan, van transformandose en fibras. Estas fibras primarias constituyen el núcleo embrionario del cristalino.

A partir del 6º-7º día de incubación (28-31 HH), la actividad diferenciadora queda restringida a un anillo preecuatorial (región germinativa del cristalino). Por lo tanto en la región preecuatorial tienen lugar las mitosis y las células pasan a la región ecuatorial donde comienzan a elongarse, iniciandose así la formación de las fibras secundarias del cristalino (RABL, 1889).

Las fibras secundarias se van colocando progresivamente por aposición sobre las fibras primarias, quedando estas últimas comprimidas en la zona central del cristalino.

En el embrión de pollo, los núcleos de las fibras primarias comienzan a degenerar en el octavo día de incubación (33-34 HH) (ROMANOFF, 1960).

Las proteínas específicas del cristalino han sido caracterizadas químicamente desde finales del siglo pasado.

Estas proteínas son: La alfa cristalina  $(\alpha)$ ; la beta cristalina  $(\beta)$ , (ZWANN, 1963; IKEDA, 1965), aunque LANGMAN (1961) la llamó gamma cristalina; y por último una proteína cuya denominación dependía de los autores estudiados. Así, para LANGMAN (1961) es la beta cristalina, para RABAEY (1962) es la FSIC o "primera cristalina soluble importante", pero finalmente se adoptó el término de delta cristalina  $(\delta)$  (ZWANN e IKEDA, 1965).

Utilizando técnicas de inmunofluorescencia se averiguó el momento de aparición de las diferentes proteínas cristalinianas (VAN DOORENMAALEN, 1966; GENIS GALVEZ y cols., 1968; ZWANN e IKEDA, 1969).

La primera es la delta cristalina ( $\delta$ ), que aparece en las células más profundas de la placoda cristaliniana en embriones de 23 somitos (50-53 horas de incubación, estadío 14 HH). A las 72-84 horas, tanto el epitelio como las fibras, sintetizan esta proteína.

Alrededor de los tres días y medio de incubación (18-21 HH), se detecta la síntesis de alfa cristalina ( $\alpha$ ) en las fibras cristalinianas centrales. Más tarde se extiende a todo el órgano y finalmente (en el 8º día) la mayor parte de la síntesis corresponde al epitelio.

La última proteína que aparece es la beta cristalina  $(\beta)$ , que lo hace en el séptimo día de incubación.

Las gammas cristalinas ( $\tau$ ), son proteínas cuya síntesis se asocia a la diferenciación fibrilar y depende de la edad del animal (GENIS GALVEZ y cols., 1968; ZWANN e IKEDA, 1969).

El origen de la cápsula del cristalino es un punto discutido en la embriología de esta estructura.

KESSLER (1877) y RABL (1898), opinan que es un producto de secreción de las células cristalinianas. Sin embargo, BABUCHIN (1863) y LIEBERKUMN (1872) describen su origen mesodérmico, pues dan gran importancia a la túnica vascular.

Para LAGUESSE (1919), la cápsula del cristalino tiene un origen común con el vítreo primario, el ligamento zonular y la hialoides vítrea. Finalmente O'RAHILLY y MEYER (1959), creen que deriva de una fina membrana que se encuentra entre el esbozo del cristalino y la hoja interna de la vesícula óptica (futura retina).

Ya hemos comentado la importancia que tiene el ectodermo superficial en la invaginación de la vesícula óptica primaria y en la diferenciación de la retina a partir de la capa interna de la vesícula óptica secundaria. (DORRIS, 1938; GAYER, 1942).

A continuación vamos a estudiar cómo la vesícula óptica influye en la morfogénesis del cristalino (inducción del cristalino).

Vemos que entre estas dos estructuras existe una correlación de diferenciación.

SPEMANN (1901) y LEWIS (1904 y 1907), comprobaron que en los anfibios el cristalino se formaba por la acción inductiva de la vesícula óptica. Pero trabajos posteriores demostraron que la inducción del cristalino es un proceso multifásico, en el que influyen al menos dos factores; el mesodermo cefálico que actúa como activador y la vesícula óptica que lo hace como inductor (MANGOLD, 1931; PHILPOTT y COULOMBRE, 1968; KARKINEN-JAASKELAINEN, 1978).

En las aves se ha comprobado que es necesario el intimo contacto entre la vesícula óptica y el ectodermo para que se desarrolle el cristalino (DANCHAKOFF, 1926; WADDINGTON y COHEN, 1936; ALEXANDER, 1937; VAN DETH, 1940; AMPRINO, 1949a; WEISS y JACKSON, 1961).

McKEEHAN (1951 y 1958), realizó varios experimentos introduciendo cuerpos extraños de distinta composición y naturaleza entre el ectodermo superficial y la vesícula óptica. De esta forma obtuvo resultados completamente opuestos, pues cuando el cuerpo extraño era una membrana de celofán (1951) en el estadio de 6 somitos, no existía respuesta del ectodermo y no se formaba cristalino. Sin embargo, al introducir una membrana de agar (1958) si se desarrollaba cristalino, pues existen sustancias que atraviesan o rodean el agar.

WEISS (1947), dudaba de la existencia de sustancias difusibles entre la vesícula óptica y el ectodermo superficial que participasen en la inducción del cristalino.

REVERBERI (1929), tras extirpar el ectodermo prospectivo cristaliniano y gran parte de la vesícula óptica en embriones entre 7 y 20 pares de somitos, observó algunas evidencias de que el ectodermo regenerado a partir de los márgenes, puede transformarse en cristalino.

De la misma forma, en experimentos de hemiextirpación encefálica en embriones de aves (ORTS LLORCA y NAVARRINA, 1969), no se desarrolla el cristalino en aquellos casos en los que no se forma vesícula óptica. Sin embargo, la formación es incompleta cuando se desarrolla la vesícula óptica, pero no contacta con el ectodermo presuntivo cristaliniano.

La acción de la capa interna de la vesícula óptica no se reduce a un efecto de choque inductor, sino que es necesaria una influencia continua por parte del esbozo retiniano para que exista una diferenciación morfogenética normal del cristalino. McKEEHAN (1954) obtuvo cristalinos más y mejor desarrollados cuando extirpó las vesículas ópticas en estadíos avanzados, y más pequeños e indiferenciados en extirpaciones precoces.

La retina es importante, no sólo en la inducción del cristalino como ya hemos visto, sino que ejerce una influencia fundamental en su estructuración; es decir, en la formación de cada una de las partes del cristalino.

Cuando el esbozo cristaliniano de los anfibios se rodea completamente de retina, todo el cristalino se transforma en fibras. (LOPASHOV, 1960; REYER, 1962).

En aves este hecho ha sido demostrado gracias a 1os experimentos de COULOMBRE y COULOMBRE (1963), y GENIS GALVEZ y (1966 y 1967). Si dentro de la vesícula óptica se gira 180⁰ el cristalino, las células del epitelio anterior que se ponen en contacto con la retina se transforman en fibras; que las fibras que habían iniciado su formación mientras desaparecen al perder el contacto con la retina. Esta última observación fue puesta en duda por CLAVERT (1972), pues vió que en mamíferos, las fibras cristalinianas continuaban su diferenciación normal cuando perdían el contacto con 1a retina. Llega un momento en el que la retina no es necesaria para que el cristalino continúe su desarrollo.

Parece ser que si se injerta una vesícula óptica (con su vesícula cristaliniana) en región auditiva, la superficie del cristalino que contacta con el otocisto forma una especie de formación fibrilar secundaria (DRAGOMIROV, 1929).

Gracias a los trabajos mediante heteroinjertos entre diferentes especies de anfibios, se sabe que el tamaño del cristalino depende de la especie y no del tamaño del ojo receptor (HARRISON, 1929).

No solamente el ectodermo cefálico tiene la capacidad de transformarse en cristalino, con un estímulo adecuado (MIZUNO, 1970). Para ALEXANDER (1937), el ectodermo del tronco tiene esa capacidad entre los estadíos 8 y 9 HH. VAN DETH (1940) opina, sin embargo que es hasta el estadío 10 HH. Este mismo autor comprueba que puede desarrollarse cristalino a partir del ectodermo cefálico hasta el estadío 26-27 HH (5 días de incubación).

De las dos capas de la vesicula óptica, la interna (esbozo de la retina) posee mayor capacidad inductora que la capa externa (esbozo del epitelio pigmentado). Experimentalmente se ha comprobado que la capa externa puede inducir la formación del esbozo cristaliniano, pero es incapaz de continuar su diferenciación (ALEXANDER, 1937; AMPRINO, 1949b).

La acción de la capa interna es mucho más importante, pues a la capacidad inductora se le une la influencia continua que debe mantener para un desarrollo normal del cristalino.

Otra cuestión es saber hasta cuándo tiene la retina, capacidad inductora. LOPASHOV (1960) en anfibios, confirma que el ectodermo embrionario es capaz de transformarse en cristalino, siempre que se ponga en contacto con una retina que aún no haya comenzado su estratificación en capas.

Finalmente queda el tema de la regeneración cristaliniana.

La regeneración del cristalino a partir del borde de la vesícula óptica fué comprobada en algunas especies de anfibios (REYER, 1962 y 1965; EGUCHI, 1967; STONE, 1967; YAMADA y cols., 1973). Este fenómeno, denominado "regeneración de WOLFF", ha sido estudiado en aves por algunos autores.

La extirpación del cristalino se sigue, en algunas especies animales, de su regeneración a partir del borde iridiano (REYER, 1962; GENIS GALVEZ, 1962).

Las primeras descripciones de la regeneración de WOLFF en embriones de pollo fueron realizadas por BARFURTH y DRAGENDORFF, en 1902.

ALEXANDER (1937), obtiene fibras cristalinianas a partir del epitelio pigmentado y del borde del iris; pero dice que para ello es necesaria la presencia de ectodermo. Sin embargo, DORRIS (1938a), al cultivar vesículas ópticas sin ectodermo obtiene fibras cristalinianas.

VAN DETH (1940), afirma que en el embrión de pollo existe regeneración de WOLFF, pero sus resultados no son aceptados por algunos autores debido los métodos utilizados (ORTS LLORCA, 1975). Sin embargo, McKEEHAN (1961) no observó este fenómeno tras la extirpación del esbozo cristaliniano entre los estadios 18-23 HH.

Gracias a los trabajos de GENIS GALVEZ (1962) y WEDLOCK y McCALLION (1968), en la actualidad muchos investigadores creen en la posibilidad de que en las aves exista regeneración de WOLFF del cristalino; aunque para concluir con esta cuestión, hoy no puede afirmarse ni negarse categóricamente que en las aves sea posible la regeneración de WOLFF.

En experimentos in vitro se ha logrado la diferenciación de esbozos cristalinianos rudimentarios, a partir del ectodermo cefálico. Estos esbozos llegan a sintetizar proteínas específicas del cristalino (MIZUNO y KATOH, 1972).

De la misma manera que en el desarrollo y diferenciación del cristalino participan determinadas estructuras embrionarias, el propio cristalino a su vez, influye en la formación de otras estructuras como por ejemplo: La córnea, el vítreo, la cámara anterior, el tamaño del orificio pupilar y además inhibe la formación de otro cristalino a partir del ectodermo o del borde del iris (ORTS LLORCA, 1975).

## 1.5. CORNEA Y CAMARA ANTERIOR.

La córnea es, junto al cristalino, una de las estructuras transparentes que forman parte del globo ocular de las aves adultas.

Antes de que la vesícula óptica primaria se ponga en contacto con el ectodermo superficial, entre ambas estructuras se encuentra el ectomesénquina cefálico que en su mayor parte deriva de la cresta neural. Este tejido, en fases posteriores del desarrollo da lugar a estructuras "ectodérmicas" y "mesenquimales" (HARRIS, 1955).

Cronológicamente, en la córnea, la primera capa que aparece y la última en completar su desarrollo es el epitelio corneal. Esta capa es la más superficial y deriva del ectodermo que recubre la vesícula cristaliniana cuando ésta se ha desprendido del ectodermo (KESSLER, 1877; AMPRINO, 1949a; NEYFACH, 1952).

Cuando la vesícula cristaliniana se separa del ectodermo superficial (esbozo del epitelio corneal), está rodeada por una sustancia granular que contiene fibras y filamentos y que tiene un aspecto mesenquimal (BRINI y cols., 1965; PORTE y cols., 1965a). Esta sustancia considerada por KESSLER (1877) como el primer esbozo de la córnea propia, fue denominada de varias formas: "vítreo anterior" (KNAPE, 1969); "mesostroma" (STUDNICKA, 1911; MIGAZZO, 1932); "membrana direccional" (O'RAHILLY y MEYER, 1955) y "estroma corneal primario" (HAY y REVEL, 1969).

El origen de esta sustancia también ha sido interpretado de diferentes maneras. KESSLER (1877), dice que es un exudado albuminoso; SEEFELDER (1926) descubrió una red de fibras procedente de los epitelios del cristalino y córnea y de la vesícula óptica secundaria. REDSLOB (1935), observa una masa compacta derivada de las membranas basales del cristalino y del epitelio corneal.

Entre los estadíos 17 HH (O'RAHILLY y MEYER, 1955) y 18 HH (HAMILTON, 1952), el esbozo del epitelio corneal tiene en su espesor dos hileras de células. Las células de la capa basal del epitelio se hipertrofian; este hecho contrasta con el ectodermo de otras regiones del embrión en cuyo espesor no se observa ninguna modificación (LAGUESSE, 1926).

Aproximadamente en el 4º día de incubación (22-23 HH) aparece una capa de células procedentes del tejido mesodérmico que se encuentra sobre los bordes de la vesícula óptica y que utilizando el andamiaje del material fibrilar o estroma primario de la córnea se introduce desde la región límbica hacia el centro. Esta primera oleada mesodérmica da lugar al endotelio corneal en el estadío 25 HH y se sitúa formando una capa debajo del epitelio y paralela a él (KNAPE, 1909; LAGUESSE, 1919; HAGEDOORN, 1928; RESLOB, 1935; O'RAHILLY y MEYER, 1959; PORTE y cols., 1965b).

Entre el epitelio y el endotelio de la córnea se forma un espacio ocupado por una sustancia acelular producida por exudación a partir del epitelio corneal.

Este espacio fue denominado "córnea propia" por KESSLER (1877) y actualmente se le identifica como el estrato acelular de la córnea (LADIJENSKI, 1915; LAGUESSE, 1926; MIGAZZO, 1935; LEPLAT, 1939; HAY y REVEL, 1969).

Entre los días 5º y 6º de incubación (26-28 HH) el estrato acelular es invadido por una segunda oleada de tejido mesodérmico desde la perifería al centro. Parte de las células se transforman en fibroblastos que van a sintetizar fibras de colágeno, entre los estadíos 28-30 HH. Es el origen del estroma corneal (WATZKA, 1935; REDSLOB, 1935; MEYER y ONRAHILLY, 1959; COULOMBRE, 1965).

Se admite que el estroma corneal se forma sobre un esbozo ectodérmico (estrato acelular), que secundariamente es invadido por elementos mesodérmicos, teniendo pues un origen ectomesodérmico (HERINGA y LOHR, 1926; NAGEOTE y GUYON, 1931; REDSLOB, 1935).

Existe controversia sobre el origen del mesodermo de la primera oleada (endotelio) y de la segunda oleada (estroma). El mesodermo que dará lugar al endotelio deriva de la primitiva línea mesenquimal (LOPASHOV y STROEVA, 1961; HAY, 1968; TRELSTAD y COULOMBRE, 1971); mientras que el mesodermo del que se origina el estroma deriva de la cresta neural (LOPASHOV, 1963).

La cámara anterior del ojo se forma en el periodo que transcurre entre la invasión mesodérmica que origina el endotelio corneal y la que da lugar al estroma. Además la cámara anterior es necesaria para que se diferencie el endotelio corneal a partir de la primera oleada mesodérmica

(COULOMBRE, 1965).

La membrana de Bowman se forma en el estadio 37 HH (11 dias de incubación). El origen de la membrana de Bowman ha sufrido varías interpretaciones a lo largo de la historia. Para unos autores lo hace a expensas de las zonas superficiales del estroma primario que no son invadidas por el tejido mesodérmico que rodea los bordes de la vesícula 1877; KNAPE, 1909; LAGUESSE, 1919). Otros opinan (KESSLER. que se origina a partir de las capas más superficiales del estroma corneal (HAGEDOORN, 1928; MIGAZZO, 1932; MEYER v O'RAHILLY, 1959; COULOMBRE, 1965; POULIQUEN y cols., Finalmente REVEL y HAY (1965), HAY (1968) y HAY y REVEL (1969) han puesto en discusión este mecanismo y opinan que 1as células del epitelio anterior de la córnea segregan una fina capa acelular en su superficie interna; aunque para que diferencie es necesario que exista contacto entre el epitelio corneal y el estroma subyacente.

El origen de la membrana de Descemet se relacionó en principio al de la membrana de Bowman; es decir, se pensó que formaba a expensas de las capas más profundas del estroma se primitivo de la córnea no es invadido por células que mesodérmicas situadas en el limbo (KESSLER, 1877; KNAPE, 1909; LAGUESSE, 1919). La membrana de Descemet se forma a partir de1 endotelio corneal. Las células endoteliales producen una membrana basal superficie en su externa o estroma1. aproximadamente el 6º día de incubación (28-29 HH) (LAGUESSE, 1926). Cuando se condensa esa membrana basal, se forma 1a membrana de Descemet en el estadio 38 HH (12 días de incubación) (REDSLOB, 1935).

Gracias a las técnicas de microscopía electrónica, hoy se sabe que la primera manifestación de la membrana de Descemet aparece en el estadío 35 HH con la presencia de una capa de nodos en la superficie externa del endotelio. El número de capas aumenta de forma progresiva hasta un total de 8 en el pollo tras la eclosión (OHKURA, 1963; BRINI y cols., 1966).

Para que se puedan diferenciar tanto el endotelio corneal como la membrana de Descemet, es necesario que se forme previamente la cámara anterior (HAGEDOORN, 1928; COULOMBRE, 1965; GENIS GALVEZ y cols., 1967).

El espesor de la córnea sufre una serie de variaciones durante el desarrollo a expensas, en su mayor parte, del En el estadio 30 HH el espesor del estroma es de 140 estroma. a partir de ese momento aumenta hasta que en el estadío 35 um, alcanza el valor más alto, 220 µm. Después HH se progresivamente debido a la deshidratación hasta unas 150 µm estadio 40 HH. En este mismo estadio se observa e1 en una mayor cantidad de fibras colágenas en las capas interna de1 estroma (MEYER y O'RAHILLY, 1959; COULOMBRE y COULOMBRE, 1961).

En el momento de la eclosión el espesor del estroma alcanza aproximadamente unas 160 µm y las fibras colágenas presentan un diámetro de 250 A (HAY y REVEL, 1969).

La córnea, que al principio presenta un radio de curvatura similar al del resto del globo ocular, cambia entre los estadíos 33-35 HH (8-9 días de incubación), disminuyendo su radio con relación al de la esclera (COULOMBRE y COULOMBRE, 1961).

En la variación intervienen de forma decisiva 1a interacción entre dos factores, el aumento de la presión intraocular (COULOMBRE, 1957) y los cambios de las estructuras perioculares, donde 1a más importante es 1a esclera (O'RAHILLY, 1962).

El cambio en la curvatura de la córnea, coincide con la condrificación del anillo cartilaginoso en el limbo de la esclera junto a la córnea (WEISS y AMPRINO, 1940; COULOMBRE y COULOMBRE, 1958). A partir de la condrificación, el globo ocular crece como dos segmentos de esfera en vez de hacerlo como una esfera.

Cuando experimentalmente se disminuye la presión intraocular durante el desarrollo, entre otras alteraciones ya descritas, en la córnea se detiene el crecimiento longitudinal (COULOMBRE, 1965).

Han sido muchas las investigaciones que se han realizado en aves y anfibios para intentar aclarar qué estructuras oculares participan en la morfogénesis normal de la córnea y en qué medida influyen en su diferenciación. Solamente vamos a mencionar aquellos experimentos que aclaran estas cuestiones, así como el ectodermo de qué zonas tiene competencia para formar epitelio corneal.

El epitelio de la córnea únicamente, se diferencia a partir del ectodermo que se relaciona con la vesícula óptica y con la vesícula cristaliniana. Al extirpar la vesícula óptica se paraliza la formación del epitelio corneal y el ectodermo se transforma en piel; estas experiencias fueron realizadas en anfibios (SPEMANN, 1901; LEWIS, 1907) y en aves (AMPRINO,

1949a). Por lo tanto la vesícula óptica tiene una importancia fundamental en la inducción del epitelio corneal.

Si se sustituye el ectodermo que cubre las vesículas óptica y cristaliniana por el ectodermo de otras zonas del embrión, éste se diferencia en epitelio corneal pues se relaciona directamente con la vesícula óptica y el cristalino. Es decir, la competencia para formar epitelio corneal a partir del ectodermo embrionario, es muy grande (FISCHEL, 1919; NEYFACH, 1952).

La importancia del cristalino en el origen y diferenciación de la córnea ha sido demostrada por varios investigadores.

La extirpación del cristalino en estadíos precoces del desarrollo detiene la histogénesis normal de la córnea (GENIS GALVEZ y cols., 1969). Incluso si el cristalino se extirpa en estadíos más avanzados, cuando la córnea ya ha iniciado su diferenciación, ésta pierde progresivamente su estructura (COULOMBRE, 1965).

Estos trabajos indican que la influencia del cristalino no es puntual, sino que su acción se realiza durante un largo periodo del desarrollo embrionario.

Gracias a los experimentos de GENIS GALVEZ (1966), sabemos algo más sobre la influencia del cristalino en el desarrollo de la córnea.

Este autor realizó rotaciones del cristalino dentro de la vesícula óptica y vió que la córnea detiene su desarrollo mientras el cristalino se reestructura; es decir, mientras se transforman las fibras en epitelio anterior y el epitelio

anterior en fibras. Una vez que el epitelio se sitúa en la superficie externa, la córnea continúa su desarrollo.

En aquellos casos donde la reestructuración del cristalino es imposible, la córnea pierde su estratificación.

Por lo tanto, el epitelio anterior del cristalino es el que influye en la estratificación de la córnea.

Finalmente queda por analizar la influencia de la cámara anterior en el desarrollo de la córnea.

Ya hemos mencionado anteriormente que es necesaria la presencia del esbozo de la cámara anterior para que se puedan diferenciar el endotelio corneal y la membrana de Descemet (HAGEDOORN, 1928; COULOMBRE, 1965; GENIS GALVEZ y cols., 1967).

En aquellos experimentos donde GENIS GALVEZ y cols. (1967) observaron que se regeneraba el cristalino a partir de los bordes de la vesícula óptica, sobre todo a partir del epitelio pigmentado; también vieron que únicamente se formaba cámara anterior delante de las zonas del cristalino que habían perdido completamente el pigmento.

Todo esto indica que si el pigmento inhibe directamente la formación de la cámara anterior, influye indirectamente inhibiendo la diferenciación de la córnea, fundamentalmente del endotelio y la membrana de Descemet.

## 1.6. COROIDES Y ESCLERA.

La coroides es una capa vascular pigmentada que rodea la mayor parte del epitelio pigmentado y que se continúa por delante con el estroma del cuerpo ciliar.

En las aves, la esclera es un verdadero esqueleto que rodea a la coroides. Está formada por un anillo de 12 a 14 huesecillos situados cerca del limbo corneo-escleral y por una cúpula de cartílago hialino que rodea y protege el segmento posterior del globo ocular aunque a nivel de la salida del nervio óptico se interrumpe para el paso de las fibras ópticas (SLONAKER, 1921).

Ambas capas surgen del mesénquima que rodea a la vesícula óptica durante el desarrollo embrionario. Este mesénquima tiene un doble origen pues una parte, el mesénquima axil, procede de la placa precordal de la notocorda. La otra porción, el ectomesénquima, tiene su origen en la cresta neural encefálica.

En embriones de pollo, O'RAHILLY (1962) observa que en las primeras 52-56 horas de incubación se condensa una membrana PAS+, alrededor de la vesícula óptica.

Entre los estadíos 25-27 HH (5 días de incubación), LEPLAT (1912) descubre una condensación del mesénquima contiguo a la vesícula óptica. Esta capa continúa el desarrollo y a los 10 días (36 HH) incluye en su espesor la coriocapilar y una membrana basal (OnRAHILLY, 1962). Una capa con vasos sanguineos de mayor calibre aparece entre los días 13 y 14 HH y en el 18 HH se reconoce con claridad la membrana de Bruch compuesta por tejido elástico (LEPLAT, 1912).

El pigmento aparece en la coroides en el 8º día de incubación (LEPLAT, 1912), aunque otros autores sitúan este detalle un día antes (BRINI, 1949; FRANCOIS y cols., 1963).

Ya hemos comentado que coroides y esclera tienen un origen común, a partir del mesodermo que rodea la vesícula óptica y el primer signo de su aparición es la presencia de una membrana PAS+ entre los estadíos 15-17 HH (ONRAHILLY, 1962).

Este autor sitúa el primer esbozo de la esclera en el estadio 24 HH (4% días de incubación) y está representado por una condensación mesodérmica por fuera de la vesícula óptica, aunque LEPLAT (1912), SLONAKER (1921) y WEISS y AMPRINO (1940) describen que el verdadero cartílago escleral se observa en el  $8^{\circ}-9^{\circ}$  día de incubación.

Aproximadamente al 7º día de incubación (30-31 HH) aparecen, a nivel del limbo, entre 12 y 14 papilas esclerales planas rodeando la córnea. Entre el 8º y 9º días (33-35 HH), las papilas hacen relieve y son sustituídas por hueso de osificación membranosa en los estadíos 36-38 HH (10-12 días de incubación) (ROMANOFF, 1960).

A partir del 12º día de incubación la esclera se diferencia y desarrolla en dirección dorso-caudal hasta envolver todo el globo ocular, excepto en la región más interna por donde salen los axones de las células ganglionares (WEISS y AMPRINO, 1940; COULOMBRE y COULOMBRE, 1958).

Para ONRAHILLY (1962), es posible observar la esclera definitiva osificada en el estadío 37 HH (11 días de incubación).

4º día de incubación (16 HH), el Hasta e1 mesénguima periocular no presenta ninguna especificidad; es decir, que injertado en otra región del embrión sólo se desarrollan fibrocitos. Sin embargo, los estudios in vivo e in vitro han demostrado que a partir de este estadío, el mesénquima rodea 1a vesícula óptica muestra capacidad de autodiferenciación, dando lugar a cartilago escleral (WEISS AMPRINO, 1940: WEISS, 1968; JIMENEZ COLLADO y cols., 1978).

La diferenciación y el crecimiento de la esclera depende, en parte, de factores mecánicos. Si experimentalmente se provoca una disminución de la presión intraocular, el globo ocular detiene su crecimiento y en la esclera se observa un engrosamiento atípico (COULOMBRE, 1956a).

En aquellos casos donde existe un aumento patológico de la presión intraocular, el globo ocular crece más de lo normal y el cartílago escleral se adelgaza (WEISS y AMPRINO, 1940).

Algunos investigadores implican a la retina y/o al epitelio pigmentado como responsables de la inducción del cartílago escleral, pues el tubo neural tiene la propiedad de inducir cartílago (LASH, 1963)

Al hablar del epitelio pigmentado vimos que para diferenciación era necesario la invasión de vasos sanguineos el mesénguima periocular (DABAGHIAN, 1958; JIMENEZ COLLADO cols., 1978). Por esta razón parece que en un primer momento el mesénquina vascularizado provoca la diferenciación del epitelio pigmentado a partir de la capa externa de 1a vesícula óptica y más tarde es el mismo epitelio pigmentado el induce la morfogénesis de que la esclera, a partir del mesénquima que 1a rodea (ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960; MURILLO FERROL, 1964; REINBOLD, 1968; ORTS LLORCA, 1975).

## 1.7. IRIS Y CUERPO CILIAR.

Durante el crecimiento de la vesícula óptica, sus bordes se adhieren al ecuador del cristalino, aproximadamente en el 4º día de incubación (LENHOSSEK, 1911; COULOMBRE, 1956b).

Simultáneamente a la primera oleada mesodérmica que da lugar al endotelio corneal, los bordes de la vesícula óptica alargan y adelgazan llegando a cubrir la región ecuatorial del cristalino. En ese momento el esbozo del iris presenta dos capas, una externa pigmentada y otra interna sin pigmento; ambas constituyen la porción ectodérmica del iris (LINDAHL, 1915: Mientras crecen los bordes de COULOMBRE, 1965). 1a vesícula óptica, el mesodermo que está en contacto con e1 esbozo del epitelio pigmentado se desplaza con los bordes pero sin sobrepasar el orificio pupilar (KESSLER, 1877; LENHOSSEK, 1911; COULOMBRE, 1956b).

La retina que forma parte del iris detiene el crecimiento y se hace rudimentaria (pars iridae retinae) (COULOMBRE, 1955).

Para O'RAHILLY y MEYER (1955), es posible identificar el primer esbozo del iris en los estadíos 28-29 HH (5 días y medio de incubación).

La formación del iris está relacionada, por un lado con el contacto entre el borde de la vesícula óptica y el cristalino (GENIS GALVEZ, 1966) y por otro con la presión intraocular (COULOMBRE, 1956a y 1957; ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960a).

En el borde libre del esbozo iridiano comienza la formación del músculo esfinter al final del 7º día de incubación (LEWIS, 1903); aunque el desarrollo se inicia entre

el 8º (COLLIN, 1903) Y 9º día (LEPLAT, 1911).

El primer esbozo del músculo esfinter consiste en la aparición de una zona estrecha, sin pigmento alrededor del orificio pupilar (LEWIS, 1903). Este tejido deriva del borde de la capa interna (retina) de la vesícula óptica, que crece más rápidamente que la capa externa; por este motivo el tejido de origen retiniano sobrepasa el epitelio pigmentado. A partir del 10º día de incubación, forma una banda continua alrededor de la pupila (ONRAHILLY y MEYER, 1955).

Aproximadamente en el 9º día, del epitelio pigmentado del iris surge un tejido que rápidamente emigra hacia el estroma iridiano. Al principio este tejido pigmentado aparece de forma discontinua, aumenta en número hasta el día 11 (LEPLAT, 1911).

A partir del día 11 (24-25 HH) comienzan a disminuir las células pigmentadas y en el estadío 27 HH pierden el pigmento y se transforman en mioblastos.

En las aves el músculo esfinter es estriado y su función es contraer la pupila. Como en el resto de vertebrados es de origen ectodérmico ya que deriva del borde de la vesícula óptica secundaria (NUSSBAUM, 1901; ROMANOFF, 1960).

el pollo existen además músculos radiales dispuestos En en dos capas; una capa interna de fibras musculares finas y dispuestas de forma radial y otra capa intermedia de fibras forma oblicua. La función gruesas dispuestas de de los. músculos radiales es la dilatación de la pupila, aunque se les imputa una función acomodativa (LEPLAT, 1911); acción ésta muy discutida y puesta en duda por SLONAKER (1921).

Durante el desarrollo, las fibras oblicuas se distinguen aproximadamente en el día 13 de incubación, mientras que las verdaderamente radiales sólo se ven a partir del día 18-19 (LEWIS, 1903).

La estructura del cuerpo ciliar es más completa que la del iris. El número de pliegues varía mucho en las diferentes especies de aves, oscilando entre 85 y 100 en los animales adultos. En el embrión de pollo de 16-17 días de incubación existen aproximadamente 90 pliegues (NUSSBAUM, 1901).

Los primeros procesos ciliares se forman entre el 9º y 10º día de incubación (KESSLER, 1877); otros autores han observado unos pliegues radiados formados por retina y epitelio pigmentado en el 6º día (NUSSBAUM, 1901; ORTS LLORCA, 1975) y en el 8º (LEWIS, 1903)

COULOMBRE (1956b) en sus trabajos, observa que el futuro cuerpo ciliar crece y se adelgaza progresivamente hasta el octavo día de incubación, momento en el que aún no existe ningún tipo de diferenciación morfológica. A partir de ese día comienza a plegarse y los procesos ciliares ya son visibles. A nivel de los procesos ciliares la retina detiene su diferenciación (pars ciliaris retinae) (COULOMBRE, 1965)

la formación del En cuerpo ciliar influyen varios Dos factores. de 1os más importantes son 1a presión la rigidez progresiva del cartilago escleral. intraocular У crecimiento primero provoca e1en extensión e1adelgazamiento de la zona ciliar; y el segundo se opone a 1a limita el crecimiento presión intraocular por 10 que (COULOMBRE, 1956a y 1957).

El primer signo de los músculos ciliares primordiales aparecen como una banda de mioblastos en la perifería del esbozo iridiano, entre el futuro cartilago escleral y el epitelio pigmentado, aproximadamente en el octavo día de incubación (LEWIS, 1903; LEPLAT, 1911).

Las primeras estrías transversales se observan en el estadio 37 HH (11 días) y la diferenciación completa de las tres divisiones del músculo ciliar son visibles en el estadio 42 HH (16 días) (NUSSBAUM, 1901; LEPLAT, 1911 y 1939).

E1 ligamento pectineo comienza su diferenciación a partir del mesodermo que rodea la vesícula óptica, aproximadamente en estadío 38 HH (12 días); aunque las primeras fibras e1elásticas no se observan hasta 1os estadios 39-40 HH. Simultáneamente. en la parte externa del ligamento pectineo, aparece un vaso sanguíneo venoso con paredes elásticas que la cámara anterior y que forma parte del plexo venoso. Este sistema de drenaje del humor acuoso es el canal de Schlemm (ANGELUCCI, 1881; LEPLAT, 1939).

En el día 16 de incubación, el ligamento pectíneo ya esta presente, pero la diferenciación completa no se adquiere hasta que el animal es adulto (COULOMBRE, 1956b).

## 2. EMBRION\_DE CODORNIZ.

El pollo es el ave más utilizada en Embriología debido a la pureza conseguida de las diferentes razas y a los numerosos estudios que sobre ella se han realizado. Por todo ello, actualmente se conoce bastante bien su desarrollo embrionario.

Sin embargo, la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) es una raza de codorniz originaria de Oriente, cuya crianza fue introducida en Europa y America hace aproximadamente 40 años (TOSCHI, 1959).

Las causas que favorecieron su introducción fueron comerciales, pues presenta una serie de ventajas en relación al pollo. Es un animal muy fuerte que resiste muchas de las enfermedades que afectan a otras aves de crianza como las gallináceas, es fácil de criar y su periodo de desarrollo embrionario es aproximadamente de 16 días, contra los 21 que dura en el pollo.

Aunque existen trabajos sobre su fisiología, morfología, duración del desarrollo y condiciones ambientales idóneas; pocas son las referencias que autores como ROMANOFF (1960), STURKIE (1965) y PEARSON (1972) han hecho sobre la codorniz.

El estudio más completo que se ha publicado sobre el desarrollo embrionario de la codorniz japonesa, fue realizado por ZACCHEI (1961). Esta investigadora observó algunas de las ventajas que presentaba para la investigación en Embriología Experimental y al no existir una descripción sistemática de las fases de desarrollo embrionario, ni una correlación morfológico-cronológica precisa; realizó un trabajo donde

estudia el desarrollo embrionario de la codorniz japonesa, describiendo unos estadíos claramente reconocibles en base a elementos morfológicos de fácil identificación.

Existen una serie de factores que son necesarios tener en cuenta, cuando se pretende fraccionar el desarrollo embrionario en estadíos basados en caracteres morfológicos.

La edad cronológica y el nivel de organización del embrión no suelen guardar una relación constante. Esta descoordinación tiene tres causas (LILLIE, 1919).

Las dos primeras: El periodo de latencia y el conjunto de condiciones físicas durante la incubación, pueden ser controladas en el laboratorio; pero la tercera que se refiere a las variaciones inherentes a los huevos (la edad de la hembra en el momento de la puesta, el tiempo que tarda el huevo en atravesar el oviducto, la raza, etc...) es prácticamente imposible de controlar.

Estos factores son tan importantes que para dos embriones de pollo de 48 horas de incubación, uno puede tener 9 pares de somitos y el otro 26 (HAMILTON, 1952).

Por todas estas razones ZACCHEI, en su trabajo, prefiere identificar determinados caracteres morfológicos y después indicar el tiempo que tardan en aparecer. El resultado lo obtiene realizando la media tras numerosas observaciones.

Nosotros vamos a resumir algunas características oculares especificando el estadío en el que aparecen.

El periodo de latencia o tiempo que tarda en comenzar el desarrollo del embrión tras introducir el huevo en la estufa, es de aproximadamente 3 horas (PADGETT y IVEY, 1959).

La formación de las vesículas ópticas se inicia en el estadío 6 (4 pares de somitos, 24-26 horas de incubación). La eversión tiene lugar en el 7 (7 somitos, 27-29 horas) y el contacto con el ectodermo lateral cefálico en el 8 (10 somitos, 29-30 horas); en este mismo estadío comienza la constricción en la base de las vesículas ópticas.

En el 9 (13 somitos, 33-34 horas) el esbozo cardiaco tiene forma de "S" y las vesículas ópticas están constreñidas en su base, aunque los pedículos ópticos no están formados hasta el estadío 10 (16 somitos, 34-36 horas).

La placoda cristaliniana comienza a ser visible en el 11 (19 somitos, 36-38 horas) y se engruesa en el 12 (22 somitos, 40-42 horas); en este momento la cabeza y el tronco forman un ángulo de casi  $90^{\circ}$ .

En el 13 (24-26 somitos, 44-46 horas), se inicia la invaginación simultánea de la vesícula óptica primaria y de la placoda cristaliniana que a partir de ese momento pasan a denominarse vesícula óptica secundaria y fosa cristaliniana, respectivamente.

Cuando los bordes de la fosa se fusionan en el estadío 14 (26-32 somitos, 50-58 horas) se habla de vesícula cristaliniana.

La pigmentación de las primeras células de la capa externa de la vesícula óptica comienza en el estadío 15 (36-40 somitos, 62-68 horas), pero microscópicamente sólo se observa con claridad en el 16 (72 horas).

El pigmento continúa aumentando y en el estadío 18 (4 días de incubación) es posible verlo de forma nítida a simple vista.

primer esbozo de las papilas esclerales aparece en e1estadío 21 (5 días y medio). Además se insinúa el esbozo de 1a membrana nictitante, que es posible observar con claridad e122 (6 días). 1a en de misma manera que aproximadamente 10 papilas esclerales haciendo relieve.

En el estadio 23 (6 días y medio), los párpados comienzan a ser visibles y presentan una forma elipsoidal, mientras que el borde libre de la membrana nictitante se encuentra entre el borde de los párpados y las papilas esclerales.

En el estadío 24 (7 días, 1,1mm. de longitud del pico), aparecen los primeros esbozos de plumas en la cabeza; el párpado inferior ha crecido y su borde libre está junto a las papilas esclerales. Finalmente la membrana nictitante se sitúa más cerca de las papilas que de los párpados.

Tanto el párpado inferior como la membrana nictitante alcanzan el borde de la córnea en el estadío 25 (8 días, 1,8-2mm. de pico). Existen entre 9 y 10 filas de esbozos de plumas, entre los párpados superiores y la línea medio-dorsal. La abertura de los párpados continúa con forma de elipse, pero con el borde rostral aplanado.

Algunos esbozos de las plumas de la cabeza comienzan a pigmentarse en el estadío 26 (9 días, 2,2mm. de pico). Los párpados están más cerrados, por lo que el inferior cubre parcialmente la córnea. En los párpados, sobre todo en el superior, se insinúan los primeros esbozos de plumas.

En el estadío 27 (10 días, 2,1-2,2mm. de pico), continúa cerrandose la hendidura palpebral por lo que la mitad de la córnea está tapada por el párpado inferior. Los esbozos de plumas son claramente visibles en el borde de los párpados y alrededor del orificio de las fosas nasales.

A partir del estadío 28 (11 días, 2,5-2,6mm. de pico) el párpado inferior cubre hasta 2/3 de la superficie corneal; mientras que en el 29 (12 días, 2,8-3mm. de pico) la hendidura palpebral es una pequeña fisura que apenas deja ver la córnea y el borde de los párpados comienza a pigmentarse.

En el estadío 30 (13 días, 3,2mm. de pico), los párpados están completamente cerrados y su borde libre presenta una pigmentación negra muy intensa. A partir del estadío 31 (14 días, 3,4mm. de pico) no se observa ninguna modificación macroscópica a nivel ocular hasta la eclosión en el estadío 33 (16 días).

Las ventajas expuestas por ZACCHEI (1961), sobre la utilización de embriones de codorniz en trabajos de Fisiología Embrionaria y Embriología Experimental, se vieron enriquecidas por las investigaciones de Le DOUARIN (1969).

Esta autora estudió los núcleos celulares de la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) y observó que debido a su composición y morfología presentaban un gran interés, no sólo desde el punto de vista citológico, sino también embriológico.

Desde el punto de vista citológico, Le DOUARIN (1969) observó que la cantidad de DNA asociada al RNA nucleolar era más importante en esta especie de lo que habitualmente es en

el resto.

Valiendose de la reacción nuclear de FEULGEN y ROSSENBECK, observó que los núcleos celulares de la codorniz y del pollo son completamente diferentes, en cuanto al modo en el que se reparte la cromatina durante la interfase. En la mayor parte de los órganos de codorniz estudiados (tubo nervioso y digestivo, gónadas, mesonefro, pulmón, etc.) los núcleos presentan una masa central de cromatina, que a veces puede ser doble y el resto del núcleo aparece casi vacío.

En otros órganos (higado y músculo cardiaco) es más frecuente que la cromatina se sitúe en varias masas centrales y/o unidas a la membrana nuclear.

Estas observaciones de Le DOUARIN, permiten considerar la masa central de cromatina que se encuentra en el núcleo de las células de codorniz como un nucleolo.

La disposición de la cromatina en los núcleos celulares del embrión de pollo durante la interfase, es muy diferente ya que se encuentra dispersa o en pequeñas condensaciones repartidas por el núcleo (Le DOUARIN, 1971).

La diferencia entre los núcleos de codorniz y pollo es muy clara en cualquier órgano que se estudie.

Desde el punto de vista embriológico el interés que tiene la diferencia entre los núcleos de estas dos especies de aves es mayor.

Cuando se trabaja sobre las interacciones tisulares durante la organogénesis, mediante técnicas de heterotransplantes y heteroinjertos (homo y heterotópicos) de esbozos; o al estudiar *in vitro* las asociaciones de tejidos de

orígenes embriológicos diferentes, el utilizar estas aves presenta grandes ventajas, puesto que es fácil reconocer las células procedentes de la codorniz y del pollo.

Todas las características que presentan los núcleos celulares del embrión de codorniz, hacen que se la considere como un "marcador biológico".

La utilización de la codorniz como marcador biológico presenta otra ventaja en relación a otros tipos de marcajes como la Timidina tritiada (WESTON, 1963; WESTON y BUTLER, 1966). Los análisis autorradiográficos con esta sustancia suelen desaparecer con el tiempo, aproximadamente a los cinco días (WESTON, 1963); mientras que los marcajes con células de codorniz presentan la característica de ser definitivos (Le DOUARIN, 1969).

Desde la publicación de los primeros trabajos sobre las características del núcleo de la codorniz japonesa, han sido muchos los investigadores que han utilizado el embrión de codorniz como marcador biológico en Embriología Experimental. En este apartado vamos a mencionar brevemente algunos, pues más tarde los comentaremos ampliamente.

Además de los múltiples trabajos de Le DOUARIN y cols. 1980). (1973. 1974 1975) y de Le LIEVRE y cols. (1975 y У migración celular y el desarrollo de sobre 1a los derivados celulares de la cresta neural; otros autores han utilizado igualmente la codorniz, considerandola como un marcador biológico.

Las inducciones que la vesícula óptica ejerce sobre el ectodermo presuntivo cristaliniano fueron estudiadas mediante cultivos por KARKINEN-JAASKELAINEN (1978).

ALVARADO-MALLART y SOTELO (1984) mediante transplantes homo y heterotópicos de esbozos del tectum óptico, investigan sobre la capacidad de adaptación del sistema retino-tectal en las aves. Estos autores, consideran que los trabajos de Le DOUARIN (1969 y 1971) han sido fundamentales en la experimentación embriológica.

La muerte celular en diferentes estructuras nerviosas relacionadas con el sistema visual (ganglio ciliar y nucleos troclear y oculomotor accesorio) fueron estudiadas por NARAYANAN y NARAYANAN (1975 y 1978b), realizando injertos de vesícula óptica; es decir, aumentando las aferencias periféricas.

Finalmente JIMENEZ COLLADO y cols. (1973, 1978, 1981 y 1983) llevan muchos años trabajando sobre el desarrollo, diferenciación y mecanismos inductores de las diferentes estructuras del globo ocular, mediante heteroinjertos heterotópicos heterocrónicos de vesícula óptica.

# 3. METODOS DE LA EMBRIOLOGIA EXPERIMENTAL.

#### 3.1. CULTIVOS Y CUERPOS EXTRAÑOS.

La Embriología Experimental utiliza diferentes métodos en la investigación de los mecanismos activadores, inductores, diferenciadores, morfogenéticos, etc., de las distintas estructuras embrionarias y de las influencias que ejercen entre sí.

Unicamente vamos a ocuparnos de aquellos que guardan relación con el presente trabajo.

Con los cultivos de tejidos y células aisladas de una estructura u órgano, se puede investigar la capacidad de crecimiento y diferenciación; mientras que cultivando elementos de varias estructuras, pueden aclararse las inducciones que ejercen unas con otras (LEWIS y LEWIS, 1911a y b; DORRIS, 1938a y b; HARRISON, 1952; REINBOLD, 1958; LOPASHOV, 1960; EGUCHI, 1967; MIZUNO, 1970; MIZUNO y KATOH, 1972; YAMADA y cols., 1973; KARKINEN-JAASKELAINEN, 1978).

Otro método consiste en utilizar la incorporación de cuerpos extraños entre dos o más estructuras embrionarias. Se utilizan para impedir el contacto y evitar así las posibles interacciones durante el desarrollo embrionario posterior.

En este apartado vamos a mencionar los trabajos de McKEEHAN (1951 y 1958), que introduce diferentes materiales entre el ectodermo y la vesícula óptica para observar la inducción que ejercen ambas estructuras entre sí. Cuando el cuerpo extraño es una membrana de celofán (1951) no se diferencia cristalino a partir del ectodermo; mientras que si

la separación la realiza con una membrana de agar permeable al agua (1958) sí se forma cristalino, pues existen sustancias que pueden atravesar o rodear el agar.

ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ (1960a), utilizan un hilo de nylon que introducen en el interior de la vesícula óptica primaria, para que en el desarrollo posterior, este cuerpo extraño se sitúe entre ambas capas de la vesícula óptica secundaria. Entre otros resultados, observaron que el epitelio pigmentado que no se relaciona con la retina neurosensorial, se transforma en retina.

#### 3.2. TRANSPLANTES.

Los transplantes en embriones de aves y de anfibios esuna de las técnicas más utilizadas en e1 estudio de1 desarrollo del sistema nervioso. Ha sido aplicada a múltiples problemas como la especificidad neuronal (STONE, 1953), la adaptabilidad e hiperplasia de las estructuras (TWITTY, 1932), e1análisis de crecimiento de los nervios y las alteraciones en la densidad celular al cambiar la inervación de los campos periféricos (WENGER, 1951; PIATT, 1957; NARAYANAN, 1964).

El transplante consiste en sustituir una estructura por otra. Pueden realizarse entre animales de la misma especie (homotransplantes) o de especies diferentes (heterotransplantes). Al mismo tiempo pueden ser homocrónicos (cuando coinciden los estadíos del donante y receptor) y heterocrónicos (si los estadíos son distintos). Finalmente, los transplantes pueden ser homotópicos (si el tejido se sitúa en la posición normal que le corresponde) y heterotópicos (cuando se colocan en un lugar que no es su posición normal).

MARTINOVITCH y PAVLOVIC (1958) y MARTINOVITCH (1958), realizan transplantes de parte del cerebro anterior entre embriones de ave, antes de que se establezca la circulación. En estos experimentos utilizaron embriones de pollo y de pato, realizando homotransplantes (pollo-pollo) y heterotransplantes (pato-pollo y pollo-pato).

Entre las conclusiones destacan: El retraso entre 1 y 5 días del periodo de incubación normal, el retraso en el desarrollo y la menor viabilidad en comparación con los animales control; este detalle se acentuaba en los casos de

heterotransplantes.

La gran mortalidad obtenida la explican por la tosca técnica quirúrgica empleada unida a la delicada estructura que manipulan y transplantan. De los embriones que lograron llevar "a término", dos sobrevivieron más tiempo y presentaban un crecimiento inferior al de los controles, pero ambos tenían reflejos alimenticios normales, movimientos coordinados y las funciones visuales y auditivas parecían también normales.

HEATON (1973), realizó transplantes de vesícula óptica de embriones de codorniz (donante) en embriones de pollo (receptor), con la particularidad de que en la intervención colocaba la vesícula óptica donante en la misma posición que estaba la del receptor, antes de estirparla (homotópicos).

En sus resultados destacó la mortalidad postoperatoria que oscilaba del 43% (entre los 2 y 5 días postcirugía) al 82% (entre los días 11 y 17 postcirugía).

Esta autora piensa que la escasa viabilidad de los embriones se debe, no sólo al trauma operatorio y a la interferencia con la integridad natural del embrión, sino que la apertura del huevo para la cirugía dificulta los giros normales del embrión.

En relación con los transplantes vió que la vesícula óptica transplantada se incorporaba al receptor en el 78% de los casos, pero alcanzaba un tamaño inferior que el ojo contralateral del huesped (pollo).

En la mayoría de los embriones aparecían plumas pigmentadas cubriendo el transplante y en general los párpados eran muy pequeños y estaban desplazados.

Aunque este trabajo iba orientado a estudiar las funciones visuales que conseguían los ojos desarrollados a partir de la vesícula óptica transplantada, también describe el grado de diferenciación de algunas estructuras oculares y del núcleo del istmo óptico (NIO).

En el análisis histológico, muestra 10 embriones de los cuales 8 presentan una retina normal y en los dos restantes existe un número muy escaso de células ganglionares.

Aunque no dispone de datos sobre el desarrollo normal y el número de pliegues del pecten en la variedad de codorniz que utiliza, concluye que esta estructura se desarrolló perfectamente, lo que indica que los intercambios vasculares entre el ojo transplantado y el huesped fueron normales.

El último trabajo del que vamos a hacer referencia es el que en 1984 realizaron ALVARADO-MALLART y SOTELO.

Estos autores realizan heterotransplantes homotópicos y heterotópicos; es decir, sustituyen el primordio del tectum óptico del embrión de pollo por el del embrión de codorniz (homotópico) y reemplazan el diencéfalo dorsal del embrión de pollo por el primordio del tectum óptico del embrión de codorniz (heterotópico).

Con estas experiencias, estudian la capacidad de adaptación del sistema retino-tectal en las aves, pues opinan que el desarrollo normal de este sistema ha sido ampliamente estudiado, pero no así su capacidad de adaptación.

Utilizan como donante el tejido de codorniz por ser un marcador biológico duradero (Le DOUARIN, 1969).

Los estudios de los embriones quimera se realizaron con métodos autorradiográficos, HRP y análisis morfométricos. Las observaciones pueden resumirse en estos puntos:

-El primordio del tectum óptico del embrión de codorniz puede desarrollar un tectum óptico totalmente laminado, incluso si se transplanta heterotópicamente.

-Las neuronas ganglionares de la retina del embrión de pollo, no sólo reconocen las neuronas tectales de la codorniz como su órgano diana específico en transplantes homotópicos, sino que incluso se desvían para contactar con el tectum transplantado heterotópicamente.

-En presencia de un transplante, la retina del embrión de pollo es incapaz de inervar una superficie tectal similar o de mayor tamaño que el del tectum control.

-Las regiones tectales que carecen de proyecciones ópticas, ya sean del donante o del huesped, presentan una laminación atrófica.

-El tectum óptico supernumerario diencefálico compite y prevalece sobre el tectum del huesped, como objetivo para las fibras ópticas.

Como observamos en aquellos casos de transplantes heterotópicos, se consigue una estructura supernumeraria que a veces puede parecer un injerto.

## 3.3. INJERTOS.

Los injertos es otro de los métodos utilizados en Embriología Experimental. Consiste en introducir o incorporar todo o parte de una o más estructuras de un animal en otro; es decir, en los injertos no se realizan intercambios.

La clasificación es similar a la que veíamos para los transplantes. Los animales pueden ser de la misma especie (homoinjertos), o de especies diferentes (heteroinjertos). Cuando donante y receptor presentan el mismo estadío se habla de injertos homocrónicos y si son de estadíos diferentes, injertos heterocrónicos.

Finalmente cuando el injerto se introduce en el lugar anatómico normal, son injertos homotópicos, pero si se incorporan en lugares atípicos del receptor hablamos de injertos heterotópicos.

Es necesario aclarar que aunque es imposible injertar una estructura en el lugar anatómico normal, porque allí se encuentra la del receptor; cuando el injerto se coloca junto a su homólogo, consideramos que el injerto es homotópico.

Pueden realizarse injertos heteroespecíficos entre embriones de diferentes escalas filogenéticas (MARTINEZ ALVAREZ, 1987).

Antes de describir los injertos más característicos entre embriones de ave, queremos destacar los trabajos realizados en anfibios por CONSTANTINE-PATON y cols..

Esta autora y su grupo de trabajo han investigado sobre el desarrollo del nervio óptico y las conexiones retino-tectales en las ranas.

Injertan una vesícula óptica en la región cefálica entre los esbozos oculares del receptor y cuando el animal es adulto estudian la anatomía y las proyecciones del nervio óptico del ojo supernumerario.

Inyectan aminoácidos radiactivos en el tercer ojo y en uno de los ojos propios del receptor y tras una corta supervivencia de dos o tres días observan el patrón que forman las conexiones de las fibras ópticas en el tectum óptico.

El resultado es un patrón en bandas semejante al que presentan la mayoría de los mamíferos en el córtex visual cuando se inyectan aminoácidos radiactivos o HRP, en un solo globo ocular.

Esta imagen en bandas de los mamíferos se debe a la decusación, de aproximadamente el 50%, de las fibras ópticas a nivel del quiasma. La decusación es prácticamente nula en aves y anfibios, pero al añadir un tercer ojo, el tectum recibe aferencias de dos ojos y por esa razón en el tectum óptico se forma un patrón similar al del córtex visual de los mamíferos (CONSTANTINE-PATON y CAPRANICA, 1976a y b; LAW y CONSTANTINE-PATON, 1978; CONSTANTINE-PATON y LAW, 1978 y 1983).

Los injertos entre embriones de ave de la misma especie (homoinjertos) vienen utilizandose desde principios de siglo. Los más frecuentes han sido los homoinjertos heterocrónicos y heterotópicos entre embriones de pollo.

Aunque para el estudio del sistema visual se emplean injertos de vesículas ópticas y/o del sistema nervioso, en algunas ocasiones se han realizado experimentos inversos; es decir, injertos de otras estructuras, como vesículas óticas en

el mesénquima periocular (MURILLO FERROL, 1964b).

Al principio las vesículas ópticas se injertaban en corioalantoides. Así, HOADLEY (1924) injerta la vesícula óptica de embriones de pollo (E: 24-48 horas de incubación) en membrana corioalantoidea de otro embrión de pollo (E: 9-10 días de incubación). Con estos experimentos estudia el grado de desarrollo de las estructuras del globo ocular.

En algunos injertos se diferencian la mayor parte de las estructuras oculares, excepto la córnea. Normalmente tanto el pecten como el nervio óptico alcanzan un deficiente grado de desarrollo. La retina suele presentar gran número de pliegues que no son acompañados por el epitelio pigmentado.

Este autor concluye afirmando que las vesículas ópticas de los embriones de pollo entre los estadíos de 36 a 72 horas de incubación, poseen capacidad de autodiferenciación cuando se extirpan y se injertan en corioalantoides.

DANCHAKOFF (1922, 1924 y 1926), realiza varios trabajos mediante injertos de vesícula óptica y/o ectodermo cristaliniano prospectivo de embriones de pollo de distintos estadíos, en corioalantoides (homoinjertos heterocrónicos heterotópicos). La mayor parte de los estudios se encaminaban a esclarecer las inducciones que la vesícula óptica ejerce sobre el desarrollo y diferenciación del cristalino.

Cuando injerta vesícula óptica y ectodermo prospectivo se desarrolla el cristalino, aunque observa que si continúa el contacto entre la vesícula óptica y el ectodermo existe una tendencia a formarse un nuevo cristalino (1924).

También afirma que al injertar ectodermo cristaliniano prospectivo aislado o separado de la vesícula óptica, no se diferencia el cristalino. Por el contrario si se injertan juntos, si se forma cristalino (1926).

ALEXANDER (1937), con homoinjertos heterocrónicos heterotópicos de vesícula óptica, también en corioalantoides confirma algunas conclusiones de DANCHAKOFF.

En el 90% de experimentos obtiene tejido ocular en el lugar del injerto.

Afirma que para que se forme cristalino, es necesaria la presencia de la vesícula óptica y que en un mismo injerto pueden aparecer hasta cinco estructuras cristalinianas entre cristalino y cuerpos lentoides o cuerpos cristalinianos.

El cristalino es una estructura que puede diferenciarse a partir de la epidermis del huesped o conjuntamente del ectodermo del huesped y del injerto.

Estudia las dos capas de la vesícula óptica y afirma que ambas capas prospectivas (retina y epitelio pigmentado) son equipotenciales hasta, al menos, los 36 pares de somitos; aunque observa que la capa externa tiene mayor capacidad de diferenciación que la capa interna.

FUJISAWA (1971) y FUJISAWA y cols. (1974), ya no injertan toda una estructura o parte de ella, sino que disocian la retina neurosensorial de embriones de pollo de 6 días y medio de incubación y la introducen en corioalantoides.

Gracias a la microscopía electrónica de transmisión, observaron que se diferenciaba una retina neurosensorial prácticamente normal con tres capas nucleares, dos capas

plexiformes y las dos capas limitantes (interna y externa).

Se desarrollaron dos tipos de células ganglionares, las típicas con axón y otras que no presentaban axón.

Las células de Müller se extendían entre las capas limitante interna y externa.

Finalmente observaron que en los fotorreceptores no se habían desarrollado los artículos externos; explicando este hecho por la ausencia de epitelio pigmentado y porque estas células habían sufrido un retraso en el crecimiento.

GOLDBERG (1974), injertó cuadrantes de la retina neurosensorial en el tectum óptico para estudiar el desarrollo de las vías visuales en el embrión de pollo. Pudo observar que los cuadrantes de retina crecían, pero no tenían especificidad para dirigirse a zonas concretas del tectum.

Para estudiar la muerte celular en diferentes estructuras relacionadas con el sistema visual se han empleado varios métodos; la utilización de los injertos se basa en aumentar las aferencias periféricas.

NARAYANAN y NARAYANAN (1975 y 1978a), realizan homoinjertos heterocrónicos de vesícula óptica de embriones de pollo y estudian el ganglio ciliar, el núcleo oculomotor accesorio y el núcleo troclear.

Estos autores no mencionan los porcentajes de mortalidad, supervivencia y éxito obtenidos, ni se ocupan de estudiar el desarrollo del globo ocular.

En sus resultados observan que cuando se aumentan las aferencias procedentes de la perifería, disminuye la muerte celular en el ganglio ciliar y en los nucleos troclear y

oculomotor accesorio; por esta razón, normalmente existe una hiperplasia neuronal.

De la misma forma, mediante homoinjertos homocrónicos heterotópicos BOYDSTON y SOHAL (1979a y b) estudian la muerte celular en cl núcleo troclear y en el núcleo del istmo óptico (NIO) contralaterales al injerto y los comparan con los mismos núcleos homolaterales.

En estos trabajos realizaron 416 intervenciones con un porcentaje de éxito del 8%. Queremos destacar las condiciones que estos autores tienen para considerar que el injerto es un éxito:

-Que el ojo injertado esté bien desarrollado de tamaño.

-Que el injerto y el ojo derecho del receptor estén incluídos en la misma órbita.

-La existencia de movimientos oculares visibles.

-Una buena diferenciación histológica de retina y cristalino .

Los estudios en el NIO y en el núcleo troclear se realizaron con la inyección de HRP. Observaron que había un aumento del número de células en los núcleos contralaterales al injerto, debido a que disminuía la muerte celular por el incremento de las aferencias periféricas.

Para finalizar vamos a mencionar algunos trabajos sobre heteroinjetos.

McKEEHAN (1951), injerta vesículas ópticas o zonas presuntivas del tubo neural que originan las vesículas ópticas de embriones de pollo, en varias regiones: Debajo del ectodermo cefálico, en el cuello y en el colon de embriones de

pato.

En aquellos injertos que no había podido separar el ectodermo de la vesícula óptica, observó que siempre se desarrollaba cristalino.

Cuando injerta vesícula óptica prospectiva (pared de tubo neural), observa que solamente se diferencia cristalino a partir de la epidermis que entra en contacto con zonas muy concretas de la pared del cerebro injertado. Esas zonas concretas corresponderían a la futura retina.

NARAYANAN y NARAYANAN (1978b), realizan heteroinjertos de regiones del cerebro entre embriones de codorniz y pollo para estudiar el origen del ganglio ciliar en las aves.

Nosotros en 1.984, comenzamos ha realizar heteroinjertos de vesícula óptica entre embriones de codorniz y pollo (PUERTA FONOLLA y cols., 1984; RIAÑO GRANERO y cols., 1986).

Algunos de los trabajos más interesantes sobre heteroinjertos de vesícula óptica en embriones de ave han sido realizados por PUCHADES ORTS y JIMENEZ COLLADO (1973) y JIMENEZ COLLADO y cols. (1978, 1981 y 1983).

En los experimentos iniciales (1973 y 1978), injertan vesículas ópticas de codorniz entre los estadíos 8 y 92 en cavidad celómica de embriones de pollo (E: 16-18 HH); es decir, realizan heteroinjertos heterocrónicos heterotópicos.

Las primeras observaciones resultaron de gran interés, pues el globo ocular presentaba una buena diferenciación y desarrollo; aunque su crecimiento en el tiempo, no se adaptaba al huesped.

En algunas estructuras del injerto existían detalles interesantes, sobre todo a nivel de la retina y del epitelio pigmentado.

En algunos injertos la retina neurosensorial presentaba numerosos pliegues, justificados por la manipulación excesiva del injerto al introducirlo en el huesped.

El epitelio pigmentado no acompaña a los pliegues de la retina, pero en algunas zonas pierde el pigmento y se engruesa, transformandose en retina neurosensorial. En las zonas de transformación no existe mesénquima en contacto con la capa externa.

Por el contrario, en otras zonas el epitelio pigmentado aparecía más grueso y pigmentado. Este detalle coincidía con las zonas donde en el mesénquima se había desarrollado una formación vascular.

En el globo ocular diferenciado a partir del injerto, existe pecten y de su polo posterior parte un nervio óptico cuyas fibras se pierden en el interior de la cavidad celómica, al no tener un órgano diana donde dirigirse.

Basandose en sus propios trabajos, JIMENEZ COLLADO y cols. (1981 Y 1983), realizan heteroinjertos, no sólo de vesícula óptica, sino que añaden una porción de mesencéfalo, para observar la actividad de las fibras del nervio óptico ante la presencia de una estructura nerviosa.

El estudio del globo ocular desveló un ligero retraso en el crecimiento en relación al estadío teórico que debía de tener.

El mesencéfalo injertado se desarrolló como un conglomerado y en su capa germinal contactaba el nervio óptico del ojo, tras un corto recorrido.

Los autores piensan que este detalle demuestra que el mesencéfalo ejerce una acción de atracción especie-específica y dependiente, en relación a las fibras procedentes de las células ganglionares de la retina.

Todos estos autores basaron sus experimentos en los injertos de tejido ocular. Sin embargo, para estudiar los mecanismos de la morfogénesis ocular y los factores que los modifican, MURILLO FERROL (1964b) realizó homoinjertos de placoda auditiva en varias regiones del embrión de pollo (heterotópicos); entre ellas junto a la vesícula óptica y estudió las modificaciones en el desarrollo de las estructuras oculares.

En sus trabajos demostró que el epitelio pigmentado puede transformarse en retina neurosensorial cuando la capa externa de la vesícula óptica se desarrolla junto a la placoda auditiva injertada.

#### 4. JUSTIFICACION. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Revisando la bibliografía sobre Embriología Experimental, observamos que no se habían realizado heteroinjertos de vesícula óptica entre embriones de codorniz y pollo, en la región cefálica

los trabajos de Embriología Descriptiva, Cuando en comenzamos a estudiar el desarrollo del globo ocular aves. nos dimos cuenta que 1a mayoría de los utilizaban embriones de pollo. Además, como únicamente existe trabajo sobre el embrión de codorniz, publicado por ZACCHEI un 1961, donde sólo aparecen referencias macroscópicas de todo en el embrión; nos planteamos las siguientes metas:

- 1. Basandonos en los estadíos de ZACCHEI (1961), estudiar el desarrollo macro y microscópico del globo ocular del embrión de codorniz.
- Diseñar una técnica quirúrgica para injertar las vesículas ópticas de los embriones de codorniz, valorando el Método más eficaz para conseguir el mayor número de éxitos.
- 3. Estudiar el crecimiento y desarrollo de las estructuras oculares para compararlas con los controles y analizar las posibles diferencias.
- 4. Finalmente observar si, como sucede en los experimentos similares realizados entre anfibios, existen conexiones del injerto (nervio óptico) con el tejido nervioso del receptor.

## MATERIAL Y METODO

#### CONTROLES DE CODORNIZ

Para poder estudiar y comparar el grado de diferenciación que han alcanzado las estructuras oculares desarrolladas a partir de las vesículas ópticas injertadas se han procesato 145 embriones de codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*).

Los huevos se limpian con Alcohol éter (Eter etílico y alcohol absoluto al 50%); se incuban en una estufa MEMERT-UV a 38º centígrados (con variaciones de 0,5ºC.) de temperatura y una humedad entre 60% (en los primeros días) y 90% (en el momento de la eclosión) (figura 3).

Los embriones control fueron datados según los criterios de ZACCHEI (Z) (1961).

La clave de los embriones control de codorniz es "CT-".

Hemos escogido cinco embriones de cada estadío, a partir del E: 7 Z., hasta dos días después de la eclosión (1+ y 2+).

A partir del estadío 23 Z, los embriones fueron anestesiados con Eter etílico al 99%.

La fijación se realizó en Formol neutro 10%, durante 30 días y excepto en los embriones somíticos que se fijaron íntegros, en el resto solamente se fijó la cabeza. Durante este periodo se quitan las plumas o sus esbozos, para evitar que rasguen los cortes histológicos.

A partir del estadío 22 Z se procedió a decalcificar las cabezas en Acido Tricloroacético al 5% en Formol neutro 10%. El tiempo de permanencia en el decalcificador oscila entre un día, para los estadíos 22-23 Z, hasta 12 días para las codornices de 1 y 2 días posteclosión.

Los cortes se realizan en parafina con un microtomo convencional de raíles tipo MINOT de la casa LEITZ, oscilando el espesor de los cortes entre 7 y 10  $\mu m$ . Las técnicas de tinción utilizadas han sido:

-Hematoxilina de CARAZZI.

-BIELSCHOWSKI en bloque

#### PREPARACION DEL RECEPTOR

Se han utilizado embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) pertenecientes a la raza Shawer blanca, por tener una incidencia espontánea de microftalmías del 1% y un índice de fecundidad del 98% (figura 1).

Los huevos se limpian con Alcohol eter y se incuban a  $37^\circ$  centígrados (con variaciones de  $0,5^\circ$ C.) de temperatura y una humedad entre el 70 y 80% (figura 3).

Durante las primeras 24-48 horas de incubación se extraen 1% centímetros cubícos de albúmina a través del polo agudo del huevo, según la técnica habitual y se abre una ventana superior, para evitar que el embrión se adhiera a la cáscara. Ambos orificios se sellan con Parafilm y parafina líquida (figura 2).

Una vez que el embrión alcanza el estadío deseado para la intervención, aumentamos el tamaño de la ventana superior del huevo para conseguir un mayor campo operatorio y lo colocamos bajo una lupa estereoscópica de gran aumento NIKON SMZ-10 (figura 4).

Estadiamos los embriones según los criterios de HAMILTON y HAMBURGER (HH) (1951).

Para poder visualizar las estructuras coloreamos primero la membrana alantoidea con una mezcla de Azul Nilo y Agar-agar y después la región del embrión que vamos a manipular.

Con un microbisturí de tungsteno (cuyo diámetro en la punta alcanza aproximadamente 40-50 µm) se cortan las membranas y se realiza una incisión en la zona elegida para cada método, como especificamos más adelante. Así dejamos el receptor preparado.

#### OBTENCION DEL INJERTO

De la misma forma que en los controles hemos utilizado, como donante, embriones de codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*). Los huevos se preparan e incuban de la misma manera.

Cuando calculamos, por el tiempo de latencia e incubación, que los embriones han alcanzado el estadío deseado (27-48 horas, según cada método), se abre el huevo, se separa la clara e introducimos la yema en PBS (Solución Buffer Fosfato) a 37º centígrados. Con unas tijeras de iridectomía cortamos cuidadosamente el disco embrionario separandolo con unas pinzas de relojero de la membrana y restos de la yema.

Colocamos el embrión en un pocillo negro y teñimos la región cefálica con una mezcla de Azul Nilo y Agar-agar y lo estadiamos según los criterios de ZACCHEI.

Con la ayuda de las pinzas de relojero, las tijeras de VANNAS y el microbisturí de tungsteno aislamos la vesícula óptica derecha que transportamos al receptor mediante una microcucharilla o con la micropipeta de SPEMANN (figuras 6 a 8).

En todos los casos se pretendía aislar la vesícula óptica con parte del pedículo óptico y el correspondiente ectodermo superficial, en el que a veces ya había comenzado la diferenciación del esbozo cristaliniano.

#### TECNICA QUIRURGICA

En la realización de los injertos hemos utilizado tres métodos, que denominamos: Método A, B y C.

De un total de 320 embriones operados, 100 lo fueron con el Método A, 70 con el B y 150 con el C.

La clave para identificar los embriones quimera es sencilla, pues todos comienzan con la letra clave "O-" y después un número del 1 al 320 por orden cronológico de intervención.

Del 0-1 al 0-100 fueron operados por el Método A, del 0-101 al 0-170 por el B y del 0-171 al 0-320 por el C.

Existen una serie de condiciones que es necesario tener presente cuando se trabaja en Embriología Experimental. En primer lugar el ambiente estéril que debe rodear en todo momento la manipulación de los embriones; para ello el laboratorio está dotado de lámparas germicidas y el material quirúrgico se mantiene en un esterilizador (figura 5).

Otra condición importante es la de tener perfectamente sistematizado cada paso de la intervención. Así creemos que es fundamental comenzar preparando el receptor y una vez realizada la incisión proteger la ventana superior del huevo mientras procedemos a la obtención del injerto. Es necesario hacerlo en este orden para evitar al máximo la hidratación progresiva que sufre la vesícula óptica mientras se encuentra en PBS.

La hidratación provoca una menor viabilidad del injerto por la propia alteración de los tejidos; además el incremento del volumen hace que aumente la manipulación para conseguir introducirlo en el receptor.

Una vez que hemos depositado el injerto "in ovo", es importante introducir en la incisión al menos dos tercios de vesícula óptica, colocando en la zona más interna de 1a incisión el pediculo óptico. Esto puede obligarnos a manipular el injerto en exceso, lo que a veces provoca roturas de la vesícula óptica. En algunas ocasiones nos hemos visto obligados a cambiar el injerto y en otras los hemos dejado tal como estaban.

A continuación describimos los tres métodos utilizados en la realización de los injertos (ver esquema):

#### METODO A

En este método las vesículas ópticas proceden de embriones de codorniz entre los estadíos 10 y 13 Z (16-26 pares de somitos, 34-46 horas de incubación) y los embriones de pollo están comprendidos entre los estadíos 17 y 21 HH

(2%-3% días de incubación).

El injerto se introduce en una incisión realizada a nivel del mesénquima periocular del ojo derecho (figuras 9 y 10).

Este método corresponde a heteroinjertos homotópicos heterocrónicos.

#### METODO B

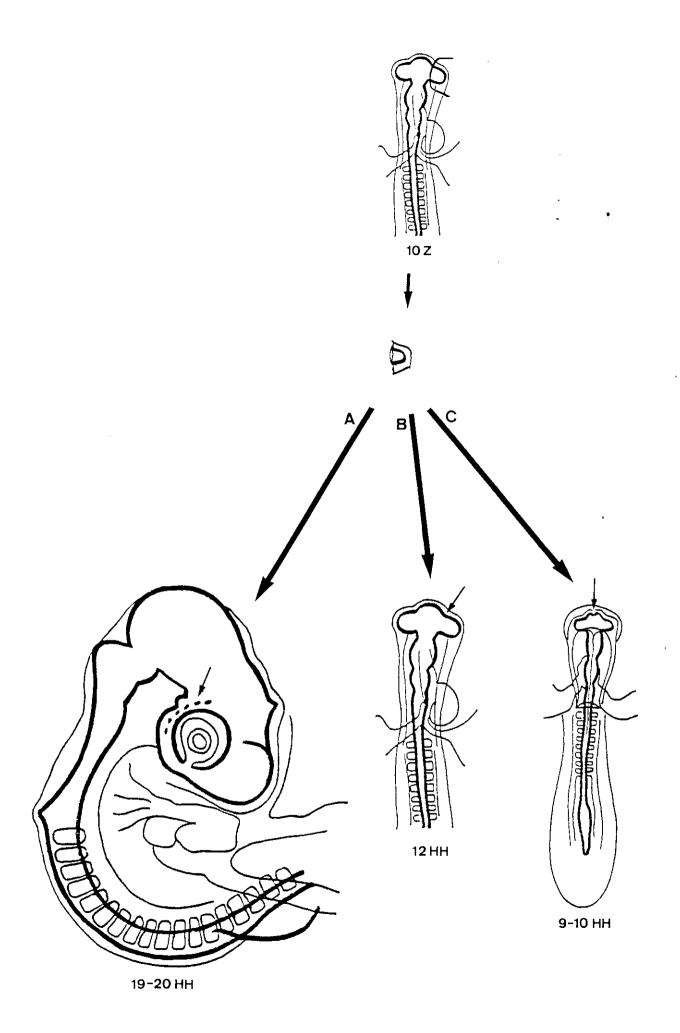
Las vesículas ópticas que proceden de embriones de codorniz entre los estadíos 10 y 12 Z (16-22 pares de somitos, 34-42 horas de incubación), se introducen en una incisión realizada en el mesénquima periocular junto al esbozo ocular derecho de embriones de pollo comprendidos entre los estadíos 12 y 14 HH (45-53 horas de incubación).

Este método corresponde a heteroinjertos homotópicos homo v heterocrónicos.

#### METODO C

Para realizar este método, el más numeroso, utilizamos vesículas ópticas procedentes de embriones de codorniz entre los estadíos 8 y 12 Z (10-22 pares de somitos, 29-42 horas de incubación), que se injertaron en embriones de pollo comprendidos entre los estadíos 9 y 13 HH (33-52 horas de incubación).

Las vesículas ópticas se introducen en el neuroporo anterior (cuando éste aún permanecía abierto) y en el resto de embriones se realiza una incisión en la línea medio-dorsal del diencéfalo (figuras 11 y 12).



Este método corresponde a heteroinjertos heterotópicos homo y heterocrónicos.

#### PERIODO DE SUPERVIVENCIA

Una vez que la intervención ha finalizado se cierra la ventana superior del huevo con Parafilm y parafina líquida; se introducen de nuevo en la estufa de incubación y se vigila diariamente su evolución.

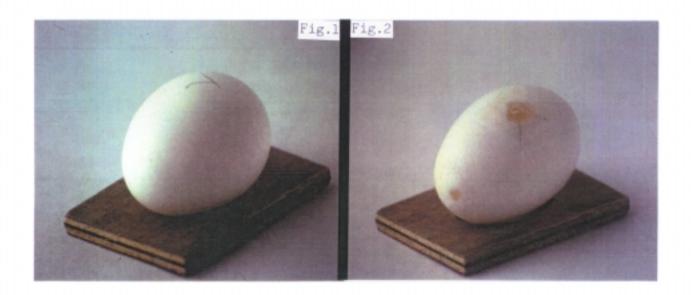
Los embriones quimera se sacan y se fijan escalonadamente en el tiempo, para intentar obtener diferentes estadios del desarrollo.

Cuando al abrir la ventana superior el embrión estaba muerto, se valoraba la posibilidad de procesarlo histológicamente realizando una prueba con algún miembro.

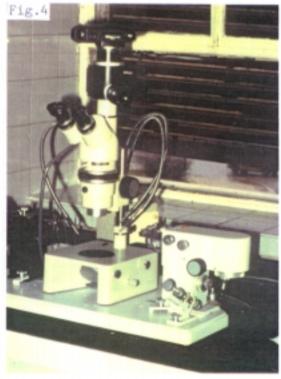
En aquellos casos que era imposible incluirlos para el estudio histológico por el deterioro de los tejidos, se les diseccionó la zona del injerto para estudiarlos macroscópicamente.

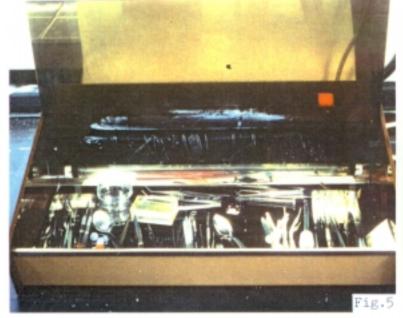
En este trabajo incluimos algunos embriones que estaban muertos, pero no macerados.

El tiempo de supervivencia oscila entre 3 y 16 días de incubación postcirugía. La razón de no sobrepasar el estadío 44 HH (18 días de incubación), responde al deterioro que sufren algunas estructuras oculares y del sistema nervioso, por los distintos productos utilizados en el proceso de decalcificación necesaria en los embriones a partir de los estadíos 29-30 HH.

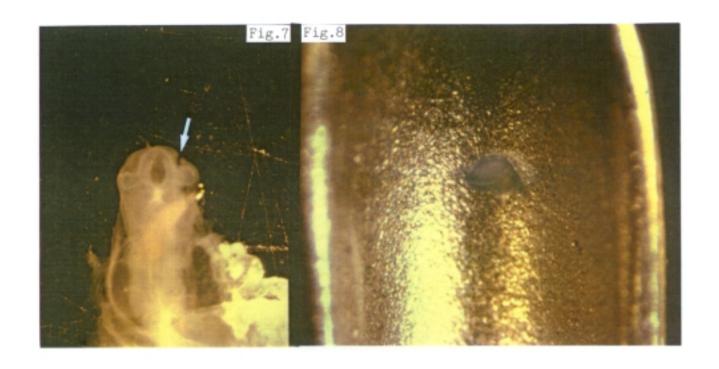


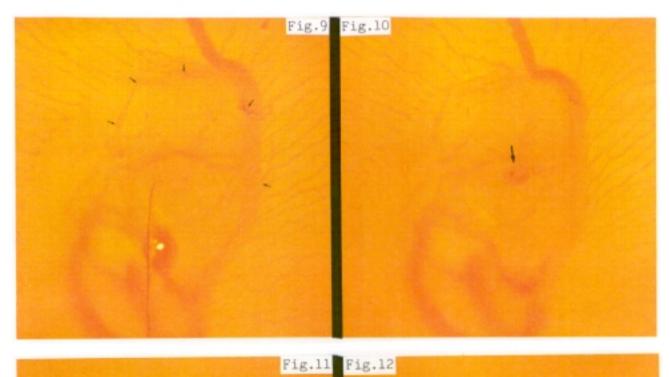


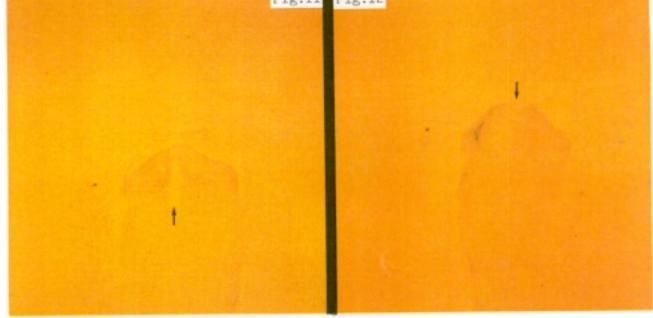












#### **FIJACION**

A los embriones de más de 10 días totales de incubación se les coloca un algodón impregnado en Eter etílico 99%, en la ventana superior del huevo, hasta que mueren.

La mayor parte de los embriones se fijaron en Formol neutro 10%.

Durante el periodo de fijación, los embriones se datan según los criterios de HAMILTON y HAMBURGER (HH) (1952); se decapitan y se despluman igual que con los controles de codorniz, para evitar que se rasguen los cortes histológicos.

El tiempo de fijación depende del tamaño de la cabeza y oscila entre uno y tres meses. El fijador se renueva normalmente cada 10 o 15 días.

#### PROCESO HISTOLOGICO

Tras la fijación algunos embriones, debido a su desarrollo, necesitan decalcificarse para ser cortados. Hemos realizado la decalcificación con ácido Tricloroacético al 5% en Formol neutro 10%.

El tiempo que las cabezas permanecen en el decalcificador oscila, entre un día para los embriones pequeños (29-30 HH) y 19-20 días para los más desarrollados (E: 43+ HH).

Los cortes se realizan en parafina con un microtomo convencional de raíles tipo MINOT de la casa LEITZ. El espesor de los cortes varía entre 7 y 10  $\mu m$ .

Las fotografías macroscópicas se realizan con un equipo fotográfico MEDICAL NIKON y las microscópicas con un NIKON-HFX, adaptado a la lupa estereoscópica NIKON SM-2 y al microscopio óptico NIKON-LABOPHOT.

#### TECNICAS DE TINCION

Las tinciones utilizadas han sido:

#### METODO DE HEMATOXILINA DE CARAZZI (HC):

- 1.- Desparafinar con 2 pases por xilo1 y otros 2 pases por alcohol de  $96^{\circ}$ .
  - 2.- Lavado con agua corriente.
  - 3.- Tinción con Hematoxilina de CARAZZI. (7-8 minutos)
  - Hematoxilina······1.0 gr.
  - Yodo potásico······0,2 gr.
  - Alumbre potásico·····50,0 gr.
  - Glicerina······200,0 cc.
  - Agua destilada·····800,0 cc.
  - 4.- Lavado con agua corriente, al chorro. (10-15 minutos)
  - 5.- Eosina amarillenta al 1%. (1-2 minutos)
  - 6.- Lavado ligero con agua.
- 7.- Deshidratación en alcohol de 96º, alcohol absoluto, carboxilol y xilol.

#### REACCION NUCLEAR DE FEULGEN (FE):

- 1.- Lavado rápido en C1H normal frío.
- 2.- Hidrólisis en C1H normal a 60ºC. (5 minutos)
- 3.- Lavado en C1H normal frío.
- 4.- Lavado rápido en agua destilada.
- 5.- Sumergir en reactivo de SCHIFF. (1 hora mínimo)
- 6.-·Sin lavar, sumergirlo (2 pases de 5 minutos) en una mezcla de:
  - 9 Partes de tampón fosfato, pH 2,3:
  - Fosfato monopotásico····14,0 gr.
  - \_\_\_\_ C1H······3.5 cc.
  - Agua destilada·····1000 cc.
  - 1 Parte de metasulfito de sodio al 15%.
  - 7.- Lavar en agua corriente. (10 minutos)

#### TECNICA DE BIELCHOWSKI EN BLOQUE (BB):

- 1.-·Fijación en Formol neutro 10% (Carbonato de magnesio a saturación), durante un mes.
  - 2.- Piridina al 50% en agua destilada. (2-4 días)
  - 3.- Lavado en agua corriente. (12-24 horas)
- 4.-·Lavado en agua destilada. (12-24 horas, renovandola varias veces)
  - 5.- Nitrato de plata al 3% a  $36^{\circ}$ C. (2-5 días)
  - 6.- Lavado en agua destilada. (pase rápido)
  - 7.- Plata amoniacal. (24 horas)
- 8.-Lavado en agua destilada. (1-2 horas, cambiandola con frecuencia)

- 9.- Reducción en Formol neutro 10%. (12-24 horas)
- 10.- Lavado en agua destilada.
- 11.- Inclusión en parafina.
- 12.- Cortes de 10 um.
- 13.-Para virar los cortes (BBV), se introducen ya montados en Cloruro de oro amarillo al 1/500. (entre unos segundos y 5 minutos)
  - 14.- Fijar en hiposulfito sódico al 5%.
  - 15.- Lavado en agua destilada.
  - 16.- Montar los cubres.

#### TECNICA DE SEVIER MUNGER (SM):

- 1.- Desparafinar e hidratar con agua destilada.
- 2.- Precalentar a 60º durante 15 minutos la solución de nitrato de plata al 20%. Meter los portas en la solución de plata caliente y dejarlos en la solución, dentro de la estufa. (15 minutos)
- 3.- Lavar cada porta durante un tiempo en agua destilada y ponerlos en un pocillo limpio.
- 4.-·Preparar la solución de plata amoniacal añadiendole 10 gotas de Formol (solución) agitando entre gota y gota; verter la solución rápidamente sobre los cortes hasta que adquieran un color marrón dorado y mover los portas para evitar los precipitados. (entre 5 a 30 minutos)
- 5.- Durante el paso anterior observar los cortes al microscopio, sin lavar, procurando que la diferenciación no sea ni muy fuerte ni muy suave.

- 6.- Lavar bien en agua corriente. (3 veces)
- 7.- Sumergir los cortes en una solución de tiosulfato sodico. (2 minutos)
  - 8.- Lavar en agua corriente.
- 9.- Deshidratar en alcohol 96º, alcohol absoluto y en xilol. 2 Pases en cada uno.
  - 10.- Montar.

#### METODO CAJAL-CASTRO (CC):

- 1.- 24 horas en el Fijador (Formol neutro 10%).
- 2.- Lavado en agua destilada (5 minutos).
- 3.- Decalcificación con una mezcla de Hidrato Cloral, Alcohol 96º y ácido Tricloroacético 5% a diferentes concentraciones y periodos de tiempo según el tamaño de las piezas. Después, 24 horas en ácido Tricloroacético 5% en Formol neutro 10%.
- $4.-\cdot24$  horas en una mezcla de Alcohol  $96^{\circ}$  (50cc) y Amoniaco (5 gotas).
- 5.- 7 días en nitrato de plata 1% a  $36^\circ$  centígrados con unas 10 gotas de piridina.
  - 6.- Lavado en agua destilada.
  - 7.- 24 horas en una mezcla de Hidroquinona, agua y Formol.

# RESULTADOS

(CONTROLES CODORNIZ)

Estadío 7: 7 pares de somitos.

27-29 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-4: 7 pares de somitos.

36 horas de incubación.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En la región más craneal del embrión se observa que el neuroporo anterior está abierto en la superficie ventral y dorsal del prosencéfalo.

El canal medular es visible y entre mesencéfalo y rombencéfalo aparece un ligero estrechamiento, distinguiendose ya las tres vesículas encefálicas.

Se inicia la eversión lateral de las vesículas ópticas a partir del prosencéfalo. (figuras 1 y 2)

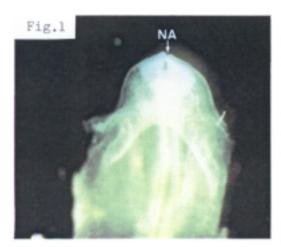
#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

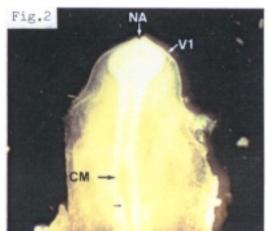
En la región dorsal observamos el neuroporo anterior abierto.

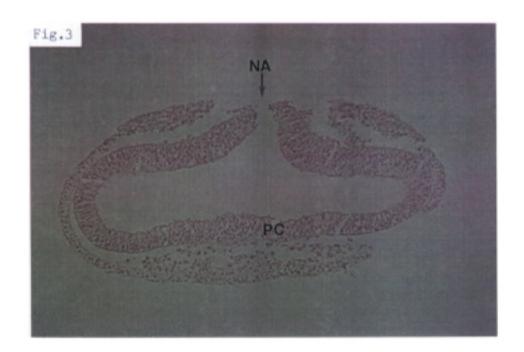
El ectodermo cefálico conserva una morfología uniforme en toda su extensión, exceptuando en la superficie dorsal donde se adelgaza.

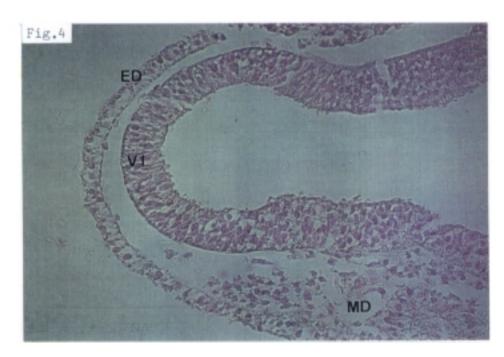
Las vesículas ópticas, en su crecimiento, se acercan al ectodermo superficial. Los núcleos de las células ectodérmicas tienden a situarse en el polo basal.

Entre las vesículas ópticas y el ectodermo no existe tejido mesodérmico. (figuras 3 y 4)









Estadío 8: 10 pares de somitos.

29-30 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-6: 10 pares de somitos.

33 horas de incubación.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En una visión dorsal del embrión, se observa que el neuroporo anterior, solamente permanece abierto en el extremo más craneal.

Se distingue claramente la separación entre diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo.

Las vesículas ópticas parecen contactar con el ectodermo superficial a la vez que inician una ligera inclinación caudal.

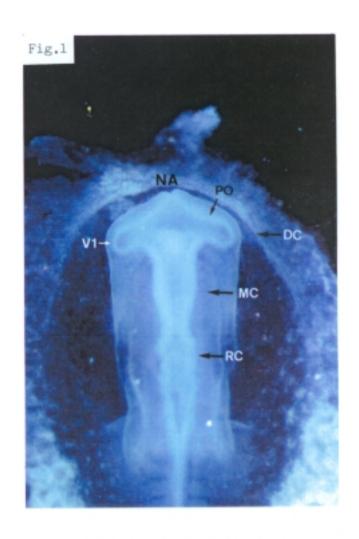
En la base del pedículo óptico aparece un leve estrechamiento. (figura 1)

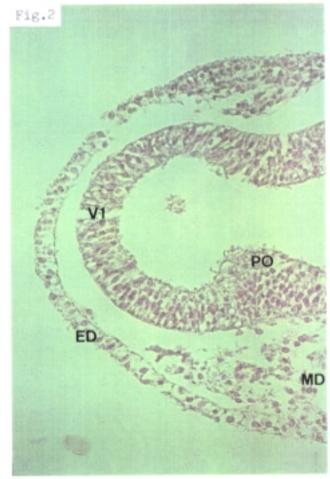
#### **ESTUDIO MICROSCOPICO:**

El ectodermo superficial es más delgado en la zona dorsal que en la lateral y en la ventral.

La vesícula óptica está rodeada de mesodermo, excepto en la zona que entra en relación con el ectodermo superficial. Entre ambas existe un espacio ópticamente vacío.

Se comienza a identificar mejor la zona que constituye el pedículo óptico y en su base se observa una ligera constricción. (figura 2)





Estadío 9: 13 pares de somitos.

33-34 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-15: 13 pares de somitos.

36 horas de incubación.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO:

El neuroporo anterior se ha cerrado en el extremo cefálico.

El esbozo cardiaco, desplazado a la derecha, inicia una incurvación en forma de "S". En él podemos diferenciar el bulbus cordis, el ventrículo, la aurícula y el seno venoso.

En su crecimiento lateral, las vesículas ópticas contactan con el ectodermo superficial, mientras la constricción del pedículo óptico es manifiesta. (figura 1)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

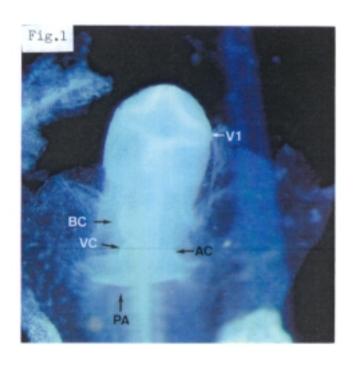
La superficie lateral y ventral de la vesícula óptica contacta con el ectodermo, que a ese nivel alcanza el máximo grosor, mientras que el mesodermo es evidente sólo en la zona dorsal.

Observamos como las células de la vesícula óptica tienden a orientarse y ordenarse en dirección a la superficie de contacto con el ectodermo. (figuras 2 y 3) ESTADIO 9: EMBRION CT-15

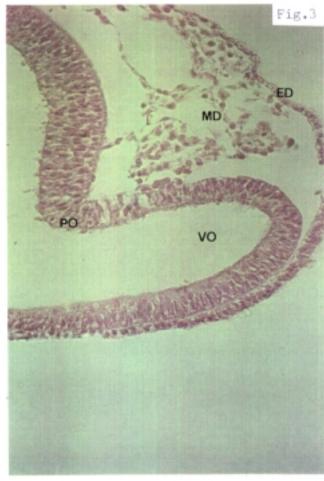
Fig.1: Visión ventral donde observamos las vesículas ópticas y el esbozo cardiaco. (3,5x)

Fig.2: Corte horizontal oblicuo que muestra como la vesícula óptica surge de la porción lateral del diencéfalo. (HC, 20x)

Fig.3: Detalle en el que vemos claramente las relaciones de la vesícula óptica con el ectodermo y el mesodermo. (HC, 40x)







Estadio 10: 16 pares de somitos.

34-36 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-17: 16 pares de somitos.

40 horas de incubación.

### **ESTUDIO MACROSCOPICO:**

La región cefálica inicia una ligera inclinación ventral.

En el esbozo cardiaco, situado a la derecha del embrión con forma de "S", distinguimos claramente el bulbus cordis y el ventrículo cardiaco. (figura 1)

Las vesículas ópticas crecen en dirección dorsal y lateral haciendo relieve en la región cefálica.

Observamos como las tres vesículas encefálicas: Telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, están perfectamente delimitadas. (figura 2)

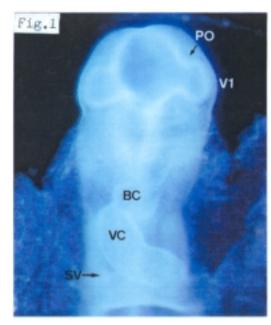
#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

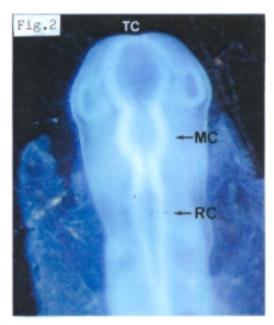
Las vesículas ópticas, en su crecimiento dorsal, están intimamente unidas al ectodermo superficial. Sus células se orientan hacia la zona de contacto. (figura 3)

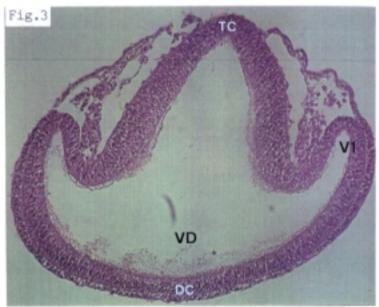
El mesodermo se sitúa dorsal a las vesículas ópticas. (figura 3)

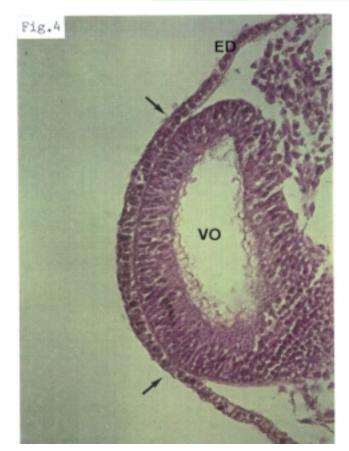
El ectodermo superficial que está en contacto con el sistema nervioso tiene mayor grosor. Esta característica se hace más evidente en el ectodermo que se relaciona con las vesículas ópticas. (entre flechas en las figuras 4 y 5)

Los ventrículos ópticos mantienen comunicación con el ventrículo diencefálico a través de la luz de los pedículos ópticos. (figura 3)











Estadío 11: 19 pares de somitos.

36-38 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-21: 19 pares de somitos.

42 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

La flexión ventral de la región cefálica se acentúa.

Continúa el desarrollo del esbozo cardiaco, delimitandose mejor sus estructuras.

La porción distal de las vesículas ópticas aparecen aplanadas y en intimo contacto en el ectodermo superficial que se hace más evidente por su mayor densidad.

Los pedículos ópticos presentan una marcada constricción de su base, aunque todavía permiten la comunicación entre los ventrículos ópticos y el diencefálico. (figuras 1 y 2)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

Existe un aumento considerable del espesor del ectodermo superficial que está en contacto con el extremo de las vesículas ópticas. Este engrosamiento corresponde a la placoda cristaliniana y representa el primer esbozo del cristalino.

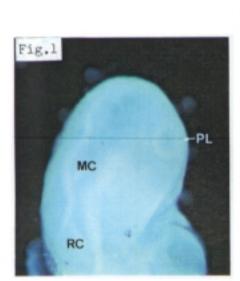
La pared de la vesícula óptica que se relaciona intimamente con la placoda cristaliniana es más gruesa que el resto.

Las células de ambas estructuras tienden a orientarse hacia la superficie de contacto.

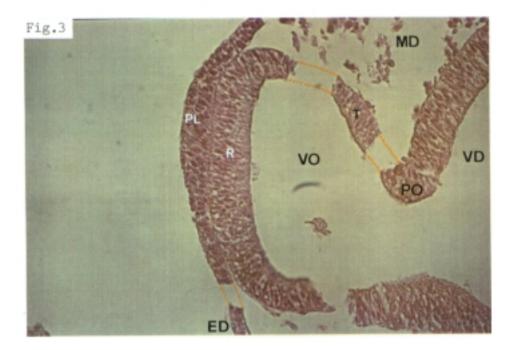
Los pedículos ópticos disminuyen de diámetro, pero aún conservan la luz en su interior. (figura 3)

### ESTADIO 11: EMBRION CT-21

- Fig.1: Visión dorso-lateral derecha, donde observamos la placoda cristaliniana como una zona de mayor densidad del ectodermo que está unido a la vesícula óptica. (4x)
- Fig.2: Visión ventral. Vemos como los extremos laterales de las vesículas ópticas están aplanados. El esbozo cardiaco continúa su desarrollo. (4x)
- Fig.3: Corte horizontal que permite observar con detalle la vesícula óptica y la placoda cristaliniana, así como la luz del pedículo óptico. (HC, 40x)







Estadío 12: 22 pares de somitos.

40-42 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-29: 22 pares de somitos.

48 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

La flexión ventral de la cabeza forma un ángulo de casi 90º con el tronco.

El ventrículo cardiaco se ha desplazado en dirección caudal, por lo que la aurícula cardiaca se sitúa por encima de él.

Observamos una abertura latero-dorsal a nivel de la flexión, que corresponde a la vesícula ótica.

En el centro de la vesícula óptica vemos una condensación del ectodermo que corresponde a la fosa cristaliniana. A nivel dorso-caudal comienza a delimitarse la fisura óptica. (figura 1)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

Observamos que en el centro de la vesícula óptica se inicia la invaginación conjunta de su pared distal y de la placoda cristaliniana. A ese nivel existe una relación íntima entre ambas estructuras. Hablamos ya de vesícula óptica secundaria y de fosa cristaliniana.

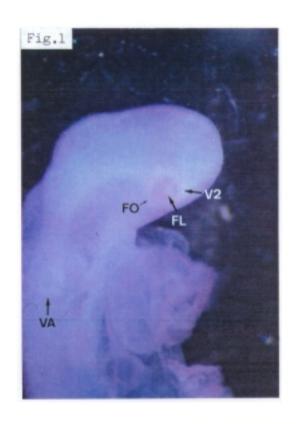
La pared distal de la vesícula óptica incrementa su espesor en relación con la pared proximal. (figuras 2 y 3)

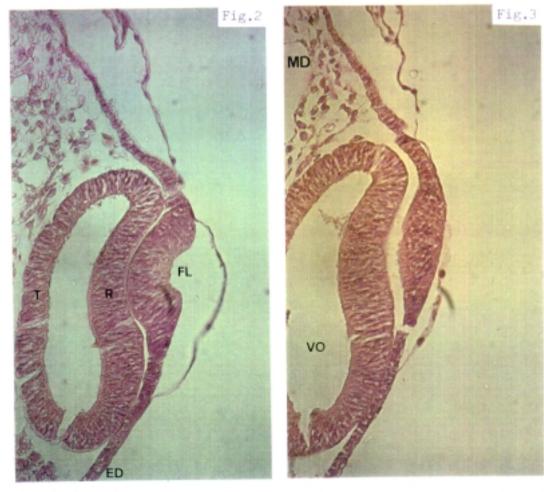
### ESTADIO 12: EMBRION CT-29

Fig.1: Visión lateral derecha. Se observa la inclinación ventral de la cabeza y en el centro de la vesícula óptica destaca la fosa cristaliniana, más densa que el resto del ectodermo. (4x)

Fig.2: Corte frontal oblicuo que coincide con el eje de invaginación de la pared distal de la vesícula óptica y de la fosa cristaliniana. (HC, 40x)

Fig.3: Corte frontal oblicuo a nivel del borde de la fosa cristaliniana. (HC, 40x)





Estadio 13: 24-26 pares de somitos.

44-46 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-33: 24 pares de somitos.

50 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

Los ejes del tronco y de la cabeza forman un ángulo agudo.

El esbozo cardiaco se encuentra dentro del embrión.

La abertura dorsal de la vesícula ótica apenas es visible; craneal a esta vesícula se distingue el núcleo del trigémino.

En el contorno de la cabeza destacan las vesículas telencefálicas y el tectum óptico.

Vemos como la vesícula óptica engloba a la fosa cristaliniana que presenta menor densidad en su centro.

La fisura óptica permanece abierta. (figura 1)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

Destaca el gran desarrollo de la pared distal de la vesícula óptica que triplica en espesor a la pared proximal.

Disminuye de forma importante el volumen del ventrículo óptico debido al acercamiento de las paredes de la vesícula óptica.

La fosa cristaliniana se sigue invaginando y comienza a ocultarse debajo del ectodermo superficial de donde deriva.

En el interior de la fosa cristaliniana se observan acúmulos de detritus celulares.

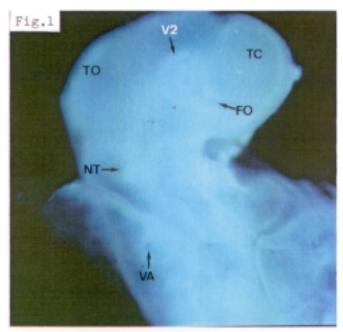
Aunque aparece exagerado por el proceso histológico, la fosa cristaliniana y la vesícula óptica comienzan a separarse, por lo que existe un espacio ópticamente vacío entre ambas. (figuras 2 y 3)

### ESTADIO 13: EMBRION CT-33

Fig.1: Visión lateral derecha. La vesícula óptica engloba a la fosa cristaliniana. Se aprecia la fisura óptica. (4x)

Fig.2: Corte horizontal que coincide con el eje de la vesícula óptica. Observamos como los bordes de la fosa cristaliniana tienden a aproximarse. (HC, 40x)

Fig.3: Corte horizontal del embrión (parasagital en relación a la vesícula óptica), que muestra los detritus celulares (flecha) en el interior de la fosa cristaliniana. (HC, 40x)







Estadío 14: 26-32 pares de somitos.

50-58 horas de incubación.

Ejemplos: Embrión CT-39: 27 pares de somitos.

56 horas de incubación.

Embrión CT-36: 32 pares de somitos.

60 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En ambos embriones la flexión ventral de la cabeza es máxima. (figuras 1 y 2)

Debido a la posición del embrión CT-39 (figura 1) podemos observar ambas vesículas óticas, la izquierda por transparencia.

Vemos que los bordes de la fisura óptica contactan en la zona media del pedículo, mientras que permanecen separadas en dirección proximal y distal. (figura 1)

En el embrión CT-36 (figura 2) distinguimos el núcleo del trigémino, dorsal a la vesícula óptica. La vesícula óptica engloba a la vesícula cristaliniana que presenta una zona central de menor densidad. Los bordes de la fisura óptica se van acercando en dirección distal.

En ambos embriones destaca el desarrollo de las vesículas telencefálicas y tectum óptico y comienza a verse el esbozo del cerebelo. (figuras 1 y 2)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

Existe una diferencia entre ambos embriones en cuanto al momento evolutivo en que se encuentra el esbozo del cristalino. En el embrión de 27 pares de somitos (CT-39) (figuras 3 y 4), vemos que los bordes aún no se han fusionado por lo que hablamos de fosa cristaliniana. Por el contrario en el otro embrión de 32 pares de somitos (CT-36) (figuras 5 y 6), los bordes se están fusionando y hablamos ya de vesícula cristaliniana. Todavía se observa el pedículo de unión residual de la vesícula cristaliniana con el ectodermo que lo recubre. En el interior aparecen detritus celulares.

Entre la pared proximal de la fosa cristaliniana y la capa interna de la vesícula óptica observamos algunas fibras que identificamos como el primer esbozo del vítreo. (figuras 3 y 4)

En relación a la vesícula óptica, no existen diferencias entre ambos embriones. La pared distal pasa a ser capa interna y conserva e incrementa su grosor en relación a la pared proximal que pasa a ser capa externa.

El ventrículo óptico aparece como una franja ópticamente vacía entre ambas capas de la vesícula óptica que aún se comunica con el ventrículo diencefálico a traves de la luz del pedículo óptico.

La pared proximal de la vesícula cristaliniana comienza a desarrollarse y ya es algo más gruesa que la pared distal. (figuras 3 a 6)

- ESTADIO 14: EMBRIONES CT-39 y CT-36
- Fig.1: Visión lateral derecha del embrión CT-39 donde vemos que los bordes de la fisura óptica contactan sólo en la zona media. (2,5x)
- Fig.2: Visión lateral derecha del embrión CT-36. Observamos que ha aumentado en dirección distal la zona de contacto de los bordes de la fisura óptica. (4x)
- Fig.3: Corte frontal del embrión CT-39, coincidiendo con el eje de la vesícula óptica, en el que vemos que los bordes de la fosa cristaliniana aún no están en contacto. (HC, 20x)
- Fig.4: Detalle que permite apreciar las diferencias entre ambas capas de la vesícula óptica. Entre la fosa cristaliniana y la vesícula óptica observamos el primer esbozo del vítreo (flecha) (HC, 40x)
- Fig.5: Corte horizontal oblicuo del embrión CT-36. Observamos que los bordes de la vesícula cristaliniana se han fusionado. (HC, 20x)
- Fig.6: Detalle de la vesícula cristaliniana donde podemos distinguir el pedículo de unión de la vesícula cristaliniana y el ectodermo superficial. Se aprecian algunos acúmulos de detritus celulares (flechas) en el interior de la vesícula. (HC, 40x)



Estadio 15: 36-40 pares de somitos.

62-68 horas de incubación.

Ejemplos: Embrión CT-41: 36 pares de somitos.

67 horas de incubación.

Embrión CT-44: 40 pares de somitos.

72 horas de incubación.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO: (CT-44)

En el tronco se observan los esbozos de los miembros superiores e inferiores. (figura 1)

Vemos que craneal a la vesícula ótica se encuentra el núcleo del VII y VIII pares craneales y dorsal a la vesícula óptica el núcleo del trigémino

En el contorno de la cabeza del embrión (de dorsal a ventral) destacan el cerebelo, tectum óptico, primer esbozo de la epífisis y vesículas telencefálicas.

En relación a la fisura óptica solamente podemos observar que los bordes del extremo distal están en contacto, pero aún no se han fusionado.

La vesícula cristaliniana, dentro de la vesícula óptica, se encuentra ligeramente desplazada caudalmente. (figuras 1 y 2)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

En ambos embriones aún se pueden observar zonas de contacto entre el ectodermo superficial y la vesícula cristaliniana. (figuras 3 y 5)

El ectodermo que recubre la vesícula cristaliniana tiene dos capas celulares. (figura 4)

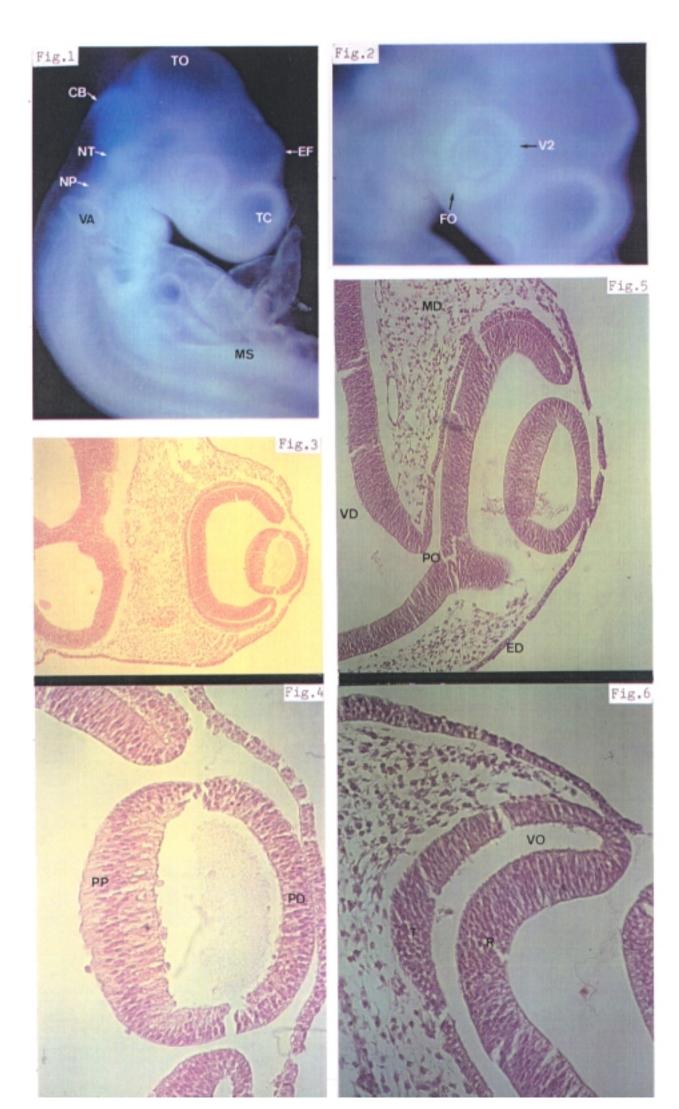
Las capas de la vesícula óptica comienzan a contactar, pero todavía podemos observar el ventrículo óptico y su comunicación con el ventrículo diencefálico a través de la luz del pedículo óptico. (figuras 3 y 6)

La capa interna de la vesícula óptica es mucho más gruesa que la capa externa. Esta diferencia es menos marcada en los bordes de la vesícula. (figura 6)

En la vesícula cristaliniana, las paredes también tienen diferentes grosores. En la pared proximal las células comienzan a alargarse, aumentando de grosor en relación a la pared distal. (figuras 3 y 5)

El mesodermo que rodea a la vesícula óptica, se extiende justo hasta su borde, sin sobrepasarlo. (figuras 3 y 6)

- ESTADIO 15: EMBRIONES CT-41 y CT-44
- Fig.1: Visión lateral derecha del embrión CT-44 donde observamos el esbozo del miembro superior, los núcleos de los pares craneales V, VII y VIII y las vesículas óptica y ótica. (2,5x)
- Fig.2: Detalle de las vesículas óptica y cristaliniana. (4x)
- Fig.3: Corte horizontal oblicuo del embrión CT-44, donde vemos que la vesícula cristaliniana está todavía en contacto con el ectodermo. (HC, 10x)
- Fig.4: Detalle de la vesícula cristaliniana del embrión CT-44 en el que se observa la elongación de las células de la pared proximal. (HC, 40x)
- Fig.5: Corte frontal del embrión CT-41 que permite ver la situación del ventrículo óptico. (HC, 20x)
- Fig.6: Detalle del borde de la vesícula óptica del embrión CT-41, donde observamos que a ese nivel la diferencia de grosor entre ambas capas es menos significativa. El mesodermo que rodea a la vesícula óptica se extiende hasta su borde, sin sobrepasarlo.  $(HC,\ 40x)$



Estadio 16: 72 horas de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-46: 76 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En la cabeza, el tectum óptico comienza a destacar del resto de estructuras encefálicas. La epífisis se encuentra entre el tectum óptico y las vesículas telencefálicas y es más evidente que en estadíos anteriores.

El proceso maxilar, que se extiende hacia la mitad de la vesícula óptica, duplica casi en longitud al proceso mandibular.

El  $2^{\circ}$  y  $3^{\circ}$  arcos branquiales son claramente visibles en la parte anterior del cuello.

La vesícula óptica comienza a pigmentarse. Este hecho se pone de manifiesto por dos detalles; en primer lugar vemos que la vesícula cristaliniana tiene un color blanco que destaca del tejido que le rodea; y en segundo lugar el contorno dorsal y craneal de la vesícula óptica presenta un tono oscuro debido al efecto aposición. Si nos fijamos con detenimiento en este último detalle podemos ver un halo oscuro en la superficie externa de la vesícula óptica. (figuras 1 y 2)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

La pared proximal de la vesícula cristaliniana, debido al proceso de elongación de sus células, ha crecido hasta contactar con la pared distal. A pesar de ello, vemos como queda un anillo localizado en la perifería y que corresponde a

#### la cámara cristaliniana

Los núcleos de las células elongadas, normalmente se sitúan en el centro de las células, adoptando forma de "media luna". (figuras 3 y 4)

En el espesor del ectodermo que recubre el cristalino existen dos capas de células. (figuras 4 y 6)

El mesodermo que rodea la vesícula óptica contiene vasos de gran calibre (figura 5) y no sobrepasa los bordes de ésta, por lo que entre la vesícula cristaliniana y el ectodermo superficial queda un espacio ópticamente vacío. (figuras 3, 4 y 6)

Los bordes de la vesícula óptica llegan hasta el ecuador del cristalino, sobrepasandolo ligeramente. (figuras 3 y 4)

Aunque ambas capas de la vesícula óptica están en contacto, aún quedan algunas zonas, como en los bordes, en las que se mantienen separadas. (figuras 3, 5 y 6)

En algunas zonas de la capa externa de la vesícula óptica (futuro epitelio pigmentado) se ven los primeros acúmulos de pigmento. Estas zonas pigmentadas coinciden con las de menor grosor de la capa externa. (figuras 3 y 5)

La capa interna de la vesícula óptica (futura retina) presenta una morfología semejante en toda su extensión, salvo a nivel de los bordes en los que disminuye de espesor. (figuras 3, 5 y 6)

ESTADIO 16: EMBRION CT-46

Fig.1: Visión lateral izquierda donde vemos el I, II y III arcos branquiales. (1,5x)

Fig.2: Detalle de la cabeza en la que destaca el desarrollo del tectum óptico y de la vesícula óptica y donde observamos además el cerebelo, la epífisis y el telencéfalo. Las flechas señalan el halo oscuro en la superficie externa de la vesícula óptica. (2x)

Fig.3: Corte frontal oblicuo que muestra todas las estructuras de la vesícula óptica. (HC, 10x)

Fig.4: Detalle del cristalino donde vemos la elongación de las células de la pared proximal que han ocluido casi totalmente la luz, pues todavía se observa la camara cristaliniana (flechas). (HC, 40x)

Fig.5: Detalle de la zona central de la vesicula óptica que muestra como en algunos puntos la capa externa comienza a pigmentarse. (HC, 40x)

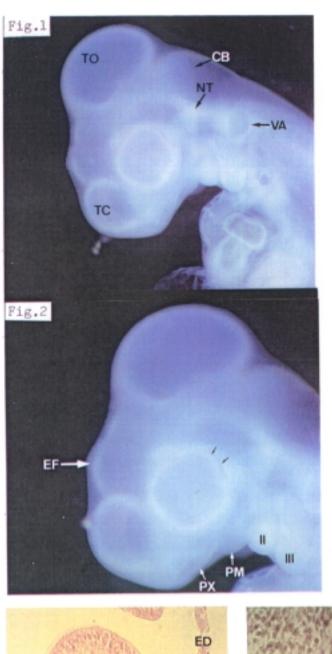
Fig.6: Detalle del borde de la vesicula óptica;

(HC, 40x)

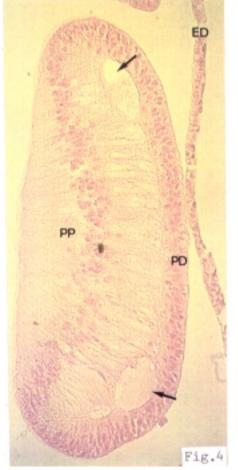
provided that the second of th

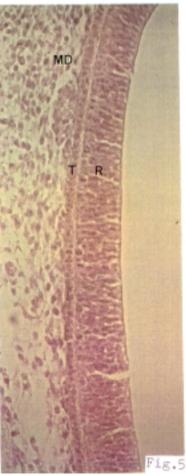
ting the first of the control of the

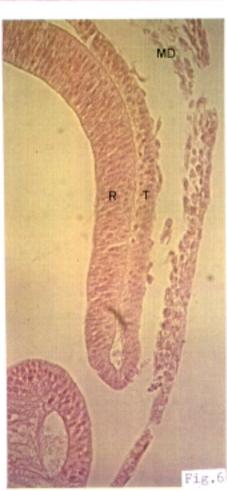
 $(2.5, 1.5) \times (2.5, 1.5) \times (2.$ 





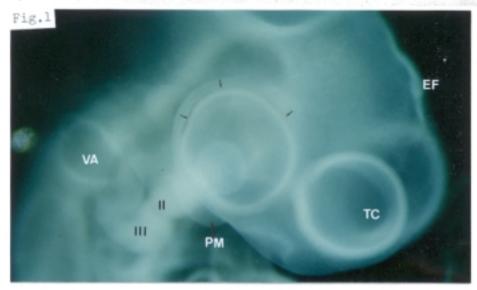






### ESTADIO 17: EMBRION CT-52

Fig.1: Visión lateral derecha de la cabeza en la que destaca la pigmentación del contorno de la vesícula óptica (flechas). (4x)



Estadio 17: 3 días y medio de incubación

Ejemplo: Embrión CT-52: 3 días y 10 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

Los esbozos de los miembros comienzan a ser más largos que anchos.

Se distingue claramente la epífisis situada en la línea media entre el tectum óptico y las vesículas telencefálicas.

En relación a la vesícula óptica, el proceso mandibular y los arcos branquiales  $2^{\circ}$  y  $3^{\circ}$  se sitúan caudales y el núcleo del trigémino dorsal.

Vemos que la vesícula óptica es más grande que las vesículas telencefálicas.

El cristalino está perfectamente delimitado en el interior de la vesícula óptica.

Como ocurría en el estadío anterior, aunque aquí es mucho más evidente, la pigmentacion de la capa externa de la vesícula óptica se observa con nitidez por el efecto aposición y delimita su contorno. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

El mesodermo que rodea la vesícula óptica comienza a sobrepasar los bordes de ésta y se introduce entre el ectodermo superficial y el epitelio anterior del cristalino. Este fenómeno, que tiene lugar de la perifería al centro, se denomina primera oleada mesodérmica y es el origen del endotelio corneal. (figuras 2 a 4)

La cámara cristaliniana ha desaparecido, ya que la pared proximal se ha fusionado completamente a la pared distal, que a partir de ahora llamaremos epitelio anterior del cristalino. Los núcleos celulares de la pared proximal mantienen la disposición en forma de "media luna" que observabamos en estadíos anteriores. (figuras 2 y 3)

A lo largo de la línea de cierre de la fisura óptica observamos el primer esbozo del pecten como un grupo de células que acompañan a la arteria cupulae retinae y que hacen relieve en el interior de la vesícula óptica. (figura 5)

En las células de la capa externa de la vesícula óptica (epitelio pigmentado) se pueden identificar claramente granos de pigmento. Normalmente la pigmentación tiene su origen en la zona central, donde la capa es más fina, y se extiende hacia los bordes de la vesícula. (figuras 2 y 8)

El espesor de la capa externa de la vesícula óptica es semejante a lo largo de toda la circunferencia, aunque en algunos embriones hemos observado que en los bordes se engruesa ligeramente. (figuras 2 y 4 a 8)

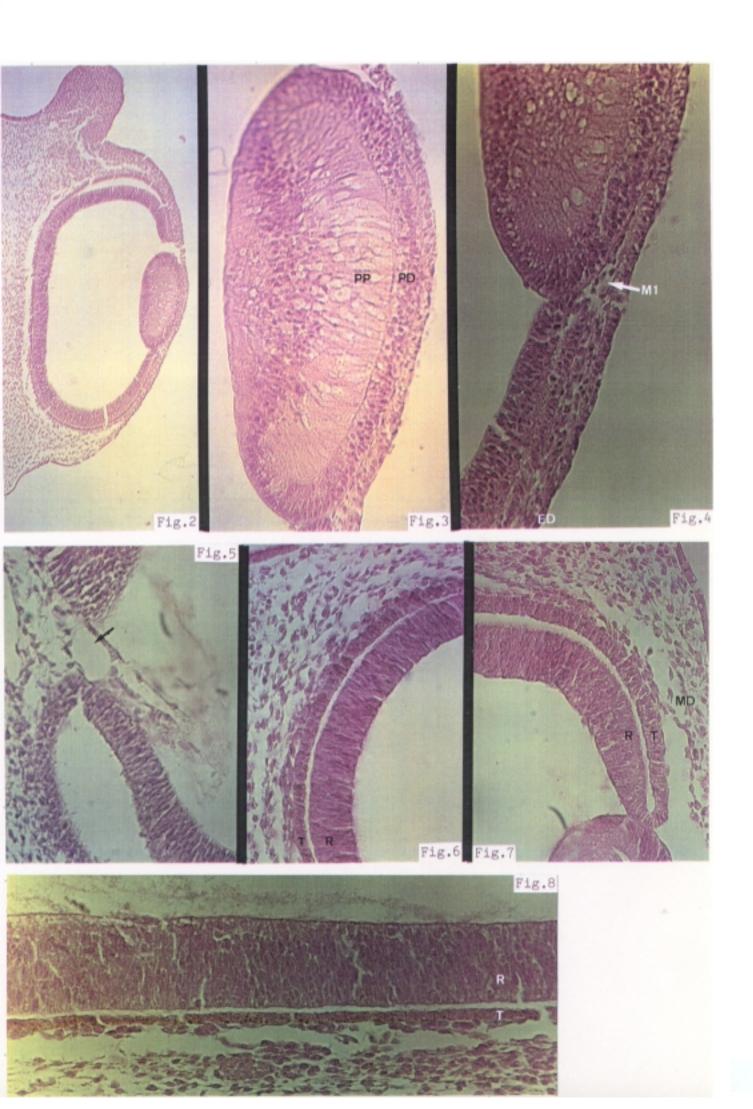
La capa interna de la vesícula óptica aunque claramente más gruesa, también presenta un espesor uniforme en toda su extensión, salvo en los bordes que se adelgaza ligeramente. la superficie interna de esta capa se observa un límite uniforme que corresponde a la limitante interna. (figuras 2 y 4 a 8)

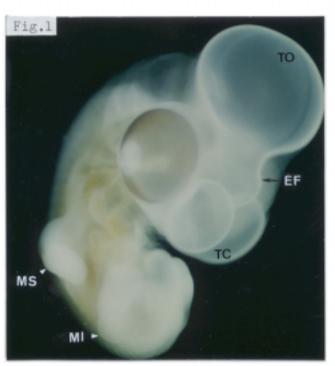
En el espesor de la capa interna (retina neurosensorial) se puede definir una ordenación concreta en capas. (figura 8)

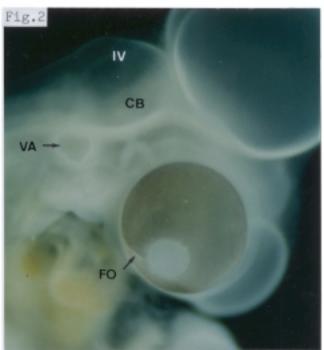
16.81

#### ESTADIO 17: EMBRION CT-52

- Fig.2: Corte frontal donde observamos todas las estructuras que integran la vesícula óptica. (HC, 10x)
- Fig.3: Detalle del cristalino en el que han desaparecido los restos de la cámara cristaliniana, al fusionarse la pared proximal con la distal. (HC, 40x)
- Fig.4: Detalle de la primera oleada mesodérmica que comienza a introducirse entre el cristalino y el ectodermo. (HC, 40x)
- Fig.5: Corte a nivel de la fisura óptica donde vemos el primer esbozo del pecten con la arteria cupulae retinae (flecha). (HC, 40x)
- Fig.6: Detalle de la pared de la vesícula óptica entre la zona central y la perifería. En la capa externa no observamos indicios de pigmentación. (HC, 40x)
- Fig.7:..Detalle del borde de la vesícula óptica. (HC, 40x)
- Fig.8: Detalle de la pared de la vesícula óptica en la zona central. Además de la gran diferencia de grosor, en la capa externa destaca la presencia de pigmento. (HC, 40x)







ESTADIO 18: EMBRION CT-58

Fig.1: Visión fronto-lateral derecha. En la cabeza destaca la pigmentación del globo ocular, la epífisis, las vesículas telencefálicas y el gran tamaño del tectum óptico. (1,4x)

Fig.2: Visión lateral derecha. Se observa con detalle el globo ocular. (1,8x)

Estadío 18: 4 días de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-58: 4 días y 6 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En los miembros, girados en dirección caudal, aparecen los pliegues del codo y rodilla y comienza a diferenciarse la lámina digital. (figura 1)

En la cabeza destacan los globos oculares por su tamaño y por su evidente pigmentación y el tectum óptico por el gran desarrollo que alcanza.

En el extremo más anterior vemos las vesículas telencefálicas y entre ellas y el tectum óptico, la epífisis haciendo relieve. En la parte posterior observamos el cerebelo y el IV ventrículo.

Las vesículas óticas se localizan dorso-caudales con relación a los globos oculares.

El cristalino se hace mucho más evidente sobre el fondo pigmentado. Lo mismo ocurre con la fisura óptica que se extiende desde el borde de la vesícula óptica hasta su límite posterior. (figuras 1 y 2)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

El mesodermo que rodea al epitelio pigmentado comienza a condensarse en algunas zonas. (figura 3)

Las células de la primera oleada mesodérmica se sitúan formando una hilera por debajo del epitelio, constituyendo el esbozo del endotelio corneal. Entre el epitelio y el endotelio apreciamos un espacio, ópticamente vacío, que corresponde al estrato acelular de la córnea. (figuras 3 a 5)

Podemos delimitar el esbozo de la cámara anterior. Su límite externo es el endotelio corneal; el interno, el epitelio anterior del cristalino y el lateral, el borde de la vesícula óptica con el mesodermo circundante. (figuras 3 a 5)

El cristalino presenta una morfología globulosa, casi esférica. Las células de la pared proximal, constituyen las fibras primarias del cristalino. (figuras 3 y 4)

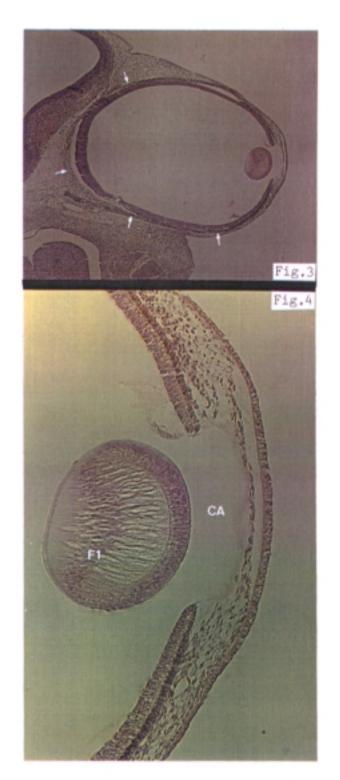
En la fisura óptica vemos que el esbozo del pecten penetra ligeramente en el globo ocular. En su interior observamos la presencia de la arteria *cupulae retinae*. (figura 7)

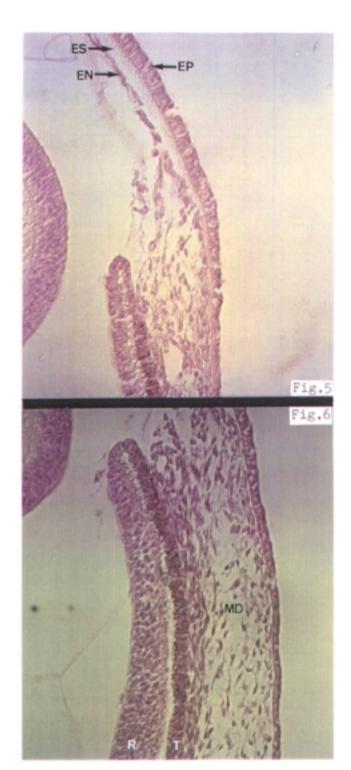
La capa externa de 1a vesícula óptica aparece En los bordes, la pigmentación es completamente pigmentada. tenue y los granos de pigmento parecen tener una cierta orientación, ya que se situán de forma preferente en el polo célula más cercano a la capa interna; por el contrario de en 1a zona central se sitúan en la superficie (figuras 4 a 8)

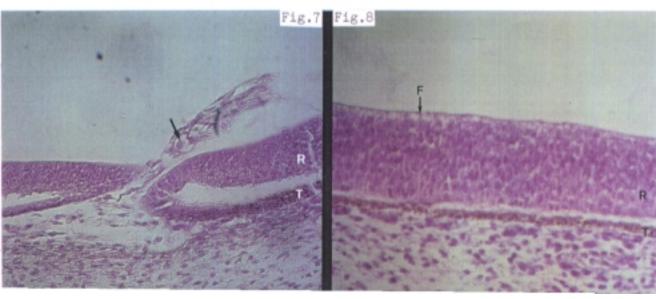
La retina disminuye de espesor en los bordes. Aunque aún no puede hablarse de ordenación en capas, en la superficie interna existe una pequeña franja acelular que podría corresponder a la capa de fibras ópticas. (figuras 5 a 8)

#### ESTADIO 18: EMBRION CT-58

- Fig.3: Corte horizontal oblicuo en el que pueden verse todas las estructuras del globo ocular y la condensación del mesodermo que lo rodea (flechas). (HC, 4x)
- Fig.4: Corte del segmento anterior donde observamos con detalle el esbozo de la cámara anterior con sus límites, córnea, cristalino y vesícula óptica. (HC, 20x)
- Fig.5: Detalle de la perifería de la córnea y del borde de la vesícula óptica. (HC, 40x)
- Fig.6: Detalle del borde de la vesícula óptica que nos permite ver la disposición de los granos de pigmento en el interior de las células. (HC, 40x)
- Fig.7: Corte a nivel de la fisura óptica. Detalle del pecten con la arteria cupulae retinae (flecha). (HC, 40x) Fig.8: Detalle del epitelio pigmentado y retina a nivel central. En la superficie interna de la retina se distingue la capa de fibras ópticas. (HC, 40x)



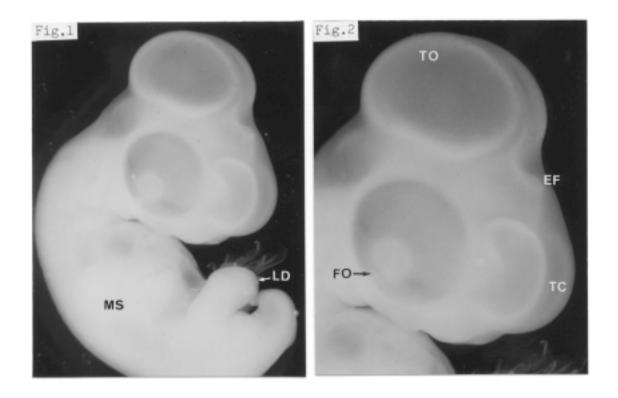




ESTADIO 19: EMBRION CT-61

Fig.1: Visión ventro-lateral derecha donde podemos observar la epífisis y el gran desarrollo del tectum óptico. (1x)

Fig.2: Detalle de la cabeza. Vemos la pequeña escotadura que la fisura óptica provoca en el orificio pupilar.



### ESTADIO 19:

Estadio 19: 4 días y medio de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-61: 4 días y medio de incubación.

#### **ESTUDIO MACROSCOPICO:**

Las extremidades se han alargado y en la lámina digital se observan pequeñas depresionas que separan los dedos. (figura 1)

El orificio del conducto auditivo externo aparece como una pequeña fisura.

El tectum óptico es la estructura nerviosa más voluminosa de la cabeza. Las vesículas telencefálicas conservan un tamaño similar a estadíos anteriores, aunque más pequeñas debido al crecimiento de la cabeza. La epífisis es claramente visible entre el tectum óptico y las vesículas telencefálicas.

Los globos oculares presentan una pigmentación más intensa.

La fisura óptica origina una pequeña escotadura en el orificio pupilar. (figuras 1 y 2)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

En la condensación mesodérmica que rodea el epitelio pigmentado se observan zonas de mayor densidad, vasos sanguíneos y filetes nerviosos. (figuras 3, 6 y 8)

E1 cristalino con una morfología ovoide está ocupado las fibras primarias. Los núcleos casi su totalidad por celulares son difíciles de identificar con esta tinción. En epitelio anterior existen dos zonas con diferentes morfologías. Así las regiones ecuatorial y preecuatorial más gruesas y sus células captan con mayor intensidad al colorante (mayor actividad metabólica, mitosis); sin embargo, la región central es más delgada y sus células muestran una coloración pálida. (figuras 3 y 4)

En la córnea observamos tres capas, la interna que tiene una sola hilera de células planas (endotelio), la externa más ancha y poliestratificada (epitelio) y entre ambas se sitúa el estrato acelular. (figuras 4 y 5)

La cámara anterior aparece ópticamente vacía, aunque a nivel periférico está parcialmente ocupada por tejido que surge a partir del mesódermo situado en los bordes de la vesícula óptica. (figuras 3 a 5)

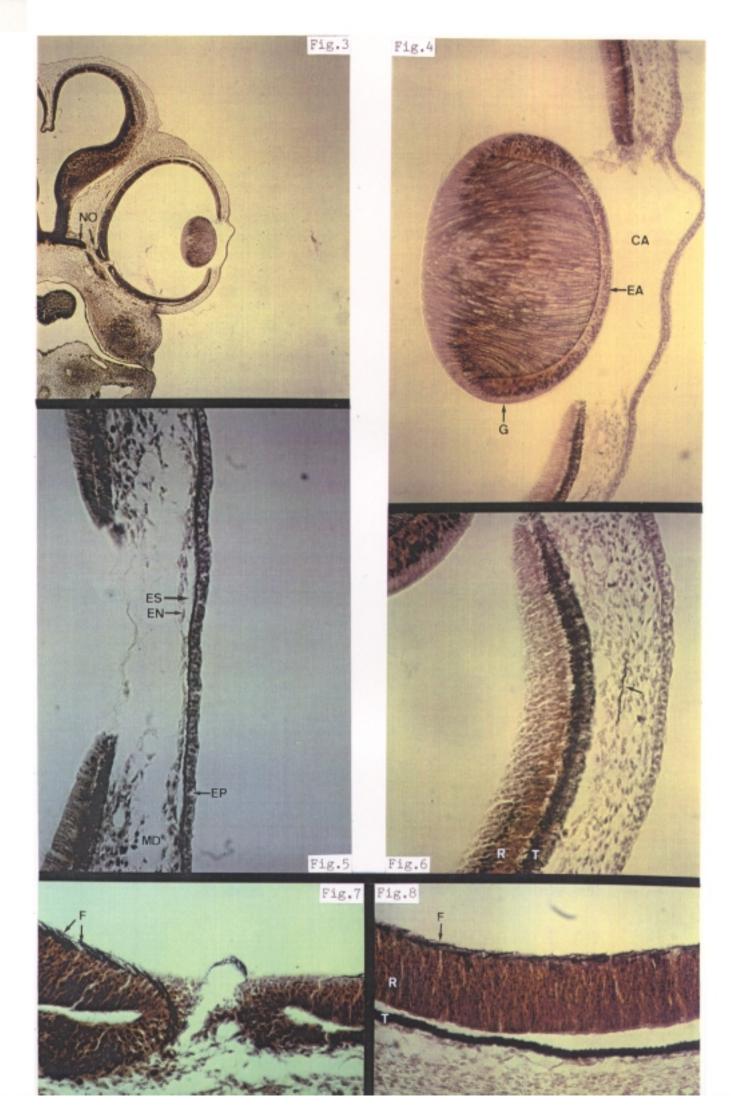
En el neuroepitelio retiniano distinguimos con nitidez la capa de fibras ópticas (en la superficie interna) formada por los axones de las células ganglionares. Estas fibras abandonan el globo ocular por la zona más posterior de la fisura óptica, para formar el nervio óptico. (figuras 3 y 7)

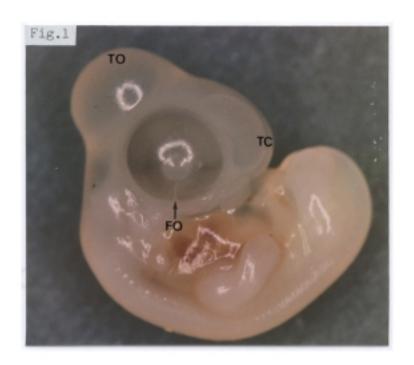
En la mitad interna de la retina vemos mayor densidad de células, aunque no podemos distinguir todavía una clara estratificación. En los bordes de la vesícula óptica el neuroepitelio retiniano es más delgado, carece de capa de fibras ópticas y tiene menor número de células. (figuras 6 a 8)

El epitelio pigmentado (en la región central) presenta un color negro intenso, mientras que a nivel periférico (en los bordes) se ensancha y la pigmentación ese localiza preferentemente en la superficie interna que está en contacto con la retina. (figuras 4 a 8)

10.714

- ESTADIO 19: EMBRION CT-61
- Fig.3: Corte horizontal oblicuo en el que se encuentran todas las estructuras del globo ocular y el esbozo del nervio óptico. (BB, 4x)
- Fig.4: Detalle del segmento anterior, donde vemos la morfología del cristalino y los límites de la cámara anterior. (BB, 20x)
- Fig.5: Corte periférico de la córnea. Observamos las capas de la córnea y el tejido mesodérmico que en ocasiones ocupa parte de la cámara anterior. (BB, 40x)
- Fig.6: Detalle de la retina y epitelio pigmentado a nivel periférico, rodeados de tejido mesodérmico en el que destacan algunos fascículos nerviosos. (flecha). (BB, 40x)
- Fig.7: Corte a nivel de la fisura óptica donde vemos la salida de los axones que van a formar el nervio óptico y el esbozo del pecten. (BB, 40x)
- Fig.8: Detalle del neuroepitelio retiniano con su capa de fibras ópticas. (BB, 40x)





ESTADIO 20: EMBRION CT-68

Fig.1: Visión lateral derecha donde observamos la longitud de los miembros superiores e inferiores y la fisura óptica como una línea blanquecina. (2x)

Estadío 20: 5 días de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-68. 5 días y 5 horas de incubación.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO:

Las extremidades se han alargado y en las láminas digitales, los surcos van individualizando los dedos.

Empiezan a formarse los primordios del pico superior e inferior.

Existe una pequeña fosa situada dorsal al arco mandibular, que corresponde a la abertura del conducto auditivo externo.

El crecimiento de la cabeza comienza a englobar el tectum óptico.

En el globo ocular distinguimos perfectamente el cristalino a través del orificio pupilar que ha disminuido de diámetro. Vemos aún la fisura óptica como una línea blanquecina. (figura 1)

ESTADIO 20: EMBRION CT-68

Fig.2: Corte horizontal oblicuo que muestra la disposición de las fibras primarias del cristalino. (BB, 20x)

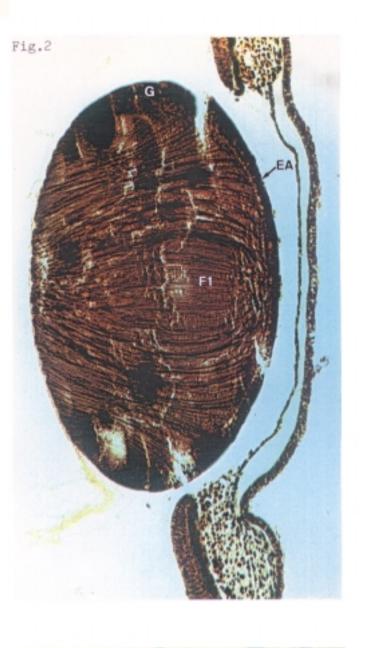
Fig.3: Corte horizontal oblicuo donde observamos el globo ocular y la condensación mesodérmica que le rodea (flechas). (BB, 4x)

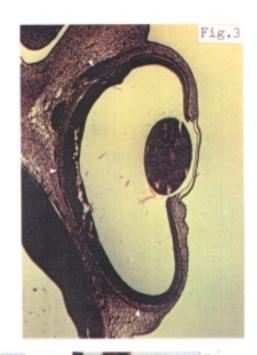
Figs.4 y 5: Detalles de la córnea donde vemos el epitelio, el estrato acelular y el endotelio. (BBV y BB, 40x)

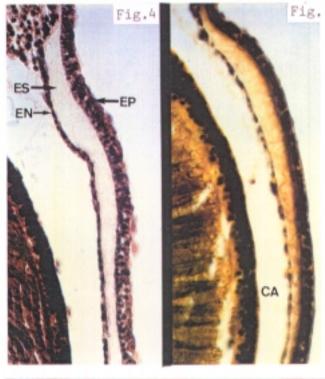
Fig.6: Detalle del neuroepitelio retiniano y del epitelio pigmentado a nivel central. (BB, 40x)

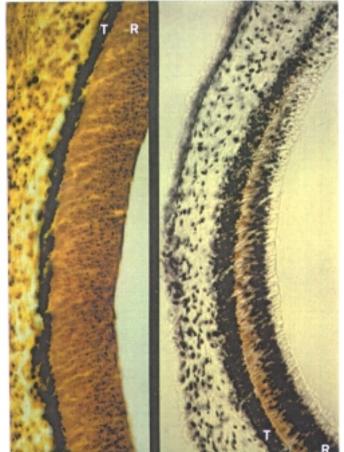
Fig.7: Detalle del borde de la vesícula óptica donde vemos que el espesor de ambos se va igualando. (BBV, 40x) Fig.8: Corte a nivel de la salida de las fibras ópticas y de la cabeza del nervio óptico. (BB, 40x)

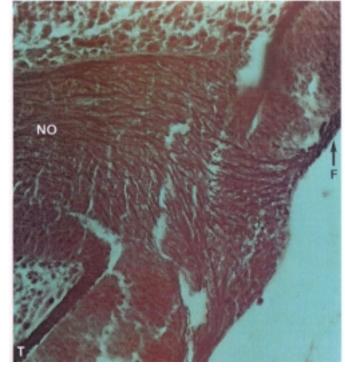
ranger in the first of the second





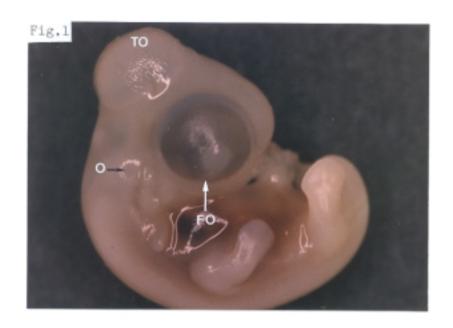






ESTADIO 21: EMBRION CT-75

Fig.1: Visión lateral derecha donde observamos el alargamiento del cuello y el desarrollo de las extremidades. (2x)



Estadío 21: 5 días y medio de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-75. 5 días y 15 horas de incubación.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En las extremidades superiores el pliegue del codo es más pronunciado. En las láminas digitales de las alas y patas el segundo dedo supera en longitud al resto.

El cuello se alarga y la cabeza ha englobado completamente las vesículas telencefálicas y parte del tectum óptico.

El pico resalta a nivel de la cavidad oral.

En el globo ocular aún se observa la fisura óptica y aparecen los primeros esbozos de las papilas esclerales. (figura 1)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

El estrato acelular de la córnea es invadido, desde 1a por células procedentes de1 perifería, mesodermo más superficial que rodea al epitelio pigmentado. La región central del estroma presenta prácticamente se acelular. mientras que en la perifería se observan gran cantidad de células, generalmente de aspecto fusiforme, que comienzan a sintetizar colágeno.

A esta invasión se la conoce como la segunda oleada mesodérmica y constituye el esbozo del estroma corneal.

Este fenómeno provoca que la córnea aumente considerablemente de espesor.

El resto de las capas corneales, epitelio y endotelio, conservan características similares a estadíos anteriores. (figuras 2 a 5)

En el cristalino observamos que las fibras primarias comienzan a situarse en el centro, desplazadas y comprimidas por las fibras secundarias procedentes de la región ecuatorial y preecuatorial del epitelio anterior. Los núcleos de las fibras aparecen pequeños y picnóticos. (figuras 2, 3 y 6)

La cámara anterior aparece deformada por las alteraciones que sobre el globo ocular ha provocado el proceso histológico. (figuras 2 y 3)

En la perifería, el epitelio pigmentado alcanza el máximo espesor, mientras que la retina se adelgaza mucho, llegando a tener una o dos capas de células. (figuras 2, 7 y 9)

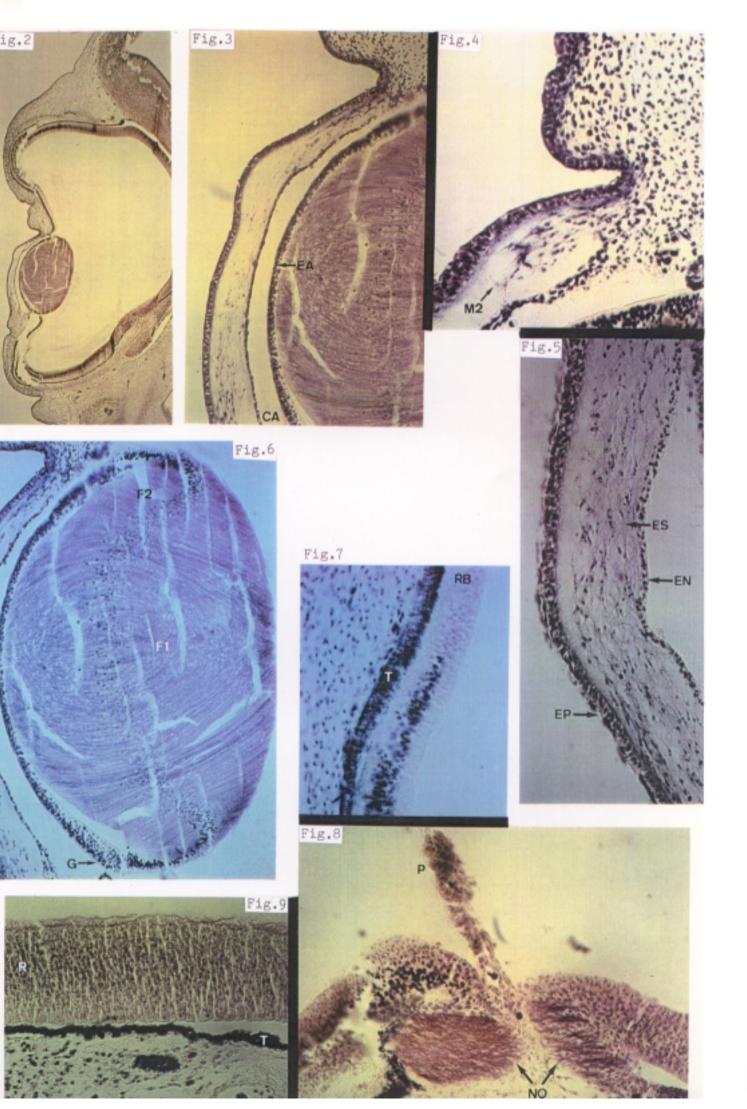
La retina neurosensorial presenta, en la región central, una mayor densidad nuclear en la mitad interna de su espesor. La capa de fibras ópticas es la única que se puede identificar con claridad. (figura 9)

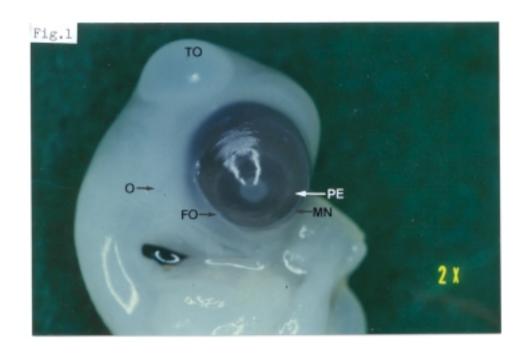
En algunas zonas de la fisura óptica aparece por primera vez una verdadera cresta celular que hace relieve en el interior del globo (esbozo del pecten). En la base de la cresta existen uno o dos vasos sanguineos que la nutren. (figura 8)

Se distinguen claramente las fibras ópticas formando el nervio óptico.

El nivel del corte histológico permite ver el nervio óptico dividido en dos porciones por el futuro pecten óptico. (figura 8)

- ESTADIO 21: EMBRION CT-75
- Fig.2: Corte frontal oblicuo del globo ocular en el que destaca el tamaño de la córnea. (BBV, 4x)
- Fig.3: Corte de la perifería corneal donde vemos que el estrato acelular comienza a estar parcialmente ocupado por células. (BBV, 20x)
- Fig.4: Detalle de la perifería corneal que está siendo invadida por la segunda oleada mesodérmica. (BBV, 40x)
- Fig.5: Corte periférico de la córnea donde vemos gran cantidad de células fusiformes ocupando el esbozo del estroma. (BBV, 40x)
- Fig.6: Detalle del cristalino. Destaca el aspecto picnótico de los núcleos de las fibras primarias y secundarias. (BBV, 20x)
- Fig.7: Detalle de la retina y epitelio pigmentado a nivel periférico, en donde presentan un grosor muy parecido. (BBV, 40x)
- Fig.8: Corte que demuestra el crecimiento del esbozo del pecten en el interior del globo ocular. (BBV, 40x)
- Fig.9: Detalle de la retina neurosensorial y epitelio pigmentado a nivel central. Por fuera vemos una condensación mesodérmica vascularizada. (BBV, 40x)





# ESTADIO 22: EMBRION CT-80

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos algunas papilas esclerales rodeando la córnea y el esbozo de la membrana nictitante. (2x)

Estadío 22: 6 días de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-80: 6 días de incubación.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO:

Se observan los primeros esbozos de plumas en la superficie dorsal de la región lumbar.

Los miembros están más desarrollados y el ala está plegada a nivel del codo.

El cuello continúa alargandose.

El tectum óptico todavía hace un pequeño relieve.

En el extremo del pico superior aparece el esbozo del diamante.

En el globo ocular destacan los esbozos de las papilas esclerales que rodean la circunferencia corneal. La membrana nictitante inicia el crecimiento en dirección dorsal. La línea de cierre de la fisura coroidea, aunque aún es visible, no llega al orificio pupilar.

El orificio pupilar continúa disminuyendo de diámetro y la estructura que le rodea presenta una pigmentación más oscura que el resto del globo ocular. (figura 1)

# ESTUDIO MICROSCOPICO:

La condensación mesodérmica que rodea la mayor parte del globo ocular corresponde al esbozo del cartilago escleral. (figuras 2 y 3)

Por primera vez aparece una estructura capaz de teñirse en el interior del globo ocular. Esta estructura, que corresponde al cuerpo vitreo, parece tener mayor consistencia en el espacio correspondiente al eje visual; es decir, entre el cristalino y el esbozo del pecten. (figuras 2, 3 y 6)

El estroma corneal está totalmente ocupado por células de aspecto fusiforme y fibras colágenas. En algunas zonas, sobre todo en el centro, parece que las células se localizan en la mitad interna. En el epitelio vemos que la capa basal aparece con una tinción oscura que contrasta con la capa más superficial. (figuras 2 a 5)

Los núcleos de las fibras cristalinianas disminuyen de tamaño haciendose picnóticos, por lo que en este estadío ya no podemos distinguirlos con claridad. Las regiones ecuatorial y preecuatorial son las únicas que se mantienen activas, pues son el origen de las fibras secundarias. (figuras 2 y 3)

Los bordes de la vesícula óptica con el mesodermo adyacente forman el primer esbozo del iris.

Entre el esbozo iridiano y el endotelio corneal se delimita un espacio ocupado por tejido mesodérmico que constituye el esbozo del ángulo irido-corneal. (figuras 2 y 3)

Rodeando la circunferencia corneal aparecen unos pliegues mesodérmicos cubiertos por un ectodermo grueso.

Estas estructuras son las papilas esclerales que veíamos en la imagen macroscópica del embrión. (figuras 2 y 3)

Al igual que describíamos en estadíos anteriores, en la retina neurosensorial existe una mayor densidad nuclear en su mitad interna. Según nos acercamos a los bordes, llega un punto en el que desaparece una banda fuertemente teñida que corresponde a las células que captan el colorante. La desaparición de esta banda coincide con un adelgazamiento de la retina y engrosamiento del epitelio pigmentado. (figura 2 y 3)

La capa de fibras ópticas, constituída por los axones de las células ganglionares, prácticamente está ausente en la perifería y alcanza el máximo espesor alrededor de la salida del nervio óptico. (figuras 2, 3 y 6 a 8)

El epitelio pigmentado es más grueso en los bordes de la vesícula óptica y en ocasiones sobrepasa sus límites. A nivel de la cabeza del nervio óptico pierde su pigmentación y se continúa con su envoltura. (figuras 3 y 6)

El esbozo del pecten se alarga y crece hacia el interior de la cavidad vítrea. (figura 7)

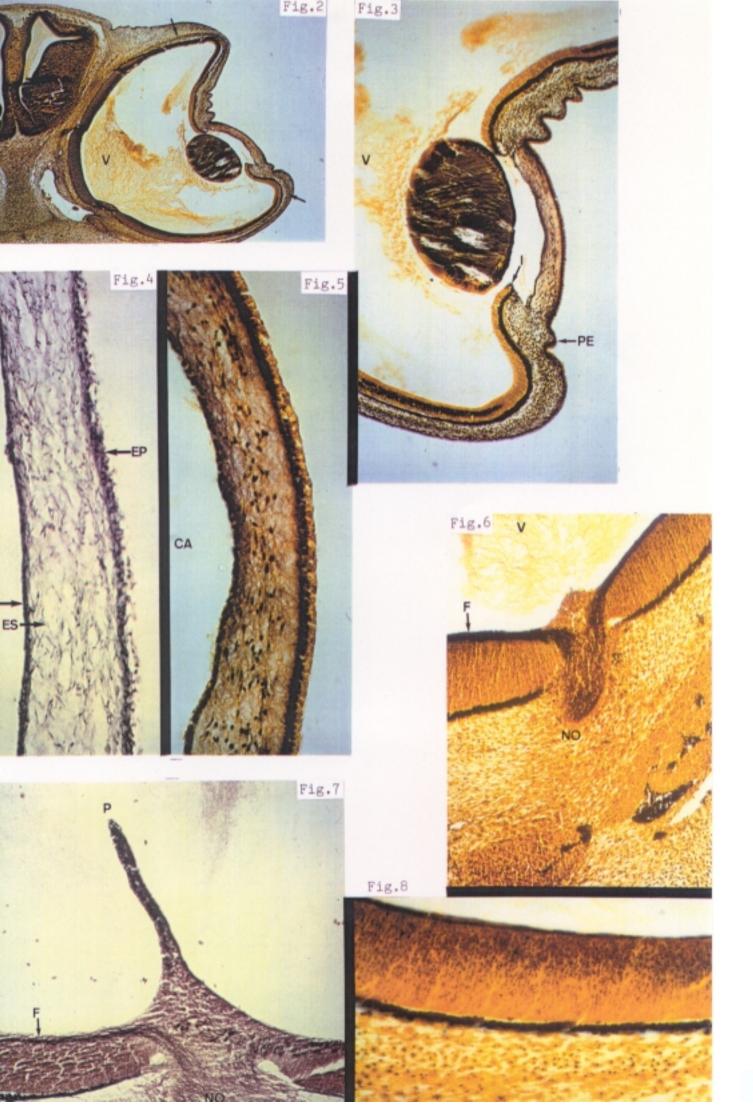
### ESTADIO 22: EMBRION CT-80

40x)

- Fig.2: Corte horizontal oblícuo donde destaca por primera vez la presencia del esbozo del cuerpo vítreo. Las flechas señalan la condensación mesodérmica. (BB, 4x) Fig.3: Corte del segmento anterior que muestra los esbozos del iris y del ángulo irido-corneal. (BB, 10x) Figs.4 y 5: Detalles de la córnea con el estroma ocupado por células mesodérmicas y fibras colágenas. (BBV y BB,
- Fig.6: Detalle de la salida de las fibras ópticas a nivel de la cabeza del nervio óptico. (BB, 20x)

the state of the s

- Fig.7: Corte a nivel del esbozo del pecten por donde también salen fibras ópticas. (BBV, 20x)
- Fig.8: Detalle de la retina neurosensorial y epitelio pigmentado de la zona central del globo ocular. (BB, 40x)



## ESTADIO 23: EMBRION CT-82

Fig.1: Visión lateral derecha de la cabeza donde vemos que el tectum sólo se ve por transparencia. La membrana nictitante continúa creciendo en dirección dorsal. (2x)



#### EMBRION 23

Estadío 23: 6 días y medio de incubación.

Ejemplo: Embrión CT-82: 6 días y 16 horas de incubación.

## ESTUDIO MACROSCOPICO:

Los esbozos de plumas pueden verse también en la raiz de los miembros superiores e inferiores.

Los dedos están perfectamente delimitados.

El tectum óptico ha quedado incluído en su totalidad dentro de la cavidad craneal y solamente se le ve por transparencia.

El proceso mandibular ha alcanzado el pico superior. El diamante, de color blanco, destaca en la punta del pico superior.

Los párpados presentan forma de elipse y no llegan a cubrir la córnea. La membrana nictitante se sitúa a medio camino entre el borde de los párpados y las papilas esclerales.

Alrededor del orificio pupilar existe un anillo que presenta una pigmentación más oscura que el resto del globo ocular.

Aún es posible observar la fisura óptica. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

De la condensación mesodérmica que rodea a la vesícula óptica comienza a diferenciarse el cartílago escleral que presenta una solución de continuidad a nivel de la salida del nervio óptico. (figura 2)

Entre el cartílago escleral y el epitelio pigmentado existe una fina capa de tejido mesodérmico vascularizado y que corresponde a la coroides. (figura 6)

Rodeando la córnea se observan las papilas esclerales como pequeñas condensaciones mesodérmicas cubiertas por ectodermo. (figuras 2 y 5)

La morfología de la córnea experimenta una importante variación, basada fundamentalmente en el cambio de espesor del estroma. En relación al resto del globo ocular destaca su diferente radio de curvatura. Estos detalles dan a la córnea un aspecto homogéneo y delimitado. (figura 2)

El desarrollo del estroma corneal provoca que el epitelio y sobre todo el endotelio parezca que han reducido su espesor en relación a estadíos anteriores. Existen dos líneas oscuras que separan el estroma del epitelio y del endotelio (esbozos de la membrana de Bowman y de la membrana de Descemet). (figura 4)

La mitad superficial del estroma corneal presenta mayor densidad de células y fibras. (figuras 2 y 4)

Observamos como las fibras primarias del cristalino, que han perdido sus núcleos, están comprimidas en el centro por las fibras secundarias, que se originan a partir de las células situadas en las regiones ecuatorial y preecuatorial

del epitelio anterior. (figuras 2 y 3)

El esbozo iridiano se alarga y sus bordes cubren la región preecuatorial del cristalino. En su espesor se distinguen tres capas; la interna es la pars iridae retinae ó porción más periférica de la retina ciega; la externa está formada por el mesodermo que rodeaba los bordes de la vesícula óptica y entre ambas se encuentra el epitelio pigmentado. (figuras 2 y 5)

El crecimiento del esbozo iridiano junto a los cambios morfológicos del mesodermo en los límites de la córnea, hacen que el espacio situado entre ambos vaya adquiriendo la forma típica del ángulo irido-corneal. (figuras 2 y 5)

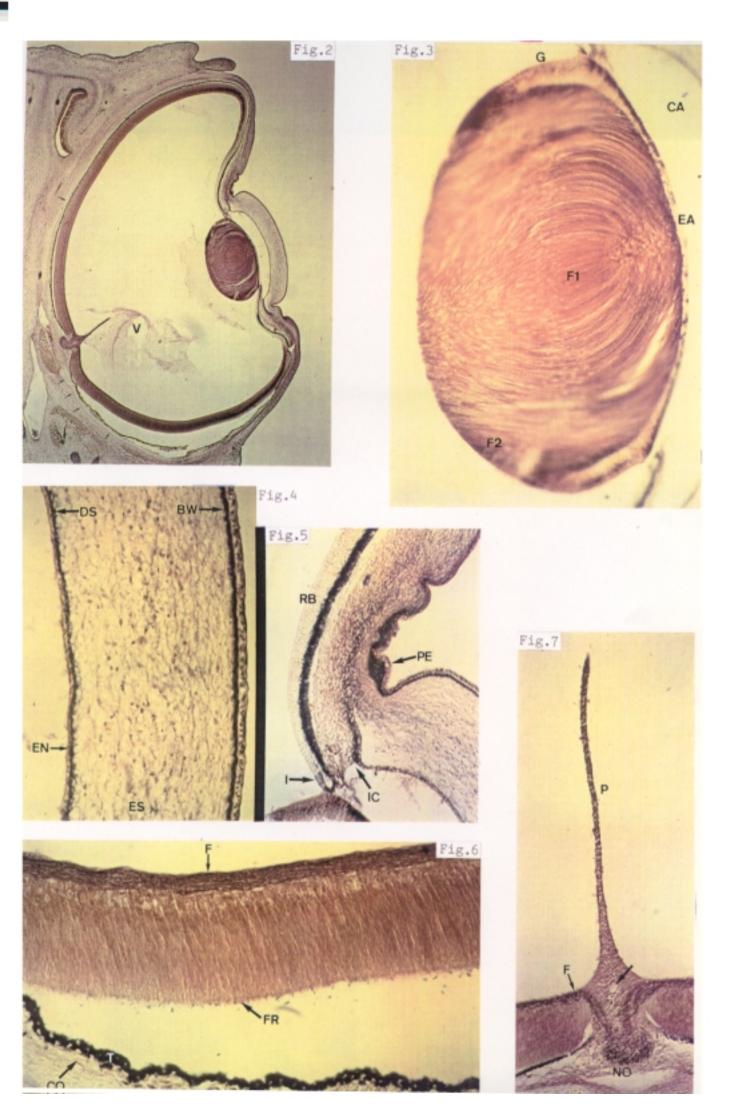
En el neuroepitelio retiniano observamos que la capa más interna o capa de fibras ópticas presenta su mayor espesor en la región que rodea la salida del nervio óptico. En el resto vemos capas que captan el colorante con mayor o menor intensidad. (figuras 2 y 5 a 7)

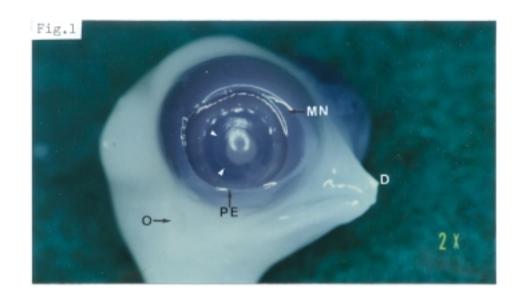
algunas zonas, la retina y el epitelio pigmentado están separados. Este hecho, que 10 observamos con frecuencia, es un artefacto de técnica debido al proceso histológico que nos permite observar una serie de interesantes como por ejemplo, la imagen irregular características, que presenta la superficie externa de la retina, debido a los artículos externos de los fotorreceptores . (figuras 2 y 6)

En el epitelio pigmentado no hay cambios, aunque es importante destacar que aumenta su espesor a partir de la zona donde la retina neurosensorial se hace más delgada (esbozo de la pars terminalis retinae). (figuras 2 y 5 a 7)

El pecten continúa creciendo en longitud y el borde aparece más pigmentado que el resto. En la base observamos la presencia de un vaso sanguíneo situado entre las fibras ópticas que están saliendo del globo ocular para formar el nervio óptico. (figura 7)

- ESTADIO 23: EMBRION CT-82
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo. Además del globo ocular rodeado por el esbozo del cartílago escleral (flechas), observamos los esbozos del párpado superior y de la membrana nictitante. (BBV, 4x)
- Fig.3: Detalle de la disposición de las fibras primarias y secundarias del cristalino, así como de la morfología del epitelio anterior. (BBV, 20x)
- Fig.4: Detalle de la córnea donde observamos el gran espesor del estroma. (BBV, 40x)
- Fig.5: Corte que nos permite observar una papila escleral y los esbozos del iris y del ángulo irido-corneal. (BBV, 20x)
- Fig.6: Detalle de la retina neurosensorial y del epitelio pigmentado y por fuera el esbozo de la coroides. Destaca también la nitidez de la capa de fibras ópticas. (BBV, 40x)
- Fig.7: Corte del pecten en cuya base podemos ver el vaso sanguíneo encargado de su nutrición (flecha) y la salida de las fibras ópticas. (BBV, 20x)





# ESTADIO 24: EMBRION CT-86

Fig.1: Visión lateral derecha donde se observan con detalle las diversas estructuras del globo ocular y los párpados. Las flechas pequeñas señalan el ecuador del cristalino. (2x)

Estadío 24: 7 días de incubación.

Longitud del pico: 1,1mm.

Ejemplo: Embrión CT-86: 7 días de incubación.

Longitud del pico: 1,1mm.

Longitud 3º dedo: 0,23cm.

## ESTUDIO MACROSCOPICO:

De la lámina digital se han independizado el primer dedo de los miembros superiores y el cuarto de los inferiores.

Los esbozos de plumas ya son visibles en el pecho, parte ventral del cuello y en los párpados superiores.

El diamante situado en el extremo del pico superior es más evidente.

El contorno del borde de los párpados tiene forma elipsoidal. El párpado inferior, en su crecimiento, alcanza el límite de las papilas esclerales.

La membrana nictitante cubre aproximadamente las 2/3 partes del espacio que se encuentra entre el borde palpebral y las papilas esclerales.

En el globo ocular ya no es visible la línea de cierre de la fisura óptica. Detrás del esbozo iridiano, observamos una circunferencia blanquecina entre las papilas esclerales y el reborde pupilar que corresponde al ecuador del cristalino. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

El cuerpo vítreo que aparece parcialmente plegado es más denso que en estadíos anteriores. (figura 2)

El desarrollo de los párpados y la membrana nictitante permite delimitar perfectamente los fondos de saco conjuntivales. (figuras 2, 5 y 6)

Vemos como el cartilago escleral rodea el globo ocular, excepto en el punto de salida del nervio óptico. En su crecimiento llega incluso hasta las zonas de transición entre retina visual y ciega. (figuras 2 y 5 a 8)

La coroides aparece como una delgada capa con vasos sanguíneos situada entre el epitelio pigmentado y el cartílago escleral. (figuras 5 a 7)

El estroma corneal continúa aumentando de grosor y en su mitad externa, que está en contacto con el epitelio, presenta una coloración más intensa que en la mitad interna. (figuras 2 a 4)

En el esbozo del iris podemos observar claramente la presencia de tres capas. La interna, muy delgada, corresponde a la pars iridae retinae; a continuación un grueso epitelio pigmentado y por último el estroma, derivado mesodérmico donde vemos que comienza a diferenciarse el músculo esfínter o constrictor de la pupila. (figuras 2 y 3)

Entre el esbozo del iris y la zona de transición entre retina visual y ciega (pars terminalis retinae) se forman por primera vez unos pliegues que incluyen el epitelio pigmentado, la zona ciega de la retina subyacente y el mesodermo correspondiente. Estos pliegues son el primer esbozo de los

procesos ciliares. (figura 5)

En 1a retina neurosensorial se observan perfectamente delimitadas todas las capas. Las capas más oscuras y citoplasma (capas corresponden a acúmulos de núcleos nucleares) y las capas más claras contienen dendritas y axones donde tienen lugar las sinapsis (capas plexiformes). es Esta ordenación va desapareciendo según nos acercamos a 1a periferia, hasta que en el borde vemos una sola hilera de células. (figuras 5 a 7)

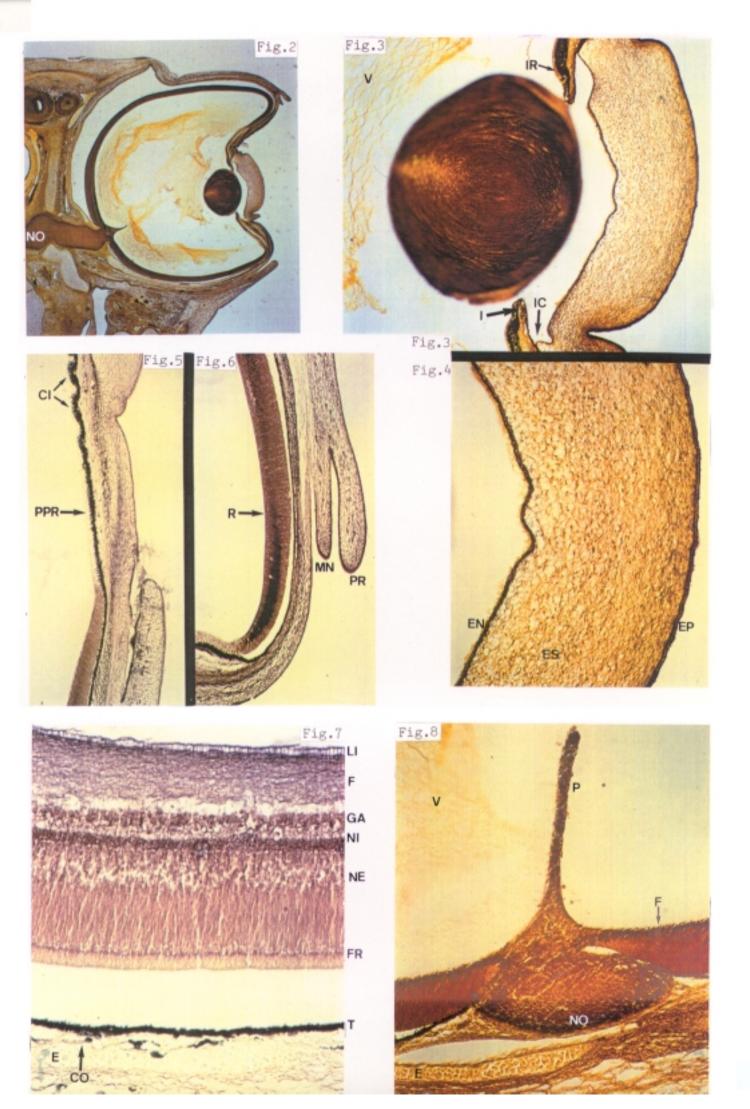
El epitelio pigmentado es más grueso cuando se encuentra junto a la retina ciega que cuando recubre a la retina neurosensorial. El cambio de grosor tiene lugar en la pars terminalis retinae. (figuras 5 y 6)

Hay zonas en las que la retina y el epitelio pigmentado están siempre en íntimo contacto, mientras que hay otras zonas donde generalmente aparecen separadas. En este embrión vemos que toda la retina ciega, hasta la transición, está unida al epitelio pigmentado, al igual que alrededor de la salida del nervio óptico. (figuras 2 y 5 a 8)

El pecten sigue su desarrollo sin modificaciones. (figura 8)

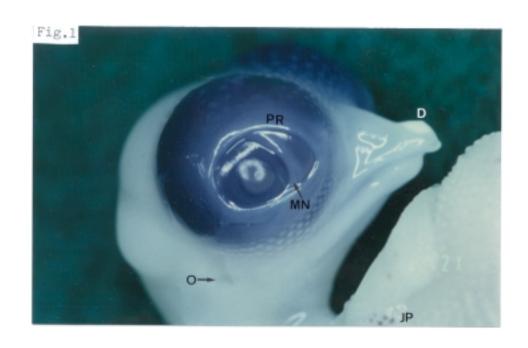
El nervio óptico se delimita perfectamente. (figuras 2 y 8)

- ESTADIO 24: EMBRION CT-86
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo que muestra una panorámica del globo ocular y la salida del nervio óptico. (BB, 2x)
- Fig.3: Detalle del segmento anterior que incluye córnea, cristalino, esbozo del iris y cámara anterior.(BB, 10x)
- Fig.4: Detalle de la córnea donde destaca el espesor del estroma. (BB, 20x)
- Fig.5: Corte que incluye el esbozo de las primeros procesos ciliares y la pars terminalis retinae. (BBV, 10x)
- Fig. 6: Corte a nivel de la membrana nictitante. (BBV, 10x) Fig. 7: Detalle de las capas de la retina neurosensorial. (BBV, 40x)
- Fig.8: Corte donde se observa el pecten y la salida del nervio óptico. (BB, 20x)



## ESTADIO 25: EMBRION CT-92

Fig.1: Visión lateral derecha. Vemos que en la raiz del ala comienzan a pigmentarse los esbozos de plumas. La membrana nictitante comienza a cubrir la córnea. (2x)



Estadio 25: 8 días de incubación.

Longitud del pico: 1,8-2 mm.

Ejemplo: Embrión CT-92. 8 días de incubación.

Longitud del pico: 1,8 mm.

Longitud del 3º dedo: 0,36 cm.

## ESTUDIO MACROSCOPICO:

En los dedos de las extremidades inferiores, aparecen los esbozos de las garras.

Los esbozos de las plumas aumentan en número y tamaño por toda la superficie del embrión. Destacamos que entre los párpados superiores y la línea mediodorsal hay 10 filas de esbozos de plumas y que algunos esbozos sobre el húmero, muslo y dorso de la cola comienzan a pigmentarse.

El orificio del conducto auditivo externo se sitúa junto al globo ocular y caudal a él.

En la cabeza el orificio de la fisura nasal se extrecha. El borde de los párpados tiene forma ovalada con el extremo rostral agudo. Los párpados delimitan la circunferencia corneal, excepto el borde rostral que está cubierto por la membrana nictitante. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

Observamos la presencia de una estructura que rellena e1interior del globo ocular y que capta perfectamente e1colorante. Esta estructura es el cuerpo vitreo y 1a superficie posterior del cristalino salta hasta la pars es terminalis retinae; decir, que tanto el iris como 1os procesos ciliares no tienen contacto con el vítreo. Rodeando al pecten también existe una zona ópticamente vacía.

El cuerpo vítreo que se encuentra rodeando el cristalino, ha captado con más intensidad el colorante.

Podemos observar que la práctica totalidad de la retina neurosensorial se halla separada del epitelio pigmentado y que sólo aquella que rodea la salida del nervio óptico, la base del pecten, y la retina ciega permanece unida al epitelio pigmentado.

Destacamos también que el epitelio pigmentado aparece siempre unido a la coroides y cartílago escleral. (figuras 2, 3 y 6 a 9)

borde libre de los párpados se distingue 1a 1a pie1 y transición entre la conjuntiva. La membrana está recubierta por tejido conjuntival. nictitante Α nivel se forman dos fondos de saco conjuntivales, uno entre el membrana nictitante y otro entre ésta párpado y 1a 1a conjuntiva que rodea el tejido mesodérmico superficial a1 cartílago escleral. (figura 5)

La córnea presenta pocas variaciones, pues el estroma conserva una mayor densidad en su mitad externa y existen dos líneas oscuras que separan el epitelio y endotelio del estroma

(membrana de Bowman y membrana de Descemet). (figuras 2 a 4)

Los pliegues de los procesos ciliares se acentúan y en el espesor de su pared podemos distinguir tres capas, como en el iris. La capa interna está formada por la retina ciega, que a este nivel se denomina pars ciliaris retinae, a continuación el epitelio pigmentado y la más externa corresponde al estroma surgido del mesodermo que rodea los bordes de la vesicula óptica. (figuras 2 y 3)

En el epitelio anterior del cristalino se distinguen dos zonas, no sólo por el espesor, sino porque los únicos núcleos que se tiñen son los de la zona ecuatorial-preecuatorial. (figura 3)

En 1a retina neurosensorial no hay cambios significativos. pues sus capas están perfectamente delimitadas. Observamos que el cuerpo vítreo está unido a limitante interna pero se desprende justo en la pars capa terminalis retinae. (figura 6 a 8)

Los axones de las células ganglionares abandonan el globo ocular agrupadas en fascículos rodeados por tejido conjuntivo. (figura 9)

El pecten sigue teniendo una morfología rectilínea sin que podamos distinguir pliegues. (figuras 2 y 9)

ESTADIO 25: EMBRION CT-92

Fig.2: Corte horizontal oblicuo donde destaca la presencia del cuerpo vítreo. (BB, 2x)

Fig.3: Corte del segmento anterior en el que observamos el iris y el esbozo de las primeros procesos ciliares. (BB, 10x)

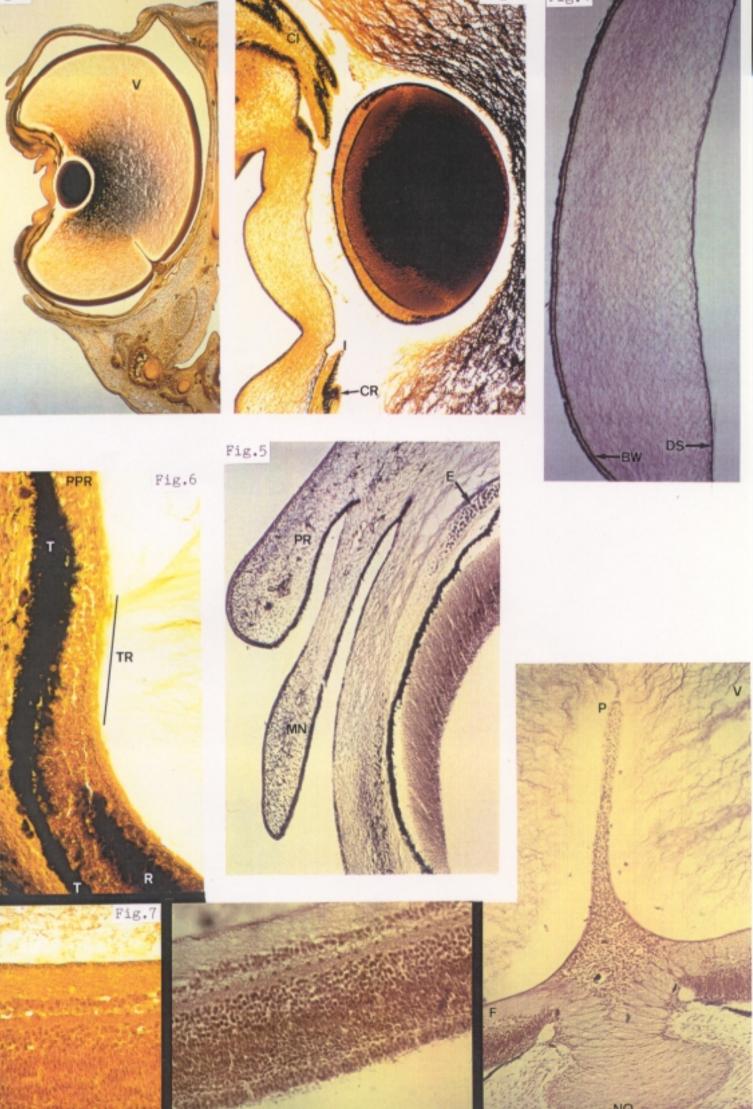
Fig.4: Detalle de la córnea donde vemos dos líneas densas que separan al epitelio y endotelio, del estroma. (BBV, 20x)

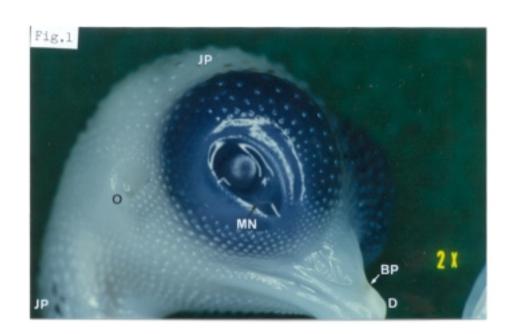
Fig.5: Corte a nivel de la membrana nictitante y párpado. Observamos los dos fondos de saco conjuntivales. (BBV, 20x)

Fig.6: Detalle de la pars terminalis retinae. Vemos como a ese nivel el cuerpo vitreo se separa. (BB, 40x)

Figs.7 y 8: Detalles de la estratificación de la retina neurosensorial en capas. (BB y BBV, 40x)

Fig.9: Corte a nivel de la base del pecten donde vemos que las fibras ópticas se agrupan en fascículos para formar el nervio óptico. (BBV, 20x)





ESTADIO 26: EMBRION CT-100

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos que se reduce el tamaño de la hendidura palpebral y aumenta el número de esbozos pigmentados de plumas. (2x)

Estadío 26: 9 días de incubación.

Longitud del pico: 2,2 mm.

Ejemplo: Embrión CT-100: 9 días y 4 horas de incubación.

Longitud del pico: 2,2 mm.

Longitud del 3º dedo: 0,43 cm.

## ESTUDIO MACROSCOPICO:

Aumenta el número de esbozos pigmentados de plumas que son visibles en el húmero, muslo, cola, cuello, dorso de la cabeza y entre los globos oculares.

El orificio del conducto auditivo externo está rodeado de esbozos de plumas.

Comienza a pigmentarse el dorso del pico superior que rodea el diamante.

Disminuye la abertura de los párpados que cubren parcialmente la córnea. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

El cuerpo vítreo ocupa toda la cavidad ocular. La hialoides vítrea permanece anclada a la limitante interna de la retina neurosensorial, aunque el proceso histológico hace que alguna zona se desprenda y se pliegue. Normalmente la zona más densa del cuerpo vítreo es la que rodea el pecten. (figura 2)

El epitelio corneal aumenta de espesor al crecer el número de hileras celulares. Entre la capa basal proliferativa del epitelio y el estroma aparece una línea de separación que corresponde a la membrana de Bowman. Sin embargo, no hemos observado la existencia de una estructura parecida entre el estroma y el endotelio. (figuras 3 y 4)

En el estroma corneal aparece una banda central ligeramente más densa que destaca del resto. (figura 4)

Continúa el desarrollo y diferenciación del ángulo irido-corneal mientras que lateral a él aparece el esbozo del sistema de drenaje del humor acuoso (semejante al canal de Schlemm) y un tejido muscular que corresponde al esbozo del músculo ciliar. (figuras 3, 5 y 6)

Aumenta el número y tamaño de los procesos ciliares cuyo eje, generalmente es perpendicular al orificio pupilar. (figura 6)

El cartílago escleral mantiene un espesor más o menos uniforme excepto en la zona que rodea la salida del nervio óptico, donde se engruesa formando un anillo. (figura 2)

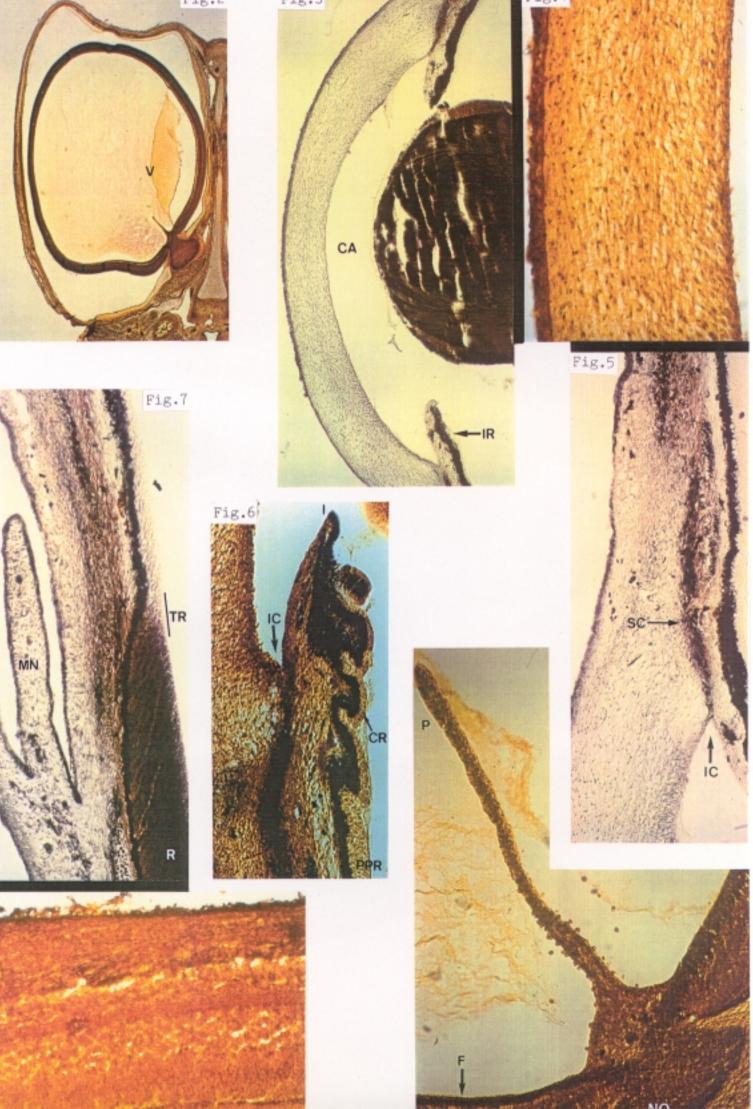
El cambio de grosor entre retina visual y ciega (pars terminalis retinae), es más brusco que en los estadíos anteriores, mientras que en la retina neurosensorial no se advierten cambios. (figuras 7 y 8)

La pars ciliaris retinae que tapiza los procesos ciliares tiene menos calibre que la pars plana retinae. La pars iridae retinae es dificil de identificar y cuando ello es posible, vemos que desaparece poco antes de llegar al borde del iris. (figuras 3 y 6)

El espesor del epitelio pigmentado varía según las zonas de la retina con las que se relaciona. El menor calibre lo presenta a nivel de la retina neurosensorial, se engruesa sobre la pars plana retinae y alcanza el mayor espesor en los procesos ciliares y el iris. (figuras 3 y 5 a 7)

En el pecten se observa que la aparición de las primeras inclinaciones coinciden con un aumento de longitud. (figura 9)

- ESTADIO 26: EMBRION CT-100
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo. El cuerpo vítreo, aunque ligeramente plegado, ocupa por completo el interior del globo ocular. (BB, 2x)
- Fig.3: Corte del segmento anterior donde destaca la perfecta sección de esfera que tiene la córnea. (BBV, 10x)
- Fig.4: Detalle de la córnea. Se observa la membrana de Bowman y el incremento de grosor del epitelio. (BB, 40x)
- Fig.5: Corte que incluye el ángulo irido-corneal y el esbozo del sistema de drenaje del humor acuoso. (BBV, 20x)
- Fig.6: Detalle del iris y de los procesos ciliares. (BB, 20x)
- Fig.7: Corte que muestra la membrana nictitante y la pars terminalis retinae. (BBV, 20x)
- Fig.8: Detalle de la retina neurosensorial con todas sus capas y desprendida del epitelio pigmentado. (BB, 40x)
- Fig.9: Corte donde se observa la cabeza del nervio óptico y las primeras inclinaciones del pecten. (BB, 20x)



ESTADIO 27: EMBRION CT-103

Fig.1: Visión lateral derecha donde se observan 3 y 4 filas de esbozos de plumas en el borde de los párpados, la pequeña hendidura palpebral y los orificios auditivo y nasal rodeados de esbozos de plumas. (1,8x)



Estadío 27: 10 días de incubación.

Longitud del pico: 2,1-2,2 mm.

Ejemplo: Embrión CT-103: 10 días y 6 horas de incubación.

Longitud del pico: 2,3 mm.

Longitud del 3º dedo: 0,54 cm.

#### ESTUDIO MACROSCOPICO:

En algunas zonas del cuerpo aparece una ligera pigmentación difusa de la piel.

Hay un aumento de la pigmentación en los esbozos de las plumas en el abdomen, pecho, miembros superiores y en la cabeza. Unicamente quedan libres algunas zonas del cuello, alas y linea media anterior.

Aparecen esbozos de plumas, algunos pigmentados, alrededor de los orificios de los conductos auditivos externos y de las fosas nasales.

La hendidura palpebral se ha reducido de tamaño, ya que el párpado inferior cubre la mitad inferior de la córnea y el superior el tercio superior. La membrana nictitante se sitúa prácticamente en el borde anterior de la córnea.

Los esbozos de las plumas se distribuyen en tres y cuatro filas sobre el borde de los párpados. (figura 1)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

La superficie externa de los párpados, irregular por la presencia de los esbozos de las plumas, contrasta con la superficie interna lisa tapizada por tejido conjuntivo. (figura 2)

En los fondos de saco conjuntivales, sobre todo en el que forma el párpado con la membrana nictitante, se observa el drenaje de las glándulas tubulares que lubrican la conjuntiva y la córnea. (figura 4)

En la córnea aparecen pequeños nervios que transcurren sobre todo por el estroma superficial y que se dirigen hacia el epitelio introduciendose en su espesor. Estos nervios sensitivos inervan el epitelio y parte del estroma superficial.

En el centro del estroma corneal observamos la banda de mayor celularidad que el resto y que parece dividir el estroma en dos partes, externa e interna. (figuras 2 y 3)

El sistema de drenaje del humor acuoso transcurre por la perifería corneal en toda su circunferencia. (figuras 2 y 4)

Las fibras secundarias del cristalino continúan diferenciandose a partir de las células de las regiones ecuatorial y preecuatorial del epitelio anterior, que son las únicas, en todo el epitelio, cuyos núcleos captan el colorante. (figura 2)

Existen varios detalles que confirman algunas observaciones hechas en estadios anteriores. La retina neurosensorial tiende a desprenderse del epitelio pigmentado, junto a él, únicamente a nivel de permaneciendo 1a retina ciega y alrededor de la salida del nervio óptico. (figuras

a 7)

Se acentúa el cambio brusco de espesor a nivel de la pars terminalis retinae, tanto en relación a la retina como al epitelio pigmentado. (figura 5)

Al desprenderse la retina del epitelio pigmentado, los artículos externos de los fotorreceptores, quedan libres y arrastran granos de pigmento entre ellos. (figura 6)

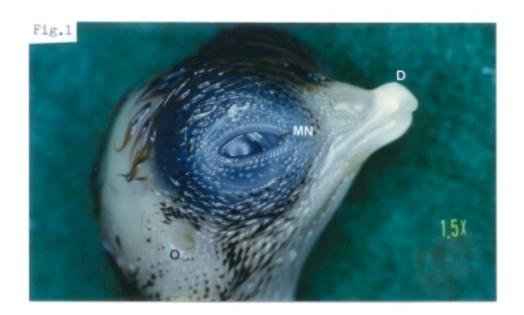
A nivel de la salida del nervio óptico vemos el entrecruzamiento de las fibras ópticas que lo componen. (figura 7)

En la base del pecten se acentúan los pliegues y en el extremo libre aumenta la pigmentación. (figura 7)

## ESTADIO 27: EMBRION CT-103

- Fig.2: Corte horizontal oblicuo del segmento anterior. En el epitelio anterior del cristalino los núcleos de las regiones ecuatorial y preecuatorial son los que han captado con más intensidad el colorante. (BBV, 10x)
- Fig.3: Detalle de la córnea donde vemos que los nervios del estroma (flechas) se dirigen al epitelio. (BBV, 40x)
- Fig.4: Corte que muestra el sistema de drenaje del humor acuoso y una glándula (flechas) en el fondo de saco que forman el párpado y la membrana nictitante. (BBV, 20x)
- Fig.5: Detalle de la pars terminalis retinae con su epitelio pigmentado correspondiente. (BBV, 40x)
- Fig.6: Detalle de la retina neurosensorial desprendida del epitelio pigmentado. Tras virar el corte, los fotorreceptores y parte de las neuronas de la capa nuclear externa conservan la tinción. (BBV, 40x)
- Fig.7: Corte a nivel del pecten en cuya base vemos la entrada de los vasos y el pliegue (flecha). En el borde libre destaca la pigmentación. (BBV, 10x)





ESTADIO 28: EMBRION CT-107

Fig.1: Visión lateral derecha de la cabeza, parcialmente desplumada, donde vemos que los esbozos de las plumas son más largos y están más pigmentados. La hendidura palpebral es más estrecha. (1,5x)

Estadio 28: 11 días de incubación.

Longitud del pico: 2,5-2,6 mm.

Ejemplo: Embrión CT-107: 11 días y 7 horas de incubación.

Longitud del pico: 2,6 mm.

Longitud del 3º dedo: 0,67 cm.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

Las papilas de la superficie plantar de las falanges están bien desarrolladas.

Prácticamente todo el embrión está cubierto por esbozos pigmentados de plumas. En la cabeza quedan las últimas zonas sin pigmentar.

La hendidura palpebral se ha reducido más de tamaño. El párpado inferior cubre aproximadamente los dos tercios inferiores de la córnea, por lo que sólo se ve el cuadrante antero-superior de la misma.

La membrana nictitante continúa en el borde anterior de la córnea. (figura 1)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

El cuerpo vítreo presenta cada vez mayor consistencia, aunque aparezca desestructurado por el proceso histológico. (figuras 2 y 3)

En la superficie externa de los párpados, como en el resto de la piel de la cabeza, se observan las zonas de implantación de las plumas antes de quitarlas. (figuras 2 y 3)

Las fibras cristalinianas y los núcleos de las células de las regionas ecuatorial y preecuatorial del epitelio anterior presentan una intensa coloración que contrasta con la palidez del resto del epitelio anterior. (figuras 2 y 3)

En el centro del estroma corneal observamos una banda densa situada más cerca del endotelio. El epitelio presenta dos capas perfectamente delimitadas, la capa basal con células en actividad (tinción más clara) y la externa con células que se van queratinizando (tinción más oscura). De hecho vemos como las más superficiales se descaman. (figuras 3 y 4)

La pars terminalis retinae es mucho más nítida y la transición ya no se realiza en una zona, sino en un punto. (figura 5)

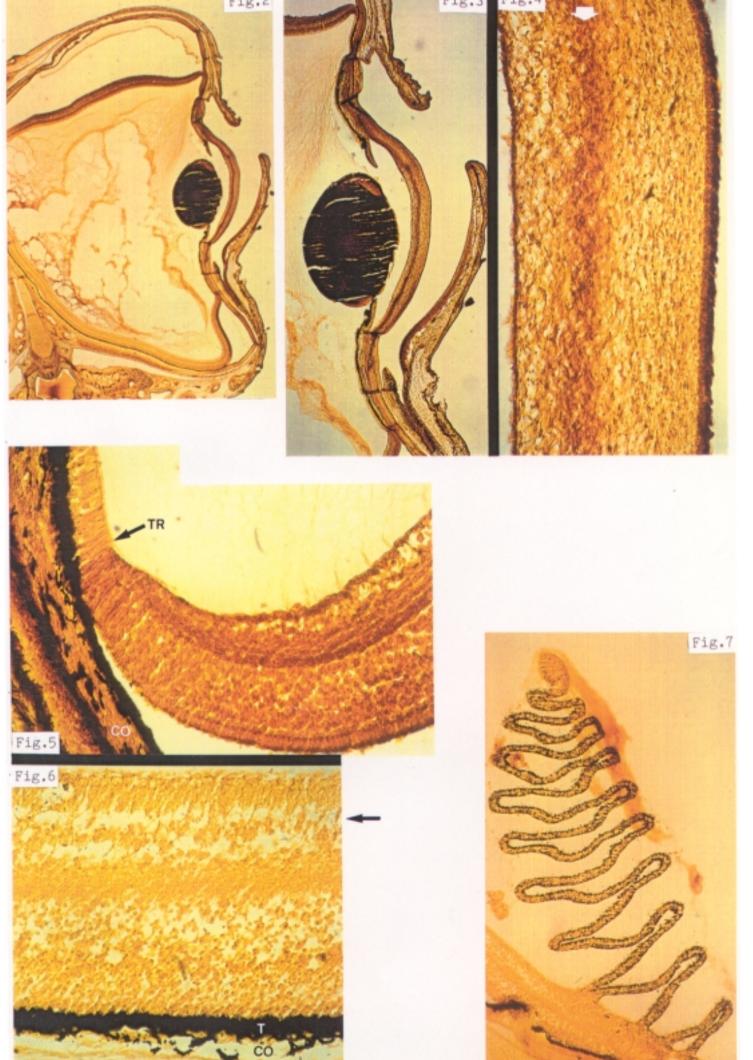
la retina neurosensorial que se mantiene unida En a1 epitelio pigmentado se observan una serie de detalles interesantes. En la superficie externa, los articulos externos de los fotorreceptores se interdigitan con 1as células del epitelio pigmentado, lo que da un aspecto de empedrado.

Quizás el detalle más interesante se halla en el espesor de la retina. Vemos que la capa de fibras ópticas aparece ligeramente separada del resto. El punto exacto de separación está situado a nivel del trayecto perpendicular de los axones de las células ganglionares. Este detalle puede observarse también en algunas zonas de la retina que está desprendida del epitelio pigmentado. (figuras 5 a 7)

Entre el epitelio pigmentado y el cartílago escleral, observamos la coroides como una fina capa vascularizada. (figura 6)

El pecten ha experimentado importantes cambios. Los pliegues son mucho más pronunciados y numerosos y en su interior aparece gran cantidad de pigmento, que se localiza sobre todo en las paredes. Los dos o tres pliegues basales, surgen de la línea de cierre de la antigua fisura óptica y en el borde libre que es más grueso y tiene forma de botón o yema, el pigmento es muy escaso. (figura 7)

- ESTADIO 28: EMBRION CT-107
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo en el que se observa el globo ocular en su conjunto. (BB, 2x)
- Fig.3: Detalle del segmento anterior. En el estroma corneal vemos una banda central densa que lo divide en dos. (BB, 4x)
- Fig.4: En la córnea observamos que en el epitelio hay una capa superficial de células que se descaman y otra capa basal. Detalle de la banda estromal densa (flecha). (BB, 40x)
- Fig.5: Detalle de la *pars terminalis retinae* y de cómo el epitelio pigmentado varía su calibre a ese nivel. (BB, 40x)
- Fig.6: Detalle de la retina neurosensorial con la capa de fibras ópticas rota y separada del resto (flecha). Adyacente al epitelio pigmentado se localiza la fina capa coroidea. (BB, 40x)
- Fig.7: Corte donde vemos la gran cantidad de pliegues que presenta el pecten. (BB, 10x)



ESTADIO 29: EMBRION CT-111

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos que los párpados están casi cerrados y su borde libre inicia una ligera pigmentación (flechas). Los esbozos de plumas comienzan a tapar el orificio del conducto auditivo externo. (1,5x)



Estadío 29: 12 días de incubación.

Longitud del pico: 2,8-3 mm.

Ejemplo: Embrión CT-111: 12 días y 6 horas de incubación.

Longitud del pico: 2,9 mm.

Longitud del 3º dedo: 0,82 cm.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

La cornificación de las uñas es manifiesta.

Los esbozos pigmentados de las plumas son mucho más largos. Este detalle es más evidente en la cabeza.

El orificio del conducto auditivo externo está parcialmente tapado por los esbozos de las plumas.

El dorso del pico superior está más pigmentado.

A través de la estrecha hendidura palpebral sólo es posible ver una pequeña franja de córnea y parte del borde libre de la membrana nictitante.

En la zona media del borde de los párpados se inicia una ligera pigmentación. (figura 1)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

El cartílago escleral llega a la altura de los procesos ciliares. (figura 2)

Los músculos oculares extrínsecos se insertan en la superficie externa del cartílago escleral y sus fibras transcurren paralelas a él. A ese nivel distinguimos filetes nerviosos.

Observamos que la coroides ha aumentado de espesor, en su interior discurren gran cantidad de vasos sanguíneos y el pigmento se distribuye de forma irregular. (figuras 4 y 5)

Se mantiene la banda densa en el centro del estroma corneal que lo divide en una porción externa, por donde transcurren los nervios sensitivos que inervan el estroma superficial y el epitelio y otra porción interna. (figura 3)

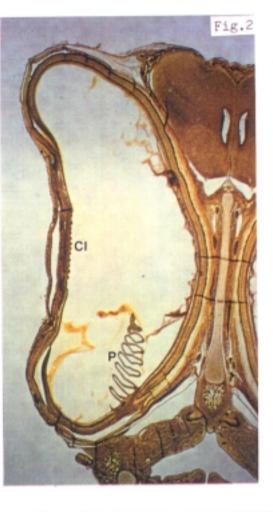
La mayor parte de la retina neurosensorial está en contacto con el epitelio pigmentado. En algunas zonas la capa de fibras ópticas esta separada del resto de la retina. Esta separación produce una rotura de los axones de las células ganglionares en su trayecto perpendicular a la retina. (figuras 2, 5 y 6)

En el espesor de los pliegues del pecten vemos pequeños vasos sanguíneos y gran cantidad de pigmento que se localiza, fundamentalmente, en las paredes.

Los últimos pliegues y el borde libre son más gruesos que el resto y presentan más pigmento que en estadíos anteriores. En la base observamos un gran vaso sanguíneo. (figura 6)

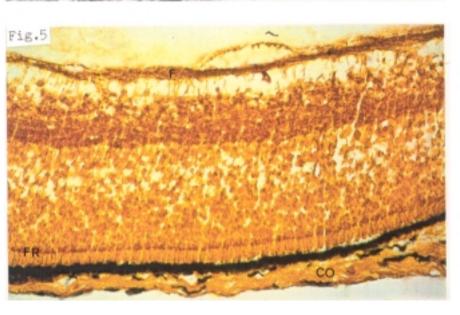
#### ESTADIO 29: EMBRION CT-111

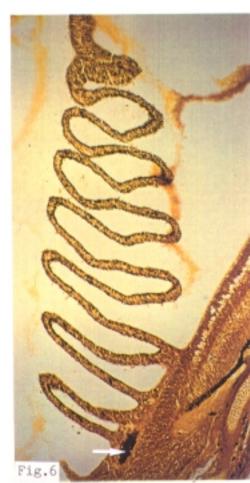
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo donde destacan los procesos ciliares y los pliegues del pecten. (BB, 2x)
- Fig.3: Detalle de la córnea. Algunas fibras nerviosas que transcurren por el estroma superficial penetran en el epitelio. (BB, 40x)
- Fig.4: Corte que muestra la coroides entre el epitelio pigmentado y el cartílago escleral y externos a él, filetes nerviosos (flechas) y fascículos musculares de los músculos oculares extrínsecos. (BBV, 40x)
- Fig.5: Detalle de las capas de la retina neurosensorial. La capa de fibras ópticas aparece separada del resto. (BB, 40x)
- Fig.6: Corte del pecten en cuya base se encuentra un gran vaso sanguíneo (flecha) y donde vemos que los granos de pigmento se sitúan sobre todo en las paredes de los pliegues. (BB, 10x)

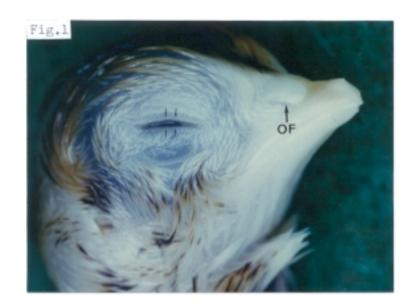












ESTADIO 30: EMBRION CT-117

Fig.1: Visión lateral derecha de la cabeza donde vemos que los párpados están prácticamente cerrados y sus bordes pigmentados (flechas). (1,5x)

Estadío 30: 13 días de incubación.

Longitud del pico: 3,2 mm.

Ejemplo: Embrión CT-117: 13 días de incubación.

Longitud del pico: 3,2 mm.

Longitud del 3º dedo: 0,95 cm.

#### **ESTUDIO MACROSCOPICO:**

Los esbozos de las plumas continúan creciendo por lo que en la cabeza tapan el orificio del conducto auditivo externo.

Los esbozos de las plumas que se encuentran en los párpados y alrededor de los orificios nasales no están pigmentados.

En los párpados, prácticamente cerrados, observamos con nitidez la pigmentación de los bordes.

El dorso del pico superior situado entre el diamante y los orificios nasales presentan una tonalidad más oscura. (figura 1)

# **ESTUDIO MICROSCOPICO:**

Observamos que los músculos oculares extrínsecos están perfectamente desarrollados, se insertan en el cartílago escleral y se distribuyen rodeando el globo ocular. (figuras 2 y 7)

Las fibras primarias del cristalino situadas en el centro, muestran una tonalidad más oscura que las fibras secundarias. Son visibles la mayoría de los núcleos celulares del epitelio anterior. (figura 3)

La hialoides vítrea está parcialmente adherida a la cápsula posterior del cristalino, mientras que sobre el epitelio anterior se observan restos del epitelio pigmentado del iris. (figuras 2 y 3)

En el estroma corneal se mantiene la banda densa que lo divide en dos partes. A través del estroma superficial vemos gruesos nervios sensitivos que terminan en el propio estroma y entre las capas basales del epitelio. (figuras 2 y 4)

No es posible demostrar la presencia de la *pars iridae* retinae. Por el contrario la *pars ciliaris retinae* tapiza el grueso epitelio pigmentado de los procesos ciliares. (figuras 3 y 7)

La retina neurosensorial va disminuyendo de espesor según se acerca a la pars terminalis retinae. A ese nivel, la capa limitante interna se desprende de la retina visual, estando unida a la hialoides vítrea. (figura 5)

Queremos insistir en un detalle ya comentado, la rotura de la capa de fibras ópticas. En este embrión podemos comprobar cómo esta capa está más separada del resto de la retina. Observamos que la rotura se ha producido a la salida de los axones. (figuras 2 y 5 a 7)

En el pecten podemos contar entre 18 y 21 pliegues que ocupan gran parte de la cavidad vítrea. En su interior observamos gran cantidad de vasos sanguíneos que hacen relieve en la pared de los pliegues ya que su diámetro es mayor que el de éstos. El pigmento se concentra, sobre todo, en la pared de los pliegues. (figura 7)

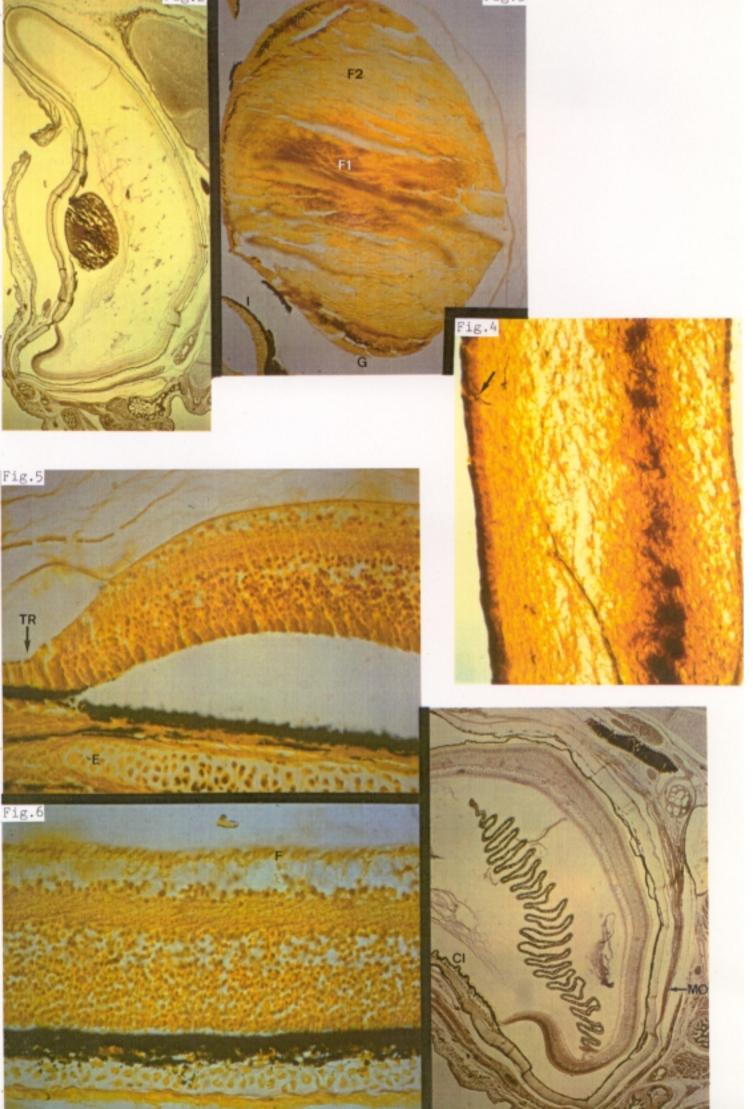
13 - 925

15.011

1000000

1 11

- ESTADIO 30: EMBRION CT-117
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo. Observamos como los músculos oculares extrínsecos se insertan en el cartílago escleral y rodean el globo ocular. (BBV, 2x)
- Fig.3: Detalle del cristalino que muestra como las fibras primarias, situadas en el centro, han captado más el colorante. (BB, 10x)
- Fig.4: Detalle de la córnea donde vemos el recorrido de un nervio por el estroma superficial y una terminación nerviosa en el epitelio (flecha). (BB, 40x)
- Fig.5: Corte a nivel de la pars terminalis retinae. La capa limitante interna aparece parcialmente desprendida. (BB, 40x)
- Fig.6: Detalle de la retina neurosensorial unida al epitelio pigmentado, que muestra la separación de la capa de fibras ópticas. (BB, 40x)
- Fig.7: Corte del pecten donde distinguimos aproximadamente 20 pliegues. (BBV, 4x)



# ESTADIO 31: EMBRION CT-121

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos los párpados cerrados y la mayor pigmentación del dorso del pico superior (flechas). El diamante es muy prominente.



Estadío 31: 14 días de incubación.

Longitud del pico: 3,4 mm.

Ejemplo: Embrión CT-121: 14 días y 6 horas de incubación.

Longitud del pico: 3,3 mm.

Longitud del 3º dedo: 1,08 cm.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

Las uñas de las patas son duras y están cornificadas. En la cabeza destaca la mayor pigmentación de los esbozos de las plumas y del dorso del pico superior. El diamante es más prominente que en estadíos anteriores.

Parece que han crecido los esbozos de las plumas de los párpados.

La hendidura palpebral está totalmente cerrada. (figura 1)

### ESTUDIO MICROSCOPICO:

El cuerpo vítreo alterado por el proceso histológico se concentra sobre la cápsula posterior del cristalino, la capa limitante interna, la retina ciega y alrededor de los pliegues del pecten. (figuras 2 y 4 a 6)

En el estroma corneal la banda central se hace más tenue y aún podemos diferenciar un estroma superficial y profundo.

Las células superficiales del epitelio corneal se van descamando, mientras las células de la capa basal continúan proliferando. (figuras 2 y 3)

No observamos la pars iridae retinae; sin embargo, las células de la pars ciliaris retinae se encuentran perfectamente ordenadas sobre el epitelio pigmentado.(figura 2)

En la retina neurosensorial no se observan cambios morfológicos; pero queremos destacar que en algunas zonas, parte de las células ganglionares acompañan a las fibras ópticas desprendidas. (figuras 4 y 6)

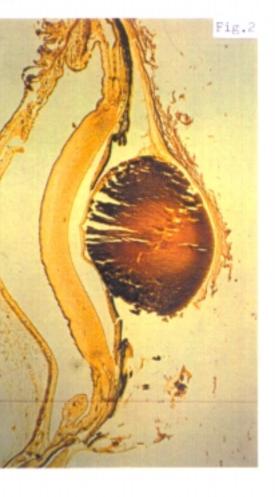
A nivel de la *pars terminalis retinae*, las primeras células en desaparecer son las ganglionares y las últimas los fotorreceptores. (figura 5)

La coroides que mantiene un desarrollo similar al de otros estadios, presenta gran cantidad de pigmento. (figuras 4 y 5)

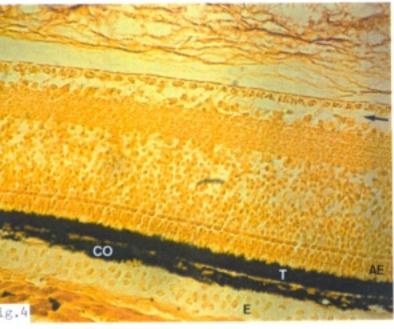
En el pecten disminuye el diámetro de los pliegues, por lo que los vasos sanguíneos hacen más relieve. El borde libre es más grueso y el pigmento se distribuye de forma homogénea. (figura 6)

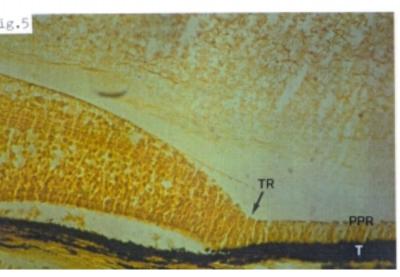
#### ESTADIO 31: EMBRION CT-121

- Fig.2: Corte horizontal oblicuo. El cuerpo vítreo alterado se concentra en la hialoides vítrea. La córnea presenta una tinción homogénea en su estroma. (BB, 4x)
- Fig.3: Detalle de la córnea donde vemos que la banda densa del estroma va desapareciendo. Las células superficiales del epitelio se descaman (flechas). (BB, 40x)
- Fig.4: Detalle de la retina neurosensorial que muestra la separación de parte de las células ganglionares (flecha). (BB, 40x)
- Fig.5: Detalle de la pars terminalis retinae donde observamos que las últimas células en desaparecer son los fotorreceptores. (BB, 40x)
- Fig.6: Corte a nivel del pecten donde vemos que los pliegues han disminuido de espesor y se han elongado. (BB, 4x)













ESTADIO 32: EMBRION CT-129

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos la pigmentación de la piel, del borde de los párpados completamente cerrados (flechas) y del dorso del pico superior. (1,3x)

Estadío 32: 15 días de incubación.

Longitud del pico: 3,4 mm.

Ejemplo: Embrión CT-129: 15 días de incubación.

Longitud del pico: 3,4 mm.

Longitud del 3º dedo: 1,23 cm.

### ESTUDIO MACROSCOPICO:

La yema del huevo se encuentra prácticamente dentro del abdomen del embrión.

Los párpados continúan cerrados y con el borde muy pigmentado.

La pigmentación también es muy evidente en la piel y en el dorso del pico, que contrasta con el color blanquecino del diamante. (figura 1)

#### ESTUDIO MICROSCOPICO:

No observamos cambios importantes que caractericen a este estadío por 10 que, de algún modo, comprobaremos detalles vistos anteriormente.

Los músculos oculares extrínsecos se insertan en el cartílago escleral, completamente osificado. (figura 2)

El epitelio corneal presenta un aspecto homogéneo (figura 4), aunque en algunas zonas la capa superficial de células queratinizadas se descama. (figura 2)

En el estroma corneal vemos restos de la banda central, mientras que en el tercio externo se observa mayor densidad de queratocitos. (figuras 2 y 4)

La zona central del epitelio anterior del cristalino es muy delgada, sobre todo si se compara con las regiones ecuatorial y preecuatorial. Las fibras cristalinianas muestran una perfecta ordenación. (figuras 2 y 3)

El epitelio pigmentado del iris tiene tendencia a pegarse al epitelio anterior del cristalino por lo que en algunas zonas se rompe. (figura 3)

En la retina neurosensorial comprobamos lo que veíamos en el estadio anterior; es decir, que la capa de células ganglionares está dividida. Esta separación es mayor donde la retina está unida al epitelio pigmentado. (figuras 5 a 7)

En las zonas donde el epitelio pigmentado está ligeramente separado de la retina, podemos identificar perfectamente los artículos externos de los fotorreceptores. (figura 6)

La *pars terminalis retinae* coincide con el cambio de espesor del epitelio pigmentado . (figura 5)

Se distingue claramente la pars ciliaris retinae formando parte del cuerpo ciliar. (figura 7)

El pecten no presenta cambios. La mayor pigmentación que observamos en los pliegues más distales se debe a que el corte histológico comprende exclusivamente la pared de estos, y en esa zona se concentra la mayor cantidad de pigmento. (figura 7)

- ESTADIO 32: EMBRION CT-129
- Fig.2: Corte horizontal oblicuo donde observamos todas las estructuras del globo ocular. Las fibras primarias del cristalino muestran un color diferente al de las fibras secundarias. (BBV, 2x)
- Fig.3: Detalle del cristalino. Destaca la perfecta ordenación de las fibras cristalinianas. (BB, 10x)
- Fig.4: Corte de la córnea donde observamos que en el tercio externo del estroma existe mayor densidad de queratocitos (flecha). (BB, 20x)
- Fig.5: Detalle de la pars terminalis retinae y del cambio de espesor del epitelio pigmentado. (BB, 40x)
- Fig.6: Detalle de la retina neurosensorial, donde se identifican perfectamente los artículos externos de los fotorreceptores. (BB, 40x)
- Fig.7: Detalle del pecten donde destaca la pigmentación de los pliegues distales debido a la dirección del corte.  $(BB,\ 4x)$



ESTADIO 33: EMBRION CT-133:

Fig.1: Visión lateral derecha. Vemos los párpados cerrados y sus bordes con una intensa pigmentación negra. El diamante comienza a pigmentarse. (1,5x)



# ESTADIO 33

Estadío 33: 16 días de incubación. Momento de la apertura del huevo (eclosión).

Ejemplo: Embrión CT-133: 16 días de incubación. El embrión comienza a romper el huevo.

Longitud del 3º dedo: 1,35 cm.

# ESTUDIO MACROSCOPICO:

La codorniz está perfectamente desarrollada.

El borde de los párpados presenta una pigmentación negra muy intensa.

El dorso del pico superior es más oscuro que en el estadio anterior y el diamante comienza a pigmentarse.

Los orificios nasales continúan cerrados. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

El ojo está completamente desarrollado.

En el espesor de los párpados se encuentran los sistemas musculares de apertura y cierre. (figura 2)

En la córnea nos encontramos una serie de cambios. El epitelio incrementa el número de capas celulares, por lo que aumenta de espesor. Las células epiteliales tienen una morfología cilíndrica en la capa basal, cúbica en la zona media y plana en la superficie externa.

El estroma corneal presenta un aspecto homogéneo al desaparecer la banda oscura. Destaca la mayor densidad de queratocitos en su tercio externo.

El endotelio tiene una sola hilera de células planas y perfectamente ordenadas.

Con este método de tinción es difícil demostrar la presencia de las membranas de Bowman y de Descemet; a veces se ve una línea de separación entre epitelio y estroma que corresponde a la membrana de Bowman. (figuras 2 y 3)

En los márgenes de la córnea existe una red vascular, semejante al canal de Schlemm, encargada de evacuar el humor acuoso que atraviesa el ángulo irido-corneal. (figura 2)

Cuando se realiza la transición entre retina visual y ciega (pars terminalis retinae), parece que las células ganglionares son las primeras en desaparecer, mientras que las células de las capas nuclear interna (bipolares, horizontales y amacrinas) y nuclear externa (fotorreceptores) son las últimas.

La pars plana retinae de la retina ciega tiene una sola hilera de células. (figura 4)

Tanto la superficie externa de todo el epitelio pigmentado, como la interna a nivel de la retina ciega presentan un aspecto más o menos liso y uniforme; en cambio la superficie interna del epitelio pigmentado que se relaciona con la retina neurosensorial ha cambiado en relación a los estadios anteriores. Aquí muestra gran cantidad de interdigitaciones en las que se introducen los artículos externos de los fotorreceptores. (figura 5)

El pecten también está completamente desarrollado y en el espesor de sus pliegues observamos gran cantidad de pigmento y de vasos sanguíneos que hacen más relieve que en estadios anteriores. (figura 6)

ESTADIO 33: EMBRION CT-133

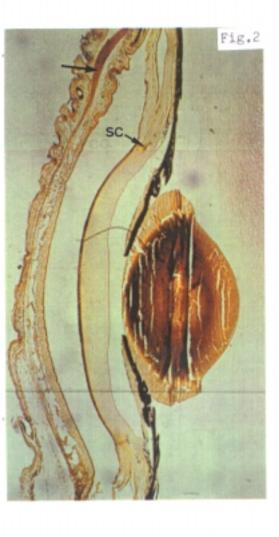
Fig.2: Corte horizontal del segmento anterior donde se observa con claridad la musculatura palpebral (flecha). En los márgenes de la córnea se encuentra el sistema de drenaje del humor acuoso. (BB, 4x)

Fig.3: Detalle de la córnea donde destacan los queratocitos inmersos en la trama de colágeno estromal; en su tercio externo la densidad de queratocitos es mayor (flecha). (BB, 40x)

Fig.4: Detalle de la pars terminalis retinae. (BB, 40x)

Fig.5: Detalle de la retina neurosensorial y epitelio pigmentado, donde se observan las interdigitaciones entre los artículos externos de los fotorreceptores y el epitelio pigmentado. (BB, 40x)

Fig.6: Corte que muestra los procesos ciliares y los pliegues del pecten. (BB, 4x)



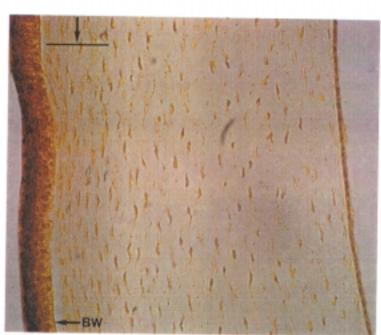
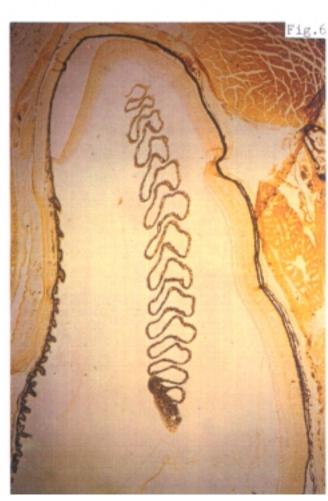


Fig.3







# **ESTADIO 1+**



ESTADIO 1+: EMBRION CT-136

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos la gran pigmentación del borde de los párpados (flechas). Destaca que la hendidura palpebral y el orificio de las fosas nasales están abiertos. (1,3x)

## ESTADIO 1+

Ejemplo: Embrión CT-136: 24 horas posteclosión.

# ESTUDIO MACROSCOPICO:

La hendidura palpebral ya está abierta y a través de ella observamos parcialmente la córnea y la membrana nictitante.

Las plumas del párpado superior comienzan a pigmentarse y el reborde palpebral presenta un color negro muy intenso.

En general vemos que en las regiones donde las plumas todavía eran blancas, éstas adquieren una ligera pigmentación ocre; por ejemplo, las plumas inferiores y laterales del pico inferior y las que se encuentran entre los ojos y entre los orificios nasales.

Por último queremos destacar que los orificios de las fosas nasales están abiertos. (figura 1)

## ESTUDIO MICROSCOPICO:

F 1 borde libre de los procesos ciliares centrales contactan con la región ecuatorial del epitelio anterior del cristalino y la superficie interna del iris está tan adherida la región preecuatorial del epitelio anterior cristaliniano que durante e1proceso histológico estas estructuras permanecen unidas a expensas de 1a rotura de1 ángu1o irido-corneal, que en algunos puntos deja al descubierto el sistema de drenaje del humor acuoso. (figura 2)

No podemos estudiar las fibras zonulares porque su frágil estructura hace que el proceso histológico las destruya.

La córnea presenta una perfecta ordenación y estructuración de cada una de sus capas. En el estroma superficial es mayor la población de queratocitos. (figuras 2 y 3)

La coroides, más gruesa que en estadíos anteriores y con gran cantidad de pigmento, está rodeada por el cartílago escleral completamente osificado. (figuras 4 y 5)

Como es habitual en los últimos estadíos, la retina ciega permanece en contacto con el epitelio pigmentado hasta la pars terminalis retinae; a partir de ese punto la retina visual normalmente está separada. (figura 4)

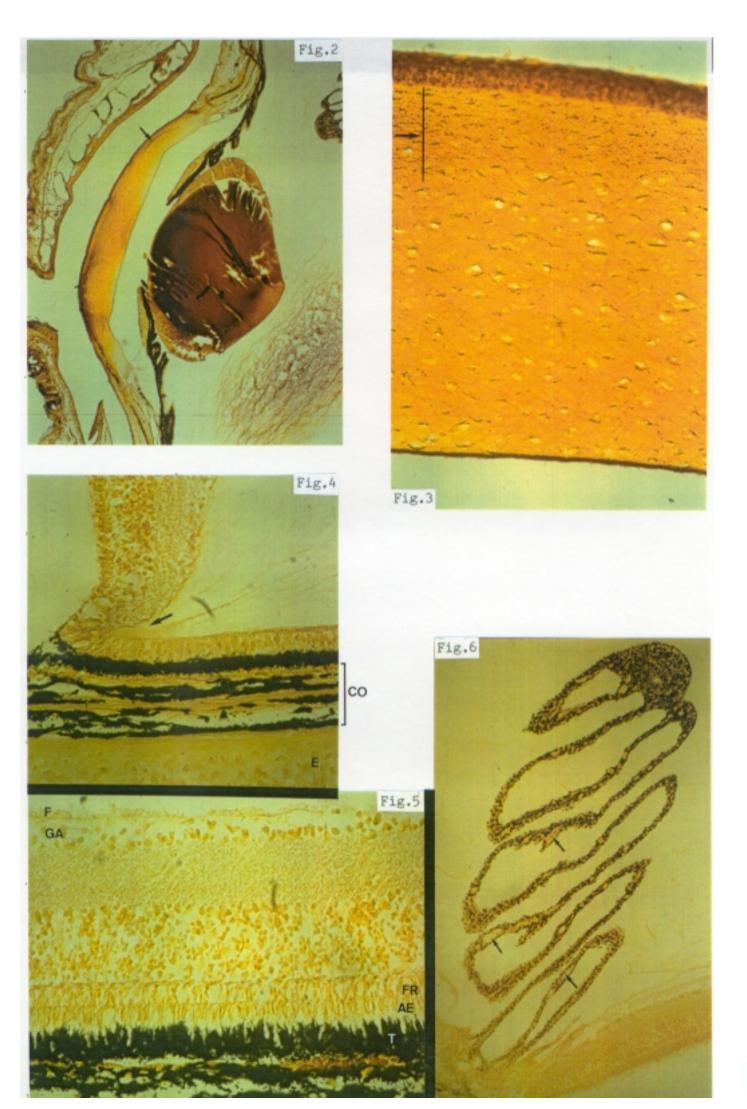
detalle en la superficie externa de la Existe un neurosensorial que ya veíamos en el estadío 33 y que aquí se hace mucho más evidente. Las interdigitaciones entre е1 articulos de epitelio pigmentado los externos los. У fotorreceptores son más númerosas y se hacen más pronunciadas. (figura 5)

Los pliegues del pecten presentan gran cantidad de pigmento; este hecho es más evidente en el borde libre. Otra característica a destacar, es el gran aporte sanguíneo que tiene, con vasos de gran calibre que hacen relieve en las paredes. (figura 6)

213

## ESTADIO 1+: EMBRION CT-136

- Fig.2: Corte horizontal oblicuo del segmento anterior. Por el estroma superficial transcurre un nervio (flecha). El párpado superior presenta un gran espesor y observamos que el ángulo irido-corneal está roto, debido a la unión entre el epitelio pigmentado del iris y el epitelio anterior del cristalino. (BB, 4x)
- Fig.3: Detalle de la perfecta ordenación de las capas de la córnea. En el estroma superficial existe mayor cantidad de queratocitos (flecha). (BB, 40x)
- Fig.4: Detalle de pars terminalis retinae; en esa zona el vítreo se adhiere con firmeza (flecha). Observamos el gran calibre de la coroides y la estructura ósea de la esclera. (BB, 40x)
- Fig.5: Corte que muestra la gran interdigitación que existe entre los artículos externos de los fotorreceptores y el epitelio pigmentado. (BB, 40x)
- Fig.6: Detalle del pecten, en cuyos pliegues destaca el número y tamaño del los vasos sanguíneos (flechas) y la cantidad de pigmento. (BB, 10x)



# ESTADIO 2+

ESTADIO 2+: EMBRION CT-145

Fig.1: Visión lateral derecha donde vemos la mayor pigmentación de las plumas situadas en los párpados y en las zonas lateral e inferior del pico inferior. (1,2x)



# ESTADIO 2+

Ejemplo: Embrión CT-145: 48 horas posteclosión.

# ESTUDIO MACROSCOPICO:

Hay pocas diferencias en comparación con el estadio anterior. A la única que podemos referirnos es al aumento de pigmentación, que es visible en el dorso del pico superior y en las plumas de los párpados y de las regiones inferiores y lateral del pico inferior.

La situación de la membrana nictitante es completamente aleatoria, pues depende de la posición que quedó tras la anestesia previa a la fijación. (figura 1)

# **ESTUDIO MICROSCOPICO:**

A los dos días de la eclosión no se observan cambios significativos en las estructuras oculares. De todas formas vamos a comentar algunos detalles que en algunos casos ya han sido descritos.

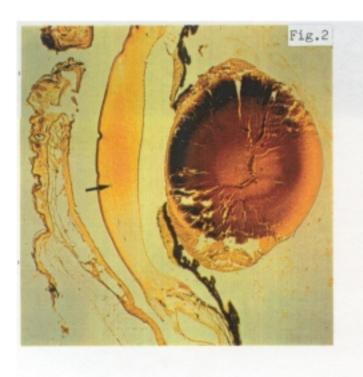
La unión entre el iris y los procesos ciliares centrales con el epitelio anterior del cristalino, provoca que se rompa la raiz del iris. (figura 2)

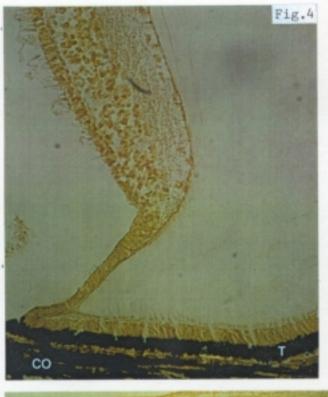
En la córnea las células originadas en la capa basal van desplazandose hacia la superficie, donde se descaman. (figuras 2 y 3)

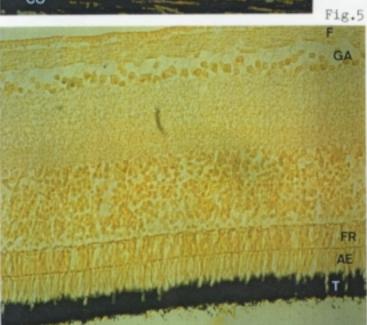
Es curioso observar que parte de la retina ciega, la que se continúa con la retina neurosensorial, acompaña a ésta última cuando se separa del epitelio pigmentado. (figura 4)

En la retina neurosensorial se mantienen las interdigitaciones entre fotorreceptores y células del epitelio pigmentado que veíamos en el estadío anterior. (figura 5)

En la base del pecten observamos la presencia de vasos sanguíneos de los que parte la vascularización de los pliegues del pecten. (figura 6)













# ABREVIATURAS CONTROLES

ACAuricula cardiaca
AEArtículos externos de los fotorreceptores
BB(V)Bielchowsky en bloque (Virado) BCBulbus cordis
BPPico superior pigmentado
BWMembrana de Bowman CACámara anterior
CBCerebelo
CIProcesos ciliares
CMCanal medular COCoroides
CRPars ciliaris retinae
DDiamante del pico
DCDiencéfalo DSMembrana de Descemet
EEsclera. Cartilago escleral
EAEpitelio anterior del cristalino
EDEctodermo EFEpifisis
ENEndotelio corneal o esbozo
EPEpitelio corneal o esbozo ESEstrato acelular de la córnea. Estroma corneal
FCapa de fibras ópticas de la retina
FlFibras primarias del cristalino
F2Fibras secundarias del cristalino FLFosa cristaliniana
FOFisura óptica (línea de cierre)
FRFotorreceptores
GEcuador del cristalino GACélulas ganglionares
HCHematoxilina de Carazzi
IIris o esbozo
<pre>IISegundo arco branquia1 IIITercer arco branquia1</pre>
ICAngulo irido-corneal o esbozo
IRPars iridae retinae IVCuarto ventrículo
JPEsbozo pigmentado de plumas
LCristalino o esbozo
LDLámina digital LICapa limitante interna de la retina
M1Primera oleada mesodérmica
M2Segunda oleada mesodérmica MCMesencéfalo
MDMesodermo
MIMiembro inferior
MNMembrana nictitante MOMúsculos oculares extrínsecos
MSMiembro superior. Ala

```
PM.....Proceso mandibular
PO.....Pediculo óptico
PP.....Pared distal de la vesícula cristaliniana
PR.....Párpados
PX.....Proceso maxilar
PPR....Pars plana retinae
R......Pared distal de la vesícula óptica primaria (7-12)
        Capa interna de la vesícula óptica secundaria (13-16)
        Retina neurosensorial (17-2+)
RB.....Retina ciega
RC.....Rombencéfalo
SC.....Canal de Schlemm (sistema de drenaje humor acuoso)
SV.....Seno venoso
T.....Pared proximal de la vesícula óptica primaria (7-12)
        Capa externa de la vesícula óptica secundaria (13-16)
        Epitelio pigmentado (17-2+)
TC.....Vesículas telencefálicas.
                                  Telencéfalo
TO..... Tectum óptico
TR.....Pars terminalis retinae
V.....Cuerpo vítreo o esbozo
V1.....Vesícula óptica primaria
V2.....Vesícula óptica secundaria
VA.....Vesícula ótica
VC.....Ventrículo cardiaco
VD.....Ventrículo diencefálico
VL.....Vesícula cristaliniana
VO.....Ventrículo óptico
```

#### 1.2. RESUMEN

Para facilitar el seguimiento hemos realizado un resumen de los resultados de los embriones control que dividiremos en dos apartados.

En el primero aparece el desarrollo de las estructuras oculares más significativas y en el segundo los acontecimientos más importantes que tienen lugar en cada estadío.

Entre los estadíos 24 a 33 Z, incluimos la longitud del tercer dedo del miembro inferior derecho de los embriones control que se escogieron para la descripción. Este dato (media aritmética) es orientativo pues no ha sido estadísticamente comprobado, si bien hemos querido mencionarlo porque aunque no aparece en el trabajo de ZACCHEI (1961); sí que es utilizado como parámetro en el embrión de pollo por HAMBURGER y HAMILTON (1951).

#### RETINA

El desarrollo de la retina se inicia en el estadío 11 Z, cuando la vesícula óptica primaria está en intimo contacto con la placoda cristaliniana. Desde ese momento se observa que la pared distal es más gruesa que la proximal.

Esta diferencia de espesor se incrementa durante la invaginación de ambas estructuras y continúa aumentando a lo largo del desarrollo.

La luz del ventrículo óptico desaparece entre los estadíos 16 y 17 Z, aunque en ocasiones quedan algunos restos en los bordes de la vesícula óptica. En el estadío 18 Z se distingue claramente la capa de fibras ópticas. Con la tinción Hematoxilina de Carazzi no se observa ninguna otra capa en el espesor de la retina, aunque existe mayor densidad celular en la mitad interna.

Hasta el estadío 24 Z no se distinguen con nitidez todas las capas de la retina neurosensorial, incluídos los artículos externos de los fotorreceptores.

Los artículos externos de los fotorreceptores se introducen entre las células del epitelio pigmentado, adoptando una morfología uniforme; pero en el estadío 33 Z y sobre todo tras la eclosión, se observan grandes interdigitaciones con aspecto de "sierra" entre ambas estructuras, que indican la presencia del estímulo luminoso sobre la retina.

Al principio, la transición entre retina neurosensorial y retina ciega (pars terminalis retinae) se realiza de forma progresiva (22 Z), por lo que abarca una gran extensión. Durante el desarrollo, la zona se va reduciendo de tamaño y en el estadío 28 Z, la transición es brusca y se localiza en un punto concreto.

A nivel de la pars terminalis retinae, las primeras células que desaparecen de la retina neurosensorial son las células ganglionares y a continuación el resto.

#### EPITELIO PIGMENTADO

Desde el estadío de placoda cristaliniana (11 Z), ya se observan diferencias de espesor entre las paredes de la vesícula óptica primaria que se acentúan durante la invaginación de la vesícula óptica secundaria.

este periodo (13 a 16 Z), la capa externa es más bordes central. en 1os que en 1a zona Esta característica se mantiene durante todo el desarrollo embrionario.

El cambio de espesor se localiza a nivel de la *pars* terminalis retinae. Es decir, el epitelio pigmentado es más grueso cuando forma parte de los procesos ciliares y del iris.

Los primeros indicios, macro y microscópicos, de pigmentación se observan en el estadío 16 Z, donde la zona central de la capa externa presenta una tonalidad más oscura que el resto. Sin embargo, los primeros granos de pigmento no se aprecian con nitidez hasta el estadío 17 Z, en esa misma zona.

Los bordes comienzan a pigmentarse en el estadío 18 2. En los primeros momentos la localización del pigmento, en el espesor de la capa externa, difiere de unas zonas a otras. Así, a nivel central los granos se sitúan en la superficie más alejada de la retina; mientras que en los bordes tienden a situarse en la superficie que contacta con la retina.

Hasta el estadío 20 Z no se pigmenta completamente toda la capa externa.

#### **PECTEN**

El primer indicio del pecten se observa a partir del estadío 17 Z cuando surge, a nivel de la fisura óptica y haciendo relieve en el interior de la vesícula óptica, un grupo de células que acompañan a la arteria cupulae opticae.

Hasta el estadío 21 Z, no se distingue una pequeña cresta que se introduce en el globo ocular siguiendo la línea de cierre de la fisura óptica.

Los primeros granos de pigmento aparecen en el borde libre del pecten, entre los estadíos 23 y 24 Z y las primeras inclinaciones se observan en el estadío 26 Z. Sin embargo, la morfología típica del animal adulto se adquiere entre los estadíos 28 a 30 Z.

A partir de la eclosión, los vasos sanguíneos incrementan el diámetro y hacen relieve en la pared de los pliegues.

#### CRISTALINO

La vesícula óptica primaria entra en contacto con el ectodermo superficial entre los estadíos 8 y 9 Z (10 a 13 somitos).

El ectodermo superficial que está en contacto con las vesículas ópticas inicia un ligero engrosamiento en el estadío 10 Z, que lo distingue del resto del ectodermo cefálico.

La verdadera placoda cristaliniana (primer esbozo del cristalino) aparece en el estadío 11 Z, como un engrosamiento del ectodermo localizado en la zona de contacto con el extremo de la vesícula óptica primaria.

Cuando el embrión tiene entre 21 y 22 somitos (12 Z), se observa una pequeña depresión en el centro de la placoda y pasa a denominarse fosa cristaliniana.

Durante la invaginación de la fosa cristaliniana y de la vesícula óptica secundaria (12 y 13 Z), ambas estructuras permanecen en íntimo contacto, aunque en ocasiones el proceso histológico puede separarlas.

En el estadío 14 Z (26 a 32 somitos), los bordes de la fosa cristaliniana se acercan y se fusionan quedando un pedículo de unión entre la vesícula cristaliniana y el ectodermo superficial que la recubre.

Mientras los bordes de la fosa se van acercando, comienzan a verse las primeras diferencias entre la pared proximal y distal del esbozo cristaliniano. La pared proximal inicia un engrosamiento originado por la elongación de sus células.

La vesícula cristaliniana se aisla completamente del ectodermo en el estadío 15 Z. La pared proximal continúa creciendo hacia la pared distal, por lo que la luz se reduce y en el estadío 16 Z, solamente se conserva algún resto que se denomina cámara cristaliniana.

La luz de la vesícula desaparece en el estadio 17 Z, pues las fibras primarias (antigua pared proximal) se han puesto en contacto con el epitelio anterior (antigua pared distal).

Desde los estadíos 18 y 19 Z, el epitelio anterior del cristalino presenta dos zonas claramente delimitadas. La zona central (inactiva) y las regiones ecuatorial y preecuatorial cuyo espesor se incrementa durante el desarrollo.

En la región preecuatorial (zona germinativa), se dividen las células que antes de incorporarse al núcleo como fibras secundarias, atravesarán la región ecuatorial.

A partir de los estadíos 20 y 21 Z las fibras secundarias comprimen en el centro, a las primarias y sus núcleos aparecen pequeños y picnóticos. En el estadío 22 Z ya es difícil observar los núcleos y desaparecen completamente en el 23 Z.

#### CORNEA Y CAMARA ANTERIOR

El primer esbozo de la córnea aparece al final del estadio 14 Z (26 a 32 somitos), cuando los bordes de la fosa cristaliniana se fusionan y el ectodermo superficial recubre las vesículas óptica y cristaliniana. Este ectodermo que presenta dos capas celulares es el esbozo del epitelio corneal.

En el estadío 17 Z (3½ días), se inicia la primera oleada mesodérmica que corresponde al esbozo del endotelio. Las células mesodérmicas que rodean el borde de la vesícula óptica se introducen entre el epitelio anterior del cristalino y el futuro epitelio corneal.

Las células mesodérmicas se sitúan formando una hilera de células en el estadío 18 Z (4 días). Entre los esbozos del epitelio y endotelio se forma un espacio acelular (ópticamente vacío al principio), que se denomina estrato acelular de la córnea.

En este mismo estadío observamos el primer esbozo de la cámara anterior.

La segunda oleada mesodérmica aparece entre los estadios 20 y 21 Z (5-5% días), invadiendo el estrato acelular de la córnea que ya está relleno de sustancia fundamental.

Igual que en la primera oleada, las células del mesodermo más superficial penetran desde la perifería hasta ocupar el centro del estrato acelular. En este momento la córnea ya presenta las tres capas celulares que la caracterízan, epitelio, estroma y endotelio.

En el estadío 26 Z aparece una banda densa, en el centro del estroma, que aumenta de intensidad en el estadío 28 Z y que se mantiene hasta el 32 Z.

Esta banda divide el estroma en dos partes que presentan algunas diferencias morfológicas. Cuando desaparece completamente la banda en el estadio 33 Z, ambas zonas del estroma conservan características particulares en relacción sobre todo a la disposición de los queratocitos.

En el estadio 22 Z se observan dos capas diferenciadas en el espesor del epitelio corneal. La estratificación se hace más evidente entre los estadios 26 y 28 Z, donde las células superficiales se queratinizan, presentan una tinción más oscura y comienzan a descamarse. A partir del estadio 33 Z (eclosión) se incrementa el espesor del estroma corneal.

El espesor del estroma y en general de toda la córnea muestra una serie de variaciones a lo largo del desarrollo. La más importante tiene lugar entre los estadíos 22 y 23 Z. A partir del estadío 31 Z el espesor va incrementandose de forma paulatina y continúa después de la eclosión.

Desde el estadío 20 Z hasta el 32 Z, el endotelio corneal experimenta pocos cambios. Sólo a partir del estadío 33 Z ya muestra su morfología típica con una sola hilera de células planas, perfectamente ordenadas.

El primer esbozo de las membranas de Bowman y de Descemet aparece en el estadío 23 Z y a partir de los estadíos 26 a 28 Z ya no nos es posible distinguirlas. Este hecho pensamos que se debe a los procesos de fijación y decalcificación.

El radio de curvatura corneal disminuye en relación al del globo ocular entre los estadíos 22 y 23 Z; aunque este detalle se observa con nitidez a partir del estadío 23 Z.

#### IRIS Y CUERPO CILIAR

Hasta el estadío 16 Z, el mesodermo que rodea la vesícula óptica se mantiene en los bordes de ésta sin sobrepasarla.

Aunque el borde de la vesícula óptica representa el primer esbozo del iris, hasta los estadíos 21 y 22 Z no es posible identificar el verdadero esbozo iridiano.

Durante los mencionados estadíos, el crecimiento de la vesícula óptica hace que sus borde se alarguen y arrastren con ellos parte del ectodermo que los cubre. De esta forma, en el esbozo del iris se distinguen la porción ectodérmica (compuesta por la retina ciega y el epitelio pigmentado) y la porción mesodérmica.

Previamente a este proceso, en el estadío 17 Z, los bordes de la vesícula óptica se ponen en contacto con la región ecuatorial del cristalino.

El iris crece y la retina ciega se adelgaza formando la pars iridae retinae (24 Z); sin embargo, a partir del estadio 27 Z se observan dos detalles: La pars iridae retinae desaparece a la vez que la superficie interna del iris se adhiere con fuerza a la región preecuatorial del epitelio anterior del cristalino.

La zona de retina y epitelio pigmentado que da lugar a la porción ectodérmica de los procesos ciliares, comienza a elongarse y se adelgaza a partir del estadío 21 Z. Pero los primeros pliegues no aparecen hasta el estadío 24 Z.

En el espesor de los pliegues se observa que la retina disminuye de grosor y pasa a denominarse pars ciliaris retinae. El epitelio pigmentado se engruesa, por lo que su espesor es mayor que el de la pars ciliaris retinae.

El desarrollo y diferenciación continúan y en el estadío 29 Z, los procesos ciliares alcanzan la morfología y estructura típica que tienen en el animal adulto; es decir, con las porciones ectodérmica y mesodérmica.

## ESTADIO 7:

Las vesículas ópticas hacen protusión en las paredes laterales del prosencéfalo. La pared distal de las vesículas ópticas se acerca al ectodermo superficial sin contactar con él. No se observa la presencia de mesodermo entre ambas estructuras.

#### ESTADIO 8:

Macroscópicamente parece que las vesículas ópticas hacen contacto con el ectodermo, pero al microscopio observamos que aún permanece un espacio ópticamente vacío entre ambas estructuras.

El ectodermo situado en las zonas lateral y ventral de la región cefálica del embrión, es más grueso que el de la zona dorsal.

En la base del pedículo óptico se inicia una ligera constricción.

## ESTADIO 9:

La pared distal de las vesículas ópticas contactan con el ectodermo superficial que a ese nivel alcanza el máximo grosor.

Las células de la vesícula óptica se orientan hacia la superficie de contacto con el ectodermo.

La constricción de los pedículos ópticos es manifiesta.

#### ESTADIO 10:

Las vesículas ópticas están en intimo contacto con el ectodermo superficial y en su crecimiento dorso-lateral, hacen relieve en la pared lateral de la región cefálica.

En el ectodermo que se relaciona con la pared distal de la vesícula óptica, se distingue perfectamente el esbozo de la placoda cristaliniana.

Los pedículos ópticos están formados.

#### ESTADIO 11:

Macroscópicamente observamos que la placoda cristaliniana aparece como una condensación ectodérmica en el centro de la vesícula óptica primaria.

La pared distal de la vesícula óptica es más gruesa que la pared proximal.

Tanto las células de la placoda cristaliniana como las de la vesícula óptica presentan una ligera orientación hacia la superficie de contacto entre ambas.

#### ESTADIO 12:

En el centro comienza la invaginación de la placoda cristaliniana y de la vesícula óptica primaria (fosa cristaliniana y vesícula óptica secundaria, respectivamente).

Se acentúa la diferencia de grosor entre las capas interna y externa de la vesícula óptica.

# ESTADIO 13:

Macroscópicamente se observa que en el centro de la fosa cristaliniana existe una zona de menor densidad que corresponde a la invaginación.

La vesícula óptica tiene un aspecto piriforme por la presencia de la fisura óptica (abierta) en posición ventro-caudal.

Los bordes de la fosa cristaliniana se acercan y en su interior se observan algunos detritus celulares.

La vesícula óptica y la fosa cristaliniana comienzan a separarse.

## ESTADIO 14:

El contacto entre los bordes de la fisura óptica se inicia en la zona media del pedículo y avanza en dirección distal.

Entre el esbozo cristaliniano y el borde de la vesícula óptica aparecen unas fibras que pueden corresponder al primer esbozo del vítreo.

Al final del estadío se cierra la fosa cristaliniana y se forma la vesícula cristaliniana que continúa en contacto con el ectodermo a través del pedículo de unión. Al mismo tiempo, se observa que la pared proximal aumenta de grosor en relación a la pared distal.

### ESTADIO 15:

Las capas interna y externa de la vesícula óptica establecen contacto en algunas zonas pero aún se distingue entre ambas el ventrículo óptico.

La vesícula cristaliniana ya se ha independizado del ectodermo superficial, aunque permanezca en contacto con él. Las células de la pared proximal comienzan a elongarse y sus núcleos se sitúan en la zona media de las células.

El ectodermo que cubre la vesícula cristaliniana corresponde al primer esbozo de la córnea (esbozo del epitelio corneal).

#### ESTADIO 16:

Se inicia la pigmentación del globo ocular que es visible macroscópicamente.

Las fibras primarias del cristalino contactan con la pared distal; aunque en el ecuador, bajo el epitelio anterior quedan restos de la luz (cámara cristaliniana).

La luz del ventrículo óptico queda limitada a los bordes de la vesícula óptica.

En la región central de la capa externa de la vesícula óptica se observa una tonalidad más oscura que en el resto. Es el inicio de la pigmentación.

#### ESTADIO 17:

Aumenta la pigmentación del globo ocular.

Lo más característico del estadío, es la primera oleada mesodérmica que comienza a ocupar el espacio entre el esbozo del epitelio corneal y el epitelio anterior del cristalino.

Los granos de pigmento son claramente visibles en la zona central de la capa externa de la vesícula óptica.

A través de la línea de cierre de la fisura óptica aparece el primer esbozo del pecten con la arteria cupulae opticae.

#### ESTADIO 18:

La pigmentación del globo ocular es manifiesta y destaca sobre el resto del embrión.

Rodeando el epitelio pigmentado se observa la condensación mesodérmica, origen de la esclera y la coroides.

Entre los esbozos del epitelio y endotelio corneales se forma el estrato acelular.

Aparece en primer esbozo de la cámara anterior.

Los bordes de la capa externa de la vesícula óptica se pigmentan y los granos de pigmento tienden a situarse en la superficie interna; mientras que en la zona central lo hacen en la superficie externa.

En la retina se distingue una fina capa de fibras ópticas en la superficie interna.

## ESTADIO 19:

En el globo ocular todavía se observa la línea de fusión de la fisura óptica.

El cristalino adopta una forma globulosa y en su epitelio anterior destacan las regiones ecuatorial y preecuatorial.

Las fibras secundarias comienzan a incorporarse al núcleo del cristalino.

En la retina destaca la capa de fibras ópticas.

#### ESTADIO 20:

Aumenta la condensación mesodérmica que rodea el epitelio pigmentado.

El estrato acelular de la córnea aparece relleno de sustancia fundamental.

Los neuroblastos tienden a situarse en la mitad interna de la retina.

## ESTADIO 21:

La segunda oleada mesodérmica invade el estrato acelular de la córnea y constituye el esbozo del estroma corneal. Como consecuencia directa, se produce un gran engrosamiento de la córnea.

A través de la línea de cierre de la fisura óptica surge una cresta celular que corresponde al esbozo del pecten.

Los núcleos de las fibras primarias y secundarias del cristalino aparecen claramente picnóticos.

#### ESTADIO 22:

Las papilas esclerales se observan con nitidez rodeando la circunferencia corneal. La membrana nictitante aparece en la región más rostral del globo ocular.

En el epitelio corneal se distinguen una capa basal y otra superficial.

La línea de cierre de la fisura óptica no llega al orificio pupilar.

En el interior del globo ocular se reconoce el cuerpo vítreo.

En el segmento anterior del globo ocular destacan los esbozos del iris y del ángulo irido-corneal.

#### ESTADIO 23:

Los párpados presentan forma de elipse.

Alrededor del orificio pupilar existe un anillo más oscuro que corresponde al mayor espesor que tiene el epitelio pigmentado a ese nivel.

Algunas zonas de la esclera presentan una estructura cartilaginosa.

Ya no son visibles los núcleos de las fibras cristalinianas.

Disminuye el radio de curvatura corneal y aumenta el espesor del estroma. Se observan los esbozos de las membranas de Bowman y de Descemet.

En la retina destacan los fotorreceptores.

# ESTADIO 24: (Tercer dedo: 0,23 cm.)

El borde del párpado inferior contacta con las papilas esclerales.

Ha desaparecido la línea de cierre de la fisura óptica.

El vítreo adquiere mayor consistencia y aparecen los primeros pliegues de los procesos ciliares.

La retina neurosensorial está perfectamente estratificada y en su espesor se distinguen todas las capas.

El proceso histológico provoca que parte de la retina visual se separe del epitelio pigmentado.

## ESTADIO 25: (Tercer dedo: 0,36 cm.)

El reborde palpebral, de forma piriforme, rodea la circunferencia corneal excepto en la zona rostral cubierta por la membrana nictitante.

El cuerpo vítreo presenta una gran consistencia y ocupa toda la cavidad ocular.

La mayor parte de la retina neurosensorial está separada del epitelio pigmentado debido al proceso histológico.

Comienza a delimitarse la pars terminalis retinae, a la vez que la pars iridae retinae deja de ser visible.

ESTADIO 26: (Tercer dedo: 0,43 cm.)

Comienzan a pigmentarse los esbozos de plumas situados entre los globos oculares.

Los párpados cubren parte de la córnea.

Las células superficiales del epitelio corneal comienzan a descamarse y en el centro del estroma aparece una banda más densa.

En los márgenes del ángulo irido-corneal, se observan los esbozos del músculo ciliar y del sistema de drenaje del humor acuoso.

El pecten se alarga y en su trayecto surgen las primeras inclinaciones.

ESTADIO 27: (Tercer dedo: 0,54 cm.)

En el borde de los párpados aparecen los primeros esbozos de plumas, mientras que en el resto comienzan a pigmentarse.

La hendidura palpebral se ha reducido bastante de tamaño.

Por el estroma superficial de la córnea transcurren pequeños nervios que terminan en el epitelio.

En la base del pecten surgen los primeros pliegues.

ESTADIO 28: (Tercer dedo: 0,67 cm.)

La banda central del estroma corneal capta con más intensidad el colorante.

La transición entre retina visual y ciega (pars terminalis retinae) es brusca.

Los artículos externos de los fotorreceptores se interdigitan con las células del epitelio pigmentado.

El pecten aparece muy plegado. En el espesor de los pliegues existen vasos sanguíneos y pigmento.

ESTADIO 29: (Tercer dedo: 0,82 cm.)

El borde libre de los párpados comienza a pigmentarse.

En el espesor de la coroides existe pigmento y gran número de vasos sanguíneos.

Como la retina neurosensorial no se ha desprendido del epitelio pigmentado, la capa de fibras ópticas aparece rota y separada del resto de la retina. Esto se debe a la tracción del vítreo sobre la retina por el proceso histológico.

El borde libre del pecten aparece también pigmentado.

ESTADIO 30: (Tercer dedo: 0,95 cm.)

Los párpados están casi cerrados y en los bordes aumenta la pigmentación.

Las células ganglionares de la retina son las primeras que desaparecen a nivel de la pars terminalis retinae.

El pecten presenta más de 20 pliegues que se distribuyen en la cavidad vítrea.

ESTADIO 31: (Tercer dedo: 1,08 cm.)

Los párpados están completamente cerrados.

La banda central del estroma corneal es mucho más tenue.

Los fotorreceptores son las últimas células que desaparecen a nivel de la pars terminalis retinae.

ESTADIO 32: (Tercer dedo: 1,23 cm.)

Mientras desaparece la banda estromal central, en el tercio superficial se observa mayor densidad de queratocitos.

El endotelio corneal va adquiriendo una morfología homogénea.

ESTADIO 33: (Tercer dedo: 1,35 cm.)

Destaca la gran pigmentación negra del borde de los párpados.

La córnea aumenta de espesor a expensas del epitelio (donde se incrementa el número de capas celulares) y sobre todo del estroma.

En el estroma desaparece la banda central y adquiere un aspecto homogéneo, aunque en el tercio externo continúa la mayor densidad de queratocitos.

El endotelio corneal presenta la morfología típica con una hilera de células planas perfectamente ordenadas.

Entre los artículos externos de los fotorreceptores y el epitelio pigmentado se incrementan las interdigitaciones.

#### ESTADIO 1+:

Los orificios nasales (pues el animal ya respira) y los párpados estan abiertos. Esto permite observar la gran pigmentación del borde libre.

La córnea presenta un aspecto homogéneo.

Las interdigitaciones entre los artículos externos de los fotorreceptores y las células del epitelio pigmentado son muy pronunciadas. Este detalle se observa porque la retina recibe el estímulo luminoso.

Aumenta el calibre de los vasos sanguíneos en el espesor de los pliegues del pecten.

# ESTADIO 2+:

La córnea es más gruesa que en el estadío anterior y a nivel retiniano se mantienen las interdigitaciones entre los fotorreceptores y el epitelio pigmentado.

Los vasos sanguíneos del pecten destacan en el interior de los pliegues.

# ABRIR CONTINUACIÓN RESULTADOS

