

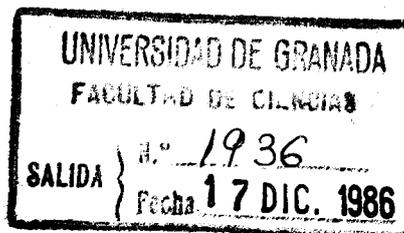
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Celular

**"Análisis morfológico e histoquímico de los procesos
de muerte celular en la diferenciación inicial de la
retina del embrión de pollo."**

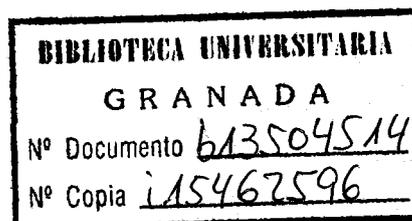
TESIS DOCTORAL

Miguel Angel Cuadros Ojeda

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION BIOLOGICAS
Departamento de Biología Celular



"ANALISIS MORFOLOGICO E HISTOQUIMICO DE LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR EN LA DIFERENCIACION INICIAL DE LA RETINA DEL EMBRION DE POLLO".



Trabajo presentado por
Miguel Angel Cuadros Ojeda,
Licenciado en Ciencias Biológicas
para aspirar al grado de Doctor.

Antonio Rios Guadix,
Catedrático y Director del Departamento de
Biología Celular de la Facultad de Ciencias,
CERTIFICO:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi
dirección, y con la codirección del Prof.
D. Francisco Abadía Fenoll, Catedrático de Biología
Celular, en este Departamento.



Nuestro agradecimiento a todos los que han colaborado en este trabajo.

A D. Antonio Rios Guadix, Catedrático de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, por su dirección y ayuda, así como por su constante apoyo.

A D. Francisco Abadía Fenoll, Catedrático de Biología Celular, que me permitió comenzar a trabajar en este Departamento, por su codirección.

Al Dr. D. Luis Caballero, por su colaboración y ayuda en los problemas técnicos para la realización de los preparados histológicos.

A la Dra. M^ª Asunción Abaurrea, Profesora Titular, por su colaboración en la realización de las inclusiones en resina.

A Encarnación Vázquez y M^ª José Martínez, por la confección de las secciones para microscopía electrónica.

Y a todos los componentes del Departamento de Biología Celular que me han ayudado, de una forma o de otra, en la realización de este trabajo.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador (convocatoria 1982) del Ministerio de Educación y Ciencia.

A mis padres.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
A. RAZON DEL TEMA	2
B. SITUACION BIBLIOGRAFICA	5
1.-Descripción general del Sistema Nervioso embrionario	6
1.1 Descripción del neuroepitelio	6
1.2 Diferenciación inicial de las células nerviosas	9
1.3 Crecimiento de la fibras nerviosas	11
2.-Desarrollo inicial de la retina	18
2.1 Desarrollo inicial del ojo	20
2.2 Morfogénesis del ojo (estadios HH13-18)	21
2.3 Citogénesis y diferenciación de las células de la retina	23
3.-Desarrollo inicial de la vía óptica	27
3.1 Diferenciación inicial de las células ganglionares	27
3.2 Crecimiento de las primeras fibras fibras ópticas	30
3.3 Especificación de las células de la retina	31
3.4 Estudios sobre el desarrollo inicial de la vía óptica	34

4.-Muerte celular en el desarrollo	41
4.1 Clasificación de la muerte celular	42
4.2 Características de la muerte celular	43
4.3 Control de la muerte celular	46
4.4 Muerte celular en el desarrollo del sistema nervioso	48
5.-Muerte celular en el desarrollo del ojo	50
5.1 Muerte celular morfogenética	51
5.2 Muerte celular histogenética	54
 II. MATERIAL Y METODOS	 56
1 Extracción del material	57
2 Técnicas generales	58
3 Impregnación argéntica	62
4 Histoquímica de la fosfatasa ácida	64
5 Microscopia electrónica	66
6 Reconstrucciones	68
7 Recuentos y representaciones gráficas del número de restos	69
8 Nota sobre la terminología	71
 III. RESULTADOS	 72
1.-Morfología de la muerte celular en la retina embrionaria	73
1.1 Muerte celular inicial	73
1.2 Fragmentación	77
1.3 Fagocitosis	78
2.-Fagocitos especializados en la retina	82
2.1 Células de origen mesodérmico en la retina	83
2.2 Actividad fosfatasa ácida	86
2.3 Actividad fosfatasa ácida en la copa óptica	90

3.-Distribución de la muerte celular en los estadios HH16-25	93
3.1 Muerte celular en los estadios HH16-17	93
3.2 Muerte celular en los estadios HH18-19	96
3.3 Muerte celular en el estadio HH20	98
3.4 Muerte celular en los estadios HH21-22	101
3.5 Muerte celular en el estadio HH23	103
3.6 Muerte celular en el estadio HH24	104
3.7 Muerte celular en el estadio HH25	106
IV. COMENTARIO	108
1.-Morfología de la muerte celular	109
2.-Fagocitos en la retina embrionaria	112
2.1 Células fagocíticas en el sistema nervioso inicial	112
2.2 Tipos de fagocitos en la retina	114
2.3 Origen de las células con actividad fosfatasa	116
2.4 Diferenciación de las células con actividad fosfatasa ácida	118
3.-Cuantificación y distribución de la muerte celular	121
3.1 Aspectos cuantitativos	121
3.2 Distribución de la muerte celular	123
3.3 Hipótesis sobre la muerte celular en la diferenciación inicial de la retina	127
V. CONCLUSIONES	132
VI. BIBLIOGRAFIA	136

I. INTRODUCCION

A. RAZON DEL TEMA

El desarrollo del sistema nervioso presenta características especiales, derivadas de su complejidad final, sustrato estructural preciso para que sea posible la función nerviosa. La gran variedad de tipos celulares y sus interrelaciones son fruto de los mismos procesos generales de la embriogénesis: proliferación celular, migración, diferenciación y muerte. Sin embargo, la regulación de estos procesos y su coordinación en todo el sistema nervioso en desarrollo implica una complejidad mucho mayor que en otros órganos. En concreto, la presencia de un tipo especial de migración celular -el crecimiento axónico-, dirigido de forma muy específica, plantea cuestiones que aún están por resolver en gran parte.

El presente trabajo se inscribe en esta línea de estudio de la embriología del sistema nervioso. En él se plantea el estudio del inicio de la diferenciación celular en la retina del embrión de pollo.

Se ha escogido esta región del sistema nervioso por estar relativamente bien estudiada, ser fácilmente accesible en el embrión y no plantear problemas de delimitación con otras zonas centrales del sistema nervioso. La razón determinante, sin embargo, es la ausencia de migración de las células diferenciadas a otras zonas distintas de la que se originan; al contrario que en las vesículas cerebrales, en que las células postmitóticas se mueven a través de distancias

considerables hasta la zona cortical (lo que se llama migración cortical), superando en su camino capas de células de origen diferente, las células ganglionares, las primeras células que se diferencian en la retina, se mantienen y maduran en la misma región de ésta. El crecimiento inicial de las fibras ópticas, además, se produce siguiendo el plano definido por la membrana vítrea de la retina, es decir, en dos dimensiones, lo que facilita su estudio y la comparación de su desarrollo en los diferentes estadios.

Durante el trabajo se ha logrado determinar una estrecha relación entre la degeneración de células indiferenciadas y el desarrollo de las fibras ópticas. La presencia en las zonas de más intensa degeneración de células macrofágicas de probable origen mesenquimal, también ha sido investigada.

B. SITUACION BIBLIOGRAFICA

1.-DESCRIPCION GENERAL DEL SISTEMA NERVIOSO EMBRIONARIO

Al igual que el resto del sistema nervioso embrionario, la retina en las fases iniciales del desarrollo está constituida por un epitelio pseudoestratificado, que por ser típico de las zonas que originan tejido nervioso se denomina neuroepitelio.

1.1 Descripción del neuroepitelio

En el neuroepitelio se distingue una zona apical, donde se encuentran células en diferentes fases de mitosis, otra basal, en relación con el mesénquima circundante, del que queda separado por una lámina basal, y una zona intermedia con núcleos a diversa altura.

Para explicar esta imagen, que es propia también de otros derivados ectodérmicos (placoda del cristalino, placoda ótica...), F. C. Sauer postuló en 1935 que, en estos epitelios, cuando la célula va a entrar en división, sufre cambios por los que el núcleo emigra hacia la superficie apical y el citoplasma adquiere una forma redondeada. Después de la división, el núcleo migrará de nuevo hacia la zona basal, y se volverá a repetir el proceso. Sauer se basaba en la observación de que los núcleos más voluminosos se situaban principalmente en la zona basal. Así se retomaba la antigua hipótesis de Schaper y se rechazaba la de His, que afirmaba que en el sistema nervioso embrionario la superficie apical estaba ocupada por células germinales en división,

mientras que el resto del epitelio pseudoestratificado estaba compuesto por "espongioblastos" o "glioblastos". Sauer denominó al proceso descrito "movimiento nuclear intercinético" (revisión en Jacobson, 1978).

Watterson y cols., (1955) observaron que al tratar con dosis adecuadas de colchicina embriones de pollo, se producía una acumulación de metafases en la luz del ventrículo por la acción de la droga; al aumentar la duración del tratamiento, se incrementaba el número de metafases bloqueadas. M. E. Sauer y Chittenden (1959) comprobaron que existía relación entre el contenido de DNA -medido por citofotometría de la reacción de Feulgen en cortes de médula de embrión de pollo- y el tamaño del núcleo. De esta forma, se lograba relacionar la posición del núcleo en el neuroepitelio y su contenido en DNA. Posteriormente, el uso de timidina tritiada permitió comprobar que la incorporación de precursor radiactivo (síntesis de DNA) estaba circunscrita a la zona basal del neuroepitelio (M. E. Sauer y Chittenden, 1959; Sidman y cols. 1959)

Langman y cols. (1966) describen con detalle el proceso. El núcleo de las células del neuroepitelio que se encuentran en la fase S se localizan en la zona basal; al entrar en G_2 comienzan a descender hacia la cara apical (luminal, al cerrarse el tubo neural), donde tendrá lugar la división celular. Al finalizar ésta, durante G_1 , ascenderá de nuevo hacia la zona de síntesis y volverá a comenzar el ciclo.

Fujita (1963) ya había comprobado esta distribución de fases del ciclo celular, también con autorradiografía. Denomina a cada zona según el estado, medido en contenido de DNA, de las células. Así, desde la superficie basal a la apical del neuroepitelio habla de una zona S (de síntesis de DNA), zona I (intermedia, constituida por células en G_1 o G_2), y la zona M (de mitosis). Además, puso de manifiesto que todas las células de la pared del tubo neural en su desarrollo inicial constituyen una población homogénea y en proliferación activa; todas las células se marcan después de un tratamiento suficiente con timidina

tritiada (10 horas aproximadamente). Fujita denominó a estas células matriciales, y a la capa que ocupan, capa matricial.

Cuando una de estas células va a abandonar el ciclo mitótico, después de realizar su última división vuelve a ascender; sin embargo, no realiza síntesis de DNA al pasar por la zona S, y se sitúa basalmente a ésta, constituyéndose una capa de neuronas en diferenciación, la capa manto. Finalmente, los axones de estas células se distribuyen externamente a la capa manto, y dan lugar a la capa marginal, formada por fibras nerviosas. (Fujita, 1963, 1964).

Los estudios con microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, han confirmado las observaciones anteriores (Hinds y Ruffet, 1971; Seymour y Berry, 1975; Nagele y Lee, 1979). Las células neuroepiteliales son células con dos procesos opuestos, uno interno, dirigido hacia la cara apical, y otro externo hacia la basal; el núcleo se sitúa a diferente altura, en la región de mayor grosor de la célula, que adopta una forma ahusada típica.

Las características descritas para el neuroepitelio del sistema nervioso son también propias de la retina durante su desarrollo inicial (Dixon y Cronly-Dillon, 1972; Hinds y Hinds, 1974; Meller y Tetzlaff, 1976; Mishima y Fujita, 1978; Prada y cols., 1981).

La invaginación que sufre el neuroepitelio para formar la copa óptica, que conduce a la diferenciación de retina neural y epitelio pigmentario, hace que estas dos láminas queden enfrentadas separadas por un espacio que se continúa directamente con el ventrículo de las vesículas cerebrales. Al avanzar el desarrollo, este espacio desaparece. Con estas modificaciones, al margen ventricular o apical de la retina neural, ahora contiguo al epitelio pigmentario, se le denomina escleral (por la futura esclerótica) y al basal, vitreal (por el futuro cuerepo vítreo). De forma análoga, al proceso ventricular se le denomina escleral o externo y al basal, vitreal o interno.

1.2 Diferenciación inicial de las células nerviosas

Como señala Fujita (1963, 1964), el inicio de la diferenciación neuronal debe determinarse dentro de la capa matricial, pero solo se hace reconocible cuando la célula alcanza la capa manto y comienza a diferenciarse morfológicamente.

Martin (1967) y Langman y cols. (1966) sugirieron que la orientación del huso mitótico respecto a la superficie ventricular podría tener relación con el destino posterior de las células hijas. Las mitosis con huso perpendicular a la superficie producirían un plano de división paralelo al ventrículo y solo una de las dos células hijas quedaría unida al extremo apical, quedando la otra libre para iniciar su diferenciación. Sechrist (1969), sin embargo, describe en la retina de embrión de pollo pares de células hijas que se impregnan con plata, manifestando que han comenzado a diferenciarse; Bennett y DiLullo (1985a,b) también encuentran pares de células hijas que, incluso en telofase, muestran una intensa reacción a anticuerpos anti-NF-M (polipéptido de neurofibrillas de peso medio). Hinds y Hinds (1974) también describen pares de células hijas que presentan características semejantes, tanto de células ventriculares o de formas transicionales hacia la diferenciación. Finalmente Calvente (1985) ha señalado que, al menos hasta el estadio HH19, las mitosis con el huso orientado paralela u oblicuamente a la superficie ventricular aparecen sobre todo en zonas de diferenciación más tardía, con alta actividad mitótica. Por tanto, en la retina del embrión de pollo, el plano de orientación del huso mitótico no parece ser un factor determinante del inicio de la diferenciación.

Cajal (1929) y Tello (1923) describieron el inicio del proceso de diferenciación neuronal utilizando métodos de impregnación argéntica, diferenciando cuatro fases en este proceso. El "neuroblasto apolar" que se libera del borde ventricular y migrará como "neuroblasto bipolar" hacia la membrana basal. Después de retraer su proceso

ventricular y empezar a formarse un axón, se convierte en "neuroblasto unipolar" y finalmente en "multipolar"; con el desarrollo de dendritas.

Se han realizado estudios para intentar determinar marcadores iniciales de la diferenciación. A nivel ultraestructural se han propuesto como marcadores el incremento del retículo endoplasmático rugoso (grupos de Nissl a microscopía óptica) y de los demás orgánulos membranosos (Tennyson, 1965; Pannese, 1968); la formación de áreas de microfilamentos y el inicio del desarrollo del axón (Lyser, 1964). Utilizando técnicas histoquímicas se ha relacionado el inicio de la diferenciación con la aparición de ciertas actividades enzimáticas, sobre todo la de la acetilcolinesterasa (Tennyson y Brzin, 1970; Pannese y cols., 1971). Por métodos inmunohistoquímicos se ha detectado el inicio de la diferenciación por la aparición de filamentos intermedios propios de células nerviosas (neurofilamentos) (Bignami y cols., 1980; Cochard y Paulin, 1984; Bennett y DiLullo, 1985a,b); de ciertos antígenos de la superficie celular (por ejemplo, Tanaka y Obata, 1984), e, incluso, de ciertas enzimas relacionados con la función neuronal (Rothman y cols., 1980).

En algunos de estos estudios se ha puesto de manifiesto que la aparición de estos marcadores se da en células que aún sufrirán división mitótica; en este hecho se apoyan algunos autores para afirmar que estas células se encuentran en su ciclo mitótico terminal (*terminal mitotic cycle*). Este hecho se produce en la aparición de neurofilamentos, detectados tanto con impregnación argéntica (Sechrist, 1969) como con inmunohistoquímica (Bennett y DiLullo, 1985a,b), en la manifestación de la actividad acetilcolinesterasa (Miki y cols., 1981; Miki y Mizoguti, 1982; Mizoguti y Miki, 1985), y de la aparición de ciertas enzimas en la célula (por ejemplo, tirosina hidroxilasa y dopamina- β -hidroxilasa) (Rothman y cols., 1980).

1.3 Crecimiento de la fibra nerviosa

El resultado de la diferenciación neuronal es, en general, una célula claramente asimétrica con un cuerpo celular o soma que contiene el núcleo y la mayoría de los orgánulos, y prolongaciones de dos tipos, axón y dendritas. La morfología de este patrón básico es muy variable, mostrando grandes diferencias entre los distintos tipos de neuronas.

Aunque el establecimiento de sinapsis que conduzcan aferencias a una neurona puede darse tanto en las dendritas, como en el soma o el axón, los impulsos eferentes van, casi exclusivamente, desde el soma al axón que conecta sinápticamente con otras células, nerviosas o efectoras. La funcionalidad del sistema nervioso depende de la correcta formación de redes que transmitan el impulso. En este sentido, es especialmente importante el que durante el desarrollo embrionario los axones alcancen sus destinos específicos y establezcan conexiones sinápticas correctas.

En muchas ocasiones se precisa el crecimiento dirigido del axón a través de rutas que pueden exceder en varios miles de veces el tamaño del soma, y durante las cuales "desprecia" otros tipos celulares diferentes del suyo específico. Los mecanismos que se han propuesto para explicar este fenómeno se pueden agrupar en varios tipos (Jacobson, 1978; Prochiantz, 1985), según el factor que se subraye como determinante en el control del crecimiento axónico.

1.- Existencia de campos eléctricos: Patel y Poo (1982) han demostrado que el crecimiento de neuritas en un cultivo de células nerviosas se dirige siempre hacia el cátodo; esta respuesta se inhibe incubando previamente el cultivo con lectinas que se unen a glicoproteínas superficiales. Sin embargo no hay mucho apoyo experimental acerca de la existencia de este tropismo en el ser vivo.

2.-Determinación del crecimiento por factores mecánicos: Se sabe que el crecimiento de los axones siempre se da sobre una

superficie, nunca en el seno de un líquido. Las fibras nerviosas crecen sobre las líneas de tensión de sustrato sometido a estiramiento, lo que parece indicar cierta guía por contacto. Bray (1984) ha observado que ejerciendo una tensión mecánica sobre el cono de crecimiento mediante una micropipeta, la neurita se alarga en la dirección de la tensión. No se trata solo de un estiramiento, sino de un verdadero crecimiento que supone adición de membrana y de citoesqueleto. Prochiantz (1985) señala que el fenómeno de crecimiento en un campo eléctrico puede ser básicamente el mismo que éste, con la única diferencia que en vez de ejercerse directamente una tensión, ésta se ejerce por la atracción del cono hacia el cátodo.

En el ser vivo estas líneas de tensión pueden originarse durante el desarrollo, debido al crecimiento diferencial de las diversas partes del organismo. El camino que han de seguir las fibras ya no es a través de una superficie más o menos uniforme, como sucede en los cultivos, sino que el cono axónico se mueve a través de una disposición intrincada de espacios extracelulares. La disposición de estos espacios, que pueden dar lugar a "canales" (Silver y Sidman, 1980), la de las células que lo delimitan, y la naturaleza y orientación de la matriz extracelular (Krayanek, 1980), pueden ser factores que determinen el crecimiento.

3.-Interacciones de tipo químico: En 1928 Ramón y Cajal enunció la hipótesis de la "quimiotaxis", que supone la liberación de sustancias atractivas del axón desde una fuente distante; la difusión del factor quimiotáctico origina un gradiente de concentración de moléculas solubles que induce un crecimiento axónico dirigido hacia su destino funcional. Así, la presencia de un explante de tejido que produce un factor atractivo, induce un crecimiento preferencial hacia él de las neuritas que se originan en otro explante de tejido nervioso (revisión en Jacobson, 1978). El factor difusible mejor conocido es el "factor de crecimiento nervioso" (*nerve growth factor*, NGF) que tiene

cualidades atractivas para el crecimiento de neuritas (Letourneau, 1982).

Sperry (1963) descarta el "efecto distante" atribuido a los factores difusibles y postula la hipótesis de la "quimioafinidad". Mantiene que el contacto o la atracción desde corta distancia por moléculas específicas no difusibles es la principal fuerza que guía a las fibras en el crecimiento: debe existir una especificidad, una etiqueta, de naturaleza citoquímica, entre la membrana del cono de crecimiento y sus células blanco. Esta especificidad permitirá a cada neurona "reconocer" a la célula correspondiente y se podría explicar la formación de conexiones topológicamente ordenadas.

En algunos sistemas se ha podido demostrar este reconocimiento específico. Bonhoeffer y Huf (1980, 1982) han puesto de manifiesto que células ganglionares de la retina se unen principalmente a células tectales cuando se cultivan conjuntamente; Halfter y cols. (1981) han demostrado que las señales que permiten el reconocimiento están asociadas a la membrana de las células tectales.

Aparte de la guía mediante moléculas específicas a que se refiere Sperry, la investigación está poniendo de manifiesto la existencia de moléculas que facilitan o permiten la adhesión del cono de crecimiento al sustrato. Estas moléculas aparecen ligadas al sustrato. Por ejemplo, células del ganglio ciliar no producen neuritas cuando se cultivan en un medio normal, pero hay abundante desarrollo de ellas si se incuban en un medio condicionado previamente por el crecimiento de células cardíacas embrionarias; el factor responsable de esta inducción del crecimiento, queda unido al sustrato (Collins y Garret, 1980). La adhesividad diferencial del extremo axónico a diferentes zonas del mismo sustrato determina la dirección predominante que tomarán las neuritas (revisión en Letourneau, 1982).

Entre estas moléculas que favorecen la adhesión, se encuentran la fibronectina y la laminina, que aparecen distribuidas

ampliamente en el embrión; esto lleva a considerar que más que dirigir el crecimiento de las fibras hacia su destino, constituyen un sustrato apto para el avance de los cono axónicos. Rickmann y Fawcett (1985), han observado que, aunque fibronectina y laminina aparecen en la matriz extracelular de todo el somita en el embrión de pollo, los axones solo invaden la mitad rostral del mismo. Estos autores consideran que son factores distintos a estas moléculas los que determinan el crecimiento de las fibras a través del somita.

Una glucoproteína denominada *neural cell adhesion molecule* (NCAM), aparece relacionada directamente con la formación de uniones entre células (Rutishauser, 1984). Aunque también se encuentra en otros tipos celulares, aparece en el neuroepitelio primitivo (Thiery y cols., 1982) y en las fibras en crecimiento (Silver y Rutishauser, 1984). Los estudios realizados en vía óptica (Thanos y cols., 1984; Silver y Rutishauser, 1984) sugieren que esta molécula interviene en la guía de los axones, tanto mediante interacciones del cono de crecimiento con células neuroepiteliales o gliales como con otros axones.

En el sistema nervioso de invertebrados se ha podido estudiar con detalle las interacciones asociadas con el crecimiento del axón. Así, se ha observado que el crecimiento del axón puede estar determinado por la interacción del axón con células específicas, células "directrices" (Bentley y Keshishian, 1982) o por la adhesividad jerarquizada a las superficies epiteliales y neuronales (Berlot y Goodman, 1984). La existencia de zonas de adhesividad diferencial también ha sido descrita en vertebrados. Katz y Lasek (1985) afirman que existe un rastro en el sustrato, una banda de intensa adhesividad, que determina el crecimiento de los axones circunferenciales de la médula embrionaria, cambiando drásticamente su dirección dorsoventral para crecer en dirección anteroposterior formando haces compactos.

Otro de los mecanismos de conducción es el crecimiento sobre fibras preexistentes. En este caso, las primeras fibras originadas, "fibras pioneras", necesitan de mecanismos de guía más específicos, y los siguientes solo han de seguir su recorrido. La destrucción experimental de las fibras pioneras conduce a que no se forme el tracto correspondiente; los axones que se desarrollan posteriormente crecen al azar de forma aberrante. Por tanto, los axones más tardíos no tienen la capacidad de las fibras pioneras para alcanzar su destino. Esto puede deberse a que no son capaces de reconocer las "señales" que guiaron a las fibras pioneras, a que las señales hayan desaparecido, o, simplemente, que en el crecimiento se haya alejado tanto su destino que no lo pueden alcanzar sin fibras preexistentes. Un ejemplo de todo esto aparece en la revisión de Edwards (1982) de sus trabajos en fibras sensitivas del grillo.

En el desarrollo inicial del tracto circunferencial de la médula del embrión de pollo, Holley (1982) también ha propuesto la existencia de fibras pioneras. Éstas crecerían inmediatamente por debajo de la membrana basal del neuroepitelio, antes de que se forme la capa manto (que en este caso es la primitiva columna motora). Cuando ésta se forma, el sustrato por el que crecerán las fibras circunferenciales posteriores es mucho más intrincado y difícil de recorrer si no existiesen fibras previas que poder seguir.

Además de la interacción con otras fibras y con otras neuronas, también se producen interacciones con células gliales, o con células indiferenciadas del sistema nervioso embrionario.

En 1979, Singer y cols. propusieron la "hipótesis del anteproyecto" (*blueprint hypothesis*), que sostiene que el patrón de fibras nerviosas iniciales se encuentra programado, de forma inherente, en el neuroepitelio primitivo y en los derivados gliales iniciales. Estas células las expresarán durante la neurogénesis en forma de canales o espacios, y por la aparición de marcadores en su superficie

celular que señalarían un rastro a seguir por las neuritas, según las afinidades de estas. Los autores se basan en sus estudios sobre la regeneración y el desarrollo embrionario de la cola del tritón. En ambos casos los axones pioneros, que marchan en dirección caudal, aparecen en el interior de canales formados por procesos radiales de las células neuroepiteliales, o por las células del epéndimo, en la regeneración. Los canales se orientan longitudinalmente, por delante de las primeras fibras en crecimiento. Entre estas células y las fibras se forman uniones de diverso tipo. Después de que una fibra aparezca en un canal, se produce una invasión masiva de neuritas que lo ocupan completamente.

Aunque no en todas las zonas aparecen los canales de forma tan manifiesta, los abundantes espacios extracelulares existentes en el sistema nervioso en desarrollo, pueden constituir una posible vía de crecimiento de los axones, que posteriormente serían determinados para cada tracto concreto por la presencia de marcadores específicos. Esta hipótesis es congruente con el hecho de que en algunos casos, el crecimiento del axón hacia su destino se produce antes de que éste se haya formado.

Hasta ahora se han considerado factores que determinan una atracción positiva del crecimiento axónico, pero también cabe pensar que existen factores que lo impidan o retarden.

Jacobson (1978) afirma que no hay pruebas que apoyen la existencia de un quimiotactismo negativo. Silver y Sapiro (1981) en su estudio del recorrido de las fibras por el nervio óptico describen fascículos aberrantes en ratas albinas: mientras que en las normales la zona dorsal del tallo está pigmentada y desprovista de axones, en las albinas aparecen fibras. Este patrón de fascículos en el tallo óptico de ratas albinas se hace así muy semejante al que aparece en el tallo del embrión de pollo, que no presenta pigmentación durante su

desarrollo. Por tanto, este fenómeno parece indicar que la presencia de pigmentación impide o retrasa el crecimiento.

Es más aparente la presencia de estructuras que constituyen una barrera física al crecimiento de los axones: túneles ciegos por su extremo periférico que obligan a crecer hacia el disco óptico en la retina del embrión de ratón (Silver y Sidman, 1980), o la formación de estructuras gliales que, "a modo de barricadas", impiden el crecimiento de las fibras de las células ganglionares fuera del tracto óptico (Silver, 1984).

2.-DESARROLLO INICIAL DE LA RETINA

Los procesos predominantes en cada momento del desarrollo han llevado a los diversos autores a establecer fases en el desarrollo de la retina. Weyssse y Burgess (1906) diferencian tres periodos en el desarrollo histológico de la retina en el pollo:

- 1º Proliferación celular, durante los días 2-8 de incubación.
- 2º Etapa de reajuste celular, en los días 8-10.
- 3º Diferenciación final, desde el día 10 hasta la eclosión.

Coulombre (1955), por su parte, se refiere a tres periodos críticos en el desarrollo del ojo, también en el pollo:

- 1º Entre los días 4 y 5 de incubación, se da el inicio de la proliferación celular activa, con un marcado aumento del área de la retina y de su grosor. Aparecen las fibras nerviosas y se puede observar la membrana limitante interna.
- 2º Entre los días 8-10 aparecen la capa plexiforme interna (día 8) y la externa (día 9 o 10). Durante el día 10 las células ganglionares se reorganizan formando

una capa unicelular; también aparecen los segmentos internos de conos y bastones.

3º Alrededor del día 15 cesa la actividad mitótica en la retina y se pueden apreciar los segmentos externos de conos y bastones.

Atendiendo exclusivamente a la proliferación celular, Morris y Cowan (1983) distinguen tres fases en la retina del embrión de pollo:

1º Fase exponencial: Hasta el quinto día de incubación hay un aumento lineal del número de células y prácticamente solo debe haber multiplicación celular.

2º Fase de diferenciación: Entre los días 5-10 disminuye la tasa de proliferación.

3º Fase final: A partir del día 10, no hay variación apreciable en el número de células de la retina.

Dütting y cols. (1983) señalan que el número total de células de la retina aumenta hasta el día 7-8 de incubación. En este momento la proporción de autorenovación -proporción de células hijas capaces de dividirse- desciende por debajo del valor crítico de 0,5, y se va frenando el incremento del número de células. Estos autores describen diferencias regionales dentro de la retina respecto a los diversos parámetros proliferativos considerados. Este hecho da lugar a una distribución espacio-temporal que puede servir para adquirir propiedades dependientes de su situación a las células que se van formando. Diferencias de este tipo han sido descritas por Calvente (1985) en la retina de embriones de los estadios HH13-14 y HH17-18.



2.1 Desarrollo inicial del ojo

El primer indicio de la formación del ojo en el pollo aparece en el estadio HH9, cuando el embrión cuenta con 7 somitas, a las 30 horas de incubación. En el extremo cefálico del blastodermo se aprecia como el pliegue neural forma dos evaginaciones laterales; en estas evaginaciones la pared presenta una composición celular semejante al resto del neuroepitelio.

En el siguiente estadio de Hamburger y Hamilton (1951), la cavidad formada por la evaginación, el ventrículo óptico, aumenta, al mismo tiempo que la vesícula se expande lateralmente. El ventrículo óptico sigue siendo continuo con la superficie libre del surco neural, cuyos pliegues aún no se han fusionado a nivel medio para constituir el tubo neural.

El establecimiento del tubo neural, que tiene lugar en la cabeza en el estadio HH11, coincide con la formación del pedículo óptico: la vesícula se expande en su zona lateral, mientras que se estrecha en la porción que conecta con el tubo neural. La expansión de la vesícula se dirige principalmente hacia el extremo caudal, coincidiendo con el establecimiento de contacto entre el neuroepitelio de su pared y el ectodermo cefálico. Este hecho desencadena la inducción del cristalino, que se forma a partir de estas zonas de ectodermo.

En los estadios siguientes, HH12 y 13, se produce el engrosamiento de las zonas adyacentes de la vesícula óptica y ectodermo, para constituir el esbozo de la retina neural y la placoda del cristalino, respectivamente. A partir de esta fase, la morfogénesis del ojo se desarrolla rápidamente, de forma que, en unas 30 horas aparecerán definidos los primordios de las diferentes partes del ojo, y se dará paso a fenómenos histogénicos y de diferenciación.

2.2 Morfogénesis del ojo (estadios HH13-18)

Para la descripción de los fenómenos morfogénéticos en el ojo, hasta el estadio HH18, Schook (1980a,b,c,d) diferencia cinco fases:

Fase 1: (Estadios 13- a 13+ de Hamburger y Hamimlton; alrededor de las 50 horas de incubación)

La vesícula tiene forma de pera y aparece estrechamente apuesta al ectodermo cefálico. En su parte ventral conecta con el prosencéfalo mediante el tallo óptico, relativamente grueso. La pared de la vesícula está constituida por un neuroepitelio ligeramente más engrosado en la zona del disco retinal.

La placoda del cristalino se presenta como una zona marcadamente más gruesa dentro del ectodermo, constituida por dos filas de núcleos, de células columnares; a medida que están más alejadas del centro, las células son más bajas y disminuye el número de filas de núcleos, hasta constituir una capa monoestratificada de células cúbicas, típica del ectodermo.

Fase 2: (estadios HH14- a 14+; alrededor de 52 horas de incubación)

Comienza la invaginación, tanto de la vesícula óptica como de la placoda del cristalino. Esta se ha iniciado por la indentación de la pared y el hundimiento de la superficie; la cavidad que resulta es la cavidad del cristalino, que desde el principio es asimétrica, ya que es más profunda en su parte dorsal.

En la vesícula óptica que ha empezado a invaginarse, se aprecia una clara diferencia de grosor entre la pared lateral y la medial. La primera, más gruesa, será la futura retina neural, mientras que la medial dará lugar al epitelio pigmentario. Entre ambas láminas, que son continuas, queda el ventrículo óptico, muy reducido por la aproximación de las dos capas.

En el borde ventral aparecen los primeros indicios de fisura óptica que se desarrollará en la fase siguiente.

Fase 3: (Estadios HH15 y 16; unas 55 horas de incubación)

La invaginación continua y se puede hablar de copa óptica en lugar de vesícula.

La cavidad del cristalino se ha hecho más profunda, siempre en sentido dorsal, y sin que aumente su abertura. Esta, el poro del cristalino, se constriñe de manera que la cavidad sólo mantendrá su conexión externa a través de un conducto estrecho, denominado tallo del cristalino.

La invaginación de la copa óptica también progresa más en sentido dorsal. El ventrículo óptico sigue disminuyendo, quedando finalmente reducido al seno marginal, por todo el borde de la copa. La capa externa, futuro epitelio pigmentario, presenta una o dos capas de células de grosor; la capa interna o invertida es de grosor homogéneo en toda su extensión (6 o 7 capas de núcleos).

La fisura óptica se aprecia claramente en la parte ventral de la copa, extendiéndose desde el borde hacia el centro, alineada con el tallo óptico. En algún caso se puede apreciar la presencia de un vaso sanguíneo en la fisura.

Fase 4: (Estadio HH17; alrededor de 70 horas de incubación)

Durante esta fase se produce la oclusión del poro del cristalino, de forma que la vesícula cristaliniana queda cerrada. Junto con la constricción del tallo, se dan procesos de muerte celular que conducirán finalmente a la separación del esbozo del cristalino del ectodermo (García Porrero y cols., 1979). A la vez se produce un engrosamiento de la pared medial de la vesícula, por empezar a adoptar sus células una forma columnar.

La invaginación de la copa óptica finaliza en esta fase, con una fisura óptica bien formada. La invaginación ha sido más pronunciada en la zona dorsal, que por tanto aparece más prominente.

Fase 5: (Estadio 18; sobre las 68 horas de incubación)

En la copa óptica se producen escasas modificaciones: persisten el seno marginal y los bordes de la copa contienen la vesícula cristaliniana. Sin embargo, se pueden apreciar diferencias de

grosor entre las distintas zonas de la retina neural, que es más gruesa en el polo posterior y menos en los laterales. Se sigue apreciando continuidad entre la luz del tallo óptico y el ventrículo.

En el cristalino la pared medial ha continuado engrosándose, sobre todo en su porción central, con lo que la luz de la vesícula adopta una forma de media luna en el corte.

En este estadio han finalizado los principales procesos morfogénéticos. El esbozo del ojo no ha adquirido su morfología final, pero los cambios precisos para ello no requieren movimientos tan importantes como los descritos. La proliferación celular continua, pues ahora se da un espectacular crecimiento del esbozo del ojo; según Romanoff (1960, pág. 391), aumenta 500 veces de volumen entre el día 4º y 9º de incubación. Progresivamente las zonas de proliferación quedan relegadas a la periferia, y según Coulombre (1955), a partir del día 15 de incubación, no hay división celular en la retina.

2.3 Citogénesis y diferenciación de las células de la retina

Mediante autorradiografía, se puede determinar el momento en que las células que originan un determinado tipo neuronal incorporaron por última vez timidina tritiada, es decir, realizaron su última fase S. Fujita y Horii (1962), con este método, señalan que las primeras células ganglionares que se originan deben salir del ciclo celular sobre el día quinto de incubación. Las células visuales incorporan timidina por última vez el día 7-8 de incubación. Mishima y Fujita (1978) confirman este dato en su estudio sobre la diferenciación de los fotorreceptores.

Aunque Khan (1973, 1974) postula una secuencia de aparición de neuronas semejante a la de los autores citados anteriormente, hay diferencias sensibles en la datación del momento de la salida del ciclo celular. Según este autor, las primeras células ganglionares salen del

ciclo mitótico entre el 2º y 3º día de incubación, en el polo posterior de la retina; partiendo de esta zona se produce una oleada de generación que se extenderá hacia la periferia. Siempre en la zona posterior, central, primera en diferenciarse, la datación de la última incorporación de timidina tritiada es la siguiente:

-Células ganglionares: en este estrato aparecen abundantes células intensamente marcadas inoculando el embrión con timidina tritiada entre los días 3-5 de incubación.

-Fotorreceptores: aunque fotorreceptores intensamente marcados aparecen ligeramente más tarde que las ganglionares, el patrón es semejante.

-Células horizontales y amacrinas: No aparecen marcadas si se inoculara después del día 6.

-Células bipolares y de Müller: aparecen células intensamente marcadas hasta el día 12, que el autor considera deben corresponder a las células gliales de la retina (de Müller).

En zonas más periféricas de la retina, la producción de células postmitóticas es posterior.

Ya se ha indicado que las células ganglionares son las primeras en originarse. Su diferenciación pasa por dos etapas que se reflejan en la polaridad de la célula: antes del sexto día de incubación la mayoría de los orgánulos se disponen en la salida del axón; a partir del citado día, cuando los axones han alcanzado ya el techo óptico, comienzan a desarrollarse las dendritas. Ligeramente antes se pueden distinguir células amacrinas; el desarrollo de las neuritas de estas células junto con las de las ganglionares formará, ya en el día 7, la capa plexiforme interna, distinguible morfológicamente y por presentar actividad acetilcolinesterasa (Shen y cols., 1956). A la de estas células sigue la diferenciación de las bipolares. En esta etapa de la

diferenciación de la retina son observables los segmentos internos de los fotorreceptores (conos y bastones). Las últimas células en diferenciarse son las horizontales, contiguas a la capa de fotorreceptores. Entre estos tipos celulares se establecerá la capa plexiforme externa, apreciable a partir del día 9 de incubación, por la contribución de prolongaciones nerviosas de células horizontales, bipolares y receptores.

De esta forma, a los 10 días de incubación son apreciables todos los tipos celulares, aún inmaduros, y la estratificación típica de la retina (Obando y cols., 1979).

Las células ganglionares han continuado su diferenciación durante este periodo, mediante el desarrollo de su árbol dendrítico. Este proceso se completa sobre el día 13, en que ya aparecen los seis tipos morfológicos que estarán presentes en el adulto (Nishimura y cols., 1979; Nishimura, 1980).

El día 15 de incubación se pueden apreciar los segmentos externos de los conos y los bastones; estas células continuarán diferenciándose, formando sus sistemas membranosos, hasta el día 20 (Mishima y Fujita, 1978).

Sheffield y Fischmann (1970) encuentran uniones del tipo *puncta adherentiae* entre los 10 y 14 días de incubación; en ese mismo estadio Armengol y cols. (1979) señalan también la presencia de vesículas cubiertas. A pesar de que estas dos estructuras pueden representar un primer estadio de la formación de uniones sinápticas, sinapsis convencionales solo pueden apreciarse a partir de los días 13-14 de vida embrionaria (Hughes y La Velle, 1974). La secuencia de aparición de uniones sinápticas en las capas de la retina de las aves es inversa a la de los mamíferos: las primeras se observan en la capa plexiforme interna, luego en la plexiforme externa y finalmente se da la maduración del polo visual del fotorreceptor (Hughes y La Velle, 1974).

Los estudios de Lindeman (1947) pusieron de manifiesto que ya en el día 19 de incubación, 48 horas antes de la eclosión, hay reflejo pupilar y, por tanto, el ojo puede ejercer función visual.

La retina adulta presenta la estructura descrita por Ramón y Cajal (1892, 1909-11, 1932-33) confirmada posteriormente por Polyac (1957): diez estratos formados por la disposición de seis tipos neuronales y un tipo celular de glía, la célula de Müller, que abarca todo el espesor de la retina con sus prolongaciones.

3.-DESARROLLO INICIAL DE LA VIA OPTICA

3.1 Diferenciación inicial de las células ganglionares

Las observaciones realizadas en este estudio, y las de otros autores, acerca de la presencia de células ganglionares diferenciadas morfológicamente y de fibras en la retina, ya en el día tercero de incubación (Ramón y Cajal, 1911; Rogers, 1957, Goldberg y Coulombre, 1972; Prada y cols., 1981, entre otros) están más en consonancia con los datos que aporta Khan (1974) que con los de Fujita y Horii (1963) acerca de la producción inicial de células ganglionares.

Sechrist (1969) comprobó que en la retina de embriones incubados 3-4 días, existen dos tipos de células en el neuroepitelio: todas incorporan timidina tritiada tras un tratamiento suficientemente largo (diez horas), pero algunas, entre el 5 y el 10%, presentan además afinidad por la plata. Sechrist realiza paralelamente un estudio a microscopía electrónica y relaciona la impregnación con la presencia de neurofilamentos en el citoplasma de estas células. Se trataría, por tanto, de células que realizan su último ciclo mitótico (*terminal mitotic cycle*) presentando ya ciertas características de diferenciación; describe células de este tipo tanto preparándose para la división como en plena mitosis y pares de células hijas. Las células mitóticas

impregnadas con plata corresponderían a los "neuroblastos apolares" de Cajal. El trabajo de Sechrist (1969) ha recibido apoyo experimental posterior en los de Bennett y Di Lullo (1985a,b), que mediante inmunohistoquímica encuentran un patrón semejante de localización de proteínas de neurofilamentos en la retina de embriones de pollo de la misma edad.

La diferenciación de las células ganglionares a partir de las ventriculares ha sido descrita en la retina de ratón por Hinds y Hinds (1974) confeccionando reconstrucciones de células a partir de cortes ultrafinos seriados. Proponen una secuencia en la que el primer signo de diferenciación es la separación del proceso escleral de la superficie ventricular, al desaparecer las uniones intercelulares que lo mantenían fijo en esa situación. Como esta separación ocurre en células postmitóticas en que el proceso vitreal no ha alcanzado la membrana basal, la célula presentaría la morfología típica de los "neuroblastos bipolares iniciales" descritos por Cajal (1929) y observados también por Sechrist (1969) en el pollo.

Estas formas transicionales entre células ventriculares y ganglionares proseguirán su diferenciación por la transformación del proceso vitreal en un cono de crecimiento axónico, que se orienta tangencialmente a la superficie vitreal de la retina y que presenta prolongaciones (filopodios y foliopodios).

El núcleo de la célula va migrando hacia la capa de células ganglionares, retrayéndose el proceso escleral hasta que desaparece. Mientras tanto, el axón se alarga y el cono pierde cualquier tipo de prolongaciones, apareciendo liso. Esta fase debe corresponder a los "neuroblastos bipolares" (Cajal, 1929) que según Sechrist (1969) también están presentes en la retina del embrión de pollo. Finalmente, los axones comienzan a agruparse en fascículos irregulares, aún antes de que los cuerpos celulares se dispongan en la capa de células ganglionares.

A la vez que se producen estos cambios en la morfología de la célula, se da una acumulación de los orgánulos en la zona yuxtannuclear. Después de realizar medidas de los diversos orgánulos, Hinds y Hinds (1974) concluyen que el incremento de orgánulos membranosos, sobre todo retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, descrito como típico en la diferenciación neuronal, es más aparente que real; aunque hay un ligero aumento, lo que sucede es más bien una acumulación de estas estructuras cerca del núcleo.

La secuencia anterior se estableció partir de la longitud del axón, de la migración de los centriolos y del cilio desde la superficie escleral hasta la zona de la futura capa de células ganglionares, y de la regresión del proceso vitreal. Considerando todos estos hechos en conjunto, se puede apreciar que no existe una coordinación completa; sobre todo aparece cierta variabilidad entre la emigración del cuerpo celular y la protusión del axón, o la existencia y longitud del proceso ventricular.

Para explicar esta variabilidad y el hecho de que algunas veces aparezcan pares de células hijas, tanto en semejante estado de diferenciación como con apariencia distinta, después de separarse, Hinds y Hinds proponen que la decisión de disparar la diferenciación puede darse tanto antes de la última mitosis (periodos S o G₂) como inmediatamente después de la mitosis (G₁). En las primeras, la orden afectaría a las dos células hijas, que por tanto tendrán el mismo destino; en el segundo caso, en las procesadas en G₁, la orden se da cuando ya se han separado las dos células hijas, y por tanto no seguirán obligatoriamente el mismo destino. Las células procesadas en S o G₂ iniciarán su diferenciación inmediatamente después de la mitosis, no desarrollando, pues, proceso escleral y las formas transicionales no lo presentarán. En las procesadas en G₁ sí se desarrolla el proceso ventricular y las células en diferenciación presentarán tanto un axón en crecimiento como un proceso ventricular más o menos considerable.

El trabajo de Prada y cols. (1981) corrobora en líneas generales el de Hinds y Hinds (1974), utilizando impregnaciones de neuronas en diferenciación según el método de Golgi en la retina del pollo.

3.2 Crecimiento de las primeras fibras ópticas

Poco después de la aparición de células diferenciadas en el borde vitreal se puede observar la presencia de las primeras fibras ópticas en el polo posterior de la retina, dirigiéndose hacia la fisura óptica (Goldberg y Coulombre, 1972; Halfter y cols., 1985).

El patrón de producción y expansión de las fibras es paralelo al de generación de las células postmitóticas descrito por Kahn (1973, 1974). Aunque este autor habla de una progresión radial de este proceso, Halfter y cols. (1985) señalan que existe una asimetría en la formación de la capa de fibras ópticas, tanto en el eje naso-temporal (más avanzada en la zona temporal) como en el dorso-ventral, diferencia ésta que se acentúa en el pollo debido al retraso que presenta el desarrollo de la retina ventral respecto a la dorsal.

Los primeros axones (fibras pioneras) crecen directamente hacia la fisura óptica y la alcanzan durante el tercer día de incubación. Abandonan la copa óptica inmediatamente dorsales a la fisura, zona del futuro disco óptico, y se disponen en el margen ventral del tallo óptico; alcanzan el quiasma durante el cuarto día de incubación. Hasta el día sexto no aparecen en el polo anterior del techo óptico las primeras fibras retinianas, y hasta el octavo no se las observa en el área central del techo. Estas primeras fibras se ramifican entonces e invaden la placa cortical del techo. Dos días después, se pueden encontrar sinapsis en el estrato óptico. La transmisión sináptica parece ser efectiva ya en el décimo día de

incubación (De Long y Coulombre, 1965; Rager, 1980; Thanos y Bonhoeffer, 1983; Navascués y cols., 1985).

Desde el inicio de su crecimiento, las fibras se asocian en fascículos. Los axones más recientes se disponen más vitrealmente que las fibras pioneras, en su recorrido por la retina. En la región del tallo, las fibras originadas antes se sitúan más cerca de la superficie ventral; las nuevas fibras que se van incorporando, lo hacen también por el margen ventral, de modo que van desplazando a las fibras iniciales hacia la parte más central del tallo (Rager, 1980; Silver y Sapiro, 1981).

3.3 Especificación de las células de la retina

Los axones de las células ganglionares han de realizar sus conexiones sinápticas con las células del techo de modo que se consiga una representación retinotópica en el techo, que haga funcional la vía óptica. Este proceso exige que los axones de las células ganglionares recorran la longitud de esta vía para establecer contactos con una célula o un grupo de ellas, muy determinado, dependiente de la localización en la retina de su soma neuronal. Sperry (1963) para explicar que en la regeneración del nervio óptico de vertebrados inferiores se recupera la funcionalidad, y tal vez también las conexiones sinápticas normales, afirma que cada célula posee una determinada etiqueta, que solo se corresponde con un número restringido de células con las que ha de establecer contactos. Sin embargo algunos autores discuten que la hipótesis de la quimioafinidad sea la única explicación de este fenómeno (Rager, 1980), y recientemente se ha puesto de manifiesto que las fibras embrionarias en crecimiento presentan características muy distintas que las fibras en regeneración, cuando se cultivan *in vitro* (Grant y Tseng, 1986).

Crossland y cols. (1974) han determinado que la "especificación" de las células ganglionares de la retina, es decir, el

que las fibras "adquieran" su destino en el techo, o "sepan" con qué células tectales han de establecer sinapsis, se da sobre los estadios HH11-12, coincidiendo con la salida del ciclo mitótico de las primeras células ganglionares (Kahn, 1973).

Las modificaciones que conducen a la especificación no se conocen. En *Xenopus laevis* algunos autores señalan que las uniones de tipo *gap* desaparecen a partir de la especificación (Dixon y Cronly-Dillon, 1972); otros afirman que lo que sucede es un cambio en la distribución de estas uniones (Hayes, 1976). En el embrión de pollo las uniones de tipo *gap* desaparecen a partir del día 7 de incubación, cuando todas las macroneuronas han salido del ciclo celular (Hayes, 1977). Este hecho da pie para sugerir que estas uniones tal vez constituyan canales de comunicación que pueden ofrecer una información posicional a la célula que va a comenzar a diferenciarse. Jacobson (1978) denomina a este mecanismo "de interacción celular", contrapuesto al "de líneas celulares", en que la especificidad sería heredada de la célula madre.

Basándose en la idea de la especificación por interacción celular, Rager (1980) y Bodick y Levinthal (1980) proponen sendas hipótesis sobre el desarrollo de la vía óptica que no precisan de la existencia de marcadores específicos en cada célula ganglionar para explicar la especificidad de sus contactos en el techo.

Bodick y Levinthal (1980), en pez cebra, afirman que la proyección retinotópica se mantiene como resultado de la combinación del patrón de proliferación y el de diferenciación. Este patrón se puede formar mediante señales entre las células, de modo que aquellas que están desarrollando su diferenciación (por ejemplo, crecimiento axónico) indiquen a otras que la comiencen. Los autores describen grupos de células ganglionares ("racimos") cuyos axones forman fascículos; en éstos, los más recientes crecen a lo largo de los axones producidos antes. A medida que los axones avanzan hacia la fisura óptica, los

fascículos se reúnen con otros, siempre procedentes de células cercanas, para dar lugar a haces. Nunca se forman haces por fascículos situados en regiones diferentes de la retina. Con esta organización, las coordenadas polares de la retina tendrán su proyección en las coordenadas rectangulares del nervio óptico, manteniéndose la relación posicional.

La hipótesis que propone Rager (1980) se basa en que el grado de ordenación de las fibras retinianas en la vía óptica durante el desarrollo y en el adulto, es suficiente para justificar la mayor parte del mapa retinotópico. No se precisa reordenación alguna de las fibras (pág. 62).

Las células ganglionares se originan inicialmente en el centro de la retina y posteriormente se extienden hacia la periferia; de esta forma, cada célula ganglionar es originada en un momento y lugar particulares, que le proporcionan una "etiqueta" (coordinada espacio-tiempo). Rager también encuentra "racimos" de células ganglionares estrechamente apuestas, aunque no describe uniones intercelulares entre ellas.

La formación del axón debe seguir el mismo curso temporal en todos los casos, lo que bastaría para que cada axón mantuviera sus relaciones de vecindad. Las primeras fibras que alcanzan la fisura óptica ocupan la posición más accesible, esto es, la parte ventral del tallo; las que lo hacen a continuación se sitúan más anterior y posteriormente, dando lugar a una zona de fascículos en forma de media luna. Los axones de las células ganglionares más periféricas, que discurren más vitrealmente, se van disponiendo también ventralmente, originando "medias lunas" adicionales. Por tanto, la organización en "anillos" de la retina pasa a ser de "medias lunas" en el tallo; posteriormente, esta disposición se cierra por diversos factores, como son la eliminación de células neuroepiteliales del tallo. De este modo se restablece la organización retinotópica (Rager, 1983).

La conexión de las fibras ópticas con las células correspondientes del techo las explica Rager suponiendo para las neuronas tectales una etiqueta "espacio-tiempo" determinada por su situación y momento de producción, de forma que, al llegar el axón procedente de la retina, la primera célula tectal que encuentra en su trayecto con la que pueda establecer contactos está situada en el lugar específico correspondiente. La ordenación del haz de fibras que llega al techo y el proceso de maduración de las células tectales consigue, de este modo, mantener la representación retinotópica.

Finalmente se realiza el acoplamiento de los dos sistemas mediante competencia y degeneración, eliminándose así las fibras aberrantes y los axones que no han establecido contacto sináptico.

Para Rager (1980), por tanto, sólo se precisa la existencia de canales de conducción preneurales que guíen las fibras a través del tallo, quiasma y tracto óptico.

La organización retinotópica así conseguida no estaría topográficamente ordenada punto por punto, sino que existe cierta variabilidad en las conexiones compatible con la funcionalidad del sistema. Si cada célula ganglionar estuviese determinada genéticamente para conectar con una neurona tectal, tal cantidad de información podría exceder el contenido del genoma; es más sencillo suponer que, en gran parte, la formación de las proyecciones durante el desarrollo depende más bien de factores extrínsecos.

3.4 Estudios sobre el inicio del desarrollo de la vía óptica

Diversos autores han investigado el crecimiento inicial de las fibras ópticas y del ambiente tisular en que lo hacen.

Suburo y cols. (1979), utilizando el microscopio electrónico de barrido, describen el borde vitreal de la retina en estadios en que no encuentran axones, es decir, preaxónicos (HH16-18), y en fases en que ya hay fibras ópticas aparentes (HH22-24). En el primer caso la superficie vitreal está formada por expansiones celulares estrechamente apuestas; más apicalmente (más hacia la superficie escleral) existen espacios extracelulares que en corte tangencial aparecen sin orientación definida. En los estadios HH22-24, la superficie vitreal tiene una estructura semejante a la descrita. Inmediatamente por debajo aparece una capa de fibras ópticas que discurre paralela a la superficie y organizada en fascículos. Los fascículos son más gruesos en la parte central de la retina y decrecen gradualmente hacia la periferia. No encuentran axones aislados, lo que les lleva a pensar que desde el inicio del crecimiento, los conos de crecimiento se disponen sobre fibras originadas anteriormente.

A los 6-9 días de incubación, los fascículos ocupan la mayor parte de la superficie vitreal; entre ellos se disponen prolongaciones celulares que en corte tangencial de la retina aparecen orientadas en filas que apuntan hacia la fisura.

Basándose en estas observaciones, excluyen que en la retina exista una disposición "geométrica" de espacios intercelulares basales como un factor determinante de la orientación de la migración axónica. La aparición de una orientación de los espacios en forma de túneles la atribuyen a un fenómeno posterior, o tal vez coincidente con la migración del axón. Estos "túneles" estarían limitados por células postmitóticas -células de Müller-. Las células neuroepiteliales, premitóticas, sufren durante el ciclo celular una serie de cambios que impondrían una continua remodelación de los espacios. De forma alternativa, proponen que tal vez los cambios de adhesividad que sufren las células según su estado pre- o postmitótico, puede favorecer el crecimiento de las fibras hacia el centro, ya que en esta zona central aparecen las primeras células postmitóticas.

En discrepancia con estas observaciones, Krayanek y Goldberg (1981), describen espacios extracelulares en el borde vitreal de la retina que forman una red, más o menos ramificada y orientada principalmente hacia la fisura ya en los estadios HH16 y 17. Explican las diferencias con Suburo y cols. (1979) manifestando que la preparación de muestras para microscopía de *scanning* puede conllevar bastante distorsión.

En el estadio HH18 encuentran axones dentro de los espacios descritos anteriormente, que a veces forman pequeños fascículos, y presentan uniones de tipo *adherens* con los procesos vitreales de las células neuroepiteliales. Esta observación permite sugerir que los primeros axones son guiados por interacciones químicas específicas a través de los espacios preexistentes, que ya poseen cierta orientación. A los 6 días de incubación, los fascículos han aumentado y aparecen en la parte más vitreal de la retina, limitados por la lámina basal y los piés terminales de lo que ya pueden ser células de Müller. Utilizando un fijador hipertónico, se observa como los espacios extracelulares aumentan y los axones se separan unos de otros, mientras que los conos de crecimiento siguen fijamente unidos a los piés terminales, lo que demuestra una adhesión específica.

"Túneles" o "canales" extracelulares han sido descritos en la retina del ratón inmediatamente antes del crecimiento de los axones (Silver y Sidman, 1980). Los espacios aparecen en la zona marginal de la retina y tallo óptico. En la región del disco óptico forman conjuntos de túneles largos, interconectados y orientados en la dirección del tallo, mientras que en la periferia se forman conductos radiales, ciegos en su lado más alejado del disco. Las fibras discurrirán por estos canales previamente formados. Los axones no pueden dirigirse hacia los bordes de la retina, por estar cegados los conductos y se ven obligados a dirigirse al disco óptico, por donde abandonaran la retina embrionaria.

En ratones mutantes, con aplasia congénita del nervio óptico, Silver y Robb (1979), observan una disminución apreciable de estos espacios intercelulares. Aunque se desarrollan células ganglionares con axón, estos adoptan un curso irregular y no logran abandonar el ojo, quedando entre la retina neural y el epitelio pigmentario.

En un estudio posterior, Silver y Sapiro (1981) han puesto de manifiesto que estos espacios extracelulares no se ordenan formando túneles en el tallo óptico de *Xenopus laevis* -que tampoco los presenta en la retina (Krayanek y Goldberg, 1981)-, ni en el del pollo; tampoco se mantiene la ordenación en túneles en la parte proximal del tallo, más cercana al diencefalo, en los mamíferos.

Halfter y Deiss (1984) realizan cultivos de retinas extendidas procedentes de embriones de 4, 5 o 6 días de incubación (E4, E5 y E6 respectivamente), para estudiar el crecimiento de las fibras ópticas. Comprueban que la mayoría de las fibras en retinas E4 y E5, o todas ellas, en las E6, se orientan y dirigen correctamente. La exactitud de la orientación aumenta claramente con el desarrollo de un patrón axonal definido, indicando que debe haber conducción de axones recién formados sobre otros preexistentes. Sin embargo, además de este fenómeno, deben concurrir otros en el crecimiento de los axones. Realizan un tratamiento enzimático con colagenasa y con tripsina de las retinas extendidas, que no desorganiza el patrón de axones previamente desarrollado, pero que modifica el crecimiento de los axones que aparecen después del tratamiento; éstos forman una trama desordenada sobre la capa de fibras ópticas. El tratamiento destruye la superficie vitreal, dejando visible la capa de fibras y alterando los pies terminales de las células que normalmente recubren la superficie vitreal. Los autores relacionan el crecimiento anómalo con la destrucción de canales que lo orienten. De hecho, pequeños cortes en la superficie vitreal permite que algunas fibras salgan de la retina y crezcan sobre la lámina basal sin ninguna orientación.

En retinas procedentes de embriones E4 y E5 encuentran dos tipos de fibras orientadas amormalmente. Las primeras son capaces de atravesar la fisura óptica y crecer hacia la periferia en la parte opuesta de la retina; parece deberse a que la fisura aún no está suficientemente desarrollada para impedir su paso. El segundo tipo son fibras que crecen directamente hacia los bordes de la retina; éstas aparecen sobre todo en regiones no centrales, donde no hay un patrón preexistente de fibras.

Estos hallazgos les llevan a postular que son diferentes los mecanismos responsables de la dirección (por ejemplo, canales, fibra preexistentes...) y de la orientación o sentido del crecimiento axónico. Además de los factores extrínsecos, señalan que pueden intervenir algunos factores intrínsecos a la fibra, como son la protusión del axón orientado siempre hacia la fisura, y la tendencia inherente del axón a crecer en línea recta.

Halfter y cols. (1985) han confirmado, mediante impregnaciones *in toto* de retinas, que la direccionalidad no depende de interacciones axón-axón o axón-células ganglionares; no se elabora un patrón ordenado de polaridad a partir de un crecimiento inicial del axón, más o menos desorganizado, y corrección posterior. La asimetría del crecimiento inicial de los axones, siempre orientados hacia la fisura, en las diversas zonas, parece descartar que la protusión del axón sea orientada a partir de un agente quimiotáctico difusible. Sin embargo, sí se puede explicar por la respuesta del axón a marcadores no difusibles que condicionan desde el principio su crecimiento, o por la existencia de una polaridad intrínseca en las células ganglionares que determinase que el axón se origine correctamente orientado. Apoyándose en que pequeñas lesiones que causan pérdida de presión intraocular afectan al patrón de fibras ópticas, proponen que el crecimiento del axón es dirigido inicialmente por el stress mecánico a que está sometida la célula y el cono de crecimiento adherido al sustrato extracelular. La tensión conduce a la orientación del citoesqueleto, y al posterior desarrollo del axón según esta orientación.

Thanos y cols. (1984) han puesto de manifiesto que la inoculación de antisuero anti-NCAM en la copa óptica del embrión de pollo durante el cuarto día de incubación, produce alteraciones en el desarrollo normal del nervio óptico. Al teñir selectivamente axones de células ganglionares de determinadas zonas de la retina con isotiocianato de rodamina, trazador que difunde por toda la célula, observan que, aunque no hay anomalías en el trayecto de las fibras en el interior de la retina, se producen perturbaciones cuando invaden la fisura: algunos axones se extienden por la fisura y abandonan la retina por posiciones ectópicas, y otros no consiguen dejar la copa óptica. Esta alteración del nervio óptico persiste durante toda la vía óptica, de forma que en el techo aparecen axones que llegan a zonas que no son su lugar normal de proyección. En el caso en que se tiñan células ganglionares de la retina central, la zona que da lugar a fibras pioneras, se puede apreciar como algunas fibras corrigen su curso mediante bruscos giros (de unos 90°) a lo largo del eje dorsoventral del techo, alcanzando su destino normal. Los axones procedentes de la retina periférica no muestran esta capacidad de corregir su trayectoria. Los autores concluyen que la NCAM está implicada en las interacciones entre los axones en la vecindad del ojo, cuando abandonan la retina. En ausencia de fibras en el techo óptico, las fibras iniciales son capaces de corregir su curso, seguramente reconociendo señales específicas; las fibras posteriores deben seguir principalmente el curso de las preexistentes, y no deben ser capaces de reconocer la señalización tectal.

En un trabajo posterior, Silver y Rutishauser (1984) utilizan también el anticuerpo anti-NCAM para determinar la distribución de esta molécula en el desarrollo del sistema visual del pollo. El anticuerpo aparece confinado al margen vitreal del polo posterior de la retina, margen venral del tallo óptico, borde externo del quiasma y presunto tracto óptico y pared rostral del techo. Por tanto, se reproduce lo que va a ser poco después el camino de las fibras ópticas. A nivel celular, el anticuerpo aparece unido a los pies terminales de las células neuroepiteliales y a las fibras en crecimiento. También realizan

perturbación del desarrollo del crecimiento mediante inoculación de anti-NCAM en la copa óptica de embriones de 3,5 días de incubación. Veinticuatro horas más tarde comprueban que en la parte inicial del tallo los axones se disponen en la región dorsal en vez de ventral, y que más adelante recuperan su situación normal, de forma que al alcanzar el quiasma la distribución de los fascículos es semejante en los tratados y no tratados. El hecho que los fascículos no sufran alteración en su recorrido intraretiniano lo relacionan los autores con la formación de canales por la orientación de las células neuroepiteliales, proporcionando una guía no solo de tipo químico sino también mecánica.

Navascués y cols. (1985) han podido comprobar que la entrada de los primeros axones en el tallo óptico coincide con la aparición de mitosis en el margen ventral del tallo. Estas divisiones celulares darán lugar a glioblastos primitivos que se transformarán en glioblastos marginales; éstos a su vez sufren mitosis radiales y producen glioblastos internos que continúan proliferando. Por tanto, la señal que desencadena la diferenciación glial en el tallo puede estar ligada a la presencia de axones.

Recientemente se ha postulado que las primeras fibras que alcanzan el techo óptico procedentes de la retina pueden cambiar durante el desarrollo su lugar de conexión sináptica (Mc Loon, 1985). Este hecho, junto con la corrección de la dirección del crecimiento de fibras pioneras en el techo, manifiestan que deben existir mecanismos específicos en la formación de la proyección retinotectal, pero no se puede descartar que los factores "ambientales y epigenéticos" (Rager, 1983) tengan un papel preponderante en el desarrollo de algunos tramos, al menos, de esta vía.

4.-MUERTE CELULAR EN EL DESARROLLO

A pesar de que en un principio se discutió la existencia real de procesos de muerte celular en el tejido vivo, atribuyendo las observaciones a artefactos producidos por la fijación o la histólisis previa a ésta, la degeneración celular es un proceso generalizado, sobre todo en el desarrollo embrionario. Aunque pueda resultar extraño, un organismo que está "construyéndose" a base de un coste energético elevado, "derrocha" una apreciable cantidad de energía al destruir estructuras celulares y macromoléculas complejas previamente sintetizadas (Saunders, 1966). Procesos de este tipo aparecen frecuentemente implicados en la morfogénesis, en la eliminación de estructuras propias del embrión, que no estarán presentes en el adulto, en el control del número de células, y en el acoplamiento de sistemas que se han desarrollado independientemente, sobre todo en el sistema nervioso.

Para distinguirla de la muerte originada en los procesos patológicos, por la acción de agentes nocivos, se le denomina muerte celular fisiológica, y por presentar casi siempre un patrón muy característico y determinado, predecible, se habla de muerte celular programada.

4.1 Clasificación de la muerte celular

Glücksman (1951) intentó clasificar la muerte celular que se produce en el desarrollo atendiendo a los procesos en que interviene.

1) Muerte celular filogenética: Se produce en la regresión de órganos o tejidos propios del estado embrionario, o en la eliminación de estructuras de tipo vestigial. Procesos de degeneración incluidos en este apartado, están muy extendidos en las especies que sufren metamorfosis, cambios drásticos durante su ontogenia. Por ejemplo, en los insectos se produce la eliminación de los órganos y tejidos larvarios durante la fase de pupa. En los vertebrados está presente en la regresión de de las branquias y la cola en los anuros. En los vertebrados superiores, al no presentar metamorfosis, son más escasos los ejemplos; sin embargo, corresponde a este tipo la regresión del pronefros y el mesonefros.

2) Muerte celular morfogenética: Contribuye a la aparición de la forma general del órgano y al control de su tamaño; también interviene en la regulación del número de células, mediante el balance proliferación/degeneración. Se producen procesos de este tipo en numerosas estructuras, como en el corazón en el pollo (Hurlé y cols., 1977), en la morfogénesis de las extremidades, principalmente en la delimitación de los dedos en la placa digital, (Saunders y cols., 1962; Ballard y Holt, 1968; Ferenández-Terán y Hurlé, 1984), o en la fusión del paladar secundario (Greene y Pratt, 1976)... También debe intervenir en la remodelación de la vesícula y copa óptica inicial (Silver y Hughes, 1973; García Porrero y cols., 1984b).

3) Muerte celular histogenética: Interviene en la diferenciación de órganos y tejidos, como, por ejemplo, el cartilago y el hueso. Sin embargo, el ejemplo más patente de este tipo de muerte celular se encuentra en el desarrollo del sistema nervioso. Desde Cajal (1928), se piensa que aquellas neuronas que no logran establecer

conexiones apropiadas, degeneran. Este hecho ha ido comprobándose mediante diferentes técnicas experimentales.

La presente clasificación, como es natural, se refiere a aquellos casos en que el papel de la muerte celular está bien definido, lo que no ocurre siempre, como es el caso de la retina en desarrollo.

4.2 Características de la muerte celular

Los procesos citológicos que aparecen como manifestación de la muerte celular presentan bastante semejanza en los distintos órganos, e incluso, en las diferentes especies. En este hecho se basan Kerr y cols. (1972) para proponer la introducción de un nuevo término, *apoptosis*, que designe los procesos de muerte celular controlada o fisiológica, ya sea en el desarrollo embrionario, en la renovación normal de los tejidos adultos, o también en la degeneración espontánea que aparece en algunas neoplasias, sin ningún tratamiento terapéutico. La apoptosis se diferencia de la necrosis coagulativa, la cual no interviene en el control de la población celular y cuya causa es un daño directo a la célula inferido por agentes físicos o químicos que alteran gravemente su fisiología; los procesos de necrosis suelen producir inflamación, mientras que esto no ocurre en la apoptosis.

Kerr y cols. (1972) señalan que la apoptosis afecta siempre a células concretas, nunca a extensas masas celulares. Histológicamente se pone de manifiesto por la formación de fragmentos citoplásmicos que contienen restos picnóticos del núcleo. Consideran dos estadios en el proceso: la formación de los "cuerpos apoptóticos" y la degradación de éstos por otras células.

Los primeros signos apreciables del proceso de apoptosis son la condensación tanto del citoplasma como del carioplasma, y la pérdida de uniones con las células vecinas. La cromatina se condensa sobre la

envuelta nuclear y, en fases más avanzadas, suele aparecer como dos casquetes picnóticos en los polos de una estructura redondeada. En esta fase aún pueden encontrarse orgánulos aparentemente intactos. Rápidamente comienza la fragmentación de la célula, que conduce a la formación de los cuerpos apoptóticos, que pueden contener únicamente citoplasma, o contener también material nuclear totalmente condensado.

Los cuerpos apoptóticos serán fagocitados por células vecinas. En el desarrollo embrionario, frecuentemente se trata de células indiferenciadas, semejantes a las que han degenerado; así sucede, por ejemplo, en la retina y cristalino del pollo (García Porrero y Ojeda, 1979; García Porrero y cols., 1979), o en el miocardio, también del pollo (Hurlé y cols., 1978).

Chu-Wang y Oppenheim (1978) realizan un estudio detallado de la muerte celular de motoneuronas en el embrión de pollo. Diferencian los tipos I y II de degeneración. El tipo I se caracteriza por la aparición de ribosomas libres que se han separado del retículo endoplásmico, fragmentación del aparato de Golgi y vacuolización de las mitocondrias. En el tipo II se aprecia una llamativa dilatación del retículo, envuelta nuclear y aparato de Golgi, que acaban fragmentándose en pequeñas vesículas; hasta las últimas fases del proceso se encuentran polirribosomas y ribosomas asociados a las vesículas membranosas. Finalmente, en ambos casos, se rompe la envuelta nuclear y se condensa la célula, dando lugar a un único cuerpo, o fragmentándose en varios. Estos autores concluyen que la degeneración tipo I se debe a la detención de la síntesis protéica y que la tipo II se origina por alteraciones de las membranas celulares.

Este estudio ultraestructural, al igual que otros del mismo tipo (revisión en Kerr y cols., 1972), o de tipo histoquímico (Ballard y Holt, 1968), manifiestan que no hay aumento significativo de los lisosomas en las células que aparecen en las distintas fases de muerte celular. Por tanto, no parece que en estos casos se produzca autólisis de las células mediante la liberación al citoplasma de sus enzimas

líticas. Otros autores, sin embargo, afirman que sí se produce autólisis en la degeneración de células embrionarias (Hinchliffe y cols., 1981). En la degeneración que ocurre durante la morfogénesis del cristalino García Porrero y cols. (1984a), describen lugares de actividad fosfatasa ácida elevada dentro de células con vacuolas autofágicas; no obstante, la aparente ausencia de fosfatasa ácida en las células en degeneración inicial o en el interior de los fragmentos, impide concluir que sea éste el mecanismo de degeneración. Saunders (1966) señala que únicamente hay un incremento drástico de la actividad hidrolasa en los casos caracterizados porque no intervienen células fagocíticas en la digestión final, como en la histólisis del músculo larval en algunos lepidópteros (Lockshin y Williams, 1965).

En un intento de determinar a nivel bioquímico, el mecanismo que desencadena la degeneración celular, Webster y Gross (1970) estudiaron el efecto de diversas drogas sobre la distribución e intensidad de la degeneración en embriones de pollo. Comprobaron que los agentes que afectan la estructura del DNA, sobre todo por la producción de entrecruzamientos (mitomicina C, mostazas de nitrógeno, hidroxihurea...), dan lugar a un incremento notable de la degeneración. Al observar estas células con microscopía electrónica, aparecen morfológicamente semejantes a las células en degeneración de los embriones no tratados. Otros agentes químicos (actinomicina D, naranja de acridina, colchicina...), no producen un aumento de la muerte celular. Aunque realizan experiencias para determinar el porcentaje de DNA con entrecruzamientos en zonas en que se dará degeneración y en otras en que no la habrá, no logran establecer diferencias significativas.

Otros autores deducen de la observación de imágenes de muerte celular inicial con dos núcleos, que este proceso puede originarse por alteraciones del ciclo mitótico (García Porrero y cols., 1979).

Recientemente se ha puesto de manifiesto que en la muerte celular por células K (*killing cells*) se dan las características de la apoptosis (Stacey y cols., 1985). Por tanto, parece que la unión de las células K a sus células blanco, es capaz de activar un programa de autodestrucción, sin llevar implicadas lesiones de la membrana plasmática.

4.3 Control de la muerte celular

Los factores que determinan la activación del programa de autodestrucción parecen ser de diverso tipo, y no son bien conocidos. Por ejemplo, la elevada densidad celular en una estructura determinada puede ser apreciada por las células de esa población por las tensiones que esto origina entre las células, por la producción excesiva, superior a un cierto umbral, de alguna de las sustancias que se liberan en el metabolismo celular, o por otros factores, ante los que la célula responde degenerando. Otra alternativa es suponer que la señal viene determinada por interacciones específicas con determinadas células. En este sentido, Fernández-Terán y Hurlé (1984) han demostrado que, en la reducción de la muerte celular en la zona interdigital del embrión de pollo que produce la administración de verde Jano B, existe una alteración que afecta a la interfase epitelio-mesénquima; los autores proponen que son estas modificaciones lo que altera el programa normal de degeneración.

Los estudios de mutantes de diferentes especies han puesto de manifiesto que algunas alteraciones morfológicas pueden tener su origen en un patrón anormal de muerte celular. Así, un exceso de muerte celular en la zona caudal del embrión de pollo conduce a la ausencia de las vertebrae correspondientes y de las estructuras asociadas (Saunders, 1966). También se han encontrado anomalías relacionadas con alteraciones en la muerte celular en el desarrollo del ojo en roedores (Silver y Hughes, 1974; Theiler y cols., 1976; Silver y Robb, 1979).

Estos datos permiten considerar la existencia de factores genéticos que controlen la muerte celular. En organismos inferiores aparecen ejemplos especialmente claros de esta muerte celular programada genéticamente. En el nematodo *Caenorhabditis elegans* se produce la degeneración de una de las dos células hijas producto de la división, en dos mitosis consecutivas, de una línea celular de neuronas; la célula que degenera es en ambos casos la situada posteriormente respecto al eje longitudinal del animal (Robertson y Thomson, 1982).

En otros casos se demuestra que el inicio de la muerte celular, o el patrón de células afectadas, puede estar determinado por factores hormonales. En este caso, las zonas afectadas son más amplias y hay una gran pérdida de células. Ejemplos de esta regulación, son los cambios que suceden en la metamorfosis; así, la ecdisona provoca en los insectos la destrucción de los tejidos internos de la larva y no afecta a aquellos órganos que permanecen en el estado adulto. En la rana, los diversos tejidos y zonas de la larva se hacen competentes para responder a la hormona, la tiroxina en este caso, en ciertos momentos del desarrollo, de forma que se produce la histolisis de la aleta ventral, luego de la cola, la fenestración del opérculo, etc. Tratamientos con niveles más altos y continuados de tiroxina, se traducen en una histolisis más extensa. En los vertebrados superiores también existe muerte celular claramente controlada por factores hormonales; por ejemplo, los conductos de Müller de embriones de pollo cultivados *in vitro* en presencia de hormona masculina, sufren regresión, mientras que los conductos de Wolff cultivados conjuntamente no se afectan.

Saunders (1966) también se refiere a un posible control por el "ambiente tisular". La degeneración en la "zona necrótica posterior" (PNZ) del esbozo del ala del embrión de pollo, se evita injertando esta porción de mesodermo en otra zona de mesénquima, o injertando junto a la PNZ tejido procedente de la zona dorsal del esbozo alar. Por tanto, el cambio de "ambiente" provoca la anulación de la orden de degeneración.

4.4 Muerte celular en el desarrollo del sistema nervioso

Aunque los fenómenos de degeneración celular también aparecen frecuentemente en la morfogénesis del sistema nervioso, por ejemplo, en la fusión de la placa neural para formar el tubo neural (Schlüter, 1973), la muerte celular se asocia principalmente con su histogénesis y diferenciación. Son abundantes los ejemplos en que parece haber una relación entre la degeneración y la disponibilidad de células blanco con las que establecer contactos. Este hecho ha sido estudiado en las motoneuronas de la médula (O'Connor y Wyttenbach, 1974; Hamburger, 1975; Chu-Wang y Oppenheim, 1978), en el desarrollo del sistema visual (Rager y Rager, 1978), en el ganglio ciliar (Pilar y Landmesser, 1976) y en las motoneuronas faciales (Ashwell y Watson, 1983), entre muchos otros casos.

Eliminando las zonas periféricas que habrían de ser inervadas por estas neuronas, se produce un incremento de la pérdida de neuronas (O'Connor y Wyttenbach, 1973; Pilar y Landmesser, 1976; Chu-Wang y Oppenheim, 1978). De forma alternativa, incrementando las zonas blanco de inervación, se puede prevenir la degeneración, como han demostrado Holliday y Hamburger (1976) injertando un esbozo de pata supernumerario en embriones de pollo; en el lado operado se produce una gran reducción de la muerte celular entre las motoneuronas de la médula, en comparación con la que aparece en el lado contralateral, no operado.

Estos procesos parecen actuar en el momento de establecer conexiones sinápticas. La ablación del techo óptico no afecta a la citogénesis y diferenciación inicial de las células ganglionares de la retina en el pollo, pero a partir del día 11 de incubación, cuando deberían haber establecido conexiones sinápticas, degeneran masivamente (Hughes y La Velle, 1975). De forma semejante, la extirpación de la copa óptica inicial no modifica la neurogénesis del techo, hasta el citado día 11 en que en el desarrollo normal se pueden encontrar conexiones retino-tectales (Kelly y Cowan, 1972). Estos hechos plantean que la

supervivencia no depende únicamente del establecimiento de aferencias, sino también de las eferencias que recibe la célula (Clarke, 1985). La importancia de este tipo de mecanismos, no sólo a nivel ontogenético, sino probablemente también filogenético, ha sido puesta de manifiesto por Katz y Lasek (1978).

Todos estos trabajos sugieren que el establecimiento de conexiones sinápticas adecuadas puede prevenir la degeneración de las neuronas. Tal vez se dé el transporte, desde la conexión hasta el soma, de señales moleculares que bloqueen el proceso de degeneración: estas señales faltarían si no se establece la sinapsis, o si ésta es inespecífica, y se produce la degeneración (Young, 1984).

En este sentido, se ha comprobado que diversos factores tróficos, además del NGF, estimulan la supervivencia de las neuronas en cultivo (revisión en Berg, 1982). Los experimentos realizados *in vivo*, en los que, después de la extirpación de extremidades se intenta evitar la degeneración de motoneuronas, mediante la administración de NGF, no han dado resultados concluyentes, habiendo cierta discrepancia entre los autores (Hamburger y Yip, 1984; Straznicky y Rush, 1985).

5.-MUERTE CELULAR EN EL DESARROLLO DEL OJO

Las primeras observaciones de procesos de muerte celular en el desarrollo del ojo descritas son las de Von Szily en 1912, que describe células necróticas en su trabajo sobre la formación del órgano de la visión en el conejo. Desde entonces se han realizado estudios en diferentes órdenes de vertebrados: como anfibios (Glücksman, 1951), mamíferos, principalmente roedores (Glücksman, 1951; Silver y Hughes, 1973, 1974; Theiler y cols., 1976; Silver, 1976; Young, 1984, entre otros), y también en aves (Hughes y La Velle, 1975, Hughes y Mc Loon, 1979; García Porrero y Ojeda, 1979; Schook, 1980a,c; García Porrero y cols., 1984b).

En el pollo se han centrado algunos estudios en los procesos de degeneración asociados a la formación del cristalino: fusión de las paredes del poro del cristalino y desprendimiento del ectodermo cefálico del que deriva (García Porrero y cols., 1979; Schook, 1980d; García Porrero y cols., 1984a).

Estos trabajos han puesto de manifiesto que existe bastante diversidad en los patrones de muerte celular en los diferentes órdenes de vertebrados. Así, Glücksmann (1951) compara estos fenómenos en anfibios y mamíferos. En los primeros, concretamente en *Rana temporaria*, no aparece muerte celular durante la morfogénesis de la retina; sin embargo posteriormente aparecerán tres oleadas de muerte celular durante la diferenciación: en la capa de células ganglionares, y en las capas nucleares interna y externa, coincidiendo con la constitución de cada una de estas capas. En el ojo de mamíferos y aves, sí aparece muerte celular en el periodo morfogenético.

5.1 Muerte celular morfogenética

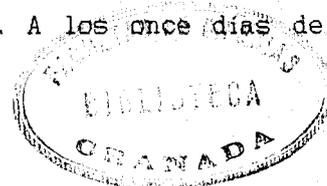
En la morfogénesis del ojo en los roedores se produce abundante muerte celular. Silver y Hughes (1973), distinguen hasta nueve zonas de degeneración entre los días 10-13 de gestación en la rata. En el primer día considerado (día 10), las células muertas son escasas y están dispersas por toda la vesícula y tallo óptico. En el día 11 -que coincide con el establecimiento de la placoda del cristalino- ya hay tres zonas de degeneración: una en el ectodermo alrededor de la placoda del cristalino, otra en la inserción del tallo en el diencéfalo, en su región rostral, y, la última, en la zona ventral de la vesícula óptica. En el transcurso de este día 11 se produce la invaginación de la vesícula y de la placoda del cristalino; el patrón de muerte celular sigue siendo semejante, aunque ha aumentado el número de restos. En el día 12 el primordio ocular ya está constituido como copa óptica; continúa habiendo una intensa degeneración en la parte ventral, pero ahora con dos zonas diferenciadas, una en la parte ventral del tallo y otra en la vesícula, dorsal al tallo. La muerte celular también afecta al epitelio pigmentario contiguo a esta zona de retina. En el día 13 de gestación desaparecen casi todas las zonas de muerte celular; en la retina y epitelio pigmentario, las células muertas se concentran a ambos lados de la fisura que acaba de formarse.

La relación de estos procesos de muerte celular con la morfogénesis no es clara. En el trabajo reseñado anteriormente, Silver y Hughes indican que la muerte celular puede servir para retardar o inhibir la invaginación de aquellas zonas en donde se produce, para integrar la serie de invaginaciones que moldean el esbozo óptico; también señalan que puede servir para la orientación del cristalino.

El estudio de mutantes con desarrollo anormal del ojo ha puesto de manifiesto que hay modificaciones en el patrón normal de muerte celular.

Silver y Hughes (1974) estudian una raza de ratón que presenta microftalmia (10% de los ratones) o anoftalmia (90%). La primera diferencia en el desarrollo frente a los individuos normales aparece a los nueve días y medio de gestación, cuando se produce la expansión de la vesícula óptica hacia el ectodermo, desplazando el mesénquima circundante. Algunas células mesenquimales quedan atrapadas entre la vesícula y el ectodermo; estas células degeneran en el individuo normal y sus restos son eliminados por células neuroepiteliales. Sin embargo, en los mutantes estas células no degeneran y separan el ectodermo y la vesícula, de forma que no hay contacto entre ellos. Este hecho debe ser la causa de que no se dé la inducción del cristalino, o que esta sea muy reducida. En aquellos embriones en que el cristalino alcanza una dimensión mínima, el desarrollo continúa, habiendo invaginación de la copa óptica; sin embargo, la fisura óptica nunca llega a formarse y no se aprecia muerte celular normal en el neuroepitelio de la retina.

Theiler y cols. (1976) estudian el desarrollo de ratones con retardo ocular (or^{-1}). Estos mutantes presentan ojos de tamaño reducido, capas retinianas anormales, y no poseen nervio óptico. Aunque a los diez días de gestación la vesícula óptica es normal y la distribución de células muertas es semejante a los controles normales, doce horas más tarde se puede apreciar una brusca disminución de las células muertas, mientras que en los individuos normales aumentan. A los once días de



gestación se observan expansiones de la capa neuroepitelial, que llegan a bloquear la fisura coroidea. En el día 12, los restos aparecen restringidos al tallo óptico, en su zona de inserción con la retina. Se aprecia que hay crecimiento de fibras ópticas y que empiezan su marcha hacia el tallo, pero no llegan a entrar en él.

Esta misma raza or^J la utilizan Silver y Robb (1979). Afirman que ya a los diez días de gestación la muerte celular está ausente de la retina neural, aunque aparece en otras zonas del sistema nervioso. Se produce la invaginación de la retina ventral para dar lugar a la fisura, pero ésta es anormal: sus márgenes se solapan y la hendidura, en vez de quedar abierta, queda constreñida; los autores atribuyen este fenómeno al exceso de células en los mutantes. En esta zona no aparecerá degeneración hasta el día 12, cuando la fisura comienza a cerrarse; sin embargo, la muerte celular está ausente de la retina dorsal.

Estos mismos autores señalan que en el día 10 es aparente, tanto en la retina de mutantes como de los controles, una gran proporción de espacio extracelular, circunscrito al margen vitreal de la zona posterior de la retina. A partir de este día hay un incremento notable de su extensión, de forma que también se aprecia abundante espacio extracelular en el tallo. En los mutantes, sin embargo, los espacios se reducen, hasta un 90% respecto del de los controles. En los individuos normales los espacios son invadidos por fibras ópticas; en los ratones or^J se produce la diferenciación de células ganglionares y el crecimiento axónico, pero las fibras siguen un curso irregular y no consiguen salir de la retina. Ante estas observaciones, los autores proponen dos funciones de los procesos de degeneración celular en el desarrollo del ojo: la regulación y extensión de los movimientos morfogénéticos, principalmente de la invaginación, y permitir la formación de canales extracelulares para el crecimiento de fibras.

En la retina del embrión de pollo, las descripciones de García Porrero y Ojeda (1979) y de Schook (1980a,c) coinciden en

general con lo descrito en mamíferos. Sin embargo, existen algunas diferencias en zonas concretas, tal vez derivadas de la diferente morfología de la copa óptica en aves y mamíferos.

García Porrero y cols. (1984) describen, mediante técnicas de tinción *in vivo* con rojo neutro tres zonas de muerte celular en la retina:

-En la parte ventral del tallo en su inserción al diencéfalo, entre los estadios HH16-19; Schook (1980c) afirma que la degeneración en esta zona comienza en el estadio HH15, mientras que Navascués y cols. (1985) señalan que no aparece muerte celular en el tallo óptico en el estadio HH18.

-Parte ventral del polo posterior de la retina, entre los estadios HH14-19; Schook (1980c) la describe con degeneración ya en el estadio HH13, antes de la invaginación de la vesícula óptica.

-Región dorsal de la copa óptica, en el borde que limita con el cristalino, entre los estadios HH15-19. Esta zona no es descrita por otros autores en el pollo, y no aparece en el ratón. García Porrero y cols. (1984), la relacionan con la remodelación de la prominencia dorsal de la copa, que desaparece en el estadio HH19.

5.2 Muerte celular histogenética

Coincidiendo con el establecimiento de las conexiones sinápticas retinotectales se produce una abundante muerte celular en la retina. Rager y Rager (1978) describen una pérdida de hasta el 40% de las células ganglionares, medidas por recuento de las fibras presentes

en el nervio óptico, a partir del día 9 de incubación. Relacionan el inicio de este fenómeno con la llegada de los primeros axones a las regiones centrales del techo óptico, producida el día anterior, y la aparición de contactos axo-dendríticos en esas zonas, en el mismo día 9. Uno o dos días después las sinapsis retino-tectales son capaces de la transmisión de impulsos, lo que coincide con el máximo número de fibras en el nervio óptico; a partir de este momento, hay una brusca disminución del número de axones de fibras ganglionares, que se estabilizará poco antes de la eclosión, cuando ya toda la superficie tectal presente conexiones sinápticas.

Los resultados de Rager y Rager están de acuerdo con los de Hughes y La Velle (1975) y Hughes y Mc Loon (1979) con experimentos de ablación del techo óptico. Estos últimos autores señalan que la distribución de las célula ganglionares en degeneración entre los días 9 y 18 de incubación recuerdan la de la ola de generación de ganglionares; por tanto, la degeneración parece coincidir con un momento concreto de la diferenciación y maduración de estas células.

Aunque Silver y Hughes (1973) manifiestan que no hay muerte celular durante la diferenciación de la retina en los mamíferos, Young (1984) describe una abundante muerte celular en la retina postnatal del ratón, entre el nacimiento y las primeras dos semanas de vida, que afecta a las diferentes capa de la retina neural. El que la muerte celular histogénética se produzca en momentos distintos en relación con el resto del desarrollo del organismo, tal vez se deba a que la secuencia sinaptogénica es distinta en aves y mamíferos (Hughes y La Velle, 1974), y a que, en el pollo, el órgano visual es ya funcional en el momento de la eclosión.

II. MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se han utilizado embriones de pollo (*Gallus domesticus*) de la raza "White Leghorn"; los huevos fértiles fueron suministrados por la "Granja Santa Isabel" de Córdoba. Después de 24 horas de reposo, los huevos fueron incubados a 38°C en una incubadora con ventilación forzada y volteo automático, durante un periodo de 50 a 120 horas, para conseguir embriones comprendidos en los estadios 16-25 de Hamburger y Hamilton (1951) (HH16-25).

1 Extracción del material

Después de localizar la situación del embrión, se abrió una ventana en la cáscara, que permitiera acceder a él; se eliminó la membrana de la cáscara y la serosa que cubren al blastodermo. Inmediatamente después se depositaron alrededor del embrión, sobre la membrana vitelina, unas gotas de fijador. Cuando se detuvo el latido cardíaco se cortó la membrana vitelina alrededor del embrión y se extrajo el mismo, pasándolo a un pocillo de solución salina para eliminar los restos de membrana y vitelo que hubiesen quedado adheridos.

Tras el lavado el embrión se depositó en una placa de Petri con solución salina o fijador, según los casos, y con unas pinzas finas se procedió a eliminar las membranas restantes, el amnios y la vesícula alantoidea. El embrión entero, o solamente la cabeza, se introdujo en el fijador.

2 Técnicas generales

A) FIJACIÓN

Los embriones fueron fijados en formol, líquido de Carnoy o glutaraldehído.

-Formol al 10% (4% de concentración real), neutralizado con carbonato magnésico (pH = 6,5-7,5). Las piezas permanecieron en el fijador 24 h. a 4°C. Posteriormente se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en etanol.

-Líquido de Carnoy (etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial 6:3:1, en volumen). Se fijaron durante una noche. Como la solución fijadora no contiene agua, no hay que proceder a la deshidratación. Para eliminar el fijador y la acidez que produce, se lavaron las piezas en una solución saturada de carbonato cálcico en etanol absoluto.

-Glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH = 7,2-7,5). La fijación también se realizó de 14 a 19 h. a 4°C. Se lavaron de 20 a 22 h. en el mismo tampón, al que se añadió sacarosa hasta una concentración final de 0,25 M, siempre a 4°C. Las piezas se postfijaron en tetróxido de osmio (Merck) al 1% en tampón de Millonig, durante 2½ h. y se lavaron en el mismo tampón. La deshidratación se realizó en etanol de gradación creciente: pasos de 15 min. en los de 30 y 50°; 1½ h. en alcohol de 70° al que se había añadido acetato de uranilo a saturación, y 30 min. en los de 90 y 100°, este último, dos cambios.

B) INCLUSIÓN

Independientemente del fijador empleado, el protocolo de inclusión fue el mismo.

Las piezas se introdujeron en óxido de propileno (Serva), dos cambios de 15 min., para transferirlos a una mezcla 1:1 en volumen de óxido de propileno y "Epon" durante dos horas y finalmente a cápsulas de gelatina en las que previamente se habían vertido unas gotas de "Epon"; las piezas se orientaron convenientemente y se rellenó la cápsula con resina.

La polimerización de la resina se realizó en estufa a las siguientes temperaturas: 37°C, 45°C y 60°C, 24 h. en cada una.

Para obtener la resina, se prepararon las soluciones madres del siguiente modo:

-Solución A:

Epon 812 (Serva)	62 ml
DDSA (Dodecenyl succinic anhydride, Serva)	100 ml

-Solución B:

Epon 812	100 ml
MNA (Methylnadic anhydride, Serva)	89 ml

Estas soluciones se mezclaron a partes iguales para constituir la solución D. A cada 10 ml de ésta se añadieron 0,15 ml de DMP 30 (p-Dimethylaminophenol, Serva). Esta mezcla es ya la resina de inclusión.

C) CORTE Y TINCIÓN

Las piezas incluidas en "Epon" fueron cortadas con cuchillas de vidrio en un 11800 Pyramitome (LKB), a un grosor de 2-4 μ , según los casos. Los cortes se transfirieron, con ayuda de unas pinzas finas, a una gota de agua destilada puesta sobre un portaobjetos desengrasado. En cada porta se colocaron 18 o 24 secciones y se pusieron sobre una

placa calorífica a 40-50 °C hasta que se evaporó todo el agua, para conseguir el estirado y pegado de los cortes.

La matriz de resina se eliminó utilizando el siguiente método: los portaobjetos se colocaron en un recipiente de lavar portas, se cubrieron con papel de filtro y se depositaron sobre éste unas gotas de bromo líquido. El recipiente se tapa y se dejan actuar los vapores de bromo unos 4-5 min. La acción del bromo hace que la resina sea soluble en acetona; para eliminar la resina bastan dos pasos en acetona de 30 seg. cada uno.

Los cortes semifinos fueron teñidos con la técnica de Feulgen y tionina alcohólica, según los casos.

-Técnica de Feulgen adaptada para cortes semifinos



Se utilizó material fijado en Carnoy.

Hidratación: Pasos sucesivos de un minuto cada uno por alcoholes de 100, 96, 90, 70, 50 y 30°, y agua.

Los cortes se introdujeron brevemente en ácido clorhídrico 1 N, a temperatura ambiente.

Hidrólisis en clorhídrico 1 N a 60°C durante 6-7 min.

Se da otro paso rápido por clorhídrico a temperatura ambiente.

Lavado con agua corriente durante 1 min.

Una hora en el reactivo de Schiff según De Tomasi (1936)

Lavado en una solución de metabisulfito (5 ml de metabisulfito potásico al 1%, 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y 90 ml de agua destilada); se realizan tres cambios de tres minutos cada uno.

Lavar con agua corriente durante 6-8 min.

Deshidratar directamente con alcohol absoluto, tres pasos de un minuto.

Aclarar en xilol, dos pasos de 45 seg.

Montaje en Eukitt.

Esta técnica específica para el DNA, tiñe intensamente la cromatina nuclear de rojo.

-Tionina alcohólica

Se trata de la técnica utilizada por Calvente (1985) con ligeras modificaciones debido al empleo de fijadores diferentes.

Hidratación: 1 min. en alcoholes de 100, 96, 90, 70 y 50°. No se hidrata hasta agua ya que la solución colorante contiene un 45% de etanol.

Tinción: El tiempo de tinción varía según la fijación de la pieza; es de 6-8 min. en piezas fijadas en formol o glutaraldehído, y de 12-15 min. si el fijador ha sido Carnoy.

Para preparar el colorante hay que añadir 200 ml de agua destilada a 250 ml de etanol de 90°; el pH se ajusta a 10-10,5 adicionando unas gotas (3 ó 4 por cada 100 ml) de hidróxido amónico al 32%. En esta mezcla se disuelven 0,45 gr de tionina (C.I. 52000, Merck). Esta solución se mantiene durante meses; únicamente es preciso añadir de vez en cuando una gota de hidróxido amónico para reemplazar al que se evapora.

La fórmula utilizada se basa en la de Sievers (1971), reemplazando la solución basificante de hidróxido sódico 0,1 N por hidróxido amónico. La ventaja de esta modificación es que la reacción se produce en un tiempo relativamente breve sin necesidad de calentar a 50-60°C, evitando el daño que esto produce a los cortes (Millonig, 1980; Chandler y Schoenwolf, 1983).

Durante dos minutos se lavan los preparados para eliminar el exceso de colorante. Se emplea agua destilada basificada hasta un pH alrededor de 10 mediante la adición de hidróxido amónico.

Se deshidrata en alcoholes de 70, 90 y 96°, basificados de forma semejante. La diferenciación se produce en el paso por alcohol de 70°; la duración de ésta depende de la intensidad de la coloración y puede oscilar entre 30 sg. y 1½ min. Para continuar la deshidratación basta un paso de 45 sg. por los demás alcoholes y dos de un minuto en etanol absoluto.

Dos cambios de xilol de 45 sg. cada uno.

Montaje en Eukitt.

En el material fijado con aldehidos se tiñen tanto el citoplasma como el nucléolo, con diferente intensidad, de azul a púrpura; el núcleo aparece más claro. Si se ha fijado con Carnoy, se tiñe intensamente la heterocromatina y el material nucleolar, mientras que el citoplasma lo hace de forma desigual y frecuentemente con apariencia granulosa, sugiriendo la tinción de los ribosomas.

Hemos realizado la mayor parte de nuestro estudio sobre material fijado en aldehidos, principalmente en glutaraldehido, debido a que son estas preparaciones las que proporcionan mayor información morfológica.

3 Impregnación argéntica

Para poner de manifiesto los primeros axones que aparecen en la retina, utilizamos el método de Rager y cols. (1979) de impregnación argéntica de tejido nervioso embrionario.

Después de extraer los embriones, fueron fijados durante tres días en la solución de Bodian:

5 ml de formol al 37%

5 ml de ácido acético glacial

90 ml de etanol de 80°.

Tras lavar las piezas en alcohol de 80°, se pasaron a una mezcla 1:1 en volumen de etanol y dioxan y, posteriormente, a dos cambios en dioxan puro para completar la deshidratación. Seguidamente se realizó la infiltración con una mezcla de dioxan y paraplast a partes iguales, primero, y en dos cambios de paraplast, después.

Las secciones de 5-10 μ se desparafinaron en xilol y se hidrataron en alcohol hasta agua. Con el fin de incrementar la impregnación de los axones con la plata los cortes se incubaron durante 1 h. en dicromato potásico al 1% y a 37 °C.

La impregnación se realizó en una solución de nitrato de plata al 1% en tampón ácido bórico-tetraborato sódico 0,1 M durante 18-20 h. a 37 °C. Para finalizar la impregnación, los cortes se lavaron en dos cambios de 10 min. de acético al 0,5%.

El revelado de las secciones se realizó en una mezcla de las siguientes soluciones:

-A: 50 gr de carbonato sódico anhidro en 1000 ml de agua destilada.

-B: 2,0 gr de nitrato amónico, 2,0 gr de nitrato de plata y 10 gr de ácido tungstosilícico (o silicowolfrámico, Merck) anhidro en 1000 ml de agua destilada.

-C: A 1000 ml de solución B se añaden 7 ml de formol al 37%.

Para obtener el revelador, se mezclan en este orden y agitando continuamente, 10 ml de A, 6,5 de B y 3,5 de C. En esta mezcla el revelado se produce en 1-5 min. Para detenerlo se usa la solución de acético 0,5%, realizando tres cambios de cinco minutos. Finalmente se lava en agua destilada, se deshidrata en alcohol, se aclara en xilol y se monta en Eukitt.

4 Histoquímica de la fosfatasa ácida

El método empleado está basado en los trabajos de Higuchi y cols. (1979) y Namba y cols. (1983).

Después de extraer los embriones como ya se ha descrito, se fijaron durante 6 h. a 4°C en paraformaldehído al 4% en tampón cacodilato 0,1 M con 0,025% de cloruro cálcico. Para prepararlo se mezclan dos soluciones:

-A: Se añaden 4 gr de paraformaldehído a 60 ml de agua destilada a 60°C. Se agita y se añaden unas diez gotas de hidróxido sódico 1 N, hasta que se aclare la solución. Se deja enfriar.

-B: Se disuelve 2,14 gr de cacodilato sódico en 40 ml de agua destilada. El pH se ajusta a 7,3-7,4 con 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 N.

Finalmente se añaden 0,025 gr de cloruro cálcico.

Tras la fijación se lava en el mismo tampón cacodilato 0,1 M, al que se añade sacarosa en concentración final del 7%; después de realizar tres cambios de 15 min. en esta solución, se dejaron las piezas una noche en ella a 4°C.

Se realiza una rápida deshidratación en alcohol, ya que la exposición prolongada al etanol produce la pérdida de actividad enzimática.

El medio de inclusión fué "Technovit 7.100" (Kulzer), según las instrucciones de la firma comercial. Aunque no se facilita la fórmula, se trata de un plástico cuyo monómero base es el glicol metacrilato.

El material se deja infiltrar durante una noche con la solución descrita en las instrucciones (Technovit 7.100, 100ml y un sobre de endurecedor I). Después se pasa a la solución definitiva (solución anterior, 15 ml y endurecedor II, 1 ml). Se deja polimerizar a

temperatura ambiente hasta el endurecimiento del bloque. Aunque la reacción de polimerización es exotérmica, la incorporación al Technovit 7.100 de un regulador de temperatura impide que esta se eleve por encima de los 40°C, lo que produciría la desnaturalización de los enzimas.

Las piezas se cortaron a 5 μ en un 1150 Autocut (Reichert Jung) con cuchillas de acero desechables, o con cuchillas de vidrio en el Pyramitome. Los cortes se estiraron sobre una gota de agua puesta en un portaobjetos o sobre la superficie de un recipiente con agua destilada. Los cortes se pegaron al porta colocándolos en una placa calorífica a 30-40°C, hasta que se evaporó el agua.

La reacción histoquímica empleada para manifestar la actividad enzimática de la fosfatasa ácida es la de Dannenberg y cols. (1963), con las modificaciones de Higuchi y cols. (1979) y Namba y cols. (1983). Como sustrato de la actividad enzimática se emplea el fosfato de naftol AS BI; el naftol liberado se une al colorante, en este caso el "fast red violet LB salt" (una sal de diazonio), que precipita. El pH óptimo del enzima (5,2-5,5) se consigue con la utilización del tampón acético-acetato de Walpole.

Antes de iniciar la reacción, los cortes se hidrataron directamente en agua destilada. Los cortes se incubaron 16-20 h. a 37°C en un medio que contiene:

Fosfato de naftol AS BI (Sigma)	10 mg
N-N' dimetil formamida	1 ml
Tampón acético-acetato sódico de Walpole 0,1 M (pH = 5,2)	100 ml
Fast red violet LB salt (Sigma)	20 mg

La solución, ligeramente turbia, se filtra y se añaden 4 gotas de una solución al 10% de cloruro de manganeso, activador del enzima.

Tras la incubación, se lava abundantemente con agua destilada, tres cambios de 5 min. cada uno.

Para poner de manifiesto los núcleos, se tiñe durante 8 min. con hemalumbre potásico de Harris (Burck, 1966). El exceso de colorante se lava con agua destilada y se vira la hematoxilina durante unos minutos con agua corriente, hasta alcanzar la tonalidad adecuada. Después, se vuelve a lavar con agua destilada.

Se deshidrata al aire y se monta en glicerina.

En algunos casos los bordes del cubre fueron sellados con laca de uñas.

Como controles de la reacción se utilizaron cortes del mismo material que fueron incubados en:

- un medio completo al que se había adicionado fluoruro sódico en concentración 0,01 M, inhibidor específico de la fosfatasa ácida;
- un medio carente de sustrato, del fosfato de naftol.

Dificultades en la extensión y pegado de los cortes, que con frecuencia se despegan tras una incubación tan prolongada, han impedido la obtención de cortes seriados, y que aparezcan defectos en muchas secciones: pequeños pliegues, zonas de distinta intensidad de virado de la hematoxilina y retención de la suciedad, incrementándose esto último por el hecho de no poderse eliminar la matriz plástica. Sin embargo, los resultados positivos de la reacción son siempre suficientemente claros para poder determinarla con precisión.

5 Microscopía electrónica

Las muestras para microscopía electrónica fueron preparadas del mismo modo que se ha descrito para las piezas fijadas en glutaraldehído y postfijadas en tetróxido de osmio.

Los cortes ultrafinos se realizaron en un Ultracut E (Reichert-Jung), a 60-70 nm de grosor, y utilizando cuchillas de vidrio.

Las rejillas con los cortes fueron teñidas con citrato de plomo y acetato de uranilo.

La solución de citrato de plomo se realiza añadiendo 1,33 gr de nitrato de plomo y 1,76 gr de citrato sódico (dihidratado), a 30 ml de agua destilada y hervida para eliminar el anhídrido carbónico.

Se agita vigorosamente la mezcla durante un minuto.

Se deja reposar 30 min., agitándola cada 5 min.

Posteriormente se añaden 6,5 ml de hidróxido sódico 1 N, y luego agua destilada -a la que también se le ha eliminado el anhídrido carbónico-, hasta completar los 50 ml. Se mezclan todos los componentes por inversión del matraz.

El pH resultante debe ser de 12.

La solución final se filtra con un filtro Millipore de 0,45 μ de diámetro, inmediatamente antes de su uso.

La solución de acetato de uranilo (Merck), es al 5% en agua destilada.

La tinción se realizó en una placa de petri cuya superficie se había impermeabilizado con cera de dentista. Sobre esta superficie se colocan unas gotas de la solución de acetato de uranilo; en ellas se dejan las rejillas durante 30 min.

Después se lavan las rejillas durante un minuto en agua destilada.

Sobre la misma superficie hidrófoba se ponen unas gotas de la solución de citrato de plomo, y se colocan sobre ellas las rejillas, unos 20 min. Para evitar la aparición de precipitados provocados por la presencia de anhídrido carbónico, se colocan en la placa unas cuantas lentes de hidróxido sódico y se tapa.

Finalmente se lavan cuidadosamente las rejillas.

6 Reconstrucciones

Para determinar las zonas de degeneración celular y de presencia de células ganglionares es preciso realizar reconstrucciones de cortes seriados de la retina. La representación de una reconstrucción completa de todo el órgano, sin embargo, no es útil para reflejar esta distribución, por lo que se ha optado por hacer reconstrucciones parciales, de bloques de 10-20 cortes consecutivos correspondientes a áreas significativas en la distribución de la muerte celular a lo largo de todo el polo posterior de la retina.

Con la ayuda de una cámara clara (Zeiss) montada en un microscopio "Zeiss Universal", se dibujó para cada corte el contorno completo del ojo, observando la preparación con un objetivo 16x; al mismo tiempo se señalaron las células ganglionares observables y los restos de degeneración, aunque a esos aumentos fuese dudosa su caracterización. A continuación se dibujó la zona posterior de la retina, objeto de nuestro estudio, utilizando el objetivo 40x, y se marcaron los restos celulares; con este dibujo se corrigió el primero, que fue el utilizado para realizar la reconstrucción.

En el caso de la reconstrucción de ojos de embriones de los estadios HH24 y 25, el tamaño del ojo impide dibujar la retina completa a los aumentos anteriores. Por tanto, la retina completa se dibujó con un objetivo 10x, corregido con otro realizado con el objetivo 16x, que a su vez se había comprobado con el de 40x. El aumento total se señala en cada dibujo.

Una vez realizados los dibujos, se agruparon los cortes en bloques de 20-40 μ de grosor (entre 10 y 20 cortes, como ya hemos señalado) y se dibujaron sobre papel vegetal haciendo coincidir el contorno del ojo; en este papel se marcaron las células ganglionares, las zonas en que son apreciables fascículos de fibras nerviosas y los signos de muerte celular. En cada retina estudiada se escogieron de 5 a 12 de estos bloques, los que se consideraron más ilustrativos.

7 Recuentos y representación gráfica del número de restos

Para la realización de recuentos se escogieron series de cortes de retinas suficientemente completos. En otras series en que se habían perdido muchos cortes, o en los que la orientación no era adecuada, realizamos recuentos solamente con fines indicativos; los valores obtenidos en estos casos no se incluyen en los resultados.

La zona de recuento se circunscribió al polo posterior de la retina, que en estos estadios es fácilmente distinguible por su diferenciación más avanzada; en este sentido no se ha atendido a una región topográficamente localizada, sino distinguible por sus características citológicas.

Se ha realizado el recuento de las siguientes estructuras:

a) Número total de células.- La unidad de recuento fue el nucléolo; en aquellas células en que se apreciaban dos nucléolos, se han contado como uno solo.

b) Número de células ganglionares.- La unidad de recuento también fue el nucléolo. Estas células se han distinguido de las restantes de la retina por su situación basal (vitreal) en el neuroepitelio, por presentar un núcleo redondeado u ovalado, pero en este caso con su eje mayor orientado paralelamente a la superficie vitreal, y mayor volumen de citoplasma; ocasionalmente también se podía apreciar la presencia de prolongaciones que se orientan hacia la fisura. Aunque con estas características puramente morfológicas se pueden pasar por alto células que ya hayan salido del ciclo mitótico, los datos así obtenidos permiten la comparación de distintas zonas de una misma retina, que es lo que se pretende.

c) Número de mitosis. En este caso la unidad de recuento fue la figura mitótica. Las anafases y telofases en las que sólo se apreciaba un grupo de cromosomas fueron contadas como 0,5.

d) Número de restos de degeneración celular. Los restos que aparecen en un mismo corte son muy diferentes en tamaño y estado de digestión. Pueden observarse desde pequeños fragmentos de 1-2 μ a otros

cuyo volumen parece equivalente a un núcleo entero. Todos estos factores y el que los restos procedan de una célula que se ha fragmentado, ha hecho que los diversos autores realicen los recuentos de forma distinta. Así, Theiler y cols. (1976) no cuentan cada fragmento aislado, sino cada "paquete conspicuo de restos de degeneración" que consideran proveniente de una única célula; otros, como Silver y Hughes (1973) cuentan todos los restos "por criterio de uniformidad". En nuestro caso se ha preferido utilizar el segundo criterio. Aunque es discutible dar el mismo valor a un núcleo en degeneración inicial que a un fagosoma en avanzada digestión, se ha optado por hacerlo así a introducir una nueva fuente de variabilidad: la consideración subjetiva de si una serie de restos más o menos próximos procede de la misma célula.

Para cada estadio se realizaron recuentos en tres o cuatro retinas, excepto en los estadios HH24 y 25, en los que se realizó los recuentos de las dos retinas de un mismo embrión, debido a que el incremento de volumen del ojo hace más costoso conseguir series completas de cortes que abarquen toda la zona de estudio.

La representación gráfica de la distribución de la muerte celular se consiguió a partir de series de cortes orientados horizontalmente. El primer corte horizontal en que se podía apreciar tallo óptico, se consideró como el origen. A partir de él se agruparon los cortes en bloques de 12 μ y se sumó el número de restos presentes en cada corte del bloque. Como en algunas ocasiones se había perdido un corte, se interpoló el número de fragmentos del corte perdido hallando la media entre el número de restos presentes en las dos secciones contiguas. De forma semejante se hizo para las células ganglionares.

Se representó el número de restos presentes en cada bloque respecto a su distancia -ya sea en sentido positivo (dorsal al tallo) o negativo (ventral al tallo óptico)- al corte señalado como origen. De esta forma se obtiene una representación de la cantidad de muerte celular a lo largo del eje dorsoventral del ojo.

Se obtuvo para cada bloque la proporción del número de restos frente al número total de células. Del mismo modo se calculó la proporción de células ganglionares, que en este caso se multiplicó por 100, valor que se denominó índice de ganglionares. Dado que el área en que se realizó el recuento era constante -lo que se conseguía utilizando una rejilla ocular-, la proporción frente al número total de células puede eliminar algunas diferencias debidas a las variaciones de grosor de los cortes, que conllevan que se realice el recuento en un volumen diferente de estructura.

8 Nota sobre la terminología

Para evitar reiteraciones, con frecuencia se utilizan en este estudio la denominación de los órganos y partes del embrión que se les da en el adulto, aunque no estén totalmente formados. Así, se hablará del ojo, retina o humor vítreo, en vez de esbozo o rudimento del ojo, retina embrionaria, o zona que en el adulto ocupará el humor vítreo.

Siguiendo las indicaciones de Angevine y cols. (Boulder Committee, 1970) no se designa como "neuroblastos" a las células nerviosas en diferenciación, a menos que se cite a un autor que sí lo haga. En general se denominarán como neuronas simplemente, aunque nos estemos refiriendo en muchos casos a células todavía muy distintas a las que son funcionales en el adulto; de esta forma también se evitan expresiones como "joven célula ganglionar" o "neurona inmadura".

Para designar las células de la capa proliferativa, se emplearán los términos de células neuroepiteliales o ventriculares.

La designación de la orientación de los cortes respecto a la copa óptica (horizontales o verticales) se realiza siguiendo los criterios de Calvente (1985). La región ventral de la retina viene definida por la presencia de la fisura óptica.

III. RESULTADOS

1.-MORFOLOGIA DE LA MUERTE CELULAR EN LA RETINA EMBRIONARIA

De acuerdo con Glücksmann (1951) la existencia de procesos de muerte celular se manifiesta por la aparición de estructuras intensamente teñidas, generalmente redondeadas en sección, de diámetro variable, que en este estudio oscila de 1-2 μ a 6 ó 7 (fotos 1, 3 y 4). En el neuroepitelio se las diferencia fácilmente de las células viables, ya que éstas, presentan un núcleo oval en secciones perpendiculares a la membrana basal, con escasa heterocromatina y uno o dos nucléolos. Gran número de los fragmentos producidos por la muerte celular se tiñen intensamente con el reactivo de Schiff en la reacción de Feulgen, manifestando su contenido en DNA.

1.1 Muerte celular inicial

Un estudio más detallado permite determinar los primeros cambios apreciables en el núcleo, al principio de la degeneración (fotos 5 y 6). Inicialmente aparecen masas de cromatina muy condensada y adosadas internamente a la envuelta nuclear. Al principio esta banda de heterocromatina es prácticamente homogénea en toda la periferia del núcleo, pero posteriormente se hace más prominente en los polos

opuestos del núcleo, apareciendo dos casquetes de material intensamente teñido. Aún suele ser visible el nucléolo, que no presenta características anormales.

No se han podido determinar en el citoplasma modificaciones anteriores a las descritas para el núcleo. Algunas células, con apariencia normal por lo demás, presentan un citoplasma claramente más oscuro al teñir con tionina; sin embargo, se desconoce si la mayor intensidad de la tinción se debe al inicio de la degeneración o a otras causas.

El núcleo comenzará posteriormente a condensarse, perdiendo ya su morfología ovalada. El citoplasma de la célula en degeneración, y tal vez también el carioplasma, han ido sufriendo modificaciones que conducen a que no pueda contrarrestar la presión ejercida por las células vecinas y se deforma, adaptándose al espacio que le deja la disposición de las células contiguas (foto 3).

El núcleo ha ido haciéndose más oscuro, tal vez como resultado de la condensación del carioplasma, y ya no se aprecia el nucléolo en muchos casos. Finalmente aparecerá como un cuerpo alargado densamente teñido.

Desde las primeras fases del proceso puede darse fragmentación. En algunas preparaciones se observan núcleos claramente picnóticos, en ocasiones con nucléolo observable, acompañados por una hilera de restos, pequeños fragmentos que pueden derivar del estrangulamiento de los procesos celulares típicos de las células neuroepiteliales (foto 3). Algunas imágenes de microscopía electrónica parecen confirmar estas deducciones basadas en la observación con el microscopio óptico (fotos 27-29). Se puede apreciar claramente la condensación cromatínica perinuclear y una mayor densidad del citoplasma frente a los electrones. En algunos casos las imágenes parecen sugerir que algunas zonas de membrana nuclear con masas heterocromáticas adosadas hacen protusión en el núcleo y tal vez se

estrangulan. Si esto fuera así la fragmentación del núcleo podría producirse en fases muy iniciales del proceso de degeneración.

El escaso número de células que pueden detectarse en las primeras fases del proceso nos hacen suponer que todos estos cambios suceden en poco tiempo, tal vez menos de dos horas.

La mayoría de las células en picnosis inicial aparecen en la capa ventricular (proliferativa) del neuroepitelio. Deben ser células indiferenciadas que aún podrían encontrarse en el ciclo celular en el momento de comenzar su degeneración. Son más frecuentes en los niveles más basales del neuroepitelio (más próximo al borde vitreal), y aparecen en menor número más apicalmente, aunque en esta zona hay abundantes restos celulares. No se han podido observar células en degeneración con dos núcleos como describen García Porrero y cols. (1979) en la separación del cristalino del ectodermo cefálico.

Ya en el estadio HH19 se aprecian células picnóticas iniciales entre células que presentan características típicas de diferenciación neuronal (foto 8). En algunos casos la célula en degeneración presenta también cierta diferenciación morfológica, con un núcleo redondeado y, en ocasiones, el nacimiento de una prolongación celular orientada paralelamente al borde vitreal. Por tanto, se puede suponer que desde fases iniciales de la histogénesis de la retina se produce la muerte de células que han comenzado a diferenciarse.

A partir del estadio HH23 aparecen estructuras que tal vez correspondan a otro tipo de muerte celular, que se harán más frecuente en los estadios siguientes (foto 7). En este caso no se observan fases de condensación de cromatina en los márgenes del núcleo. Presentan una condensación homogénea de todo el contenido nuclear, que se tiñe de azul intenso con la tiónina; rodeando a esta masa hay una ligera banda desprovista de tinción y, finalmente, encerrando toda la estructura, una línea que parece corresponder a la membrana plasmática. Esta membrana,

al igual que la condensación central, presenta ligeras ondulaciones en su contorno.

Algunas estructuras de este tipo aparecen en el estadio HH23 (de 2 a 5 en una retina) y aumentan hasta un número de alrededor de 20 en el HH24. En ocasiones pueden confundirse con alguna de las fases de mitosis desplazadas (equivalentes a las mitosis subventriculares de otras regiones del sistema nervioso central en desarrollo), que aparecen por primera vez en la retina de pollo sobre el estadio HH20-21. Sin embargo, más frecuentemente la ausencia de la apariencia propia de los cromosomas mitóticos y la falta de turgencia que presenta la membrana nuclear los distingue claramente.

Estas estructuras son más abundantes en las zonas periféricas de la retina, donde está comenzando a formarse una capa definida de células ganglionares. Así, en una retina del estadio HH24 encontramos 15 en esta región periférica y solo 3 en la central. Casi siempre aparecen inmediatamente por debajo de la membrana basal (vitreal) o muy próxima a ella; solo en dos ocasiones, en la misma retina anterior, se encuentran a media altura en el neuroepitelio.

Tal vez se trate de procesos de degeneración celular con características distintas y que parece no darse en las células neuroepiteliales indiferenciadas. Podría establecerse un paralelismo entre este hecho y las descripciones de Chu-Wang y Oppenheim (1978), que constatan la existencia de dos procesos diferentes de degeneración en motoneuronas de la médula. Por la localización de las células parece tratarse de muerte celular de neuronas inmaduras.

1.2 Fragmentación

Ya se ha señalado que la rotura de la célula debe darse rápidamente. Los fragmentos producidos presentan tamaños muy diversos y pueden contener o no restos de material nuclear. Estos últimos se tiñen intensamente con la reacción de Feulgen y aparecen de azul más oscuro con la tiónina alcohólica; los fragmentos que únicamente presentan restos de citoplasma no se tiñen con la reacción de Feulgen y lo hacen con poca intensidad con la tiónina. Es difícil determinar el número de fragmentos en que se rompe una célula. En una misma sección se pueden encontrar hasta 8 o 9 fragmentos muy próximos o alineados, que sugieren que provienen de la degeneración de la misma célula. En estos casos los fragmentos suelen ser de pequeño tamaño. Es lógico suponer que el número de fragmentos en que se rompe una célula y los volúmenes de estos han de estar en relación inversa. La variabilidad en el número de fragmentos debe ser, pues, consecuencia de su volumen; en este sentido, no hay datos que permitan hacer suposiciones sobre el mecanismo celular que conduce a la rotura de la célula. Aparte, no se puede descartar que los restos sufran roturas posteriores durante la digestión y aumente su dispersión.

Frecuentemente se pueden observar restos de pequeño tamaño alineados según el grosor del neuroepitelio (fotos 3 y 9): esta imagen sugiere la fragmentación de los procesos celulares. Este hecho también puede relacionarse con la eliminación del proceso vitreal al iniciarse la mitosis, de acuerdo con lo propuesto por Hinds y Ruffet (1971) en la vesícula cerebral del ratón. Sin embargo, formaciones de este tipo solo son frecuentes en zonas con abundante muerte celular y no aparecen en otras zonas en que se produce abundante mitosis.

Las características morfológicas de los procesos de muerte celular y su desarrollo en el tiempo coinciden con el fenómeno descrito por Kerr y cols. (1972) como *apoptosis*.

1.3 Fagocitosis

Los restos producidos en la fragmentación son eliminados por fagocitosis. Como ya han puesto de manifiesto García Porrero y Ojeda (1979) son las mismas células neuroepiteliales vecinas las que actúan como fagocitos.

En las zonas de mayor densidad de muerte celular es más frecuente encontrar restos libres en los espacios extracelulares; sin embargo éstos son muy escasos en las zonas con degeneración más reducida (fotos 3 y 9). Este hecho tal vez se deba a que en las primeras son más frecuentes las fases iniciales de la degeneración, pero también puede suponerse que en la degeneración intensa la cantidad de restos supere la capacidad fagocítica de las células neuroepiteliales, que son fagocitos no específicos.

Los restos fagocitados presentan aspectos y tamaños diversos. Algunos tienen 4 ó 5 μ de diámetro. Su forma es esférica en general y su contenido no es homogéneo, distinguiéndose dos o tres intensidades de tinción con la tionina. El azul más oscuro aparece formando uno o dos casquetes en los bordes de la estructura; también aparecen en ocasiones grumos redondeados. El resto aparece sin teñir (foto 10). Frecuentemente se observa en el centro de la estructura un cuerpo redondeado teñido menos intensamente que los casquetes y que tiene la apariencia de un nucléolo. La técnica de Feulgen pone de manifiesto que en estructuras de este tipo solo se tiñen de rojo los casquetes periféricos. El que no se haya encontrado ningún caso en que aparezca teñido con el reactivo de Schiff el cuerpo central que a veces se observa con la tionina, puede significar que esta estructura no posea DNA; la semejanza con el nucléolo de las células viables permite suponer que se trate de material nucleolar (es decir, principalmente RNA), que como ya han propuesto anteriormente otros autores (Ballard y Holt, 1968) sufre una digestión más lenta, o posterior, que la cromatina. Alrededor de restos de este tipo se observa con frecuencia un halo desprovisto de tinción.

Formaciones de este tipo aparecen en diferente relación con células neuroepiteliales. En algunos casos están totalmente rodeadas por una banda de citoplasma y se puede apreciar que producen una deformación en el núcleo (foto 10); en otros casos, la imagen sugiere que, aunque en estrecha relación con la célula neuroepitelial, los fragmentos están libres, no encerrados en su citoplasma. Las observaciones de García Porrero y Qjeda (1979) y García Porrero y cols. (1984) utilizando *scanning*, de que los restos se encuentran en "cráteres" que se forman en la superficie de la célula, permiten explicar estas imágenes como distintos planos de corte de invaginaciones que contienen restos. En otros fagosomas la digestión parece mucho más avanzada. El material intensamente teñido ya no aparece como casquetes periféricos, sino disgregado y con límites menos definidos.

Más frecuentes son los fragmentos de menor tamaño. Tampoco su aspecto es totalmente homogéneo, con uno o dos cuerpos en su interior más intensamente teñidos. Esta apariencia también se presenta en material teñido con el método de Feulgen, por lo que deben contener DNA. El resto de la estructura debe estar constituido de material citoplásmico.

Las células que contienen fagosomas no son diferenciables a nivel de microscopía óptica de las que no lo presentan; ni la apariencia del núcleo ni la del citoplasma permite diferenciarlas. Tampoco a nivel ultraestructural se pueden establecer diferencias citológicas. En las micrografías electrónicas se pueden apreciar fragmentos celulares en distinto estado de digestión en el interior de la célula y rodeados de membrana. La imagen ultraestructural de estos fagosomas se correlaciona estrechamente con los tipos descritos con microscopía óptica (fotos 28 y 29).

Los fagosomas de mayor tamaño (5-6 μ) se sitúan siempre cerca del núcleo, en la parte más engrosada de la célula neuroepitelial. La vacuola fagocítica deforma con frecuencia el núcleo, que presenta una

muesca en la zona contigua. Una misma célula puede presentar más de un fagosoma; en estos casos se suelen situar en ambos polos del núcleo.

Los restos más pequeños aparecen con frecuencia en los procesos celulares, fundamentalmente en el vitreal, formándose en ocasiones en su interior una fila de cuatro o cinco restos de apariencia muy densa.

Células neuroepiteliales con fagosomas se encuentran en todos los niveles de la zona ventricular. Como la distancia del núcleo al límite apical (escleral) es reflejo de la fase del ciclo celular en que se encuentra, la digestión debe producirse durante todo el ciclo. Sin embargo, no se puede excluir que el inicio de la fagocitosis esté ligado a una de las fases del ciclo, aunque continúe durante el resto de éste.

Como también ha observado Schook (1980a,c) con frecuencia se observan células en mitosis en el borde escleral, que contienen restos celulares (fotos 11 y 12). Este hecho parece indicar que el proceso de digestión se extiende durante gran parte del ciclo celular. No es posible determinar hasta que punto continúa el proceso de digestión activa durante la mitosis, o si, como parece más lógico pensar dada la detención de la síntesis protéica, se interrumpe para continuar posteriormente en las células hijas.

Esta interpretación es totalmente diferente a la de Young (1984) que describe estas imágenes como "picnosis de cromosomas en mitosis". Sin embargo, en este material se observan dotaciones cromosómicas de morfología normal en las distintas fases de mitosis, y cuerpos intensamente teñidos que al estudiar cortes seriados se comprueba que no presentan continuidad con los cromosomas. Aunque como ya se ha señalado los fagosomas aparecen tanto en el polo apical como en el basal de las células interfásicas, en las mitóticas se observan principalmente en la basal (la opuesta al epitelio pigmentario). Únicamente en algunas profases se encuentran restos en el polo apical. Ya en metafase los restos deben moverse hasta la zona basal, ya sea

por un fenómeno activo de la célula o pasivamente, debido al cambio de densidad de citoplasma y la desaparición del núcleo.

En ocasiones la célula en mitosis contiene más de un fagosoma, ambos en el polo basal. La continuación del proceso puede conducir a que cada resto quede en un lado distinto del surco de división y por tanto vaya a pasar a una célula hija diferente (foto 14). Esta idea se apoya en imágenes de telofases en que la progresión del surco ha separado los dos restos y explicaría la apariencia de algunos pares de células que presentan núcleo semejante, poco voluminoso, situado cerca del borde escleral y que presentan ambas un fagosoma en su polo basal.

Las células neuroepiteliales que realizan fagocitosis no solo son capaces de proseguir el ciclo celular, sino que seguramente también se diferencian para dar lugar a neuronas. Aunque en número escaso, hemos encontrado células ganglionares, claramente diferenciadas de las células ventriculares, que contienen un cuerpo intensamente teñido en su citoplasma; este cuerpo tal vez corresponda a un fagosoma en que la digestión de los restos está muy avanzada (foto 13). Es más pausable pensar que estas imágenes corresponden a restos que fueron fagocitados por la célula antes de iniciar su diferenciación y cuya digestión ha continuado, ya que es de suponer que la célula en diferenciación tiene disminuida su actividad fagocítica.

2.-FAGOCITOS ESPECIALIZADOS EN LA RETINA

Durante el estudio morfológico de las diferentes fases de la muerte celular y fagocitosis, se observaron núcleos de aspecto normal, pero con características distintas a los de las células neuroepiteliales: su forma es bastante irregular y se aprecia que parecen estar comprimidos por los abundantes restos en degeneración que los circundan; también su orientación es diferente a la de las células neuroepiteliales, que se disponen abarcando el grosor del neuroepitelio. El que en ocasiones se pueda apreciar una membrana que rodea al conjunto de fragmentos y núcleo, dió pie para suponer que se podía tratar de fagocitos más especializados que las células ventriculares típicas (fotos 17 y 18).

Células con esta morfología aparecen ya en el estadio HH20. Frecuentemente solo se distingue un conjunto de restos agrupados, con la apariencia de lo que Ballard y Holt (1968) describen como *clusters* ("racimo" o "paquete") (fotos 15 y 16). En algunas ocasiones el núcleo no es observable, mientras que en otras se le aprecia totalmente rodeado de fragmentos en distinto estado de degeneración. "Paquetes" de este tipo son frecuentes también en el mesénquima cefálico, en las proximidades del ojo. En la retina, las formaciones descritas se presentan siempre en zonas de intensa degeneración: durante los

estadios HH20-23 aparecen ligeramente dorsales a la zona de inserción del tallo óptico, y más desplazados ventralmente en los estadios HH24-25. Su localización también coincide con regiones en que hay desarrollo aparente de fibras ópticas (foto 20).

Para explicar la aparición de estas células en la retina neural, hay dos posibilidades,

- que sean células que se diferencian a partir de células neuroepiteliales típicas;
- que tengan su origen fuera de la retina y emigren hasta ella.

La migración a partir de otras zonas del sistema nervioso en desarrollo para alcanzar la retina parece poco probable, debido a la densidad celular que presenta el neuroepitelio en esos estadios y porque las células de la retina son muy semejantes a las del resto del sistema nervioso y deben tener semejantes potencialidades. Por esto, la consideración de la segunda de las posibilidades anteriores lleva a examinar si hay células de origen no neural que puedan introducirse en el neuroepitelio de la retina.

2.1 Células de origen mesodérmico en la retina

Desde el inicio de la formación de la copa óptica podemos encontrar células libres en los espacios que constituirán posteriormente la cámara posterior del ojo (espacio vitreal), entre el esbozo del cristalino y la retina neural.

En cortes semifinos estas células aparecen con núcleo de morfología algo variable, más o menos redondeado o claramente ovalado. Con la técnica de tinción empleada, la tiónina alcohólica, el contenido nuclear suele presentar una fina banda de heterocromatina periférica, más aparente que en las células neuroepiteliales, y un nucléolo (fotos 3, 9, 19 y 20).

La morfología general de las células tampoco es muy constante. En algunos casos el núcleo está rodeado por una banda de citoplasma, nunca muy ancha, y que hace adoptar una forma redondeada a las células. En otras se aprecian prolongaciones citoplásmicas gruesas, una o dos; en este caso, las prolongaciones se presentan en polos opuestos del núcleo, que adopta una forma ovalada. Finalmente, un tercer tipo morfológico lo constituyen células con abundantes prolongaciones citoplásmicas, más delgadas y cortas, evaginaciones de la membrana plasmática dispuestas radialmente respecto al núcleo -aunque suelen ser más patentes en una zona concreta-, y que pueden acabar en un ensanchamiento o botón. Una constante en estas células es la presencia de vacuolas más o menos voluminosas, que en ocasiones ocupan casi todo el citoplasma; de hecho, en algunos cortes que no pasan por el núcleo, la célula aparece como vesículas vacías de diverso tamaño y rodeadas de membrana.

Con cierta frecuencia estas células aparecen en división (foto 22), si bien su escaso número en cada copa óptica, y su distribución, diseminadas por toda la cámara posterior, dificulta realizar análisis específicos de índices mitóticos.

Estas células pueden encontrarse en diferentes zonas del interior de la copa óptica:

-En el espacio libre que queda entre el borde de la copa óptica y el esbozo del cristalino. Casi siempre presentan prolongaciones citoplásmicas gruesas (foto 21).

-Células libres en el interior de la copa óptica. En este caso las células suelen ser redondeadas y las vacuolas más prominentes (fotos 19 y 20). Es en estas células donde se observan mitosis.

-Adosadas a la membrana basal del cristalino. Ya en el estadio HH16 se pueden encontrar en esa localización. Las células aparecen aplanadas y estrechamente apuestas a la lámina basal; de hecho, en

preparaciones en que esta lámina se ha desprendido del cuerpo del cristalino, la célula continúa unida a ella.

-Adosadas a la membrana basal del neuroepitelio. Entre estas células se pueden distinguir las que se encuentran en zonas de retina central y en zonas de retina más periférica. Estas últimas son semejantes a las descritas adosadas al cristalino: aplanadas sobre la superficie basal (fotos 23 y 24). En la zona de retina central, en general aparecen redondeadas o con prolongaciones radiales cortas. En las células situadas a poca distancia de la superficie vitreal, unas 10 μ , es frecuente apreciar una gruesa prolongación dirigida hacia la membrana basal (foto 9). Células en esta última zona, aunque aparecen antes (estadio HH18 por lo menos), son más frecuentes a partir del estadio HH20 y continúan presentándose al menos hasta el HH25.

La morfología diversa de estas células permite suponer que se encuentran moviéndose dentro de la copa óptica; los diferentes aspectos que presentan podrían corresponder a diversas fases de movimiento, ya sea sobre una membrana basal o en el seno de la matriz fluida que ocupa la copa óptica.

El camino que siguen parece deducirse claramente de sus diversas localizaciones. Se introducen entre el borde de la copa óptica y el cristalino, pasando a la cámara posterior del ojo. En ella pueden moverse sobre la membrana basal del neuroepitelio, la del cristalino, o directamente a través del fluido. En algunos casos se producirían mitosis, siempre en estas últimas.

La relación que puedan presentar estas células con la arteria hialoidea no es clara; en algunos casos aparecen junto a las células que forman estos vasos. No se puede excluir que en ocasiones pasen al espacio vitreal por extravasación desde la arteria, pero la entrada directamente desde el mesénquima circundante es fácilmente constatable y debe de ser la vía principal de acceso de estas células a la copa.

La frecuente disposición de células de este tipo en zonas próximas a zonas de degeneración intensa y la presencia de las agrupaciones de restos descritas más arriba, permiten suponer relaciones entre estos fenómenos. Tal vez estas células se puedan introducir en la retina y actuar como macrófagos especializados. Esta hipótesis cobra fuerza al observar células que se disponen a través del borde vitreal, presentando parte de su núcleo en el neuroepitelio y el resto en el humor vítreo (fotos 25 y 26). Células en esta situación aparecen únicamente en la zona inmediatamente dorsal a la arteria hialoidea en el momento en que ésta abandona la cámara posterior, para salir de la copa óptica ventralmente al tallo.

2.2 Actividad fosfatasa ácida

Para lograr una mejor caracterización de los supuestos fagocitos diferenciados de la retina se realizó la determinación histoquímica de la actividad del enzima fosfatasa ácida. La fosfatasa ácida, al igual que otras hidrolasas (esterasas, β -galactosidasa...), son enzimas asociados a los lisosomas y que intervienen en los procesos de digestión celular. En células que realizan fagocitosis o se están diferenciando para poseer actividad macrofágica, la actividad de dicho enzima se encuentra notablemente aumentada respecto a otros tipos celulares.

Con esta reacción histoquímica se pretende, por una parte, comprobar si en la retina en desarrollo existen subpoblaciones, en cuanto a la presencia de este enzima, entre las células neuroepiteliales, y obtener más datos acerca de las células que aparecen en la cámara posterior y su función en la retina.

Tras 16-20 h. de incubación de los cortes de 5 μ del material incluido en glicolmetacrilato, la actividad del enzima se traduce en un color rojo de distinta intensidad que aparece en algunas

células. En ellas se aprecia que la actividad se encuentra en el citoplasma, mientras que el núcleo aparece contrastado con hematoxilina. La adición al medio de incubación de fluoruro sódico (NaF) 0,01 M -inhibidor específico de la fosfatasa ácida: Ballard y Holt (1968), Gabe (1968), Namba y cols. (1983)- produce una ausencia total de los productos de la reacción. De forma similar, no aparecen células teñidas de rojo después de incubar en un medio carente de sustrato, el fosfato de naftol AS BI. Estos controles permiten afirmar la especificidad de la reacción para el enzima.

Los productos de la reacción aparecen claramente circunscritos al citoplasma y presentan diversos aspectos. En algunos casos la tinción roja es homogénea en todo el citoplasma, mientras que en otros se pueden distinguir "gránulos" de tinción más intensa (foto 31), de aproximadamente 1-2 μ de diámetro, sobre un fondo de tinción homogénea del citoplasma. Estos sitios de tinción más intensa podrían corresponder a lisosomas, mientras que la actividad difusa por todo el citoplasma puede deberse a:

-que con la metodología de fijación e inclusión empleadas se produzca rotura de la membrana lisosomal y los enzimas originalmente situados en estos orgánulos se dispersen por todo el citoplasma;

-que los productos de la reacción puedan difundir a través de la membrana lisosomal, pero no de la plasmática, lo que impediría que apareciese tinción en el espacio extracelular.

Células teñidas de rojo son relativamente frecuentes en el mesodermo cefálico y aparecen en la cámara posterior del ojo. Para intentar conocer mejor la naturaleza de estas últimas, se realizó un estudio de las situadas en el mesénquima.

La diferente morfología que presentan las células con actividad en el mesénquima, nos ha permitido catalogarlas en cuatro tipos:

A.- Células de aspecto general semejante al de las células mesenquimatosas -el principal tipo celular del mesénquima embrionario-. Su núcleo es alargado, al igual que el citoplasma, y presenta la forma fusiforme típica. La reacción positiva se aprecia claramente en estas células, siendo frecuente observar los "gránulos" de alrededor de 1 μ . No se observa que estén realizando fagocitosis, y aparecen rodeadas de células morfológicamente semejantes pero sin actividad (fotos 30 y 31).

B.- Células con citoplasma más redondeado en sección; pueden presentar prolongaciones de diverso tipo y vacuolas. También se pueden encontrar en ellas las partículas intensamente teñidas, pero son más difíciles de distinguir que en el caso anterior, ya que el citoplasma se tiñe mucho más (foto 32).

C.- Células de aspecto semejante a las anteriores, pero en las que ya pueden observarse procesos de fagocitosis. En general no presentan más de tres o cuatro restos contenidos en su citoplasma. Su actividad enzimática sigue siendo intensa. Con frecuencia se puede distinguir el núcleo del fagocito de los restos picnóticos que está digiriendo (foto 33).

D.- El último tipo corresponde a los *clusters* descritos por Ballard y Holt (1968). En ellos es mucho más difícil apreciar la presencia de un núcleo "sano", el perteneciente al macrófago. En estas formaciones pueden aparecer más de diez restos. Alrededor de todo ello se observa una tinción roja, frecuentemente más débil que en los tipos anteriores; esto permite pensar que la actividad fosfatasa es menos intensa, aunque también se ha distribuido en un volumen mayor (foto 35).

Entre los tipos C y D se pueden encontrar situaciones intermedias, en cuanto a la intensidad de la tinción y el número de restos que se distinguen en la célula.

La descripción de estos posibles tipos permite suponer una secuencia de diferenciación de macrófagos a partir de las células mesenquimales. El primer paso lo debe constituir el incremento de la actividad fosfatasa ácida, reflejo del aumento de lisosomas. La producción de éstos debe ser anterior a que la célula sufra cambios morfológicos: en lo que se ha descrito como tipo A se observa ya una tinción muy aparente y se conserva la morfología mesenquimal.

Rápidamente deben comenzar las modificaciones de la forma, ya que el tipo A de células no es muy frecuente en las preparaciones. El núcleo se hace redondeado y la célula deja de ser fusiforme. Hay un aumento considerable de actividad fosfatasa. Las células comienzan entonces a realizar fagocitosis (aunque tal vez podría hacerlo también antes) de fragmentos o de células enteras. El englobamiento de nuevos restos o la rotura de los ingeridos anteriormente hará que el citoplasma se vaya llenando de restos en diferente estado de digestión. A medida que aumenta el número de restos, la actividad debe disminuir, haciéndose más difusa. En ningún caso se han observado en el mesénquima procesos de degeneración celular no asociados a actividad del enzima.

La secuencia propuesta supone que la diferenciación de las células mesenquimales se puede iniciar sin estar en contacto con restos celulares, ya que las células de tipo A pueden encontrarse en regiones sin signos de degeneración celular previa.

Las células con actividad fosfatasa ácida son capaces de dividirse, como lo prueban las imágenes de mitosis con intensa tinción roja (foto 34). Los productos de la reacción ocupan todo el citoplasma, delimitándolo claramente. No son observables fragmentos celulares en su

interior; tal vez estas células se dividan antes de haber realizado actividad fagocítica.

También se observan células con intensa tinción en el interior de los vasos en formación; en estos casos corresponden principalmente a los tipos B y C. Son especialmente frecuentes en los vasos que se disponen alrededor de la copa óptica (foto 33).

2.3 Actividad fosfatasa ácida en la copa óptica

En los cortes en que se realizó la reacción histoquímica para la fosfatasa ácida, se pudo comprobar que todas las células que aparecen en el espacio vitreal se tiñen de rojo, manifestando que presentan esa actividad enzimática. La morfología y coloración corresponde a las células de tipo B. Se encuentran entre el cristalino y la copa óptica, la membrana basal del cristalino, libres en el espacio vitreal y adheridas a la membrana basal de la retina, con la morfología descrita anteriormente sobre cortes semifinos (fotos 36-39). Este hecho permite suponer que las células vitreales descritas en cortes semifinos pertenecen al mismo tipo celular.

Aunque, como ya se ha señalado, células con actividad enzimática son abundantes en muchos vasos, no hemos logrado apreciarlas claramente en la arteria hialoidea en su recorrido por el interior de la copa óptica.

Células con actividad fosfatasa ácida aparecen ya en el estadio HH17, primero en el que hemos realizado la reacción histoquímica. Como en estadios anteriores hay células de morfología semejante, es probable que desde el inicio de la copa óptica, estadio HH14, haya células con actividad enzimática en el ojo. En el estadio HH17 se aprecian fácilmente signos de degeneración celular en la retina neural, pero no aparece en ella tinción roja que manifieste el enzima, que por otra parte es abundante en otras partes del preparado.

A partir del estadio HH19 y hasta el HH24, por lo menos, aparecen células con actividad en el neuroepitelio de la retina (fotos 40-43). Son células de mayor tamaño que las neuroepiteliales y presentan variaciones en el volumen de restos que contienen y en la intensidad de la tinción que presentan. Corresponden a los tipos C y D del mesénquima. Predominan sobre todo estas últimas, presentando abundante número de restos y actividad no muy intensa. Entre las células con menos restos y con reacción más intensa, algunas muestran un proceso dirigido hacia la membrana vitreal que puede tratarse de la porción de citoplasma más retrasada en el movimiento celular (foto 41). En cada retina de estos estadios aparecen de una a cuatro células con actividad fosfatasa.

Estas células se encuentran en la zona de más intensa degeneración celular en estos estadios: a nivel del tallo óptico o en una zona de 100 μ dorsalmente a él. Aparecen siempre, por tanto, en zonas en que hay diferenciación de fibras ópticas y más o menos en relación con ellas; en general se sitúan inmediatamente por debajo (más escleralemente) de los axones o parcialmente incluidas en esta capa de fibras (fotos 41-43).

En esta misma región encontramos otros fragmentos, tanto aparentemente libres como englobados por células neuroepiteliales, también en mitosis. En estos casos no se aprecia actividad enzimática. Por tanto, la reacción roja solo se presenta en células que se apartan de la morfología de las neuroepiteliales, y que parecen provenir del humor vítreo.

En este sentido, se pueden observar células con actividad que se encuentran entre la retina y el espacio vitreal, de manera que parecen estar entrando a la retina neural (fotos 44 y 45); estas zonas de retina coinciden con la existencia de una capa de fibras ópticas más

desarrollada y corresponde a la salida de la arteria hialoidea de la copa óptica. Por tanto, esta zona es la misma que la que se ha descrito para las imágenes de la entrada de células en la retina en cortes semifinos.

FOTOGRAFIAS

Foto nº 1: Retina central. Estadio HH19. Se pueden observar algunas células diferenciadas morfológicamente cerca del borde vitreal del neuroepitelio, y algunos axones (flechas) discurriendo paralelamente a la membrana basal. Aparecen algunos restos celulares dispersos y dos células con signos de diferenciación inicial (flechas gruesas). x800.

Foto nº 2: Retina central. Estadio HH20. Impregnación argéntica. Aparecen axones teñidos (flechas) en la zona del futuro disco óptico. x600.



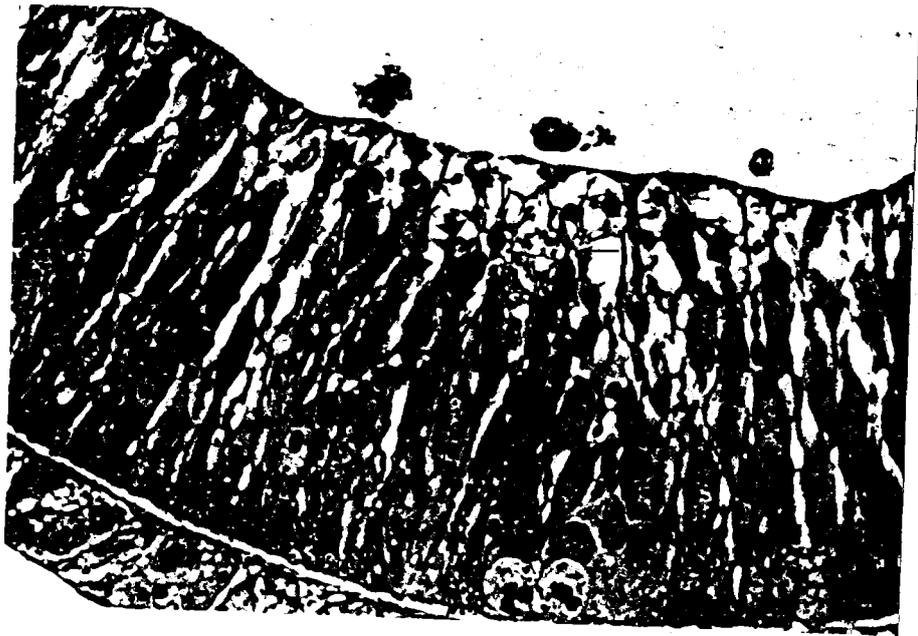
1



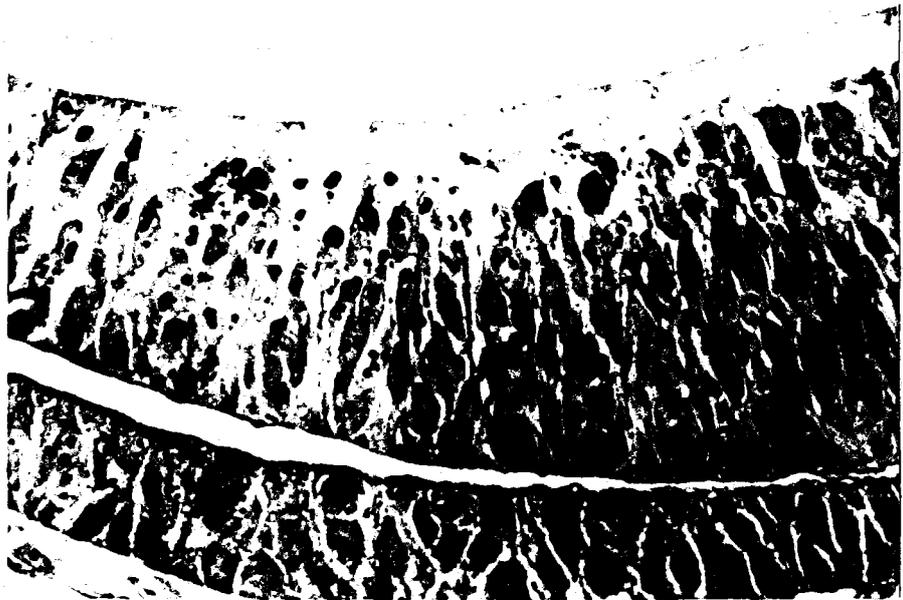
2

Foto nº 3: Retina central. Estadio HH21. Se pueden observar núcleos picnóticos, tanto en degeneración inicial (flechas gruesas), como en fases más avanzadas, con un núcleo más condensado. En esta zona se aprecian algunos fascículos (flechas). Enfrente de esta zona con degeneración intensa, aparecen tres células en el humor vítreo. x800.

Foto nº 4: Estadio HH24. Restos celulares situados en la retina ventral. x700.



3



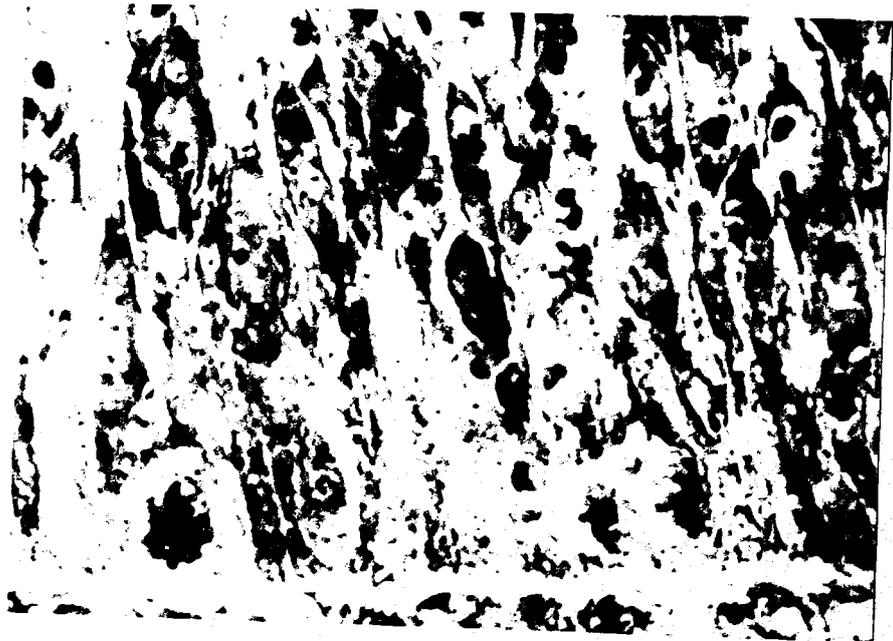
4

Foto nº 5: Retina central. Estadio HH19. Célula que presenta los rasgos iniciales de la degeneración. Se observa la condensación de la cromatina en la periferia del núcleo, el nucléolo aparentemente normal, y la fragmentación del citoplasma. ×2000.

Foto nº 6: Retina central. Estadio HH21. Célula en degeneración inicial. ×1600.



5



6

Foto nº 7: Retina periférica. Estadio HH24. Célula en degeneración que presenta características distintas a las de la retina central. ×1800.

Foto nº 8: Retina central. Estadio HH19. Célula en degeneración inicial que aparece junto a células diferenciadas, y que presenta las mismas características de éstas. ×2000.



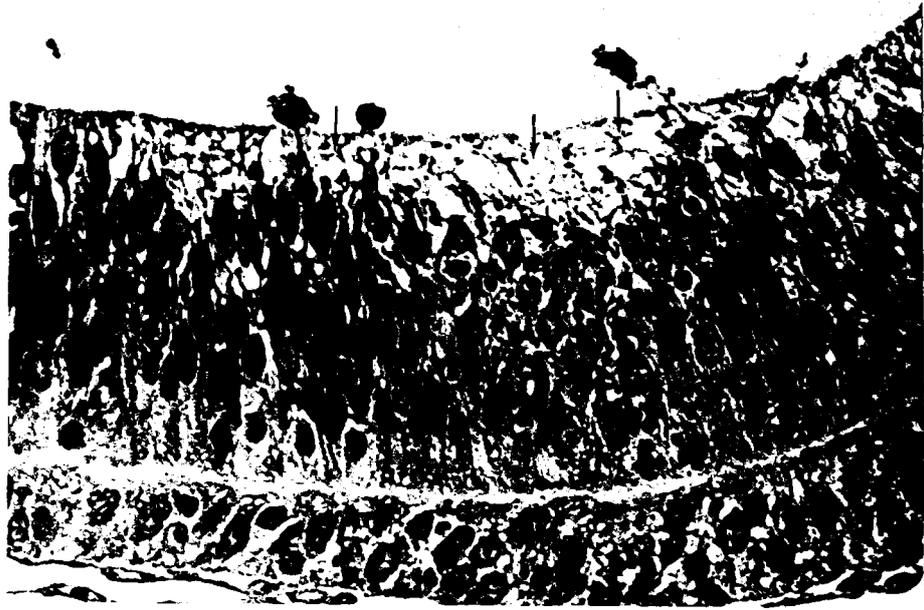
7



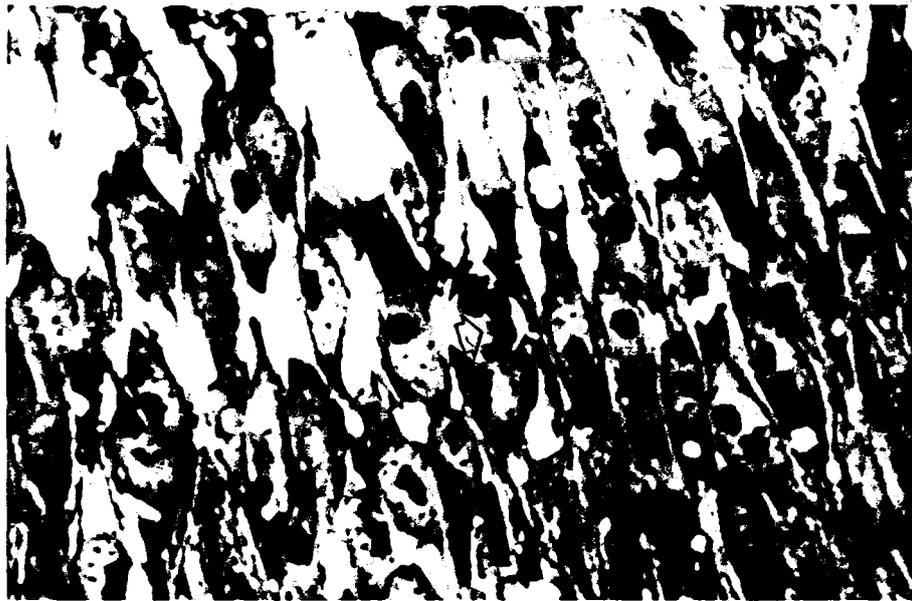
8

Foto nº 9: Retina central. Estadio HH22. Zona de intensa degeneración asociada a la presencia de fibras (flechas). Muchos de los restos aparecen alineados, sugiriendo que proceden de la fragmentación de una misma célula. Aparecen dos células adosadas al borde vitreal, y una tercera emite una prolongación hacia la retina. x800.

Foto nº 10: Retina central. Estadio HH23. Fragmento celular incluido por una célula neuroepitelial. En el fagosoma se aprecia una zona poco teñida, que debe corresponder a material citoplásmico, dos cuerpos muy pichóticos, y otro (flecha), que tiene la misma apariencia que el nucléolo de las células vecinas. x1800.



9



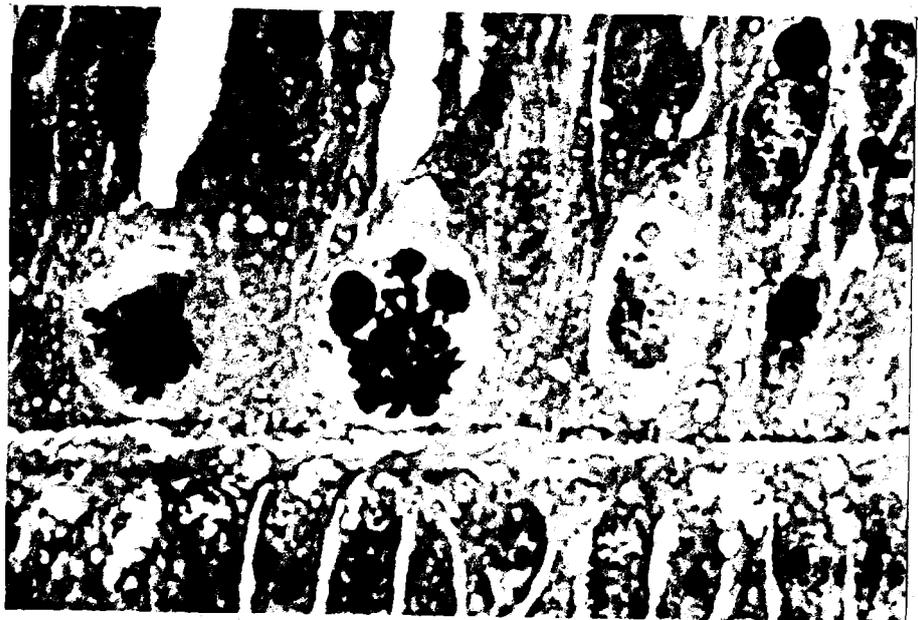
10

Foto nº 11: Retina central. Estadio HH19. Anafase en la que se aprecia un único grupo de cromosomas y que presenta un fragmento celular incluido. x2000.

Foto nº 12: Retina central. Estadio HH22. Metafase que contiene varios restos celulares.



11



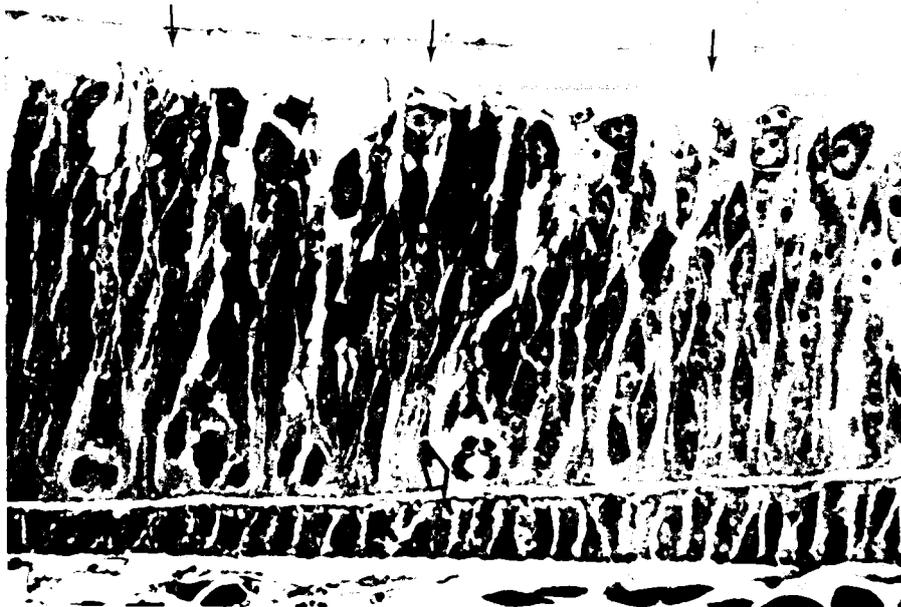
12

Foto nº 13: Retina central. Estadio HH19. Célula con diferenciación morfológica que presenta un fagosoma. x1900.

Foto nº 14: Retina central. Estadio HH24. Anafase (flecha gruesa) con dos fragmentos celulares incluidos. Se aprecia también una capa bastante definida de células ganglionares y la capa de fibras ópticas (flechas); el tallo se encontraría a la derecha de la foto. x800.



13



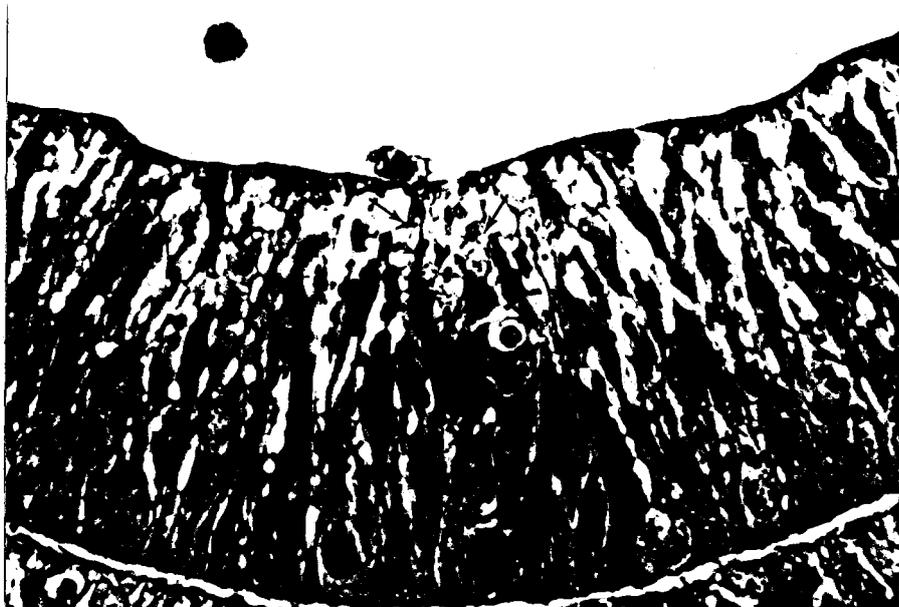
14

Foto nº 15: Retina central. Estadio HH22. Corte horizontal que pasa por la región del disco óptico. Aparece un paquete de restos cerca de los haces de fibras que abandonan la retina (flechas). ×700.

Foto nº 16: Retina central. Estadio HH22. Paquetes de restos cercanos a los haces de fibras (flechas), que discurren hacia el tallo. ×800.



15



16

Foto nº 17: Ampliación de la foto nº 15. Se observa una célula en degeneración inicial (flecha llena) y un paquete de restos que contiene abundantes fragmentos; en este último, se aprecia un núcleo aparentemente normal (flecha vacía). ×1900.

Foto nº 18: Retina central. Estadio HH23. Varios paquetes de restos próximos a la zona de fibras. Uno de los paquetes (flecha) parece incluido por una célula neuroepitelial. ×1800



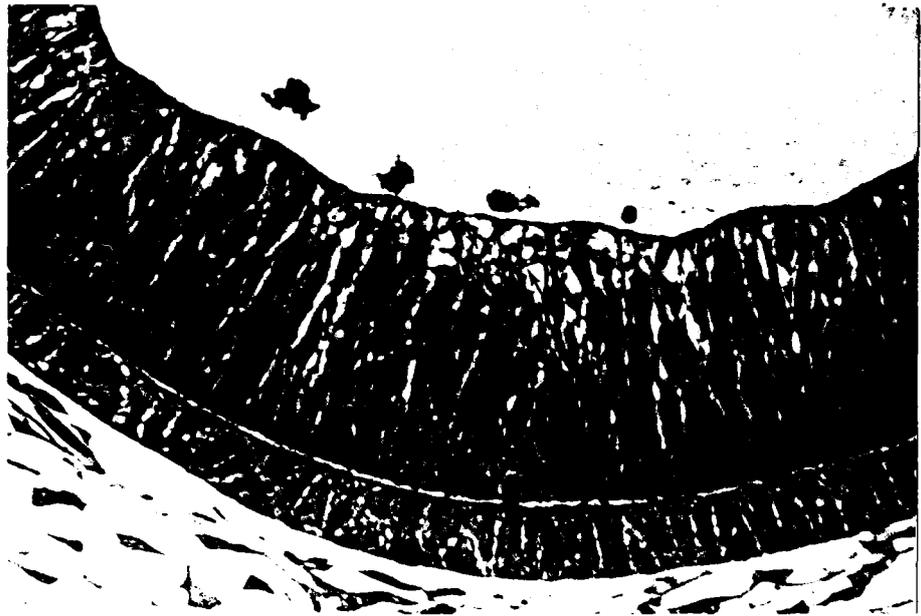
17



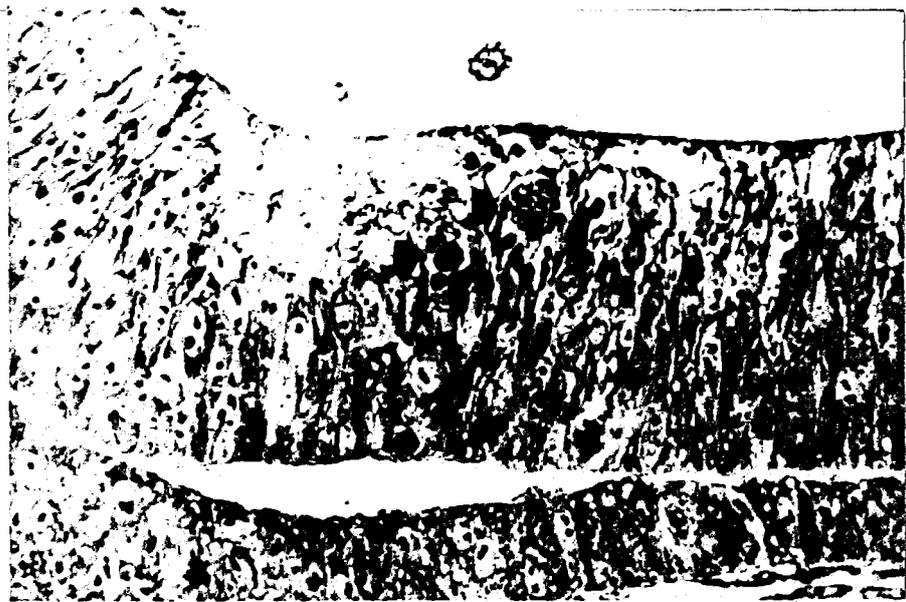
18

Foto nº 19: Retina central. Estadio HH21. Tres células en el humor vitreo, enfrentadas a una zona con intensa degeneración, y en la que se pueden apreciar fibras (flechas). x450.

Foto nº 20: Región del disco óptico. Estadio HH23. Contiguos a la zona de fibras aparecen dos paquetes de restos (flechas). En el humor vitreo se puede observar un macrófago que presenta cortas prolongaciones citoplásmicas. x600.



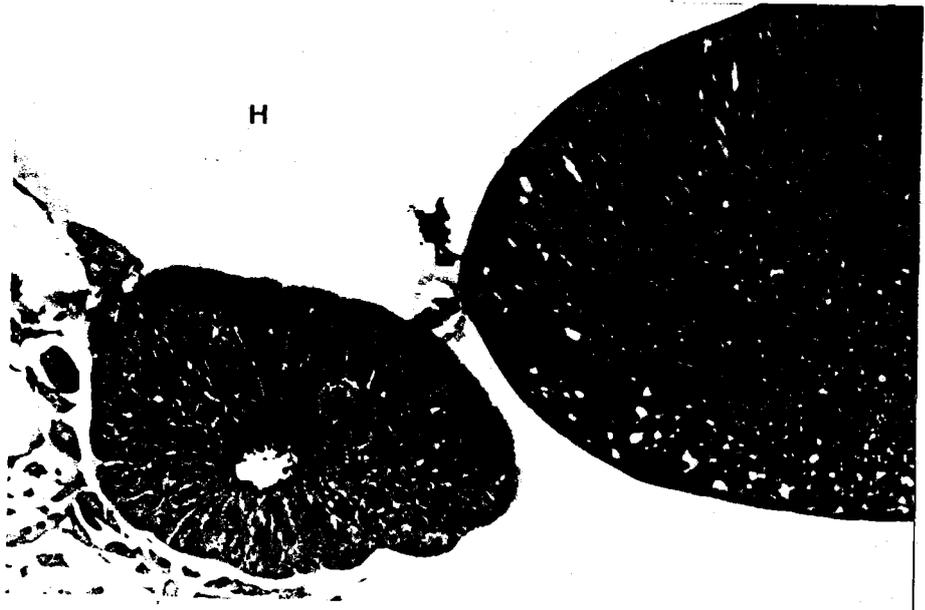
19



20

Foto nº 21: Retina periférica. Estadio HH21. Macrófago en las proximidades del cristalino y borde de la copa óptica; de esta última sólo se aprecia un fragmento, por estar interrumpida por la fisura óptica. H, humor vítreo. x450.

Foto nº 22: Copa óptica. Estadio HH22. Célula en metafase en el humor vítreo. En la parte inferior se aprecia la retina central.



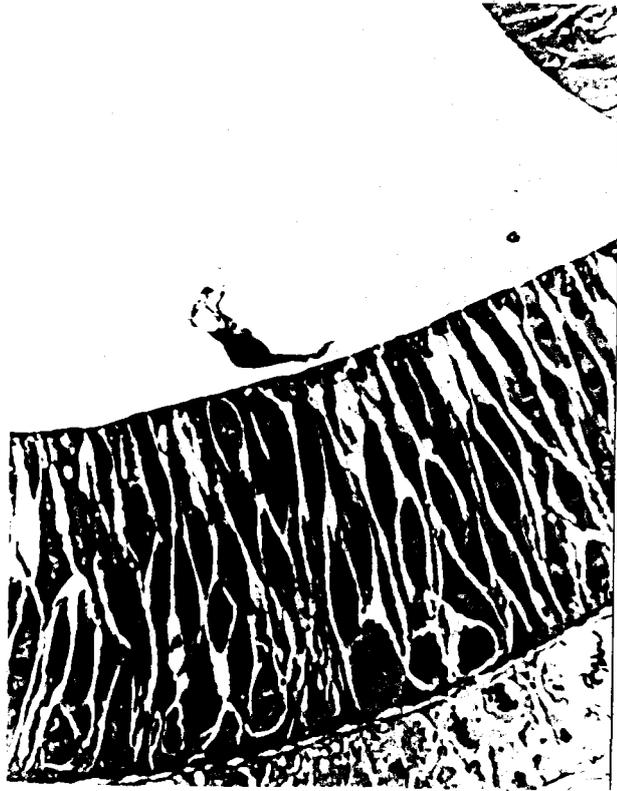
21



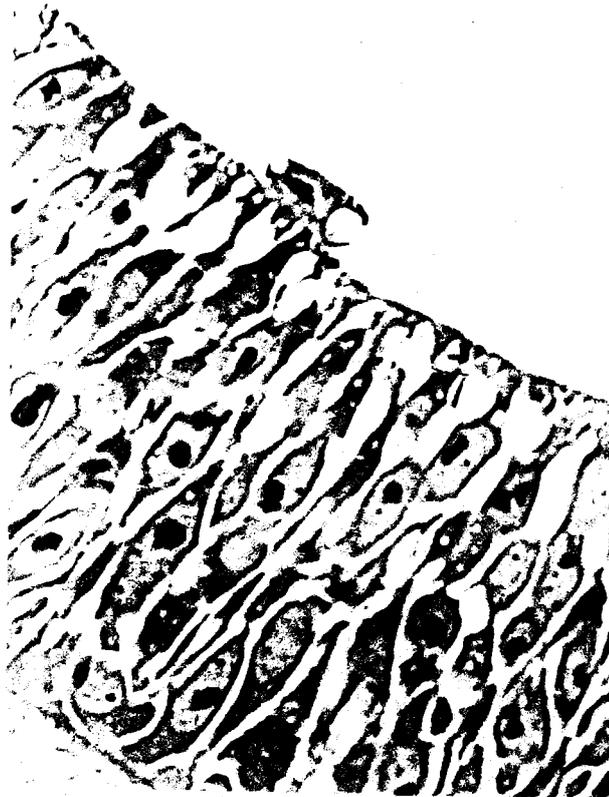
22

Foto nº 23: Retina periférica. Estadio HH22. Macrófago cerca de la membrana basal del neuroepitelio, presentando dos prolongaciones citoplásmicas gruesas, una de ellas con vacuolas. ×700.

Foto nº 24: Retina periférica. Estadio HH21. Célula adosada a la membrana basal del neuroepitelio. ×1400.



23



24

Foto nº 25: Retina central. Estadio HH22. Célula (flecha gruesa) junto a la membrana basal del neuroepitelio, entre éste y la arteria hialoidea (indicada por una estrella). Se observan haces de fibras en el disco óptico. x700.

Foto nº 26: Sección horizontal al ojo a nivel del disco óptico. Estadio HH23. Fijación en Carnoy. Célula (flecha) que presenta parte de su núcleo en el interior del neuroepitelio y el resto en el humor vítreo. En el humor vítreo se observan células -una de ellas en mitosis-, que están en relación con la arteria hialoidea, como se comprueba de la observación del corte siguiente. x800.



25



26

Foto nº 27: Retina central. Estadio HH21. Micrografía electrónica de una célula en degeneración inicial. Se aprecia la mayor densidad del citoplasma y carioplasma, el retículo y la envuelta nuclear dilatados, y numerosas vesículas. Aparecen tres condensaciones cromatínicas que hacen protusión en el contorno del núcleo. El nucléolo no presenta características anormales. ×10000.



27

Foto nº 28: Retina central. Estadio HH21. Micrografía electrónica que muestra un fagosoma incluido en una célula neuroepitelial, cerca del núcleo. ×9000.

Foto nº 29: Retina central. Estadio HH21. Fagosoma incluido en una célula neuroepitelial. Aunque el contenido aparece ya en digestión avanzada, se puede reconocer una mitocondria (flecha). ×16000.



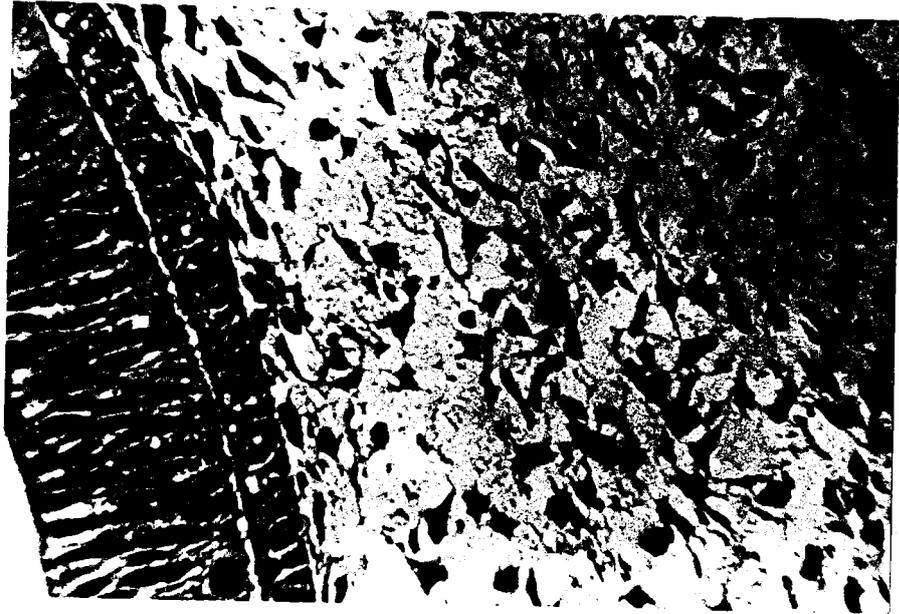
28



29

Foto nº 30: Mesénquima cefálico. Estadio HH22. Fosfatasa ácida. Se aprecia una célula (flecha) con morfología semejante a la de las mesenquimales, y que presenta actividad fosfatasa. ×500.

Foto nº 31: Ampliación de la anterior. Se observa que el citoplasma contiene puntos de tinción más intensa, lo que sugiere la localización lisosomal de la reacción. ×2000.



30



31

Foto nº 32: Mesénquima cefálico. Estadio HH22. Célula con intensa actividad fosfatasa (flecha) que presenta una morfología claramente diferenciada de la de las células mesenquimatosas. ×1800.

Foto nº 33: Mesénquima cefálico. Estadio HH22. Células con actividad enzimática en el interior de un vaso de la futura esclera. Una de ellas (flecha) contiene algunos restos. ×500.



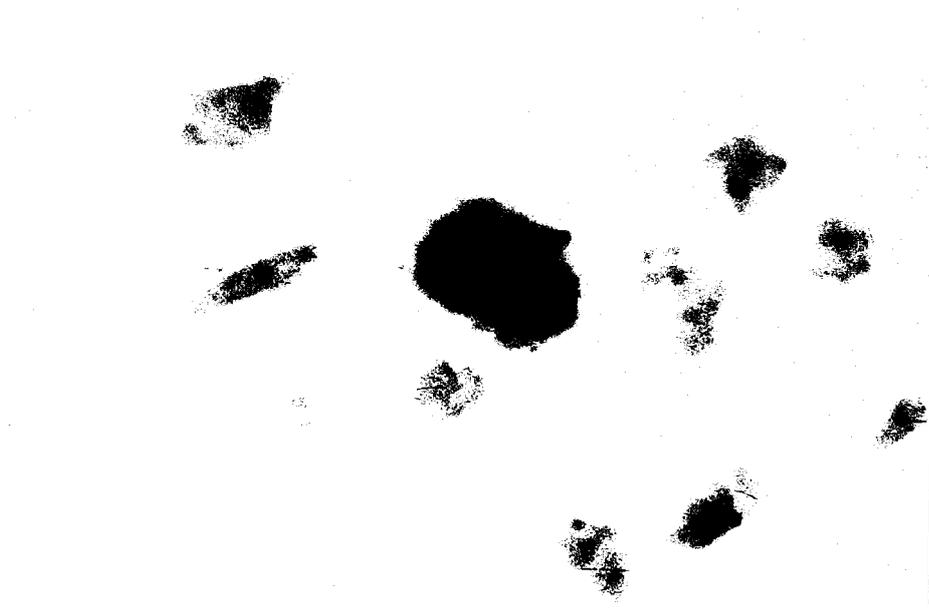
32



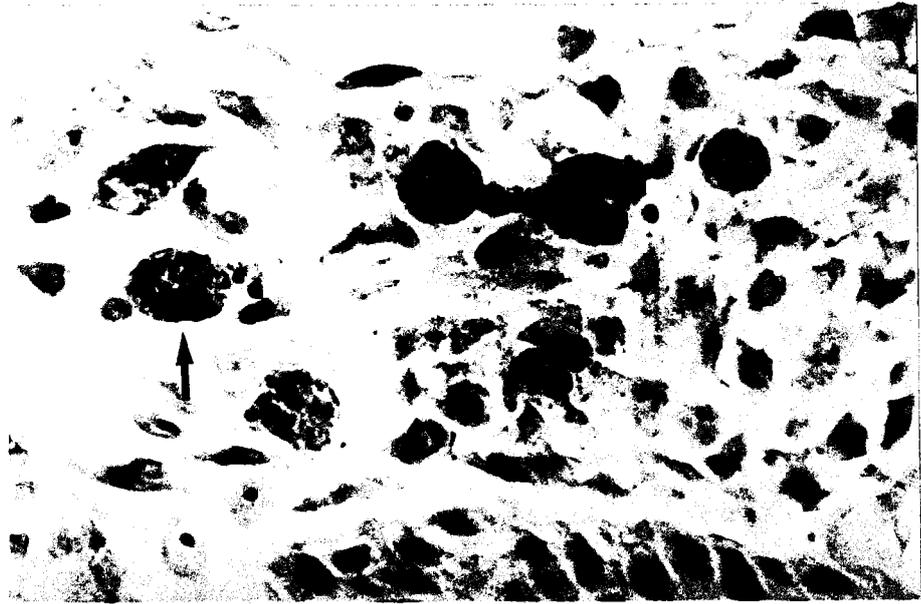
33

Foto nº 34: Mesénquima cefálico. Estadio HH22. Célula en anafase con intensa actividad enzimática. ×2000.

Foto nº 35: Mesénquima cefálico. Estadio HH21. Aparecen varios paquetes de restos con diferente intensidad de reacción enzimática y que contienen abundantes fragmentos. En uno de ellos (flecha) se distingue un núcleo aparentemente normal. ×1000.



34



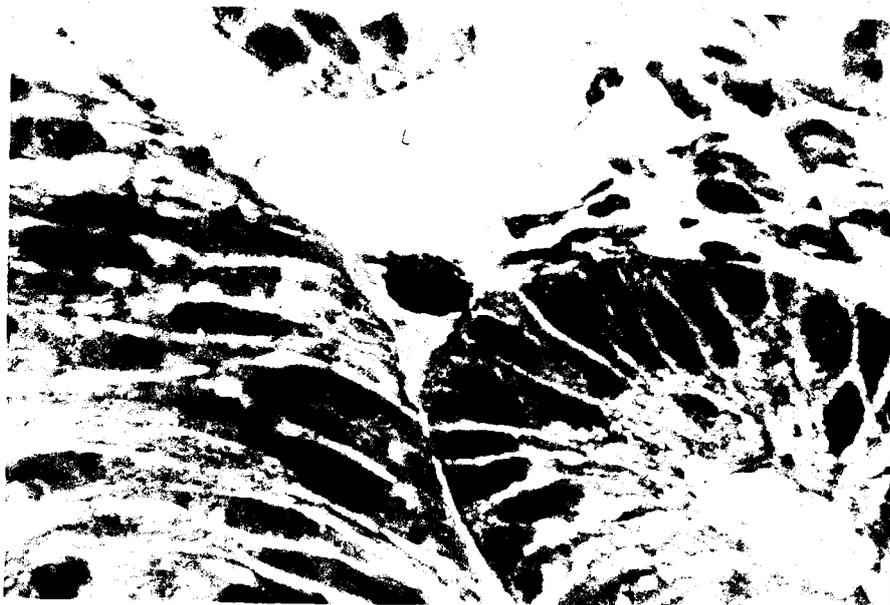
35

Foto nº 36: Borde de la copa óptica. Estadio HH22. Célula con actividad fosfatasa que parece haber abandonado el mesénquima (flecha), situada entre el cristalino, a la izquierda, y el borde de la copa óptica. ×600.

Foto nº 37: Ampliación de la anterior. ×1800.



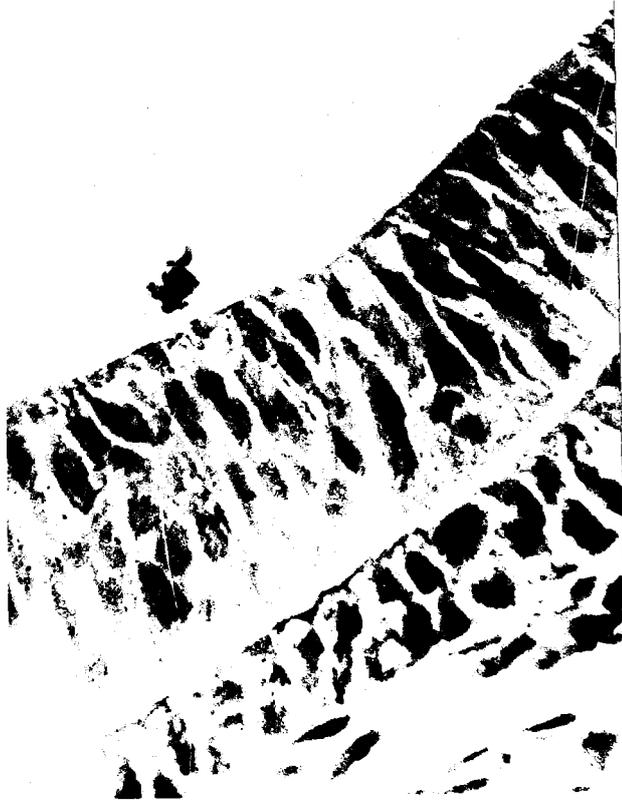
36



37

Foto nº 38: Retina periférica. Estadio HH22. Célula con actividad enzimática próxima al neuroepitelio. x800.

Foto nº 39: Retina central. Estadio HH20. Célula con actividad fosfatasa ácida cerca de la membrana basal de la retina. x2000.



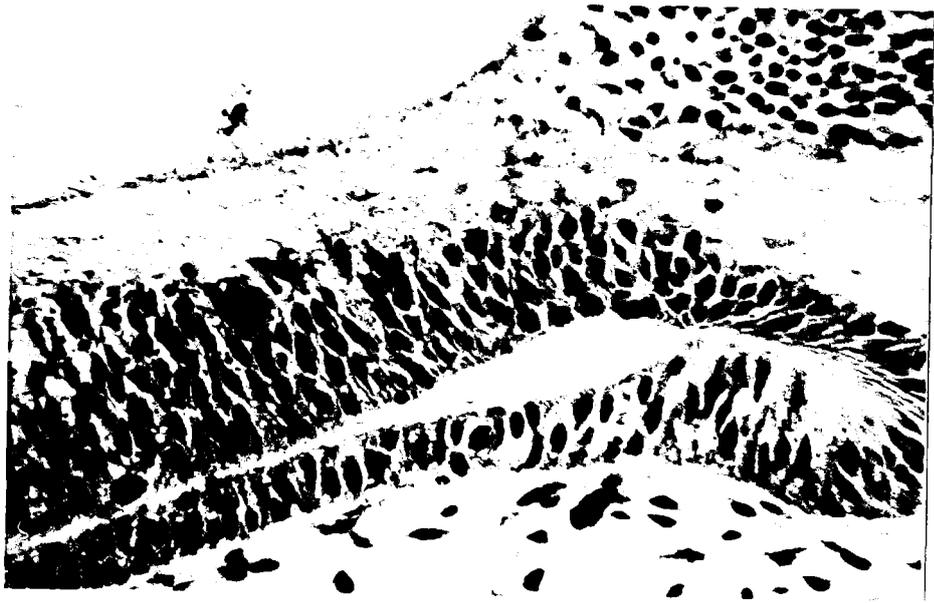
38



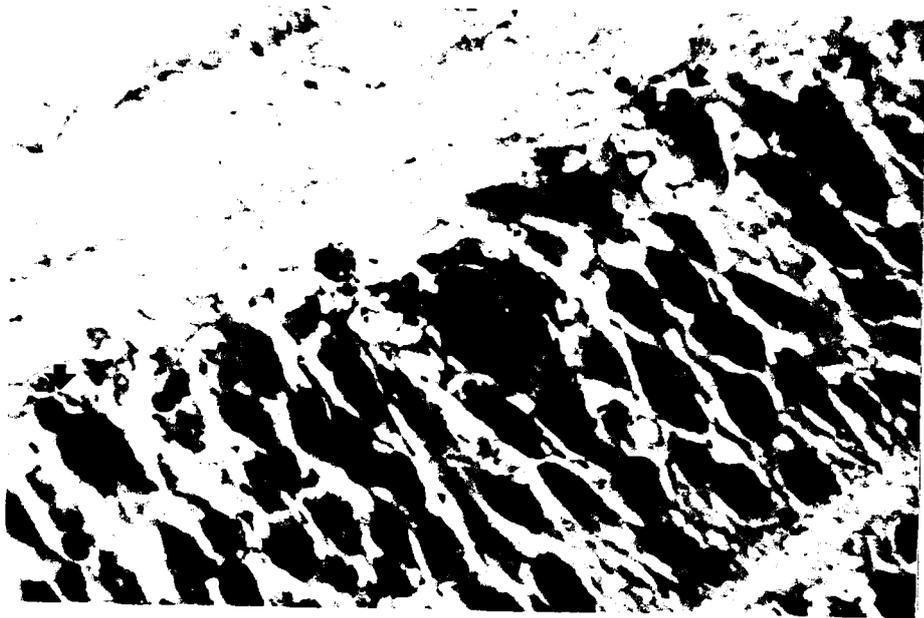
39

Foto nº 40: Retina central. Estadio HH21. Célula con intensa actividad fosfatasa dentro de la retina, situada en la zona del disco óptico. x700.

Foto nº 41: Ampliación de la anterior. El macrófago no contiene muchos restos. Los fragmentos celulares que aparecen en esta zona, ya sea libres o incluidos en células neuroepiteliales (flechas), no manifiestan reacción enzimática. x1800.



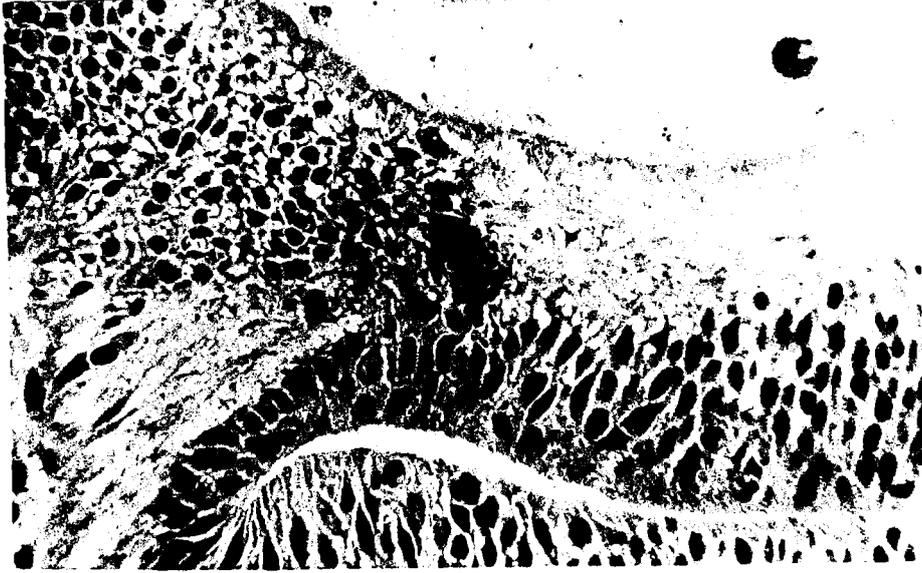
40



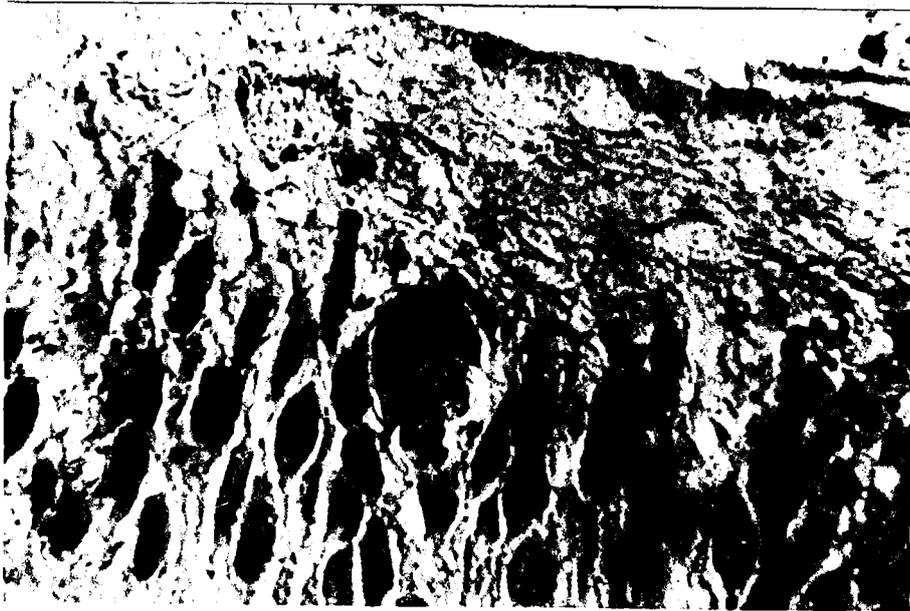
41

Foto nº 42: Retina central. Estadio HH22. Macrófago cargado con abundantes restos, en la zona del disco óptico. La actividad enzimática es poco intensa. ×700.

Foto nº 43: Retina central. Estadio HH22. Macrófago con actividad difusa y abundantes restos incluidos. ×1800.



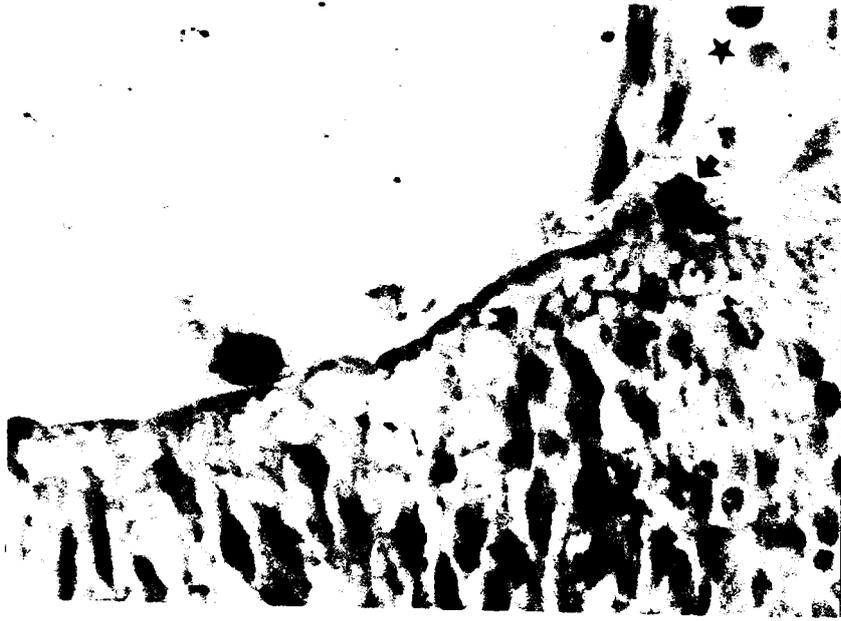
42



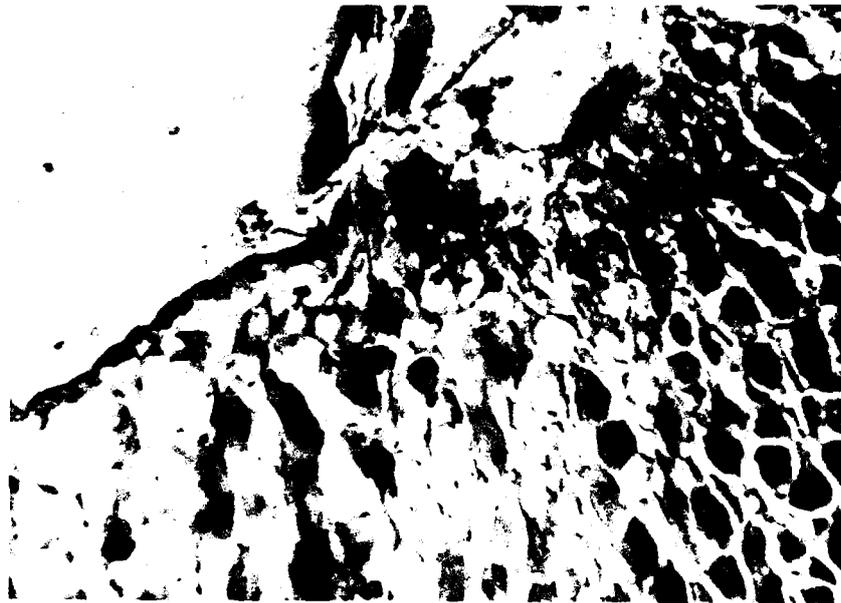
43

Foto nº 44: Retina central. Estadio HH22. Dos macrófagos junto a la membrana basal de la retina. Uno de ellos (flecha) está prácticamente dentro del neuroepitelio, en la zona de salida de la arteria hialoidea (indicada por una estrella). ×1000.

Foto nº 45: Ampliación de la anterior. ×1500.



44



45

3.-DISTRIBUCION DE LA MUERTE CELULAR EN LOS ESTADIOS HH16-25

3.1 Muerte celular en los estadios HH16-17

Durante los estadios HH16 y 17, el esbozo óptico presenta ya su morfología de copa -copa óptica- y se aprecia, aún no muy desarrollada, la fisura óptica en su parte ventral.

Se puede distinguir la zona central de la retina y la periférica. En la primera se aprecian, bajo el borde vitreal, zonas de espacio extracelular, que está ocupado en el embrión vivo por una matriz. Los citados espacios pueden aparecer como consecuencia del engrosamiento del neuroepitelio en esta zona, y de que los núcleos, en su migración intercinética, no alcanzan la membrana basal del neuroepitelio; sin embargo, en las zonas periféricas se observan núcleos en el mismo borde vitreal. En niveles más apicales (esclerales) los espacios extracelulares son mucho menores y el neuroepitelio no difiere del de las zonas periféricas.

En las retinas del estadio HH17 son ya observables células de núcleo redondeado y más claro que el de las células neuroepiteliales, que hasta este momento han sido el único tipo celular presente en la retina. Son neuronas jóvenes en diferenciación, que dan lugar a las

células ganglionares maduras. Su número es escaso y en estos preparados no es mayor de quince.

Goldberg y Coulombre (1972), Suburo y cols. (1979), y Krayanek y Goldberg (1981), afirman que en estos estadios no hay axones que discurren por la retina. Halfter y cols. (1985), sin embargo, señalan que ya en el estadio HH16 se pueden observar los primeros axones -muy cortos- que acaban de originarse. De cualquier manera, el área que ocupan estas fibras apenas tiene importancia en relación al desarrollo de la retina en ese momento, y se puede considerar a la retina como preaxónica.

Durante este periodo, en la capa retiniana de la copa óptica aparecen dos zonas diferenciadas de muerte celular, que han sido descritas, respectivamente, por Schook (1980a,c) y por García Porrero y cols. (1984). Esta última se presenta en la parte dorsal de la retina, inmediatamente sobre el esbozo del cristalino. La primera, mucho más abundante en restos celulares, se localiza en la retina central, abarcando prácticamente toda la extensión de la zona posterior de la retina.

En general, los restos que aparecen en esta zona lo hacen en forma dispersa; raramente, en secciones horizontales, se encuentran más de tres o cuatro restos por corte. Únicamente se hace más abundante en una zona que abarca entre las 30 y 70 μ a partir de la inserción del tallo, dorsalmente a él. En esta región pueden llegar a aparecer hasta 10-15 fragmentos por sección, que parecen proceder de la degeneración de tres o cuatro células distintas, al menos. Aparte de esta zona, la degeneración se da en células aisladas.

El número de restos que se encuentran en toda la zona posterior de la retina varía entre los distintos ejemplares estudiados, a pesar de haberlos catalogado en el mismo estadio de Hamburger y Hamilton (1951), de que presenten la misma morfología del esbozo

óptico, o, incluso, de que se trate de las dos retinas de un mismo embrión.

Aunque los resultados (tabla 1; fig. 1) parecen señalar una mayor presencia de restos en el estadio HH16, la naturaleza del proceso que estamos considerando no permite establecer estas diferencias y es preferible considerar todos estos datos de forma conjunta, sobre todo refiriéndolos a que, en cuanto a la diferenciación, la retina neural presenta características semejantes.

Independientemente de las diferencias numéricas, a veces hasta del 100%, la distribución de los restos en la retina es muy constante y se ajusta a lo que Schook (1980a) llama zona ventral de degeneración, que corresponde a la zona comprendida en unas 80-100 μ de la inserción del tallo.

La representación gráfica (fig. 2) del número de restos respecto a la situación del tallo óptico permite apreciar como casi todos aparecen entre las 20 y 100 μ , existiendo un máximo de degeneración en el punto medio. Aunque más dorsalmente aparecen algunos restos, se encuentran dispersos, sin formar una zona de degeneración tan concreta.

<u>Estadio HH</u>	<u>T. incubación</u>	<u>nº restos</u>	<u>media ± e.s.</u>
16	51-56 h.	116	
16		120	165,0 ± 30,6
16		177	
16		247	
17	52-64 h.	113	
17		127	98,3 ± 22,0
17		55	
18	65-69 h.	196	
18		190	166,7 ± 26,4
18		114	
19	68-72 h.	111	
19		149	162,2 ± 20,3
19		201	
19		188	
20	70-72 h.	380	
20		651	894,0 ± 386,5
20		1.651	
21-22	3-3,5 d.	1.089	
21-22		1.157	
21-22		1.237	1.325,6 ± 107,8
21-22		1.477	
21-22		1.668	

Estadio HH T. incubación nº restos media ± e.s.

23	3,5-4 d.	1.667	
23		1.536	1.595,0 ± 38,3
23		1.582	
24	4 d.	2.313	2.103,5 ± 209,5
24		1.894	
25	4,5 d.	1.965	1.630,0 ± 335,0
25		1.295	

Fig. nº 1: Representación gráfica del número total de restos contados en la región central (más diferenciada) de la retina (ordenadas), respecto al estadio de Hamburger y Hamilton (1951) (abscisas). Cada punto corresponde a la media de los valores indicados para cada estadio en la tabla 1; las barras verticales representan el error *standard*.

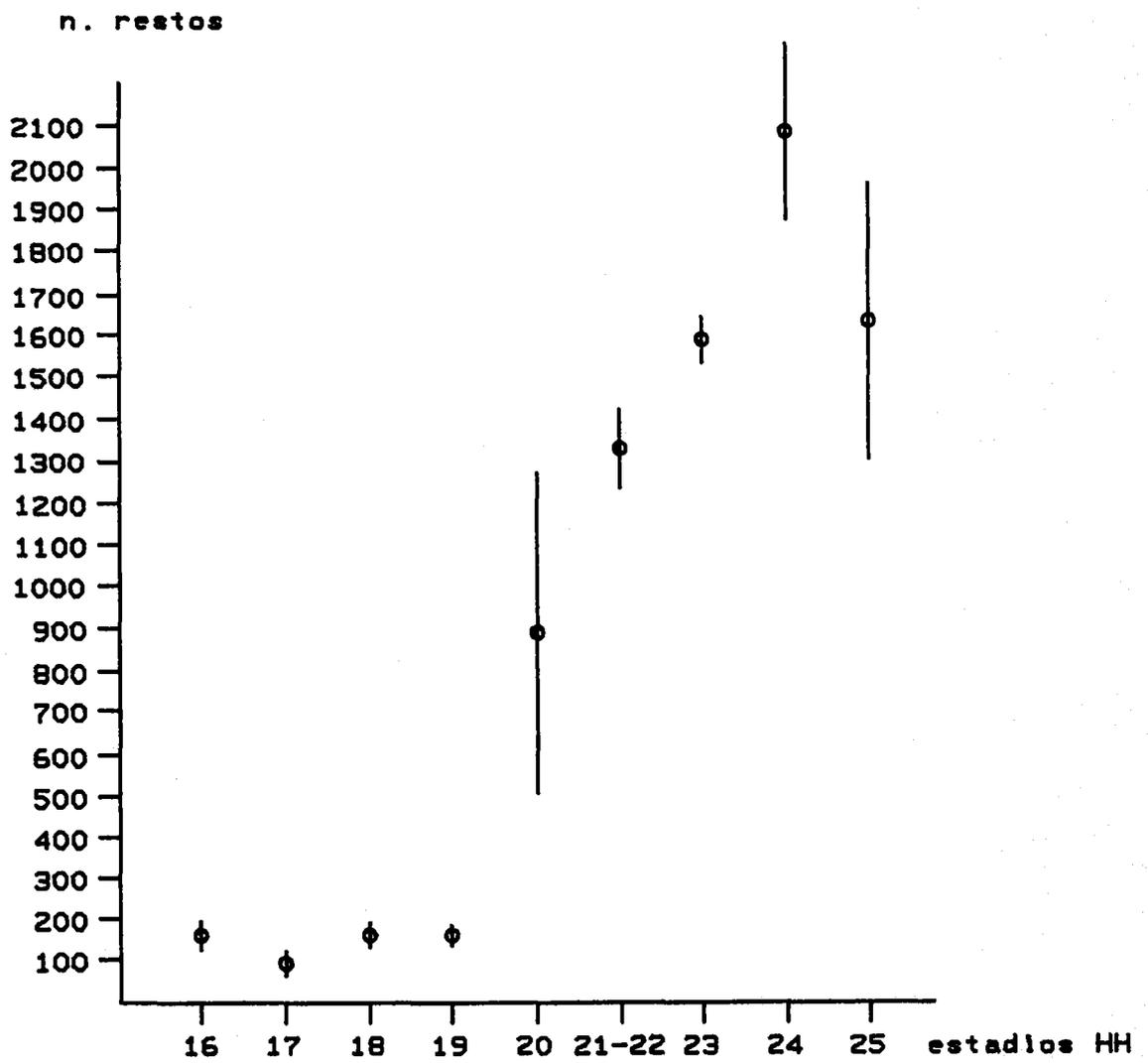
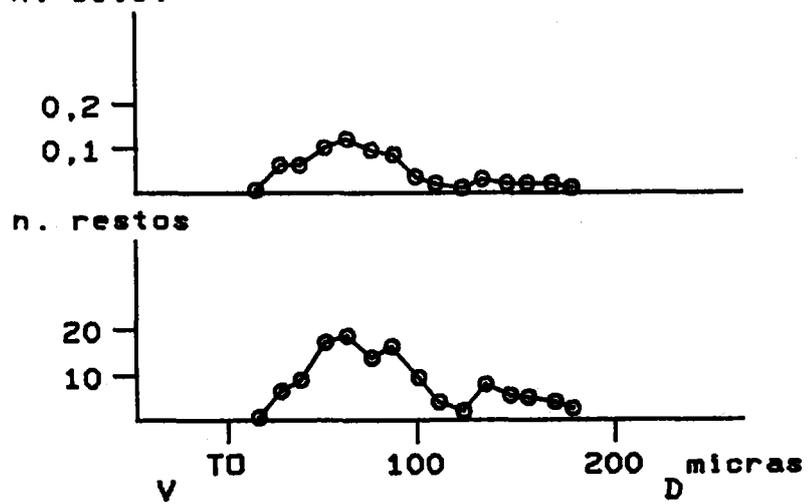


Fig. nº 2: Representación gráfica de la distribución de restos celulares a lo largo de la retina central de un embrión del estadio HH17. La gráfica inferior corresponde al número absoluto de restos en cada bloque de 12 μ , y la superior a la proporción número de restos/número total de células.

D: dorsal; V: ventral; TO: nivel del primer corte en que aparece tallo óptico.

n. restos
n. cels.



3.2 Muerte celular en los estadios HH18-19

En los estadios HH18 y 19 se puede apreciar claramente la presencia de células diferenciadas en el borde vitreal de la retina, en su región central (foto 1). Estas células ganglionares en maduración emiten ya sus axones en dirección al tallo óptico, alcanzándolo al final del HH19.

En las preparaciones de cortes semifinos de material postfijado en osmio, se observan en el polo posterior de la retina algunos fascículos poco nutridos. La naturaleza axónica de estas prolongaciones se deduce de su situación y orientación, y de su correspondencia con las fibras que aparecen teñidas en retinas en que se realizó impregnación argéntica. Aunque en esta región aparecen abundantes espacios extracelulares, y se afirma que se disponen formando túneles orientados en la dirección del tallo (Krayanek y Goldberg, 1981), a nivel de este último no se observan fibras. Los fascículos se harán patentes en esta región a partir de estadios ligeramente posteriores.

La muerte celular continúa siendo más abundante en el polo posterior de la retina y apenas afecta a la retina periférica, excepto los escasos restos que aparecen en la zona descrita por García Porrero y cols. (1984). La mayor frecuencia de restos sigue apareciendo entre las 30 y 100 μ , dorsalmente al tallo. En los embriones más avanzados se hacen más frecuentes las células muertas situadas más cerca del tallo. En dos retinas de las ocho estudiadas en estos estadios, se han observado algunos restos en la retina ventral. En general, el número de restos parece que se incrementa respecto al estadio HH17, aunque con las mismas reservas que las expresadas anteriormente; no parece haber diferencias significativas entre estos dos estadios.

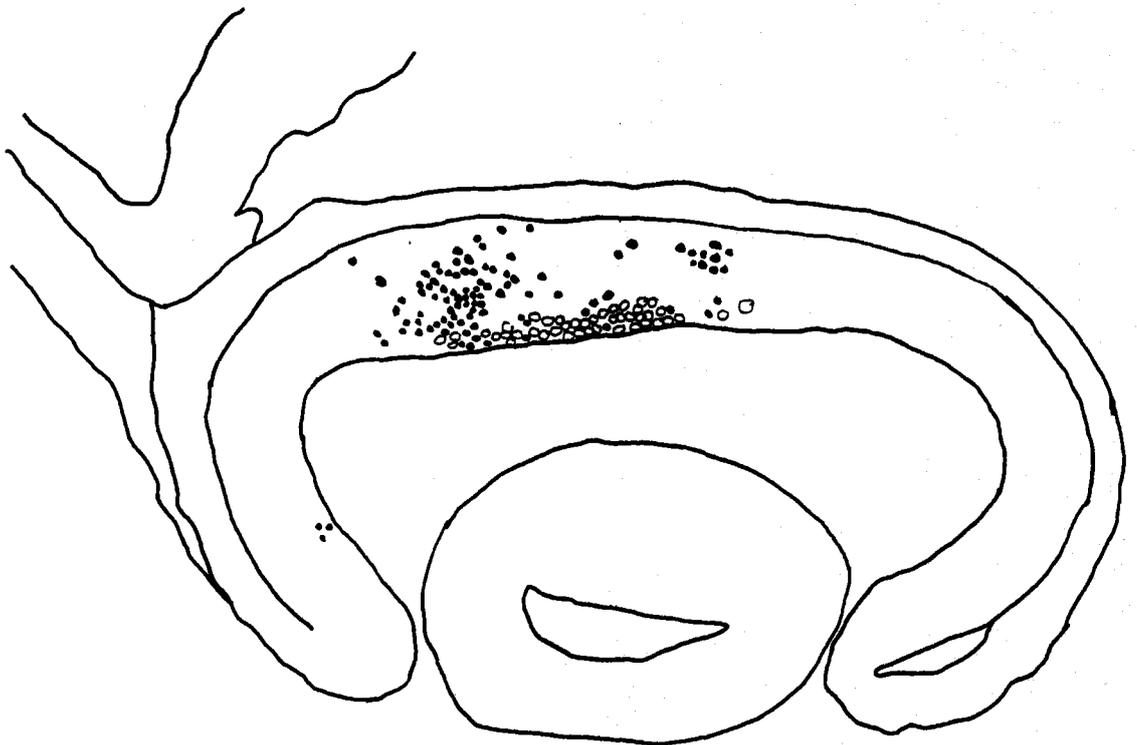
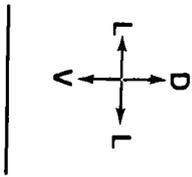
Las figura 3 representa la situación de los restos celulares en las dos retinas de un embrión del estadio HH19. Se distinguen dos

áreas de distinta densidad de muerte celular en la retina central. La primera, mucho más intensa, se dispone entre el tallo y la zona en que se observan las primeras células ganglionares. La segunda, más escasa, es más dorsal, aunque siempre en una zona con diferenciación aparente de ganglionares. Como sucedía en estadios anteriores, no aparece muerte celular a nivel del tallo óptico.

Unicamente aparecen cuatro o cinco células en degeneración inicial. Aparecen en las dos zonas descritas; sin embargo, mientras que en la primera se pueden observar a diversa altura dentro del neuroepitelio, en esta última se sitúan próximas al borde vitreal, al mismo nivel que las células ganglionares. Este hecho pudiera significar que las células que degeneran en la zona más dorsal están en proceso de diferenciación, mientras que las más próximas al tallo son sobre todo células neuroepiteliales indiferenciadas. El escaso número de estas células que se observa en cada retina no permite una certeza absoluta acerca de estas suposiciones.

Fig. nº 3: Distribución de restos celulares (puntos negros) y células ganglionares (círculos vacíos) en las dos retinas de un embrión HH19.

Tanto en este dibujo como en los siguientes la barra corresponde a 100 μ . D: dorsal; V: ventral; L: lateral; M: medial; N: nasal; T: temporal.



3.3 Muerte celular en el estadio HH20

En estadios anteriores el desarrollo del ojo está bien caracterizado por diferencias morfológicas claras, como son la relación entre el ectodermo cefálico y el esbozo del cristalino, el grado de invaginación de la copa óptica y las relaciones entre su capa interna y externa o la diferenciación de las fibras del cristalino. A partir del estadio HH20, sin embargo, el ojo presenta características más constantes, al menos hasta el estadio HH24, y los cambios que sufre corresponden sobre todo a crecimiento y diferenciación.

Las células ganglionares aumentan rápidamente en número, observación realizada también con autorradiografía por Kahn (1973), de manera que comienza a distinguirse una capa de células diferenciadas, discontinua, en la región vitreal del neuroepitelio. Entre estas células y el borde vitreal se pueden distinguir algunos haces de fibras ópticas, poco nutridos (foto 2). Las fibras se aprecian en la región prospectiva del disco óptico, e incluso en la región ventral del tallo, sobre todo, proximalmente.

Coincidiendo con esta fase de incremento de la presencia de fibras nerviosas en la retina, hay un claro aumento de la muerte celular. En distintas retinas del estadio HH20 el número de restos oscila entre unos 350 y 1.600 (tabla 1). Estos datos permiten suponer que durante este estadio se dispara el número de células que degeneran. Aunque el error *standard* sea casi el 50% del valor de la media, no hay solapamiento con los valores obtenidos en embriones anteriores. Estas diferencias y las que aparecen a lo largo del trabajo, no pueden ser atribuidas a errores en el recuento, pérdida de cortes u otro error que no sea constante en todo el estudio. Las series de cortes utilizadas son suficientemente completas, y los ojos han sido catalogados cuidadosamente según los criterios de O'Rahilly y Meyer (1959), después de haber sido clasificado el embrión, antes de procesarlo, según Hamburger y Hamilton (1951).

La representación gráfica de la distribución de la muerte celular según el eje dorsoventral del ojo, manifiesta que la mayor frecuencia de restos sigue apareciendo en la región inmediatamente dorsal al tallo. En las retinas de este estadio con menor número de restos, éstos son más abundantes entre las 60 y 80 μ , siempre dorsalmente a la inserción del tallo; más dorsalmente desciende el número de fragmentos, manteniendo valores bajos y constantes en el resto de la región posterior (fig. 4a). La muerte celular está prácticamente ausente de la región periférica, exceptuando los restos que continúan apareciendo en la zona descrita por García Porrero y cols. (1984).

En la retina con muerte celular más abundante, también encontramos un pico pronunciado de degeneración en la representación del número de restos, en la zona dorsal al tallo. Sin embargo, el área con muerte celular incrementada es mayor, y alcanza hasta unas 120 μ ; restos de degeneración, aunque escasos, pueden observarse a nivel de la inserción del tallo óptico (fig. 5a).

Para constatar si la variación en el número de restos que encontramos es exclusivamente reflejo de la variación del número de células que aparecen en cada sección, se ha calculado el índice de fragmentos por número de células y se ha representado de forma análoga al número total de restos. En la gráfica que se obtiene (figs. 4b y 5b) se puede apreciar que se atenúan las variaciones bruscas que aparecían en la gráfica anterior, por lo que eran debidas al diferente grosor de los cortes; sin embargo, continúa apareciendo el pico de muerte celular en la misma zona, y el descenso de la frecuencia de restos más dorsalmente.

Aparte de los restos celulares, también se ha hecho recuento del número de células con características claras de diferenciación y del número de mitosis.

El índice mitótico se mantiene constante, con ligeras variaciones, en la retina posterior; parece haber un cierto descenso de este índice en la región del tallo óptico.

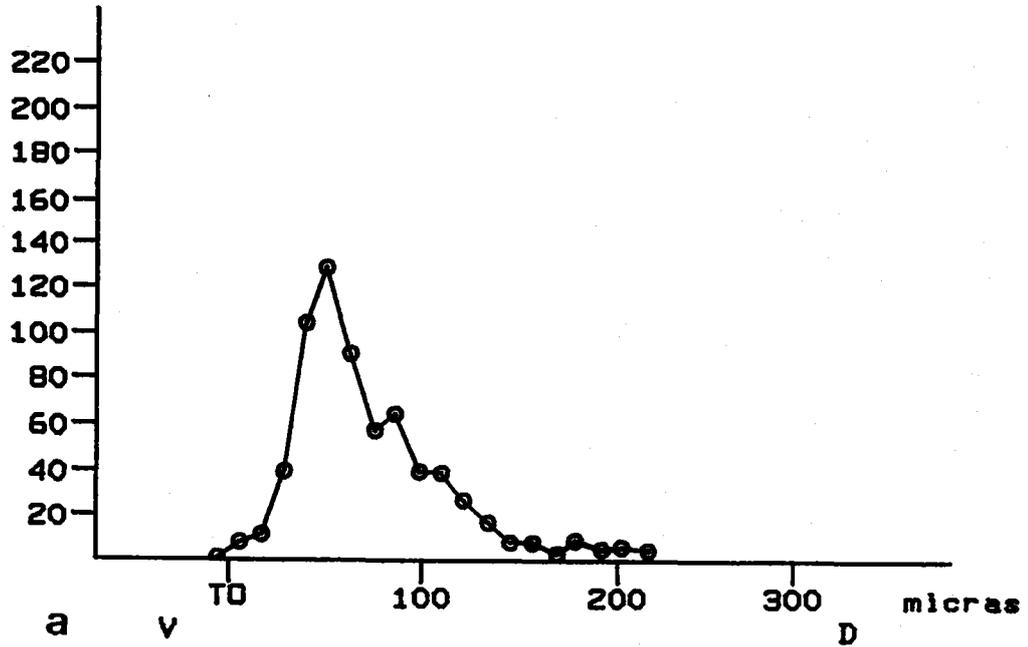
La representación del índice de ganglionares adopta una forma muy característica. No aparecen células diferenciadas a nivel del tallo óptico y no se encuentran las primeras hasta las 30-40 μ de él. Rápidamente se incrementa su proporción, de manera que antes de las 100 μ dorsalmente al tallo, han alcanzado un máximo que se mantiene hasta la zona de transición entre la retina más diferenciada y la periférica. La representación conjunta de las curvas de proporción de restos y de ganglionares, pone de relieve que el máximo de degeneración se sitúa siempre inmediatamente ventral al de células ganglionares; la disminución brusca de los restos celulares presentes coincide con el aumento de la proporción de células diferenciadas (figs. 4b y 5b).

Los dibujos de cortes de retina, en que se señala la situación de los restos y de las células ganglionares, confirman la representación gráfica (fig. 6). Los restos aparecen concentrados en el polo posterior de la retina, en las regiones más cercanas al tallo, apareciendo siempre próximos a fascículos de fibras. Más dorsalmente, en zonas en que se observa mayor número de ganglionares, los restos son mucho más escasos y dispersos.

Fig. nº 4: a) Distribución del número de restos a lo largo de la retina central de un embrión HH20; corresponde a una de las retina con restos aún no muy abundantes.

b) Id. de la proporción de restos (círculos) y del índice de ganglionares (triángulos).

n restos



$\frac{n. \text{ restos}}{n. \text{ cels.}}$

I.G.

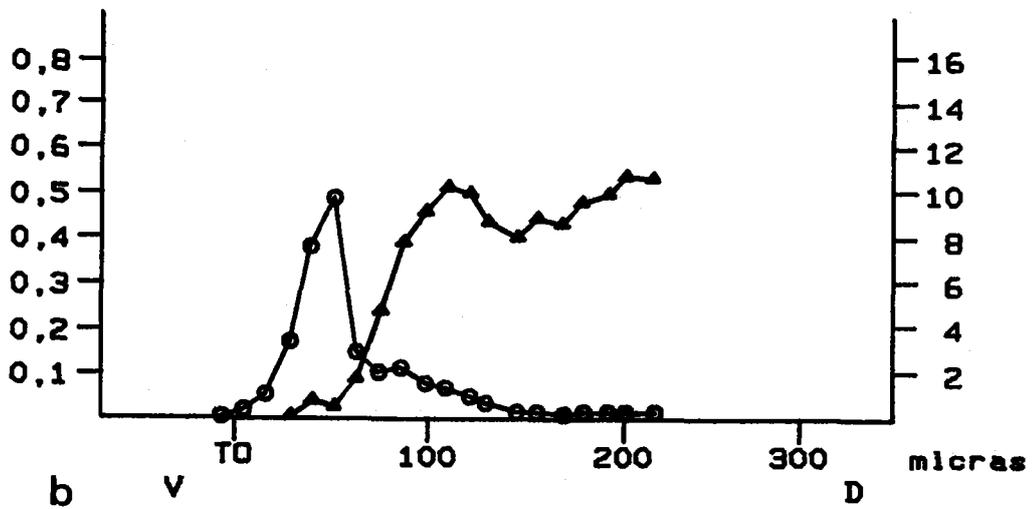
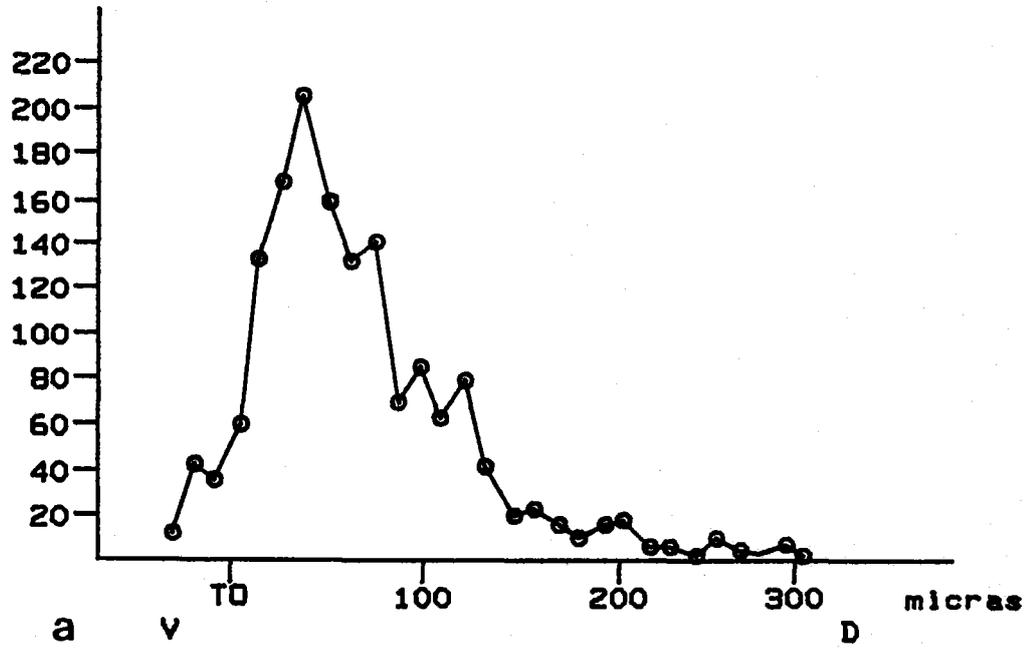


Fig. nº 5: a) Distribución del número de restos celulares a lo largo de la retina central de un embrión HH20; corresponde a la retina con mayor cantidad de restos.

b) Id. de la proporción de restos (círculos) y del índice de ganglionares (triángulos).

n restos



n. restos
n. cels.

I.G.

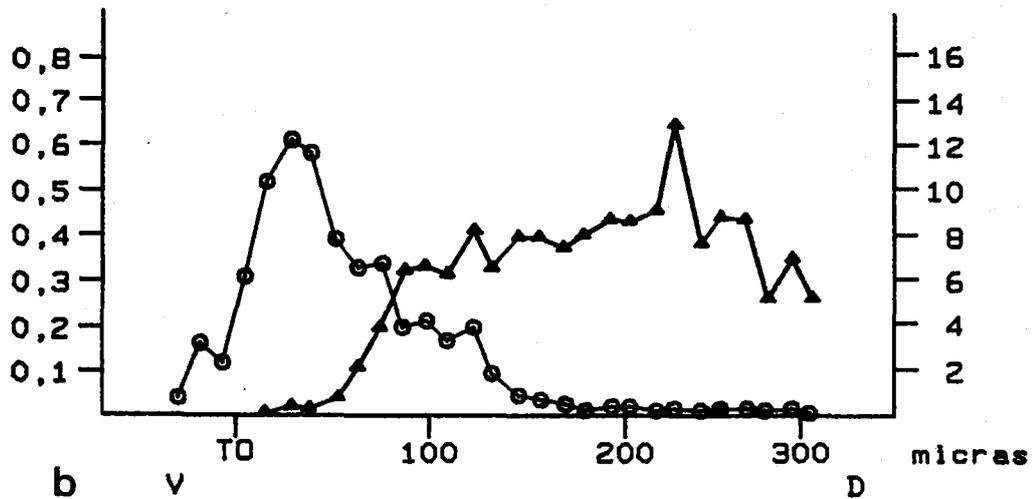
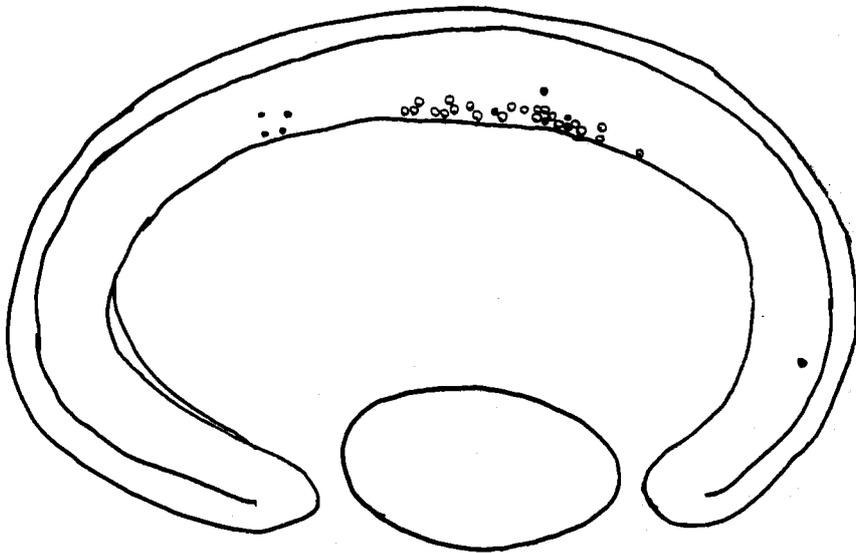
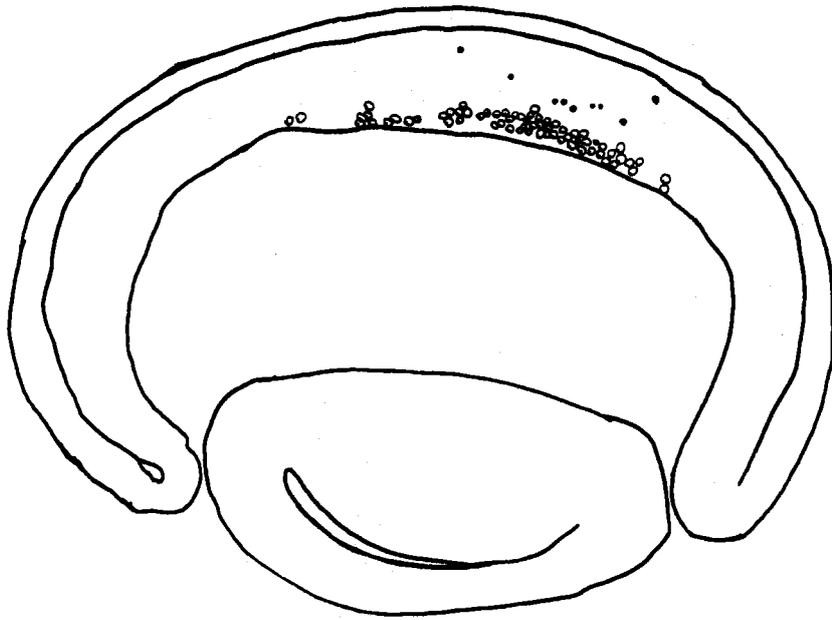
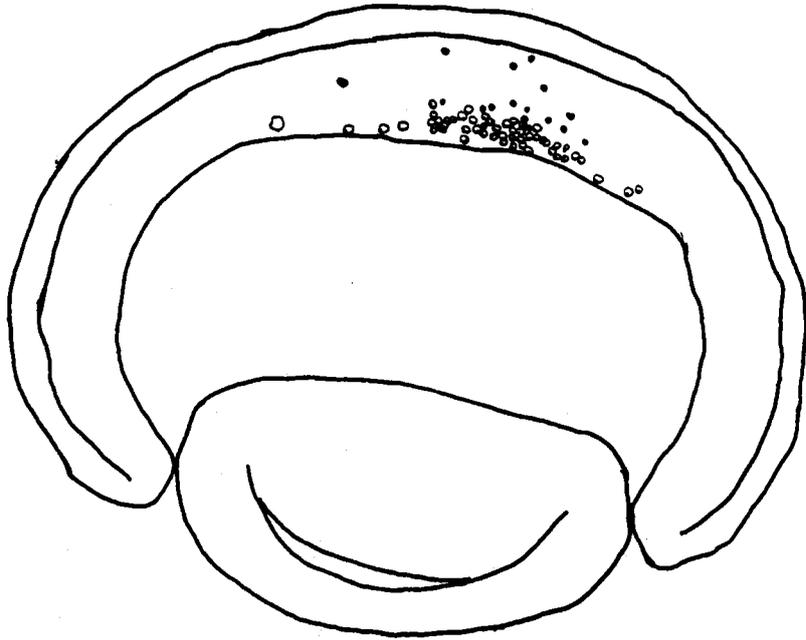
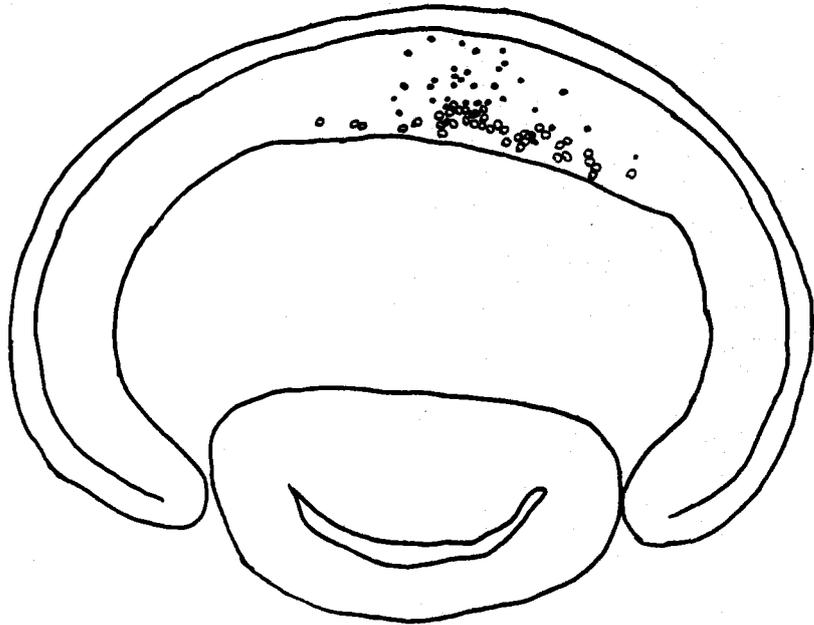
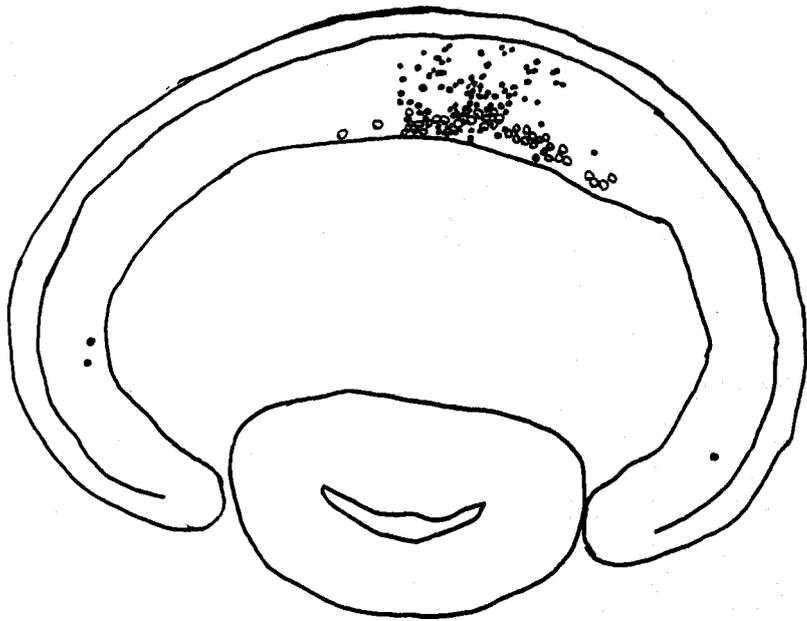
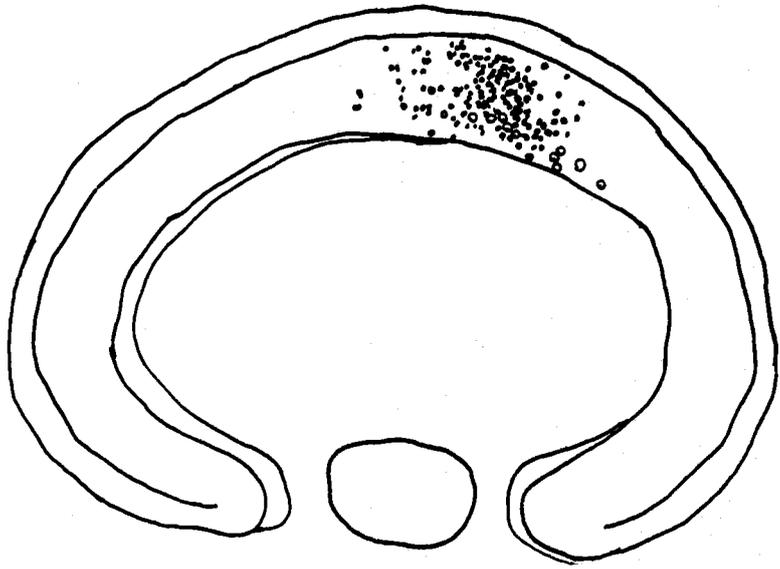
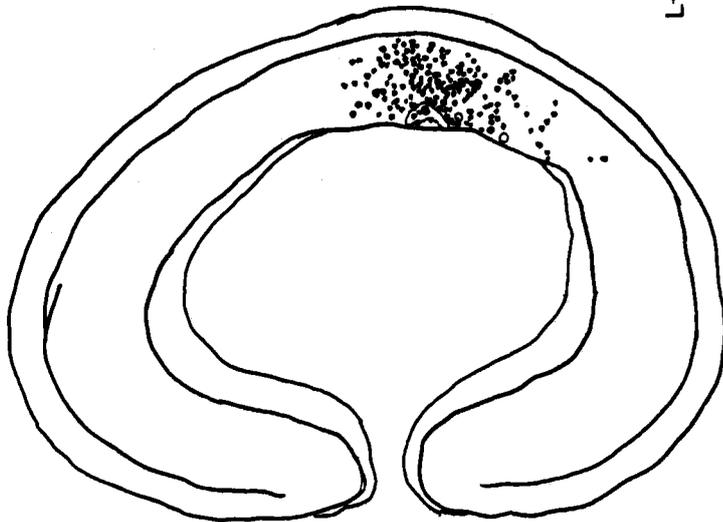
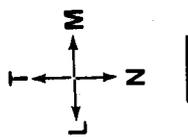
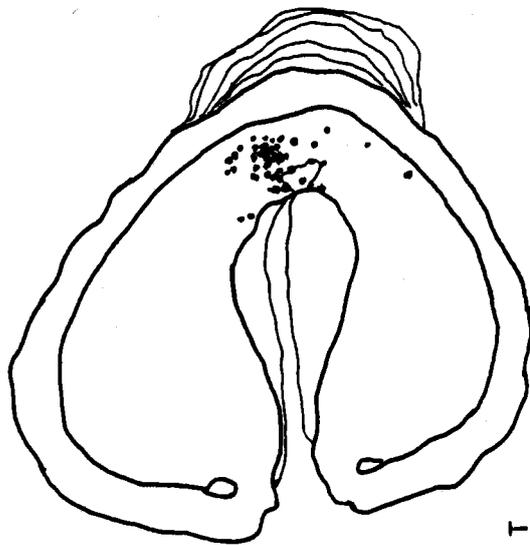
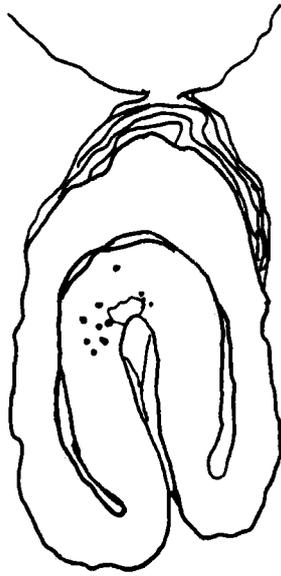


Fig. nº 6: Dibujos a partir de secciones horizontales de una retina de embrión HH20. Cada dibujo corresponde a un bloque de 20-40 μ (10-20 secciones) y entre cada dos consecutivos se ha despreciado un bloque de 15-30 μ (7-15 secciones). Los dibujos están dispuestos de izquierda a derecha de más dorsal a más ventral. En el perfil de la retina se han señalado los restos celulares (puntos negros) y las células ganglionares (círculos vacíos).







3.4 Muerte celular en los estadios HH21-22

La retina neural presenta durante estos estadios un aspecto muy semejante. Continúan en ella principalmente procesos de crecimiento y diferenciación, sin que se aprecien cambios morfológicos notables. Como esta circunstancia también se produce en la observación del embrión completo (O'Rahilly y Meyer, 1959) se ha preferido considerar conjuntamente estos dos estadios.

Las diferencias con el estadio anterior son principalmente de tipo cuantitativo: mayor cantidad de células ganglionares, mayor extensión de los fascículos de fibras ópticas, y, en el epitelio pigmentario, mayor extensión de los gránulos de pigmento, que habían aparecido por primera vez en la retina en el estadio HH20.

El número de restos que aparecen en la zona que se considera, presenta también bastantes variaciones (entre los 1.000 restos a los 1.600) (tabla 1), pero no comparables con las del estadio anterior. Es por esto, que más que a un incremento debido a que haya cambiado la dinámica del proceso de muerte celular -que es lo que se propone para el estadio HH20- las diferencias han de ser producto de los inconvenientes de realizar recuento de restos, ya indicados en "Material y métodos" y al hacer referencia a la muerte celular en los estadios HH16 y 17. Por ejemplo, en un mismo embrión se pueden encontrar los valores mínimo y máximo de número de restos en sus dos retinas. Las diferencias numéricas no implican diferencias de distribución, que sigue siendo constante y claramente delimitada.

La representación gráfica de la variación del número de restos celulares respecto al eje dorsoventral (fig. 7), es semejante a la descrita anteriormente para las retinas de embriones del estadio HH20 con muerte celular abundante. La mayor parte de los restos siguen situándose en las primeras 100 μ dorsalmente al tallo, y aparece un máximo muy prominente entre las 40-60 μ . Además, aumentan ligeramente los restos situados a nivel del tallo óptico.

La distribución de la proporción de células ganglionares (fig. 7b) presenta un patrón semejante al descrito anteriormente para el estadio HH20, y su correlación con la frecuencia de restos también se mantiene constante: el pico de mayor densidad de restos es inmediatamente ventral al comienzo de la zona de mayor presencia de células ganglionares, aunque éstas son cada vez más abundantes ventralmente.

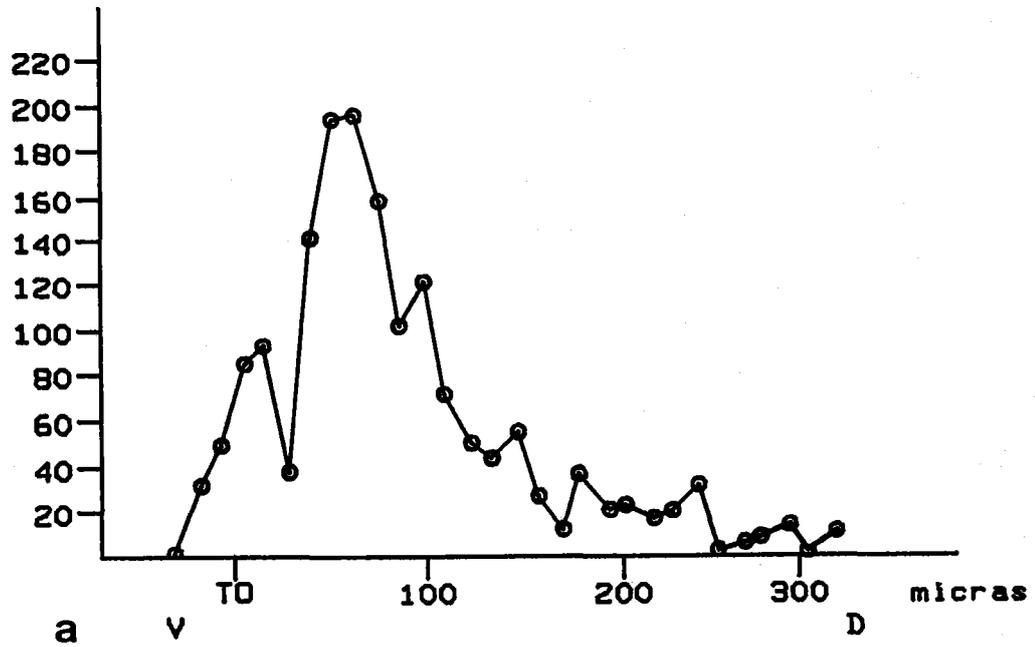
Dibujos realizados a partir de secciones horizontales de la retina confirman la distribución descrita (fig 8). La muerte celular se restringe prácticamente a las zonas con mayor diferenciación de la retina y casi no afecta a las regiones periféricas. Los signos de muerte celular se hacen más abundantes, y además, dispuestos de forma más compacta, a medida que están más próximas al tallo. Los restos aparecen con frecuencia en columnas, según el grosor del neuroepitelio. En las secciones en que no son abundantes las células ganglionares (es decir, a la altura de la zona prospectiva del disco óptico), los restos se circunscriben a las regiones que presentan fibras. Más ventralmente, a nivel del tallo, los restos aparecen más dispersos, aunque siguen presentando relación estrecha con los haces de fibras. A nivel de la fisura óptica, los fragmentos, mucho más escasos, se disponen sobre todo a los lados de la fisura; la región que es continua con el tallo, por la que salen las fibras, no presenta una degeneración intensa.

Los dibujos de secciones frontales de la retina (fig. 9) muestran, además de la relación entre distribución de células ganglionares y fragmentos, la relación entre la degeneración y las fibras nerviosas en el momento en que abandonan la superficie vitreal para invadir el tallo: restos más o menos dispersos, que acompañan la trayectoria de los haces de fibras. En la parte ventral de la retina se aprecian algunos restos dispersos.

Fig. nº 7: a) Representación gráfica del número de restos celulares a lo largo de una retina central de un embrión HH22.

b) Id. de la proporción de restos (círculos) y del índice de ganglionares (triángulos).

n restos



$\frac{n. restos}{n. cels.}$

I.G.

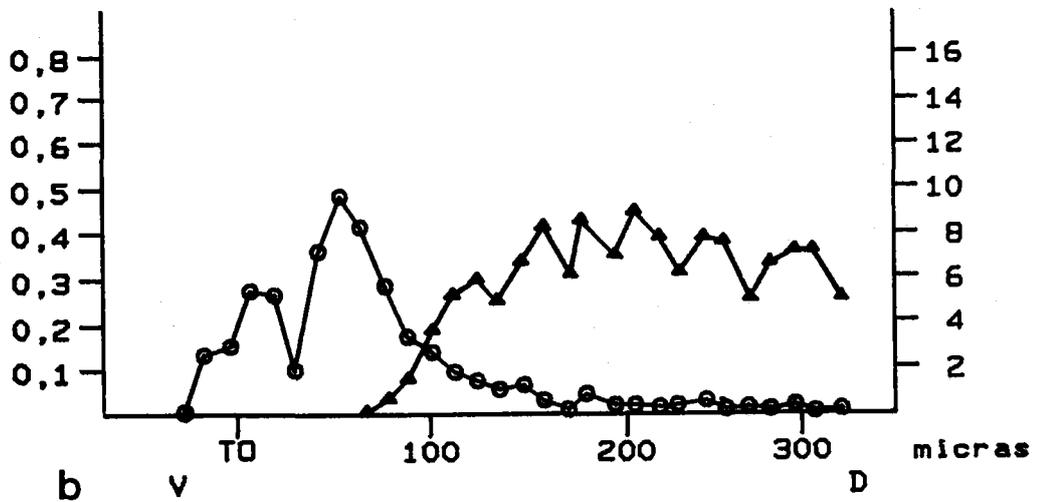
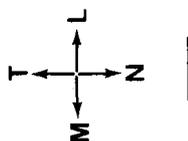
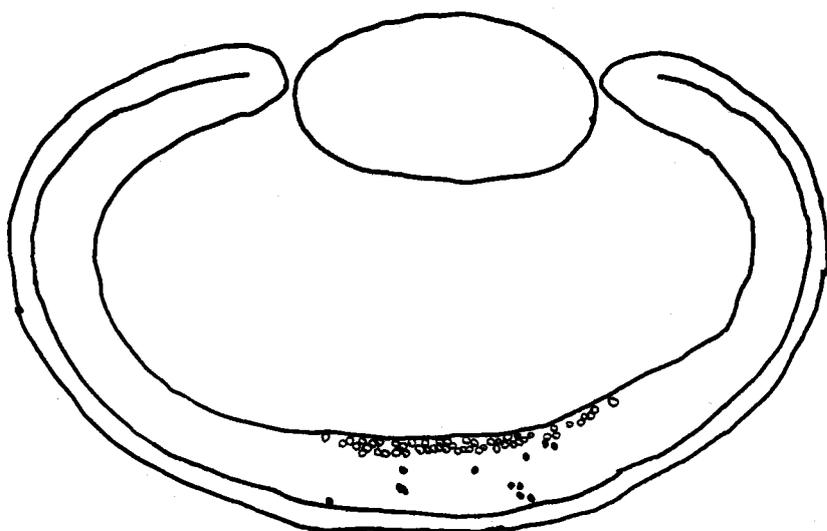
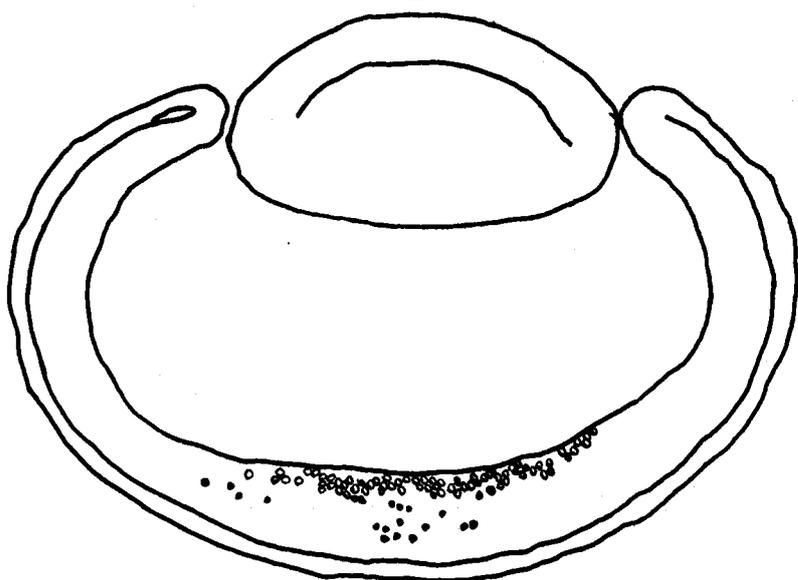
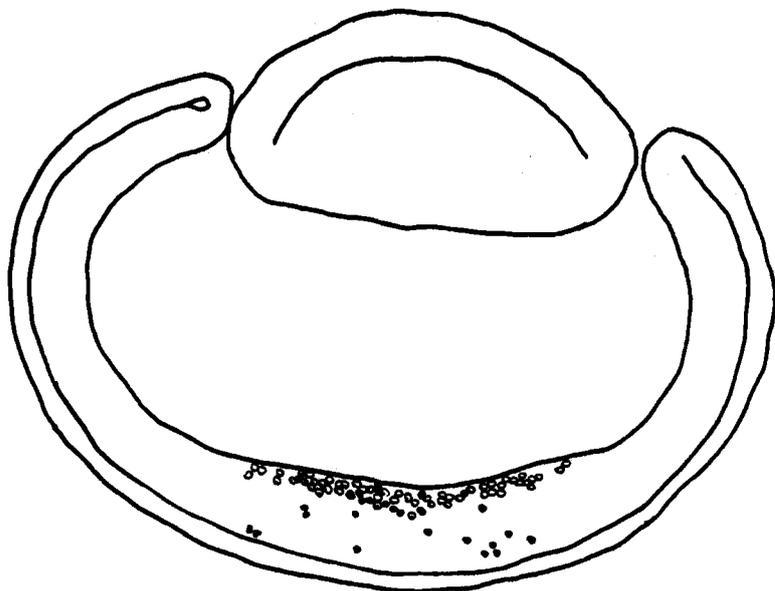
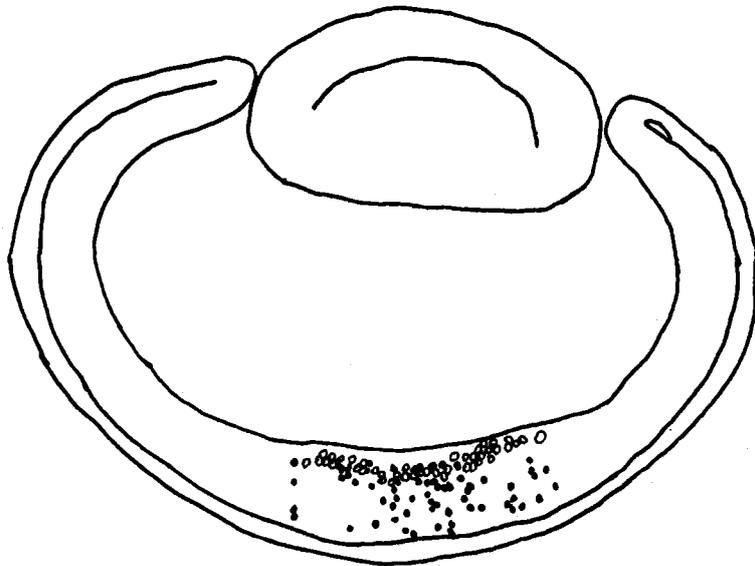
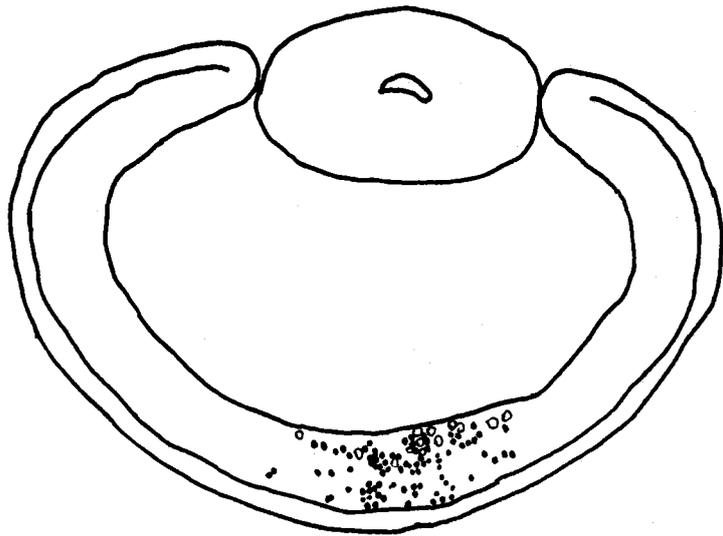
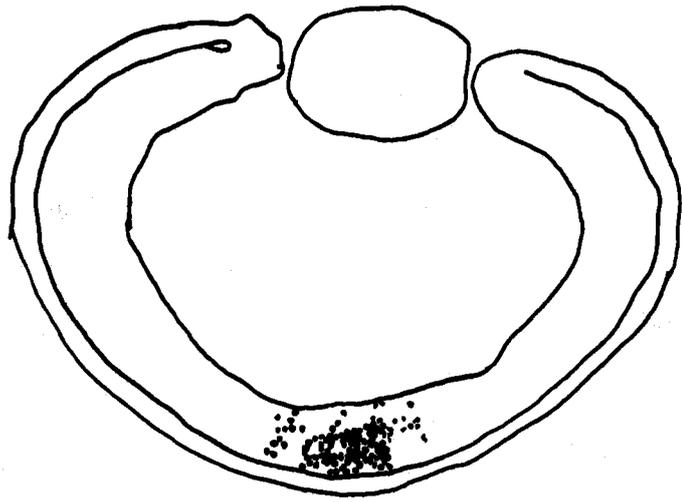


Fig. nº 8: Dibujos, a partir de secciones horizontales de una retina de un embrión HH22. De izquierda a derecha, de más dorsal a más ventral. Puntos negros, restos celulares; círculos vacíos, ganglionares.





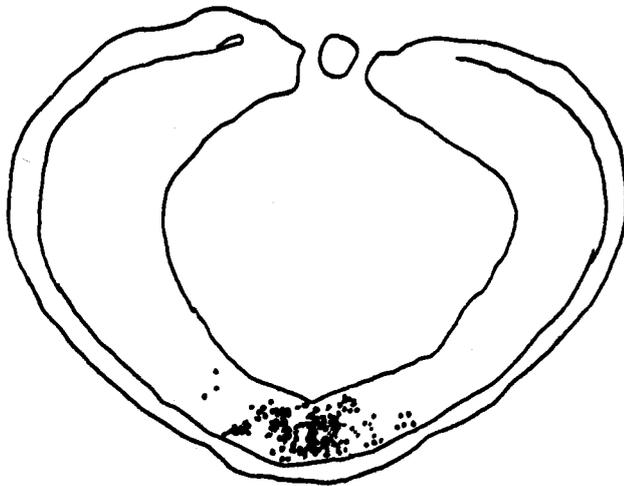
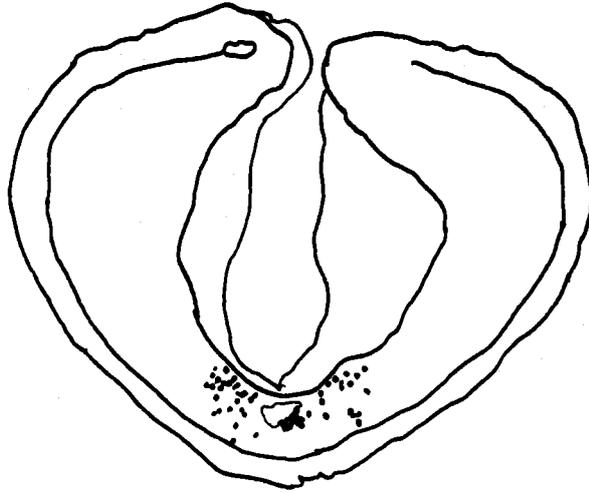
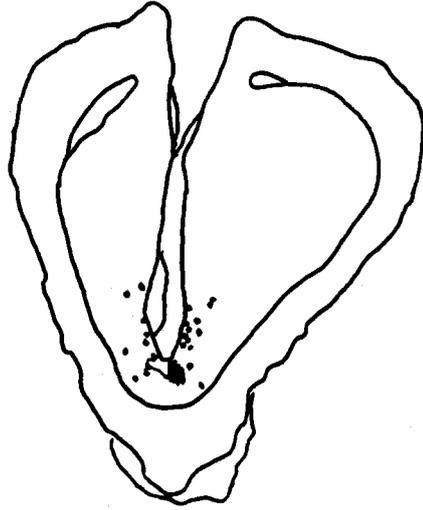
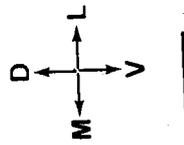
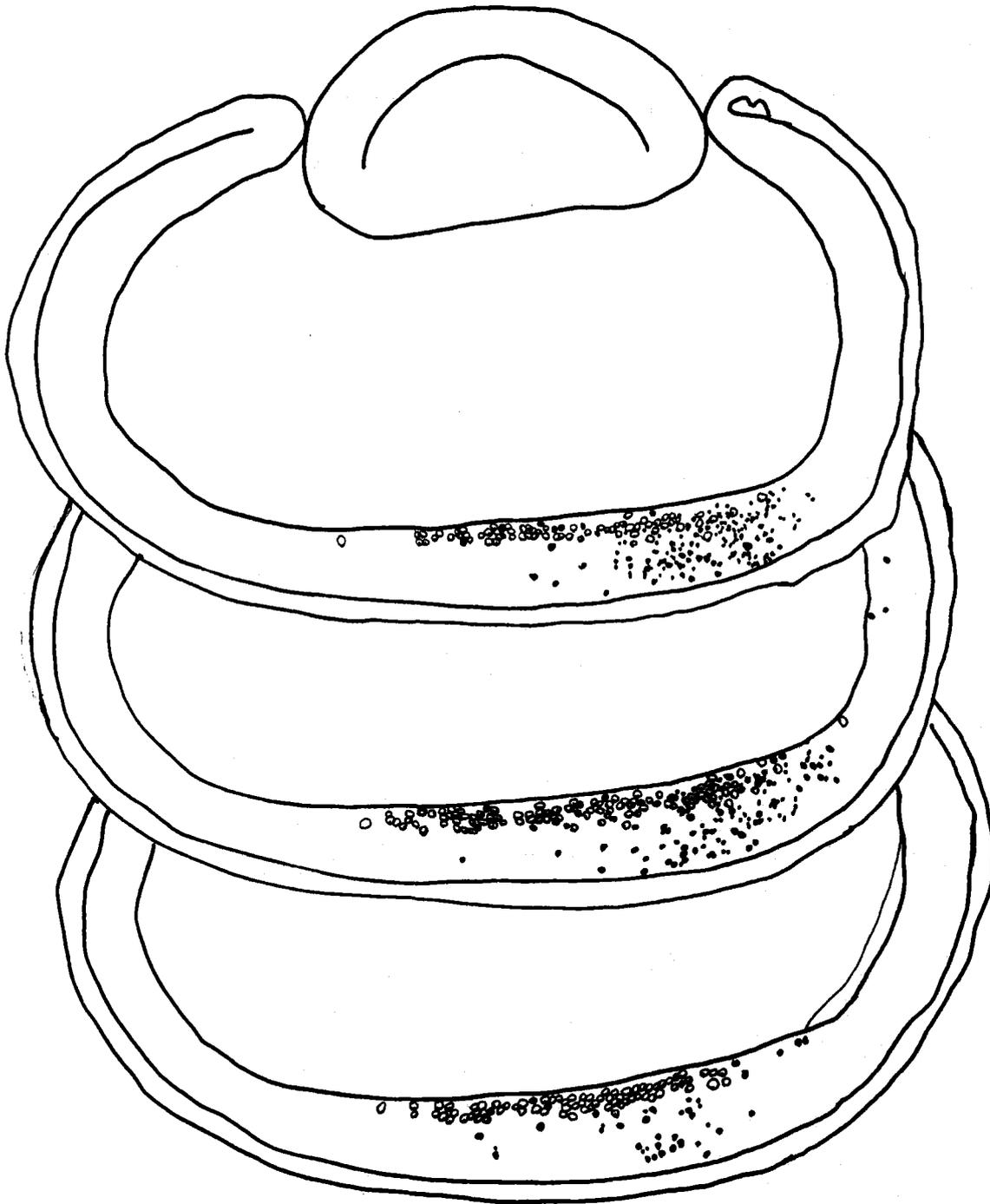
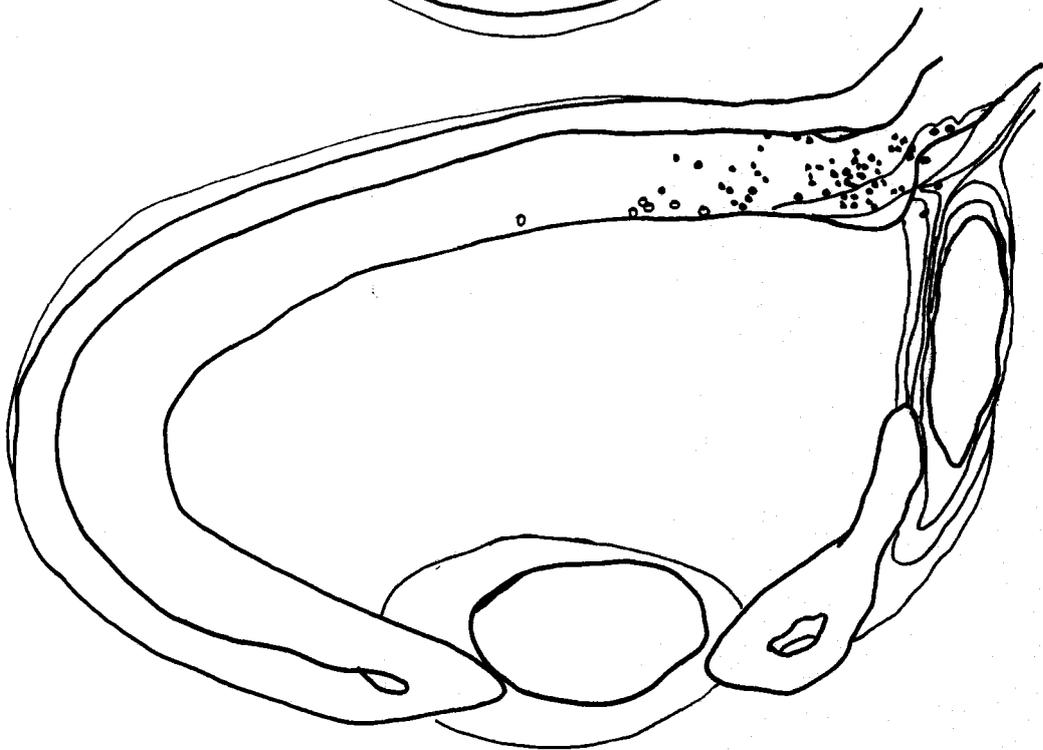
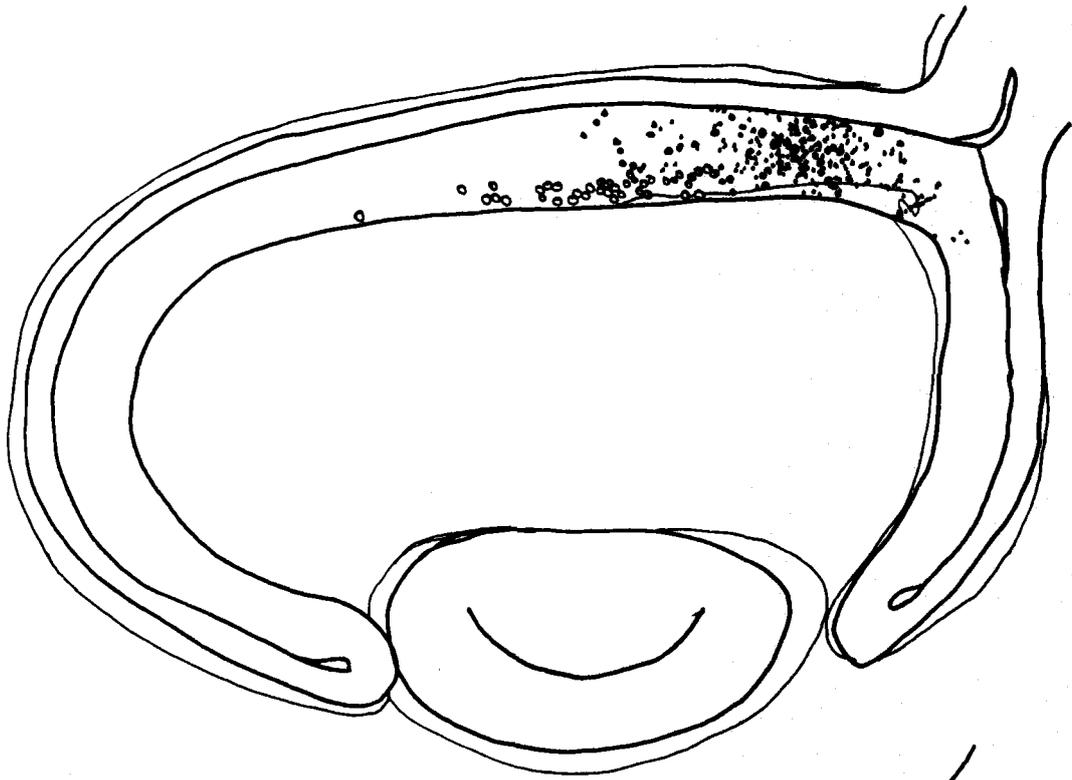


Fig. nº 9: Dibujos, a partir de secciones frontales de una retina de un emrión de estadio HH21. De izquierda a derecha, de más posterior (temporal) a más anterior (nasal).





3.5 Muerte celular en el estadio HH23

Se siguen manteniendo las características generales de la retina de los estadios anteriores. Sin embargo, el avance del proceso de diferenciación permite distinguir ya claramente la capa del nervio óptico y la región del disco óptico. En la retina central, las células ganglionares forman una capa prácticamente continua. Otra característica de este estadio es el aumento considerable de la pigmentación.

El número de restos de las retinas estudiadas es muy semejante al de los dos estadios anteriores, aunque la media es ligeramente superior al estadio HH21-22. Por tanto, se puede pensar que durante este estadio el proceso se estabiliza. A pesar de que no hay solapamiento entre los errores *standard* de del estadio HH23 y del de HH21-22, no se puede afirmar con total seguridad que haya realmente un incremento de la muerte celular.

En la distribución del número de restos se aprecia que continúa el ligero desplazamiento de la degeneración hacia regiones más ventrales, apareciendo ya muerte celular en la retina neural a nivel del tallo (fig. 10a).

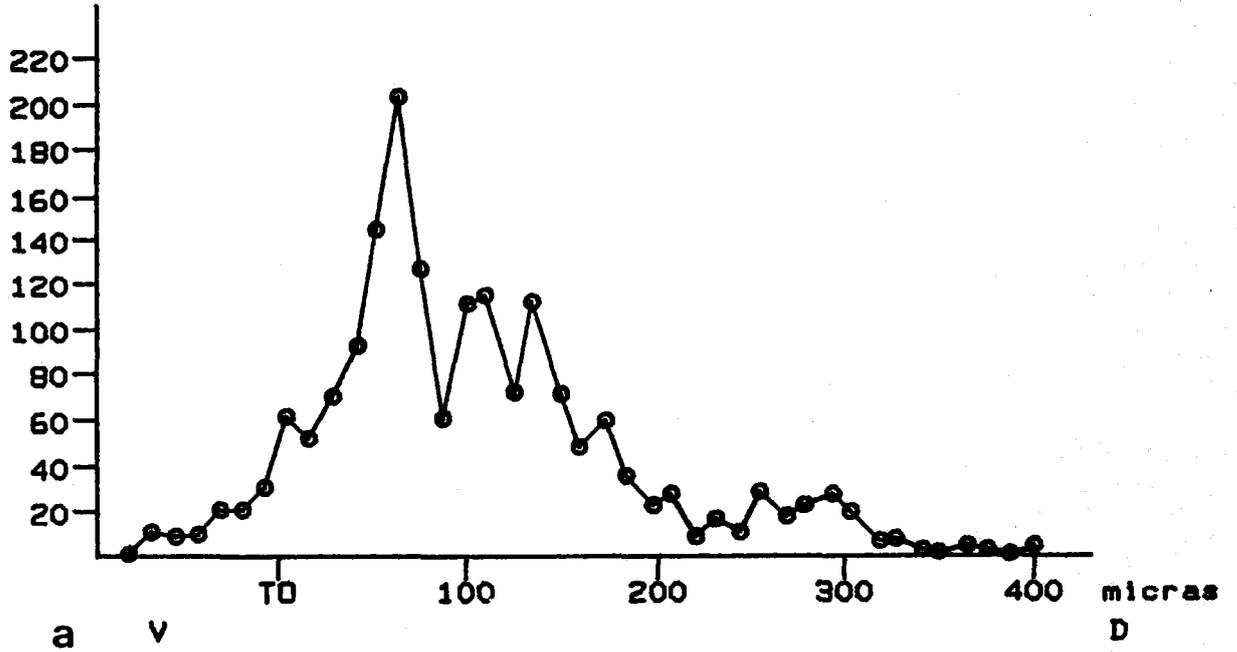
La proporción de células ganglionares y de restos de degeneración celular mantienen un patrón semejante (fig. 10b). A pesar de que cada vez se encuentran células ganglionares en regiones más próximas al tallo, el pico de máxima degeneración se mantiene entre las ganglionares y el tallo.

Dibujos de cortes frontales (fig. 11) ilustran lo señalado anteriormente, y, sobre todo, la situación de los restos a nivel del tallo óptico.

Fig. nº 10: a) Distribución del número de restos celulares a lo largo de la retina central de un embrión HH23.

b) Id. de la proporción de restos (círculos) y del índice de ganglionares (triángulos).

n restos



$\frac{n. restos}{n. cels.}$

I.G.

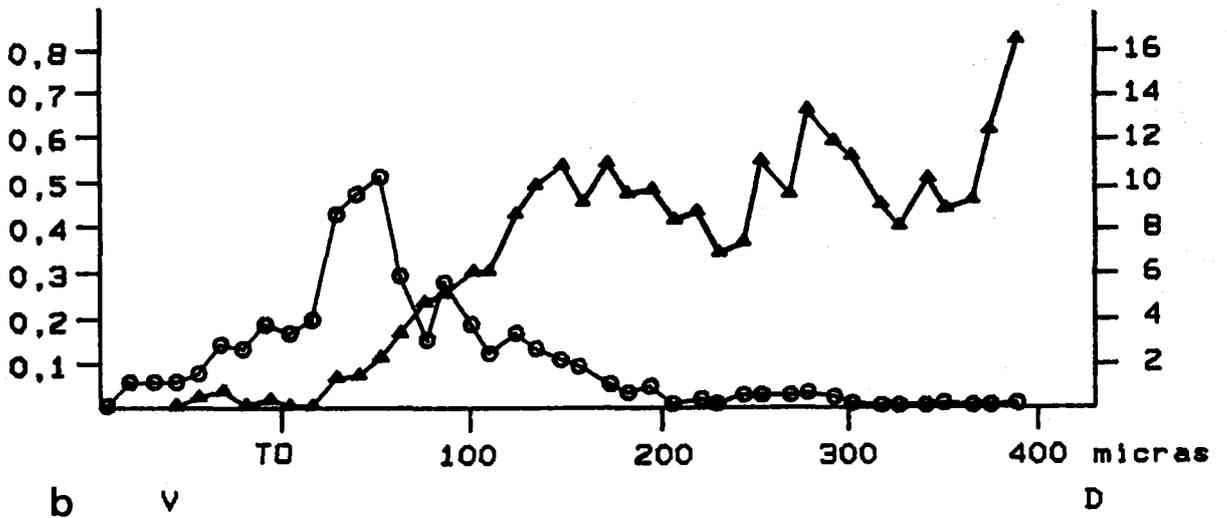
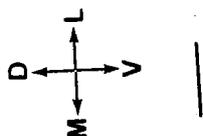
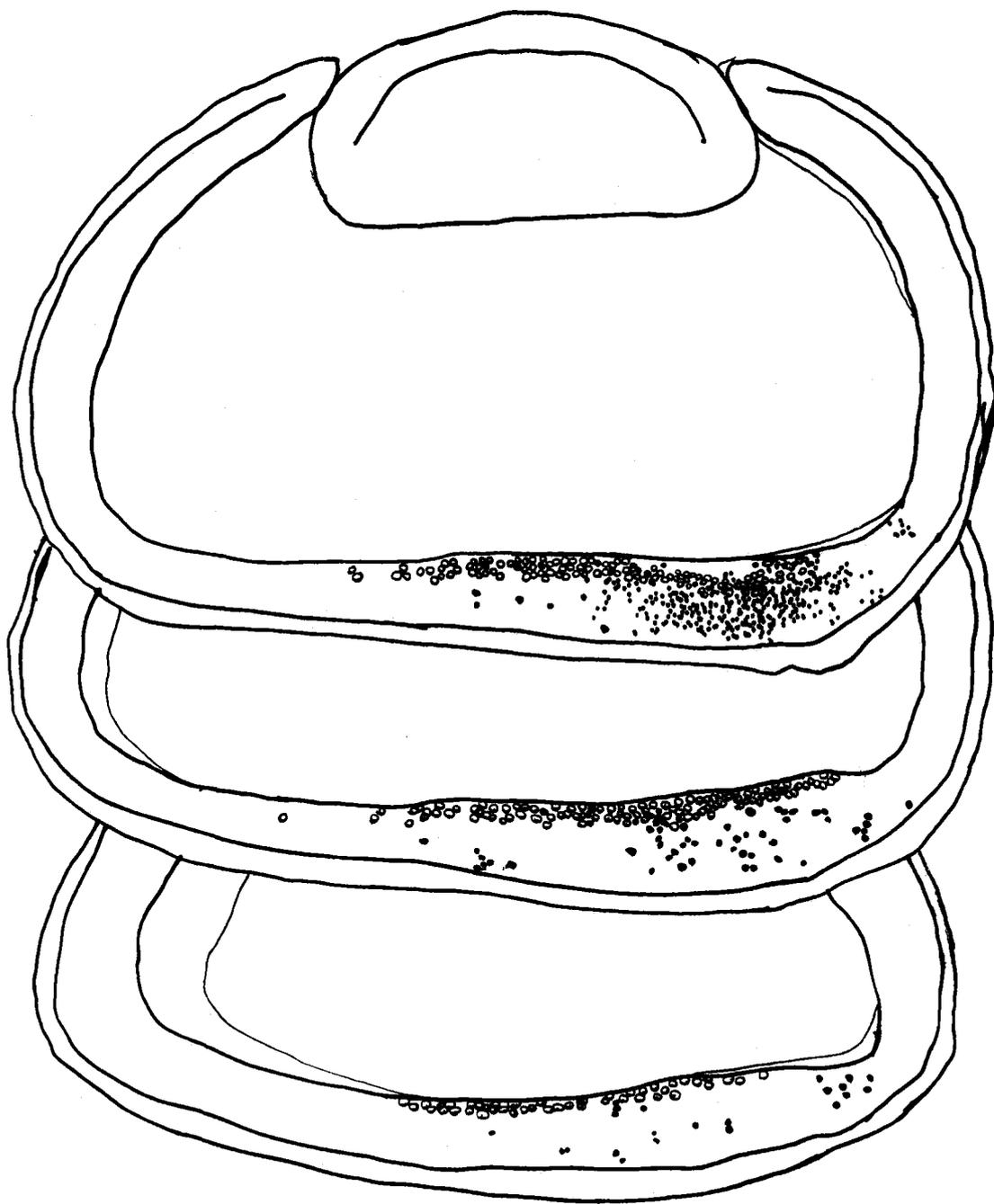
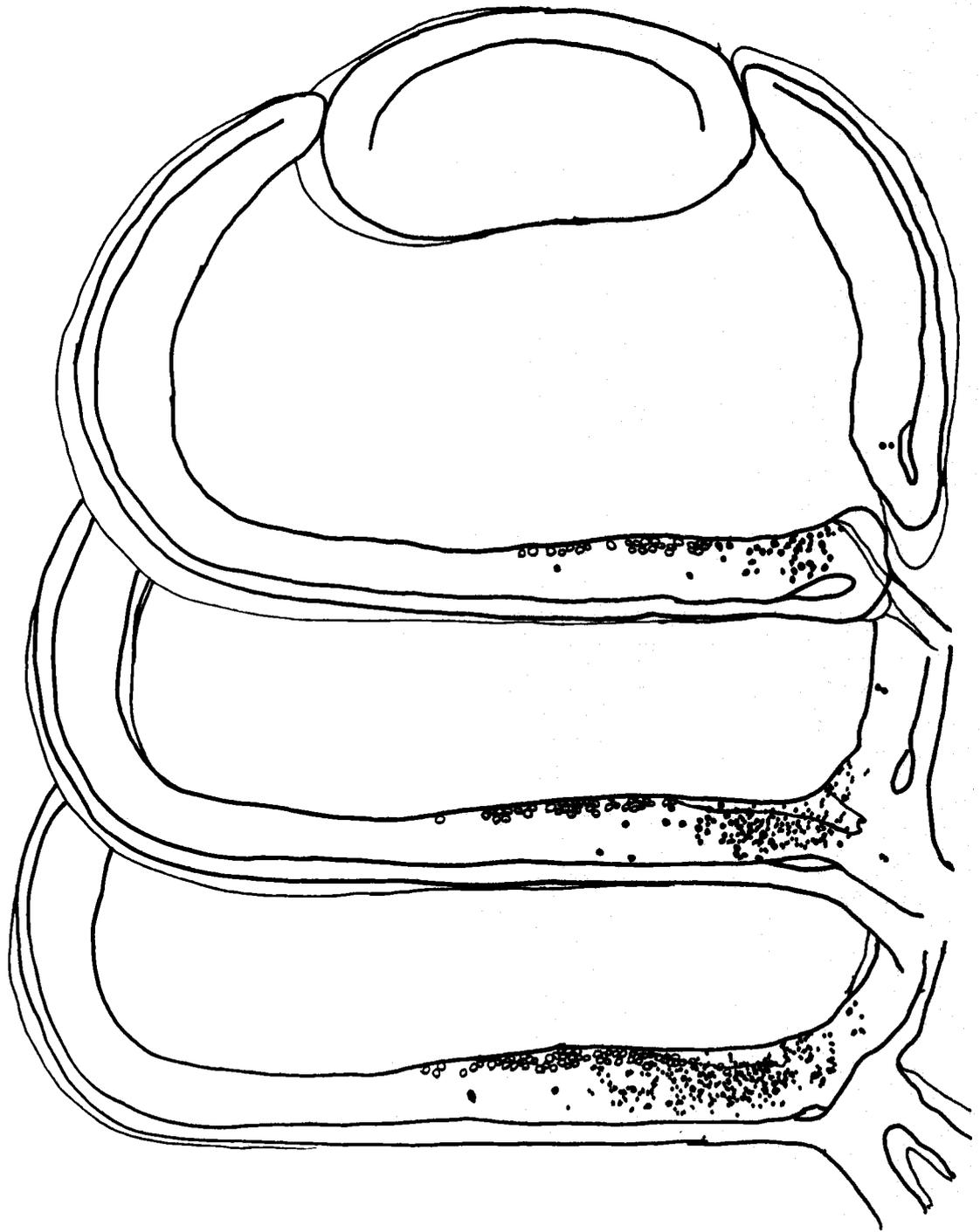


Fig. nº 11: Dibujos, a partir de secciones frontales, de una retina HH23. De izquierda a derecha, de más posterior (temporal) a más anterior (nasal).





3.6 Muerte celular en el estadio HH24

El ojo ha aumentado considerablemente de tamaño y va adoptando una forma más esférica, aunque aún hay un desarrollo mayor de la retina dorsal frente a la ventral. La capa del nervio óptico es distinguible, y las células ganglionares aparecen prácticamente en toda la región posterior de la retina; de todas formas, es evidente el mayor progreso de la diferenciación en la retina central. El disco óptico aparece ya más delimitado, por la presencia de gran cantidad de fibras que abandonan la retina. En la región del tallo, en la que predominan los haces de fibras, aparecen escasas células dispersas entre los fascículos.

El número de restos ha aumentado bastante respecto al estadio HH23, siendo de unos 2.000 (tabla 1).

El estudio de la distribución en cortes frontales, pone de manifiesto que la degeneración, aunque está presente en un área amplia de la retina, solo aparece de forma concentrada en las zonas ventrales a las regiones con capa de células ganglionares diferenciada. Por tanto, se repite la distribución de células ganglionares y restos que habíamos encontrado anteriormente (fig. 12). Sin embargo, la expansión de la porción de retina que presenta capa de células ganglionares, hace que los fragmentos que se sitúan ventralmente a ella se encuentren ya a nivel del tallo óptico. También son observables restos en cantidad apreciable ventralmente al tallo (foto 4).

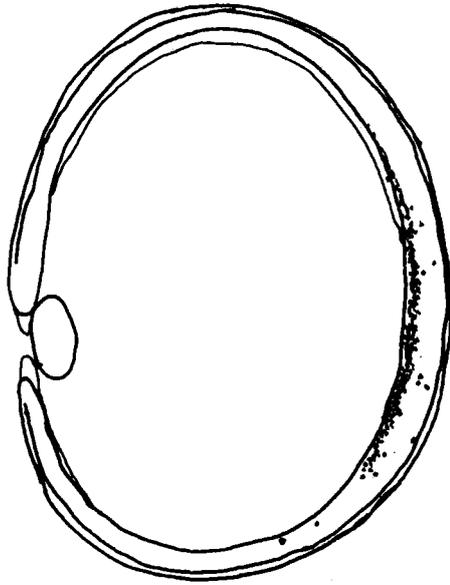
En esta zona ventral aparecen por primera vez fibras, visibles en embriones post fijados con tetróxido de osmio y teñidos con tionicina, y células ganglionares. Se puede, pues, relacionar la existencia de muerte con los inicios de la diferenciación celular en esta zona. Este hecho no es observable en la parte más central por la presencia de la fisura óptica. Las observaciones anteriores concuerdan con las realizadas acerca del desarrollo de fibras ópticas mediante montajes *in toto* de retinas (Rogers, 1957; Goldberg y Coulombre, 1972;

Halfter y cols., 1985). Tal vez, la incidencia de la muerte celular en una zona en la que hasta ese momento no había aparecido en gran número, es la responsable del incremento del número de restos que ocurre en este estadio.

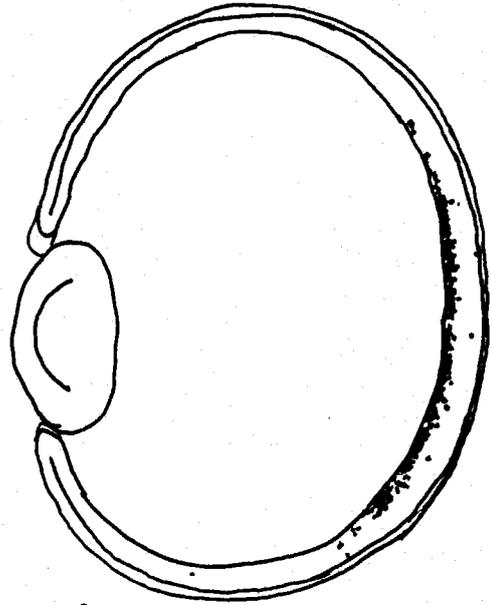
Fig. nº 12: Dibujos, a partir de secciones de cortes frontales de una retina de un embrión HH24. 1 más anterior (frontal).

a) Dibujo de la retina completa.

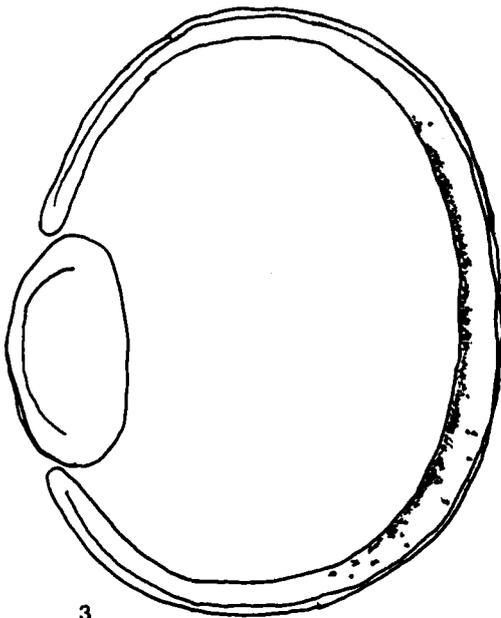
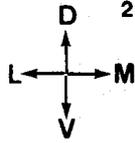
b) Ampliación de la retina central para observar la relación entre restos celulares (puntos negros) y las células ganglionares (círculos vacíos).



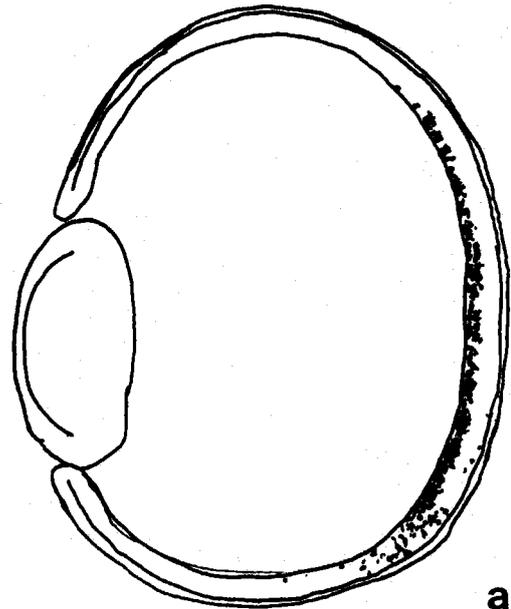
1



2

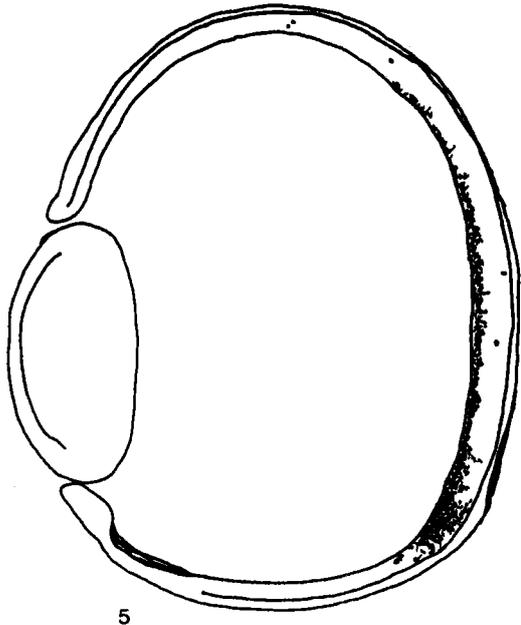


3

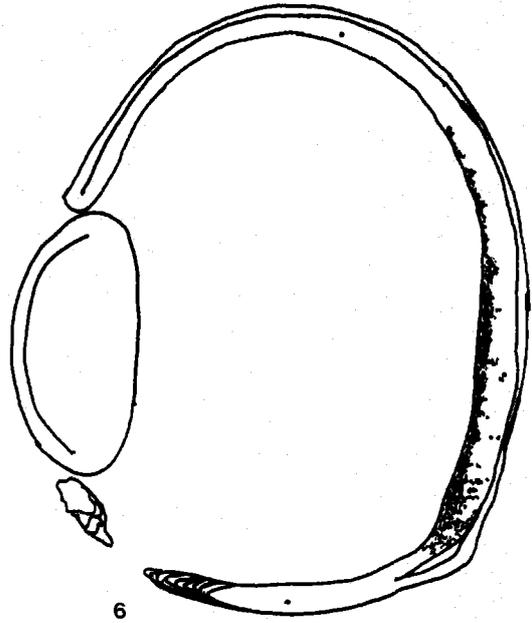


4

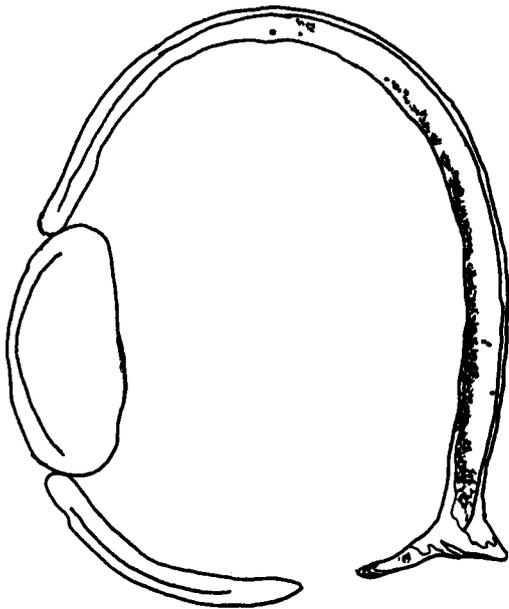
a



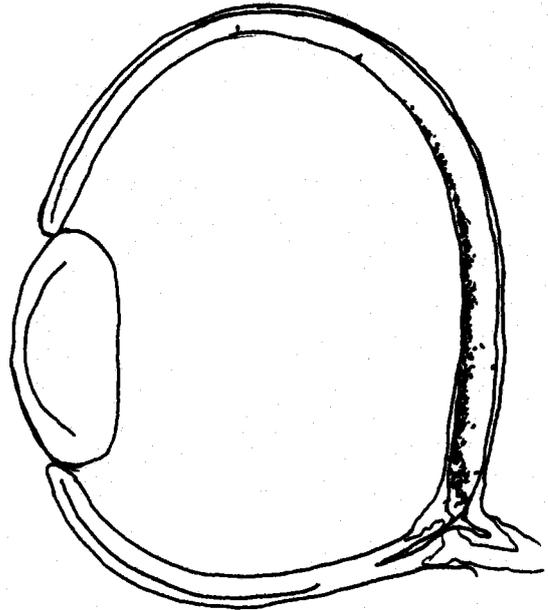
5



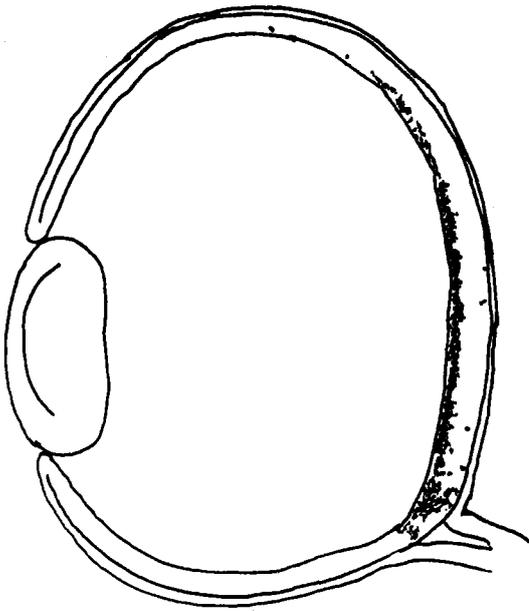
6



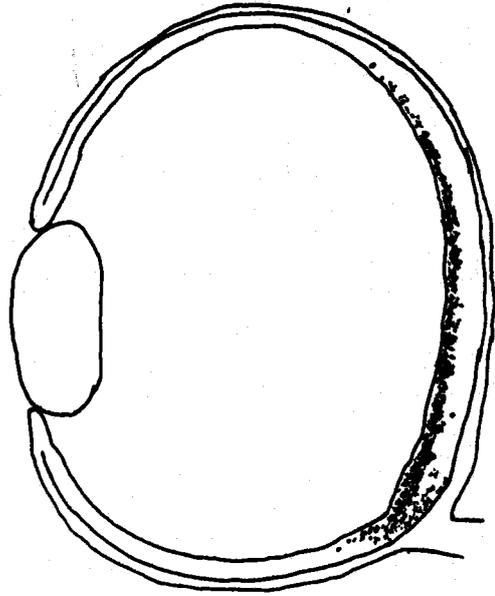
7



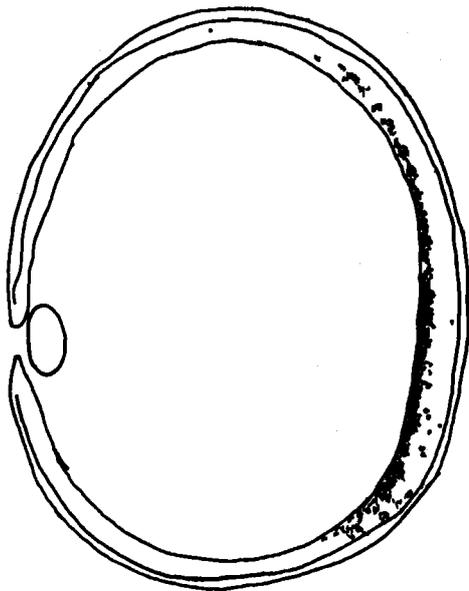
8



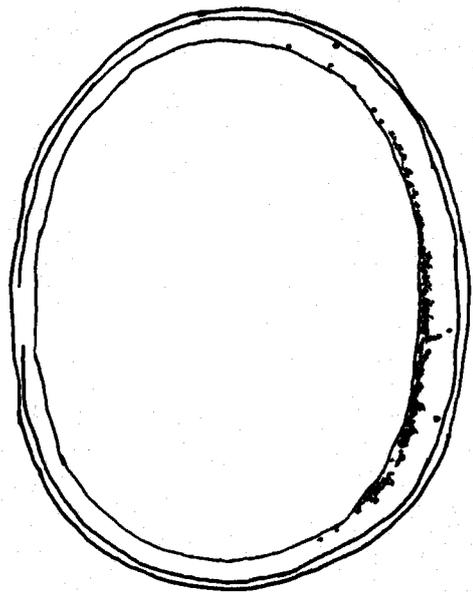
9



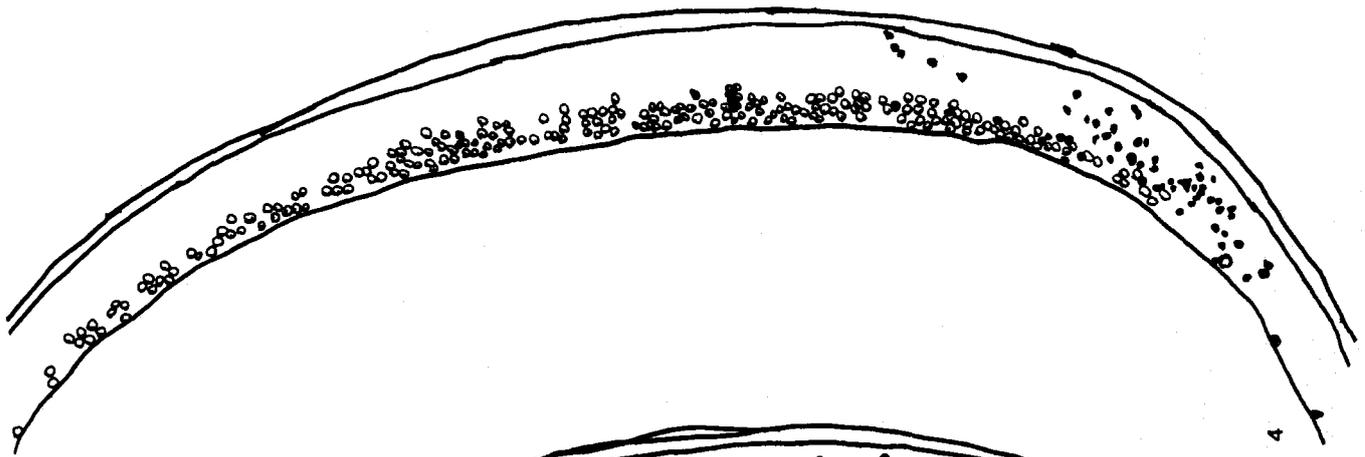
10



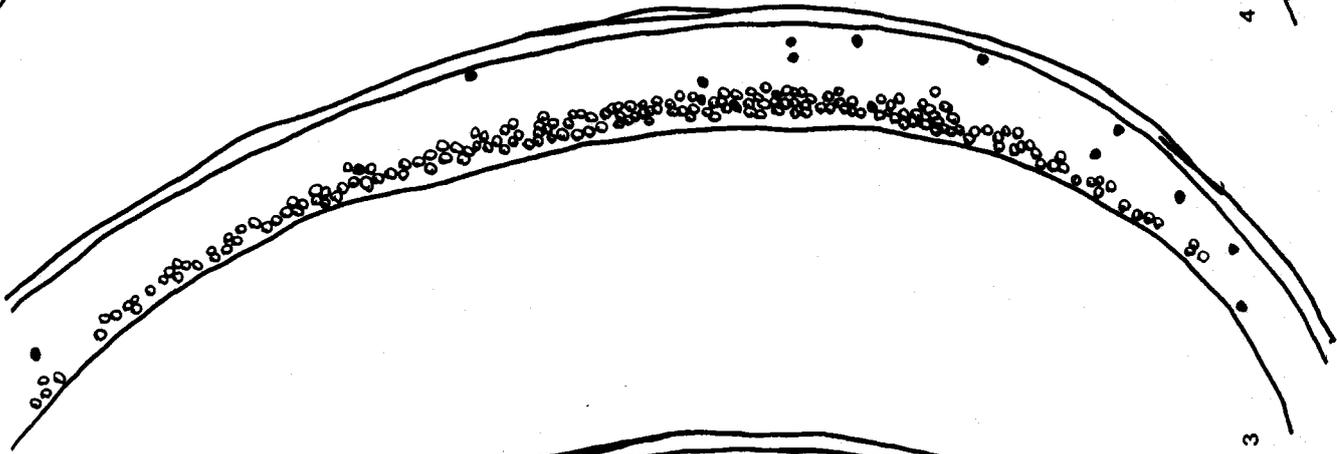
11



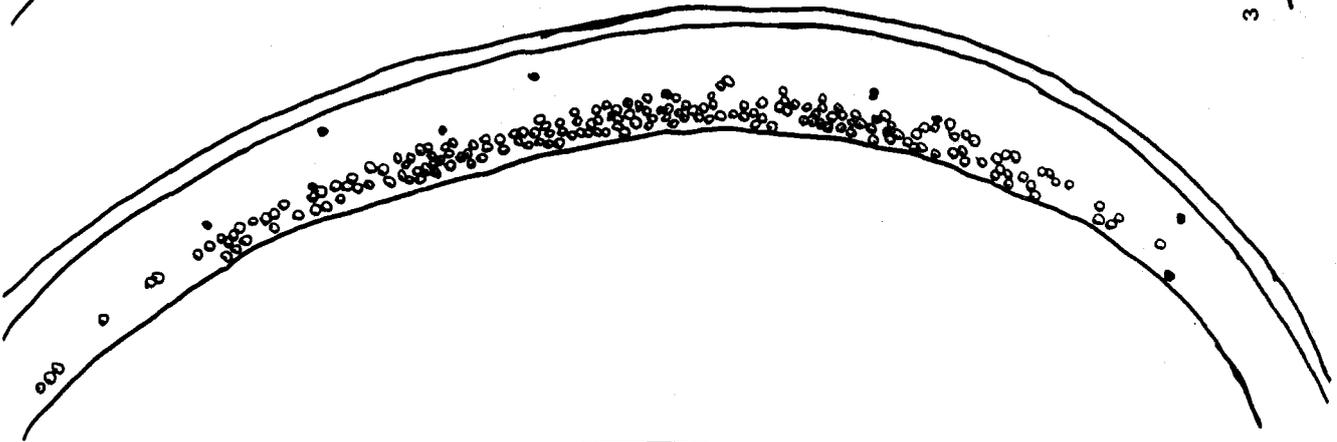
12



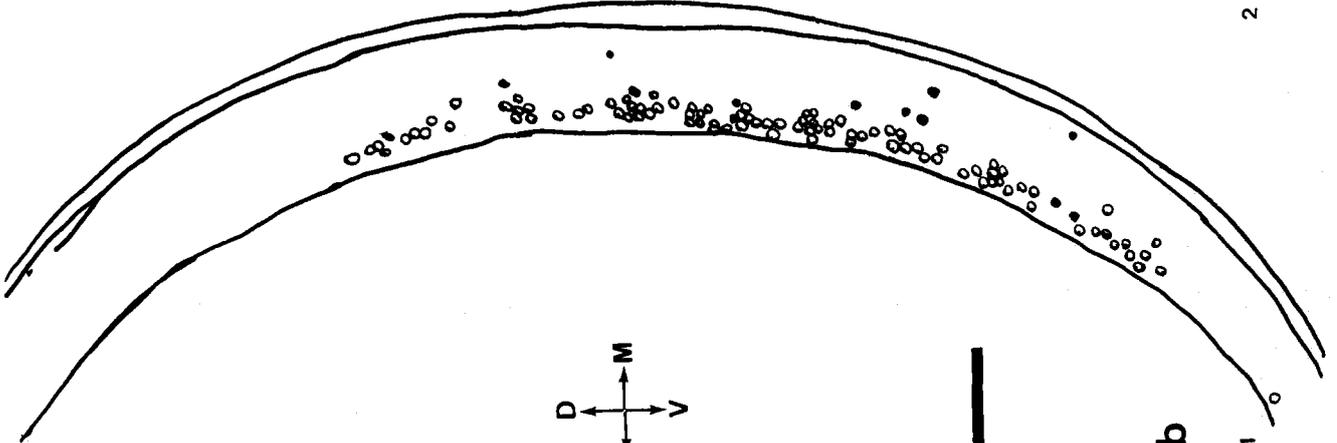
4



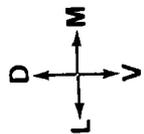
3



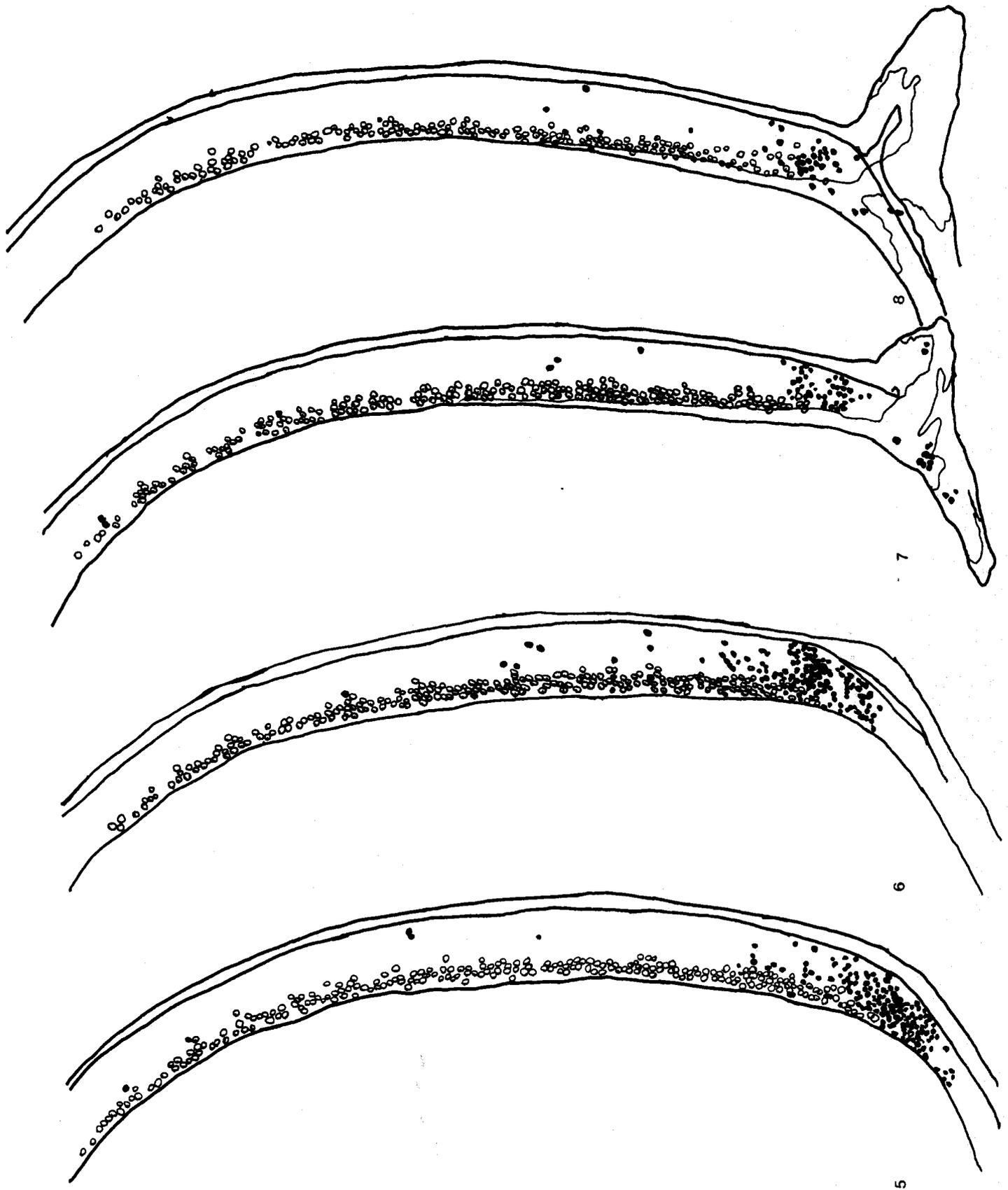
2

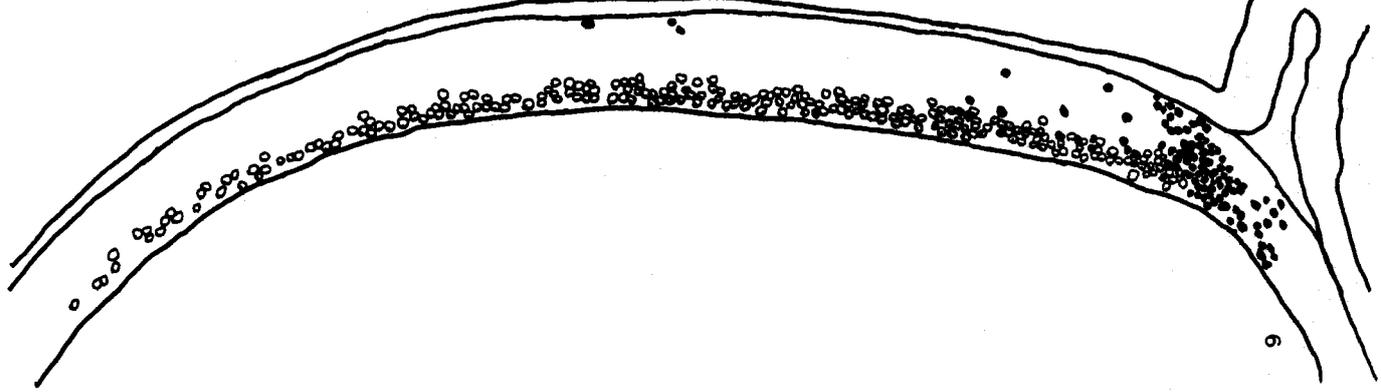
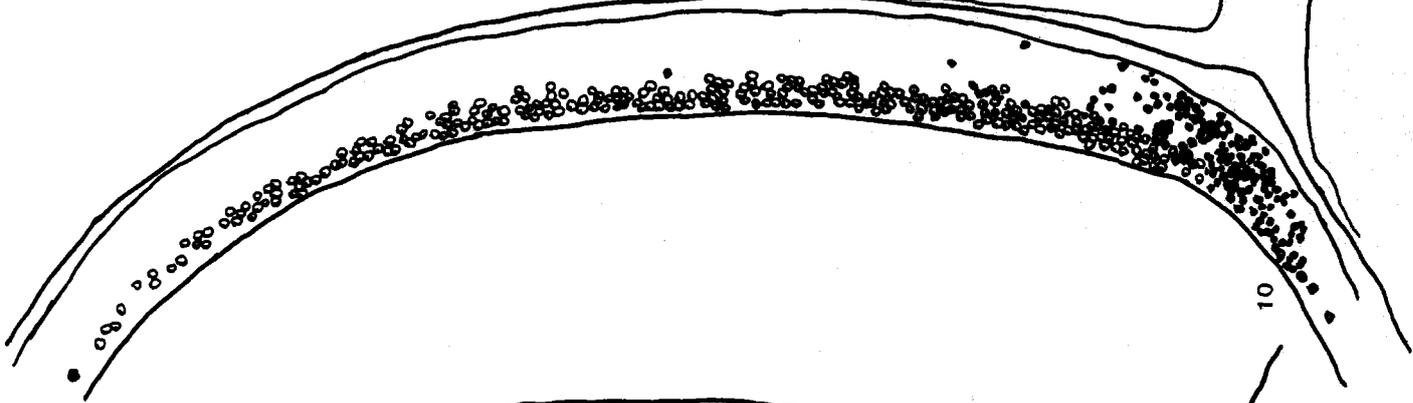
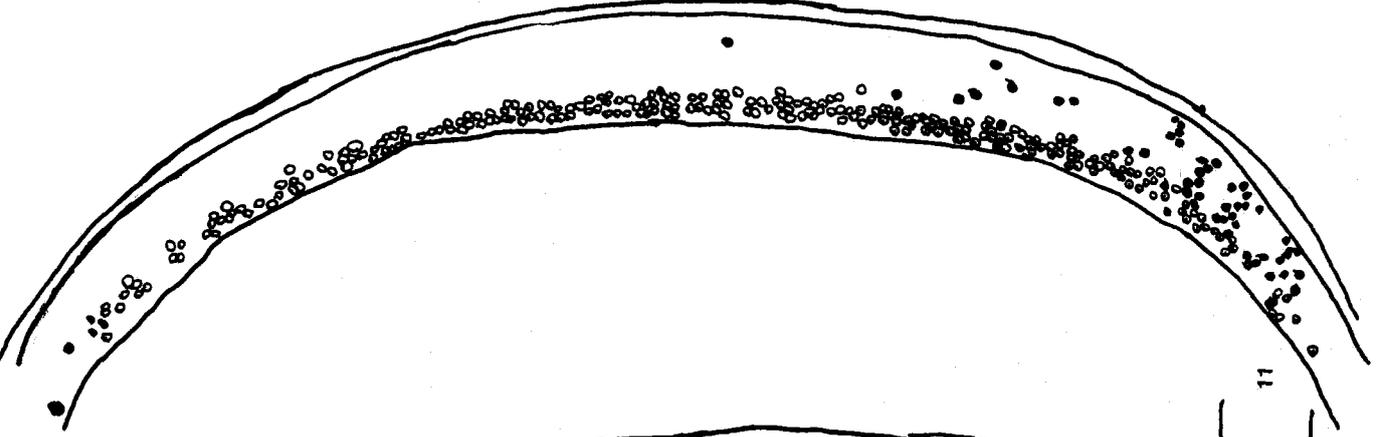
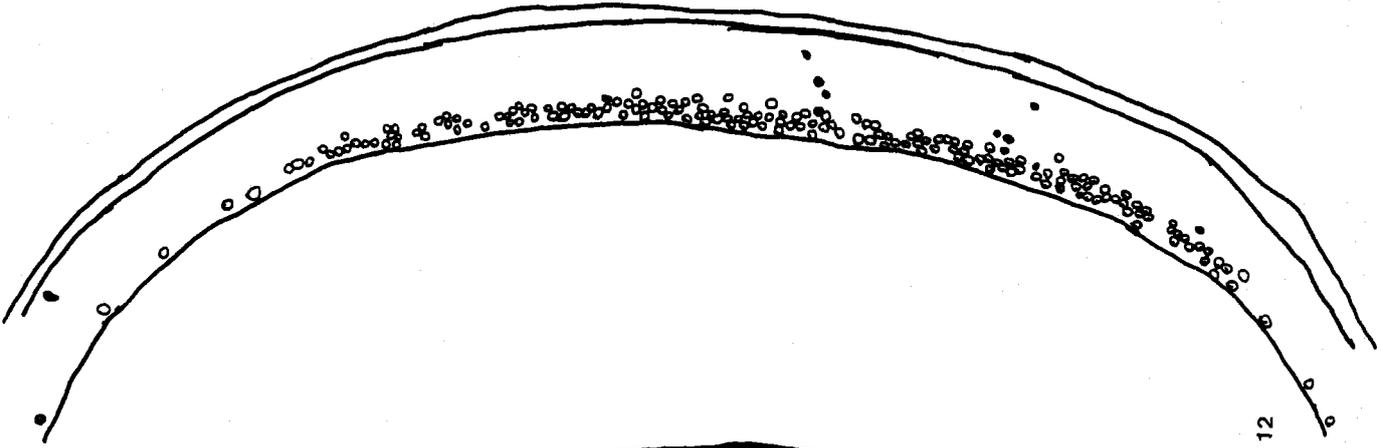


1



b





3.7 Muerte celular en el estadio HH25

Este estadio, último objeto de este estudio, se caracteriza porque la fisura se ha cerrado totalmente o lo está haciendo. Ha habido de nuevo un crecimiento aparente del ojo, y tanto la capa de ganglionares como la de fibras ópticas, son ya evidentes en la zona ventral de la retina.

El número de restos parece haber descendido respecto al estadio anterior, aunque el solapamiento de los errores *standard* no permite afirmarlo concluyentemente.

La representación gráfica de la distribución de la muerte celular en el eje dorsoventral nos permite observar que el patrón, bastante constante hasta el estadio HH23 se ha modificado sensiblemente. No hay un pico de muerte celular intensa en zonas dorsales al tallo, manteniéndose constante en las zonas de retina a nivel del tallo óptico, y disparándose ventralmente a él (fig. 13).

Aunque la región con diferenciación clara abarca más de 200 μ a ambos lados de la fisura, la mayoría de la muerte celular se sitúa en el primer tercio de esa zona, en dónde no aparecen prácticamente células ganglionares (fig. 14).

Al considerar la proporción de restos frente al número de células, vemos que, aún en las zonas de mayor degeneración, esta es muy baja (no llega a 0,20, frente a los 0,50 que alcanza en otros estadios). Este hecho puede ser debido al incremento de relativo del número de células, pero sobre todo es atribuible a que se ha incrementado grandemente la zona de recuento en cada corte, para abarcar toda la zona en que aparece degeneración y que presente diferenciación citológica clara.

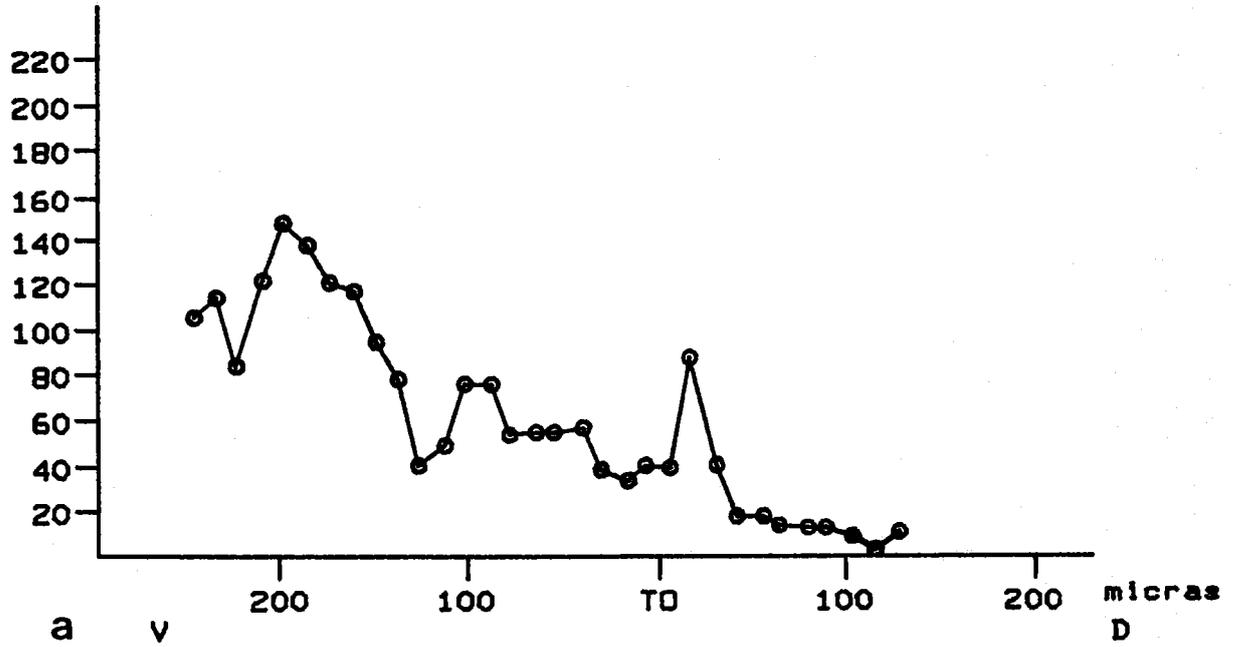
La proporción de células ganglionares disminuye algo a nivel del tallo y más aún ventralmente, manifestando que en esta zona la

citogénesis y diferenciación se encuentra más retrasada (fig. 13b). El que en esta zona no aparezca la correlación observada anteriormente entre diferenciación y restos celulares, se puede explicar teniendo en cuenta que los axones de la retina ventral crecen perpendicularmente hacia la fisura (Halfter y cols., 1985); por tanto, sigue apareciendo muerte celular entre las células ganglionares y el destino del crecimiento de sus axones.

Fig. nº 13: a) Distribución del número de restos a lo largo de la zona de retina ventral que presenta diferenciación y de las primeras 100 μ de retina dorsal al tallo, de una retina de estadio HH25.

b) Id. de la proporción de restos (círculos) y del índice de ganglionares (triángulos).

n restos



$\frac{n \text{ restos}}{n \text{ cels}}$

I.G.

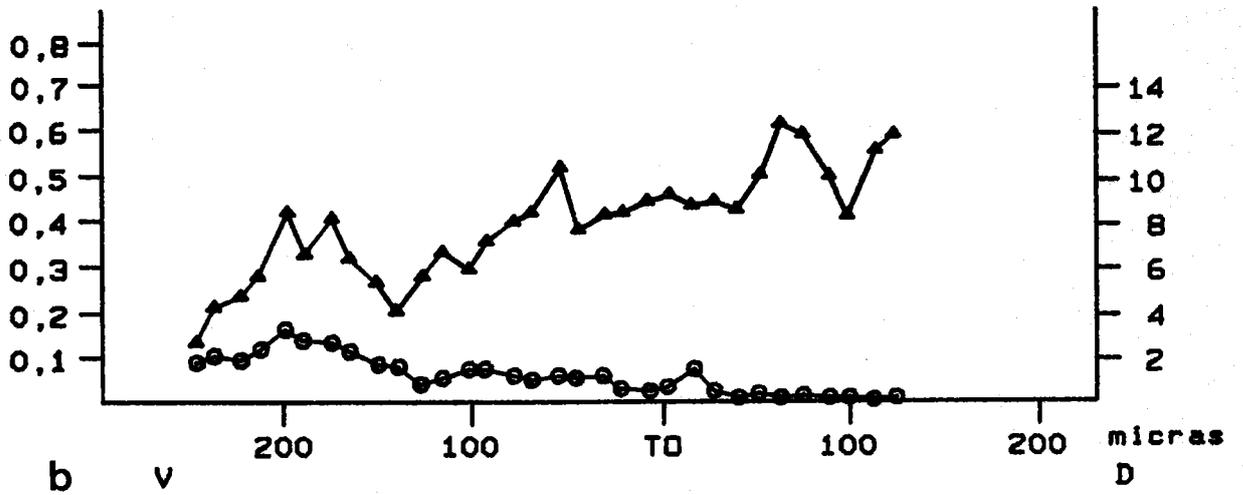
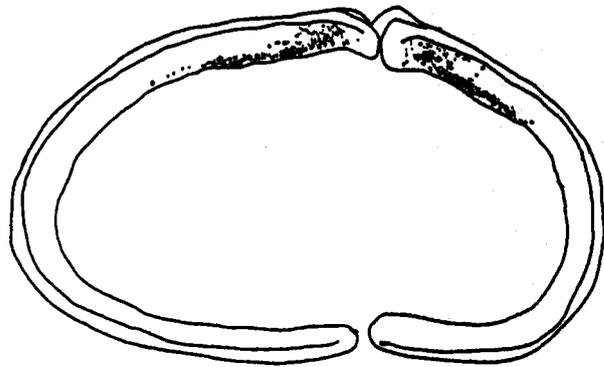
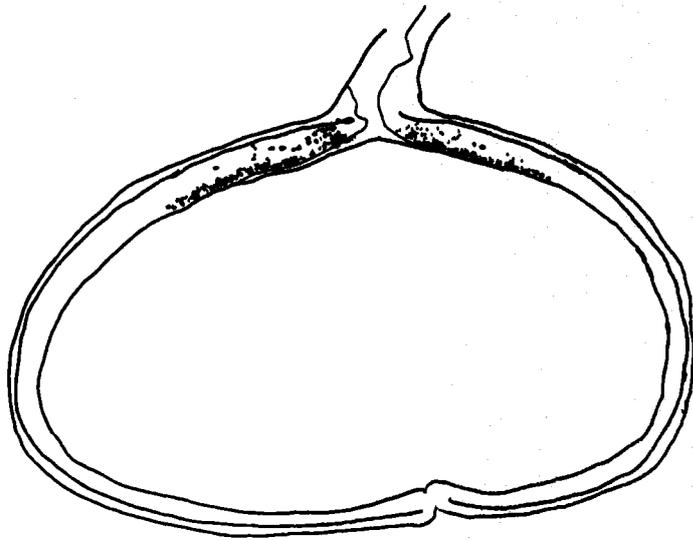
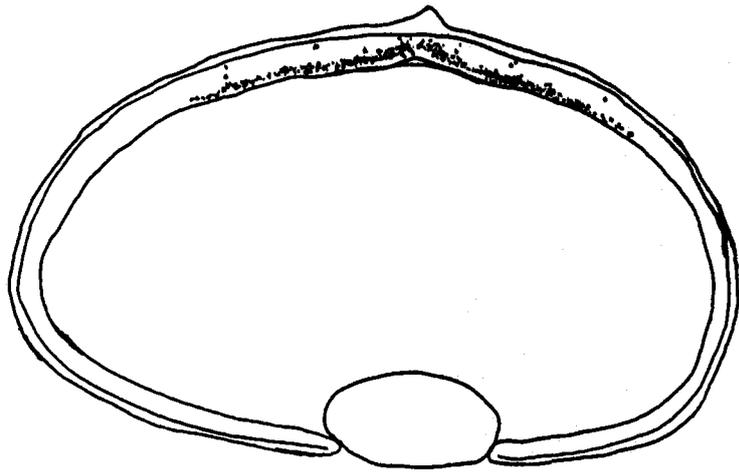


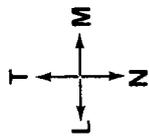
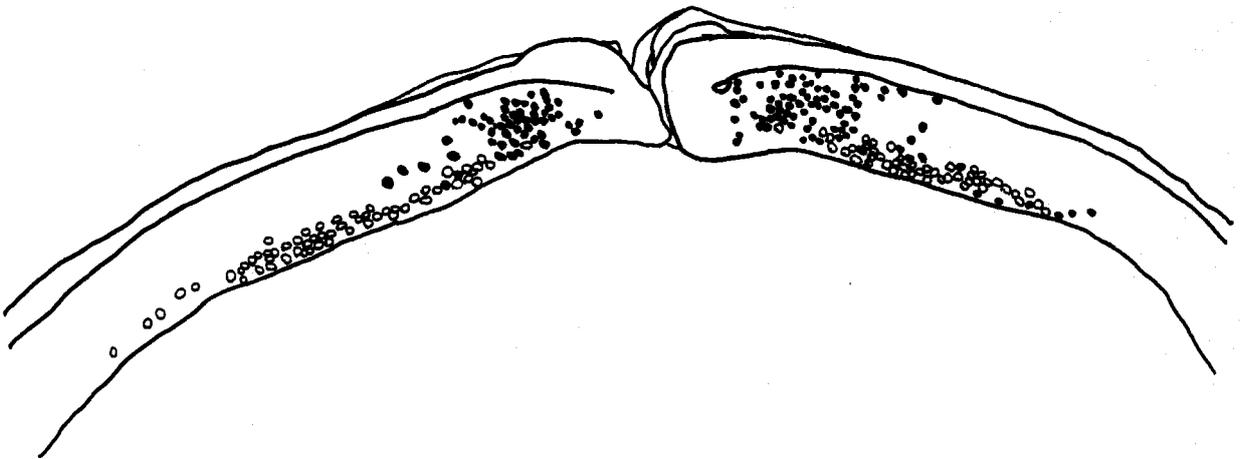
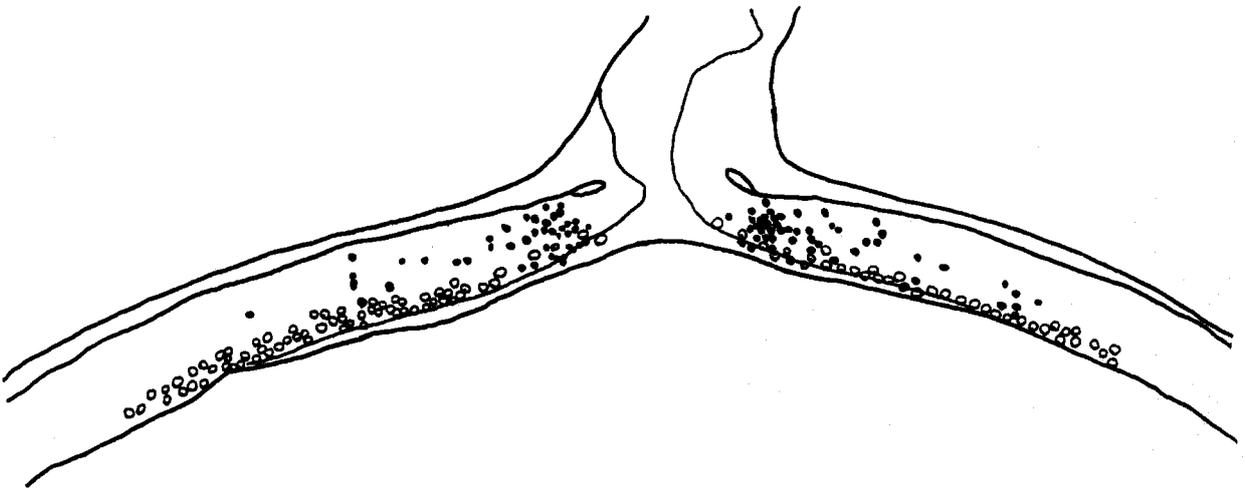
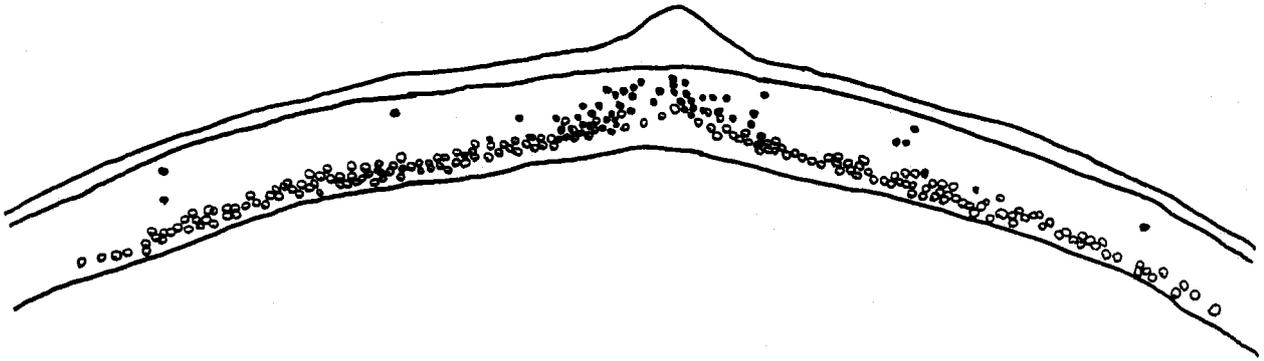
Fig. nº 14: Dibujos de bloques de 40 μ de grosor correspondientes a zonas representativas de la distribución de restos celulares (puntos negros) y células ganglionares (círculos vacíos) en la retina de un embrión HH25.

a) Dibujos de la retina completa. De izquierda a derecha, corresponden, respectivamente, a retina ventral, al nivel del tallo óptico, y a unas 50 μ dorsalmente a éste.

b) Ampliación de la zona central de la retina.



—
a



b

IV. COMENTARIO

1.-MORFOLOGIA DE LA MUERTE CELULAR

La degeneración celular en la retina del embrión de pollo se caracteriza por presentar una condensación inicial del núcleo, rotura de la célula (fragmentación) y posterior fagocitosis de los restos. Estas características se corresponden a lo que Kerr y cols. (1972) denominan *apoptosis*.

Las células afectadas por este fenómeno se encuentran en la capa ventricular de la retina, lo que da pie a suponer que se trata de células neuroepiteliales indiferenciadas. La degeneración de algunas células con diferenciación morfológica, apreciable sobre todo en el estadio HH19, y el posible segundo tipo de degeneración, distinto al menos en sus fases iniciales, deben ser excepciones a este hecho; sin embargo, en ambos casos la localización de estas estructuras es diferente a la de la muerte celular típica en los estadios considerados del desarrollo de la retina.

El mecanismo que desencadena la muerte celular fisiológica no es conocido. En el caso de la retina no parece probable que se pueda tratar del efecto de una sustancia difusible que actúe directamente sobre las células: en el embrión la difusión es muy rápida y extensa y un mecanismo de esa naturaleza debería producir una degeneración masiva. Una alternativa a este hecho lo puede constituir el que

receptores para esta sustancia sólo estén presentes en algún momento de la vida de la célula (por ejemplo, en alguna fase del ciclo celular), lo que limitaría el efecto de la sustancia difusible a la proporción de células que se encuentren en ese estado. Otro factor que puede ser responsable de la degeneración es un control directamente genético, como se ha descrito en algunos invertebrados (Robertson y Thompson, 1982). En la retina, la superposición de un patrón temporal de generación con otro de localización topográfica puede proporcionar a cada célula unas determinadas coordenadas espacio-temporales, tal y como también se ha propuesto para la especificación de las células ganglionares (Jacobson, 1978); las células que posean determinadas coordenadas serían inducidas a degenerar. Finalmente hay que considerar que la degeneración puede darse en respuesta a factores ambientales (Saunders, 1966) derivados del tamaño de la población celular y puede actuar regulándola; estos factores podrían ser tensiones o fuerzas ejercidas sobre la célula o acumulación de sustancias producidas por el metabolismo celular que, al sobrepasar un cierto umbral en una zona, induce la muerte.

Una alternativa a estas hipótesis, relacionando muerte celular y crecimiento de fibras nerviosas, es presentado más adelante, al discutir la distribución de la muerte celular en la retina.

Tampoco se ha determinado como se produce la fragmentación de la célula durante la degeneración. La fragmentación puede ser originada por cambios en la permeabilidad celular y posterior hinchamiento del contenido citoplásmico hasta que estalle, dando lugar a porciones de material que siguen envueltos en membrana, o por rotura de la membrana. La formación de zonas de la célula estranguladas del resto tal vez es solamente el reflejo de las presiones externas que sufre la célula y que no puede compensar con su presión interna.

Finalmente se producirán cuerpos apoptóticos (Kerr y cols., 1972) que han de ser fagocitados. La fagocitosis es realizada en estos estadios principalmente por células neuroepiteliales que deben estar aún en el ciclo celular, como manifiesta la presencia de células en mitosis que contienen restos celulares en digestión. Este hecho es también observado por Ballard y Holt (1968). Además, estas células parece que pueden continuar su diferenciación hasta neuronas.

La caracterización de estos fagocitos como células neuroepiteliales se hace en base a su morfología al microscopio óptico y electrónico, y está en consonancia con las observaciones de otros autores en este mismo material (García Porrero y Ojeda, 1979; García Porrero y cols., 1984). La formación de invaginaciones a modo de cráteres en la superficie de los fagocitos, que García Porrero y cols. (1979) postulan, debe producirse por la necesidad de mantener los contactos basales y apicales, lo que impide la formación de pseudópodos. Por lo tanto, la capacidad fagocítica de estas células debe ser muy limitada, como corresponde a fagocitos "no profesionales". La ausencia de actividad fosfatasa ácida en estas células también parece indicar que estas células no han sufrido ningún tipo de diferenciación especial para realizar esa función de digestión.

Los fagocitos deben incorporar los productos finales de la digestión, como parecen indicar los resultados de Silver (1976). Sin embargo, aún está por determinar hasta qué punto se trata exclusivamente de la utilización de nutrientes como tales, o si también se produce en la degeneración algún factor que sea capaz de afectar el metabolismo o la diferenciación de las células que lo incorporan.

2.-FAGOCITOS DE LA RETINA EMBRIONARIA

2.1 Células fagocíticas en el sistema nervioso inicial

Aunque bastantes autores han hecho referencia a la muerte celular en el desarrollo histológico de la retina en los vertebrados, (Glücksman, 1951; Silver y Hughes, 1973, 1974; Theiler y cols., 1976; Silver y Robb, 1979), también en el embrión de pollo (García Porrero y Ojeda, 1979; Schook, 1980a,c; García Porrero y cols., 1984), no aparecen referencias a que en esta fase del desarrollo existan en la retina células fagocíticas que no sean de tipo neuroepitelial.

De los trabajos citados, solo dos se refieren a esta posibilidad, para desecharla. Theiler y cols. (1976) afirman que no intervienen macrófagos en la fagocitosis de los restos en la retina del ratón, ya que consideran muy difícil que células procedentes del mesénquima puedan introducirse en el neuroepitelio de la retina, cuando todavía no la han invadido vasos sanguíneos. Aunque no se han realizado estudios en el embrión de ratón que permitan afirmar la entrada de células mesenquimatosas en la retina, de manera semejante a lo que se propone en el pollo, las dificultades que señalan Theiler y cols. pueden

ser salvadas por las células mesenquimales en el ratón del mismo modo que en el pollo, cuya retina embrionaria tiene una constitución semejante. Schook (1980c) manifiesta que no se encuentran macrófagos en la copa óptica del embrión de pollo (hasta el estadio HH18), ni en el mesenquima ni en los vasos sanguíneos en formación alrededor del ojo. En estadios anteriores al HH19 no se han encontrado células con actividad fosfatasa en la retina, pero sin embargo sí aparecen en los vasos que se están formando en la futura esclera y en el interior de la copa óptica. El que este autor no logre diferenciarlas es fácil de explicar, ya que se basa únicamente en la observación morfológica con técnicas generales.

Hinds y Hinds (1974, 1978) en su estudio del inicio de la diferenciación de las células ganglionares y amacrinas mediante cortes ultrafinos seriados, describen células cuya morfología se aparta de la de las neuronas en diferenciación y que frecuentemente presentan fagosomas. Los autores afirman que estos macrófagos, como los catalogan, deben originarse por la diferenciación de células ventriculares (neuroepiteliales), ya que en el momento del desarrollo que estudian, la pared de la retina no ha sido invadida por vasos sanguíneos.

Young (1984) describe la presencia de macrófagos asociados a vasos en formación en las capas más internas de la retina del ratón durante los procesos de degeneración celular que ocurren en los primeros treinta días del desarrollo postnatal. Estas células no llegan a introducirse en la capa ventricular y nuclear externa, donde los restos, según afirma, deben ser eliminados por células ventriculares vecinas, por células de Müller o por los fotorreceptores.

Las células de Müller, única célula glial descrita en la retina, son señaladas como responsables de la fagocitosis de restos de las células ganglionares que degeneran, tanto en el desarrollo normal como en situación experimental en la retina del embrión de pollo (Hughes y La Velle, 1975; Hughes y Mc Loon, 1979; Meller, 1981). Estos

estudios se centran en estadios posteriores al sexto día de incubación, cuando ya puede apreciarse diferenciación de las células de Müller.

Otros autores, también en la degeneración de células ganglionares, afirman que la fagocitosis la llevan a cabo células gliales (Rager, 1980, en el pollo a partir del día 8^o de incubación) o células de la microglía (Cunningham y cols., 1982, en la retina postnatal de la rata).

Esta discrepancia también existe en otras regiones del sistema nervioso en desarrollo. Por ejemplo, en el caso de la degeneración de motoneuronas en la médula espinal, la eliminación de restos ha sido asignada a macrófagos de origen mesodérmico (Levi-Montacini, 1950; Hamburger, 1958), en el embrión de pollo; a microglía en *Xenopus* (Hughes, 1961); a astrocitos (O'Connor y Wittenbach, 1974) en embriones de pollo de 4-6 días de incubación; y a células ependimales radiales y leucocitos mononucleares, que se introducen en el tejido nervioso a través de los vasos sanguíneos (Chu-Wang y Oppenheim, 1978). Aunque este trabajo se ha realizado centrando las observaciones en la retina, también se han observado células con actividad fosfatasa ácida en la zona marginal del diencefalo, con frecuencia asociadas a vasos.

2.2 Tipos de fagocitos en la retina

La presencia de dos tipos distintos de células que realizan fagocitosis en la retina del embrión de pollo se fundamenta en la observación morfológica y en la detección de la actividad fosfatasa ácida.

El primer tipo corresponde a células neuroepiteliales indiferenciadas morfológicamente y que no manifiestan actividad fosfatasa. El número de restos que contienen estas células es siempre reducido, apareciendo uno o dos en la misma sección. Al microscopio

electrónico estas células que poseen fagosomas, son semejantes a las que no los presentan.

Las segundas son células de morfología muy distinta, con un citoplasma que aparece totalmente ocupado por restos celulares, que con frecuencia enmascaran el núcleo, haciéndolo muy difícil de distinguir. Estas células sí poseen actividad fosfatasa ácida.

La ausencia de actividad fosfatasa ácida en las primeras células ha de ser discutida. Ya que la fosfatasa ácida es un enzima característico de los lisosomas, es difícil suponer que realmente no se encuentre en células que están realizando digestión celular. En fagocitos "no profesionales", como son las células epiteliales del borde marginal de la copa del cristalino, García Porrero y cols. (1984) han podido determinar ultraestructuralmente la presencia de esta actividad enzimática; la actividad está igualmente presente en células del esbozo del cristalino situadas en zonas en que no ocurre degeneración.

La falta de actividad en las células neuroepiteliales puede deberse a:

-Que estas células posean una actividad enzimática que esté por debajo del umbral detectable por la técnica.

-En cierta forma relacionado con lo anterior, también puede deberse a que durante la fijación e inclusión se produzca una pérdida de actividad que la llegue a eliminar de estas células, o que impida detectarla; la reacción se observaría en los macrófagos porque, por su mayor actividad, la pérdida que sufren no es suficiente para que quede por debajo de lo detectable por la técnica. En este sentido Ballard y Holt (1968) han señalado que tras 24 horas de fijación en aldehidos se pierde hasta un 80% de la actividad presente en el tejido fresco, determinada bioquímicamente. Higuchi y cols. (1979) han puesto de manifiesto que la actividad fosfatasa detectada en los cortes aumenta al

incrementar el tiempo de incubación; así mismo, la realización de la fijación e inclusión a 2°C incrementa la intensidad de la reacción y el número de células que la presentan (Namba y cols., 1983). Todos estos hechos ponen de relieve que variaciones en la metodología producen modificaciones en los resultados de la técnica.

-Una última alternativa es que se trate de fosfatasas ácidas diferentes, es decir, que sean dos proteínas distintas las que aparecen en las células neuroepiteliales y en los macrófagos mesenquimales. La presente en las células neuroepiteliales no produciría reacción con el sustrato empleado, mientras que la de los macrófagos, sí lo hace. Ballard y Holt (1968) no lograron distinguir entre el enzima responsable de la actividad fosfatasa ácida demostrada con el fosfato de naftol y con el método de Gomori, aunque tampoco pudieron concluir que se tratase del mismo enzima.

Sea cual sea la razón de este comportamiento de la técnica empleada, permite distinguir perfectamente estos tipos celulares, de forma constante en todos los embriones estudiados. De hecho no se ha encontrado actividad fosfatasa ácida en la retina que no estuviese asociada a paquetes de restos (*clusters*); de forma recíproca, todas las agrupaciones de restos que aparecen en el mesénquima manifiestan esta actividad.

2.3 Origen de las células con actividad fosfatasa

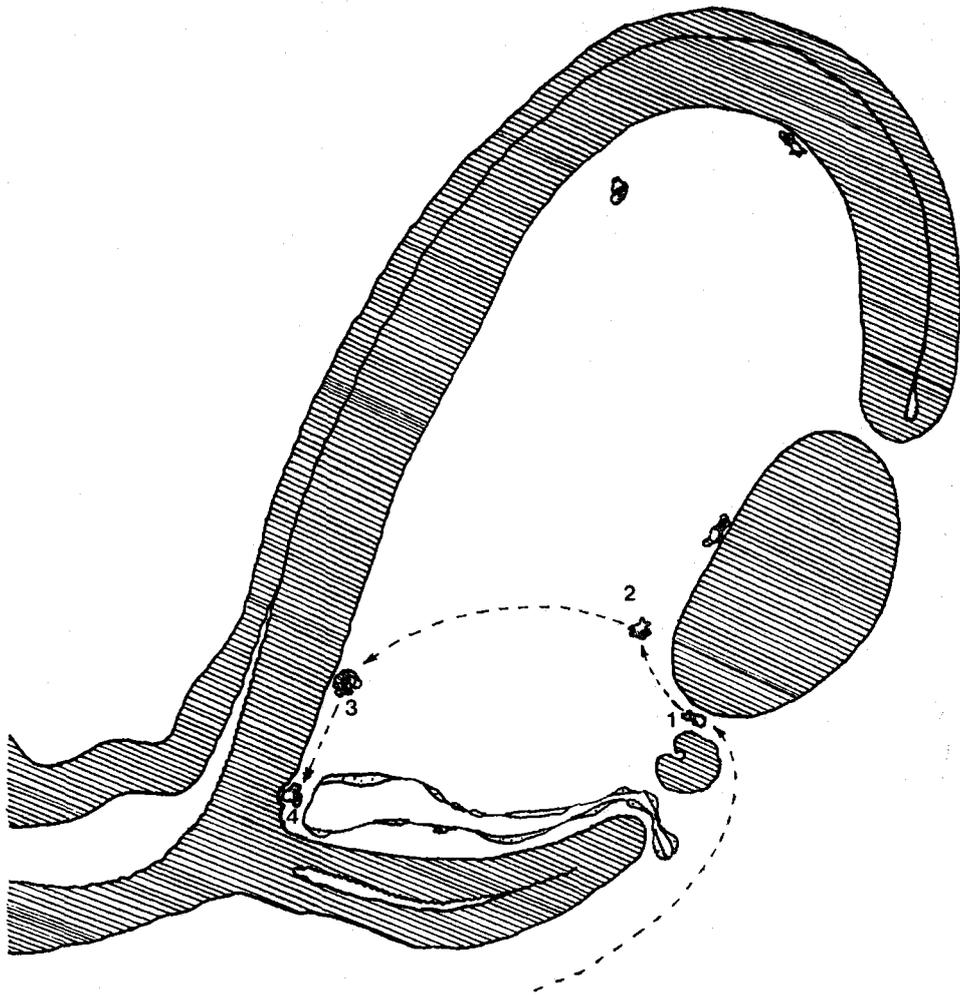
La presencia de células con actividad fosfatasa en diferentes situaciones dentro de la copa óptica permite suponer que entran a partir del mesénquima cefálico. A la vista de las observaciones parece poco probable que las células con actividad fosfatasa ácida provengan de la diferenciación de células neuroepiteliales, aunque no se pueda descartar que los grupos de restos con esta actividad correspondan a

grupos de células neuroepiteliales que degeneran conjuntamente, con una alta producción de enzimas autolíticas. Sin embargo, los signos de degeneración inicial aparecen siempre en células aisladas y los paquetes de restos en zonas de abundante presencia de fragmentos más o menos digeridos.

A pesar de las dificultades que entraña proponer un modelo de movimiento a partir de imágenes estáticas, la observación de las células fosfatasa-positiva en el interior de la copa óptica sugiere fuertemente el que estas células alcanzan la retina moviéndose a través del humor vítreo (fig. 15). El hecho que en los preparados en que se ha realizado la reacción histoquímica se tiñan todas las células que aparecen en el humor vítreo, da pie para considerar como del mismo tipo celular las que se observan en cortes semifinos.

Las imágenes que muestran células con esta actividad entre el cristalino y el borde de la copa óptica permiten suponer que es a través de este espacio que acceden a la cámara posterior del ojo. El movimiento de estas células hasta el interior de la copa óptica puede deberse a la difusión de alguna sustancia quimiotáctica desde la misma retina o, más probablemente, desde el contenido de la copa óptica. La difusión produciría un gradiente de concentración que guiaría a las células que se han diferenciado dentro del mesénquima hasta su entrada en el ojo; estas células diferenciadas deben presentar receptores para la sustancia quimiotáctica, que no posean las mesenquimales típicas. Dentro de la copa óptica, ya sea por un movimiento más o menos al azar, o por la existencia de alguna señalización, alcanzarán la zona posterior de la retina. En esta zona la lámina basal tal vez posea características distintas que las células sean capaces de reconocer; este hecho se infiere de la observación de la morfología de las células que aparecen adheridas a esta zona; mientras que las que se observan pegadas a la membrana basal del cristalino y de regiones periféricas de retina aparecen muy aplanadas, íntimamente apuestas a ella, en la retina posterior conservan una forma más esférica en sección. De esta forma, los presuntos macrófagos alcanzan la única vía de entrada a la retina

Fig. nº 15: Esquema del camino propuesto para la entrada de macrófagos mesenquimales en el interior de la copa óptica y en la retina neural. Acceden al humor vítreo introduciéndose entre el cristalino y el borde de la copa (1). Posteriormente se deben mover por el interior de ésta (2), hasta que alcanzan la retina central(3), donde presentan características distintas. La invasión del neuroepitelio parece darse únicamente en la zona de salida de la arteria hialoidea (4).



que se ha podido determinar, es decir, la zona inmediatamente dorsal a la que limita la salida de la copa óptica de la arteria hialoidea.

Para acceder a la retina, estas células deben atravesar la membrana basal, que aparece claramente definida con el microscopio electrónico. Para ello, se pueden suponer mecanismos semejantes a los propuestos por Nichols (1986) para explicar la salida de las células de la placoda del trigémino, seguramente mediante actividad colagenasa.

Debido a que no se ha encontrado en la bibliografía referencias a este hecho, no se pueden confrontar estos datos con los de otros autores.

2.4 Diferenciación de las células con actividad fosfatasa ácida

Estos estudios permiten afirmar el origen mesenquimal de las células con actividad fosfatasa ácida de la retina. Además, también se puede comprobar que estas células se diferencian directamente a partir de células con morfología semejante a la de las mesenquimales típicas.

Como primera manifestación de la diferenciación, las células mesenquimales mostrarían un incremento de la actividad fosfatasa ácida; sin embargo, su forma general es la misma que la de las células que la rodean y que no presentan actividad. El aspecto "puntual", no homogéneo de la tinción, que se aprecia en estas células sugiere la localización lisosómica del enzima; este hecho es menos constatable en células que presentan mayor intensidad de reacción enzimática. Junto con el incremento de la actividad, hay un cambio morfológico, y un progresivo aumento del número de restos fagocitados que se observan en su interior. La pérdida de intensidad de la reacción en los macrófagos más cargados de restos marca el final del proceso, tal como se puede describir en este material.

El destino final de los macrófagos no es conocido. No tienen porqué estar relacionados con las líneas celulares que darán lugar a las células fagocíticas del adulto. En este sentido, Ballard y Holt (1968) afirman que en ocasiones los macrófagos mesenquimales pueden degenerar y ser fagocitados a su vez. Esta hipótesis explicaría imágenes en que no es apreciable el núcleo "sano" del fagocito y sí, sin embargo, fragmentos considerables de material picnótico; la disminución de la actividad fosfatasa sería consecuencia de la falta de producción activa del enzima.

Aunque algunos autores hacen referencia a que se produce autólisis de las células en degeneración (Hinchliffe y cols., 1981), en nuestras preparaciones no hemos hallado imágenes que apoyen esta idea, es decir, células aisladas con signos de degeneración y una actividad fosfatasa elevada.

Ballard y Holt (1968) describen la diferenciación histoquímica de las células mesenquimales. El proceso se inicia tras el comienzo de la fagocitosis de restos celulares; posteriormente se incrementa el número que contienen y paralelamente aumenta la intensidad de la reacción para la actividad fosfatasa ácida y esterasa. Por tanto, la diferenciación de estos macrófagos sería inducida por la presencia de muerte celular. En el presente estudio, aunque no se puede descartar que en algunos casos se desencadene la diferenciación tal y como estos autores proponen, se encuentran frecuentemente células que están en diferenciación inicial, que coconservan aún su apariencia mesenquimal, y en zonas en las que no hay degeneración. Esta discrepancia puede explicarse considerando que se emplean técnicas diferentes para poner de manifiesto las actividades enzimáticas. El mayor detalle que se observa en las secciones de 5 μ de material incluido en glicolmetacrilato, frente a los cortes de 10 μ de criostato (Higuchi y cols., 1979) que utilizan estos autores, puede haberles impedido apreciar fases más iniciales de la diferenciación. También ha de tenerse en cuenta que la zona de degeneración es diferente; mientras que en la demarcación de los dedos se produce la

degeneración de un área extensa con gran abundancia de células mesenquimales, que deben poseer mayor capacidad fagocítica, los macrófagos en el mesénquima céfálico se diferencian para ejercer su función, en algunas ocasiones, en zonas distintas del mesénquima, como es la retina.

Las células en mitosis con actividad fosfatasa indican que estas células son capaces de división. Este hecho ya ha sido señalado en macrófagos embrionarios en otros tejidos y especies (Sorokin y cols., 1984). La necesidad de realizar cortes seriados de material plástico y efectuar la reacción enzimática para identificar estas células, ha impedido analizar la distribución de estas células en el mesénquima. Las mitosis teñidas no presentan restos en su interior, al contrario de lo que señalan Ballard y Holt (1968).

3.-CUANTIFICACION Y DISTRIBUCION DE LA MUERTE CELULAR

3.1 Aspectos cuantitativos

La cuantificación sobre cortes seriados de la muerte celular plantea problemas derivados de la fragmentación y eliminación de las células, como ya ha sido indicado en "Resultados". En este sentido serían de desear indicadores del número de células que han degenerado y que permitan comparar, de modo fiable, diferentes estadios. Así, por ejemplo, Rager y Rager (1978a,b) utilizan el número de fibras de células ganglionares presentes en el nervio óptico para estudiar las variaciones en el número de estas células. En el presente caso, es muy difícil establecer una comparación entre el recuento del número total de células en diferentes estadios, ya que hay factores, como la proliferación celular y la diferenciación, que afectan mucho más intensamente a esta población que la degeneración celular.

El recuento de los restos presentes permite, sin embargo, obtener una idea bastante aproximada de la degeneración, y establecer comparaciones entre los estadios del desarrollo que se consideren. Este método es utilizado por Silver y Hughes (1973), Theiler y cols. (1976) y Silver y Robb (1979), entre otros.

Los resultados obtenidos (tabla 1; fig. 1) muestran que antes del estadio HH20 el nivel de muerte celular se mantiene prácticamente constante desde el estadio HH16. Dado el incremento del número de células que sufre la retina durante estos estadios, evidentemente disminuye la relación entre número de células que degeneran y número total de células.

La diferencia en el número total de restos se hace muy considerable entre los estadios HH19 y 21. El estadio HH20 se puede considerar de transición en este incremento de la degeneración. Los embriones estudiados de este estadio muestran poca homogeneidad en cuanto al número de restos, lo cual es atribuible a que en poco tiempo (se considera que el estadio HH20 comprende las 70-72 h. de incubación) se hace diez veces mayor.

Posteriormente, aumenta el número medio de fragmentos en cada estadio, hasta el HH24, para disminuir ligeramente en el HH25, último considerado. De cualquier manera, ha de atribuirse solo un valor relativo a estos datos estadísticos, ya que si bien el número de células que degeneran en cada momento sí debe ser más o menos constante, el número de restos que se produzcan tras la fragmentación y posterior digestión no se puede afirmar que sea reflejo proporcional de las células muertas. En este sentido, Silver y Hughes (1973) dan como representativa de la degeneración celular en cada estadio la media del número de restos que encuentran en las dos retinas de un mismo embrión.

El incremento de la muerte celular en el embrión de pollo coincide con el aumento del desarrollo de las fibras ópticas y su fasciculación, hechos que se producen sobre el estadio HH19-20 (Goldberg y Coulombre, 1972; Halfter y cols., 1985).

Silver y Hughes (1973) y Silver y Robb (1979) realizan un estudio de la muerte celular durante la morfogénesis del ojo en rata y ratón, respectivamente. Señalan un incremento constante de la muerte

celular hasta el día 12º de gestación en la rata en lo que denominan "zona ventral de degeneración"; la muerte celular disminuye drásticamente 24 h. más tarde. En este caso no existe coincidencia entre el aumento de la muerte celular y el desarrollo de las fibras, ya que los primeros axones son visibles en la retina el día 14º en la rata y el 12,5 en el ratón (Silver y Robb, 1979; Silver y Sapiro, 1981), es decir, cuando ya está disminuyendo la degeneración. El trabajo de Glucksmann (1951) parece sugerir que tampoco hay muerte celular en este momento de la diferenciación en la retina de *Rana temporaria*. No se han encontrado otras referencias concretas a este hecho en otras especies.

En el pollo, a pesar de que es a partir del estadio HH19 cuando la muerte celular se hace más intensa, no se había señalado la existencia de degeneración en los estadios HH20-25 (p. ej., García Porrero y cols., 1984).

3.2 Distribución de la muerte celular

Las zonas de muerte celular que aparecen en la retina de embriones de estadios HH16-17 se ajusta a las descritas por García Porrero y Ojeda (1979) y Schook (1980a,c) y presenta gran similitud con la distribución de la muerte celular en lo que Silver y Hughes (1973) denominan "zona ventral de degeneración" en roedores.

En las preparaciones de estos estadios aparece un escaso número de células ganglionares y las fibras están prácticamente ausentes, por lo que no se pueden establecer relaciones entre la degeneración y estos fenómenos.

En el estadio HH18 el patrón de muerte celular no ha variado, pero son ya observables con técnicas generales grupos de células ganglionares en el borde vitreal. La reconstrucción de dos retinas del estadio HH19 permite apreciar que la muerte celular se localiza ventral

al polo posterior, donde se ve un gran número de células ganglionares. El tallo aparece libre de restos celulares y de fibras que discurren por él; éstas sí son apreciables en la zona de muerte celular intensa.

Ya se ha señalado que, cuantitativamente, durante el estadio HH20 se produce un incremento notable de la presencia de fragmentos celulares. Sin embargo, el patrón de muerte celular es semejante al de estadios anteriores. Como se puede comprobar en las gráficas de distribución de restos, en el tallo óptico aún no aparecen prácticamente restos. La mayor cantidad de degeneración corresponde a la zona de retina comprendida entre la inserción del tallo y la de mayor índice de células ganglionares, situada más dorsalmente. Aunque las células ganglionares han aumentado claramente en la retina respecto a estadios anteriores y se ha extendido su presencia también ventralmente hacia el tallo, la degeneración parece haber sido empujada por la diferenciación de estas células hacia posiciones también más ventrales. En el estadio HH25, en el cual las células ganglionares son también abundantes a nivel del tallo, la degeneración celular se presenta sobre todo ventralmente al tallo.

La principal modificación que puede observarse en esta zona respecto a estadios anteriores es el incremento notable de fibras nerviosas que discurren hacia la fisura coroidea para salir de la retina por la parte ventral del tallo (nuestras propias observaciones; Rager, 1980; Silver y Sapiro, 1981; Halfter y cols., 1985)

La impregnación argéntica de montajes *in toto* de retinas (Goldberg y Coulombre, 1972; Halfter y cols., 1985) pone de manifiesto que la formación inicial de los fascículos de fibras ópticas adopta una disposición "en forma de árbol". A partir del estadio HH23 alcanzan la fisura axones no sólo provenientes de la región dorsal a ella, sino también de la lateral. Estos patrones de fibras se pueden relacionar fácilmente con la distribución descrita de muerte celular hasta el estadio HH25.

En reconstrucciones realizadas a partir de secciones horizontales del ojo, se aprecia cómo la muerte celular está más dispersa en las zonas más dorsales, y se va haciendo más intensa, a la vez que se concentra en una columna de degeneración inmediatamente dorsal al tallo, a medida que nos aproximamos a él. Esta distribución es correlacionable con la forma de árbol descrita para la disposición de las fibras: la columna de degeneración más intensa corresponde al "tronco" del árbol formado por las fibras ópticas; la zona de muerte celular más difusa correspondería a las "ramas" constituidas por fascículos poco nutridos, que, al ir uniéndose darán lugar al tronco más grueso. Finalmente, los haces de fibras abandonarán la retina por el disco óptico, aún no muy definido.

Continuando con esta correlación, la llegada de fibras al disco óptico desde regiones laterales a partir del estadio HH23, debe suponer un incremento de la muerte celular a nivel del tallo. Este hecho es ligeramente apreciable en la representación gráfica de la distribución de la degeneración en un ojo del estadio HH23; en la reconstrucción de un embrión del estadio HH24 se aprecia claramente este incremento de la degeneración en regiones laterales del tallo.

En la distribución de la degeneración en la retina ventral al tallo también es apreciable una estrecha correlación con la presencia de fibras. En esta región las primeras fibras son detectadas en el estadio HH23; los axones crecen perpendicularmente a la fisura, hasta que la alcanzan, momento en que se produce un brusco giro de las fibras nerviosas, que se orientan paralelamente a los bordes de la fisura y se dirigen hacia el tallo, para salir por su cara ventral. Por tanto, el mayor número de fibras, y sobre todo los fascículos más nutridos, aparecerá a ambos lados de la fisura. Esta localización es la que presenta la mayor densidad de restos en el estadio HH25.

Se ha señalado anteriormente que la distribución de muerte celular descrita para el pollo entre los estadios HH16 y 25 en la retina posterior coincide a grandes rasgos con la que describen Silver

y Hughes (1973) en roedores, también en la localización de los últimos restos que se producen, a ambos lados de la fisura óptica. Sin embargo, no se puede establecer una correlación semejante a la del pollo con el desarrollo de las fibras ópticas; en el primer caso, la mayor cantidad de muerte celular ocurre antes de la aparición de axones en la retina.

Silver y Sidman (1980) sugieren que la eliminación de células en el neuroepitelio permite una cierta reordenación de las restantes para formar "canales" (espacios extracelulares limitados por procesos neuroepiteliales) que sirvan de guía a las fibras en su salida de la retina. La muerte celular puede contribuir a la formación de estos canales previamente a la aparición de fibras nerviosas, como describen en el pollo Krayanek y Goldberg (1981). Es de destacar que este sistema de canales está más desarrollado en los roedores que en el pollo: así en estos animales se extienden a lo largo de la primera mitad del tallo, mientras que en el pollo solamente forman en esta zona un conglomerado de túneles semejante a un laberinto sin dirección predominante; en *Xenopus* los espacios son de tamaño mucho menor y no tienen alineación clara (Silver y Sapiro, 1981; Krayanek y Goldberg, 1981). La comparación de material procedente de embriones de pollo con fotografías de la retina del embrión de ratón (p.ej.: Silver y Robb, 1979, fig. 2A; Silver y Sidman, figs. 1 y 3) permite concluir que la extensión de los canales es mucho mayor en la retina de ratón antes de iniciarse el crecimiento de fibras nerviosas. Apoyándose en esto se puede suponer que el significado de la muerte celular en ambos casos debe ser semejante -la constitución de canales de conducción de fibras-, pero tendrían una relación temporal distinta con la aparición de axones en la retina.

Silver y Robb (1979) han relacionado la reducción de la muerte celular en la retina de ratones con la aplasia del nervio óptico, en los que se observa una disminución, frente a individuos normales, de los espacios extracelulares presentes en la retina y posterior desarrollo de las fibras ópticas, que no logran salir de la copa óptica. Von Szily (1912), que también observó degeneración en la retina en

desarrollo del conejo, afirma que aquella precede al crecimiento de las fibras y que los productos liberados en la degeneración pueden tener un efecto quimiotáctico sobre las fibras que avanzan hacia el tallo.

En cualquier caso, no puede desecharse la posible función morfogenética de la muerte celular en esta fase del desarrollo del ojo en que continúa modelándose su forma; sin embargo, la estrecha relación que presenta con el patrón de fibras, tanto en su variación cuantitativa como en la de su distribución, permite inclinarse más a relacionarla con la histogénesis retiniana.

3.3 Hipótesis sobre la muerte celular en la diferenciación inicial de la retina

1. Las fibras pioneras, que se originan en la retina central, deben ser capaces de reconocer señales específicas que les permitan seguir una vía adecuada hasta el techo óptico. Esta posibilidad ha recibido apoyo experimental al observarse que axones procedentes de esta zona de la retina son capaces de corregir su localización en el techo, variando bruscamente su dirección de crecimiento (Thanos y cols., 1984). Otros factores que pueden contribuir a esta regulación del crecimiento son la orientación de los espacios extracelulares en la retina y la presencia de moléculas relacionadas con la adhesividad diferencial.

Aunque se discute acerca de la existencia o no de canales destinados a la orientación del crecimiento, previamente a la aparición de las primeras fibras (Suburo y cols., 1979; Krayanek y Goldberg, 1981), es evidente la existencia de abundantes espacios extracelulares en el futuro recorrido de las fibras ópticas; aunque no se lleguen a constituir canales cerrados, al menos deben representar una zona de menor resistencia al crecimiento axónico, que en estas fases iniciales parece presentar una tendencia

inherente a ser en línea recta (Halfter y Deiss, 1984). También puede jugar un papel importante la presencia de señales específicas en las células neuroepiteliales, como proponen Singer y cols. (1979); de hecho, Krayanek y Goldberg (1981) señalan que los axones se adhieren fuertemente a la superficie de los pies terminales de las células neuroepiteliales, que además aparecen orientadas convenientemente. Silver y Rutishauser (1984) han puesto de manifiesto la presencia de NCAM a lo largo de toda la vía óptica, desde los pies terminales de las células neuroepiteliales de la retina hasta el techo óptico.

2. Los axones se irán originando en una secuencia dependiente de las coordenadas espacio-tiempo que adquieren las células ganglionares en su secuencia de generación (Bodick y Levinthal, 1980; Rager, 1980). Las fibras recién formadas parecen crecer siguiendo las preexistentes (Bodick y Levinthal, 1980), manteniéndose de este modo las relaciones de contigüidad existentes entre las células ganglionares que las originan. Este mecanismo, junto con el mantenimiento de la velocidad de crecimiento de los axones, conservaría la ordenación de las fibras, al menos dentro de la retina. Sin embargo, la salida de la retina supone una transformación de las coordenadas según las cuales se ordenan las fibras. Además, la confluencia de axones de muy diferentes regiones sobre la zona del disco óptico puede conducir a que se mezclen fascículos de procedencia distante.

3. Si se suponen canales de crecimiento de amplio calibre, podría darse la entrada en el mismo canal de fascículos que provienen de grupos de ganglionares de zonas diferentes. Sin embargo, este hecho se evita si los canales van aumentando de calibre a medida que se incrementa el grosor de los fascículos por la adición de nuevas fibras. Esta relación estrecha impediría que se incorporasen fascículos de cierta importancia a un canal por el

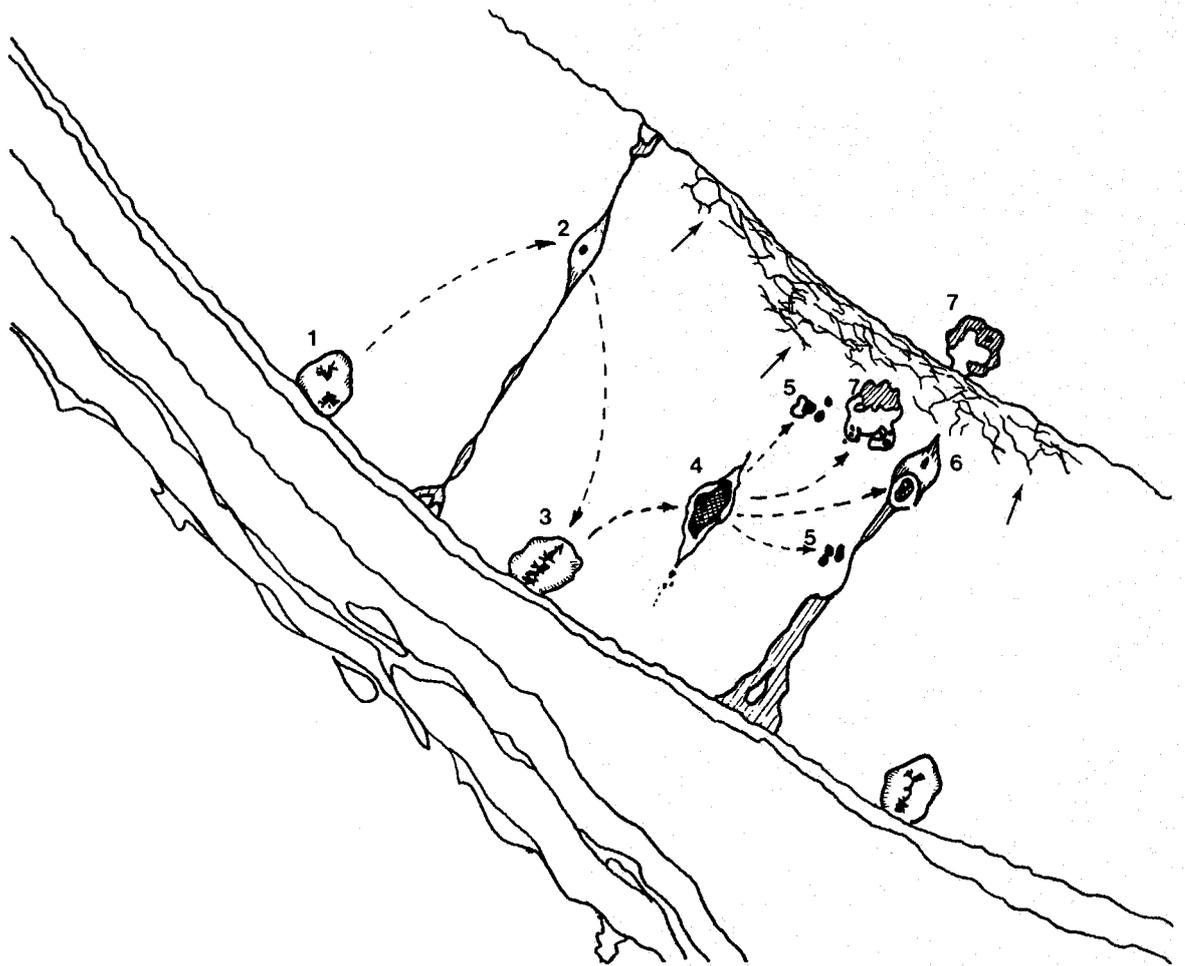
que ya discurren fibras, aunque seguramente pueden entrar en él axones individuales o pequeños haces de estos.

4. El mecanismo propuesto para ajustar el diámetro de los canales y el grosor de las fibras que circulan por ellos es el de interacciones directas entre los axones en crecimiento y los procesos vitreales de las células neuroepiteliales. Suburo y cols. (1979) señalan que los posibles canales de orientación de crecimiento que pudieran formar las células neuroepiteliales indiferenciadas se modificarían continuamente por el crecimiento y eliminación alternante de los procesos vitreales durante el ciclo celular. Estas modificaciones no se producirían si se eliminasen los procesos que interrumpieran un canal por el que discurren fibras. Así, si al crecer el proceso vitreal de una célula que acaba de sufrir mitosis, hace contacto con fibras que le impiden alcanzar la membrana basal, sería inducida a degenerar (fig. 16). Por tanto, la remodelación de los canales se realiza a medida que van aumentando las fibras que discurren por ellos.

5. Este proceso de muerte celular inducida por el desarrollo de la capa de fibras ópticas sólo es preciso en las fases iniciales del establecimiento del patrón de organización de los fascículos. Ya en la retina de 5 días de incubación se aprecia cómo los conos de crecimiento se disponen en la zona vitreal de los fascículos (Rager, 1980), lo que permite suponer que una vez que el canal tiene una cierta anchura (en sentido paralelo a la membrana basal) no es preciso que se incremente más, pues las nuevas fibras se incorporan sobre las anteriores (más vitrealmente a ellas).

6. Ya se ha indicado que un mecanismo de formación de los canales como el descrito, serviría para impedir que se mezclen

Fig. nº 16: Esquema que ilustra la hipótesis propuesta para explicar la degeneración celular de células neuroepiteliales en la retina central. Las células indiferenciadas realizan su ciclo mitótico (1-3); si en el crecimiento del proceso vitreal este encuentra fibras (flechas) que le impiden alcanzar la membrana basal, la célula degenera (4) y se rompe en fragmentos (5), que serán fagocitados por otras células neuroepiteliales (6) o por macrófagos de origen mesénquimal (7). El dibujo está realizado a partir de varios campos de un mismo preparado de un embrión HH22.



haces de un cierto calibre. Las fibras que no lograsen mantener su relación correcta dentro de los haces y produjesen conexiones anormales en el techo, habrían de ser eliminadas. La intensa degeneración de células ganglionares en la retina (Hughes y Mc Loon, 1979; Rager, 1980) que conduce a la desaparición de hasta el 40% de las fibras producidas en un principio, podría ser el reflejo de esta corrección, además de servir, como proponen Rager y Rager (1978), para el acoplamiento de los sistemas retina-techo óptico.

Se ha intentado un análisis experimental de esta hipótesis mediante el uso de colchicina, droga que según Webster y Gross (1970) no afecta a la muerte celular fisiológica en el embrión de pollo y que inhibe *in vitro* el crecimiento de las fibras nerviosas (Daniels, 1973). Aunque se observa en estos embriones un marcado descenso de la degeneración celular en la retina, es preciso realizar un análisis más detallado del efecto de la droga para obtener conclusiones fiables.

La hipótesis de que el factor desencadenante de la muerte celular en el pollo, sean las interacciones entre los procesos vitreales y los fascículos explica muy bien la estrecha relación que aparece entre degeneración y crecimiento de fibras, tanto en su cuantificación respecto a los diversos estadios, como a su localización en la retina. Por tanto, la distribución definitiva de canales se construiría por la influencia de las fibras en crecimiento. Recientemente, Scott y Bunt (1986), han propuesto que, en el tubo neural de *Xenopus*, la constitución de canales es posterior a la aparición de las primeras fibras; después de que estas fibras pioneras hayan aparecido, se va modificando la morfología de las células neuroepiteliales y los espacios se disponen alineados, permitiendo el crecimiento en línea recta de los fascículos más desarrollados.

En este sentido, la respuesta de la célula neuroepitelial a la interacción con axones o fascículos de ellos puede ser considerada de modo análogo a lo que proponen Navascués y cols. (1985) en el tallo óptico del embrión de pollo tras la llegada de las primeras fibras; en este caso, se produce proliferación en la zona marginal y posterior diferenciación de células gliales. Aunque en la retina lo que se induzca por el crecimiento de las primeras fibras sea la degeneración, este proceso es necesario para el desarrollo normal -se trata de muerte celular fisiológica-. Por tanto, se podría hablar de un tipo especial de diferenciación que conduce a la eliminación de algunas células. Al igual que la diferenciación celular este mecanismo debe responder a la activación de unos genes determinados (Young, 1984) como parece apoyar el hecho de que en algunas anomalías del desarrollo, heredables genéticamente, el fenómeno primariamente afectado sea la degeneración celular (Saunders, 1966), incluyendo el desarrollo inicial del ojo (Silver y Hughes, 1974; Theiler y cols., 1976; Silver y Robb, 1979). La activación de los genes responsables por diversas señales, como pueden ser las interacciones ya mencionadas, sería, pues, el factor desencadenante del inicio de la muerte de una célula concreta.

V. CONCLUSIONES

- 1ª. En el desarrollo de la retina en el embrión de pollo se produce, a partir del estadio HH20, un incremento notable de la muerte celular, que se prolonga hasta el estadio HH25.
- 2ª. Los procesos de muerte celular durante estos estadios afectan fundamentalmente a células neuroepiteliales indiferenciadas.
- 3ª. Entre los estadios HH20 y HH23, la principal zona de degeneración celular se localiza en la región central de la retina neural, dorsalmente a la inserción del tallo óptico. En el estadio HH24 se puede apreciar un incremento en la degeneración en la zona de inserción del tallo, y zona ventral. En el estadio HH25 la región con degeneración celular más intensa corresponde a la retina ventral.
- 4ª. La comparación de las distribuciones de los restos celulares y de las células ganglionares manifiesta que la zona de mayor presencia de restos se sitúa, durante los estadios

HH19 a HH23, entre la región de retina con diferenciación más avanzada -con mayor proporción de células ganglionares- y el tallo óptico. Esto supone que a lo largo de este periodo la zona de degeneración más intensa se aproxima paulatinamente a la inserción del tallo.

- 5ª. En el estadio HH25 la muerte celular se concentra en la retina ventral, a ambos lados de la fisura óptica, mientras que las células ganglionares aparecen periféricamente a estas zonas de degeneración.
- 6ª. El aumento de la muerte celular y su distribución espacio-temporal, se corresponden estrechamente con el patrón de desarrollo de fibras ópticas: hasta el estadio HH24, las fibras aparecen en la retina principalmente en la región del futuro disco óptico, mientras que en el HH25 son apreciables los axones de las células ganglionares de la zona ventral que discurren paralelamente a la fisura, hacia el tallo. Esta correlación en el tiempo y la distribución parece sugerir que la degeneración celular está implicada en los procesos de orientación del crecimiento y fasciculación de las fibras ópticas.
- 7ª. La morfología de la muerte celular en estas fases del desarrollo corresponde a la del fenómeno de *apoptosis*: hay condensación del material nuclear, fragmentación de la célula y fagocitosis de los restos.
- 8ª. La fagocitosis es realizada por dos tipos celulares diferentes: células neuroepiteliales vecinas a la que ha degenerado -que aparecen morfológica y estructuralmente semejantes a ella-, y fagocitos más especializados que parecen proceder del mesénquima cefálico.

- 9ª. La capacidad fagocítica de las células neuroepiteliales es menor a la de los fagocitos más especializados, y no presentan actividad fosfatasa ácida detectable. Los procesos de fagocitosis no parecen interferir en el desarrollo del ciclo mitótico; la digestión de restos puede proseguir tras haber comenzado su diferenciación morfológica.
- 10ª. Los fagocitos más especializados realizan una fagocitosis más intensa y presentan una apreciable actividad fosfatasa ácida.
- 11ª. Estas células se originan en el mesénquima a partir de células mesenquimatosas típicas que no se encuentran en relación con zonas de muerte celular. A medida que progresa su diferenciación morfológica e histoquímica, se hacen más redondeadas y se van cargando de restos en su citoplasma. Al final aparecen como masas de restos rodeadas de una actividad enzimática difusa.
- 12ª. Los fagocitos mesenquimáticos se introducen en la copa óptica entre los bordes de ésta y el cristalino. Una vez en la región del futuro humor vítreo, se pueden mover tanto sobre la membrana basal del neuroepitelio como a través de la matriz fluida que ocupa esta zona. Estas células entran en el neuroepitelio por la zona de salida de la arteria hialoidea de la retina.

VI. BIBLIOGRAFIA

Armengol, J.A., F. Prada, J.M. Genis-Gálvez (1979): Vesículas cubiertas (*coated vesicles*) en la retina del embrión de pollo: ¿un primer estadio sinaptogénico?

Morf. Norm. Patol., Sec. A, 3:643-667

Ashwell, K.W., C.R. Watson (1983): The development of facial motoneurons in the mouse. Neuronal death and the innervation of the facial nucleus.

J. Embryol. Exp. Morphol., 77:117-141

Ballard, K.J., S.J. Holt (1968): Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes.

J. Cell Sci., 3:245-262

Bennett, G.S., C. DiLullo (1985a): Expression of a neurofilament protein by the precursor of a subpopulation of ventral spinal cord neurons.

Develop. Biol., 107:94-106

Bennett, G.S., C. DiLullo (1985b): Transient expression of a neurofilament protein by replicating neuroepithelial cells of the embryonic chick brain.

Develop. Biol., 107:107-127

Bentley, D., H. Keshishian (1982): Pathfinding by peripheral pioneer neurons in grasshoppers.

Science, 218:1082-1088

Berg, D.K. (1982): Cell death in neuronal development. Regulation by trophic factors.

En: *Neuronal development* (N.C. Spitzer, ed.), pp. 297-331. Plenum Press, New York.

Berlot, J., C.S. Goodman (1984): Guidance of peripheral pioneer neurons in the grasshopper: adhesive hierarchy of epithelial and neuronal surfaces.

Science, 223:493-496

Bignami, A., D. Dahl, M.W. Seiler (1980): Neurofilaments in the chick embryo during early development. I. Immunofluorescent study with antisera to neurofilament protein.

Develop. Neurosci., 3:151-161

Bodick, N., C. Levinthal (1980): Growing optic nerve fibers follow neighbors during embryogenesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4374-4378

Bonhoeffer, F., J. Huf (1980): Recognition of cell types by axonal growth cones *in vitro*.

Nature, 288:162-164

Bonhoeffer, F., J. Huf (1982): *In vitro* experiments on axon guidance demonstrating an antero-posterior gradient on the tectum.

Eur. Mol. Biol. Org. J., 1:427-431

Boulder Committee (1970): Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology.

Anat. Rec., 166:257-262

Bray, D. (1984): Axonal growth in response to experimentally applied mechanical tension.

Develop. Biol., 102:379-389

Burck, H.C. (1966): Histologische technik.

Thieme, Stuttgart (Trad. Ed. Paz Montalvo, Madrid, 1969)

Calvente, R. (1985): Estudio estereológico de la distribución mitótica en el desarrollo de la retina de *Gallus domesticus*, L.

Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Chandler, N.B., G.C. Schoenwolf (1983): Wrinkle-free plastic sections for light microscopy.

Stain. Tech., 58:238-240

Chu-Wang, I-W., R.W. Oppenheim (1978): Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development.

J. Comp. Neurol., 177:33-58

Clarke, P.G.H. (1985): Neuronal death during development in the isthmo-optic nucleus of the chick: sustaining role of afferents from the tectum.

J. Comp. Neurol., 234:365-379

Cochard, P., D. Paulin (1984): Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*.

J. Neurosci., 4:2080-2094

Collins, F., J.E. Garret (1980): Elongating nerve fibers are guided by a pathway of material released from embryonic nonneuronal cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6226-6228

Coulombre, A.J. (1955): Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick.

Am. J. Anat., 96:153-189

Crossland, W.J., J.R. Currie, L.A. Rogers, J.P. Kelly (1974): The specification of retino-tectal projection in the chick.

J. Comp. Neurol., 155:127-164

Cunningham, T.J., I.M. Mohler, D.L. Giordano (1982): Naturally occurring neuron death in the ganglion cell layer of the neonatal rat.

Develop. Brain Res., 2:203-215

Daniels, M.P. (1973): Fine structural changes in neurons and nerve fibers associated with colchicine inhibition of nerve fibers formation *in vitro*.

J. Cell Biol., 58:463-470

Dannenbergh, A.M., M.S. Burnstone, P.C. Walters, J.W. Kinsley (1963): A histochemical study of phagocytic and enzymatic functions of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages. I. Survey and states of cellular activation.

J. Cell Biol., 17:465-486

De Long, G.R., A.J. Coulombre (1965): Development of the retinotectal topographic projection in the chick embryo.

Exp. Neurol., 13:351-363

De Tomasi, J.A. (1936): Citado en: H.J. Conn, M.A. Darrow y V.M. Emmel, *Staining procedures*, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1960, pp. 215-216.

Dixon, J.S., J.R. Cronly-Dillon (1972): The fine structure of developing retina in *Xenopus laevis*.

J. Embryol. Exp. Morphol., 28:659-666

Dütting, D., A. Gierer, G. Hansmann (1983): Self-renewal of the stem cells differentiation of nerve cells in the developing chick retina.

Develop. Brain Res., 10:21-32

Edwards, J.S. (1982): Pioneer fibers: the case for guidance in the embryonic nervous system of the cricket.

En: *Neuronal development* (N.C. Spitzer, ed.), pp 255-266, Plenum Press, New York.

Fernández-Terán, M.A., J.M. Hurlé (1984): Syndactyly induced by Janus Green B in the embryonic chick leg bud: a reexamination.

J. Embryol. Exp. Morphol., 84:159-175

Fujita, S. (1963): The matrix cell and histogenesis of the nervous system.

J. Comp. Neurol., 120:37-42

Fujita, S. (1964): Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography.

J. Comp. Neurol., 122:311-328

Fujita, S., M. Horii (1963): Analysis of cytogenesis in chick retina by tritiated thymidine autoradiography.

Arch. Histol. (Japan), 23:359-366

Gabe, M. (1968): *Technique histologique*. Masson, Paris.

García-Porrero, J.A., J.A. Collado, J.L. Ojeda (1979): Cell death during detachment of the lens rudiment from ectoderm in the chick embryo.

Anat. Rec., 193:791-804

García-Porrero, J.A., E. Colvée, J.L. Ojeda (1984a): The mechanism of cell death and phagocytosis in the early chick lens morphogenesis: a scanning electron microscopy and cytochemical approach.

Anat. Rec., 208:123-136

García-Porrero, J.A., E. Colvée, J.L. Ojeda (1984b): Cell death in the dorsal part of the chick optic cup. Evidence for a new necrotic zone.

J. Embryol. Exp. Morphol., 80:241-149

García-Porrero, J.A., J.L. Ojeda (1979): Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina.

Experientia, 35:375-376

Glücksman, A. (1951): Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.

Biol. Rev., 26:59-86

Goldberg, S., A.J. Coulombre (1972): Topographical development of the ganglion cell fiber layer in the chick retina. A whole mount study.

J. Comp. Neurol., 146:507-518

Greene, R.M., R.M. Pratt (1976): Developmental aspect of secondary palate formation.

J. Embryol. Exp. Morphol., 36:225-245

Halfter, W., M. Claviez, U. Schwarz (1981): Preferential adhesion of tectal membranes to anterior chick retina neurites.

Nature, 292:67-70

Halfter, W., S. Deiss (1984): Axon growth in embryonic chick and quail retina whole mounts *in vitro*.

Develop. Biol., 102:344-355

Halfter, W., S. Deiss, U. Schwarz (1985): The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina.

J. Comp. Neurol., 232:466-480

Hamburger, V. (1958): Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia.

Am. J. Anat., 102:365-410

Hamburger, V. (1975): Cell death in the development of lateral column of the chick embryo.

J. Comp. Neurol., 160:535-546

Hamburger, V., H. Hamilton (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo.

J. Morphol., 88:49-90

Hamburger, V., J.W. Yip (1984): Reduction of experimentally induced neuronal death in spinal ganglia of the chick embryo by nerve growth factor.

J. Neurosci., 4:767-774

Hayes, B.P. (1976): The distribution of intercellular gap junctions in the developing retina and pigment epithelium of *Xenopus laevis*.

Anat. Embryol., 150:99-111

Hayes, B.P. (1977): Intercellular gap junctions in the developing retina and pigment epithelium of the chick.

Anat. Embryol., 151:325-333

Higuchi, S., M. Suga, A.M. Dannenberg, B.H. Schofield (1979): Histochemical demonstration of enzymatic activities in plastic and embedded tissue section.

Stain Tech., 54:5-12

Hinchliffe, J.R., J.A. García-Porrero, M. Gumpel-Pinot (1981): The role of the zone of polarising activity in controlling the maintenance and antero-posterior differentiation of the apical mesoderm of the chick wing bud: histochemical techniques in the analysis of a developmental problem.

Histochem. J., 13:643-658



Hinds, J.W., P.L. Hinds (1974): Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic study using serial sections.

Develop. Biol., 37:381-416

Hinds, J.W., P.L. Hinds (1978): Early development of amacrine cells in the mouse retina: an electron microscopic serial section analysis.

J. Comp. Neurol., 179:277-300

Hinds, J.W., T.L. Ruffet (1971): Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle.

Z. Zellforsch., 115:226-264

Holley, J.A. (1982): Early development of the circumferential axonal pathway in mouse and chick spinal cord.

J. Comp. Neurol., 205:371-382

Hollyday, M., V. Hamburger (1976): Reduction of naturally occurring motor neuron loss by enlargements of the periphery.

J. Comp. Neurol., 170:311-320

Hughes, A.F. (1961): Cell degeneration in the larval ventral horn of *Xenopus laevis* (Daudin).

J. Embryol. Exp. Morphol., 9:269-284

Hughes, W.F., A. LaVelle (1974): On the synaptogenic sequence in the chick retina.

Anat. Rec., 179:297-302

Hughes, W.F., A. La Velle (1975): The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos.

J. Comp. Neurol., 163:265-284

Hughes, W.F., S.C. Mc Loon (1979): Ganglion cell death during retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction.

Exp. Neurol., 66:587-601

Hurlé, J.M., M. Lafarga, J.L. Ojeda (1977): Cytological and cytochemical studies on the necrotic area of the bulbus of the chick embryo heart: phagocytosis by developing myocardial cells.

J. Embryol. Exp. Morphol., 41:161-170

Hurlé, J.M., M. Lafarga, J.L. Ojeda (1978): *In vivo* phagocytosis by developing myocardial cells: an ultrastructural study.

J. Cell Sci., 33:363-369

Jacobson, M. (1978): *Developmental Neurobiology*. 2nd. ed. Plenum Press, New York.

Kahn, A.J. (1973): Ganglion cell formation in the chick neural retina.

Brain Res., 63:285-290

Kahn, A.J. (1974): An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina.

Develop. Biol., 38:30-30

Katz, M.J., R.J. Lasek (1978): Evolution of the nervous system: role of ontogenic mechanisms in the evolution of matching populations.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1349-1352

Katz, M.J., R.J. Lasek (1985): How are the elemental axon patterns produced in the spinal cord?.

En: *Perspectives on neuroscience* (Y. Tsukada, ed.), pp. 43-60. University of Tokyo Press, Tokyo.

Kelly, J.P., W.M. Cowan (1972): Studies on development in the chick optic tectum. III. Effects of early eye removal.

Brain Res., 42:263-288

Kerr, J.F., A.H. Wyllie, A.R. Currie (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics.

Br. J. Cancer, 26:239-257

Krayanek, S. (1980): Structure and orientation of extracellular matrix in developing chick optic tectum.

Anat. Rec., 197:95-109

Krayanek, S., S. Goldberg (1981): Oriented extracellular channels and axonal guidance in the embryonic chick retina.

Develop. Biol., 84:41-50

Langman, J., R. Guerrant, B. Freeman (1966): Behaviour of neuroepithelial cells during closure of the neural tube.

J. Comp. Neurol., 127:399-412

Letourneau, P.C. (1982): Nerve fiber growth and its regulation by extrinsic factors.

En: *Neuronal development* (N.C. Spitzer, ed.), pp. 213-254. Plenum Press, New York.

Levi-Montacini, R. (1950): The origin and development of the visceral system in the spinal cord of the chick embryo.

J. Morphol., 86:253-283

Lindeman, V.F. (1947): The cholinesterase and acetylcholine content of the chick retina, with special reference to functional activity as indicated by the pupillary constrictor reflex.

Am. J. Physiol., 148:40-44

Lockshin, R.A., C.M. Williams (1965): Programmed cell death. I. Cytology of cell degeneration in the intersegmental muscles of the peryi silkworm.

J. Insect. Physiol., 11:123-133

Lyser, K.M. (1964): Early differentiation of motor neuroblast in the chick embryo as studied by electron microscopy. I. General aspects.

Develop. Biol., 10:433-466

Martin, A.H. (1967): Significance of mitotic spindle fibre orientation in the neural tube.

Nature, 216:1133-1134

Mc Loon, S.C. (1985): Evidence for shifting connections during development of the chick retinotectal projections.

J. Neurosci., 5:2570-2580

Meller, K. (1981): Effects of concavalin A on developing ganglion cells in the retina of chick embryos.

J. Embryol. Exp. Morphol., 65:27-39

Meller, K., W. Tetzlaff (1976): Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina.

Cell Tissue Res., 170:145-159

Miki, A., Y. Atoji, H. Mizoguti (1981): The relationship between the proliferating ability and acetylcholinesterase activity of the neural tube cells in early chick embryos.

Acta Histochem. Cytochem., 14:461-475

Miki, A., H. Mizoguti (1982): Proliferating ability, morphological development and acetylcholinesterase activity of the neural tube cells in early chick embryos: an electron microscopic study.

Histochemistry, 76:303-314

Millonig, J. (1980): How to avoid wrinkles while staining thick plastic sections.

Stain Tech., 55:118-119

Mishima, H., H. Fujita (1978): Studies on the cytodifferentiation of the neuroblasts and visual cells in the chick embryo retina, using the electron-microscopic autoradiography of ³H-thymidine.

Albrecht v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalm., 206:1-10

Mizoguti, H., A. Miki (1985): Interrelationship among the proliferating ability, morphological development and acetylcholinesterase activity of the neural tube cells in early chick embryos.

Acta Histochem. Cytochem., 18:85-96

Morris, V.B., R. Cowan (1984): A growth curve of cell numbers in the neural retina of embryonic chick.

Cell Tissue Kinet., 17:199-208

Nagele, R.G., H. Lee (1979): Ultrastructural changes in cells associated with interkinetic nuclear migration in the developing chick neuroepithelium.

J. Exp. Zool., 210:89-106

Namba, M., A.M. Dannenberg, F. Tanaka (1983): Improvement in the histochemical demonstration of acid phosphatase, β -galactosidase and nonspecific esterase in glycol methacrylate tissue sections by cold temperature embedding.

Stain Tech., 58:207-214

Navascués, J., L. Rodríguez-Gallardo, G. Martín-Partido, I.S. Alvarez (1985): Proliferation of glial precursors during the early development of the chick optic nerve.

Anat. Embryol., 172:365-373

Nichols, D.H. (1986): Mesenchyme formation from the trigeminal placodes of the mouse embryo.

Am. J. Anat., 176:19-31

Nishimura, Y. (1980): Determination of the developmental pattern of retinal ganglion cells in chick embryo by Golgi impregnation and other methods.

Anat. Embryol., 158:329-347

Nishimura, Y., Y. Inoue, K. Shimai (1979): Morphological development of retinal ganglion cells in the chick embryo.

Exp. Neurol., 64:44-60

Obando, I., F. Prada, J.A. Armengol, J.M. Genis-Gálvez (1979): Algunos datos autorradiográficos sobre la histogénesis retiniana.

Morf. Norm. Fpatol., Sec. A, 3:379-385

O'Connor, T.M., C.R. Wytttenbach (1974): Cell death in the embryonic chick spinal cord.

J. Cell Biol., 60:448-459

O'Rahilly, R., D.B. Meyer (1959): The early development of the eye in the chick *Gallus domesticus* (stages 8 to 25).

Acta Anat., 39:20-58

Pannese, E. (1968): Developmental changes of the endoplasmic reticulum and ribosomes in nerve cells of the spinal ganglia of the domestic fowl.

J. Comp. Neurol., 132:331-364

Pannese, E., L. Luciano, S. Iurato, E. Reale (1971): Cholinesterase activity in spinal ganglia neuroblasts: an histochemical study at the electron microscope.

J. Ultrastruct. Res., 36:46-67

Patel, N., N.M. Poo (1982): Orientation of neuritic growth by extracellular fields.

J. Neurosci., 2:483-496

Pilar, G., L. Landmesser (1976): Ultrastructural differentiation during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia.

J. Cell Biol., 68:339-356

Polyak, S.L. (1957): *The vertebrate visual system*. University of Chicago Press, Chicago.

Prada, C., L. Puelles, J.M. Genis-Gálvez (1981): A Golgi study of the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina.

Anat. Embryol., 161:305-317

Prochiantz, A. (1985): Neuronal growth and shape.

Develop. Neurosci., 7:189-198

Rager, G. (1980): Development of the retinotectal projection in the chicken.

Adv. Anat. Embryol. and Cell Biol., 63:1-93

Rager, G. (1983): Structural analysis of fiber organization during development.

En: *Molecular and cellular interactions underlying higher brain functions*. *Progress in Brain Research*, vol. 58. (J.P. Changeaux, J. Glowinsky, M. Imbert y F.E. Bloom, eds.) Elsevier, Amsterdam.

Rager, G., S. Lausmann, F. Gallyas (1979): An improved silver stain for developing nervous tissue.

Stain Tech., 54:193-200

Patel, N., N.M. Poo (1982): Orientation of neuritic growth by extracellular fields.

J. Neurosci., 2:483-496

Pilar, G., L. Landmesser (1976): Ultrastructural differentiation during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia.

J. Cell Biol., 68:339-356

Polyac, S.L. (1957): *The vertebrate visual system*. University of Chicago Press, Chicago.

Prada, C., L. Puelles, J.M. Genis-Gálvez (1981): A Golgi study of the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina.

Anat. Embryol., 161:305-317

Prochiantz, A. (1985): Neuronal growth and shape.

Develop. Neurosci., 7:189-198

Rager, G. (1980): Development of the retinotectal projection in the chicken.

Adv. Anat. Embryol. and Cell Biol., 63:1-93

Rager, G. (1983): Structural analysis of fiber organization during development.

En: *Molecular and cellular interactions underlying higher brain functions*. *Progress in Brain Research*, vol. 58. (J.P. Changeaux, J. Glowinsky, M. Imbert y F.E. Bloom, eds.) Elsevier, Amsterdam.

Rager, G., S. Lausmann, F. Gallyas (1979): An improved silver stain for developing nervous tissue.

Stain Tech., 54:193-200

Rager, G., U. Rager (1973): System matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken.

Exp. Brain Res., 33:65-78

Ramón y Cajal, S. (1892): La retine des vertebres.

La Cellule, 9:119-227

Ramón y Cajal, S. (1909-1911): *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres.*

Reimpresión Instituto Ramón y Cajal, Madrid, 1952

Ramón y Cajal, S. (1928): *Degeneration and regeneration of the nervous system.* (R.M. May, trad.).

Hafner, New York, 1959

Ramón y Cajal, S. (1929): En: *Studies on vertebrate neurogenesis.*

(Trad. R.L. Guth). Springfield, Ill, 1960.

Ramón y Cajal, S. (1932-1933): La retina des vertebres.

Trav. Lav. Rech. Biol. Univ. Madrid, 28(Apendice):1-144

Rickmann, M., J.W. Fawcett, R.J. Keynes (1985): The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite.

J. Embryol. Exp. Morphol., 90:437-455

Robertson, A.M.G., J.N. Thomson (1982): Morphology of programmed cell death in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans* larvae.

J. Embryol. Exp. Morphol., 67:89-100

Rogers, K.T. (1957): Early development of the optic nerve in the chick.

Anat. Rec., 127:97-104

Romanoff, A.L. (1960): *The avian embryo. Structural and functional development.*

Mc Millan Co., New York

Rothman, T.P., L.A. Specht, M.D. Gershon, T.H. Joh, G. Teitelman, V.M. Pickel, D.J. Reis (1980): Catecholamine biosynthetic enzymes are expressed in replicating cells of the peripheral but not the central nervous system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6221-6225

Ruthisausher, U. (1984): Developmental biology of a neural cell adhesion molecule.

Nature, 310:549-555

Sauer, F.C. (1935): Mitosis in the neural tube.

J. Comp. Neurol., 62:377-405

Sauer, M.E., A.C. Chittenden (1959): Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo. Evidence for intermitotic migration of nuclei.

Exp. Cell Res., 16:1-6

Sauer, M.E., B.E. Walker (1959): Radiographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 101:557-560

Saunders, J.W. (1966): Death in embryonic systems.

Science, 154:604-612

Saunders, J.W., M.T. Gasseling, L.C. Saunders (1962): Cellular death in morphogenesis of the avian wing.

Develop. Biol., 5:147-178

Romanoff, A.L. (1960): *The avian embryo. Structural and functional development.*

Mc Millan Co., New York

Rothman, T.P., L.A. Specht, M.D. Gershon, T.H. Joh, G. Teitelman, V.M. Pickel, D.J. Reis (1980): Catecholamine biosynthetic enzymes are expressed in replicating cells of the peripheral but not the central nervous system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6221-6225

Ruthisausher, U. (1984): Developmental biology of a neural cell adhesion molecule.

Nature, 310:549-555

Sauer, F.C. (1935): Mitosis in the neural tube.

J. Comp. Neurol., 62:377-405

Sauer, M.E., A.C. Chittenden (1959): Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo. Evidence for intermitotic migration of nuclei.

Exp. Cell Res., 16:1-6

Sauer, M.E., B.E. Walker (1959): Radiographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 101:557-560

Saunders, J.W. (1966): Death in embryonic systems.

Science, 154:604-612

Saunders, J.W., M.T. Gasseling, L.C. Saunders (1962): Cellular death in morphogenesis of the avian wing.

Develop. Biol., 5:147-178

Schook, P. (1980a): Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. A light microscopic and reconstructive study.

Acta Morphol. Neerl-Scand., 18:1-30

Schook, P. (1980b): Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. An ultrastructural and spatial reconstructive study. A. Invagination of the lens placode.

Acta Morphol. Neerl-Scand., 18:133-157

Schook, P. (1980c): Id. B. Invagination of the optic vesicle and fusion of its walls.

Acta Morphol. Neerl-Scand., 18:159-180

Schook, P. (1980d): Id. C. Obliteration of the lens stalk lumen and separation of the lens vesicle from the surface ectoderm.

Acta Morphol. Neerl-Scand., 18:195-211

Scott, T.M., S.M. Bunt (1986): An examination of the evidence for the existence of preformed pathways in the neural tube of *Xenopus laevis*.

J. Embryol. Exp. Morphol., 91:181-195

Sechrist, J.W., (1969): Neurocytogenesis. I. Neurofibrils, neurofilaments and terminal mitotic cycle.

Am. J. Anat., 124:117-134

Seymour, R.M., M. Berry (1975): Scanning and transmission electron microscopic study of interkinetic nuclear migration in the cerebral vesicles of the rat.

J. Comp. Neurol., 160:105-126

Sheffield, J.B., D.A. Fischmann (1970): Intercellular junctions in the developing retina of the chick embryo.

Z. Zellforsch., 104:405-418

Shen, S.C., P. Greenfield, E.J. Boell (1956): Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogenesis.

J. Comp. Neurol., 106:433-462

Sidman, R.L., I.L. Miale, N. Feder (1959): Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system.

Exp. Neurol., 1:322-333

Sievers, J. (1971): Basic two-dye stains for epoxy-embedded 0,3-1 μ sections.

Stain Tech., 46:195-199

Silver, J. (1976): A study of ocular morphogenesis in the rat using ^3H -thymidine autoradiography. Evidence for thymidine recycling in the developing retina.

Develop. Biol., 49:487-495

Silver, J. (1984): Studies on the factors that govern directionality of axonal growth in the embryonic optic nerve and the chiasm of mice.

J. Comp. Neurol., 223:238-251

Silver, J., A.F.W. Hughes (1973): The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye.

J. Morphol., 140:159-170

Silver, J., A.F.W. Hughes (1974): The relationship between morphogenetic cell death and development of congenital anophthalmia.

J. Comp. Neurol., 157:281-302

Silver, J., R.M. Robb (1979): Studies on the development of the eye cup and optic nerve in normal mice and in mutants with congenital nerve aplasia.

Develop. Biol., 68:175-190

Silver, J., U. Rutishauser (1984): Guidance of optic axons *in vivo* by a preformed adhesive pathways of neuroepithelial endfeet.

Develop. Biol., 106:485-499

Silver, J., J. Sapiro (1981): Axonal guidance during development of the optic nerve: the role of pigmented epithelia and other extrinsic factors.

J. Comp. Neurol., 202:521-538

Silver, J., R.L. Sidman (1980): A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axons.

J. Comp. Neurol., 189:101-111

Singer, M., R.H. Nordlander, M. Egar (1979): Axonal guidance during embryogenesis and regeneration of the spinal cord in the newt: the blueprint hypothesis of neural pathway patterning.

J. Comp. Neurol., 185:1-22

Sorokin, P., R.F. Hoyt, M.M. Grant (1984): Development of macrophages in the lungs of fetal rabbits, rats and hamsters.

Anat. Rec., 208:103-121

Sperry, R.W. (1963): Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50:703-710

Stacey, N.H., C.J. Bishop, J.W. Halliday, V.J. Halliday, W.G.E. Cooksley, L.W. Powell, J.F.R. Kerr (1985): Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity.

J. Cell Sci., 74:169-179

Straznicky, C., R.A. Rush (1985): Nerve growth factor treatment does not prevent dorsal root ganglion cell death induced by target removal in chick embryos.

Anat. Embryol., 171:357-363

Suburo, A., N. Carri, R. Adler (1979): The environment of axonal migration in the developing chick retina: a scanning electron microscopic (SEM) study.

J. Comp. Neurol., **184**:519-536

Szily, A.v. (1912): Citado en Theiler y cols., 1976.

Tanaka, H., K. Obata (1984): Developmental changes in unique cell surface antigens of chick embryo spinal motoneurons and ganglion cells.

Develop. Biol., **106**:26-37

Tello, F. (1923): Les diferenciaciones neuronales dans l'embryon du poulet pendant les premiers jours de l'incubation.

Trav. Lab. Rech. Biol. Univ. Madrid, **21**:1-93

Tennyson, V.M. (1965): Electron microscopic study of the developing neuroblast of the dorsal root ganglia of the rabbit embryo.

J. Comp. Neurol., **124**:267-318

Tennyson, V.M., M. Brzin (1970): The appearance of acetylcholinesterase in the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo.

J. Cell Biol., **46**:64-80

Thanos, S., F. Bonhoeffer (1983): Investigation on the development and topographic order of retino-tectal axons: anterograde and retrograde staining of axons and perikarya with rhodamine *in vivo*.

J. Comp. Neurol., **219**:420-430

Thanos, S., F. Bonhoeffer, U. Rutishauser (1984): Fiber-fiber interactions and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**:1906-1910

Theiler, K., D.S. Varnum, J.H. Nadeau, L.C. Stevens, B. Cagianut (1976): A new allele of ocular retardation: early development and morphogenetic cell death.

Anat. Embryol., 150:85-97

Thiery, J-P., J.L. Duband, U. Rutishauser, G.M. Edelman (1982): Cell adhesion molecules in early chick embryogenesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6737-6471

Watterson, R.L., P. Veneziano, A. Bartha (1956): Absence of a true germinal zone in neural tubes of young chick embryos as demonstrated by the colchicine technique.

Anat. Rec., 124:379

Webster, D.A., J. Gross (1970): Studies on possible mechanisms of programmed cell death in chick embryo.

Develop. Biol., 22:157-184

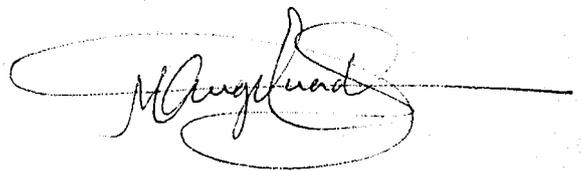
Weyse, A.W., W.S. Burgess (1906): Histogenesis of the retina.

Amer. Nat., 40:611-637

Young, R.W. (1984): Cell death during differentiation of the retina in the mouse.

J. Comp. Neurol., 229:362-373

Esta tesis fué concluida en
Granada, el día 7 de octubre
de 1.986.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'M. Cuadros Ojeda', written over a horizontal line.

Fdo. Miguel A. Cuadros Ojeda.