

BIBLIOTECA UCM



5306063153

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

DESARROLLO DE LA MUSCULATURA

INTRINSECA OCULAR EN EL EMBRION

DE POLLO



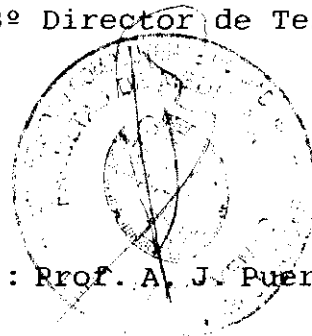
Autor:

M. C. Barrio Asensio

Fdo.: M. C. Barrio Asensio

R.- 22.210

Vº Bº Director de Tesis:



Fdo.: Prof. A. J. Puerta Fonollá

Madrid 1993



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

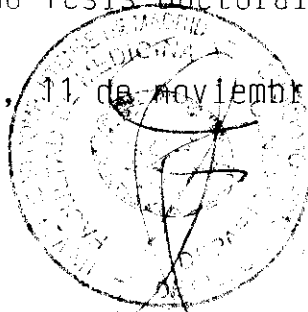
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

MADRID

DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO DE ANATOMIA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

INFORMA: Que el trabajo titulado: "DESARROLLO DE LA MUSCULATURA INTRINSECA OCULAR EN EL EMBRION DE POLLO", ha sido realizado bajo mi dirección por D^a M^a CARMEN BARRIO ASENTO, reuniendo las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, 11 de noviembre de 1993



Fdo.:Prof. A. J. Puerta Fonollá

A Pablo y a Mercedes como pequeña
muestra de gratitud por todo
cuanto me han dado.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	1
JUSTIFICACION.....	4
INTRODUCCION.....	6
I. FORMACION DEL ESBOZO OCULAR.....	7
1.- Contribución del neuroectodermo y ectodermo de superficie.....	8
2.- Contribución de la cresta neural y/o del mesodermo.....	15
3.- Desarrollo del cuerpo ciliar y del iris.....	18
II. ANATOMIA COMPARADA DE LA MUSCULATURA INTRINSECA OCULAR.....	26
III. MUSCULATURA INTRINSECA OCULAR EN LAS AVES.....	29
1.- Músculo ciliar.....	29
2.- Morfogénesis del músculo ciliar.....	31
3.- Musculatura del iris: Esfínter y dilatador.....	32
4.- Morfogénesis del esfínter pupilar.....	33
5.- Morfogénesis del dilatador.....	40
6.- Inervación de la musculatura intrínseca ocular...	41
IV. LINAJES MUSCULARES Y CITODIFERENCIACION.....	45
MATERIAL Y METODOS.....	56
RESULTADOS.....	60

	Página
DISCUSION.....	128
I. ASIMETRIA EN EL DESARROLLO.....	129
II. MORFOGENESIS DEL CUERPO CILIAR Y DE SU MUSCULATURA...	136
III. MORFOGENESIS DEL IRIS Y DE SU MUSCULATURA.....	139
 CONCLUSIONES.....	 154
 BIBLIOGRAFIA.....	 157

AGRADECIMIENTOS

Creo que sólo los que viven de cerca una Tesis Doctoral saben el esfuerzo que conlleva. Esta tarea para mí ha sido grata y se lo debo a las personas que integran el Departamento de Ciencias Morfológicas I. Me han brindado su afecto y su apoyo, por ello tienen mi más sincero agradecimiento.

Quisiera de forma especial dar las gracias al Dr. Puerta Fonollá por haber dirigido la Tesis. Su interés y su entusiasmo por los resultados que íbamos obteniendo me han servido de estímulo constante. Sus consejos y apoyo siempre han estado presentes.

Mi gratitud al Dr. Peña Melián que asumió la responsabilidad de encauzarnos en el mundo de la investigación, sintetizó el anticuerpo en el que se basa esta Tesis y atendió pacientemente mis dudas derivadas de su utilización. Mi agradecimiento lo hago extensivo a la Dra. Le Douarin, a la Dra. Ziller y al Dr. Rong del *Institut d'Embryologie Cellulaire et Moleculaire du CNRS* (Paris) que también contribuyeron en la obtención del anticuerpo y por permitir su utilización.

Al Dr. Murillo González siempre le agradeceré sus consejos y apoyo y el que se haya preocupado por este trabajo tanto como si fuese suyo. La ayuda ofrecida en la elaboración final de la Tesis me ha ahorrado tantas horas de trabajo que sólo espero que nuestra amistad me disculpe.

Al Departamento de Biología Celular de la Universidad Complutense de Madrid por aceptar la defensa de la Tesis.

A Mercedes, M^a Dolores, Pablo y José Luis y al resto de mi familia, sé que les debo una parte muy importante de esta Tesis. He encontrado en todo momento cariño, comprensión y apoyo.

A mis amigos por haberme animado y por hacerme olvidar las horas de trabajo.

A todos aquellos que con su cariño, amistad y estímulo han hecho posible esta Tesis, gracias.

JUSTIFICACION



A pesar del interés que ha suscitado el desarrollo del ojo de los vertebrados en la Embriología causal, las investigaciones referentes a la morfogénesis del iris y del cuerpo ciliar son sorprendentemente escasas (STROEVA, 1967).

Años después, BEEBE (1986) opina que este vacío no ha sido corregido.

Uno de los profesores del Departamento en colaboración con investigadores del *Institut d'Embryologie Cellulaire et Moleculaire du CNRS* (Paris) sintetizaron un anticuerpo monoclonal denominado 13F4. El 13F4 marca selectivamente patrones de diferenciación muscular, así como musculatura adulta y se liga a una proteína citoplasmática de 54 Kd de peso molecular (RONG y col., 1987).

Por otro lado, ORTS LLORCA (1975) nos recuerda anecdóticamente la necesidad de revisar la Embriología descriptiva cuando parece una ciencia concluida. "Hechos que parecen definitivamente adquiridos, son modificados, pero siempre para sugerir o plantear nuevos problemas que se someten a análisis experimental". A su parecer, "la inmunquímica ha influido como una de las técnicas más importantes en la evolución de la Embriología moderna".

Así, la exigencia constante de revisión, la insuficiencia bibliográfica y la disponibilidad del 13F4 nos decidió a iniciar un estudio sobre la ontogenia de la musculatura intrínseca ocular, basándonos siempre en la alta especificidad del anticuerpo.

INTRODUCCION

I . FORMACION DEL ESBOZO OCULAR

En la organogénesis ocular asistimos a la obtención de una excepcional complejidad estructural y multiplicidad citológica a partir de pocos tipos celulares.

Dice COULOMBRE (1961): "Pocos órganos son iguales al ojo de vertebrados en la diversidad de tipos celulares o en el alto grado de diferenciación que alcanzan las células".

Sabemos hoy que la mayoría de los componentes del ojo provienen del ectoblasto del embrión en sus tres aspectos: ectodermo de superficie, neuroectodermo y cresta neural. La contribución del mesodermo es relativamente escasa.

1.- Contribución del neuroectodermo y ectodermo de superficie.

La primera información referente a la aparición de las vesículas ópticas en aves, es atribuida a **PANDER (1817)**, que describió su formación a partir del tubo neural en embriones de pollo.

El territorio prospectivo de la placa neural destinado a la formación de los ojos, territorio ocular, es inicialmente único y está situado en la línea media, próximo al borde rostral del territorio prosencefálico; este territorio único ha de dividirse en dos campos para poder dar lugar a la formación de los esbozos oculares. Ello parece deberse a la acción del mesodermo cefálico subyacente y en anfibios también al endodermo del intestino anterior. El fallo de este mecanismo produce una ciclopía (**NODEN y DE LAHUNTA, 1990**).

Mediante la técnica de quimeras codorniz-pollo (**LE DOUARIN, 1973**), **COULY y LE DOUARIN (1985, 1987 y 1988)** mapearon la región rostral del primordio neural e identificaron la región presuntiva de las vesículas ópticas en embriones de 3 a 4 somitos. Las áreas neuroepiteliales que originan los esbozos oculares se encuentran laterales a la futura neurohipófisis, la cual es caudal a la presuntiva región adenohipófisis-hipotálamo.

La formación del esbozo ocular comienza muy pronto. **ALEXANDER (1937)**, describe la aparición de las vesículas ópticas en el estadio de 5 somitos como dos expansiones laterales de la pared del prosencéfalo. Sin embargo, su morfología no es claramente distinguible hasta el estadio 9 de **HAMBURGER-HAMILTON**

(HH) (HAMBURGER y HAMILTON, 1951; O'RAHILLY y MEYER, 1959; ROMANOFF, 1960).

Las vesículas ópticas continúan con su crecimiento lateral hasta contactar con el ectodermo de superficie en el estadio 10 HH (O'RAHILLY y MEYER, 1959; HILFER, 1983). En este momento se inicia la inducción de las placodas cristalínianas.

Este fue el primer ejemplo de inducción puesto en evidencia por SPEMANN (1901) y ratificado por LEWIS en (1904).

No obstante, JACOBSON (1958 y 1966), MIZUNO (1970 y 1972), KARKINEN-JAASKELAINEN (1978), GRAINGER y col. (1988) y HENRY y GRAINGER (1990), creen que la inducción del cristalino es un proceso multifásico, donde la vesícula óptica juega un papel esencial, aunque no suficiente, para la determinación del cristalino.

En el estadio 12 HH, el ectodermo con el que ha contactado la vesícula óptica comienza a engrosarse y constituye el primordio del cristalino o placoda cristalíniana. Más tarde, entre los estadios 14 al 17 HH, la placoda comienza a invaginarse formando la fosa cristalíniana. Esta invaginación es simultánea a la que experimenta la vesícula óptica, momento en que pasa a denominarse copa óptica. La fosa cristalíniana terminará cerrándose por fusión de sus bordes y se separa de su ectodermo matriz. Este constituye desde entonces el epitelio corneal (TELLO, 1923; O'RAHILLY y MEYER, 1959).

Los mecanismos implicados en la invaginación y posterior separación del esbozo del cristalino han sido estudiados por numerosos autores (O'RAHILLY y MEYER, 1959; GARCIA-PORRERO y col., 1979; SCHOOK, 1980a, 1980b y 1980d; HILFER, 1983).

Además, se han descrito factores involucrados en la

invaginación de la vesícula óptica (SCHOOK, 1980c; BRADY y HILFER, 1982; YANG y HILFER, 1982; MALONEY y WAKELY, 1982a; HILFER, 1983; GARCIA-PORRERO y col., 1987).

WAKELY (1977) y HILFER (1983) han mostrado con microscopía electrónica la existencia de matriz extracelular entre la placoda cristaliniiana y la vesícula óptica y proponen que esta matriz es responsable de la cohesión y del sincronismo de los movimientos morfogenéticos que tienen lugar en ambas estructuras durante la invaginación. Pero, para COULOMBRE (1965a), MALONEY y WAKELY (1982a y 1982b), YANG y HILFER (1982), GARCIA-PORRERO y col. (1987), los dos procesos de invaginación estarían regulados por factores diferentes.

Finalmente, se oblitera la cavidad de la vesícula cristaliniiana. Las células de la vesícula próximas a la copa óptica, y que constituyen el epitelio posterior del cristalino, comienzan a elongarse transformándose en las fibras primarias del cristalino (O'RAHILLY y MEYER, 1959; COULOMBRE, 1965b). Este proceso transcurre entre los estadios 18 al 21 HH (O'RAHILLY y MEYER, 1959).

GIROUD (1957) y CLAVERT (1972), experimentalmente en los mamíferos, demostraron la influencia de la copa óptica en el inicio de la diferenciación de las fibras del cristalino. LOPASHOV (1960) en anfibios, y COULOMBRE Y COULOMBRE (1963) y GENIS GALVEZ (1965) en aves, llegaron a idénticas conclusiones.

Estudios más recientes (BEEBE y col., 1980; BEEBE y col., 1987) indican que la leutropina, presente en el humor vítreo, estimula la diferenciación de las células del cristalino en fibras.

En cuanto a la invaginación de la vesícula óptica, se

traduce en la formación de la copa óptica. Tiene dos capas, una externa, futuro epitelio pigmentado de la retina y otra interna más gruesa, esbozo de la retina neurosensorial (o retina propiamente dicha).

Los territorios prospectivos del epitelio pigmentado y de la retina no están determinados en los primeros estadios de la copa óptica. Constituyen un sistema equipotencial capaz de experimentar reversibilidad morfogenética en un sentido u otro. Este hecho fue demostrado en anfibios por DRAGOMIROV (1932 y 1933). En embriones de pollo, ALEXANDER (1937) afirmó la posibilidad de esta mutua transformación hasta el estadio de 36 somitos (estadio 18 HH).

El contacto entre vesícula óptica y epiblasto cefálico es condición previa para delimitar la región que se ha de diferenciar en retina. Así, LOPASHOV (1960) mostró que en anfibios, la ausencia de ectodermo superficial provoca una disminución del número de células de la retina y su transformación en epitelio pigmentado.

LOPASHOV (1960) en anfibios, ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ (1960) y MURILLO FERROL (1964) en aves y STROEVA (1956) en mamíferos, comprobaron que la presencia de mesénquima periorcular es fundamental para que la capa externa de la copa óptica, en contacto con el mesénquima, se diferencia en epitelio pigmentado. La capa interna, que queda aislada de dicho mesénquima se transforma en retina.

Por otra parte, la capa interna ejerce una acción inhibitoria sobre la hoja externa, impidiendo que se transdiferencie en retina (ORTS LLORCA y GENIS GALVEZ, 1960; COULOMBRE y COULOMBRE, 1965).

A continuación referiremos algunos aspectos relevantes de la diferenciación histológica.

Al comenzar la invaginación de la vesícula óptica, la futura capa neurosensorial aumenta su espesor de manera no uniforme. El mayor espesor corresponde a la región central y disminuye hacia la periferia (WEYSSE y BURGESS, 1906; COULOMBRE, 1955).

Durante los días 4 a 8 de incubación las mitosis que tienen lugar en el margen de la copa óptica contribuyen a aumentar el área de la capa sensorial. El incremento de su espesor se debe a la división de las células subyacentes al epitelio pigmentado. Las células recién formadas migran hacia las capas más profundas y el estrato más superficial constituye temporalmente, una capa germinativa. Al cesar las mitosis, la proliferación celular queda confinada al margen de la copa óptica (COULOMBRE, 1955 y 1961). En esta región la actividad mitótica finaliza, aparentemente, en el día 15 de incubación (COULOMBRE, 1955 y 1956).

La diferenciación de los neuroblastos en los diferentes elementos celulares de la capa sensorial ocurre de manera centrífuga, desde la región central hacia la zona marginal. Así, durante el desarrollo, el borde de la copa óptica retrasa su diferenciación respecto a la porción central de la retina. También es característico que la maduración progrese desde el vítreo hacia la esclera. Las primeras células que aparecen son las ganglionares y las últimas los fotorreceptores (COULOMBRE, 1955 y 1961).

SHEN y col. (1956), LAYER (1983), LAYER y col. (1987), SPIRA y col. (1987), afirmaron que tanto la diferenciación neuronal como química procede según se ha descrito anteriormente.

La capa externa de la copa óptica da lugar al epitelio pigmentado de la retina. Desde los primeros estadios del desarrollo es mucho más delgada que la capa neurosensorial. Está integrada por una hilera de células salvo, en la región marginal, donde existen dos capas celulares con una alta capacidad de división que se mantiene hasta que finaliza el crecimiento del globo ocular (**WEYSSE y BURGESS, 1906**).

Para **COULOMBRE (1955)** la proliferación celular cesa en el día 8 de incubación. Observó que cuatro días antes ya había un marcado descenso de la actividad mitótica. Las células cambiaban de forma (de columnares a hexagonales) y aparecían gránulos de melanina.

No obstante, existen diferencias sobre el momento en que se inicia la pigmentación. Así, **WEYSSE y BURGESS (1906)** consideran el período comprendido entre las 64 - 65 horas de incubación. **HAMBURGER y HAMILTON (1951)** en el estadio 20 HH, **O'RAHILLY y MEYER (1955)** en el estadio 23 HH y **EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975)** en el día 4 de incubación.

LEPLAT (1914) y **EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975)** en pollo, **RIAÑO (1991)** en codorniz, determinaron que el pigmento se localiza en las células del polo posterior y después se extiende hacia la zona marginal. Contrariamente **SLONAKER (1921)** en *Passer domesticus* y **COULOMBRE (1955)** en pollo, detectaron los primeros gránulos de pigmento en la región periférica.

La copa óptica después de concluir las mitosis continúa creciendo hasta alcanzar su tamaño definitivo. **COULOMBRE (1955)** analizó la densidad y modificaciones celulares en relación con la edad del embrión. El epitelio pigmentado sufre una disminución en el número de células por unidad de área, paralela a

hipertrofia celular. Matizó que las primeras células en experimentar este proceso son las de la región central. En la retina neurosensorial la expansión lleva consigo la pérdida de espesor de algunos de sus estratos (ganglionar y nuclear interno) así como el distanciamiento de los fotorreceptores.

COULOMBRE (1956) demostraría experimentalmente que la fuerza necesaria para la expansión de la copa óptica era la presión intraocular generada por el cuerpo vítreo. Este crecimiento es contrarrestado en parte por el cartílago escleral. Su aparición disminuye la velocidad de expansión del globo ocular.

2.- Contribución de la cresta neural y/o del mesodermo.

Las vesículas ópticas desde su constitución están asociadas a una población celular mesenquimatosa. Este mesénquima deriva de dos fuentes: mesodermo paraxial y cresta neural (JOHNSTON y col., 1979; NODEN, 1978a, 1982, 1984a y 1984b; MEIER, 1982; LE DOUARIN, 1982; GANS y NORTHCUTT, 1983).

Mediante el uso de timidina tritiada (WESTON, 1963; JOHNSTON, 1966), de quimeras codorniz-pollo (LE DOUARIN, 1973) o de microscopía electrónica de barrido (ANDERSON y MEIER, 1981), puede seguirse la migración de las células de cresta neural.

Las vesículas ópticas, salvo en la superficie caudal (futuro borde dorsotemporal) donde se localiza el mesodermo paraxial, van siendo circundadas por células procedentes de cresta neural mesencefálica y prosencefálica quedando acumuladas en el ángulo formado por la evaginación del prosencéfalo y el ectodermo de superficie (JOHNSTON, 1966; JOHNSTON y col., 1979; NODEN, 1975, 1982 y 1984b; ANDERSON y MEIER, 1981).

El mesénquima del borde de la copa óptica se dirige hacia el polo anterior del ojo. La invasión del espacio entre el cristalino y el epitelio corneal, tiene lugar en dos oleadas sucesivas. La primera comienza en el estadio 22 HH (O'RAHILLY y MEYER, 1955) para formar el endotelio corneal. La segunda, a partir de la cual se genera el estroma de la córnea, en el día 6 de incubación (BRINI y col., 1965).

La coroides se diferencia en el día 5 de incubación (LEPLAT, 1912) inducida por el epitelio pigmentado de la retina (WEISS y AMPRINO, 1940; GIROUD, 1957).

El cartílago escleral comienza a desarrollarse entre los días 7 a 8 de incubación (WEISS y AMPRINO, 1940) y necesita la presencia del epitelio pigmentado de la retina (WEISS y AMPRINO, 1940; AMPRINO, 1949; NEWSOME, 1972). La formación definitiva del cartílago está mediada por la matriz extracelular elaborada por el neuroepitelio (NEWSOME, 1976; SMITH y THOROGOOD, 1983; THOROGOOD, 1988).

MURRAY (1943) estudió los huesos esclerales, su aparición era precedida por las papilas esclerales. HALL (1981) examinó fenómenos sobre la inducción. COULOMBRE y col. (1962) encuentran que las papilas surgen durante el día 8 de incubación. Primero las del lado temporal respecto a la fisura coroidea, y después las del lado nasal.

BALAZS y col. (1965) describieron la entrada de células mesenquimatosas en la cavidad vítrea. Esta invasión fue confirmada por JOHNSTON y col. (1979) en el estadio 17 HH.

El posterior acúmulo de material vítreo genera presión intraocular. Esta presión es fundamental para el crecimiento y morfogénesis de la mayoría de las estructuras del globo ocular (COULOMBRE, 1956 y 1965b; COULOMBRE y COULOMBRE, 1957, 1963 Y 1964; COULOMBRE y col., 1963).

La técnica de quimeras ha permitido identificar la contribución del mesodermo y/o de la cresta neural en la formación de los tejidos oculares.

La musculatura extrínseca proviene de mesodermo paraxial pero el tejido conjuntivo asociado a los músculos es de cresta neural (JOHNSTON y col., 1979; NODEN, 1983).

El esqueleto de la órbita derivaría de cresta neural (LE LIEVRE, 1978; NODEN, 1978a) aunque algunos huesos cuentan con la

participación del mesodermo (JOHNSTON y col., 1979).

Las células que se internan en el cuerpo vítreo provienen tanto de cresta neural como de mesodermo. El endotelio y estroma corneal, coroides, la mayor parte de la esclera y de los huesos esclerales tienen su origen en la cresta neural (JOHNSTON y col., 1979).

3.- Desarrollo del cuerpo ciliar y del iris.

En la justificación de esta Tesis hemos comentado la escasa literatura relacionada con la morfogénesis del cuerpo ciliar y del iris. Añadimos ahora que también ha sido poco precisa o incluso confusa puesto que en opinión de REICHMAN y BEEBE (1990) se identifica como "retina anterior" o "iris" lo que presumiblemente corresponde al prospectivo cuerpo ciliar. Inexplicablemente, estas deficiencias, persisten en la actualidad.

Cuerpo ciliar e iris se van a desarrollar a expensas de la copa óptica y del mesénquima periocular.

Antes de revisar su formación abordaremos el fenómeno de inducción del cuerpo ciliar y del iris. Esto implica que el margen de la copa óptica no se diferencie en retina y que genere dos estructuras morfológica y fisiológicamente diferentes.

Recordemos que la diferenciación de la retina discurre desde el polo posterior del ojo hacia la zona marginal (COULOMBRE, 1955 y 1961).

El borde no comprometido de la copa óptica se adhiere al ecuador del cristalino en el día 4 de incubación (LENHOSSEK, 1911; COULOMBRE, 1957).

GIROUD (1957), en su trabajo sobre teratogénesis en mamíferos, fue el primero en señalar al cristalino como responsable de la formación del iris. GENIS GALVEZ (1966) en pollo y DABAGIAN y col. (1966) en anfibios, concluyeron de igual manera. STROEVA (1963), en rata, matizó que el epitelio del cristalino es el inductor del rudimento común iris-cuerpo ciliar.

CLAVERT (1972), en conejo, también constata la necesidad de que exista contacto entre el reborde de la copa y el cristalino para que el primero, se diferencie en iris y procesos ciliares. Además, es la única región que puede experimentar la acción inductora del cristalino; no así la retina. Pero en este punto, discrepa con los resultados obtenidos por STROEVA (1963).

Sin embargo, parece que existe acuerdo en que si se extirpa el cristalino, el esbozo del iris (McKEEHAN, 1961) en el pollo, o el reborde de la copa óptica (CLAVERT, 1972; STROEVA, 1967) en mamíferos, se transforma en retina.

STROEVA (1967) explicaría que el papel del epitelio cristalino es inhibir la proliferación y las potencialidades de los neuroblastos que han entrado en contacto con él.

YAMADA y col. (1973) afirman que en los anfibios el borde de la vesícula óptica puede regenerar un cristalino.

En cuanto a la formación del cuerpo ciliar y del iris, BEEBE (1986) considera que una vez constituida la copa óptica, el anillo marginal representa las dos capas del presuntivo epitelio ciliar. El iris en esta época todavía no está presente. Se forma más tarde por el crecimiento del borde de la copa óptica. Así, las capas externa e interna del iris, son derivadas y continuas con las capas externa e interna del epitelio ciliar.

Un hecho diferencial de la morfogénesis del cuerpo ciliar es la formación de los procesos ciliares. KESSLER (1877) describe su aparición entre los días 9 y 10 de incubación.

Para COULOMBRE y COULOMBRE (1957) los procesos surgen en el día 8 de incubación, aunque el primer indicio de diferenciación del cuerpo ciliar puede apreciarse en el día 5 de incubación. Mediante examen macroscópico de ojos disecados observaron que la

retina presenta una línea oscura muy tenue concéntrica al cristalino.

BARD y ROSS (1982a), coinciden en señalar este hecho, sin embargo, la ora serrata es más nítida en el estadio 29 HH. Explican que el cuerpo ciliar aparece más marcado porque su epitelio interno tiene menor espesor que el neuroepitelio de la retina. Para estos autores los procesos ciliares se inician en el estadio 29 HH en el lado temporal y en el estadio 33 HH han cubierto la circunferencia del cuerpo ciliar.

Mediante el empleo de acetilcolinesterasa **REICHMAN y BEEBE (1990)** detectaron el prospectivo epitelio ciliar en el estadio 25 HH. El marcaje fue más intenso en el tramo nasal que en el temporal.

COULOMBRE y COULOMBRE (1957) determinan que la formación de los procesos ciliares y la asimetría del cuerpo ciliar están relacionadas con la aparición de las placas esclerales. Observaron que entre los días 4 a 8 de incubación el cuerpo ciliar crece simétrico al eje del cristalino. A partir de esta fecha se expande más rápido en la zona posterior que en la anterior. (Queremos entender temporal y nasal respectivamente. Téngase en cuenta la posición de los globos oculares en este estadio del desarrollo). El cuadrante inferoanterior es el más reducido y el superoposterior el más extenso, condición que se mantiene durante toda la vida. Los procesos ciliares comienzan su diferenciación en el día 8 de incubación en el cuadrante anteroinferior donde también aparecen los primeros cartílagos esclerales. Cuando experimentalmente eliminan la presión intraocular generada por el vítreo, el cuerpo ciliar permanece simétrico y el número de procesos ciliares se reduce. Por tanto,

allí donde van apareciendo las placas, el cuerpo ciliar se expande más lentamente y se pliega.

Esta sugerente hipótesis es discutida por **BARD y ROSS (1982a y 1982b)** en base a que los pliegues surgen antes que las placas esclerales. Proponen un mecanismo distinto para la formación de los procesos ciliares, donde no niegan el papel de la presión intraocular enfatizado tantas veces por **COULOMBRE**.

Este mecanismo está sustentado en las siguientes observaciones:

- Unas horas antes de iniciarse la formación de los pliegues, el mesénquima ciliar cuenta con vasos sanguíneos distanciados regularmente y localizados junto al epitelio. Más tarde, cada pliegue ciliar tiene un vaso.

- En el estadio 24 HH comienza un proceso de separación celular que afecta a las superficies laterales del epitelio interno. En el estadio 36 HH se reestructura y en el estadio 38 HH no existen vestigios de disgregación.

La presión intraocular produce la expansión en el ojo salvo en el borde de la retina que está adosado al cristalino, lo cual crea tensión. El resultado es el crecimiento y plegamiento de una zona que ha sido preparada para ello. La pérdida de uniones la hace más susceptible a las fuerzas resultantes que cualquier otra zona de la retina y los vasos proporcionan un armazón rígido debido a la presión sanguínea. El epitelio, que es más flexible, se pliega.

PORTE y col. (1968), BEEBE y col. (1983), BEEBE (1986), puntualizan que la presión intraocular involucrada en la morfogénesis de muchos tejidos oculares, incluido el cuerpo

ciliar, podría ser generada por el propio epitelio ciliar, puesto que su maduración funcional es previa al desarrollo de los procesos ciliares. En este sentido, **SCOTT y col. (1984)** en ratón, y **LINSER y PLUNKETT (1989)** en pollo, obtuvieron microftalmías mediante el empleo de inhibidores para la anhidrasa carbónica (enzima relacionada con la secreción de humor acuoso).

REICHMAN y BEEBE (1992) mostraron un aumento de volumen en las células del epitelio ciliar antes y durante la formación de pliegues. Sugieren que ello es un reflejo de la actividad secretora de las células. La presión intraocular creada, proporciona parte de la fuerza necesaria para la formación de los pliegues y por otro lado estimularía la división celular del epitelio interno en el estadio 30 HH.

La región de la retina que se convierte en cuerpo ciliar es histológicamente una bicapa. La capa externa constituye el epitelio pigmentado y la interna el epitelio no pigmentado continuo con el neuroepitelio de la retina. Ambos epitelios son monoestratificados salvo el interno que en su tramo posterior es pseudoestratificado en el estadio 27 HH (**BARD y ROSS, 1982a**).

Una descripción de la citodiferenciación del epitelio externo puede encontrarse en **PORTE y col. (1968)** y **EL-HIFNAWI y HINRISCHEN (1975)**. La del epitelio no pigmentado en **PORTE y col. (1968)** y **EL-HIFNAWI (1978)**.

Suprayacente al epitelio, el mesénquima periocular proveniente de cresta neural (**JOHNSTON y col., 1979; NODEN, 1982**) origina el estroma. Muchas veces se ha puesto de manifiesto la necesidad de una interacción mesénquima-epitelio para el normal desarrollo de algunas estructuras oculares y no oculares (**GOLOSOW y GROBSTEIN, 1962; BARD y HAY, 1975; CUTLER y CHAUDHRY, 1973;**

HARDIN y McCLAY, 1990; SPIEGEL y SPIEGEL, 1992).

Según **EL-HIFNAWI (1978)** las células del epitelio interno del cuerpo ciliar pueden requerir la interacción con las mesenquimatosas para la citodiferenciación de las primeras. Este autor observó contactos entre las células que han migrado durante la formación del vítreo y las células del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar. Dicho contacto se establece en el día 8 de incubación. En el espacio intercelular (110 Å) se interponen fibras de colágeno. **GROBSTEIN y COHEN (1965)** y **MEIER y HAY (1974)** atribuyen al colágeno un papel mediador en los sucesos de inducción entre mesénquima y epitelio.

BEEBE (1986) piensa que la interacción del epitelio con el mesénquima suprayacente induce la diferenciación del músculo ciliar y del estroma.

El esbozo del iris se forma por la elongación del borde de la copa óptica que va cubriendo la región ecuatorial del cristalino. El mesénquima sigue este desplazamiento, pero el extremo del iris es exclusivamente epitelial. Este proceso ocurre entre los días 7 y 8 de incubación (**LEPLAT, 1912; LINDAHL, 1915; ROMANOFF, 1960**), en el día 6 de incubación (**BRINI y col., 1965**), o en el estadio 30 HH **FERRARI y KOCH (1984a)**,

NODEN (1978a y 1982) duda de que en su totalidad el mesénquima provenga de cresta neural. Las experiencias de **YAMASHITA y SOHAL (1987)** apuntan la participación del mesodermo en la formación del estroma.

COULOMBRE y COULOMBRE (1957) aseguran que el iris aparece sobre el día 9 ó 10 de incubación. El borde libre de la zona ciliar se extiende rápidamente hasta el día 17 de incubación, después su tamaño es constante. **GABELLA y CLARKE (1983)**

encuentran que el incremento más acusado ocurre entre los días 12 a 17 de incubación, dos días antes de la eclosión el tamaño no varía y vuelve a aumentar después del nacimiento.

BARD y ROSS (1982a) comprobaron que los procesos ciliares no llegan hasta el margen de la copa óptica. Queda un anillo de 100 μm sin plegarse, el anillo pupilar, que crece para formar el iris. El primordio del iris queda salvaguardado del plegamiento que sufre el cuerpo ciliar ya que, presumiblemente, sus células no se separan. De hecho, es una región particularmente rígida.

BARD y ROSS (1982b) determinaron que el diámetro del iris permanece virtualmente constante durante la morfogénesis del cuerpo ciliar. Experimentalmente el iris no se expande por acción de la presión intraocular.

EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975) estudiaron detalladamente la melanogénesis y ultraestructura de las dos capas del epitelio del iris. Ambas son continuas en el borde pupilar. El epitelio pigmentado de la retina, pseudoestratificado, evoluciona hacia epitelio monoestratificado cúbico (día 10 de incubación) y se convierte en plano (día 15 de incubación). El neuroepitelio de la retina también en el día 10 de incubación ha pasado a ser una capa celular.

Estos autores encontraron que la pigmentación no alcanza el margen pupilar hasta el día 5 de incubación y sólo entonces comienza a pigmentarse el epitelio posterior; tal evento coincide con la pérdida de espesor de esta capa. La adquisición de melanina en la capa interna avanza hacia el cuerpo ciliar. Contrariamente, para **GABELLA y CLARKE (1983)** y **FERRARI y KOCH (1984a)** la pigmentación comienza en la raíz del iris.

Ambas capas están pigmentadas en el día 10 de incubación

(EL-HIFNAWI y HINRICHSEN, 1975; FERRARI y KOCH, 1984a) o en el día 12 de incubación (GABELLA y CLARKE, 1983).

EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975) sostienen que en el epitelio externo del iris existen células con escaso contenido de melanosomas, incluso completamente desprovistas de ellos. Sin embargo, en todas evidenciaron la presencia de tirosinasa mediante la técnica para Dopa.

EL-HIFNAWI (1977) observó interacciones entre células mesenquimatosas y el epitelio interno del iris. Estas células y las fibras de colágeno interpuestas entre ambos tipos celulares desaparecen cuando el epitelio interno del iris está completamente pigmentado. Sugiere, como haría un año después (1978) con el cuerpo ciliar, alguna implicación por parte de estas interacciones en la diferenciación del epitelio interno del iris.

II. ANATOMIA COMPARADA DE LA MUSCULATURA INTRINSECA OCULAR

En ningún momento se ha pretendido realizar un exhaustivo examen de la musculatura intrínseca ocular en la escala filogenética. Sólo nos referiremos a aquellos aspectos morfológicos y embriológicos que creemos relacionados con este trabajo de investigación.

La musculatura intrínseca ocular es lisa salvo en los reptiles y en las aves que es estriada (GEBERG, 1884).

En el estroma del cuerpo ciliar se localizan fibras musculares que en su conjunto se denominan músculo ciliar. En anfibios y en algunos reptiles existen otras fibras musculares (músculo protractor del cristalino) que guardan relación con el cuerpo ciliar pero que no están completamente incluidas en él.

Una característica constante en los anfibios, reptiles, aves y mamíferos es la asimetría del cuerpo ciliar (DUKE-ELDER, 1958). En los anfibios está mucho más desarrollado ventral y dorsalmente. En los anuros, el músculo ciliar y el músculo protactor del cristalino se localizan en estas dos regiones. Los urodelos únicamente tienen un protactor cristaliniano en la porción ventral (PRINCE, 1956; DUKE-ELDER, 1958; TRIPATHI, 1974).

Aunque con notables diferencias, el músculo ciliar (fibras meridionales) de los reptiles consta de una porción anterior o músculo de Crampton y otra posterior o músculo de Brücke. Con relativa frecuencia hay fibras circulares en la mitad temporal. En muchas especies también suele existir un músculo adicional, el músculo transversal, situado ventralmente y análogo al músculo protactor del cristalino de los anfibios (LEPLAT, 1921; WALLS,

1942).

En determinados mamíferos el músculo ciliar puede estar ausente o como en los primates, ocupar la práctica totalidad del cuerpo ciliar (DUKE-ELDER, 1958; TRIPATHI, 1974). Convencionalmente el músculo ciliar suele dividirse en tres porciones, pero ROHEN (1964) lo considera como un único músculo con una arquitectura especial.

Desde LEWIS (1903), no se discute la procedencia del músculo ciliar, se admite que su origen es mesenquimatoso.

Durante la embriogénesis del músculo ciliar de los mamíferos, WOLF (1956) observó diferencias con el desarrollo de otros músculos lisos. En algunas especies se asemejaba al miocardio embrionario, otras al músculo ciliar de pollo en formación.

PRINCE (1956) y DUKE-ELDER (1958) afirman que los anfibios poseen los dos músculos del iris: esfínter y dilatador. En Rana esculenta y Rana temporaria el dilatador consiste en unas cuantas fibras dispersas (GLAUS-MOST, 1969). Pero en Rana pipens (NOLTE y POINTNER, 1975), Taricha torosa (TONOSAKI y KELLY, 1971) y Bufo marinus (ARMSTRONG y BELL, 1968) no hay dilatador. También el dilatador está ausente en algunos reptiles (PRINCE, 1956) y en ciertos mamíferos (DUKE-ELDER, 1958).

A pesar de que en los reptiles la musculatura es estriada, REGER y col. (1960) encontraron células lisas en el esfínter de Alligator mississippiensis y algunas de ellas presentaban determinadas características de las fibras estriadas. Posteriormente, REGER (1966), constató que las fibras estriadas diferían estructuralmente de la de los músculos esqueléticos típicos y especula con la posibilidad de que se trate de fibras

de contracción lenta más que de contracción rápida.

Ocasionalmente, en el conejillo de Indias (*Cavia porcellus*) unas cuantas células lisas recuerdan a las estriadas (GABELLA, 1974a y 1974b).

Esfínter y dilatador del iris derivarían del neuroectodermo (NUSSBAUM, 1901; SZILLI, 1901; HERZOG, 1902). La región pupilar del epitelio externo de los mamíferos genera el esfínter; el dilatador, procede de la transformación de algunas células del epitelio externo en células mioepiteliales (IMAIZUMI y KUWARA, 1971; LAI, 1972a y 1972b; TAMURA y SMELSER, 1973).

TONOSAKY y KELLY (1971) proponen que en los anfibios el esfínter deriva de la porción de la capa interna del iris que está evertida sobre el epitelio externo, pero NOLTE y POINTNER (1975) no pudieron ratificarlo.

III. MUSCULATURA INTRINSECA OCULAR EN LAS AVES

1.- Músculo ciliar.

LEPLAT (1912) realizó una descripción del músculo ciliar. Está dividido en tres porciones:

1) Músculo de Crampton o tensor de la córnea, es el más rostral.

2) Músculo de Müller o tensor anterior de la coroides es el más profundo.

3) Músculo de Brücke o tensor posterior de la coroides.

Los dos últimos pueden ser denominados conjuntamente como *protactor corporis ciliaris* puesto que ejercen un papel más activo sobre el cuerpo ciliar que sobre la coroides.

La parte fibrosa de la esclera (transición esclera-córnea) da inserción a los músculos de Crampton y de Brücke. Ciertas fibras del músculo de Crampton finalizan en el borde periférico interno de la córnea y otras, las más posteriores, sobre las paredes del canal de Schlemm. Sobre esta última zona, pero en un tramo más occipital, se insertan las fibras del músculo de Müller que convergen con las de Brücke para insertarse en el ligamento anular de la coroides.

PRINCE (1956) reconoce en las aves la existencia de los músculos de Crampton y de Brücke y ocasionalmente este último se divide en dos partes, la más anterior, es conocida como músculo de Müller.

TRIPATHI (1974) precisa que el músculo de Müller, cuando

existe, es la porción más interna. Sus fibras son circulares y se insertan en el limbo esclerocorneal por una extensión aponeurótica.

DUKE-ELDER (1958) sólo admite la presencia de dos músculos. El de Crampton, es el más anterior y el de Brücke forma el anclaje del ligamento pectinado. **STAFLOVA (1969)** corrobora esta idea.

2.- Morfogénesis del músculo ciliar.

El músculo ciliar se forma *in situ* a partir de células mesenquimatosas (LEWIS, 1903). Estas células son de cresta neural cefálica (JOHNSTON y col., 1979; NODEN, 1984b).

El esbozo del músculo ciliar, en el día 8½, de incubación está constituido por una agrupación celular a modo de banda que se extiende desde la periferia de la córnea hasta la ora serrata. Estas células se van a orientar siguiendo los meridianos del globo ocular y en el día 10 de incubación tienen aspecto de mioblastos (LEPLAT, 1912). Un día antes, muestran actividad acetilcolinesterasa (LUCCHI y col., 1974).

En el día 11 de incubación las células tienen varios núcleos, aparecen miofibrillas y los primeros signos de estriación transversal (LEPLAT, 1912; LUCCHI y col., 1974).

LEWIS (1903) y LEPLAT (1912) observaron que el epitelio externo de la retina ciliar produce brotes celulares pigmentados. A partir del día 9½ de incubación se independizan y forman células migratorias pigmentadas. Para LEPLAT (1912) desde el día 13 de incubación los brotes dejan de ser visibles.

Ocasionalmente, en embriones más jóvenes, LEWIS (1903) también describe este hecho en los incipientes procesos ciliares.

LEPLAT (1912) considera que el músculo ciliar de 16 días de incubación está dividido en sus tres porciones y completamente diferenciado. Hasta el momento de la eclosión los cambios van a ser de escasa importancia, únicamente aumentará de tamaño.

3.- Musculatura del iris: Esfínter y Dilatador.

DURAND (1893a) examinó la musculatura del iris en las aves. En el pollo reconoció tres estratos musculares:

1) El más externo, esfínter pupilar, integrado por fibras circulares que se extienden desde el borde pupilar hasta el cuerpo ciliar.

2) Un estrato intermedio de fibras oblicuas. Se localiza en los 2/3 periféricos del iris y llegan hasta el esfínter.

3) La capa muscular interna, suprayacente al epitelio, son fibras delgadas de disposición radial, cubren toda la longitud del iris y en el extremo pupilar están en relación con el esfínter.

Estos dos últimos estratos constituyen el dilatador pupilar y se insertan en el tejido conjuntivo del cuerpo ciliar.

Frecuentemente observó anastomosis entre las fibras de un mismo estrato y entre fibras de estratos diferentes. Algunas uniones celulares recuerdan a las del músculo cardíaco.

4.- Morfogénesis del esfínter pupilar.

El primero en investigar el desarrollo del esfínter o constrictor fue **DURAND (1893a y 1893b)**. Encontró que las fibras del esfínter aparecen en el día 9 de incubación. Se sitúan cerca de la pupila y hasta el día 13 de incubación no son visibles en la raíz del iris.

LEWIS (1903) y **COLLIN (1903a y 1903b)** atribuyeron al esfínter un origen ectodérmico, o más preciso, neuroectodérmico, de la copa óptica. Sin embargo, discrepan al precisar su procedencia. **LEWIS** propone que deriva del epitelio externo del iris. **COLLIN** del epitelio interno.

LEWIS (1903) asegura que durante el día 7 de incubación la zona pupilar del epitelio externo pierde el pigmento, aumenta de tamaño y genera un brote celular que se introduce en el estroma. Esta estructura en el ángulo pupilar contacta con el epitelio interno. Tal proceso no ocurre simultáneamente en todo el ojo, pero en el día 10 de incubación hay una banda continua alrededor de la pupila.

Al mismo tiempo, observó en la capa externa y a cierta distancia de la pupila, acúmulos celulares protuyendo en el mesénquima (día 8 de incubación). Algunas de estas masas celulares se despigmentan antes de separarse del epitelio y contribuyen a la formación de la porción periférica del esfínter. Otras, aún con pigmento cuando se rompe la conexión, permanecen como tales y son las células pigmentadas del estroma.

De igual manera, **COLLIN (1903a y 1903b)** encuentra una masa epitelial en el estroma, próxima a la pupila (día 8 de

incubación). Pero, a diferencia de **LEWIS**, interpreta que es consecuencia del crecimiento asincrónico de las dos hojas epiteliales. La interna crece más rápida, se incurva y sobrepasa a la hoja externa.

COLLIN (1903a) manifiesta que el esbozo muscular está desprovisto de pigmento, como también lo está, en esta época, su epitelio matriz (epitelio interno). En los días siguientes a su inicio, el rudimento del esfínter se elonga hacia el cuerpo ciliar por división de sus células y por las del epitelio interno. La maduración muscular procede desde el borde ciliar o raíz del iris hacia la pupila.

LEPLAT (1912) concilia ambas teorías. En concordancia con **COLLIN**, describe la eversión del epitelio posterior (día 7 de incubación) para formar el esbozo muscular. Pero a veces, este primordio tiene células pigmentadas que pudieron ser arrastradas del epitelio externo al incurvarse el interno. Las células epiteliales se transforman en mioblastos (día 10 de incubación). En el día 12 de incubación se han formado fibras musculares y un día después, las fibras musculares presentan estrías. También localizó, en el día 9 de incubación, los grupos pigmentados provenientes del epitelio externo, hallados por **LEWIS**. Se transforman en mioblastos y se incorporan a la estructura muscular a la vez que va disminuyendo su grado de pigmentación. Hacia el día 12 de incubación hay un menor número de estos brotes y los mioblastos con gránulos de pigmento son extremadamente escasos. En estadíos posteriores (días 14 a 20 de incubación) los grupos celulares que se separan del epitelio son pocos y voluminosos, no se diferencian en mioblastos, sino que dan lugar a las células pigmentadas.

El siguiente estudio que se realizó sobre el desarrollo del constrictor en las aves es debido a **BRINI y col. (1964)**. Con microscopía electrónica de transmisión, observaron que las células epiteliales externas (salvo las de la región pupilar) se transforman en fibras musculares estriadas (día 12 a 13 de incubación) pasando previamente por un estado intermedio de células mioepiteliales (día 11 de incubación).

MUSSINI y col. (1976) notaron que durante el desarrollo, las células musculares tienen características ultraestructurales semejantes al músculo liso en formación. Únicamente en los estadios finales adquieren la apariencia de músculo estriado. Interpretan que en la misma célula muscular existen dos generaciones de miofilamentos sintetizados en dos momentos sucesivos.

Para **LUCCHI y col. (1974)** la diferenciación de las células evertidas del epitelio interno en fibras estriadas (día 11 de incubación) ocurre, en términos generales, como en los músculos esqueléticos de origen mesodérmico.

Mediante microscopía electrónica de barrido **FERRARI y KOCH (1984a)** confirmaron que la porción próxima a la pupila del epitelio externo genera brotes celulares que se asientan en el mesénquima. Por medio de inmunohistoquímica contra miosina detectaron las primeras células musculares diferenciadas (día 11 de incubación) en la mitad periférica del iris. Algunas poseían organización sarcomérica. En fases más avanzadas del desarrollo, las células positivas para el anticuerpo pueblan el estroma excepto en la zona precursora del esfínter que sigue emitiendo brotes hasta el día 17 de incubación. Precisan que el músculo inicia su formación y diferenciación histológica en el cuadrante

inferotemporal y progresa alrededor del ojo.

Desde que **GABELLA y CLARKE (1983)** mostraron células lisas en el esfínter de pollo, tanto en el embrión como en el adulto, la teoría acerca del origen epitelial de las fibras estriadas fue abandonada.

Estos autores describen cómo la eversión del epitelio interno constituye unos discretos brotes para modelar en el día 10 de incubación una lamela epitelial, estructurada en monocapa, carente de pigmento y donde no hay mitosis; su máximo desarrollo lo alcanza en el día 11 de incubación. La lamela es el origen de la musculatura lisa. Las células del borde libre adquieren características musculares lisas, y se van separando para acumularse en la región pupilar y central del iris donde suelen asociarse con miotubos y células indiferenciadas; en algunas áreas están en aposición con fibras estriadas.

Los resultados de **YAMASHITA y SOHAL (1986)** difieren en algunos aspectos. La lamela se forma por brotes del epitelio externo, posee pigmento y antes de coalescer como una banda (estadio 35 HH) pueden identificarse células lisas (estadio 34 HH).

PEIRONE y col. (1990) entienden que si bien las células de la lamela (epitelio interno) se transforman en células lisas, son fundamentalmente las del epitelio externo durante los estadios 35 al 40 HH, las que contribuyen a la formación de la musculatura lisa.

Para **GABELLA y CLARKE (1983)** la lamela deja de ser visible como tal estructura en el día 14 de incubación. Observan que en el lugar que antes ocupaba hay gránulos de pigmento, e igualmente las células lisas adquieren gránulos de melanina. Proponen que

la musculatura lisa detiene su crecimiento en el día 15 de incubación y sólo entonces las fibras estriadas son predominantes. Las células musculares lisas quedan confinadas al margen pupilar y aunque su volumen disminuye, no encontraron células en proceso de degeneración. Descartan la posibilidad de transformación de células lisas en estriadas, fusión entre ambos tipos o células con áreas lisas y estriadas.

YAMASHITA y SOHAL (1986) manifiestan que en el estadio 41 HH el 80% de las células son estriadas.

NAKANO y NAKAMURA (1985) mediante formación de quimeras pollo-codorniz sostienen que la estirpe estriada procede de cresta neural. El habitual brote celular del margen pupilar (estadio 35 HH) es del receptor. En el día 19 de incubación cerca de la pupila, en el estroma, hay células de pollo y creen que pueden ser descendientes del brote observado en el estadio 35 HH.

YAMASHITA y SOHAL (1987) con la misma técnica, pero usando como receptor el pato, concluyeron que si bien las células esqueléticas de la porción dorsal del iris provienen de cresta neural, en la porción ventral, además, participa el mesodermo craneal.

PEIRONE y col. (1990) sugieren que algunas células epiteliales en el transcurso de su evolución hacia células musculares lisas, especialmente las de la zona pupilar, se fusionan con miotubos y dan lugar en esta región a elementos celulares compartimentalizados. Esto es, parte de su citoplasma tiene apariencia de músculo estriado, mientras otra parte posee una estructuración típica de músculo liso. Así, el epitelio toma parte en la formación del músculo estriado.

También **GABELLA y CLARKE (1983)** y **YAMASHITA y SOHAL (1986)**

observaron grupos celulares que desde el estadio 38 HH se independizan del epitelio externo y se adentran en el estroma, pero para ellos la musculatura estriada deriva de células mesenquimatosas.

PEIRONE y col. (1990) sitúan el comienzo de la histogénesis del músculo estriado en el cuadrante inferotemporal del iris. En el estadio 25 HH catalogaron a ciertas células mesenquimatosas como mioblastos presuntivos basándose en la presencia de filamentos de desmina, actividad acetilcolinesterasa y características ultraestructurales. La actividad acetilcolinesterasa no fue encontrada por **LUCCHI y col. (1974)** hasta el día 9 de incubación. **NARAYANAN y NARAYANAN (1981)** la detectaron en el estadio 31 HH.

NARAYANAN y NARAYANAN (1981) y **PEIRONE y col. (1990)** observan el estadio 35 HH miotubos con miofilamentos.

Sin embargo, en el estadio 36 HH y también con microscopía electrónica de transmisión **YAMASHITA y SOHAL (1986)** no apreciaron miofilamentos. Sólo admiten la presencia de musculatura estriada un día después.

GABELLA y CLARKE (1983) la identificaron al final del día 10 de incubación.

Los precursores de las bandas Z son visibles en el estadio 37 HH (**LUCCHI y col., 1974; NARAYANAN y NARAYANAN, 1981**) y ocasionalmente en este estadio, alguna fibra muscular presenta organización sarcomérica (**LUCCHI y col., 1974; NARAYANAN y NARAYANAN, 1981; FERRARI y KOCH, 1984a**).

Las investigaciones llevadas a cabo *in vitro* a fin de determinar la capacidad del iris intacto, de su mesénquima y de su epitelio para organizar músculo son bastante dispares.

FERRARI y KOCH (1984b) siempre obtuvieron diferenciación muscular esquelética aunque en el caso del epitelio fuese muy limitada. La proporción de explantes de iris intactos que desarrollaron músculo incrementó con la edad del embrión y consideran que está correlacionado con la incidencia de células epiteliales en el estroma. Por ello, sugieren la necesidad de interacciones recíprocas epitelio-mesénquima para la normal formación del músculo.

YAMASHITA y SOHAL (1986) al analizar el cultivo de epitelio observaron que origina musculatura lisa.

PEIRONE y col. (1990) no identificaron ningún tipo muscular, tan sólo células epiteliales.

5.- Morfogénesis del dilatador.

El origen del dilatador ha suscitado menor controversia. Se admite que proviene del epitelio externo del iris (LEPLAT, 1912; BRINI y col., 1964; GABELLA y CLARKE, 1983; FERRARI Y KOCH, 1984a). Sólo NAKANO y NAKAMURA (1985) opinan que su origen es mesenquimatoso a partir de la cresta neural.

DURAND (1893a y 1893b) observa la aparición de fibras oblicuas en el iris hacia el día 13 de incubación. Las radiales en el día 19 de incubación.

GABELLA y CLARKE (1983), FERRARI y KOCH (1984a) admiten que las células del epitelio externo emiten procesos radiales de naturaleza muscular comenzando en la raíz del iris y progresando hacia la pupila. Refieren con fechas diferentes, una secuencia, según la cual el dilatador se ha formado en la raíz, mitad periférica y región pupilar del iris. GABELLA y CLARKE (1983) proponen los días 15, 17 y 19 a 21 de incubación. FERRARI y KOCH (1984a) establecen los días 13, 15 y un día posteclosión.

BRINI y col. (1964) establecen que la morfogénesis de las fibras estriadas del dilatador implica un estado mioepitelial antes de independizarse del epitelio.

Para FERRARI y KOCH (1984a) sólo algunas células del epitelio anterior se separan y forman miotubos en el estadio 40 HH.

GABELLA y CLARKE (1983) sostienen que se trata de un mioepitelio incluso en adultos.

6.- Inervación de la musculatura intrínseca ocular.

La musculatura intrínseca ocular recibe inervación postganglionar de los ganglios ciliar y cervical superior.

El ganglio ciliar aparece hacia las 70 - 72 horas de incubación (34 - 36 somitos o estadio 18 HH) (CARPENTER, 1906; TELLO, 1923; LEVI-MONTALCINI y AMPRINO, 1947; AMPRINO, 1949).

El primer estudio experimental que señala el origen del ganglio ciliar en la cresta neural cefálica se debe a HAMMOND e YNTEMA (1958). NODEN (1975) y NARAYANAN y NARAYANAN (1978) indican que procede de la cresta neural mesencefálica. NODEN (1978b) y D'AMICO-MARTEL y NODEN (1983), proponen que es la porción más caudal mesencefálica y la más rostral metencefálica.

BARALD (1988), utilizando anticuerpos monoclonales detectó la presencia de un antígeno en una subpoblación de cresta neural mesencefálica. Este antígeno aparece después, en las neuronas del ganglio ciliar.

La mayoría de las neuronas alcanzan la posición en el ganglio en el estadio 25 HH (LANDMESSER y PILAR, 1974).

El ganglio ciliar está integrado por dos poblaciones anatómicamente diferentes (CARPENTER, 1906; HESS, 1965). Estas dos poblaciones son también fisiológicamente independientes (MARWIT y col., 1971).

Los axones de estos dos tipos celulares forman distintos nervios postganglionares. Los denominados ciliares inervan el iris y el cuerpo ciliar. Un segundo grupo de nervios más delgados, los coroides, se distribuyen en el músculo liso de los vasos de la coroides (MARWIT y col., 1971; LANDMESSER y PILAR,

1974).

PILAR y col. (1980) mediante la estimulación eléctrica de los nervios ciliares manifestaron la existencia de subpoblaciones en el ganglio ciliar, cada una de las cuales inerva una parte diferente. Encontraron que las tres ramas principales de los nervios ciliares inervan el músculo ciliar. La rama I, la porción lateral de este músculo, la rama II áreas intermedias y la rama III la porción medial. El constrictor pupilar recibe eferencias por las ramas I y II. Finalmente una pequeña bifurcación de la rama II está destinada al dilatador.

RODRIGUEZ PEREZ (1964) aprecia el crecimiento de los axones postganglionares cuando el embrión tiene 90 horas.

MARCHI y col. (1980a) afirman que las fibras nerviosas están presentes en el mesénquima periocular en el estadio 25 HH. PEIRONE y col. (1990) lo ratifican e indican que se localizan en el cuadrante inferotemporal.

Para LANDMESSER y PILAR (1972) los axones llegan a su prospectivo territorio diana en el estadio 26 HH. GABELLA y CLARKE (1983) describen ocasionalmente en el iris fibras amielínicas en el estadio 35 HH. En esta fecha LUCCHI y col. (1974), NARAYANAN y NARAYANAN (1981), YAMASHITA y SOHAL (1986) consideran que son perfectamente visibles en el territorio muscular del iris y LUCCHI y col. (1974) también los describen en el cuerpo ciliar.

En este estadio el cuerpo ciliar y el iris muestran actividad acetilcolinesterasa en las presuntivas células musculares y en los axones, los cuales cuentan ya con botones terminales y vesículas sinápticas. En las uniones neuromusculares el enzima comienza a detectarse en el día 11 de incubación

(LUCCHI y col., 1974), o entre los días 13 a 15 de incubación (NARAYANAN y NARAYANAN, 1981) en la musculatura del iris.

PILAR y col. (1981) estudiaron las transformaciones ultraestructurales que acontecen durante el desarrollo de las uniones neuromusculares en el iris de pollo. Estas, no son sincrónicas. Los contactos se inician aproximadamente en el estadio 35 HH y logran su madurez entre los días 9 a 10 posteclosión.

Los axones adquieren sus vainas de mielina en los últimos días anteriores al nacimiento (NARAYANAN y NARAYANAN, 1981).

Se han realizado exhaustivos análisis enzimáticos. Así, MARCHI y col. (1979) y MARCHI y GIACOBINI (1980) han analizado las variaciones de los niveles de acetilcolinesterasa y colina en el iris y ganglio ciliar de embriones de pollo y adultos respectivamente, así como la recaptura de colina durante el desarrollo (MARCHI y col., 1980a) y después del nacimiento (MARCHI y col., 1980b). También se determinó las fluctuaciones en la actividad de acetilcolinesterasa y acetiltransferasa en embriones (CHIAPPINELLI y col., 1976) o tras la eclosión (MARCHI y col., 1980c) y el metabolismo colinérgico en el iris adulto (MARCHI y col., 1981).

El ganglio cervical superior proviene de cresta neural truncal y las neuronas probablemente llegan a su enclave en el estadio 26 HH (día 5 de incubación) (KIRBY y GILMORE, 1976).

Con histoquímica KIRBY y col. (1978) observaron que en el estadio 39 HH una banda axonal adrenérgica circunscribía el dilatador en la zona ciliar. Un día más tarde, estadio 40 HH, las fibras nerviosas se adentran en el músculo. Progresivamente, el número de fibras va aumentando y en el estadio 42 HH, los 2/3 del

dilatador están inervados. Tras el nacimiento, durante las dos primeras semanas, los axones antes al azar, se orientan radialmente, aumentan su diámetro y sus ramificaciones.

STAFLOVA (1969) afirmó que el músculo ciliar y especialmente el músculo de Brücke recibe inervación adrenérgica.

IV. LINAJES MUSCULARES Y CITO-DIFERENCIACION

Las investigaciones acerca de la morfogénesis del músculo liso, han avanzado menos que las del músculo esquelético.

Las razones a juicio de HIRAI e HIRABAYASHI (1983) son la falta de una típica estructura visible a microscopio óptico y la complejidad para aislar el tejido.

Según los anteriores autores, el primer paso en la diferenciación de la musculatura, la determinación, es poco conocida; el segundo, la expresión de genes específicos, ha sido más estudiado.

El mesénquima es el precursor de una gran variedad de células estromales, incluyendo fibroblastos y células musculares lisas (PATTEN, 1953).

La molleja del pollo ha sido utilizada como modelo experimental para la investigación del músculo liso. GABELLA (1989), asegura que a pesar de la inmadurez, fibroblastos, células musculares e intersticiales son perfectamente distinguibles unas de otras.

Sin embargo, las células musculares lisas comparten características funcionales con los fibroblastos: sintetizan proteínas de la matriz extracelular. Así, ROSS y KLEBANOFF (1971) en rata detectaron síntesis de fibras de colágeno y elásticas *in vivo*. JONES y col. (1979), *in vitro*, comprobaron que además producían glucoproteínas. También GERSTENFELD y col. (1984) en pollo, GRAHAM y col. (1987) y PERR y col. (1992) en intestino humano adulto y fetal respectivamente, obtuvieron colágeno.

DARBY y col. (1990) establecieron que los fibroblastos se

diferenciaban en los denominados miofibroblastos los cuales, durante un corto espacio de tiempo expresan un marcador específico del músculo liso.

Es aceptado que los miofibroblastos esqueléticos comprometidos en la fusión no responden a un estímulo mitogénico (LIM y HAUSCHKA, 1984).

BENNETT y COBB (1969) y GABELLA (1989) indican que el período de máxima actividad mitótica en el músculo liso es anterior a la diferenciación pero sus células, a pesar de un alto grado de diferenciación son susceptibles de sufrir división.

Para CHAMLEY y CAMPBELL (1974) y CHAMLEY y col. (1974) en los conductos deferentes de mamíferos plantean que previamente debe existir una desdiferenciación celular.

YAMAUCHI y BURNSTOCK (1969) exponen una detallada secuencia del desarrollo de la musculatura lisa en los conductos deferentes de ratón. Esta secuencia coincide con la hallada por BENNETT y COBB (1969), GABELLA (1989) *in vivo* en la molleja de pollo y por CAMPBELL y col. (1974) *in vitro*. Sería la siguiente:

- 1) Elongación de los miofibroblastos que adquieren forma de huso.
- 2) Aparición de miofilamentos. Se agrupan paralelos al eje longitudinal de la célula y están asociados con los cuerpos densos.
- 3) Al final del desarrollo incrementan considerablemente las vesículas de pinocitosis, las uniones en hendidura (nexus), las placas densas de la membrana plasmática y la lámina basal.

Las isoformas de las proteínas contráctiles y sus variaciones a lo largo del desarrollo han sido estudiadas por IZANT y LAZARIDES (1977), HUIATT y col. (1980), RUBENSTEIN

(1981), SOBUE y col. (1981), STUEWER y GROSCHEL-STEWART (1985), PARANKO y PELLINIEMI (1992), FRID y col. (1992), o su relación con sus mensajeros correspondientes SABORIO y col. (1979).

La presencia de unidades contráctiles en el músculo liso de vertebrados fue demostrada por microscopía de luz polarizada y electrónica (BOIS, 1973; SMALL, 1974). Estas unidades están compuestas por filamentos gruesos de miosina, filamentos finos de actina y cuerpos densos (BOIS, 1973; ASHTON y col., 1975; BAGBY, 1980). Los cuerpos densos, son funcionalmente análogos a las líneas Z del músculo esquelético (BOND y SOMLYO, 1982; FAY y col., 1983; ISHII y TAKAHASHI, 1983; TSUKITA y col., 1983).

HIRAI e HIRABAYASHI (1986) observaron que la síntesis y acumulación de las proteínas contráctiles va seguida de su inmediata organización en miofibrillas. Sugieren que los filamentos de actina podrían ser utilizados como un molde donde se organizan los filamentos gruesos y la desmina contribuye al ensamblaje de los miofilamentos.

La observación de que fibras con fenotipos diversos se yuxtaponen en los músculos estriados de vertebrados fue demostrado fisiológicamente y mediante histoquímica para la ATPasa. Las diferencias han sido confirmadas usando pruebas inmunológicas y genética molecular (STOCKDALE, 1992).

La formación del músculo esquelético se lleva a cabo en oleadas o fases. KELLY y ZACKS (1969) mostraron que durante la miogénesis se forma una primera generación de fibras, después, una segunda generación de miotubos se agrega a las fibras ya formadas.

WHITE y HAUSCHKA (1971), HAUSCHKA (1974), WHITE y col. (1975), HAUSCHKA y col. (1979), describen dos tipos de

mioblastos, primarios y secundarios. Difieren en la edad en que se aíslan para ser cultivados, en el requerimiento del medio de cultivo y en la morfología de las fibras que originan.

STOCKDALE y MILLER (1987) modifican la terminología y denominan a los mioblastos primarios y secundarios, así como a las fibras que forman, embrionarios y fetales respectivamente.

Las células satélite descritas por **MAURO (1961)**, serían otro tipo de mioblastos, mioblastos adultos, que contribuyen al crecimiento y reparación del músculo adulto (**STOCKDALE, 1989**).

SEED y HAUSCHKA (1984), **MILLER y STOCKDALE (1986a)**, indican que los mioblastos embrionarios no son los precursores de los fetales, por tanto, los tipos de mioblastos no son descendientes lineales unos de otros.

MILLER y col. (1985) marcaron los mioblastos embrionarios de pollo con anticuerpos monoclonales para las isoformas rápida y lenta de la cadena pesada de miosina (MHC). Sus resultados ponen de manifiesto la existencia de tres subtipos: rápidos, lentos y rápidos-lentos.

Sus hallazgos fueron corroborados y los análisis extendidos a los demás tipos de mioblastos tanto en aves como en mamíferos donde también se encontraron múltiples subtipos (**MILLER y STOCKDALE, 1986a, 1986b y 1989; CROW y STOCKDALE, 1986a y 1986b; SCHAFER y col., 1987; VIVARELLI y col., 1988; CONDON y col., 1990; STOCKDALE, 1990; FELDMAN y STOCKDALE, 1990; PAGE y col., 1992**).

Según **FISCHMAN (1967)**, la formación del músculo esquelético puede dividirse en una serie de etapas que se superponen.

- Transformación de células mesenquimatosas indiferenciadas en mioblastos mononucleados.

- Agregación y fusión de los mioblastos en miotubos.
- Iniciación y continua regulación de la síntesis de proteínas miofibrilares.
- Organización de las proteínas miofibrilares en miofibrillas estriadas.
- Formación del retículo sarcoplásmico y sistema de túbulos transversales.
- Inervación e integración funcional de la actividad contráctil.

El primer paso en la miogénesis puede situarse en los presuntivos mioblastos en división. Expresan fenotipos musculares tales como la desmina (BIGNAMI y DAHL, 1984; HILL y col., 1986; FURST y col., 1989a), proteína intrínseca de membrana H36 (KAUFMAN y FOSTER, 1988; KAUFMAN y col., 1991) o proteínas de superficie (SASSE y col., 1984; GEORGE-WEINSTEIN y col., 1988).

Cuando los presuntivos mioblastos dejan el ciclo mitótico hay un cambio notable en su forma celular y en sus propiedades funcionales. Tiene lugar entonces la elaboración del patrón proteínico (HOLTZER, 1970). Los mioblastos diferenciados, postmitóticos, sintetizan otras proteínas musculares específicas del sarcómero (HOLTZER y col., 1957; CHI y col., 1975; GROEVE y col., 1985; HILL y col., 1986; FURST y col., 1989a) así como del sistema de endomembranas (JORGENSEN y col., 1977).

Los mioblastos con su característica forma de huso, se fusionan, y dan lugar a los miotubos (HOLTZER y col., 1957; BISCHOFF, 1978). Antes, los mioblastos deben alinearse, reconocerse y adherirse. La fibronectina podría desempeñar una acción importante (CHIQUET y col., 1981).

WAKELAM (1985) propone que la fusión lleva consigo cambios en las proteínas y lípidos de membrana y examina algunos factores (AMPC, neuropéptidos) implicados en la regulación del proceso.

Al mismo tiempo hay un aumento de mRNAs para biosintetizar proteínas contráctiles (YABLONKA y YAFFE, 1977; DELVIN y EMERSON, 1979) y de proteínas contráctiles (HOLTZER y col., 1957; DELVIN y EMERSON, 1978; OBINATA y col., 1984; BAHLER y col., 1985; GROVE y col., 1985; HILL y col., 1986).

Sin embargo, la fusión no es indispensable para que las células sigan expresando proteínas, alcancen cierto grado de organización sarcomérica (OKAZAKI y HOLTZER, 1965; SHAINBERG y col., 1971) o aparezcan receptores para acetilcolina (HARTZELL y FAMBROUGH, 1973).

Antes de que la fusión se lleva a cabo, las miofibrillas comienzan a ensamblarse (DLUGOSZ y col., 1984; WANG y col., 1988).

La asociación ocurre predominantemente en la periferia del miotubo y en relación con la membrana plasmática. Los miofilamentos se disponen paralelos al eje longitudinal del miotubo y se empaquetan en una estructura hexagonal, un filamento grueso de miosina interacciona con seis filamentos finos de actina (HUXLEY, 1957; ALLEN y PEPE, 1965; FISCHMAN, 1967; PENG y col., 1981).

Las miofibrillas recién formadas van siendo trasladadas hacia el centro durante el transcurso del desarrollo (FISCHMAN, 1967; PENG y col., 1981).

Posteriormente, las miofibrillas adquieren su característica estriación transversal. La línea Z es el primer signo de estriación (WEED, 1936; Van BREEMAN, 1952; HIBBS, 1956; ALLEN y

PEPE, 1965). Se organiza así, primero el complejo I-Z-I y después la banda A (PENG y col., 1981; FURST y col., 1989a; SCHULTEISS y col., 1990; FLUCHER, 1992; FLUCHER y col., 1992).

Hoy se conocen algunos de los factores que intervienen en la organización de los elementos contráctiles.

Así, DLUGOSZ y col. (1984) proponen que los microfilamentos forman un armazón sobre el cual se edifican las miofibrillas.

ANTIN y col. (1981), TOYAMA y col. (1982), FURST y col. (1989a), sugieren la independencia en el ensamblaje de los filamentos gruesos en bandas A y los finos en las I-Z-I.

Recientes investigaciones, atribuyen a dos proteínas, titina (WANG, 1985; HILL y col., 1986; MARUYANA, 1986; TOKUYASU y MAHER, 1987a y 1987b; WANG y col., 1988; FURST y col., 1989a y 1989b) y nebulina (WANG y WRIGHT, 1988; KRUGER y col., 1991) el papel de organizar la estructura sarcomérica.

La titina organizaría la banda A (WANG y col., 1988) y además relaciona esta banda con el complejo I-Z-I (FURST y col., 1989b). Esta interacción tiene lugar al final de la vida embrionaria (FURST y col., 1989a).

La nebulina proporcionaría longitud uniforme a los filamentos finos (WANG y WRIGHT, 1988; KRUGEL y col., 1991).

Finalmente los núcleos migran hasta alcanzar una posición periférica y la estructura se denomina entonces miofibra (FLUCHER, 1992).

Por otra parte, CHEVALLIER y KIENY (1982) sugieren que el mesénquima ejerce una influencia sobre la formación del patrón muscular. GRIM y WACHTLER (1991) comprobaron que el patrón no depende de la presencia de células miogénicas ya que puede construirse en su ausencia.

Uno de los problemas que en la actualidad se debaten con gran expectación es el papel de la inervación motora en la diferenciación del músculo.

En opinión de **SOHAL y HOLT (1980)**, el músculo esquelético de las aves es capaz de un desarrollo limitado en ausencia de inervación. No obstante los factores tróficos del nervio y la actividad muscular son esenciales para la ejecución del programa de desarrollo. En cierto modo, cuantificaron el alcance de la regulación por parte de los nervios motores en el oblicuo superior de embriones de pato. En el músculo aneural observaron una desorganización y consiguiente desaparición de las bandas Z y material contráctil. El tejido muscular, finalmente fue sustituido por tejido conjuntivo. El efecto causado en el músculo paralizado no resultó tan drástico.

In vitro se requiere tejido o extractos neurales para la progresión y supervivencia de los miotubos (**PETERSON y CRAIN, 1970; OH, 1975 y 1976**).

SOHAL (1983) sugiere que la formación de los elementos postsinápticos están programados por el músculo.

SOHAL y WRENN (1984) comprobaron que la presencia de acetilcolinesterasa en el músculo no depende de la actividad muscular ni de contactos con neuronas motoras.

INESTROSA y col. (1982) y SILBERSTEIN y col. (1982) en mamíferos ratificaron dicha independencia.

En ausencia de elementos neurales se forman receptores para acetilcolinesterasa *in vivo* (**BRAITHWAITE y HARRIS, 1979; CREAZZO y SOHAL, 1983**) e *in vitro* (**WELDON y col., 1981**), aunque los extractos neurales pueden incrementar el número de estos receptores en los miotubos (**CHRISTIAN y col., 1978; PODLESKI y**

col., 1978; JESSELL y col., 1979).

RONG y col. (1990 y 1992) precisan que la morfogénesis de los músculos vertebrales requieren la presencia del tubo neural y de la notocorda, no así los músculos de los miembros. En fases posteriores el desarrollo del músculo esquelético depende de la inervación. Contrariamente, la ablación del tubo neural y notocorda no afectó a los músculos liso y cardíaco.

Se han planteado otras investigaciones a fin de determinar el momento en que el sistema nervioso es crucial para la diferenciación muscular.

GONZALEZ SANTANDER y col. (1990) estudiaron en el miotomo de embriones de pollo la aparición de los denominados "filamentos iniciales". Resultó ser independiente de la inervación.

La primera fase de formación de fibras, tanto en aves como en mamíferos, a partir de los mioblastos primarios, es independiente de las motoneuronas. En contraste, la diferenciación de la segunda generación de mioblastos (fetales) está bajo el control nervioso (HARRIS, 1981; McLENAN, 1983; PHILLIPS y BENNETT, 1984; MILLER y STOCKDALE, 1986a y 1986b; ROSS y col., 1987).

Actualmente se admite que la determinación de los fenotipos de fibras (lentos o rápidos) no está regido por la inervación (BUTLER y col., 1982; LAING y LAMB, 1983; PHILLIPS y BENNETT, 1984; CROW y STOCKDALE, 1986a; PHILLIPS y col., 1986; VOGEL y LANDMESSER, 1987; WEYDERT y col., 1987; ROBSON, 1993).

No obstante FREDETTE y LANDMESSER (1991) demuestran en embriones de pollo que algunos miotubos primarios lentos son neurodependientes y los miotubos secundarios rápidos no son en

su totalidad dependientes de la inervación.

De forma específica en el iris, **ALOISI y MUSSINI (1979)** proponen que los nervios son determinantes para la constitución de la musculatura.

Los cambios morfológicos y bioquímicos en el músculo coinciden con el incremento de terminales axónicos (**NARAYANAN y NARAYANAN, 1981**).

PILAR y col. (1980) analizaron la musculatura del iris tras realizar axotomía parcial de los nervios ciliares. En aquellos embriones que reciben algunos axones de la rama intacta, rama III (destinada exclusivamente al músculo ciliar), el número de células diferenciadas y sus precursores descendían casi hasta una cuarta parte. Sin embargo, en los iris completamente denervados sólo encontraron precursores musculares (células mioepiteliales). Confirman que la diferenciación del músculo, o al menos su mantenimiento requiere cierta influencia nerviosa.

Los estudios de **PEIRONE y col. (1990)** *in vivo* e *in vitro* corroboran la idea de que las fibras nerviosas están involucradas en la miogénesis.

Contrariamente en los cultivos realizados por **FERRARI y KOCH (1984b)** y **YAMASHITA y SOHAL (1986)**, en ausencia de inervación, se desarrolló músculo esquelético.

CHIAPPINELLI y col. (1976) opinan que entre el músculo y los nervios existen interacciones recíprocas que provocan la inducción de acetilcolinesterasa en los elementos pre y postsinápticos. Esto es posterior a la formación de las uniones neuromusculares.

NARAYANAN y NARAYANAN (1981) plantean que la síntesis del enzima es inducida por los contactos iniciales ya que la

maduración de las uniones ocurre después.

La axotomía de los nervios ciliares no altera en exceso la actividad de la acetilcolinesterasa. El análisis electroforético reveló que ciertas isoformas del enzima son neurodependientes, pero estas, podrían relacionarse con la maduración posteclosión o con las isoformas de las uniones neuromusculares (SCARSELLA y col., 1978),

MUSSINI y col. (1984) denervaron iris de pollo adulto. Sus resultados concuerdan con los de SCARSELLA y col. (1978). La acetilcolinesterasa del músculo no depende de la inervación, pero sí la de las uniones neuromusculares.

En mamíferos LAI (1972a y 1976), IMAIZUMI y KUWABARA (1971), TAMURA y SMELSER (1973), descartaron la influencia del factor nervioso en la morfogénesis de la musculatura del iris puesto que esfínter y dilatador están diferenciados antes de ser invadidos por fibras nerviosas.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo se han utilizado embriones de ave de la especie *Gallus gallus domesticus* pertenecientes a la raza Shaver blanca.

Los huevos fecundados fueron limpiados con una solución alcohol-éter al 50%. Se incubaron en posición horizontal en una estufa MEMMERT-UV a 37° C de temperatura y 80% de humedad.

Los embriones fueron obtenidos según la técnica habitual y datados según los criterios morfológicos de **HAMBURGER y HAMILTON (1951)**. Estuvieron comprendidos entre los estadíos 25 a 45 HH y se emplearon de dos a cuatro embriones por estadío.

Las cabezas fueron fijadas en líquido de Bouin durante un período de tiempo variable, dependiendo del estadío.

Desde el estadío 35 HH en adelante se quitaron las plumas o sus esbozos para evitar que se desgaren los cortes histológicos.

A continuación fueron procesados para su inclusión en parafina mediante el proceder habitual de Peterfy.

Las piezas fueron cortadas de manera seriada según un plano transversal, frontal o sagital. El espesor de los cortes fue de 5 ó 7 μm . Los cortes se efectuaron con un microtomo de rotación tipo Minot de la casa LEITZ.

Posteriormente, los cortes fueron desparafinados e hidratados:

- 2 baños de 15 minutos en xilol.
- 2 baños de 10 minutos en alcohol de 96°.
- 2 baños de 10 minutos en alcohol de 70°.
- Agua (hasta la hidratación).

Se llevó a cabo una técnica inmunohistoquímica y algunos portaobjetos fueron reservados para ser teñidos con Hematoxilina-Eosina o con Hematoxilina de Mallory.

1.- Técnica inmunohistoquímica.

En este caso, el último baño en alcohol de 70° se prolongó por espacio de varias horas hasta eliminar completamente el fijador a fin de que no interfiera en el marcaje.

- 2 baños de 15 minutos en agua destilada.
- 2 baños de 15 minutos en PBS (Phosphate Buffer Saline).
- Los cortes se incubaron con el sobrenadante, sin diluir, procedente del clon 13F4 durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Lavado en PBS (2 baños de 15 minutos).
- Reincubación con una inmunoglobulina biotinada antiratón durante 30 minutos.
(Dilución 1:50 en 2% - new bron calf serum - NCS/PBS).
- Lavado en PBS (2 baños de 15 minutos).
- Los cortes se cubren con el complejo Streptavidin-biotina-peroxidasa durante 30 minutos Dilución 1:200 en 2% NCS/PBS.
- Lavado en PBS (2 baños de 15 minutos).
- Se procede al revelado del marcaje con diaminobencidina (DAB). 25 mg de DAB en 100 ml de PBS y en presencia de 0.03% de peróxido de hidrógeno.
- Se deshidratan y montan de forma convencional.

2.- Tinción con Hematoxilina-Eosina.

- Tinción con Hematoxilina de Carazzi (8 minutos).
- Lavado en agua corriente al chorro (15 minutos).
- Se limpian los portas.
- Eosina amarillenta al 1% (1 minutos).
- Lavado ligero en agua.
- Deshidratar y montar.

3.- Hematoxilina de Mallory.

- Fijación en Zenker (10 minutos).
- Lavado en agua corriente.
- Lavado en alcohol de 90° iodado (10 a 15 minutos).
- Lavado en alcohol de 96° (poco tiempo).
- Lavado en abundante agua corriente.
- Inmersión en permanganato potásico al 0.25% (5 minutos).
- Lavado en abundante agua corriente.
- Inmersión en ácido oxálico al 5% (10 minutos).
- Lavado en abundante agua corriente.
- Tinción con Hematoxilina de Mallory (24 horas mínimo).
- Alcoholes de 96° (poco tiempo).
- Deshidratar y montar.

Las preparaciones se estudiaron con un microscopio NIKON OPTIPHOT y se fotografiaron con una cámara NIKON FX-35A.

RESULTADOS

Abreviaturas utilizadas en los resultados.

c: córnea.

cc: cuerpo ciliar.

ce: capa externa de la porción óptica de la retina.

ci: capa interna de la porción óptica de la retina.

e: esclera.

ei: epitelio interno del esbozo cuerpo ciliar-iris.

H-E: Hematoxilina-Eosina.

I: segmento inferior del globo ocular.

ir: iris.

N: segmento nasal del globo ocular.

oc: orbículo ciliar.

os: ora serrata.

pc: procesos ciliares.

pi: porción interna del músculo ciliar.

po: porción occipital del músculo ciliar.

pr: porción rostral del músculo ciliar.

rc: región ciliar del iris.

rm: región media del iris.

rp: región pupilar del iris.

S: segmento superior del globo ocular.

T: segmento temporal del globo ocular.

Tr: trabeculum.

En la descripción de los cortes, siempre que en ellos sea visible la abertura de la copa óptica o pupilar, utilizaremos la siguiente terminología:

- Segmentos nasal y temporal si los cortes fueron transversales para la cabeza.

- Segmentos superior e inferior para los cortes frontales y sagitales para la cabeza, teniendo en cuenta que los cortes sagitales resultan los más oblicuos de todos dada la disposición de los globos oculares.

ESTADIOS 25 AL 28 HH

Desde el inicio de este estudio, estadio 25 HH, puede apreciarse el diferente grado de espesor y diferenciación entre la región central y marginal de la porción nerviosa de la retina (Lámina 1: foto 1). La diferencia va siendo más acusada en estadios posteriores (Lámina 1: fotos 2; Lámina 2: foto 1).

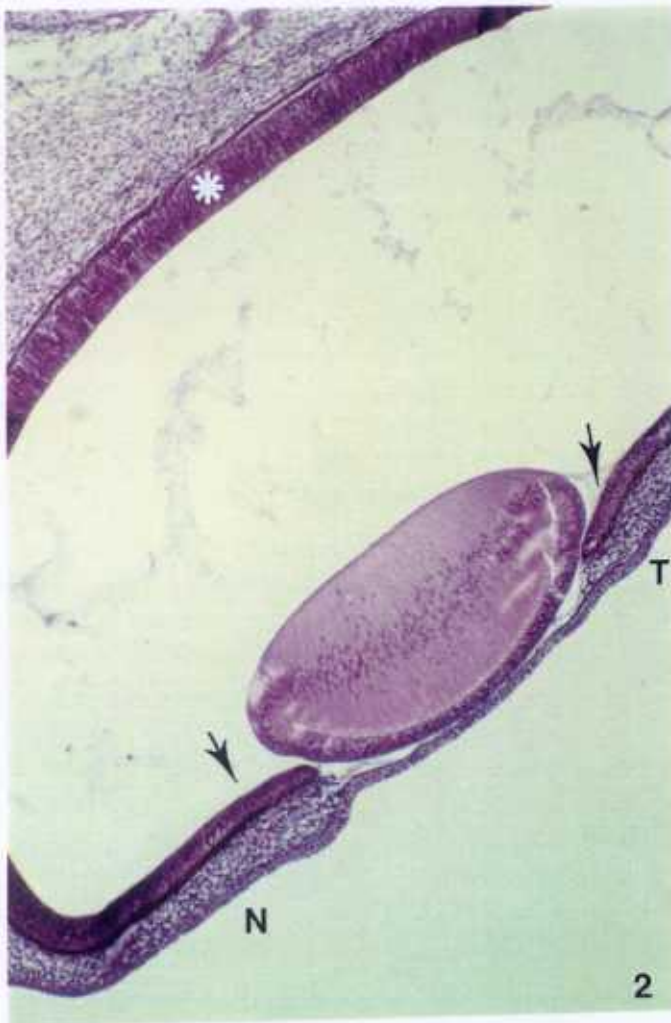
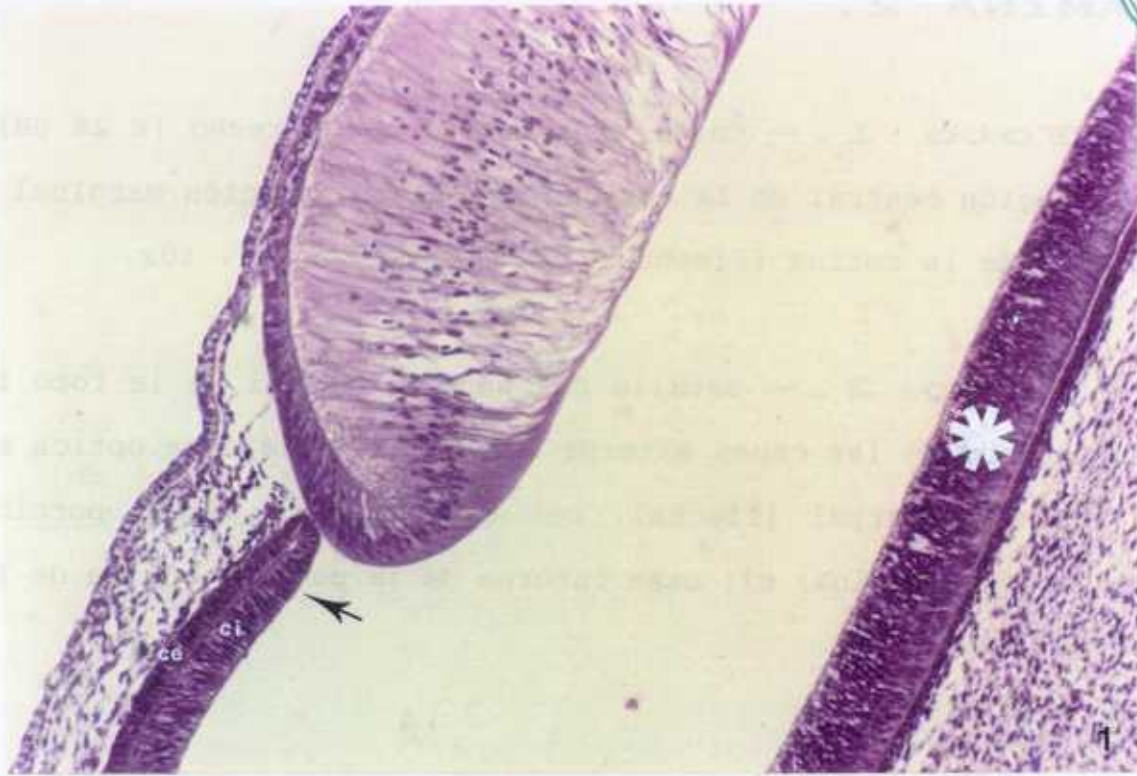
En todos los especímenes la capa externa de la copa óptica está pigmentada y su extremo más rostral en continuidad con la capa interna (Lámina 1: fotos 1 y 3; Lámina 2: foto 2). Puede apreciarse que la pigmentación de la capa externa disminuye rostralmente (Lámina 2: foto 2).

LAMINA 1.

Foto 1. — Corte transversal ojo derecho (E 25 HH). H-E. Región central de la retina (asterisco). Región marginal o rostral de la retina (flecha). **ce:** capa externa de la porción óptica de la retina; **ci:** capa interna de la porción óptica de la retina. 20x.

Foto 2. — Corte transversal ojo izquierdo (E 27 HH). H-E. Región central de la retina (asterisco). Región marginal o rostral de la retina (flechas). **N:** segmento nasal del globo ocular; **T:** segmento temporal del globo ocular. 10x.

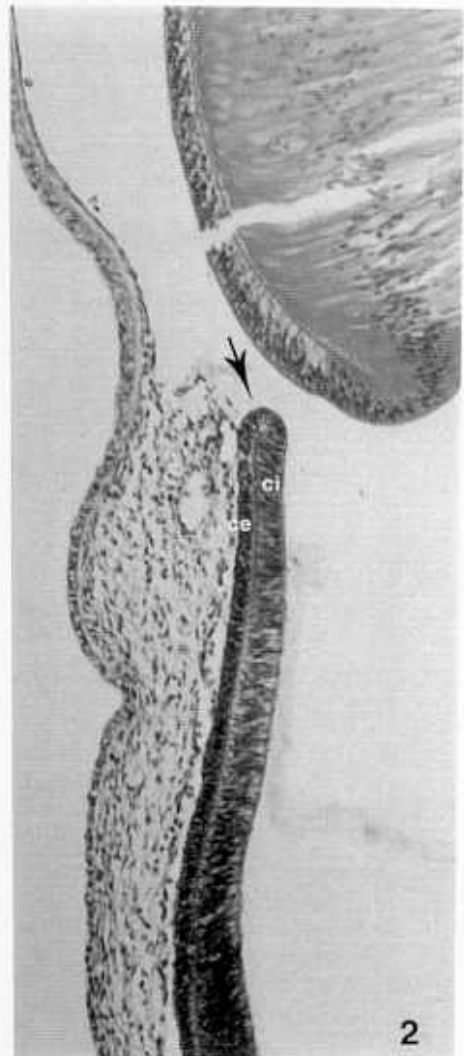
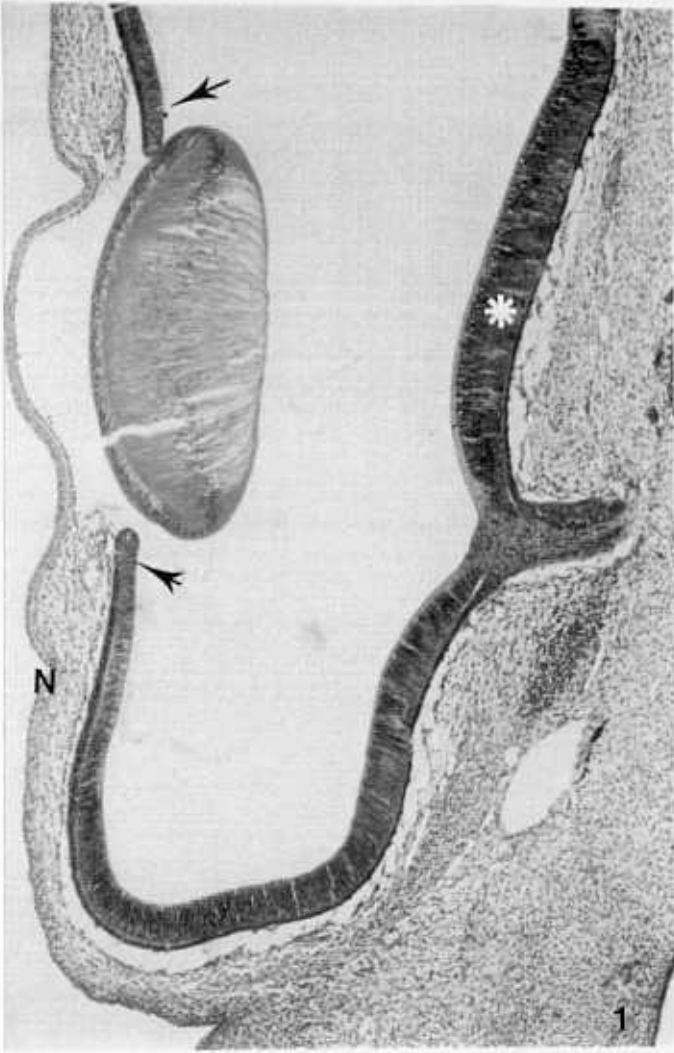
Foto 3. — Corte transversal ojo derecho, segmento nasal (E 27 HH). H-E. Continuidad de las capas externa e interna de la copa óptica en su extremo rostral (flecha). **ce:** capa externa de la porción óptica de la retina; **ci:** capa interna de la porción óptica de la retina. 20x.



LAMINA 2 .

Foto 1 . — Corte transversal ojo derecho (E 28 HH). H-E. Región central de la retina (asterisco). Región marginal o rostral de la retina (flechas). **N:** segmento nasal. 10x.

Foto 2 . — Detalle del segmento nasal de la foto 1. Continuidad de las capas externa e interna de la copa óptica en su extremo rostral (flecha). ce: capa externa de la porción óptica de la retina; ci: capa interna de la porción óptica de la retina. 20x.



ESTADIO 29 HH

En este estadio encontramos el primer indicio del esbozo cuerpo ciliar-iris. El extremo de la copa óptica comienza a crecer junto con el mesénquima suprayacente hacia el polo anterior del globo ocular. Sin embargo, el crecimiento no es uniforme. El primordio es únicamente visible en el segmento nasal del ojo (Lámina 3: fotos 1, 2 y 3) y queda delimitado por el ángulo formado entre la córnea y la región elongada. Los segmentos restantes del globo ocular no han crecido (Lámina 3: fotos 1 y 4).

Puede apreciarse que en el extremo rostral del esbozo cuerpo ciliar-iris, el epitelio interno está evertido sobre el epitelio externo y constituye el borde pupilar (Lámina 3: foto 2). Este tramo evertido carece prácticamente de pigmento (Lámina 3: fotos 2 y 3).

Contrariamente en las zonas de la copa óptica que no han experimentado elongación, puede observarse la presencia de gránulos de melanina en el borde pupilar y en las células del epitelio posterior adyacentes al borde pupilar (Lámina 3: foto 4). Nótese el gradiente de melanina entre las células del epitelio posterior, borde pupilar, extremo rostral del epitelio externo y resto del epitelio externo.

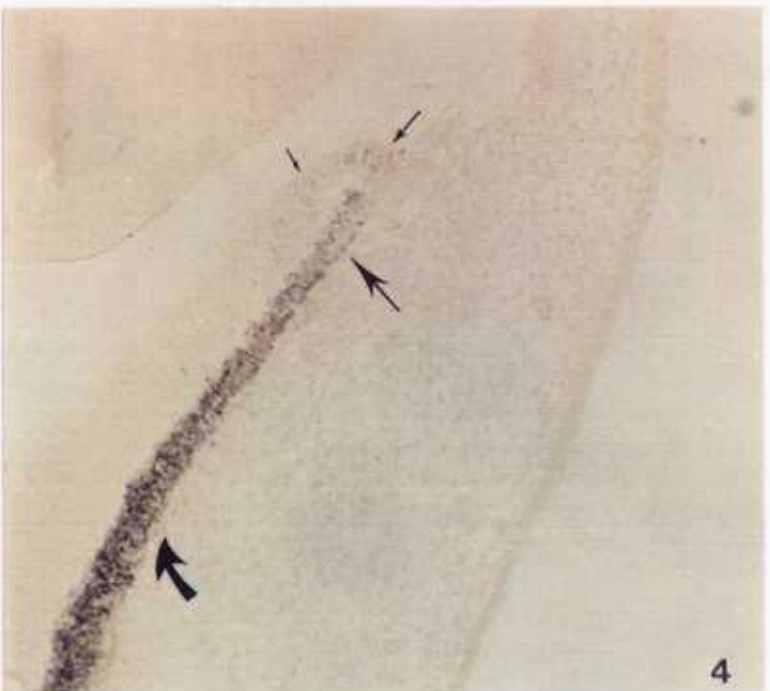
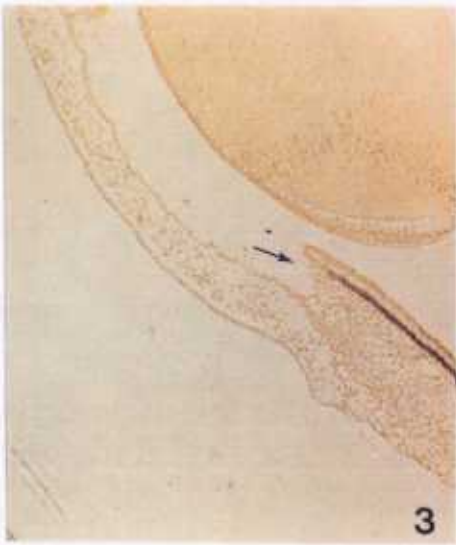
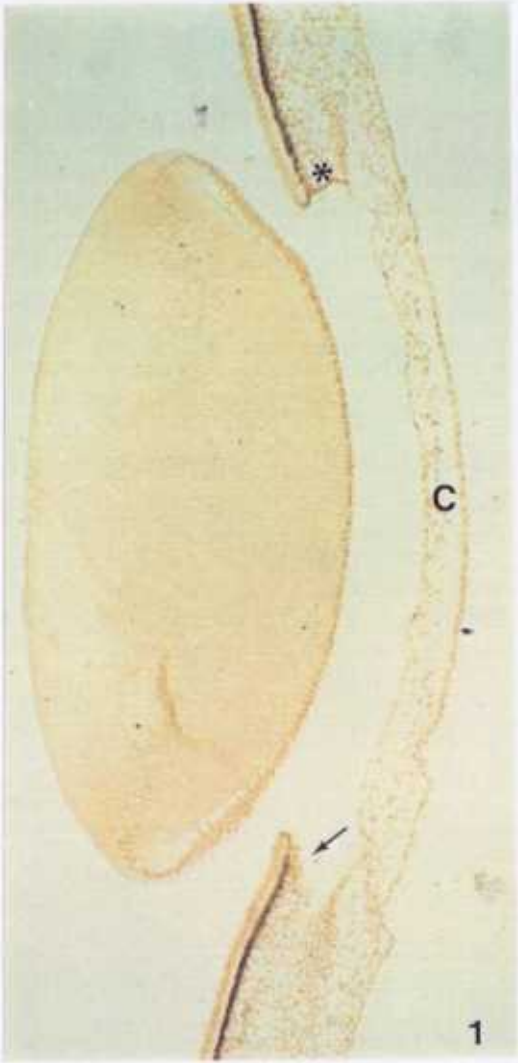
LAMINA 3 .

Foto 1 . — Corte transversal ojo izquierdo (E 29 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Segmento nasal de la copa óptica elongado (flecha) frente al segmento temporal (asterisco). c: córnea. 10x.

Foto 2 . — Corte transversal ojo izquierdo, segmento nasal (E 29 HH). H-E. Eversión (flechas). ei: epitelio interno del esbozo cuerpo ciliar-iris. 40x.

Foto 3 . — Corte transversal ojo derecho, segmento nasal (E 29 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Elongación del extremo rostral de la copa óptica (flecha). 10x.

Foto 4 . — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior (E 29 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. El tamaño de las flechas refleja la cantidad de melanina (flechas). 40x.



ESTADIO 30 HH

El primordio del cuerpo ciliar-iris es ahora visible en los segmentos inferior (Lámina 4: fotos 1 y 2) y temporal (Lámina 4: foto 3) del ojo. El tramo superior de la copa óptica no ha progresado y la diferencia es patente con el tramo inferior (Lámina 4: foto 1).

Puede observarse el menor grado de pigmentación del borde pupilar entre la porción nasal (Lámina 4: foto 4) y las porciones recién elongadas inferior (Lámina 4: foto 2) y temporal (Lámina 4: foto 3).

En este estadio del desarrollo tiene lugar la formación de los procesos ciliares en la región nasal del globo ocular (Lámina 5: fotos 1 y 3). La temporal no presenta indicios de plegamiento (Lámina 5: fotos 1 y 2).

Poco después, al final del estadio 30 HH (Estadio 30+ HH) los procesos ciliares aparecen en la región inferior (Lámina 5: foto 4), la dorsal permanece sin modificar.

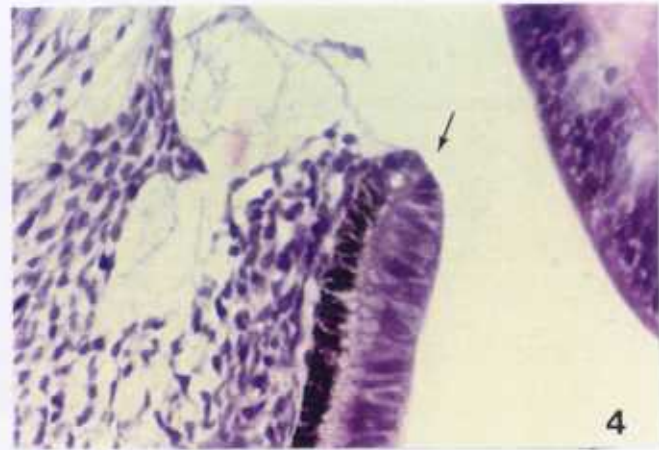
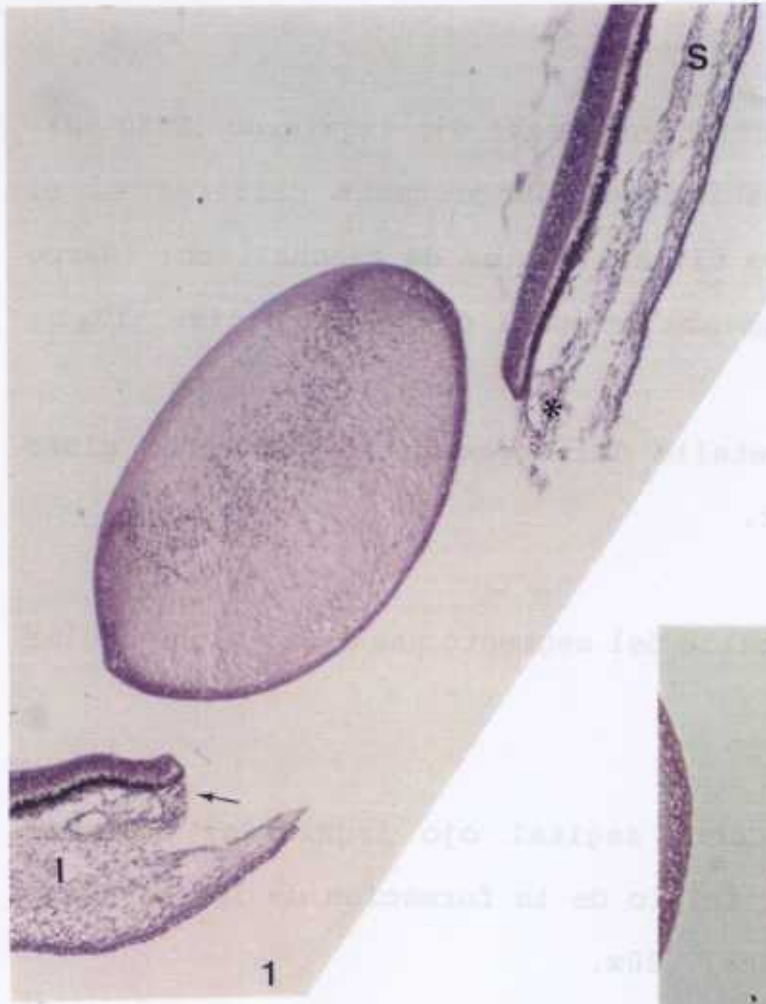
LAMINA 4 .

Foto 1 . - Corte sagital ojo izquierdo (E 30 HH). H-E. Segmento inferior de la copa óptica elongado (flecha) frente al segmento superior (asterisco). I: segmento inferior del globo ocular; S: segmento superior del globo ocular. 10x.

Foto 2 . - Detalle del segmento inferior del globo ocular de la foto 1. Pigmentación del borde pupilar (flecha). 20x.

Foto 3 . - Corte transversal ojo derecho, segmento temporal (E 30 HH). H-E. Pigmentación del borde pupilar (flecha). 40x.

Foto 4 . - Corte transversal ojo derecho, segmento nasal (E 30 HH). H-E. Pigmentación del borde pupilar (flecha). 40x.



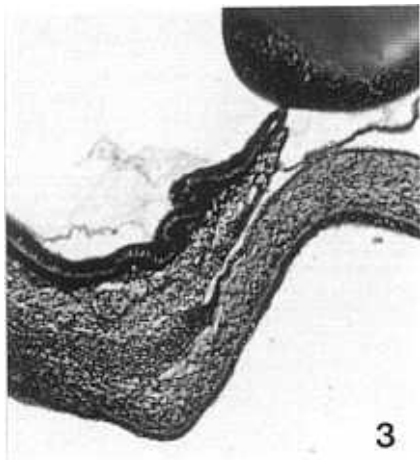
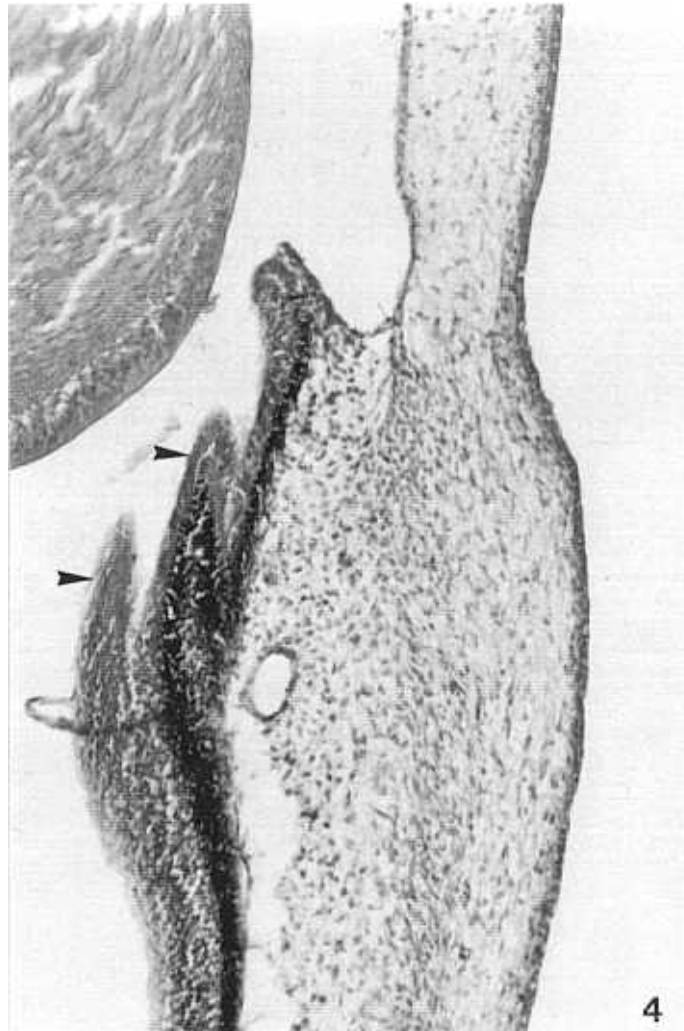
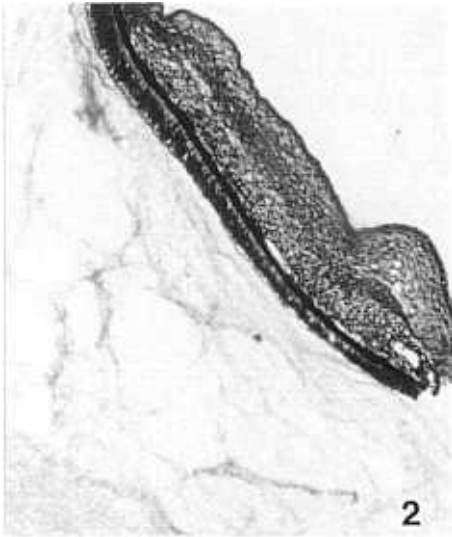
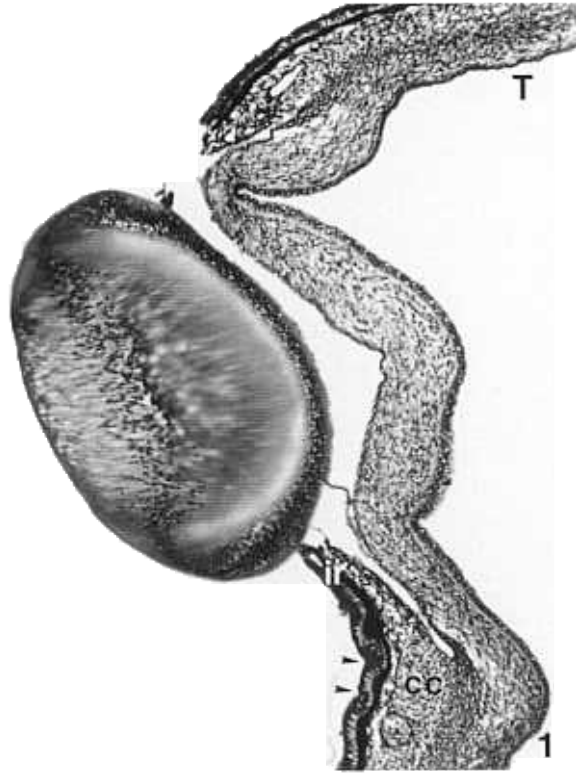
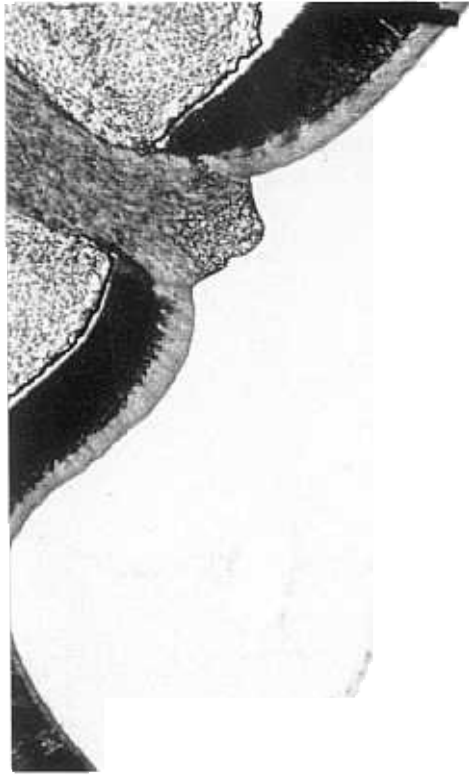
LAMINA 5.

Foto 1. — Corte transversal ojo izquierdo (E 30 HH). H-E. Inicio de la formación de los procesos ciliares en el segmento nasal del cuerpo ciliar (puntas de flecha). cc: cuerpo ciliar; ir: iris; T: segmento temporal del globo ocular. 10x.

Foto 2. — Detalle del segmento temporal del globo ocular de la foto 1. 10x.

Foto 3. — Detalle del segmento nasal del globo ocular de la foto 1. 10x.

Foto 4. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior (E 30 HH). H-E. Inicio de la formación de los procesos ciliares (puntas de flecha). 20x.



ESTADIO 31 HH

Los procesos ciliares se forman en la región temporal y puede apreciarse que su plegamiento es menos acusado que los del tramo nasal (Lámina 6: foto 1).

El epitelio externo del cuerpo ciliar y del iris se encuentra intensamente pigmentado, sin embargo, las células del extremo rostral de este epitelio parece que están ligeramente menos pigmentadas (Lámina 6: fotos 2 y 3).

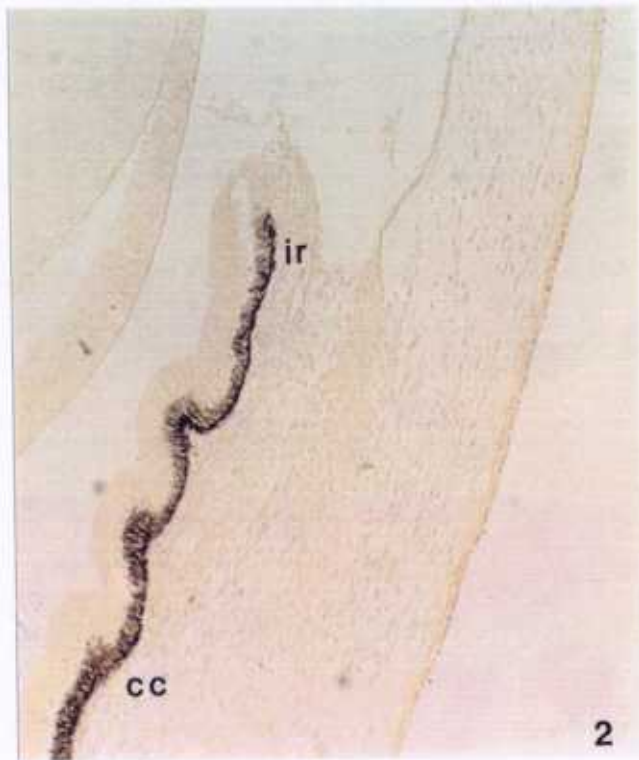
En el segmento temporal, la eversión del epitelio interno contiene algunos gránulos de melanina (Lámina 6: foto 3). En el segmento nasal la melanina es prácticamente inexistente (Lámina 6: foto 2).

LAMINA 6 .

Foto 1 . — Corte transversal ojo izquierdo (E 31 HH).
Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Inicio de la formación de los procesos ciliares en el segmento temporal (puntas de flecha). **N:** segmento nasal del globo ocular; **T:** segmento temporal del globo ocular. 10x.

Foto 2 . — Detalle del segmento nasal del globo ocular de la foto 1. **cc:** cuerpo ciliar. **ir:** iris. 20x.

Foto 3 . — Detalle del segmento temporal del globo ocular de la foto 1. Gránulos de melanina en la región evertida (flecha). 20x.



ESTADIO 32 HH

Los procesos ciliares cubren toda la circunferencia del cuerpo ciliar pero puede notarse que los de la porción superior están más retrasados en su desarrollo (Lámina 7: foto 1).

En el cuerpo ciliar se detecta el inicio de una condensación mesenquimatosa; en el ángulo iridocorneal la densidad nuclear es más elevada y corresponde al esbozo del *trabeculum* (Lámina 7: foto 1).

En el mesénquima del cuerpo ciliar se observan por primera vez, células positivas para el anticuerpo monoclonal 13F4 (Lámina 7: foto 2). Estos mioblastos aunque escasos, se localizan en el seno de la incipiente condensación mesenquimatosa salvo en el segmento superior del cuerpo ciliar.

La región evertida del epitelio interno comienza a introducirse en el estroma del iris pero sin perder la conexión con su epitelio matriz (Lámina 7: fotos 3 y 4). Esta estructura epitelial inmersa en el estroma a veces presenta pigmento. Aparentemente el pigmento es menos frecuente en los lados nasal (Lámina 7: foto 3) e inferior que en las zonas temporal (Lámina 7: foto 4) o superior (Lámina 8: foto 1).

El borde pupilar carece de pigmento en los tramos nasal (Lámina 8: foto 2) e inferior; pero aún los segmentos superior (Lámina 8: foto 1) y temporal (Lámina 8: foto 3) contienen algunos gránulos.

De forma ocasional, la región ciliar del epitelio interno del iris en su segmento nasal contiene pequeños gránulos de melanina (Lámina 8: foto 2).

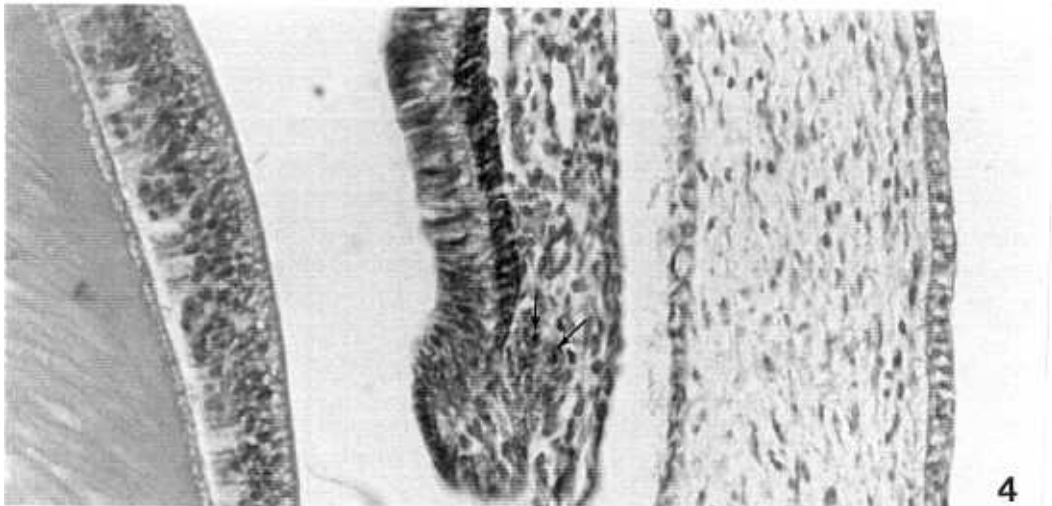
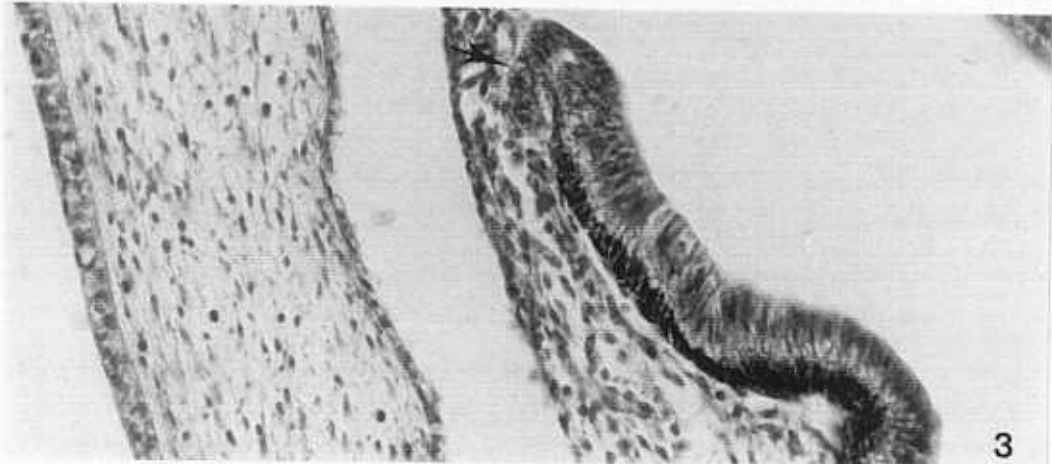
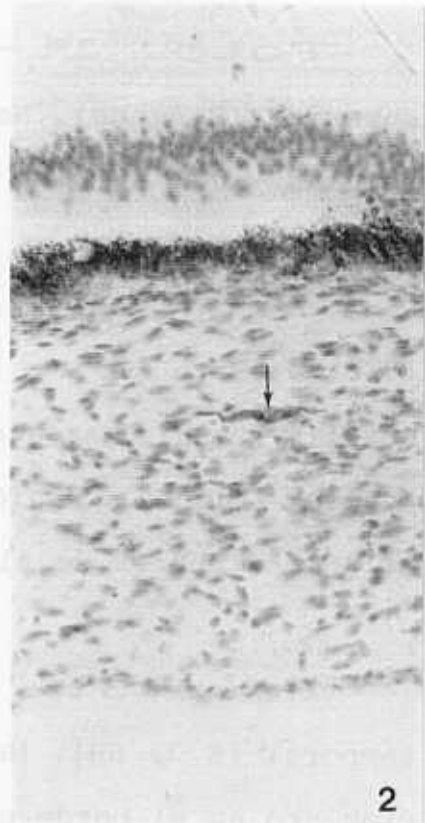
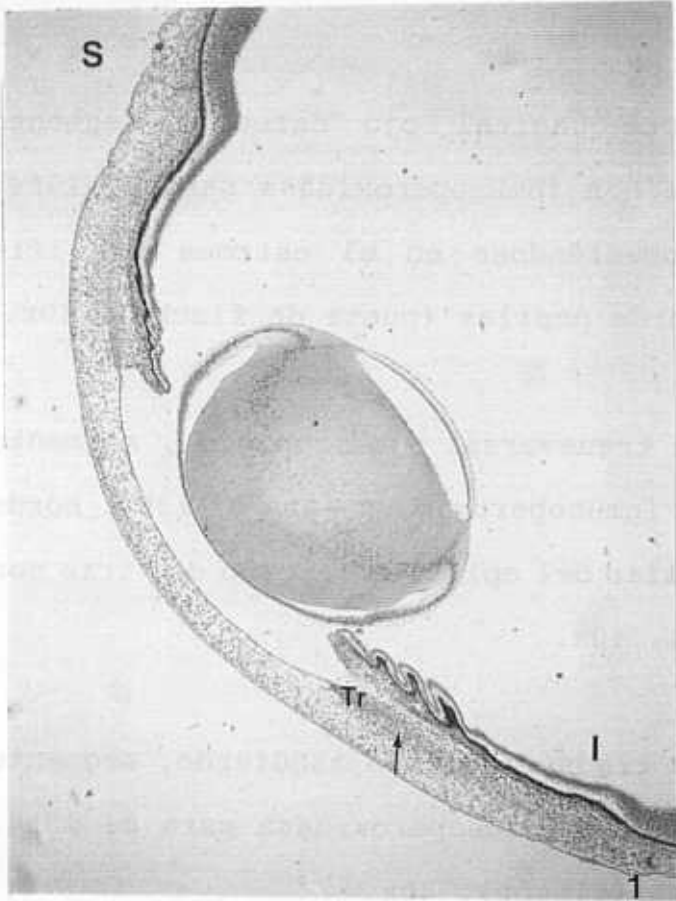
LAMINA 7 .

Foto 1 . - Corte sagital ojo derecho (E 32 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Condensación mesenquimatososa (flecha). I: segmento inferior del globo ocular; S: segmento superior del globo ocular; Tr: trabeculun. 4x.

Foto 2 . - Detalle de la porción inferior del cuerpo ciliar de la foto 1. Célula positiva para el 13F4 (flecha). 40x.

Foto 3 . - Corte transversal ojo derecho, segmento nasal (E 32 HH). H-E. La parte evertida del epitelio interno se introduce en el estroma del iris (flecha). 40x.

Foto 4 . - Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal (E 32 HH). H-E. La masa celular que se introduce en el estroma del iris contiene pigmento (flechas). 40x.



LAMINA 8 .

Foto 1 . - Corte sagital ojo derecho, segmento superior (E 32 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Células con melanina introduciéndose en el estroma del iris (flecha). Melanina en el borde pupilar (punta de flecha). 40x.

Foto 2 . - Corte transversal ojo izquierdo, segmento nasal (E 32 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Borde pupilar (flecha). Región ciliar del epitelio interno del iris con melanina (puntas de flecha). 40x.

Foto 3 . - Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal (E 32 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Pigmento en el borde pupilar (flecha). 40x.



ESTADIO 33 HH

En el cuerpo ciliar se aprecia una morfología diferente entre el tramo superior e inferior (Lámina 9: foto 1).

La condensación mesenquimatosa del cuerpo ciliar constituye una banda continua desde el *trabeculum* hasta la ora serrata, sin embargo, en el tramo superior no aparece tan marcada como en el tramo inferior (Lámina 9: foto 1).

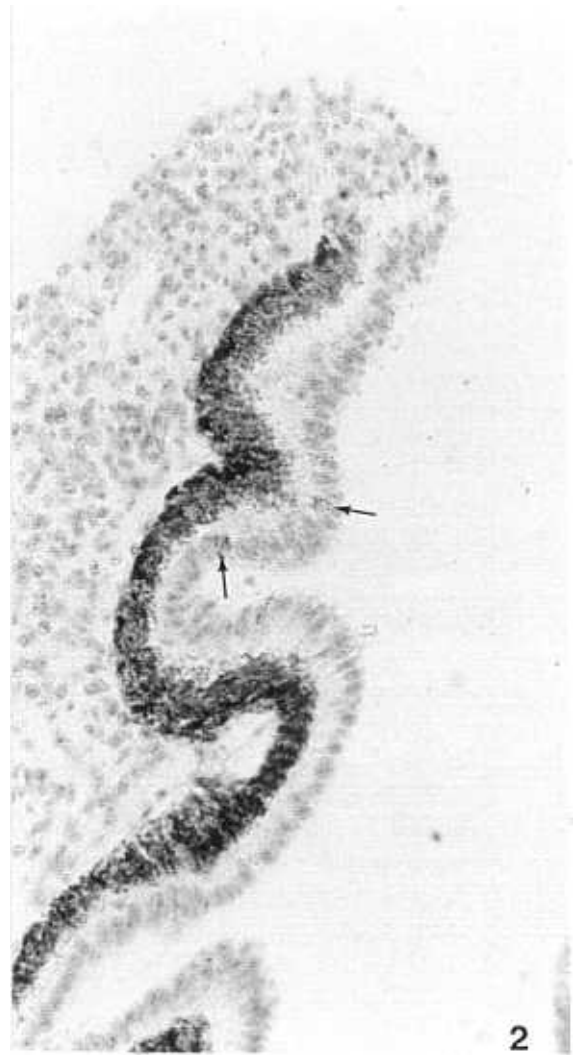
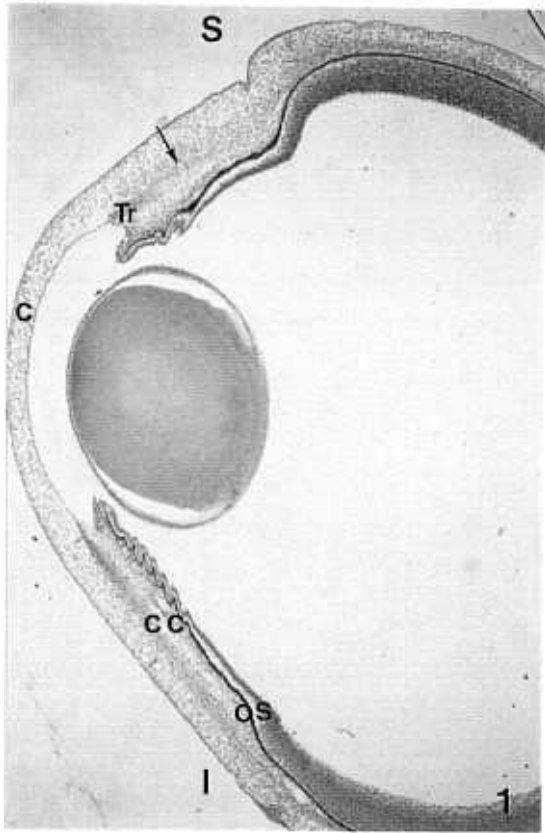
Aunque en escasa cantidad, las células positivas para el 13F4 ahora también están presentes en la región superior del cuerpo ciliar.

En el segmento inferior del iris, algunas células de la porción ciliar del epitelio interno contienen pequeños gránulos de pigmento (Lamina 9: foto 2).

LAMINA 9 .

Foto 1. - Corte sagital ojo derecho (E 33 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Condensación mesenquimatosa del segmento superior del cuerpo ciliar (flecha).
c: córnea; cc: cuerpo ciliar; I: segmento inferior; os: ora serrata; S: segmento superior; Tr: *trabeculum*. 4x.

Foto 2. - Corte sagital ojo derecho, segmento inferior (E 33 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Células con pigmento en la región ciliar del epitelio interno del iris (flechas). 40x.



ESTADIOS 34 Y 35 HH

Existe una clara asimetría entre la región superior e inferior del cuerpo ciliar (Lámina 10: foto 1).

La condensación mesenquimatosa se ha acentuado en el tramo superior, pero sigue contrastando con la del lado contralateral (Lámina 10: foto 1).

Desde este momento, es habitual la presencia de células positivas para el 13F4 en el segmento superior del cuerpo ciliar y en la cara profunda del *trabeculum* (Lámina 10: foto 2).

También, a partir del estadio 34 HH el epitelio externo del cuerpo ciliar emite brotes de células pigmentadas y son más frecuentes en el orbículo ciliar que en los procesos ciliares (Lámina 10: foto 3). Sin embargo, la formación de estos brotes en el tramo superior es muy limitada y no se generaliza hasta el estadio 35 HH.

En el estroma del iris se detectan células que han adquirido el epítotope que reconoce el 13F4, pero se aprecia que hay dos intensidades de marcaje en localizaciones diferentes:

- En la mitad periférica del estroma del iris (Lámina 10: foto 4), un número muy escaso de células exhiben un marcaje igual al de los mioblastos del cuerpo ciliar. Estas células, están ausentes en el tramo superior del iris incluso en el estadio 35 HH.

- En el estroma de la región pupilar un considerable número de células muestran un marcaje más tenue (Lámina 10: foto 5). Algunas de ellas, contienen gránulos de melanina, especialmente las del segmento superior del iris (Lámina 10: foto 6). Nótese que estas células están más distanciadas del epitelio externo que

en los estadios precedentes.

Los mioblastos de la región pupilar los vemos en el estadio 35 HH como una estructura alejada del epitelio externo y en continuidad con el epitelio interno (Lámina 11: fotos 1, 2 y 3).

El extremo distal a la pupila de esta estructura asentada en el estroma parece que se ha fragmentado en pequeños grupos celulares. También puede observarse que en el segmento temporal de esta estructura hay pigmento (Lámina 11: foto 1).

El epitelio externo del iris en su porción media, forma brotes celulares que se dirigen hacia el estroma donde es evidente la presencia de células con pigmento (Lámina 11: fotos 1 y 2).

En el epitelio interno del iris la existencia de melanina comienza a ser frecuente en la región ciliar (Lámina 10: fotos 4 y 5) y a extenderse hacia la zona pupilar (Lámina 11: fotos 1, 2 y 3). Puede notarse que la pigmentación es más intensa en el lado nasal del epitelio (Lámina 11: foto 3) respecto al lado temporal (Lámina 11: fotos 1 y 2).

LAMINA 10 .

Foto 1 . — Corte sagital ojo izquierdo (E 34 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Condensación mesenquimatosa (flechas). I: segmento inferior; oc: orbículo ciliar; pc: procesos ciliares; S: segmento superior; Tr: *trabeculum*. 4x.

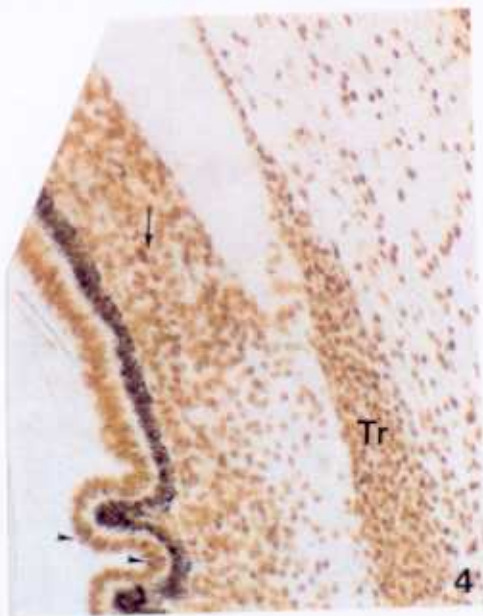
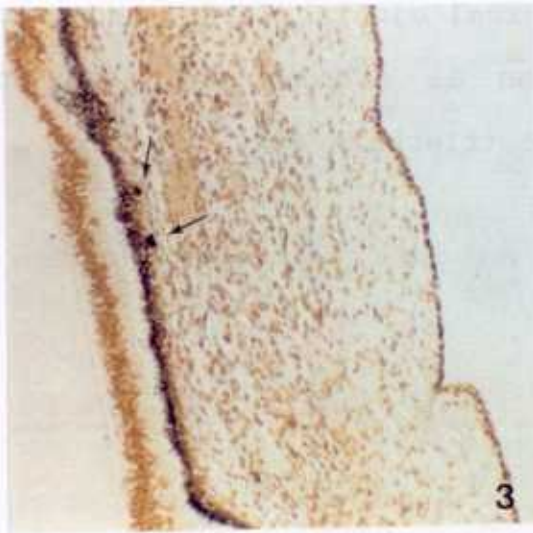
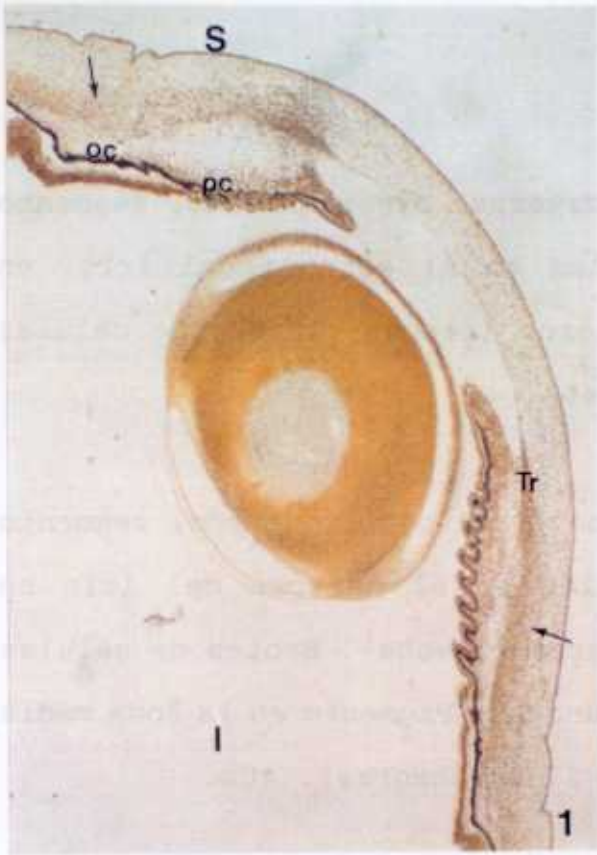
Foto 2 . — Detalle del segmento superior del globo ocular de la foto 1. Células positivas para el 13F4 (flechas). Tr: *trabeculum*. 10x.

Foto 3 . — Detalle del segmento inferior del orbículo ciliar de la foto 1. Brotes de células pigmentadas (flechas). 20x.

Foto 4 . — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 34 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Célula positiva para el 13F4 (flecha). Melanina en el epitelio interno de la región ciliar del iris (puntas de flecha). Tr: *trabeculum*. 20x.

Foto 5 . — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 34 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Células positivas para el 13F4 (flecha). Melanina en el epitelio interno de la región ciliar del iris (puntas de flecha). 40x.

Foto 6 . — Corte sagital ojo derecho, segmento superior del iris (E 34 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Células marcadas positivamente con gránulos de melanina en su interior (flecha). 40x.

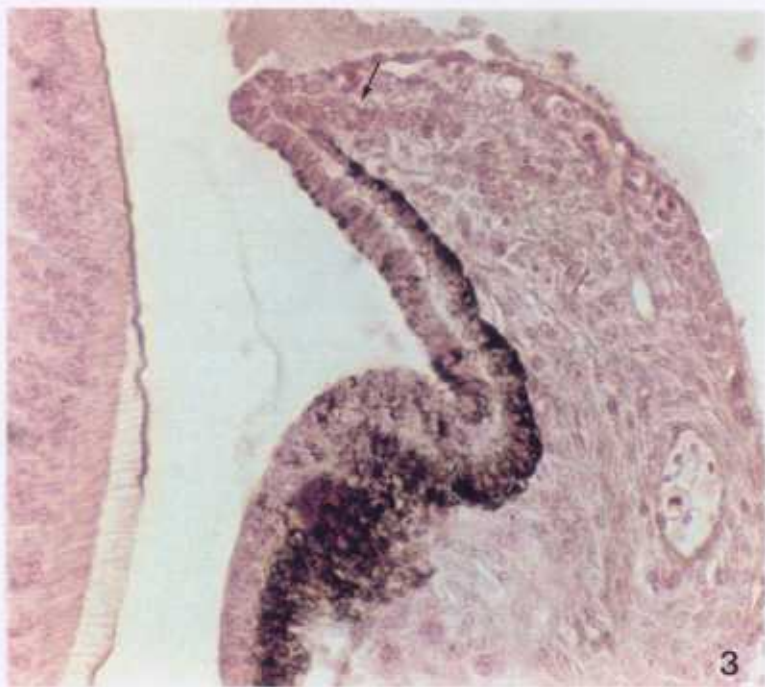


LAMINA 11.

Foto 1. — Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal (E 35 HH). H-E. Células en el estroma del iris, en continuidad con el epitelio interno (flecha). Brote de células pigmentadas (punta de flecha). 40x.

Foto 2. — Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal (E 35 HH). H-E. Células en el estroma del iris en continuidad con el epitelio interno (flecha). Brotes de células pigmentadas (puntas de flecha blancas). Pigmento en la zona media del estroma del iris (puntas de flecha negras). 40x.

Foto 3. — Corte transversal ojo izquierdo, segmento nasal (E 35 HH). H-E. Células en el estroma del iris en continuidad con el epitelio interno (flecha). 40x.



ESTADIO 36 HH

En este momento hay un destacado incremento de células marcadas tanto en el cuerpo ciliar como en el iris (Lámina 12: foto 1).

En el cuerpo ciliar puede observarse la asimetría morfológica entre los tramos superior e inferior (Lámina 12: foto 1), así como el mayor número de células positivas en el lado inferior (Lámina 12: foto 3) respecto al superior (Lámina 12: foto 2).

También se aprecia el diferente grado de pigmentación del epitelio interno del iris, más acusado en el lado inferior (Lámina 12: foto 3) que en el superior (Lámina 12: foto 2).

Tanto en el cuerpo ciliar (Lámina 13: foto 1) como en el iris algunos mioblastos se han fusionado.

En el iris, la asimetría en cuanto al número de células marcadas no parece existir, pero el marcaje no es uniforme. Pueden distinguirse tres zonas (Lámina 13: foto 2):

- **Pupilar:** las células manifiestan un marcaje tenue y no tienen pigmento.

- **Intermedia:** hay una heterogeneidad de marcaje pero es bastante intenso. Algunas células poseen gránulos de melanina. En el epitelio externo, células parcial o totalmente despigmentadas han adquirido el epítotope que reconoce el 13F4. A veces este epitelio protuye hacia el estroma y emite brotes celulares.

- **Raíz ciliar:** aunque escasas, las células están fuertemente marcadas y con una morfología bien definidas semejante a los mioblastos esqueléticos.

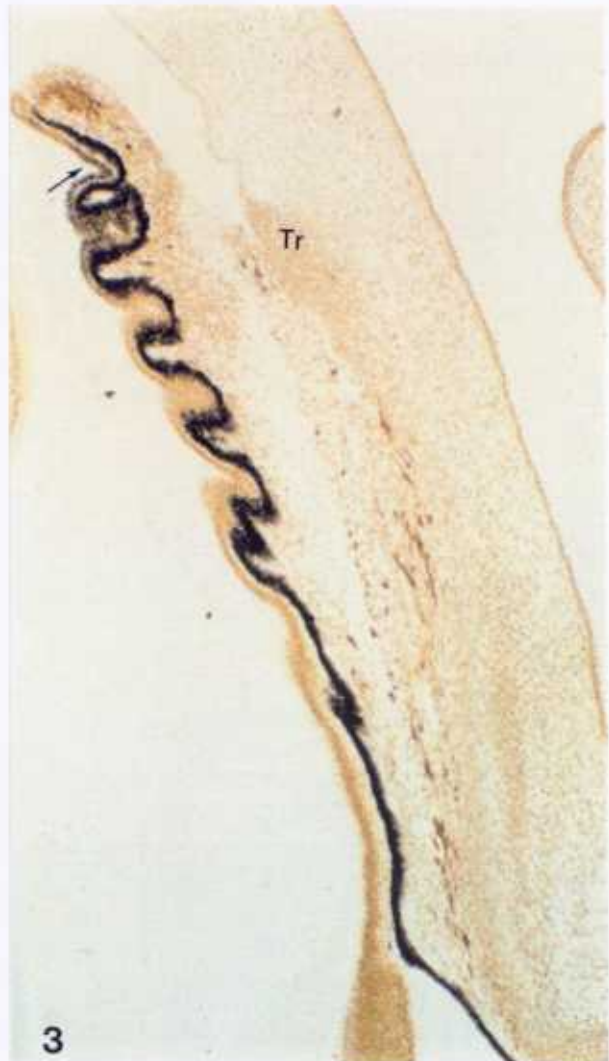
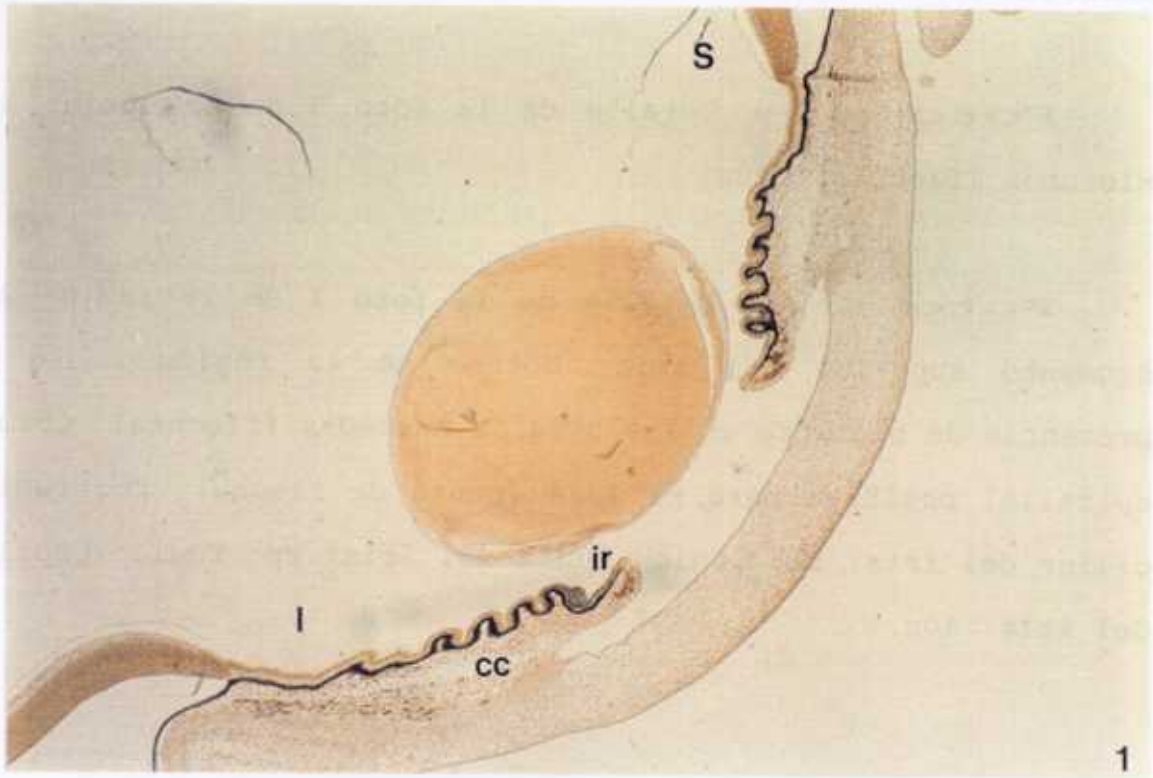
Al final del día 10 de incubación (estadio 36+ HH) siguen observándose estas tres zonas (Lámina 14: foto 1), pero en las regiones nasal e inferior del cuerpo ciliar (Lámina 14: foto 2) han ocurrido cambios notables. El número de mioblastos ha aumentado de manera importante y se integran en una masa muscular bien definida. Los mioblastos han adquirido dos orientaciones diferentes. Los rostrales son vistos perpendiculares al plano de corte. Los occipitales resultan ser oblicuos. Entre esta masa muscular y el epitelio externo del cuerpo ciliar, el tejido conjuntivo cuenta con brotes de células pigmentadas y con algún mioblasto.

LAMINA 12 .

Foto 1 . — Corte frontal ojo izquierdo (E 36 HH).
Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. cc: cuerpo ciliar;
I: segmento inferior; ir: iris; S: segmento superior. 4x.

Foto 2 . — Corte frontal ojo izquierdo (E 36 HH).
Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Detalle del segmento
superior del globo ocular. Pigmentación del epitelio interno del
iris (flecha). 10x.

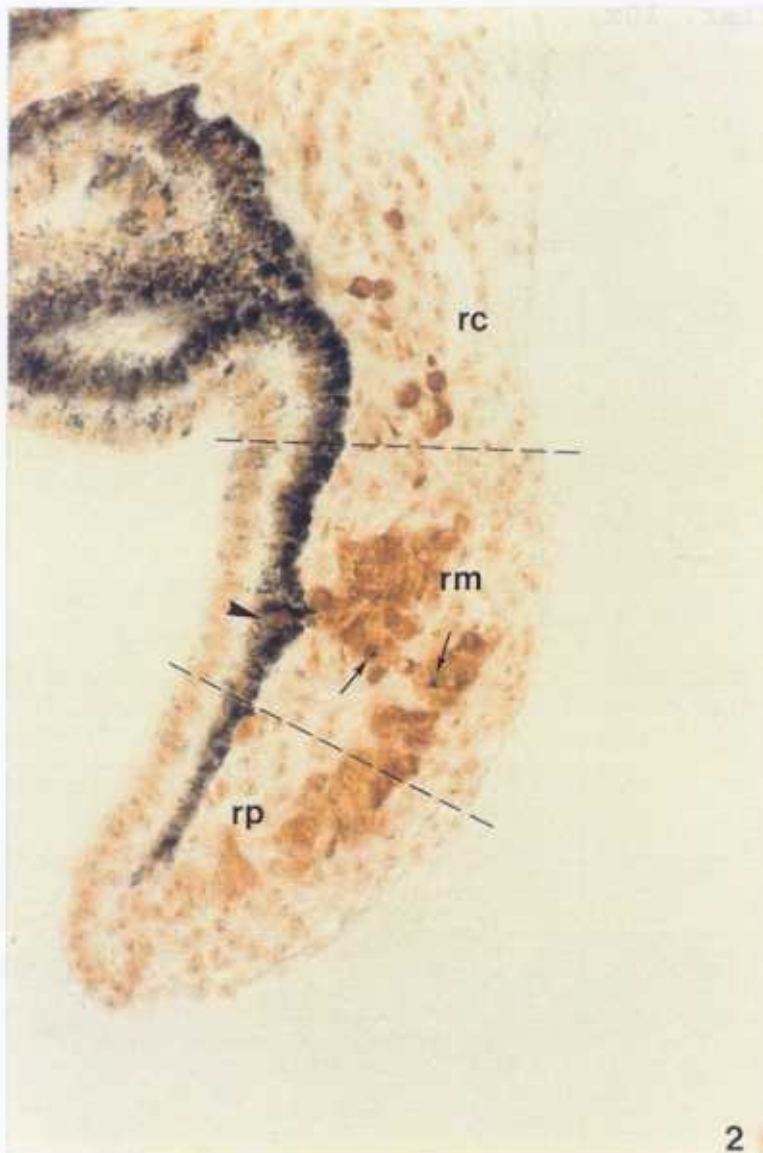
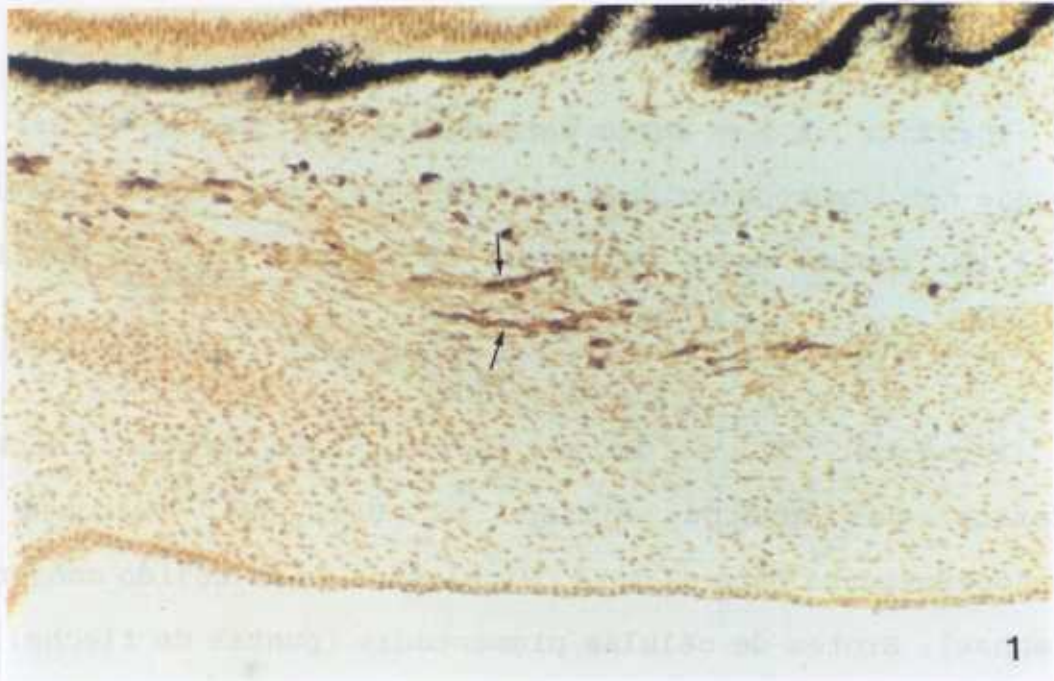
Foto 3 . — Corte frontal ojo izquierdo (E 36 HH).
Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Detalle del segmento
inferior del globo ocular. Pigmentación del epitelio interno del
iris (flecha). Tr: *trabeculum* 10x.



LAMINA 13 .

Foto 1 . — Detalle de la foto 3 de la lámina 12.
Miotubos (flechas). 20x.

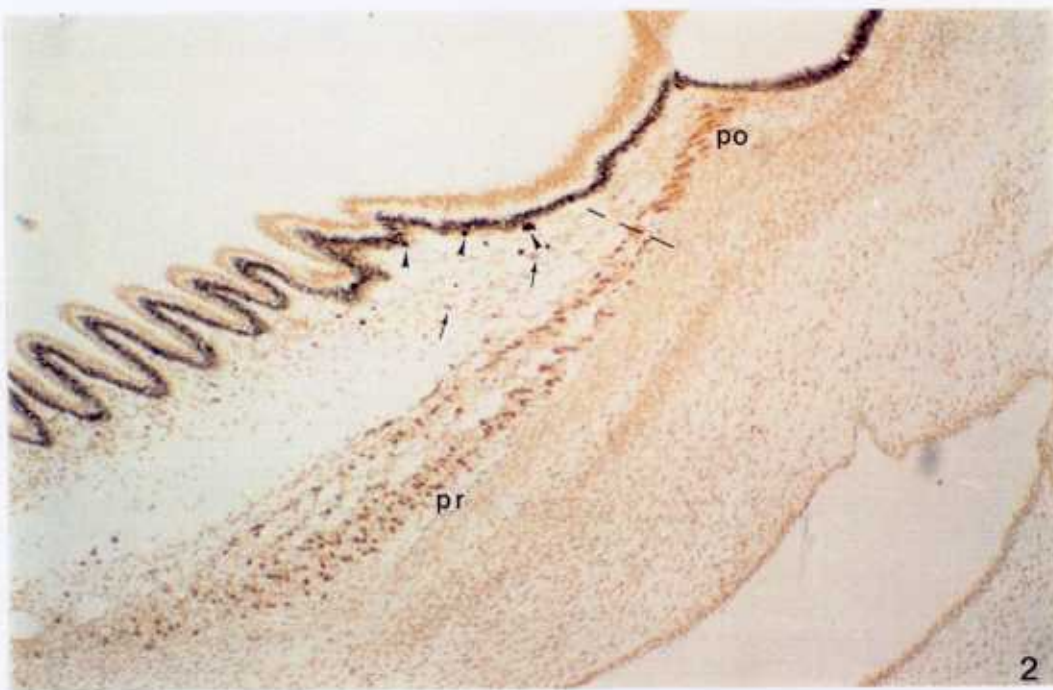
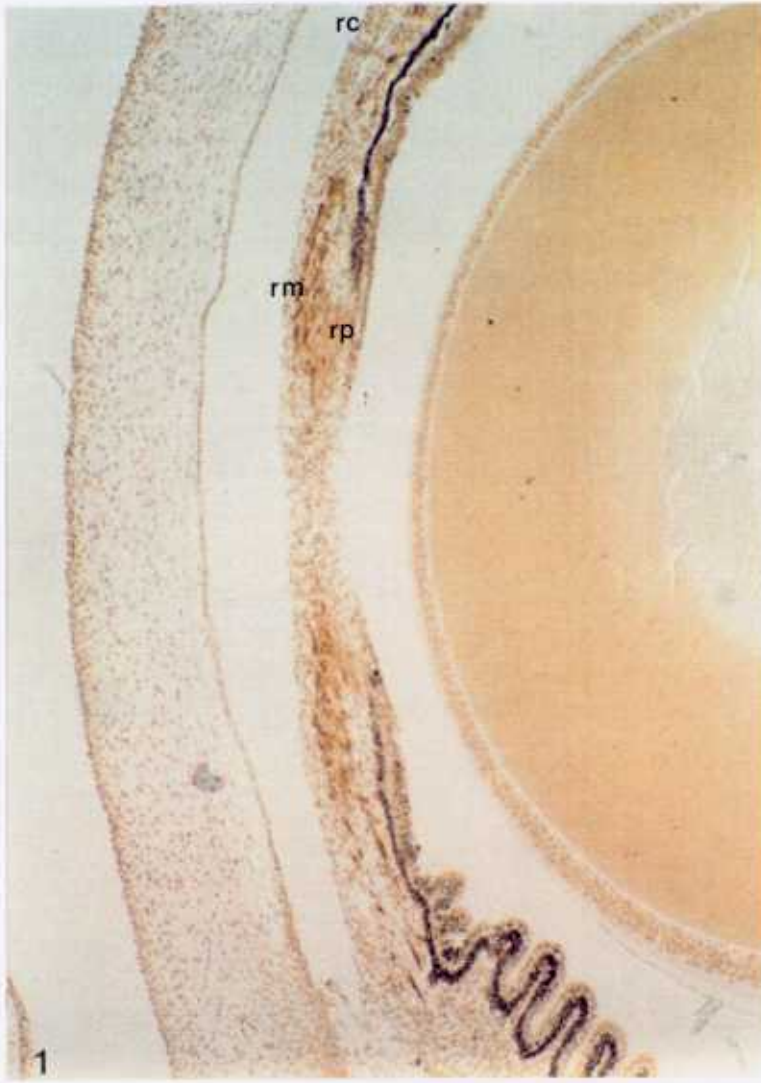
Foto 2 . — Detalle de la foto 1 de la lámina 12,
segmento superior del iris. Nótese en la región media la
presencia de pigmento en las células marcadas (flechas). Célula
epitelial positiva para el 13F4 (punta de flecha). **rc**: región
ciliar del iris; **rm**: región media del iris; **rp**: región pupilar
del iris. 40x.



LAMINA 14 .

Foto 1 . - Corte parasagital ojo derecho (E 36+ HH).
Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris; rp: región pupilar del iris.
10x.

Foto 2 . - Corte sagital ojo derecho, segmento inferior del cuerpo ciliar (E 36+ HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos en el tejido conjuntivo (flechas). Brotes de células pigmentadas (puntas de flecha). po: porción occipital del músculo ciliar; pr: porción rostral del músculo ciliar. 10x.



ESTADIO 37 HH

Aún cuando es posible detectar un menor número de células positivas para el 13F4 en los lados temporal (Lámina 15: foto 1) y superior del músculo ciliar, la asimetría queda finalmente corregida en el transcurso de este estadio (Lámina 15: foto 2). Puede observarse una masa muscular compacta donde las células están dispuestas en dos direcciones diferentes: las rostrales son oblicuas al plano de corte y las occipitales aparecen longitudinales. En el tejido conjuntivo subyacente al músculo ciliar hay mioblastos y brotes de células pigmentadas.

Las células del músculo ciliar muestran estriaciones transversales correspondientes a la organización sarcomérica (Lámina 15: foto 3).

La descripción de la disposición de las células marcadas en el iris durante el estadio 36 HH sigue siendo similar en el estadio 37 HH, aunque con una tendencia a mezclarse. Obsérvese (Lámina 16: foto 1) que en la región ciliar del iris, ahora con un importante número de células, no parece tan claramente distinguible de la región intermedia y en la región pupilar existen mioblastos con un fuerte marcaje.

En el estroma de la región pupilar se aprecia una masa celular en continuidad con el epitelio posterior, más intensamente marcada cuanto más alejada de él (Lámina 16: foto 2).

En la región media del epitelio externo del iris siguen observándose células marcadas que aparentemente se dirigen hacia el estroma (Lámina 16: foto 1). También en la región media del iris, pero próximas a la región ciliar, algunas células inmersas

en el epitelio externo muestran el epítotope del 13F4. La presencia de células positivas con pigmento es habitual en el tramo medio del iris (Lámina 16: foto 3).

Nótese la diferente pigmentación del epitelio interno del iris, más acusada en su tramo nasal (Lámina 16: foto 3) que en el temporal (Lámina 16: foto 1 y 2).

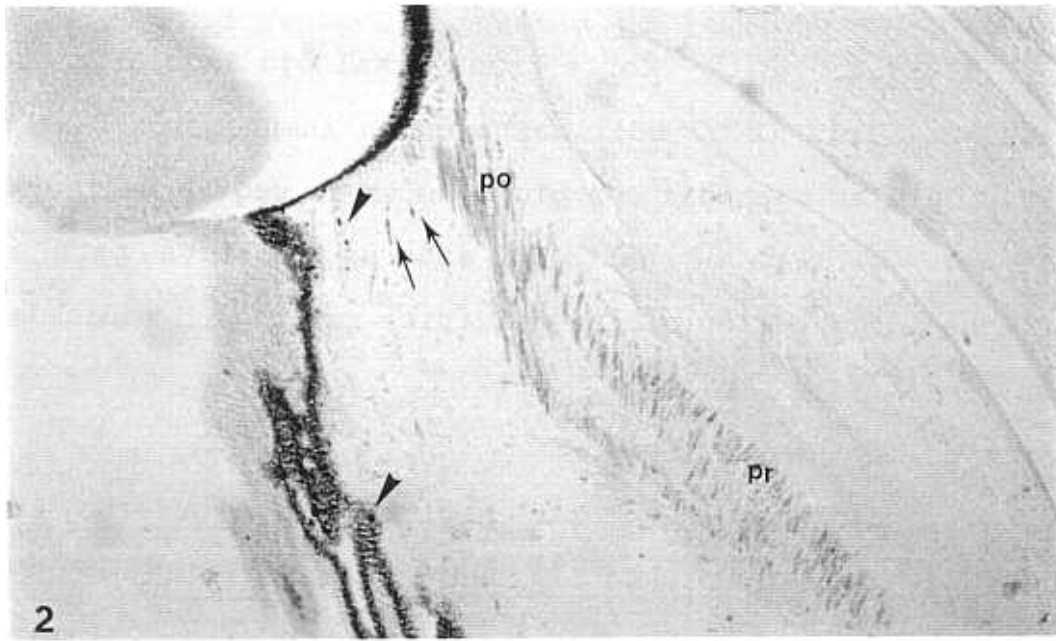
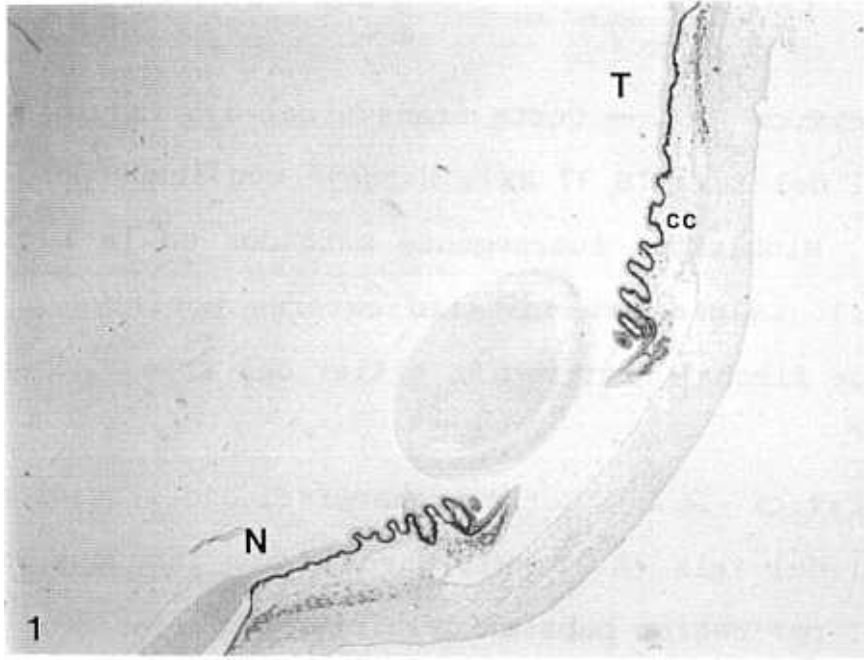
Las primeras fibras con estriaciones transversales en el esfínter pupilar se detectan en la región ciliar o raíz del iris (Lámina 16: foto 4).

LAMINA 15.

Foto 1. — Corte transversal ojo izquierdo (E 37 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. cc: cuerpo ciliar; N: segmento nasal del globo ocular; T: segmento temporal del globo ocular. 4x.

Foto 2. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento superior del cuerpo ciliar (E 37+ HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos en el tejido conjuntivo subyacente al músculo (flechas). Brotes de células pigmentadas (puntas de flecha). po: porción occipital del músculo ciliar; pr: porción rostral del músculo ciliar. 10x.

Foto 3. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del músculo ciliar (E 37+ HH). Hematoxilina de Mallory. Estriaciones transversales en las fibras musculares (flechas). e: esclera. 40x.



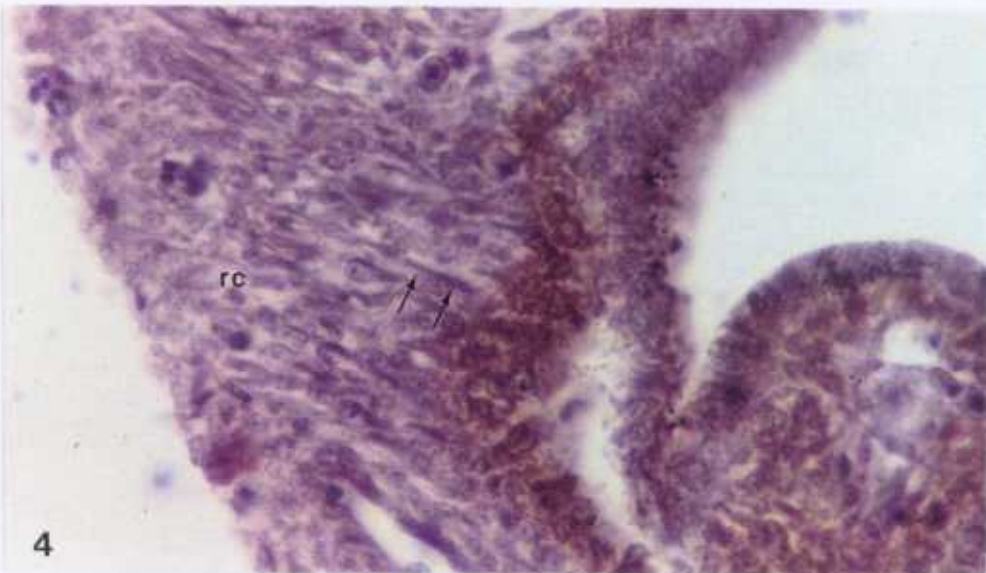
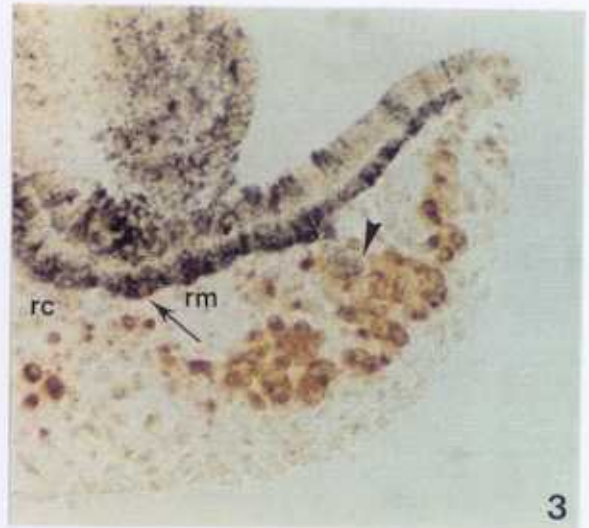
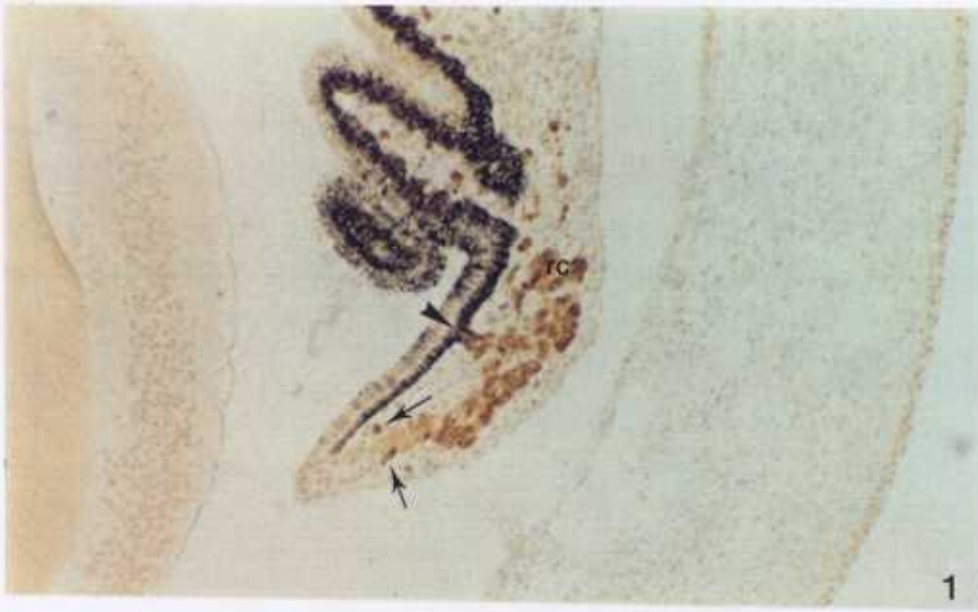
LAMINA 16 .

Foto 1 . - Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal del iris (E 37 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos fuertemente marcados en la región pupilar (flechas). Célula del epitelio externo positiva para el 13F4 (punta de flecha). rc: región ciliar del iris. 20x.

Foto 2 . - Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal del iris (E 37 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. rp: región pupilar del iris. 40x.

Foto 3 . - Corte transversal ojo izquierdo, segmento nasal del iris (E 37 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Células marcadas con pigmento en la región media (punta de flecha). Célula del epitelio externo positiva para el 13F4 (flecha). rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris. 40x.

Foto 4 . - Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 37+ HH). Hematoxilina de Mallory. Estriaciones en las fibras del esfínter pupilar (flechas). rc: región ciliar del iris. 40x.



ESTADIOS 38 Y 39 HH



El músculo ciliar continúa integrado por fibras musculares dispuestas en dos direcciones. El tejido conjuntivo subyacente al músculo contiene más mioblastos que en el estadio precedente (Lámina 17: foto 1).

En el epitelio externo del cuerpo ciliar y fundamentalmente en la zona del orbículo ciliar se observa la existencia de células positivas para el 13F4 que aparentemente se están independizando de él (Lámina 17: foto 2, 3 y 4).

Los mioblastos no integrados en la masa muscular comienzan a fusionarse en el estadio 38 HH y a converger a nivel de la ora serrata con las fibras de la porción occipital del músculo ciliar (Lámina 17. foto 5). Este proceso de integración queda ligeramente retrasado en el tramo superior, pero en el estadio 39 HH es claramente visible.

En el iris, el esfínter pupilar ocupa la práctica totalidad del estroma (Lámina 18: foto 1). En la región pupilar se nota un marcaje menos intenso.

El epitelio externo contienen células positivas para el anticuerpo 13F4 en casi toda su extensión (Lámina 18: foto 2). Constituyen el esbozo del músculo dilatador. En la mitad periférica del iris hay miotubos, pero no parecen perder la conexión con el epitelio. Esfínter y dilatador supuestamente confluyen en la mitad periférica del iris.

En el estadio 38 HH el epitelio interno del iris está pigmentado en toda su longitud aunque se nota una menor densidad de pigmentación en las células más rostrales (Lámina 18: fotos 1 y 2). También el borde pupilar contiene algunos gránulos de

melanina (Lámina 18: foto 2).

En el estadio 39 HH los dos epitelios del iris están muy pigmentados (Lámina 18: foto 3). La pigmentación del borde pupilar es menos marcada. Ocasionalmente aparece melanina en la región pupilar del iris.

LAMINA 17.

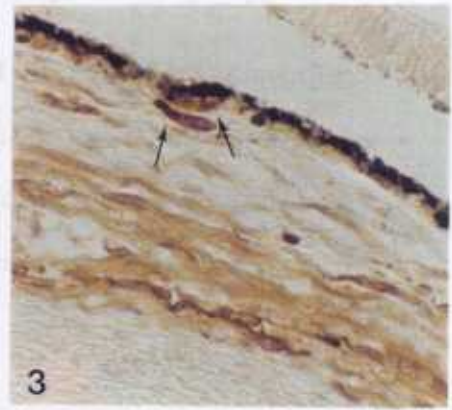
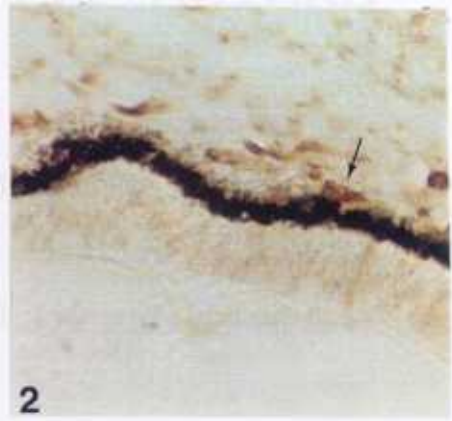
Foto 1. - Corte frontal ojo derecho, segmento superior (E 38 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos en el tejido conjuntivo subyacente al músculo (flechas). Brotes de células pigmentadas (puntas de flecha). oc: orbículo ciliar; pc: procesos ciliares; po: porción occipital del músculo ciliar; pr: porción rostral del músculo ciliar; Tr: *trabeculum*. 10x.

Foto 2. - Corte frontal ojo izquierdo, orbículo ciliar (E 38 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Célula positiva para el 13F4 parcialmente despigmentada separándose del epitelio externo (flecha). 40x.

Foto 3. - Corte transversal ojo derecho, orbículo ciliar (E 38 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos con pigmento (flechas), uno de ellos aún está inmerso en el epitelio externo. 40x.

Foto 4. - Corte frontal ojo derecho, orbículo ciliar (E 39 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblasto separándose del epitelio externo (flecha). 40x.

Foto 5. - Corte frontal ojo derecho, segmento inferior del cuerpo ciliar (E 39 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos integrándose en el músculo ciliar (flechas). os: ora serrata; po: porción occipital del músculo ciliar. 10x.

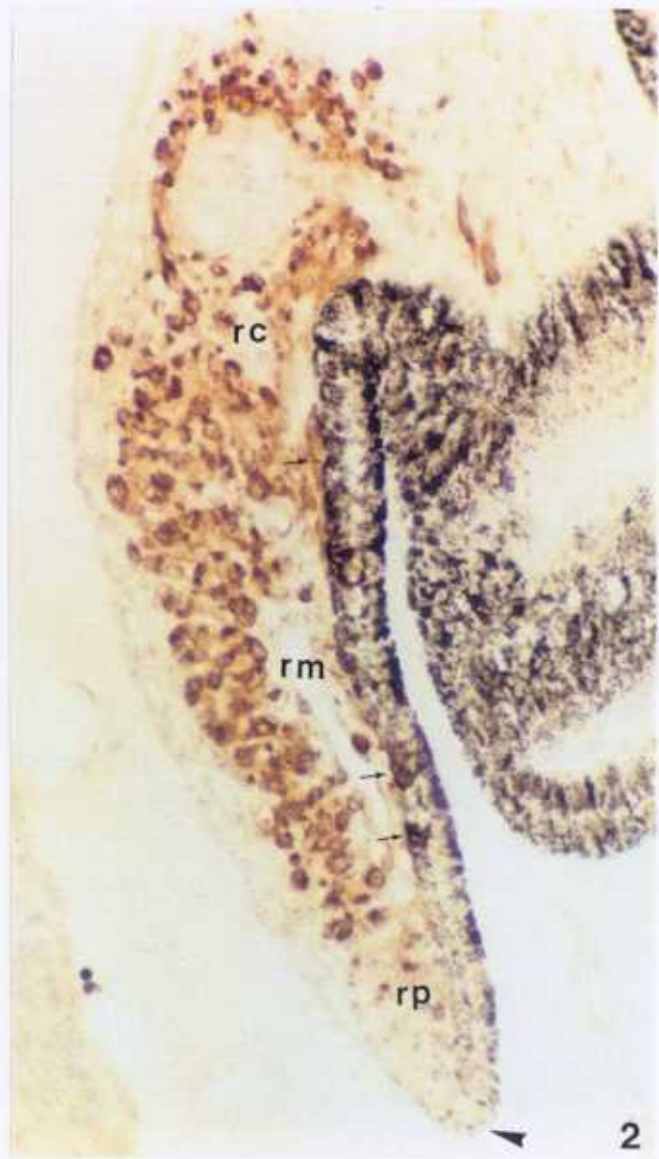
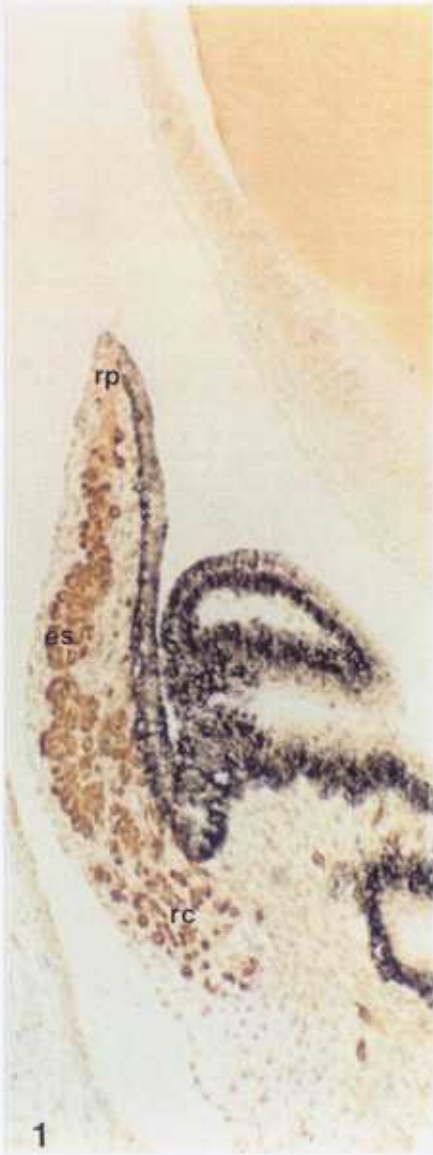


LAMINA 18.

Foto 1. — Corte transversal ojo derecho, segmento nasal del iris (E 38 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. es: esfínter pupilar; rc: región ciliar del iris; rp: región pupilar del iris. 20x.

Foto 2. — Corte transversal ojo derecho, segmento temporal del iris (E 38 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Células positivas para el 13F4 en el epitelio externo (flechas). Borde pupilar (punta de flecha). rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris; rp: región pupilar del iris. 40x.

Foto 3. — Corte frontal ojo derecho, segmento superior (E 39 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Dilatador del iris (flechas). rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris; rp: región pupilar del iris. 20x.



ESTADIO 40 HH

En el músculo ciliar además de las fibras rostrales y occipitales descritas en estadios precedentes se aprecian unas fibras internas con disposición relativamente longitudinal que confluyen cerca de la ora serrata con las fibras occipitales (Lámina 19: fotos 1 y 2). Siguen detectándose algunos mioblastos en el tejido subyacente al músculo y brotes de células pigmentadas (Lámina 19: foto 3).

El esfínter pupilar presenta una positividad homogénea y ya no es posible detectar el marcaje tenue de la región pupilar (Lámina 20: fotos 1 y 2).

El borde pupilar está pigmentado y es más patente en el tramo inferior (Lámina 20: foto 2) que en el superior (Lámina 20: foto 1).

En la región pupilar del esfínter las fibras musculares han adquirido gránulos de melanina. También se observa pigmento en las fibras de la región media (Lámina 20. foto 2).

En la mitad periférica del iris, las fibras del esfínter tienen estriaciones transversales (Lámina 20: foto 3).

Suprayacente al epitelio externo del iris se observan células positivas para el 13F4, pertenecientes al dilatador, que casi alcanzan la región pupilar (Lámina 20: fotos 1 y 2).

En la zona ciliar (Lámina 21: foto 1) y en la zona media (Lámina 21: foto 2) hay miotubos y puede notarse que están en conexión con el epitelio.

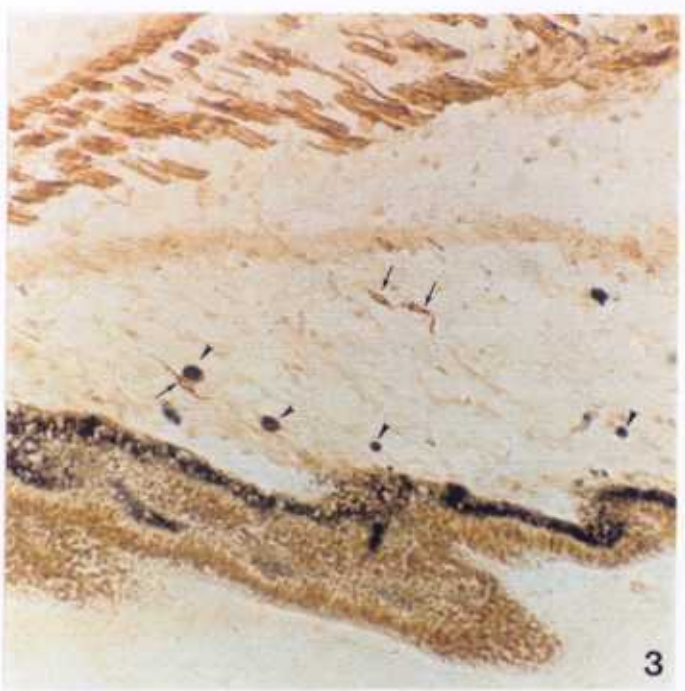
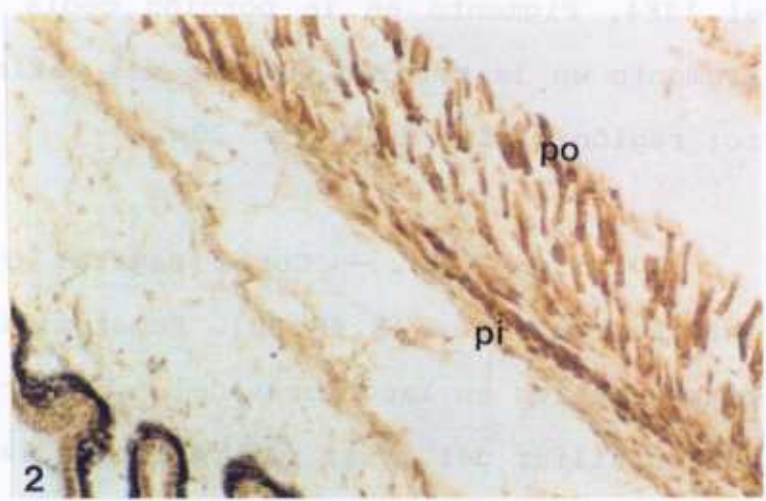
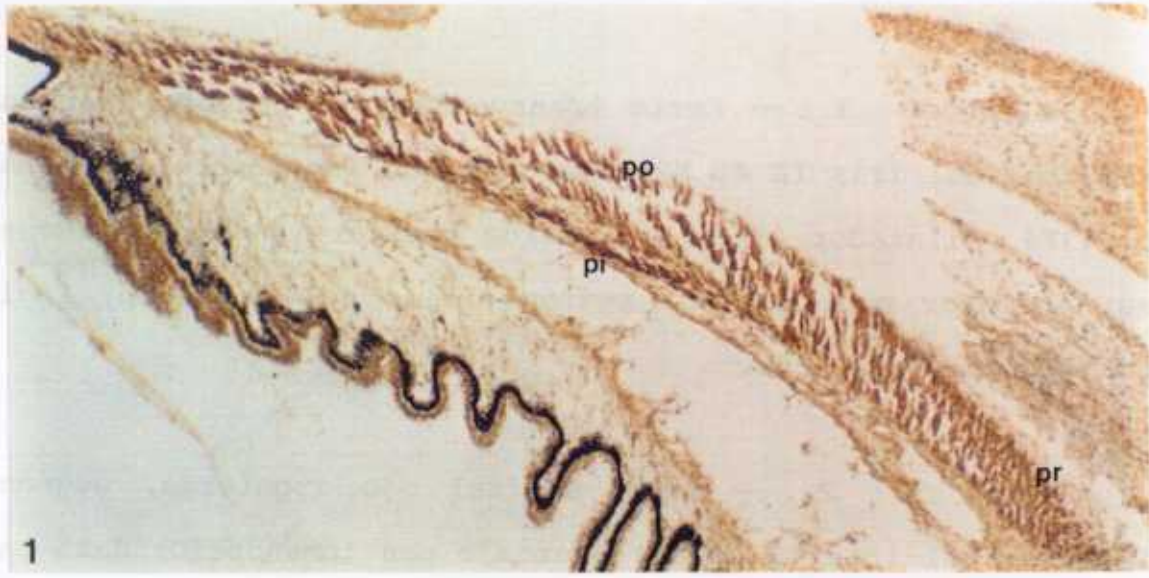
Las fibras del dilatador son estriadas (Lámina 21: foto 3).

LAMINA 19.

Foto 1. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento superior del músculo ciliar (E 40 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. **pi:** porción interna del músculo ciliar; **po:** porción occipital del músculo ciliar; **pr:** porción rostral del músculo ciliar. 10x.

Foto 2. — Detalle de las porciones interna y occipital del músculo ciliar de la **foto 1.** **pi:** porción interna; **po:** porción occipital. 20x.

Foto 3. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento superior. Detalle del tejido conjuntivo subyacente al músculo ciliar (E 40 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos (flechas). Células con melanina (puntas de flecha). 20x.

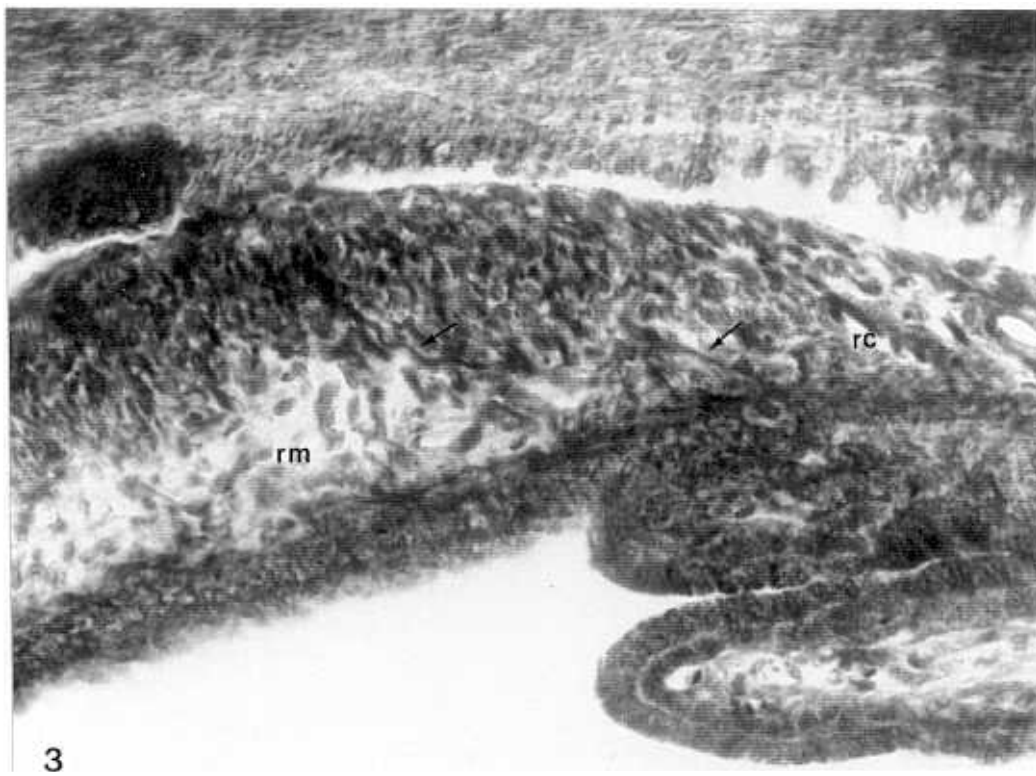
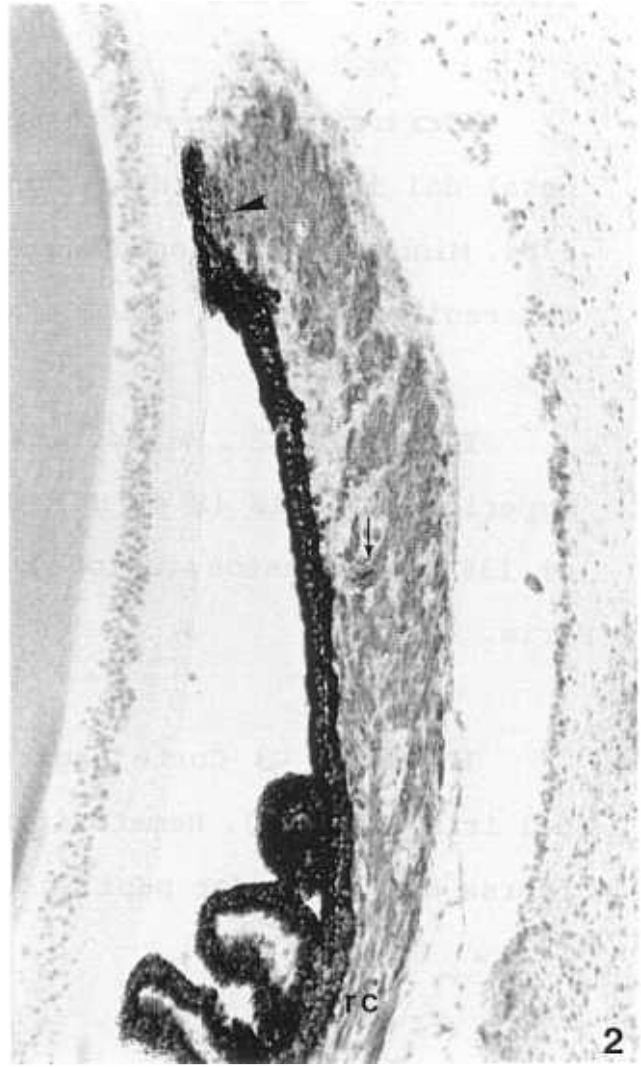
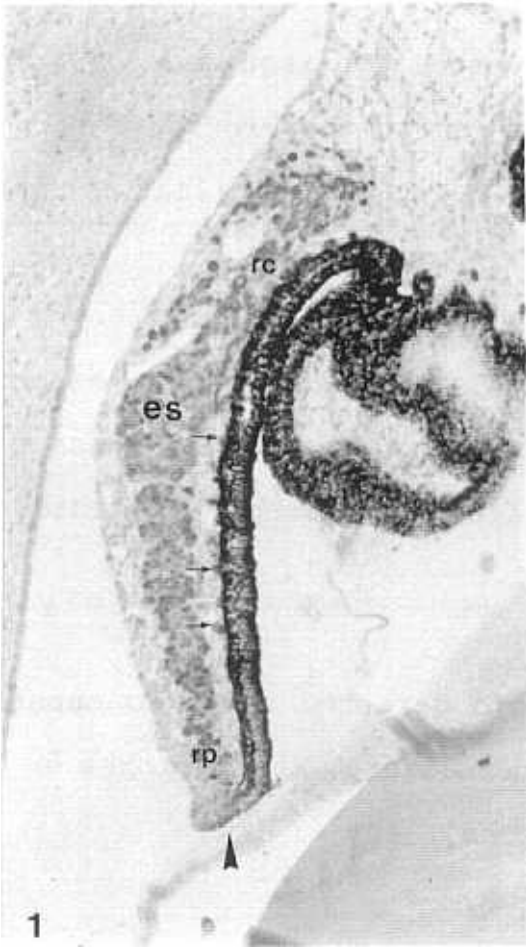


LAMINA 20.

Foto 1. — Corte transversal ojo derecho, segmento temporal del iris (E 40 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Dilatador (flechas). Borde pupilar (punta de flecha). es: esfínter pupilar. rc: región ciliar del iris; rp: región pupilar del iris. 20x.

Foto 2. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 40 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Pigmento en la porción media del esfínter (flecha). Pigmento en la porción pupilar del esfínter (punta de flecha). rc: región ciliar del iris. 20x.

Foto 3. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 40 HH). Hematoxilina de Mallory. Estrías transversales en las fibras del esfínter pupilar (flechas). rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris. 40x.

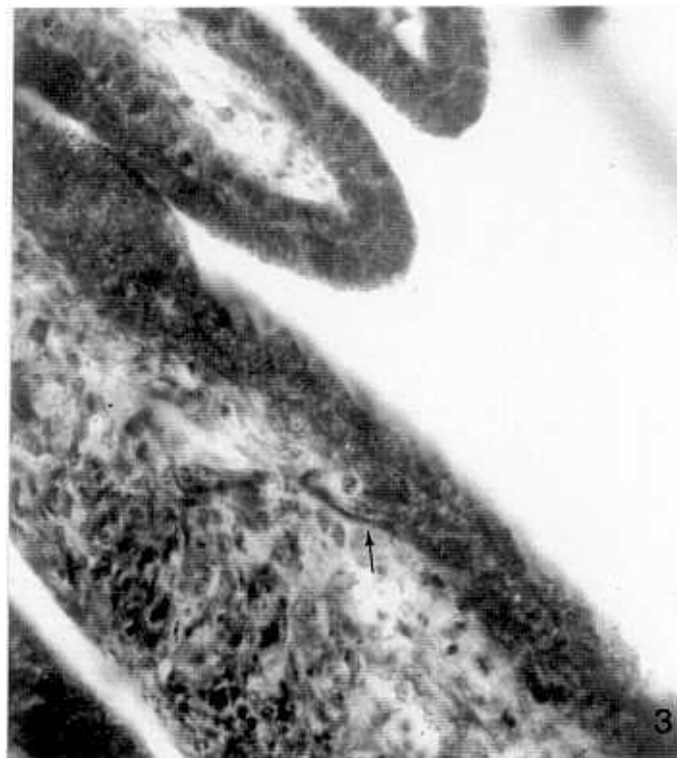
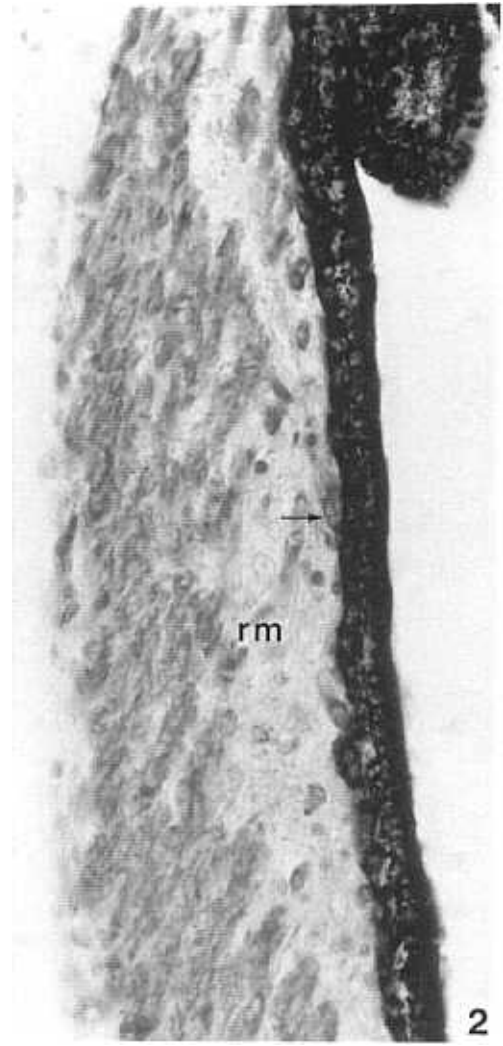
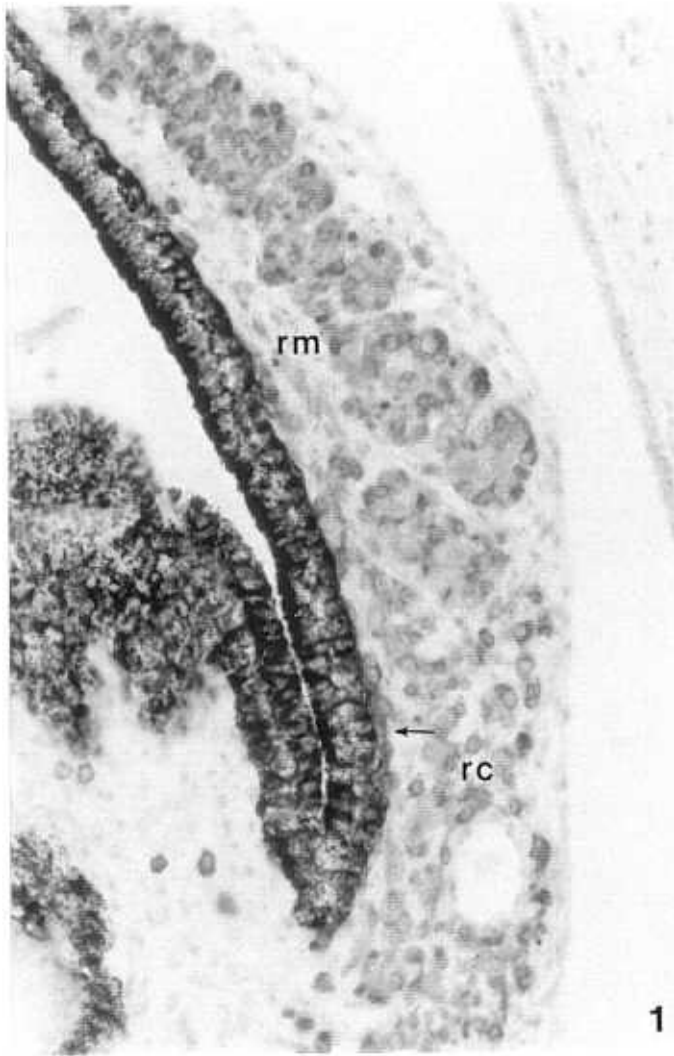


LAMINA 21.

Foto 1. — Corte transversal ojo izquierdo, segmento nasal del iris (E 40 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos fusionados (flecha). rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris. 40x.

Foto 2. — Corte sagital del ojo derecho, segmento superior del iris (E 40 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos fusionados (flecha). rm: región media del iris. 40x.

Foto 3 Corte sagital ojo derecho, segmento superior del iris (E 40 HH). Hematoxilina de Mallory. Estriaciones en las fibras del dilatador pupilar (flecha). 40x.



ESTADIOS 41 Y 42 HH

El músculo ciliar está integrado por tres porciones: rostral, occipital e interna. Esta última cuenta con un menor número de células musculares (Lámina 22. foto 1).

En la región media del iris el epitelio interno sigue generando brotes de células pigmentadas hacia el esfínter. El borde pupilar está ahora también muy pigmentado en el tramo superior. En los distintos segmentos del ojo parece que el borde pupilar emite células pigmentadas hacia el estroma de la región pupilar del iris (Lámina 22: foto 2).

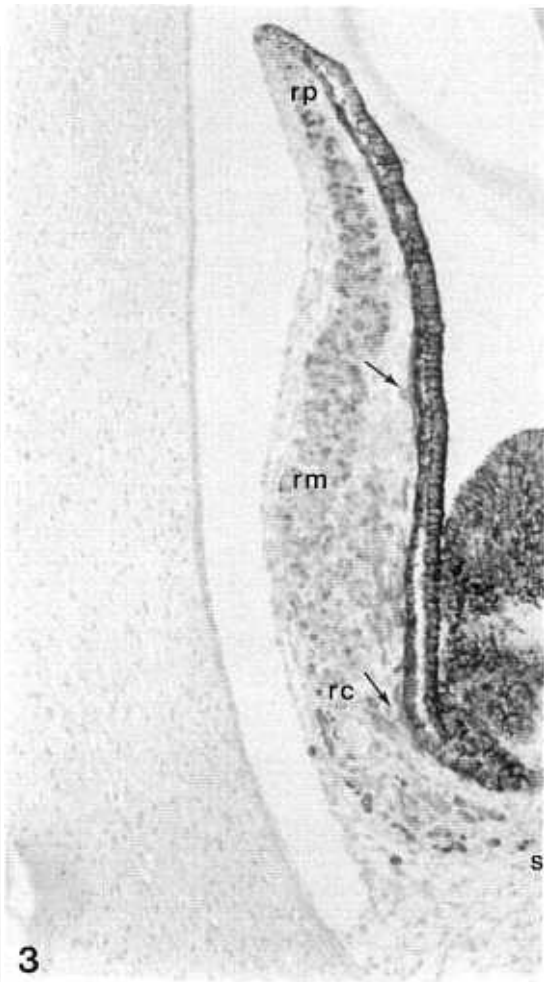
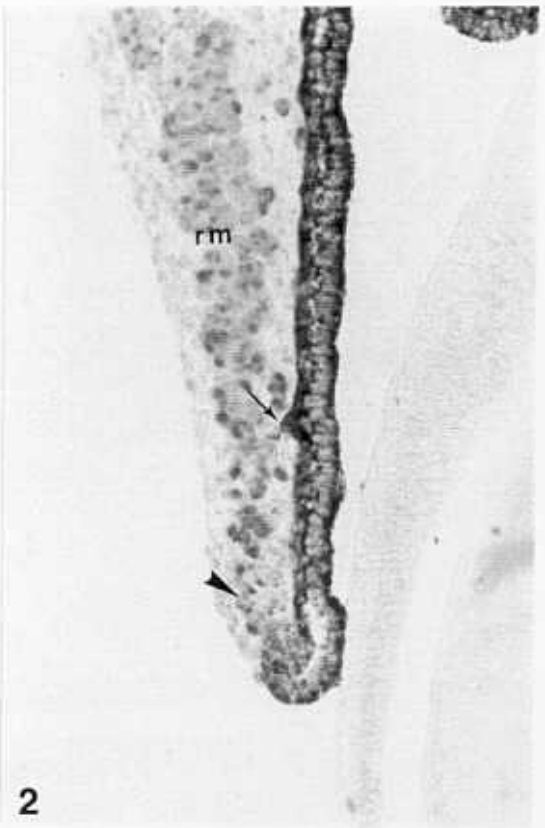
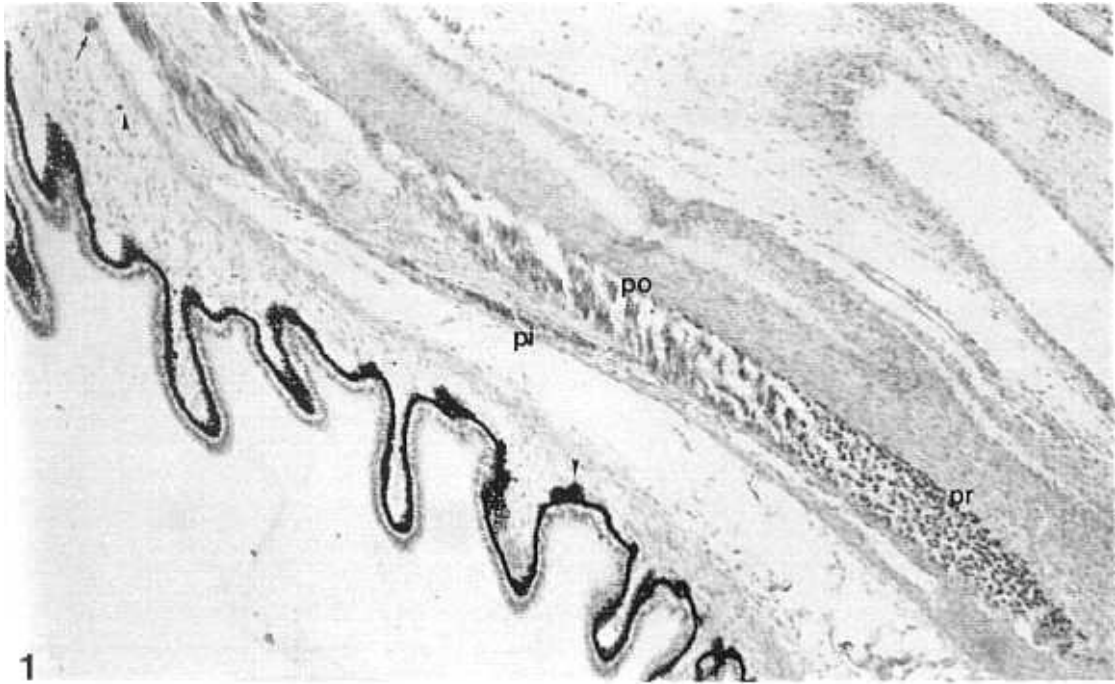
El músculo dilatador cubre casi la totalidad del epitelio externo. Puede apreciarse las fibras del dilatador en las regiones ciliar y media. La zona más rostral del epitelio queda exenta de estas células (Lámina 22: foto 3).

LAMINA 22 .

Foto 1 . — Corte sagital ojo izquierdo, segmento superior del músculo ciliar (E 42 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos (flecha). Brotes de células pigmentadas (puntas de flecha). **pi**: porción interna del músculo ciliar; **po**: porción occipital del músculo ciliar; **pr**: porción rostral del músculo ciliar. 10x.

Foto 2 . — Corte transversal ojo derecho, segmento temporal del iris (E 41 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Brote del epitelio externo en la región media del iris (flecha). Pigmento en el estroma de la región pupilar del iris (punta de flecha). **rm**: región media del iris. 20x.

Foto 3 . — Corte transversal ojo derecho, segmento nasal del iris (E 41 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos del dilatador fusionados (flechas). **rc**: región ciliar del iris; **rm**: región media del iris; **rp**: región pupilar del iris. 20x.



ESTADIOS 43 AL 45 HH

El músculo ciliar no ha sufrido modificaciones importantes. Sigue integrado por las tres porciones anteriormente descritas. En el tejido conjuntivo subyacente al músculo se observan algunos mioblastos y brotes de células pigmentadas (Lámina 23: foto 1).

Los dos epitelios del iris están fuertemente pigmentados así como el reborde pupilar (Lámina 23: fotos 2, 3 y 4).

En la región pupilar, el esfínter y el estroma contienen melanina (Lámina 23. fotos 2, 3 y 4). En la región media del iris continúa detectándose la existencia de brotes pigmentados procedentes del epitelio externo (Lámina 23. fotos 2 y 4).

Puede apreciarse que la región pupilar del esfínter está formada por células musculares lisas; el resto del músculo está constituido por fibras musculares estriadas (Lámina 24).

Al final del desarrollo embrionario (estadio 45 HH) se observa que las fibras del dilatador a pesar de haber avanzado rostralmente no alcanzan la región pupilar del iris (Lámina 23: foto 4).

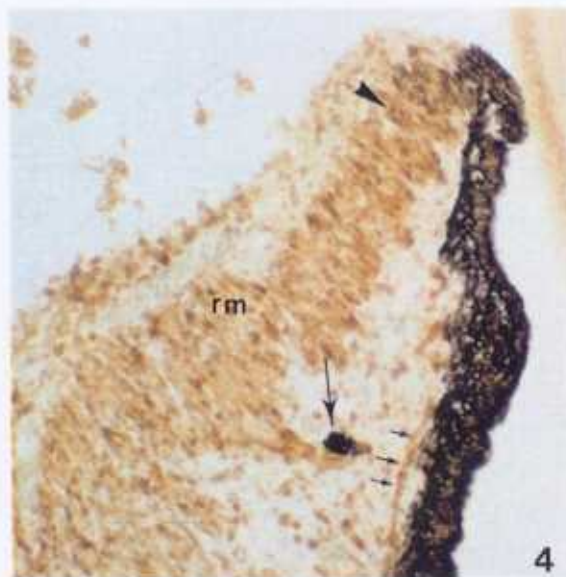
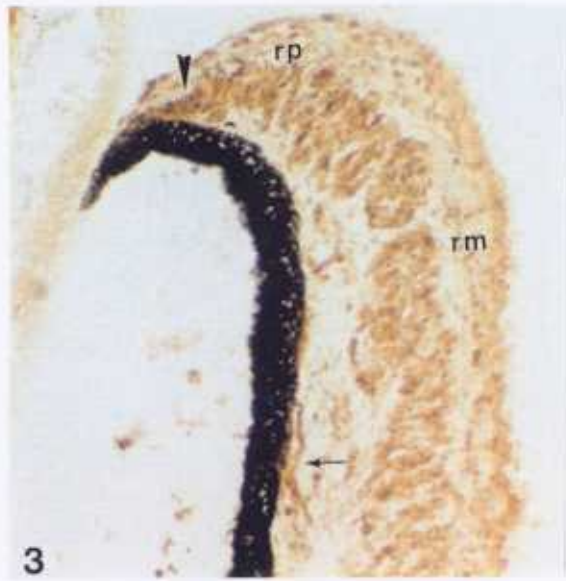
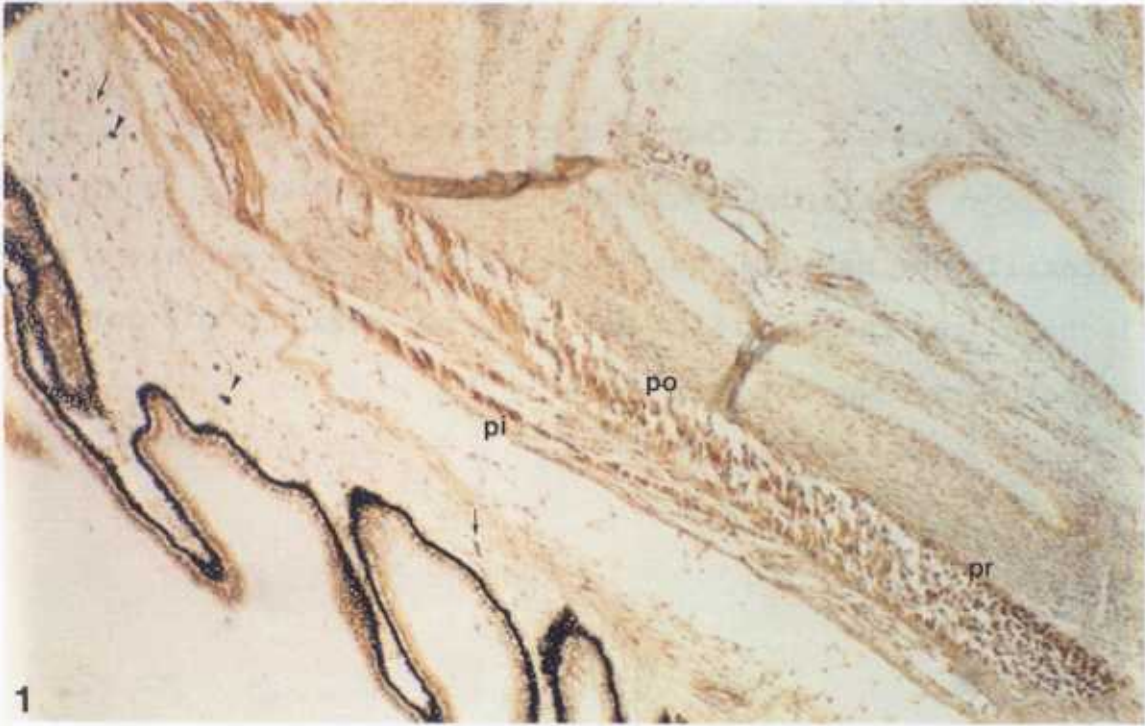
LAMINA 23.

Foto 1. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento superior del músculo ciliar (E 45 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos (flechas). Brotes de células pigmentadas (puntas de flecha). **pi**: porción interna del músculo ciliar; **po**: porción occipital del músculo ciliar; **pr**: porción rostral del músculo ciliar. 10x.

Foto 2. — Corte transversal ojo izquierdo, segmento temporal del iris (E 43 HH). marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Pigmento en la región media del esfínter pupilar (flecha). Pigmento en la región pupilar del iris (punta de flecha). **rm**: región media del iris. 20x.

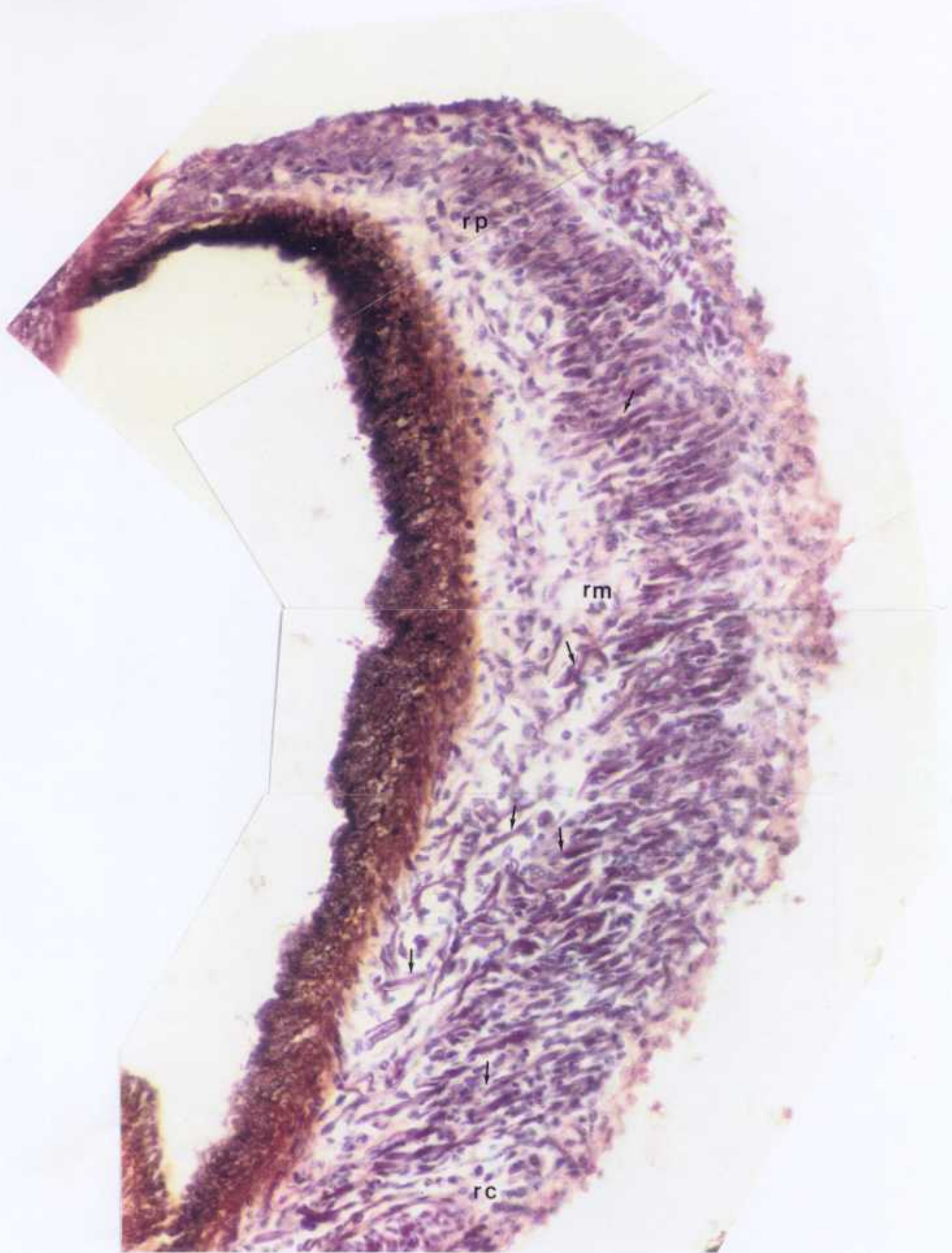
Foto 3. — Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 44 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos del dilatador fusionados (flecha). Pigmento en la región pupilar del iris (punta de flecha). **rm**: región media del iris; **rp**: región pupilar del iris. 20x.

Foto 4. — Corte sagital ojo derecho, segmento inferior del iris (E 45 HH). Marcaje con inmunoperoxidasa para el 13F4. Mioblastos del dilatador fusionados (flechas pequeñas). Pigmento en la región media del esfínter pupilar (punta de flecha). Pigmento en la región pupilar del iris (flecha grande). **rm**: región media del iris. 20x.



LAMINA 24.

Composición fotográfica.— Corte sagital ojo izquierdo, segmento inferior del iris (E 44 HH). Hematoxilina de Mallory. Estriaciones en las fibras del esfínter (flechas). rc: región ciliar del iris; rm: región media del iris; rp: región pupilar del iris. 40x.



DISCUSSION

I . ASIMETRIA EN EL DESARROLLO

Al estudiar la morfogénesis de la musculatura intrínseca ocular, hemos observado algunos hechos concernientes al desarrollo del cuerpo ciliar y del iris. Antes, nos ocuparemos de una cuestión que podría ser meramente terminológica pero que en los últimos años, con el fin de esclarecerla, ha creado disparidad de criterios.

Son muchos los autores que asimilan el crecimiento de la copa óptica con la formación del iris (LEPLAT, 1912; LINDAHL, 1915; ROMANOFF, 1960; BRINI y col., 1965; FERRARI y KOCH, 1984a y 1984b). Otros consideran que se trata del cuerpo ciliar (COULOMBRE y COULOMBRE, 1957; BEEBE, 1986; REICHMAN y BEEBE, 1990).

STROEVA (1963), CLAVERT (1972), BARD y ROSS (1982a y 1982b), proponen que el crecimiento de la copa óptica constituye el esbozo común cuerpo ciliar-iris.

Nosotros hemos observado (Lámina 5: fotos 1, 3 y 4; Lámina 6: foto 2), al igual que BARD y ROSS (1982a) y en contra de la opinión de COULOMBRE y COULOMBRE (1957) que al formarse los procesos ciliares queda una zona más rostral sin plegarse y correspondería al iris.

Salvo los trabajos de STROEVA (1967) y BARD y ROSS (1982a y 1982b), donde se identifica la segregación de los territorios del cuerpo ciliar y del iris poco antes de la formación de los procesos ciliares, no conocemos ningún otro donde se precisen criterios claros sobre esta segregación.

Así, en un estudio reciente REICHMAN y BEEBE (1990) utilizando inmunohistoquímica para acetilcolinesterasa marcaron

la región más periférica de la copa óptica y aseguran que se trata del presuntivo cuerpo ciliar y no del iris o de la retina anterior, pero lo que no explican es si en estadios posteriores también el iris es positivo.

Por tanto, parece más adecuado considerar un rudimento común cuerpo ciliar-iris.

Con la salvedad de la confusión terminológica existente, el borde de la copa óptica comienza a elongarse entre los días 7 y 8 (LEPLAT, 1912; LINDAHL, 1915; ROMANOFF, 1960), en el día 6 de incubación (BRINI y col., 1965) o en el estadio 30 HH (FERRARI y KOCH, 1984a).

Nuestros resultados muestran que el crecimiento se inicia en el estadio 29 HH (6 - 6½ días de incubación) (Lámina 3: fotos 1 y 2). También BARD y ROSS (1982b) detectaron un considerable aumento de la presuntiva región ciliar entre los estadios 29 al 30 de HH.

La asimetría es una característica constante en el desarrollo del esbozo cuerpo ciliar-iris (FERRARI y KOCH, 1984a), del cuerpo ciliar (COULOMBRE y COULOMBRE, 1957; BARD y ROSS, 1982a y 1982b; REICHMAN y BEEBE, 1990) y del iris (FERRARI y KOCH, 1984a y 1984b).

Los datos que hemos obtenido ratifican la existencia de asimetría en el transcurso del desarrollo del cuerpo ciliar y del iris, así como en el de su esbozo común.

Podría parecer aventurado por nuestra parte intentar interpretar las observaciones referentes a la asimetría, ya que las cabezas de los embriones no fueron orientadas con este fin y los cortes para los globos oculares resultan en cierta medida oblicuos.

DURAND (1893a), a raíz de su estudio sobre el iris insiste en la importancia de la orientación de los cortes para conocer la exacta disposición de las fibras musculares. Creemos que también debe tenerse presente en un estudio sobre la asimetría; pero no fue planteado como objeto de estudio.

Ahora bien, la elongación del borde de la copa óptica es visible primero en el tramo nasal (Lámina 3: fotos 1 y 3), después en el inferior y en el temporal (Lámina 4: fotos 1, 2 y 3). Parece lógico proponer que el crecimiento comience en la región inferonasal, con ello se elimina el error por oblicuidad de los cortes. Siguiendo con el mismo planteamiento, el desarrollo continúa en el área inferotemporal. Finalmente, el esbozo se forma en la porción superior.

El criterio que hemos utilizado para identificar el territorio correspondiente al iris es la aparición de los procesos ciliares, ya que como antes explicamos, rostral a ellos, la zona que queda sin plegarse corresponde al iris. En este sentido, cuerpo ciliar e iris, como tales territorios, aparecen simultáneamente (Lámina 5: foto 1; Lámina 6: foto 2).

La observación de que los procesos ciliares se forman en este orden: tramo nasal (Lámina 5: foto 1), inferior (Lámina 5: foto 4), temporal (Lámina 6: foto 1) y superior (Lámina 7: foto 1), nos lleva a sugerir que el desarrollo del cuerpo ciliar y del iris sigue una secuencia análoga a la de su primordio. No obstante, carecemos de elementos de juicio para discernir cual de los dos cuadrantes, superotemporal o superonasal es el último en formarse. Esto es, si el crecimiento avanza en un sentido a partir de un punto o en dos direcciones opuestas.

FERRARI y KOCH (1984a) afirmaron que la diferenciación del

iris ocurre como la de su esbozo. Mediante examen macroscópico de ojos disecados consideran que el crecimiento es secuencial alrededor del ojo, comenzando por la región temporal adyacente a la fisura coroidea. (Téngase en cuenta que la fisura coroidea queda en el cuadrante inferonasal).

Para **COULOMBRE y COULOMBRE (1957)** también por medio de un estudio macroscópico determinaron que los procesos se inician en la región anteroinferior (inferonasal) por debajo de la fisura coroidea (entendemos en dirección temporal) y una vez cubierto un cuarto de circunferencia, y continuando esta dirección de avance, se inicia la formación de procesos ciliares en sentido opuesto, por encima (entendemos en dirección nasal) a la fisura coroidea.

Los resultados de **FERRARI y KOCH (1984a)** discrepan profundamente con los obtenidos por **COULOMBRE y COULOMBRE (1957)**.

Aunque nuestros datos pueden parecer en principio más próximos a los de **COULOMBRE y COULOMBRE** (última región formada la superior) es evidente que según la propuesta de **FERRARI y KOCH**, la última zona donde nosotros detectaríamos cambios sigue siendo la superior ya que si bien ellos encuentran que el último tramo formado es el inferonasal, parte de este cuadrante también es el primero que se desarrolló.

Creemos, y ambas teorías lo confirman, que son los segmentos nasal e inferior respecto al temporal y al superior los que muestran más pronto indicios de diferenciación.

REICHMAN y BEEBE (1990) hallaron una mayor intensidad de marcaje en el lado nasal que en el temporal durante los estadios 25 al 30 HH, en lo que denominan esbozo del cuerpo ciliar y estaría de acuerdo con nuestra propuesta.

Sin embargo, **BARD y ROSS (1982a y 1982b)** afirman sin más detalles, que los procesos ciliares se inician en el lado temporal.

La dirección en que se lleva a cabo la formación del esbozo cuerpo ciliar-iris y de los procesos ciliares es un problema sin resolver y resulta curioso que en los estudios referentes a la asimetría nunca exista una discusión con los trabajos precedentes.

Respecto a la asimetría del cuerpo ciliar, **COULOMBRE y COULOMBRE (1957)** estudiaron la relación entre el segmento nasal y temporal del cuerpo ciliar. Aseguran que el cuerpo ciliar deja de ser simétrico a partir del día 8 de incubación. Nosotros no hemos realizado mediciones pero nos parece que en el estadio 33 HH ya existe una clara asimetría entre los segmentos superior e inferior (**Lámina 9: foto 1**) y no resulta tan acusada entre los lados nasal y temporal.

En cuanto al iris **FERRARI y KOCH (1984a)** y **PEIRONE y col. (1990)** manifiestan que el desarrollo del esfínter pupilar (a propósito de la porción estriada) comienza en el cuadrante inferotemporal.

Nuestros datos no pueden confirmarlo puesto que únicamente notamos una ausencia de marcaje en el lado superior durante los estadios 34 y 35 HH. En el estadio 36 HH ya no se aprecia asimetría (**Lámina 12: fotos 1, 2 y 3**). Pensamos que tal vez no nos es posible detectar la asimetría inicial de la musculatura puesto que observamos células musculares diferenciadas y en esta época la asimetría podría haberse atenuado parcialmente. Los anteriores autores se refieren a células musculares presuntivas. Más adelante discutiremos sus resultados sobre la diferenciación del esfínter pupilar.

En nuestros resultados hemos observado otros ejemplos de asimetría tanto en el cuerpo ciliar como en el iris que no han sido descritos:

- Desde el estadio 34 HH tiene lugar la formación de los brotes celulares a partir del epitelio externo del cuerpo ciliar (Lámina 10: foto 3). Este proceso se retrasa en el tramo superior, son prácticamente inexistentes en el estadio 34 HH (Lámina 10: foto 2).

- La condensación mesenquimatosa cuando está constituida, estadio 33 HH, es más patente en el lado inferior que en el superior (Lámina 9: foto 1).

- La presencia de células positivas para el 13F4 en el tramo superior del cuerpo ciliar se detecta en el estadio 33 HH. Con anterioridad (estadio 32 HH) el resto de los segmentos muestran células marcadas (Lámina 7: foto 2). Puede notarse que existe un menor número de células positivas en el tramo superior (Lámina 12: foto 2) respecto al inferior (Lámina 12: foto 3) y en el tramo temporal respecto al nasal (Lámina 15: foto 1). La asimetría, en cuanto al número de células marcadas parece corregirse durante el estadio 37 HH (Lámina 15: foto 2).

- Tanto la estructuración de las fibras del músculo ciliar en dos orientaciones diferentes (Lámina 14: foto 2), como la organización de su porción interna (Lámina 17: foto 5) están ligeramente retrasadas en el tramo superior.

- La pigmentación del epitelio interno del iris no es sincrónica. Los segmentos nasal (Lámina 8: foto 2) e inferior (Lámina 9: foto 2) adquieren gránulos de melanina más pronto que sus segmentos contralaterales. También se aprecia que son los segmentos nasal (Lámina 11: foto 3) e inferior (Lámina 12: foto

3) respecto a los segmentos temporal (Lámina 11: fotos 1 y 2) y superior (Lámina 12: foto 2) los que presentan mayor cantidad de melanina durante el transcurso de la pigmentación. Por tanto, los segmentos del globo ocular que primero se desarrollan son los que antes se pigmentan.

II. MORFOGENESIS DEL CUERPO CILIAR Y DE SU MUSCULATURA

La aparición de los procesos ciliares ocurre según distintos autores durante los días 9 a 10 de incubación (KESSLER, 1877) en el día 8 de incubación (COULOMBRE y COULOMBRE, 1957) o en el estadio 29 HH (BARD y ROSS, 1982a). Nosotros situamos su inicio en el estadio 30 HH (6½ - 7 días de incubación) (Lámina 5: fotos 1 y 3) y observamos que en el estadio 32 HH (Lámina 7: foto 1) han cubierto la circunferencia del cuerpo ciliar y no en el estadio 33 HH como proponen BARD y ROSS (1982a).

En cuanto al desarrollo de la musculatura ciliar en aves tan solo LEPLAT (1912) y LUCCHI y col. (1974) se ocupan de ella.

Ambos estudios describen la formación de una condensación mesenquimatosa en el día 8½ de incubación (LEPLAT, 1912) o en el día 9 de incubación (LUCCHI y col., 1974), que identifican como esbozo del músculo ciliar.

LEPLAT (1912) describe mioblastos en el día 10, pero LUCCHI y col. (1974) no los encuentran hasta el día 11 de incubación.

Según nuestros datos, la condensación mesenquimatosa queda establecida en el estadio 33 HH (7½ - 8 días de incubación) (Lámina 9: foto 1) y en el estadio precedente es visible en el ángulo iridocorneal (Lámina 7: foto 1).

Con el anticuerpo monoclonal 13F4 hemos observado que las primeras células musculares diferenciadas aparecen en el estadio 32 HH (7½ días de incubación) (Lámina 7: foto 2) en el seno de la incipiente condensación mesenquimatosa. Las células positivas para el anticuerpo van siendo más numerosas pero es en el estadio 36 HH (10 días de incubación) cuando se produce un considerable

aumento de células marcadas y comienzan a fusionarse para formar miotubos (Lámina 13: foto 1).

Para LEPLAT (1912) y LUCCHI y col. (1974) los miotubos no están presentes hasta el día 11 de incubación aunque, de acuerdo con ellos, las estriaciones transversales del músculo son distinguibles en esta fecha, estadio 37 HH (Lámina 15: foto 3).

Puede notarse que durante los estadios 36 y 37 HH tienen lugar los cambios más acusados en la morfogénesis de la musculatura ciliar. Hay gran incremento de células diferenciadas, fusión de mioblastos (Lámina 13: foto 1) y organización de las fibras musculares en dos direcciones diferentes (Lámina 14: foto 2).

Durante los estadios 37 a 39 HH puede detectarse la presencia de células marcadas en el tejido conjuntivo subyacente al músculo ciliar pero no integradas en él (Lámina 15: foto 2; Lámina 17: fotos 1 y 5).

En el estadio 40 HH, y coincidiendo con LEPLAT (1912), observamos una tercera porción en el músculo ciliar (Lámina 19: fotos 1 y 2). A partir de este estadio y hasta la eclosión el número de mioblastos no incorporados a la estructura muscular es muy reducido (Lámina 19. foto 3; Lámina 22: foto 1; Lámina 23: foto 1).

Basándonos en este hecho sugerimos que son estas células las que en el estadio 40 HH forman la porción más interna del músculo ciliar.

Tanto LEWIS (1903) como LEPLAT (1912) indican que el epitelio externo de la retina ciliar produce brotes celulares pigmentados a partir del día 9½ de incubación. Estos brotes, para LEPLAT, cesan en el día 13 aunque LEWIS los continúa visualizando

hasta el final de su estudio, día 14 de incubación. Este último autor también detecta de forma ocasional brotes procedentes de los procesos ciliares al final del día 7 de incubación.

Hemos encontrado que los brotes en los procesos ciliares y en el orbículo ciliar han roto la lámina basal en el estadio 34 HH (8 días de incubación) (Lámina 10: foto 3) y los continuamos observando en el estadio 45 HH (Lámina 23: foto 1).

LEPLAT (1912) afirma que estos brotes se transforman en células pigmentadas y que no hay mioblastos que contengan melanina.

La técnica inmunohistoquímica para el 13F4 nos ha permitido observar que en el epitelio externo del orbículo ciliar existen células parcialmente despigmentadas y positivas para el 13F4 que aparentemente migran hacia el tejido conjuntivo suprayacente (Lámina 17: fotos 2, 3 y 4). Creemos que estas células podrían formar parte de la porción interna del músculo ciliar ya que las detectamos durante los estadios 38 y 39 HH, momento en el que aumenta el número de mioblastos en el tejido conjuntivo subyacente al músculo (Lámina 17: foto 1) y comienza a organizarse la porción interna (Lámina 17: foto 5).

III. MORFOGENESIS DEL IRIS Y DE SU MUSCULATURA

Ya hemos referido con anterioridad la tendencia por parte de muchos autores a identificar la elongación del extremo rostral de la copa óptica con el iris.

BARD y ROSS (1982a y 1982b) reconocen en el embrión de pollo del estadio 28 HH la segregación del territorio cuerpo ciliar-iris. Según el criterio que nosotros hemos utilizado (formación de los procesos ciliares) el iris como tal territorio aparece en el estadio 30 HH (6½ - 7 días de incubación) (Lámina 5: fotos 1 y 4). Para **COULOMBRE y COULOMBRE (1957)** el iris se origina entre los días 9 a 10 de incubación por el crecimiento del borde libre del cuerpo ciliar.

Se han propuesto dos teorías sobre la dirección de pigmentación del epitelio interno del iris: **EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975)** afirman que progresa desde el borde pupilar hacia el borde ciliar del iris; **GABELLA y CLARKE (1983)**, **FERRARI y KOCH (1984a)** sostienen que avanza en sentido contrario.

Nuestros datos, muestran que ambas teorías son válidas y no excluyentes, es decir, el iris tiende a pigmentarse en las dos direcciones aunque no de forma simultánea; pero la dirección que prevalece es la defendida por **FERRARI y KOCH (1984a)**.

Como puede observarse, el segmento de la copa óptica que primero se elonga, segmento nasal, contiene menos pigmento en el borde pupilar (Lámina 3: foto 2; Lámina 4: foto 4) que aquellos que retrasan su elongación; incluso, el pigmento puede sobrepasar el borde pupilar y localizarse en las células del epitelio interno adyacentes al borde pupilar (Lámina 3: foto 4; Lámina 4.

foto 3). Esto es señal inequívoca de la progresión propuesta por **EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975)**.

Tal y como estableció **COLLIN (1903a y 1903b)** el epitelio interno se divide más rápido que el externo y se incurva sobre él. La continuidad de los epitelios se pierde en el extremo pupilar y quedan perfectamente demarcados.

Pensamos que desde el momento en que se produce la eversión del epitelio interno, la progresión del pigmento hacia la raíz o borde ciliar del iris se detiene. Prueba de ello es que no aumenta la cantidad de gránulos de melanina en el borde pupilar (Lámina 6: fotos 2 y 3; Lámina 8: fotos 1, 2 y 3).

Poco después de interrumpirse el proceso de pigmentación del epitelio interno del iris desde el borde pupilar hacia la raíz, ésta comienza a presentar melanina (Lámina 8: foto 2; Lámina 9: foto 2; Lámina 10: fotos 4 y 5). En estadios posteriores se observa pigmento en la zona media (Lámina 11: foto 3; Lámina 12: foto 3; Lámina 16: foto 2) y finalmente en el borde pupilar (Lámina 20: fotos 1 y 2). En definitiva es el avance propuesto por **GABELLA Y CLARKE (1983)** y **FERRARI y KOCH (1984)**.

Al igual que **GABELLA y CLARKE (1983)** creemos que ambos epitelios están totalmente pigmentados en el estadio 38 HH (12 días de incubación) (Lámina 18: fotos 1 y 2) puesto que en el día 10 de incubación (Lámina 12: fotos 2 y 3), como proponen **EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975)** y **FERRARI y KOCH (1984a)**, no todas las regiones han adquirido melanina. La disparidad de fechas podría ser debida a la zona estudiada, sin tener presente la asimetría que nosotros hemos sugerido.

La denominada lamela epitelial por **GABELLA y CLARKE (1983)** ha sido reconocida por diferentes autores. Difieren en su

procedencia, en el modo de edificarse y en el estadio de su formación.

LEWIS (1903) afirma que proviene del epitelio externo del iris, el cual emite un brote celular de gran tamaño desde la región pupilar para formar una banda continua en el día 10 de incubación. FERRARI y KOCH (1984a) aunque sostienen que se trata de varios brotes celulares, coinciden en señalar este hecho y también YAMASHITA y SOHAL (1986) pero para estos últimos se constituye en el estadio 35 HH (8½ - 9 días de incubación).

COLLIN (1903a y 1903b) sostiene que la lamela tiene su origen, a partir del día 8 de incubación, en la eversión del epitelio posterior. Para LEPLAT (1912) ocurre en el día 7 de incubación, o según LUCCHI y col. (1974) y PEIRONE y col. (1990), en el día 9 de incubación. GABELLA y CLARKE (1983) afirman que el epitelio interno genera primero brotes celulares (día 9 de incubación) para un día después formar la lamela epitelial y alcanzar su máximo desarrollo en el día 11. La lamela deja de ser visible en el día 14 de incubación.

Nuestros resultados indican que es la región evertida del epitelio interno la que en el que en el estadio 32 HH (7½ días de incubación) se introduce en el mesénquima (Lámina 7: fotos 3 y 4) y conforma la lamela tal y como puede observarse en el estadio 35 HH (8½ - 9 días de incubación) (Lámina 11: fotos 1, 2 y 3). La formación de esta estructura no parece que sea debida a la coalescencia de brotes puesto que nunca hemos detectado la pérdida de conexión con su epitelio matriz. Creemos que no sólo un buen procesamiento sino también una dirección de corte afortunada revela su verdadera estructura y su procedencia.

Hemos podido observar gránulos de pigmento en la lamela

(Lámina 11: foto 1). Únicamente LEPLAT (1912) y YAMASHITA y SOHAL (1986) lo admiten.

Para LEPLAT (1912) la existencia de melanina sería justificable porque el epitelio interno al evertirse podría arrastrar alguna célula del epitelio externo.

Desde nuestra perspectiva, la melanina presente en la lamela, es un reflejo del desplazamiento celular experimentado por la región evertida para construir dicha lamela. Como puede apreciarse, el pigmento presente en el borde pupilar y en el epitelio interno adyacente al borde pupilar (Lámina 3: foto 4; Lámina 4: foto 3), en estadios más avanzados deja de ser visible en estas zonas y se detecta en las células de la región evertida que se están introduciendo en el estroma del iris (Lámina 7: foto 4; Lámina 8: foto 1). Más tarde, el pigmento se localiza en regiones de la lamela relativamente distales al borde pupilar (Lámina 11: foto 1). También puede notarse que la pigmentación de la región evertida es más abundante en aquellos tramos del globo ocular que realizan más tarde su elongación (Lámina 7: foto 4; Lámina 8: foto 1; Lámina 10: foto 6), y como hemos explicado anteriormente, adquieren más cantidad de melanina. Entonces, la melanina puede ser utilizada como un marcador más o menos preciso de las posiciones celulares. Esta precisión depende de si no existen mitosis en la lamela durante su constitución.

COLLIN (1903a y 1903b) explica que la eversión del epitelio interno crece y se introduce en el estroma por división de sus células y las del epitelio posterior.

GABELLA y CLARKE (1983) afirman que en la lamela no hay mitosis. Su formación depende de las divisiones del epitelio interno.



Parece más aceptable admitir un empuje desde el epitelio interno (independientemente de si existen o no mitosis en la lamela) que una inserción celular por parte del epitelio externo el cual, aunque emite brotes celulares, queda aparentemente bien delimitado de la región evertida (Lámina 11: fotos 1 y 2).

Los primeros signos de diferenciación muscular aparecen en el estadio 34 HH. Puede distinguirse, en la región pupilar del iris unas células con una intensidad de marcaje tenue (Lámina 10: fotos 5 y 6) frente a otras poco numerosas y fuertemente marcadas localizadas en la mitad periférica del iris (Lámina 10: foto 4). Estas últimas tienen una morfología y un marcaje igual a los mioblastos esqueléticos que muestran RONG y col. (1987 y 1990).

La diferenciación muscular estriada es detectada en estadios posteriores por otros autores. En el estadio 35 HH (NARAYANAN y NARAYANAN, 1981), al final del 36 HH (GABELLA y CLARKE, 1983), en el 37 HH (BRINI y col., 1964; LUCCHI y col., 1974; FERRARI y KOCH, 1984a; YAMASHITA Y SOHAL, 1986). Tan sólo PEIRONE y col. (1990), en el estadio 25 HH encuentran entre la población mesenquimatosa del cuadrante inferotemporal de la copa óptica algunas células que poseen características ultraestructurales semejantes a los mioblastos presuntivos. En esta población mesenquimatosa ciertas células presentan actividad acetilcolinesterasa. A microscopía de luz también identificaron células positivas para la desmina. La actividad acetilcolinesterasa no fue encontrada por LUCCHI y col. (1974) hasta el día 9 de incubación (estadio 35 HH) o hasta el estadio 31 HH por NARAYANAN y NARAYANAN (1981). También REICHMAN y BEEBE (1990) detectaron acetilcolinesterasa en el estadio 25 HH pero localizada en el epitelio ciliar y no en las células del estroma

próximas al epitelio como proponen PEIRONE y col. (1990). Además estos autores no presentan el seguimiento del marcaje con desmina a lo largo del desarrollo; sólo muestran la positividad en el estadio 25 HH. También nos resulta extraño que futuras células musculares sean positivas para la desmina no antes, sino mucho antes de encontrar el epítotope del 13F4. El músculo cardíaco y el miotomo se marcan con este último anticuerpo en estadios muy precoces (RONG y col., 1987 y 1990) y la positividad para la desmina aparece un poco después (RONG y col., comunicación personal).

No tenemos ningún indicio para pensar que en la musculatura intrínseca ocular sea distinto. Aún más, la segregación de los territorios cuerpo ciliar e iris en el estadio 25 HH no ha tenido lugar (BARD y ROSS, 1982a y 1982b) ni siquiera la copa óptica se ha elongado. Desconocemos el motivo por el que PEIRONE y col. (1990) suponen que son los mioblastos del iris y no los del cuerpo ciliar, cuando en nuestros resultados es evidente que son los del cuerpo ciliar los primeros que se detectan con el 13F4 (Lámina 7: foto 2).

GABELLA y CLARKE (1983) y YAMASHITA y SOHAL (1986) afirman que la región más distal de la lamela se fragmenta en grupos celulares que muestran características de células musculares lisas en los estadios 36 o 35 HH respectivamente. LUCCHI y col. (1974) y también mediante microscopía electrónica de transmisión sostienen que las células de la lamela se transforman en musculatura estriada. BRINI y col. (1964) y MUSSINI y col. (1976) manifiestan que durante la diferenciación de las células epiteliales a células musculares estriadas se pasa por un estado intermedio de células musculares lisas. Cabe pensar que ante

imágenes semejantes, existen diferentes criterios.

El anticuerpo monoclonal 13F4 marca secuencialmente la diferenciación muscular cardíaca, esquelética y lisa. Durante los estadios iniciales en que se detecta la positividad para el 13F4 en el músculo liso, el marcaje que exhibe es más tenue que el que manifiesta el músculo estriado en sus fases iniciales (RONG y col., 1987 y 1990).

En el estadio 34 HH la región evertida del epitelio interno del iris, o futura lamela epitelial, es positiva para el 13F4 (Lámina 10: fotos 5 y 6). Su intensidad de marcaje es más débil que la que muestran los mioblastos de la porción periférica del iris (Lámina 10: foto 4) o los del músculo ciliar (Lámina 12: foto 3). Este marcaje diferencial se aprecia hasta el estadio 39 HH (Lámina 13: foto 2; Lámina 14: foto 1; Lámina 16: fotos 1 y 2; Lámina 18: fotos 1 y 3) y queda siempre confinado a la región pupilar. No hemos encontrado ninguna otra zona con este marcaje, esto es, en la que se forme músculo liso.

PEIRONE y col. (1990) afirman que aunque la lamela epitelial contribuye a la formación de la musculatura lisa del esfínter, es el epitelio externo el responsable de la formación de la mayor parte del músculo liso mediante la emisión de brotes entre los estadios 35 a 40 HH.

Muchos investigadores también reconocen que el epitelio externo del iris origina a cierta distancia de la pupila brotes de células pigmentadas, pero discrepan sobre el proceso de diferenciación que sufren estos brotes.

LEWIS (1903) considera que se diferencian en células musculares estriadas si antes de independizarse del epitelio se han despigmentado. Para LEPLAT (1912) las células que se separan

del epitelio entre los días 9 a 12 de incubación dan lugar a mioblastos, las que se desprenden entre los días 14 a 20 de incubación permanecen como células pigmentadas.

GABELLA y CLARKE (1983), FERRARI y KOCH (1984a), YAMASHITA y SOHAL (1986) niegan la participación de estas células en la formación de la musculatura tanto lisa como estriada.

De igual modo hemos encontrado estos brotes entre los estadios 35 a 45 HH (Lámina 11: fotos 1 y 2; Lámina 23: foto 4) y pensamos que existen razones evidentes para apoyar parte de la idea de **LEWIS (1903)**. Las células que emigran poseen pigmento (Lámina 11: foto 2), pero no se detecta acúmulo de estas células en el estroma. Podrían entonces despigmentarse progresivamente. Desde el estadio 36 HH, en la zona media del estroma del iris aparecen células marcadas, algunas de estas células además de ser positivas para el anticuerpo contienen gránulos de pigmento (Lámina 13: foto 2). Por lo tanto según nuestras observaciones el epitelio externo sí que contribuye a la formación de la musculatura, aunque sus células no se hayan despigmentado completamente antes de separarse del epitelio.

EL-HIFNAWI y HINRICHSEN (1975) encontraron en el epitelio externo del iris células total o parcialmente despigmentadas e insinúan (puesto que no aportan pruebas) que estas células participarían en la formación del esfínter pupilar. Nuestros datos muestran que efectivamente, en el epitelio externo existen células positivas para un anticuerpo específico de diferenciación muscular y musculatura adulta (Lámina 13: foto 2; Lámina 16: foto 1).

La intensidad de marcaje de estas células así como el de las células de la región media del esfínter es muy similar a las de

la región ciliar (mioblastos esqueléticos). Estas células son detectadas en el estadio 36 HH (Lámina 13: foto 2) coincidiendo con el incremento de mioblastos esqueléticos y no en el estadio 34 HH donde se observa positividad para la musculatura lisa.

Por otro lado, en el estadio 36 HH en la zona central del iris se han formado miotubos y en estadios más avanzados esta región contiene fibras estriadas (Lámina 24).

Entendemos que son pruebas suficientes para involucrar al epitelio externo en la formación de la musculatura estriada. Por ello discrepamos de GABELLA y CLARKE (1983) y de YAMASHIYA y SOHAL (1986 y 1987) para quienes la musculatura estriada procede en su totalidad de mesénquima. NAKANO y NAKAMURA (1985) afirman que el origen es de cresta neural pero manifiestan que sus resultados no excluyen la posibilidad de que algunas células estriadas se originen del epitelio.

Igualmente nuestra propuesta sobre el destino de los brotes celulares generados por el epitelio externo nos lleva a cuestionar la hipótesis de PEIRONE y col. (1990); para ellos, como ya se ha comentado, los epitelios externo e interno del iris participan en la génesis de la musculatura lisa. Esto además, implicaría un gran número de células musculares lisas. GABELLA y CLARKE (1983) afirman el predominio de la musculatura lisa sobre la estriada hasta el día 14 de incubación (estadio 40 HH). También YAMASHITA y SOHAL (1986) opinan que sólo a partir del estadio 41 HH la musculatura estriada es más abundante que la lisa. GABELLA y CLARKE (1983) manifiestan que no pueden explicar la regresión de las células musculares lisas ya que no observan degeneración muscular.

Apelando al marcaje diferencial que proporciona el

anticuerpo 13F4 entre músculo liso y estriado reiteramos que la musculatura lisa desde el inicio de su desarrollo queda confinada a la región pupilar (Lámina 13: foto 2; Lámina 14: foto 1; Lámina 16: fotos 1 y 2; Lámina 18: fotos 1 y 3), donde las células nunca presentan estrías (Lámina 24). La región media del iris, como hemos visto, no contiene células lisas y tal vez la aparición tardía de la organización sarcomérica (Lámina 20: foto 3; Lámina 24) en esta zona frente a la región ciliar (Lámina 16: foto 4) podría inducir confusión.

PEIRONE y col. (1990) también sugieren que algunas células epiteliales en el transcurso de su evolución hacia células musculares lisas, se fusionan con miotubos dando lugar a elementos celulares compartimentalizados y situados en la región próxima a la pupila. Tal proceso no solamente no fue observado por GABELLA y CLARKE (1983) sino que niegan que pueda ocurrir.

Nosotros no podemos opinar puesto que hemos utilizado únicamente microscopía de luz, pero en la zona pupilar del iris no hemos detectado estriaciones transversales (Lámina 24). Ello no indica que en la zona de transición lisa-estriada tales estructuras compartimentalizadas puedan detectarse a microscopía electrónica.

SCAPOLO y col. (1988) realizaron un estudio histoquímico, inmunohistoquímico y ultraestructural de las fibras del esfínter pupilar en pollos adultos. Encontraron tres zonas: pupilar, intermedia y ciliar. Cada una de ellas posee determinadas características particulares y distintivas.

Como hemos descrito, durante la morfogénesis de este músculo existen tres zonas claramente diferentes, con orígenes distintos. La zona pupilar (músculo liso) proviene del epitelio interno del

iris; las zonas media y ciliar del esfínter, ambas musculatura estriada, proceden respectivamente del epitelio externo del iris y de células mesenquimatosas (Lámina 13: foto 2).

Resulta interesante que más tarde la región media contenga mioblastos como los de la zona ciliar, alguno de los cuales puede localizarse en el tramo pupilar cuyo extremo más occipital está en continuidad con la porción media (Lámina 16: foto 1).

Las observaciones de SCAPOLO y col. (1988) están en conformidad con lo que acabamos de exponer. Encontraron que en la región intermedia además de poseer fibras exclusivas contenía algunas de las que caracterizan a la región ciliar. El tramo pupilar, formado por músculo liso cuenta además con dos tipos de fibras estriadas. Esto no contradice nuestros resultados puesto que reconocen un músculo liso bien desarrollado y las fibras estriadas de esta región podrían corresponder a la zona de transición pupilar-intermedia, donde también detectamos mioblastos semejantes a los de la región ciliar.

Otro punto de discusión es la presencia o ausencia de pigmento en la musculatura lisa y estriada.

De acuerdo con YAMASHITA Y SOHAL (1986), hemos observado algunos gránulos de pigmento en el músculo liso (Lámina 10: foto 6). GABELLA y CLARKE (1983) únicamente los encuentran a partir del día 14 de incubación. Para ellos, en esta fecha ya no es visible la lamela y en su lugar aparece gran cantidad de pigmento. Nuestras observaciones ratifican la aparición de melanina en esta zona del iris a la vez que el borde pupilar se va pigmentando intensamente (Lámina 20: foto 2).

Pensamos que al igual que se pigmenta el borde pupilar, las células que estuvieron vinculadas a él, y ahora se encuentran

inmersas en el estroma como músculo liso, conservan la capacidad para sintetizar melanina. Además, el borde pupilar puede emitir brotes celulares, como lo hace el epitelio externo, pero con la particularidad de que a diferencia de lo que ocurre en la región media del iris, en la zona pupilar sí parece existir un acúmulo de células pigmentadas sin evolucionar hacia células musculares y podrían representar un refuerzo de la pigmentación del borde pupilar (Lámina 22: foto 2; Lámina 23: foto 2).

Respecto a la musculatura estriada, **MUSSINI y col. (1976)** admiten que los miotubos contienen gránulos de melanina. **YAMASHITA y SOHAL (1986)** los detectaron de forma ocasional en el músculo.

Como ya hemos mencionado, la presencia de mioblastos con pigmento es habitual en la región media del esfínter pupilar. **LAI (1972a y 1972b)** describe en el esfínter y en el dilatador de la rata que la pérdida de pigmentación va asociada con un incremento de miofilamentos.

A diferencia de **LEPLAT (1912)**, quien considera que a partir del día 14 de incubación las células que se desprenden del epitelio externo del iris no evolucionan hacia células musculares, nosotros creemos que también las células que se desprenden en estadios avanzados de la región media del iris se diferencian en células musculares y se integran en la estructura del esfínter, puesto que no hay acúmulo de pigmento y éste sí se detecta transitoriamente en la musculatura (Lámina 20: foto 2; Lámina 22: foto 2; Lámina 23: fotos 2 y 4).

FERRARI y KOCH (1984a) utilizando un anticuerpo contra miosina detectan las primeras células musculares diferenciadas en la raíz o borde ciliar del iris. La positividad para este

anticuerpo progresa hacia la región pupilar. Describen la presencia de estriaciones transversales en las fibras musculares de la raíz en el día 11 de incubación.

Basándonos en la alta especificidad del 13F4 discrepamos con la progresión propuesta por estos autores aunque corroboramos que las estriaciones están presentes en la raíz del iris en el estadio 37 HH (Lámina 16: foto 4). Suponemos, puesto que no lo mencionan, que las estriaciones cursan hacia la pupila. Nosotros sí describimos esta progresión (Lámina 20: foto 3; Lámina 24) y pensamos que podría estar bajo la influencia nerviosa.

GONZALEZ-SANTANDER (1990) afirma que la síntesis de los denominados "filamentos iniciales" en el miotomo es independiente de la inervación.

RONG y col. (1990 y 1992) precisan que la musculatura esquelética de los miembros en fase posteriores de su desarrollo es neurodependiente.

En opinión de SOHAL y HOLT (1980) el músculo esquelético de las aves es capaz de un desarrollo limitado en ausencia de inervación. No obstante los factores tróficos del nervio y la actividad muscular son esenciales para la ejecución del programa de desarrollo. Al denervar el oblicuo superior de embriones de pato observaron desorganización y desaparición de las bandas Z.

El crecimiento axonal en el iris, descrito detalladamente por KIRBY y col. (1978) en el caso del dilatador, progresa desde la raíz o región ciliar.

Las uniones neuromusculares en el iris de pollo comienzan en diferentes fechas según los autores, y como asegura PILAR y col. (1981) no son sincrónicas.

La formación de estriás transversales (organización

sarcomérica) podría ser un evento de maduración muscular estriada que progresa en el mismo sentido que los nervios han ido invadiendo el territorio muscular y ejerciendo su efecto trófico.

En cuanto a la morfogénesis del dilatador DURAND (1893a y 1893b) estableció que está integrado por fibras dispuestas en dos direcciones, las cuales se forman en diferentes estadios del desarrollo. Los demás autores que han estudiado el dilatador (BRINI y col., 1964; GABELLA y CLARKE, 1983; FERRARI y KOCH, 1984a), no hacen referencia a que existan dos paquetes musculares distintos. Nosotros tampoco hemos podido distinguirlos.

GABELLA y CLARKE (1983), FERRARI y KOCH (1984a), proponen con fechas diferentes, que el desarrollo del dilatador comienza en el borde ciliar del iris en los días 15 o 13 de incubación respectivamente. Después, el dilatador se localiza en la mitad periférica del iris, días 17 y 15 respectivamente, y finalmente se forma en la región pupilar, días 21 y 1 día posteclosión según estos autores.

En el estadio 37 HH (11 días de incubación) hemos observado que en la región media del epitelio externo, muy cerca de la región ciliar alguna célula muestra el epítipo del 13F4 (Lámina 16: foto 3). Creemos que esta positividad corresponde a las primeras células diferenciadas del dilatador pupilar dado que en el estadio 38 HH (12 días de incubación) hay un elevado número de células positivas para el 13F4 en todo el epitelio externo del iris, salvo en la región próxima a la pupila, y puede notarse que en la mitad periférica del iris hay miotubos (Lámina 18: foto 2). En el estadio 40 HH (14 días de incubación) la presencia de miotubos es habitual en la región media (Lámina 21: foto 2), y al final del desarrollo embrionario los miotubos se observan

próximos a la región pupilar (Lámina 23: fotos 3 y 4).

Posiblemente GABELLA y CLARKE (1983) y FERRARI y KOCH (1984a) se hayan referido a la formación de miotubos o de fibras del dilatador, y no al inicio de la morfogénesis puesto que con el 13F4, se pone de manifiesto la presencia de las primeras células diferenciadas en el estadio 37 HH. La aparición de estas células no se ajusta al avance que estos autores proponen, ya que en el estadio 38 HH las células positivas se encuentran por todo el epitelio.

La secuencia que GABELLA y CLARKE (1983) y FERRARI y KOCH (1984a) defienden es válida sólo para las fases posteriores del desarrollo (fusión de mioblastos) aunque discrepamos en las fechas, para nosotros serían los estadios 38 HH (12 días de incubación) (Lámina 18: foto 2), 40 HH (14 días de incubación) (Lámina 21: foto 2) y 45 HH (19 días de incubación) (Lámina 23: foto 4).

La formación de los miotubos, o de las fibras musculares, podría ser neurodependiente ya que KIRBY y col. (1978) encontraron que los nervios progresan desde la región ciliar hacia la pupila.

Finalmente y de acuerdo con GABELLA y CLARKE (1983) creemos que el dilatador es un mioepitelio; no hemos hallado fibras musculares desligadas del epitelio (Lámina 18: foto 2; Lámina 21: fotos 1, 2 y 3; Lámina 22: foto 3; Lámina 23: fotos 3 y 4).

CONCLUSIONES

1 . — El anticuerpo monoclonal 13F4 permite detectar los mioblastos de la musculatura intrínseca ocular en fases muy tempranas de su morfogénesis. Los mioblastos del músculo ciliar son visibles en el estadio 32 HH, los del esfínter pupilar en el estadio 34 HH y los del dilatador pupilar en el estadio 37 HH.

2 . — El origen del músculo ciliar no es exclusivamente mesenquimatoso, también deriva de células epiteliales. Durante los estadios 38 y 39 HH el epitelio externo del cuerpo ciliar, y fundamentalmente el epitelio de la región del orbículo ciliar toma parte en la formación de la porción interna del músculo ciliar.

3 . — La organización del músculo ciliar en sus tres porciones, se lleva a cabo en dos fases. Primero se forman las porciones rostral y occipital (final del estadio 36 HH), después, la porción interna del músculo (estadios 38 y 39 HH).

4 . — La diferenciación de los mioblastos y la organización del músculo ciliar no es sincrónica ni simétrica.

5 . — La teoría de LEWIS (1903) que involucraba al epitelio externo del iris en la morfogénesis del esfínter pupilar y que no es admitida en la actualidad, es parcialmente cierta. Nuestras observaciones demuestran que es la porción media del epitelio la que emite los brotes celulares durante los estadios 35 a 45 HH y que todos los brotes generan musculatura estriada.

6 . — Las tres regiones del esfínter pupilar descritas en el adulto, pueden ser consecuencia de las tres regiones detectadas en el estadio 36 HH y que corresponderían a un triple origen del músculo.

7 . — El inicio de la diferenciación de las células del músculo dilatador a partir del epitelio externo es sincrónico.

8 . — En el proceso de pigmentación del epitelio interno del iris prevalece la teoría que asegura que transcurre desde el borde ciliar hacia el borde pupilar. La otra teoría existente, según la cual la pigmentación ocurre en sentido contrario, también es válida, aunque no simultánea y queda anulada cuando el epitelio interno se incurva sobre el epitelio externo.

9 . — La pigmentación del epitelio externo del iris no es sincrónica alrededor de su circunferencia. Las primeras células que adquieren melanina son las de los segmentos nasal e inferior. En estos segmentos, el contenido de melanina es más acusado en los segmentos contralaterales durante los estadios en que se efectúa la pigmentación.

10 . — El motivo por el cual la lamela epitelial (o el músculo liso) contiene pigmento puede ser explicado por el crecimiento del epitelio interno del iris más que por el desplazamiento de células desde el epitelio externo al evertirse el epitelio interno.

BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, L.E.:

"An experimental study of the role of optic cup and overlying ectoderm in lens formation in the chick embryo".

J. Exp. Zool. 75: 41-68 (1937).

ALOISI, M., y MUSSINI, I.:

"Nerve dependent differentiation: the case of avian iris muscle".

En: *Multidisciplinary Approach to brain development*, editado por C. Di Benedetta, R. Balazs, G. Gombos y G. Porcellati. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979

ALLEN, E.R., y PEPE, F.A.:

"Ultrastructure of developing muscle cells in the chick embryo".

Am. J. Anat. 116: 115-148 (1965).

AMPRINO, R.:

"Corrélation entre les organes pendant le développement. Recherches expérimentales sur l'oeil et ses annexes".

Compt. Rend. Anat. 36: 3-11 (1949).

ANDERSON, C.B., y MEIER, S.:

"The influence of the metameric pattern in the mesoderm on migration of cranial neural crest cells in the chick embryo".

Dev. Biol. 85: 385-402 (1981).

ANTIN, P.B.; FORRY-SCHAUDIES, S.; FRIEDMAN, T.M.; TAPSCOTT, S., y HOLTZER, H.:

"Taxol induces postmitotic myoblasts to assemble interdigitating microtubule-myosin arrays that exclude actin filaments".

J. Cell Biol. 90: 300-308 (1981).

ARMSTRONG, P.B., y BELL, A.L.:

"Pupillary responses in the toad as related to innervation of the iris".

Am. J. Physiol. 214: 566-753 (1968)

ASHTON, F.T.; SOMLYO, A.V., y SOMLYO, A.P.:

"The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereo electron microscopy".

J. Mol. Biol. 98: 17-29 (1975).

BAGBY, R.M.:

"Double-immunofluorescent staining of isolated smooth muscle cells".

Histochemistry 69: 113-130 (1980).

BAHLER, M.; MOSER, H.M.; EPPENBERGER, y WALLIMANN, T.:
"Heart C-protein is transiently expressed during skeletal muscle development in the embryo, but persists in cultured myogenic cells".
Dev. Biol. 112: 345-352 (1985).

BALAZS, E.A.; TOTH, L.Z.J.; JUTHEDEN, G.M., y COLLINS, B.-A.:
"Cytological and biochemical studies on the developing chicken vitreous".
Exp. Eye Res. 4: 237-248 (1965).

BARALD, K.F.:
"Monoclonal antibodies made to chick mesencephalic neural crest cells and to ciliary ganglion neurons identify a common antigen on the neurons and a neural crest subpopulation".
J. Neurosci. Res. 21: 107-118 (1988).

BARD, J.B., y HAY, E.D.:
"The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movements in situ and in vitro".
J. Cell Biol. 67: 400-418 (1975)

BARD, J.B., y ROSS, A.S.:
"The morphogenesis of the ciliary body of the avian eye I. Lateral cell detachment facilitates epithelial folding".
Develop. Biol. 92: 73-86 (1982a).

BARD, J.B., y ROSS, A.S.:
"The morphogenesis of the ciliary body of the avian eye II. Differential enlargement causes an epithelium to form radial folds".
Dev. Biol. 92: 87-96 (1982b).

BEEBE, D.C.:
"Development of the ciliary body: a brief review".
Trans. Ophthalmol. Soc. U.K. 105: 123-130 (1986).

BEEBE, D.C.; FEAGANS, D.E., y JEBENS, H.A.:
"Leutropin: a factor in vitreous humor wich promotes lens fiber cell differentiation".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 490-493 (1980)

BEEBE, D.C.; LATKER, C.H.; JOHNSON, M.C., y JEBENS, H.A.H.:
"Evidence for an active fluid transport system during early ocular development in chicken".
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24 (Suppl), 153 (1983).

BEEBE, D.C.; SILVER, M.H.; BELCHER, K.S.; VAN WYK, J.J.; SROBODA, M.E., y ZELENKA, P.S.:

"Leutropin, a protein that controls lens fiber formation, is related functionally and immunologically to the insuline-like growth factors".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2327-2330 (1987)

BENNETT, T., y COBB, J.L.S.:

"Studies on the avian gizzard: the development of the gizzard and its innervation".

Z. Zellforsch 98: 599-621 (1969).

BIGNAMI, A., y DAHL, D.:

"Early appearance of desmin, the muscle-type intermediate filament protein, in the rat embryo".

J. Histochem. Cytochem. 32: 473-476 (1984).

BISCHOFF, R.:

"Myoblast fusion".

Cell surf. Rev. 5: 127-179 (1978).

BOIS, R.M.:

"The organization of the contractile apparatus of vertebrate smooth muscle".

Anat. Rec. 177: 61-78 (1973).

BOND, M., y SOMLYO, A.V.:

"Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle".

J. Cell Biol. 95: 403-413 (1982).

BRADY, R.C., y HILFER, S.R.:

"Optic cup formation: a calcium-regulated process".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5587-5591 (1982).

BRAITHWAITE, A.W., y HARRIS, A.J.:

"Neural influences on acetylcholine receptor clusters during embryonic development of skeletal muscle".

Nature 279: 549-551 (1979).

BRINI, A.; PORTE, A., y STOECKEL, M.E.:

"Développement ultrastructural des muscles iriens chez l'embryon de poulet".

Bull. Mem. Soc. Fr. Ophtalmol 77: 488-497 (1964).

BRINI, A.; PORTE, A., y STOECKEL, M.E.:

"Développement des structures bordant la chambre antérieure chez l'embryon de poulet. Étude au microscope électronique".

Bull. Mem. Soc. Fr. Ophtalmol. 78: 263-277 (1965).

BUTLER, J.; COSMOS, E., y BRIERLEY, J.:

"Differentiation of muscle fiber types in aneurogenic brachial muscles of the chick embryo".

J. Exp. Zool. 224: 65-80 (1982).

CAMPBELL, G.R.; CHAMLEY, J.H., y BURNSTOCK, G.:

"Development of smooth muscle cells in tissue culture".

J. Anat. 117: 295-312 (1974).

CARPENTER, F.W.:

"The development of the oculomotor nerve, the ciliary ganglion and the abducent nerve in the chick".

Bull. Museum Comp. Zool. Harvard Coll. 48: 140-243 (1906).

CLAVERT, A.:

"Contribution a l'etude des interactions entre l'ebauche nerveuse de l'oeil et l'ebauche cristallinienne".

Arch. Anat. Hist. Embr. norm. et exp. 55: 75-104 (1972).

COLLIN, R.:

"Recherches sur le développement du muscle sphincter de l'iris".

Bibl. Anat. 12: 183-196 (1903a).

COLLIN, M.R.:

"Premiers stades du développement du muscle sphincter de l'iris chez les oiseaux".

C. R. Soc. Biol. 55: 1055-1056 (1903b).

CONDON, K.; SILBERSTEIN, L.; BLAU, H.M., y THOMPSON, W.J.:

"Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb".

Dev. Biol. 138: 256-274 (1990).

COULOMBRE, A.J.:

"Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick".

Am. J. Anat. 96: 153-189 (1955).

COULOMBRE, A.J.:

"The role of intraocular pressure in the development of the chick eye I. Control of eye size".

J. Exp. Zool. 133: 211-225 (1956).

COULOMBRE, A.J.:

"Cytology of the developing eye".

Int. Rev. Cytol. 11: 161-194 (1961).

COULOMBRE, A.J.:

"The eye".

En: *Organogenesis*, editado por R.L. De Haan y H. Ursprung. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1965a, pág. 219-251.

COULOMBRE, A.J.:

"Experimental embryology of the vertebrate eye".

Invest. Ophthalmol. 4: 411-419 (1965b).

COULOMBRE, A.J., y COULOMBRE, J.L.:

"The role of intraocular pressure in the development of the chick eye: III. Ciliary body".

Am. J. Ophthalmol. 44: 85-92 (1957).

COULOMBRE, A.J.; COULOMBRE, J.L., y MEHTA, H.:

"The skeleton of the eye I. Conjunctival papillae and scleral ossicles".

Dev. Biol. 5: 382-401 (1962).

COULOMBRE, A.J., y COULOMBRE, J.L.:

"Lens development I. Role of the lens in eye growth".

J. Exp. Zool. 156: 39-47 (1964).

COULOMBRE, A.J.; STEINBERG, S.N., y COULOMBRE, J.L.:

"The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. V. Pigmented epithelium".

Invest. Ophthalmol. 2: 83-89 (1963).

COULOMBRE, J.L., y COULOMBRE, A.J.:

"Lens development: fiber elongation and lens orientation".

Science 142: 1489-1490 (1963).

COULOMBRE, J.L., y COULOMBRE, A.J.:

"Regeneration of neural retina from pigmented epithelium in the chick embryo".

Dev. Biol. 12: 79-92 (1965)

COULY, G.F., y LE DOUARIN, N.M.:

"Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon".

Dev. Biol. 110: 422-439 (1985).

COULY, G.F., y LE DOUARIN, N.M.:

"Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities".

Dev. Biol. 120: 198-214 (1987).

COULY, G.F., y LE DOUARIN, N.M.:

"The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo".
Development 103 (Suppl.): 101-113 (1988).

CREAZZO, T.L., y SOHAL, G.S.:

"Neural control of embryonic acetylcholine receptor and skeletal muscle".
Cell Tissue Res. 228: 1-12 (1983).

CROW, M.T., y STOCKDALE, F.E.:

"Myosin expression and specialization among the earliest muscle fibers of the developing avian limb".
Dev. Biol. 113: 238-254 (1986a).

CROW, M.T., y STOCKDALE, F.E.:

"The developmental program of fast myosin heavy chain expression in avian skeletal muscle".
Dev. Biol. 118: 333-342 (1986b).

CUTLER, L.S., y CHAUDHRY, A.P.:

"Intercellular contacts at the epithelial-mesenchymal interface during the prenatal development of the rat submandibular gland".
Dev. Biol. 33: 229-240 (1973).

CHAMLEY, J.H., y CAMPBELL, G.R.:

"Mitosis of contractile smooth muscle cells in tissue culture".
Exp. Cell Res. 84: 105-110 (1974).

CHAMLEY, J.H.; CAMPBELL, G.R., y BURNSTOCK, G.:

"Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cells number and nerve fibers".
J. Embryol. exp. Morphol. 32: 297-323 (1974)

CHEVALLIER, A., y KIENY, M.:

"On the role of the connective tissue in the patterning of the chick limb musculature".
Wilhelm Roux'Arch Entwich Org. 191: 277-280 (1982).

CHI, J.C.; FELLINI, S.A., y HOLTZER, H.:

"Differences among myosins synthesized in non-myogenic cells, presumptive myoblasts, and myoblasts".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 4999-5003 (1975).

CHIAPPINELLI, V.; GIACOBINI, E.; PILAR, G., y UCHIMURA, H.:

"Induction of cholinergic enzymes in chick ciliary ganglion and iris muscle cells during synapse formation".
J. Physiol. 257: 749-766 (1976).

CHIQUET, M.; EPPENBERGER, H.M., y TURNER, D.C.:

"Muscle morphogenesis: evidence for an organization function of exogenous fibronectin".

Dev. Biol. 88: 220-235 (1981).

CHRISTIAN, C.N.; DANIELS, M.D.; SUGIYAMA, H.; VOGEL, Z.; JACQUES, L., y NELSON, P.G.:

"A factor from neurons increases the number of acetylcholinesterase receptor aggregates on cultured muscle cells".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4011-4015 (1978).

DABAGIAN, N.V.; STROEVA, O.G., y SHERESHEVA, E.L.:

"The induction of iris anlage by the crystalline lens in retina regenerates in tadpole of Anura".

Dokl. Acad. Nauk, SSSR 167: 953-955 (1966).

D'AMICO-MARTEL, A., y NODEN, D.M.:

"Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia".

Am. J. Anat. 166: 445-468 (1983).

DARBY, I.; SKALLI, O., y GABBIANI, G.:

" α -smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing".

Lab. Invest. 63: 21-29 (1990).

DELVIN, R.B., y EMERSON, C.P. Jr.:

"Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation".

Cell 13: 599-611 (1978).

DELVIN, R.B., y EMERSON, C.P. Jr.:

"Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation".

Dev. Biol. 69: 202-216 (1979).

DLUGOSZ, A.A.; ANTIN, P.B.; NACHMIAS, V.T., y HOLTZER, H.:

"The relationship between stress fiber-like structures and nascent myofibrils in cultured cardiac myocytes".

J. Cell Biol. 99: 2268-2278 (1984).

DRAGOMIROV, N.:

"Über die Entwicklung von Angenbechern aus transplantierten Stückchen des embryonalen Tapetums".

Roux Arch. Entw. Mech. 126: 636-662 (1932).

DRAGAMIROV, N.:

"Über die Koordination der Teilprozesse in der embryonalen morphogenese des Augenbechers".

Roux Arch. Entw. Mech. 129: 560-581 (1933).

DUKE-ELDER, S.:

"System of ophthalmology. Vol. I. The eye in evolution".

Henry Kimpton, London. 1958.

DURAND, G.:

"Disposition et développement des muscles dans l'iris des oiseaux".

J. Anat. (Paris) 29: 604-636 (1893a).

DURAND, G.:

"Développement des muscles de l'iris chez l'embryon de poulet".

C. R. Soc. Biol. 45: 242-243 (1893b).

EL-HIFNAWI, E.:

"Interaction between mesenchymal cells and the posterior iris epithelium in chicken embryos".

Anat. Embryol. 151: 109-118 (1977).

EL-HIFNAWI, E.:

"Direct contact at the epithelial-mesenchymal interface during the early development of the chicken ciliary epithelium".

Exp. Eye Res. 27: 691-700 (1978).

EL-HIFNAWI, E., y HINRICHSEN, K.:

"Melanogenesis in the pigment epithelium of chicken embryos. I. Topogenesis of pigment in the iris anlage".

Anat. Embryol. 147: 177-187 (1975).

FAY, F.S.; FUJIWARA, K.; RESS, D.D., y FOGARTY, K.E.:

"Distribution of α -actinin in single isolated smooth muscle cells".

J. Cell Biol. 96: 783-795 (1983).

FELDMAN, J.L., y STOCKDALE, F.E.:

"Skeletal muscle satellite cell diversity: satellite cells from fibers of different types in cell culture".

Dev. Biol. 143: 320-334 (1990).

FERRARI, P.A., y KOCH, W.E.:

"Development of the iris in the chicken embryo I. A study of growth and histodifferentiation utilizing immunocytochemistry for muscle differentiation".

J. Embryol. exp. Morph. 81: 153-167 (1984a).

FERRARI, P.A., y KOCH, W.E.:

"Development of the iris in the chicken embryo II. Differentiation of the irideal muscles in vitro".
J. Embryol. exp. Morph. 81: 169-183 (1984b).

FISCHMAN,, D.A.:

"An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle".
J. Cell Biol. 32: 557-575 (1967).

FLUCHER, B.E.:

"Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad".
Dev. Biol. 154: 245-260 (1992).

FLUCHER, B.E.; PHILLIPS, J.L.; POWELL, J.A.;; ANDREWS, S.B., y DANIELS, M.P.:

"Coordinated development of myofibrils, sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro".
Dev. Biol. 150: 266-280 (1992).

FREDETTE, B.J., y LANDMESSER, L.T.:

"A reevaluation of the role of innervation in primary and secondary myogenesis in developing chick muscle".
Dev. Biol. 143: 19-35 (1991).

FRID, M.G.; SHEKHONIN, B.V.; KOTELIANSKY, V.E., y GLUKHOVA, M.A.:

"Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin".
Dev. Biol. 153: 185-193 (1992).

FURST, D.O.; OSBORN, M., y WEBER, K.:

"Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly".
J. Cell Biol. 109: 517-527 (1989a).

FURST, D.O.; NAVE, R.; OSBORN, M., y WEBER, K.:

"Repetitive titin epitopes with a 42 nm spacing coincide in relative position with known. A band striations also identified by major myosin-associated proteins".
J. Cell Sci. 94: 119-125 (1989b).

GABELLA, G.:

"The sphincter pupillae of the guinea-pig. Structure of muscle cells, intercellular relations and density of innervation".
Proc. Roy. Soc. B. 186: 369-386 (1974a).

GABELLA, G.:

"Striated muscle cells in the guinea-pig iris".
Cell Tissue Res. 154: 181-188 (1974b).

GABELLA, G.:

"Development of smooth muscle: ultrastructural study of the chick embryo gizzard".
Anat. Embryol. 180: 213-226 (1989).

GABELLA, G., y CLARKE, E.:

"Embryonic development of the smooth and striated musculatures of the chicken iris".
Cell Tissue Res. 229: 37-59 (1983).

GANS, C., y NORTHCUTT, R.G.:

"Neural crest and the origin of vertebrates: a new head".
Science 220: 268-274 (1983).

GARCIA-PORRERO, J.A.; COLLADO, J.A., y OJEDA, J.L.:

"Cell death during detachment of the lens rudiment from ectoderm in the chick embryo".
Anat. Rec. 193: 791-804 (1979).

GARCIA-PORRERO, J.A.; COLVEE, E., y OJEDA, J.L.:

"Retinal cell death occurs in the absence of retinal disc invagination: experimental evidence in papaverine-treated chicken embryos".
Anat. Rec. 217: 395-401 (1987).

GEBERG, A.:

"Über die nerven der Iris und des Ciliarkorpers bei Vögeln".
Int. Monatschr Anat. Hist. 1: 7-52 (1884).

GENIS-GALVEZ, J.M.:

"Quelques aspects de la différenciation et détermination du cristallin".
Bull. Assoc. Anat. 124: 642-653 (1965).

GENIS-GALVEZ, J.M.:

"Role of the lens in the morphogenesis of the iris and cornea".
Nature 210: 209-210 (1966).

GEORGE-WEINSTEIN, M.; DECKER, C., y HORWITZ, A.:

"Combinations of monoclonal antibodies distinguish mesenchymal, myogenic, and chondrogenic precursors of the developing chick embryo".
Dev. Biol. 125: 34-50 (1988).

GERSTENFELD, L.C.; CRAWFORD, C.R.; BOEDTKER, H., y DOTY, P.:
"Expression of type I and III collagen genes during differentiation of embryonic chicken myoblasts in culture".
Mol. Cell Biol. 4: 1483-1492 (1984).

GIROUD, A.:
"Phénomènes d'induction et leurs perturbations chez les mammifères".
Acta Anat. 30: 297-306 (1957).

GLAUS-MOST, L.:
"Zur Lichtreaktion der isolierten Froschiris".
Rev. suisse Zool 76: 799-848 (1969).

GOLOSOW, N., y GROBSTEIN, C.:
"Epithelio-mesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis".
Dev. Biol. 4: 242-255 (1962).

GONZALEZ-SANTANDER, R.; MARTINEZ-CUADRADO,, G.; MARTINEZ-ALONSO, J., y TOLEDO-LOBO, M.V.:
"First ultrastructural differentiation of myoblasts of chicken embryos: appearance of the initial filaments".
Histol. Histopath. 5: 231-239 (1990).

GRAHAM, M.F.; DRUCKER, D.E.M.; DIEGELMANN, R.F., y ELSON, C.O.:
"Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture".
Gastroenterology 92: 400-405 (1987).

GRAINGER, R.M.; HENRY, J.J., y HENDERSON, R.A.:
"Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction".
Develop. 102: 517-526 (1988).

GRIM, M., y WACHTLER, F.:
"Muscle morphogenesis in the absence of myogenic cells".
Anat. Embryol. 183: 67-70 (1991).

GROBSTEIN, C., y COHEN, J.:
"Collagenase: effect on morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro".
Science 150: 626-628 (1965).

GROVE, B.K.; CERNY, L.; PERRIARD, J.-C., y EPPENBERGER, H.M.:
"Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development".
J. Cell Biol. 101: 1413-1421 (1985).

HALL, B.K.:

"Specificity in the differentiation and morphogenesis of neural crest-derived scleral ossicles and of epithelial scleral papillae in the eye of the embryonic chick".

J. Embryol. exp. Morph. 66: 175-190 (1981).

HAMBURGER, V., y HAMILTON, H.L.:

"A series of normal stages in the development of the chick embryo".

J. Morphol. 88: 49-92 (1951).

HAMMOND, W.S., e YNTEMA, C.L.:

"Origin of ciliary ganglion in the chick".

J. comp. Neurol. 110: 367-389 (1958).

HARDIN, J., y McCLAY, D.R.:

"Target recognition by the archenteron during Sea urchin gastrulation".

Dev. Biol. 142: 86-102 (1990).

HARRIS, A.J.:

"Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscles. I. Neural regulation of muscle fiber numbers".

Phil. Trans. R. Soc. London B 293: 257-277 (1981).

HARTZELL, H.C., y FAMBROUGH, D.M.:

"Acetylcholine receptor production and incorporation into membranes of developing muscle fibers".

Dev. Biol. 30: 153-165 (1973).

HAUSCHKA, S.D.:

"Clonal analysis of vertebrate myogenesis. III. Developmental changes in muscle-colony forming cells of the human fetal limb".

Dev. Biol. 37: 345-368 (1974).

HAUSCHKA, S.D.; LINKHART, T.A.; CLEGG, C., y MERRIL, G.:

"Clonal studies of human and mouse muscle".

En: *Muscle regeneration*, editado por A. Mauro. Raven press, New York, 1979.

HENRY, J.J., y GRAINGER, R.M.:

"Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*".

Dev. Biol. 141: 149-163 (1990).

HERZOG, H.:

"Über die Entwicklung der Binnenmuskulatur des Auges".

Arch. mikr. Anat. 60: 517-586 (1902).

HESS, A.:

"Developmental changes in the structure of the synapse on the myelinated cell bodies of the chicken ciliary ganglion".
J. Cell Biol. 25: 1-19 (1965).

HIBBS, R.C.:

"Electron microscopy of developing cardiac muscle in chick embryos".
Am. J. Anat. 99: 17-52 (1956).

HILFER, S.R.:

"Development of the eye of the chick embryo".
Scand. Electron. Microsc. 3: 1353-1369 (1983),

HILL, C.S.; DURAN, S.; LIN, Z.; WEBER, K., y HOLTZER, H.:

"Titin and myosin, but not desmin, are linked during myofibrillogenesis in postmitotic mononucleated myoblasts".
J. Cell Biol. 103 (6): 2185-2196 (1986).

HIRAI, S.-I., y HIRABAYASHI, T.:

"Developmental change of protein constituents in chicken gizzards".
Dev. Biol. 97: 483-493 (1983).

HIRAI, S.-I., y HIRABAYASHI, T.:

"Development of myofibrils in the gizzard of chicken embryos. Intracellular distribution of structural proteins and development of contractility".
Cell Tissue Res. 243: 487-493 (1986).

HOLTZER, H.:

"Myogenesis".
En: *Cell Differentiation*, editado por Schjeide y De Vellis. Van Nostrand-Reinhold, New York, 1970.

HOLTZER, H.; MARSHALL, J., y FINCK, H.:

"An analysis of myogenesis by the use of fluorescent anti-myosin".
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3: 705-723 (1957).

HUIATT, T.W.; ROBSON, R.M.; ARAKAWA, N., y STROMER, M.H.:

"Desmin from avian smooth muscle".
J. Biol. Chem. 255: 6981-6989 (1980).

HUXLEY, H.:

"The double array of filaments in cross striated muscle".
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3: 631-648 (1957).

IMAIZUMI, M., y KUWABARA, T.:

"Development of the rat iris".

Invest. Ophthalmol. 10: 733-744 (1971).

INESTROSA, N.C.; SILBERSTEIN, L., y HALL, Z.W.:

"Association of the synaptic form of acetylcholinesterase with extracellular matrix in cultured mouse muscle cells".

Cell 29: 71-79 (1982).

ISHII, N., y TAKAHASHI, K.:

"Polarity of myofilaments in molluscan smooth muscle".

Cell Tissue Res. 234: 533-545 (1983).

IZANT, J.G., y LAZARIDES, E.:

"Invariance and heterogeneity in the major structural and regulatory proteins of chick muscle cells revealed by two-dimensional gel electrophoresis".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1450-1454 (1977).

JACOBSON, A.G.:

"The roles of neural and non-neural tissues in lens induction".

J. Exp. Zool. 139: 525-557 (1958).

JACOBSON, A.G.:

"Inductive processes in embryonic development".

Science 152: 25-34 (1966).

JESSELL, T.M.; SIEGEL, R.E., y FISCHBACH, G.D.:

"Induction of acetylcholine receptor on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5397-5401 (1979).

JOHNSTON, M.C.:

"A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo".

Anat. Rec. 156: 143-156 (1966).

JOHNSTON, M.C.; NODEN, D.M.; HAZELTON, R.D.; COULOMBRE, J.L., y COULOMBRE, A.J.:

"Origins of avian ocular and periocular tissues".

Exp. Eye Res. 29: 27-43 (1979).

JONES, P.A.; SCOTT-BURDEN, T., y GEVERS, W.:

"Glycoprotein, elastin, and collagen secretion by rat smooth muscle cells".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 353-357 (1979).

JORGENSEN, A.O.; KALNINS, V.I.; ZUBRZYCKA, E., y McLENNAN, D.H.:
"Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cells cultures".
J. Cell Biol. 74: 287-298 (1977).

KARKINEN-JAASKELAINEN, M.:
"Permissive and directive interactions in lens induction".
J. Embryol. exp. Morph. 44: 167-179 (1978).

KAUFMAN, S.J., y FOSTER, R.F.:
"Replicating myoblast express a muscle specific phenotype".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9606-9610 (1988).

KAUFMAN, S.J.; GEORGE-WEINSTEIN, M., y FOSTER, R.F.:
"In vitro development of precursor cells in the myogenic lineage".
Dev. Biol. 146: 228-238 (1991).

KELLY, A.M., y ZACKS, S.I.:
"The histogenesis of rat intercostal muscle".
J. Cell. Biol. 42: 135-152 (1969).

KESSLER, L.:
"Zur Entwicklung des Auges der Wirbelthiere".
F.C.W. Vogel, Leipzig. 1877.

KIRBY, M.L.; DIAB, I.M., y MATTIO, T.G.:
"Development of adrenergic innervation of the iris and fluorescent ganglion cells in the choroid of the chick eye".
Anat. Rec. 191: 311-320 (1978).

KIRBY, M.L., y GILMORE, S.A.:
"A correlative histofluorescence and light microscopic study of the formation of the sympathetic trunks in chick embryos".
Anat. Rec. 186: 437-450 (1976).

KRUGER, M.; WRIGHT, J., y WANG, K.:
"Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filaments length, nebulin size, and epitope profile".
J. Cell Biol. 115: 97-107 (1991).

LAI, Y.-L.:
"The development of the sphincter muscle in the iris of the albino rat".
Exp. Eye Res. 14: 196-202 (1972a).

LAI, Y.-L.:

"The development of the dilator muscle in the iris of the albino rat".

Exp. Eye Res. 14: 203-207 (1972b).

LAI, Y.-L.:

"Development of the iris innervation in rat".

Invest. Ophthalmol. 15: 960-966 (1976).

LAING, N.G., y LAMB, A.H.:

"The distribution of muscle fibre types in chick embryo wings transplanted to the pelvic region is normal".

J. Embryol. exp. Morph. 78: 67-82 (1983).

LANDMESSER, L., y PILAR, G.:

"The onset and development of transmission in the chick ciliary ganglion".

J. Physiol. 222: 691-713 (1972).

LANDMESSER, L., y PILAR, G.:

"Synapse formation during embryogenesis on ganglion cells lacking a periphery".

J. Physiol. 241: 715-736 (1974).

LAYER, P.G.:

"Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6413-6417 (1983).

LAYER, P.G.; ALBER, R., y SPORNS, O.:

"Quantitative development and molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of the chick brain and retina".

J. Neurochem. 49: 175-182 (1987).

LE DOUARIN, N.:

"A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology".

Dev. Biol. 30: 217-222 (1973).

LE DOUARIN, N.:

"The neural crest, source of mesenchymal cells".

En: *The neural crest*. Cambridge University, Cambridge, 1982.

LE LIEVRE, C.S.:

"Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds".

J. Embryol. exp. Morph. 47: 17-37 (1978).

LENHOSSEK, M. VON:

"Die entwicklung und beieutung der zonula-fasern nach untersuchongen am huhnchen".

Arch. Mik. Anat. Entwick 77: 280-310 (1911).

LEPLAT, G.:

"Recherches sur le développement et la structure de la membrane vasculaire de l'oeil des oiseaux".

Arch. Biol. (Liège) 27: 403-523 (1912).

LEPLAT, G.:

"Les plastosomes des cellules visuelles et leur rôle dans la différenciation des connes et des batonnets".

Anat. Anz. 45: 215-221 (1914).

LEPLAT, G.:

"Sur le devéveloppement de la musculature interne de l'oeil des reptiles".

Bull. Acad. Belge Cl. Sci. 7: 748-752 (1921).

LEVI-MONTALCINI, R., y AMPRINO, R.:

"Recherches expérimentales sur l'origine du ganglion ciliaire dand l'embryon de poulet".

Arch. Biol. Paris 58: 265-288 (1947).

LEWIS, W.H.:

"Wandering pigmented cells arising from the epithelium of the optic cup, with observations on the origin of the m. sphincter pupillae in the chick".

Am. J. Anat. 2: 405-416 (1903).

LEWIS, W.H.:

"Experimental studies on the development of the eye in Amphibia. I. On the origin of the lens in *Rana polustris*".

Am. J. Anat. 3: 505-536 (1904).

LIM, R.W., y HAUSCHKA, S.D.:

"EGF responsiveness and receptor regulation in normal and differentiation defective mouse myoblasts".

Dev. Biol. 97: 48-58 (1984).

LINDAHL, C.:

"Die Entwicklung der vorderen augenkammer".

Anat. Hefte Abt. 52: 195-276 (1915).

LINSER, P.J., y PLUNKETT, J.A.:

"A role for carbonic anhydrase in early eye morphogenesis".

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30: 783-785 (1989).

LOPASHOV, G.V.:

"Developmental mechanism in eye rudiments of vertebrate embryos".
London. Pergamon press. 1960.

LUCCHI, M.L.; BORTOLAMI, R., y CALLEGARI, E.:

"Fine structure of intrinsic eye muscle of birds: development and postnatal changes".
J. Submicr. Cytol. 6: 205-218 (1974).

MALONEY, C., y WAKELY, J.:

"Microfilament patterns in the developing chick eye: their role in invaginations".
Exp. Eye Res. 34: 877-886 (1982a).

MALONEY, C., y WAKELY, J.:

"Analysis of tissue interactions in chick eye morphogenesis using cytochalasin B".
Exp. Eye Res. 35: 77-87 (1982b).

MARCHI, M., y GIACOBINI, E.:

"Development and aging of cholinergic synapses. II. Continuous growth of acetylcholine and choline levels in autonomic ganglia and iris of the chick".
Dev. Neurosci. 3: 39-48 (1980)

MARCHI, M.; GIACOBINI, E., y HRUSCHAK, K.:

"Development and aging of cholinergic synapses. I. Endogenous levels of acetylcholine and choline in developing autonomic ganglia and iris of the chick".
Dev. Neurosci. 2: 201-212 (1979).

MARCHI, M.; HOFFMAN, D.W.; GIACOBINI, E., y FREDRICKSON, T.:

"Development and aging of cholinergic synapses IV. Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities in autonomic ganglia and iris of the chick".
Dev. Neurosci. 3: 235-247 (1980c).

MARCHI, M.; HOFFMAN, D.W.; GIACOBINI, E., y FREDRICKSON, T.:

"Age dependent changes in choline uptake of the iris".
Brain Res. 194: 423-431 (1980b).

MARCHI, M.; HOFFMAN, D.W.; GIACOBINI, E., y VOLLE, R.:

"Development and aging of cholinergic synapses VI. Mechanisms of acetylcholine biosynthesis in the chick iris".
Dev. Neurosci. 4: 442-450 (1981).

MARCHI, M.; HOFFMAN, D.W.; MUSSINI, I., y GIACOBINI, E.:
"Development and aging of cholinergic synapses III. Choline uptake in the developing iris of the chick".
Dev. Neurosci. 3: 185-198 (1980a).

MARUYANA, K.:
"Connectin, an elastic filamentous protein of striated muscle".
Int. Rev. Cytol. 104: 81-114 (1986).

MARWITT, R.; PILAR, G., y WEAKLY, J.N.:
"Characterization of two ganglion cell populations in avian ciliary ganglia".
Brain Res. 25: 317-334 (1971).

MAURO, A.:
"Satellite cell of skeletal muscle fibers".
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 493-495 (1961).

McKEEHAN, M.S.:
"The capacity for lens regeneration in the chick embryo".
Anat. Rec. 141: 227-230 (1961).

McLENNAN, I.S.:
"Neural dependence and independence of myotube production in chicken hindlimb muscles".
Dev. Biol. 98: 287-294 (1983).

MEIER, S.:
"Clinical, structural and biochemical advances in hereditary eye disorders".
Editado por D.L. Daenth. A.R. Liss Inc. Pág. 1-16. New York, 1982.

MEIER, S., y HAY, E.D.:
"Control of corneal differentiation by extracellular materials. Collagen as a promotor and stabilizer of epithelial stroma production".
Dev. Biol. 38: 240-270 (1974).

MILLER, J.B.; CROW, M.T., y STOCKDALE, F.E.:
"Slow and fast myosin heavy chain content defines three types of myotubes in early muscle cell cultures".
J. Cell Biol. 101: 1643-1650 (1985).

MILLER, J.B., y STOCKDALE, F.E.:
"Development regulation of the multiple myogenic cell lineages of the avian embryo".
J. Cell Biol. 103: 2197-2208 (1986a).

MILLER, J.B., y STOCKDALE, F.E.:

"Developmental origins of skeletal muscle fibers: Clonal analysis of myogenic cell lineages based on expression of fast and slow myosin heavy chains".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3860-3864 (1986b)

MILLER, J.B., y STOCKDALE, F.E.:

"Multiple cellular processes regulate expression of slow myosin heavy chain isoforms during avian myogenesis in vitro".

Dev. Biol. 136: 393-404 (1989).

MIZUNO, T.:

"Induction de cristallin in vitro, chez le poulet, en absence de la vésicule optique".

C.R. Acad. Sci. Paris 271: 2190-2192 (1970).

MIZUNO, T.:

"Lens differentiation in vitro in the absence of optic vesicle in the epiblast of chick blastoderm under the influence of skin dermis".

J. Embryol. exp. Morph. 28: 117-132 (1972).

MURILLO FERROL, N.L.:

"Contribución al conocimiento de la diferenciación del epitelio pigmentario de la retina".

Anales del Desarrollo 12: 51-61 (1964).

MURRAY, P.D.F.:

"The development of the conjunctival papillae and of the scleral bones in the chick embryo".

J. Anat. (Lond.) 77: 225-240 (1943).

MUSSINI, I.; ALOISI, M., y LUCKE-RAMPAZZI, S.:

"Transient smooth muscle features in developing chick iris striated muscle".

J. Submicr. Cytol. 8: 256 (1976).

MUSSINI, I.; PAGGI, P.; LEONE, F.; SCARSELLA, G., y TOSCHI, G.:

"Degeneration and regeneration of neuromuscular junctions in chicken iris muscle after crush of the ciliary nerves: a study of ultrastructural changes and of cholinergic enzymes".

Neuroscience 12: 53-66 (1984).

NAKANO, K.E., y NAKAMURA, H.:

"Origin of the irideal striated muscle in birds".

J. Embryol. exp. Morph. 88: 1-13 (1985).

NARAYANAN, C.H., y NARAYANAN, Y.:

"On the origin of the ciliary ganglion in birds studied by the method of interspecific transplantation of embryonic brain regions between quail and chick".

J. Embryol. exp. Morph. 47: 137-148 (1978).

NARAYANAN, Y., y NARAYANAN, C.H.:

"Ultrastructural and histochemical observations in the developing iris musculature in the chick".

J. Embryol. exp. Morph. 62: 117-127 (1981).

NEWSOME, D.A.:

"Cartilage induction by retinal pigment epithelium of chicken embryo".

Dev. Biol. 27: 575-579 (1972).

NEWSOME, D.A.:

"In vitro stimulation of cartilage in embryonic chick neural crest cells by products of retinal pigmented epithelium".

Dev. Biol. 49: 496-507 (1976).

NODEN, D.M.:

"An analysis of the migratory behavior of avian cephalic neural crest cells".

Dev. Biol. 42: 106-130 (1975).

NODEN, D.M.:

"The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation I. Skeletal and connective tissues".

Dev. Biol. 67: 296-312 (1978a).

NODEN, D.M.:

"The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation II. Neural tissues".

Dev. Biol. 67: 313-329 (1978b).

NODEN, D.M.:

"Periocular mesenchyme: Neural crest and mesodermal interactions".

En: "*Biomedical Foundation of Ophthalmology*". Editado por F.A. Jacobiec. Harper and Row, New York, 1982.

NODEN, D.M.:

"The embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues".

Am. J. Anat. 168: 257-276 (1983).

NODEN, D.M.:

"Craneofacial development: new views on old problems".
Anat. Rec. 208: 1-13 (1984a).

NODEN, D.M.:

"The use of chimeras in analyses of craniofacial development".
En: *Chimeras in developmental biology*. Academic Press, London, 1984b.

NODEN, D.M., y DE LAHUNTA, A.:

"*Embriología de los animales domésticos*".
Ed. Acribia. S.A. Zaragoza. 1990, cap. 6.

NOLTE, J., y POINTNER, F.:

"The fine structure of the iris of the grass frog, *Rana pipiens*".
Cell Tissue Res. 158: 111-120 (1975).

NUSSBAUM, M.:

"Die Entwicklung der Biennenmuskeln des Auges der Wirbelthiere".
Arch. mikr. Anat. 58: 199-230 (1901).

**OBINATA, T.; REINACH, F.C.; BADER, D.M.; MASAKI, T.; KITANI, S.,
y FISCHMAN, D.A.:**

"Immunocytochemical analysis of C-protein isoform transitions during the development of chicken skeletal muscle".
Dev. Biol. 101: 116-124 (1984).

OH, T.H.:

"Neurotrophic effect: characterization of nerve extract that stimulated muscle development in culture".
Exp. Neurol. 46: 432-438 (1975).

OH, T.H.:

"Neurotrophic effects of sciatic nerve extracts on muscle development in culture".
Exp. Neurol. 50: 376-386 (1976).

OKAZAKI, K., y HOLTZER, H.:

"An analysis of myogenesis in vitro using fluorescein-labeled antimyosin".
J. Histochem. Cytochem. 13: 726-739 (1965).

O'RAHILLY, R., y MEYER, D.B.:

"Correlations between the development of the eye and embryonic staging in the chick".
Anat. Rec. 121: 346 (1955).

O'RAHILLY, R., y MEYER, D.B.:

"The early development of the eye in the chick".

Acta Anat. 36: 20-58 (1959).

ORTS-LLORCA, F.:

"Embriología".

En: *Historia Universal de la Medicina*, editado por P. Laín Entralgo, Salvat Editores S.A., Barcelona, 1975.

ORTS-LLORCA, F., y GENIS-GALVEZ, J.M.:

"Experimental production of the retinal septa in the chick embryo. Differentiation of pigment epithelium into neural retina".

Acta Anat. 42: 31-70 (1960).

PAGE, S.; MILLER, J.B.; DIMARIO, J.X.; HAGER, E.J.; MOSER, A., y STOCKDALE, F.E.:

"Developmentally regulated expression of three slow isoforms of myosin heavy chain: diversity among the first fibers to form in avian muscle".

Dev. Biol. 154: 118-128 (1992).

PANDER, Dr.:

"*Beytrage zur Entwicklungsgeschichte des Huhnchens im eye*".

Wurzburg. 1817.

PARANKO, J., y PELLINIEMI, L.J.:

"Differentiation of smooth muscle cells in the fetal rat testis and ovary: localization of alkaline phosphatase, smooth muscle myosin, F-actin, and desmin".

Cell Tissue Res. 268: 521-530 (1992).

PATTEN, B.M.:

"*Human Embryology*". Mc Graw-Hill, New York, 1953.

PEIRONE, S.; SISTO-DANEO, L., y FILOGAMO, G.:

"Embryogenesis of the avian iris sphincter muscle: in vivo and in vitro studies".

Int. J. Dev. Neurosci. 8: 17-31 (1990).

PENG, H.B.; WOLOSEWICK, J.J., y CHENG, P.-C.:

"The development of myofibrils in cultured muscle cells: a whole-mount and thin-section electron microscopic study".

Dev. Biol. 88: 121-136 (1981).

PERR, H.A.; GRIDER, J.R.; MILLS, A.S.; KORNSTEIN, M.; TURNER, D.A.; DIEGELMANN, R.F., y GRAHAM, M.F.:

"Collagen production by human smooth muscle cells isolated during intestinal organogenesis".

Anat. Embryol. 185: 517-527 (1992).

PETERSON, E.R., y CRAIN, S.M.:

"Innervation in cultures of fetal rodent skeletal muscle by organotypic explants of spinal cord from different animals".

Z. Zellforsch 106: 1-21 (1970).

PHILLIPS, W.D.; EVERETT, A.W., y BENNETT, M.R.:

"The role of innervation in the establishment of the topographic distribution of primary myotube types during development".

J. Neurocytol. 15: 397-405 (1986).

PHILLIPS, W.D., y BENNETT, M.R.:

"Differentiation of fiber types in wing muscles during embryonic development: effect of neural tube removal".

Dev. Biol. 106: 457-468 (1984).

PILAR, G.; LANDMESSER, L., y BURSTEIN, L.:

"Competition for survival among developing ciliary ganglion cells".

J. Neurophysiol. 43: 233-254 (1980).

PILAR, G.; TUTTLE, J., y VACA, K.:

"Functional maturation of motor nerve terminals in the avian iris: ultrastructure, transmitter metabolism and synaptic reliability".

J. Physiol. 321: 175-193 (1981).

PODLESKI, T.R.; AXELROD, D.; RAVDIN, P.; GREENBERG, I.; JOHNSON, M.M., y SALPETER, M.M.:

"Nerve extract induces increase and redistribution of acetylcholine receptors on cloned muscle cells".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2035-2039 (1978).

PORTE, A.; STOECKEL, M.E.; BRINI, A., y MÉTAIS, P.:

"Structure et différenciation du corps ciliaire et du feuillet pigmenté de la rétine chez le poulet".

Arch. Ophth. (Paris) 28: 259-282 (1968).

PRINCE, J.H.:

"*Comparative anatomy of the eye*".

Editado por Charles C. Tomas. Publisher. Illinois USA. 1956.

REGER, J.F.:

"The fine structure of iridial constrictor pupillae muscle of Alligator mississippiensis".
Anat. Rec. 155: 197-216 (1966)

REGER, J.F.; SMITH, S.W., y SCHOPP, R.T.:

"The fine structure of mixed smooth and striated muscle in the iris of Alligator mississippiensis".
Anat. Rec. 136: 345 (1960).

REICHMAN, E.F., y BEEBE, D.C.:

"Acetylcholinesterase activity as a marker for the development of the ciliary epithelium in the chicken embryo".
Exp. Eye Res. 51: 249-255 (1990).

REICHMAN, E.F., y BEEBE, D.C.:

"Changes in cellular dynamics during the development of the ciliary epithelium".
Dev. Dyn. 193: 125-135 (1992).

RIAÑO GRANERO, M.:

"Análisis experimental de heteroinjertos de vesícula óptica en embriones de ave".
Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 1991.

ROBSON, L.G.:

"Cellular patterning of fast and slow fibers in the intermandibularis muscle of chick embryos".
Development 117: 329-339 (1993).

RODRIGUEZ-PEREZ, A.P.:

"Studies on the genesis of the cephalic parasympathetic nerve. The origin of the ciliary ganglion in the chick embryo".
Acta Neuroveg. (Wien) 26: 271-286 (1964).

ROHEN, J.:

"Das Auge und seine Hilfsorgane".
En: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie den Menschen*, editado por W.V. Mollendorf. Ergänz zu Bd. III/2 Berlin, 1964.

ROMANOFF, A.L.:

"The avian embryo. Structural and functional development".
The McMillan Company. New York, 1960, cap. 4 y 5.

RONG, P.M.; TEILLET, M.A., y ZILLER, C.:

"Differential influence of the neural primordium on muscle development in myotome and limb".

En: *The avian model developmental biology: from organism to genes*, editado por CNRS. Paris, 1990.

RONG, P.M.; TEILLET, M.-A.; ZILLER, C., y LE DOUARIN, N.M.:

"The neural tube/notochord complex is necessary for vertebral but not limb and body wall striated muscle differentiation".

Development 115: 657-672 (1992).

RONG, P.M.; ZILLER, C.; PEÑA-MELIAN, A., y LE DOUARIN, N.M.:

"A monoclonal antibody specific for avian early myogenic cells and differentiated muscle".

Dev. Biol. 122: 338-353 (1987).

ROSS, J.J.; DUXSON, M.J., y HARRIS, A.J.:

"Neural determination of muscle fiber numbers in embryonic rat lumbrical muscles".

Development 100: 395-409 (1987).

ROSS, R., y KLEBANOFF, S.J.:

"The smooth muscle cell I. In vivo synthesis of connective tissue proteins".

J. Cell Biol. 50: 159-171 (1971).

RUBENSTEIN, P.A.:

"Differential behavior of gizzard isoactins".

Arch. Biochem. Biophys. 210: 598-608 (1981).

SABORIO, J.L.; SEGURA, M.; FLORES, M.; GARCIA, R., y PALMER, E.:

"Differential expression of gizzard actin genes during chick embryogenesis".

J. Biol. Chem. 254: 11119-11125 (1979).

SASSE, J.; HORWITZ, A.; PACIFICI, M., y HOLTZER, H.:

"Separation of precursor myogenic and chondrogenic cells in early limb bud mesenchyme by monoclonal antibody".

J. Cell Biol. 99: 1856-1866 (1984).

SCAPOLO, P.A.; PEIRONE, S.M.; FILOGAMO, G., y VEGGETTI, A.:

"Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural observations on the iris muscles of *Gallus gallus*".

Anat. Rec. 221: 687-699 (1988)..

SCARSELLA, G.; TOSCHI, G.; CHIAPPINELLI, V.A., y GIACOBINI, E.:

"Molecular forms of acetylcholinesterase in the ciliary ganglion and iris of the chick".

Dev. Neurosci. 1: 133-141 (1978).

SCOTT, W.J.; LANE, D.; RANDELL, J.L., y SCHREINER, C.M.:
"Malformations in nonlimb structures induced by acetazolamide and
others inhibitors of carbonic anhydrase".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 429: 447-455 (1984).

SCHAFFER, D.A.; MILLER, J.B., y STOCKDALE, F.E.:
"Cell diversification within the myogenic lineage: in vitro
generation of two types of myoblasts from a single myogenic
progenitor cell".
Cell 48: 659-670 (1987).

SCHOOK, P.:
"Morphogenetic movements during the early development of the
chick eye. A light microscopic and spatial reconstructive study".
Acta Morphol. Neerl.-Scand. 18: 1-30 (1980a).

SCHOOK, P.:
"Morphogenetic movements during the early development of the
chick eye. An ultrastructural and spacial reconstructive study
A. Invagination of the lens placode".
Acta Morphol. Neerl.-Scand. 18: 133-157 (1980b).

SCHOOK, P.:
"Morphogenetic movements during the early development of the
chick eye. An ultrastructural and spatial reconstructive study.
B. Invagination of the optic vesicle and fusion of its walls".
Acta Morphol. Neerl.-Scand. 18: 159-180 (1980c).

SCHOOK, P.:
"Morphogenetic movements during the early development of the
chick eye. An ultrastructural and spatial study. C. Obliteration
of the lens stalk lumen and separation of the lens vesicle from
the surface ectoderm".
Acta Morphol. Neerl.-Scand. 18: 195-211 (1980d).

SCHULTEISS, T.; LIN, Z.; LU, M.-H.; MURRAY, J.; FISCHMAN, D.A.;
WEBER, K.; MASAKI, T.; IMAMURA, M., y HOLTZER, H.:
"Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins
in cardiac non-striated and striated myofibrils".
J. Cell. Biol. 110: 1159-1172 (1990).

SEED, J., y HAUSCHKA, S.D.:
"Temporal separation of the migration of distinct myogenic
precursor populations into the developing chick wing bud".
Dev. Biol. 106: 389-393 (1984).

SHAINBERG, A.; YAGIL, G., y YAFFE, D.:
"Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation in vitro".
Dev. Biol. 25: 1-29 (1971).

SHEN, S.-C.; GREENFIELD, P., y BOELL, E.J.:
"Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogenesis".
J. Comp. Neurol. 106: 433-462 (1956).

SILBERSTEIN, L.; INESTROSA, N.C., y HALL, Z.W.:
"Aneural muscle cell cultures make synaptic basal lamina components".
Nature 295: 143-145 (1982).

SLONAKER, J.R.:
"The development of the eye and its accessory parts in the English sparrow (*Passer domesticus*).
J. Morphol. 35: 263-357 (1921).

SMALL, J.V.:
"Contractile units in vertebrate smooth muscle cells".
Nature 249: 324-326 (1974).

SMITH, L., y THOROGOOD, P.:
"Transfilter studies on the mechanism of epithelio-mesenchymal interaction leading to chondrogenic differentiation of neural crest cells".
J. Embryol. exp. Morph. 75: 165-188 (1983).

SOBUE, K.; MURAMOTO, Y.; FUJITA, M., y KAKIUCHI, S.:
"Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5652-5655 (1981).

SOHAL, G.S.:
"Differentiation of postsynaptic specializations in muscle developing without motor innervation".
Anat. Rec. 205: 189 (1983).

SOHAL, G.S., y HOLT, R.K.:
"Role of innervation on the embryonic development of skeletal muscle".
Cell Tissue Res. 210: 383-393 (1980).

SOHAL, G.S., y WRENN, R.W.:
"Appearance of high-molecular-weight acetylcholinesterase in aneural muscle developing in vivo".
Dev. Biol. 101: 229-234 (1984).

SPEAMANN, H.:

"Über Korrelationen in der Entwicklung des Auges".
Verh. Anat. Ges. Jena Verslg. Bonn 15: 61-79 (1901).

SPIEGEL, E., y SPIEGEL, M.:

"The insertion of mesenchyme cells into the ectoderm during differentiation in Sea urchin embryos".
Roux's Arch. Dev. Biol. 201: 383-388 (1992).

SPIRA, A.W.; MILLAR, T.J.; ISHIMOTO, I.; EPSTEIN, M.L.; JOHNSON, C.D.; DAHL, J.L., y MORGAN, I.G.:

"Localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the embryonic chick retina".
J. Comp. Neural. 260: 526-528 (1987).

STAFLOVA, J.:

"A comparative study of the adrenergic innervation of the iris and ciliary structures in 18 species in phylogenesis".
J. Morph. 128: 387-402 (1969).

STOCKDALE, F.E.:

"Skeletal muscle fiber specification during development and the myogenic cell lineage".

En: *Proceeding of the Assembly of the Nervous System Symposia of the 47th Annual Meeting, Society for Developmental Biology*, ediatado por L.T. Landmesser. Alan R. Liss, New York, 1989.

STOCKDALE, F.E.:

"The myogenic lineage: evidence for multiple cellular precursors during avian limb development".

Proc. exp. Biol. Med. 194: 71-75 (1990).

STOCKDALE, F.E.:

"Myogenic cell lineages".

Dev. Biol. 154: 284-298 (1992).

STOCKDALE, F.E., y MILLER, J.B.:

"The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles".

Dev. Biol. 123: 1-9 (1987).

STROEVA, O.G.:

"Experimental study of the conditions determining the development of the pigmented epithelium and the retina in mammals".

Dokl. Acad. Nauk. SSSR 109: 657-660 (1956).

STROEVA, O.G.:

"The role of the lens epithelium in the induction of iris and ciliary body tissue".

Dokl. Acad. Nauk. SSSR 151: 464-467 (1963).

STROEVA, O.G.:

"The correlation of the processes of proliferation and determination in the morphogenesis of iris and ciliary body in rats".

J. Embryol. exp. Morph. 18: 269-287 (1967).

STUEWER, D., y GROSCHER-STEWART, U.:

Expression of immunoreactive myosin and myoglobin in the developing chicken gizzard".

Roux's Arch. Dev. Biol. 194: 417-424 (1985).

SZILLI, A.:

"Zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der hinteren Irisschichten, mit besonderer Berücksichtigung des Musculus spincter iridis des Menschen".

Anat. Anz. 20: 161-175 (1901).

TAMURA, T., y SMELSER, G.K.:

"Development of the sphincter and dilator muscles of the iris".

Arch. Ophthalmol. 89: 332-339 (1973).

TELLO, J.F.:

"Les différenciations neuronales dans l'embryon de poulet, pendant les premiers jours de l'incubation".

Travaux Lab. Recher. Biol. l'Université Madrid 21: 1-93 (1923).

THOROGOOD, P.:

"The developmental specification of the vertebrate skull".

Development 103 (Supl.): 141-153 (1988).

TOKUYASU, K.T., y MAHER, P.A.:

"Immunocytochemical studies of cardiac myofbrillogenesis in early chick embryos. I. Presence of immunofluorescent titin spots in premyofibril stages".

J. Cell Biol. 105: 2781-2793 (1987a).

TOKUYASU, K.T., y MAHER, P.A.:

"Immunocytochemical studies of cardiac myofubrillogenesis in early chick embryos. II. Generation of α -actinin dots within titin spots at the time of the first myofibril formation".

J. Cell Biol. 105: 2795-2801 (1987b).

TONOSAKI, A., y KELLY, D.E.:

"Fine structural study on the origin and development of the sphincter pupillae muscle in the west coast newt (*Taricha torosa*)".

Anat. Rec. 170: 57-74 (1971).

TOYAMA, Y.; FORRY-SCHAUDIES, S.; HOFFMAN, B., y HOLTZER, H.:

"Effects of taxol and colcemid on myofibrillogenesis".

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6556-6560 (1982).

TRIPATHI, B.C.:

"*The eye*". Vol. 5. Comparative physiology, editado por H: Davson y L.T. Graham. Jr. Academic press. New York and London. 1974

TSUKITA, S.; TSUKITA, S., y ISHIKAWA, H.:

"Association of actin and 10 nm filaments with the dense body in smooth muscle cells of the chicken gizzard".

Cell Tissue Res. 229: 233-242 (1983).

VAN BREEMAN, V.L.:

"Myofibril development observed with the electron microscope".

Anat. Rec. 113: 179-195 (1952).

VIVARELLI, E.; BROWN, W.E.; WHALEN, R.G., y COSSU, G.:

"The expression of slow myosin during mammalian somitogenesis and limb bud differentiation".

J. Cell Biol. 107: 2191-2197 (1988).

VOGEL, M., y LANDMESSER, L.:

"Distribution of fiber types in embryonic chick limb muscles innervated by foreign motoneurons".

Dev. Biol. 119: 481-495 (1987).

WAKELAM, J.O.:

"Review article. The fusion of myoblasts".

Biochem. J. 228: 1-12 (1985).

WAKELY, J.:

"Scanning electron microscope study of the extracellular matrix between presumptive lens and presumptive retina of the chick embryo".

Anat. Embryol. 150: 163-170 (1977).

WALLS, G.L.:

"*The vertebrate eye and its adaptative radiation*".

Hafner publishing Co. New York, 1942.

WANG, K.:

"Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle: review and hypothesis".
Cell Muscle Motil. 6: 315-371 (1985).



WANG, K., y WRIGHT, J.:

"Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line".
J. Cell Biol. 107: 2199-2212 (1988).

WANG, S.-M.; GREASER, M.L.; SCHULTZ, E.; BULINSKI, J.C.; LIN, J.J.C., y LESSARD, J.L.:

"Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin".
J. Cell Biol. 107: 1075-1083 (1988).

WEED, I.G.:

"Cytological studies of developing muscle with special reference of myofibrils, mitochondria, Golgi material, and nuclei".
Z. Zellforsch mikr. Anat. 25: 516-590 (1936).

WEISS, P., y AMPRINO, R.:

"The effect of mechanical stress on the differentiation of scleral cartilage in vitro and the embryo".
Growth 4: 245-258 (1940).

WELDON, P.R.; MOODY-CORBETT, F., y COHEN, M.W.:

"Ultrastructure of sites of cholinesterase activity on amphibian embryonic muscle cells cultured without nerve".
Dev. Biol. 84: 341-350 (1981).

WESTON, J.A.:

"A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick".
Dev. Biol. 6: 279-310 (1963).

WEYDERT, A.; BARTON, P.; HARRIS, A.J.; PINSET, C., y BUCKINGHAM, M.:

"Developmental pattern of mouse skeletal myosin heavy chain gene transcripts in vivo and in vitro".
Cell 49: 121-129 (1987).

WEYSSE, A.W., y BURGESS, W.S.:

"Histogenesis of the retina".
Am. Nat. 40: 611-638 (1906).

WHITE, N.K.; BONNER, P.H.; NELSON, D.R., y HAUSCHKA, S.D.:
"Clonal analysis of vertebrate myogenesis. IV. Medium-dependent classification of colony-forming cells".
Dev. Biol. 44: 346-361 (1975).

WHITE, N.K., y HAUSCHKA, S.D.:
"Muscle development in vitro: a new conditioned medium effect on colony differentiation".
Exp. Cell Res. 67: 479-482 (1971).

WOOLF, D.:
"A comparative cytological study of the ciliary muscle".
Anat. Rec. 124: 145-163 (1956).

YABLONKA, Z., y YAFFE, D.:
"Synthesis of myosin light chains and accumulation of translatable mRNA coding for light chain-like polypeptides in differentiating muscle cultures".
Differentiation 8: 133-143 (1977).

YAMADA, T.; REESE, D.H., y McDEVITT, D.S.:
"Transformation of iris into lens in vitro and its dependency on neural retina".
Differentiation 1: 65-82 (1973).

YAMASHITA, T., y SOHAL, G.S.:
"Development of smooth and skeletal muscle cells in the iris of the domestic duck, chick and quail".
Cell Tiss. Res. 244: 121-131 (1986).

YAMASHITA, T., y SOHAL, G.S.:
"Embryonic origin of skeletal muscle cells in the iris of the duck and quail".
Cell Tiss. Res. 249: 31-37 (1987).

YAMAUCHI, A., y BURNSTOCK, G.:
"Post-natal development of smooth cells in the mouse vas deferens. A fine structural study".
J. Anat. 104: 1-15 (1969).

YANG, J.J., y HILFER, S.R.:
"The effect of inhibitors of glycoconjugate synthesis on optic cup formation in the chick embryo".
Dev. Biol. 92: 41-53 (1982).