

DIFERENCIACION Y MADURACION CITOARQUITECTONICA DEL PROSENCEFALO DEL PERRO*

(DIFFERENTIATION AND CYTOARQUITECTONIC MATURITY OF THE
PROSENCEPHALON OF DOG).

por

J. VIVO RODRIGUEZ**

El amplio e irregular recorrido de las emigraciones de los distintos substratos prosencefálicos condicionan en buena medida la complejidad aparente y real de estos territorios y, de un modo especial, las estructuras telencefálicas. Esta misma compleja organización comporta limitaciones en el conocimiento de dichos substratos, no sólo en los mamíferos domésticos sino en el hombre, sobre el que en las últimas décadas han progresado tales conocimientos.

Uno de los hechos que quizás más haya llamado la atención ha sido la maduración neuronal, tratando con ello de conocer el momento en que un centro inicia su actividad y se integra en el funcionalismo del sistema nervioso; esto lo denomina Smith-Agreda cronología de maduración. Este mismo autor, y muchos de sus colaboradores, han tratado de desvelar la referida maduración histológica en la positividad transitoria que presentan algunas neuronas frente al luxol, mediante el método somático-milínico de Klüver-Barrera (1953), una fuente de estudio para su conocimiento (Smith-Agreda y Fernández-Ortega, 1967). Ellos mismos han tratado de comprobar la autenticidad de este hecho, al controlar su acción con distintos métodos de inclusión (Smith-Agreda y Fernández-Ortega, 1969), comprobar distintos fijadores (Fernández-Ortega y Mesa, 1972) o comparar esta maduración mediante el método de Golgi (Meyer, 1976), así como analizando ultraestructuralmente la neuronas luxol-negativas (Ferrer-Torres y Fernández-Ortega, 1973).

Otros dos hechos hemos considerado significativos: por un lado, el matiz dinámico que adquiere tras los estudios de Kahle (1951) la matriz (epitelio germinativo) y el manto (zona de diferenciación), al catalogarlos en fases proliferativas, emigratorias y de agotamiento; por otro lado, la apreciación de Salas (1975) acerca de la apetencia tintorial por el luxol de las células dotadas de potencial germinativo.

* Resumen de la tesina de licenciatura dirigida por el Prof. Dr. E. Agüera.

** Profesor ayudante de anatomía y embriología de la Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Inspirados sobre estas bases hemos querido hacer una aportación al conocimiento de uno de los substratos rectores del ser vivo, cual es el de la organización y maduración citoarquitectónica de los territorios prosencefálicos, eligiendo para nuestro estudio el perro en su período de desarrollo prenatal.

Material y métodos.

Se han utilizado dos perras gestantes de parecida constitución física, a las que se practicaron dos cesáreas experimentales; a los 20 y 42 días, a la primera, y 30 y proximidades del parto, a la segunda, extrayendo en cada intervención dos embriones y fetos para la obtención del material necesario para su estudio óptico y ultraestructural.

En edades embrionarias (20 y 30 días) se utilizaron los especímenes completos para la obtención del material destinado al estudio óptico, así como una muestra del territorio prosencefálico, para su análisis ultraestructural. En épocas fetales (42 días y a término), fueron extraídos los encéfalos de la formativa cavidad craneal, seccionados sagitalmente (hemiencefalos) para las preparaciones destinadas a fotomicroscopía, así como la toma de tres muestras de territorios próximos a corteza telencefálica, corona radiada y diencéfalo, respectivamente, para su investigación ultramicroscópica.

Todo este material, para su estudio, lo agrupamos en relación a la época de desarrollo prenatal, comprobada ésta por los datos cronológicos de la especie en estudio descritos por Evans and Sack (1973), en los siguientes apartados:

- Grupo I. Material obtenido en embriones de 20 días de edad, para su estudio óptico y ultraestructural.
- Grupo II. Embriones de 30 días de desarrollo prenatal, para su estudio a fotomicroscopía y muestras del prosencéfalo de los mismos, para su análisis ultraestructural.
- Grupo III. Prosencéfalos y las tres muestras referidas de los mismos en edades fetales tempranas (42 días), para su estudio óptico y electrónico, respectivamente.
- Grupo IV. Material para su análisis a fotomicroscopía y microscopía electrónica, de los territorios en estudio, obtenidos de fetos a término.

Los especímenes destinados a microscopía óptica fueron fijados en formol al 10 p. 100, incluidos en parafina y previo tallado, cortados a 8μ (*).

* A los hemiencefalos de feto a término se les aplicaron dos cortes transversales, con lo que fueron tres los bloques sometidos a fijación e inclusión (rostral, medio y caudal), con el fin de facilitar ambos procesos.

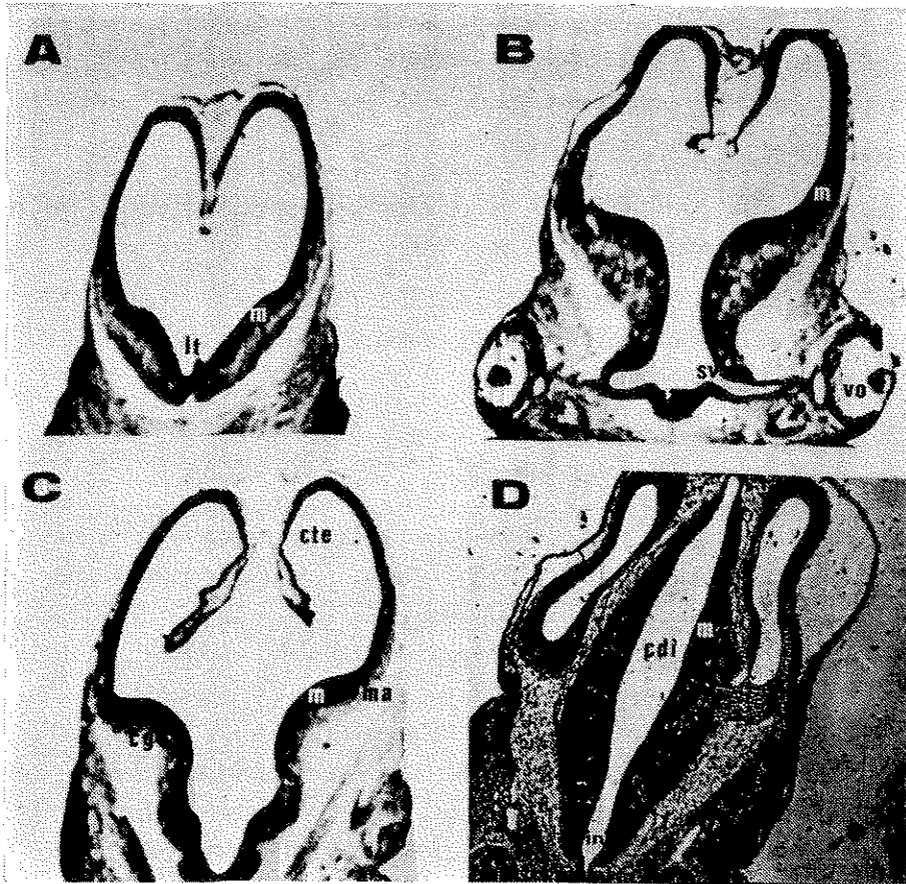


FIGURA 1. Cortes transversales rostrocaudales (A-D) del prosencéfalo de un embrión de 20 días. Tinción: Klüver-Barrera, X 16.

El conjunto de cortes así obtenidos se agrupó en tres series, de acuerdo con las técnicas empleadas:

- Serie 1 Tinción con luxol-azul rápido, método de Klüver-Barrera modificado (Smith-Agreda y Fernández-Ortega, 1967).
- Serie 2. Método de Klüver-Barrera (1953).
- Serie 3. Reservada para comprobación de resultados, condicionando el método a la observación de las dos series anteriores.

El material destinado a electromicroscopía fue sometido al proceso normal de fijado (glutaraldehído), refijado (tetróxido de osmio), inclusión en araldita, tallado, corte y montaje para observación ultraestructural.

Resultados.

Las observaciones sobre el material en estudio las agrupamos, para su exposición en dos grandes apartados. El primero (A), atendiendo a los datos suministrados por fotomicroscopía sobre la configuración y detalles más significativos de los substratos prosencefálicos, así como el comportamiento de apetencia tintorial por el luxol de las diferentes comunidades celulares; a tales fines, seguimos la evolución cronológica de las matrices y su maduración citoarquitectónica. El segundo apartado (B) lo referimos al estudio ultraestructural, en estrecha relación con el grado de diferenciación y maduración que ofrecen en los estadios que se analizan las células y prolongaciones citoplasmáticas de los territorios y material en estudio.

A. I. En cuanto al material procedente de embriones de 20 días, y a fotomicroscopía, destaca la formación de las grandes cavidades ventriculares (fig. 1) correspondientes a la cavidad diencefálica (cdi) y cavidades telencefálicas (cte). Dichas cavidades aparecen configuradas como tales en los territorios más caudales, apreciándose a estos niveles la organización de sus paredes. Así, se advierte una intensa positividad al luxol en las placas matrices de los territorios hipotalámicos y de modo especial en los talámicos, destacando, aunque en menor grado al observado en los territorios rostrales, las matrices subtalámicas. La placa matriz relacionada con el futuro territorio epitalámico aparece consolidándose a esta edad.

En buena parte de su extensión, dichas cavidades se relacionan entre sí; en consecuencia, los futuros agujeros interventriculares aparecen en esta edad como grandes espacios interventriculares (A-C, fig. 1), si bien las propias cavidades denotan accidentes que insinúan estructuras identificables. Tal es el caso de la lámina matrices (m) implicadas en la organización del hipotálamo, observándose el elongamiento progresivo del surco ventral, que apunta colateralmente hacia las vesículas oftálmicas a fin de suministrar el material formativo del estrato cerebral de la retina.

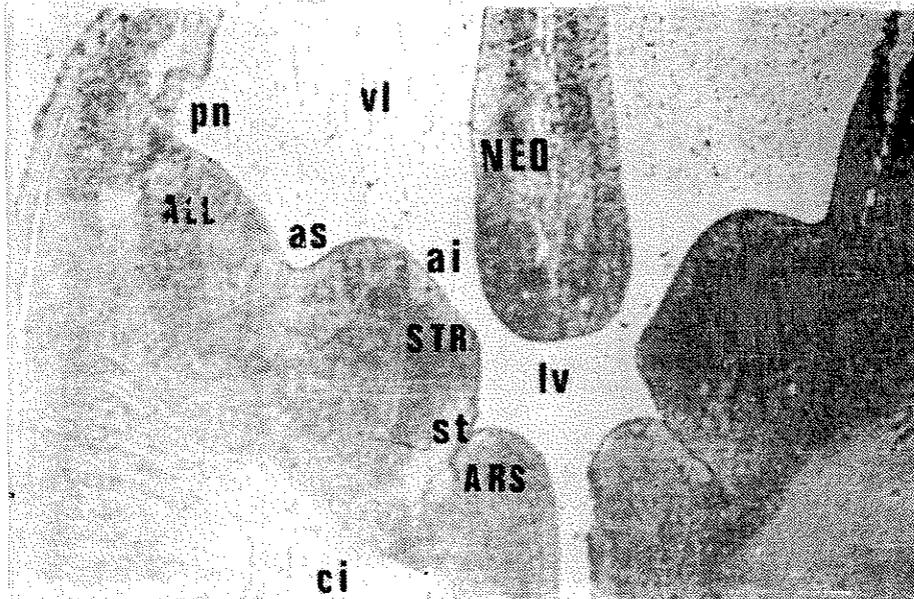


FIGURA 2. Corte transversal de los territorios medios del prosencéfalo de un embrión de 30 días, a nivel de los agujeros interventriculares. Tinción Luxol. X 27.

Por otro lado las matrices relacionadas con la cavidad telencefálica expresan distinto grado de desarrollo y evolución, disminuyendo el estado proliferativo de las mismas desde la continuidad de la matriz diencefálica por el espacio interventricular en dirección laterodorsomedial, hasta la insinuación de los septos intermedios. De este modo se aprecia el desarrollo neto y el estado proliferativo de las matrices y emigraciones en las estructuras ventromediales de las vesículas (columna ganglionar, cg).

A. II. El crecimiento y desarrollo que experimenta el prosencéfalo del perro entre los 20 y 30 días de edad prenatal es bastante ostensible y exhuberante. Dicho crecimiento se acusa de modo especial en las vesículas telencefálicas, presentando, las matrices de los substratos telencefálicos distintos estados proliferativos. Así, sobre las preparaciones teñidas con luxol-azul rápido (método modificado de Klüver-Barrera) (fig. 2) se observan en incipiente estado de agotamiento las placas matrices relacionadas con el *striatum* (STR), donde las emigraciones celulares aparecen en buena medida ya establecidas; en estado proliferativo y momento de emigra-

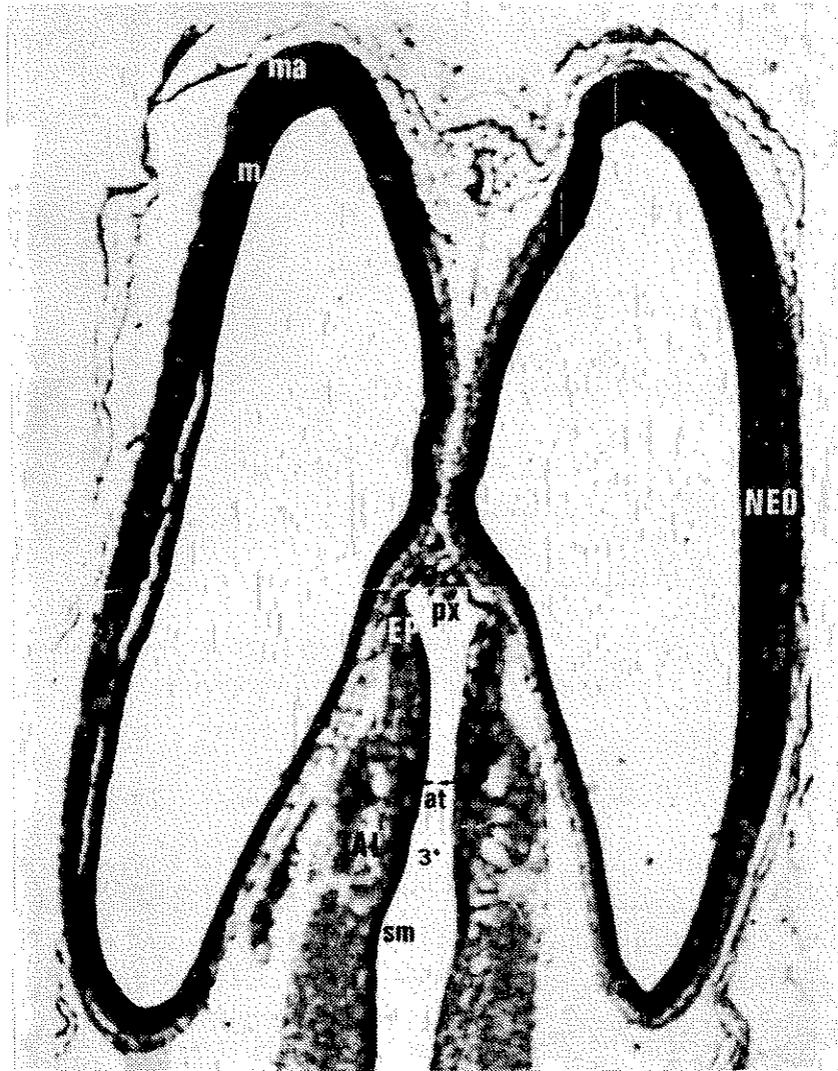


FIGURA 3. Corte longitudinal dorsoventral que interesa los lóbulos frontal y temporal del telencéfalo, así como el territorio dorsal diencefálico, en un embrión de 30 días.

Tinción: Klüver-Barrera. X 23.

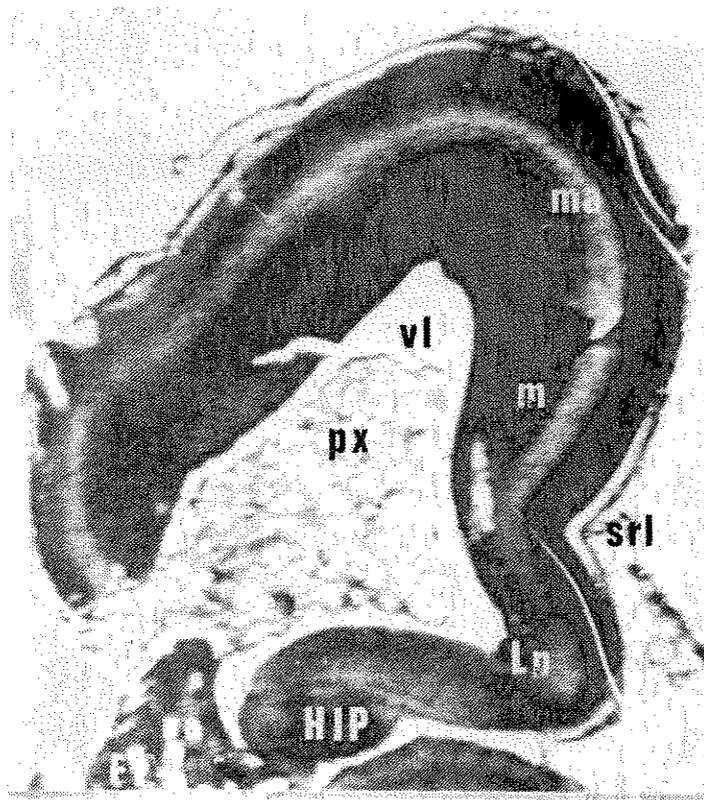


FIGURA 4. Corte transversal de la vesícula telencefálica derecha de feto de perro, de 42 días de edad. Tinción: Luxol. X 20.

ción, las matrices allocorticales (ALL); aparecen en un estadio intermedio de diferenciación y desarrollo, respecto a las expresadas, las relacionadas con el *arquistriatum* (ARS); y muestran un estado proliferativo inicial las matrices neocorticales (NEO).

El *striatum* y *arquistriatum*, expresados como columna ganglionar en los embriones del grupo I, aparecen separados en esta edad por el surco terminal (st) configurado en territorios muy próximos al agujero interventricular. El límite paleoneocortical (pn) evidenciado en el material de 20 días, está presente en los encéfalos de perro de 30 días de desarrollo prenatal, y denota la separación allocortical. El crecimiento exuberante del *striatum*, motiva la presentación de un nuevo surco como límite estrialocortical (as). Por su parte el *neostriatum* (NEO) sigue mostrando el crecimiento en sentido laterodorsomedial, anunciado en edades más precoces,

VIVO RODRIGUEZ: DIFERENCIACION CITOARQUITECTONICA DEL PROSENCEFALO.

por lo que sus matrices muestran el menor grado de desarrollo en el límite ventromedial del neocórtex (extremo distal del septo interhemisférico a nivel de los agujeros interventriculares), apareciendo la matriz de estos substratos en estado inicial de proliferación.

El diencéfalo muestra un estado de maduración y diferenciación más acusado que las vesículas telencefálicas ya descritas, identificándose diversos agrupamientos en varios estados de las distintas emigraciones acaecidas. De este modo podemos apreciar (fig 3) el tálamo (TAL), conformado en situación dorsal al surco medio (sm), en cuya cavidad insinúa el acercamiento de sus paredes hacia la configuración de la futura adherencia intertalámica (at).

Por otro lado, en el epitálamo (EP) se observa el comienzo del estado proliferativo, apareciendo las matrices colindantes del surco dorsal con elevado potencial de dichas actividades germinativas, así como una acentuada positividad de los plexos coroideos (px) por el luxol, observada esta apetencia tintorial incluso en las preparaciones de la serie 2 (método de Klüver-Barrera).

A III. En épocas fetales (42 días) los substratos prosencefálicos apuntan hacia una configuración definitiva (fig. 4), de modo que en los ventrículos laterales (vl) conformados, destaca la gran expansión que experimentan a esta edad los plexos coroideos (px).

En los distintos substratos prosencefálicos, así como en el comportamiento de estos con el luxol, se denota un apreciable grado de maduración y diferenciación celular.

El neocórtex se manifiesta como amplia banda de acúmulos celulares teñidos de azul, alcanzando el mayor grosor cortical en los territorios rostralaterales; y la más intensa positividad, en los acúmulos celulares del claustro. Hemos de hacer notar, así mismo, que los estratos más superficiales de la franja neocortical no presentan apetencia tintorial por el luxol.

Las fibras nerviosas en las edades en estudio denotan apetencia por el luxol en los trayectos axónicos del bulbo olfatorio, así como (se diferencia claramente en la cápsula interna) una ligera positividad en buena parte de las fibras que la integran.

A. IV. Todo el segmento prosencefálico experimenta un alto grado de evolución morfogenética en el período comprendido entre las épocas fetales precoces y la proximidad del nacimiento. Los substratos en estudio de fetos a término (fig. 5) aparecen configurados en casi su totalidad, diferenciándose en su morfología externa los surcos rinal lateral (srl) y esplénial (sp), insinuados los marginales (sma), mientras que en el territorio dorso-rostral destaca plenamente el surco crucial (scr). Los ventrículos laterales (vl), aparecen bien conformados y provistos de abundantes plexos coroideos (px) en su interior; las paredes de los mismos muestran una morfología uniforme, aunque en su comportamiento con el luxol expresan el distinto

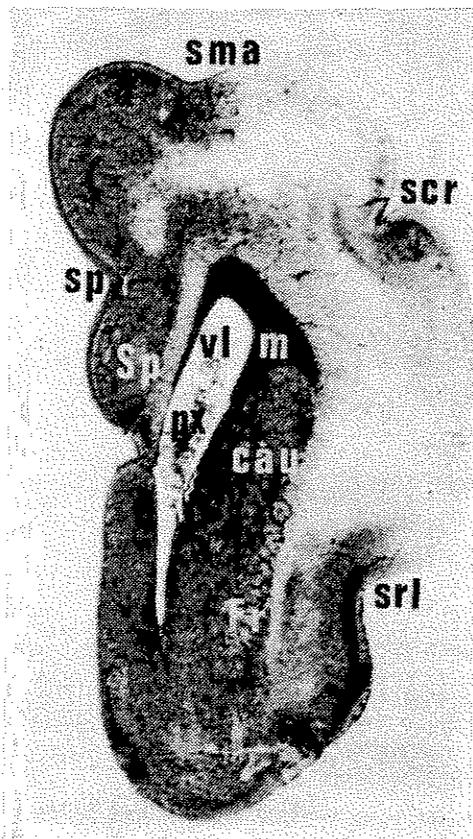


FIGURA 5. Corte transversal del hemiencéfalo derecho de feto de perro a término.
Tinción: Luxol. X 6.

estado funcional de sus matrices. Así, podemos notar que casi toda la pared medial de los ventrículos está recubierta por un epitelio ependimario (ep, fig. 5), mientras que en las paredes lateroventrales y superficie dorsal muestra la mayor afinidad por el luxol, organizando el *neostriatum*.

Respecto a los substratos telencefálicos, diferentes centros y estratos aparecen en esta época diferenciados, expresando comportamiento diverso en sus reacciones con el luxol. De este modo, se denota reacción al luxol, entre otras, en la población celular del núcleo caudado (cau), formación reticular (Fr) de los territorios próximos al núcleo y haz lenticular, así como se aprecia positividad en las fibras nerviosas de la cápsula interna. Por su parte, en el hipocampo, tanto el giro dentado, subículo y pie del hipocampo (Asta de Amon) se advierte una visible apetencia tintorial por el luxol.

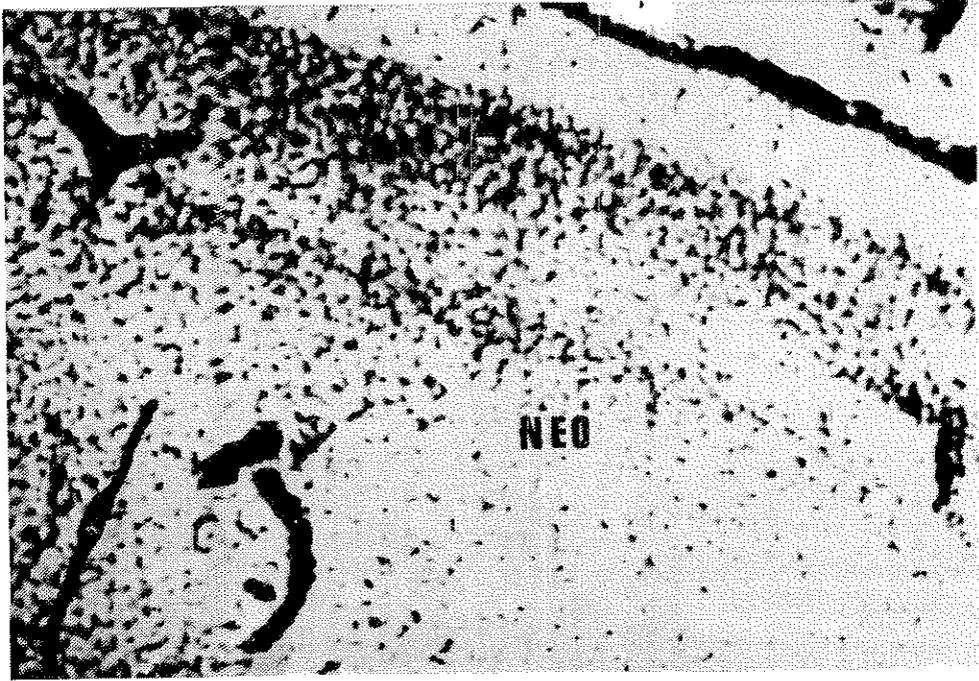


FIGURA 6. Territorios neocorticales de feto a término. Tinción: Luxol. X 32.

En lo que respecta a la corteza, se distinguen dos o tres estratos celulares teñidos de azul, destacando esta positividad en los territorios adyacentes al surco crucial (scr), así como en la corteza del lóbulo temporal, en la que pueden identificarse 5-6 estratos celulares distintos, todos ellos con apetencia tintorial por el luxol (fig. 6).

B. I-IV. En cuanto a nuestras observaciones ultraestructurales, siempre condicionadas a las muestras obtenidas para su estudio, podríamos sucintamente señalar que en épocas embrionarias se observa un elevado grado de inmadurez celular. Dichas células aparecen agrupadas en abundantes acúmulos homogéneos en los que difícilmente podemos predecir su diferenciación. Los axones observados en épocas fetales los podemos considerar en vías de desarrollo, dada la insinuación de los túbulos (neurotúbulos) en buena parte de dichas fibras.

En las proximidades del nacimiento (fig. 7), aparecen sus componentes celulares totalmente diferenciados, agrupadas sus células en forma de mosaico en sus distintos substratos, los núcleos de dichas células son grandes, muestran gran riqueza cromatínica y sus prolongaciones citoplasmáticas dependen del substrato que se contempla.

Las fibras nerviosas, en estas edades, aparecen igualmente bien diferenciadas en el citoplasma de las células satélite, aunque nunca encontramos en las muestras estudiadas, la presencia de mielina.

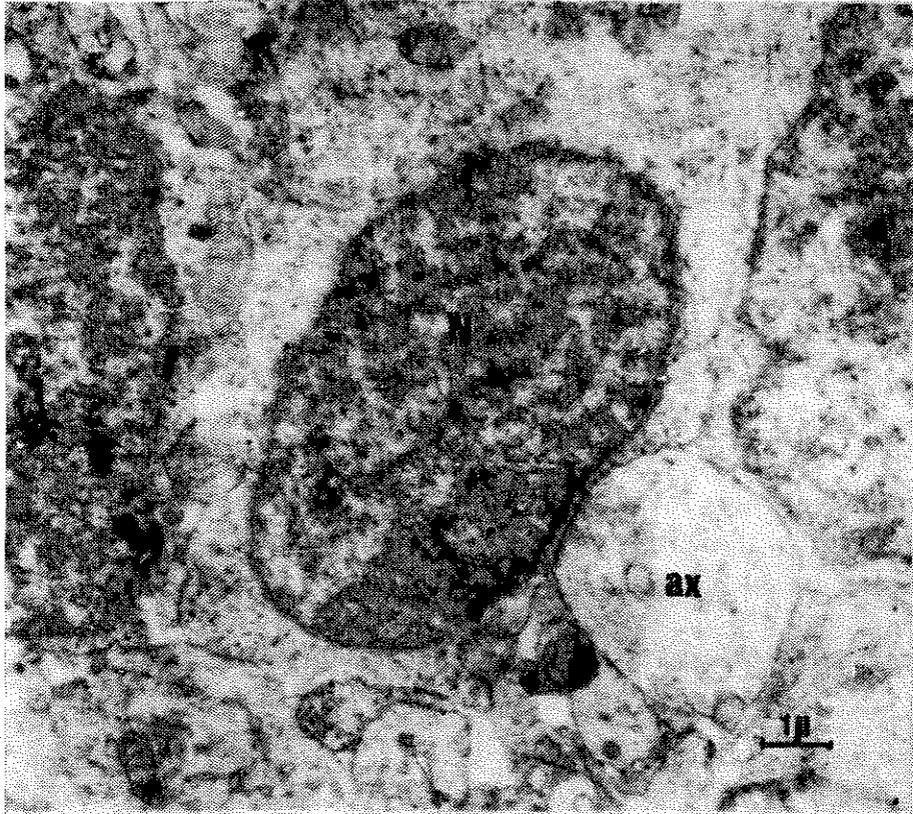


FIGURA 7. Microelectrofotografía del estrato granular telencefálico de feto a término.

Discusión.

La complejidad de los substratos proencefálicos queda enmarcada en el modo peculiar de organizarse sus territorios durante el desarrollo. Un fundamento primordial estriba en el plan centrífugo que preside el crecimiento, desarrollo y maduración de las estructuras del sistema nervioso; por otro lado, la diversidad de matrices que intervienen en su formación, así como las distintas épocas de su evolución; por último, las emigraciones, igualmente cronológicas, que experimentan y los gradientes de proliferación celular, con vistas a conformar dichos substratos.

De nuestras observaciones en la especie y edades en estudio, hemos de destacar que en épocas embrionarias se consuman las elongaciones rostrolaterales de la cavidad diencefálica; territorio éste (diencefalo) que en épocas tempranas del desarrollo (20 días) aparece con un aceptable grado de diferenciación, mostrando en las últimas edades embrionarias el comienzo de organización del epitálamo; a nuestro entender, el substrato diencefálico más tardío en constituirse. También hemos notado que el grado de organización de las vesículas telencefálicas del perro, en épocas embrionarias, es bastante limitado. Así, a los 20 días sólo se detecta la columna ganglionar, mientras que al mes de gestación esta columna muestra la organización inicial del *striatum*, *archistriatum* y *allostriatum*. En orden a la evolución cronológica

VIVO RODRIGUEZ: DIFERENCIACION CITOARQUITECTONICA DEL PROSENCEFALO.

de las matrices neocorticales del perro, a estas edades, se manifiesta el sentido latero-dorso-medial de organización y crecimiento de las vesículas en estudio; hecho preconizado por Fernández-Ortega (1969) en la especie humana.

En épocas fetales culmina la inercia de las emigraciones celulares, de los substratos prosencefálicos. Los hechos más significativos acontecen en el *archistriatum*, y *allostriatum*, así como la proliferación de las matrices del *neostriatum* y el consabido desarrollo y expansión del *neocortex*.

Del estadio organizativo y expansivo de las matrices del *neostriatum* en que se inicia el desarrollo fetal, se expresa el crecimiento, emigración y constitución de buena parte del *neocortex*, así como la diferenciación de algunos surcos y la iniciación de maduración cortical de ciertos territorios telencefálicos.

En general hemos de admitir que la diferenciación y maduración arquitectónica de los substratos prosencefálicos es casi nula en edades embrionarias y bastante limitada en comparación con otros territorios nerviosos de esta especie en edades similares (Agüera y Blanco, 1976) sobre médula cervical. Ello nos confirma, una vez más, el sentido centrífugo de organización del sistema nervioso.

Resumen.

Se realiza un estudio inicial con vistas a interpretar el desarrollo morfogenético y maduración citoarquitectónica del prosencéfalo de perro en épocas tanto embrionarias como fetales. Para ello se utiliza el método de Klüver-Barrera, que permite observar el estado proliferativo, emigratorio y de agotamiento de las matrices en los estadios que se examinan, así como la positividad neuronal al luxol en distintos centros en estudio que integran su actividad al funcionalismo del sistema, y la aparición de mielina relacionada con la fibra nerviosa, permitiendo con todo ello explorar la cronología de maduración citoarquitectónica de los substratos que se observan. Así mismo, con el análisis ultraestructural, se hace una aportación a la diferenciación celular al igual que al estado de madurez exónica de los territorios que se contemplan.

Summary.

An initial study undertaken with a view to interpretate the growth and cytoarchitectonic maturity in the prosencephalon of the dog in embryonic and foetal stages. The Klüver-Barrera method was used allowing observation of the study, as well as the appearance of neurons positive to luxol in the distinct center of the substratum studied, which integrate themselves to the functionalism of the system, and, the appearance of myeline related to the nerve fiber allowing the study of the chronology of the citoarchitectonic maturity of the observed sustratum. So now with ultrastructural analysis we can check the celular diferenciacion and the state of axonic maturity of the contemplated territories.

Bibliografía.

- Agüera, E. y A. Blanco, 1976.—Cronología de maduración funcional citoarquitectónica y mielinización de la médula cervical del perro. *An. Anat.*, 25: 461-471.
- Evans, H. E. and W. O. Sack, 1973.—Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and selected references. *Anat., Histol., Embryol.*, 2: 11-45.
- Fernández-Ortega, I. 1969.—Relación entre positividad neuronal por el luxol-fat-blue y maduración cronológica de los centros talámicos en el hombre. *An. Anat.*, 18: 27-35.
- 1973.—Consideraciones en relación con la maduración postnatal del sistema nervioso central del gato. *An. Anat.*, 22: 25-33.
- Ferres-Torres, R. e I. Fernández-Ortega, 1973.—Características ultraestructurales de las neuronas luxol-negativas en fases tempranas de desarrollo. *An. Anat.*, 22: 35-40.
- Huges, A. F. W., 1968.—Aspects of Neuronal Ontogeny. Lagos Press Ltd. London.
- Kahle, W., 1951.—Studien über die Matrixphasen und die örtlichen Reifungsunterschiede im embryonalen menschlichen Gehirn. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 166: 273-302.
- Klüver, H. and E. Barrera, 1953.—A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. Neuropath Exp. Neurol.*, 12: 400-403.
- Lobo, 1973.—Topografía de la formación reticular diencefálica y telencefálica en la rata. *An. Anat.*, 22: 113-124.
- Mayer, G. 1976.—Maduración morfofuncional de las neuronas en algunos centros telencefálicos (un estudio con el método de Golgi en el ratón blanco). *An. Anat.*, 25: 93-136.
- Salas, A. 1976.—Aportación a la organización morfofuncional de centros encefálicos. *An. Anat.*, 25: 585-620.
- Sarnat, H. B. and M. G. Netsky, 1974.—Evolution of the Nervous System. Oxford Univ. Press., New York.
- Smith-Agreda, J. e I. Fernández-Ortega, 1967.—Aspectos nucleares de la diferenciación neuronal en el método de Klüver Barrera. *An. Anat.*, 16: 227-237.
- Smith-Agreda, J. e I. Fernández-Ortega, 1969.—Positividad neuronal por el luxol-fat-blue en relación con distintos métodos de inducción. *An. Anat.*, 18: 7-12.
- Smith-Agreda, J. e I. Fernández-Ortega, 1971.—Aportación a la organización en desarrollo del telencéfalo humano. *An. Anat.*, 20: 555-568.