

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía



TESIS DOCTORAL

Heteroinjertos de miembros

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Antonio Fernández Matesanz

Madrid, 2015

Antonio Fernández Matesanz

TP
1983
017



X-53-1003373 0

HETEROINJERTOS DE MIEMBROS

Departamento de Anatomía
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1983



SIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 17/83

© Antonio Fernández Matesanz
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-1847-1983

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

*CATEDRA II DE ANATOMIA:
Prof. J. JIMENEZ COLLADO.

"HETEROINJERTOS DE MIEMBROS."

Trabajo de Investigación para optar al grado de:
DOCTOR.

Presentado por el Licenciado:

D. ANTONIO FERNANDEZ MATESANZ. "



Universidad Complutense
Facultad de Medicina

CÁTEDRA DE ANATOMÍA

D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO
CATEDRÁTICO

D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO, CATEDRÁTICO HONORARIO DE ANATOMÍA DESCRIPTIVA Y TOPOGRÁFICA CON SUS TÉCNICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICO: Que los estudios efectuados en la elaboración del Trabajo de investigación realizado por el Licenciado D. Antonio Fernandez Matesanz, base para su Tesis Doctoral, titulada: "Heteroinjertos de Miembros" han sido realizados bajo mi dirección, empleándose para ello el material perteneciente a la Cátedra 2º de Anatomía de esta Facultad, así como los Laboratorios de investigación adscritos a la misma, durante los años 1978, 1979, 1980 y 1981.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid a 28 de Mayo de 1.981.



Universidad Complutense
Facultad de Medicina
CATEDRA DE ANATOMIA

Dr. J. SORRADO PEREZ
PROFESOR ADJ.

DON JUAN SORRADO PEREZ, PROFESOR ADJUNTO DE LA II^o
CATEDRA DE ANATOMIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID.

CERTIFICO: Que los estudios efectuados en la elaboración del Trabajo de investigación realizado por el Licenciado D. Antonio Fernandez Matesanz, base para su Tesis Doctoral titulada: "Heteroinjertos de Miembros" fueron realizados bajo mi dirección en los Laboratorios experimentales de la Cátedra de Anatomía de esta Facultad de Medicina, durante los años 1.978, 1.979, 1980 y 1.981.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid, a 21 de Mayo de 1.981.

Dr. J. SORRADO PEREZ
PROFESOR ADJUNTO
CATEDRA DE ANATOMIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

DEDICATORIA
=====

A mis hijos
Antonio, Cristina y Alberto,
estímulo de éste trabajo.

AGRADECIMIENTO
=====

Obtener la titulación de doctor es noble proyecto que resulta apasionante para cualquier licenciado pero aún más, para quienes hemos hechos humildes andaduras por la investigación y la docencia.

Si bien las aspiraciones, son fruto de un organismo juvenil que se ven pronto frenadas por las antagónicas necesidades profesionales y compromisos socio-familiares que demandan tiempo, dedicación y estudio, la madurez que confieren los años, las circunstancias de la tarea médica habitual y las mismas conjeturas de la actividad profesional, hacen resurgir dichas aspiraciones con más preocupación y entrega, transcurridos algunos lustros.

Una vez decidido a trabajar para la consecución de la Tesis, el primer problema fué la elección del tema, sentando como premisa, su posible originalidad e interés dentro de la multiplicidad de temas que nos proporciona la Medicina actual, y la Anatomía en particular, asignatura y ciencia a la que vengo ligado en diferentes facetas desde 1.954.

La circunstancia y la fortuna de estar adscrito como profesor encargado de curso en la Cátedra II de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, han querido que los trabajos pudieran hacerse bajo la dirección científica, el justo criterio y las personalísimas cualidades que vierten con una total y generosa dedicación a la insigne labor de magisterio e investigación, el Catedrático numerario de la misma, Ilmo. Sr. D. Juan Jiménez Collado y el profesor adjunto D. Juan Sobrado Pérez. Al amparo de su interés y bajo sus inapreciables enseñanzas, consejos

y dirección, emprendimos éste Trabajo de Tesis que ha sido realizado íntegramente en el laboratorio de la Cátedra.

INDICE

=====

	Páginas
I N D I C E	I
AGRADECIMIENTO	II
INTRODUCCION:	
* GENESIS CAUSAL DE LOS MIEMBROS.....	1
* MECANISMO FORMAL DE LOS MIEMBROS.....	12
BOSQUEJO HISTORICO DE LAS TECNICAS DE INJER TOS EN EMBRIONES DE VERTERRADOS	35
MATERIAL Y METODOS	42
DESCRIPCION DE LAS OBSERVACIONES	49
CLAVE DE LAS SIGNATURAS EN LA ICONOGRAFIA..	179
RESULTADOS Y DISCUSION	180
CONCLUSIONES	210
BIBLIOGRAFIA	

I N T R O D U C C I O N



GENESIS CAUSAL DE LOS MIEMBROS
=====

GENESIS CAUSAL DE LOS MIEMBROS
=====

Los dos pares de miembros que caracterizan a todos los vertebrados, comienzan a formarse más tardíamente en los anfibios que en los amniotas, siendo constante en ambas especies, la primera manifestación morfológica un engrosamiento de la "somatopleura lateral" a los somitos y en íntima asociación con ellos.

Es constante también para cada especie, el nivel en que esto tiene lugar, es decir, los somitos a cuya altura se realiza el engrosamiento de la "somatopleura" y de cuyos nervios segmentarios dependerá la inervación.

La proximidad somítica ha hecho pensar que el material integrante procedente de estos, contribuye a la formación de los miembros, aunque ZWILLING, 1.961, afirma que pueden desarrollarse sin su aportación; MILAIRE, 1.957-59, sin embargo, considera que prolongaciones somíticas se introducen en el esbozo de los miembros, contribuyendo al mantenimiento de la clásica teoría emitida por BAER, 1.827.

Poco después de formarse el engrosamiento de la "somatopleura", el epiblasto que lo recubre, y que hasta ahora no podía distinguirse del de las regiones vecinas, se engruesa, hecho éste, debido a que los elementos celulares se hacen columnares o cilíndricos. En las aves y reptiles, SAUNDERS, 1.948-1.957, y en el hombre, DENAAN, 1.959, afecta a la forma de un engrosamiento mamelonado apical pseudo-estratificado; es la cresta apical, disposición que se hace más evidente y mejor diferenciada en la parte media del mamelón del miembro, formando relieve en la superfi-

cie del cuerpo embrionario. Fig. 1.

El mamelón o esbozo del miembro, se alarga estando formado por un recubrimiento epiblastico con "la cresta apical" en su extremo y un corazón mesoblástico; la "cresta apical" sólo existe a este nivel y a partir de ella se diferenciarán la extremidad distal y dedos, Fgs. 2 y 3. La parte central, mesoblástica, comienza a condensarse para formar los precursores cartilagosos de los segmentos esqueléticos, lo que tiene lugar en una secuencia próximo-distal. Fig.4.

La determinación de los miembros es muy precoz; cuando sólo existe un ligero engrosamiento de la "somatopleura", el explante de esta región a coriolatoides o injertada a cavidad celómica, y continuar su desarrollo da origen a un miembro típico, solo un poco más pequeño que el del huésped, MURILLO, 1.963-1.965; JIMENEZ COLLADO-PUCHADES, 1.971-73; Figs.5.

El miembro que se origina es el que corresponde al esbozo injertado; para CHAUBE, 1.959, en las aves, Fig.6, existiría a partir de los estadios de 8 a 11 pares de somitos "36-40 horas incubación", IX-X de HAMILTON-HAMBURGER, una cronología morfogénica o mejor determinación. La determinación de la lateralidad, sólo quedaría fijada en las aves en el estadio XV de HAMILTON-HAMBURGER "80-90 horas de incubación", MURILLO, 1.965; antes de esta fase, el miembro injertado se adapta al lado correspondiente del huésped, pero después de este estadio, un miembro izquierdo trasplantado al lado derecho, se desarrollará como miembro izquierdo. Ello no quiere decir que ya en esta fase se trate de un mosaico, pues es posible obtener miembros bífidos o dobles, si es incidido

el "esbozo presuntivo" en dos partes, según una línea perpendicular al eje del cuerpo. También es posible obtener bifideces de un miembro si se hace una incisión longitudinal entre los somitos y el esbozo del miembro o si se introduce en él una lámina de mica, MURILLO, 1.968, o se injerta un corazón, ORTS LLORCA, 1.969; JIMENEZ COLIADO-PUCHADES, 1.971-1.973. Fig.7.

¿El engrosamiento de la somatopleura que inicia la formación del miembro, se debe a propiedades intrínsecas o es consecuencia de un proceso de inducción?

No poseemos datos objetivos suficientes para aclarar este problema, pero las evidencias más sugestivas provienen de la producción de miembros supernumerarios por medio de inductores anómalos. BALINSKY, 1.929; FILATOW, 1.928; TAKAYA, 1.938, observaron en anfibios como injertos de vesícula ótica o placoda olfativa debajo de la piel, a nivel de la placa lateral del mesoblasto y por tanto en región no presuntiva de miembros, dan lugar con frecuencia a miembros supernumerarios localizados a este nivel. Todo el mesoblasto lateral posee capacidad de reaccionar ante el injerto, que hace de inductor, y dar origen a un miembro. BALINSKY, 1.957, valiéndose de técnicas citoquímicas y microscopía electrónica, llega a la conclusión de que en estos casos, la membrana basal del epiblasto a nivel del injerto no existe y sugiere que este retraso en su delimitación, es el factor inicial en la inducción del miembro al permitir un contacto íntimo e interacción mutua entre epiblasto y mesoblasto, mecanismo que pondría en marcha el complicado proceso de formación del miembro.

No se ha observado ni descrito este mecanismo en el proceso "normal" del desarrollo de los miembros; de igual modo, se desconocen las causas que condicionan la no formación de la membrana basal. Para RALINSKY, 1.929, 1931 y 1.957, la confirmación completa, sólo podría obtenerse mediante destrucciones selectivas de la membrana basal, por lo que ciertas inducciones de miembros, como las obtenidas por NASSONOW, 1.895, mediante injertos de trozos de cartilago bajo el epiblasto de la somatopleura, probablemente por inducción, pone en marcha el mecanismo que conducirá a la formación de un miembro.

El criterio dominante de que el epiblasto del miembro sólo desarrollaba un papel pasivo en su formación, ha sido abandonado a partir de los estudios de SAUNDERS, 1.948, ya que demuestra experimentalmente como la extirpación de la "cresta apical" en embriones de aves, detiene la formación del miembro, en dependencia a su vez del estadio en el que se realizó la extirpación, ya que cuando se realizó en fases precoces falta casi todo el miembro, mientras que cuando se realiza en periodos más tardíos, sólo hay ausencia de las porciones distales. Estas experiencias han tenido una confirmación genética. ZWILLING, 1.949, 1.956 a, 1.956 b, 1.956 c, 1.961, observa en los embriones de las aves, portadores de la mutación "sin alas" como en los homocigóticos, las alas se esbozan normalmente, pero a partir del tercer día, comienza a degenerar la "cresta apical"; cuanto más precoz es la degeneración, faltan más partes distales de los miembros, observándose ausencias completas de las alas cuando la degeneración acontece en los estadios iniciales. Es evidente que la "cresta apical"

ejerce acción o influencia inductora sobre el mesoblasto subyacente. Similares resultados se han obtenido mediante técnicas enzimáticas con las que es posible separar los componentes meso y epiblastístico del esbozo de un miembro -tripsina y verseno-, y cultivar la parte mesoblástica con epiblastos diferentes, obteniéndose resultados de gran interés: el mesoblasto aislado o cultivado con epiblasto "no de miembro", detiene la formación de las estructuras distales. Tampoco se forma miembro cuando se cultivan o ponen en contacto mesoblasto y epiblasto de miembro si este no contiene la "cresta apical". SAUNDERS, 1.948 a, 1.948 b, demuestra la acción inductora de la "cresta apical" para formar estructuras distales, mediante injertos de "cresta apical" en áreas de mesoblasto presuntivo de muslo, observando a los 2-3 días post-intervención la formación a este nivel de dedos y no de estructuras correspondientes al muslo.

Sin embargo AMPRINO y CAMOSSO, 1.959, no aceptan el papel inductor de la "cresta apical" y atribuyen al mesénquima el papel principal, al obtener duplicidades distales de los miembros en experiencias en las que seccionan y aíslan la parte distal del esbozo del miembro superior en los estadios 19 y 26 y la vuelven a colocar "in situ" previo giro de 180°, es decir, colocando la porción craneal en posición caudal y viceversa. En base a sus observaciones, consideran que en condiciones normales, la diferenciación del miembro, tiene lugar según una secuencia "próximo-distal". La inversión cráneo-caudal realizada, entre los territorios proximales y distales, favorecería la formación de una extremidad distal doble a expensas del mesénquima indiferenciado de esta par

te, sometida después de la operación a influencias que se ejercen ahora según un eje cráneo-caudal invertido.

Tampoco KVENY, 1.960, acepta el papel que SAUNDERS, 1.948, y ZWILLING, 1.956, atribuyen a la "cresta apical" en la diferenciación de los miembros. Esta autora injerta mesoblasto presuntivo de miembro, cuyo epiblasto ha sido separado de él por acción del verseno y los sitúa por debajo del área pelúcida en estadios XII-XIV de HAMILTON-HAMBURGER, -60/70 horas de incubación-, 15 a 23 pares de somitos, región ésta que dará lugar a la piel del tronco situada entre los miembros. En muchos casos obtiene miembro supernumerario, por lo que deduce que el mesodermo del miembro es el inductor principal del mismo.

Sin embargo, la importancia de la "cresta apical" para la diferenciación de las estructuras distales de los miembros está experimentalmente confirmada. Cuando se extirpa todo el epiblasto que recubre el esbozo de un miembro y se colocan "crestas apicales" en la cara lateral del esbozo, el crecimiento distal del miembro se detiene, pero las partes heterotípicas cubiertas por "cresta apical", crecen y originan estructuras distales -dedos-; de ello se deduce que cualquier porción de la superficie mesoblástica, incluyendo la base, que normalmente debería formar elementos de la cintura, puesta en contacto con "cresta apical", forma estructuras distales -dedos-. Es más, ZWILLING -1.961-, aporta datos que no sólo demuestran la importancia de la "cresta apical" en la diferenciación de las estructuras depende de la naturaleza del epiblasto. Así cuando mesoblasto de miembro de pollo es recubierto por "cresta apical" de pato, en los miembros quime-

- 8 -

ras que se forman, los dedos están unidos por membranas interdigitales características de pato, especie que proporcionó el material epiblastico.

No sólo la "cresta apical" actúa sobre el mesoblasto induciendo estructuras distales, sino que actúa recíprocamente sobre el apiblasto. Esta acción o "factor de mantenimiento" que ejerce el mesoblasto sobre la "cresta apical", ha sido demostrada mediante reemplazamientos o sustituciones de mesoblasto de miembro por mesoblasto de otra procedencia, por ejemplo, lámina lateral o somitos; en tales casos, la "cresta apical" degenera lo que demuestra que el "factor mantenimiento" es específico y corresponde específicamente al mesoblasto de miembros y no a otro.

La cresta epiblastica al formarse los relieves de los dedos, se fragmenta en varias porciones que cubren la parte apical de éstos. Esta subdivisión, se debe al mesoblasto y no es una propiedad intrínseca de la cresta apical. Ello demuestra que existe un factor en el mesoblasto, al que se debe la persistencia de la "cresta apical" y su actividad, así como su fragmentación en las partes típicas que originarán la estructura del miembro.

¿Pero existe además un factor vascular?. A numerosos investigadores, les ha llamado la atención la formación precoz de un gran vaso marginal, situado en la inmediata vecindad de la "cresta epidérmica apical", en el espesor del mesénquima subyacente, ha hecho pensar si esta vascularización juega algún papel en el crecimiento y diferenciación distal del miembro. CARTER. 1.954 observó grandes variaciones en el tamaño y disposición de este vaso marginal y sus ramas en los miembros de embriones de ratón por

tadores de mutaciones genéticas, tipo luxato mouse y caracterizados por graves anomalías de los miembros. TCHUMI, 1.957, mantiene el criterio de que es la "cresta apical" la que determina el desarrollo y trayecto del seno marginal y éste a su vez, provee al miembro de metabolitos necesarios para su crecimiento, pues cuando la parte apical del miembro es desprovista de su "cresta epidérmica", el mesoblasto degenera rápidamente, al contrario que en aquellas experiencias en que se mantiene y en las que se forma normalmente el seno marginal y continúa el miembro en su desarrollo normal, SAUNDERS, 1.959; Para AMPRINO, 1.958, éste efecto se debe no a la ausencia de "cresta epidérmica", sino a un efecto "necrosante irritativo" del líquido amniótico sobre la porción desprovista de epidermis. De todas formas, podemos aceptar que la "cresta apical" influencia el desarrollo del seno marginal, pero el papel exacto que ejercen estos vasos sobre el desarrollo del miembro no es desconocido, pudiendo pertenecer e integrarse en los factores de "epigénesis trófica de DALCO".

Los miembros se desarrollan según una secuencia próximo-distal. La simple observación precedente de la embriología descriptiva parecía demostrar que los miembros se desarrollaban según una ordenación distal-proximal, es decir, que la porción por la que se inicia el muñon de un miembro representa el material de los dedos, a los que se añadiría secundariamente el pie, pierna, muslo y cingulum.

La Embriología causal no sólo no ha confirmado esta su posición, sino que ha demostrado todo lo contrario, la secuencia próximo-distal en el crecimiento y diferenciación de los miembros

criterio válido tanto en anfibios como en aves. Los experimentos de SAUNDERS, 1.948, consistentes en extirpaciones de cresta en estadios muy jóvenes, demuestran la formación sólo de los elementos correspondientes a la cintura; extirpaciones en estadios cada vez más avanzados, dan origen a estructuras cada vez más distales y las porciones que se forman son las correspondientes a los mapas o territorios prospectivos de los miembros, HAMPE, 1.956.

Sólo MILAIRE, 1.956-1.957, discrepa en relación a los mamíferos y mantiene una secuencia distal-proximal en la diferenciación de los miembros de esta especie.

Si admitimos la secuencia próximo-distal en la diferenciación de los miembros, es evidente que el esbozo primitivo de un miembro no puede ser un "mosáico", pues en estas fases aún no contiene los esbozos de las partes distales, sería como dice ZWILLING, un sistema en desarrollo en el cual las partes distales tienen que ser elaboradas. Por eso, no es extraño que posea una gran capacidad de regulación. Así, cuando el esbozo de un miembro se extirpa, su porción o tercio central por medio de dos cortes paralelos y se ponen en contacto las partes no extirpadas, se desarrolla un miembro completo, con la articulación femoro-tibial si se trata del inferior, mientras que el cultivo de la parte central extirpada origina otra articulación femoro-tibial, WOLFF y HAMBRE, 1.945 HAMPRE y AMPRINO y CAMOSSO, 1.955, han obtenido también regulaciones muy notables en los esbozos de los miembros de las aves, aumentando o disminuyendo el material de un esbozo por medio de injertos y observan como el material disponible es utilizado de tal forma que el resultado es un miembro armónico.

PATRON NEURAL DE LOS MIEMBROS.-

Es ya conocido desde hace tiempo, que cuando el esbozo de un miembro se trasplanta heterotípicamente, autoinjerto, es invadido por nervios procedentes de regiones vecinas del punto en que se injertó. El ejemplo más notable de esto son los injertos realizados por BRAMS y SUZUKI de esbozos de miembros de anfibios en la región cefálica. El miembro se desarrolla y diferencia en esta típica posición y es invadido en muchos de estos casos por fibras nerviosas procedentes del trigémino, que se distribuyen por el interior del miembro siguiendo el patrón que a este le corresponde, es decir, toman la disposición de nervios del miembro superior o inferior según que el esbozo trasplantado fuera uno u otro. PUCHADES-ORTS, 1.968, en injertos homotípicos de esbozo de miembro superior en reboencéfalo y tronco observa en la mayoría de las experiencias como a partir en unos casos del trigémino y en otros del plexo lumbar, emergen nervios que conjuntamente con vasos invaden el injerto por su base de implantación. Mediante la tinción de BIELSCHOWSKI, se observa la distribución de las ramas nerviosas en el interior del miembro, disponiéndose como nervios típicos de la extremidad superior. Fig. 8.



Fig. 1

12



Fig. 2

13'



Fig. 3

13



Fig. 4

13³



Fig. 5

13^h



Fig. 6

135

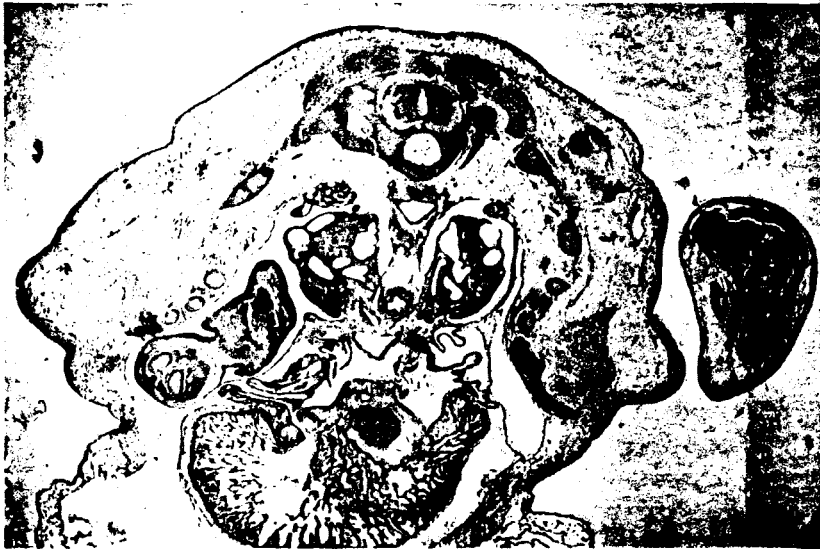


Fig. 7

13^c



Fig. 8

MECANISMO FORMAL DE LOS MIEMBROS

=====

MECANISMO FORMAL DE LOS MIEMBROS
=====

Se ha analizado en el capítulo anterior las teorías existentes en relación con los mecanismos causales de la morfogénesis de los miembros fundadas esencialmente en los resultados de trabajos experimentales realizados en embriones de aves y en un menor número, en larvas de anfibios.

Estas experiencias han llevado a formular conclusiones muy parecidas: la génesis de un miembro implica la intervención de una serie ininterrumpida de interacciones inductoras entre los dos constituyentes primordiales del esbozo apendicular, el meso-blasto y su recubrimiento epiblastico. Estos hechos experimentales han sido agrupados y analizados por ZWILLING, 1.961, en aves y por TSCHUMI, 1.962, en anfibios. Posteriormente, varios investigadores -AMPRINO, 1.956 y CAMOSO, 1.956; NILAIFE, 1.957; MULNART, 1.964; MURILLO, 1.963; PUCHADES-JIMENEZ COLLADO, 1.971-1.973- han completado estos estudios con enfoques y perspectivas diferentes.

Pero ¿cómo se inició un miembro?, esto es ¿cuál es su mecanismo formal?

Antes de la aparición del esbozo del miembro, los territorios sobre los que se va a localizar poseen y manifiestan ciertas propiedades, unas generales, como son las correspondientes a la estructura del tronco, y otras que le son propias y que, o bien las poseen desde el principio, o las van adquiriendo progresivamente a lo largo de la diferenciación del miembro.

TERRITORIOS PRESUNTIVOS

En los embriones de los estadios 13 y 14 de HAMILTON-HAMBURGER, 19 a 22 pares de somitos, la progresión cefalocaudal de los procesos de organogénesis permiten subdividir la región truncal en dos porciones sensiblemente iguales, aunque su estructura sea diferente. Al examen directo, aparece en la porción anterior del tronco, formando relieve a la vez que el mesoblasto lateral se condensa en una cresta, cuyos límites adquieren la disposición de dos líneas sombreadas y paralelas; es la cresta de WOLFF, mejor decir, condensación de la porción dorsal de la somatopleura situada entre los somitos y pared lateral del cuerpo del embrión.

En todos los vertebrados estudiados, -roedores, aves y reptiles-, se localiza a nivel de la cresta de WOLFF una elevada concentración de ácido ribonucleico. Sin embargo, solamente las porciones extremas de la cresta de WOLFF van a diferenciarse como miembro, área miembro-formadora; mientras que la porción intermedia lo va a hacer como estructura propia de la pared del tronco. STRAUSS y RAWLESS, 1.953, MURILLO, 1.963-1.965.

La cresta de WOLFF, se extiende hasta nivel del 17° somito y su límite caudal queda claramente indicado al desaparecer las líneas densas correspondientes al mesoblasto lateral. En la porción posterior de la región truncal, el mesoblasto lateral dibuja a cada lado una placa más densa y de límites imprecisos, que "sobrepasa caudalmente la zona del "nudo" de HENSEN. Por delante de ésta región, el material somítico está segmentado en 2 ó 3 metámeras, más caudalmente, el mesoblasto somítico está aún inseg -

mentado y su integridad morfológica resulta difícilmente respetada por los líquidos fijadores empleados, tanto para el estudio histológico como para el histoquímico.

En embriones de 20 pares de somitos y según los criterios establecidos experimentalmente por CHAUBE, 1.959, el territorio presuntivo del miembro superior, se extiende desde el 14 al 19 somitos, mientras que el correspondiente al miembro inferior, se haya localizado en la extremidad caudal de la región no segmentada, inmediatamente por delante del nudo de HENSEN. No existe propiamente hecho o particularidad morfológica, que permita limitar exacta y precisamente estos territorios, tanto en el examen "in toto", como en los cortes microscópicos.

A lo largo de la porción elevada del tronco y correspondiente a la cresta de WOLFF, el mesoblasto parieto-pleural se encuentra agrupado adquiriendo la disposición de una densa hoja subepiblastica interpuesta entre el mesoblasto intermedio por dentro del surco limitante lateral que separa al embrión de los territorios extraembrionarios, por fuera. Los elementos celulares que forman esta condensación, tienen una morfología muy parecida a los fibroblastos, encontrándose orientados perpendicularmente a la cara profunda de la hoja subepiblastica y presentando un polo citoplásmico profundo en contacto con una capa limitante basal, así como un polo superficial, dirigido hacia el epiblasto y en ocasiones en contacto con esta capa.

Contrariamente a lo observado en los territorios más externos del tronco, la disposición de las células parieto-pleurales en el seno de esta hoja, es francamente desordenado, evo -

cando un proceso de dislocación o cuando menos, condenación previa a una laminación. La conformación y posición de las numerosas células, parecen indicar que han perdido el contacto con la limitante profunda de la región parieto-pleural, adquiriendo en su disposición una forma irregularmente estrellada en el área subepiblastica. Sin embargo, la hoja parieto-pleural de la cresta de WOLFF, posee netamente un mayor espesor en comparación con la correspondiente a la región retro-cardíaca. También su extensión intraembrionaria es de modo similar, más densa que en las áreas extraembrionarias.

La estructuración del epiblasto a este nivel es prácticamente homogénea y al igual que en el resto del tronco, de los dos estratos celulares que lo constituyen, basal y superficial; es la capa basal, la que se caracteriza tanto por la altura de sus células, como por los espacios intercelulares. Desde este punto de vista, tan solo una veintena de células basales dispuestas sobre una capa transversa del territorio suprayacente parieto-pleural, representan al epiblasto presuntivo del miembro.

Morfológicamente hay que destacar las estrechas relaciones existentes entre la hoja parietopleural y los vasos venosos que se encuentran en contacto y en dirección caudocefálica. Se trata de la vena cardinal posterior, por dentro, y la vena onfal_o entérica, por fuera; ésta última se sitúa exactamente en el surco limitante de los territorios embrionarios y extraembrionarios, entre la capa parieto-pleural y el epiblasto.

La distribución del ácido ribonucléico en los esbozos de la región truncal anterior, puede esquematizarse de modo

simple: se presenta con el mismo grado de intensidad en el citoplasma y material nuclear de las células pertenecientes a todas las estructuras del tronco. Las variaciones regionales de la concentración del ácido ribonucléico, sólo son aparentes y están en dependencia a las variaciones de la densidad celular. Una fuerte basofilia caracteriza la región profunda de la hoja parietopleural, en la que se acumulan los citoplasmas profundos de las células mesoblásticas altas. La basofilia relativamente pequeña y estable de la hoja epiblastica, es consecuente al número extremadamente reducido de elementos celulares existentes en el espesor del estrato basal.

Al examinar las mismas estructuras de la región truncal posterior, en la porción que no corresponde a la cresta de WOLFF, y por tanto desprovista de segmentación somítica, aparecen evidente dos diferencias fundamentales: una, la ordenación regular de las células mesoblásticas en la hoja parieto-pleural; y otra, la considerable altura de las células epiblasticas del estrato basal.

La porción intraembrionaria de la lámina parieto-pleural, está configurada a este nivel por un sólo estrato de células altas, alineadas, sin signos de migración superficial. El tamaño de éstas células disminuye gradualmente en los confines de las regiones intra y extraembrionarias, aunque todas poseen un elevado contenido en ácido ribonucléico.

Por todo ello, la cavidad celómica es prácticamente virtual, ya que tan solo muestra una pequeña dilatación en la región truncal anterior.

La capa basal del epiblasto es también pobre en células, sobre todo, al compararse con las de territorios más cefálicos, aunque su tamaño y dimensiones son considerablemente mayores que aquellos.

No existe hecho morfológico alguno, que permita distinguir en los cortes histológicos, territorios presuntivos de los miembros inferiores así como áreas que formarán la región parietal interpuesta entre los dos pares de miembros.

ESTUDIO ENZIMATICO

La fosfatasa alcalina es la enzima que resulta menos específica, ya que se encuentra ampliamente repartida en la mayoría de las estructuras embrionarias. Todos los constituyentes del cuerpo embrionario de pollo, presentan precozmente una reacción positiva, contrariamente a lo que ocurre con los embriones de mamíferos, en los que esta reacción predomina únicamente en los estadios más jóvenes en determinados esbozos, sobre todo en las estructuras inductoras. En la región presuntiva esta actividad se manifiesta con una intensidad variable en las diferentes áreas del miembro del mesoblasto lateral; sin embargo, es aún más pronunciada en la porción parieto-pleural que en la propia esplacno-pleura.

A su vez, la reacción a nivel parieto-pleural es más predominante en los territorios posteriores y menos evidenciable a nivel truncal, existiendo un ligero acúmulo en las áreas presuntivas "específicas" de miembros, -superior e inferior-; Así como

para el esbozo caudal o cola. Conjuntamente y a nivel del tronco, la actividad si bien es menos evidente, se presenta una mayor selectividad en los territorios más internos de la hoja parieto-pleural, territorios, que están más próximos al material somítico segmentado. En las zonas presuntivas de miembros, estos materiales que presentan una mayor actividad, entran en la constitución de la región próximo-dorsal de los esbozos. Por el contrario, la actividad de la fosfatasa ácida, se encuentra poco extendida en las estructuras truncales. Así, la reacción se manifiesta sólo con una cierta intensidad en las capas celulares profundas del tubo neural y notocorda, mientras que es más moderada a nivel somítico. En el área parieto-pleural, solo es localizable en las células subepidérmicas del epiblasto. La selectividad de la reacción de la fosfatasa ácida en el esbozo neural, notocorda y somitos, aparece con una gran nitidez en relación con los territorios menos diferenciados del tronco y el esbozo caudal en vías de diferenciación. En estas regiones de formación más precoz, el mesoblasto de las láminas laterales es inactivo aún, al contrario que en los territorios más diferenciados.

Los lugares de desfosforilización del ATP y del AMP, difieren considerablemente de los glicerofosfatos. En las dos hojas de las láminas laterales así como en la notocorda, se muestra evidente una reacción intensa de ATP-asa. Esta actividad se manifiesta con la misma intensidad en la región truncal anterior y en los territorios posteriores en vías de formación, así como a nivel de las dos láminas mesoblásticas y nudo de HENSEN, lo que demuestra su gran precocidad. En embriones algo más avanzados, 22 a 24 na -

ras de somitos, similar reacción se localiza intensamente en el mesoblasto parietopleural y notocorda, aunque es prácticamente nula en la hoja esplacnopleural. En relación a la actividad desfosforilante de AMP se observa como las láminas laterales son totalmente inactivas y tan sólo la notocorda y la lámina de células germinales del tubo neural, poseen positividad a nivel truncal.

INDIVIDUALIZACION DEL ESBOZO DE MIEMBROS

La individualización morfológica del esbozo del miembro superior se localiza entre las 50 y 56 horas de incubación, embriones de los estadios 14 a 16 de HAMILTON-HAMBURGER, con una variante somítica de 20 a 26 pares. El esbozo del miembro inferior, aparece más tardíamente, embriones de 26 pares de somitos aunque, su crecimiento es más rápido en comparación al miembro superior, ya que en el estadio 17, 30 pares de somitos, ambos esbozos son prácticamente superponibles en superficie aunque no en volumen.

Al examen microscópico "in toto" se observa el esbozo del miembro superior, en embriones de 24 somitos, bajo la forma de una cresta densa situada frente a los somitos 10-18, no extendiéndose aún por detrás del origen de las arterias onfalo-entéricas. Horas más tarde, embriones de 26 somitos, los esbozos muestran una cresta que sobresale del borde lateral de la región anterior del tronco, extendiéndose en sentido craneo-caudal, desde el 11 al 21 somitos y su porción posterior o área de origen, cubre el inicio de la arteria onfalo-entérica homolateral. En estos estadios, los materiales presuntivos de miembro inferior están toda

vía incorporados en la hoja parietopleural condensada de la zona truncal posterior; el espesor a este nivel es marcadamente mayor en comparación con las áreas próximas mesoblásticas.

En los estadios 16-17 de HAMILTON-HAMPURGER, la forma exterior del esbozo del miembro superior no se modifica ostensiblemente, pero el proceso de individualización del mesoblasto laterotruncal se extiende de modo acelerado en los territorios más posteriores del tronco. Es propiamente en el estadio de 28 somitos, cuando se observa con nitidez la cresta de WOLFF, que formará la parte lateral del tronco, porción interpuesta entre los dos pares de miembros. Esta estructura emerge de cada lado, desde la prolongación del esbozo del miembro superior, y se extiende hasta el 25 somito, continuándose hacia atrás y adentro por el relieve del esbozo inicial del miembro inferior, que se individualiza precisamente en este estadio.

En el desarrollo normal, son suficientes tan sólo unas horas para que el esbozo del miembro inferior adquiriera dimensiones netamente superiores a los del miembro superior. Estas diferencias son claramente perceptibles en embriones de 29 somitos; en este estadio, el crecimiento del miembro superior comienza a ser más intenso en la parte media, mientras que la parte caudal se incorpora a la porción craneal de la cresta de WOLFF.

Las modificaciones estructurales que caracterizan la individualización y crecimiento de los esbozos superiores e inferiores, son sensiblemente iguales.

Desde un enfoque citoquímico, los dos pares de

miembros en vías de individualización, manifiestan las mismas propiedades en cuanto a su contenido en ARN y propiedades desfosforilantes a los glicero-fosfatos y ATP; sin embargo, la reacción a la AMP-asa presenta modificaciones espectaculares, que nos revelan la existencia entre los dos esbozos de una importante diferencia relativa al equipamiento enzimático del mesoblasto. Al igual que acontece en los mamíferos, es la aparición de las actividades proliferativas en el mesoblasto parieto-pleural el signo que marca el inicio de la morfogénesis de los miembros en las aves.

Así pues en las fases más precoces de su desarrollo, los esbozos latero-truncales y los territorios presuntivos de miembros, poseen determinadas propiedades citoquímicas uniformemente repartidas. Todo el mesoblasto parieto-pleural es netamente rico en ARN lo que es prueba de una intensa actividad de fosforilante así como de ATP. A estas dos propiedades se asocia más tardíamente la actividad de la fosfatasa ácida que aparece durante la fase de proliferación de esta hoja pero que al contrario de los anteriores, se manifiesta con la misma intensidad en los esbozos de los miembros y en el territorio intermedio de la cresta de WOLFF.

Los estadios que preceden inmediatamente a la individualización de los esbozos, se caracterizan por la existencia de escasas particularidades citoquímicas y estructurales que con carácter regional difieren netamente en las porciones cefálica y caudal de la pared truncal, hecho que refleja en cierto modo, la existencia de un gradiente cefalocaudal que preside la mayoría de los procesos iniciales de la organogénesis, manifestado sobre todo por la traducción de actividades regionales ligadas a la diferenciación ulterior de los territorios que le han sido asignados.

Por ello, encontramos la reacción más intensa de la fosfatasa alcalina en los territorios primitivos y menos evolucionados de la hoja parieto-pleural, así como en todas las áreas presuntivas parieto-pleurales; este hecho se inicia en la extremidad anterior del tronco y progresa rápidamente hacia la porción caudal, sin manifestar desde un principio predilección por

los territorios presuntivos de los miembros.

Si bien en el panorama general de las modificaciones que preceden y acompañan a las primeras fases de la morfogénesis de los miembros, aparecen estos signos, se observa que dos de ellos están íntimamente ligados a la progresión de estos procesos y aparecen simultáneamente, siendo su naturaleza idéntica a nivel del esbozo alar y miembro inferior, aunque se manifiestan en momentos diferentes y con modalidades distintas en los dos territorios presuntivos. Se trata, por una parte, de una aceleración regional de las actividades de crecimiento del mesoblasto parietoneural y de otra, de la adquisición por la materia en vía de proliferación de propiedades desfosforilantes así como de AMP.

El crecimiento mesoblástico evoluciona de una manera muy diferente a nivel alar o de miembro inferior. En el primer caso, las actividades proliferativas iniciales se extienden fuera de los futuros límites del esbozo alar, esto es, parece como si la puesta a punto de los materiales presuntivos alares evolucionaran en su inicio al mismo ritmo que el mesoblasto laterotruncal que lo rodea; por ello, resulta que los primeros esbozos alares macroscópicamente perceptibles, engloban una buena parte de la cresta de WOLFF y sobrepasan en longitud el límite caudal de los territorios alares presuntivos.

Al contrario y a nivel de los esbozos del miembro inferior, la aceleración regional del crecimiento mesoblástico está perfectamente limitada al futuro territorio del miembro, territorio que permite delimitarse muy específicamente. Esta diferencia entre los dos tipos de esbozos, es una consecuencia evidente del

gradiente cefalo-caudal que gobierna la individualización de todas las estructuras truncales. El crecimiento del mesoblasto alar coincide con el correspondiente al mesoblasto latero-truncal circundante, mientras que en territorio del miembro posterior, el mismo proceso surge en un momento en el que la hoja parieto-pleural no ha alcanzado aún el grado de madurez que se presenta en la región anterior del tronco.

En base a las propiedades enzimáticas de los esbozos iniciales del miembro superior, se podría considerar su primera individualización como un fenómeno progresivo en el que la selectividad regional, no precisa nada más que algunas horas para su normal desarrollo.

Sin embargo, el mesoblasto presuntivo de miembro superior, adquiere bruscamente un nuevo equipamiento enzimático que le es propio y que le distingue de una forma evidente de los materiales advacentes de la cresta de WOLFF. La actividad de la AMPasa aparece más tardíamente en el mesoblasto de los esbozos del miembro inferior en vías de crecimiento; pero se manifiesta con una intensidad nítidamente menor que en los esbozos alares; por otro lado, en los dos esbozos pares de miembros y desde su primera aparición, la nueva propiedad enzimática finaliza en los territorios post-axiales de los esbozos, por lo que hasta cierto punto revela la existencia de un metabolismo diferente no sólo a nivel de los esbozos alares y de miembro inferior sino a su vez, en sus constituyentes mesoblásticos post-axiales en comparación a los preaxiales.

Por su distribución, así como por su evidente intensi-

dad en los dos tipos de esbozos esta actividad enzimática parece estar sobre todo ligada al inicio de propiedades morfológicas específicas en el mesoblasto formador de miembro.

Una vez que las células mesodérmicas han perdido su disposición pseudoepitelial primitiva, comienzan a multiplicarse activamente y el mesoblasto neoformado se acumula por debajo del epiblasto adyacente. Las numerosas figuras mitóticas que testimonian esta entrada en fase proliferativa, se observan a niveles distintos de la hojilla pero sobre todo en su profundidad, esto es, cerca de la cavidad celómica y sobre todo del lado dorsal, en donde las imágenes de división son más numerosas.

El crecimiento mesoblástico iniciado en el territorio alar presuntivo, se propaga rápidamente en dirección caudal. Esta progresión aparece claramente si se examinan cortes transversales a diversos niveles de la región del tronco de un embrión de 24 pares de somitos. En este estadio, la cantidad de mesoblasto nuevo formado es máxima en la porción craneal del territorio alar, mientras que disminuye en la porción caudal, de tal modo que es muy escasa a nivel de las arterias onfalo-entéricas y en la futura región en la cresta de WOLFF. La proliferación no ha llegado aún al territorio presuntivo del miembro inferior, en donde la hoja parieto-pleural conserva su aspecto monoestratificado de estadios precedentes.

Algunas horas más tarde, embriones de 26 pares de somitos, el engrosamiento del mesoblasto parieto-pleural ha progresado considerablemente en los territorios alares esto es, miembro

superior, que se presenta bajo la forma de dos esbozos alargados que se prolongan a cada lado el primer rudimento de la cresta de WOLFF. Examinados en cortes transversales, el esbozo del miembro superior aparece constituido por un conjunto homogéneo de mesoblasto muy basófilo, cruzado y ocupado por numerosas lagunas vasculares. Las imágenes de división celular predominan aún en la profundidad del territorio dorsal del esbozo, cerca del fondo de saco externo de la cavidad celómica, por lo que se observa a este nivel, un acúmulo acentuado de ácido ribonucleico citoplasmático.

El examen de los territorios más caudales del tronco nos muestra una discreta proliferación parieto-pleural únicamente a nivel de la zona presuntiva del miembro inferior. La abundancia del neomesoblasto acumulado a este nivel, hace notar un crecimiento netamente más activo que en los territorios más cefálicos de la cresta de WOLFF, hecho éste contrario a lo observado por otros autores, para los que la formación de cresta mesoblástica laterotruncal es uniforme, y en la que los extremos se engruesan para originar los miembros. El mesoblasto presuntivo de los miembros manifiesta en su conjunto una actividad proliferativa más importante que en el resto de esta capa, pero este carácter regional aparece con más nitidez aún a nivel del esbozo de miembro inferior en comparación al miembro superior.

En este mismo estadio, se produce las primeras modificaciones del epiblasto del esbozo del miembro superior; hasta este momento la hoja de revestimiento se encuentra suavemente elevada y dispuesta sobre el mesoblasto subyacente condensado; cuando el esbozo esta ya en vías de formación, se produce una condensa -

ción y aumento sensible en el número de las células epiblasticas basales en la porción de la hoja que tapiza los territorios ventro-apicales del esbozo del miembro.

Los nuevos contingentes celulares aparecidos a este nivel, están encajados en grandes espacios intercelulares que caracterizan la totalidad del recubrimiento epiblastico; esta modificación confiere una tipificación a la región, que adquiere un aspecto compacto así como marcadamente basófilo que lo distingue del territorio dorsal y axial en donde la densidad celular del epiblasto continua prácticamente igual. Los límites estrictos de esta condensación a nivel del esbozo de los miembros superiores, es la primera manifestación epiblastica que anuncia la formación de la cana apical.

Las modificaciones estructurales observadas en el embrión de 26 pares de somitos, se acentúan y concretan a nivel del esbozo rudimentario del miembro inferior, ya que su crecimiento y condensación se hace de modo muy acelerado a la vez que presenta una práctica individualización y caracterización a nivel del 28 y 29 metámeros. El examen de los cortes transversales de un embrión de 29 pares de somitos, sirve para explicarnos la evolución general de las estructuras latero-truncuales. Aunque durante este periodo a nivel del esbozo del miembro superior aparece un discreto enriquecimiento por nuevos contingentes mesoblasticos sin embargo, la simple observación nos muestra un real enlentecimiento en relación con el crecimiento exuberante del mesoblasto del esbozo de los miembros inferiores en estos embriones. Este enlentecimiento es sobre todo más importante en el territorio de la

cresta de WOLFF, en cuyo extremo caudal, el grado de condensación del mesoblasto es prácticamente nulo por lo que el contenido general de las células en ácido ribonucleico, ha disminuido bruscamente y un elevado número de ellas han entrado en picnosis. Esta involución degenerativa del mesoblasto de la cresta de WOLFF, no ha sido prácticamente nunca observada ni descrita en los embriones de mamífero, hecho éste que en las aves nos induce a señalar específicamente tres detalles:

1.- La cresta de WOLFF en una primera fase posee un crecimiento similar a todo lo largo para rápidamente aumentar a nivel del esbozo presuntivo del miembro superior, seguido de otro para el miembro inferior. Estos dos crecimientos hacen que el resto de la cresta de WOLFF parezca absorbida por ellos, por lo que rápidamente se transforma en una condensación fina y lineal llegando prácticamente a desaparecer.

2.- Si bien el esbozo del miembro superior aparece antes y su condensación al principio es más intensa y volumétrica -mente mayor, en cuatro-seis horas, esto es, a lo sumo en dos estadios, el esbozo del miembro inferior no solamente iguala, sino que sobrepasa al esbozo del superior, no sólo en volumen como en su eje transversal, por lo que a partir de embriones de 29-32 pares de somitos, el esbozo del miembro inferior es más claro, evidente y estructurado que el superior. Al igual que en el esbozo alar, la proliferación mesoblástica del esbozo del miembro inferior predomina en la profundidad del territorio dorsal; esta región es por tanto, la de mayor actividad, por lo que presenta una mayor riqueza en ácido ribonucleico y al igual ocurriría con el

miembro alar, la densidad celular epiblastica es mayor en el vértice o punta del sector ventro-apical de la hojilla epiblastica, por lo que esta modificación es a todos puntos, comparable a la observada como inicio de cresta apical de SAUNDERS.

3.- Esbozos constituidos. Estadios 18 a 19 de HAMILTON HAMBURGER, 33 a 40 pares de somitos.

Este periodo del desarrollo corresponde a un hecho fácilmente destacable, cual es el cese de la actividad proliferativa del mesoblasto parieto-pleural, por lo que los dos pares de esbozos adquieren en este momento una configuración que les distinguen netamente de la pared truncal intermedia. Cada esbozo comienza a crecer en sentido próximo-distal y a nivel de los esbozos del miembro superior, el proceso coincide con una reducción en las dimensiones cefalo-caudales de su base de implantación u origen, como consecuencia a la incorporación de los territorios mesoblásticos adyacentes a la cresta de WOLFF. Al igual que en los estadios precedentes, el volumen global del esbozo del miembro inferior es con mucho superior al de los miembros alares.

Iniciado el crecimiento, cada esbozo adquiere la forma de un segmento de disco, en el que se le puede reconocer una cara dorsal y otra ventral, netamente separadas por un borde circunferencial o marginal a lo largo del que se diferencia la cresta apical. A su vez, cada esbozo puede ser dividido arbitrariamente en dos porciones: una paraxial y otra postaxial, situadas a una parte y a otra del eje próximo-distal, línea imaginaria tendida perpendicularmente al neuroeje que pasa por el centro del borde marginal. Observado in vivo esta subdivisión, permite constatar al

final del estadio 18 y sobre todo al principio del 19 el crecimiento de dos pares de esbozos de miembros que tienden a predominar del lado postaxial. Analizado microscópicamente, las principales modificaciones que llaman nuestra atención son aquellas en relación a la formación de la cresta apical. El mesoblasto en vías de condensación, conserva el aspecto de un campo celular homogéneo, en donde nos es difícil precisar la repartición general y la sistematización vascular correspondiente, por lo que la mayoría de las propiedades desfosforilantes que caracterizan al mesoblasto en vías de crecimiento se acentúan y localizan en los esbozos ya constituidos. La individualización estructural de la capa apical se acompaña a su vez, de un aumento sensible de la actividad de las dos fosfatasas.

La estructuración microscópica de los esbozos de los miembros y su capacidad en ácido ribonucleico, son diferentes en los embriones de los estadios 18 y 19 de HAMILTON-HANFURGER.

Al igual que en los estadios precedentes, la cara antinótica de los esbozos de los miembros, es uniformemente convexa manteniéndose subdividida en dos partes: dorsal y ventral por el relieve de la región apical. A su vez, el mesoblasto es denso, y basófilo, salvo en la vecindad de la hoja parieto-pleural en donde las células son menos abundantes; en esta región proximal más laxa, por donde caminan los principales vasos sanguíneos al inicio, muy irregularmente dispersos. La red circulatoria es tributaria de numerosas vías arteriales de origen aórtico y de múltiples vénulas que desembocan ventralmente en la vena encefalo-enterica. En el embrión el territorio presuntivo de la capa apical que cu -

En los estadios anteriores toda la región ventro-marginal del esbozo, se encuentra dispuesto en posición apical, donde se establece la unión entre las porciones dorsal y ventral de la hoja de recubrimiento. Si se compara este hecho con los observados en los estadios 16 a 18, se evidencia como la densidad celular y el contenido en ácido ribonucleico del epiblasto apical, son mayores en la parte postaxial del esbozo que en su región axial.

Esta diferencia es índice de la formación más precoz de la porción postaxial de la capa apical y desde estos estadios en adelante, su transformación es más evidente hacia una cresta aguda o saliente; ello trae como consecuencia, una condensación considerable y muy localizada del número de células, que se localizan en cuatro o cinco capas superpuestas. Al igual que en los mamíferos, la mayoría de las células superficiales, presentan una prolongación citoplásmica delgada y rica en ácido ribonucleico, que se insinúa profundamente hasta contactar con la membrana basal.

En la región preaxial del esbozo en el estadio 19, el epiblasto apical es muy denso y muy basófilo, pero todas las células se encuentran agrupadas en un sólo estrato. Su distribución general, es bastante homogénea, salvo en la mitad postaxial del esbozo, donde la densidad celular tiende a acentuarse en el centro del campo mesoblástico; en el plano vascular lo característico es la aparición de numerosas vénulas satélites de las arterias de procedencia aórtica, que van a drenar gran parte de la sangre hacia la vena cardinal posterior. De igual modo que en los mamíferos, el drenaje venoso por la vía cardinal recoge mayor territo-

rio, prácticamente la totalidad del área postaxial, por lo que es mayor que el territorio de drenaje onfalo-entérico.

A fin de tener un criterio objetivo y personal, no solamente hemos analizado cortes en dirección frontal, con objeto de analizar posibles asimetrías cefalo-caudales que se nos podían haber escapado al examen en los cortes anteriores y así, hemos podido constatar en los esbozos correspondientes al miembro superior, la individualización más precoz de la capa apical del lado postaxial, mientras que para el esbozo del miembro inferior y al contrario, se nos ha permitido analizar la existencia de un enriquecimiento local del campo mesoblástico en ácido ribonucleico; este territorio más basófilo, se encuentra situado precisamente bajo la porción postaxial y recubierto de modo muy individual por la capa apical. Estas modificaciones nos muestran claramente la preponderancia postaxial de las actividades organogénicas, que en su conjunto van a localizarse más precozmente en el esbozo del miembro inferior que en el alar.

En conjunto, en las fases más precoces del desarrollo de los miembros, los esbozos latero-trunciales y sus territorios presuntivos manifiestan ciertas propiedades citoquímicas uniformemente repartidas. Todo el mesoblásto parieto-pleural es muy rico en ácido ribonucleico y es una prueba de una intensa actividad de fosforilante de ATP. A estas dos propiedades, se asocia más tarde la actividad de la fosfatasa ácida, que aparece durante la fase de proliferación de esta hoja, pero se manifiesta con la misma intensidad en los esbozos de los miembros y en el territorio intermedio de la cresta de POLFF.

En los estadios que preceden inmediatamente a la individualización de los esbozos, las otras particularidades citoquímicas y estructurales aparecen con modalidades que difieren nítidamente en las porciones cefálicas y caudal de la pared truncal, por lo que se manifiesta un gradiente cefalo-caudal que preside la mayoría de los movimientos fundamentales de la organogénesis, sobre todo en la producción de actividades regionales ligadas a la diferenciación ulterior de los territorios que están en marcha. Es evidente, por la reacción más intensa de la fosfatasa alcalina en los territorios inmaduros y menos evolucionados del mesoblasto parieto-neural, así como en todas las primeras manifestaciones de su crecimiento, que iniciándose en la extremidad anterior del tronco, progresa hacia su extremidad caudal, sin manifestar ninguna predilección aparente por los territorios presuntivos de los miembros.

BOSQUEJO HISTORICO DE LAS TECNICAS DE INJERTOS
=====

EN EMBRIONES DE VERTEBRADOS
=====

BOSQUEJO HISTORICO DE LAS TECNICAS DE INJERTOS
=====

EN EMBRIONES DE VERTEBRADOS
=====

La técnica de trasplantes ha sido empleada en Embriología experimental a fin de analizar los problemas relacionados con la Fisiología del desarrollo; su aplicación y perfeccionamiento ha hecho posible recabar información en relación con los procesos causales de la Ototenia.

1.- INJERTO EN MEMBRANA CORIOALANTOIDES

La técnica de aislamiento y cultivo de porciones de embriones en membranas corioalantoides, ha sido método practicado hace años, usado frecuentemente ya que en muchos aspectos representa las condiciones adecuadas para el cultivo de tejido, al poseer la membrana corioalantoidea de las aves, un abundante mesénquima rodeado por un estrato ectodérmico -epitelio amniótico- y una lámina endodérmica -epitelio alantoideo-. En el 8º día de incubación, presenta una rica vascularización, por lo que es capaz de incorporar rápidamente a tejidos u órganos a injertar. Los tejidos injertados a partir de este día, encuentran un medio ideal para su cultivo, por lo que se alcanza una diferenciación citológica e incluso histológica completa; sin embargo, la morfocénesis se altera en gran modo, probablemente como resultado de las manipulaciones mecánicas así como de la limitación de espacio y pérdida de interconexiones normales del fragmento o área injertada.

Esta técnica fué usada por vez primera por ROUS y MURPHY, 1.911, para estudiar mediante injertos de sarcomas de rata, su evolución y comportamiento en el embrión de ave. Rápidamente

este método fué adoptado por la mayoría de los embriólogos, y así DACHAKOFF, 1.916; HOADLEY, 1.924; WILLIFF, 1.924, la emplean a fin de analizar las potencias organogenéticas y capacidades de diferenciación de las distintas áreas del blastodermo de pollo en estadios iniciales del desarrollo.

WILLIFF, 1.927, en injertos en corioalantoides de blastodermos "in toto", estadio de prolongación cefálica, observó como el nodo de HENSEN, realizaba un importante papel en la forma de los órganos axiales del embrión; posteriormente y usando idéntico material, HUNT, 1.931, evidencia como esta área no es solamente inductora de órganos axiales y somitos, sino que además condiciona e incide en el normal desarrollo del embrión. PAWLES, 1936-1943; WILLIFF Y PAWLES, 1.935, fragmentan blastodermo en estadios de línea primitiva y de prolongación cefálica en 18 áreas; su cultivo en corioalantoides demuestra como cada una de ellas, sufre una especial histogénesis dando lugar a estructura u órgano específico; ello hizo que se realizara el mapa potencial organogenético de las áreas específicas o "campo embrionario".

No solamente se ha empleado la membrana corioalantoides para analizar y estructurar las capas o áreas específicas, sino que injertos de órganos ya diferenciados, han prendido y su ulterior desarrollo a servido para analizar la incidencia de factores ambientales en su morfogénesis. Esta técnica al principio usada era especie-específica, recientemente ha sido empleada en combinaciones heteroespecíficas; esto es, empleando áreas o estructuras procedentes no de la misma especie de aves, sino incluso de mamíferos.

NICHOLAS y PUDNICK, 1.927, obtienen áreas y tejidos de embriones de rata de 6 a 11 días y los injertan en corioalantoides de pollo de 9 a 12 días; sin embargo, la diferenciación histológica y organogenética en gran número de observaciones es prácticamente anormal. Mejores resultados desde el punto de vista de su ulterior diferenciación en cuanto a material de ratas se refiere, ha sido obtenido por WATTERMAN, 1.937, con tejidos embrionarios de conejo. Con material embrionario humano se ha empleado esta técnica por DANTCHAKOFF y GAGERIN, 1.929.

2.- CULTIVOS "IN VITRO".

WADDINGTON, 1.932, cultivó en plasma sanguíneo grandes porciones e incluso blastodermos íntegros. RUDNICK y SPRATT, 1945 posteriormente, perfeccionaron esta técnica con lo que se logra analizar las capacidades específicas de un área u órgano aislado. Si bien la técnica es sencilla, la supervivencia es corta, por lo que los tejidos no alcanzan marcados grados de diferenciación, sobre todo cuando el cultivo corresponde a blastodermos "in toto", ya que los mejores resultados son cuando son cultivados a partir de fases previas, estadios 4 y 5 de HAMILTON-HAMBURGER, sobreviviendo a lo sumo dos o tres días, fases previas a la aparición de la circulación.

Esta técnica ha demostrado una mayor especificidad en cuanto a la diferenciación y estructuración del área cultivada, ya que los cultivos crecen y se diferencian siguiendo su capacidad v " potencia prospectiva, mientras que en los casos de injertos de corioalantoides, la capacidad prospectiva puede ser en ocasiones modificada o influenciada por las potencias morfo genéticas de lám-

nas o estructuras pertenecientes al embrión receptor. SPRATT, 1946 mediante este método, marca los embriones con partículas de carbón por lo que en ocasiones puede seguir con exactitud los movimientos morfoenéticos. La capacidad de inducción de la línea primitiva ha sido estudiada por WADDINGTON, 1.933-1.934, en experiencias en que porciones de línea primitiva son introducidas en un blastodermo "in vitro". Observa como el trasplante realiza su normal autodiferenciación, mientras que el ectodermo en contacto con él, da lugar a formaciones medulares más o menos típicas; se demuestra mediante esta técnica como el receptor ha "reaccionado y evocado" a partir de un injerto aislado.

Posteriormente SPRATT, 1.949-1.950, y con la finalidad de establecer los gradientes histoquímicos y requerimientos específicos en las etapas del desarrollo, en cultivos de blastodermo "in toto", adiciona carbohidratos específicos a fin de evidenciar en tejidos y órganos los cambios metabólicos y degradaciones dependientes en su morfoénesis y diferenciación.

La técnica de cultivo de tejido ha sido también utilizada a fin de analizar la diferenciación de primordios tisulares. FEIL, 1.939; HARDY, 1.949, la emplearon para estudiar la formación del esternón y la diferenciación y estructuración de miembros.

3.- INJERTOS EN CAVIDAD CELOMICA

HAMPURGER, 1.938, empleó por primera vez esta técnica a fin de analizar la diferenciación de esbozos de embriones de ave. Este método ha demostrado ser el mejor y el más idóneo para

analizar y estudiar los procesos de diferenciación de tejidos a nivel embrionario. Estructuras aisladas son introducidas dentro de la cavidad celómica a través de una pequeña incisión en la somatopléura, próxima a la entrada de los grandes vasos. El estadio ideal para HAMBURGER, vendría a corresponder al 10-11 de HAMILTON HAMBURGER, cuando la porción posterior del cuerpo embrionario yace sobre el vitelo y no está aún cubierto por el amnios.

Los trasplantes prenden fácilmente en pared celómica o en cavidades y es muy frecuente que sufran una rica y abundante vascularización. Los injertos pueden continuar su normal crecimiento durante largos períodos de tiempo e incluso llevar a la eclosión.

Esta técnica ha sido adoptada en el estudio y análisis de los mecanismos formales de la diferenciación y en la génesis causal de muchas de sus estructuras y usada por RAWLFS, 1.944 - 1.945, quién la emplea a fin de estudiar el patrón pimentario de la piel. AMPRINO, 1.952-1.964, analiza los mecanismos causales de la diferenciación de los miembros; MURILLO FERROL, 1.952; ORTS LLOPÇA, 1.969-1.970, JIMÉNEZ COLLADO, 1.971; JIMÉNEZ COLLADO-PUCHADES ORTS, 1.977, la utilizan en injertos homo y heteroespecíficos de áreas y estructuras en fases precoces del desarrollo, analizando los mecanismos causales de su diferenciación a la vez que tratan de obtener información de los procesos normomorfogenéticos y su posible alteración.

Es evidente que esta técnica, ha sufrido modificaciones y adaptaciones por los diversos investigadores que la emplean y sobre todo en dependencia al material usado como injerto. No

obstante AMPRINO, 1.968 y JIMENEZ COLLADO, 1.965, han realizado una ingeniosa modificación, consistente en refrigerar el huevo receptor, con lo que al producirse un calentamiento de la corriente, que a veces llega incluso al paro circulatorio, disminuye la hemorragia, factor causal y mayor índice de los fracasos operativos. También mediante heteroinjertos heterocrónicos entre especies con diferente volumen nuclear y empleando marcajes con isótopos radioactivos, preferentemente timidina tritiada, se ha podido estudiar y evidenciar las capacidades de regulación, dependencia y adaptación de estructuras en distinto grado de diferenciación, ORTS LLORCA-JIMENEZ COLLADO, 1.967.

Una ventaja que presenta esta técnica es que el injerto cuando prende en cavidad celómica, crece fácilmente ya que no tiene impedimento mecánico que impida su desarrollo y diferenciación.

MATERIAL Y METODOS
=====

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de las experiencias objeto de este Trabajo de Investigación base de nuestra Tesis Doctoral, se han utilizado embriones de pollo de la raza LEGHOP-CORNICH, así como embriones de codorniz, COTURNIX COTURNIX JAPONICA. Los embriones receptores, -embriones de pollo- seguían su proceso de incubación en estufa de cultivo a temperatura uniforme de 38°C con control automático de humedad y ventilación, hasta haber adquirido un desarrollo idóneo para la intervención que en ellos se iba a realizar. Seguidamente los huevos eran retirados de la estufa de incubación y siguiendo el proceder habitual de F. WOLFF, se les practicaba una pequeña ventana en el polo agudo, por la que se retiraban dos centímetros cúbicos de albúmina; con esta maniobra se despegaba el disco embrionario o embrión -dependiendo del estadio-, de la membrana coagular, cara interna, en su punto de máxima convexidad con lo que se podía maniobrar mucho más fácilmente en la apertura del huevo.

Una vez cerrado el polo agudo, se practicaba una ventana aproximadamente de 2 x 3,5 a 4 centímetros en el culmen o punto de mayor convexidad del huevo; bajo el mismo, habitualmente se encontraba el disco embrionario o embrión. Una vez localizado el espécimen y observado el estadio evolutivo era nuevamente cerrado con una lámina transparente de Microfilm de 0,5 mm. con lo que al ser reintroducido en la estufa de incubación, podía seguirse su cronología evolutiva y ser retirado en el momento más idóneo y apropiado para la intervención.

Los huevos dadores, procedentes de codorniz, eran colocados en estufa con idéntico proceder técnico, esto es, manteniendo una temperatura constante de 38°C y control automático de humedad y aireación. Una vez llenado el estadio deseado, control que se realiza mediante la escala de ZACHEI, eran abiertos en un recipiente previamente preparado con líquido de TYRODE ó GEY a temperatura ambiental, 22 a 26°C. Liberados de albúmina, eran cortados por el ecuador, aislados de la mayor cantidad posible de vitelo y llevados a un salliers, en donde en líquido de TYRODE o GEY son limpiados por su cara ventral de los granos de vitelo aún residuales, seguidamente se les extirpa el esbozo presuntivo del miembro superior, material que nos servía como porción dadora a injertar.

Aislado el material a injertar, es transportado en microcucharilla o bien mediante micropipeta al embrión receptor, 5, en el que previamente se le había realizado una incisión con microhisturí de Tungsteno, afilado a la llama oxidante con un diámetro de 1 a 1,5 micras, a nivel de la raíz del miembro superior, según técnica habitual, JIMENEZ COLLADO-PUCHADES, 1.976. Fig.9

Para los embriones receptores, los estadios óptimos de su desarrollo estaban comprendidos entre el 12 y 17 de HAMILTON HAMBURGER. Los estadios ideales empleados para la extirpación del esbozo del miembro en los embriones dadores, -codorniz-, eran los comprendidos entre los estadios 8 a 10 de ZACHEI.

Una vez realizado el injerto e introducido en profundidad el material dador, se cierra el huevo con una nueva película de Microfilm de 0,5 mm. de espesor, siendo reintroducido en la es

tufa de cultivo en la que se mantenía su incubación hasta el estado del desarrollo por nosotros deseado. Generalmente los embriones son sacrificados al tercer, cuarto o quinto día post-intervención; esto es, cuando el embrión había llegado a los estadios 28-38 de HAMILTON HAMBURGER, estos estadios por nosotros fijados se basan en que generalmente el injerto ha adquirido ya el máximo de desarrollo y ulterior estructuración, a la vez que las porciones en él diferenciadas, presentan ya una morfología característica.

Las intervenciones quirúrgicas realizadas en embriones de aves a partir del 4° día de incubación tienen el peligro de hemorragia; a veces, muy localizadas, pero que suelen producir la muerte del embrión en un corto periodo de tiempo, disminuyendo así la eficacia y por ende, la viabilidad en los resultados de las experiencias a realizar.

A fin de obviar este inconveniente, hemos empleado un proceder técnico que consiste en una variante al método de AMPRINO, 1.969. La variante propuesta y realizada por JIMENEZ COLLADO, 1.969, se basa en una pseudo-hibernación, puesto que consiste en sacar el huevo al que se le va a realizar la intervención, -huevo de pollo receptor-, una hora antes de ser operado, para ser introducido en nevera regulada a una temperatura de 10 a 14°C. En ésta se mantiene hasta escasos minutos antes de realizar la intervención.

Una vez efectuado el injerto, es nuevamente introducido en nevera durante media hora e idéntica temperatura, 10 a 14°C pasado este tiempo, se saca y colocado en su soporte se mantiene

a temperatura ambiental de laboratorio para un lento y progresivo recalentamiento. Una vez recalentado, generalmente 20-30 minutos, es reintroducido en la estufa de incubación de modo habitual y normal.

El por qué de esta pseudo-hibernación está en dependencia al factor vascular; al poseer el embrión de pollo en los estadios XIV a XVIII de HAMILTON HAMBURGER un vaso axil-arterial principal del esbozo del miembro originada a partir de un abundante plexo capilar, es frecuente que al incidir sobre esta área, se produzcan hemorragias, que oscilan y están en dependencia con el desarrollo vascular, entre una dispersión hemática o una continua y rítmica expulsión de sangre en paralelo a los latidos cardíacos. Mediante la refrigeración, o pseudo-hibernación, el corazón prácticamente deja de latir, ya que escasamente podemos objetivar de 1 a 4 latidos por minuto; la circulación por tanto, es lenta y el estancamiento sanguíneo si bien, es mayor al producirse una marcada y gran vasoconstricción, hace que la intervención y el mecanismo de introducción del injerto sea prácticamente exaquo. Evidentemente si de modo rápido se recalienta el huevo, no solamente se produce una vasodilatación, sino que los mecanismos reguladores de la tonicidad vascular embrionaria, sufren una marcada alteración, por lo que se condiciona un proceso de vasoplejia. Por ello la necesidad de nuevamente refrigerar o mantener la pseudo-hibernación durante un tiempo que se ha venido a demostrar que transcurrido, no se produce status hemorrágico, ya que por los mecanismos tisulares de coagulación, se han cerrado las bocuillas capilares, con lo que prácticamente la causa del fracaso más habitual,

la hemorragia, queda subsanada.

Previamente a la intervención así como a la limpieza y colocación, tanto de los huevos dadores, como receptores, y de un modo discontinuo, pero con una periodicidad de 6-9 horas, son encendidas lámparas germicidas en el laboratorio durante periodos de 15 minutos; de este modo, la segunda causa del fracaso y manipulación de estructuras embrionarias, infección, prácticamente queda obviada, puesto que en todas las experiencias por nosotros realizadas, no ha existido ningún proceso de contaminación o infección por hongos que tan habitual es en estos medios de trabajo

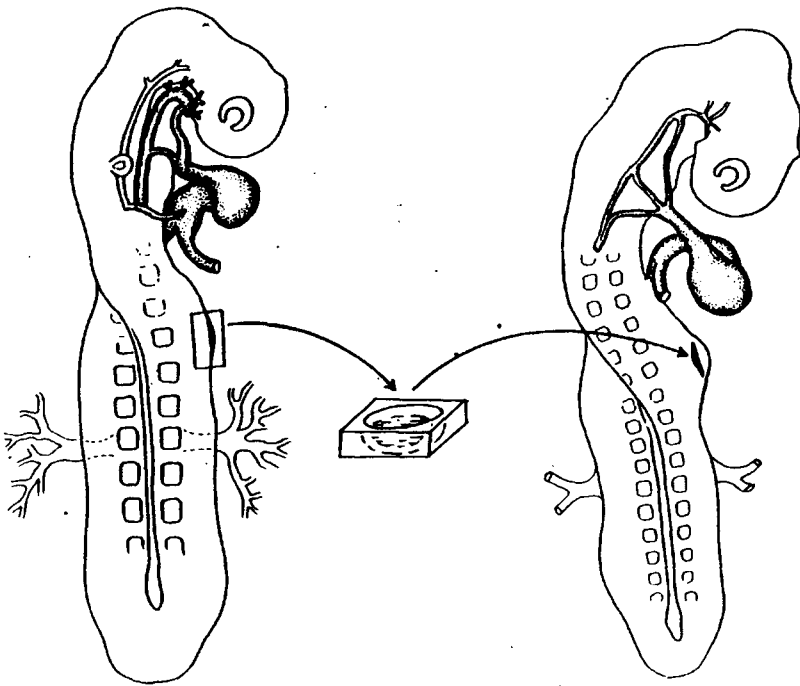
La evolución postoperatoria de los embriones intervenidos experimentalmente era controlada de modo periódico, por lo que al alcanzar en su desarrollo el estadio deseado, eran fijados vivos en Formol Neutro al 10%. Los embriones así fijados y mantenidos durante 2 a 4 días, son incluidos según técnica habitual del laboratorio, en parafina para su ulterior manejo en microtomo, en el que se realiza de modo constante cortes seriados a 10 micras de grosor, en planos de sección frontal o transversal. Posteriormente, los cortes son teñidos con las técnicas también habituales Hematoxilina-Fosina, -variante de JIMFNEZ COLLADO-, AZAN, VAN - GIEMSON y a veces de modo específico, mediante proceder en bloque de BJELCHOWSKI.

Para este trabajo de Investigación, base de nuestra Tesis Doctoral hemos operado 150 huevos; los iniertos realizados han consistido en esbozo o área presuntiva de miembro de embriones de codorniz de los estadios 8 a 10 de ZACHET.

La supervivencia obtenida ha sido del 72%, 108 embriones, de los que en el presente estudio, hemos descrito 7 que presentan los caracteres más numerosos y frecuentes de los 4 grupos en que hemos sistematizado nuestros resultados, y ello en base a: que esta sistematización se ha realizado en dependencia, no sólo de las estructuras derivadas a partir del injerto, sino del material que fué injertado, su estadio y cronología y en especial a la localización del área intervenida. Por ello, está es la razón que nos ha hecho describir uno o a lo sumo dos especímenes de cada grupo. Es evidente que la agrupación o unificación total es imposible hecho éste lógico en todo proceder experimental en el terreno biológico; sin embargo, la similitud en un alto grado de coordenadas previamente condicionadas, nos ha facilitado su codificación y agrupamiento.

A fin de completar el estudio para tener una clara visión espacial, se han realizado varias reconstrucciones por los métodos tridimensionales de BORN y topométrico de AURROUX; de este modo, hemos tenido un más claro conocimiento de las relaciones y topografía del injerto. Evidentemente estos métodos nos han permitido objetivar de manera clara y precisa la existencia de una formación desarrollada a partir del injerto, que si bien no posee una compleja morfología, si nos muestra una disposición que en determinados casos, se asemeja a los astadios controles.

1863



Esquema de la intervención.

Fig. 9.

DESCRIPCION DE LAS OBSERVACIONES

=====

GRUPO I

Embrión	Estadio dador ZACCHI	Estadio Receptor HAMILTON HAMBURGER	Fijación post-inter- vención HAMILTON HAMBURGER	Grosor Cortes	Coloración
M-116	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C- 60	13	17	27	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C- 2	12	18	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SP- 1	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SP- 2	13	17	27	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SP- 5	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
R-101	12	16	27	10 Micras	Hematoxilina Eosina
S- 4	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 54	12	17	28	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 63	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 69	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 80	12	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 12	12	17	28	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 1	12	17	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina

GRUPO I

Modelos descritos:
=====

* M-116

dador: estadio 12 de Zacchei.

receptor: estadio 17 de Hamilton Hamburger.

* C-60

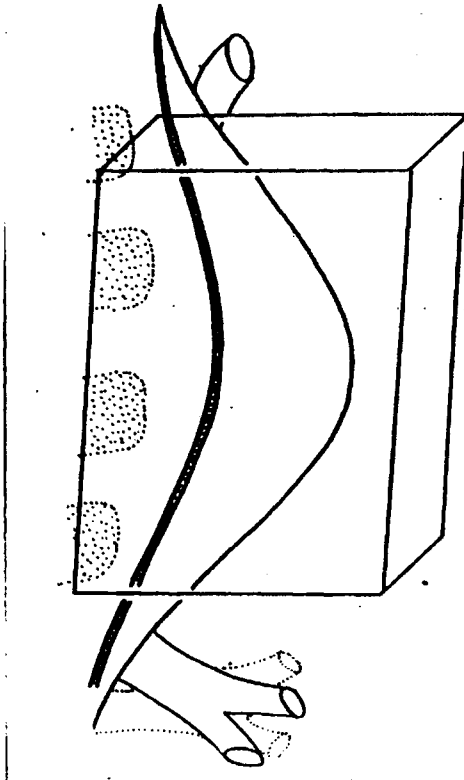
dador: estadio 13 de Zacchei.

receptor: estadio 17 de Hamilton Hamburger.

* C-2

dador: estadio 12 de Zacchei.

receptor: estadio 18 de Hamilton Hamburger.



Representación esquemática del material injertado.

GRUPO I: EMBRION_M-116

EMBRION M-116

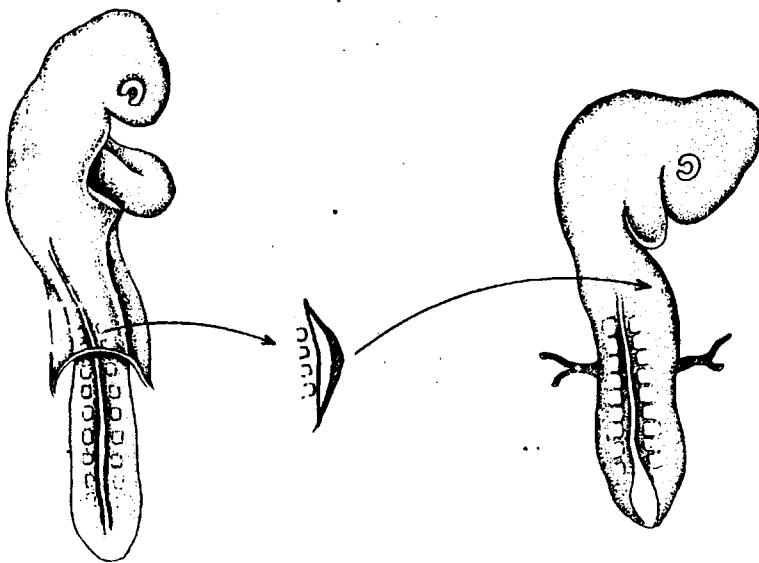
Protocolo
=====

*dador: estadio 12 de Zacchei.

*receptor: estadio 17 de Hamilton Hamburger.

*Material Injertado: se injerta esbozo de miembro superior derecho y mesodermo paraaxial.

*Fijación: se fija vivo en estadio 26 de HAMILTON HAMBURGER.



El injerto ha prendido en la pared dorsolateral de la cavidad celómica lateral, a la aurícula del lado derecho y en la raíz del miembro superior de este lado.

La base de implantación es muy amplia, de modo que en los cortes más craneales, da la impresión, debido a la oblicuidad de ser un engrosamiento de la pared celómica; sin embargo, llama la atención dos formaciones dispuestas transversalmente, Fig. 10, que van a delimitar entre sí un ángulo abierto hacia dentro, que corresponden a escápula y caracoides. De estas dos estructuras sólo se observan tres fragmentos, de tal modo que las dos anterolateral representan a escapular y el medial y posterior a coracoides. Entre estas estructuras se delimita un espacio ocupado por masa muscular individualizada, así como una gruesa formación vascular. Es interesante señalar la presencia de un nervio raquídeo originado en el receptor, que discurriendo tangencial a la base de implantación del injerto, se dirige en dirección al miembro superior derecho, al que llega y por el que se distribuye, no evidenciándose ninguna rama, o fibra que penetre en el injerto, hecho esto de gran interés, habida cuenta que en él, se han diferenciado fibras musculares que adquieren un grado y estructuración similar a las del receptor. Rápidamente y en cortes más caudales -Fig. 11a, b- los dos núcleos anteriores se fusionan, dando lugar a una estructura laminar en hoja de sable típica de escápula, pudiendo incluso observar en ello -Fig. 11b- formación muscular que originada en su cara convexa se dirige lateral y caudalmente a una pieza cartilaginosa que hará su aparición y que corresponde a

húmero. En la concavidad de la escápula se observa la presencia de un abundante y aparentemente desorganizado tejido mesenquimal conteniendo 2 formaciones vasculares, una de ellas, rodeada de adventicia. En la porción medial del proceso coracoides aparece una nueva condensación cartilaginosa, con la que se articula mediante dos superficies perfectamente estructuradas, incluso delimitándose cámara articular, y que corresponde a la porción lateral de la clavícula. A este nivel, un grueso nervio raquídeo procedente del receptor se dirige al miembro superior y al igual que en cortes precedentes, pasa tangencial a la base de implantación del injerto, sin ceder o intercambiar fibras. Escasos cortes en dirección caudal, escápula y proceso coracoides se unen, forman la típica orquilla, Figs.12 y 13, la clavícula aparece cortada en mayor extensión y en su cara inferior se observa nítidamente el grueso vaso arterial antes descrito, disposición ésta típica.

En dirección caudal, Fig.14, el injerto presenta un alto grado de diferenciación en las estructuras cartilaginosas, siendo superponibles a la del receptor. La coracoides va desapareciendo a la vez que el extremo lateral de la escápula aumenta de grosor, apareciendo una superficie articular. Rápidamente, Fig 15,16a,16b la extremidad lateral de la escápula aumenta de grosor, a diferencia de su extremo medial que va adelgazándose, de tal modo, que en el corte más inferior, Fig.16b, aparece su borde medial unido al resto de la escápula por una banda de mesénquima precartilaginosa. Es precisamente a este nivel cuando el epitelio de recuperación del injerto en su porción más ante -

rior se engruesa, adquiriendo una disposición prácticamente superponible con el extremo rostral del miembro del receptor. La porción engrosada de la escápula presenta una superficie lisa y recubierta por una lámina de mayor consistencia que el resto; a su vez, está rodeada por una voluminosa masa muscular diferenciada, ricamente vascularizada, que forma conglomerados o grupos musculares en todo idénticos a los observables en los miembros del receptor. La amplia red vascular, ya estructurada con vasos con adventicia y envoltura mesénquimal, se encuentra dispuesta en la concavidad de la orquilla inmediatamente caudal a la clavícula, estructura que a este nivel ya ha desaparecido.

En dirección caudal, Figs. 17, 18 y 19, el injerto sufre una evidente diferenciación a nivel de la escápula en la que, sólo queda visible su borde superior y lateral o engrosado. Aparece una nueva estructura cilíndrica que se articula con la cavidad lateral de la escápula; entre ambas estructuras se delimita una cavidad articular con interzónula en la que incluso, Fig. 19, puede delimitarse una condensación marginal que representa a la cúpula articular. Rodeando a estas estructuras aparece una condensación de blastema muscular en idéntico grado de estructuración a la del huésped: medial a ella aparecen gruesas formaciones arteriales así como linfáticas y espacios libres vacuolares de origen mesénquimal.

A lo largo de toda la serie, no aparecen formaciones nerviosas; sin embargo, entre los vasos de la pared celómica del receptor y los del injerto se establecen gruesas anastomosis. / Mayor aumento, algunos elementos formes poseen morfología típica

de codorniz.

En dirección caudal, Fig. 20 , la masa cartilaginosa de la escápula disminuye, aumentando la correspondiente al húmero, observándose aún la disposición articular; sin embargo, Figs. 21a, 21 b , rápidamente la porción humeral aumenta, a la vez que en la masa del injerto aparecen dos modificaciones:

* El pedículo de fijación desaparece quedando el injerto libre en cavidad celómica.

* El injerto por la presencia de una marcada incisura se estructura en dos bloques o porciones:

A) Lateral, en cuyo espesor se localiza y estructura el húmero rodeado por blastema muscular altamente diferenciado.

B) Medial, formada por una evaginación sin estructura en su interior ocupada por mesénquima indiferenciado y que en la reconstrucción planimétrica viene a corresponder a la porción más inferior del área cingular primeramente diferenciada en el injerto.

Es evidente que en el injerto se han establecido dos áreas, una medial correspondiente a la cintura, que disminuye y desaparece cuando las estructuras lo han en dirección caudal, y otra lateral, que al contrario progresivamente aumenta de tamaño, a la vez que el húmero y las estructuras del antebrazo la ocupan y representa la porción distal o alar del miembro.

Rápidamente y en dirección caudal de la formación humeral, solo se secciona su extremo distal, por lo que el bloqueo o

masa lateral disminuye de tamaño; la porción medial adquiere un secundario pedículo de fijación al mesonefros, presentando una completa indiferenciación en su contenido ya que, no observándose estructura con tipicidad muscular y aún menos cartilaginosa, Fig. 22, Por el contrario, el extremo distal de la masa lateral, Figs 23 y 24, presenta una evidente tipicidad habida cuenta que:

* Aparecen gruesas condensaciones musculares encapsuladas y en las superficies teóricamente dorsal y lateral del húmero

* La porción distal se va aplanando a la vez que aparece una interzona mediante la cual se establece un área articular para formaciones cartilaginosas situadas condicionalmente.

* Aparecen formaciones vasculares llenas de contenido hemático algunas de ellas, en puntos próximos al cartilago y que recuerdan a estructuras vasculares del ala.

* Rodeando esta masa existe un epitelio de recubrimiento en el que en su extremo más rostral se evidencia epitelio poliestratificado.

El injerto ya situado a nivel del hígado, Figs. 25 y 26, y separado de la masa ventricular por una lámina pericárdica fibrosa y continua, presenta dos marcadas variaciones en relación a cortes anteriores:

* La masa medial y dorsal disminuye rápidamente de tamaño de modo que inicia un proceso de reducción y fragmentación.

* En el extremo más anterior de la masa lateral ocupada por las formaciones cartilaginosas y diferenciadas, el húmero

en fase cartilaginosa similar a las estructuras del huesped, se halla rodeado de formaciones musculares que por su disposición se asemejan a las localizadas en el área de transición entre porción de húmero y ala. Esta disposición se mantiene, de tal modo, que en los cortes últimos el injerto situado en la cara lateral, Figs. 27 y 28, del hígado, en la que grava una marcada huella, está constituido por una condensación cartilaginosa sin morfología típica, rodeada de acúmulos blastemáticos musculares desorganizados y ampliamente vascularizados, y todo ello en el interior de un saco o formación sacular.

A lo largo de toda la serie no se evidencia formación nerviosa en el interior del injerto; sin embargo, nervios raquídeos del huesped se sitúan próximos o en la base de implantación del injerto, sin introducirse o ceder fibrillas en el injerto. Esto es más evidente habida cuenta que en ocasiones al ir acompañadas por formaciones vasculares, éstas sí se anastomosan con formaciones vasculares del injerto.

Fig. 10

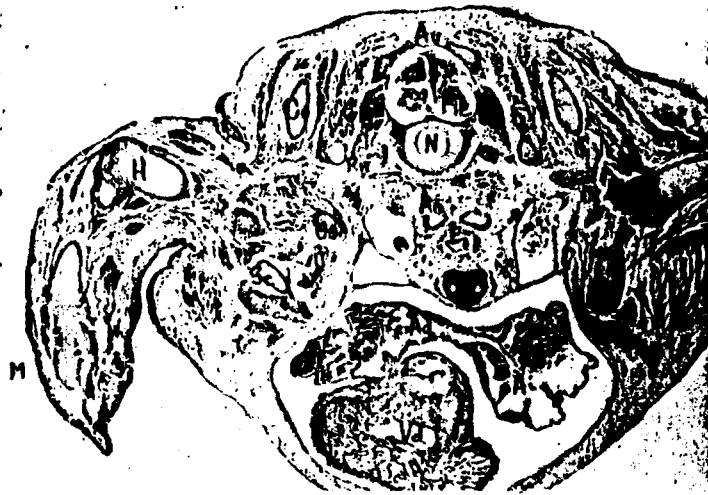


Fig. 11a



Fig. 11b





Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14

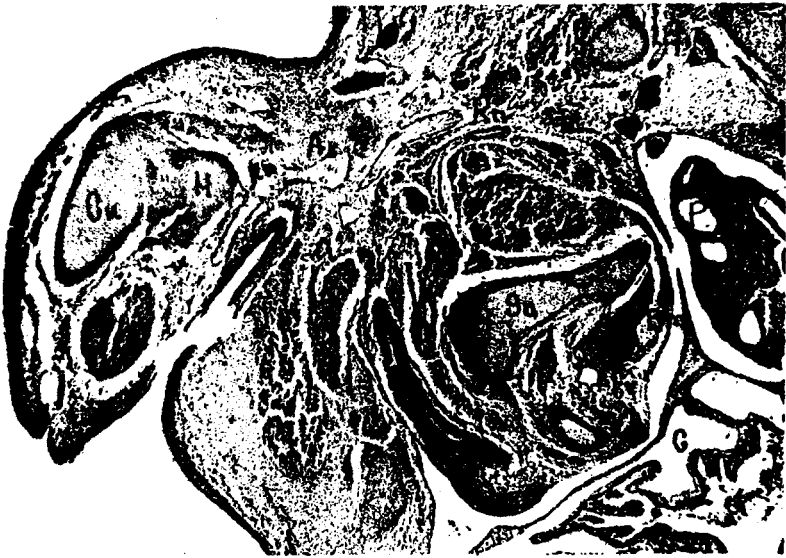


Fig. 15



Fig. 16a

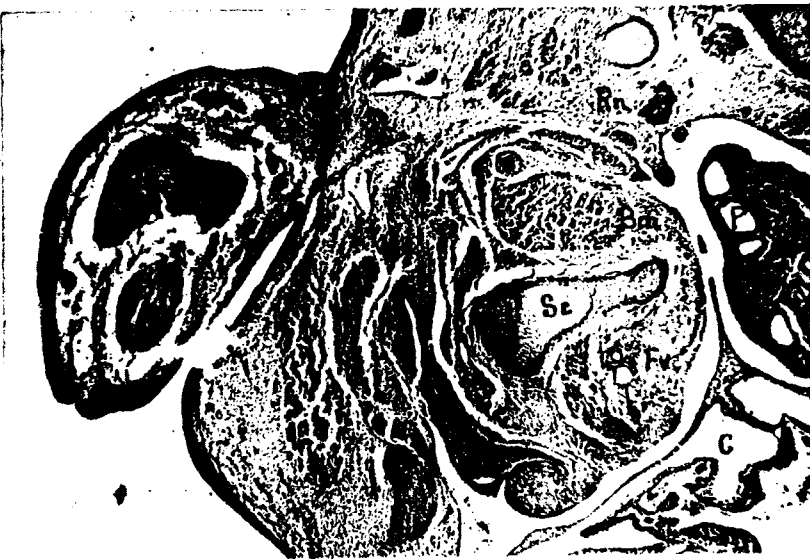


Fig. 16b



Fig. 17



Fig. 18



Fig. 19

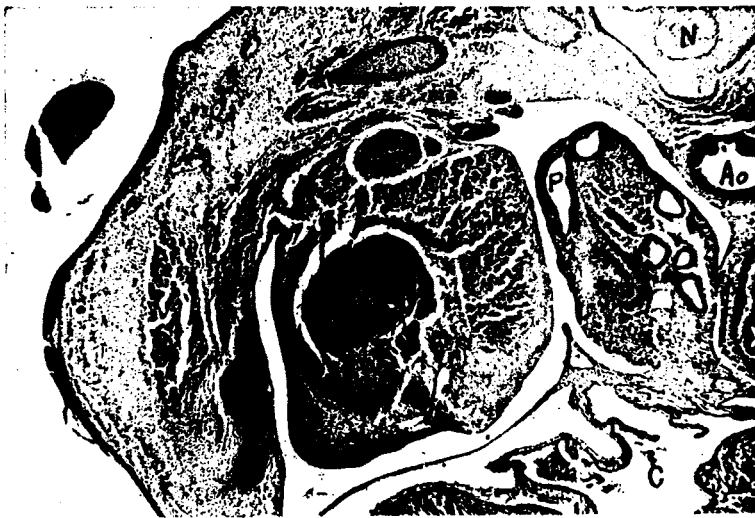


Fig. 20

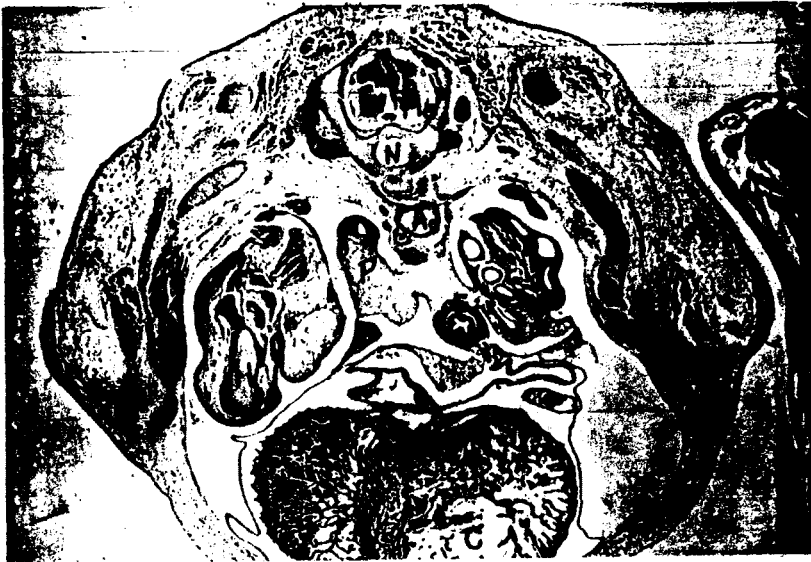


Fig. 21



Fig. 22



Fig. 23



Fig. 24



Fig. 25



Fig. 26

70

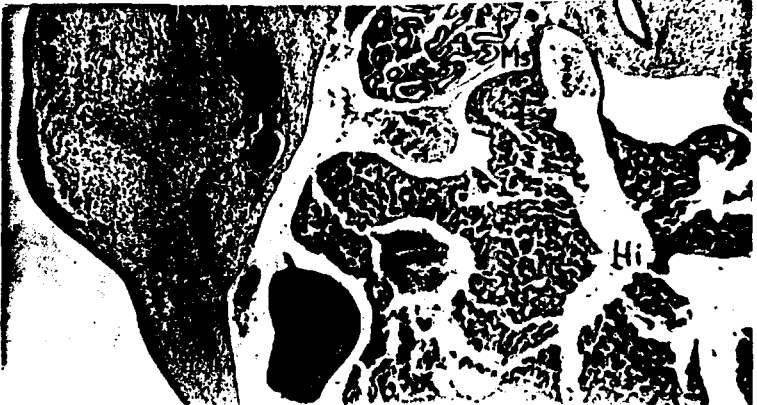
Fig. 27



Fig. 28



Fig. 29



- 71 -

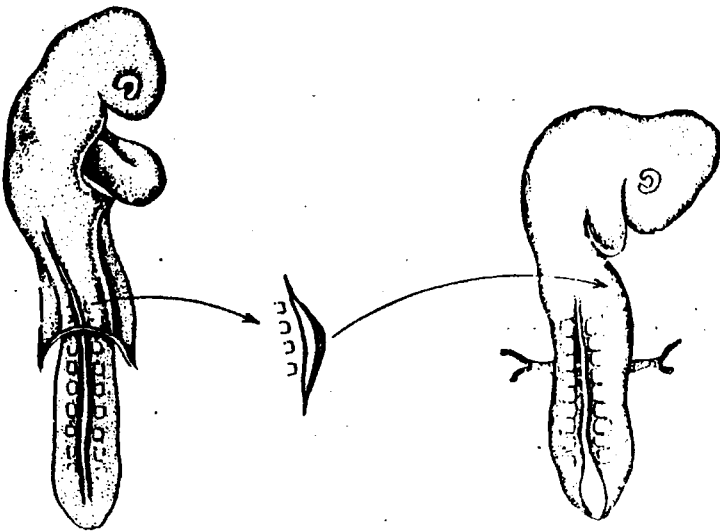
GRUPO I: EMBRION C-60
=====

“

EMBRION C-60

Protocolo

- * **dador:** estadio 13 de Zacchei.
- * **receptor:** estadio 17 de Hamilton Hamburger.
- * **Material Injertado:** se injerta esbozo de miembro superior y mesodermo paraaxial.
- * **Fijación:** se fija vivo en estadio 27 de Hamilton Hamburger.



El injerto ha prendido en la pared interna de la cavidad celómica a nivel de la base de implantación del miembro superior derecho, que muestra una discreta hipoplasia aunque en él se ha diferenciado una cresta apical de SAUNDERS, bajo la cual aparecen un mesodermo sin grado de organización y aún menos condricificación, por lo que los elementos osteoarticulares muestran un marcado grado de indiferenciación. Figs.30a y b.

El injerto hace cada vez más relieve en cavidad celómica, relacionándose a distancia con esófago y bronquios de los que se encuentra separado por una vena cardinal así como por los grandes troncos de salida cardiacos a través de una lámina continua de pericardio.

En el injerto se ha diferenciado una lámina escapular en la que incluso se observa una atípica cavidad articular para el húmero, rodeada por una voluminosa masa muscular, que en parte se une a la procedente de la raíz del miembro receptor. No se observa raíz nerviosa a este nivel, a diferencia con el miembro heterolateral en el que aparecen fibras nerviosas originadas de un nervio raquídeo, discurriendo entre las fibras musculares del miembro y que interpretamos como nervio mediano.

Inmediatamente y en dirección caudal la formación ósea diferenciada en el injerto se aplanan, apareciendo una interzona, disposición atípica correspondiente a la interlínea articular escapulo-humeral, figs.31a y b, que posee escasas áreas de vacuolización, dando impresión de haberse establecido una sinartrosis escapulo-humeral.

Es importante destacar:

1.- La masa muscular diferenciada a partir del injerto adquiere estructuración en todo lo similar a la del receptor.

2.- En la zona latero-marginal o base de implantación del injerto se observa como una gruesa arteria y varias venas procedentes del receptor, que interpretamos como arteria humeral, que da origen a un grueso tronco, introduciéndose en plena masa muscular diferenciada del injerto.;

3.- A diferencia con el miembro contralateral, no se observa fibra radicular, no sólo del miembro diferenciado sino tampoco procedente de la médula del huesped. Este hecho es aún más demostrativo a nivel de la base de implantación, en la que sólo se aprecian vasos y espacios posiblemente linfáticos.

El húmero diferenciado, fig. 32 a, es atípico ya que fig. 32 b, presenta una convexidad medial a la vez que posee mayor grosor que el normal; su grado de condricificación es prácticamente superponible a embriones controles de idéntico estadio, encontrándose rodeado por una masa muscular que si bien adquiere un grado de estructuración avanzada, no presenta tipicidad en su distribución ni laminación. El epiblasto recubre el extremo libre del injerto, presentando una condensación, que por su disposición es la típica en la raíz de un miembro control de los estadios 12 a 14 de ZACCHEI.

Es precisamente a este nivel, figs. 33a y b, donde se inicia una invaginación, o mejor incisura, mediante la cual el injerto se encuentra excindido en dos porciones: una mayor, latero-cra

neal en la que se localiza el húmero diferenciado, así como la mayoría del blastema muscular, mientras que en la otra, medio-caudal, y regular en su recubrimiento epiblastico, se haya ocupado por un mesénquima indiferenciado denso y sin apenas disposiciones vasculares. La raíz del injerto se ha separado de la pared celómica, implantándose ahora a nivel del meso o tabique pleuropericárdico, por lo que a través de él, se relaciona dorsalmente con el pulmón derecho, mientras que ventralmente lo hace con la orejuela -fig.

La bifidez del injerto va rápida y progresivamente desapareciendo, fig. 34, a la vez que húmero, figs. 35, se va ensanchando, por lo que escasamente 30 micras en dirección caudal, fig. 36, se observa:

* La extremidad distal del húmero ensanchada y aplanada que se "articula" con dos formaciones óseas de las que se encuentra separada por interlíneas articulares densas en las que no se evidencian fases de interzonas.

* Rodeando las formaciones cartilaginosas se encuentra blastema muscular, a veces cruzados por gruesos vasos, cuyas fibras se disponen unas ventralmente al húmero y otras lo hacen saltando de húmero a los huesos del antebrazo.

* El injerto se encuentra ahora libre en cavidad celómica, ya que su meso o anclaje ha desaparecido por lo que entra en contacto directo con el pulmón y aurícula derecha, aunque separado de ellas por el pericardio. A gran aumento, siguen sin observarse fibras nerviosas, y su epitelio de recubrimiento se mantiene uniforme. Las dos formaciones óseas correspondientes a los hue

Los huesos del antebrazo, fig. 37, se independizan entre sí y con la extremidad distal del húmero, por lo que en determinados cortes, la disposición de éstos cartílagos, adquiere forma de "H", correspondiendo los polos superiores a las porciones distales del húmero, que por artificio de técnica están discretamente separados, mientras que las inferiores, lo son de los huesos del antebrazo, que ya poseen pericondrio capsular, que les aíslan e independizan, no sólo entre sí, sino también con el húmero, a gran aumento aparecen nítidas áreas de interzonas, fase previa a la cavitación. Muy rápidamente, figs. 38a y b las dos formaciones cartilaginosa del antebrazo se independizan, disponiéndose en paralelo y adquiriendo no sólo una disposición, sino estructura similar a los embriones controles de idéntico estadio. Sin embargo, un hecho llama la atención: es la presencia en la porción dorsal del injerto de una laguna vascular que ocupa la porción teóricamente correspondiente al brazo, ocupada en casi su totalidad por elementos formes y a la que van a confluír formaciones vasculares que se sitúan en plena masa de mesénquima y en ambas porciones del miembro diferenciado. Es ya evidente el inicio de una estrangulación en el borde lateral así como un relieve o convexidad en el medial, detalles éstos que fácilmente hacen dividir el miembro diferenciado en dos porciones: braquial y antebraquial. En el extremo distal aparece una disposición atípica que interpretamos como cresta apical.

Progresivamente, el estrangulamiento lateral y la convexidad medial van aumentando, por lo que, fig. 39, es ya muy manifiesta la existencia de una marcada incisura, figs. 40 a y b, que divide incompletamente al miembro diferenciado. La laguna vas

cular cuyo inicio se realizó en cortes anteriores, adquiere ahora un gran volumen, ocupando la práctica totalidad de la superficie superior del miembro, comprimiendo y desplazando al blastema muscular por lo que de la disposición típica laminar y aplanada primeramente observada, se transforma en un ovillo en el que es difícil distinguir planos individuales. Los dos huesos del antebrazo mantienen su disposición y estructura normal, estando rodeados por condensaciones musculares en las que es fácil distinguir plano ventral y dorsal. Una gruesa arteria probablemente la antebraquial, se sitúa entre ambos, pero en ningún caso se evidencia la existencia de fibra nerviosa.

El miembro diferenciado sufre ahora una flexión ventral en su extremo distal, por lo que las dos incisuras se ponen en contacto, observándose -fig. 41 -, la presencia de dos áreas independientes: una superior, próxima al pulmón, ocupada por la gran laguna vascular y en la que existe blastema muscular, y otra distal, en la que se localizan formaciones cartilagosas correspondientes al antebrazo, rodeadas por estratos musculares organizados.

Finalmente, figs. 42, 43 y 44, el injerto sufre un proceso de desdiferenciación habida cuenta que:

* La mita superior y dorsal se encuentra transformada en un divertículo lacunar, relleno de elementos formes.

" * La extremidad inferior y ventral termina sin continuarse con paleta manía, o estructura que la represente.

* La gran laguna hemática se yuxtapone al hígado sin

establecer ningún tipo de relación con él, quedando a modo de fondo de saco.

En resumen, en esta experiencia, se han diferenciado a partir del injerto:

1.- Miembro en el que se observa formación correspondiente a la cintura, húmero y radio.

2.- Blastema muscular.

3.- Cresta apical de SAUNDERS atípica.

4.- Formaciones vasculares.

5.- No existe a nivel alguno, fibra nerviosa tanto diferenciada del injerto como procedente del huesped.

6.- El miembro derecho del receptor, ha quedado hipoplásico, de manera que en el mismo no se ha diferenciado musculatura ni formación cartilaginosa, quedando reducido a un mamelón.



Fig. 30a



Fig. 30b



Fig. 31a



Fig. 31b



Fig. 32a



Fig. 32b

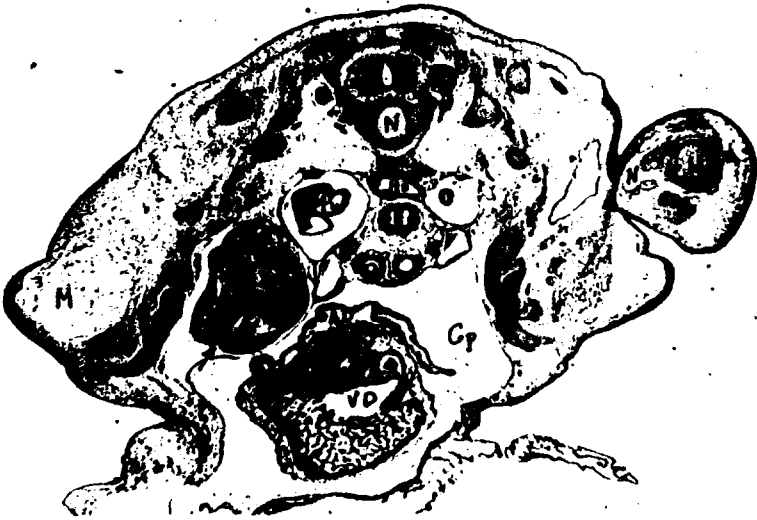


Fig. 33a



Fig. 33b



Fig. 34

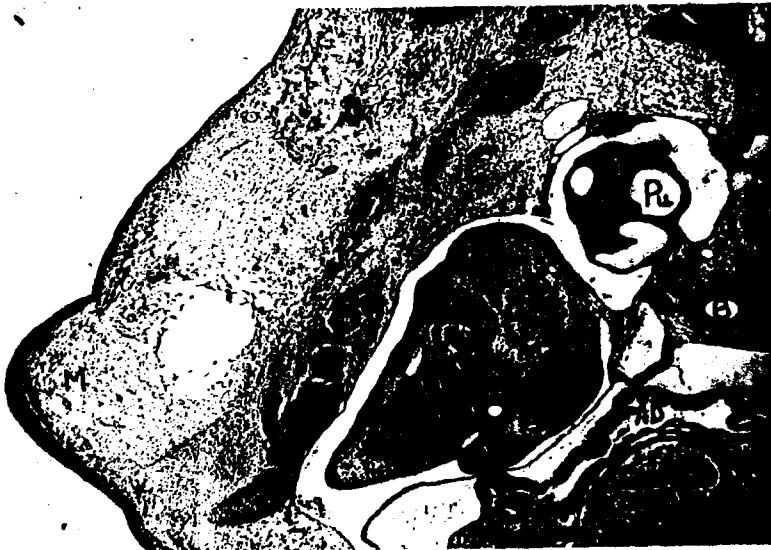


Fig. 35



Fig. 36



Fig. 37



Fig. 38a



Fig. 38b

Fig. 39



Fig. 40a

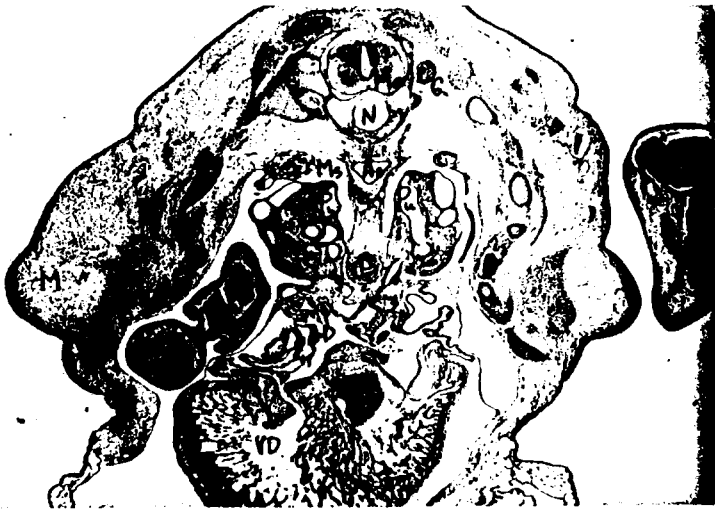
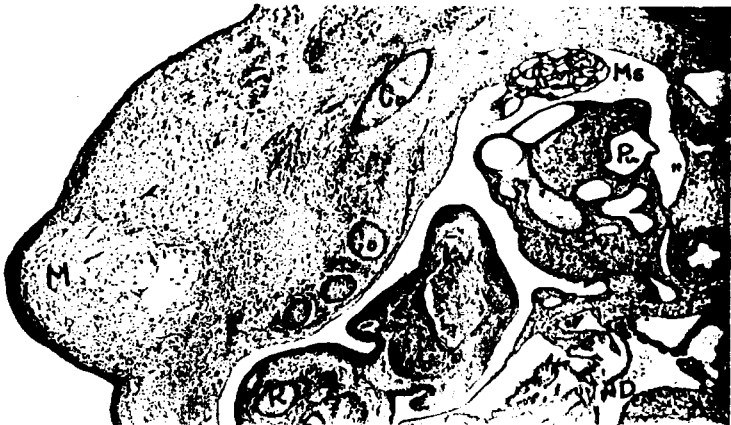


Fig. 40b



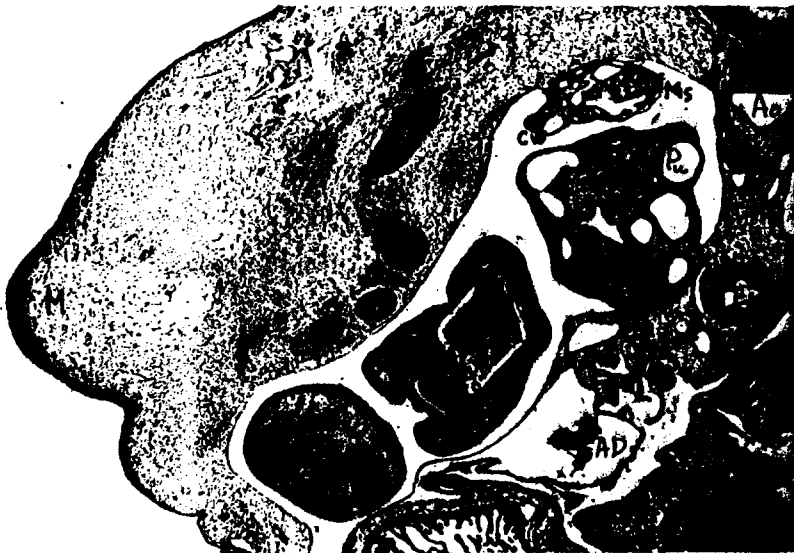


Fig. 41



Fig. 42



Fig. 43



Fig. 44

GRUPO I: EMBRION C-2

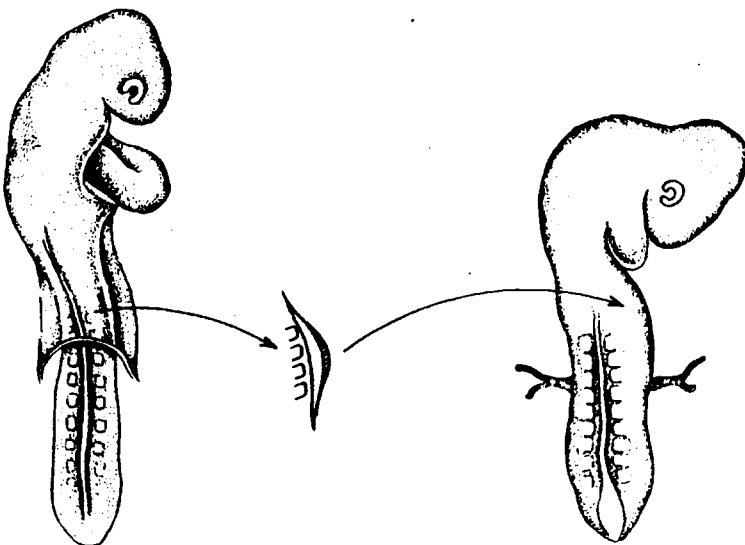
=====

EMBRION C-2

Protocolo

=====

- * **dador:** estadio 12 de Zacchei.
- * **receptor:** estadio 18 de Hamilton Hamburger.
- * **Material Injertado:** se injerta esbozo de miembro superior izquierdo y mesodermo paraaxial.
- * **Fijación:** se fija vivo en estadio 26 de Hamilton Hamburger.



En los cortes más craneales, el injerto ha perdido en la pared dorsolateral de la cavidad celómica, en la base de implantación del miembro superior derecho, haciendo relieve en cavidad y en proximidad al pulmón de este lado aún en fase glándula - las fig. 45a. Un grueso vaso procedente de la aorta situado en la base del mesonefros, que se dirige transversalmente al miembro superior se encuentra situado a nivel de la implantación del injerto, originándose de él una gruesa formación vascular que se introduce en el injerto. En la porción ventral del injerto y a nivel del mesénquima indiferenciado que lo separa de la porción superior de la aurícula derecha aparece otro grueso vaso - fig.45b que ramificándose se introduce en el mesénquima diferenciado. Estructuralmente el injerto a este nivel está formado por un mesénquima indiferenciado, en práctica continuidad con el correspondiente a la pared celómica, recubierto por una fina lámina epitelial monoestratificada, no apareciendo en su interior núcleo o condensación de significación cartilaginosa. Es interesante señalar como una gruesa y voluminosa raíz nerviosa originada en la médula del receptor, se dirige en dirección lateroventral, introduciéndose en el esbozo del miembro del receptor; sin embargo, no da ninguna rama al injerto, dando la impresión de que el mesénquima de la base de implantación actúa como tabique o septo, ya que incluso deriva la dirección de las fibras. Rápidamente el injerto presenta disposición bilobulada de tal forma que la porción más anterior y lateral se aísla por la presencia de un surco, estableciéndose de este modo -fig.46a y b- dos claras porciones: una superior y dorsal voluminosa, formada por una masa de mesénquima indiferenciado

ampliamente vascularizado, ya que en su interior aparecen amplias redes vasculares en conexión con vasos del huesped y otra porción al principio menor, situada neutro medial recubierta por epitelio poliestratificado en cuyo interior se evidencia un mesénquima con mayor grado de estructuración, ya que incluso aparece un nido o inicio de condensación precartilaginosa.

Rápidamente -fig. 47a y b - la porción ventral adquiere un mayor grado de diferenciación aumentando en volumen a la vez que se organiza su mesénquima; es evidente la existencia de dos áreas de estructuración, una indiferenciada y rídicamente vascularizada y otra anterior, densa, en la que los vasos se sitúan próximos al epitelio de recubrimiento, estando rodeados por áreas mesénquimales de mayor densidad celular. Esta disposición se mantiene, en cortes sucesivos a la vez que -fig. 48a y b - aumenta progresivamente en volumen la porción ventral, de tal modo que en ella aparece una clara estructuración vascular que situándose en la porción marginal va a disponerse de forma típica -figs. 49a y b - del vaso marginal o axil del miembro.

Es precisamente en estos niveles cuando aparece una condensación o poliestratificación del epitelio de superficie en la porción bilobulada que va a corresponder, figs. 50a, b, c y d - a una cresta apical de SAUNDERS que comparada, fig. 51 a la del miembro de este lado, presenta una completa tipicidad, incluso en su patrón vascular.

El mesénquima que ocupa el injerto se condensa, formando un núcleo o nido de sustancia precartilaginosa, estando rodea-

do por una amplia red vascular sin observarse a ningún nivel estructura nerviosa.

En cortes más caudales -figs 52a y b- la porción ventral crece y se estructura más que la dorsal, de tal modo que se evidencia en su área central una condensación precartilaginosa rodeada de gruesas formaciones vasculares, de las que la situada próxima a la base de implantación mantiene contigüidad con los vasos de la pared celónica del huesped. A lo largo de toda la serie no aparece estructura neural en el injerto.

Rápidamente y por un crecimiento de la porción ventral aparece -figs 53a, b- una completa bilobulación de la masa del injerto, de tal modo, que la porción dorsolateral, que en cortes anteriores estaba ocupada por un mesénquima indiferenciado, adquiere un aspecto desorganizado a diferencia de la porción ventral que progresivamente adquiere en mayor grado similitud con el miembro del receptor, sin embargo claramente de él se diferencia por:

- * ausencia de patrón neural.
- * " " tipicidad en la condensación del blastema precartilaginoso; No obstante el patrón vascular es muy similar.

Por último, el injerto, que se encuentra libre en la cavidad celónica -figs. 54, 55, 56- se relaciona con la cara dorsal del hígado, del que se encuentra separado por una banda vascular formada por la arteria vitelina; a este nivel y hasta su finalización, está formado por un mesénquima, sin aparente estructura

ción, ampliamente vascularizado y recubierto por un epitelio en el que en sus extremos medial y lateral, aparecen claras condensaciones epiliales.

Por tanto, a partir del injerto se ha diferenciado no sólo la porción distal del esbozo del miembro, sino la raíz o cintura escapular que a diferencia con aquel, presenta un menor grado de estructuración, ya que el mesénquima que lo ocupa no posee núcleos de condensación; sólo una amplia red vascular en conexión con la arteria principal del miembro receptor ampliamente por el se distribuye sin aparente patrón. El miembro, por contrario, si bien presenta un crecimiento y diferenciación menor al correspondiente a edad, posee un núcleo precartilaginoso, rodeado por una típica red vascular que en sus extremos se estructura como arteria axial, es sobre todo el epitelio de recubrimiento el que mayor grado de tipicidad presenta, ya que se poliestratifica dando lugar a una cresta apical de SAUNDERS; a este nivel y bajo ella, se localiza un vaso que corresponde y representa en su disposición a la arteria marginal.

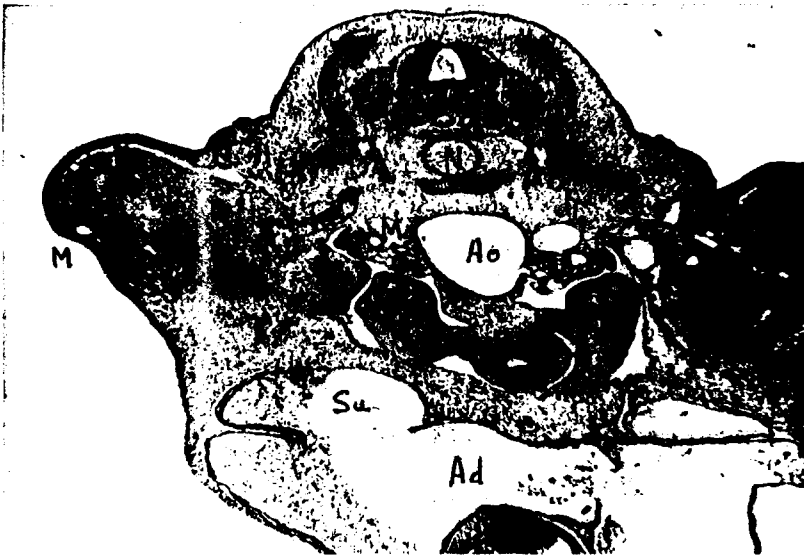


Fig. 45a



Fig. 45b



Fig. 46a



Fig. 46b



Fig. 47a



Fig. 47b



Fig. 48a



Fig. 48b

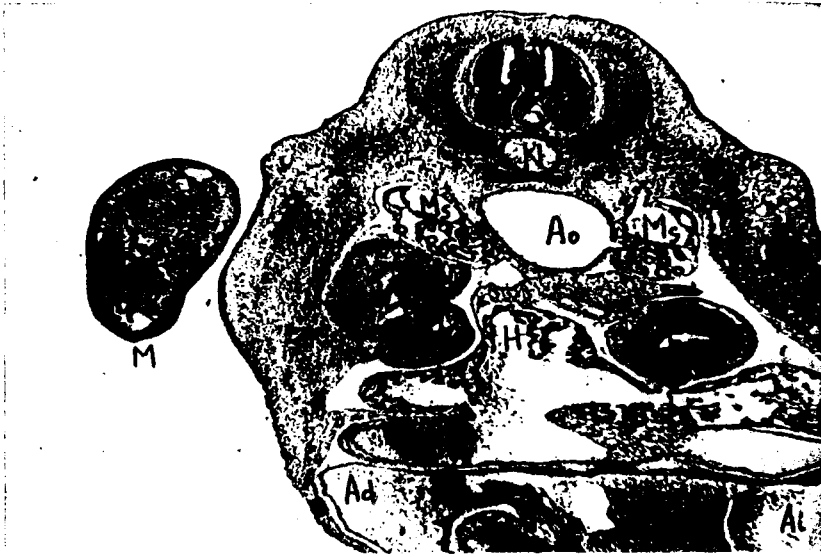


Fig. 49a



Fig. 49b



Fig. 50a



Fig. 50b



Fig. 50c



Fig. 50d



Fig. 51

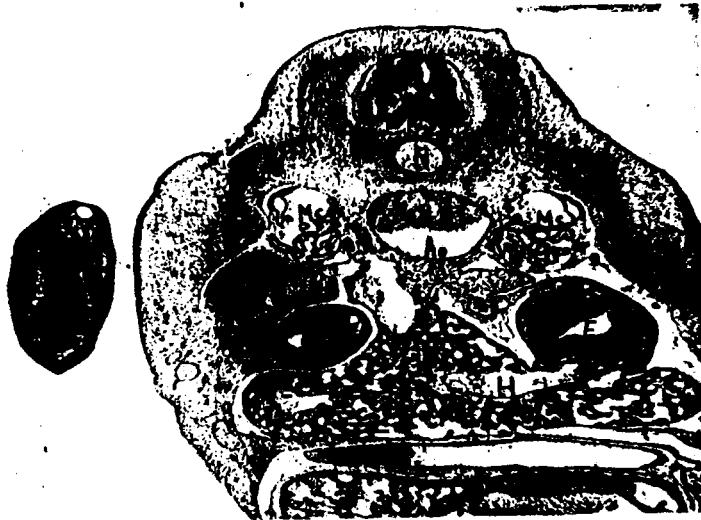


Fig. 52a



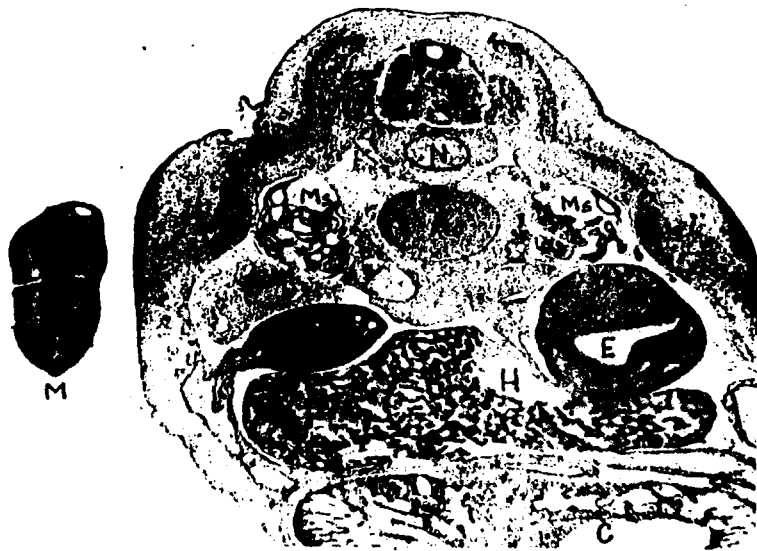


Fig. 53a



Fig. 53b

105

Fig. 54

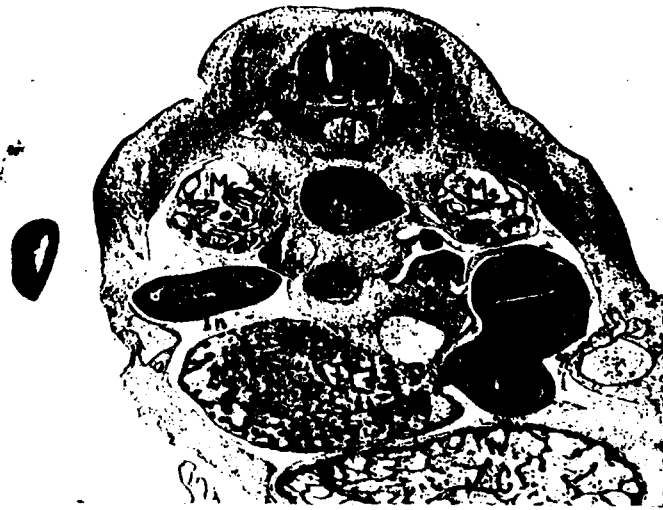


Fig. 55



"

Fig. 56



GRUPO II

Embrión	Estadio dador ZACCHEI	Estadio Receptor HAMILTON HAMBURGER	Fijación post-inter- vención HAMILTON HAMBURGER	Grosor Cortes	Coloración
M- 83	14	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
E- 1	14	18	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina
EC-127	13	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 5	14	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 93	14	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M-107	14	19	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina
MD- 4	14	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M-23	14	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
M- 44	14	19	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina
E- 9	14	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
E- 27	14	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
E- 42	14	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina

- 107 -

GRUPO II

Embriones descritos:

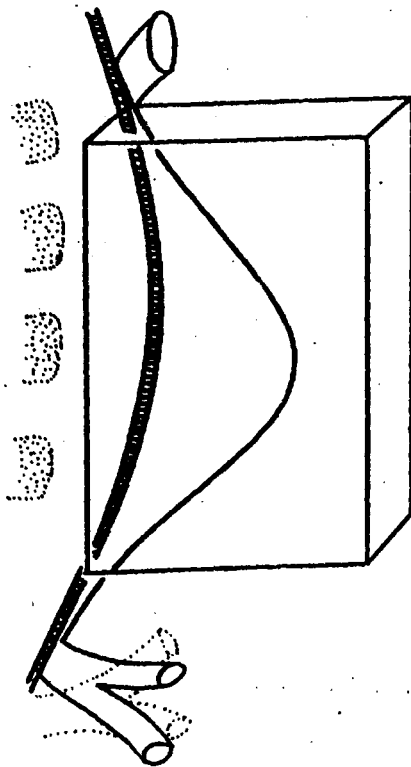
=====

* M - 83

dador: estadio 14 de Zacchei.

receptor: estadio 18 de Hamilton Hamburger.

Embrión M-83



GRUPO II:

Representación esquemática del material
injertado.

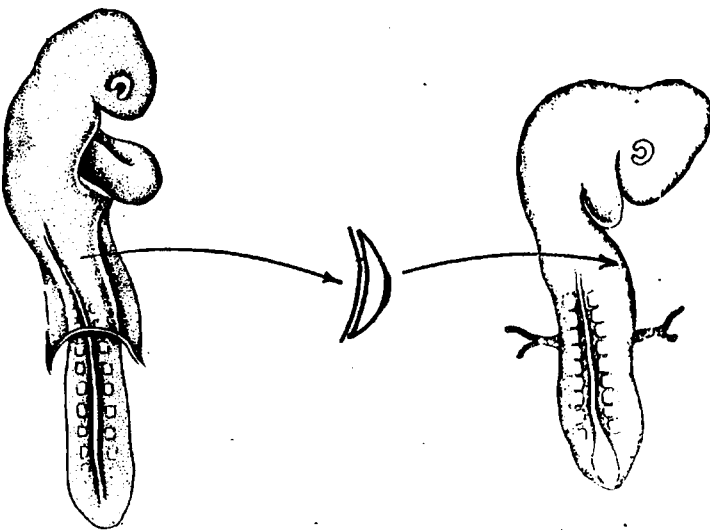
GRUPO II: EMBRION M-83
=====

“

EMBRIÓN M-83

Protocolo

- * dador: estadio 14 de Zacc
- * receptor: estadio 18 de Hamilton Hamburger.
- * Material Injertado: se injerta esbozo de miembro superior aislado, seccionado a nivel de la base o relieve.
- * Fijación: se fija vivo en estadio 29 de Hamilton Hamburger.



El injerto ha prendido en cavidad celómica uniéndose a la pared lateral, base de implantación del miembro superior derecho que presenta un marcado grado de abducción. En los cortes más craneales, se observa la existencia de una masa en la que se han diferenciado gruesos cúmulos musculares, de estructura y disposición similar a la del receptor, fig.57. Dorsal al injerto aparece una gruesa raíz nerviosa procedente de la médula del receptor que se dirige en dirección lateral, bordea al injerto, fig.58 sin intercambiar fibras para las estructuras en él diferenciadas. Conjuntamente, fig.57,58, aparece junto a la masa muscular diferenciada, dos gruesas formaciones en fase ya cartilaginosa, que representan tanto la dorsal, como la situada ventralmente en el injerto y vá en práctico contacto con la pared del huesped, a húmero; porciones atípicamente incurvadas. Entre ambas porciones incurvadas y cortadas a distinto nivel, aparece un grueso vaso, posiblemente arteria branquial, en cuyo interior aparecen gruesos acúmulos sanguíneos y en la que vemos sobre todo en cortes más craneales, fig.57, como establece conexión con vasos procedentes del receptor, sobre todo con aquellos que acompañan a la gruesa raíz nerviosa.

En dirección caudal, el injerto va progresivamente, fig.59, aislándose del receptor, de tal manera que su extremo ventral queda ya libre en cavidad celómica, estableciendo solución de contigüidad con las cavidades cardíacas derechas a través de la lámina pericárdica, mientras que la porción dorsal y base del injerto lo hace previa interposición de una fina lámina mesenquimal con el pulmón derecho, en fase ya vesicular. Es interesante a este ni



vel la existencia de vasos que, procedentes de la pared dorso-lateral del huesped, forman amplias lagunas anastomóticas con la masa diferenciada a partir del injerto, de manera que aproximadamente alrededor de 70 micras en dirección caudal, la base de implantación de la misma, está rodeada por un amplio círculo vascular. Las dos porciones incurvadas del húmero se van progresivamente aproximando, de manera que, figs 60a,b, se unen para constituir una sola formación que corresponde, figs 61a,b al tercio distal humeral. A este nivel es interesante señalar como las masas musculares diferenciadas en el injerto, se disponen topográficamente de una manera similar a embriones control, observándose la presencia de un eje vascular central, interpretando a la masa muscular como músculos braquiales-flexores.

En la pared celómica se ha diferenciado a este nivel formaciones cartilaginosas que corresponden a costillas del huesped, que presentan idéntica estructura y topografía a las contralaterales.

El húmero progresivamente va ensanchándose, disposición típica de su extremidad distal, figs 62a,b, observándose por artefacto de técnica la presencia de una fisura que no corresponde a articulación. Sin embargo, fig.63, rápidamente el húmero adquiere la forma en estrella o trípode, como consecuencia a la condensación en tres puntos periféricos del cartilago, quedando la porción central menos condensada; ésta imagen es la típica de la porción distal humeral. El injerto solamente se mantiene unido a la pared celómica por una pequeña base de implantación, en la que se visualiza un grueso vaso que, procedente del huesped establece

conexión con el injerto. Escasamente 50 micras en dirección caudal aparece por vez primera la presencia de una interlínea articular, establecida, figs 64a,b, entre la extremidad distal del húmero y la proximal del cúbito, éste último en fase de menor condricificación. Ambas formaciones cartilaginosas se encuentran rodeadas por un anillo de fibras musculares, disposición típicas de estos niveles. En el espesor del injerto y medial a las formaciones cartilaginosas, se observa con nitidez la existencia de una gruesa formación vascular seccionada transversalmente, en la que se evidencia a gran aumento las distintas capas musculares que corresponden a un grueso vaso, tal vez aorta, diferenciada en el injerto. En el espesor del mismo, no aparecen fibras nerviosas, tanto procedentes del injerto como intercambiadas con el receptor, en el que sin embargo, se observan fibras que, procedentes de la médula, rodean la base de implantación de la masa diferenciada, en su discurrir hacia el miembro derecho del huésped.

La formación integrante del cúbito, progresivamente va adquiriendo una morfología y grado de condricificación correspondiente a su estadio, figs 65a y b por lo que se dispone en paralelo a una nueva formación aparecida radio, figs. 66,67, rodeando a ambas estructuras, aparece un blastema muscular organizado.

A este nivel se observa por vez primera la existencia de una evaginación en la cara medial del injerto, enmarcada por dos fuertes incisuras, por lo que de modo progresivo y muy rápidamente aparece una masa a modo de paleta dorsal, ocupada al principio por un blastema indiferenciado. Es precisamente a este nivel, cuando observamos que articulándose con la cara lateral del cúbi-

to aparece, figs. 67, 68a y b ; una nueva formación cartilaginosa que ocupa prácticamente la totalidad del mamelón aislado a partir de la cara medial del injerto.

Progresivamente , fig. 69a, b y 70 a, b , la masa del injerto se subdivide en 2 porciones:

a) una dorsal que se va afilando y que quedará únicamente ocupada por unas condensaciones musculares de disposición radial da.

b) Otra ventro-medial, ocupada por la formación cartilaginosa correspondiente a radio, que manteniendo su morfología y relaciones típicas, aparece invadida por amplias lagunas vasculares, ocupadas por elementos formes. En esta formación, se va paulatinamente diferenciando -Figs 71a, b, 72 a y b- puntos de condricación que escasamente 80 micras en dirección caudal -Figs. 73 a, b- van a dar lugar a las osículas digitales.

Es precisamente a este nivel y sobre todo a mayor aumento, cuando se observa:

* La porción superior dorsal del injerto, ha desaparecido, quedando únicamente del mismo, su porción caudomedial, que establece relaciones de continuidad con hígado y mesonefros, encontrándose entre ambas estructuras, sin mesos o puentes vasculares que les unan.

* En el injerto es fácilmente reconocible una paleta digital, en la que se observan hasta 5 formaciones condricadas se paradas entre sí por interlíneas en fase de interzona articular.

* A este nivel no se evidencia formaciones nerviosas, si una amplia red vascular situada entre y en el espesor de la masa muscular.

* La extremidad distal, en este caso lateral del injerto, se afila, dando lugar a una atípica cresta apical de SAUNDERS

Las condensaciones cartilaginosas digitales se articulan entre sí, figs. 74a y b, dando lugar a típicas articulaciones es clara la condensación cartilaginosa en 5 núcleos distales y un núcleo proximal, éste correspondiente a la extremidad distal del radio. Entre los núcleos de condricificación distal se delimitan interzonas articulares. El injerto a este nivel presenta una estranoulación que fácilmente hace que en el mismo se distingan 2 porciones: una estrechada que corresponde al stilopodo, mientras que la ensanchada a modo de paleta, lo es del ziqópodo; en ésta, es donde el grado de diferenciación de los conglomerados cartilaginosos es mayor, así como la laminación y estructuración del blastema muscular y mesénquima.

Caudalmente, figs. 75a y b, el injerto se transforma en un fondo de saco o receso, ocupado únicamente por mesénquima indiferenciado, cruzado por amplia red vascular sin tipicidad u organización. La cresta apical se mantiene aunque su grado de laminación es escaso. Por último, figs. 76a,b y 77, el injerto finaliza a nivel medio de la masa hepática, que le separa de estómago y transcavidad de los epiplones. Esta constituido por un mesénquima indiferenciado que rodea a un conglomerado blastemático premuscular, dispuesto únicamente a nivel del ensanchamiento descrito como paleta digital.

116

Fig. 57



Fig. 58



Fig. 59





Fig. 60a



Fig. 60b



Fig. 61a



Fig. 61b

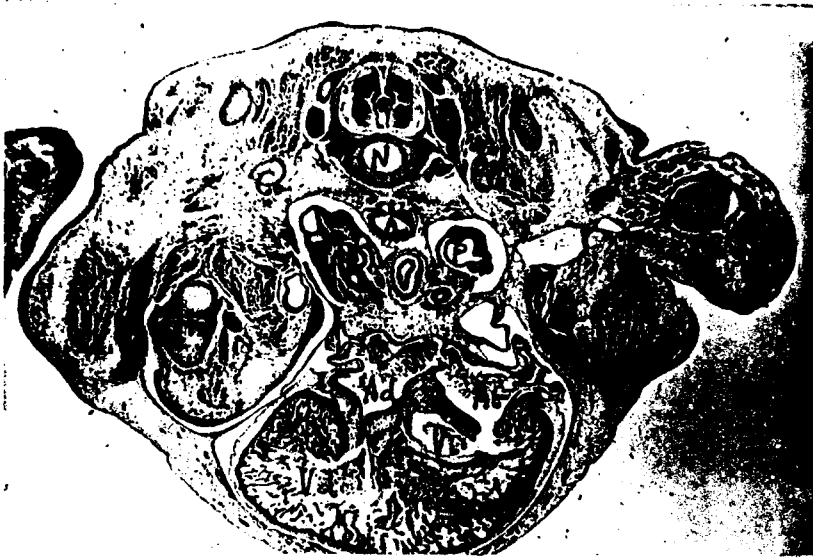


Fig. 62a



Fig. 62b

122

Fig. 63

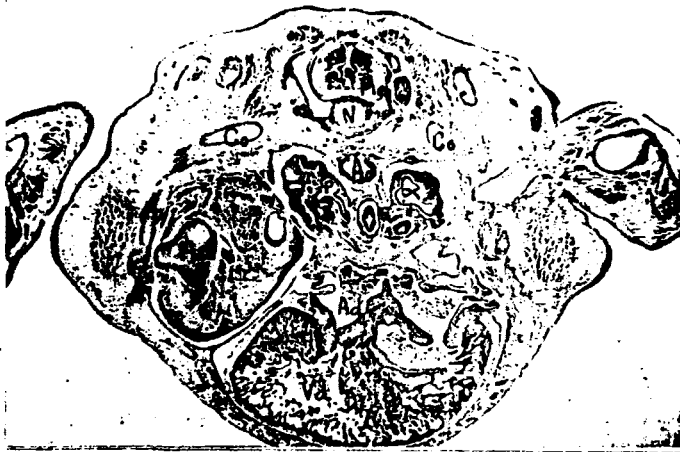


Fig. 64a

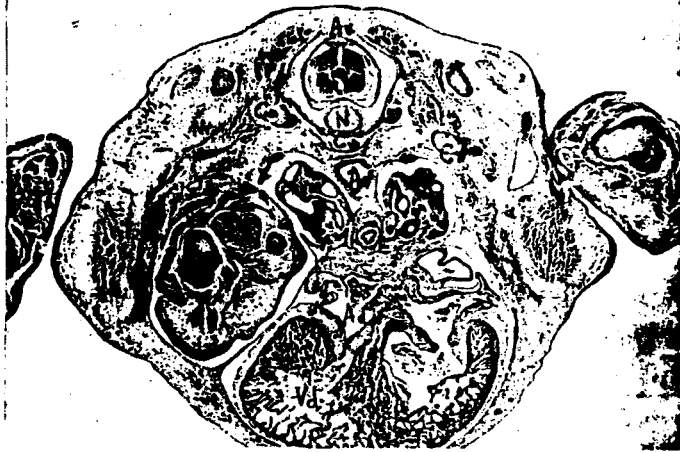


Fig. 64b



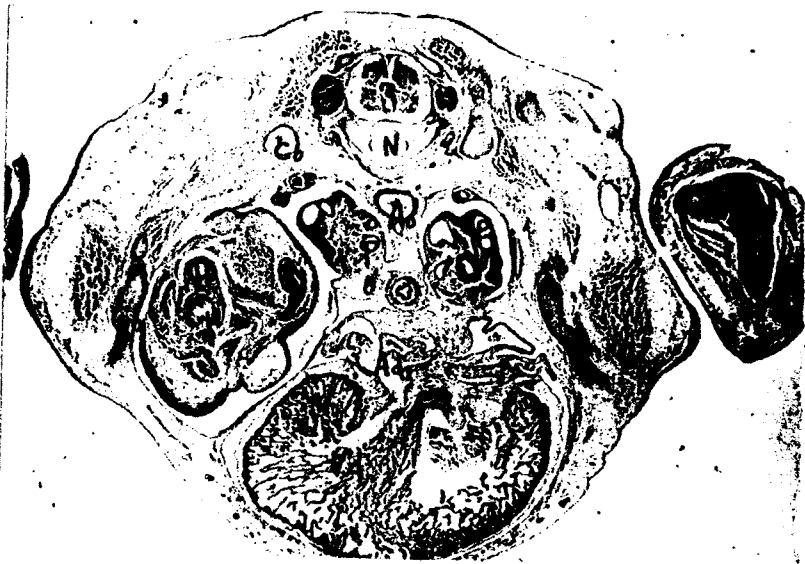


Fig. 65a



Fig. 65b



Fig. 66

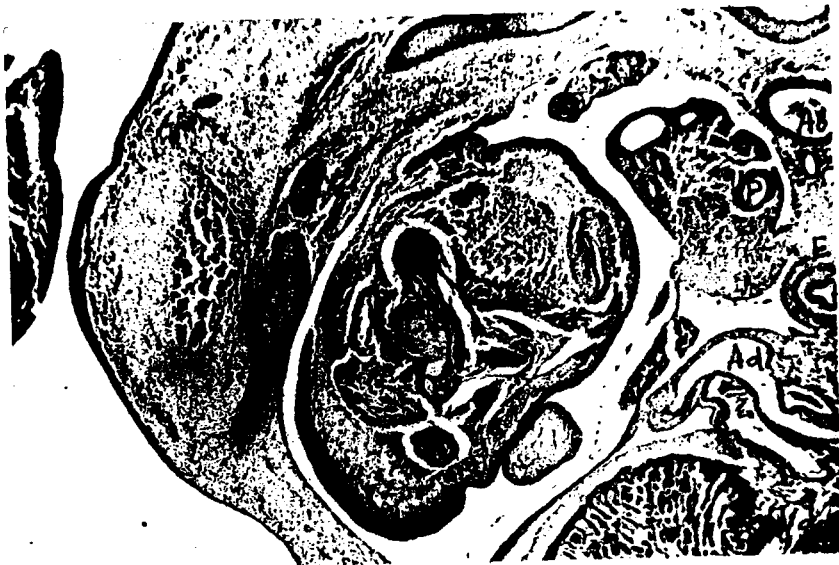


Fig. 67



Fig. 68b



Fig. 69a



Fig. 69b

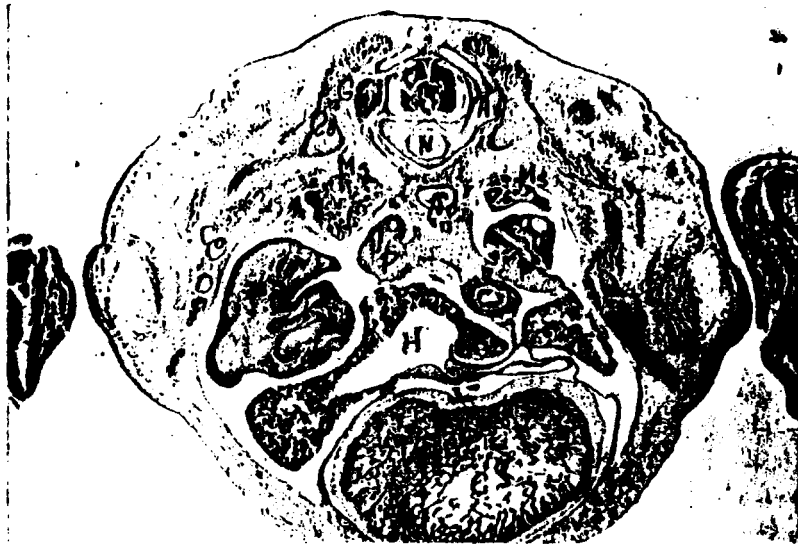


Fig. 70a

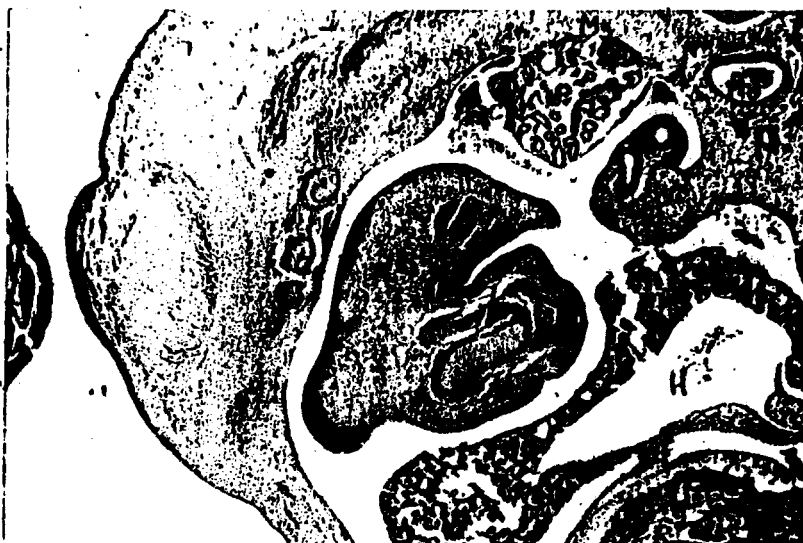


Fig. 70b

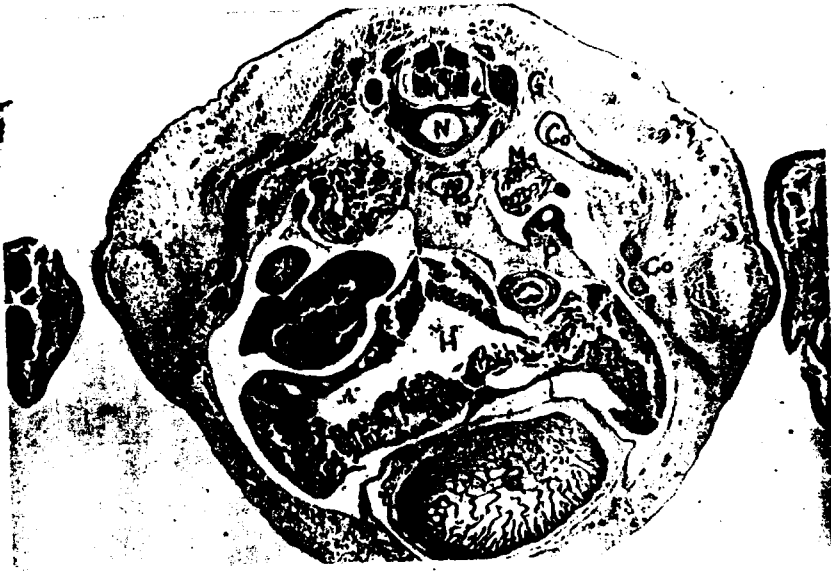


Fig. 71a



Fig. 71b

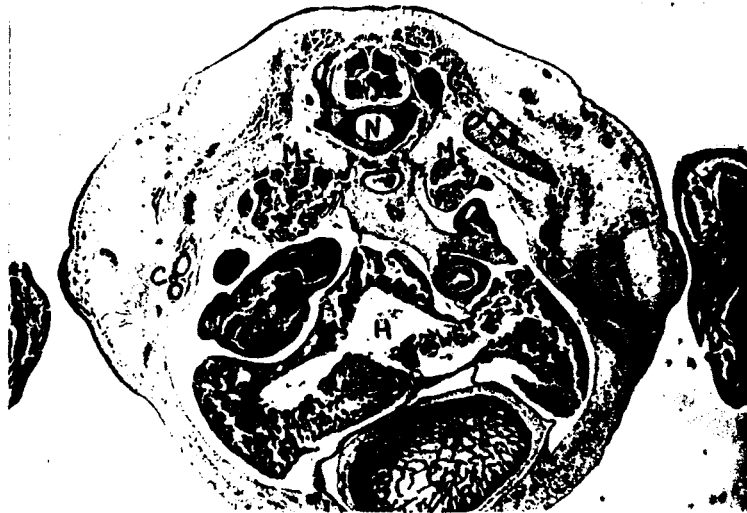


Fig. 72a



Fig. 72b

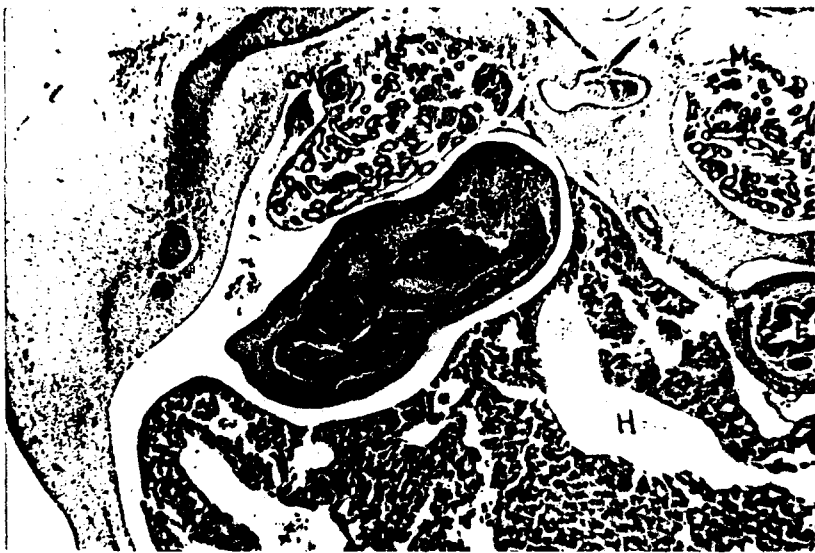


Fig. 73a

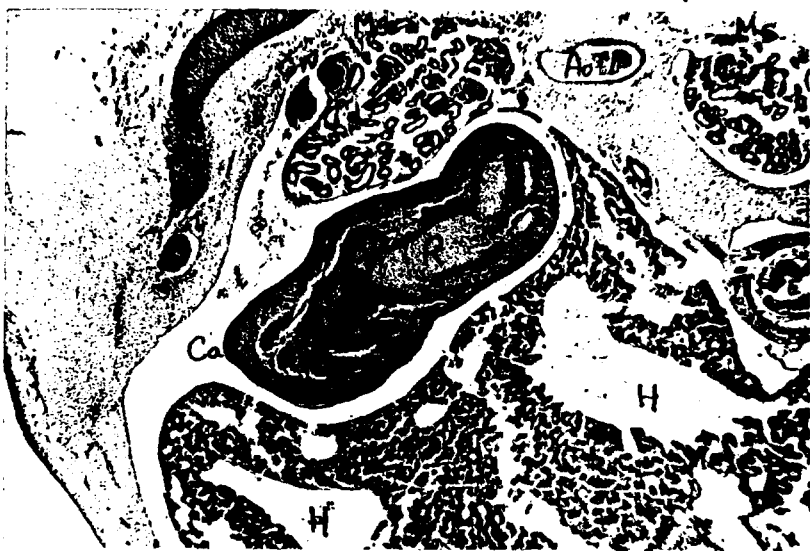


Fig. 73b

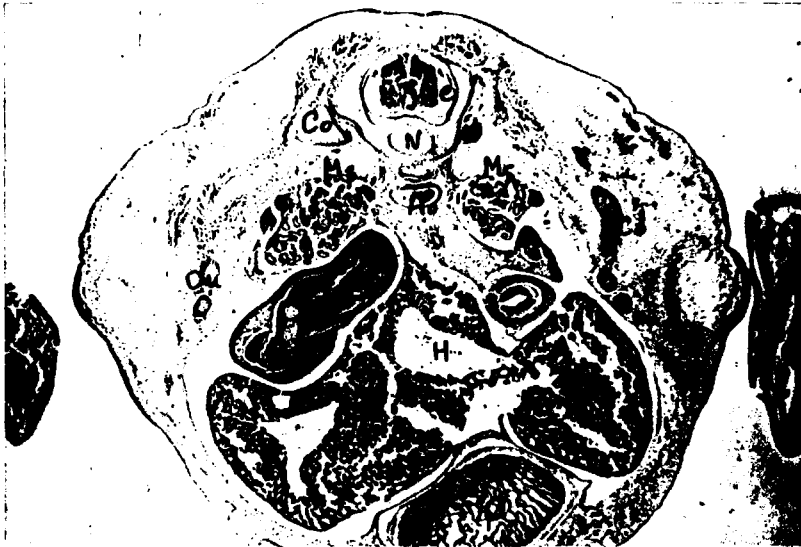


Fig. 74a

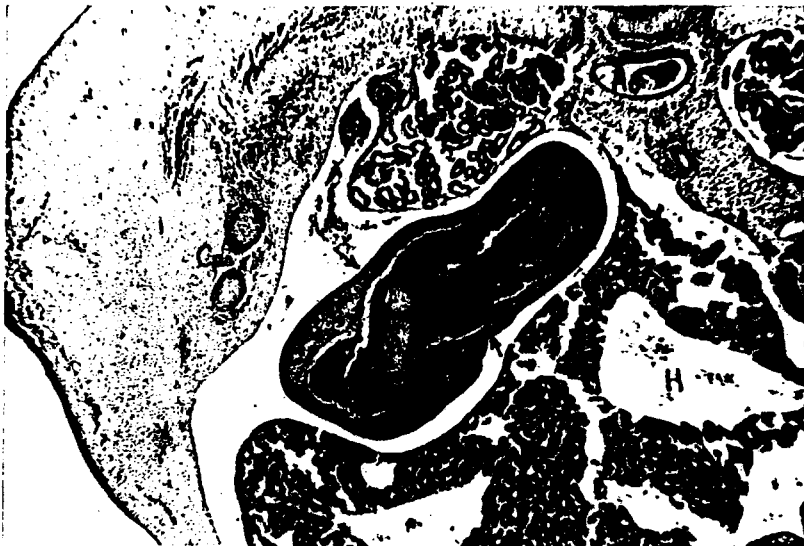


Fig. 74b

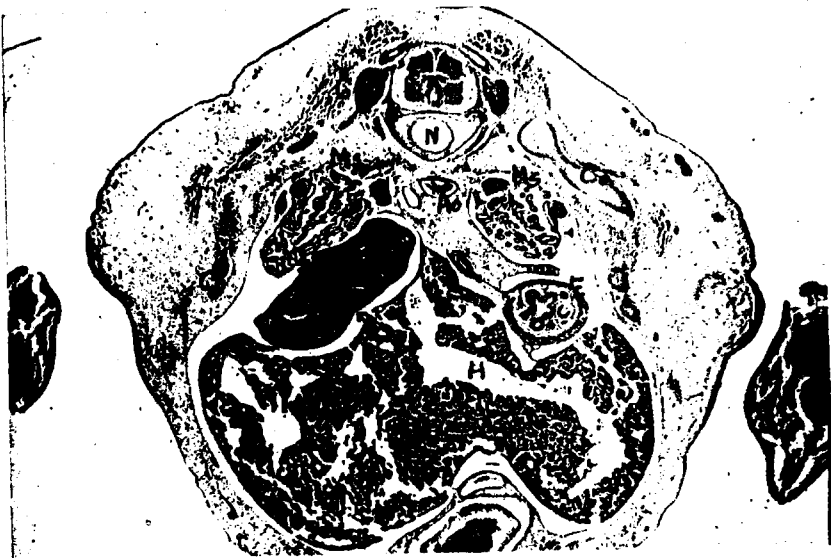


Fig. 130

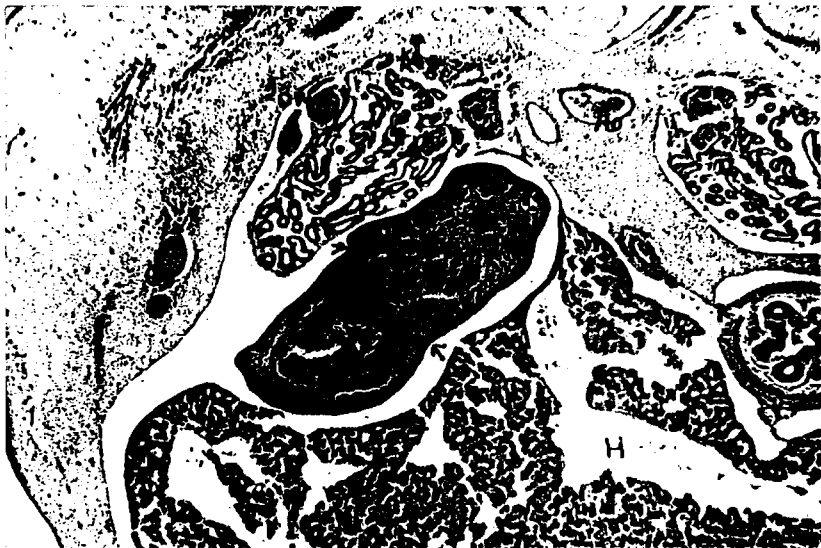


Fig. 130b

131

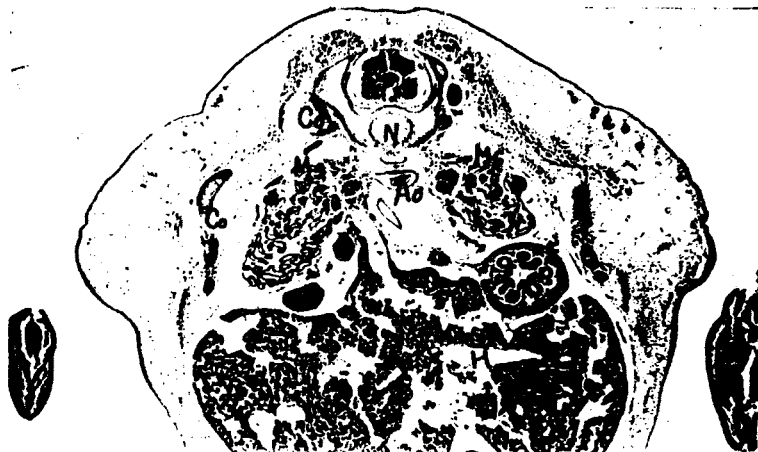
Fig. 76a



Fig. 86b



Fig. 77



GRUPO III

Embrión	Estadio dador ZACCHEI	Estadio Receptor HAMILTON HAMBURGER	Fijación post-inter- vención HAMILTON HAMBURGER	Grosor Cortes	Coloración
C-25	10	15	24	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C- 6	10	15	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C-21	10	15	27	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C-93	10	14	26	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C-42	10	16	28	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C-51	10	15	28	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C-47	10	16	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
C- 9	11	16	28	10 Micras	Hematoxilina Eosina

G R U P O III

Embriones descritos:

* C-6

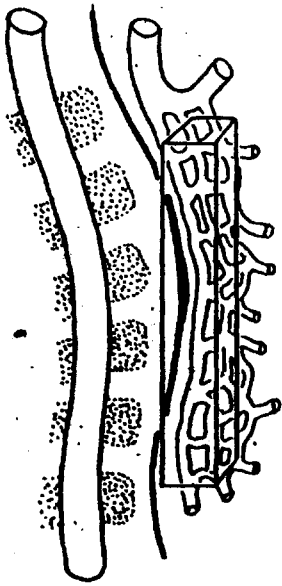
dador: estadio 10 de Zacchei.

receptor: estadio 15 de Hamilton Hamburger.

* C-25

dador: estadio 10 de Zacchei.

receptor: estadio 15 de Hamilton Hamburger.



Representación esquemática del material injertado.

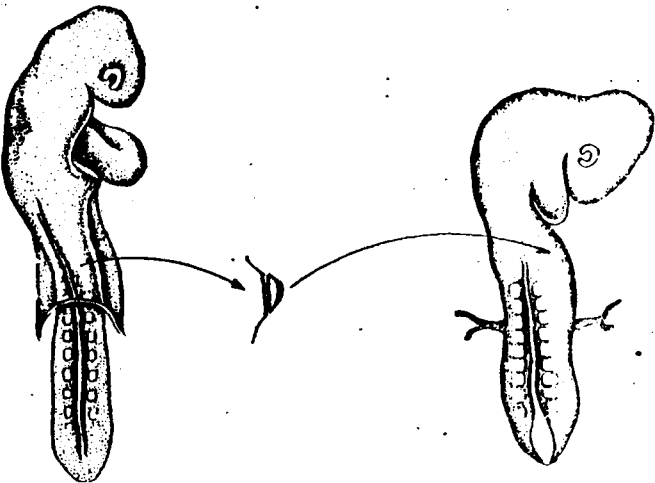
"

GRUPO III: Embrión C-6
=====

EMBRION C-6

otocolo

- * dador: estadio 10 de Zacchei.
- * receptor: estadio 15 de Hamilton Hamburger.
- * material injertado: al no existir esbozo de miembro, se secciona y extirpa el pequeño relieve o base de origen apendicular así como mesodermo lateral paraaxial in segmentado.
- * Fijación: se fija vivo en estadio 26 de Hamilton Hamburger.



En los cortes más craneales, fig. 78, el injerto se encuentra libre, en cavidad torácica, habiendo desplazado discretamente hacia la línea media al pulmón de éste lado. Está constituido por un mesénquima indiferenciado, recubierto por epitelio estratificado. En su interior, no se observa tipo alguno de condensación blastemática, existiendo sin embargo, una amplia red en la que se evidencian, fig. 79, elementos formes.

En dirección caudal, el injerto -fig. 80 a - se aproxima a la pared celómica, de modo que establece por su cara medial un amplio pedículo de fijación, a través del cual, ingresan formaciones vasculares procedentes del receptor. Es interesante señalar que esta experiencia es la más joven de la serie, tanto por el estadio de fijación del receptor, como por el tiempo en que el injerto se ha mantenido; por ello, y al haber empleado una técnica de coloración específica para la observación de los conglomérados precartilaginosos, se observa como en el interior del material diferenciado a partir del injerto, aparece una gruesa condensación de caracteres similares a los conglomérados, identificados en el miembro superior del receptor. Conjuntamente aparecen fibras radiales que pasan próximos a la base de implantación del miembro superior derecho del huésped, que en ningún momento y nivel se introducen o establecen intercambio con el injerto.

A mayor aumento, fig. 80 b, el blastema precartilaginoso diferenciado se encuentra envuelto en un amplio e irregular círculo vascular, establecido a partir de las anastomosis realizadas con el receptor.

La base de implantación disminuye, figs. 81 , por lo que durante un corto periodo, figs. 82 , el injerto queda libre en cavidad celómica. Sin embargo, figs. 83 - 84 , aparece un nuevo pedículo de fijación; a lo largo de todos estos cortes, el injerto ha mantenido identidad en la estructuración, de tal modo que el mesénquima que lo ocupa presenta un amplio y voluminoso núcleo de condricificación así como abundante red vascular. A estos niveles el injerto se alarga en dirección latero-medial, semejando un miembro superior en estadio 10-12 ZACCHEI.

Rápidamente la base de implantación aumenta, figs. 85 86, 87 observándose varios interesantes detalles:

* la existencia de un conglomerado precartilaginoso rodeado por dos gruesas formaciones vasculares, todo ello en el espesor de la porción más ensanchada de las dos en que se está dividiendo el injerto, y que por su disposición, mucho se asemeja al esqueleto cingular del miembro superior.

* La porción inferior de las dos en que se ha fragmentado incompletamente el injerto, presenta una punta aguda recubierta a diferencia del resto, por epitelio poliestratificado.

* No se observa en su interior ninguna formación nerviosa.

En dirección caudal, fig. 88 , el injerto queda nuevamente libre en cavidad celómica, entrando en relación con la cara superior del hígado y mesonefros derecho: en su interior, se observa una gruesa laguna vascular llena de elementos formes que rodean a un pequeño conglomerado precartilaginoso. El extremo me-

dial del injerto, fig. 89 , presenta una condensación a nivel del epitelio de recubrimiento, y a escasa distancia del mismo se sitúa un grueso vaso.

Escasamente 60 micras en dirección caudal, el injerto presenta de nuevo una mayor elongación según eje lateromedial, figs. 90 a, b, y c, de tal modo que su morfología es en todo idéntica a la de un miembro superior de embriones controles de similar estadio; en base a esta similitud se observa:

* Dos condensaciones precartilaginosas, entre las que se interponen mesénquima indiferenciado y amplias e irregulares disposiciones vasculares.

* Epitelio de recubrimiento monoestratificado que sólo a nivel, figs. 90 c, de la extremidad distal, se endruesa, transformándose en poliestratificado, originando una cresta apical de SAUNDERS típica.

* En profundidad del mesénquima y próximo a la cresta apical, como es la norma, se observa un vaso marginal del que emergen formaciones anfractuadas.

Esta disposición se mantiene prácticamente hasta los cortes más inferiores; figs. 91a, b y c, de tal modo, que el injerto termina en un pequeño mamelón, figs. 92a y b, en el que se observa con toda nitidez el vaso marginal, la cresta apical de SAUNDERS y el mesénquima que lo ocupa. Esta imagen observada aislada e independientemente correspondería a un miembro ortotípico de un embrión de los estadios 10-12 de ZACCHEI explantado o cortado independientemente al resto embrionario.

En este embrión, por tanto, se ha diferenciado a partir del injerto, blastema precartilaginoso correspondiente a la cintura, mesénquima indiferenciado, vaso marginal y cresta apical de SAUNDERS, no así formaciones blastemáticas precartilaginosas o musculares, por lo que corresponde por tanto, a una observación muy precoz y en cierto grado superponible al estadio del receptor en el que también la estructuración de los miembros está en fase inicial.

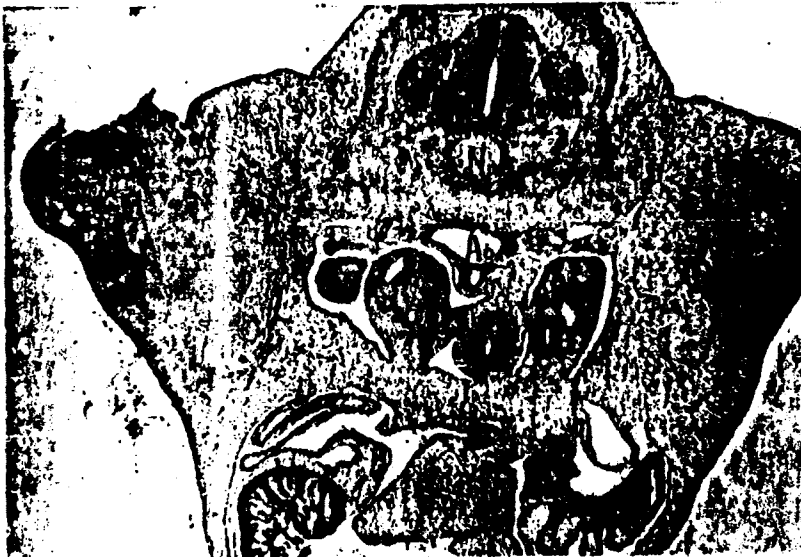


Fig. 78

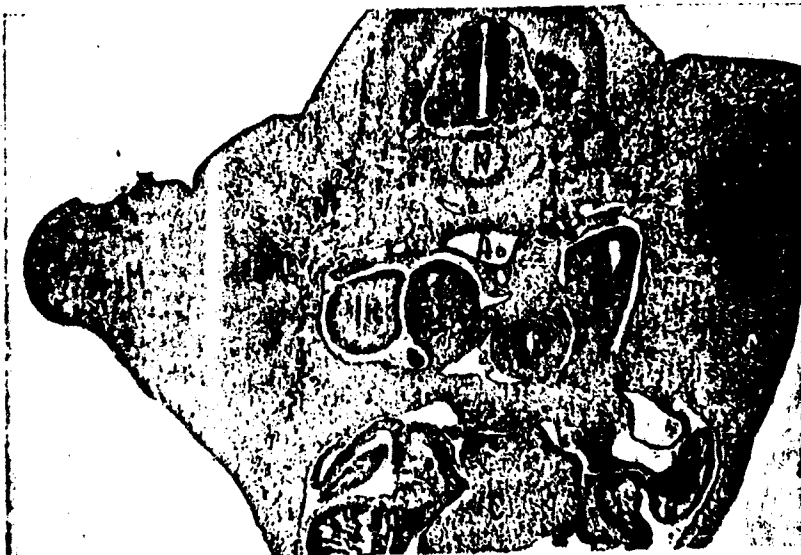


Fig. 79

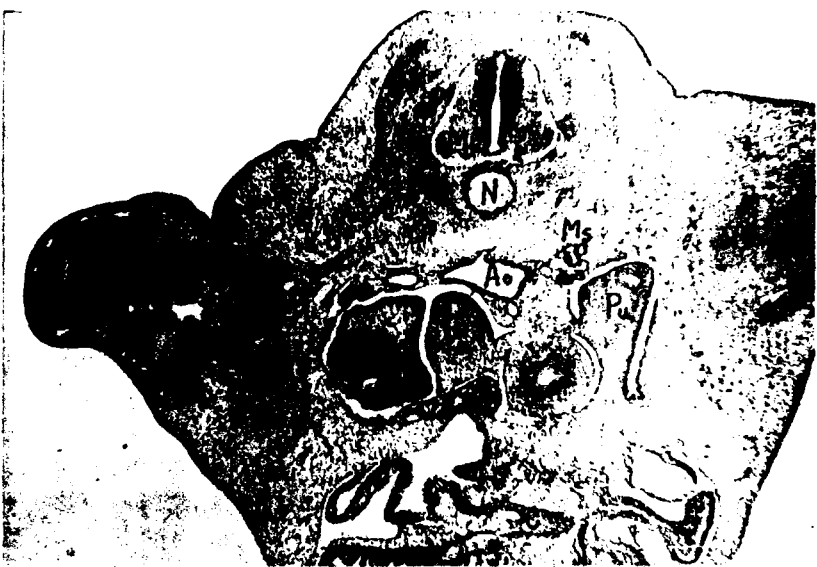


Fig. 80a

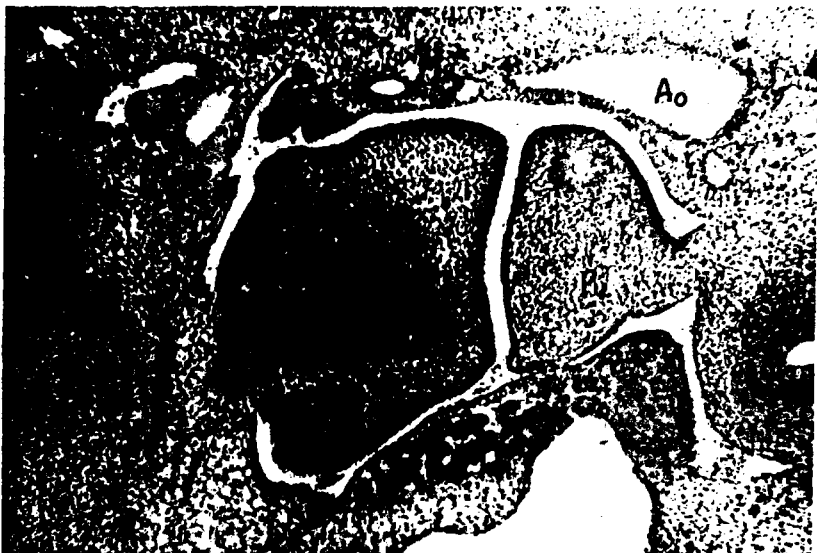


Fig. 80b

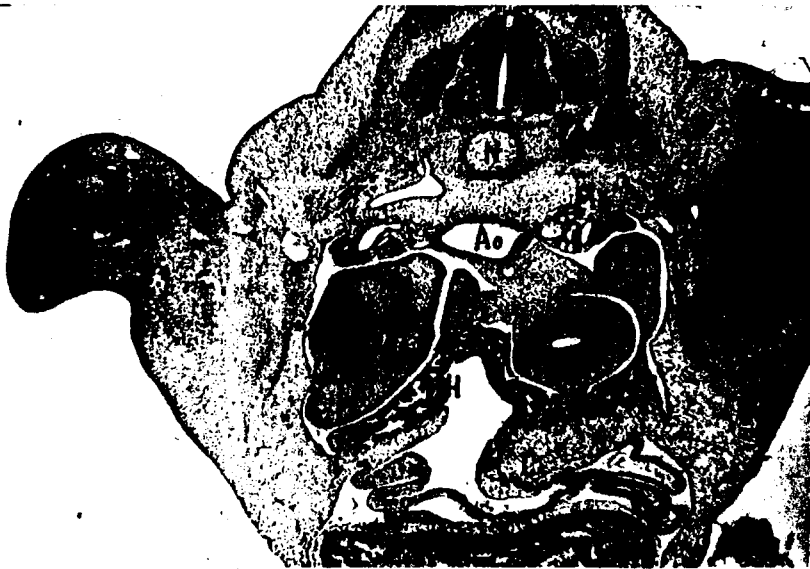


Fig. 81

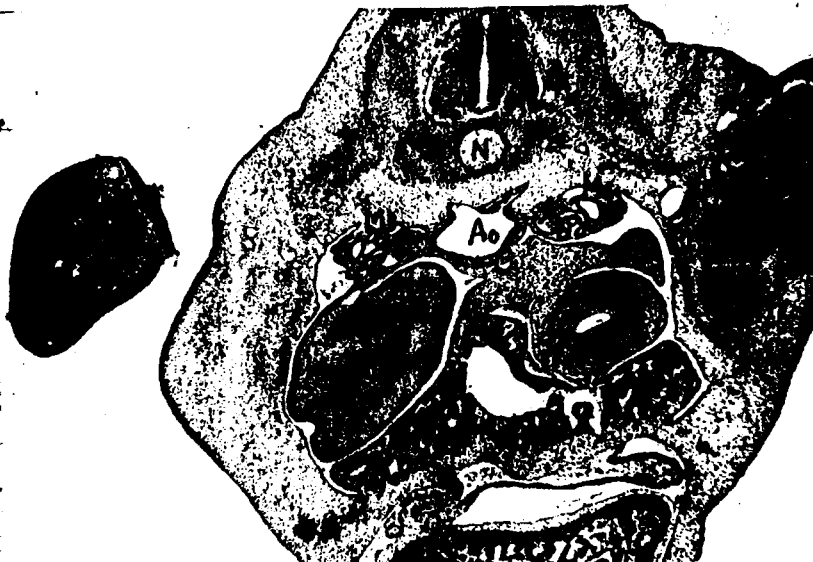


Fig. 82

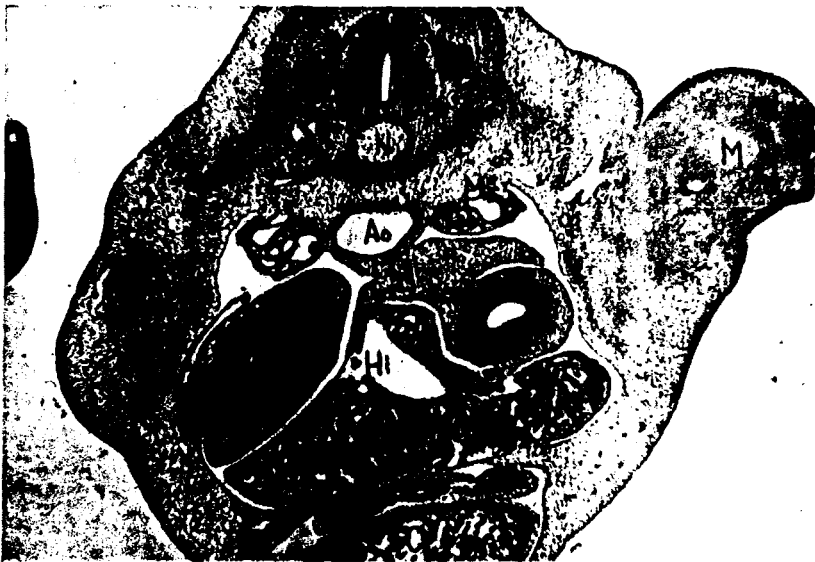


Fig. 83



Fig. 84

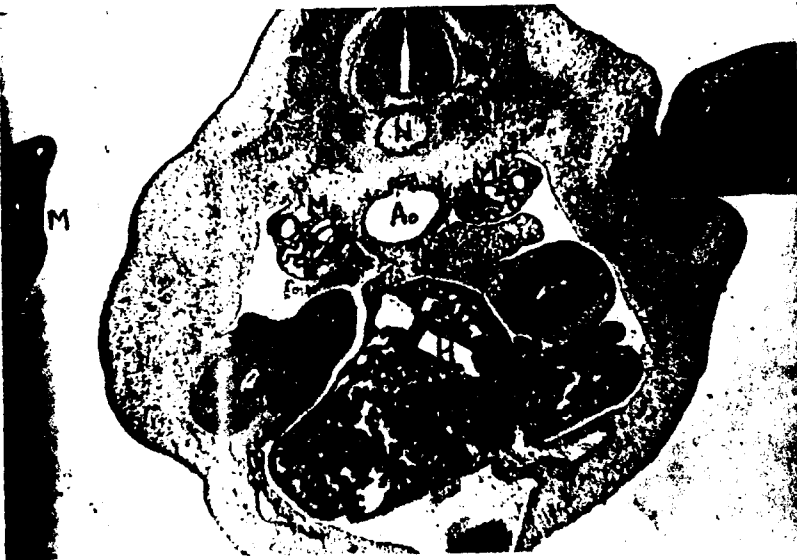


Fig. 85

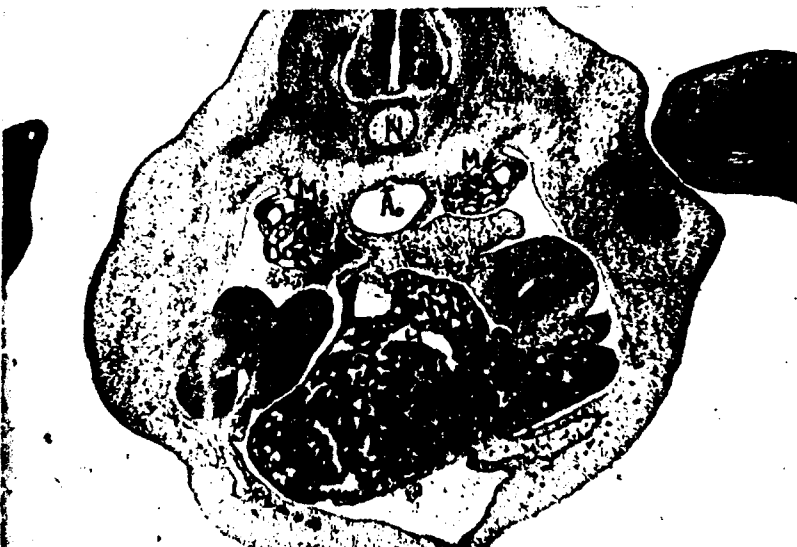


Fig. 86

116

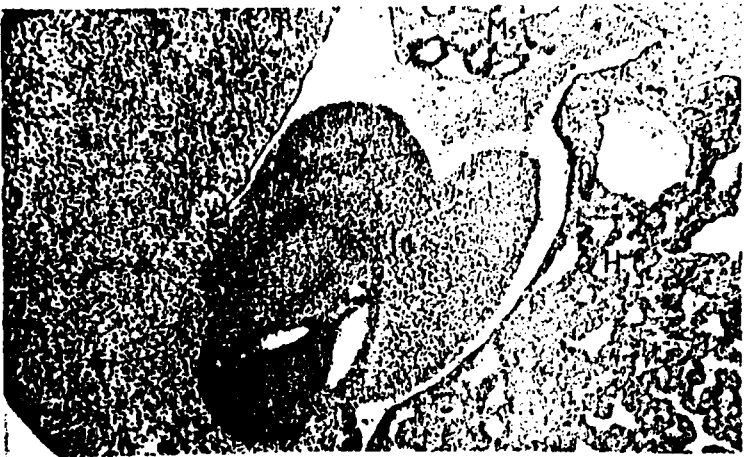


fig. 87

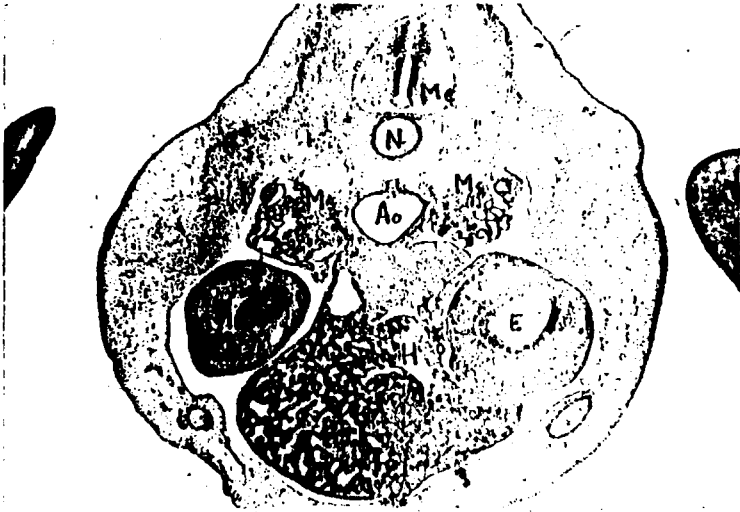


fig. 88

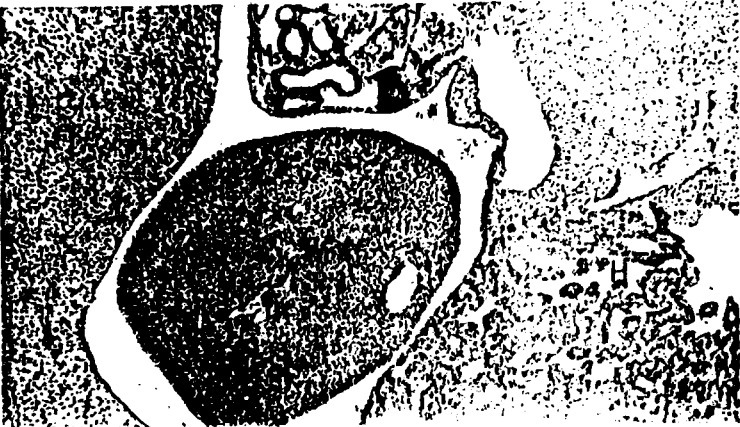


fig. 89

147

Fig. 90a

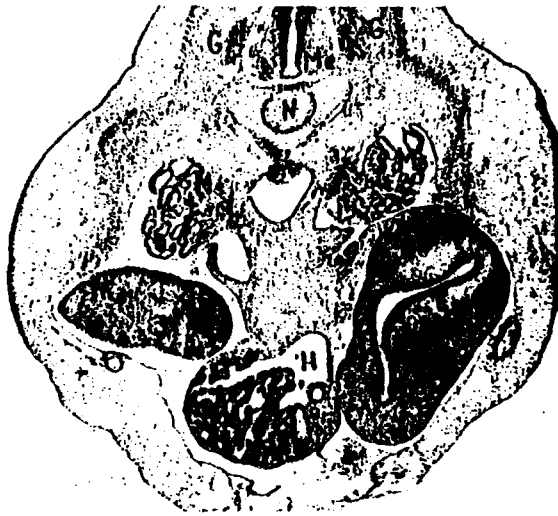


Fig. 90b



Fig. 90c



1A8

Fig. 91a



Fig. 91b

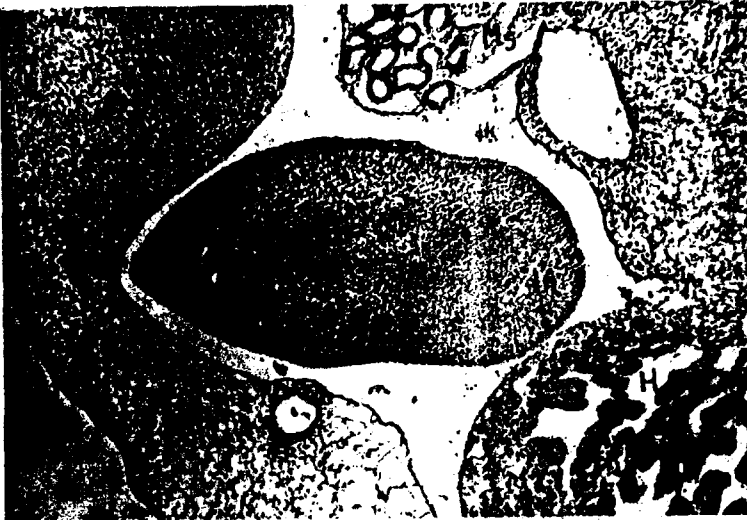


Fig. 91c



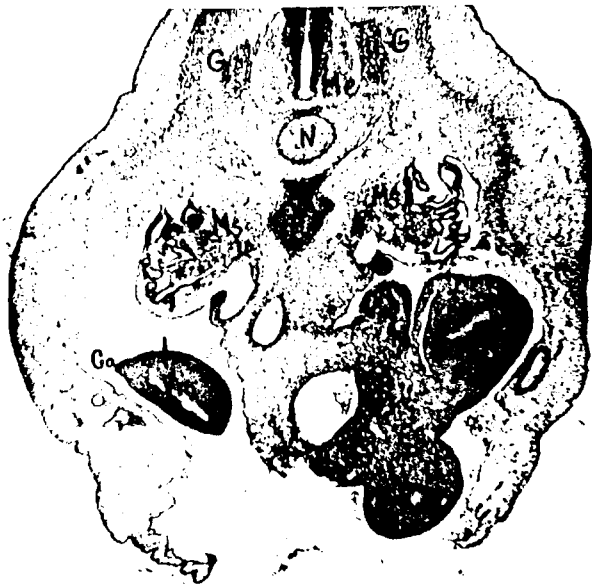


Fig. 92a



Fig. 92b

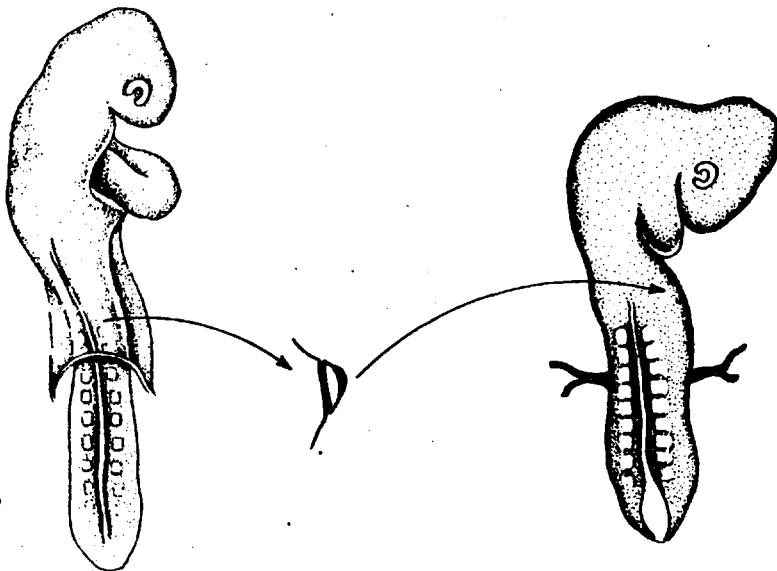
- 150 -

GRUPO III: Embrión C-25
=====

EMBRION C-25

Protocolo

- * dador: estadio 10 de Zacchei.
- * receptor: estadio 15 de Hamilton Hamburger.
- * Material Injertado: al no existir esbozo de miembro se secciona y extirpa el pequeño relieve o base de origen apendicular así como mesodermo lateral-paraaxial in segmentado.
- * Fijación: se fija vivo en estadio 24 de Hamilton Hamburger.



En los cortes más craneales fig.93, el injerto ha prendido en la porción dorsolateral de la cavidad celómica, implantado por una base que establece puentes con la porción dorsal y lateral de la cavidad celómica, así como con el tramo más superior del mesonefros. A este nivel estructuralmente está formado por un mesénquima laxo en el que aparecen de modo irregular amplios espacios vacuolares, muchos de ellos de origen vascular; así en la parte central aparecen dos gruesas formaciones vasculares y es precisamente a este nivel, donde el mesénquima se condensa a modo de nido germinativo de sustancia precartilaginosa, Fig.94; Un hecho de gran interés hay que destacar precisamente en este nivel y es la existencia de una gruesa raíz nerviosa que procedente de la médula del receptor se dirige hacia el miembro del lado derecho. Se sitúa en la base del injerto, de tal modo que incluso a ciertos niveles, da la impresión de disecar la pared celómica y estar situada inmediatamente bajo su epitelio, pero en ningún momento, intercambia o cede fibras al injerto. Este hecho es de gran interés, habida cuenta que por el contrario, un voluminoso vaso situado de idéntico modo, aquí también localizado, emite gran número de finas anastomosis que se introducen en el mesénquima de la estructura diferenciada. En cortes más caudales -Figs. 95a,b - el injerto ha aumentado de volumen estando únicamente adherido a la pared de la cavidad celómica en el área correspondiente a la base de implantación del miembro superior derecho por un pequeño meso. Las formaciones vasculares se han unificado estructurándose en un vaso de relativo grosor, en el que la adventicia se encuentra rodeada por una formación anular completa de mesénquima, con

un aspecto muy similar al de la arteria principal o axial del miembro. En el injerto se ha diferenciado en su porción dorsal un conglomerado irregularmente cilíndrico de sustancia precartilaginosa, con una consistencia también superponible al del miembro del receptor, estando todo ello, rodeado de un mesénquima laxo, sin estructuración, que a modo de sustancia indiferenciada ocupa al injerto. En su borde medial se diferencia una condensación lineal, que a gran aumento -fig.95b , corresponde a epitelio de recubrimiento. Es más, precisamente bajo el epitelio de la porción marginal, aparece una formación vascular que tanto por su topografía como estructura puede ser interpretada como vaso axial. Rápidamente el injerto pierde su conexión con la pared celómica -Fig. 96 - por lo que queda libre; sin embargo, la formación vascular observada en su borde lateral continúa, aumentando incluso en su diferenciación por lo que se transforma en el vaso principal del injerto. A ese nivel y rodeando de modo incompleto al núcleo precartilaginoso aparece en su borde ventral, una diferenciación en el mesénquima, que se estructura como blastema muscular, imagen ésta similar a la que se observa en los miembros del receptor. Sin embargo, la estructuración del injerto presenta con la del miembro del lado derecho una única diferencia y es que en ella, no aparece formación nerviosa, mientras que en la del miembro del receptor, claramente se distinguen dos nervios, uno, situado en la cara dorsal, que correspondera al radial, y otro junto a una gruesa formación vascular, arteria humeral o braquial, por lo que lo interpretamos como nervio mediano. La similitud entre ambas masas es cada vez más manifiesta, pues incluso, fig. 97 , aparece en

el injerto una atípica y pequeña cresta apical de SAUNDERS. El injerto establece, fig. 98, un nuevo pedículo de fijación con el hígado, de tal manera, Figs. 98, 99, que al crecer en dirección ventral, graba una huella profunda en su borde y cara posterior. Es precisamente a este nivel, Fig. 100a,b en donde se observa la formación de una gruesa red vascular que procedente del hígado establece conexión con las divisiones de los vasos primeramente diferenciadas en el injerto. A partir de este nivel, el mesénquima da la impresión de ser desplazado por las formaciones vasculares, que al ir progresivamente aumentando, hacen que el injerto se transforme, Fig. 101a,b, en una voluminosa formación sacular. El nido de blastemia precartilaginoso desaparece, por lo que el interior del injerto, aparece - Fig. 101 b, ahora ocupándolo la amplia malla o red vascular, entrecruzada por puentes o tabiques mesénquimales indiferenciados.

Esta disposición se acentúa en dirección caudal, Figs. 102, 103, en las que el mesénquima progresivamente es desplazado a la porción periférica, quedando el centro ocupado por una amplia laguna vascular, que finalmente - fig. 104 - forma un fondo saco, cuyas paredes la forman el epitelio de recubrimiento, así como una escasa lámina mesenquimal; el resto corresponde a la formación lacunar y elementos formes sanguíneos que la ocupan.

El injerto finaliza a nivel de la segunda porción del duodeno como una formación densa que viene a corresponder al fondo saco hemático en el que en último lugar se ha transformado el injerto.

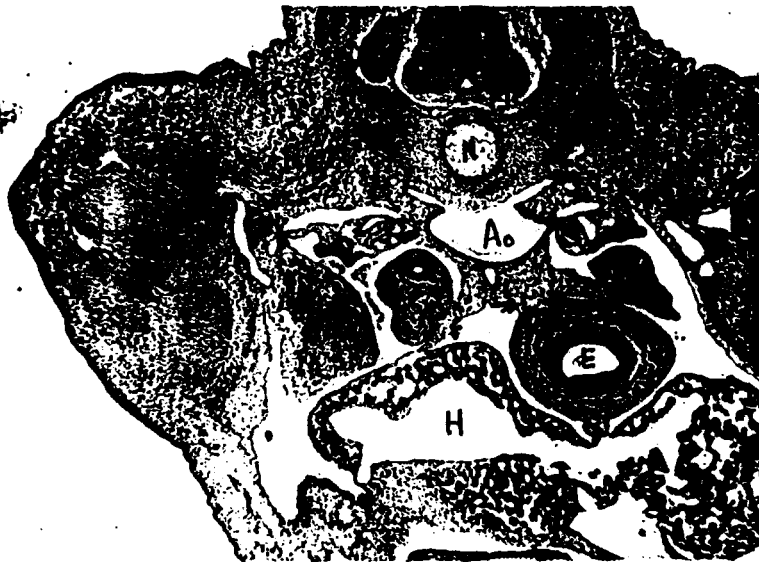


Fig. 93



Fig. 94

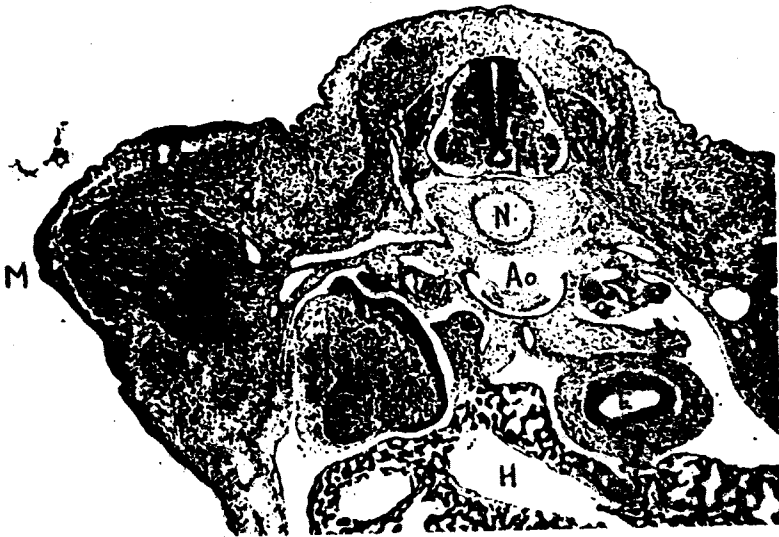


Fig. 95a



Fig. 95b

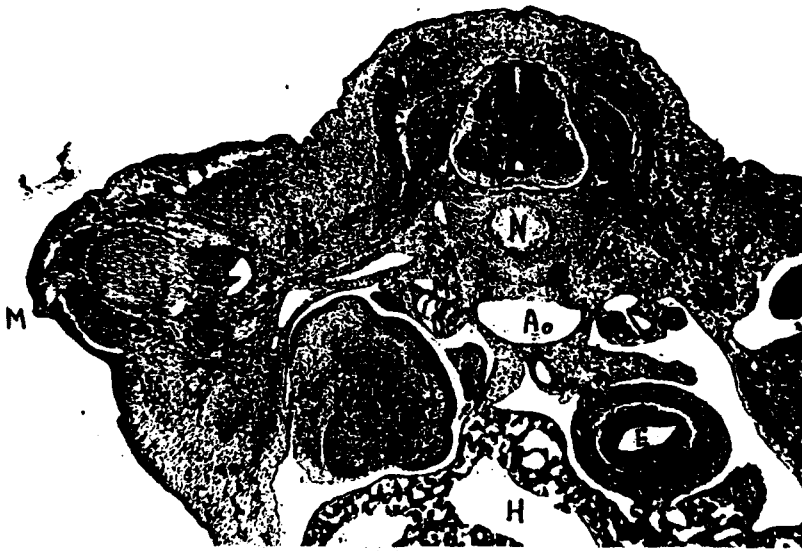


Fig. 96



Fig. 97



Fig. 98

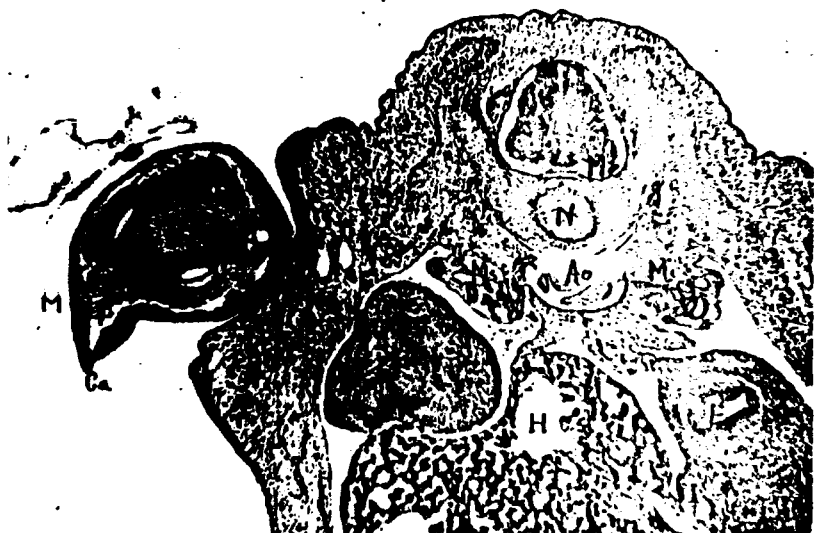


Fig. 99



Fig. 100a

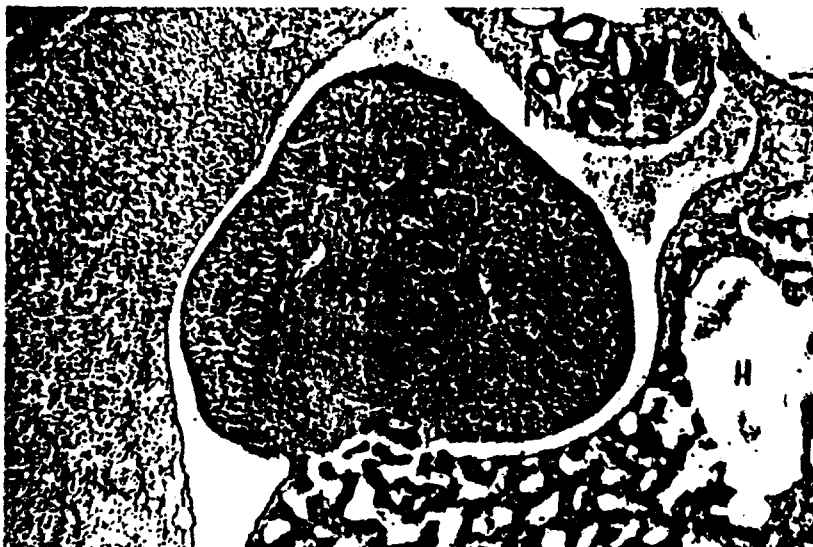


Fig. 100b

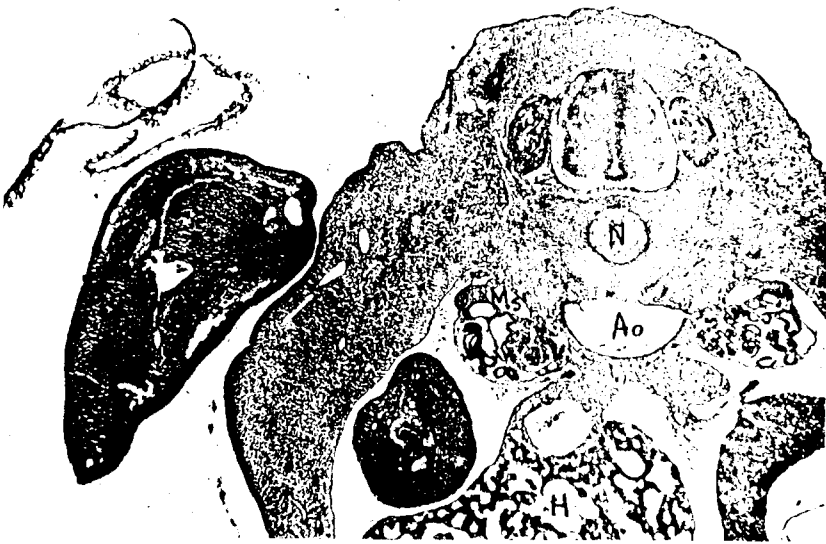


Fig. 101a

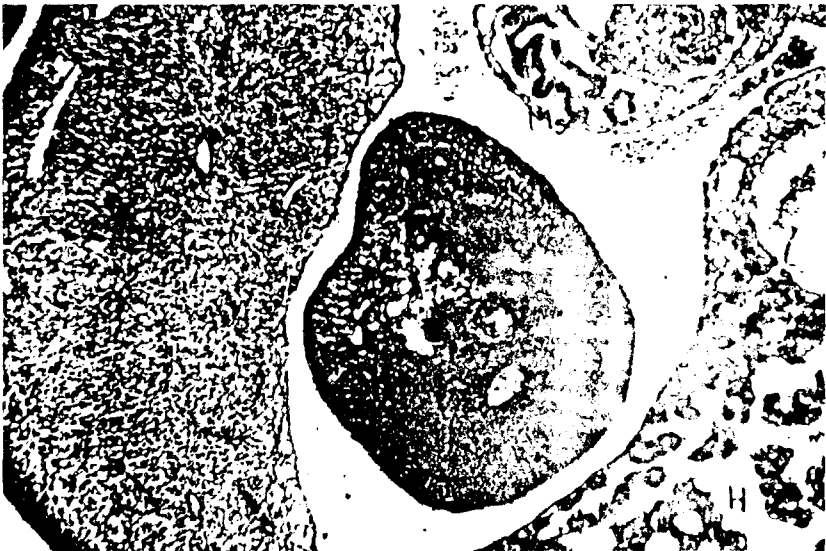


Fig. 101b

161

Fig. 102

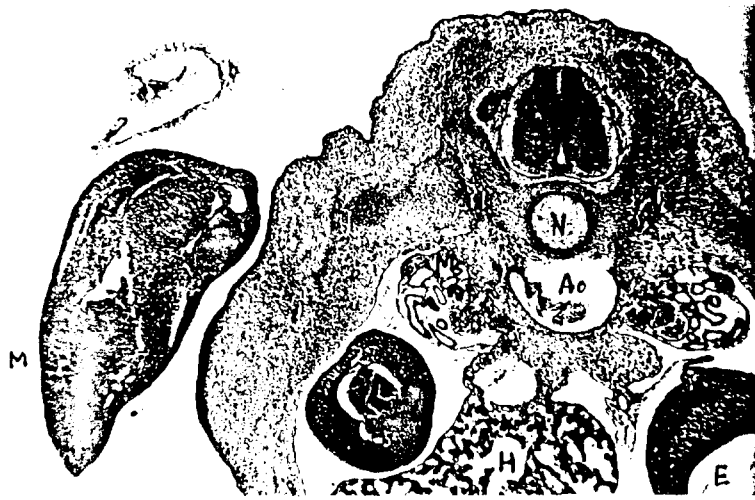


Fig. 103

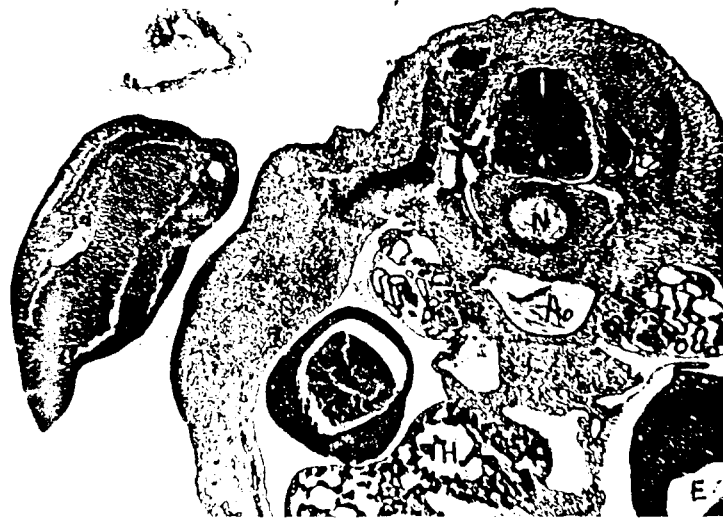
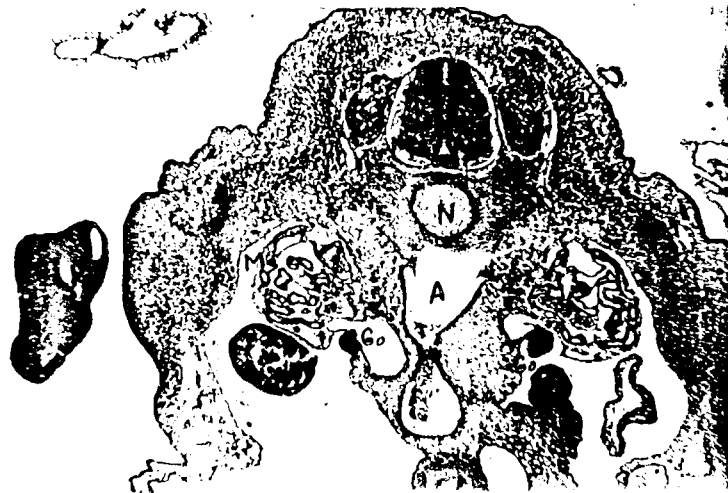


Fig. 104



GRUPO IV

Embrión	Estadio dador ZACCHEI	Estadio Receptor HAMILTON HAMBURGER	Fijación post-inter- vención HAMILTON HAMBURGER	Grosor Cortes	Coloración
H-4- 67	14	18	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina
H-7- 67	14	18	30	10 Micras	Hematoxilina Eosina
H-22-67	13	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
H-39-67	14	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SN- 5	14	18	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SN- 7	14	17	28	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SN- 4	14	17	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SN-39	14	18	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SN-43	14	18	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
SN- 2	14	18	30	10 Micras	Hematoxilina Eosina
H- 6-67	14	19	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
H- 6-51	14	19	29	10 Micras	Hematoxilina Eosina
H- 6-43	15	18	31	10 Micras	Hematoxilina Eosina

- 163 -

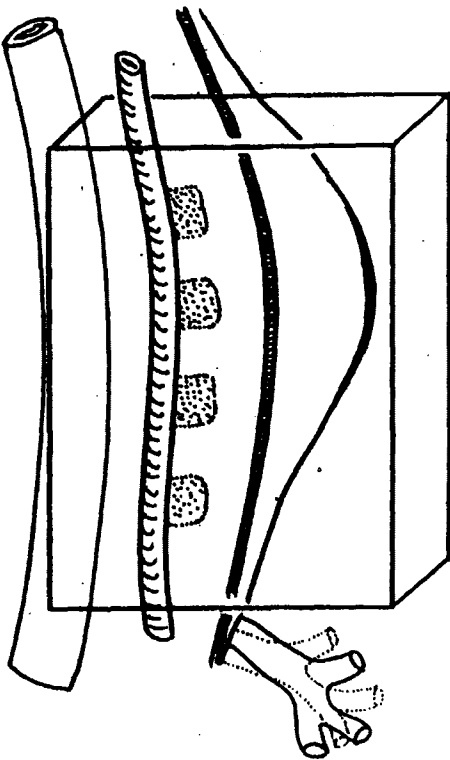
GRUPO IV

Embriones descritos:

* H4-67

dador: estadio 14 de Zacchei.

receptor: estadio 18 de Hamilton Hamburger.



GRUPO IV

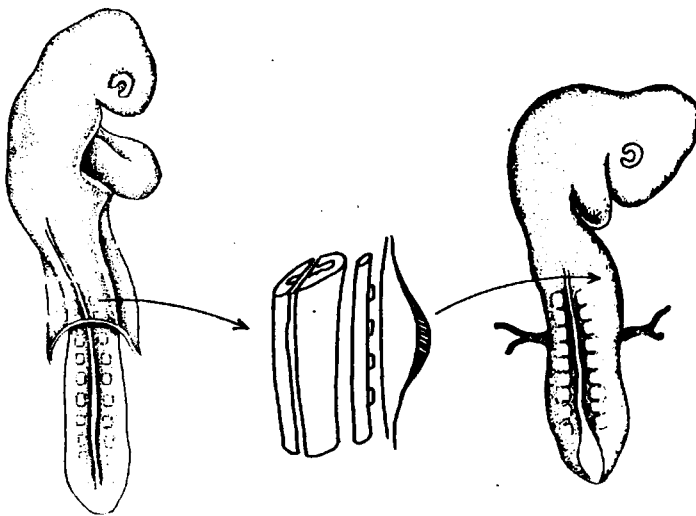
Embrión H4-67. Representación esquemática del material injertado.

EMBRION H-4-67

Protocolo

=====

- * dador: estadio 14 de Zacchei.
- * receptor: estadio 18 de Hamilton Hamburger.
- * Material Injertado: esbozo de miembro superior vascular sistema nervioso, y mesodermo para-axial segmentado -somito-.
- * Fijación: se fija vivo en estadio 31 de Hamilton Hamburger.



A partir del material injertado se ha diferenciado estructuras no sólo correspondientes al miembro, sino al Sistema Nervioso y notocorda. El injerto ha prendido en la raíz de mesogastrio ventral, lateral a estómago, y, ventral a sistema venoso portal y páncreas. Esta formado, Figs.105 a y b, por una masa de eje mayor anteroposterior, en cuyo pedículo de fijación aparecen formaciones mesonefríticas en el que claramente aparece en dirección dorsoventral Sistema Nervioso evertido que continúa su límite con un epitelio de recubrimiento que va envolviendo a una masa de mesénquima indiferenciado, en el que en su extremo más ventral aparece una laguna vascular similar al vaso axilar. En el eje del pedículo de fijación aparece una gruesa formación vascular que pone en conexión las formaciones del injerto con el grueso tronco arterial aórtico.

En seguida, Fig.106 el injerto nos muestra un gran crecimiento en dirección ventromedial por lo que su extremo más anterior, está próximo a la zona de transición estómago-duodeno. En él se ha diferenciado:

* Sistema Nervioso revertido, que corresponde a médula en típica disposición de eversión, mieloptosis, presentando en su porción basal pequeñas y discontinuas formaciones radiculares neurales que tras corto recorrido finalizan en el mesénquima inmediato.

* El eje vascular que ocupa la raíz o pedículo de fijación posee en sus inmediaciones lóbulos mesonefríticos, por lo que la formación mesenquimal está rodeada por un anillo de estruc

turas nefrales.

* Las formaciones lacunares que ocupan la porción anterior del injerto que progresivamente va adquiriendo la disposición de miembro, Figs. 107 a, b, y c, al unirse las dos porciones ocupan la porción medial, disposición ésta similar al vaso marginal. Es precisamente a partir de ésta figura cuando en la porción basal del sistema nervioso diferenciado aparece una nueva estructura - que corresponde a notocorda; superficial a ella, el sistema nervioso presenta un vestigio de canal medular. Ocupando el injerto aparece un mesénquima desorganizado sin aparente estructuración en el que aparecen pequeñas fibrillas procedentes del sistema nervioso diferenciado. En la porción ventral de la notocorda se ha diferenciado una formación vascular que corresponde a aorta.

Esta disposición se mantiene en cortes sucesivos, de modo que el injerto adquiere una configuración típica de miembro, - Figs. 108 a, b, y c, con una base de implantación amplia en la que existe notocorda, sistema nervioso y aorta dorsal. Es interesante señalar como el epitelio de recubrimiento que recubre la porción más rostral del injerto, se hace más evidente 25 micras en dirección caudal, de tal manera que Figs. 109 a, b, y c, puede fácilmente distinguirse a este nivel una cresta apical de Saunders. Es en ésta figura cuando se observa un hecho muy interesante y es la disminución del anillo mesenquimal que rodea a la notocorda que ahora adquiere forma regularmente cilíndrica, a diferencia de cortes anteriores en que presentaba disposición en S itálica irregular.

A nivel de la zona de transición de 1° a 2° porción duodenal, el injerto se hace más alargado, disminuye en grosor a la

vez que en su porción dorsal el mesénquima se condensa y las amplias lagunas vasculares en él existentes, disminuyen; sólo se localiza en su extremo ventral área de miembro; Figs.110 a,b.

Escasos cortes en dirección caudal, Figs.111 a,b, se produce en el injerto interesantes cambios; a la vez el pedículo de fijación ha desaparecido por lo que aparece libre en cavidad celómica.

* La notocorda se encuentra parcialmente rodeada por anillo cartilagosos y ventral a ella aparecen dos formaciones, que corresponden a las aortas ventrales.

* De la porción basal del sistema nervioso evertido se ven emerger pequeños filetes nerviosos.

* En la porción dorsal de la notocorda el sistema nervioso presenta una depresión correspondiente a canal medular.

* La porción correspondiente al miembro presenta densidad uniforme no apreciándose a estos niveles formaciones musculares; el epitelio de recubrimiento presenta una pequeña condensación o estratificación, que interpretamos como cresta apical.

Por último, Figs.112,113 a este nivel del intestino delgado, el injerto ha disminuido quedando de él, sólo la porción más ventral.

En resumen, en esta experiencia en la que se ha injertado conjuntamente con el área presuntiva de miembro, sistema nervioso a nivel medular y somito, aparece por vez primera en todas nuestras series fibras nerviosas, procedentes exclusivamente del material injertado, conjuntamente y al incluirse notocorda apare-

ce esta formación, que adquiere disposición atípica e irregular al igual que el sistema nervioso. Es interesante destacar la presencia de un voluminoso eje vascular que ocupa la raíz del injerto así como la existencia de formación que corresponde a aorta.

Tal vez como consecuencia del corto periodo de supervivencia mantenida tras la intervención no se ha diferenciado condensación en el blastema con carácter o significado precartilaginoso.

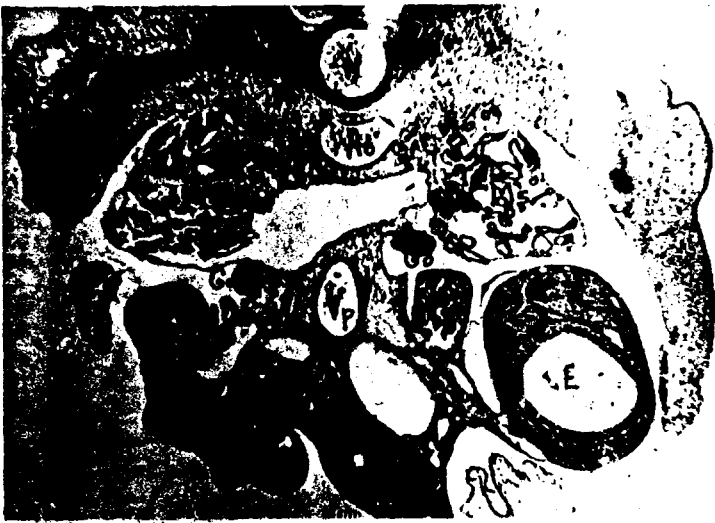


Fig. 105a



Fig. 105b



Fig. 106



Fig. 107a



Fig. 107b



Fig. 107c

113
Fig. 108a



Fig. 108c

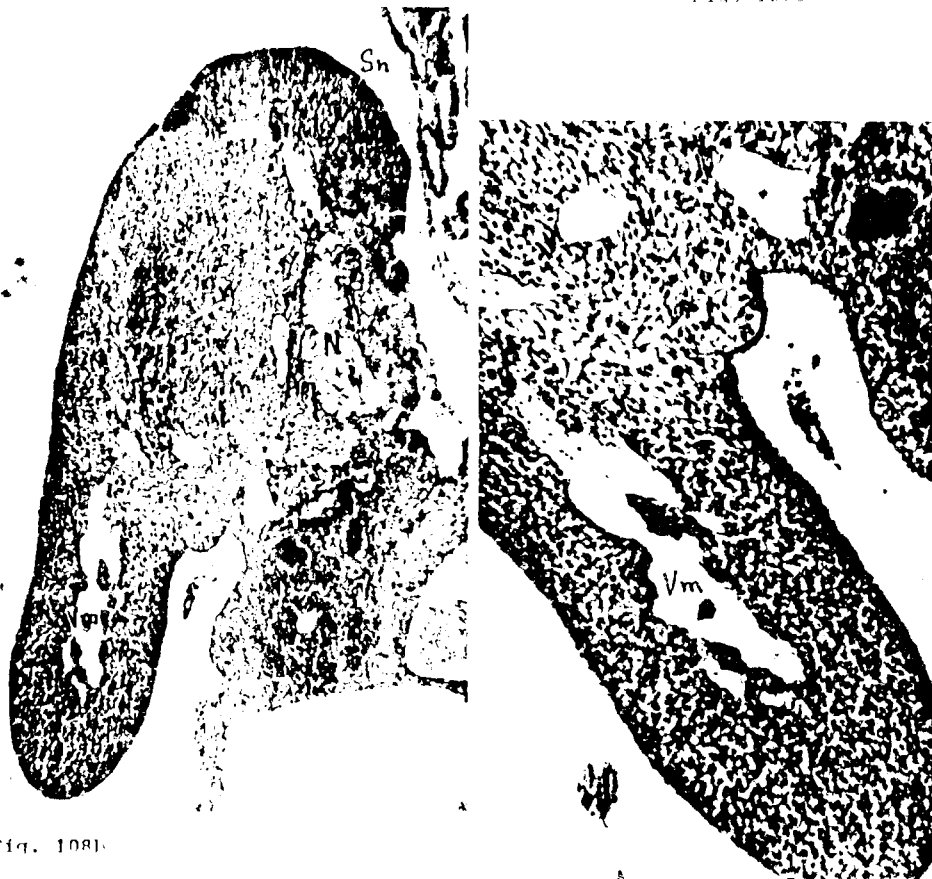


Fig. 108b

17b

Fig. 109a

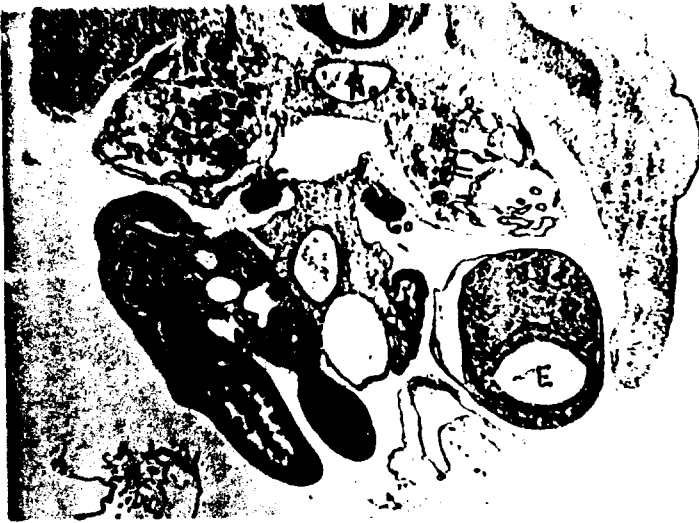


Fig. 109c



Fig. 109b

175



Fig. 110a

Fig. 110b





Fig. 111a



Fig. 111b



Fig. 112



Fig. 113

CLAVE DE LAS SIGNATURAS EN LA ICONOGRAFIA

Aa - - - Arteria Axilar.	H - - - Húmero.
Ab - - - Arteria Braquial.	Hf - - - Hgado.
Ad - - - Aurícula Derecha.	In - - - Injerto.
Ai - - - Aurícula izquierda.	Iv - - - Laguna vascular.
Ao - - - Aorta.	M - - - Miembro.
Av - - - Arco vertebral.	Me - - - Médula.
Ax - - - Arteria Axilar.	Ms - - - Mesonefros
B - - - Bronquio.	Mu - - - Músculo.
Bm - - - Blastema muscular.	N - - - Notocorda.
C - - - Corazón.	Nr - - - Nervio.
Ca - - - Cresta Apical de SAUNDERS.	Os - - - Osícula.
Cm - - - Canal medular.	P - - - Pulmón.
Co - - - Costilla.	Pa - - - Páncreas.
Cp - - - Cavidad pericárdica.	Pu - - - Pulmonar.
Cr - - - Coracoides.	R - - - Radio.
Cu - - - Cúbito.	Pn - - - Raíz nerviosa.
Cv - - - Cuerpo vertebral.	Sc - - - Escápula.
Cw - - - Conducto de WOLFF.	Scr - - - Escápula receptor.
D - - - Duodeno.	Sp - - - Septum primun.
E - - - Esófago.	Sv - - - Seno venoso.
Es - - - Estómago.	T - - - Tráquea.
Fp - - - Foramen Primun	Ta - - - Troncos arteriales.
Fs - - - Fondo de saco vascular.	Tpn - - - Tabique pleuroperi- cárdico.
Fv - - - Formación vascular.	Vd - - - Ventrículo Derecho.
G - - - Gendlio raquídeo.	Vj - - - Ventrículo izquierdo
Go - - - Gónada.	Vm - - - Vaso Marginal.
	Vp - - - Vena porta.

RESULTADOS Y DISCUSION
=====

“

RESULTADOS Y DISCUSION

Varias son las interrogantes que han surgido como consecuencia de éste trabajo de investigación, base para nuestra Tesis Doctoral; en síntesis, cuatro interpretamos como más importantes:

1°.- ¿A partir de qué estadio se diferencian las estructuras que corresponden a miembro?, esto es, ¿En qué estadio del desarrollo el material procedente del dador es capaz de auto-diferenciarse?.

2°.- ¿Qué estructuras se originan a partir del material injertado?.

3°.- ¿Los procesos de diferenciación de las estructuras que aparecen en el injerto, son normales? o por el contrario, ¿faltan alguna estructura?.

4°.- ¿Sufren los miembros injertados y diferenciados una neoinervación y neovascularización?.

Por último y aunque se ha tocado de forma marginal en nuestro trabajo, cabe señalar una interesante cuestión y es: las estructuras diferenciadas, ¿siguen su horario morfogénico? o por el contrario, ¿se adaptan al horario y mecanismos del huésped?, esto es, ¿mantienen su patrón genético o adquieren el del receptor?.

Los estadios por nosotros escogidos para la extirpación del material dador han estado comprendidos entre el VIII y X de ZACCHEI. Ello en base a nuestra propia experiencia, ya que en estadios previos a estos, el miembro o mejor las estructuras que se diferencian a partir del esbozo del mismo, no dan lugar a una formación armóni-

ca o cuando menos, con una cierta tipicidad. Esta hipótesis de trabajo confirmada en nuestras experiencias viene a ser superponible, en cierto modo, a la Experiencia de KIFNY, 1.960, en otras especies de vertebrados para quien el mesodermo presuntivo expresa su especificidad regional cuando tiene lugar el implante a partir del 2° día de incubación. Injertos de porción de tubo neural o cordón somítico, KIFNY y BRUGRAJ, 1.970, sin participación del área mesodérmica presuntiva de miembro, dan lugar en el injerto, a la diferenciación de un miembro, al haber adquirido el mesodermo ya, su especificidad y responder ante un inductor heterotípico.

En estadios más precoces, 11 a 12 pares de somitos, el mesodermo presuntivo de miembro no manifiesta aún su poder inductor es necesario inducirlo o ponerlo en contacto con el mesodermo somítico para que puedan expresarse las potencias inductoras; éste resultado ha permitido a KIENY, 1.971, confirmar como las potencialidades de miembro se expresan y están a su vez en dependencia al mesodermo somatopleural. Sin embargo, no permiten saber si en los estadios de 11 pares de somitos, el mesodermo del territorio presuntivo posee autónoma y específicamente sus propiedades o si es el mesodermo somítico el que le confiere su poder inductor. De cualquier manera, las experiencias muestran como en los estadios donde el mesodermo presuntivo no posee todavía poder morfogenético, sólo el mesodermo somítico regional tiene capacidad para en tiempo normal conferir dicho poder; ni el mesodermo somítico a nivel cefálico e incluso caudal, lo pueden sustituir. La inactividad o falta de potencialidad morfogenética del mesodermo somítico distante, por ejemplo, a nivel cefálico, puede explicarse en base

a que se haya situado y desarrollado a niveles en que normalmente no se forma tipo alguno de apéndice. Sin embargo, el resultado negativo obtenido con el mesodermo somítico de la porción caudal del cuerpo, es más difícil de interpretar ya que la Cresta de WOLF, correspondiente a miembro inferior en estos estadios se extiende próximo al polo inferior. Experiencias ulteriores de KIFNY 1.971, tratan de precisar si esta capacidad es debida a una pérdida precoz del poder miembrogenético del mesodermo somítico a nivel del ala o a su capacidad regional específica, por la que el mesodermo de la porción caudal sería incapaz de responder.

El mesodermo somítico de miembro conserva su poder morfogénico después del estadio en que el mesodermo somatopleural a su nivel adquiere capacidad autodiferenciativa y así, en los estadios de 11 a 20 pares de somitos, X a XIII de HAMILTON HAMBURGER, injertos de mesodermo somítico conteniendo la porción proximal de miembro, ejercen actividad inductora sensiblemente constante dando lugar a miembro. Esta cronología estimamos puede aplicarse como únicamente debida al poder inductor del mesodermo miembro presuntivo y debe ser distinguida de aquellos factores que intervienen en la autodiferenciación del esbozo del miembro. Así el esbozo de miembro no es capaz de autodiferenciación, nada más que en un estadio bien avanzado, a partir del cual, su mesodermo ha adquirido un poder inductor autónomo; HAMBURGER, 1.969, obtiene en injertos en cavidad celómica el desarrollo de esbozos de miembro cuando correspondía el material dador a embriones de los estadios de 24 pares de somitos. En injertos en la porción lateral del cuerpo, MURILLO FERROL, 1.965, no observa el desarrollo de esbozo si procede de -

embriones de menos de 29 pares de somitos. PINAUD, 1.970, en injertos en cavidad celómica de esbozo procedentes de embriones de los estadios 19 a 44 pares de somitos, precisa para que en el miembro superior sea posible una autodiferenciación, que el material ha de ser extirpado a partir de estadios de 25 pares de somitos; así mismo, y en técnicas de implantación celómica por vía extra-embriónica, BRUGAL, precisa que el estadio mínimo corresponde a los 23 pares de somitos. Coincidente con el estadio a partir del que se evidencia la capacidad de autodiferenciación de miembros, HAMBURGER, MURILLO FERRO y PINAUD, la somatopleura aparece a este nivel engrosada como resultante de una proliferación mesodérmica consecuente a la acción inductora que el mesodermo ejerce sobre el ectodermo subyacente, hecho éste, que ocurre a partir del estadio de 29 pares de somitos.

¿Cual es el modo de acción del mesodermo somítico?. El estado actual de nuestros conocimientos no permiten todavía responder definitivamente a esta interrogante. La contribución que podemos aportar a éste problema es que a nivel del área presuntiva, el mesodermo somítico puede ejercer su acción morfogénica sobre el mesodermo somatopleural sin que las relaciones tisulares normales entre ellos estén determinadas, esto es, próximas o en contacto. En las técnicas de asociación de estos dos constituyentes, el mesodermo somatopleural se encuentra determinado, por lo que da lugar a un miembro suplementario; éste resultado estimamos que es un hecho en parte dependiente a la influencia histoenzimática que ejerce el mesodermo somítico sobre el somatopleural, aunque no debe de excluirse una participación celular del mesodermo

somítico sobre o a nivel del mesodermo del futuro miembro. Si la hipótesis de una contribución material de los somitos al esbozo de miembro ha sido establecida en los anfibios, AMANO, 1.960 y 1.962, FINNEGAN, 1.962 y 1.963, y en los reptiles MILAIRE, 1.957 y RAYNAUD y VASSE, 1.968, no ocurre lo mismo en las aves, donde una participación celular masiva del mesodermo somítico no ha sido demostrada. Así, marcas de carbón situadas a nivel de miembro superior, en el mesodermo segmentado, no han sido encontradas en el esbozo ya diferenciado de miembro, SAUNDERS, 1.948, PINOT, 1970 GRIN, 1.970. Por otra parte, la interposición de un filtro de Millipore entre el mesodermo somítico y el territorio presuntivo de miembro, no impide el desarrollo de éstos, MURILLO FERROL, 1.965.

Sin embargo, un hecho particular es interesante destacar el mesodermo somítico extirpado en fase morfogénica inductora e implantado en mesodermo somatopleural, es capaz en su ausencia, de inducir un miembro suplementario. Estas experiencias dan lugar a formaciones atípicas de miembro, al no contener equipamiento esquelético, nódulos cartilaginosos ni formaciones típicas. Por ello, estimamos que este tipo de experiencias muestran como el mesodermo somatopleural no posee competencia miembrogénica si no es bajo la influencia morfogénica de los somitos correspondientes al área de miembro.

Los injertos de la porción distal del esbozo presuntivo de miembro se desarrollan y dan lugar heterotópicamente a miembro cuando son extirpados en fase en que la predeterminación ya está firmemente establecida; es más, en aquellas experiencias en que hemos injertado todo el esbozo o incluso material mesodérmico segmen

tado del nivel de la base de implantación de miembro, dan también lugar a miembro con un grado de diferenciación mayor. Este hecho nos puede llevar a considerar a que en las fases iniciales del desarrollo el esbozo de miembro si bien posee una capacidad presuntiva específica para dar lugar a miembro, necesita el aporte de material de mesodermo paraaxial segmentado tal y como se evidencia en la serie I en la que aparece un cinulum, que practicamente por su estructuración, corresponde a un embrión testigo del estadio X de ZACCHEI. Es evidente que estos territorios de la somatopleura poseen precozmente material y factores indispensables para el desarrollo de miembros armónicos y completos. Los procesos de organogénesis y de diferenciación son esencialmente los mismos en la somatopleura destinada a formar miembros, cuello o pared de cuerpo; es consecuente a un patrón genético del que en gran parte dependen los mecanismos del normal desarrollo, profundamente diferente aunque en determinadas fases interdependientes para cada región. Los factores de esta diversidad o especificidad aún son desconocidos sin embargo en el tritón, la banda de somatopleura que está interpuesta entre los territorios del miembro anterior y posterior, dan origen a una extremidad perfecta si es sometida a estimulaciones diversas; así, si se injerta otocisto, plácoda olfativa o microconglomerado de celoidina, induce el desarrollo de un miembro heterotípico. Para BALINSKY, 1.957, el material inespecífico implantado, inducirá o sera capaz de iniciar y activar los factores específicos para el desarrollo del miembro, que estarían contenidos en el mesodermo de la somatopleura sin participar directamente en la formación de la extremidad heterotípica. Asi mis

mo, cuando se injerta mesodermo del área presuntiva de miembro en la somatopleura de la porción lateral del cuerpo, el injerto se limitaría a poner en juego una serie de reacciones locales.

El primer signo morfológico de la formación del esbozo de los miembros en los embriones de amniotas es la aparición de un espesamiento del ectodermo, cresta de WOLF, situada bajo forma de semiluna alargada en el eje longitudinal del embrión. La epidermis que cubre el esbozo mesodérmico presenta un mayor grado de condensación sobre su cara ventral, que aumenta sobre todo a nivel del vértice del borde libre del miembro, nivel en donde adquiere el aspecto de cresta cada vez más espesa y con más relieve. Esta condensación epiblastica se reduce en sentido craneo-caudal y dorso-ventral, a la vez que su grosor aumenta con el alargamiento del miembro. Viene en admitirse que la cresta ectodérmica es el resultado de una inducción ejercida por el mesodermo subyacente del esbozo; en efecto, en embriones de aves, esta condensación epitelial se diferencia e induce las formaciones de partes de miembros, situadas en la pared del cuerpo o a nivel de la cola, SEARS y ZWILLING, 1964, o incluso a nivel del ectodermo extraembrionario KIENY, 1.960, cuando son puestos en contacto con mesodermo del esbozo precoz de miembro. Sin embargo, la formación de la cresta apical no es únicamente debida a la proliferación celular in situ; las células epiteliales se multiplican a lo largo de una banda ventral próxima a la base de implantación del mismo. La condensación apical se forma y se mantiene debido a un deslizamiento próximo-distal del ectodermo de las dos caras opuestas del esbozo desplazamiento de ectodermo descrito por LEVI, 1.908, aunque has-

ta, AMPRINO Y CAMOSSO, 1.958, no había sido posible su demostración experimental, recientemente revisada por SEARS Y ZWILLING, 1.964.

Los métodos de marcas de carbón introducidos en regiones diversas del mesodermo del esbozo, evidencian la topografía de los territorios presuntivos de las diversas partes del miembro, SAUNDERS, 1.948, HAUPE, 1.956, AMPRINO Y CAMOSSO, 1.958. En los estadios precoces de la morfogénesis de un miembro, embriones de pollo de 36 somitos, estadios 18 o 19 pares de HAMBURGER HAMILTON sólo las partes destinadas a formar la cintura y estilopodo están individualizadas, mientras que cingopodo, metapodo y autopodo no están aún establecidos. Estos territorios se individualizan en la región apical del esbozo a la vez que este último aumenta en grosor y longitud, por lo que en cada estadio del desarrollo se produce una segregación de estructuras distales bajo forma de capas estratificadas siguiendo el eje próximo-distal del esbozo. En efecto, las marcas introducidas en la parte distal del mesodermo del esbozo de miembro, se encuentra más tarde a niveles cada vez más distantes del borde distal, como si otros territorios se interpusieran entre éste y las partes marcadas.

Es evidente pues que este tipo de experiencias vienen a confirmar en parte, las realizadas por nosotros, sobre todo las del grupo I, en las que extirpábamos no solamente el esbozo del miembro, sino el mesodermo somítico, paraaxial, correspondiente a su base de implantación. En todos estos casos, el resultado ha sido un miembro con mayor grado de diferenciación a la vez que aparecen estructuras con mayor tipicidad. Sin embargo, el problema -

se amplia pues no solo es necesario conocer la localización del material a extirpar e injertar, mesodermo o mesénquima somítico, sino la relación existente, su diferente estructuración y la evolución ectodérmica que los recubre, pues se conoce la existencia de procesos de interrelación entre ambas hojas en la edificación de un miembro normal.

Nuestras experiencias vienen a clarificar parte de este interesante proceso morfo-genético, habida cuenta de que en ellas, en unos casos, hemos extirpado parte de la envoltura ectodérmica, mientras que en otros la mantenemos con el engrosamiento apical y en otras ocasiones sin el, esto es, hemos realizado la lisis de la cresta ectodérmica apical o cresta de SAUNDERS. Sin embargo, en la mayoría de las experiencias que presentamos en éste trabajo de investigación, hemos mantenido la envoltura y engrosamiento ectodérmico.

Los miembros del embrión de pollo, STARS y JANNER, 1.971, pueden ser reconocidos histológicamente en el estadio 16 de HAMILTON HAMBURGER como condensaciones mesodérmicas en la cara lateral del cuerpo embrionario, haciéndose evidentes a partir de los estadios 17 y 18 de HAMILTON HAMBURGER; no obstante, las regiones formadoras de miembros, han sido localizadas en el estadio 7 a nivel de la cara lateral del cuerpo embrionario, MOLE, 1.934, RUDNICK, 1.945, CHAUVE, 1.959. Injertos de ectodermo más mesodermo de regiones miembro-formadoras, embriones del estadio 8 de HAMILTON HAMBURGER, RUDNICK, 1.945, o injertos de mesodermo sólo de las regiones de miembro en estadios 12 a 17 de HAMILTON HAMBURGER, dan lugar a miembro; los ejes craneo-caudal y dorso-ventral de éstas áreas y -

su contenido, ectodermo más mesodermo, han demostrado estar determinadas en el estadio 12 de HAMILTON HAMBURGER. Para KIENY, 1976, las combinaciones heteroespecíficas aportan una contribución de gran valor en el desarrollo del miembro, ya que evidencian un proceso de desplazamiento o deslizamiento continuo del ectodermo en dirección distal, por lo que la mayoría de las células ectodérmicas y en especial las correspondientes a la cresta apical se originan proximalmente y son transportadas a la porción distal por movimientos propios del ectodermo en relación con el mesodermo, - AMPPINO y CAMOSSO, 1.958, KIENY, 1.975. Por último, existe un particular independencia de las células de la peridermis en relación con las basales ectodérmicas, de tal modo, que el desplazamiento en dirección distal de la peridermis es más rápido que el realizado por las células ectodérmicas basales; los resultados expuestos por KIENY y PAUTOU, 1.976, difieren no obstante de los de WOLPERT y colaboradores, 1.973, fundamentalmente en que las operaciones o técnicas realizadas difieren: 1° En el estadio en que la experiencia ha sido realizada, pues la mayoría de los injertos de KIENY y PAUTOU lo fueron en el estadio 24 de HAMILTON HAMBURGER, fase que precede sólo en escasas horas a la determinación irreversible de los tejidos, en especial cartílago y músculo según su localización central o periférica en el esbozo del miembro. 2° a la amplitud del territorio presuntivo de la cintura escapular sobre el que se ha realizado el injerto, y por último a la técnica operatoria propiamente dicha.

NICHOLAS, 1.933, injerta esbozos aislados y porciones de embriones de rata en coioalantoides de pollo, observando como

el grado de crecimiento y diferenciación de las estructuras aparecidas dependen fundamentalmente del estadio del material donante, técnica del trasplante y medio en que se han conservado hasta el momento del injerto; por ello, embriones presomíticos o de los primeros estadios somíticos cuando fueron trasplantados con sus membranas intactas, evidenciaron como el desarrollo progresivo de la forma embrionaria se relaciona con la existencia de una placenta funcional; de otra parte, embriones mas avanzados en su diferenciación han evolucionado hasta un estadio bien avanzado, evidenciándose en los mismos, las formaciones ópticas, auditivas e incluso la existencia de miembros.

Los resultados obtenidos en trasplantes de tejido cartilaginoso y hueso de STEPHENSON y TOMKINS, 1.964, es aparentemente similar a las experiencias de injertos de cartílagos embrionarios de anfibios, reptiles y mamíferos, ya que continúan su crecimiento y diferenciación cuando son trasplantados a corioalantoides, siempre en dependencia del factor edad, ya que el cartílago joven, poco diferenciado, crece bien no así, el del mayor grado de estructuración que lo realiza con menos extensión; por lo que la gradual reducción en capacidad de crecimiento y diferenciación se evidencia en toda técnica de xenoplástia, ya sea de cartílago embrionario o de otra estructura. Posteriormente BRADLEY observa en injertos de estructuras de aves con diferente volumen nuclear, la formación de cartílagos pequeños e irregulares, en los que la cintura era siempre anormal, variando en relación a otras formaciones cartilaginosas aparecidas en su disposición, por lo que parece no haber correlación entre el grado de diferenciación en miembro y cintura. Este

hecho lo hemos observado en nuestras series del grupo III en las que hemos injertado conjuntamente con el esbozo o area de miembro porción proximal de la base de implantación del mismo, esto es, - cresta de WOLFF existente en continuidad con el área presuntiva - de miembro. En todas nuestras experiencias se diferencia cartilago y formaciones mesenquimales que le confieren al injerto un aspecto y morfología completamente normal, incluso y así lo describimos en una de las observaciones, su similitud es completa a un miembro típico de un testigo correspondiente al estadio X de ZA - CCHEI.

El examen histológico evidenció procesos de condrogénesis normal e incluso osteogénicos precoces, aunque solamente se evidenciaron en dos casos de nuestras experiencias. Los procesos osteogénicos más avanzados presentaban graves anormalidades consistentes fundamentalmente en hipertrofia de la formación ósea, cavitación anormal con incurvaciones y fundamentalmente, fusiones articulares. Las fusiones son mas frecuentes para BRASLEY, 1.941, entre fémur y tibia en los injertos que realizó de miembro inferior; para nosotros, sin embargo, y al haber realizado nuestras series con áreas de miembro superior, las fusiones son mas evidentes y se localizan sobre todo a nivel de la articulación del miembro con los huesos del antebrazo.

Las articulaciones entre elementos largos están para BRADLEY, 1.941, más frecuentemente afectadas que las correspondientes a huesos cortos, no describiéndolas entre las formaciones de la -- porción distal del miembro. Los elementos que sufrieron un grado - de flexión o angulación y los puntos de contacto entre ellos que -

aparecían en las áreas de fusión, posiblemente son el resultado del crecimiento diferencial y a la vez causa de incurvación y anulación de cavidad. Estos tipos de fusión fueron descritos por HAMBURGER y WADGH, 1.940, clasificándolos en dos tipos o grados; el primario, consiste en la fusión por tejido fibroso y el resultado es que los elementos en contacto están anclados por áreas fibrosas. El segundo tipo de fusión, descrito por FELL y CANTY, 1.934, se realiza por cartilago y ello debido al cese o anulación de la diferenciación articular y como consecuencia, ulterior fusión de los esbozos o rudimentos oseos entre sí. Ocasionalmente pueden aparecer en la misma articulación ambos tipos de fusión, según nuestras observaciones, embriones de las aves, en los que se evidencia la presencia de un tejido fibroso en la región media y cartilago en las porciones laterales; estas dos formas o tipos de fusión, incluso son observables en una misma articulación. El tejido muscular de los injertos era atípico, READLEY, 1.941, mostrando una marcada tendencia hacia la degeneración, al contrario de lo que observábamos en el sistema esquelético o de soporte. HUNT, 1.932, HAMBURGER, 1.979 y EASTLICK, 1.933, observaron como la diferenciación muscular en el miembro ocurre durante un período limitado en ausencia de aporte nervioso. Nuestras experiencias claramente evidenciadas como la ausencia de un aparato nervioso condiciona una desorganización muscular, hecho este coincidente con las observaciones clínicas y experimentales, en las que músculos desprovistos de aporte nervioso motor, degeneran a menos que se les provea de una estimulación artificial suficiente. En el músculo adulto la degeneración grasa se reconoce por una acumulación

de gotas a nivel de las fibrillas para finalmente aparecer un bloqueo del espacio interfibrilar con ausencia de sarcolema, proceso éste que BRADLEY describe en sus observaciones.

EASTLICK, 1.943, describe como los blastemas musculares o premusculares que no poseen inervación, sufren un proceso de - sarcolisi y fagocitosis, siendo reemplazados por un tejido adiposo irregular e inespecífico, sobretodo en aquellos casos en que - la vascularización es irregular y ha tardado tiempo en presentarse.

En muchas observaciones el desarrollo del tejido muscular en los injertos era anormal, por el gran número de fibras, así como por la marcada desdiferenciación de las mismas, observándose no obstante la presencia de formaciones tendinosas. BRADLEY, 1941,

La masa muscular en injertos es según nuestras observaciones menor y a la vez menos diferenciada que en los controles, encontrándose procesos de degeneración con presencia de células atípicas, vacuolas y engrosamientos posiblemente degenerativos, que dan lugar a formaciones musculares atípicas por su forma y localización. En nuestras experiencias es mas frecuente su presencia en la serie II evidenciando la presencia de nuevos conglomerados atípicos de masa sistemática en período premuscular; a mayor aumento aparecen gotas de grasa en pleno espesor, así como una marcada y evidente indiferenciación miodénica. BRADLEY, en algunos casos, - describe fibras musculares unidas a cartílagos por medio de formaciones fibrosas que interpreta como tendón; en nuestras experiencias este hecho no es evidenciable, habida cuenta que en la mayoría de las observaciones no se han diferenciado fibra muscular, si

no blastema premuscular; sin embargo, en otras observaciones, serie 3, aparecen fibras musculares; su unión a cartilago se realiza por un tejido en vías de diferenciación; la mayoría de las fibras musculares eran atípicas y presentaban discretos signos de degeneración, ya que su morfología era esférica en vez de alargada existiendo gran número de macrófagos que los envuelven en su totalidad, por lo que solo es posible describir un escaso número de miofibrillas normalmente organizadas; entre ellas, las células musculares se han hecho más redondeadas y su ectoplasma contiene muchas y pequeñas gotas de grasa. En una fase más avanzada, el proceso degenerativo conlleva la observación de grandes vacuolas citoplásmicas únicas presumiblemente formadas por fusión de las gotas de grasa, resultante a su vez, de la deformidad nuclear y disminución citoplasmática, por lo que las células aparecen o adquieren una apariencia de tejido adiposo.

Este proceso de degeneración muscular, es aún más evidente en injertos sin inervación, en los que en el interior de las células musculares aparece una gradual acumulación de contenido graso que progresivamente se va uniendo para formar grandes vacuolas, que a su vez, condicionan la presencia de células esféricas con el núcleo desplazado a un polo; la posterior acumulación de grasa, distorsiona al núcleo, que degenera "in situ" proceso seguido de ruptura de la membrana celular.

BRADLEY, 1.941, realiza el estudio histológico de la diferenciación cartilaginosa y del periodo inicial de la osificación observando que eran normales, siendo independientes a la presencia o no en los injertos de inervación así como a la actividad funcio-

nal del miembro desarrollado.

En nuestras observaciones, los cartílagos adquieren una morfología y disposición muy avanzada e incluso en observaciones de las series I y II, llegan a adquirir una estructuración prácticamente normal. Sin embargo, a veces, aparece una cierta e irregular distorsión morfológica que interpretamos puede ser el resultado de factores no específicos relacionados con la técnica operatoria e incluso con el ulterior desarrollo vascular, así como también a que el injerto haya sufrido en su manipulación alteraciones tales como excesiva hidratación, alteración tisular..., hechos estos, que BRADLEY, considera en sus experiencias muy frecuentes, no así en las nuestras.

Las observaciones de fusiones articulares, BRADLEY, 1941, son similares a los hallazgos de HAMBURGER y WAUGH, 1940, y se localizan principalmente en las articulaciones de la cintura y entre los huesos largos; sin embargo, a nivel de las articulaciones falángicas distales prácticamente no suelen observarse. Las fusiones no se han descrito en ninguno de los especímenes control con inervación normal y actividad funcional "in vivo".

En nuestras experiencias, en todos los miembros injertados, que no presentaban inervación, aparece una cavidad articular en su normal situación topográfica, que a su vez es estructuralmente anormal, coincidente siempre con fusiones primarias o secundarias a distinto nivel, aunque el proceso de cavitación en todas ellas es evidente.

La fusión articular puede ser interpretada consecuente a que la fase de diferenciación cartilaginosa en las experiencias,

persistía mucho más allá que en la normal, por lo que el tejido - fibroso articular es reemplazado en tiempo distinto, esto es, antes por cartilago presentando por tanto, una fase atípica, secundaria, de condricificación. Algunas fusiones fibrosas eran masivas y como tal persisten, hecho este opuesto al criterio normalmente establecido, LEVI, 1909 en la que la separación articular ocurre inmediatamente tras la formación en fase blastemática de los elementos esqueléticos.

Un hecho habitual es que no aparece reacción alguna de inmunidad, rechazo, en el embrión huésped al injerto y ello por varias razones. Principalmente y es un hecho constante, el no observarse presencia de acúmulos leucocitarios; sólo y excepcionalmente, aparecen fagocitos a nivel de los elementos musculares degeneradas. Sin embargo, la degeneración muscular no era el proceso único a nivel del injerto, ya que aparecen y describimos fases de normal desarrollo y disposición en los restantes estructuras. En otros sentido, es un hecho ya de antiguo aceptado, SALOMON, - 1.963, que difícilmente los embriones de pollo pueden estar sensibilizados a células extrañas, antes del quinceavo día, ya que el inicio de la competencia inmunológica frente a trasplantes de elementos celulares extraños no aparece hasta el 2° día de la eclosión.

Para SUMMERBELL, LEWIS y WOLPERT, 1.977, el grado de diferenciación del injerto está en relación con la capacidad y estructuración del donante y receptor. Así, en injertos de cartilago -- continúan su normal crecimiento cuando proceden de dadores de especies y género distinto al del huésped incluso cuando el material

lo es de mamífero; si el donante es de los estadios iniciales - del desarrollo y esta determinado; de igual modo, la edad es un factor de importancia en los resultados de xenoplastias, ya que material extirpado en jóvenes embriones crecen y se diferencian adquiriendo a veces un grado similar al del receptor; sin embargo al aumentar en edad, aparece una gradual reducción, en su capacidad, tal vez en dependencia a que en los tejidos indiferenciados o en áreas prospectivas, actúan con menor intensidad los mecanismos inmunológicos, que parecen estar basados en los requerimientos metabólicos de determinadas estructuras, por lo que la especificación de un tejido, es mejor en ambientes xenoplásticos, receptores que no han de necesitar metabolismo específico para la supervivencia sino también para su crecimiento y diferenciación.

SENO y BUYUKOZER, 1.958, evidenciaron como somitos marcados procedentes de embriones de ave de los estadios 9 a 11 pares de HAMILTON HAMBURGER, injertados en membrana corioalantoidea son capaces de formar cartilago en ausencia de notocorda e incluso de médula espinal. BALINSKY, 1.966, describe la existencia de un factor de desarrollo que actúa sobre la diferenciación mesenquimato-sa del esbozo de miembro en cultivo, por lo que en cultivos de esbozos de miembro en salieres con filtros de Millipore, la densidad celular se encuentra directamente asociada a los calibres o diámetros del poro; densidades bajas diferencian blastemas pre-musculares al contrario que las altas en las que aparecen en todas formaciones cartilagosas, a la vez que densidades intermedias forman músculo y cartilago de modo constante. BALINSKY, interpretó estos hallazgos como una determinación de los patrones de agru-

gación dependientes al volumen y densidad celular.

Sin embargo, resulta difícil depender o hacer depender el proceso de diferenciación mesenquimal a la determinación y gradiente celular, ya que factores externos juegan una parte importante en la expresión de una determinada área, así como su ulterior determinación; hecho éste observado por ABBOT, HOLTZER, 1.966, 1.968, en cultivos de monocapas de condrocitos vertebrales, en los que la densidad de las células y medio influyeron no sólo en la capacidad de formación, de cartilago, sino a su vez, en la medida y frecuencia de su aparición. CAHN, 1.966, describe cómo la proporción de capas que constituyen la matriz del cartilago varían con el medio, densidad celular y fase de crecimiento celular, pudiendo en determinadas circunstancias o etapas, perder todo índice sus características de diferenciación, que son recuperadas nuevamente cuando las condiciones ambientales se normalizan y son óptimas. KONIGSBERG, 1.966, usando células retinianas pigmentadas, describe como éstas estirpes celulares aisladas o en contacto con estirpes celulares o áreas mesenquimatosas crestales, pueden reemprender de nuevo su capacidad y función en dependencia al ambiente en que se realiza el cultivo.

Evidentemente pues, estos hallazgos sugieren la presencia de un periodo de estabilización durante la diferenciación, en el que las células parecen requerir influencias del medio periambientai para que la diferenciación definitiva pueda lograrse; sin embargo, en un mínimo número de éstas células parecen ser capaces de mantener un estadio de determinación latente hasta que las condiciones necesarias estabilizadoras aparecen determinadas. En nues

tras pbservaciones, aparecen áreas de elementos mesenquimales mejor organizados o en mayor grado de diferenciación, próximas a grandes formaciones vasculares, éste hecho viene a hablar a favor de una epigénesis trófica en el sentido de DALCA.

MEDOFF, 1.967 y LASH, 1.968, parecen demostrar que la fase de estabilización se localiza o está asociada con la formación de productos celulares esenciales en niveles críticos, que dan lugar a la formación de factores subcomitantes que a su vez favorecen o retrasan el proceso de activación.

Una de las preguntas más interesantes, creemos, de nuestro Trabajo de Investigación, es el posible análisis de la relación existente entre el miembro injertado y sistema nervioso central o periférico del receptor, ya que resulta interesante poder incidir sobre los factores que regulan la dirección de las fibras nerviosas del huesped, la posible conexión de algunas de éstas con los órganos que se han diferenciado a partir del injerto, así como su distribución. Es evidente que resultaría también interesante el poder evidenciar la existencia de interconexiones entre el sistema nervioso central o periférico del receptor y el miembro diferenciado, así como analizar las posibles influencias que ejercen estos elementos o estructuras supernumerarias sobre los ganglios raquídeos y áreas motoras de la médula espinal situadas a nivel de la neoestructura desarrollada.

BRAUS, 1.905, en homoinjertos de miembros extirpados en estadios precoces del desarrollo e injertados en lugar heterotópico, observa la presencia de nervios que procedente del receptor penetran en el injerto ramificándose de un modo prácticamente idéntico o similar a las estructuras nerviosas en su posición normal. Idénticas observaciones y conclusiones son debidas a HARRISON, 1.907, que consideró como la distribución de las fibras nervio

idéntico o similar a las estructuras nerviosas en su posición normal. Idénticas observaciones y conclusiones son debidas a HARRISON, 1.907, que consideró como la distribución de las fibras nerviosas estaban controladas y reguladas en su orientación y distribución por las estructuras que se diferencian a partir del injerto; por ello y en síntesis, considera la existencia de dos factores en relación con la neoinervación; 1°.- origen del nervio a partir de la médula; y 2°.- dirección y control en la distribución y crecimiento del nervio en dependencia a las estructuras aparecidas en el miembro, que a su vez determinan la distribución específica de las fibras en el interior del mismo.

DETWILLIER, 1.936, en injertos de miembro superior en localización heterotópica, varios segmentos som-íticos en dirección caudal a su primitiva posición, comprueba en los casos en el que el desplazamiento era sólo de uno o dos somitos, como la neoinervación procedía de ramas del plexo braquial, sin que en ella apareciese ningún tipo de alteración, excepto la orientación un poco más en dirección caudal de las fibras. Esto indujo a postular la existencia de un factor de atracción, posiblemente de naturaleza quimiotrópica que el injerto ejerce sobre los nervios del plexo braquial.

WEISS, 1.941, sin embargo, describió, como los factores que condicionan la inervación así como la orientación de las fibras en el interior del miembro, vienen dados por la distribución y disposición de estructuras periambitales que directamente o a través de las propias fibras nerviosas regulan la distribución.

CASTRO, 1.963, en experiencias consistentes en la reducción de centros nerviosos espinales, a fin de evidenciar los posibles -

efectos sobre el desarrollo de los cambios espinales, postuló dos hipótesis: 1° una selectiva afinidad coincidente con el criterio de HAMBURGER.

2° Una mecánica y dinámica en relación entre el crecimiento de las fibras y el esbozo del miembro diferenciado.

PUCHADES ORTS, 1.968, realizó trasplantes de esbozo de miembros superiores a áreas heterotópicas en unos casos; en otros, previa ablación del esbozo y rotación del mismo, vuelve a reimplantarlo en su normal disposición. Entre otros resultados, llegó a la conclusión de que en éstas series de experiencias no existe o no se evidencia un camino o dirección preferente para el nervio espinal, por lo que cada uno de ellos creció y dirigió la porción del miembro injertado más accesible a él, sin tener en cuenta su orientación incluso en los casos en que existió una reinserción de miembros cruzados, derecho por izquierdo, con o sin rotación, el nervio entraba y se distribuía por su nuevo hábitat de forma habitual. Sin embargo, era muy frecuente la presencia de -- hiperplasias no sólo en los ganglios de los que se originaba el nervio, sino a veces incluso de éste mismo.

Habida cuenta que a partir de los trabajos de TELLO, 1.922, se viene aceptando que la invasión de la musculatura del embrión de pollo por fibras nerviosas tiene lugar hacia el 5° día de la incubación, es evidente que éstas pueden ya objetivarse a los diez días, al haber establecido los botones terminales contacto con las miofibrillas, estadio 32-35 de HAMILTON HAMBURGER, por lo que la formación de las placas motoras sigue tres fases sucesivas y dependientes: en primer lugar, se produce un engrosamiento

a lo largo de la fibra nerviosa; en una segunda fase, aparece una especie de enrollamiento de la porción engrosada para, por último, establecerse la diferenciación de la placa motriz a partir específicamente de ésta porción.

Por tanto, es evidente que los nervios y centros nerviosos muestran en su desarrollo una precisa correspondencia con los órganos cuya inervación le está encomendada. Los nervios espinales que inervan los miembros de mamíferos, son más robustos que aquellos otros de diferente nivel biológico; de igual modo, los ganglios de las metamerias que corresponden a éstos miembros son también de mayor tamaño, por lo que la médula presenta un engrosamiento en las regiones donde se asientan las neuronas cuyos axones están encargados de la inervación de los miembros anteriores y posteriores, nivel correspondiente a las regiones cervical y lumbar. Experimentalmente esta correspondencia parece estar establecida entre el grado de desarrollo del sistema nervioso y los órganos periféricos, debido a una directa correlación entre ambas estructuras, por lo que DETWILLIER, 1.926, observó como la extirpación de un miembro superior condiciona constantemente que los nervios procedentes del plexo braquial de éste lado queden más delgados que los del colateral. Así mismo, los ganglios espinales a cuyo nivel aparece el plexo braquial son más pequeños, llegando incluso a estar reducido su número hasta un 50%. Por el contrario, DETWILLIER, 1.926, describe si el trasplante o injerto de un miembro se sitúa a nivel del área de miembro extirpado, como los nervios espinales locales que proporcionan su inervación, no sólo son más gruesos, sino que los ganglios son de mayor tamaño que los del lado opuesto, siendo incluso muy frecuente un aumento en su número así como en el volumen

celular que en ocasiones llega hasta un 40%. HAMBURGER y BRUKER, 1.940, en experiencias similares en embriones de pollo y salamandra, demostraron como las partes sensitivas y motoras de la médula estaban reducidas en los casos de ausencia del miembro, siendo por el contrario muy voluminosas en aquellos casos en que homo o heterotópicamente se había injertado un miembro supernumerario.

El problema planteado por los condicionantes que determinan como las fibras nerviosas en su crecimiento llegan a los órganos periféricos desde los ganglios espinales, en cierto modo viene a ser aclarada en éstas experiencias, en las que cuando el miembro que es extirpado y trasplantado antes de que en él se hubieran desarrollado fibras nerviosas se sitúa en una posición próxima a la normal, las ramas del plexo braquial o lumbosacro se desvían en su recorrido para dirigirse e invadir el miembro trasplantado. Si la distancia entre miembro injertado y área que primitivamente ocupaba no es demasiado grande, las ramas del plexo penetran y se ramifican en el interior del mismo, reproduciendo su normal disposición, por lo que en éstos casos, el miembro es aparentemente normal en su funcionalismo, ya que se mueve en coordinación con el heterolateral. DETWILLIET, 1.926, describe en experiencias consistentes en injertos de miembro supernumerario en las proximidades de miembro normal, como a partir del plexo braquial del receptor, emergen fibras que se dirigen hacia el miembro injertado condicionando así su inervación. HAMBURGER, 1.929, demostró como un obstáculo situado en el trayecto de la fibra nerviosa, en ocasiones y cuando estas pueden evitarlo, es rodeado para alcanzar así su destino; y MURILLO FERROL, 1.968, sitúa láminas de millipore de distinto gro-

sor en sus poros, y demuestra cuando estos poseen un determinado calibre, como son atravesados por las fibras nerviosas para llegar a su nueva disposición; cuando el calibre de los poros es inferior al diámetro de las fibras nerviosas o incluso, la membrana que se interpone posee calibre capilar y por tanto, prácticamente continua, la fibra nerviosa constantemente rodea y a veces realiza un largo desplazamiento antes de llegar al miembro injertado. Sin embargo, si el esbozo del miembro es transplantado lejos de su posición normal o si el trayecto de las fibras nerviosas es bloqueado por un obstáculo demasiado grande, las fibras nerviosas no llegan al no ser aparentemente atraídas por el miembro. En aquellos casos en que los nervios no se distribuyen en el interior del miembro, su estructuración es irregular y anómala y su funcionalismo nulo, ya que son prácticamente inmóviles o a lo sumo realizan movimientos atípicos e incoordinados. PUCHADES ORTS, 1.968, describe y observa por vez primera o mejor dicho, como ejemplo a nivel del sistema nervioso central, vesícula óptica o vesícula auditiva, reciben nervios procedentes de éstas áreas, por lo que injertos situados a nivel mesencefálico, reciben ramas procedentes del triquémino en algunos casos o en otros incluso del hipogloso.

Es evidente que hasta éste momento, hemos venido haciendo mención a los homoinjertos, esto es, material procedente de la misma especie; sin embargo, solamente se habían realizado escasos trabajos de heteroinjertos y prácticamente en ninguno de ellos se había estudiado la neoinervación; la norma en nuestras observaciones es la no existencia en el interior del miembro de fibras nerviosas procedentes del huesped, de tal modo que en las observaciones del Grupo I y II y en las microfotografías 10, 11, 15, 57 y 58, se observan como raíces

nerviosas procedentes del receptor, algunas correspondientes al plexo braquialle incluso otras correspondiente a gruesos nervios raquídeos intercostales, pasan por la base de implantación del injerto y en ocasiones la disecan; en todos estos casos, las fibras nerviosas, van acompañados por formaciones vasculares normales. En todas nuestras observaciones los vasos entran, manteniendo un patrón más o menos atípico, pero en ningún caso, incluso en observaciones en que se han realizado tinciones de plata en bloque - - BIFLCHOWSKY o CAJAL, reticulina, aparecen fibras nerviosas en el interior del injerto. Es evidente pues, que existe una quimiospecificidad o neuroespecificidad en el proceso de reinervación, de tal modo que estructuras procedentes de otra especie no son capaces de extraer, dirigir o informar la presencia de fibras nerviosas para su neoinervación.

A fin de completar ésta experiencia hicimos una prueba ex jubantibus consistente en injertar conjuntamente con el esbozo del miembro, sistema nervioso con y sin notocorda. En todas estas observaciones, que vienen a corresponder al grupo IV, observamos y describimos la presencia de formaciones nerviosas e incluso de ganglios espinales y a veces a raíz nerviosa de disposición prácticamente normal. El sistema nervioso diferenciado en éstos injertos es atípico, ya que se encuentra en disposición laminar o evertido dando en ocasiones la impresión de ser una mielosquisis; sin embargo, en todas estas formaciones neurales medulares, se originan nervios raquídeos que siguiendo un camino más o menos atípico, se distribuyen en el material injertado. En aquellas experiencias en que el grado de diferenciación fué mayor por haberse mantenido una ma-

por supervivencia, las fibras nerviosas se distribuyen siguiendo un patrón en ocasiones idéntico a los del Nervio Mediano e incluso Radial.

HAMBURGER, 1.925, observa deficiencias esqueléticas en el pie de embriones de codorniz, a las que había sido extirpado una porción del mesencéfalo; las alteraciones afectaban al lado tibial más que al fibular. La correlación entre la lesión del neuroeje y las anomalías apendiculares, es enigmática. Más recientemente y a lo largo de numerosas y diversas intervenciones sobre el tubo neural en embriones de pollo, KIENY y colaboradores, 1.971, SENDEL y colaboradores, 1.966, han observado un fenómeno similar, pero de mayor amplitud que el descrito por HAMBURGER, ya que en el 24% de los embriones en los que el tubo neural había sido lesionado por irradiaciones o excindido y reemplazado por otro fragmento de órgano, tubo digestivo, mesodermo somatopleural o incluso tubo neural tratado a 60-100° de ebullición-, presentaban malformaciones en los miembros posteriores, caracterizadas principalmente en una frecuencia elevada, 71%, de hemimelia preaxial, esto es, ausencia o hipodesarrollo de tibia y de los radios 1°, 2° y a veces, excepcionalmente, del 3°. Sin embargo es conveniente precisar, que todas las intervenciones habían desencadenado malformación de los miembros inferiores, ya que se habían realizado sobre o a partir del 26° somito, de tal manera, que las anomalías solo pueden ser explicadas por una lesión directa del mesodermo somatopleural del territorio correspondiente a miembro inferior.

KIENY, FOUVET y THEVENET, 1.971, y KIENY y FOUVET, 1.974, describen en experiencias de liberación precoz de una porción del tubo neural por delante del territorio presuntivo de miembro infe-

rior, la existencia de inervación deficiente del esbozo, que en ocasiones está asociada a hemimelia preaxial o postaxial. Estas experiencias intentan establecer una relación casual entre el defecto local, -preaxial o postaxial-, la alteración en el patrón de su inervación y de la no diferenciación o hipodiferenciación de piezas esqueléticas. FAUVER, 1.973, en un trabajo preliminar, describe las etapas de la puesta en situación de la inervación normal en el miembro inferior del embrión de pollo entre el tercer día y medio y el 10 de la incubación: Posteriormente y siguiendo idéntico proceder técnico, KIENY, 1.974, analiza experimentalmente la inervación de los miembros posteriores de 6 embriones operados así como en un embrión afecto de hemimelia postaxial congénita unilateral, comparando su distribución neural con el patrón normal previamente establecido. Llega entre otras a la conclusión de que la excisión de una porción del tubo neural, con o sin notocorda subyacente, practicada en el curso del tercer día de la incubación en una zona comprendida entre el 8° y el 26° somito, modifica la morfogénesis indistintamente en la mitad preaxial o postaxial del miembro, pero manteniendo siempre la otra mitad normalmente desarrollada. Los miembros afectados de hemimelia preaxial, 71% de las malformaciones, presentan una deficiencia grave del nervio ciático. La naturaleza pre o postaxial de las malformaciones parecen estar en relación con el nivel de la excisión del tubo neural. nuestras experiencias confirman este criterio, pues aunque la técnica y método experimental es diferente, en aquellos casos, grupo I, II y III, en que no existe patrón neural en el injerto, la diferenciación de las formaciones esqueléticas no solo es atípica, sino que se encuentra más re-

tardada, su disposición y estructura presentan signos de indiferen
ciación, faltando en especímenes que mantuvieron un mayor horario -
post-intervención, porciones post-axiales aún en los embriones en
los que en el injerto se incluyó cresta apical de SAUNDERS.

207'

“

207²

CONCLUSIONES
=====

CONCLUSIONES

- 1.- El área-miembro formadora en los embriones de codorniz, se encuentra determinada a partir del estadio VIII de ZACCHEI; extirpaciones e injertos de áreas ectomesenquimales previas a éste estadio, no dan lugar a miembro.
- 2.- Injertos de áreas ectomesenquimatosas miembro-formadoras conjuntamente con mesodermo somítico, dan lugar a miembros en los estadios VI y VII de ZACCHEI, con elevado grado de tipicidad, por lo que el mesodermo somatopleural y paraaxial segmentado induce o activa las potencias inductoras del territorio primitivo de miembro.
- 3.- Cuando el material dador incluía Cresta Apical de SAUNDERS, se diferencian estructuras distales, incluso paleta digital.
- 4.- Sólo en experiencias en las que se injertó conjuntamente con el área miembro-formadora, material de la porción proximal de la base de implantación, Cresta de WOLFF, se diferenció cintura torácica.
- 5.- Las estructuras diferenciadas a partir del injerto, mantienen su horario organogenético, no adaptándose al del receptor, aunque en ocasiones presentan discreto retraso en relación a controles de similar horario.
- 6.- En las series I - II en las que se injertó área miembro-formadora y mesodermo paraaxial segmentado, se diferenciaron formaciones cartilaginosa con elevado grado de tipicidad.
- 7.- En las series I, II y III, en los extremos articulares de las formaciones cartilaginosa diferenciadas es prácticamente constante la presencia de procesos de cavitación anormal, au

sencia de fase de interzonas así como existencia de incurvaciones y fusiones articulares.

- 8.- Las fusiones articulares se localizan preferencialmente a nivel del cigopodo, siendo prácticamente inexistentes en las formaciones del extremo distal y radios digitales.
- 9.- En las series I, II y III se diferencian formaciones blastemáticas musculares, que adquieren constantemente un menor grado de estructura y diferenciación que controles de idéntico estadio, apareciendo incluso en la serie II marcados signos de desdiferenciación y degeneración grasa.
- 10.- En las series I, II y III no se observa la existencia en el injerto de fibras nerviosas, tanto procedentes del receptor como diferenciadas a partir del injerto.
- 11.- En las series I, II y III, se establece una marcada e irregular red vascular, sin patrón atípico, ampliamente anastomosada son formaciones vasculares del receptor.
- 12.- En la serie IV en la que conjuntamente con el material del área miembro-formadora se injertaba Sistema Nervioso de nivel Truncal, se diferencian formaciones medulares, atípicas y evertidas, de las que se originaban fibras nerviosas que se distribuían por el injerto.
- 13.- En la serie IV, el grado de diferenciación del blastema muscular procedente del material injertado es similar a embriónes controles. Las condensaciones cartilaginosas presentan en sus extremidades formaciones cavitarias articulares típicas, incluso, laminaciones capsulares.

212

..

BIBLIOGRAFIA
=====

BIBLIOGRAFIA.

ABBOT, J. y HOLTZER, H.- The loss of phenotypic traits by differentiated cells III. The reversible behaviour of chondrocytes. J. Cell Biol. 28: 473-87. 1.966.

ABBOT, J. y HOLTZER, H.- The loss of phenotypic traits by differentiated cells V. The effect of 5 budr on doned chondrocytes. Proc. - Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59, 1144-51. 1.968.

AMANO, H.- Role of the somitic tissue in the limb development of - the urodelan amphibia. Arch. Biol. Liège. 71-343-366.- 1.960!

AMPRINO, R.- Developmental changes of the hand skeleton induced - by grafting leg mesoderm to the wing bud in the chicken. Roux' --- Arch. 161: 1-22. 1.968

AMPRINO, R. y AMPRINO BONETTI.- Effect of the implantation site on the development of grafted limb bud mesoderm in chick embryos. Nature. 204-298.1.964

AMPRINO, R. y CAMOSSO, M.- Ricerche sprerimentali sulla morfogenesi degli arti nel pollo. J. Exptl. Zool. 129, 435-493. 1.955.

AMPRINO, R. y CAMOSSO, M.- Aspetti della morfogenesi dell'ala --- nell'embrione di pollo. Atti. Soc. Ital. Suppl. 65, 96-104. 1956.

AMPRINO, R. y CAMOSSO, M.- Experimental observations on influences exerted by the proximalover distal territories of the extremities. Experientia, 14: 241-243. 1.958.

AMPRINO, R. y CAMOSSO, M.- Observation sur les duplications experi-
" menteles de la partie distale de l'ebauche et l'aile cher l'embryon de poulet. Arch. Anat. Micros. Morphol. Exptl. 48, 261-305.1.959.

BAER, K. EVON.- Arch. Anat. Physiol. 10: 556-568. Citado en "The-

Avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1.960. 608-615. 1.827.

BALINSKY, B.I.- Never die mesoderm verschiebungen bei der extremitate induktion. Roux'Arch. Entw. mech er organ. 116: 604-632.1.929

BALINSKY, B.I.- Zur dynamik der extremitatenknos penbildung. Roux' Arch. Entw. mech. d organ. 123: 565-648. 1.931.

BALINSKY, B.I.- New experiments on the mode ofaction of the limb - inductor. J. Exp. Zool. 134. 239-274. 1.957.

BRADLEY, E.M.- Sex differentiation of chick and duck ganads as studied in monoplastic and heteroplastic host graft combinations. -- Anat. Rec. 79. 507-529. 1.941.

BRAUS.- Experimentelle Beiträge zur Frange nach der Entwicklung - peripheren nerven. Anat. Anaz. Bol. 26, 233-479. 1.905.

CAHN, R.D. y CAHN, M.B.- Heritability of cellular differentiation clonal growth and expression of differentiation in retinal pigment cells in vitro. Proc. nat. Acad. S. U.S.A. 55, 106-14. 1.966.

CAIRNS, J.M.- Development of grafts from mouse embryos to the wing bud of the chick embryo. Developmental biology 12, 36-52. 1.965.

CARTER, T.C.- The genetics of luxate mice. J. Genet. 52: 1-35.1954.

CHAUBE, S.H.- On axiation and symmetry in trasplanted wing of the chick. J. Exp. Zool. 140, 29-78. 1.959.

COON, H.G.- Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells "in vitro". Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A. 55, 66-73.1966

DALCK, A.- Une conception nouvelle des bases physiologiques de la morphogenere. Arch. Biol. Lieqé. 48. 121-147. 1.937.

DALCK, A.- The concept of physiological competition -spigelman- and the interpretation of vert ehate morphogenesis. Exp. Cell. Res. 6th.

Intern. Congr. Exp. Cytol. Suppl. I 483-496. 1.949.

DANCHAKOFF, V.- Am. S. Anat. 20: 255-308. Citado en "The avian Embryo" por Alexis Romanoff. The mac millan company. New York. 1960 1.916.

DANTCHAKOFF, V. y GAGARIN, A.- Embryoherz in der chorioallantois des huhnchens. Zeit. Ges. Anat. 89: 754. 1.929.

DANTCHAKOFF, V. y GAGARIN, F.- Der aufban des geschlechts beimm - hoherem lirbertier. Gustav. Fischer. Jena. 1.941.

EASTLICK, H.F.- Studies on transplanted embryonic limbs of chick. The development of muscle in nerveless and in innervated grafts.- J. Expl. Zool. 93, 27-47. 1.943.

FELL, H.R.- Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B. 229: 407-463. Citado en "The Avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1.960. 1.939.

FELL, H.B.- The future of tissue culture in relation to morphology. J. Natur. Cancer Inst., 19, 643-662. 1.957.

FELL, H.B. y CANTI, R.G.- Experiments on the development "in vitro" of the avian Knee-jourt. Proc. Roy. Soc. B. 116+316-351.1934.

FILATOW, D.- Never die verpflanzung des epithels und des mesenchy- mes einer vorderen extremitanten knospe bei embryonen von axolott. Roux'Arch. 113, 240-244. 1.928.

FINNEGAN, C. V.- Observations of dependent histogenesis in salaman der limb development. J. Embryol. Exp. Morphol. 325-338. 1.963.

FOUVET, B.- Innervation et morphogeriese de la patte her l'embryon de poulet. Arch. Anat. microscopique 62, 269-280. 1973.

GLICK, B.- The induction of supernumerary limbs in Amblystoma. -- Anat. Rec. 43, 407-414. 1.931.

GRIM, M.- Differentiation of myoblast and the relationship between somites and the wing bud of the chick embryo. Z. Anat. Entwicklun_gsgesch 132: 260-271, 1.970.

HAMBURGER, V.- Vever den einfluss des nerven systems auf die entwicklung der extremitaten von RANA FUSCA. Poux' Arch. 105: 149 - 201. 1.925.

HAMBURGER, V.- Morphogenetic and axial differentiation of trasplanted limb primordia of 2 day chick embryos. J. Exptl. Zool 77, 379-400. 1.938.

HAMBURGER, V. y HAMILTON, H.L.- A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 88, 49-92. 1.951.

HAMBURGER, V. y WAUGH, M.- The primary development of the skeleton in nemeles á d poorly innervated limb transplants of chick embryos. Physiol. Zool. 13, 367-382. 1.940.

HAMBURGER, V.- Citado por Jimenez Collado. 1.980. 1.969.

HAMBURGER, V.- Citado por Jimenez Collado. 1.980. 1.979.

HAMPE, A.- Sur la topographie des ebauches presomptives du membre posterieur du poulet. CR Acad. Sci. 243: 970-973. 1.956.

HAMPE, A.- Contribution a l'etude du developpement et de la regulation des deficiences et des excedents dans la patte de l'embryon de poulet. Arch. Ant. Microscop. Morphol. Exptl. 48, 345-478. 1959"

HARDY, M.H.- The development of mouse hair "in vitro" with some observations on pigmentation. J. Anat. 83: 364. 1.949.

HARDY, M.H.- The histochemistry in the mouse. J. Anat. 90. 285 - 337. 1.952.

HIRAIWA, J.P.- Some observations on the early development of didelphis aurita. O. Je. micros. Sci. 63. 91-140. 1.918.

HIRAIWA, Y.K.- Studies on grafts of embryonic tissues of the rat on the chorioallantoic membrane of the chick. J. Exptl. Zool. 49; 441. 1.927.

HOADLEY, L.- Biol. Bull. 46: 281-315. Citado en "The avian embryo por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1.960 - 384. 1.924.

HUNT, E.A.- The differentiation of chick limb buds in chorioallantoic grafts with special references to the muscles. J. Exptl. Zol. 62: 57-91. 1.932.

JIMENEZ COLLADO, J.- Greffe de matériel somitique sur embrions de poulet. An. Desar. Vol. XIII 29, 97-109. 1.965.

JIMENEZ COLLADO, J.- Autodiferenciación e inducción de cartilago a partir de injertos de mesonefros en embriones de pollo. An. Des. Vol. XVI. 1.968.

JIMENEZ COLLADO, J.- ¿Posee el mesonefros capacidad condrogénica? . Revit. Amq. Ortop. Año 7. Vol. 7. n° 41. 291-99. 1.972.

JIMENEZ COLLADO, J.- Desarrollo y diferenciación de los injertos de esbozos de miembros de la codorniz al embrión de pollo. Caracteres nucleolares de las células de la codorniz -Coturnix coturnix -japónica-. Arch. Fac. Med. Madrid, 1.973.

JIMENEZ COLLADO, J.- Génesis causal de los miembros. Arch. Cirugía y Traumat. vol. 63. 1.978.

JIMENEZ COLLADO, J. y PUCHADES ORTS, A.- Injertos heterotópicos de mesodermo segmentado de pato -anas- a pollo gallus-gallus. An. Des.

Vol. XVI. 36, 207-218. 1.969.

JIMENEZ COLLADO, J. y PUCHADES ORTS, A.- Anales del desarrollo XV 36. 1.970. Injertos heterotópicos de mesodermo segmentado de XV - anas- al pollo - gallus gallus-. 1.970

KIENY, M.- Role inducteur du mesoderme dans la differentiation precoce du bourgeon de membre chez l'embryon de poulet. J. Embryo Ex. Morph. 8, 457-467. 1.960.

KIENY, M.- Les phases d'activite morphogene du mesoderme somatopleural pendant le developpement precoce du membre chez l'embryon de poulet. Ann. L'embryol. Morpho. 4, 281-298. 1.971.

KIENY, M.- Citado por Puchades Orts, 1.981. 1.975.

KIENY, M.- Citado por Puchades Orts, 1.981. 1.971.

KIENY, M. y BRUGAL.- Sur le role du mesoderme somitique dans la differentiation de la patte de l'embryon de poulet. C.P. Acad. San Paris. 270: 1009-2014. 1.970.

KIENY, M. y FOUVET, B.- Innervation et morphogenese de la patte chez l'embryon de poulet. Archives de anatomie. microscopique 63: 281 - 298. 1.974.

KIENY, M., MAUGER, A. y THEVENET, A.- Influence du systeme nerveux axial sur la morphogenese des les membres chez l'embryon de poulet Cr. Acad. Sci. Paris. 272: 121 - 124. 1.971.

KIENY, M. y PAOTOU, m.P.- Sur le mecanisme de la cecrose morphogene dans le pied de l'embryon de poulet. C.P. Hebd. Seanc. Acad. Sci Paris. D. 270, 3.091 - 3.094. 1.964.

- KONIGSBERG, I.R.- Clonal analysis of myogenesis. Science. N. York 140. 1273-84. 1.963.
- LASH, J.W.- Somitic mesenchyme and its response to cartilage in -duction. In epithelial mesenchymal interactions. Ed. P. fleischma -jer y R. Billingham pp 165- 72. Baltimore.
- LEVI, G.- Sullo sviluppo della cresta apicale degli arti. Monit. Zool. ital. 19, 93-102. 1.908.
- MEDOFF, J.- Enzymatic events during cartilage differentiation in the chick embryonic limb bud. Developmental biology. 16, 118-143. 1.967.
- MILAIRE, J.- Contribution a l'etude morphologique et cytochimi -que des bourgeons de membres chez le rat. Arch. Biol Paris. 67, -297-391. 1.956.
- MILAIRE, J.- Contribution a la connaissance morphologique et cy -tochimique des bourgeons des membres cher quelques reptiles. Arch Biol. Paris 68, 429-512. 1.957.
- MILAIRE, J.- Etude de l'embryon dyosindactylic. Searces. Sur Belf 1.959.
- MILAIRE, J.- Contribution a l'etude morphologique et cytoquimi -que des membres cher le rat. Arch. Biol. 67. 297-391. 1.959.
- MULNARD, I.- Analyse experimentale de la chondogenese dans le bour -geon de membre de la souris. C.R. Acad. Sci. Paris. 258, 6525-6526 1.964.
- MURILLO FERROL, N.L.- About the material forming of the ribs and sternum. An experimental analysis in the chick embryo. Anal. Des. 11, 391-402. 1.963.
- MURILLO FERROL, N.L.- Análisis experimental de la participación --

del mesoblasto paraaxial sobre la morfogénesis de los miembros en el embrión de las aves. Anal. Desc. 11, 63-76. 1.963

MURILLO-FERROL, N.L.- Etude causale de la differentiation la plus precoce de l'ebauche morphologique des membres analyse experimentale cher les embryons d'oiseaux. Acta anat. 62, 80-103. 1.965.

NASSONOW, N.V.- Zool. Anz. 18, 277-280. Citado en "The avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. - 1.960-978. 1.895.

NICHOLAS, J.S. y RUDNICH, D.- The development of embryonic rat - tissues upon the chick chorioallantois. J. Exp. Zool. 66, 193.262 1.933.

ORTS LLORCA, F. y JIMENEZ COLLADO, J.- Desarrollo y diferenciación de los injertos de esbozos de miembro de la codorniz al embrión de pollo. Caracteres nucleolares de las células de la codorniz -coturnix coturnix japónica-. T- Embriología Experimental 15-37.1.971

ORTS LLORCA, F. y JIMENEZ COLLADO, J.- Determination of heart polarity anteroventral axis in the chicken embryo. Arch. Entwicklun gsmech. Organ 158, 147-163. 1.967.

ORTS LLORCA, F. y MURILLO FERROL, N.- Duplicites experimentales - des membres cher l'embryon de poulet seconde reunion Europeene d'anatomie. Bruxelles. C.R. Ass. Anat. 122: 294-303. 1.964.

PINOT, M.- Le role du mesoderme somitique dans la morphogenese - precoce des membres de l'embryon de poulet. J. Embryol. Exp. Morphol. 23: 109-151. 1.970.

PUCHADES ORTS, A.- Diferenciación de las estructuras en los injertos de miembros -auto y homoinjertos-. Analisis experimental en el embrión de pollo. Ana. Desarro 33, 113-136. 1968.

PUCHADES ORTOS, A.; JIMENEZ COLLADO, J. y CLAVELSAINZ, M.- Desarrollo y diferenciación de heteroinjertos de esbozos de miembros en embriones de ave. Anal. Desarro. 20-48. 57-64.1976.

RAWLESS, M.E.- Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. Physiol. Zool. 20: 248-265. 1947.

RAWLESS, M.E.- Physiol. Zool. 16: 22-43. Citado por Jimenez-Collado 1961. 1943.

RAYNAUD, A. y VASSE, J.- Les relations entre les somites et la crete de Wolff, chez les embryons de reptiles. Arch. Biol. Lieja. 80 95-120.1969.

POUS, P. y MURPHY, J.R.- J. Am. Med. Assoc. 56: 741-742. Citado en "The avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1960. 1911.

RUANO GIL, D. and PUCHADES ORTOS, A.- Differentiation of limb grafts in the nervous system of the chicken embryo. Arch. Anat. Hist. - Embr. Norm. et Exp. 49, 491-498. 1966.

RUDNICK, D.- Limb forming potencies of the chick blastoderm. Including notes on associated trunk structures. Trans. Con. Acad. Scin 36, 353-377. 1945.

SAUNDERS, J.W.- The proximo distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exptl. - Zool. 108, 363-404. 1948.

SAUNDERS, J.W. Jr.- The role of the apical ridge of ectoder in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts, in the chick. J. Morph. 101, 57-88. - 1.957.

SAUNDERS, J.W.; GASSELLING, M.T. y CAIRNS, J.M.- The differentia -

tion of prospective thigh mesoderm grafted beneath the apical ectodermal ridge of the wing bud in the chick embryo. *Develop. Biol.* 1, 282-301. 1959.

SEARLS, R.L. y JANNERS, M.Y.- The imitation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev. Biol.* 24: 198-213, 1971.

SEARLS, R.L. y ZWILLING, T.- Regeneration of the apical ectodermal ridge of the chick embryo limb bud. *Develop. Biol.* 9: 38-55. - 1964.

SENGEL, P.H. - Sur les modalités de la cicatrisation de l'ectoderme dorsal en la présence et en l'absence du tube neural chez l'embryon de poulet. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 263, 278-228. 1966.

SENO, T. y BUYUKOZER, G.- Cartilage formation in somite grafts of chick blastoderm. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash* 44, 1274-84. 1958.

SOLOMON, J.B.- Ontogenesis of immunological competence of lymphocytes in chicken skin. *Transplant. Bull* 1, 327-333. 1963.

SOLOMON, J.B.- Actively acquired transplantation immunity in the chick embryo. *Nature Lond.* 198, 1171- 1173. 1963.

SPRATT, N.T.- *J. Exptl. Zool.* 103: 259-304. Citado por Jimenez-Collado. 1946.

SPRATT, N.T.- *J. Exptl. Zool.* 110:273-298. Citado en "The avian embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Com-pany. New York. - 1960 - 194. 1949.

SPRATT, N.T.- *J. Exptl. Zool.* 114: 375-402. Citado en "The avian embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Comany. New York. - 1.960 - 217-738. 1950.

SPRATT, N.T. Jr.- Physiological mechanisms in development. *Physiol. Rev.* 34, 1-24. 1954.

STEPHENSON, N.G. y TOMKINS, K.N.- Transplantation of embryonic cartilage and bone on to the chorioallantois of the chick. J. Embryol Exp. Morphol. 12,4-825-839. 1964.

STRAUS, W.L. y RAWLESS, M.E.- Am. J. Anat. 92: 471-509. 1953.

SUMMERBELL, D.; LEWIS, J.H. y WOLPERT, L.- Positional information in chick limb morphogenesis. Nature London. 244, 492-6. 1973.

SUZUKI, K.- Zool. Mag. Japan. Citado en "The avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1960: 67 - 72. 1930.

TAKAYA, H.- On the notochord-forming potency of the prechordal plate in triturus gastrulae. Proc. Imp. Acad., Japan, 29, 374-380 1953.

TSCHUMI, P.A.- The growth of the hindlimb bud of "Xenopus leavis" and its dependence upon the epidermis. J. Anat. 91, 149-173. 1957.

TCHUMI, P.A.- Form und musterbildung bei der tetrapodenextremitat. Rev. Suisse Zool 69, 239-254. 1962.

UMANSKY, R.- The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb bud mesenchyme. Devel. Bio 13, 31-56. 1966.

WADDINGTON, C.H.- Phil Trans. Roy. Soc. London. Ser. B. 221: 179-230. Citado por Jimenez-Collado. 1961. 1932.

WADDINGTON, C.H.- Experiments on the development of chick and duck embryos, cultivated in vitro. Phil. Trans. London, 221, 179-230. 1932.

WADDINGTON, C.H.- J. Exptl. Biol. 10: 38-46. Citado en "The avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1960: 177-78. 1983.

WADDINGTON, C.H.- J. Exptl. Biol. 11: 211-227. Citado en "The avian embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1960: 177-78. 1934.

WADDINGTON, C.H.- Evocation by some further chemical compounds. - Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. 125, 365-372.

WADDINGTON, C.H. and NEEDHAM, J.- Evocation, individuation and competence, in amphibian organizer action. Proc. Acad. Sci. Amst. 39, 887-891. 1936.

WATERMAN, A.J.- Developmental capacities of trasplanted hepatic, - pancreatic and lung tissues of the rabbit embryo. Am. J. Anat. 58 2-57. 1936.

WILLIER, B.H.- Am. J. Anat. 33: 67-103. Citado en "The avian Embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. - 1960: 677-877-1128. 1924.

WILLIER, B.H.- J. Exptl. Zool. 46: 409-466. Citado en "The avian embryo" por Alexis L. Romanoff. The Mac Millan Company. New York. 1960. 859. 1927.

WILLIER, B.H. y RAWLES, M.E.- Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 32: - 1293-1296. Citado por Jimenez-Collado, 1961. 1935.

WOLFF, E.- Production expérimentale et déterminisme d'une monstruo site inconue symmetrie anereure. C.R. Acad. Sci. 119, 1673-1675. - 1934.

WOLFF, E. y HAMPE, A.- Sur la regulation de la patte de poulet - apres resection d'un segment intermediaire. Paris. C.P. Soc. Biol. 148, 154-156. 1954.

WOLPERT, L.- Positional information and the spatial pattern of ce llular differentiation. J. Theor. Biol. 25, 1-47.

ZWILLING, E.- The role of epithelial components in the developmental origin of the "wingless" syndrome of chick embryos. J. Exp. Zool. 111: 175-188. 1949.

ZWILLING, E.- Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. J. Exp. Zool. 132: 219-239. 1956.

ZWILLING, E.- T. Limb morphogenesis. R. Advan. Morphogenesis, 1, 301-330. 1961.

ZWILLING, E. y HANSBOROUGH, L.A.- Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. J. Exp. Zool. 132: 219 - 239. 1956.

