



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Secuencia morfogenética de los miembros en el
embrión humano: el sistema epitelio-
mesenquimal”

Autor:

Almudena Reyes Fierro

Directores:

Prof. Dr. D. Juan Jiménez Collado

Prof. Dr. D. Pedro Guillén García

Prof. Dr. D. Francisco de la Gala Sánchez

Murcia, septiembre de 2016



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Prof. Dr. D. JUAN JIMÉNEZ COLLADO, el Prof. Dr. D. PEDRO GUILLEN GARCÍA y el Prof. Dr. D. FRANCISCO DE LA GALA SÁNCHEZ como Directores de la Tesis Doctoral titulada: **“Secuencia morfo genética de los miembros en el embrión humano: el sistema epitelio-mesenquimal”** realizada por Dña. **ALMUDENA REYES FIERRO** en el Departamento de Ciencias de la Salud, autoriza su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 28 de septiembre de 2016.

Fdo. Prof. Juan Jiménez Collado

Fdo. Prof. Pedro Guillén García

Fdo. Prof. Francisco de la Gala Sánchez

Quisiera manifestar mi gratitud a todas las personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, y muy especialmente a mis directores:

Al Profesor Juan Jiménez Collado por su increíble e incansable espíritu de investigación y de docencia, pues sin él, este trabajo no habría visto la luz.

Al Dr. Pedro Guillén García, por haberme servido de guía.

Al Dr. Francisco de la Gala Sánchez, por su paciencia infinita y su tesón.

También quiero dar las gracias a Dña. Montse Juanilla, por su desinteresada colaboración con este proyecto.

A mis familiares y amigos:

Muy especialmente a mi marido y mis hijos por haberme dado todo su cariño y apoyo para tener la fortaleza necesaria para la realización de un trabajo de esta índole.

A mis hermanas por formar parte de mi vida.

A mi padre que en un día como hoy estaría muy orgulloso de mí, y como no, a mi madre, por todo, por haberme educado para ser la persona que soy hoy.

INDICE

Introducción	9
Material y métodos	59
Descripción de nuestras observaciones	65
Discusión	149
Conclusiones	175
Bibliografía	179

INTRODUCCIÓN

Describir los procesos de diferenciación y desarrollo de órganos, sistemas y aparatos desde patrones citomorfológicos iniciales -síntesis evolutiva-, es patrimonio de la Embriología Descriptiva, Ciencia tan antigua como la Humanidad misma, en la que gracias a observaciones espontáneas y en ocasiones fortuitas, establecieron en los siglos XVIII y XIX una Ciencia coherente.

Muy rápidamente, esta Embriología Descriptiva se amplió haciéndose Comparada, evidenciando cómo en los primeros estadios del desarrollo, son comparables en el conjunto de vertebrados; el desarrollo del germen a partir de las tres hojas diferenciadas primarias determinadas en el estadio de gastrulación, van a diferenciarse los órganos primordiales idénticos en todos los vertebrados, en los que sólo en estadios más avanzados, aparecerán las variaciones entre clases, órdenes y especies.

Sin embargo, fue difícil al principio aceptar un fenómeno tan presente a la vez que espectacular, como es el desarrollo embrionario y en modo especial su dinamismo al transformarse en un individuo de modo armónico, progresivo y complejo, periodos o fases directamente dependientes a dos órdenes o secuencias biológicas: crecimiento y morfogénesis. En la primera y sobre todo, codificada por la segunda, la configuración externa va pareja a una estructura específica interna que la determina, diversifica y orienta a caminos específicos, -de especie-, en áreas bien determinadas con exclusión de otras, carácter que conlleva complejos mecanismos de activación de la morfogénesis a la vez que de inhibición, control y regularización entre las diversas porciones en crecimiento; es por ello obligado que sus elementos se diferencien morfológicamente a la vez que se especialicen biológicamente.

Por ello, no es de extrañar que DUESBERG en 1926, considerara que los mecanismos del desarrollo fueran “inducidos” por la interacción de factores preformados específicos de determinadas fases de un esbozo de órgano y factores epigenéticos dependientes del medio o estructuras próximas, criterios que primero ROUX, 1930, y luego SPELMANN, 1936, analizaron experimentalmente.

Parece pues evidente que la Embriología tanto Descriptiva como Experimental sobrepasaron los límites convencionales entre Morfología, Fisiología y Bioquímica, pasando de ser una ciencia accesoria de la Anatomía a una verdadera Biología del Desarrollo, JIMÉNEZ COLLADO, 1986.

La evolución de nuestro concepto de vida ha sido tan rápida, que la Biología del Desarrollo ha expresado como sus fundamentales manifestaciones, deben abordarse a nivel celular como unidad viviente; no obstante es obligado considerar que el problema de funcionamiento de una célula diferenciada es distinto del de la diferenciación propiamente dicha, ya que este proceso no puede abordarse más que en tejidos en vía de diferenciación, cuyo germen, el embrión, nos suministra la posibilidad en calidad única y rica para su estudio al poderse seguir en él todos los estadios del fenómeno morfogénico.

Por ello, la Biología Molecular, inicia su recorrido en el punto de volver a la Embriología; preguntas como ¿cuál es el patrón celular en el periodo embrionario humano que se establece formal para la diferenciación de un miembro?, ¿cuál es el mecanismo normodiferenciativo que establece su complejidad estructural?.

Las respuestas a estas preguntas, consideramos pertenecen a la Biología del Desarrollo, al analizarse en ella no sólo el modo por el que las células embrionarias inicialmente indiferenciadas dan lugar a una estructura o

formación típica de la especie, sino como se establecen los mecanismos y sistemas interdependientes que controlan su crecimiento e información posicional inicial a lo largo de su proceso diferenciativo CAPDEVILA J, 1998.

El análisis morfodiferenciativo y desarrollo de los miembros humanos, si bien se inició a finales del siglo XVIII, debido a la dificultad de su estudio en estadios iniciales, -periodo somítico-, ha sido en gran modo abordado por el específico de sistemas, órganos y en nuestro interés, en articulaciones y formaciones aisladas de mamíferos y vertebrados, al haberse aceptado que los estadios y mecanismos morfo-diferenciativos tanto formales como causales, se producen según un modelo o patrón, básicamente similar en todos los vertebrados tetrápodos.

GENGEBEUR, 1870, consideró que los esbozos de los miembros habían evolucionado a partir de los arcos branquiales, aunque TACHER, 1877 y MIVART, 1879, los interpretaron como porciones o crecimientos especializados de los pliegues o aletas laterales de los seláceos, criterio durante tiempo mantenido y aceptado sobre todo por BALFOUR, 1881, en sus estudios embriológicos en elasmobranquios en los que describe y sistematiza por vez primera, los materiales miembro-integrantes de los mismos.

Hoy se viene a aceptar BALINSKY, 1957; REUSS y col., 1965; SAUNDERS, 1968 y JIMÉNEZ COLLADO, 1981, que la Cresta de WOLFF, estructurada por el mesodermo de la somatopleura latero-dorsal del embrión en estadios de 8-14 pares de somitos, formada por grupos celulares inicialmente indiferenciados con una elevada concentración de ácido ribonucleico, AR, en íntima relación con los somitos de las láminas celulares de la porción ventral, es el primer anlage de miembro diferenciado.

Según este criterio GUSTAFSON, 1963; JANNERS, 1970; ORTS LLORCA, 1975, el esbozo inicial del miembro, contiene dos poblaciones mesenquimales que no pueden en este estadio inicial distinguirse morfológicamente, más aun, al formar un conglomerado uniforme. Se vino en considerar que a partir de las células de origen somítico, se diferencian cartílagos y fibras musculares estriadas, mientras que la población somatopleural daría lugar a constituyentes esqueléticos: tendones, fascias, y tejidos conjuntivos tanto profundos como superficiales, incorporándose y contribuyendo a la formación del miembro ZWILLING, 1961; MILAIRE, 1957, formaciones recubiertas por ectodermo en todo idéntico al de la superficie embrionaria, siendo la primera manifestación del mecanismo tanto diferenciador como estructural.

La Cresta de WOLFF es difícilmente observable macroscópicamente al ser rápidamente “absorbida” por el crecimiento del mesodermo del dorso embrionario, ZWILLING 1961, aunque JIMÉNEZ COLLADO 1999, la identifica y disecciona en un embrión humano de 24 pares de somitos, 3 mm vértex-coxis, 20±1 día post-ovulación (Figs. 1a y 2a).

En base a un crecimiento celular irregular más evidente, localizado y mayor de la Cresta de WOLFF en sus porciones craneal y caudal, se originan dos relieves mamelonados, aunque la capacidad miembro formadora se mantiene durante un corto tiempo en el resto crestal ante inductores heterotípicos neuroespecíficos, BALINSKY, 1974; MURILLO, 1984 y JIMÉNEZ COLLADO, 1991.

Para que las células mesodérmicas del esbozo apendicular proliferen es imprescindible el mantenimiento de la Cresta Apical de SAUNDERS, ectodermo, como mecanismo causal; no obstante, los mecanismos moleculares que determinan el posicionamiento de cada estructura son en parte desconocidos, considerándose sin embargo al gen que codifica la proteína Fgf8

como regulador de la forma transitoria y dinámica en el mesodermo somatopleural a nivel de las áreas en que se inicia el esbozo del miembro
CAPDEVILA J., 1998.



Fig. 1a
Embrión humano 3.5 mm
Cresta de WOLFF disecada



Fig. 2a
Entre los dos relieves de miembro, Cresta de
WOLFF

El ectodermo que cubre el soma, a nivel de los esbozos apendiculares, presenta pliegues epiblasticos que sobresalen gradualmente como consecuencia del engrosamiento del mesénquima somatopleural primero y del posterior origen somítico. Sufré una especialización estructural por cuanto a nivel de su extremo distal, aparece engrosado, a modo de casquete, formando la Cresta Apical de SAUNDERS, 1948, o A.E.R. de ZWILLING, 1961, que se mantiene en el esbozo hasta la diferenciación y determinación de sus diferentes estructuras y fijación topogénica, fase a partir de la que “retrógrada” a la cito-especificidad típica del resto del recubrimiento ectodérmico tal y como describimos.

Células mesodérmicas contenidas en el esbozo localizadas en la porción distal del primitivo esbozo, que han determinado la Zona de Progreso, PZ, por inducción o dependencia de la Cresta Apical, dan lugar a un marcado contingente de elementos mesodérmicos de los que un grupo se localiza en la porción posterior del esbozo, definiendo la Zona de Actividad Polarizante, ZPA, que actuará como organizador del modelo de crecimiento antero-posterior, mientras que otro grupo lo hace en la porción central para así definirla, NC, de gran importancia para la determinación de formaciones cartílago-fibrosas.

Los cambios en la morfología que experimenta la Cresta Apical de SAUNDERS, se establecen de modo rápido y secuencial dorso-ventralmente, hasta adquirir la forma de cuña o casquete protuberancial, desapareciendo cuando la diferenciación alcanza la porción medio-distal del esbozo.

El momento de aparición de la Cresta Apical se establece en relación con los cambios progresivos de forma y tamaño del esbozo, pudiendo por ello variar considerablemente, aunque es constante en su secuencia y orden cuando el esbozo del miembro presenta simetría en sus ejes dorso-ventral y antero-posterior.

Las células columnares características de la Cresta Apical, establecen estrecho contacto mediante uniones lagunares bien desarrolladas, a la vez que haces miofilamentosos del citoplasma basal orientados en el plano dorso-ventral, regularizan la morfología en cuña. El contacto entre ectodermo y mesodermo apical, se establece por expansiones filopodiales y procesos laminares del citoplasma de las células mesodérmicas próximas o en contacto con la lámina basal epiblastica.

KELLEY, 1983, realiza un minucioso estudio ultraestructural del epitelio crestal descrito por primera vez por STEINER, 1929, como “tope o copa ectodérmica” en el miembro superior de un embrión de 9 mm, estudio completado por SAUNDERS, 1948; O’RAHILLY, 1962; GADNER y GRAY, 1956; MILAIRE, 1965; AMPRINO, 1965..., comparando las observaciones realizadas por microscopía óptica con la ultraestructural, haciendo especial incidencia analítica en la presencia, disposición y modificaciones de la membrana basal en embriones humanos estadios, 15 a 19 CARNEGIE, 5ª a 7ª semana post-ovulación.

Describe como el epitelio apical, Cresta de SAUNDERS, es un conjunto celular complejo, estructurado por numerosos sistemas subcelulares y una lámina basal que varía en su disposición y relaciones en dependencia a localizaciones digital o interdigitales, tanto en la paleta mania como pedia, formación que en su especificidad solo se organiza a nivel del segmento o porción apical de la extremidad; conjuntamente con estas características, la presencia de cromatina difusa y una regulación proteica activa favorece o son cuando menos, índice de mecanismos de citodiferenciación.

Estas características se modifican en el epitelio zonular engrosado durante los estadios estudiados, por lo que sugiere e interpreta que podrían realizar o establecer un papel potencial bien en la formación de la lámina basal o en la elaboración de material específico para la morfogénesis mesenquimal de esta región.

En los embriones más jóvenes, estadio 15 CARNEGIE, las células más superficiales presentan numerosas vellosidades apicales que se proyectan hacia el espacio amniótico, de las que algunas retornan a la superficie de la célula para unirse a la membrana plasmática, tipo unión estrecha-zónula ocludens-zónula intermedia-zónula adheren-y uniones en hendidura-gap junction-que se

desarrollan intercelular, apareciendo núcleos ovoides o fusiformes con nucléolos prominentes escasos en cromatina, ribosomas libres y retículo endoplásmico escaso.

Es constante la presencia de una delgada y continua lámina basal epitelial que la separa de las células mesenquimales que a diferentes niveles forman varias capas.

En fases más avanzadas, embriones de los estadios 17-19 CARNEGIE, si bien las características ultraestructurales de las células epiteliales se mantienen, la capa germinativa se estratifica, aumenta los gaps junctions, zónula ocludens y zónula macular así como el glucógeno prevalente, complejos de Golgi...; los espacios permanecen extracelulares y la lámina basal no se modifica en relación con los estadios anteriores.

La presencia constante de epitelio interdigital adelgazado a diferencia de las varias capas existentes a nivel digital, puede interpretarse como signo de uniones subyacentes mesenquimales o incluso, de macrofagia tal y como consideran SAUNDERS y GASSELING, 1968, en respuesta a la falta del factor de mantenimiento mesodérmico; por ello, interpretan que la existencia de esta capa o lámina podría ser aceptada como barrera para la transferencia de macromoléculas normogénicas diferenciativas.

En el hombre, las descripciones de KELLY revelan como durante el normal desarrollo de las extremidades, estadios 15 a 19 CARNEGIE, es constante la presencia de una lámina basal intacta, carácter normodiferenciativo inductor o regulador del sistema epitelio-mesenquimal, ya que en homo o heteroinjertos de esbozos o material somático en embriones de aves, es esencial la ruptura de la lámina basal ectodérmica, no solo para que se fije sino para el

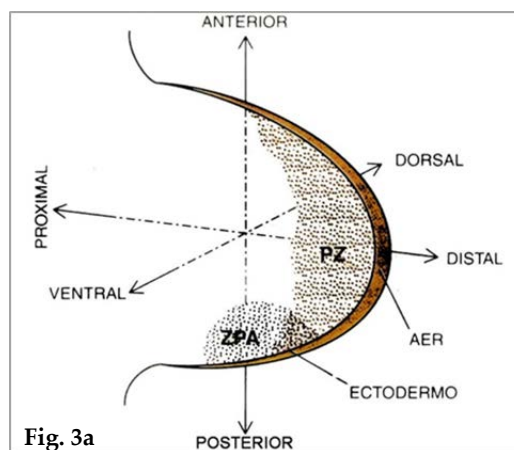
desarrollo del miembro injertado, JURAND, 1965; KALLMAN y GROBSTEIN, 1965; JIMÉNEZ COLLADO, 1973; ORTS LLORCA, 1975 y 1981.

La cresta epiblastica al formarse los relieves radiales de los dedos, se fragmenta en varias porciones que cubren la porción apical; esta subdivisión se debe al mesoblasto y no es una propiedad intrínseca crestal, carácter que demuestra la existencia de un factor mesoblástico del que depende tanto la cresta como su actividad.

STURDEE AP, 1975; MOURY JD, 1995; RICHARDSON, 1998, consideran que junto a la “acción” protectora de la condensación ectodérmica apical, en virtud de su peculiar geometría de crecimiento expansivo asociado a ulterior división próximo-distal, podría probablemente proporcionar un espacio libre en ensanchamiento y elongación, especialmente en el extremo del esbozo del mesodermo proliferante que sería invadido progresivamente y en donde la reducción en la densidad celular podría favorecer la división celular.

Este criterio considera como los principales “momentos” del desarrollo, sería expresión de propiedades intrínsecas y mecanismos morfogénicos de interacciones con determinadas regiones precoces, próximas y en diferenciación de los territorios distales mesodérmicos.

En todas las especies, incluido el hombre, el miembro superior se desarrolla inicialmente antes que el inferior; no obstante los dos extremos distales en su mecanismo de crecimiento, presentan forma de paleta orientada con arreglo a los tres ejes espaciales morfo-génicos. El desarrollo de la extremidad por tanto es



dependiente a la distribución de elementos según estos ejes (Fig. 3a).

Eje próximo-distal: el esbozo del miembro crece progresivamente según una línea de seguimiento próximo-distal. Las experiencias clásicas de SAUNDERS, 1948, mostraron como la ablación de la Cresta Apical entraña una parada del crecimiento próximo-distal del miembro en formaciones de estructuras proximales y defecto de diferenciación de estructuras distales; esta anorganogénesis del desarrollo es más severo cuando la ablación se realiza precozmente.

La interpretación de esta experiencia es que las estructuras proximales están “especificadas” más anteriormente, más precoz que las distales; por ello, algunos postulan que la Cresta Apical segrega un factor difusor capaz de activar las células mesenquimales del esbozo para favorecer su proliferación y diferenciación.

Para explicar la determinación de estructuras próximo-distales en el miembro evaginado, en línea con el concepto de Zona de Progreso, se ha sugerido, DOLLÉ, 1992, que es necesario un aumento secuencial en la concentración del morfogeno producido por la Cresta Apical, mecanismo que podría ser efectivo aumentando la retroalimentación mediante estructuras próximo-distales previamente determinadas; la asunción de este principio basado en el modelo de “coordinación polar”.

La zona mesenquimal situada en contacto con la Cresta Apical, se denomina Zona de Progreso, PZ.

El análisis del patrón de expresión de genes de la familia de factores de crecimiento fibroblástico, Fibroblast Growth Factor, FGF, en la que existen 19 miembros en los vertebrados, ha mostrado que algunos de ellos, FGF2, FGF4 y

FGF8 son expresados por la Cresta Apical NISWANDER y MARTIN, 1999, SUZUKI y cols., 1992, CROSSLEY y MARTIN, 1995, estas evidencias y consiguientes resultados específicos, han sido revisados, analizados y confirmados por FALLON y cols., 1994, después de extirpaciones de la Cresta Apical, por lo que aseguran la detención y determinación del crecimiento próximo-distal del miembro.

Los FGF producidos por la Cresta Apical actuarían sobre las células mesenquimatosas de la Zona de Progreso induciendo la transcripción de genes tipo *Msx1* y *Msx2* capaces de mantener las células en una fase de indiferenciación que a su vez inician el proceso diferenciativo y de crecimiento próximo-distal del miembro.

El análisis del patrón de expresión del gen para FGF10, muestra que esta molécula segregada, es dependiente a la actividad celular de la somatopleura a nivel del anlage de miembro, OHUCHI, 1997; la aplicación ectópica de FGF10 es suficiente para inducir la formación del miembro ectópico, SEKINE y cols., 1999; DE MOERLOOZE y cols., 2000.

Eje antero-posterior; este eje está caracterizado por una polarización de estructuras óseas y formaciones digitales, esta última orientando el pulgar en posición anterior mientras que el anular lo hace en posterior.

Las experiencias clásicas de SAUNDERS y GASSELING, 1968, han evidenciado cómo un injerto heterotópico de una región o material posterior de miembro de la región anterior, desarrolla e induce una duplicación en espejo digital.

Esta zona así delimitada por estas experiencias de injertos, ha sido denominada Zona de Actividad Polarizante, Z.P.A. Se viene en considerar que

a partir de ella, se segrega un factor difusible que conduce a la liberación de un gradiente molecular capaz de inducir una polarización antero-posterior del miembro, que actuaría a modo de sustancia morfogénica, gen HOXD, LEE y cols., 1992; no obstante las propiedades atribuidas a la ZPA no parecen exclusivas a este escaso contingente celular ya que células de los somitos a nivel somatopleural, muestran una actividad similar. De igual modo, el horario celular propio de este contingente celular es variable, ya que si bien su papel en los estadios tempranos del anlage es manifiesto, es residual en fases posteriores.

No obstante para WOLPERT, 1989, el modelaje esquelotípico del miembro, estaría controlado por una interacción entre factores y mesénquima regulado bajo control en la concentración del morfogeno producido por la Cresta Apical, mecanismo mediante el cual estructuras próximo-distales previamente determinadas son secuencialmente reguladas por la ZPA.

- Eje ventro-dorsal: las experiencias clásicas han mostrado como la rotación de la capa ectodérmica de superficie que cubre al esbozo del miembro, condiciona una inversión del eje mesenquimal, MAC CABE y cols., 1973-74, por lo que es obligado aceptar que el control molecular de este eje está condicionado por sustancias morfogénicas o genes con diferente expresión en las superficies ventral y dorsal, PARR y MAC MAHON, 1995.

La polarización ventro-dorsal del ectodermo de superficie se manifiesta muy precozmente antes del crecimiento del miembro. Los somitos inducen la identidad dorsal del ectodermo suprayacente, mientras que la somatopleura induce la identidad ventral, MICHAUD y cols., 1997; de este modo, el ectodermo de superficie recibe informaciones de polarización del mesodermo subyacente, para en un segundo tiempo una vez el miembro ya diferenciado, este ectodermo polarizado induce y contribuye a regular la polarización del mesénquima del N.C. indiferenciado.

Delgados vasos sanguíneos arteriales procedentes de los vasos intersegmentarios laterales penetran en la base del esbozo inicial del miembro, en donde se ramifican formando una amplia red tridimensional; estas formaciones no alcanzan la membrana basal del ectodermo de recubrimiento, de la que están separadas por una delgada lámina mesenquimal avascular, cuya presencia se ha considerado dependiente a la secreción de ácido hialurónico posiblemente de naturaleza ectodérmica. De uno de estos vasos arteriales intersegmentarios, se desarrolla la Arteria Central que suministrará la mayor parte del caudal sanguíneo; simultáneamente de la porción proximal de la red vascular inicial, se individualiza por un mecanismo de regresión de componentes del plexo, un conjunto venoso que a su vez origina el Sinus Venosus de HOCHFRETTER o Seno Marginal se localiza y discurre en el mesénquima delimitado por el epitelio pseudocolumnar de la Cresta Apical.

El patrón vascular del miembro, tiene gran importancia por cuanto se le considera responsable de un gradiente del mesénquima y su compartimentalización por el que las áreas o conjuntos celulares mesodérmicos más vascularizados se diferencian más fácilmente a músculo y tejidos conjuntivo-fibrosos, mientras que la porción central prácticamente exenta de vasos, con excepción de la Arteria Central, lo hace a cartílago, proceso en síntesis dependiente a los diversos niveles de nutrientes que conducirían entre otros factores morfogénicos a la expresión de los fenotipos cartilaginoso y muscular, CAPLAN, 1984, aunque BALINSKY, 1981, considera que en los primeros estadios del desarrollo no se diferencian tejidos de sostén; no obstante, interpreta que la vascularización juega un importante papel en el inicial periodo diferenciativo así como en fases de mantenimiento.

JIMÉNEZ COLLADO, 2008, en una revisión del patrón morfo-estructural de los miembros en estadios embrionarios precoces, considera que antes de la aparición del esbozo del miembro, los territorios sobre los que se van a

localizar, poseen y manifiestan determinadas propiedades, unas generales y otras que le son propias, que bien las poseen desde el inicio del proceso diferenciativo o lo que es tal vez más importante, las van adquiriendo a lo largo de la diferenciación y morfogénesis, carácter éste específico y selectivo que hace que sean denominadas “áreas morfogénicas o campos de metabolismo de activos procesos codificados a sistemas submicroscópicos de significación bioquímica específica”.

En la mayoría de los vertebrados tetrápodos y como consecuencia a la progresión céfalo-caudal de los procesos organogenéticos, permite subdividir la región truncal en dos porciones sensiblemente iguales, aunque su citoestructura sea diferente. Al examen directo, aparece en la porción anterior del tronco formando relieve, la Cresta de WOLFF, diferenciada y dependiente a la condensación de la porción dorsal de la somatopleura que al inicio presenta una evidente concentración de ácido ribonucleico, índice de elevada actividad mitótica; las secuenciales divisiones celulares, adquieren un mayor índice celular en los extremos craneal y caudal, por lo que a estos niveles se diferencian nítidamente en condensaciones para así determinar las “áreas miembro formadoras”, estructuradas no solo por el aumento “in loco” de los procesos mitóticos, sino por el enlentecimiento y práctica anulación de los mismos en la porción crestal intermedia. El área capaz de dar origen y convertirse en miembro es mucho más extensa de lo que luego lo hace. BALINSKY, 1974.

En embriones de 24 pares de somitos CHAUBE, 1959; BLECHSCHMIDT, 1969 y JIMÉNEZ COLLADO, 1981 el territorio presuntivo del miembro superior, está comprendido entre el 8º y 12º somitos. Un poco más avanzado el desarrollo, el esbozo del miembro aparece como una condensación densa situada frente a los somitos 10-18, delimitada dorsalmente por el origen de las arterias onfalo-entéricas que marcan un plano preciso de relieve en la pared

lateral del cuerpo, para seguidamente extenderse en sentido cráneo-caudal desde los somitos 14 a 22, por lo que la porción posterior del área de origen, se relaciona íntimamente con la Arteria Onfalo-entérica homolateral; en estos estadios, los materiales presuntivos del miembro inferior están aún en vías de incorporación, ya que se encuentran localizados en la hoja parieto-pleural condensada en la zona truncal posterior.

Es pues evidente que el crecimiento mesoblástico evoluciona de manera muy diferente a estos dos niveles de anlagen de miembro, aunque en común se caracterizan porque las actividades proliferativas iniciales, sobrepasan las áreas límites iniciales, englobando una mayor porción del material de la Cresta de WOLFF, sobrepasando en longitud los límites prospectivos. Sin embargo a nivel del esbozo del miembro inferior, cabe destacar un menor crecimiento, JIMÉNEZ COLLADO, 1989, quedando más limitada, diferenciación ésta entre esbozos consecuencia del gradiente céfalo-caudal que rige la individualización de las estructuras truncales, proceso coincidente con las modificaciones del epiblasto de recubrimiento.

Este engrosamiento estructurado de la somatopleura, discutido por ZWILLING, 1961, se encuentra recubierto al igual que el resto del cuerpo embrionario por un epitelio monoestratificado y por una delgada capa de células aplanada, peridermo o peritelio, disposición que se mantiene uniforme excepto a nivel de las condensaciones o áreas miembro formadoras en las que se engruesa en dependencia a una mayor estratificación en dos capas celulares: basal, formada por células columnares o cilíndricas y sobre esta, otra constituida por células cúbicas, STELLER, 1973.

En los embriones humanos en estos estadios iniciales, DEHAAN R, 1959, esta neoestratificación se traduce en un engrosamiento mamelonado apical, Cresta de SAUNDERS, dispositivo que se hace más evidente y mejor

diferenciado en la porción media de las condensaciones de las áreas miembro formadoras, nivel en el que dan origen a un marcado relieve en la superficie del cuerpo embrionario (Fig. 5a).

El momento de aparición de la Cresta Apical en relación con los cambios progresivos de forma y tamaño global del esbozo está en relación con las modificaciones de forma y tamaño en modo especial cuando el esbozo presenta igual longitud y grosor, es decir, dos de los tres ejes de crecimiento, que a su vez se traduce por un engrosamiento ectodérmico en el borde superior que se mantiene secuencialmente pseudoestratificado en los puntos digitales, aunque con menos presencia en los espacios interdigitales, O'RAHILLY y cols., 1943 y SAUNDERS, 1948.

Las células de la Cresta Apical de SAUNDERS presentan específica tipicidad, de igual modo, el complejo de GOLGI es más abundante al igual que las mitosis.

La Cresta Apical es el reflejo morfológico de la interdependencia ectodermo-mesodermo en el desarrollo del miembro; se viene en aceptar que de ella se diferencia la porción distal del miembro y dedos, mientras que del corazón mesoblástico se formarán los precursores musculares cartilaginosos de los segmentos esqueléticos, proceso que tiene lugar en la secuencia próximo-distal, MURILLO, 1971; JIMÉNEZ COLLADO, 1983 (Fig. 4a).

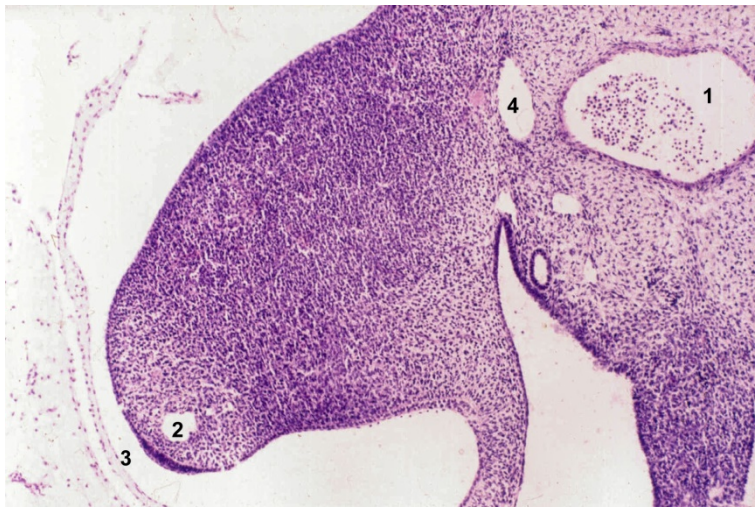


Fig. 4a
Esbozo miembro superior
Embrión humano 18 somitos
Colección Prof. Jiménez
Collado

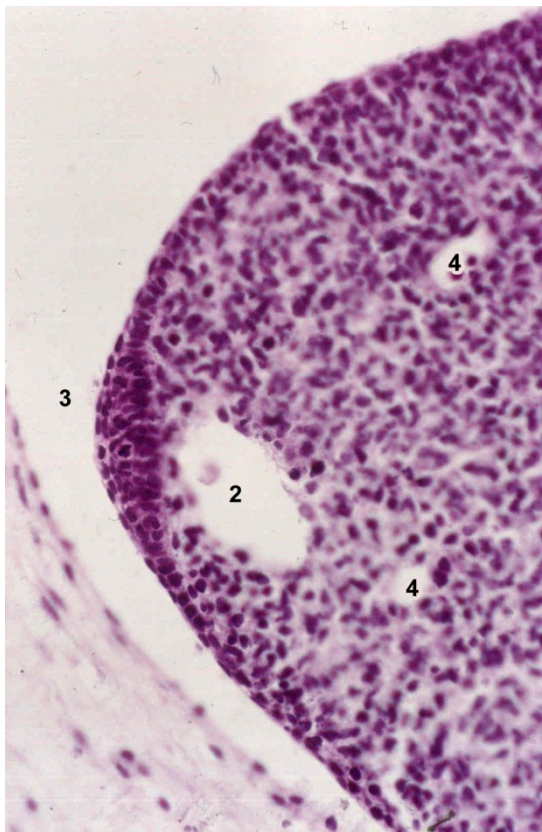


Fig. 5a
A mayor aumento porción distal
de miembro superior
Embrión humano 18 somitos
Colección Prof. Jiménez Collado
1. Aorta.
2. Seno Marginal.
3. Cresta apical de SAUNDERS.
4. Vasos plexurales arteriales

El criterio durante tiempo aceptado que el ectodermo del miembro sólo desarrolla un papel pasivo en su edificación, AMPRINO y cols., 1955-1958, ha sido abandonado a partir de las experiencias de SAUNDERS 1948, que demostró cómo la extirpación de la Cresta Apical en embriones de vertebrados detiene su diferenciación; sin embargo, el papel inductor y diferenciador de la

Cresta Apical está en directa dependencia al horario o estadio morfodiferenciativo, pues a medida que este avanza, va progresivamente disminuyendo, incluso desaparece una vez que el miembro adquiere su índice de estructuración típica apendicular, SUMMERBELL, 1974 (Fig. 5a).

YASUDA Y, 1973, cultiva in vitro esbozos de miembro de embriones humanos de los estadios XII a XIX de STREETER, cuatro a seis semanas post-ovulación con la finalidad entre otras de analizar los elementos que se diferencian, grado de estructuración de los mismos y en modo especial la cronicidad de las formaciones musculares, condrales y conjuntivas. Divide las experiencias en tres grupos dependientes al horario morfogénico en que fue extirpado el esbozo de miembro; en el primero que lo forma los procedentes de estadios XII y XIII, observa como en el mesénquima indiferenciado que lo ocupa, a los ocho y catorce días de cultivo no se ha diferenciado blastema ni muscular ni condrogénico, mientras que en el grupo segundo, esbozos de embriones de los estadios XIV a XVI que estructuralmente contiene Cresta Apical, describe mejor y mayor ordenación del contenido mesodérmico, ha diferenciado acúmulos de blastema premuscular que se mezclan prácticamente con el mesénquima en nódulos densos e irregulares así como pequeños y escasos de blastema cartilaginoso situados a nivel proximal del área que normalmente se localizan próximos o en contacto con la base de implantación del esbozo extirpado. Esta estructuración se modifica en el tercer grupo de embriones, estadios XVII-XVIII, en los que a partir del cuarto día se localizan blastemas cartilaginosos típicos próximos o en contacto con acúmulos de fibras musculares que en los días 8 y 14 de cultivo presentan lisis celular, pignosis e incluso áreas de necrosis a diferencia de los esbozos cartilaginosos en los que se han diferenciado moldes típicos de formaciones tronculares e incluso radios digitales en las paletas mania y pedia, aunque ésta última presenta menor grado de diferenciación.

Considera como resultados de estas experiencias, que los esbozos extirpados y cultivados de los grupos I y II que eran portadores de la fina red vascular que se distribuye sin aparente patrón por el mesénquima indiferenciado, forma fibras premusculares, mientras que el grupo III, si bien en el momento de su extirpación y cultivo el aporte vascular periférico se mantiene, dando incluso imagen de un Seno Marginal, la porción central que ocupa en el mesénquima ha diferenciado cartílago, es mínimamente vascular, disposición ésta por la que interpreta la diferencia del mesénquima y su aporte vascular primero y mayor en las áreas o niveles periféricos en los que van a localizarse fibras premusculares, mientras del núcleo central con escaso aporte vascular, contribuye a la condrogénesis que ocupa una porción fija en su topogenia sólo modificada por el eje de crecimiento próximo-distal.

Es evidente pues, que la Cresta Apical, ejerce acción inductora sobre el mesodermo, ofreciendo a su vez un índice de especificidad, pues el mesoblasto "in vitro" aislado o cultivado con epiblasto no de áreas miembro formadoras, detiene la formación de estructuras distales, mientras que cuando el mesoblasto aislado y cultivado con epiblasto de área miembro formadora no contiene Cresta Apical, no forma miembro. JIMÉNEZ COLLADO, 1981.

Sin embargo, no por todos es aceptada la importancia de la Cresta Apical en la diferenciación de las estructuras distales de los miembros. AMPRINO, 1980, experimentalmente observó que extirpaciones totales del epiblasto que recubre el esbozo del miembro y su parcial sustitución por Cresta Apical procedente de otros embriones, originan bloqueos e incluso ausencia de crecimiento distal del miembro a la vez que en las porciones de mesodermo cubierta por crestas apicales heterólogas crecen y se originan estructuras distales, SUMMERBELL, 1974 y JIMÉNEZ COLLADO, 1981.

Parece pues evidente que áreas o niveles mesodérmicos, incluyendo base, que en condiciones normales forman elementos del cingulum, puestas en contacto con Cresta Apical, originan estructuras distales,-dedos-. Este carácter de dependencia ectodérmica es aún más importante por cuanto la diferenciación de las estructuras están en íntima dependencia a la naturaleza y tipo de Cresta Apical injertada.

ROWEN y FALLON, 1982, en extirpaciones selectivas de Cresta Apical observaron que va seguida de una ola de muerte celular en el mesodermo subyacente y de la detención en el desarrollo de las estructuras distales, deficiencias que serán mayores cuanto más temprano es el estadio en que se actúe.

En experiencias "in vitro" de fragmentos de mesodermo en ausencia de Cresta, aparecen signos de necrosis y destrucción, mientras que en aquellas otras en las que el mesoblasto es puesto en presencia de Cresta Apical, prolifera y da origen a una estructura con grado y tipicidad de miembro, CAIRNS, 1975.

No es preciso el contacto directo entre Cresta y mesodermo para la puesta en marcha y regulación de este mecanismo inductor, SOLURSH, 1981, ya que la interposición de láminas porosas no lo detiene o anula, tal vez debido a la liberación y difusión a partir del ectodermo de sustancias reguladoras, MARKWALD y KRUG, 1985, de las que han sido aisladas más de veinte proteínas del recubrimiento ectodérmico del esbozo de miembro, de las cuales unas son de alto peso molecular de naturaleza glicoproteica más abundantes en la mitad posterior del esbozo del miembro. MAC CABE, 1982.

Es pues evidente que durante el periodo inicial de la morfogénesis apendicular, el epiblasto de recubrimiento de los esbozos, sufre modificaciones

regionales que evocan una activa participación de esta hoja en el desarrollo, crecimiento y organización del mesoblasto subyacente.

Cualquiera que sea el estadio considerado en el área del esbozo apendicular, la diferenciación epiblastica posee características similares: las células basales se transforman en cilíndricas o columnares con su prolongación profunda en contacto con la membrana basal; estas porciones citoplasmáticas se enriquecen en ARN ribosomal y mitocondrial, mientras que el resto del citoplasma manifiesta una afinidad selectiva a las fosfatasa ácidas así como a la 5 nucleotidasa, MILAIRE, 1973.

Según sea considerado el estadio del desarrollo, un número variable pero siempre constante de células peridérmicas contribuyen a la densificación celular de las zonas y áreas diferenciadas del epiblasto, proceso que se acentúa en la zona ventro-marginal del esbozo para así adquirir su máximo en la capa apical crestal; dos procesos parecen modular este mecanismo:

- multiplicación mitótica.
- desplazamiento de células superficiales a partir de territorios próximos del peridermo.

Estas áreas así definidas y diferenciadas del ectodermo de superficie, Cresta Apical de SAUNDERS, ejercen sobre el mesodermo un control continuo y a la vez variable por su intensidad y localización. A su vez, no sólo la Cresta Apical actúa sobre el mesodermo induciendo estructuras distales, sino que este lo hace recíprocamente sobre el ectodermo, estableciendo una acción o "factor de mantenimiento" ZWILLING, 1961, MAC CABE y PARKER, 1975-1982.

La Cresta Apical al formarse los relieves digitales, se fragmenta en áreas que recubren su porción distal, carácter dependiente del mesodermo y no propiedad intrínseca de la cresta epiblastica. Sin embargo el proceso íntimo que regula este mecanismo morfogénico, es la programación armónica de la muerte celular, HURLE y HINCHLIFFE, 1978, HINCHLIFFE y JOHNSON, 1980, habiéndose descrito en algunas especies áreas de específica localización: Zona Necrótica Anterior, GOEL y MATHUR, 1977, Zona Necrótica Posterior, MILAIRE, 1977, en los bordes del esbozo, en pleno espesor de la porción media del esbozo, Mancha Opaca, DAWD y HINNCHLIFFE, 1971, así como en los espacios interdigitales, Zona Necrótica Interdigital, LITWAC, 1973, que modelarían la formación final del miembro, cuya programación sería un “activo fenómeno genético” integrado y dependiente a los procesos diferenciativos.

Las células en vías de necrosis, sufren un brusco descenso en sus niveles de síntesis de ADN, ARN y proteínas, proceso que condiciona una fragmentación autolítica seguida de ingestión y atrapamiento de los fragmentos por otros elementos celulares que actuarían de macrófagos, modificando su citoestructuración por la presencia de numerosas vacuolas ricas en fosfatasa ácida, POLLACK y FALLON, 1976, HURLE y HINCHLIFFE, 1978.

Existen sustancias que modifican los mecanismos y patrón de muerte celular: altas dosis de aspirina dadas a ratas de la raza LEGORD en los días 9 a 12 de la preñez, dan un alto porcentaje de polidactilia, KLEIN, 1988, por el contrario inyecciones de tiadacidina o azul tripan originan sindactilia por posible bloqueo del proceso necrótico interdigital MILAIRE, 1969, TUCHMAN DUPLESSIS y PATON, 1978, MANSON y MILLER, 1983.

La formación de un gran vaso marginal, situado en la inmediata vecindad de la cresta epidérmica apical, en pleno espesor del mesénquima, Seno Venoso Marginal de HOCHSTETTER, resume el caudal sanguíneo procedente de la

Arteria Central; este dispositivo vascular ha dado origen a hipótesis sobre el papel y posible acción en el crecimiento y diferenciación distal, ya que la simple observación en especímenes con mutaciones genéticas, evidencia grandes anomalías en la disposición y patrón vascular, CARTER, 1954.

El desarrollo y trayecto del Seno Marginal, a partir de las experiencias de TCHUMI, 1967, parece estar determinado por la Cresta Apical, pues cuando la porción distal del miembro es desprovista de recubrimiento ectodérmico con o sin lesión del Seno Venoso, el mesénquima degenera rápidamente; el mecanismo íntimo de esta degeneración es en gran parte desconocido, por lo que le atribuye JIMÉNEZ COLLADO, 1982, que entra en el capítulo de la Epigénesis Trófica de DALQ.

No obstante, hoy se considera que el patrón de distribución vascular sería responsable de la diferenciación del mesoblasto biogénico e incluso condral en dependencia a la modificación del gradiente metabólico: las áreas con mayor riqueza vascular se diferenciarían a fibra muscular y tejido conectivo, mientras que las de menor aporte, lo harían a cartílago.

Esta definición del patrón o territorialidad vascular, CAPLAN, 1984, condiciona áreas con específico crecimiento en periodos de activa proliferación celular con diferentes niveles de oxígeno y modelo secuencial previo a la determinación de los fenotipos muscular y cartilaginoso.

Existe no obstante en relación con la diferenciación muscular, criterios de la aportación somítica, ya definida por VON BAUER, 1827. Experimentalmente la extirpación en vertebrados y mamíferos de somitos a nivel del esbozo del miembro y sustitución por otros de diferentes especies que posean diferente patrón nuclear, actúan como marcadores biológicos, ORTS LLORCA y JIMÉNEZ COLLADO, 1992, por lo que es fácil evidenciar cómo las masas

musculares diferenciadas son portadoras del patrón nuclear de los somitos injertados, mientras que los tendones y tejido conectivo lo hacen a partir de los elementos típicos del receptor.

LUNG-YUN y cols., 1995, en experiencias de trasplantes ortotópicos de somitos de embriones de rata previamente marcados con sustancia lipofílica fluorescente DiI, observaron como a nivel de implantación, la localización y presencia en la porción proximal del esbozo de fibras musculares estriadas marcadas que secundariamente en dependencia al normal mecanismo diferenciador, se “extienden y avanzan”, mecanismo este que puede estar establecido tanto activa como pasivamente, llegando a ocupar áreas mesenquimales próximas al recubrimiento ectodérmico distal, según línea de crecimiento próximo-distal.

En una segunda fase experimental, material aislado de somatopleura, previamente marcado, es injertado con idéntico proceder y técnica y observaron la no diferenciación de fibra muscular en la base de implantación del miembro y aún menos en su interior; por el contrario, describen la presencia de material condrogénico y tejido conjuntivo, fijo, sin capacidad activa ni de arrastre pasivo a otros territorios o áreas del miembro.

BRAND y SABELY, 1993, describieron previamente que este proceso específico de diferenciación mio-condrogénico, se mantiene y realiza una vez alcanzado el gradiente somítico, ya que en fases previas, el anlage somítico puede diferenciar condrocitos y endotelio vascular, AGNISH y KOCHIAR, 1997, probablemente en una fase de pluripotencialidad celular somítica, WADDINGTON y MARTIN, 1989, así como a influencias del ambiente tisular.

FULLAT L, 1921, en su Tesis Doctoral estudia el origen de la musculatura estriada de las extremidades en el conejo, al considerar que el mecanismo

diferenciativo y estadios morfogénéticos han de ser idénticos a los acontecidos en el hombre, proceso aceptado que puede ser debido a uno de estos tres mecanismos: primero dependiente a la aparición de una doble yema o condensación en el miotomo, segundo por la aparición de una sola yema en la región de la lámina ventral del miotomo y tercero sin intervención de procedencia miotónica, es decir, del segmento primitivo, sino por dispersión de mioblastos en el mesénquima indiferenciado del esbozo de la extremidad originados en la región ventral del miotomo que sucesivamente al aumentar en número, darían lugar a la musculatura de las extremidades.

Este tercer y último proceder, propuesto por MAURER, 1907 es el más aceptado ya que serían mioblastos derivados y emigrados directamente del somito, aunque en anfibios, BYRNES, interpreta que toda la musculatura deriva únicamente de la somatopleura.

En sus descripciones a partir de embriones jóvenes, 11 días, describe fibras nerviosas procedentes del tubo neural que finalizan a nivel del esbozo de miembro, dando la impresión que desplazan, textualmente dice "arrastran" al mesénquima tóraco-abdominal hacia la pared externa; por el contrario, los segmentos primitivos,-somitos-, ninguno emigra, divide y aún menos total o parcialmente se aproximan e introducen en el miembro, por cuanto entre ambos, miembro y somito, se sitúa una lámina de tejido laxo avascular, observación que es constante en todas las series estudiadas en las que incluso ya dividido en miotomo y esclerotomo, en la base del esbozo, se mantiene tejido laxo a modo de lámina de similar altura y longitud que la vena cardinal anterior; por tanto, para FULLAT, ni miotomos aislados ni condensaciones de mioblastos se desplazan hacia la base de origen del miembro y aún menos lo colonizan.

En estadios un poco más avanzados, embriones de 16 días, el nervio espinal ya estructurado se orienta hacia la superficie de origen de miembro para en estadios siguientes, penetrar en el esbozo ya diferenciado por el que se distribuye; por tanto, el nervio es previo a la diferenciación muscular, por lo que interpreta como el origen y diferenciación de la musculatura de las extremidades en vertebrados mamíferos, no procede de los segmentos primitivos sino por un proceso diferenciador "in situ" del mesénquima propio, fase de blastema primitivo indiferenciado, que ocupa el esbozo epitelial del miembro.

La colonización de las células somáticas con capacidad diferenciadora a músculo, parece realizarse por vías previamente establecidas con componentes y matriz extracelular. La contribución somática a la edificación del miembro no sólo ha de considerarse en su aportación biogénica ya en estadios iniciales. MURILLO, 1963, considera la posible liberación de un "factor de mantenimiento" regulador sobre el mesodermo somatopleural.

Histológicamente se ha evidenciado como los somitos situados en la raíz o área de implantación del miembro, emiten prolongaciones citoplásmicas que contribuyen a la determinación del área presuntiva del miembro, REYNAUD y VASE, 1969, poseyendo capacidad inductora, O'RAHILLY, 1972, WACHTER F, 1982, competencia que experimentalmente en trasplantes dan origen a miembros supernumerarios. DHOUAILLY y KIENY, 1972, JIMÉNEZ COLLADO y MATESANZ, 1980.

SHINOHARA H y cols., 1990, estudian las fases primeras de entrada de fibras nerviosas en el esbozo del miembro y observan como en embriones humanos de 5 mm, fibras nerviosas diferenciadas en el cordón espinal se sitúan próximas a la base de implantación del miembro superior para en embriones de 7 mm, cuando la extremidad superior aparece ya bien definida, fibras nerviosas

procedentes de C5 a T1 se aproximan a la vez que inician la estructuración del plexo braquial y la emergencia de pequeños y cortos nervios. En embriones de 9 mm, junto con las modificaciones en el ya diferenciado esbozo del miembro, del plexo braquial emergen largas ramas que se individualizan como nervio mediano, radial y cubital, distribuyéndose próximos a la paleta mania en fase aún de estructuración morfológica, mecanismo presente en embriones de 11 mm, en el que están definidos los radios digitales; en embriones de 13 mm, a nivel del codo, el nervio mediano presenta topografía y relaciones vasculo-musculares similares al adulto, estableciendo la inervación del músculo pronator teres y palmaris longus, mientras que el nervio cubital una vez dada la ramita para el flexor carpi ulnaris, se divide en tres ramas finales.

En embriones de 20 mm, la disposición y topografía neuro-muscular aparece prácticamente finalizada, incluso están presentes las ramas digitales que se sitúan próximas a las falanges, fases diferentes en el miembro inferior que lo hace más tardíamente, descripción ésta no coincidente con las establecidas por LEWIS, 1902, PIGANIOL G, 1959 y CAMERON J, 1982, aunque si con las de O'RAHILLY R y GARDNER R, 1973-1975.

Si bien no se define el criterio de presencia neuronal en la diferenciación de mioblastos, viene en considerarse en base a estudios ultraestructurales, SHINOHARA H y cols., 1976-1988, que los miofilamentos son evidentes en el estadio 13 CARNEGIE y la línea Z en el 18 CARNEGIE, datos que unidos a la existencia de isoenzimas específicas marcadores moleculares de la diferenciación miogénica, -enolasa y creatin-kinasa-, son evidentes en el estadio 15 y 16 CARNEGIE; por tanto, considera que cambios o modulaciones morfológicos y bioquímicos inciden en la miogénesis de los esbozos de miembros facilitando o condicionando que el nervio entre y se distribuya por el esbozo de la extremidad coincidiendo con la diferenciación de los diversos componentes propios estructurales.

Al igual que el factor vascular puede ser considerado inductor primario o secundario, la presencia de fibras nerviosas procedentes del receptor con un patrón de distribución similar al control, JIMÉNEZ COLLADO, 1981, regulan la estructuración y topografía de los elementos mesodérmicos diferenciados CASTRO, 1963, LANCE JONES, 1980, MURILLO, 1980, LANDMESSER, 1980. Esta capacidad de atracción y orientación fibrilar no es específica en su topografía, pues injertos de esbozos de miembro a nivel cefálico -mesencéfalo o romboencéfalo- son colonizados por fibras del trigémino, PUCHADES, 1968 (Figs. 6a y 7a).

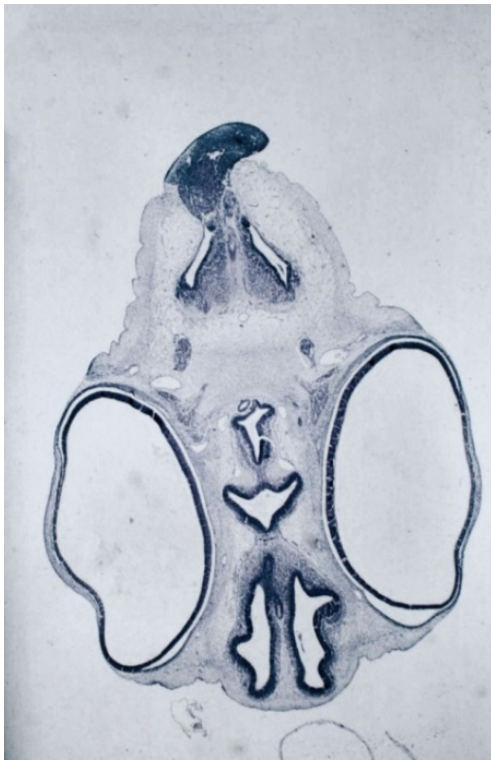


Fig. 6a
 Injerto de esbozo de miembro
 Embrión dador, pollo, estadio 9 Hamilton-
 Hamburger
 Embrión receptor, pollo, estadio 7
 Hamilton-Hamburger
 PUCHADES A 1968

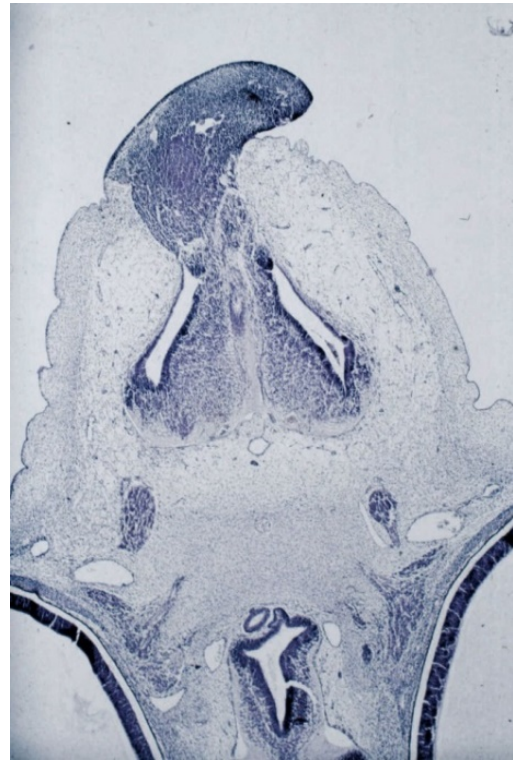


Fig. 7a
 A mayor aumento
 Esbozo de miembro diferenciado en
 mesencéfalo
 Nervio Trigémino invade injerto
 diferenciado
 PUCHADES A 1968

Es pues evidente la existencia de una quimio o neuroespecificidad especie-específica, JIMÉNEZ COLLADO, 1980, proceso que se establece al igual que el factor vascular, JIMÉNEZ COLLADO y MATESANZ, 1982. La naturaleza de estos mecanismos y su posible regulación por factores de naturaleza molecular son prácticamente desconocidos, aunque SWANSON y LEWIS, 1982, consideran una íntima dependencia con la precisa diferenciación de las células musculares, en modo especial a las propiedades de superficie de las células mesenquimales del miembro en vías de diferenciación biogénica AL GHAI TEH y LEWIS, 1996, KIAYANEK y GOLBERG, 1981.

Más recientemente, JIMÉNEZ COLLADO, 1999-2002, considera que dependiente a los propios mecanismos del desarrollo, se producen modificaciones en la superficie celular mesoblástica que determinan áreas o microambientes con mayor coeficiente de adhesión para rutas de crecimiento neural, SHELLSWELL, 1980.

Una vez diferenciado el miembro, se ha intentado desde antiguo establecer el cómo y dónde se localizan los precursores del esqueleto apendicular que han de desarrollar la unidad morfo-estructural, criterios no extrapolables en algunos de los integrantes del filum y aún menos en el hombre.

En un trabajo excepcional no solo por el tiempo de su publicación sino por su preciso contenido, análisis descriptivo e iconografía, BARDEEN CH y HARMON LEWIS W, 1901, *The American Journal of Anatomy*, vol 1, nº1, dan a conocer por primera vez las etapas iniciales del desarrollo de las extremidades en embriones humanos, incidiendo en la descripción de la morfología externa y dispositivo estructural diferenciado, que describen junto con la topogénesis de la superficie o plataforma de implantación del esbozo a nivel del relieve cordonal celular de WOLFF.

En embriones de dos semanas (Fig. 8a), 2 mm, describen la presencia de una banda celular densa insegmentada a nivel 8-10 somítico cubierta por un epitelio ligeramente engrosado, no siendo en ella visible la presencia de relieve o esbozo de miembro; sin embargo, en embriones de 4 semanas, 3,5 mm, observan y describen la existencia de un acúmulo o discreta condensación de tejido no diferenciado en el cordón wolffiano de crecimiento irregular por la presencia de dos discretos relieves: uno a nivel C5- T1 que representa el anlage del miembro superior, mientras que el otro, caudal, más limitado entre 1L-5L corresponde al miembro inferior.

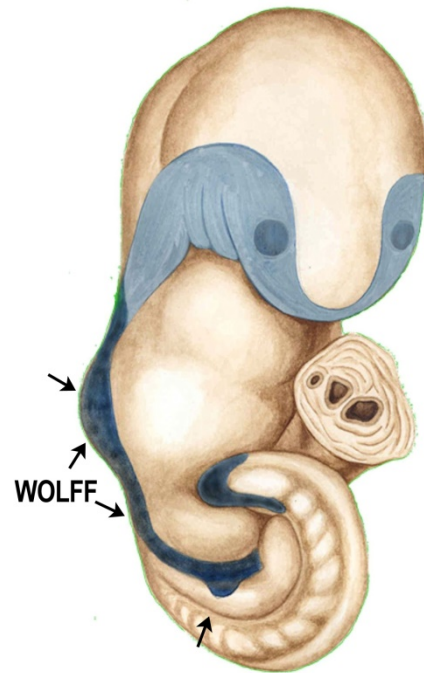


Fig. 8a
Representación esquemática de un embrión humano del inicio del periodo somítico. Cresta de WOLFF con los relieves de los esbozos de miembro.

Una fase un poco más avanzada, embrión de 5 mm, la base o relieve inicial ha aumentado, localizándose entre 5C y último torácico para miembro superior, en el que es visible un crecimiento longitudinal cuyo análisis histológico, muestra la presencia de condensaciones celulares indiferenciadas, a las que llegan escasas fibras nerviosas así como ramos vasculares.

En embriones de cinco semanas (Fig. 9a), se ha establecido una mayor y más precisa organización tisular del esbozo; la base de implantación apendicular, orientada cauda-lateral, ha crecido dando origen al esbozo de miembro, pudiéndose definir en él, la existencia de una inflexión que consideran esbozo del pliegue de codo; histológicamente está ocupada por nidos o acúmulos celulares separados en dos planos por fibras nerviosas

procedentes de raíz medular, así como formaciones vasculares de la aorta abdominal y drenaje venoso a la vena cardinal inferior.

El esbozo del miembro inferior si bien presenta similitud en contenido y estructura, su crecimiento y diferenciación es menor.

Una fase más avanzada, finales de quinta semana, la caracteriza la presencia de paleta mania y pedia, así como un discreto mayor crecimiento del miembro inferior en el que es posible distinguir el esbozo de la rodilla.

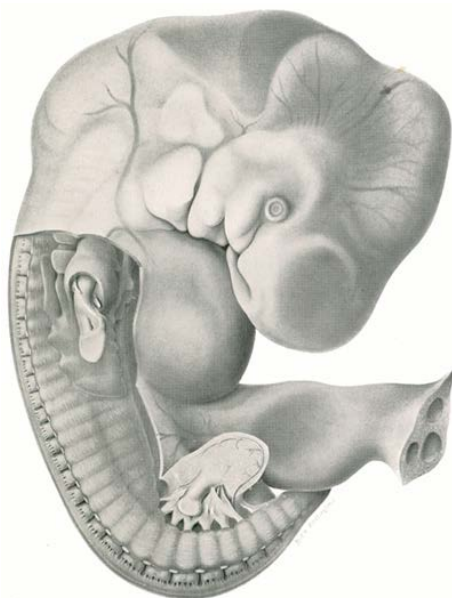


Fig. 9a
Reconstrucción Colección Viena
Embrión de 9 mm.
BARDEEN-LEWIS 1901

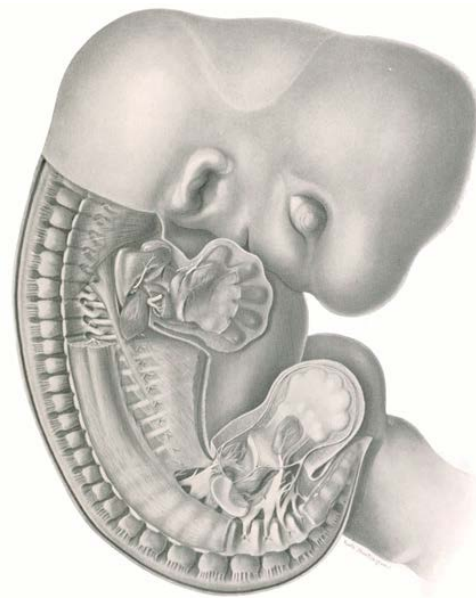


Fig. 10a
Reconstrucción Colección Viena.
Embrión de 11 mm.
BARDEEN-LEWIS 1901

En embriones de la sexta semana (Fig. 10a) la presencia de acúmulos musculares es constante, separados en grupos ventro-lateral y dorsal, por ramas nerviosas procedentes de los ya establecidos plexos nerviosos así como por formaciones vasculares.

En el miembro inferior se ha diferenciado la porción pélvica; el fémur corto y voluminoso no presenta aún definida sus características morfológicas, mientras que tibia y peroné están representados por dos barras mesenquimales a diferencia del esqueleto del pie que lo hace por un mesénquima denso, poco diferenciado. La aportación vascular queda establecida por gruesas ramas procedentes de la arteria isquiática como estructura base, de la que se originan e individualizan las arterias femoral y obturatriz, mientras el drenaje venoso se realiza en la vena cardinal con la participación de las venas femoral e isquiática.

A nivel del miembro superior, el plexo braquial se ha estructurado en la base de implantación, en la que están individualizadas sus ramas terminales. La presencia de una voluminosa masa muscular se estructura en tres acúmulos celulares en los que es posible individualizar uno superficial en el que se localizan extensor digiti quinti, extensor comunis y extensor carpi ulnaris; el segundo grupo que representa y corresponde al resto de la musculatura corta del antebrazo, lo forma un mesénquima condensado digital en el que es difícil diferenciar la masa premuscular de la pericondral, mientras que el tercer grupo lo integra el conjunto flexor, dividido a su vez en dos planos.

El húmero, cúbito y radio están presentes en fase de cartílago hialino, mientras que el resto del tejido esquelatígeno se encuentra en fase de mesénquima condensado precartilaginoso.

En fase más avanzada, 15-17 mm, tanto la musculatura como el patrón de distribución neural es parecida al adulto.

En el miembro inferior los esbozos del aparato de sostén están ya establecidos, excepto las falanges aún en fase de mesénquima no organizado.

En el miembro superior, se observa una estructuración similar con un mayor grado de diferenciación y madurez, ya que las formaciones propias del aparato de sostén, presentan una lámina mesenquimal condensada que a modo de funda, forma el pericondrio.

Finalmente en un embrión de 20 mm (Fig. 11a), las extremidades presentan una muy avanzada diferenciación morfológica y disposición estructural; el pie sigue orientado medialmente mientras que la mano lo está en discreta prono-supinación.



Fig. 11a
Reconstrucción Colección Viena.
Embrión de 21 mm.
BARDEEN-LEWIS 1901

También por primera vez, realizan BARDEEN y HARMON LEWIS una escala de referencias morfogénicas. En base a sus observaciones, consideran que las extremidades se desarrollan de la Cresta o Banda de WOLFF a partir de dos relieves en ella diferenciados en los que se establece “el molde apendicular” mientras que las formaciones musculares y estructuras esqueléticas lo hacen del mesénquima propio de la extremidad, no interviniendo elementos derivados del miotomo o esclerotomo.

La diferenciación esquelética comienza en el miembro superior a nivel del hombro extendiéndose en dirección próximo-distal, proceso diferenciativo que precede a la invasión nerviosa de los plexos originados a finales de la cuarta semana y principio de la quinta, por lo que consideran no puede establecerse la integración o impulso diferenciador ni dependencia entre presencia neural y diferenciación estructural apendicular,

aunque consideran a partir de la sexta semana, un posible gradiente témporo-diferenciador.

RETTNERER, 1902, interpreta que la evolución de los elementos conjuntivos embrionarios da origen a cartílago y ligamentos, mientras que los músculos se originan "in situ" a partir del mesénquima de las áreas en que se van a establecer, criterio que coincide con DUGES 1838, ya que considera que el miembro se desarrolla por la "fusión" de un sistema unitario de cinco radios digitales, cuya característica primera es la formación del húmero y fémur, seguida del cúbito y radio y tibia y peroné, para por último los cinco radios o relieves digitales, primero unidos por una membrana de la que se independizan finalmente; este mecanismo es simultáneo y dependiente con la presencia de cinco nervios agrupados a nivel tanto del miembro superior como inferior. Una vez que el esbozo de miembro aparece como relieve, se inicia una proliferación tanto del ectodermo como del "protoplasma común" indiferenciado que lo ocupa, en el que en dependencia a un crecimiento ordenado da lugar a un aumento en longitud y grosor del esbozo esquelético, para lo que "no es preciso invocar y aún menos considerar" la llegada problemática de elementos formados y presentes en otras porciones del cuerpo embrionario. Una de las conclusiones a que llega es que los nódulos o acúmulos cartilaginosos aparecen en el tejido primitivo esquelético en áreas de sostén del miembro, con una cadencia en horario, ya que los últimos en aparecer corresponden siempre a la porción radiada distal y extremidad de la misma.

Desde los inicios de los estudios sobre la morfogénesis muscular apendicular, se planteó una interesante problemática motivada por la aportación somítica, demostrada experimentalmente MILAIRE, 1957, MAUGER, 1980, contribuyendo así al mantenimiento de la clásica teoría emitida por BAUER, 1827.

En experiencias en embriones de ave a los que se les extirpan varios somitos a nivel del esbozo de miembro siendo inmediatamente sustituidos por otros homo y heterocrómicos procedentes de codorniz, especie con diferente patrón nuclear, por lo que actúan como marcador diferenciador biológico, ORTS LLORCA y JIMÉNEZ COLLADO, 1971, observaron la colonización de células de codorniz en el esbozo y su ulterior transformación en masas musculares, mientras que tendones y tejido cartilaginoso lo hacían a expensas de elementos típicos del receptor, pollo. Estas recombinaciones heterotípicas presentan además, el carácter de su no regionalización, pues el material somítico trasplantado de codorniz, no necesariamente ha de proceder de áreas próximas o en contacto con esbozo de miembro.

La colonización de las células somíticas con capacidad diferenciadora a músculo, parece realizarse por vías previamente establecidas por componentes y matriz extracelular, siendo considerada la fibronectina la de mayor capacidad como parece evidenciarse en cultivos de células biogénicas en presencia de esta glicoproteína en los que la adhesión y líneas de migración se realiza a lo largo de estrías, TURNER, 1983.

WACHTER y cols., 1982, en heteroinjertos de somitos pollo-codorniz, observaron la presencia en el 99% de núcleos celulares de la codorniz, en músculos a todos los niveles del receptor, cuando se injertó aislada e independientemente somitos o porciones dorsales de estos ya diferenciados y estructuralmente formados, observaciones que interpretan como determinantes celulares de la miogénesis, no así de la condrogénesis, habida cuenta que solo describen en muy escaso número, atípicos nódulos de cartílago ectópico; sin embargo, en estadios iniciales de la diferenciación somítica en el material dador, -codorniz-, la capacidad miogénica se mantiene mientras que la condrogénica aumenta, aunque es siempre muy inferior a aquella.

En injertos de somatopleura, no observan presencia de musculatura estriada, si de modo específico de cartílago diferenciado al igual que las obtenidas en las experiencias de STRAUS y RAWEES, 1953, CHIRST y cols., 1979 y MAUGER y cols., 1980, solo a nivel del injerto realizado en el que posteriormente quedó fijo; este hecho muestra una diferencia en el comportamiento migratorio miocondrogénico dentro del esbozo del miembro.

Esta diferente respuesta podría ser dependiente a:

1. todas las células somáticas en periodo de indeterminación o fase inicial del mismo, tienen capacidad tanto miogénica como escasa condrogénica.
2. cuando se ha diferenciado el esclerotomo, material parcial procedente de la división somática, podía ser "reterminado" a dar cartílago. NATHANSON y HAY, 1980.
3. las células con capacidad miogénica, abandonan en su proceso migratorio la porción central somática. JACOB y cols., 1978, quedando el resto con capacidad condrocítica.
4. reordenación específica del contenido celular en el somito a partir de una fase o estadio dependiente de la determinación. MESTRES y HINRICHSEN, 1976.

Parece pues evidente, que la determinación a cartílago, se establece tardíamente en la somatopleura, manteniéndose diferencias en su patrón y mecanismo migratorio.

Las células de cartílago diferenciadas de origen somático o somatopleural no muestran tendencia migratoria en el miembro, a diferencia a otras regiones,

por ejemplo área paranotocordal en la que dan lugar a vértebra. Esto demuestra que la migración celular condrocítica depende de al menos dos factores: celular y ambiente morfogénico al que obligadamente hay que contar con el tiempo o fase diferenciativa.

ORTS LLORCA y JIMÉNEZ COLLADO, 1971, en injertos de esbozos de miembro de codorniz a embrión de pollo, estudian los caracteres nucleolares del material dador, según proceder técnico de FEULGEN y LEDOUARIN, 1960, así como del receptor, pudiendo demostrar en la codorniz la presencia de un nucleolo voluminoso mientras que en el pollo a todos los niveles muestra una red cromática difusa dispersa en el núcleo pero ningún nucleolo de gran tamaño.

Esta característica morfológica sirvió de etiqueta o marcador biológico para experiencias de injertos de somitos aislados o conjuntamente con Cresta de WOLFF, en las que en síntesis han considerado estos investigadores.

El material codorniz dador a nivel somítico, ha dado lugar a formaciones tanto musculares como condrales de modo desigual, ya que sólo en escaso número se observan nucleolos voluminosos en cartílago; por el contrario cuando el material dador procedía de somatopleura o Cresta de WOLFF, formaciones condrales aparecen en mayor número marcadas, manteniéndose próximas al lugar del injerto, a diferencia de las musculares de esta y anterior experiencia que se localizan prácticamente de modo irregular por el miembro diferenciado.

La contribución somítica en la edificación del miembro, no sólo ha de considerarse en su aportación biogénica, ya que en estadios iniciales del desarrollo tanto en aves como en mamíferos parece liberar un factor de mantenimiento regulador o estimulador sobre el mesodermo somatopleural.

En embriones de ave, se ha evidenciado histológicamente como los somitos situados en el área de implantación del miembro, emiten prolongaciones ictoplágicas que contribuyen a la determinación del área presuntiva miembro formadora, REYNAND-VASE, 1969, poseyendo incluso competencia, esto es, capacidad inductora, ya que trasplantados heterotópicamente dan origen a miembros supernumerarios, DHOUAILLY y KIENY, 1972.

Más recientemente CRIST y BRAND-SABERI, 2002, consideran que los precursores de músculo para miembro se originan a partir de la capa epitelial dermo-miotónica del somito, proceso cuya especialización es controlado por señalización e interacción local de estructuras embrionarias, de tal manera que solo las porciones laterales del dermo-miotomo tienen capacidad para desplazarse y anidar en los esbozos del miembro; como requisito previo para la migración, las células precursoras han de sufrir una fase de desepitelización, proceso enzimático regulado genéticamente, BAILEY y cols., 2001.

Experimentalmente en aves, el mecanismo previo a la fase de desepitelización está regulado por interacción entre el receptor tirosin-kinasa transmembranal y el factor de crecimiento hepatoentérico característico del contenido celular de la somatopleura a nivel del anlage de miembro.

Las células precursoras adoptan una morfología típicamente mesenquimal, aunque con pérdida de su especificación biogénica epiaxial e hipoaxial. Alcanzado su lugar en el esbozo, los elementos celulares inician un proceso para establecer no sólo su capacidad sino la determinación en zonas ventral y dorsal.

Una vez invadido el mesénquima no diferenciado que ocupa el miembro desde su estadio inicial, aumentado por crecimiento "in situ" y discreta

aportación de la somatopleura, los precursores biogénicos se agrupan y diferencian en formaciones premusculares dorsal y ventral topográficamente en relación al eje axial del miembro, de tal modo que secuencialmente con el crecimiento del miembro, estos acúmulos se dividen y sectorizan en dirección próximo-distal, eje de crecimiento, a nivel stylopodo, zygotopodo y autopodo.

No obstante, aún hoy en día, se desconoce si en el somito existe un área o nivel que con especificidad determine músculo, criterio que sin embargo, WACHTLER, 1991, acepta en experiencias en ratas en las que describe la presencia en el mesodermo somatopleural de componentes específicos.

STOCKDALE, 1997 interpreta que el proceso definitivo de la diferenciación muscular, se establece por aportaciones a modo de “oleadas fibrilares” de tal manera que las fibras primarias, a las que denomina “fibras embrionarias”, configuran un pequeño anlage de la forma, tipo y situación de ulteriores aportaciones o componentes, que por su cronología diferenciadora, DI MARIO, 1997, las divide en precursores embrionarios, fetal y adulto, clasificación esta que si bien por su morfología característica y tipología es válida, plantea dudas en aceptar, JIMÉNEZ COLLADO, 2011, por cuanto:

- a. Los precursores mioblásticos embrionarios, fetal y adulto son tanto al principio como en tiempos diferentes, procedentes del anlage inicial.
- b. Por el contrario, hay poblaciones biogénicas precursoras con fases, forma y tiempo órgano-morfogénico específicos en el somito.

Si bien se consideró que el esbozo de miembro lo integra una población homogénea de células somatopleurales, CHEVALLIER y cols., 1976-1978 han demostrado experimentalmente que el contenido mesodérmico en fase inicial del brote se origina a partir de dos fuentes, ya que en extirpaciones de somitos,

injertos ortotópicos pollo-codorniz así como en destrucciones por irradiación del área somítica craneal y caudal al esbozo, la masa muscular diferenciada era de extirpe y citosignificación somítica, mientras que cartílago, tendones y tejido conectivos -perimio y endomio- lo eran somatopleural.

No obstante, en base a las experiencias realizadas, no descartan la posibilidad que en ciertas condiciones, el mesodermo somatopleural pueda ser capaz de expresar propiedades miogénicas, es decir, que las células mesenquimales somatopleurales puedan cambiar la predeterminación condrogénica a una expresión miogénica, criterio que consideran pueda ser dependiente a :

1. emigración compensatoria somítica, sobre todo porque la potencialidad miogénica somítica no está regionalizada.
2. la somatopleura puede dar lugar a fibras musculares, "compensando" la deficiencia somítica en su fase inicial.

No obstante, la eliminación del mesodermo somítico organotópico a nivel de la superficie de implantación del esbozo de miembro, tiene como resultado experimental en el inicio de su proceso morfogénico, a la disminución e incluso ausencia en su totalidad de musculatura.

La aparición de las atipicidades celulares durante el desarrollo va acompañada de cambios en los factores y módulos de división celular STOCKADALE y HOLTZER, 1961, FUJITA, 1962, WESSELLS, 1964, en las diferentes porciones o áreas presuntivas del esbozo de miembro en estadios iniciales, estudio que ha venido realizándose experimentalmente en embriones de ave ZWILLING, 1961, AMPRINO, 1965.

JANNERS y cols., 1970, determinan estos cambios de porcentajes, mitosis y síntesis de ADN, previo marcaje con timidina tritiada, en tres áreas o subpoblaciones del esbozo: porción de la base de implantación del esbozo, porción central y ambiente celular en la punta o vértice del miembro, describiendo como en la primera fase, el índice disminuye en la porción próxima a la zona de implantación, zona que es considerada procedente de la somatopleura o Cresta de WOLFF, a partir de la que se derivan condensaciones cartilaginosas. Sin embargo esta determinación celular es dependiente a un periodo cronológico, por cuanto su trasplante o injerto al área o porción cardial, con distinto patrón citoestructural, va a diferenciarse cuando es en fase inicial a cartílago, es decir, mantiene su tipicidad, que modifica cuando el injerto es más avanzado que lo hace a músculo o tejido conjuntivo. Por tanto, junto a la tipicidad de origen, señala y establece dependencia cronológica morfogénica, puesto que los elementos celulares de la porción o subpoblación central de la que acepta su origen somático, normalmente se diferencian más tardíamente a músculo, “transformándolas” como las propias de su población, por ello sugieren que este proceso es dependiente a la pérdida o modificación en un punto o momento citomorfológico del ciclo de división celular.

MARCHOK y HERRMANN, 1977, consideran que la localización temporal de los elementos celulares poseen “dependencia y tipicidad”, que en un primer periodo o fase es morfológicamente idéntico; la “capacidad miogénica” es dependiente a su origen unido a la presencia de factores química e inmunológicamente propios, tal y como BARIL y cols., 1967, definieron con la miosina. Esta capacidad de división tanto en el área presuntiva condrocítica como miogénica finaliza en las aves aproximadamente en el quinto día de incubación, periodo en el que tanto cartílago como musculatura están estructurados prácticamente.

DUPREZ, 2002, considera en embriones de mamíferos y experimentalmente en aves, que la musculatura de miembro y tronco son de origen somítico, estableciendo dos áreas de migración celular: de la porción medial somítica se diferencian elementos miogénicos epiaxiales, mientras que de la porción lateral lo hacen los correspondientes a hipoaaxial, es decir, miembros y pared del tronco, criterio en parte coincidente con ORDAHL y LEDOUARIN 1992 y CRIST y cols., 1997-2002; estableciéndose desde principio dos territorios con especificidad migratoria, proceso codificado por la diferenciación, migración y proliferación celular zonal somítica, programa morfogénico a su vez, regulado por factores biogénicos, MRFs, que establecen cuatro fases que esquemáticamente representan (Fig. 12a):

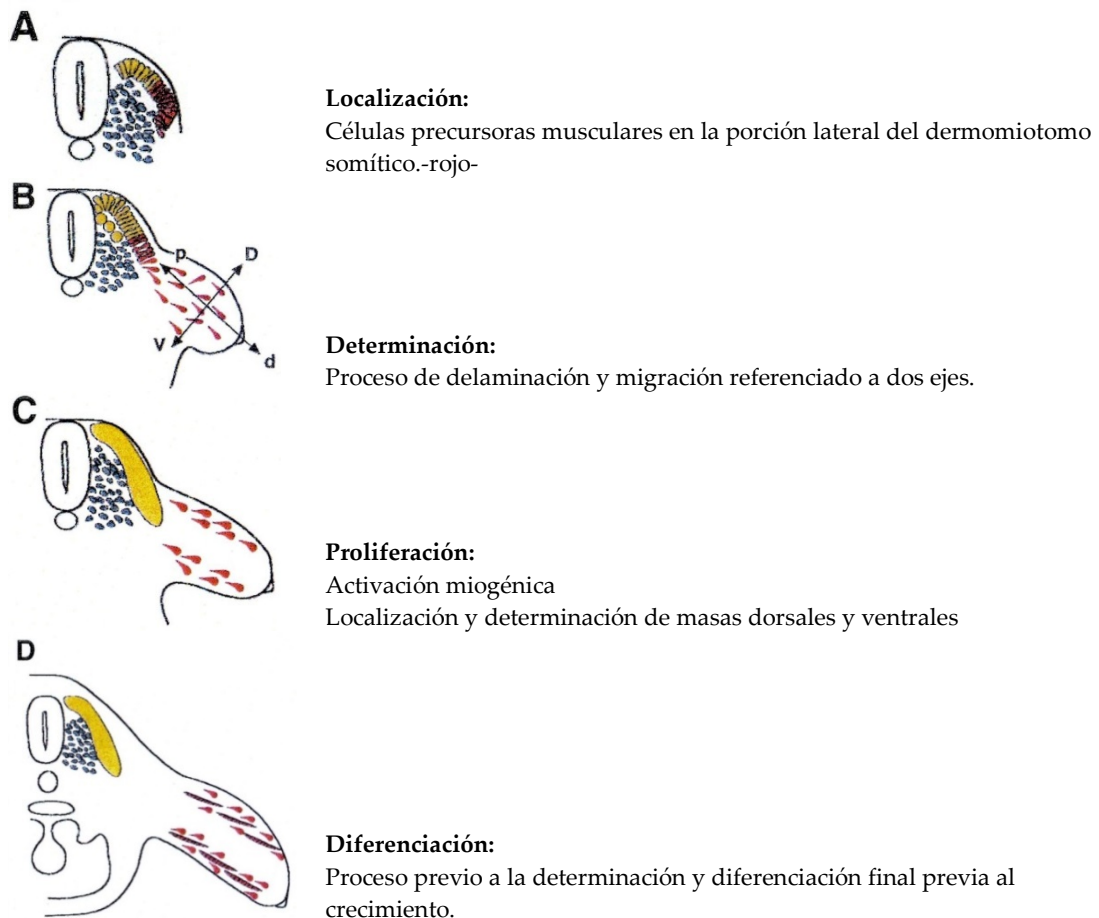


Fig. 12a

No obstante, el mesodermo somatopleural a nivel de la base de implantación del miembro, si bien contiene e integra información para la definición muscular, BAYLIES y MICHELSON, 2001, no define por el contrario la región o área tisular mesodérmica con capacidad posicional para el músculo ya diferenciado, estableciéndose una similitud entre los mecanismos que forman el eje de crecimiento próximo-distal del miembro con la formación de su musculatura, criterio en parte considerado previamente por TICKLE, 2000.

Establecido y aceptado que el mesodermo paraaxial por celularidad somítica y somatopleural, es el inductor primario junto con el epitelio de recubrimiento especializado, de la diferenciación de los miembros en vertebrados y mamíferos, es obligado analizar el patrón y horario morfogénico de algunas de las estructuras que lo integran.

El desarrollo prenatal del esqueleto humano ya definido y diferenciado, ha sido estudiado por numerosos investigadores; los resultados se han basado fundamentalmente en el análisis y descripción de los diferentes periodos de osificación ROBERTSON, 1951, O'RAHILLY y MEYER, 1957....

Sin embargo no se ha prestado esta atención a los estadios tempranos del desarrollo, periodo embrionario, a excepción del trabajo de SENIOR 1929, del origen y secuencia morfogénica de la condricificación de diversas estructuras, por cuanto este periodo es crítico para la interpretación y valoración científica y clínica de atipias o anormogénesis congénitas.

Es obligado recordar el mecanismo identificativo y causal del proceso de condricificación definido por SENIOR que aún hoy en día se mantiene: "Una condensación mesenquimal consistente en un denso conglomerado celular con límites indefinidos se acepta como blastema; cuando la separación o identificación de un núcleo en una porción localizada del conglomerado

presenta una apariencia más densa, es de suponer el depósito de matriz en esta zona y la condricación se considera empezada.”

Por tanto, el término de blastema diferenciado es sinónimo de condricado, STREETER, 1949. Este autor utilizó los estadios descritos por SENIOR para catalogar y establecer los estadios embrionarios; desafortunadamente SENIOR no publicó completamente sus hallazgos de localización del primer esbozo de miembro y su topogénesis somática, formación y estructuración del epitelio de recubrimiento, abordaje neural, condricación... fracasando los intentos de localizar sus notas originales.

No obstante, la observación y descripción de formaciones de “sostén” así denominadas por SENIOR, viene dándose desde HULTKANZ, 1897, al publicar la presencia de estructuras cartilaginosas en un embrión de 18 mm, estudio al parecer continuado por su colaborador HAGEN, 1900, que describe los elementos esqueléticos de la articulación del codo en embriones de 17 y 21 mm, y que HESSER, 1926, complementa en embriones de 22, 25 y 27 mm, en los que interpreta que en esta fase final del periodo embrionario, la “morfología diferenciadora” está ya prácticamente definida en su estructuración cartilaginosa.

De manera prácticamente generalizada, el estudio y publicación de la determinación y diferenciación del periodo blastemático de las estructuras y formaciones de miembro, se han realizado aisladas e independientes o bien en áreas funcionalmente estructuradas: cadera, hombro, codo, pie...; nuestro proyecto ha sido y es realizar el estudio conjunto de las formaciones del miembro en embriones de 2 a 30 mm. 4ª a 8ª semanas, estadios 11 a 23 CARNEGIE, estudio este sólo avalado en las investigaciones y publicaciones SENIOR, 1929, O'RAHILLY, 1973 y JIMÉNEZ COLLADO, 1993, poniendo especial punto de atención no solo a la presencia y diferenciación de los

acúmulos o condensaciones blastemáticas, sino en el mecanismo, posible o no, de interdependencia epitelio-mesenquimal así como de su horario morfogénico.

SENIOR 1929:

Hand:

- Hamate, capitate, metacarpals II to IV, almost simultaneously.
- Metacarpal V. Multangulum minus. First phalanx of digit II to IV.
- Triquetrum, multangulum majus, metacarpal I, first phalanx of V. Navicular and central.
- First phalanx of I. Lunate. Second phalanx of II to IV. Third phalanx of V.

Foot:

- Metatarsals II to IV. Cuboid, metatarsal V. Calcaneus, talus, cuneiform 3.
- Cuneiform 2. Cuneiform 1, metatarsal I.
- Navicular. First phalanx of II to IV. First phalanx of V.
- First of I. Second phalanx of II to IV. Second phalanx of I.
- Third phalanx of II to IV. Third phalanx of V.

O'RAHILLY 1973:

Feature	Stage for upper limb	Stage for lower limb
Limb bud	12	13
Length: width=1:1	14	15
Apical ectodermal ridge	14-17	15-18
Hand plate/foot plate	15	16
Mesenchymal skeleton	15	16
Mesenchymal scapula/hip	16	15-18
Mesenchymal humerus, radius, ulna/femur, tibia, fibula	16	17
Chondrifying humerus/femur	16-17	17-18
Chondrifying radius/tibia	17	17-18
Chondrifying ulna/fibula	17-18	17-18
Finger rays/toe rays	17-18	18
Chondrifying metacarpus/metatarsus	17-18	18-19
Chondrifying carpus except pisiform/tarsus	18-19	18-19
Chondrifying scapula/hip	18	19
Chondrifying proximal phalanges	18-19	19-21
Homogenous shoulder & elbow/hip & knee	19	19
Homogenous wrist/ankle	?	21
3-layered elbow/knee	?	21
Chondrifying middle phalanges	19-20	21
Chondrifying distal phalanges	20-21	21-23
3-layered wrist/ankle	21	23
Ossifying humerus & radius/femur & tibia	21-23	22-23
Ossifying ulna/fibula	22-23	23
Cavitation in shoulder & elbow/hip & Knee	23	23
Cavitation in wrist/ankle	23	?

JIMENEZ COLLADO, 1993:

Miembro SUPERIOR – Estadios CARNEGIE

	Fase blastema	Fase cartílago	Fase ósea
Húmero	16	16-17	21-22
Radio	16	17	21-23
Cúbito	16-17	17-18	22-23
Paleta mania	17	18-21	feto
Carpo	18	18-19	
pisiforme		19-21	
metacarpianos	17	17-18	
Falanges proximales	18	18-19	
Falanges medias	18	19-20	
Falanges distales	19	20-21	

Miembro INFERIOR – Estadios CARNEGIE

	Fase blastema	Fase cartílago	Fase ósea
Femur	17	17-18	22-23
Patela	20	21	nacimiento
Tibia	17	17-18	22-23
Paleta pedia	17-18	18-22	feto
Tarso	18	19-20	
Metatarso	18	18-19	
Falanges proximales	18	20	
Falanges medias	18	21	
Falanges distales	19	21-23	
Fibula	17	17-18	feto

MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de este Trabajo de Investigación, base de Tesis Doctoral, hemos estudiado 38 embriones humanos de la colección del Profesor J. JIMÉNEZ COLLADO existentes en el INSTITUTO DE EMBRIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, comprendidos entre los 2 y 31 mm, estadios 11 a 23 CARNEGIE, a fin de tener un amplio y personal conocimiento de las formaciones y estructuras morfogénicas primeras en la diferenciación de los miembros.

Este estudio se realizó conforme a la Normativa dictada por la Declaración de Helsinki, 1995, revisada en Edimburgo, 2000, siendo por tanto la mayoría de embriones procedentes de embarazos ectópicos donados por Departamentos e instituciones nacionales y extranjeras según consta en su Registro y Hoja de Control, habiéndose desechado para nuestro estudio aquellos malformados o atípicos.

Como es normal es estos casos de numeroso material estudiado, con la finalidad de evitar reiteraciones innecesarias en las descripciones y sobre todo en la necesaria y obligada iconografía original aportada, hemos seleccionado las características y momentos diferenciativos típicos dentro de los parámetros organogénicos más comunes de los estadios 11 al 23 de CARNEGIE, que nos han permitido seguir un normal y secuencial horario morfodiferenciativo.

Las técnicas de tinción empleadas en la preparación, fijación y tinción del material elegido fueron las habituales en el Instituto de Embriología, que nos ha permitido estudiar citomorfológicamente secciones histológicas de embriones con más de 50 años de antigüedad y perfecta conservación de la Colección del Profesor JIMÉNEZ COLLADO.

Estadio CARNEGIE	Tamaño milímetros	Tiempo postovulación	Identificación Embrión
11	2,1 mm	24+/-1 día	VAL.2
11	2,5 mm	24+/-1 día	CIX.
11	2,6 mm	24+/-1 día	G.V.11
11	3 mm	24+/-1 día	Mat.6
12	4,5 mm	26+/- 1 día	J.D 2
12	5 mm	26+/- 1 día	Ba 7
12	4,5 mm	26+/- 1 día	Oy3
13	6 mm	28+/- 1 día	Rb
13	6,5 mm	28+/- 1 día	Esc11
13	7 mm	28+/- 1 día	Esc 8
14	8 mm	32+/- 1 día	Ecx9
14	8,5 mm	32+/- 1 día	Mad. 6
14	10 mm	32+/- 1 día	Me
15	11 mm	33+/- 1 día	H.O.11
15	11 mm	33+/- 1 día	Ep.1
15	10,5 mm	34+/- 1 día	E.H.
16	12 mm	37+/- 1 día	E5
16	12,5 mm	37+/- 1 día	P.R.
17	13,5 mm	41+/- 1 día	V.e. 4
17	13 mm	41+/- 1 día	H2
17	14 mm	41+/- 1 día	H.L.25
17	14,5 mm	41+/- 1 día	A.L
18	16 mm	44+/- 1 día	G.I.8
18	16,5 mm	44+/- 1 día	J.5
18	17,2 mm	44+/- 1 día	G.V.9
19	18 mm	47+/- 1 día	H.L.7
19	19 mm	47+/- 1 día	H.L.9

Estadio CARNEGIE	Tamaño milímetros	Tiempo postovulación	Identificación Embrión
20	21 mm	50+/- 1 día	E.1
20	22 mm	50+/- 1 día	Nom.
20	22,5 mm	50+/- 1 día	R.X.
21	23,5 mm	52+/- 1 día	H.7
21	24 mm	52+/- 1 día	Mat.4
23	29 mm	57+/- 1 día	Nat.1
23	29 mm	57+/- 1 día	Lit.7
23	30 mm	57+/- 1 día	Mat.4
23	32 mm	57+/- 1 día	R.3
23	34 mm	57+/- 1 día	C.O.2

DESCRIPCIÓN DE NUESTRAS OBSERVACIONES

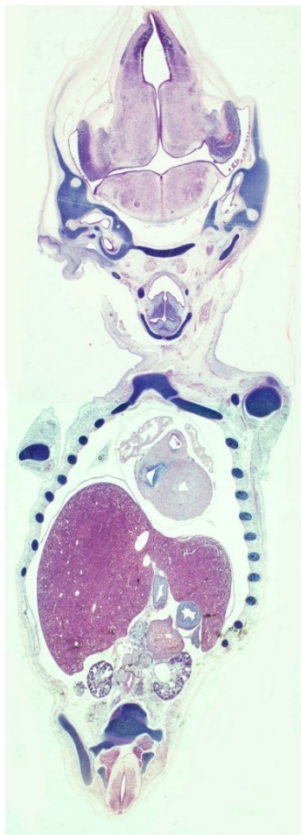
Con la finalidad de establecer el patrón normogénico de los miembros así como el modelo de condricación de sus principales estructuras, hemos agrupado los 23 Horizontes establecidos por STREETER, 1942, 1945, 1948, 1951, del periodo embrionario, revisados y establecidos en ESTADIOS CARNEGIE, por O'RAHILLY y MULLER, 1987-1998, hoy por todos aceptados como norma y etapas morfodiferenciativas en cinco semanas, agrupados a su vez por nosotros en CINCO PROTOCOLOS, para el mejor análisis conjunto y definición de parámetros, habida cuenta que en este periodo embrionario, se diferencian el mayor número de estructuras, desde la cuerda del tímpano al estapes, de los vasos intercostales al fascículo atrioventricular, del músculo abductor del 5º dedo al sustentaculum tali ... O'RAHILLY y col. 1981, es más la gran mayoría de anomalías congénitas se originan y establecen durante este periodo órgano diferenciador.

Al final de la 8ª semana postovulación, 56-61 días, 29-31 mm vértex-coxis, el embrión tiene prácticamente el 90% de las 4.500 estructuras anatómicas que presentamos al nacer.

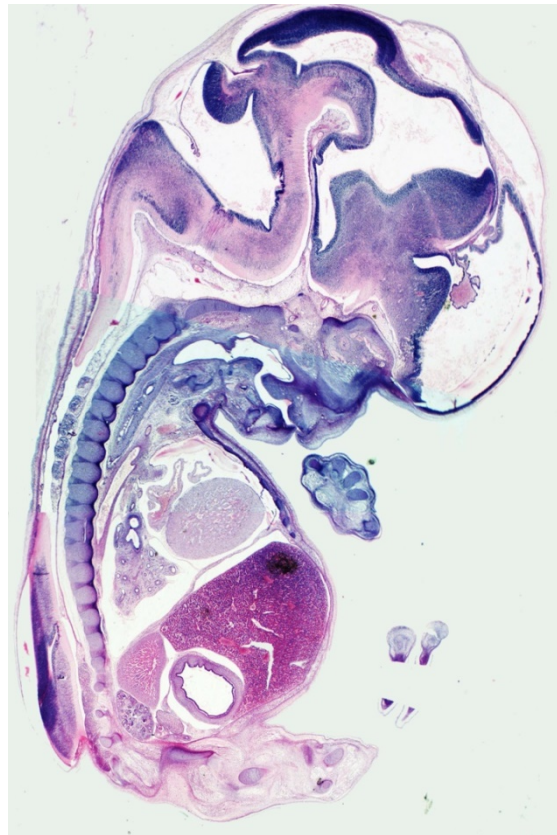
Las características externas como la aparición de los esbozos de miembro, STREETER, 1941, permiten admitir con uniformidad y criterio conjunto, su referencia para precisar las diferentes fases; de igual modo también lo es la historia menstrual como factor a utilizar, teniendo siempre en cuenta las variaciones y causa de errores posibles. OLLMAN 1967, MOORE y col. 1981; no es ocasional que se describan embriones de diferentes "edades gestacionales" asignados a una misma Etapa, carácter este que refleja la variación natural típica de todas las especies.

JIMENEZ COLLADO, 1991, considera definir y aceptar el parámetro "longitud vértex-coxis", como el más útil en términos generales, por cuanto prácticamente viene en coincidir con la medición "in vivo" por ultrasonido, siempre y cuando durante el periodo de fijación, -formol al 10%- no se modifique las curvaturas naturales del cuerpo embrionario.

Estas características y particularidades han sido mantenidas en la Colección JIMENEZ COLLADO que hemos estudiado, conjuntamente con la precisión en la diferenciación de determinadas estructuras, órganos y formaciones: invaginación de la copa óptica, presencia de la placoda cristaliniiana, septación cardiaca, procesos de condricificación y osificación... estableciendo los PUNTOS REFERENCIALES para definir lo más preciso el Estadio, tal y como consideramos en estos cortes histológicos.



Embrión humano 15 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 19 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PROTOCOLO I

4ª semana postovulación

Embriones Humanos de los Estadios 10-13 CARNEGIE

ESTADIO 10 CARNEGIE



Embrión 3 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión 7 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

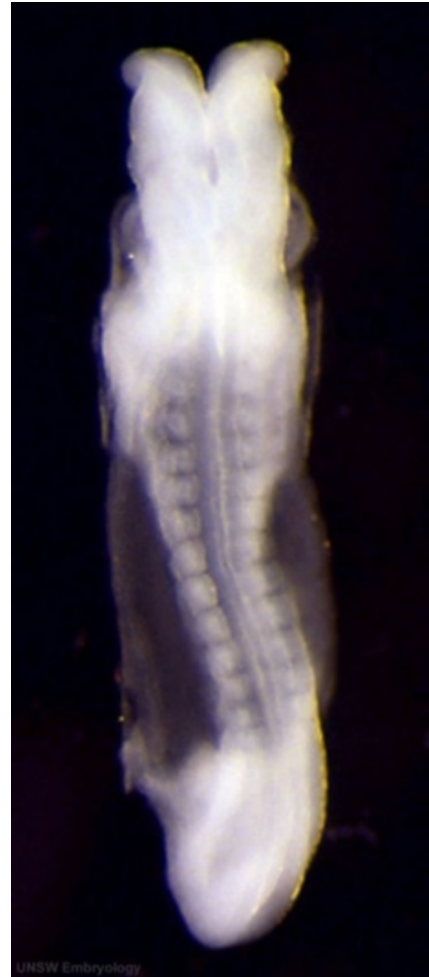
1. Aproximadamente 1,5 a 3 mm., 22±1 día postovulación
2. El embrión presenta forma de reloj de arena; la porción somítica o central ya cerrada, da origen al tubo neural, a diferencia de los extremos en los que persiste el surco. HEUSER y CORNER 1957. JIMENEZ COLLADO 1963.
3. El canal neuroentérico suele estar aún abierto.
4. Citológicamente se distingue mesodermo para-axial y placa lateral-somatopleura.

5. El segundo arco aórtico está ya presente.
6. Tubo cardiaco incurvado en S en el que se ha diferenciado mioepicardio y jalea acelular de DAVIES.
7. Esbozo de placoda ótica.
8. Son visibles los esbozos de los dos primeros arcos faríngeo-branquiales.
9. La cavidad celómica se continúa con el celoma extraembrionario.
10. Se establece el surco laringotraqueal.
11. El cordón nefrogénico se diferencia a partir del mesodermo intermedio.
12. CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS:
 - Este estadio es particularmente importante por cuanto durante el mismo, el tubo neural comienza su formación a partir de los pliegues y surco; por ello en los embriones más jóvenes de este estadio se mantiene el surco abierto en toda su extensión para al final de la etapa progresivamente irse cerrando a partir de romboencéfalo.
 - En este estadio el Nudo Primitivo se sitúa a nivel de la porta anterior. HEUSER y CORNER, 1957; zona en la que densas células situadas axialmente son interpretadas como porción notocordal.
 - La longitud media de un somito es de 80 micras, MULLER y O'RAHILLY, 1958; se sigue manteniendo la estructura somatocélica así como una mayor presencia a nivel del ángulo ventro medial del somito.
 - Rostral al canal neuroentérico, la placa notocordal está en continuidad con el endodermo así como con la membrana basal; la placa precordal está dispuesta caudal a la porción rostral del prosencéfalo, disposición que para GILBERT, 1953 puede ser considerada y admitida como fuente de la musculatura extrínseca ocular, JIMENEZ COLLADO, 1981.

ESTADIO 11 CARNEGIE



Embrión humano 12 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 17 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 2,5 a 4,5 mm., 24±1 día postovulación
2. El embrión presenta la curvatura o ensilladura dorso-lumbar.
3. Pueden distinguirse por transiluminación los somitos occipitales y torácicos.
4. Es marcado el relieve del saco pericárdico bajo el polo cefálico.
5. El neuroporo craneal está cerrado.
6. Se observan por vez primera la presencia de neuromeros.

7. La evaginación óptica entra en contacto con el ectodermo.
8. Fragmentación del mesocardio dorsal.
9. Trabeculización cardíaca. Se inicia la fase de septación diferenciándose el septum intermedium. JIMENEZ COLLADO 1959.
10. Ruptura de la membrana buco-faríngea de HOSFRETTER.
11. Esbozo hepático en septum transversum.
12. Los esbozos pulmonares en fase glandular.
13. Se inicia la diferenciación del canal mesonefrítico de WOLFF.
14. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - La fusión de los pliegues neurales se ha extendido rostral a mesencéfalo, con lo que la delimitación y cierre del neuroporo craneal es el hecho determinativo de este estadio.
 - El primer somito es tal vez el menor en tamaño y celularidad, se encuentra situado caudal a la cresta neuro-vagal a la vez, numerosas figuras mitóticas indican el comienzo de su transformación y área de inervación del hipogloso.
 - Cuatro pares de somitos se consideran como región occipital aunque sólo la presencia de la cresta neural puede ser definitoria para distinguir ésta de la región cervical, placa precordial.
 - El tiempo medio para la formación o definición de un par de somitos es de 6,6 horas, MULLER-O'RAHILLY, 1986.
 - El tubo cardíaco en principio estructuralmente formado por endocardio, inicia un proceso de recubrimiento por mioepicardio; desde este momento se observa en su luz células mesodérmicas, por lo que podemos considerar que se ha iniciado circulación, JIMENEZ COLLADO, 1953-1987.
 - Se define la placa notocordal; presenta un doble sistema estructural, parte a partir de la placa rostral al canal neuroentérico y parte de la condensación axial invaginada por línea primitiva, GILBERT, 1957.

ESTADIO 12 CARNEGIE



Embrión humano 20 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 27 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 3 a 5 mm., 26 ± 1 días postovulación, 21-29 pares de somitos
2. El embrión presenta una marcada ensilladura dorso-lumbar característica.
3. La longitud de estos embriones, está condicionada por la ensilladura y su posible modificación por las técnicas de fijación.

4. Son visibles tres arcos faríngeo-branquiales, esbozándose el sinus cervical.
5. Clara presencia de la dilatación vesicular óptica.
6. El tubo nervioso está completamente cerrado, diferenciándose el rodete romboencefálico.
7. El 3° arco aórtico es visible.
8. Se establece el septum primum iniciándose el septum interventricular, JIMENEZ COLLADO, 1963.
9. Se ha diferenciado estómago y páncreas dorsal a la vez que la masa hepática aumenta considerablemente.
10. Los esbozos pulmonares están aún en la fase glandular; el surco traqueo-esofágico entra en fase de ruptura.
11. El conducto mesonéfrico se aproxima y establece contacto con la cloaca.
12. Se observa el esbozo del miembro superior como débil relieve ectodérmico a nivel de los somitos 8 a 10. MULLER-O'RAHILLY, 1986.
13. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - El número de somitos es difícil precisar histológicamente por cuanto el primero está en plena fase de estallido celular contribuyendo a la definición del área nervio Hipogloso.
 - Se establecen tres arcos faringo-branquiales así como la presencia de sus tres membranas, dividiéndose en porciones ventral y dorsal.
 - a. El anillo ectodérmico descrito por SCHMITT, 1898, se ha estructurado en seis porciones: porción rostral, faríngea, occipital y cérvico-torácica, correspondiente a miembro, porción intermedia y caudal. BLECHSCHMIDT, 1948.

ESTADIO 13 CARNEGIE



Embrión humano 30 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 30 pares de somitos
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 4 a 6 mm., 28 ± 1 días postovulación, 30 ó más pares de somitos; en ocasiones y de forma excepcional se han descrito 35 y 36 pares. CORNER, 1929.
2. Final de periodo somítico.
3. El sistema nervioso central es el principal determinante de la forma embrionaria.
4. A nivel dorsal, en el tubo nervioso se distinguen tres niveles: ependimario, manto y marginal.
5. La placoda cristaliniiana es identificable.

6. La vesícula ótica se aísla y desplaza a superficie.
7. Desaparece el primer arco aórtico, iniciándose por fases el cuarto y sexto.
8. El esbozo glandular tiroideo es visible a nivel bucal –foramen coecum- en su trayecto, -ductus tiroglossus-.
9. Se diferencian los bronquios primarios.
10. A nivel cardiaco se establece el vestíbulo aórtico del ventrículo izquierdo, el conus arteriosus del ventrículo derecho así como aorta ascendente y tronco pulmonar.
11. Se diferencia páncreas ventral.
12. Esófago aislado e independiente de tráquea.
13. La presencia de los cuatro esbozos de miembro caracterizan este estadio. Mejor definidos los superiores, mientras que los inferiores, discretos relieves, se continúan caudalmente con el engrosamiento epitelial de la membrana cloacal.
14. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - Los miembros establecidos por mesénquima indiferenciado, aparecen envueltos por una lámina continua monoestratificada de ectodermo; sólo en los especímenes mayores de este estadio se esboza una ligera condensación apical.
 - Frente al otocisto, se localiza el ganglio vestibulo-facial, el ganglio trigémino es visible a nivel del ángulo pontino.
 - Las cavidades cardiacas en los especímenes fijados en formol, aparecen distendidas, con elementos en su luz, por lo que el corazón en conjunto, es marcadamente prominente.
 - La masa hepática es mayor, su volumen junto con el cardiaco, es prácticamente igual al del polo cefálico embrionario.
 - La notocorda finaliza a nivel de la porción basilar, JIMENEZ COLLADO, 1971.

EMBRIONES DE LA 4ª SEMANA

En los embriones más jóvenes de la cuarta semana, 2 a 2,3 mm., estadios 10 y 11 CARNEGIE en las series histológicas, Figs. 1 y 2, se observa la presen-



Fig. 1

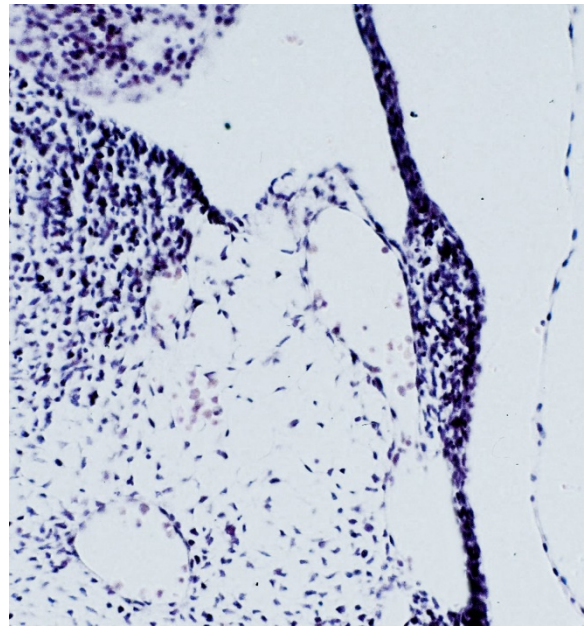


Fig. 2

cia de un acúmulo de mesénquima somatopleural avascular a modo de semiluna en la porción latero-medial del cuerpo embrionario no segmentado, situado en el tercio superior de la superficie de la pared corporal que interpretamos como esbozo de la plataforma de origen del futuro miembro superior, nivel 7-8º somitos, cubierta por una lámina continua monoestratificada de epitelio ectodérmico de superficie que en un embrión pocas horas más avanzado, es más evidente a la vez que permite observar la presencia de nidos vasculares, Figs. 3-4.



Fig. 3

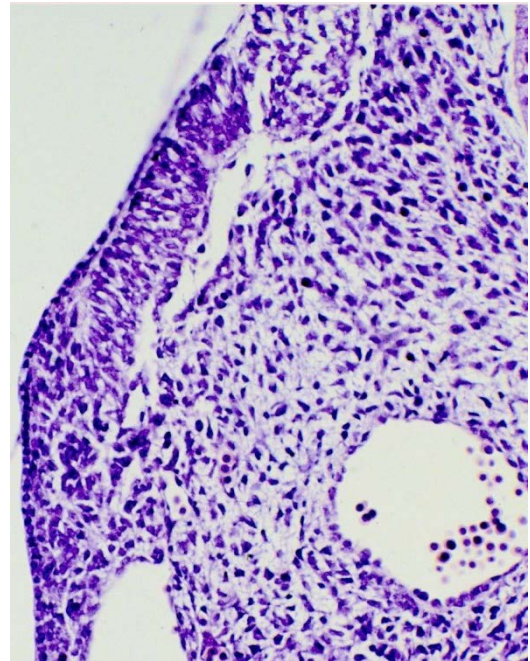


Fig. 4

En secciones frontales a nivel medio notocordal, observamos en estos dos estadios claramente, Fig. 5, como se alinean los somitos parcialmente seccionados, en fase de estallido celular, separados de la plataforma o área que hemos interpretado como superficie base del inicial proceso diferenciativo del miembro superior. La presencia de este espacio que separa somatopleura y emigración mesenquimal del somito, nos hace considerar que hasta este momento, el esbozo se ha



Fig. 5

diferenciado y es dependiente en su organización a mesénquima somatopleural, que al final de este estadio, se va completando secuencialmente con el mesénquima somático, que si bien modifica en conjunto la morfología del esbozo, mantiene, Figs. 6-7 y 8, dos características hasta ahora inexistentes: la no diferenciación del contenido mesenquimal y la continuidad de la lámina ectodérmica que lo cubre conjuntamente con un pequeño número de nidos vasculares aislados y sin conexión.

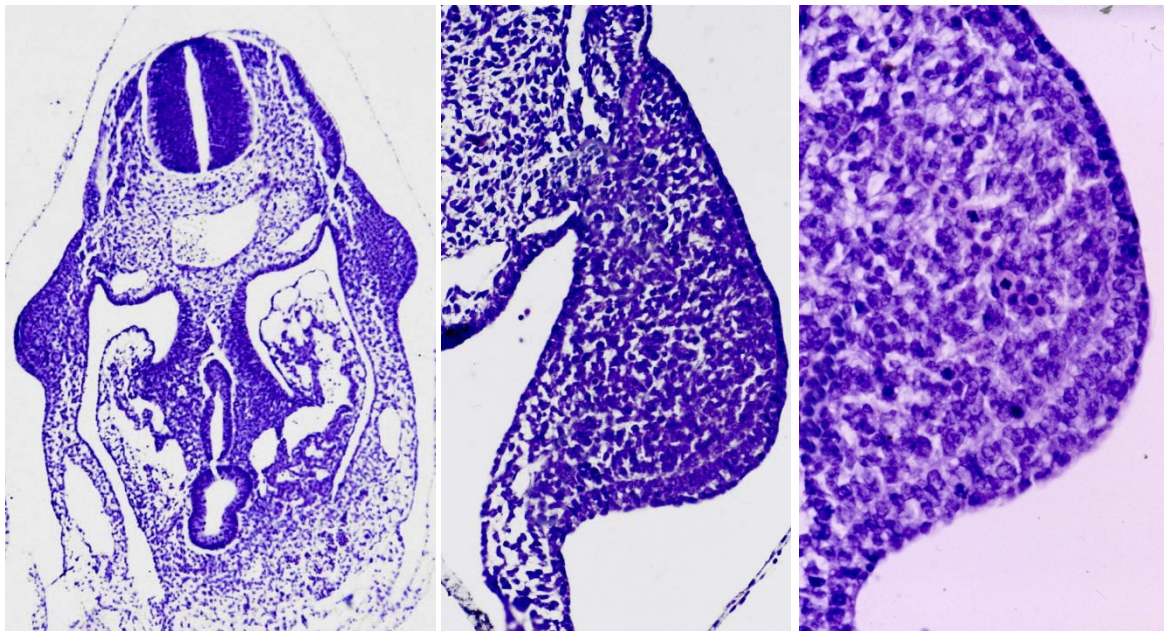


Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Un poco más avanzado el desarrollo en este mismo estadio 11 CARNEGIE, el esbozo de miembro superior, Figs. 9 y 10 ha aumentado de volumen, haciendo ya un evidente relieve en la superficie embrionario, nivel Cresta de WOLFF, embriones de 4 mm., ocupado por el conjunto mesenquimal que mantiene aún su grado de indiferenciación estructural, observamos como el ectodermo de superficie que lo cubre, presenta un aumento en su celularidad así como una irregularidad en su delaminación al estar más aumentada en su porción ventro-axial.

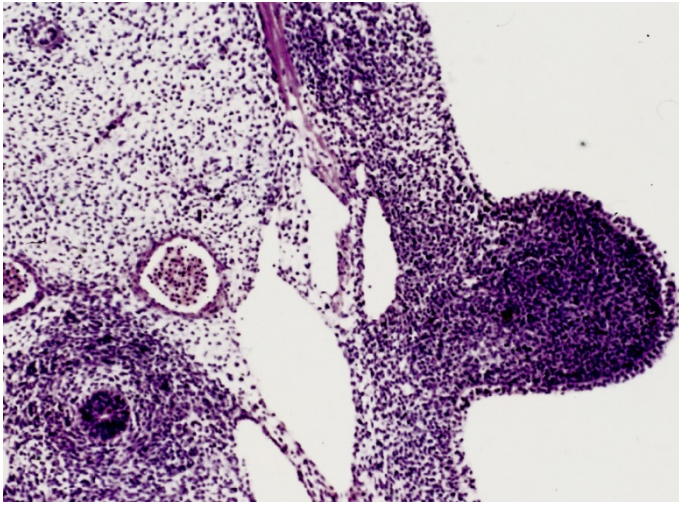


Fig. 9

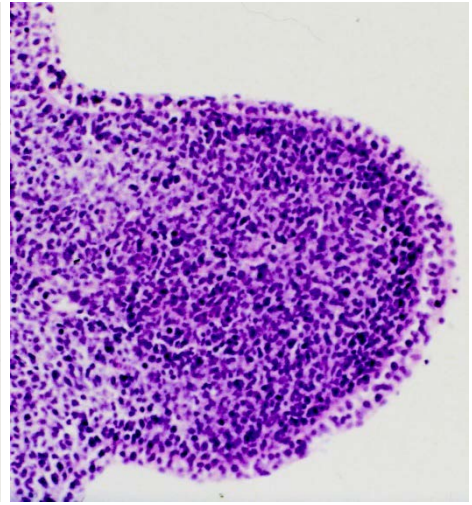


Fig. 10

Conjuntamente con estos mecanismos y modificaciones estructurales o tal vez a ellos dependientes, el esbozo presenta un rápido crecimiento por lo que no solo es mayor su relieve, Figs. 11 y 12, sino que al “limitar” su base de implantación en la Cresta de WOLFF, aumenta en sentido próximo-distal, presentando una morfología columnar irregular, por cuanto va disminuyendo su eje medio-lateral distalmente finalizando agudo.

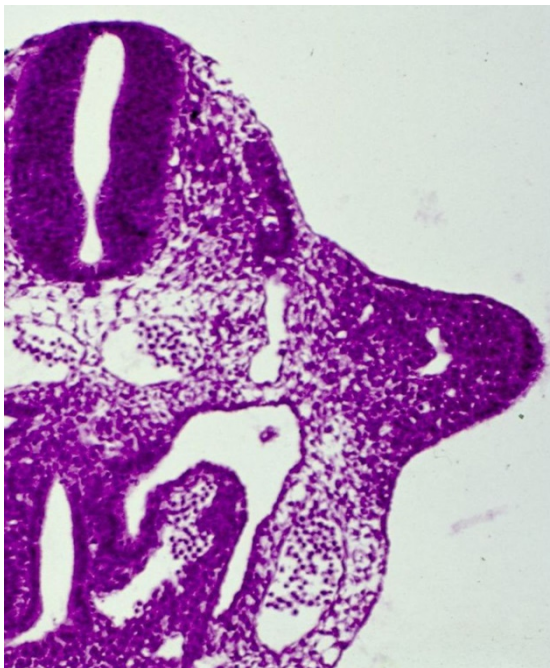


Fig. 11

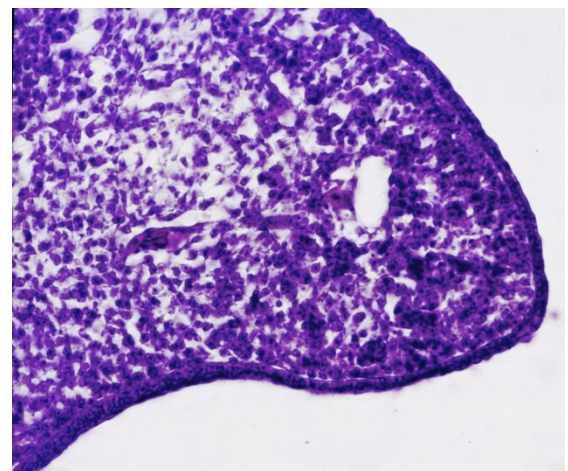


Fig. 12

Es precisamente en esta fase, embriones de 4,5 mm., estadio 12 CARNEGIE, cuando observamos y describimos, Figs. 13-14 y 15, la presencia de numerosas formaciones vasculares, primero aisladas que van rápidamente a contactar, unirse, para formar lagunas vasculares y posteriormente pequeñas y cortas redes de significación venosa que establecen conexión con otras localizadas en la base de implantación somatopleural; como consecuencia de este dispositivo, se diferencia una red vascular de significado venoso que en el extremo distal o apical del esbozo, da origen al seno venoso marginal.

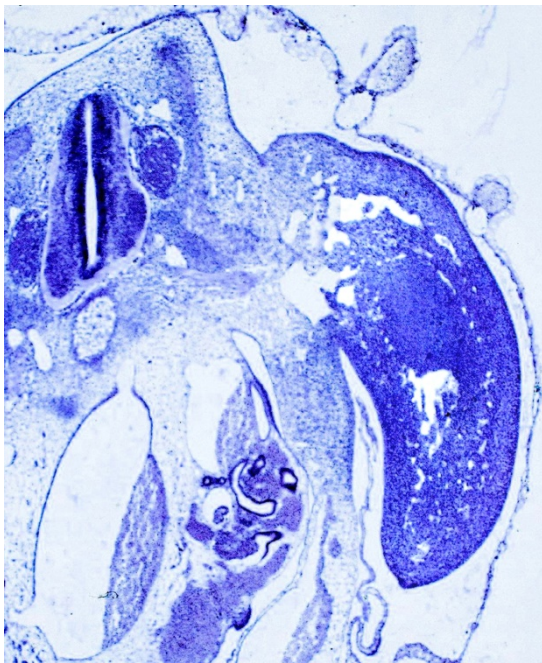


Fig. 13

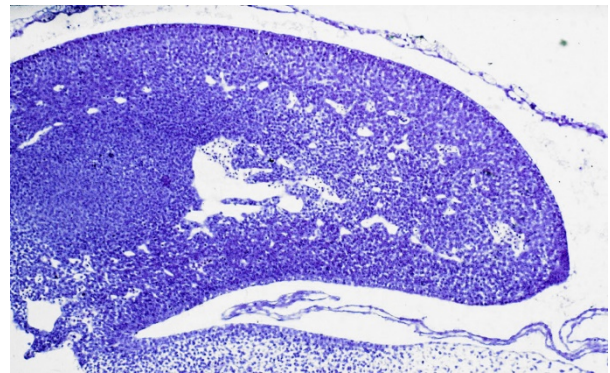


Fig. 14

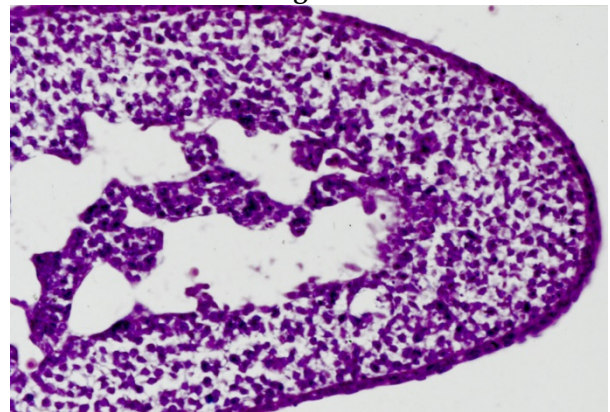


Fig. 15

La presencia de células mesoblásticas como precursoras de la red capilar, considerada y descrita por WOOLARD, originadas y diferenciadas "in situ", ulteriormente se anastomosan con ramitas intersegmentarias que se disponen a modo de canales de drenaje abierto al sistema cardinal; esta "articulación vascular" no interviene aun en la diferenciación de las diversas estructuras del

miembro hasta una vez establecido el sistema venoso, embriones de la 5ª semana.

Simultáneamente con estos mecanismos diferenciativos, se forma un marcado relieve en la superficie latero-dorsal del esbozo que delimita una pequeña depresión, fosa axilar, que se mantiene hasta final de este estadio.

El ectodermo de superficie que ha sufrido un aumento en su celularidad y delaminación, en su porción disto-medial o vértice, Fig. 16, a partir de embriones de 5 mm., estadio 12 CARNEGIE, diferencia al esbozo de la cresta apical de SAUNDERS separada del mesénquima indiferenciado por una limitante avascular.

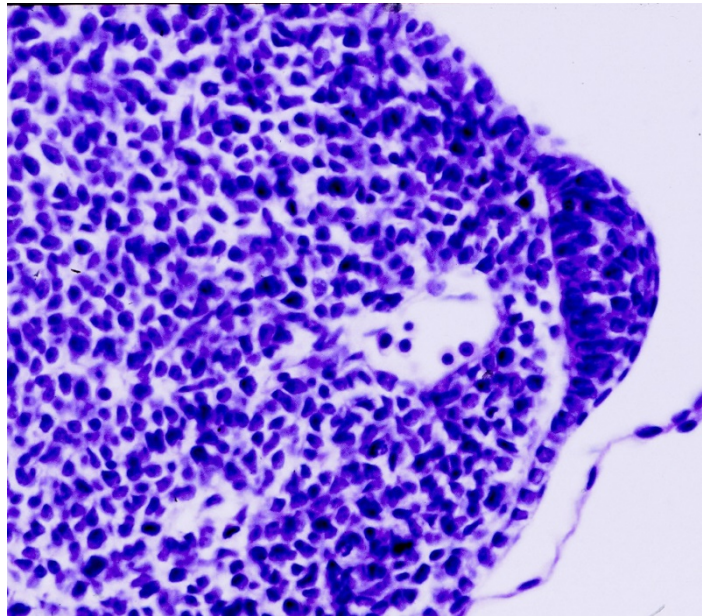


Fig. 16

Conjuntamente con este programado mecanismo diferenciativo, pero no simultáneamente, se establece el miembro inferior, iniciándose en tiempo distinto más avanzado, ya que la presencia en las series histológicas de la condensación mesenquimal, esbozo, se observa y describimos en embriones de más de 5 mm., estadios 12-13 CARNEGIE, nivel 18-21 somitos, Figs. 17-18, cubierto por la lámina monoestratificada uniforme de epitelio, que al final de este estadiaje y al igual que acontecía en el miembro superior, modifica su celularidad y delaminación originando la Cresta Apical de SAUNDERS.

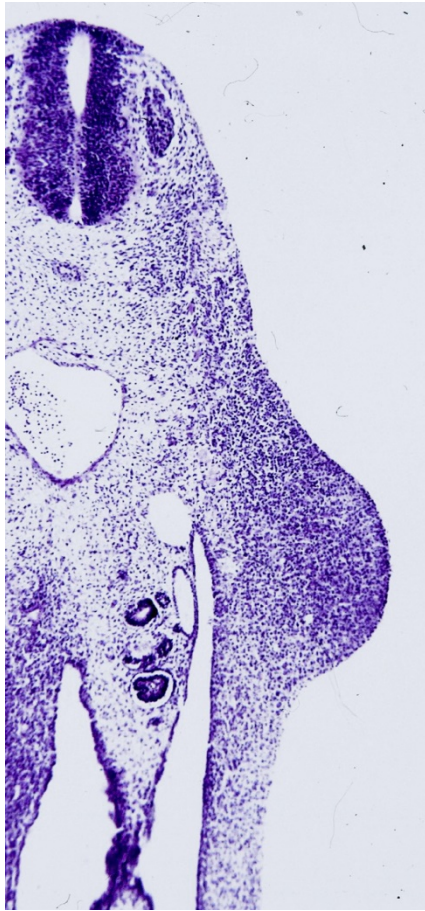


Fig. 17

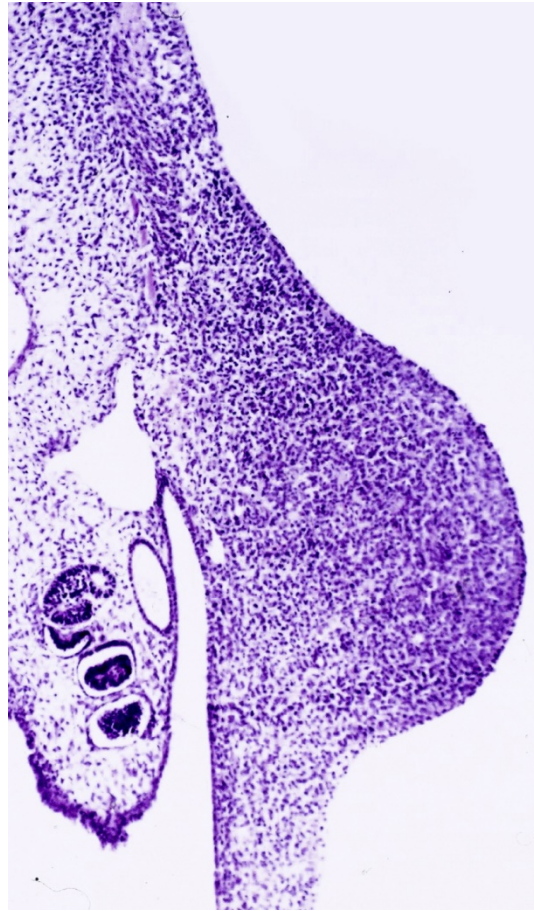


Fig. 18

Hasta final de la cuarta semana, estadio 13 CARNEGIE, el mesénquima que lo rellena y ocupa, si bien recibe o diferencia estructura vascular que formará el seno venoso mantiene la indefinición y uniformidad que observamos en el miembro superior Figs. 19-20 y 21.



Fig. 19



Fig. 20

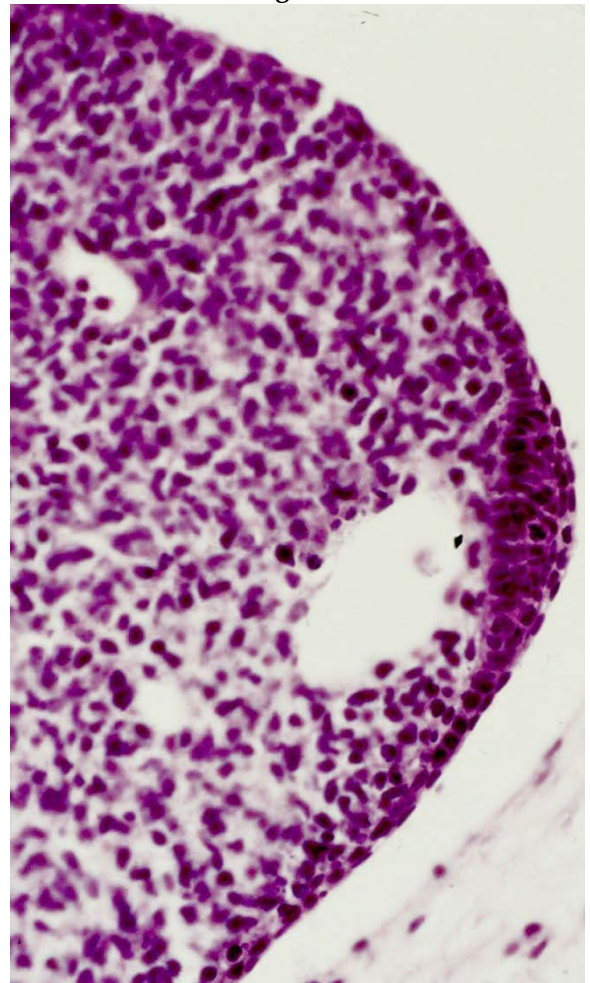


Fig. 21

PROTOCOLO II

5ª semana postovulación

Embriones Humanos de los Estadios 14-15 CARNEGIE

ESTADIO 14



Embrión humano 5,5 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 6,5 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 5 a 7 mm., 32 ± 1 días postovulación
2. Tres arcos faríngeos son constantes a cada lado.
3. La curvatura nual permite distinguir mielencéfalo de metencéfalo.
4. El volumen del polo cefálico, sistema nervioso central, caracteriza la morfología embrionaria. STREETER, 1945.

5. El relieve del saco pericárdico así como el de la masa hepática sobrepasan el diámetro transversal del abdomen.
6. La vesícula ótica ya individualizada y cerrada en la superficie.
7. Se diferencian los cojinetes cardiacos.
8. Los esbozos ureterales contactan con la pars metanefrítica.
9. El esbozo del miembro superior crece en dirección postero-distal, distinguiéndose una cresta ectodérmica en su vértice, así como una arcada vascular marginal. Se esboza la paleta mania.
10. Los esbozos de los miembros están nítidamente diferenciados, sobresaliendo del contorno corporal.
11. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - En algunos embriones de este estadio se observa un desplazamiento de la convexidad dorsal del cerebro y médula espinal a nivel de los somitos 5-6 cervicales que determinan el Nackengrube de HIS.
 - Los esbozos del miembro superior modifican su morfología, por cuanto primero aplanado ahora forma un conjunto redondeado que se ensancha distalmente para formar la placa mania. Estructuralmente el contenido del esbozo muestra cambios diferenciales con estadios anteriores, por cuanto el mesénquima que lo forma modifica estructura y condensación, por la presencia de núcleos densos con aparente regionalización; la presencia de gran número de formaciones vasculares inicia una programación y red vascular. A diferencia, los esbozos de miembro inferior no son comparables ni en forma ni estructura mesenquimal con los miembros superiores.
 - En la mayoría de los embriones, las aurículas están dilatadas y sus paredes endocárdicas delgadas se destacan en contra con los gruesos muros trabeculados mioendocárdicos de los ventrículos.
 - La vesícula cristaliniiana permanece fijada a ectodermo; su morfología y fijación es una de las características de este estadio, PEARSON, 1968.

ESTADIO 15



Embrión humano 7 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 8,5 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. El polo cefálico es voluminoso, habiéndose diferenciado las vesículas diencefálicas.
2. Se establece un modelo facial con la diferenciación de fosas nasales, pars mandibular y maxilar.
3. La epífisis cerebris se diferencia en la porción dorsal encefálica.
4. Es visible el pigmento retiniano así como vítreo.
5. A nivel cardíaco se diferencia el foramen secundum.

6. Recto y ciego enmarcan un bien diferenciado intestino grueso.
7. Se observa la aparición de bronquios secundarios.
8. Los ganglios espinales forman dos columnas regulares laterales, que en los embriones en fases de fijación y pases por alcohol y benzol, tienen la semejanza de bloques somáticos.
9. La cresta mamaria es visible.
10. El miembro superior ya bien diferenciado puede dividirse en porción troncular y distal de la Paleta mania; el miembro inferior menos diferenciado, muestra un aplanamiento que se transforma más tardíamente en paleta pedia.
11. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS. Estructuralmente cinco características caracterizan este Estadio:
 - a. Las vesículas lenticulares contactan por sus bordes, por lo que desaparece la continuidad con el ectodermo de superficie.
 - b. Los discos nasales debido al cada vez mayor crecimiento de las formaciones circundantes, se disponen a modo de formaciones voluminosas deprimidas de morfología oval.
 - c. El arco hioideo se diferencia en segmentos: pars ventral y dorsal.
 - d. Las transformaciones activas, -crecimiento-, que acontecen en el esbozo de los miembros superiores, contribuyen con precisión para identificar este estadio ya que se establece su regionalización en placas distal de mano y media de antebrazo, brazo y base o región de hombro. En la extremidad inferior es menos destacable y avanzada esta regionalización zonular.
 - e. En todos los esbozos de este estadio se han diferenciado grupos y acúmulos de blastema premuscular, ganglios espinales, formaciones vasculares y la presencia libre y plexual de fibras nerviosas.

EMBRIONES DE LA 5ª SEMANA

La 5ª semana, embriones de 5 a 9 mm., estadios 14-15 CARNEGIE presentan un conjunto de caracteres que los hacen específicos en el periodo morfogénico a la vez que diferenciativos y estructural en el mecanismo causal de miembros.

Observamos y describimos como la base de implantación del miembro superior se dispone a nivel de los somitos, 7 a 12, iniciando distalmente un ensanchamiento placodial, futura placa mania, dispuesta básicamente paralela al plano medio-corporal. El mesénquima indiferenciado que ocupa el esbozo que en fases anteriores presentaba uniformidad en su estructura y contenido celular, ahora con mayor o menor intensidad en dependencia a la tinción histológica así como fundamentalmente a la calidad tisular, se desarrollan núcleos y condensaciones celulares, embriones de 5,5 mm, estadio CARNEGIE, al principio aisladas. Figs. 22 y 23, que interpretamos como blasto-esqueléticas, que rápidamente van a relacionarse o estar "limitadas" por formaciones neurales, Figs. 24 y 25.

A la observación macroscópica, si bien ambos miembros están nítidamente diferenciados, la superficie o área de implantación del miembro superior es mayor que la del inferior.



Fig. 22



Fig. 23

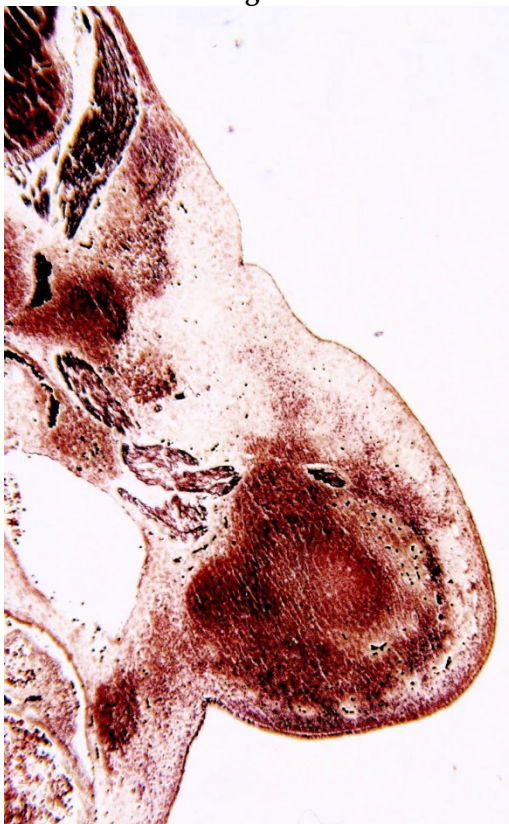


Fig. 24



Fig. 25

La morfología columnar de los esbozos, en los que se mantiene el predominio diferenciativo del miembro superior, adquiere un mayor relieve a la vez que la configuración uniforme columnar la modifica al presentar tres porciones o niveles de proximal a distal que corresponden el primero a la superficie de implantación, la segunda porción conserva en parte sus ejes columnares y una tercera, de menor extensión y superficie que finaliza aplanada, que corresponderá a la futura paleta mania, Figs. 26 y 27, es decir podría interpretarse como basipodo, estilópodo y zigopodo. Entre segunda y tercera porción, se establece más o menos marcado de modo constante a lo largo de estos estadios, una inflexión que algunos interpretan como área futura de codo criterio que nosotros no consideramos.



Fig. 26



Fig. 27

La laminación epitelial que recubre el relieve cada vez mayor de la porción paraaxial, Fig. 26, ventral o flexora, si bien incrementa esta laminación diferencial, se hace ahora más limitada al disponerse como dedal a nivel del ápex o pico del esbozo, para así mejor definir la Cresta Apical de SAUNDER.

De igual modo, a partir de embriones de 7,5 mm, estadio 15, se estructura una basal continua entre superficie interna de la lámina epitelial de recubrimiento y mesénquima, estableciéndose un espacio acelular de importancia por cuanto su ruptura o ausencia da lugar a alteraciones en el blastema condensado así como en el patrón microvascular del mesénquima en contacto.

El esbozo de miembro inferior se observa avanzado el estadio 14, presentando desde su inicio un recubrimiento epitelial más denso en la superficie paraaxial, característica similar a la observada en el miembro superior; su superficie de implantación se sitúa a nivel de los somitos 13-17. El epitelio ectodérmico se continúa con la membrana cloacal o placa anal; previamente de la porción distal o vértice se localiza la Cresta Apical; no obstante, en su conjunto, la morfología del miembro inferior no repite la forma macroscópica de la superior, de tal forma que la mitad distal del esbozo es más estrecha que la mitad rostral.

Para nosotros, en base a nuestras observaciones, tal vez la presencia por primera vez de estructuras fibrilares nerviosas para miembro, sea el hecho definitorio de estos estadios 14-15 CARNEGIE por cuanto observamos y describimos, Figs. 28 y 29, delgadas fibras nerviosas que abordan la base de



Fig. 28



Fig. 29

implantación del miembro, en donde se unen iniciando un corto trayecto por el mesénquima que a partir de este momento, embriones de 5mm, estadio 14, presenta condensaciones celulares, fase o proceso que en especímenes más avanzados, embriones de 8 mm., Figs. 30 y 31, estadio 15 CARNEGIE, forman troncos nerviosos que anastomosándose dan lugar a plexos a dos niveles topográficos: cérvico-torácico y lumbo-sacro en la base de implantación somatopleural, que al principio no la sobrepasan para más avanzado este este estadio 15 se independizan nervios que ya en el interior del esbozo "delimitan" por contigüidad, Figs. 32-33 y 34, las condensaciones antes interpretadas como anlagen o blastemas mio-esqueléticos.

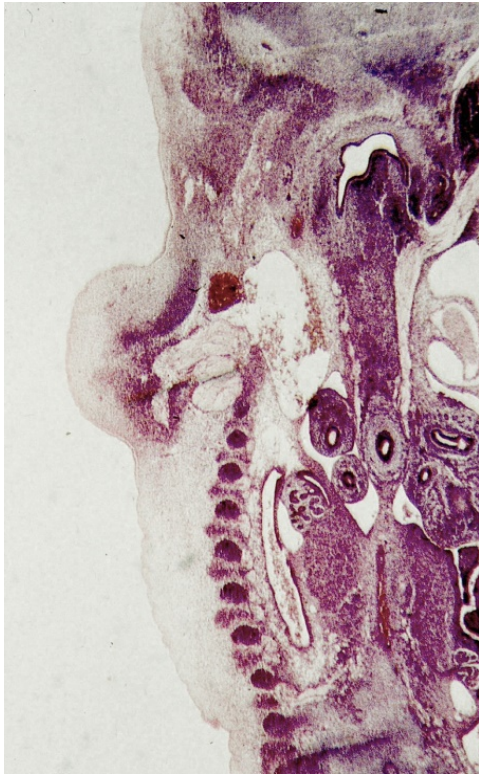


Fig. 30

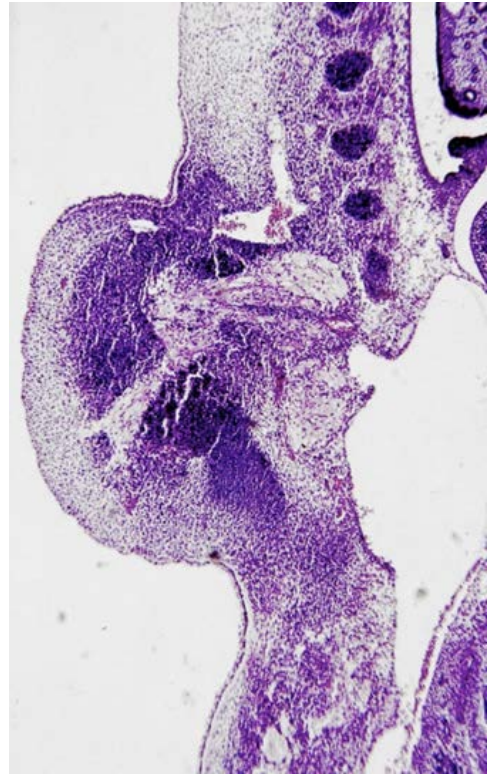


Fig. 31

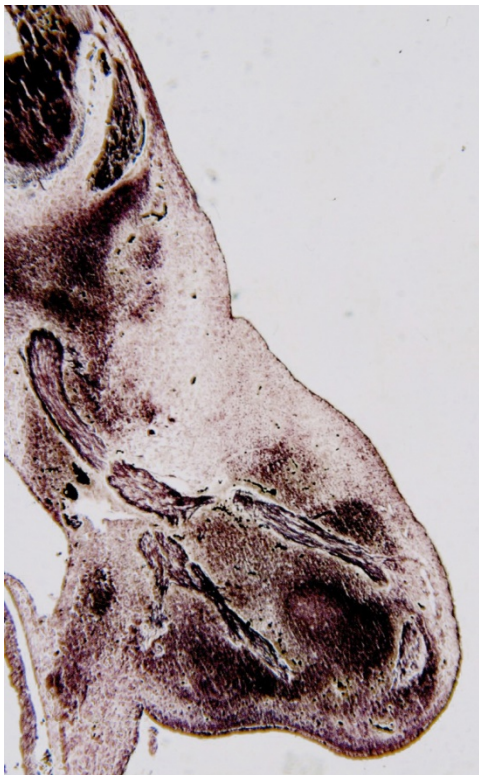


Fig. 32

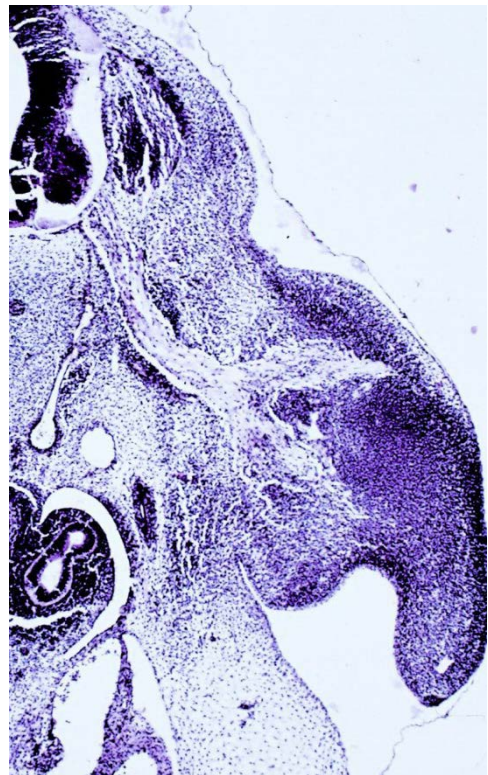


Fig. 33



Fig. 34

Consideramos el carácter neural determinante a modo inductor de esta diferenciación y disposición así como en su posible mecanismo morfodiferenciador de los núcleos mesenquimales, por cuanto a partir de este periodo su ausencia condiciona que el proceso diferenciativo mesodérmico no se inicia o interrumpe y aún menos, se establece.

La presencia de formaciones vasculares ha aumentado, disponiéndose ahora en el miembro superior a modo de irregular red que en embriones de 9 mm, estadio 15 CARNEGIE, definen la Arteria Recta o Central de VON PAPE, que en su establecimiento presenta numerosas anastomosis con ramitas procedentes del área somítica ya muy diferenciada, Fig. 34.

Un vaso marginal tanto en el miembro superior como inferior puede ser reconocido iniciándose, que en estadios más avanzados, sexta semana, embriones de 12-13 mm., estadio 17 CARNEGIE, ya se observa con frecuencia sobre todo cuando el embrión es fijado en Gails frio y Peróxido (Fig. 34b).



Fig. 34b

El relieve que se establece entre origen de miembro superior e inferior limita una porción no segmentada de la línea o Cresta Somatopleural de WOLFF, que no interviene en la diferenciación "propia" de miembro ya que interpretamos dará origen a la musculatura de la pared corporal latero-ventral.

PROTOCOLO III

(6^a semana postovulación)

Embriones Humanos de los Estadios 16 y 17 CARNEGIE

ESTADIO 16



Embrión humano 9 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 10,5 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 8 a 12 mm., 37 ± 1 días postovulación.
2. El embrión se caracteriza por un aumento transversal del contenido toraco-abdominal así como a nivel de la región mesencefálica.
3. El plexo braquial presenta un molde casi definitivo en su formación radicular.
4. Hipófisis y cuerpos mamilares presentan un elevado grado diferenciativo.

5. El pedículo óptico se individualiza a la vez que la fisura retiniana comienza a fusionarse.
6. Los cojinetes atrio-ventriculares dorsal y ventro-medial se fusionan para completar la septación bulbo-ventricular.
7. Páncreas ventral y dorsal se fusionan.
8. El metanefros aún se mantiene situado a nivel sacro.
9. El septum urogenital se observa a modo de lámina septal ventro medial.
10. Se diferencia oído externo y tubérculos auriculares.
11. Se diferencian los canales paramesonefríticos de MÜLLER.
12. Paladar primario, valvas verticales posicionalmente.
13. En el miembro superior, condensaciones mesenquimales esbozan humero, cubito y radio, iniciando el proceso de condricificación humeral así como la definición de masas premusculares. En el miembro inferior se observa la presencia de tres condensaciones esbozo de cadera, pierna y pie.
14. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - a. Las regiones mesencefálicas y tálamo presentan un mayor aumento en celularidad por lo que destacan por su volumen.
 - b. El pigmento de la capa externa de la retina adquiere presencia y regularidad definida.
 - c. El esbozo del miembro inferior presenta comparativamente con el superior un mayor crecimiento aunque mantiene sus propias características diferenciales, la placa pedia difícilmente existente.
 - d. El mesénquima del polo cefálico presenta tanto citológicamente como potencial caracteres específicos, por cuanto gran parte de él es derivado de la cresta neural así como de la placoda precordial, GILBERT, 1957, JIMÉNEZ COLLADO, 2004-2014.

ESTADIO 17



Embrión humano 11,5 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 13 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 11 a 14 mm., 41 ± 1 días postovulación.
2. La mayoría de los ramos dorsales de los nervios espinales están diferenciados; los nervios mediano, radial y el esbozo del ulnar pueden describirse junto a masas en fase de diferenciación miogénica.
3. Esbozo de canales semicirculares.
4. A nivel cardiaco el foramen primun se cierra previa a la presencia del foramen secundum. ORTS LLORCA, 1965, estableciéndose los canales atrioventriculares derecho e izquierdo ya separados.

5. El apéndice cecal puede observarse conjuntamente con el desplazamiento del intestino grueso ascendente.
6. A nivel laríngeo aparecen diferenciados epiglotis, cricoides así como ya formado el vestíbulo laríngeo.
7. En el sinus urogenital se diferencia una porción pelviana que forma el canal vesico-uretral y otra fálica o seno urogenital propiamente dicho.
8. Diferenciación y patrones formativos de cuerpo vertebral y discos intervertebrales; se inicia el proceso de condricación a nivel del centrum vertebral y basioccipital.
9. A nivel de la extremidad superior se establece la fase de condricación en húmero y radio, mientras que en el inferior, solo es marcada para fémur.
10. En el miembro superior, a nivel de la paleta se describen los radios digitales y sus distintas porciones y flexuras, mientras que en el miembro inferior solo describimos condensaciones sin definida morfología mesenquimatosas que moldean fémur, tibia así como blastemas premusculares de igual modo no definidos.

11. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

- a. Los relieves o montículos auriculares constan de seis condensaciones superficiales, tres en el arco mandibular y tres en el hioideo; estos últimos más prominentes formaran el pabellón auditivo externo.
- b. Los procesos palatinos se mantienen aún verticales y en el espacio por ellos delimitado se sitúa caudal el esbozo muscular lingual.
- c. Los centros vertebrales han aumentado su proceso de condricación; el arco neural inicia el proceso de cierre por una lámina fibrosa, lámina reúnen, ENSENIG, 1949.
- d. Proceso de condricación a nivel de condrocráneo, BLECHSCHMIDT, 1963.

EMBRIONES DE LA 6ª SEMANA

Tal vez, una de las características que definen a los embriones de este Protocolo, sexta semana, es la presencia de acúmulos blastemáticos derivados de la “segregación más que división” de los bloques de mesénquima relacionados con formaciones neurales que nos permiten observar masas musculares y sobre todo, blastemas condrogénos mejor diferenciados, que describimos en estadios precoces, embriones de 8 mm. , Figs. 35 y 36.

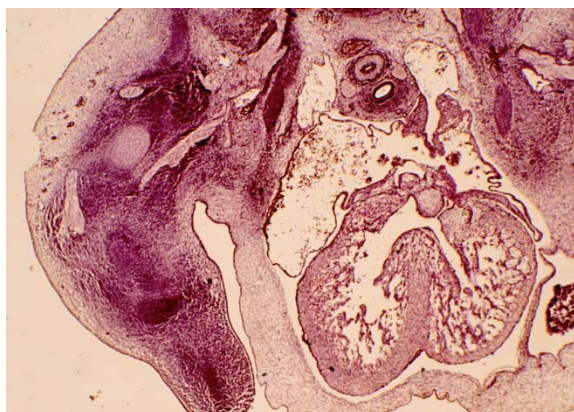


Fig. 35

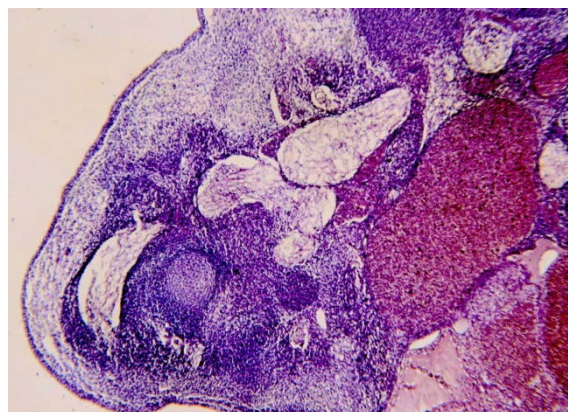


Fig. 36

Esta íntima relación y posible dependencia diferenciadora, si bien se inicia en los embriones más jóvenes, se mantiene durante un largo periodo, por cuanto la organización blastemática condral es patrón morfológico constante al establecerse la presencia de fibra nerviosa posiblemente como “inductor o codificador condrogénico”.

Es por ello constante que la condrogénesis de las porciones distales del miembro, inicien su proceso diferenciador más tardíamente, esto es, una vez establecida la presencia neuronal, difícil de objetivar, solo posible en secuencia cuando es estudiado el esbozo del miembro “in toto” o bien cuando el análisis histológico y su interpretación se establece seriadamente.

En los embriones más jóvenes, 8,2 mm., estadio 16 CARNEGIE, se observa un aumento de volumen así como en la superficie de la porción distal de los miembros, inicio de la presencia de placas y radios digitales, sobre todo a nivel

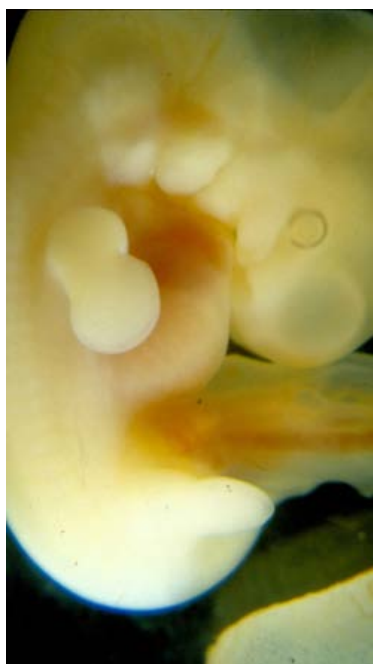


Fig. 37



Fig. 38

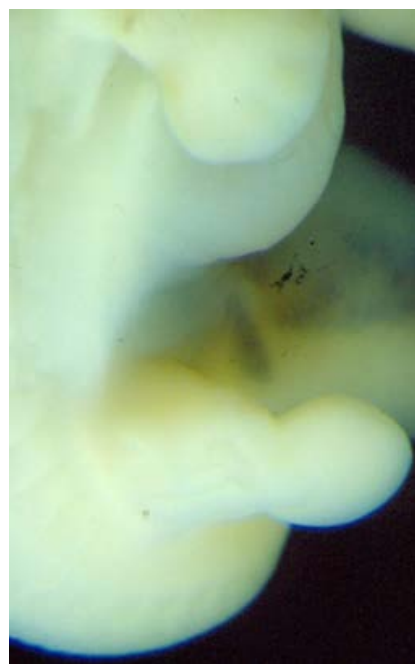


Fig. 39

de miembro superior, formaciones cubiertas por una fina lámina epiblastica continua en la que no es posible observar la presencia de la Cresta de



Fig. 40

SAUNDERS, disposición ésta característica en el miembro superior ya que en el inferior, el mesénquima que lo ocupa presenta la laminación epitelial crestal sí como el seno venoso marginal, Figs. 37, 38, 39 y 40.

La cresta apical presente y descrita a partir del estadio 16 CARNEGIE, se mantiene en los estadios de este Protocolo, aunque en

embriones al final del estadio 17, va disminuyendo por lo que sobre todo en el miembro superior es frecuentemente difícil identificar, al contrario que en el miembro inferior que se mantiene de manera clara y continua, Figs. 41, 42, 43 y 44.

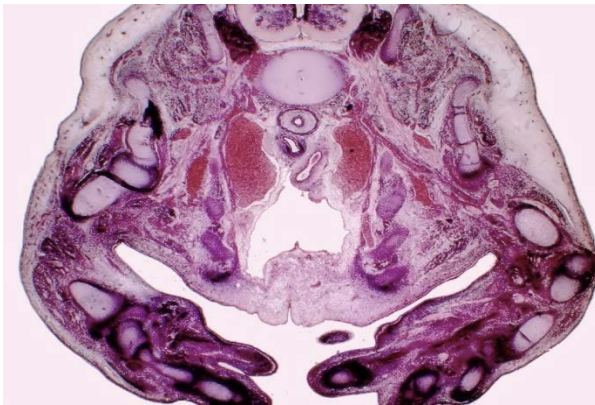


Fig. 41

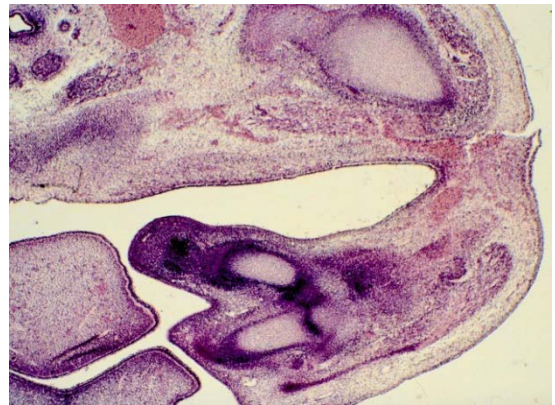


Fig. 42



Fig. 43



Fig. 44

Los acúmulos plexurales formados en estadios anteriores estructurados y definidos como cervico-braquial, Fig. 45, radicularmente a partir de C4-T1 y



Fig. 45

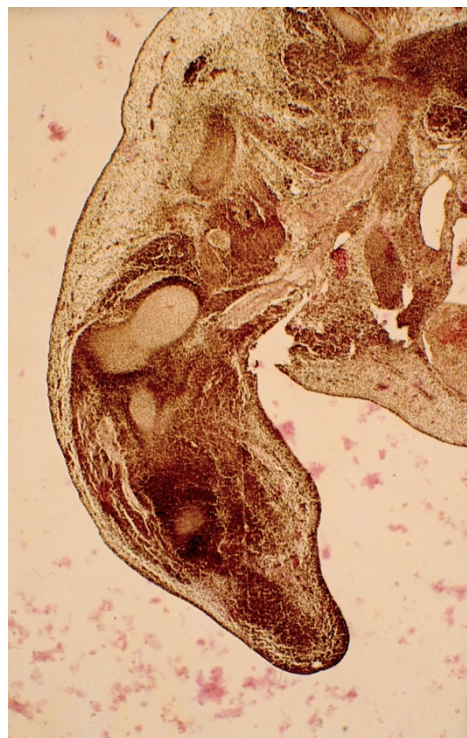


Fig. 46

lumbo-sacro, Fig. 46, L5-S2, localizados a nivel de la superficie de implantación del miembro y orientados perpendicularmente al plano medio sagital, presentan dos características comunes: sobrepasan la condensación mesenquimal somato-pleural a la vez que orientan su trayectoria al eje próximo-distal del miembro, en el que ya es posible describir formaciones nerviosas fibrilares relacionadas y en contacto con condensaciones blastemáticas condrales más y mejor estructuradas.

Topográficamente pueden identificarse como radial, mediano y cubital que finalizan próximos a la placa mania, mientras que en el miembro inferior son por el contrario menos marcados nervios isquiático y obturador, ambos de corto recorriendo.

Es en embriones de 10,5 mm., cuando observamos y describimos en el miembro superior los blastemas que interpretamos como húmero y menos marcados y muy parcialmente como radio en su tercio proximal, Fig. 47, y ya más avanza-



Fig. 47



Fig. 48

do el estadio, embriones de 12,5 mm., es posible hacerlo en el miembro inferior a fémur y tibia, también está solo proximalmente, Fig. 48, formaciones que en conjunto su identificación en un solo plano es difícil, prácticamente no posible, por cuanto la orientación normal al modificar y adaptarse su forma y volumen del cuerpo en un único plano en su orientación para miembros, en los planos de sección e iconografía original que presentamos es compleja; no obstante es posible observar la presencia de interzonas articulares e incluso interpretar en ellas inicio de cápsula y refuerzos capsulares ligamentarios en niveles que establecerán áreas articulares, Fig. 49.



Fig. 49

La laminación epitelial que establece la Cresta Apical de SAUNDERS, se observa débilmente en el epitelio de la superficie epiaxial de la placa mania a nivel del extremo de los radios digitales, disminuyendo e incluso prácticamente anulándose en la porción o superficie laminar interdigital que separa y diferencia el esbozo aparecido unitario presente en embriones de 13 mm, estadio 17 CARNEGIE. En la placa pedia por el contrario, al ser menor y tardía comparativamente su diferenciación, se mantiene la cresta como condensación y relieve único en la superficie distal del

miembro a lo largo de su borde post-axial así como la cuña o dedal típico crestario, caracteres dependiente a la asincronía diferenciadora entre ambos miembros.

Morfológicamente y como carácter diferenciador en los embriones de este Protocolo, las placas mania y pedia ya definidas y aparecidas en su práctica totalidad, presentan características no comunes, por cuanto si bien aumentan en volumen la porción distal del miembro, la correspondiente a miembro superior, adquiere y mantiene una morfología aplanada de amplia superficie tanto dorsal como ventral mientras que la inferior, placa pedia, se dispone irregularmente cilíndrica finalizando prácticamente en pico.

Esta morfología que es característica, se mantiene un corto periodo, por cuanto al final del estadio 17, va progresivamente modificándose por un mayor y más rápido proceso de alineación sobre todo en el miembro inferior.

Estructuralmente por el contrario, se mantiene, siendo esta una característica constante en su estadiaje embrionario.

Las porciones distales en esta fase, compuestas por mesénquima condensado, se alinea con una masa blastemática de la que se originan prolongaciones digitales, en ocasiones cortas. En el estadio 17, final de este Protocolo, es típico la condricificación del 2º metacarpiano, frecuentemente del 3º y 4º así como pequeños acúmulos correspondientes a futuros huesecillos carpianos: grande y ganchoso; en el miembro inferior, placa pedia, una condensación blastemática avascular, va definiendo la presencia de elementos del tarso, en especial de astrágalo y 2º y 3º metatarsiano.



Fig. 50

En embriones de 13-14 mm se distinguen aisladas y próximas a los ya diferenciados acúmulos blastemáticos condrales, Fig. 50, masas musculares a las que le llegan formaciones neurales, cada vez mejor ordenadas en su estructura que establecen un gradiente de territorialidad topográfica prácticamente definitivo.

Los nidos vasculares que se observan y localizan en el conjunto mesenquimal del miembro, inician una fase troncular, compleja en su ordenamiento y proximidad a nervios, estableciendo un patrón vasculo-neural que interviene en

el modelaje funcional y estructural del miembro, Fig. 51.

Fundamentalmente y en su conjunto, los embriones que integran este Protocolo presentan como caracteres específicos en el desarrollo del miembro, la estruc-

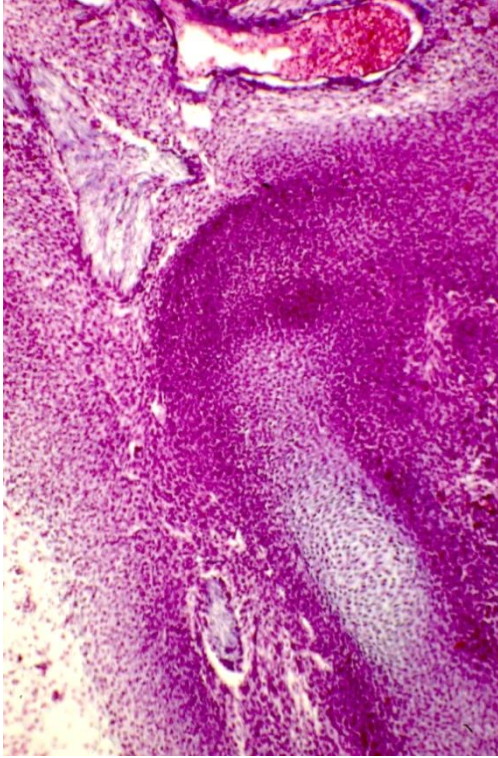


Fig. 50

turación condral ya típica al final del estadio 17 de CARNEGIE de formaciones tronculares, con la definición y presencia de elementos osteogénicos definidos: húmero, radio, fémur y tibia así como carpianas y tarsiana en continuidad con metacarpo y metatarso, área distal que en su conjunto presenta y mantiene diferente grado de especificidad diferenciadora.

PROTOCOLO IV

(7^a semana postovulación)

Embriones Humanos de los Estadios 18 y 19 CARNEGIE

A partir de embriones de 14 mm hasta el final del Periodo Embrionario, embriones de 30-31 mm., séptima a octava semana postovulación, estadios 18 a 23 CARNEGIE, presentan característica específica y selectiva común a la vez que fundamental: las condensaciones o acúmulos blastemáticos miocondrales descritos con especificidad para cada estadio, se han diferenciado, -“madurado”-, a cartílago, incluso algunos al final, próximos ya al Periodo Fetal, inician la modulación osteogénica. O’RAHILLY, 1972.

Por ello, en estos últimos estadios vamos a reflejar algunas de las formaciones esclerotópicas, describiendo aquellas que con carácter “típico de horario morfogénico” presentan mayor especificidad, pero sin entrar en el análisis y estudio selectivo de las mismas.

ESTADIO 18



Embrión humano 14 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 17 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 13 a 18 mm., 44±1 día postovulación
2. En los embriones de la 7ª semana es obligado para una exacta catalogación embrionaria el estudio de cortes histológicos a diversos niveles y planos.
3. Las curvaturas cervical y lumbar son netas.
4. Los ganglios espinales se localizan en los orificios intervertebrales.
5. Los núcleos y origen aparente de los pares craneales son prácticamente idénticos a los del adulto.
6. Están formados los plexos coroideos de los ventrículos laterales.

7. Se diferencia el órgano vomeronasal de JACOBSON.
8. Esbozo de córnea.
9. Se han diferenciado 1 a 3 canales semicirculares.
10. El corazón presenta cuatro cámaras, se diferencia el septum secundum, obliterándose el foramen interventricular.
11. Se originan las arterias coronarias. JIMÉNEZ COLLADO 1992.
12. Presencia de cartílagos tiroideo y traqueales.
13. Presencia de musculatura laríngea aún en fase inicial.
14. Los bronquios segmentarios se individualizan.
15. En el miembro superior se visualizan los radios digitales en la paleta, a la vez que los procesos de condricación lo hacen a nivel de cabeza humeral, carpo y falanges proximales.
16. Se establecen los puntos de osificación de la clavícula.
17. Se establece el área articular del codo.
18. En el miembro inferior, menos desarrollado, sin embargo el proceso de condricación se localiza en fémur, tibia, fibula y tarso.
19. En áreas mesenquimales próximas a metanefros, las ampollas de los túbulos colectores permanecen indiferenciadas.

ESTADIO 19



Embrión humano 14 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



Embrión humano 18 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 17 a 20 mm., 48 ± 1 día postovulación
2. El tronco se endereza, por lo que la ensilladura lumbar no es visible.
3. Desarrollo de los párpados.
4. El pabellón auditivo externo es visible.
5. Presencia del sistema ganglionar parasimpático-craneal.
6. Bulbo olfatorio individualizado.
7. Las células ganglionares de la retina desarrollan la estructuración del nervio óptico.

8. El sistema nervioso intrínseco cardiaco está presente así como el fascículo atrio-ventricular.
9. Membrana anal persistente.
10. El canal pleuro-peritoneal se mantiene.
11. Bronquios subsegmentarios presentes.
12. Organización segmentaria de arterias y venas pulmonares.
13. Ruptura de la membrana cloacal.
14. Avanzado proceso de osificación de maxilar y mandíbula.
15. Condrificación de los procesos articulares y pedículos vertebrales.
16. Los miembros superiores e inferiores se disponen paralelos al plano medio-sagital.
17. Identificación del epicóndilo humeral y olecranon. La articulación del codo queda establecida.
18. En el miembro inferior inicio de la condrificación del coxal así como de la cabeza femoral.
19. Se establece por vez primera el esbozo mesenquimal de la patela.
20. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - a. Glándula submandibular aparece su esbozo como condensación del epitelio de la ranura paramedial sublingual.
 - b. Nervio óptico: estructuración de las fibras nerviosas que llegan a retina.
 - c. Húmero: la diferenciación de los condrocitos es marcada, no habiéndose aún iniciado la fase de osificación que es ya visible en clavícula.
 - d. Adenohipófisis: se inicia la diferenciación de la pars intermedia así como los lóbulos laterales que formarán la parstuberalis. El tallo es relativamente grueso con restos de lumen.
 - e. Órgano vomeronasal: se diferencia a modo de engrosamiento del epitelio nasal.
 - f. En áreas mesenquimales próximas a metanefros, las ampollas de los túbulos colectores permanecen indiferenciadas.

EMBRIONES DE LA 7ª SEMANA



Los embriones de la 7ª semana, presentan características que son constantes a lo largo de estos dos estadios.

Macroscópicamente, la disposición y morfología de sus miembros establece diferente orientación, no solo debida a la estructuración y crecimiento somático, sino que el miembro superior en su conjunto sufre un proceso de rotación por cuanto su aproximación a tórax y sobre todo contacto con el voluminoso relieve abdominal, condiciona que la mano, su borde medial, se posicione

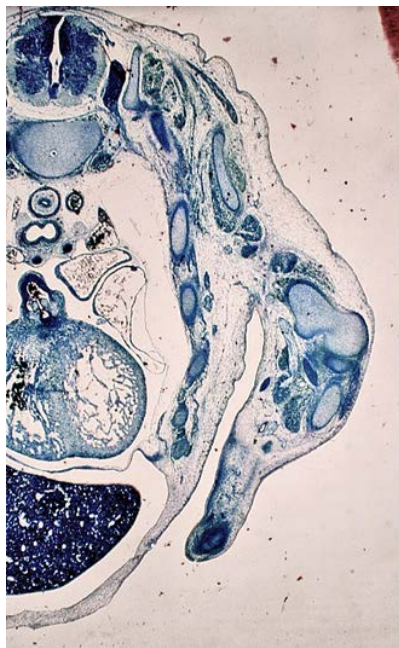
preaxial configurando un marcaje por el que la futura palma, se oriente medialmente en contacto con la superficie abdominal, posición de pronación.

Este posicionamiento condilar condiciona que las series histológicas, cuyo plano de se-



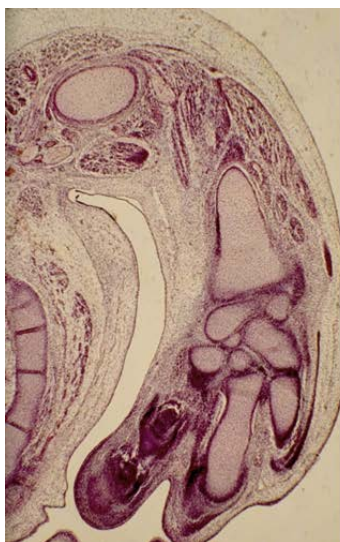
cción mayoritario es transversal, no comprenda porciones de los elementos

esqueletógenos en su conjunto, al encontrarse en diferentes planos, lo que prácticamente imposibilita integración de los mismos en una sección histológica aislada no secuencial.

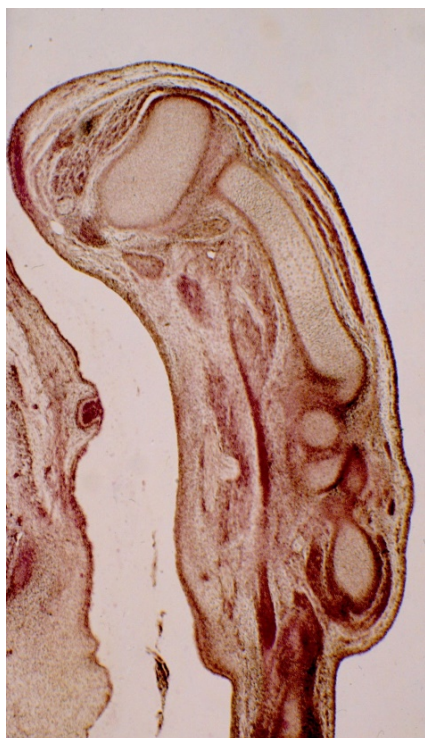


Por el contrario, el miembro inferior, tanto en extensión o una vez establecida la flexión femoro-tibial en su fase inicial, rodilla, son recogidos en conjunto o incluso en su totalidad cuando esta ya establecida la porción distal

incluso pierna y tarso con elementos metatarsianos.



Los extremos distales de los miembros que habían iniciado las placas mania y pedia en estadios anteriores, presentan un marcado avance en su diferenciación,



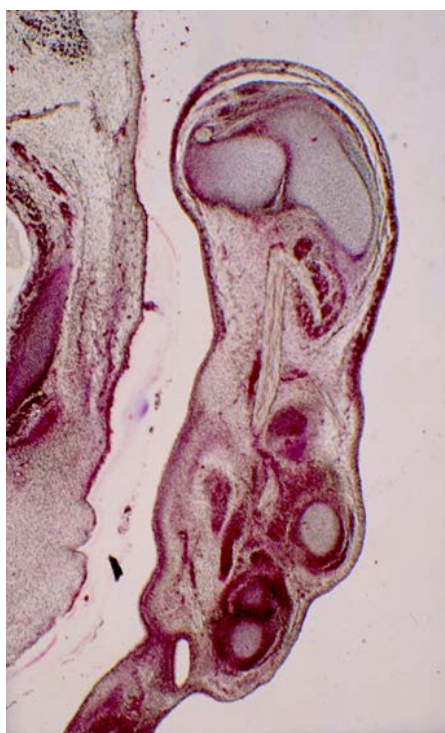
por cuanto la presencia de radios digitales es constante y uniforme, características no solo morfológicas y estructurales que le hacen típicas sino el aislamiento y mantenimiento de la capa o lámina ectodérmica interdigital.

Otra característica de igual modo constante es la diferenciación y condricificación, -“maduración”-, en su sistema esqueletógeno, a excepción de la porción distal del miembro inferior, en la que se está iniciando este proceso evolutivo-diferenciador observándose y caracterizando aún áreas blastemáticas indiferenciadas, “orientadas” no obstante ya a anlagen tarsianos-metatarsianos

previamente establecidos al final del estadio anterior.

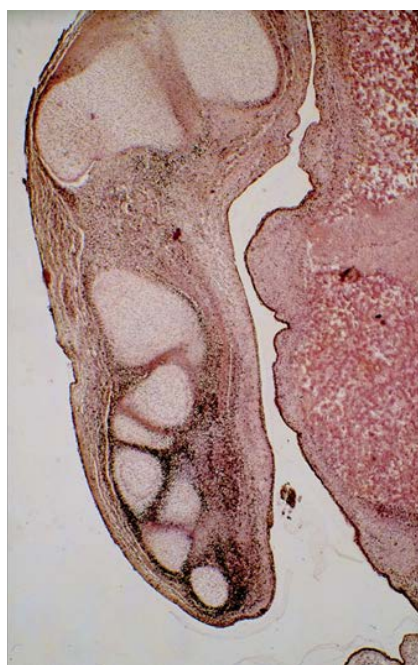
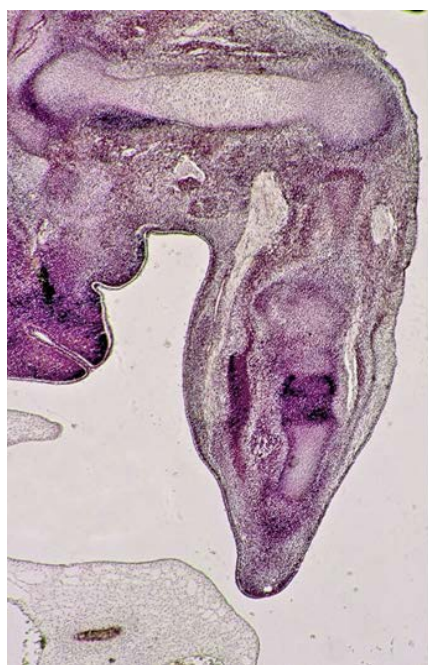
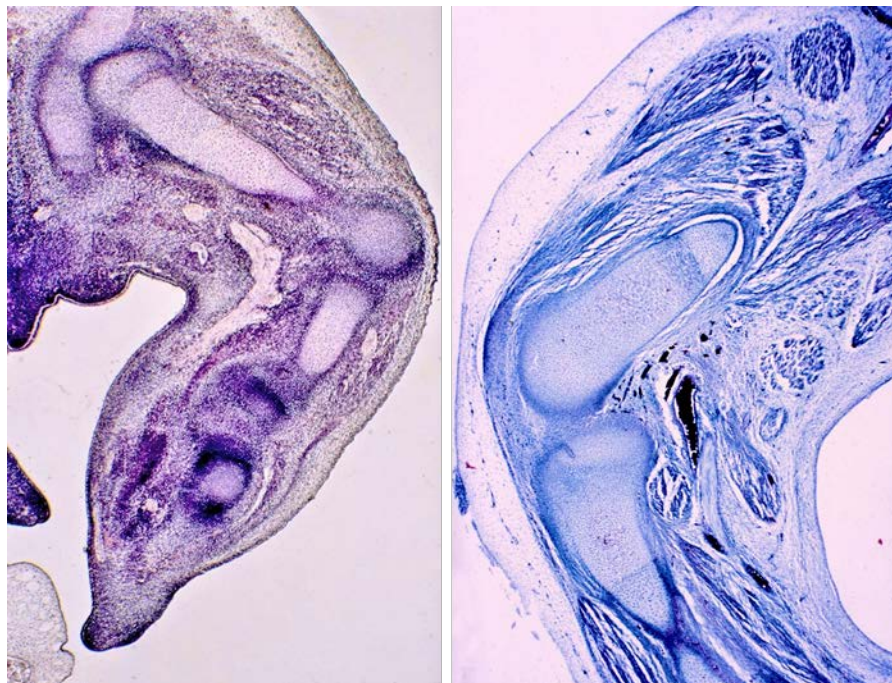
El modelado condral de las porciones esqueletógenas, salvo, excepciones, está presente.

En los embriones más jóvenes, estadio 18



CARNEGIE, las formaciones nerviosas, origen del plexo braquial, presentan

mejor y mayor ordenación, por lo que a diferentes niveles o planos topográficos, pueden reconocerse ramos aislados de los nervios mediano, cubital, por su trayectoria y relaciones músculo esqueléticas, así como pequeños ramos individualizados en rela-

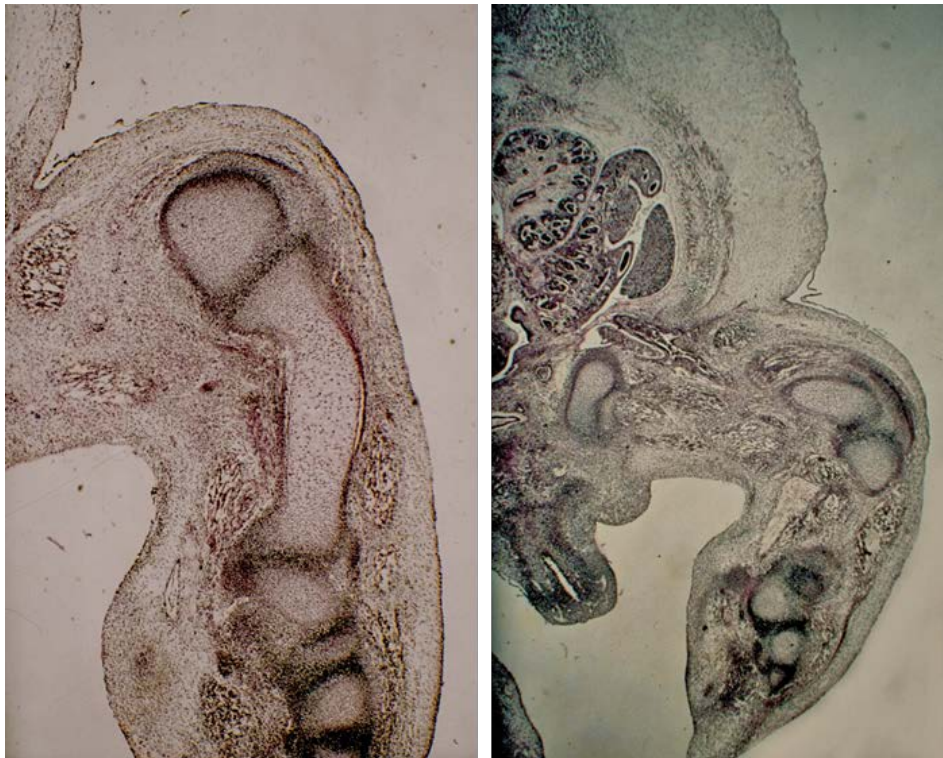


ción con masas musculares ya definidas, carácter y topografía idéntica al adulto.

Es constante la presencia de formaciones vasculares, formando frecuentemente unidades neuro-vas-

culares, disposición que se mantiene constante a partir de este periodo embrionario hasta su finalización.

En embriones más avanzados, sobre todo a partir de 16 mm, son reconocibles en el miembro superior húmero, radio y cúbito en diferentes planos y niveles, así como características a ellos correspondientes: apófisis estiloides, cóndilos, olécranon, fosillas y áreas prearticulares..., y formaciones carpianas. Es obligado recordar como a nivel de la ya establecida articulación del codo, cubito y radio son identificables aislados e independientes, mientras que distalmente aún mantienen en un denso acumulo blastemático que las mantienen en contigüidad con formaciones carpianas ya presentes, pero siempre menos



cubito. La articulación del codo en embriones de 16 mm se define no solo por su morfología sino porque poco más avanzado el estadio, embriones de 18-19 mm, presenta ya sus relaciones morfológicas prácticamente del adulto, incluso su anlage ligamentario.

Los elementos carpianos están prácticamente presentes, aunque en secciones histológicas no son aún todos identificables, por cuanto a la ausencia de pisiforme es frecuente no observable semilunar y trapezoide.

En el miembro inferior en los embriones del estadio 18 CARNEGIE aún no está definida estructuralmente la placa pedia por cuanto se observa y hemos descrito en el extremo distal, la vena marginal y la Cresta Apical de SAUNDERS en fase de atipicidad o aplanamiento laminar en continuidad con el ectodermo que recubre el borde libre placodial aún no estructurado.

Los radios digitales por tanto, a diferencia con la placa mania, no están bien definidos macroscópicamente; el resto de elementos esqueletógenos por el contrario, lo son: extremidad proximal de fémur, ya condricada, diáfisis y en modo especial cóndilos que contactan con la porción proximal de tibia, estableciendo una articulación amplia en sus límites y contenido periarticular, musculatura, esbozo de tendón patelar, mejor lámina fibrosa femoro-tibial y mesénquima patelar definido, acúmulos meniscales y ligamentarios...

La tibia aparece en pleno proceso de condricación a diferencia de la fíbula, aún en fase blastemática, aunque a nivel distal, al final del estadio 19, puede describirse un discreto núcleo condral sin continuidad.

Distalmente, a nivel topográfico tarsal, se observan líneas condrales, futuro anlage de calcáneo y astrágalo, así como metatarsianos, proceso que en su conjunto, al final del estadio 19 es posible describir la existencia de dos condensaciones distales que representan tibia y peroné independientes incluso con procesos estiloides, todo ello en fase blastemática bien definida.

PROTOCOLO V

(8ª semana postovulación)

Embriones Humanos de los Estadios 20 a 23 CARNEGIE

A partir del estadio primero de los cuatro que forman este Protocolo, 8ª semana, final del Periodo Embrionario, el estudio de las formas es ya insuficiente para precisar el estadio, por lo que las características histológicas de determinados órganos internos es fundamental y obligado.

Este criterio establecido por STREETER, 1951, hoy en día se mantiene y acepta, por lo que formaciones como ojo, oído, sistema respiratorio, corazón y riñón son entre otros, los Puntos Referenciales mayores en el desarrollo de las estructuras ya definidas y caracterizadas.

No obstante y al igual que en el Protocolo IV, 7ª semana postovulación, los miembros están ya diferenciados y sus estructuras son prácticamente idénticas al adulto, por lo que incorporamos unas secuencias micrográficas, ya que el final del Periodo Embrionario, es fundamentalmente de “crecimiento” O’RAHILLY y GARDNER, 1972, DI MARIO, 1997, STOCKDALE, 1997, lejano en el establecimiento del Sistema epitelio-mesenquimal que hemos estudiado.

ESTADIO 20



Embrión humano 19 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

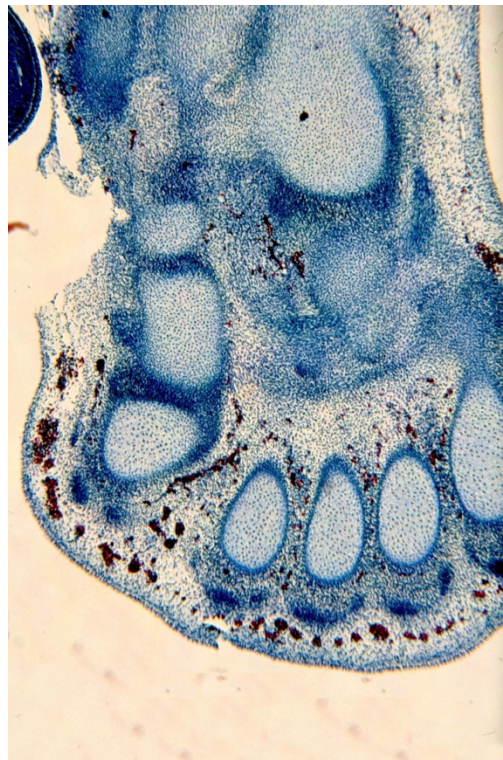
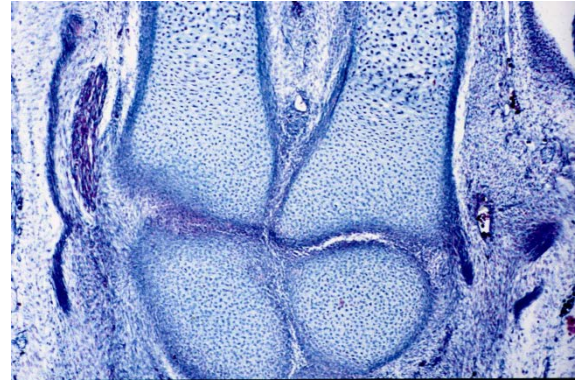
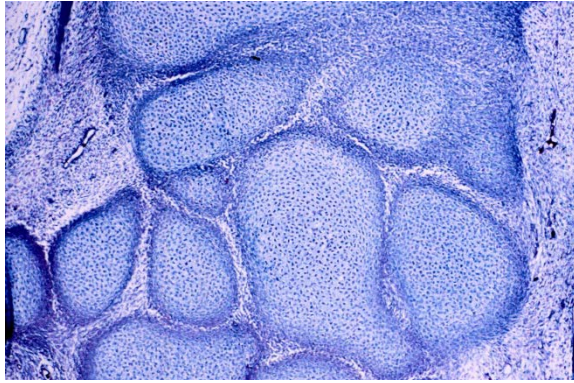


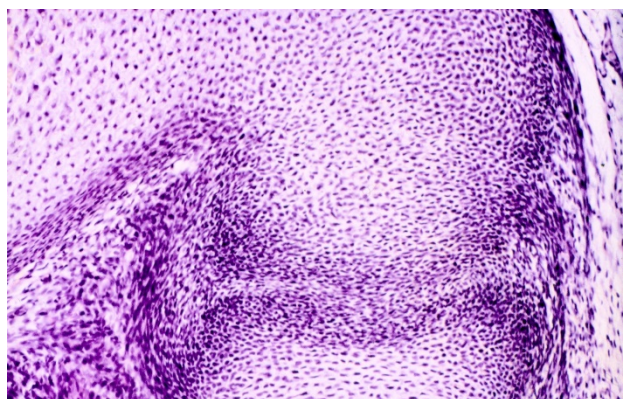
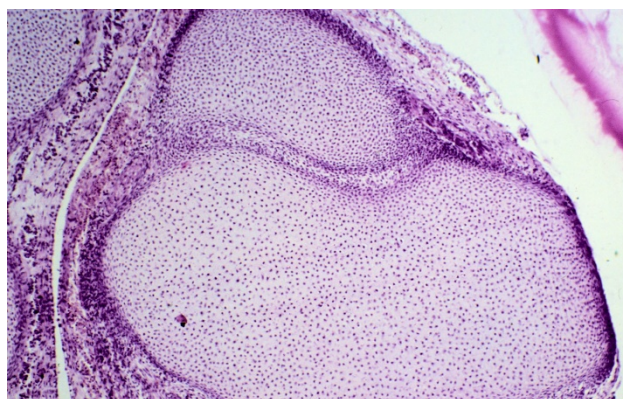
Embrión humano 20,5 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 18 a 23 mm
2. Aproximadamente 51 ± 1 días postovulación.
3. Se diferencia el mesotelio de la córnea.
4. Se establece el surco medio del cuarto ventrículo a la vez que se individualiza el ventrículo medio.
5. El septum secundum se diferencia estableciéndose sus dos valvas.
6. La segmentación hepática presenta un patrón prácticamente definitivo.

7. Individualización de la ampolla rectal y ruptura de la membrana anal.
8. El metanefros asciende de pelvis a abdomen a la vez que en su superficie se observan los pliegues de lobulación.
9. Los miembros superiores aumentan en longitud, observándose la flexura del codo.
10. La membrana interdigital se mantiene.
11. Aumenta la fase de condricificación tanto en miembro superior como inferior a la vez que se estructuran mesos y ligamentos; en modo especial en el miembro inferior de cruzados y laterales.
12. Se reconoce el tubérculo calcáneo.
13. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - a. Cornea: se establece el desarrollo del epitelio anterior, lámina postepitelial futura sustancia propia y epitelio posterior.
 - b. Nervio óptico: lo forman un pequeño conjunto fibrilar, su lumen se extiende prácticamente en su totalidad, O'RAHILLY, 1966.
 - c. Conducto coclear: modifica posicionalmente de craneal a horizontal.
 - d. Adenohipófisis: se mantiene el tallo largo y delgado; presencia de acúmulos capilares en la superficie rostral adenohipofisaria.
 - e. Órgano vomeronasal: se define como saco ciego poco profundo.
 - f. Glándula submandibular: el ductus principal aún corto, no presenta luz regular.
 - g. Metanefros: se inicia un proceso diferenciativo en su estructura vesicular.
 - h. Húmero: las características son transicionales entre estadios 19 y 21.





ESTADIO 21



Embrión humano 21 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado



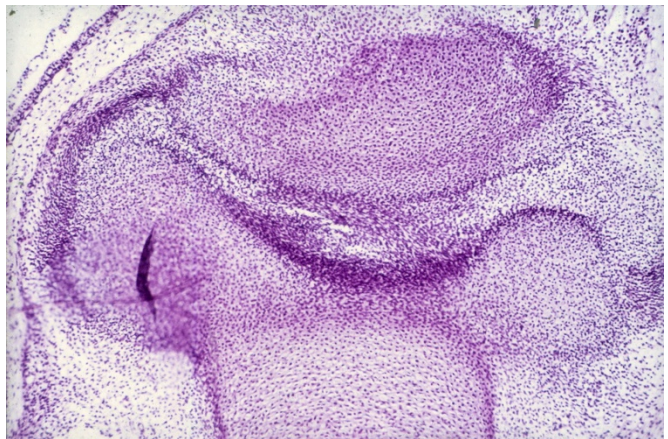
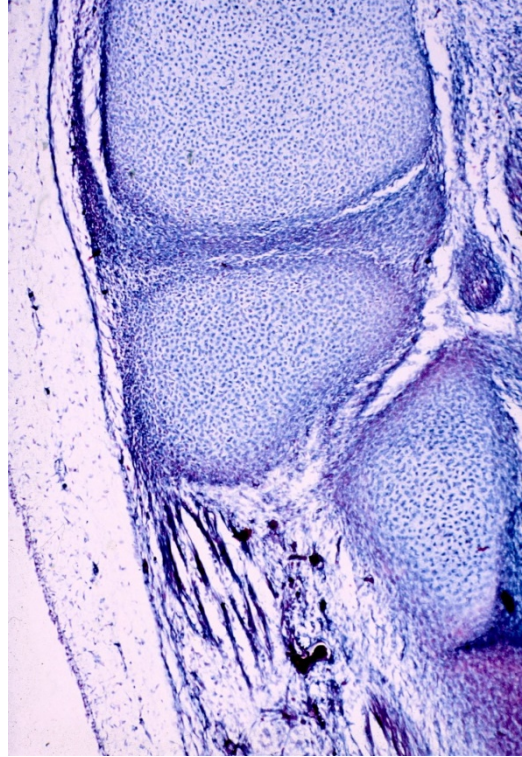
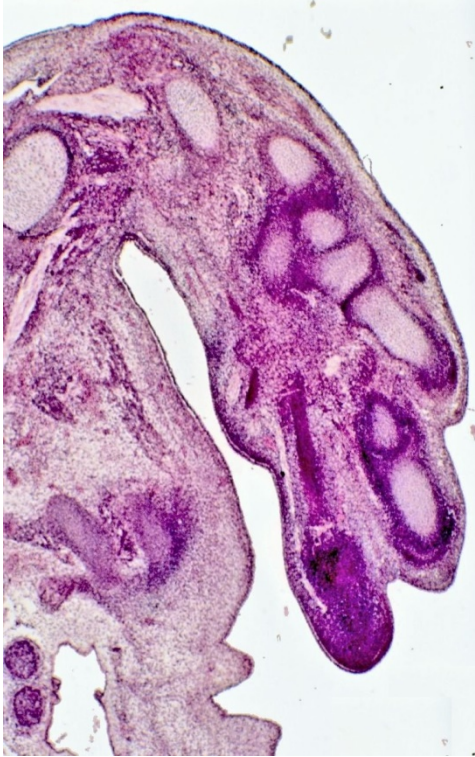
Embrión humano 23 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 22 a 24 mm., 52±1 día postovulación.
2. Las tres curvaturas del Sistema Nervioso Central son evidentes y típicas en su disposición.
3. Individualización de la córnea.
4. La lengua se sitúa caudal a los procesos palatinos.
5. Cierre de los canales pleuro-peritoneales.
6. En el metanefros se diferencian los glomérulos.

7. Las manos y pies se sitúan próximas al plano medio. Los dedos aparecen casi en su totalidad libres y las manos ligeramente flexionadas miran al relieve cardiaco dispuestas en un plano transversal.
8. Se inicia el proceso de osificación en húmero y radio.
9. La musculatura del miembro superior está finalizada en su topografía.
10. Se desarrollan espina iliaca antero superior e isquiática.
11. Condrificación patelar iniciándose a nivel de las falanges medias y distales.
12. Las articulaciones del miembro inferior se encuentran desarrolladas e individualizadas.
13. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - a. Cornea: grupos celulares invaden la lámina postepitelial.
 - b. Nervio óptico: recubrimiento epindimario; la arteria hialoidea es visible a nivel bulbar; un pequeño conjunto fibrilar llega al SNC.
 - c. Conducto coclear: aparece definido en su disposición.
 - d. Adenohipófisis: la pars media presenta fases de integración.
 - e. Órgano vomeronasal: el saco se reduce a una pequeña invaginación que presenta contacto entre sus bordes, transformándose en saco cerrado.
 - f. Glándula submandibular: el conducto principal así como la porción acino-lobulillar están rodeados por mesénquima.
 - g. Metanefros: capsulas glomerulares se localizan aunque no glomérulos funcionales.
 - h. Húmero: en fase cartilaginosa 1-4. STREETER, 1949.
 - i. SNC: el núcleo olivar está presente en romboencéfalo; $\frac{3}{4}$ partes de la superficie diencefálica forma los hemisferios cerebrales.





ESTADIO 22



Embrión humano 21 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

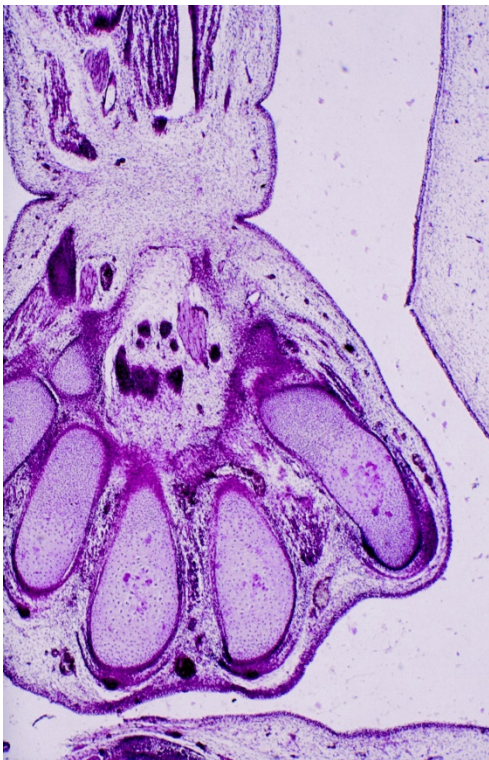
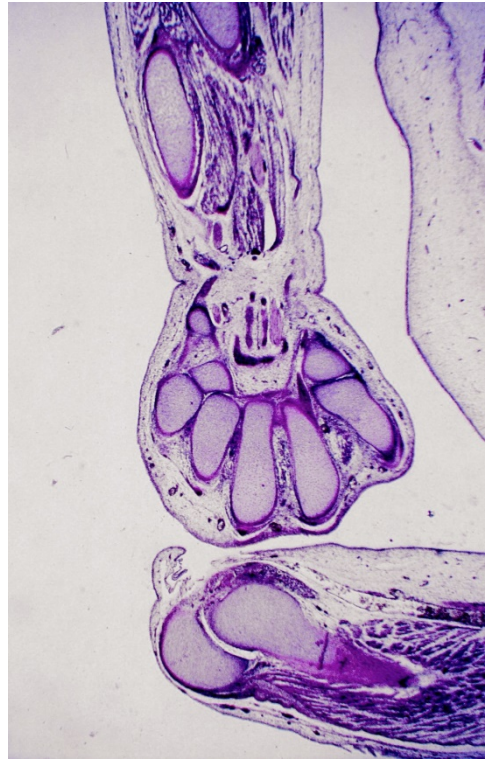


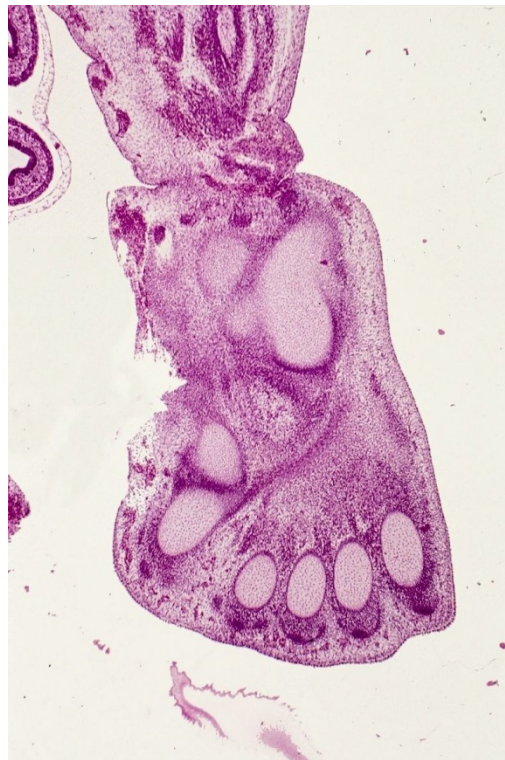
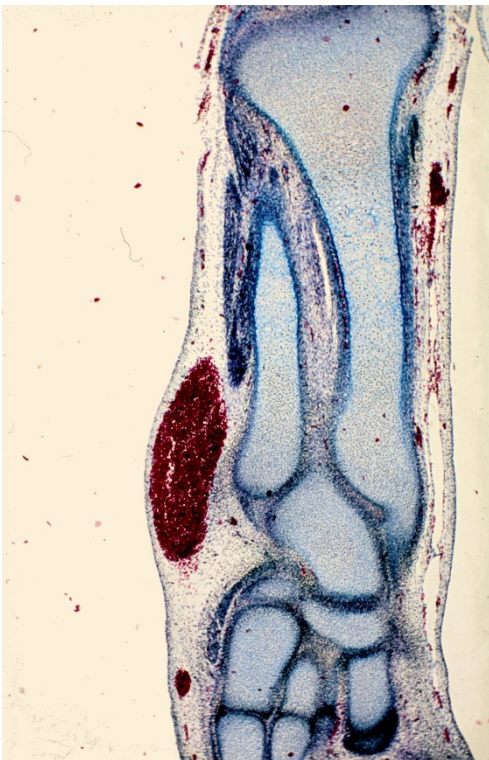
Embrión humano 21 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 25 a 27 mm., 52±1 día postovulación.
2. Los párpados ya diferenciados cubren sólo la porción excéntrica de los globos oculares.
3. Oído externo: modelado, trago y antitrago.
4. Individualización de la lámina cortical y cuerpo estriado.
5. Definición de la cámara anterior del ojo y esclera.

6. Obliteración de la vena cava superior izquierda.
7. Los canales paramesonefríticos se unen y llegan al sinus urogenital.
8. La superficies plantares contactan mientras que las manos se sitúan sobre la pared del tronco-abdomen.
9. Inicio de osificación cubital así como del fémur y tibia.
10. Individualización de los meniscos de la rodilla.
11. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS:
 - a. Cornea: condensación escleral; la invasión de la lámina postepitelial es completa
 - b. Nervio óptico: el mesénquima que lo envuelve se diferencia de la lámina mesenquimal. Formaciones fibromusculares.
 - c. Conducto coclear: presenta disposición definitiva.
 - d. Adenohipófisis: Las porciones aisladas e independientes del tallo entran en fase de absorción final.
 - e. Órgano vomeronasal: su precisa delimitación y topografía se establece en este estadio manteniéndose en el siguiente.
 - f. Glándula submandibular: se diferencian los conductos secundarios ductales procedentes de los acúmulos glandulares. Se ha establecido un lumen en el ductus principal a nivel del surco paramediano sublingual.
 - g. Metanefros: presencia de numerosos glomérulos estructurales, aunque sin contenido y por consiguiente limitada funcionalidad.
 - h. Húmero: se establece con nitidez la presencia de osteoblastos así como del collar óseo.





ESTADIO 23



Embrión humano 28 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

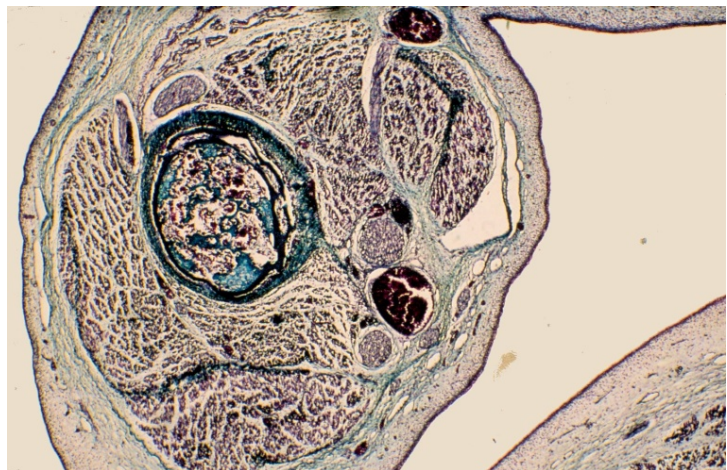


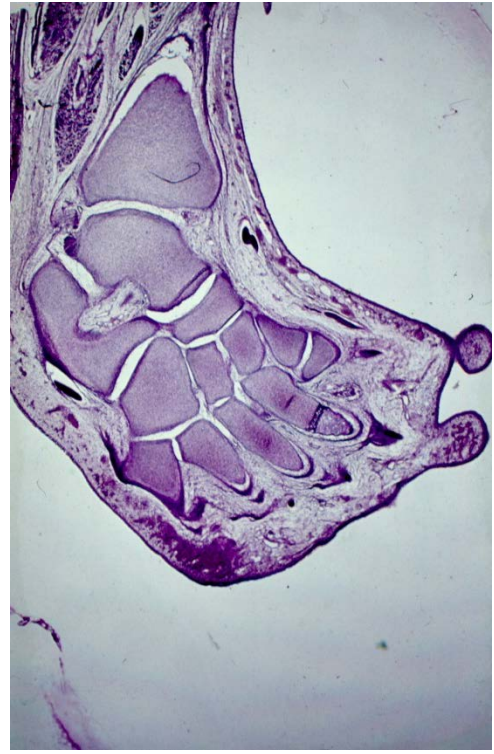
Embrión humano 31 mm.
Colección: Prof. J. Jiménez Collado

PUNTOS REFERENCIALES

1. Aproximadamente 27 a 31 mm., 57 a 59 días postovulación
2. El polo cefálico acentúa su flexión ventral.
3. El plexo subcutáneo del scalp se extiende hasta vértex.
4. Los hemisferios cerebrales son prominentes.
5. Inicia su diferenciación el hipocampo.
6. El orificio interventricular se localiza a modo de fisura bajo la arcada parafisaria.

7. Los principales elementos del tálamo-encéfalo e hipotálamo son identificables.
8. La hernia umbilical normal contiene aún numerosas asas intestinales.
9. Los cartílagos aritenoides se mantienen parcialmente diferenciados.
10. La musculatura laríngea posee un patrón topográfico idéntico al del adulto.
11. Los procesos palatinos se horizontalizan y en ocasiones contactan.
12. Se inicia el proceso de osificación frontal, maxilar y escama del temporal.
13. Los procesos transversos de las vértebras cervicales inician su división.
14. Los miembros aumentan en longitud y muestran mejor sus porciones articulares: codos y rodillas. Los dedos separados y bien individualizados.
15. Presencia de cavidades articulares en los esbozos del miembro superior e inferior así como de láminas sinoviales.
16. Se mantiene el proceso de osificación de los huesos largos de los miembros.





DISCUSIÓN

El inicial proceso evolutivo de los miembros, claramente muestra los cambios conceptuales en los últimos tiempos, tanto en la aceptación y descripción morfológica organoestablecida como con los resultados obtenidos bajo un análisis experimental, molecular o genético.

Aceptado que el proceso para que el mesodermo indiferenciado que coloniza y ocupa el esbozo de miembro, prolifere en su mecanismo diferenciador específico, regulado "in loco" con una determinada cronología, es imprescindible el mantenimiento del revestimiento epitelial, aumento en su laminación así como engrosamiento mamelonado a un determinado nivel para formar la Cresta Apical de SAUNDER, EktodermKappe de BRAUS o Epithelverdia de FISCHER, como centro de crecimiento y mecanismo formal; el análisis de su temporalidad no ha sido descrito de modo secuencial en las series con precisión, excepto por STREETER, 1949, BLECHSCHMIDT, 1948- 1951, ORAHILLY Y GARDNER 1956; es por lo que consideramos que el análisis en nuestros embriones con definición ordenada en los estadios de su presencia tiene valor, por cuanto representa y contribuye a establecer no sólo su diferenciación sino control y regulación del mesodermo, habida cuenta que este lo hace recíprocamente sobre el ectodermo, estableciendo a modo de factor de mutuo mantenimiento.

Observamos y describimos como en embriones de la 4ª semana 3mm., estadio 12 CARNEGIE en los esbozos del miembro superior tanto las superficies ventral como dorsal, limitadas por un discreto relieve o borde axial, se encuentran revestidas por una delgada y continua lámina ectodérmica, carácter normodiferenciativo inductor o regulador del sistema epitelio-mesenquimal, que a nivel distal presenta en su estrato basal condensaciones nucleares, disposición esta inexistente en el área del futuro miembro inferior,

disposición descrita por JURAND 1965 y JIMÉNEZ COLLADO 1973 y que coincide con nuestras descripciones.

Consideramos que antes de la aparición del esbozo del miembro, los territorios sobre los que se van a diferenciar, presentan manifestaciones y propiedades, unas generales y otras que le son propias que bien las poseen de principio o lo que tal vez es más importante, la van adquiriendo a lo largo de la diferenciación y morfogénesis con carácter selectivo y específico, por lo que junto con MILAIRE, 1956, CAPLAN, 1984, ORTS y JIMÉNEZ COLLADO, 2002, pueden ser considerados como áreas morfogénicas y campos específicos de activos procesos metabólicos.

Describimos en embriones de 24 pares de somitos, coincidiendo con las observaciones de CHAUBE 1959, BLECHSCMIDT 1969 como el territorio presuntivo de miembro está comprendido entre el 8º y 12 somito delimitada dorsalmente por el origen de las arterias onfalo-entéricas a nivel de la hoja parieto-pleural condensada en la zona truncal posterior.

Un poco más avanzado en este periodo, embriones de 3,5 mm el miembro superior hace ya relieve en media luna en la superficie ventrolateral del cuerpo embrionario, aunque histológicamente, observamos y describimos previamente y por vez primera un acúmulo y condensación en embriones de 2,3 mm, que presenta un aumento laminar epitelial en la superficie ventral y borde ventrolateral que se continua con el ectodermo de superficie monolaminar más delgado. A nivel del miembro inferior, marcadamente menor al estar su esbozo iniciándose, el engrosamiento laminar, queda limitado a la superficie ventral.

En embriones de 4,5 mm de este mismo periodo, el miembro superior presenta una mayor superficie dorso-lateral convexa y menor ventro-medial cóncava, separadas por un marcado borde ventro-lateral, finalizando

distalmente en una dilatación consecuente al mayor acúmulo celular en su porción distal, caracterizado por la presencia de varias capas de núcleos en el estrato germinativo, inicio del esbozo de la Cresta Apical, formación ésta en relación con delgadas estructuras vasculares, que en algunos especímenes, se anastomosan para formar una arcada marginal, futura vena marginal de HOCHSTETTER que describimos al igual que CAPLAN, 1981. El esbozo del miembro inferior presenta un menor relieve, en el que es evidente una superficie plana o cóncava ventral y otra plana dorsal más amplia, en la que se observa un aumento de la laminación epitelial menos extensa y voluminosa, sin presencia de acúmulo celular. Por tanto, en base a nuestras observaciones, consideramos que en los embriones de la 4ª semana, estadios 10 y fundamentalmente 11 CARNEGIE, presentan o en ellos se establece la Cresta Apical en el miembro superior, no así en el miembro inferior, en el que es característico el engrosamiento laminar amplio sobre todo en su borde o línea preaxial en el estadio 13 CARNEGIE.

El momento de aparición de la Cresta Apical se mantiene con las modificaciones de forma y tamaño del esbozo y en modo especial, con la presencia y regulación de sus tres ejes de crecimiento.

La Cresta Apical, consideramos, es el reflejo morfológico de la interdependencia ectodermo-mesodermo en el desarrollo, habida cuenta que por ella o a partir de ella se desarrollan los precursores de estructuras esquelóticas; por ello consideramos que el criterio por algunos mantenidos, AMPRINO 1955, que el ectodermo solo desarrolla un papel pasivo, ha sido abandonado, pues su "modo" activo como inductor y diferenciador no solo es condición exigida sino incluso dependiente al horario morfodiferenciativo.

Es pues evidente que durante el periodo inicial de la morfogénesis apendicular, el epiblasto de recubrimiento si bien sufre modificaciones

regionales, evocan una activa participación en el desarrollo, crecimiento y organización del mesoblasto.

A su vez, la Cresta Apical, observamos y describimos en nuestros embriones, no solo actúa sobre el mesodermo induciendo estructuras distales, sino que este lo hace recíprocamente sobre el ectodermo, estableciendo un factor de mantenimiento, criterio que coincidimos con MAC CABE y PARKER, 1982.

Estos caracteres histológicos y regionalización son en parte coincidentes con las descripciones de STREETER, 1949, BLECHSCHMIDT, 1956, O'RAHILLY y cols., 1972, sin embargo, las ahora dadas son dos estadios previos, por lo que se aumenta y amplía el posible horario teratogénico.

En embriones de la 5ª semana, 7 mm, estadio 14 CARNEGIE, el miembro superior presenta una regionalización próximo-distal, así como esbozo de placa mania, cuyas superficies están en continuidad en el extremo distal, delimitando un área alanceolada. El ectodermo engrosado apical presenta a este nivel, forma de casquete o dedal en contacto con el mesénquima indiferenciado del que se encuentra separado por una basal nucleada y formaciones vasculares sin aparente patrón de distribución reglado. En el miembro inferior se observa por vez primera a lo largo del borde ventro-lateral, una condensación nuclear y aumento en la porción medio-distal de la línea crestal ectodérmica, al igual que anteriormente se describió en el miembro superior, que forma al principio relieve y que en embriones del estadio 15 CARNEGIE, 6 mm., al aumentar en volumen, adquiere una práctica similitud con la Cresta Apical antes descrita y observada en miembro superior.

En embriones de la sexta semana, 8-9 mm, estadio 16 CARNEGIE, describimos como la placa mania presenta en su porción periférica un aumento

en su estructura y configuración para así diferenciar la porción digital, que ocasionalmente por transparencia permite visualizar la vena marginal periférica a lo largo de su borde libre, observándose la cresta epiblastica ocupando toda la superficie ventral o preaxial y parte de la dorsal o postaxial, así como diferenciaciones del blastema ahora evidente en fase de caracterización miocondral. En el miembro inferior su extremo distal a diferencia, presenta un menor ensanchamiento por lo que prácticamente no se describe aun placa pedia, estableciéndose no obstante una densa línea cresta epiblastica a lo largo de su borde post-axial, así como un relieve mamelonado en cuña o dedal típico de Cresta de SAUNDERS.

En embriones del final de este periodo, 11-12 mm, estadio 17 CARNEGIE, la placa mania se caracteriza por la presencia de los radios digitales descritos por STREETER, 1949; la Cresta ectodérmica apical se sitúa a lo largo del borde libre bien delimitada y prominente, observándose los relieves digitales que dan apariencia por su división y ahora localización, de dientes de sierra unidos por una membrana interdigital libre de condensación ectodérmica crestal, tal y como describimos al igual que O'RAHILLY, 1963. En el miembro inferior, la placa es menor y más regular en su porción marginal, ya que los relieves digitales son menos evidentes, estando presente una Cresta Apical ectodérmica prominente en su borde preaxial.

En embriones de 13-15 mm, séptima semana, estadio 18 CARNEGIE, no observamos Cresta Apical en los miembros superiores, mientras que en los inferiores se observa su presencia muy delgada en las formaciones radiales digitales, que en embriones de 18-19 mm estadio 19 CARNEGIE es inexistente.

Por tanto, en base a nuestras observaciones esquematizamos la existencia a nivel distal primero de un engrosamiento laminar ectodérmico en el relieve semilunar de los miembros, transformación en Cresta Apical, primero única en

nivel determinado de su borde libre que se divide para disponerse en la porción distal de los radios digitales y finalmente desaparecer conjuntamente con la formación vascular que se localiza en su borde libre aunque separada por una basal mononuclear continua.

Es característico y constante que el periodo crestal es diferente en miembros superior e inferior, ya que si bien aparecen próximos al inicio de la cuarta semana para miembro superior, estadio 10, para miembro inferior lo es al final de esta o principio de la quinta, estadio 13, manteniéndose hasta el estadio 18, para miembro superior y, estadio 19 para miembro inferior.

Describimos al igual que DI MARIO, 1997, STOCKDALE, 1997, como la superficie del anlage de miembro, es mayor que la futura base de implantación, por lo que el aumento de laminación, si bien se realiza a lo largo de toda ella, solo por un mecanismo de segregación mesodérmica, vascular o genético se va limitando para disponerse no sobre el esbozo en media luna prominente del miembro sino únicamente sobre su extremo distal, según nuestras observaciones.

La interacción epitelio-mesénquima es un punto de controversia importante y un factor complejo en la morfogénesis de los miembros en vertebrados. Tan pronto como el esbozo del miembro humano es visible, hemos descrito, consideramos precozmente, un grueso ectodermo que se observa en su porción ventral, O'RAHILLY, GARDNER y GRAY, 1956, que rápidamente da lugar a la Cresta Ectodérmica Apical (A.E.R.) formación que ha sido objeto de numerosas investigaciones experimentales, particularmente en embriones de ave, aunque más recientemente estudiada en mamíferos, MILAIRE 1973, JIMÉNEZ COLLADO 1981. Hoy es obligado aceptar que existe una continua interdependencia morfogenética entre ectodermo apical y mesodermo, relación ésta importante en el desarrollo y diferenciación regional, pero no

necesariamente secuencial de determinación, FABER, 1971, de los componentes del miembro en una secuencia próximo-distal.

Experimentalmente se considera, JIMÉNEZ COLLADO, 1980, LANCE-JONES, 1988, que el ectodermo "responde" a una inducción del mesodermo por formación de la AER, la cual, a su vez, induce el crecimiento del mesodermo. La Cresta Apical se considera regulada por un factor específico del ectodermo apical: A.E.M.E., ZWILLING, 1961.

El anillo ectodérmico ha sido interpretado por CAUNA, 1963, como dos zonas longitudinales "placodiales" de ectodermo especializado. La cresta de ectodermo apical, que CAUNA llama "placa del miembro" la describe similar en estructura histológica a las placas de los órganos de los sentidos y de los arcos faríngeos.

No consideramos la presencia de tal anillo epitelial, por cuanto en su estudio histológico, no la hemos encontrado; se trata de un engrosamiento local, que por los mecanismos que aún hoy desconocemos, aumenta su laminación, con la característica que primero comprende una mayor área, habida cuenta, que la plataforma de origen o implantación del miembro, es mucho más amplia al inicio de su diferenciación.

El esbozo inicial de miembro consideramos en base a nuestras observaciones, no es un mosaico de regiones sino un sistema altamente regulativo celular, ZWILLING, 1961, JIMÉNEZ COLLADO, 2002. Consideramos que los componentes de miembro, están inicialmente auto-diferenciados aunque poseen un grado de dependencia a determinados factores, como nervios y vasos que estudiamos y describimos por su continua diferenciación, dependencias que se correlacionan con la actividad funcional BRADLEY 1970, SHINOHARA, 1988, YASUDA, 1973.

El desarrollo de la forma externa y el cambio de posición de los miembros han sido considerados por BLECHSCHMIDT 1951 y por HOCHSTETTER 1952.

En embriones de 7 a 11 mm modifican los ejes longitudinales de los esbozos de los miembros superior e inferior, que mantienen básicamente paralelos los bordes preaxiales que miran en dirección craneal mientras que los bordes postaxiales lo hacen en dirección caudal. Más tarde, el miembro superior lo modifica de forma que el borde preaxial (indicado por el pulgar) cambia de craneal a medial, correspondiendo a una posición de pronación. En los miembros inferiores, el borde preaxial indicado por el dedo gordo se mantiene craneal al final del periodo embrionario.

Aceptado el sistema epitelio-mesenquimal como inductor, regulador y diferenciación de miembro, obligado es conocer e interpretar lo estadios primeros de su morfogénesis así como diferentes criterios interpretativos.

La primera observación por la que describimos macroscópicamente el esbozo inicial de miembro, corresponde al embrión de 3 mm, inicio de la 4ª semana, descripción en tiempo diferencial por cuanto solo es visible macroscópicamente el esbozo del miembro superior, hecho este que coincide con STREETER, 1949, O'RAHILLY y GARDNER, 1972, sin embargo, el estudio microscópico incluso a bajos aumentos que realizamos, nos muestra este esbozo más precozmente por cuanto es plenamente objetivable en embriones de 2,3 mm. La mayoría de autores actuales sitúan el área o superficie a partir de la que se origina el miembro en la cresta lineal somatopleural latero-dorsal del cuerpo embrionario referenciada a determinados somitos, criterio que tanto macro como microscópicamente corresponde con nuestras observaciones, ya que desde un principio y a lo largo de todo el periodo morfodiferenciativo, los esbozos de miembro son dos relieves o engrosamientos limpios y ordenados de la Cresta de WOLFF, relieves mesenquimales no segmentado, indiferenciado,

implantados a modo de protrusiones distantes en este periodo de las formaciones somíticas y ganglionar, que está iniciando su mecanismo de estallido y diferenciación celular.

La implantación de la base del relieve apendicular, consideramos y así lo describimos al igual que BLECHSCMIDT, 1956, en este periodo inicial, corresponde o se localiza a nivel de la somatopleura, hecho este que en parte condiciona y regula en la determinación y especificidad de estructuras mioesqueléticas según STREETER, 1949, con quien en parte coincidimos.

Según nuestras observaciones, establecemos el área de implantación somatopleural recubierta por ectodermo de superficie, "referida" a los somitos 8 a 10, que son considerados 5º cervical y 1º torácico para miembro superior ZWILLING, 1961, SHINOHARA, 1990, mientras que el inferior más tardíamente diferenciado, será a nivel de los somitos 16-18, en embriones en periodo inicial, PUCHADES, 1976, JIMENEZ COLLADO, 2008, localizan de modo preciso el nivel somítico y definición topográfica en que se sitúan, carácter éste con el que no coincidimos, por cuanto si bien los relieves se sitúan próximos al mesénquima segmentado, no es posible por la variedad y horarios descritos y existentes en las preparaciones definir la topografía referencial, más aun cuando aún hoy en día, desconocemos con precisión el número de somitos totales existentes en esta fase singular de la diferenciación. No obstante y en parte coincidente con nuestras observaciones, STREETER, 1949, CHAUBE, 1959 y JIMÉNEZ COLLADO, 1969, describen como en embriones con 20 pares de somitos el territorio presuntivo del miembro superior se extiende desde el 8º al 12 somito, mientras que el correspondiente al miembro inferior, menor en su diferenciación, se haya localizado en la extremidad caudal de la región no segmentada, inmediatamente por delante del NUDO de HENSEN. En embriones con 24-26 pares de somitos, un poco más avanzado el desarrollo, el esbozo del miembro superior aparece como condensación densa situada frente

a los somitos 10-18, delimitada dorsalmente por el origen de las arterias onfaloentéricas que marcan un límite preciso al relieve o engrosamiento de la pared lateral del tronco, extendiéndose en sentido cráneo-caudal desde el 12 al 21 somito, origen de la porción posterior de la arteria onfaloentérica homolateral; en esta fase o periodo, los materiales presuntivos del miembro inferior están aún en vías de incorporación, ya que se encuentran localizados en la hoja parieto-pleural condensada de la zona troncal posterior.

Según nuestras observaciones en embriones de 2,3 mm, el esbozo de miembro ocupado por un conjunto armónico y regular de mesénquima somato pleural cubierto por epitelio monolaminar similar al resto de recubrimiento somático, va secuencialmente a presentar un aumento de elementos celulares en su superficie dorso-lateral que se extiende hasta el vértice o porción distal en la que a partir de embriones de 4,5 mm se esboza la Cresta Apical de SAUNDERS, separada por una basal limitante acelular, que será espacio para formaciones vasculares, presencia obligada para la diferenciación mesenquimal, distinguiéndose una red fundamentalmente de significado venoso que dará origen al Seno Venoso o Marginal así como a un vaso de trayecto más o menos longitudinal de estructura arterial, origen de la Arteria Recta o Primaria de VON PAPE ampliamente anastomosada a ramitas de origen intersegmental somáticas, tal y como antes hemos hecho mención.

Como consecuencia de las evaginaciones o relieves producidos en la cresta de WOLFF se delimita entre ellas una depresión o valle, descrita por BALINSKY, 1981, que consideramos "no interviene grandemente" en la diferenciación y desarrollo del miembro; consideramos podría ser interpretada como específica para diferenciación de la porción antero-dorsal de tórax-abdomen. A su vez dependiente a este mismo mecanismo de crecimiento, craneal y caudalmente a los relieves se distinguen dos fosas: axilar y crural y esta última menos marcada y en continuidad con el pliegue cruro-genital.

Un hecho constante es la presencia de ganglios espinales, raíces y ramos nerviosos que a diferencia sobre todo de estos últimos con el patrón vascular que rápidamente invade el esbozo del miembro; por el contrario no se observan o mejor a diferencia, no hay presencia de formación neural en el mesénquima del miembro.

Sin embargo, las finas y numerosas formaciones vasculares que llegan a la base o superficie de implantación en este periodo a partir de embriones de 5 mm, inicia y establece su invasión aparentemente sin patrón habida cuenta de la organización indiferenciada del mesénquima que lo ocupa.

Simultánea y formalmente para que el crecimiento y proliferación se establezca, es preciso la integridad del ectodermo de superficie, YASUDA, 1973, ROWEN y FALLON, 1982, MARKWARD y KRUG, 1985, así como la diferenciación de la Cresta Apical de SAUNDERS a modo de casquete o dedal en el extremo distal del esbozo que se mantiene hasta fases avanzadas, tal y como describimos y estudiamos en nuestras observaciones. Una acción o factor de mantenimiento mutuo reglado y armónico, MAC CABE y PARKER 1975-1982, JIMÉNEZ COLLADO, 1981, MURILLO, 1981, actúa a modo de verdadera llave y control de la normal definición y morfogénesis de áreas de crecimiento.

La formación de un voluminoso vaso marginal como hemos descrito situado en inmediata vecindad con la Cresta Apical, Seno Venoso de HOCHSTETTER, que drena las numerosas ramas de la arteria central, parece estar determinado por la Cresta Apical, TCHUMI, 1977, estableciendo a nuestro criterio un mecanismo responsable de la territorialidad "in situ" del mesodermo, ya que las áreas con mayor riqueza vascular se diferencian a muscular y tejido conectivo mientras que las de menor aporte lo hacen a cartílago.

Al igual que el factor vascular regulado por la Cresta Apical de SAUNDERS, puede ser considerado inductor primario la presencia de fibras nerviosas con capacidad para regular la estructuración y topografía de los elementos diferenciados, PUCHADES ORTS 1968, JIMÉNEZ COLLADO-MATESANZ, 1980, WACHTER, 1982, estableciéndose una neuro-especificidad especie-específica a la vez que regional, por cuanto la diferenciación y maduración mesenquimal se realiza conforme al eje de crecimiento próximo-distal, criterio éste que definimos de gran valor morfogénico.

Consideramos es obligado interpretar que la primera condensación mesenquimal por nosotros observada y descrita es de origen somatopleural, por cuanto la formación somítica en fase aun previa a su estallido celular migratorio, se encuentra aún compacta, independiente y separada por un espacio acelular del esbozo del miembro ocupado parcialmente por mesénquima indiferenciado.

En embriones más avanzados, 5,5 mm, estadio 12 CARNEGIE, el esbozo a nivel del 8º somito, que consideramos como superior, aumenta a partir de este momento de volumen por la aportación ahora celular somítica, estableciéndose una condensación base somatopleural amplía a modo de área o nivel de implantación con diferente ordenación celular que define la Cresta de WOLFF del resto mesenquimal indiferenciado ocupando el esbozo conjuntamente con una abundante vascularización de significación venosa marginal, en la porción apical del esbozo.

Conjuntamente, pero no de modo simultáneo, se establece en embriones de 5,5-6 mm, estadio 13 CARNEGIE el esbozo del miembro inferior, que mantiene idéntico proceso y secuencia normogénica.

Los embriones de la 5ª semana, 5 a 9 mm, presentan un conjunto de caracteres que los hacen específicos a la vez que diferenciativos tanto por su morfología como estructuración en el mecanismo causal de miembro.

Describimos el relieve columnar ya establecido formalmente de miembro, que modifica su forma y volumen de manera desigual, ya que el correspondiente a miembro superior, lo hace conforme a los tres ejes definidos de crecimiento: próximo-distal, antero-posterior y sobre todo medio-lateral, por lo que se establece e inicia la diferenciación placodial, mientras que en el correspondiente a miembro inferior, si bien de igual modo aumenta de volumen y tamaño, lo hace solo o fundamentalmente en prolongación del eje próximo-distal, finalizando estrecho y en punta.

El mesénquima indiferenciado que ocupa el esbozo que en estadios anteriores presentaba uniformidad estructural, desarrolla núcleos ó áreas de condensación celular blastemáticas miocondrales, con una mayor presencia de estas últimas, -condrales-, que desde el principio se relacionan con formaciones neurales, tal y como describe MACCABE, 1972, O'RAHILLY, 1953-2010, sin embargo incompletas en su descripción a nuestras observaciones.

El miembro inferior inicia y establece un modelo diferenciador más tardíamente, avanzado ya el estadio 14.

Consideramos en modo especial y específico, 5ª semana, la presencia por primera vez descritas en estas iniciales fases, de formaciones fibrilares nerviosas para miembro que a nivel de la condensación somatopleural, se unen para establecer plexos de dos niveles.

Los embriones de 8 a 14 mm., sexta semana presentan mejor diferenciación por segregación más que por división de bloques o

condensaciones blastemáticas, en modo especial condrales en miembro superior, al establecerse territorialmente la presencia de fibra nerviosa, carácter que a nuestro criterio hemos considerado "condiciona" como posible inductor o codificador condral a modo de patrón morfológico en un posicionamiento de diferenciación según eje próximo distal; es por ello por lo que consideramos como la condrogénesis de las porciones distales del miembro, inician el proceso diferenciador más tardíamente al igual que en su conjunto el miembro inferior.

En los embriones más jóvenes de este estadio, es evidente el aumento en volumen de la porción distal sobre todo en el esbozo ya establecido de miembro superior, con la presencia de placa mania y radios digitales unidos por una continua y delgada membrana interdigital, mientras que en el miembro inferior se mantiene aún su forma y compactación alanceolada en la que se puede aún describir Cresta Apical de SAUNDERS y Seno Venoso Marginal, a diferencia del miembro superior, en el que prácticamente desaparece al continuarse su epitelio con idéntica estructura laminar de superficie.

Los acúmulos plexurales estructurados a nivel de la plataforma somatopleural sobrepasan estas condensaciones mesenquimales en fase inicial de condricación, relacionándose y en contacto con formaciones miocondrales previamente establecidas.

En embriones de 10,5 m. describimos la presencia en el miembro superior de húmero y menos marcado tercio medio-distal de radio en continuidad con una densa masa blastemática de la que emerge y definen condensaciones condrales carpianas, futuros huesecillos grande y ganchoso así como metacarpianos 2º y frecuentemente 3º y 4º, mientras que a nivel miembro inferior, más tardíamente diferenciado, embriones de 13 mm., identificamos fémur y tibia, en continuidad con un blastema estructurado en el que se ha diferenciado tarso y 2º metatarsiano, siendo constante, la presencia de

formaciones musculares y nerviosas ordenadas en su morfología y territorialidad, procesos y estructuras diferenciadas que coincidimos con las descritas por JIMÉNEZ COLLADO-MATESANZ, 1980, SAUNDERS, 1998.

Morfológicamente las placas manio y pedia ya definidas, no presentan caracteres comunes por cuanto si bien aumentan su volumen en la porción distal del miembro, la correspondiente a miembro superior adquiere y mantiene una morfología planada de amplia superficie tanto dorsal como ventral, mientras que la inferior, placa pedia, lo hace irregularmente cilíndrica finalizando en dedal o pico.

Describimos en embriones de 14 mm los blastemas ya diferenciados que muestran mejores y más definidas condensaciones condrales y musculares con ordenación en su territorialidad, estudiando a la vez posibles factores que condicionen su topogénesis.

A partir de embriones de 14 mm, 7ª semana post-ovulación, estadio 18 CARNEGIE, es constante la presencia de características específicas y selectivas a la vez que fundamentales que modelan este periodo embrionario, establecido a partir del desarrollo de los acúmulos núcleos blastemático mio-condrales descritos en estadios anteriores, que inician un proceso de diferenciación selectiva, maduración estructural a cartílago, incluso para algunos ósea por modulación osteogénica próxima a Periodo Fetal.

Describimos al igual que STREETER, 1949, O'RAHILLY, 1969 y HAYNE, 1978, aunque con criterios no concordantes, como las porciones distales de los miembros, placas mania y pedia, inician un marcado avance diferenciador por la presencia de radios digitales, su aislamiento e individualización por la lámina ectodérmica interdigital, proceso no considerado por MARCHOK, 1967; de igual modo, consideramos como característica específica, las primeras fases y su

ulterior establecimiento del mecanismo de maduración miocondral que sigue manteniendo pequeñas áreas blastemáticas indiferencias en el extremo distal del esbozo de miembro inferior “orientadas” no obstante, a condensaciones tarso-metatarsianas previamente establecidas en el estadio anterior.

Los embriones más jóvenes, 16 mm, presentan carácter específico consistente en que las formaciones fibrilares neurales, origen de los plexos ya diferenciados y establecidos, presentan mejor y mayor sistematización, pudiendo establecer planos topográficos de recorriendo y distribución así como establecer relaciones mio-vasculares ya definidos, carácter y topogenia prácticamente idéntica al adulto.

De igual modo, pero sobre todo a partir de 17-18 mm, son reconocibles en el miembro superior húmero, radio y porción proximal de cubito, así como formaciones a ellos dependientes: apófisis estiloides, cóndilos, olecranon, áreas prearticulares.... Y formaciones carpianas, no así diáfisis y extremo distal de cubito.

No obstante en esta fase a nivel de miembro inferior, describimos la presencia de Cresta Apical de SAUNDERS en proceso o fase de delaminación por atipicidad celular sobre todo a nivel de la lámina interdigital; los radios digitales a diferencia con la placa mania no están definidos independientes macroscópicamente, por lo que consideramos en su definición y modelo estructural una fase inferior o aun no establecida, al igual que en las formaciones distales esquelóticas.

Observamos y describimos ya presentes a fémur con su extremidad proximal y diáfisis condrificada, diferenciación de área articular femoro-tibial amplia y con contenido periarticular, ordenación musculatura así como lámina femoro-tibial, primer esbozo patelar; es característico como la fíbula

individualizada proximalmente, a nivel tarsal presenta un pequeño núcleo, evidente y marcado, próximo y en contacto en embriones más avanzados con dos condensaciones, anclajes de calcáneo y astrágalo dispuestos en línea con el eje de crecimiento y continuidad, formaciones en fase blastemáticas bien definidas en las que al final de este estadio descubrimos por vez primera como condensaciones que modelan tibia y con selectividad la porción distal de tibia y peroné individualizadas.

Al final de este periodo tanto carpo, metacarpiano y falanges proximal y media están ya definidos; de igual modo en miembro inferior, con un retraso en su morfogénesis, tarso, metatarso y dedos lo son también.

El desarrollo prenatal del esqueleto humano ya definido y diferenciado, ha sido estudiado por numerosos investigadores; los resultados se han basado fundamentalmente en el análisis y descripción de los diferentes periodos de osificación ROBERTSON, 1951, O'RAHILLY y MEYER, 1957....

De manera prácticamente generalizada, el estudio y publicación de la determinación y diferenciación del periodo condral de las estructuras y formaciones de miembro, se ha realizado en estructuras independientes o bien en áreas funcionalmente estructuradas: cadera, hombro, codo, pie...

Hemos estudiado los estadios iniciales de la morfogénesis y su dependencia epitelio-mesenquimal en los Protocolos que describimos, embriones de 2,3 mm. a 41, estadios 10 a 23 CARNEGIE, 4ª a 8ª semana postovulación, para en los dos últimos Protocolos, IV y V, establecer pautas de lógica continuidad únicamente de modo referencial, tal y como queda en las síntesis de estos estadios, analizando algunos de estos parámetros y caracteres con diversos autores en periodos de tiempo.

PREYHER, 1847, interpreta la presencia de cartílago en el tercio medio de la diáfisis humeral a los 10,5-11 mm, que OLIVIER describe en embriones de 13 mm como “cartílago hialino” a modo de lámina pericondrial ya constante a partir de especímenes de 30 mm.

LEWIS, 1901, describe la diferenciación de la extremidad proximal del húmero en la quinta semana, no así la distal que la observa más tardíamente; en la primera describe el esbozo de las apófisis, tuberosidad mayor y tubérculo deltoideo en un embrión de 17 mm, en el que el surco radial está ya presente, formaciones estas que FALDINO, 1921, observa en embriones de 21 mm, considerando que la morfología humeral es ya “prácticamente similar” al adulto al describir incluso el ángulo de torsión que lo valora en 60-61°.

HAINES W, 1947, establece un horario diferenciativo de algunas estructuras y formaciones esquelóticas.

En embriones de 12 mm los núcleos cartilaginosos a nivel del hombro y codo presentan ya morfología característica aunque a nivel del miembro inferior, cadera y rodilla, permanecen aún en fase precondral. En embriones de 18 mm establece la futura cápsula articular y ligamentos intrínsecos.

HAYNES, 1947, observa la condensación capsular humero-cubital en embriones de 20 mm, procedente del blastema existente entre húmero, cúbito y radio en embriones de 12 mm. Las condensaciones perizonales se extienden desde húmero a cúbito y radio a partir de los 17 mm, para así establecer el esbozo de los ligamentos colaterales y anular.

STREETER, 1949, considera que el húmero ha adquirido su morfología normal en embriones de 14-16 mm, describiendo a partir de los 27 mm la formación anular o collar preóseo.

GRAY y GARDNER, 1950, condrales en húmero, cúbito y radio en embriones de 13 a 15 mm, identifican en el tercio proximal diafisario del cúbito al olecranon y a partir de los 17 mm, el proceso coronoides; los blastemas precondrales de cúbito y radio lo forman un acúmulo voluminoso celular, en su porción distal que progresivamente no solo disminuye sino que se divide, por lo que en embriones de 20 mm, la condricación de las epífisis distales es independiente así como la presencia de conjuntos pericondrales.

BLECHSCHITD, 1951-1956, describe a partir de la sexta semana, la diferenciación de las paletas mania y pedia, así como los núcleos cartilagosos a nivel del hombro y codo que presentan morfología característica, no así a nivel de miembro inferior en que los correspondientes a cadera y rodilla permanecen aún en fase precondral.

GRAY, GARDNER y O'RAHILLY, 1957, describen la presencia de radio y cúbito en fase de mesénquima condensado en el estadio 16, 8-11 mm, en el que inicia el proceso de condricación en el radio, estadio 17, 11 a 13 mm, fase en la que los esbozos condrales se separan proximalmente, mientras que a nivel distal se mantienen como condensación única en continuidad con el blastema indiferenciado de la paleta mania en la que se están iniciando los relieves digitales en el horizonte 19, 17-20 mm, los procesos estiloides de radio y cúbito están ya definidos. En el horizonte 21, 22-24, los elementos esqueléticos de la mano cuyos esbozos blastemáticos estaban presentes en el estadio 17, inician el proceso de condricación en capitata y hamatum y finalizando en lunatum y pisiforme; a nivel de la paleta mania, los dedos inician su condricación en secuencia próximo distal en el horizonte 23, 28-30 mm, siendo primero los metacarpianos y falanges proximales para finalmente hacerlo algunas falanges medias distales ya que por regla general, este proceso la mayoría lo inician y finalizan en periodo fetal.

O'RAHILLY y GARDNER, 1972, describen en el estadio 21, 22-24 mm, la presencia de condensación condroide en húmero y radio, no en tibia y cúbito; en el estadio 22, 22-28 mm, células osteoides e incluso manguito peridiafisario en húmero e inicio en radio, fémur, tibia y cúbito, aunque no lo observan en peroné en el que lo describen ya más avanzada la fase e incluso en periodo fetal, 30 mm, a la vez que individualizan condensaciones para los metacarpianos y primeras falanges. Cuando la flexión de la rodilla es evidente, embriones de 17-19 mm, las columnas mesodérmicas digitales, presentan áreas necróticas en los espacios interdigitales que estudia y mejor describe, MILAIRE, 1963.

En embriones de 20-24 mm consideran como la porción distal condrificada de la fíbula, entra en contacto con el calcáneo, disposición que se mantiene hasta final del periodo embrionario; previamente en embriones de la sexta semana, 14 mm, el blastema condensado correspondiente a maléolo tibial, se extiende más distalmente que la fíbula, embriones de 17-21 mm, disposición que se modifica progresivamente hasta alcanzar el predominio tibial.

Para LANGMAN, 1977, la porción distal del esbozo en su conjunto, se aplana para así formar las placas mania y pedia como "medio" de crecimiento y normalización distal.

GUILLEN y cols., 1981, describen como en embriones de 20 mm, el pie se sitúa en prolongación con la pierna, habida cuenta que la dorsi-flexión y angulación del tobillo, movimiento dependiente al cada vez más acentuado desplazamiento del calcáneo bajo el astrágalo así como al progresivo crecimiento fibular, embriones de 23 mm, fase en la que se establece por vez primera interzonas.

Al final del periodo embrionario, las características posicionales son equino-varo-adducción; así mismo observan como astrágalo y calcáneo a los 15

mm, situados en prolongación con tibia, inician el mecanismo de traslación o desplazamiento que lo finalizan a los 28-30 mm.

HINRICHSEN, 1994, realiza un amplio estudio de las diferencias en la formación, modelo y organización de la mano y pie, tanto en el esbozo y estructuras del miembro superior como inferior; la predeterminación del núcleo mesenquimal que lo ocupa, presenta homogeneidad celular. La primera condensación se sitúa en la base de implantación del miembro, estadio 14 para miembro superior y 15 para inferior, iniciándose un proceso de condricación del futuro esqueleto en los estadios 16 y 18 respectivamente, finalizando en el 21 en las falanges proximales y 23 en las distales.

JIMENEZ COLLADO, 2008, en embriones de 11-14 mm, describe núcleos blastemáticos a nivel de los esbozos ya definidos distal de fémur y proximal de tibia, unidos por blastema no diferenciado, determinándose áreas o niveles tisulares que predeterminan zona articular, que en dependencia al proceso de maduración y diferenciación tisular, van desplazándose y recubriendo los extremos de ambas formaciones con una uniforme y continua capa de pericondrio.

Las condensaciones definidas de blastemas ya diferenciados en fase precondral de muslo, pierna y más tardíamente de pie, las estudia en embriones de 13 a 17 mm observando en los más avanzados, áreas de condricación en fémur, proceso diferenciativo más evidente en tercio medio, disposición por la que los extremos distales tanto de fémur como de tibia inician el mecanismo de condricación con rapidez en dependencia a la suma de procesos propios de división celular, mayor presencia de material intercelular, de fibras de colágena así como liberación de sustancia fundamental.

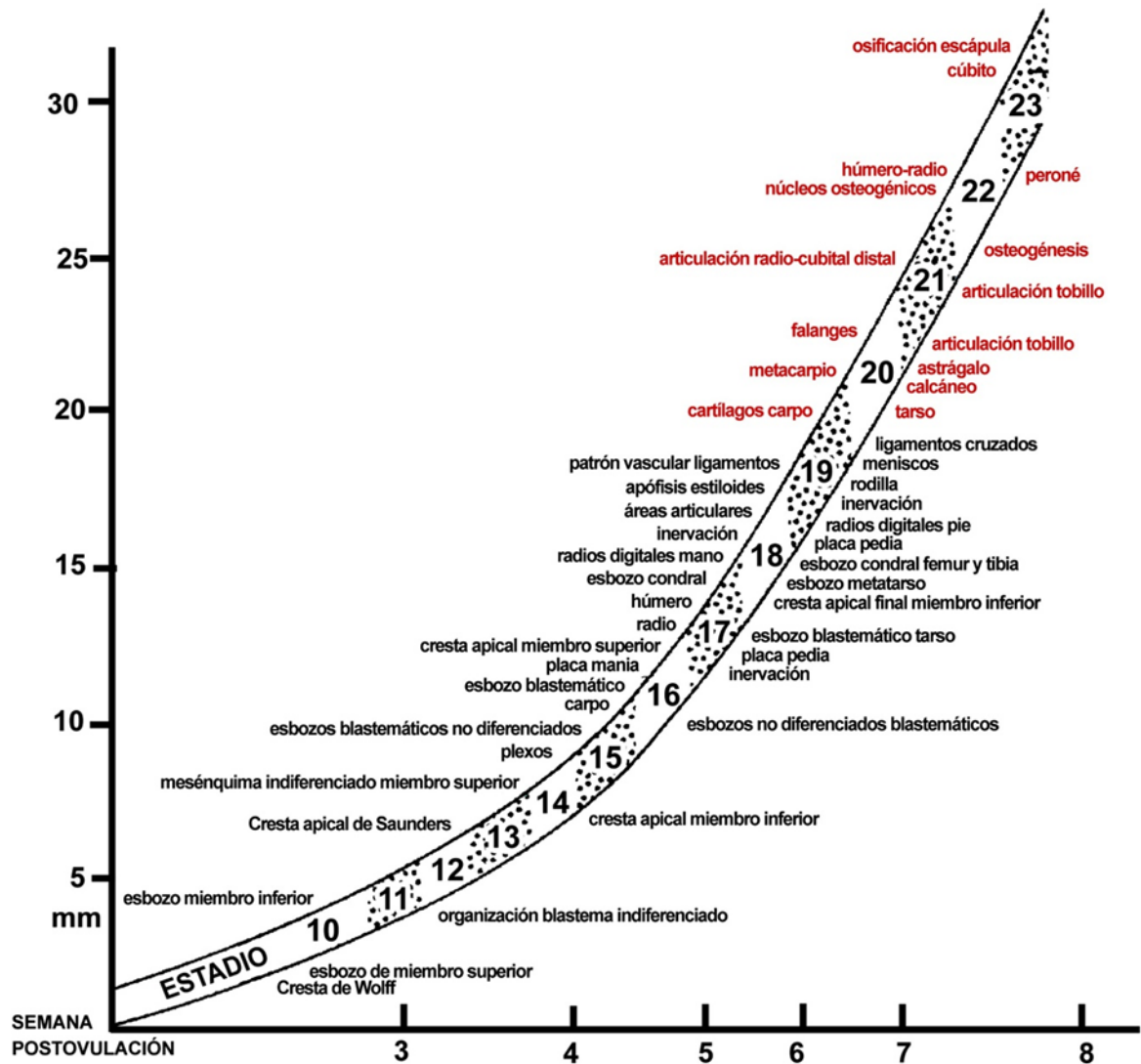
En embriones de 16-18 mm, cóndilos femorales y meseta tibial están definidos, iniciándose la condricación e individualización tibio-fibular. Describe prácticamente constante como en este periodo, la condensación blastemática correspondiente a rótula situada en la cara profunda del músculo cuádriceps, aun parcialmente separada de él, es manifiesta; este proceso diferenciativo sufre un rápido crecimiento, por lo que en embriones de 20 mm a la vez que la condensación fibular y agregado celular rotuliano está mejor organizado, los cóndilos femorales y meseta tibial presentan áreas de maduración condral, preósea, más evidentes en embriones al final del periodosomático.

El estudio por nosotros realizado y referido en estos dos Protocolos finales del Periodo Embrionario, consideramos pueden establecer un horario morfodiferenciador secuencial facilitando la integración referencial anterior.

CONCLUSIONES

1. El mecanismo causal en los estadios iniciales de la morfogénesis de miembro, se establece a partir de la interdependencia y regulación epitelio-mesenquimal de las áreas miembro-formadoras.
2. La condricación y crecimiento del esbozo de miembro, se realiza según eje próximo-distal.
3. Admitida la secuencia próximo-distal, el esbozo de miembro no puede ser considerado como un "mosaico", ya que en estas fases aun no contiene ni están firmemente determinados los territorios prospectivos distales.
4. Todo elemento celular integrado en el proceso diferenciador, es un sistema en desarrollo con capacidad de definir una posición específica en relación con uno o más puntos de referencia de su propio sistema.
5. La Cresta de WOLFF, relieve mesenquimal de la somatopleura, la describimos por vez primera conjuntamente con el esbozo inicial de miembro en embriones de 2,3 mm, estadio 10 CARNEGIE.
6. La Cresta Apical de SAUNDERS se observa y describimos en tiempos distintos: en el esbozo de miembro superior lo hace en embriones de 2,5 mm, estadio 10 CARNEGIE, finalizando a los 15 mm, estadio 18 CARNEGIE.
En el esbozo de miembro inferior, se esboza en el estadio 13 CARNEGIE, manteniéndose hasta el estadio 19, embriones de 19 mm, carácter que clasifica diferencias cráneo-morfológicas entre miembros, presenta por tanto, directa dependencia al horario morfológico.
7. La Cresta Apical de SAUNDERS es el reflejo morfológico de la interdependencia epitelio-mesenquimal en el desarrollo del miembro.

8. Consideramos e interpretamos en el momento presente, que la interacción epitelio-mesenquimal, punto de controversia y factor complejo-regulador-inductor, incide formalmente en la determinación y morfogénesis de los miembros.
9. Observamos y describimos como el primer contingente o acúmulo celular del esbozo de miembro, es somatopleural, al que le sigue en tiempo, la aportación somítica una vez en ella producida la división en mio-esclerotomo y dermatomo.
10. Consideramos como consecuencia de la temprana vascularización e inervación, que ambas formaciones juegan un importante papel no solo en el desarrollo sino en la diferenciación estructural mio-condral del mesénquima indiferenciado del esbozo de miembro.
11. Hemos estudiado y descrito el periodo embrionario humano incidiendo con especial atención en las primitivas formaciones blastemáticas, su origen y evolución, para secuencialmente llegar a un análisis de su diferenciación formal a nivel de miembro de las estructuras mio-condrales, que con la venia de este Tribunal proyectamos.



BIBLIOGRAFÍA

- AGNISH ND, KOCHHAR DM. (1977).- The role of somites in the growth and early development of mouse limb buds. *Dev Biol. Mar*; 56(1):174-83.
- AL GHAI TEH H, LEWIS K. (1996).- The importance of timing differentiation during limb development. *Dev Biol.* 1780:343-362.
- AMPRINO R, CAMOSSO M. (1955).- Le role morphogenetique de la crete ectodermique apicale du bourgeon des membres de l'embryon de poulet. *Cr Ass Anat.* 42:197-203.
- AMPRINO R, CAMOSSO M. (1955).- Ricerche sperimentali sulla morfogenesi degli arti nel pollo. *J Experimental Zool.* 129:453-493.
- AMPRINO R, CAMOSSO M. (1956).- Etude experimentale de la morphogenese de l'aile dans l'embryon de poulet. *Recherches par la methode des marques colorées.* *Arch Biol.* 67:613-633.
- AMPRINO R, CAMOSSO M. (1958).- Analisi sperimentale dello sviluppo dell'ala nell'embrione di pollo. *Wienel Roux Arch.* 150:509-541.
- AMPRINO R, CAMOSSO M. (1959).- On the role of the "apical ridge" in the development of the chick embryo limb bud. *Acta Anat.* 38: 280-8.
- AMPRINO R, CAMOSSO M. (1966).- Developmental influences exerted by the pre-axial upon the distal territories of the chick embryo limb bud. *Acta Anat.* 63 (3):363-87.
- AMPRINO R. (1964).- Relations morphogenetiques entre l'ectoderme et le mesoderme dans le developpement des membres. *Arch Biol.* 75:1047-1050.
- AMPRINO R. (1965).- Aspects of limb morphogenesis in the chicken. *Organogenesis.* Ed Dehaan. 255-282.
- BALFOUR FM. (1881).- On the development of the skeleton of the paired fins of elasmobranchii, considered in relation to its bearings on the nature of the limbs of the vertebrata. *Proc. Zool. Soc. London.* 662-671.

- BALINSKY BI. (1931).- Zur dynamik der extremitäten knospen bildung. Wilhelm roux' archiv fur entwicklungsmechnik der organismen. 123:565–648.
- BALINSKY BI. (1957).- New experiments on the mode of action of the limb inductor. Journal of Experimental Zoology. 134:239–273.
- BALINSKY BI. (1974).- On the role of the ectoderm in the limb development of the chick limb. Dev Biol. 13:101-124.
- BALINSKY BI. (1981).- Introduction to embryology, 5th ed. Saunders. Philadelphia.
- BARDEEN CR, HARMON LEWIS W. (1901).- The development of the limb body-walls and back in man. Amer J Anat. 1:1-36.
- BARDEEN CR, LEWIS WH. (1901).- The development of the limbs, body-wall and back in man. Am J Anat 1:1-35.
- BARDEEN CR. (1905).- Studies on the development of human skeleton. Amer J Anat. 4:265-302.
- BAUER G. (1827).- Bremerkungen uber dens astragulus und das intermedium tar. Jahrb. vol 11: 468-483.
- BAYLIES MK, MICHELSON AM. (2001).- Invertebrate myogenesis: looking back to the future of muscle development. Curr Opin Genet Dev. aug11(4):431-9.
- BLECHSCMIDT E. (1951).- Die frühembryonale lageentwicklung der gliedmaßen. Entwicklung der extremitäten beim menschen. Z Anat Entwickl Gesch. 115:529-540.
- BLECHSCMIDT E. (1956).- Der menschliche embryo. Stuttgart. Schattauer.
- BLECHSCMIDT E. (1969).- Entwicklungsfunktionelle untersuchungen am bewegungsapparat. Acta Anat. 27:62-88.
- BRAND-SABERY B. (1993).- The ventralizing effect of the notochord on somatic differentiation in chick embryos. Anat Embryol. 188:239-245.

- BRAND-SABERY B. (1996).- N-cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud. *Dev Biol.* 25:160-173.
- BRAND-SABERY B. (1996).- Scatter factor/hepatocyte growth factor (sf/hgf) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev Biol.* 179: 303-308.
- BRAND-SABERY B. (1999).- An experimental analysis of the development capabilities distal parts avian leg buds. *Am J Anat.* 173:321-340.
- CAIRNS JM. (1966).- Cell generation times and growth of chick wing bud. *American Zoologist.* 6:328.
- CAIRNS JM. (1975).- The function of the ectodermal apical ridge and distinctive characteristics of adjacent distal mesoderm in the avian wing-bud. *J Embryol Exp Morphol.* 34(1):155-169.
- CAMERON IL. (1964).- Is the duration of DNA synthesis in somatic cells of mammals and birds a constant?. *J Cell Biol.* 20:185-188.
- CAPDEVILA J. (1998).- Control of dorsoventral somite patterning by wnt-1 and β -catenin. *Dev Biol.* 193:182-194.
- CAPDEVILA J. (1999).- Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell.* 4:839-849.
- CAPDEVILA J. (2001).- Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Cell Dev Biol.* 17:87-132.
- CAPLAN AI. (1981).- The control of muscle and cartilage development in the chick limb. *J Embryol Exp Morphol.* 29:571-583.
- CAPLAN AI. (1984).- Effects of the nicotinamide-sensitive teratogen of chick limb. *Exp Cell Res.* 62: 341-355.
- CARTER TC. (1954).- Genetic of luxate mice. *J Genet.* 52:1-35.
- CHAUBE S. (1959).- On axiation and symmetry in transplanted wing of the chick. *J Exp Zool.* 140:29-79.

- CHEVALIER AM. (1976).- Sur l'origine de la musculature de l'aile chez les oiseaux. *Conc R Hebd Acad Sci.* 282:309-311.
- CHEVALLIER A, KIENY M, MAUGER A. (1978).- Limb-somite relationship: origin of limb. *J Embryol Exp Morphol.* 41:245-258.
- CHRIST B, BRAND-SABERI B. (2002).- Limb muscle development. *Int J Dev Biol.* 46:905-914.
- CHRIST B, BRAND-SABERI B. (2002).- Limb muscle development. *Int J Dev Biol.* 46: 905-914.
- CHRIST B, JACOB HJ, JACOB M. (1979).- Differentiating abilities of avian somatopleural mesoderm. *Experientia.* 15; 35(10):1376-8.
- CHRIST B. (1974).- Über den ursprung der flügelmuskulatur. Experimentelle untersuchungen mit wachtel-und hühnerembryonen. *Experientia.* 30: 1446-1448.
- CHRIST B. (1977).- Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol.* 150:171-186.
- CHRIST B. (1983).- On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. *Anat Embryol.* 166:87-101.
- CHRIST B. (1995).- Early stages of chick somite development. *Anat Embryol.* 191:381-396.
- CROSSLEY PH, MARTIN GR. (1995).- The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* 121(2):439-51.
- DALCZ A. (1938).- Une conception nouvelle des bases physiologique de la morphogeneses. *Arch Biol.* 48:669.
- DAWD DS, HINNCHLIFFE JR. (1971).- Cell death in the 'opaque patch' in the central mesenchyme of the developing chick limb: a cytological, cytochemical and electron microscopic analysis. *Embryol Exp. Morph.* vol. 26: 401-424.

- DE MOERLOOZE L, SPENCER-DENE B, REVEST JM, HAJIHOSSEINI M, ROSEWELL I, DICKSON C. (2000).- n important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development*. 127(3):483-92.
- DEHAAN RL. (1959). Citado por Orts. 1975.
- DETWILER SR. (1933).- On the time of determination of the antero-posterior axis of the forelimb in amblystoma. *J Exp Zool*. 64:405-414.
- DHOUAILLY D, KIENY M. (1972).- The capacity of the flank somatic mesoderm of early bird embryos to participate in limb development. *Dev Biol*. 28(1):162-75.
- DI MARIO JX. (1997).- Both myoblast lineage and innervation determine fiber type. *Dev Biol*. 188:167-180.
- DOLLÉ P, DIERICH A, SCHIMMANG T, SCHUHBAUR B, LEMEURE M, CHAMBON P, DUBOULE D. (1993).- Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell*. 75: 431-41
- DRUSHEL RF, PECHAK DG, CAPLAN AI. (1985).- The anatomy, ultrastructure and fluid dynamics of the developing vasculature of the embryonic chick wing bud. *Cell Differ*. 16(1):13-28.
- DUESBERG M. (1926). Citado por Orts 1975.
- DUGÈS AL. (1838).- *Tratado de fisiología comparada*.
- DUPREZ D. (2002).- Signals regulating muscle formation in the limbs during embryonic development. *Dev Biol*. 46:915-926.
- FALDINO G. (1921).- *Recerche sullo sviluppo delle articolazione*. *Chi D Org*. 5:609-651.
- FALLON JF, LÓPEZ A, ROS MA, SAVAGE MP, OLWIN BB, SIMANDL BK. (1994).- FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, 264: 104-107.
- FUJITA S. (1962).- Kinetic of cellular proliferation. *Exp Cell Res*. 28:52-60.

- FULLAT L. (1921).- El origen de los músculos de las extremidades. Tesis Doctoral. Rev Medica de Barcelona. Tomo VI nov 26.
- GADNER E, GRAY DJ. (1956).- The prenatal development of the skeleton and joints of the human foot. *J Bone Jt Surg.* 41:847-876.
- GEGENBAUR K. (1870).- Über das skelet der gliedmassen der wirbeltiere im allgemeinen und der hintergliedmassen der selachier insbesondere. *Jenaische Z. Med. Naturwiss.* 5: 397-447.
- GOEL SC, MATHUR JK. (1977).- Morphogenesis in reptilian limbs. In ed. D.A. Ede, J. R. Hinchliffe, and M. Balls, 387-404. Cambridge: Cambridge University Press.
- GORDON ROBERTSON G. (1955).- A study of abnormalities in early chick embryos inoculated with newcastle disease virus. *J Exp Zool.* 129:5-43.
- GRAY DJ, GADNER E, O'RAHILLY R. (1957).- The prenatal development of the human humerus. *Amer J Anat.* 124:431-445.
- GRAY DJ, GADNER E. (1950).- The prenatal development of the skeleton and joints of the human hand. *Amer J Anat.* 101:169-223.
- GUILLEN P. (1984).- Embriología del calcáneo. *Act Traumat.* 64:135-153.
- GUSTAFSON T. (1963).- The cellular basis of morphogenesis and sea urchin development. *Int Rev Cytol.* 139:214-15.
- HAGEN W. (1900).- Die bilding des knorpelskelet beim menschlichen embryo. *Arch F Anat and Physiol. Abth.* 1-40.
- HAYNES RW. (1947).- The development of joints. *J Anat.* 81:33-55.
- HESSER C. (1926).- Beitrag zur kenntnis des galenentwicklung. *Anat Embryol.* 55:489-567.
- HINCHLIFFE JR, JOHNSON DR. (1980).- The development of the vertebrate limb: an approach through experiment, genetics and evolution. The clarendon press, oxford university press. 269.
- HINCHLIFFE JR. (2002).- Developmental basis of limb evolution. *J Dev Biol.* 46:835-845.

- HIRSINGER E. (1997).- Noggin acts downstream of WNT and sonic hedgehog to antagonize bmp4 in avian somite patterning. *Development*. 124 (22): 4605-14.
- HULTKANZ J. (1872).- Handbuch der systematischen anatomie des menschen. *J Anat Physio*. 6: 432.
- HURLE J, HINCHLIFFE JR. (1978).- Cell death in the posterior necrotic zone (PNZ) of the chick wing-bud: a stereoscan and ultrastructural survey of autolysis and cell fragmentation. *Embryol. exp. Morph.* vol. 43, pp. 123-136.
- HURLE JM, FERNANDEZ-TERAN MA. (1983).- Fine structure of regressing interdigital membranes during the formation of the digits of the chick embryo leg bud. *J Embryol Exp Morph*, 78:195–209.
- JACOB M, JACOB JH, CHRIST B. (1975).- Die frühe Differenzierung des chordanahen Bindegewebes. Raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an Hühnerembryonen. [The early differentiation of the perinotochordal connective tissue. A scanning and transmission electron microscopic study on chick embryos]. *Experientia* 31: 1083-1086.
- JACOBSON A, MOURY JD. (1995).- Tissue boundaries and cell behavior during neurulation original research article. *Dev Biol*. 98-110.
- JANNERS MY, SEARLS RL. (1970).- Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol*. 23(1):136-65.
- JANNERS MY, SEARLS RL. (1970).- Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol*. 23:136-65.
- JIMÉNEZ COLLADO, J.; PUCHADES ORTS, A. (1969).- Injertos heterotipicos de mesodermo segmentado de pato, anas, a pollo, gallus gallus. *Ann. Des.* Vol. XVI.

- JIMÉNEZ COLLADO J, MATESANZ A. (1980).- Injertos de esbozos de miembro en estadios IX a XIV de Hamilton- Hamburger. Trab Inst Embriol. 5:121-143.
- JIMENEZ COLLADO J, MATESANZ A. (1982).- Heteroinjertos de miembro en vertebrados. Trab inst embriol 1982; 9:7-21.
- JIMENEZ COLLADO J, PUCHADES A. (1973).- Injertos heterotópicos de mesodermo segmentado de pato (anas) al pollo (galles gallus). Anat desarro. 15:36:207-218.
- JIMENEZ COLLADO J. (1971).- Análisis experimental de la capacidad condrogénica. J Rev Cir Ortop. 27.
- JIMENEZ COLLADO J. (1980).- Cresta apical de Saunders; significado y dependencia diferenciadora en morfogénesis apendicular. Conf R Acad. Santander.
- JIMENEZ COLLADO J. (1981).- Cultivo in vitro de esbozos de miembro. Trab Inst Embryol. 2:64-79.
- JIMENEZ COLLADO J. (1982).- Autodiferenciación de cartílago a partir de injertos de mesonefros. J Rev Cir Ortop. 31.
- JIMENEZ COLLADO J. (1983).- Descripción de un embrión humano de tres pares de somitos. An Desarrollo. 11: 150-158.
- JIMENEZ COLLADO J. (1986).- Desarrollo articular. Conf R Acad. Santander.
- JIMENEZ COLLADO J. (1989).- Sur une methods de cultura d'organes embryonares in vitro. Biol. 10:463-470.
- JIMENEZ COLLADO J. (1993).- The early development of the shoulder joint. Ann Meeting of Am Ant Res.
- JIMENEZ COLLADO J. (1999).- El mecanismo formal del cingulum en embriones de vertebrado. Trab Inst Embryol. 3:27-41.

- JIMENEZ COLLADO J. (2002).- ¿La articulación intervertebral discosomática puede considerarse una diartrosis? *Ann Real Acad Nac Medic.* XX.
- JIMENEZ COLLADO J. (2008).- The development of somatopleura in the embryonic limb buds. *Train Develop Biol.* 149:36-41.
- JIMENEZ COLLADO J. (2011).- The early development of limb in human stages. *Train Develop Biol* 164:1-16. *Ann Real Acd Medic.*
- JIMENEZ COLLADO J. (1973).- Desarrollo y diferenciación de miembro en embriones de ave. *Trab inst embriol.* 3:27-41.
- JURAND A. (1965).- Ultrastructural aspects of early development of the forelimb buds in the chick and mouse. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 162:387-405.
- KALLMAN F, GROBSTEIN C. (1965).- Source of collagen at epitheliomesenchymal interfaces during inductive interaction. *Dev Biol.* 11:169-83.
- KELLEY RO, GOETINCK PF, MACCABE JA (eds). (1983).- *Limb development and regeneration, part b.* Liss, New York.
- KELLEY RO. (1973).- Fine structure of the apical rim-mesenchyme complex during limb morphogenesis in man. *Embryol. Exp. Morph.* 29 (1): 117-131.
- KIENY M, MAUGER A, SENDEL P. (1972).- Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of axial skeleton of the chick embryo. *Dev Biol.* 28(1):142-61.
- KLEIN G. (1988).- Role of laminin a chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell.* 55(2):331-41.
- KRAYANEK S, GOLDBERG S. (1981).- Oriented extracellular channels and axonal guidance in the embryonic chick retina. *Dev Biol.* 84(1):41-50.
- KRUG EL, MJAATVEDT CH, MARKWALD RR. (1987).- Extracellular matrix from embryonic myocardium elicits an early morphogenetic event in cardiac endothelial differentiation. *Dev Biol.* 120(2):348-55.

- KRUG EL, RUNYAN RB, MARKWALD RR. (1985).- Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation. *Dev Biol.* 112(2):414-26.
- LANCE-JONES C, LANDMESSER L. (1980).- Motoneurone projection patterns in the chick hind limb following early partial reversals of the spinal cord. *J Physiol.* 302:581-602.
- LANCE-JONES C, LANDMESSER L. (1980).- Motoneurone projection patterns in embryonic chick limbs following partial deletions of the spinal cord. *J Physiol.* 302:559-80.
- LANCE-JONES C. (1988).- The somitic level of origin of embryonic chick hindlimb muscles. *Dev Biol.* 126(2):394-407.
- LANDMESSER LT. (1980).- The generation of neuromuscular specificity. *Annu Rev Neurosci.* 3:279-302.
- LE DOUARIN N, BARQ, G. (1969).- Sur l'utilisation des cellules de la Caille japonaise comme "marqueurs biologiques" en embryologie expérimentale. *C.R. Acad. Sci. Paris,* 269:1543-1546.
- LEWIS WH. (1920).- The cartilaginous skull of a human embryo twenty-one millimeters in length. *Contrib Embryol.* 9:299-324.
- LEWIS WT. (1902).- The development of the arm in man. *Am J Anat.* 1:145-183.
- MACCABE JA, MACCABE AB, ABBOTT UK, MCCARREY JR. (1975).- Limb development in diplopodia4: a polydactylous mutation in the chicken. *J Exp Zool.* 191(3):383-94.
- MACCABE JA, PARKER BW. (1975).- The in vitro maintenance of the apical ectodermal ridge of the chick embryo wing bud: an assay for polarizing activity. *Dev Biol.* 45(2):349-57.
- MACCABE JA, PARKER BW. (1976).- Polarizing activity in the developing limb of the Syrian hamster. *J Exp Zool.* 195(2):311-7.

- MACCABE JA. (1974).- Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol.* 39(1):69-82.
- MANSON JM, MILLER ML. (1983).- Contribution of mesenchymal cell death and mitotic alteration to asymmetric limb malformations induced by MNNG. *Teratog Carcinog Mutagen.* 3(4):335-53.
- MARCHOK AC, HERRMANN H. (1967).- Studies of muscle development. I. Changes in cell proliferation. *Dev Biol.* 15(2):129-55.
- MAUGER A, KIENY M. (1980).- Migratory and organogenetic capacities of muscle cells in bird embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 189:123-134.
- MAUGER A, KIENY M. (1980).- Migratory and organogenic capacities of muscle cells in bird embryos. *Wilhelm Roux's Arch.* 189:123-134.
- MAUGER A. (1980).- Limb-somite relationship: myogenic potentialities of somatopleural mesoderm. *Arch Anat Micr Morphol Exp.* 69(3):175-195.
- MESTRES P, HINRICHSSEN K. (1976).- Zur histogenese des somiten beim hiihnchen. *J Embryol Exp Morph.* 36(3): 669-683.
- MICHAUD JL, LAPOINTE F, LE DOUARIN NM. (1997).- The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development.* 124(8):1453-63.
- MILAIRE J, ROOZE M. (1983).- Hereditary and induced modifications of the normal necrotic patterns in the developing limb buds of the rat and mouse: Facts and hypotheses. *Arch. Biol. (Bruxelles),* 94:459-490.
- MILAIRE J. (1957).- Contribution à la connaissance morphologique et cytochimique des bourgeons de membres chez quelques reptiles. *Arch Biol.* 68: 429-512.
- MILAIRE J. (1959).- Cytochemical predifferentiation of various cephalic configurations in the mouse embryo. *Arch Biol.* 70:587-730.
- MILAIRE J. (1963).- Le role de la cape apicale dans la formation des membres des vertebres. *Ann Soc Roy Zool.* 91:124-145.

- MILAIRE J. (1965).- Aspects of limb morphogenesis in mammals. In *Organogenesis*, ed. R.L. DeHaan&H.Ursprung, pp. 283-300. New York: Holt, Rinehart&Winston.
- MILAIRE J. (1967).- Histochemical study of the 1st stages of development of the limbs in chickens (stages 13 to 19). *Arch Biol.* 78(3):286-346
- MILAIRE J. (1969).- Etude morphogénétique de las syndactylie postaxiale provoquée chez le rat par l'hadacidine. *Arch Biol.* 80:167.
- MILAIRE J. (1973).- Indices d'une participation morphogene de l'epiblaste au cours du developpement des membres chez les mammiferes. *Arch. Biol.* 84: 87-114.
- MILAIRE J. (1977).- Histochemical expression of morphogenetic gradients during limb morphogenesis (with particular reference to mammalian embryos). *Birth Defects Orig Artic Ser.* 13(1):37-67.
- MIVART G. (1879).- Notes on the Fins of Elasmobranchs, with Considerations on the Nature and Homologues of Vertebrate Limbs. *The Transactions of the Zoological Society of London.* Volume 10, Issue 10, pages 439-484.
- MURILLO-FERROL N.L. (1965).- Étude causale de la différenciation la plus précoce de l'ébauche morphologique des membres. Analyse expérimentale chez les embryons d'oiseaux. *Acta Anatomica.* 62:80-103.
- MURILLO-FERROL NL. (1963).- Análisis experimental de la participación del mesoblasto paraaxial en la morfogénesis de los miembros en el embrión de aves. *Anal Desar.* 11:63-76.
- NATHANSON MA, HAY ED. (1980).- Analysis of cartilage differentiation from skeletal muscle grown on bone matrix. I. Ultrastructural aspects. *Dev Biol.* 78(2):301-31.
- NISWANDER L, MARTIN GR. (1992).- Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development.* 114(3):755-68.

- NISWANDER L, TICKLE C, VOGEL A, BOOTH I, MARTIN GR. (1993).- FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*. 75(3):579-87.
- OHUCHI H, NAKAGAWA T, YAMAMOTO A, ARAGA A, OHATA T, ISHIMARU Y, YOSHIOKA H, KUWANA T, NOHNO T, YAMASAKI M, ITOH N, NOJI S. (1997).- The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*. 124(11):2235-44.
- O'RAHILLY R, GARDNER E. (1972).- The initial appearance of ossification in staged human embryos. *Am J Anat*. 134(3):291-301.
- O'RAHILLY R, GARDNER E. (1975).- The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo. *Anat Embryol (Berl)*. 6;148(1):1-23.
- O'RAHILLY R. (1948).- Chondrification in the hands and feet of staged human embryos. Carnegie institution of washington. *Contrib Embryol*. 250:165-191.
- O'RAHILLY R. (1951).- Morphological patterns in limb deficiencies and duplications. *Am J Anat*. 89 (2):135-93.
- O'RAHILLY R. (1957).- The development of joints. *Ir J Med Sci*. (382):456-61.
- O'RAHILLY R. (1963).- The early development of the otic vesicle in staged human embryos. *Embryol Exp Morphol*. 11:741-55.
- O'RAHILLY R. (2010).- Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs*. 192(2):73-84.
- ORDAHL CP, LE DOUARIN NM. (1992).- Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*. 114(2):339-53.
- ORTS-LLORCA F, JIMÉNEZ-COLLADO J. (1969).- The development of heterologous grafts, labeled with thymidine-3h in the cardiac area of the chick blastoderm. *Developmental Biology*. 19: 213-227.

- ORTS-LLORCA F, JIMÉNEZ-COLLADO J. (1971).- 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 japonica*). Archivos De La Facultad De Medicina De Madrid. 20: 61-74.
- ORTS-LLORCA F, JIMÉNEZ-COLLADO J. (1992).- Diferenciación del patrón celular de esbozos de miembro en embriones de vertebrados. Conf Col Médicos Murcia.
- ORTS-LLORCA F. (1981).- New technique: grafts labeled with isotopes in embryology. Real Academia Nacional Medicina. Tomo XXXII.
- PARR BA, MCMAHON AP. (1995).- Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. Nature. 23; 374(6520):350-3.
- PIGANIOL G. (1959).- Le développement des nerfs du member superieur. Arch Anat Path. 6:59-70.
- POLLAK RD, FALLON JF. (1976).- Autoradiographic analysis of macromolecular syntheses in prospectively necrotic cells of the chick limb bud. II. Nucleic acids. Exp Cell Res. 100(1):15-22.
- PUCHADES A. (1968).- Injertos de miembro interespecie. Tesis doctoral.
- PUCHADES A. (1976).- Desarrollo y diferenciación de heteroinjertos de esbozos de miembros en embriones de ave. Anal Desarr. 48:57-64.
- RETTERER E. (1902).- Contribution au developpement du squelette des extremités chez les mammiferes. Janat Phys. 29: 467-614.
- RETTERER, E. (1902).- Ebauche squelettogene des membres et developpement des articulations. Journal of anatomy and physiology. 38:473-509.
- REUSS C, SAUNDERS JW. (1965).- Inductive and axial properties of prospective limb mesoderm in the early chick embryo. Am. Zool. (abstr.) 5: 214.

- RICHARDSON MK. (1990).- Mechanisms of pigment pattern formation in the quail embryo. *Development*. 109, 81-89.
- ROUX GH. (1947).- The cranial development of certain ethiopian "insectivores" and its bearing on the mutual affinities of the group. *Acta Zool*. 28:1-233.
- SAUNDERS JW, GASSELING MT. (1962).- Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol*. 5:147-78.
- SAUNDERS JW, GASSELING MT. (1968).- Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *Epithelial-mesenchymal interactions*. 78-97.
- SAUNDERS JW. (1972).- The origin and movement of the limb-bud epithelium and mesenchyme in the chick embryo as determined by radioautographic. *J Embryol Exp Morph*. 25:85-96.
- SAUNDERS JW. (1998).- The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool*. 282 (6): 628-68.
- SCHLESSINGER J, PLOTNIKOV AN, IBRAHIMI OA, ELISEENKOVA AV, YEH BK, YAYON A, LINHARDT RJ, MOHAMMADI M. (2000).- Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*. 6(3):743-50.
- SEKINE K, OHUCHI H, FUJIWARA M, YAMASAKI M, YOSHIZAWA T, SATO T, YAGISHITA N, MATSUI D, KOGA Y, ITOH N, KATO S. (1999).- Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet*. 21(1):138-41.
- SENIOR HD. (1929).- The chondrification of the human hand and foot skeleton. *Anat Rec*. 42:35.
- SENIOR JW. (1929).- Developmental horizons. *Anat Rec*. 42:41-42.
- SHELLSWELL GB. (1977).- The pattern of muscle and tendon development in the chick wing. *En Fallon y Crosby*. 71-86.
- SHINOHARA H. (1986).- Development of gamma-enolase in system of human embryos. *Act Histochem*. 19:319-328.

- SHINOHARA H. (1988).- Myogenesis in the upper limb bud of human embryo. *Act Anat.* 64:442.
- SHINOHARA H. (1990).- Development of the innervation pattern in the upper limb of staged human embryos. *Acta Anatomica.* 138:265–269.
- SOLURSH M. (1979).- Increase in levels of cyclic amp during avian limb chondrogenesis in vitro. *Different.* 15(3):183-6.
- STEINER K. (1929).- Über die entwicklung und differenzierungsweise der menschlichen haut. *Z Zellforsch Mikros Anat.* 8:691-720.
- STOCKDALE FE. (1997).- Mechanisms of formation of muscle fiber types. *Cell Struct Funct.* 22:37-43.
- STOCKDALE FE, HOLTZER H. (1961).- DNA synthesis and myogenesis. *Exp Cell Res* 24:508-520.
- STOCKER KM. 1990).- Hensen's node, but not other biological signallers, can induce supernumerary digits in the developing chick limb bud. *Roux's Archives of Developmental Biology.* 198:371-381.
- STREETER GL. (1949).- Developmental horizons in human embryos; a review of the histogenesis of cartilage and bone. *Contrib Embryol.* 33(213-221):149-68.
- SUMMERBELL D. (1973).- Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature.* 24;244(5417):492-6.
- SUMMERBELL D. (1974).- Interaction between the proximo-distal and antero-posterior co-ordinates of positional value during the specification of positional information in the early development of the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol.* 32(1):227-37.
- SWANSON GJ, LEWIS J. (1986).- Sensory nerve routes in chick wing buds deprived of motor innervations. *J. Embryol. Exp. Morph.* 95: 37-52.
- SZE L-Y, LEE KKH, WEBB SE, LI Z, PAULIN D. (1995).- Migration of myogenic cells from the somites to the fore-limb buds of developing mouse embryos. *Dev Dyn.* 203:324–336.

- TICKLE C. (1982).- Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature*. 8;296(5857):564-6.
- TSCHUMI PA. (1957).- The growth of the hindlimb bud of *Xenopus laevis* and its dependence upon the epidermis. *J Anat*. 91(2):149-173.
- VON BAUER KE. (1827).- Ueber die Kiemen und Kiemengefäße der Wirbeltiere. *Meckel's Archiv*.
- WACHTLER F. (1982).- Grafting experiments on determination and migratory behaviour of presomitic, somitic and somatopleural cells in avian embryos. *Anat Embryol*. 164(3):369-78.
- WACHTLER F. (1991).- Muscle morphogenesis in the absence of myogenic cells. *Anat Embryol*. 183(1):67-70.
- WESSELLS NK. (1964).- DNA synthesis, mitosis and differentiation in pancreatic acinar cells in vitro. *J Cell Biol*. 20, 415-433.
- WESSELLS NK. (1971).- Microfilaments in cellular and developmental processes. *Science*. 15;171(3967):135-43.
- WOLPERT L. (1969).- Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol*. 25:1-47.
- WOLPERT L. (1989).- The embryology of the locomotor system.
- WOLPERT L. (1990).- Signals in limb development: stop, go, stay, and position. *J Cell Sci Suppl*. 13:199-208.
- YASUDA Y. (1973).- Differentiation in vitro of mouse limb of mouse embryos. *Acta Anat*. 41:259-267.
- YASUDA Y. (1973).- Differentiation of human limb buds in vitro. *Anat Rec*. 175:561-579.
- ZWILLING E. (1956).- Reciprocal dependence of ectoderm and mesoderm during chick embryo limb development. *Am Nat*. 90:257-265.
- ZWILLING E. (1961).- Limb morphogenesis. *Advan Morphol*. 1:301-330.