

DESARROLLO DE LA INERVACIÓN DEL MIEMBRO POSTERIOR DEL EMBRIÓN DE RATA BLANCA (*RATTUS NORVERGICUS*, BERKENHOUT, 1769)

DEVELOPMENT OF RAT EMBRYO (*RATTUS NORVERGICUS*, BERKENHOUT, 1769) HINDLIMB INNERVATION

Johanna Suárez-Rairán^{1,2}, Laura Córdoba-Parrado^{1,3}, Hernán Hurtado-Giraldo^{1,4}

Resumen

Se describe el patrón de inervación del miembro posterior con el establecimiento de los plexos lumbosacos y los nervios femoral, ciático, tibial, fibular y plantares en el embrión de rata (*Rattus norvegicus*). La metodología utilizada permitió una mejor visualización de este fenómeno biológico y su relación con otras estructuras corporales como cartilago, ganglios sensoriales y médula espinal ya que todas ellas sufren cambios que se presentan tanto en el espacio como en el tiempo. Además, el modelo 3D generado será de gran utilidad para posteriores investigaciones en este campo, al igual que de herramienta docente para ilustrar de manera sencilla y adecuada este complejo fenómeno.

Palabras clave: desarrollo, embrión de rata, miembro posterior, patrón de inervación.

Abstract

This work describes the pattern of rat embryo hind limb innervation. Especially in relation to the lumbosacral plexus and femoral, ciatic, tibial, fibular, and plantar nerves. The methodology used (3D reconstruction at different developmental stages) allowed a better visualization of this biological phenomenon and its connection to other structures and tissues like cartilage, sensory ganglia and spinal cord, as all these structures and nerves change over time as well as spacially. The 3D model generated will be useful for other studies on this research field, and it also represents an educational tool that simply and clearly illustrates this complex phenomenon.

Key words: development, innervation pattern, hind limb, rat embryo.

INTRODUCCIÓN

La inervación es el modo de distribución anatómica y funcional de los nervios que permite la transmisión de un impulso nervioso a una región del organismo. Esta inervación implica la formación de conexiones muy precisas desde las neuronas hasta sus blancos, es decir, requiere de una alta especificidad para que las prolongaciones en crecimiento lleguen a los tejidos blanco y la propagación de impulsos nerviosos a través de las fibras que se formaron sea correcta (Al-Ghaith y Lewis, 1982; McLennan, 1983; Ross, et al., 1997; Yip y Yip, 1992).

En el caso del sistema motor, el propósito de estudios hechos con vertebrados es entender como la motoneurona debe interactuar con el patrón de desarrollo de los músculos para formar las conexiones precisas requeridas para un movimiento coordinado (Landmesser, 1984). Esto ha llevado a muchos investigadores a buscar modelos diferentes para el estudio de la especificidad de la reinervación, así como para definir la topografía interna de los nervios seleccionados (Honig et al., 1998).

El interés de hacer este estudio en la rata se debe a que en este animal se han hecho la mayoría de las

¹ Programa de Biología Aplicada. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.

² Correos electrónicos: ² <johis201@yahoo.com>, ³ <laurac_rdoaba@hotmail.com>, ⁴ <hurticos@yahoo.com>.

investigaciones sobre la regeneración del nervio periférico (Lowrie y Vrbová, 1992; Mirnics y Koerber, 1995), desconociendo aún el establecimiento del patrón de inervación de este nervio del miembro posterior en las diferentes etapas embrionarias de este animal.

El estudio a desarrollar, junto con los ya realizados en diferentes especies de vertebrados, serán la pauta para dar inicio a una línea de investigación que en un futuro, mediante la comparación de estos, ayudarán a establecer si hay un patrón general de inervación durante el desarrollo embrionario. La utilización del patrón de desarrollo puede servir de guía para el establecimiento de este en el humano y así se pueda contribuir en los estudios de regeneración de los nervios, debido a que hasta el momento no existen sistemas que aseguren una reconexión correcta de los nervios seccionados y sus blancos, conduciendo a una recuperación funcional cuya calidad es difícil de predecir (Montoya et al., 2002).

Hasta el momento se han hecho algunos estudios sobre el establecimiento del patrón de inervación en ratón (Bogusch, 1992; Wanek et al., 1989), en pollo (Al-Ghaith y Lewis, 1982; McLennan, 1983; Wang y Scott, 1997), en conejo (Cameron y McCredie, 1982) y en rata (Montoya et al., 2002), pero ningún estudio ha llegado a una reconstrucción espacial y temporal, razón que lleva a hacer un estudio completo sobre el patrón de inervación y reconstrucción de este tipo, factor importante ya que se trata de un fenómeno que varía tanto en el espacio como en el tiempo.

Este proyecto plantea generar modelos tridimensionales, a diferentes momentos del desarrollo, que muestren la distribución espacial de la inervación del miembro posterior del embrión de rata en relación con otras estructuras corporales como cartílago, vasos sanguíneos, mesénquima, músculos, ganglios sensoriales y médula espinal. Este modelo servirá tanto de insumo para posteriores

investigaciones en este campo, como de herramienta docente para ilustrar de manera sencilla y adecuada este complejo fenómeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas grávidas adultas de 300-400 g de la especie *R. norvegicus* de la cepa Wistar, tipo genético exocriado, de E 13, E 14, E 17 y E 19 días de gestación, correspondientes a los estados de desarrollo (según Witschi), 27, 29, 34 y 35, respectivamente (Baker et al., 1980; Hill, 2000). Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio de Producción del Instituto Nacional de Salud (INS), donde se criaron en condiciones de alimentación, luminosidad, humedad, temperatura y sonoridad controladas. Se usaron 6 ratas grávidas con un promedio de 12 embriones cada una.

Las ratas grávidas se sacrificaron con una sobredosis intraperitoneal de ketamina de 100 mg/rata (Weisbroth y Fudens, 1972) y en los casos en que esta sobredosis no fue efectiva se usaron mascarillas de éter. Se extrajeron los embriones y fueron ubicados en formaldehído 4% durante 5 días a 4 °C. Se tomaron cuatro embriones de cada edad, se realizaron los cortes de dos embriones los cuales fueron analizados y encontrando una similitud en el desarrollo entre estos se reportarán los resultados de un embrión. La edad de los embriones se estableció de acuerdo a las características morfológicas externas y tamaño del embrión teniendo en cuenta los criterios de Baker et al. (1980) y Hill (2000).

Para el procesamiento de los embriones se siguió el protocolo propuesto por Nakao e Ishizawa (1994) y Prophet et al. (1995).

Se realizó una disección para obtener miembros posteriores derechos, que incluyeran una parte de columna vertebral. Se les hizo un lavado en amortiguador fosfato tres veces durante 10 min cada uno. La deshidratación se hizo con concentraciones crecientes de etanol: al 50% tres lavados de 5 min cada

uno; al 70% tres lavados de 5 min cada uno; y al 90, 95 y 100% dos lavados de 10 min cada uno. Finalmente, la impregnación en parafina que incluye dos baños en xilol de 10 min cada uno y tres baños en parafina de una hora cada uno.

Se realizaron cortes seriados de 10 μm de espesor cada uno. Los cortes fueron realizados en disposición transversal para las edades de 17 y 19 días y en el caso de las edades de 13 y 14 días la sección del tronco y los miembros posteriores debido a su posición se cortaron longitudinalmente (figura 1), los cortes se realizaron en dirección próximo-distal. Se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina usando el protocolo propuesto por Hurtado (1990). Después de la coloración de los tejidos se realizó un montaje usando una cantidad apropiada de Entellan®, cubriendo los cortes con laminillas.

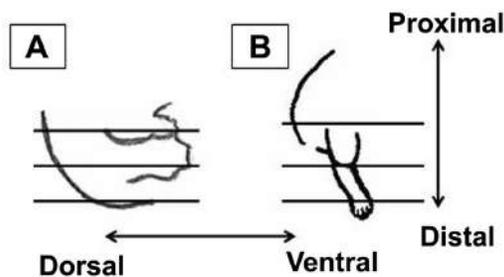


Figura 1. Esquema de la disposición (líneas) de los cortes realizados para cada una de las edades trabajadas. A.- E 13 y E 14; B.- E 17 y E 19.

Se procedió al análisis de los cortes realizados por medio de observaciones microscópicas (microscopio óptico), fotografías (fotomicroscopio) y digitalización de imágenes (microscopio digital) para la reconstrucción tridimensional de la distribución de las fibras nerviosas y el estudio de los tejidos relacionados con los nervios en desarrollo (Bogusch y Dierichs, 1995). Los parámetros que se tomaron en cuenta al realizar el análisis fueron: presencia o ausencia de haces de fibras, ubicación de los haces de fibras y tipos de tejidos que están cerca de los haces de fibras. Los parámetros antes menciona-

dos se tomaron en cuenta para cada edad y nivel del embrión realizado.

Análisis de cortes. Inicialmente se digitalizaron los cortes seriados y se almacenaron en un medio magnético. Debido a la gran cantidad de cortes obtenidos no se digitalizaron todos los cortes, únicamente ciertas secciones las cuales fueron escogidas siguiendo varios criterios como fueron el cambio y la ubicación que presentaban las fibras y las estructuras que facilitarían su ubicación a lo largo del miembro posterior. Los puntos de referencia tisulares utilizados para las edades de 13 y 14 días de gestación fueron la médula espinal y los ganglios sensoriales y para las edades de 17 y 19 días de gestación fueron la médula espinal, los ganglios sensoriales y los primordios cartilagosos de la columna vertebral y la cadera (primera sección-cadera), primordio cartilaginoso femoral (segunda sección-muslo), primordio cartilaginoso tibial y fibular (tercera sección-pierna), y los primordios cartilagosos plantares (cuarta sección-tarsos, metatarsos y dedos).

La digitalización se hizo con un microscopio digital Intel QX3 a 60X controlado por su respectivo programa informático QX3™ *Microscope software*. Cuando los cortes a digitalizar eran muy grandes, fue necesaria la toma de la imagen en varios campos. Las imágenes se almacenaron en formato BMP y se manejó el contraste de tal manera que se volvieron imágenes binarias (blanco y negro) necesarias para la formación de la imagen tridimensional posterior.

Con el programa *Scion Image* las imágenes digitalizadas se procesaron y se realizaron los montajes correspondientes en los casos en que las imágenes se tomaron en más de un campo debido a su dimensión. Con ayuda de este programa y un microscopio Zeiss, utilizando magnificaciones de 50, 100 y 400 X, se dibujaron en el corte los haces nerviosos y se delimitaron los ganglios sensoriales, la médula espinal, y los tejidos cartilagosos. Fue necesario convertir las imágenes a un formato BMP reconocido por los pro-

gramas informáticos *EM (sEM) Align e IGL Trace*, usando el programa *Convert*.

Posteriormente, utilizando el programa informático "*Software serial EM (sEM) Align*", se alinearon los cortes. El programa informático *IGL Trace*, permitió delimitar las regiones correspondientes a los nervios y a otros tejidos en cada corte, utilizando colores diferentes para cada uno de ellos. Además de generar el archivo de reconstrucción 3D.

Finalmente las reconstrucciones se visualizaron con un programa Visor para realidad virtual (*Solidview*).

El programa informático *Scion Image* (de libre distribución) se obtuvo del sitio de internet <www.scioncorp.com>. Los programas informáticos *Align*, *Convert*, *Trace* y los visores VRML se obtuvieron del sitio Internet: <<http://synapses.mcg.edu/tools/index.stm>> (también de libre disposición para su uso).

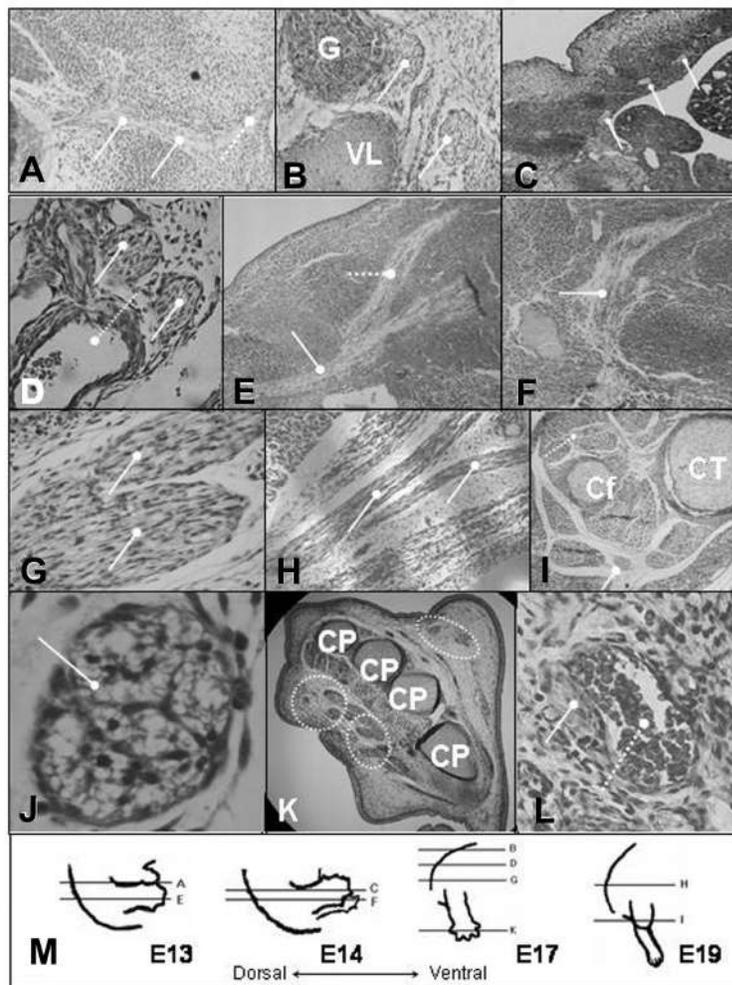


Figura 2. Nervios periféricos identificados. **A.-** Plexo lumbosacro (línea continua) y nervio femoral (línea punteada) E 13, X200. **B.-** Plexo lumbosacro E 17 (línea continua), X800. **C.-** Nervio femoral E 14 (línea continua), X200. **D.-** Nervio (línea continua) y arteria femoral (línea punteada) E 17, X800. **E.-** Nervio ciático E 13 (línea continua), X200. **F.-** Nervio ciático E 14 (línea continua), X400. **G.-** Nervio ciático E 17 (línea continua), X2000. **H.-** Nervio ciático E 19 (línea continua), X1000. **I.-** Nervio tibial (línea continua) y fibular (línea punteada) E 19, X800. **J.-** Detalle nervio tibial E 19 (línea continua), X1000. **K.-** Nervios plantares E 17 (círculo punteado), X400. **L.-** Detalle nervio plantar E 17 (línea continua), vaso sanguíneo (línea punteada), X800. **M.-** Esquemata del nivel del corte en los embriones E 13, E 14, E 17 y E 19. **Simbología:** (CF) primordio cartilaginosa fibular; (CP) primordios cartilaginosa plantares; (CT) primordio cartilaginosa tibial; (G) ganglios sensoriales; (VL) primordio cartilaginosa vertebral.

RESULTADOS

Para este estudio se identificaron los plexos lumbosacos, los nervios ciático, femoral, tibial, fibular y plantares (figura 2) y las estructuras tales como médula espinal, ganglios sensoriales (en las cuatro edades) y cartilago (en E 17 y E 19), y se reconstruyeron secciones correspondientes a estas estructuras. Adicionalmente, se reconstruyó el contorno el cual nos permitirá la ubicación espacial de las estructuras mencionadas anteriormente.

En E 13 la médula espinal se ha extendido a lo largo del embrión en dirección próximo-distal y los nervios raquídeos han crecido siguiendo áreas de mesénquima difuso en dirección dorso-ventral (correspondientes a los futuros agujeros intervertebrales) que se encuentran en las zonas de mesénquima más condensado que posteriormente formarán el molde cartilaginoso de las vértebras dando origen a los plexos lumbosacos (figuras 2A y 3A).

Los plexos lumbosacos son alimentados a lo largo del desarrollo por haces que salen inicialmente de la médula espinal y los ganglios sensoriales, y que al unirse forman troncos que se extienden hacia la región ventral de la muestra (figura 3A). Para E 14 esta ubicación se mantiene aumentando su complejidad y compactación (figura 3B). En E 17 a nivel de las vértebras lumbares ubicadas frente a las diapófisis craneales se localizan los plexos los cuales se observan como grandes haces que varían en cuanto a su tamaño, compactación y complejidad, siendo estas dos últimas mayores en comparación con lo observado en E 13 y E 14 (figuras 2 A-B). A esta edad se observa claramente los haces que alimentan al plexo desprendiéndose de la médula espinal y los ganglios sensoriales atravesando los agujeros intervertebrales (figura 3C). En E 19 los plexos se ubican de forma similar a lo observado para E 17 variando en cuanto a su complejidad y compactación de los haces de fibras, lo cual es mayor. A partir de los plexos lumbosacos se originan varios nervios periféricos, siendo el femoral y el ciático los más notorios (figuras 8 A-B).

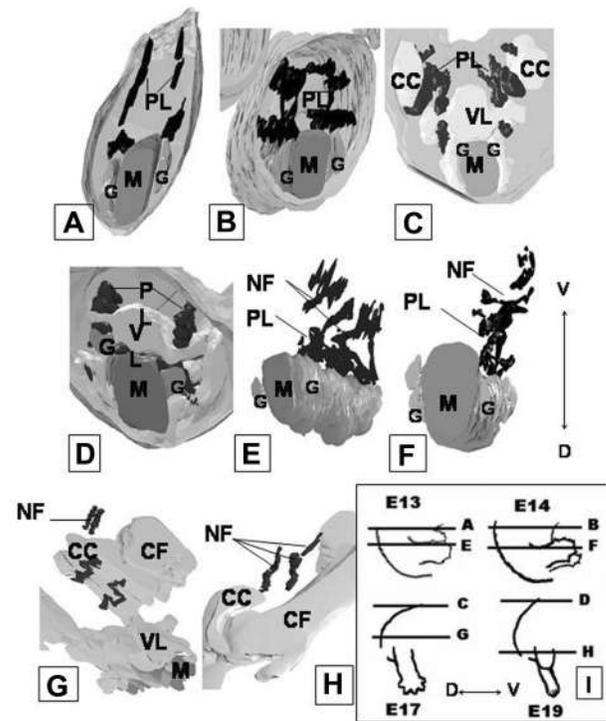


Figura 3. Reconstrucciones 3D de la diferenciación del plexo lumbosacro y el nervio femoral del miembro posterior. **A.-** E 13 (51 cortes). **B.-** E 14 (43 cortes). **C.-** E 17 (28 cortes). **D.-** E 19 (46 cortes). **E.-** E 13 (104 cortes). **F.-** E 14 (29 cortes). **G.-** E 17 (24 cortes). **H.-** E 19 (52 cortes). **I.-** Esquemas de E 13, E 14, E 17 y E 19, las líneas muestran las secciones reconstruidas. **Simbología:** (CC) primordio cartilaginoso de la cadera; (CF) primordio cartilaginoso femoral; (D) dorsal; (G) ganglios sensoriales; (M) médula espinal; (NF) nervio femoral; (PL) plexos lumbosacos; (V) ventral; (VL) primordio cartilaginoso vertebral.

En las cuatro edades, el nervio femoral, se origina a partir de una ramificación que se desprende del plexo lumbosacro. En las edades iniciales (E 13 y E 14) se observa como un grupo de haces ubicados hacia la parte medial superficial del miembro (figuras 2 A y C). Al avanzar en los cortes en dirección próximo-distal, se van observando varias regiones del nervio, la cuales cambian de tamaño y longitud. Según lo observado en los cortes realizados y en la imagen 3D obtenida, el nervio femoral se ubica hacia la región anterior medial del miembro, en la superficie de este. En E 13 está comenzando a desprenderse del plexo aumentando su extensión en E 14 (figuras 2 A y C; 3 E-F; 8 A-B).

En E 17 este nervio es inicialmente profundo a nivel de los primordios cartilagosos de la cadera y a medida que se va acercando a la región del muslo cambia de dirección haciéndose más superficial y desplazándose hacia la parte medial del muslo y continúa en la misma ubicación hacia la región distal del primordio cartilaginoso del fémur (figura 3G). En la pierna el nervio femoral mantiene su ubicación aumentando el número de ramificaciones y finalizando al inicio de los primordios cartilagosos de los tarsos. Para E 19 este nervio mantiene la ubicación y dirección próximo-distal, observada en E 17, presentando ramificaciones en todo su recorrido (figuras 2D; 3H; 8 C-D).

Similar al nervio femoral, el nervio ciático se origina desde el plexo lumbosacro (figuras 8 A-C). Este nervio se ubica en la región profunda del miembro, inervando la parte posterior de este. Desde E 13 este nervio se observa como un haz en forma de tronco muy prominente en la región media del botón, el cual a esta edad está ingresando al miembro y posteriormente, en E 14 se ubica más incluido en este (figuras 2 E-F; 4 A-B).

Para E 17 a nivel de la unión entre los primordios cartilagosos del acetábulo y el fémur, se desprende el nervio ciático del plexo lumbosacro y se extiende a lo largo del primordio cartilaginoso del fémur en la parte profunda del muslo, y así se mantiene en toda su extensión. A esta edad el nervio se observa más compacto con relación a E 13 y E 14 (figuras 2 G; 6 A-C). En E 19, el único cambio apreciable del nervio ciático fue en cuanto a su apariencia sin mostrar diferencia en cuanto a su ubicación, extensión y dirección próximo-distal, con respecto a E 17 (figuras 2H; 4 C y E; 8 C-D).

Para E 13 y E 14, los nervios femoral y ciático son los más importantes (en termino de tamaño) que se pudieron localizar, lo que no significa que son los únicos que se encuentran. En estas edades, los haces están acompañados por grandes vasos sanguíneos, en donde el único vaso identificable fue la aorta (figura 7F).

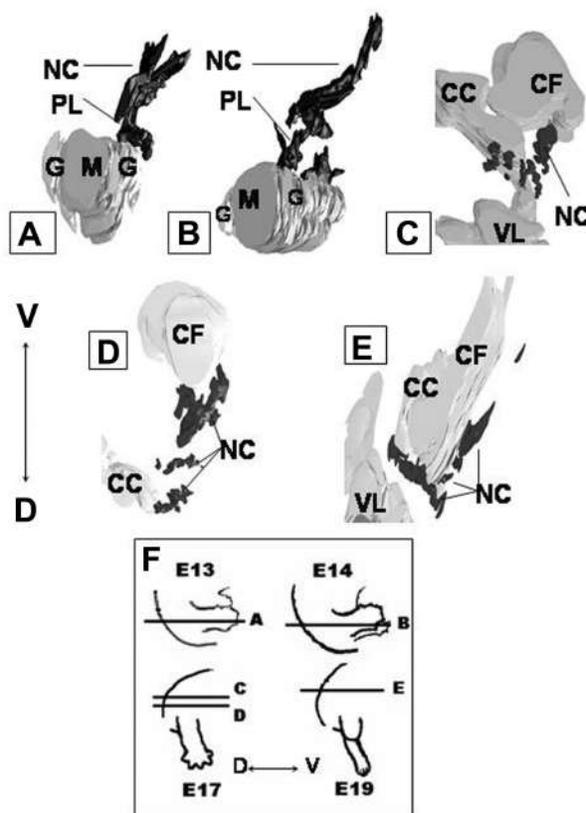


Figura 4. Reconstrucciones 3D de la diferenciación del nervio ciático del miembro posterior. **A.-** E 13 (40 cortes). **B.-** E 14 (46 cortes). **C.-** E 17 (24 cortes). **D.-** E 17 (77 cortes). **E.-** E 19 (26 cortes). **F.-** Esquemas de E 13, E 14, E 17 y E 19, las líneas muestran las secciones reconstruidas. **Simbología:** (CC) primordio cartilaginoso de la cadera; (CF) primordio cartilaginoso femoral; (D) dorsal; (G) ganglios sensoriales; (M) médula espinal; (NC) nervio ciático; (PL) plexos lumbosacos; (V) ventral; (VL) primordio cartilaginoso vertebral.

La compactación para los plexos lumbosacos y los nervios femoral y ciático en el caso de las cuatro edades varía, haciéndose más notoria en E 19. Para E 13 la compactación es baja, observándose como hilos dispersos limitados por un tejido de difícil reconocimiento (figura 6A). Para E 14 la compactación de los haces es muy similar que la observada en E 13. Se observan como un grupo de hilos dispersos manteniendo una misma dirección los cuales se encuentran limitados por un tejido difícil de reconocer (figura 6B). En

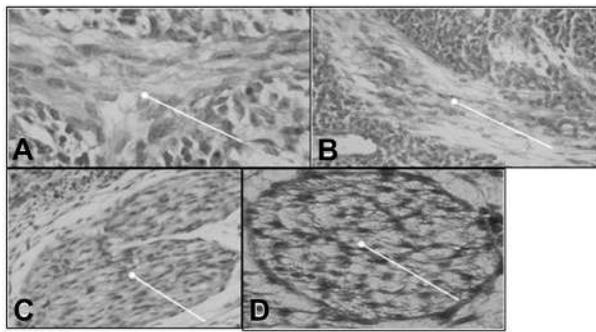


Figura 6. Compactación de haces nerviosos. **A.-** E 13 plexos lumbosacros, X2000. **B.-** E 14 nervio ciático, X800. **C.-** E 17 nervio ciático, X2000. **D.-** E19 Nervio tibial, X2000. Línea continua muestra los diferentes haces nerviosos.

Al igual que los haces nervioso, los tejidos encontrados cerca de estos sufren cambios notorios de los cuales se hará una descripción breve seguidamente.

Para el nivel de desarrollo de E 13 se puede apreciar que el tejido circundante a la ruta seguida por los haces es tejido tipo mesénquima en su mayoría, el cual está presentando condensación, proceso que hasta ahora se está iniciando, aspecto que puede ser observado debido a las diversas agrupaciones de células mesenquimáticas que se presentan (figura 7A).

En cuanto a E 14 el cambio que se observa no es mayor al que se presenta en E 13, ya que en general el tejido circundante es tejido tipo mesénquima, el cual como se mencionó anteriormente está en proceso de diferenciación y con respecto a la edad anterior se presentan mayor número de condensaciones (figura 7B).

Para E 13 y E 14 en la médula espinal la materia gris es de fácil apreciación, observándose la materia blanca en formación (figura 7G).

En algunos casos los haces están acompañados por grandes vasos sanguíneos, en donde el único vaso identificable en E 13 y E 14 fue la aorta (figura 7F).

En E 17 una subpoblación del mesénquima ha sufrido procesos de diferenciación formando cartílago (figuras 7 C-D). Además se encuentran otras condensaciones que más adelante darán origen a los músculos (no se identificaron los diferentes primordios musculares en este trabajo) (figura 7E). Estos procesos en E 19 se observan de forma similar.

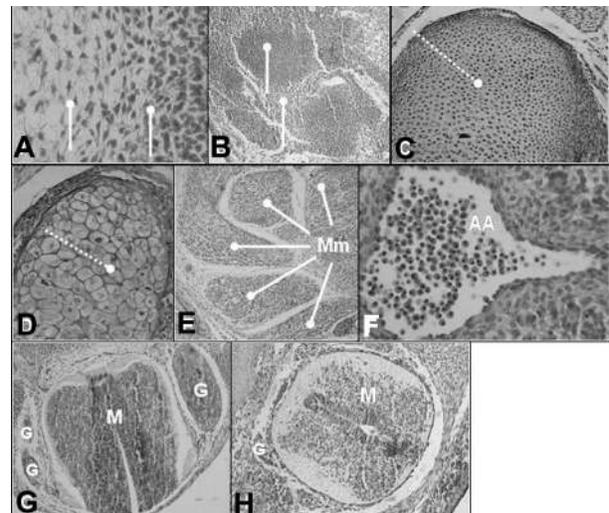


Figura 7. Tejidos. **A.-** Mesénquima E 13, X1000. **B.-** Mesénquima E 14, X200. **C-D.-** Cartilago en diferenciación, X600-X800 respectivamente. **E.-** Futuras masas musculares X400. **F.-** Aorta E 13, X800. **G.-** Médula espinal E 14, X800. **H.-** Médula espinal E 17, X800. Línea continua mesenquima; Línea punteada cartilago. **Simbología:** (AA) aorta; (G) ganglios sensoriales; (M) médula espinal; (Mm) futuras masas musculares.

Para estas edades en la médula espinal se observa la diferencia entre estructuras como la materia gris y la materia blanca, las astas están comenzando a proyectarse y el canal neural se está definiendo (figura 7H).

Con lo expuesto con anterioridad se puede describir el patrón de inervación seguido por las fibras nerviosas en el miembro posterior del embrión de rata, el cual muestra un progreso en dirección próximo-distal. La diferenciación observada en los nervios indica que la inervación se presenta en forma simultánea tanto en dirección dorso-ventral como próximo-distal.

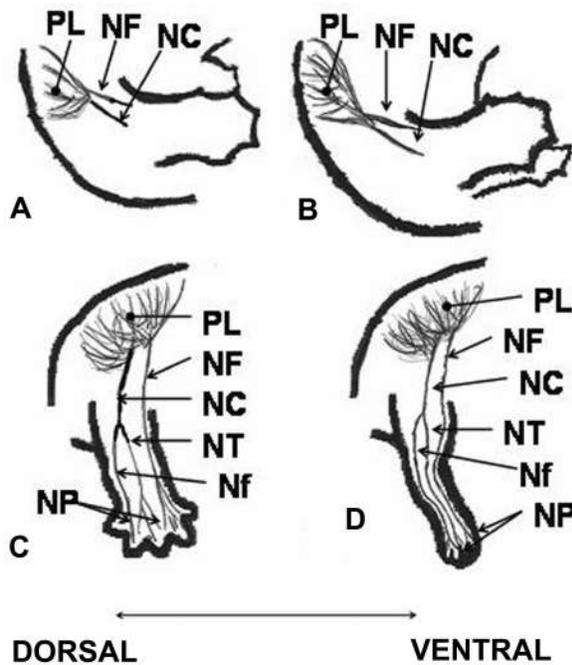


Figura 8. Esquemas del patrón de innervación observado en E 13, E 14, E 17 y E 19. **Simbología:** (NC) nervio ciático; (Nf) nervio fibular; (NF) nervio femoral; (NP) nervios plantares; (NT) nervio tibial; (PL) plexos lumbosacos.

DISCUSIÓN

Debido a la escasa información que se tiene sobre el desarrollo de la innervación de miembros en rata en sus estados embrionarios y a la importancia que han tenido los estudios de regeneración en esta, es determinante entender como son llevados a cabo estos procesos lo que permitiría inferir dos grandes interrogantes de la neurobiología: cómo las fibras encuentran el camino hasta sus blancos? y cómo son formados las conexiones neuronales específicas?

Aunque con este estudio no se da respuesta a esas grandes interrogantes, se genera una base a estudios posteriores que permitirán dar respuesta a estas.

Según Gilbert (2000) y McLennan (1983), las rutas que tiene los haces de fibras en desarrollo no son al azar sino que tienen un patrón de innervación

que permite que este proceso se lleve a cabo, afirmación que puede ser corroborada en este estudio con las rutas de innervación seguidas por los diferentes nervios identificados, refiriéndonos específicamente a los plexos lumbosacos y los nervios femoral y ciático, encontrados en las cuatro edades trabajadas (E 13, E 14, E 17 y E 19) y a los nervios tibial, fibular y los plantares, encontrados en las edades más avanzadas (E 17 y E 19).

En este estudio, por medio de las reconstrucciones obtenidas, se logró observar de manera precisa la forma, ubicación y distribución de los nervios y las estructuras relacionadas, al igual que permitió demostrar la relación espacial entre las fibras nerviosas y las estructuras relacionadas y mostrar los cambios morfológicos y la interacción que se presenta entre estos a lo largo del desarrollo embrionario.

Se iniciará discutiendo el patrón de innervación seguido por el plexo lumbosacro en las cuatro edades trabajadas, el cual para todas las edades presentó un patrón definido en cuanto a su ubicación, difiriendo con respecto a la complejidad de su estructura, siendo complejidad definida como el número de ramificaciones que alimentan al plexo a medida que se va desarrollando a través del tiempo.

Las fibras que alimentan a los plexos nacen en la médula y los ganglios sensoriales en los cuales existen neuronas que poseen receptores capaces de reconocer moléculas quimiotrópicas ubicadas en el ambiente por el cual crecen las fibras, y que determinan las rutas que deben seguir estas fibras y los blancos a los que deben llegar (Coonan et al., 2002). Estas moléculas pueden ser repulsivas o atrayentes, y si llegan a cambiar pueden causar errores en ruta de innervación (Andrews y Mastick, 2003; Bagnard et al., 2000; Becker y Becker, 2002; Dontchev y Letourneau, 2002; Finger et al., 2002; Gilbert, 2000; Honig et al., 1998; Isbister et al., 2003; Kaufman, 1992; Landmesser et al., 1988; Marie y Blagburn, 2003; Sanes et al., 2000; Sharma y Frank, 1998; Shimizu et al., 2000; Wright et al., 1995).

La similitud encontrada en el patrón de distribución de los plexos en las edades estudiadas, muestra que este ya está establecido a la edad de 13 días de gestación como lo afirma Mirnics y Koerber (1995) variando a lo largo del desarrollo la estructura del plexo en cuanto a su complejidad (definido anteriormente), y a la compactación de las fibras. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que a medida que se desarrollan, las fibras que lo forman van presentando cambios moleculares en la membrana, que generan una afinidad mayor entre ellas que hacia las células del tejido circundante como se presentaba en las edades iniciales (13 y 14 días de gestación) (Al-Ghaith y Lewis, 1982; Gilbert, 2000; Landmesser et al., 1988).

Simultáneamente a la edad de 13 días de gestación se presenta la ramificación de los grandes troncos nerviosos (femoral y ciático), desde el plexo lumbosacro. Los nervios femoral y ciático al igual que el plexo presentan una ruta establecida la cual se mantiene durante el desarrollo embrionario variando en su compactación y extensión en el miembro (Mirnics y Koerber, 1995).

La extensión está determinada por el grado de condensación y diferenciación del mesénquima, al igual que las moléculas generadas por este (Cameron y McCredie, 1982). Simultáneo a esto, existen fibras pioneras que lideran la inervación y que a medida que la fibra se desarrolla generan moléculas que hacen que el mesénquima sufra una maduración, proceso que simultáneamente permite que la fibra siga su ruta presentándose periodos de espera (sin determinar en este caso), los cuales explicarían la diferencia presentada en cuanto a la extensión de los troncos nerviosos entre las edades E 13 y E 14 (Al-Ghaith y Lewis, 1982; Gilbert, 2000; Kaufman, 1992; Mirnics y Koerber, 1995; Sanes, et al., 2000; Wang y Scott, 2000).

En E 17 una subpoblación del mesénquima ha sufrido procesos de diferenciación formando cartílago, el cual genera moléculas quimiorepulsivas que limitan el desplazamiento de las fibras evitando que

se introduzcan dentro de este (Becker y Becker, 2002; Bernhardt y Schachner, 2000; Kaufman, 1992; Oldekamp, et al., 2004). Este cartílago a esta edad presenta diferentes estadios de diferenciación, los cuales se mantienen en E 19.

Según la distribución observada en E 13 y E 14, de los nervios que están ubicados cerca de conglomerados de células que posteriormente generarán cartílago, se podría pensar que estos emiten desde sus estados de diferenciación temprana, ciertas señales que restringen la ubicación del haz y hacen que este se mantenga en la ruta de inervación establecida.

También se encuentran otras condensaciones que más adelante darán origen a los músculos (sin identificar), los cuales desde que se están diferenciando generan moléculas que intervienen en la ruta de inervación. Además, existen fibras nerviosas que desde el origen están destinadas a inervar estas masas musculares, dichas fibras generan diferentes moléculas que les permiten fascicularse selectivamente con axones que comparten destinos similares a lo largo de su trayecto y al encontrar su blanco se unen a este con ayuda de moléculas del medio que promueven la interacción axón-miotubo (Honig et al., 1998; Landmesser, 1984; Milner et al., 1998), haciendo a las masas musculares blancos específicos en el proceso de inervación.

El nervio tibial y el nervio fibular en E 13 y E 14 no fueron identificados, esto puede confirmar lo reportado por Coggeshall et al. (1994), quienes afirman que hasta E 15 y E 16 las fibras entran al miembro y empiezan un desarrollo distal sin alcanzar sus blancos. Sin embargo, Mirnics y Koerber (1995) afirman que en E 14 las fibras se extienden a lo largo de la pierna dando origen a los nervios plantares mediales y laterales, los cuales hasta E 15 penetran en la pata.

En este caso para E 17 y E 19 el desarrollo de los nervios tibial y fibular ya es evidente, y aunque dieron origen a los nervios plantares no se puede ase-

gurar si las fibras en su totalidad ya han alcanzado sus blancos o si la inervación observada en este estadio es la definitiva debido a las limitaciones de la metodología utilizada.

En cuanto a los nervios plantares, solo se logro identificados en E 17 y E 19 como se ha venido mencionando, esto debido al grado de desarrollo que se presenta a este nivel. Sin embargo, no ha sido posible contrastar nuestras observaciones con trabajos de otros autores, ya que la mayoría de los trabajos existentes en el área solo mencionan estos nervios de forma tangencial, o simplemente no los tienen en cuenta.

La relación espacial que se observa entre los haces nerviosos y las estructuras relacionadas, nos lleva a asumir que la ruta de inervación seguida por los nervios está influenciada por factores tanto intrínsecos como extrínsecos, que llevan al desarrollo de los nervios hasta su blanco específico y si se presenta alguna alteración de estos factores causa errores en el patrón generando conexiones inespecíficas o erróneas con sus blancos (mutaciones). Los factores intrínsecos están representados por las interacciones membranales axón/axón y los extrínsecos por las moléculas identificadas en otros estudios las cuales se ubican difusas en el ambiente, principalmente en el mesénquima, el cual es el tejido con el que presentan mayor contacto desde sus inicios, siendo el precursor de estructuras como el cartilago y los músculos, entre otros; o actúan como dominios de la membrana célula/axón, las cuales a pesar de no haber sido, en algunos casos, identificadas específicas para rata por su acción se podría pensar que tienen una influencia sino igual, es similar.

La laminina, mencionada como una molécula guía en el crecimiento axonal en el SNP por su importancia en el mantenimiento de los fascículos nerviosos más que como guía de estos, aunque no se descarta la posibilidad que existan otros complejos de laminina que tengan una función en el crecimiento de los axones (Yip y Yip, 1992). Las

netrinas y las slits se cree que forman un gradiente quimiotáctico a lo largo de la vía de exploración del cono de crecimiento. En otros casos, esos factores pueden generar efectos en la dirección de la migración del cono en un punto de elección específico (Cooper, 2002; Hirata et al., 2001, Sanes et al., 2000). Las conectinas, identificadas por su especificidad neuromuscular, las cuales son expresadas bajo el control directo de un gen homeótico en la superficie de un subgrupo de motoneuronas y las células musculares que inervan, al igual que las fasII y fasIII y las semaII, que actúan como factores repulsivos (Sanes et al., 2000; Tannahill, 1997). Otras moléculas identificadas por su acción local o de largo alcance en la guía axonal han sido la fibronectina, la tenascina, las caderinas y las CAM (moléculas de adhesión celular); y como guías de largo alcance se encuentran las semaforinas y neurotropinas, entre otras (Andrews y Mastick, 2003; Bagnard et al., 2000; Bogusch y Dierichs, 1995; Cooper, 2002; Finger et al., 2002; Fredette et al., 1996; Fu et al., 2000; Gilbert, 2000; Honig et al., 1998; Isbister et al., 2003; Sanes et al., 2000; Wright et al., 1995). Además de las moléculas identificadas se han encontrado genes como los *hox*, encargados de la iniciación del crecimiento del miembro y los genes *netrin* que ayudan a la correcta inervación de los músculos (Sanes et al., 2000; Wahba et al., 2001).

Aunque en la actualidad se conoce mucho sobre la acción de estas moléculas en el desarrollo del sistema nervioso, aún falta conocer como el axón puede integrar las señales simultáneas que recibe y generar una sola, y como ellos pueden adaptar sus respuestas mientras se desplazan a lo largo de su ruta de inervación. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado en el sistema nervioso central (SNC) y muy pocos en el sistema nervioso periférico (SNP), pero el hecho que las neuronas de los dos sistemas presenten interacciones repulsivas, da a creer que las moléculas que influyen en el SNC también lo pueden hacer en el SNP pero de forma diferente (Cooper, 2002; Sanes et al., 2000).

En cuanto a la presencia de haces relacionados con los vasos sanguíneos es debido a que estos requieren de una inervación temprana, ya que ésta es la fuente de obtención de alimento por parte del embrión (Gilbert, 2000; Ross et al., 1997).

En este estudio la reconstrucción tridimensional ha sido de gran utilidad, ya que permite observar las relaciones topográficas que se presentan a lo largo de su desarrollo entre los nervios estudiados y las estructuras que lo rodean, aspecto importante para comprender la ruta de inervación que se presenta en el miembro posterior del embrión de rata y que sólo puede ser conocido en su contexto tridimensional.

A medida que el tiempo de desarrollo transcurre, los haces nerviosos tienden a aumentar su complejidad, lo que se ve reflejado en un mayor volumen y área superficial (observaciones no publicadas). Dicho aumento se presenta en las estructuras relacionadas en proporciones similares. Este suceso implica que el área de interacción entre los nervios con las células del medio aumente, al igual que la cantidad de interacciones entre estos, aspecto que se refleja en el nivel de compactación y desarrollo de los haces y en la diferenciación de los tejidos circundantes, entre otros.

El aumento en el número de interacciones puede influenciar el grado de compactación y desarrollo de los haces, posiblemente, porque genera un cambio molecular que lleva a un cambio en la afinidad tanto en la relación axón/axón como en la relación axón/célula. Sin embargo, esto no puede ser probado en este estudio, ya que el número de muestras tomado no es suficiente para determinar dicha cantidad de conexiones.

Con base en datos preliminares del Grupo, se observa que el desarrollo no se da igual para todos los haces nerviosos tratados; presentándose el pico de desarrollo para cada uno a diferentes edades.

Los plexos lumbosacros y los nervios femoral, ciático, tibial fibular y plantares en las edades en las cuales se observaron presentaron un patrón de inervación establecido en cuanto a su ubicación, difiriendo con respecto a la compactación, extensión en el miembro y a la complejidad de su estructura, esto último con respecto a los plexos lumbosacros.

La relación espacial que se observa entre los haces nerviosos y las estructuras relacionadas, nos lleva a asumir que la ruta de inervación seguida por los nervios está influenciada por moléculas o elementos que ejercen respuestas negativas y positivas en los axones, las cuales están ubicadas principalmente en el mesénquima, el cual es el tejido con el que presentan mayor contacto desde sus inicios, siendo este el precursor de estructuras como el cartílago y los músculos entre otros.

El cartílago interviene en la ruta de inervación, limitando el desplazamiento de las fibras al evitar que se introduzcan dentro de este, lo cual ocurre desde sus estados de diferenciación temprana. Esto se presenta de forma similar con condensaciones que más adelante darán origen a los músculos, los cuales desde que se están diferenciando intervienen en la ruta de inervación al ser blancos específicos o por contrario evitando el paso de las fibras a través de ellos. Además de intervenir en la ruta de inervación que siguen las fibras, la interacción que se presenta entre los nervios y el mesénquima se ve reflejada en la compactación de las fibras y su extensión en el miembro.

Los puntos de referencia tisulares utilizados presentaron una diferenciación a lo largo de las edades trabajadas lo cual se relaciona con la diferenciación de los nervios y se presenta en forma coherente con el desarrollo morfológico del miembro. Aunque para las edades de E 17 y E 19 días de gestación ya se ha dado la diferenciación hasta nervios plantares no se puede asegurar si las fibras en su totalidad ya han alcanzado sus blancos o si la inervación observada en este estadio es la definitiva.

Para resaltar, la reconstrucción tridimensional como herramienta metodológica que facilita la comprensión de los fenómenos que cambian tanto en el tiempo como en el espacio. Además, es muy útil para la enseñanza, especialmente en áreas como anatomía, morfología, embriología, en los cuales es indispensable conocer las relaciones espaciales y tempora-

les que se presentan entre las diferentes estructuras implicadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Militar Nueva Granada por el apoyo financiero y tecnológico proporcionado a este proyecto (código del proyecto: CIAS 2002-008).

REFERENCIAS

- Al-Ghaith L, Lewis J.** 1982. Pioneer growth cones in virgin mesenchyme: an electron-microscope study in the developing chick wing. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 68:149-160.
- Andrews G, Mastick G.** 2003. R-Cadherin is a Pax6 regulated, growth promoting cue for pioneer axons. *The Journal of Neuroscience*, 23(30):9873-9880.
- Bagnard D, Thomasset N, Lohrum M, Püschel A, Bolz J.** 2000. Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *The Journal of Neuroscience*, 20(3):1030-1035.
- Baker H, Russell J, Weisbroth S.** 1980. *The Laboratory Rat*. Vol. II. Academy Press. San Diego (California). E. U. A.
- Becker C, Becker T.** 2002. Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, 22(3):842-853.
- Bernhardt R, Schachner M.** 2000. Chondroitin sulfates affect the formation of the segmental motor nerves in zebrafish embryos. *Developmental Biology*, 221(1):206-219.
- Bogusch G.** 1992. Specialized cell contacts in the developing nerves of mouse embryos. *Acta Anatomica*, 145(4):370-372.
- Bogusch G, Dierichs R.** 1995. Outgrowing nerves in the foreleg a mouse embryo viewed by three-dimensional reconstruction from electron micrographs. *Cell and Tissue Research*, 280:197-199.
- Cameron J, McCredie J.** 1982. Innervation of the undifferentiated limb bud in rabbit embryo. *Journal of Anatomy*, 134(4):795-808.
- Coggeshall R, Pover C, Fitzgerald M.** 1994. Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Developmental Brain Research*, 82:193-212.
- Coonan J, Bartlett P, Galea M.** 2002. Role of EphA4 in defining the position of a motoneuron pool within the spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 458:98-111.
- Cooper H.** 2002. Axon guidance receptors direct growth cone pathfinding: rivalry at the leading edge. *The International Journal of Developmental Biology*, 46:621-631.
- Dontchev V, Letourneau P.** 2002. Nerve growth factor and semaphorin 3a signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. *The Journal of Neuroscience*, 22(15):6659-6669.
- Finger J, Bronson R, Harris B, Johnson K, Przyborski S, Ackerman S.** 2002. The Netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. *The Journal of Neuroscience*, 22(23):10346-10356.
- Fredette B, Millar J, Ranscht B.** 1996. Inhibition of motor axon growth by T-cadherin substrata. *Development*, 122:3163-6171.
- Fu S, Sharma K, Luo Y, Raper J, Frank E.** 2000. SEMA3A regulates developing sensory projections in the chicken spinal cord. *Journal of Neurobiology*, 45(4):227-236.
- Gilbert S.** 2000. *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland (Massachusetts), E. U. A.

- Hill M.** 2000. *Embryology*. School of Anatomy. Version 2.2. The University of New South Wales. Reino Unido.
- Hirata T, Fujisawa H, Wu J, Rao Y.** 2001. Short range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor Slit. *The Journal of Neuroscience*, 21(7):2373-2379.
- Honig M, Frase P, Camilli S.** 1998. The spatial relationship among cutaneous, muscle sensory and motoneuron axons during development of the chick hindlimb. *Development*, 125:995-1004.
- Hurtado H.** 1990. Peripheral nervous system regeneration in the adult rat: the regeneration chamber model. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biología Celular, Universidad Católica de Lovaina, Bélgica.
- Isbister C, Mackenzie P, To K, O'Connor T.** 2003. Gradient steepness influences the pathfinding decisions of neuronal growth cones in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 23(1):193-202.
- Kaufman M.** 1992. *The atlas of mouse development*. Academic Press Limited. Londres, Inglaterra.
- Landmesser L.** 1984. The development of specific motor pathways in the chick embryo. *Trends in Neurosciences*, 7:336-339.
- Landmesser L, Dahm L, Schultz K, Rutishauser U.** 1988. Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle. *Developmental Biology*, 130(2):645-70.
- Lowrie M, Vrbová G.** 1992. Dependence of postnatal motoneurons on their targets review and hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 15(3):80-85.
- Marie B, Blagburn J.** 2003. Differential roles of engrailed paralogs in determining sensory axon guidance and synaptic target recognition. *The Journal of Neuroscience*, 23(21):7954-9862.
- McLennan I.** 1983. The development of the pattern of innervation in chicken hindlimb muscles: evidence for specification of nerve-muscle connections. *Developmental Biology*, 97:229-238.
- Milner L, Rafuse V, Landmesser L.** 1998. Selective fasciculation and divergent pathfinding decisions of embryonic chick motor axons projecting to fast and slow muscle regions. *The Journal of Neuroscience*, 18(9):3297-3313.
- Mirnic K, Koerber R.** 1995. Prenatal development of rat primary afferent fibers: i. peripheral projections. *The Journal of Comparative Neurology*, 355:589-600.
- Montoya J, Ariza J, Sutachan J, Hurtado H.** 2002. Relationship between functional deficiencies and the contribution of myelin nerve fibers derived from L4, L5 and L6 spinolumbar branches in adult rat sciatic nerve. *Experimental Neurology*, 173(2):266-274.
- Nakao T, Ishizawa A.** 1994. Development of the spinal nerves in the mouse with special reference to innervation of the axial musculature. *Anatomy and Embryology*, 189:115-138.
- Oldekamp J, Krämer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T.** 2004. Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expression Patterns*, 4(3):283-288.
- Prophet E, Mill B, Arrington J, Sobin L (eds.).** 1995. *Métodos histoembriológicos*. Registro de patología de los Estados Unidos de América (ARP). Washington, D. C., E. U. A.
- Ross M, Romrell L, Kaye G.** 1995. Nervous tissue. Pp. 256-300. *En: Ross M, Romrell L, Kaye G. Histology. A text and atlas*. Williams and Wilkins. Baltimore (Maryland), E. U. A.
- Sanes D, Reh T, Harris W.** 2000. *Development of the nervous system*. Academic Press. San Diego (California), E. U. A.
- Sharman K, Frank E.** 1998. Sensory axons are guided by local cues in the developing dorsal spinal cord. *Development*, 125(4):635-643.
- Shimizu M, Murakami Y, Suto F, Fujisawa H.** 2000. Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *The Journal of Cell Biology*, 148:1283-1294.
- Tannahill D, Cook G, Keynes R.** 1997. Axon guidance and somites. *Cell and Tissue Research*, 290:275-283.
- Wahba G, Hostikka S, Carpenter E.** 2001. The paralogous Hox genes Hoxa10 and Hoxd10 interact to pattern the mouse hindlimb peripheral nervous system and skeleton. *Developmental Biology*, 231(1):87-102.

- Wanek N, Muneoka K, Holler-Dinsmore G, Burton R, Bryant S.** 1989. A staging system for mouse limb development. *The Journal of Experimental Zoology*, 249:41-49.
- Wang G, Scott S.** 1997. Muscle sensory innervation patterns in embryonic chick hindlimbs following dorsal root ganglion reversal. *Developmental Biology*, 186:27-35.
- Wang G, Scott S.** 2000. The “Waiting Period” of sensory and motor axons in early chick hindlimb: its role in axon pathfinding and neuronal maturation. *The Journal of Neuroscience*, 20(14):5358-5366.
- Weisbroth S, Fudens J.** 1972. Use of ketamine hydrochloride as an anesthetic in laboratory rabbits, rats, mice and guinea pigs. *Laboratory Animal Science*, 22(6):804-806.
- Wright D, White F, Gerfen R, Silos I, Snider W.** 1995. The guidance molecule semaphorin III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. *The Journal of Comparative Neurology*, 361(2):321-333.
- Yip J, Yip Y.** 1992. Laminin-developmental expression and role in axonal outgrowth in the peripheral nervous system of the chick. *Developmental Brain Research*, 68:23-33.

