

Prov. T. 13/65

T
16
6

**"DESARROLLO RETINIANO Y DISTRIBUCION CELULAR
TRAS LA ADMINISTRACION DE COLCHICINA A EMBRIONES
DE Gallus domesticus EN LOS ESTADIOS INICIALES
EMBRIONARIOS"**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	<u>619677388</u>
Nº Copia	<u>121224365</u>

OPORTUNIDAD	61
7 JUN. 1981	
CONSERVACION DE DOCUMENTOS	

FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Biología Celular

**"DESARROLLO RETINIANO Y DISTRIBUCION CELULAR
TRAS LA ADMINISTRACION DE COLCHICINA A EMBRIONES
DE Gallus domesticus EN LOS ESTADIOS INICIALES
EMBRIONARIOS"-**

MEMORIA presentada para
aspirar al grado de DOCTOR
E N C I E N C I A S
BIOLOGICAS.

Granada, Junio 1991

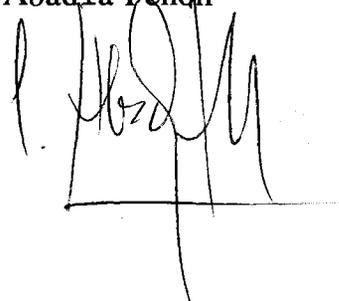
Por Francisco Abadía Molina

Los abajo firmantes como Directores de la presente Tesis certifican que el presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada

Fdo.: R. Calvente Iglesias



Fdo.: F. Abadía Fenoll



A mis padres

Mi agradecimiento a los Directores de la presente Tesis, así como a cuantas personas del Dept. de Biología Celular me han ayudado en la realización de este estudio, sin cuyo interés y dedicación no podría haberse culminado en la forma deseada.

I N D I C E

	Pg.
INTRODUCCION.....	1
I.- MATERIAL Y METODO.....	4
A.- Sistema General.....	6
B.- Descripción detallada de los procederes empleados.....	10
II.- SITUACION BIBLIOGRAFICA.....	28
III.- OBSERVACIONES Y RESULTADOS.....	60
- Embriones tipo 13col1H.....	63
- " " 13col2H.....	77
- " " 13col4H.....	97
- " " 13col8H.....	116
- " " 16col4H.....	136
- " " 16col8H.....	158
- Embriones sin tratamiento.....	181
- Descripciones detalladas de observaciones a nivel celular.....	195
IV.- COMENTARIO Y DEDUCCIONES.....	210
- Sobre la preparación del material.....	211
- Sobre modificaciones generales de la estructura.....	215
- Sobre la diversa acción de la colchicina.....	218
- Sobre la respuesta celular a la acción de la droga.....	248
CONCLUSIONES.....	253
BIBLIOGRAFIA.....	258

INTRODUCCION

Durante la formación de de la retina del pollo (*Gallus domesticus*), las sucesivas divisiones han de ir acompañadas de procesos de distinción que les permita aquella expresión determinante de la conformación del órgano que están constituyendo los tipos diversificados en el contenido. De este modo, la forma orgánica y la diferenciación celular son dos fenómenos conjuntos que de alguna manera han de encontrar manifestada su peculiaridad en los primeros ciclos de división en el desarrollo.

En el desarrollo de la copa óptica se observa una disposición celular formada por una población tanto más homogénea en su estado de división cuanto más cerca nos encontramos de los primeros momentos. Durante las primeras etapas de extensión y conformación de la copa óptica, hemos de considerar como hechos más importantes, de un lado, el incremento poblacional, conseguido a través de la multiplicación celular y, de otro, la duración del ciclo y ubicación de la mitosis, expresados en el número de las mismas y los lugares en donde aparecen.

En los mecanismos celulares de diferenciación, la decisión celular tiene necesariamente que ocurrir antes de que signos morfológicos nos revelen el que dicho proceso está ya instalado. Tal proceso no ocurre simultáneamente en la retina ni es igual en los mismos sectores a lo largo del desarrollo. Esto nos ha de llevar al estudio de lo ocurrido a lo largo del período que va desde los momentos iniciales de división celular y aquellos en que tenga lugar algún signo de diferenciación, como son a partir del estadio 18-19 de Hamburger y

Hamilton. Por ello, en el presente estudio vamos a atender fundamentalmente a aquellos procesos ocurridos entre los momentos iniciales de la proliferación celular y distribución celular hasta el momento en que aparezcan muestras morfológicas de la existencia de neuronas ganglionares.

En estudios anteriores ya habíamos analizado la situación de los estadios comprendidos entre el 13HH y el 19-20HH (Hamburger y Hamilton, 1951), para conocer en ellos los índices mitóticos (IM), la localización y frecuencia de las figuras de división. También otros autores habían indicado la existencia de modificaciones en los ciclos a lo largo de esas primeras etapas de desarrollo en la formación retiniana en el pollo (Fujita, 1962; Kahn, 1974; Almendros y cols., 1982; Abadía Fenoll y cols, 1983, 1984; Calvente y cols., 1983, 1985). Sin embargo, en ninguno de estos estudios habían sido consideradas la influencia que el empleo de la colchicina pudiera ejercer en el desarrollo de la copa óptica, y por todo lo antedicho, nuestro propósito en el presente trabajo se centró en analizar la variación en las células y sus mitosis en esas etapas de desarrollo tras la administración de la droga.

En el desarrollo del estudio trataremos los siguientes apartados:

- I.- Material y Método.
- II.- Situación Bibliográfica.
- III.- Observaciones y Resultados.
- IV.- Comentario y Conclusiones.

I.- MATERIAL Y METODO

Para el presente trabajo se han utilizado 60 embriones de pollo (*Gallus domesticus*) comprendidos entre los estadios 13 al 20 de Hamburger y Hamilton (HH). Los lotes han incluido embriones observados tanto en situación normal como tras la inyección de colchicina. El conjunto se subdividió de la siguiente forma: embriones normales: 10 del estadio 13-15, 10 del estadio 17-18 y 10 del estadio 19-20; tratados con colchicina: 5 embriones por cada caso de tratamiento con 1h, 2h, 4h y 8h a partir del estadio 13, y 5 embriones con 4 y 8h de tratamiento a partir del 16⁺).

Los estudios se han realizado sobre secciones histológicas de 4 y 6 μm de espesor para su observación a microscopía óptica. Como medios de tinción de las secciones se han utilizado la toluidina y la reacción citoquímica de Feulgen. Los preparados se realizaron sobre copas ópticas que fueron incluidas en resina Spurr para su corte y tinción. A continuación se expone el procedimiento seguido, que consta de los siguientes apartados:

A) Sistema general.

B) Descripción detallada de los procedimientos técnicos.

A. SISTEMA GENERAL.-

A.1. Determinación de parámetros de catalogación del órgano retiniano y de sus células.-

Para la obtención de los valores y fórmulas que se han empleado en el presente estudio, se han verificado determinaciones en la retina sobre: el volumen total, su número de células, y áreas y volúmenes de los 9 sectores en que se dividió la retina para las seis zonas (frontales y horizontales):

SA - SM - SP (Superior: anterior, media y posterior)

MA - MM - MP (Media: anterior, media y posterior)

IA - IM - IP (Inferior: anterior, media y posterior)

y los correspondientes de la dirección vertical.

Volumen total

La determinación de los volúmenes de la región prospectiva del epitelio retiniano se realizó a lo largo de las etapas analizadas sobre unos territorios delimitados del siguiente modo:

- 1) Trazando dos líneas paralelas que pasen por los bordes laterales del ventrículo óptico, allí donde se ve que la retina se adelgaza para dar transición a la lámina pigmentaria.
- 2) Trazando dos líneas perpendiculares a la extensión total retiniana, con lo que se consigue en cada nivel tres regiones de un tercio.

Para obtener el volumen total de la copa y regiones (V_t), se calculó el área de la superficie delimitada en cada corte histológico, y del conjunto de cada bloque se emplearon los valores correspondientes para calcular el volumen total utilizando el principio de Cavalieri:

$$V_t = t \sum p \cdot a(p)$$

expresión que, si se dispone de un analizador semiautomático de imágenes y se segmenta el área correspondiente se transforma en:

$$V_t = t \sum_{i=1}^{i=n} A_i$$

por sustitución de $\sum p \cdot a(p)$ por $\sum A_i$

Áreas estudiadas y su número de células. En su caso, volúmenes hallados a partir de ellas

Tras calcular V_t , se pasó a estimar el valor N correspondiente al número de células tomando el núcleo como unidad de recuento. Para los recuentos se tomaron 8 pares de cortes de forma aleatoria.

Escogidos los cortes en donde se iban a realizar los recuentos y medidas y determinado el valor de extensión $0 \rightarrow x$, se repartieron a partes iguales esas longitudes para obtener las zonas anterior, media y posterior e igualmente en la dirección perpendicular, las regiones superior, media e inferior, con lo que se obtuvieron 9 territorios (superior-anterior, superior-media, etc.) en los que se realizaron las medidas.

Se procedió a obtener los valores según la siguiente pauta:

- 1) Se calcularon los volúmenes ocupados por cada territorio (1 a 9) siguiendo el método de Cavalieri.
- 2) Se tomaron dentro de cada territorio y aleatoriamente una zona de $900 \mu\text{m}^2$, que representa el "frame" de medida, y a partir de ella es como se establecieron las relaciones de los valores y los cálculos totales.
- 3) Los volúmenes nucleares y el número de células se establecieron a partir de la fórmula de De Hoff y Rhines (1961):

$$N_V = \frac{N_A}{D}$$

o de Gundersen (1988):

$$\frac{4}{3} \pi l_0^3$$

o Cruz Orive (1986):

$$\frac{\pi}{3} l_0^3$$

según que la transección sea parcial desde el punto Q al contorno del perfil o tome todo el perfil.

- 4) Siguiendo el proceder de Cruz-Orive se hacen los disectores que proporcionan el selector y se calcula v_n .
- 5) Sobre el material anterior y tras el empleo del estimador de líneas y puntos adecuado se calcula el volumen total de las partículas y su relación V_V mediante el valor P_p .
- 6) Ahora se aplica la fórmula:

$$N_{par} = V_{ref} \frac{V_v}{V_n}$$

y con ello habremos obtenido el número de células, su volumen medio y su relación con el volumen contenedor.

Distribuciones celulares a partir del análisis de sus núcleos

Las células de la capa retiniana en los primeros estadios del desarrollo, etapas entre el 13 y el 19 de Hamburger y Hamilton, pertenecen a una población que es más homogénea conforme observamos estadios más primitivos y que se diversifica con el desarrollo hasta producir los tipos celulares completamente diferenciados.

La progresiva diversificación sabemos que se instala sobre ciclos que se van alargando hasta la etapa G_0 , por tanto resulta de interés analizar esta condición en situación normal y tras la influencia que haya podido ejercer la inyección de colchicina. Sobre los preparados seleccionados y siguiendo el procedimiento aleatorio de obtención de la muestra se dieron los siguientes pasos:

- 1º.- Selección de las células contenidas en los correspondientes frames de las 9 zonas analizadas.
- 2º.- Realización de las distribuciones celulares, confección de histogramas y de rectas de regresión entre área, volúmenes y número de mitosis para la comparación de valores entre los distintos conjuntos de cada situación estudiada.
- 3º.- Corrección de los excesos en las cuantificaciones, empleando las fórmulas correspondientes.

B. DESCRIPCION DETALLADA DE LOS PROCEDERES EMPLEADOS.-

B.1. Tratamiento de los animales:

Método General de preparación.

Inyección de colchicina.

B.2. Inclusión y corte. Técnicas de tinción e histoquímica para ADN.

B.3. Sobre la obtención de parámetros para el análisis celular.

B.4. Tratamiento de los datos.

B.1. Tratamiento de los animales

Método general de preparación

Los huevos fecundados, y aún sin iniciar su desarrollo, pasaron a una incubadora, donde fueron mantenidos a una t° de $38,5^{\circ}\text{C}$. Durante el tiempo de experiencia eran sometidos a un volteo automático periódico.

Entre los embriones empleados hemos distinguido:

- a) Embriones tratados con colchicina.
- b) Embriones sin tratamiento.
- c) Embriones controles.

Los embriones sin tratar suponen un desarrollo normal, contrastado con otras experiencias de nuestro laboratorio y en los que no se realizaron maniobras de ningún tipo sobre los especímenes, salvo la incubación.

Los embriones control lo fueron con huevos no tratados pero a los que se les inyectaba simplemente suero salino para poder asegurar que las variaciones que se produjeran se debían en su caso a la colchicina y no al mecanismo instrumental. Así se pudo comprobar, por lo que las comparaciones se realizaron entre embriones normales y tratados con colchicina eran equivalentes a las que se habrían obtenido con animales sin manipular.

Inyección de colchicina

Se empleó colchicina en polvo de "Sigma". Se preparó una solución madre: 10mgr de colchicina en 100ml de solución salina Ringer.

La solución salina Ringer se preparó disolviendo en 1l de agua destilada:

ClNa..... 9,00gr

ClK..... 0,30gr

Cl₂Ca..... 0,25gr

En el momento del empleo de la solución para ser inyectada se procedió a diluirla para obtener una concentración de 0,1/100ml.

Cuando los huevos alcanzaron el desarrollo deseado, se sacaron de la incubadora y, poniendo su cámara de aire hacia arriba, se abrió una ventana en la cámara y membranas, hasta poner visible al embrión que quedaba envuelto sólo por su membrana vitelina. Entonces se procedió a inyectar la droga mediante jeringuillas hipodérmicas esterilizadas, empleándose volúmenes de 0,1ml por animal. La administración se verificó llegando hasta la zona inferior de la región del ojo izquierdo; que son los que fundamentalmente se han utilizado.

Posteriormente, los huevos así tratados eran sellados con material plástico adhesivo. Concluida la operación, se introducían nuevamente en la incubadora hasta que transcurriera el tiempo de incubación acorde con el tiempo de experiencia concreta.

- Tipos de experiencia en relación con el tiempo de tratamiento y los estadios de desarrollo en los embriones tratados -

Se emplearon animales que estuvieron en incubación un tiempo comprendido entre las 48 y las 72h. A estos tiempos deben añadirse los de acción bajo la droga, que fueron 1, 2,4 y 8h. Según lo anterior resulta el siguiente cuadro de experiencias:

COMIENZO TRATAMIENTO (Hr INCUBACION)	TIEMPO TRATAMIENTO	NUMERO DE EXPERIENCIAS		
		TRATADOS	SIN TRATAR	
			Nº	ESTADIO
48h	1h	5	10	13-15HH
	2h	5		
	4h	5	10	16-17HH
	8h	5		
60h	4h	5	10	19-20HH
	8h	5		

Los embriones sin tratar eran estudiados a una edad considerada la suma de los dos tiempos: iniciación más tratamientos.

- Extracción de los embriones y determinación de su estadio (HH) de desarrollo-

Tras la abertura del huevo y previo a la extracción del embrión, se le añadían unas gotas de fijador (formaldehído-glutaraldehído al 2%, v/v). Colocado el embrión en un vidrio de reloj e inmerso en líquido fijador, se procedió a determinar el estadio de desarrollo siguiendo las tablas de Hamburger y Hamilton (1951) y los estudios de O'Rahilly y Meyer (1959).

B.2. Inclusión y corte. Técnicas de tinción e histoquímica para ADN

Fijación e Inclusión

En la preparación del glutaraldehído se procedió a mezclar 8 volúmenes de glutaraldehído al 25% con 92 volúmenes de cacodilato sódico 0,1M (pH 7,4). Para el formaldehído se preparó la solución mezclando 5 volúmenes del mismo al 40% con 95 volúmenes de la solución tampón antedicha y que consta de:

cacodilato sódico.....	11,000gr
Cl ₂ Ca.....	0,250gr
sacarosa.....	8,558gr
agua destilada.....	completar hasta 500cc

Para conseguir un pH 7,4, se añaden unas gotas de ClH y se comprueba que el pH de la solución es ese.

Los embriones se mantuvieron durante una noche y a una temperatura de 4°C en la anterior mezcla fijadora.

Una vez conseguida la fijación de los embriones, se procedió al lavado de los mismos, eliminando el fijador de las muestras, con tres pases sucesivos de 1h en solución tampón.

Seguidamente, se llevó a cabo la deshidratación de las piezas: Este proceso supone el pase gradual de los embriones desde acetona al 30% hasta acetona al 100% de la siguiente forma:

acetona 30%.....	1h
acetona 50%.....	1h
acetona 70%.....	1h
acetona 90%.....	1h
acetona 100%.....	1h
acetona 100%.....	1h

A continuación se eliminó la acetona de las piezas con pases sucesivos en óxido de propileno, (por ser éste más miscible con las resinas que la acetona) de la siguiente forma:

Etanol 100%-Oxido de propileno (1:1).....	5min
Oxido de propileno.....	10min
Oxido de propileno.....	10min
Oxido de propileno.....	10min

Para la inclusión propiamente dicha, se verificaron los siguientes pasos:

Oxido de propileno-Resina (1:1)..... 1h
Resina..... 12h
Inclusión en cápsulas con
resina y en estufa a 60°C..... 16h

La resina utilizada en la inclusión ha sido "Spurr", en la que los distintos componentes fueron mezclados en el siguiente orden y cantidad:

ERL 4206..... 10,0gr
DER 736..... 6,0gr
NSA..... 26,0gr
S1..... 0,4gr

Las cápsulas utilizadas en la inclusión han de estar completamente secas antes de entrar en contacto con el medio de inclusión, en este caso resina "Spurr".

Obtención de secciones histológicas

Conseguidos los bloques de inclusión, éstos han de ser tallados antes de proceder a la obtención seriada de secciones histológicas. Ambos procesos se llevaron a cabo en un piramitomo LKB. El tallado adecuado de las piezas definió la posterior dirección de corte deseada.

El corte de los bloques se realizó a 4 μm y 6 μm en función de que las secciones histológicas fueran destinadas a posterior tinción con azul de toluidina y/o la reacción de Feulgen.

Las secciones recogidas se colocaron unas a continuación de otras en riguroso orden sobre pequeñas gotas de agua, dispuestas en portaobjetos. El pegado de los cortes se consiguió manteniendo los portas sobre una placa calefactora a 50°C durante unos minutos hasta la total evaporación del agua.

Tinciones

Tanto para la tinción con azul de toluidina como para la demostración con la reacción de Feulgen hubo de eliminarse la resina de las secciones histológicas, lo que se consiguió sometiendo los cortes a la acción de vapores de bromo (en campana de gases) y posterior pase de las secciones por acetona durante 1min.

Previo al procedimiento de tinción, los cortes fueron hidratados gradualmente, por pases sucesivos en alcoholes según la siguiente pauta:

Alcohol 100°.....	1min
Alcohol 96°.....	1min
Alcohol 90°.....	1min
Alcohol 70°.....	1min
Alcohol 50°.....	1min
Alcohol 30°.....	1min

- Tinción con Azul de Toluidina -

La solución colorante se preparó añadiendo 0,33gr de Azul de Toluidina a 100ml de agua destilada. Con objeto de basificar el colorante, se añadieron además 0,66gr de tetraborato sódico hidratado, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Las secciones histológicas fueron bañadas durante 2min en la solución colorante y posteriormente lavadas con agua destilada.

La deshidratación se ajustó a los siguientes pases en alcoholes durante el tiempo indicado:

Alcohol 30°.....	1min
Alcohol 50°.....	1min
Alcohol 70°.....	1min
Alcohol 90°.....	1min
Alcohol 96°.....	1min
Alcohol 100°.....	1min

Tras la deshidratación, los cortes fueron aclarados con dos pases en Xilol durante un tiempo de 1min.

Después de un ligero secado de los portas con papel de filtro, se procedió al montaje de los mismos. El medio de montaje utilizado fue el Eukitt.

- Desarrollo de la reacción de Feulgen -

Una vez hidratadas las secciones histológicas y tras haber sido cortadas a 4μ ó 6μ , siguieron el siguiente proceso:

- * Hidrólisis ácida caliente con ClH 1N..... 10min
- * Lavado con agua destilada..... 5min
- * Baño en reactivo de Schiff..... 90min
- * Baño en ácido sulfuroso SO_3H 15min
- * Lavado con agua corriente..... 15min
- * Deshidratación en pases por alcoholes desde 30° a 100°..... 1min/alc.
- * Aclarado con Xilol (2 pases)..... 1min
- * Montaje en Eukitt

El ácido sulfuroso fue preparado nuevamente cada vez que se llevó a cabo la reacción de Feulgen, añadiendo 0,45gr de metabisulfito de sodio a 75ml de agua destilada.

La preparación del reactivo de Schiff se hizo siguiendo la siguiente pauta:

Pararosanilina.....	1,0gr
Metabisulfito de sodio.....	1,9gr
CIH 1N.....	15cc
Agua destilada.....	85cc

Estos componentes mezclados según el orden expuesto se dejaron madurar durante unas 12h, tras las cuales se añadieron (con objeto de eliminar el exceso de colorante), de 0,3 a 0,5gr de carbon activo por cada 100ml de solución, agitándose la solución durante unos minutos, dejándose reposar y pasando a filtrar el reactivo a través de un filtro de cerámica.

Un análisis comparativo entre los valores proporcionados por las tinciones con toluidina y el desarrollo de la reacción de Feulgen nos permitió comprobar que, a efectos de valoraciones morfométricas, los volúmenes y densidades celulares eran prácticamente iguales cuando se emplearon preparados con toluidina como cuando lo fue con Feulgen. Para ello el mejor procedimiento nos pareció el llevar a cabo en varios embriones tinciones alternativas en los portas de un mismo animal; con lo que de haber tenido lugar modificaciones como consecuencia de la técnica se podían detectar sin duda.

B.3. Bases para la obtención de parámetros para el análisis celular

Realizada la selección de células que se han de analizar, se estudiaron los volúmenes, número de núcleos celulares y los espacios por ellas ocupados (P/P) y se distinguieron dentro de las mitosis el número correspondiente de subfases.

En la detección de la condensación del producto ha de tenerse en cuenta que se trabaja con secciones histológicas y que, por tanto, es posible que ante un perfil nuclear concreto se trate de una sección con menor volumen que aquél derivado del volumen del núcleo completo.

Proceder para los cálculos del volumen nuclear

Para poder ser exactos en la obtención de valores, se aprovecharon las ventajas de los procederes del disector (Sterio, 1985), selector (Cruz-Orive, 1987) y nucleador (Gundersen y col., 1988) para utilizar el microscopio en condiciones tales que permitan la obtención de datos sin desviación sistemática de la media. Se consigue dicha situación cuando a efectos de medida se toma dentro del preparado esa zona intermedia en cuyo volumen encontramos células completas. Para ello se puede hacer su selector determinando la altura h dentro del propio preparado. Sobre los elementos se coloca ahora un 'frame' que permita obtener los valores de \bar{l}_0^3 . Para todo lo cual, se toma primero, y de forma aleatoria, un valor entre 0 y 1 y, seguidamente, tomando un intervalo de 0,18, se obtienen entre 5 y 7 giros cuyos valores pueden ser p.e. 0,47, 0,65, 0,83, 0,01, 0,019, 0,37 y 0,55. A continuación, tras determinar los arco-coseno alternantes de tales valores, se hacen medidas de las transecciones, sin mover el preparado pero moviendo el 'frame' o viceversa, según el equipo que se posea.

Simultáneamente, y sobre el conjunto de elementos existentes se tomaron los valores p/P .

Con todos estos datos obtenidos se puede aplicar la fórmula:

$$N_{par} = \frac{P}{P} \cdot \frac{V_{ref}}{V_n}$$

A estos efectos y para ver si nuestro procedimiento resulta útil y exacto, se realizó una prueba empleando los dos tipos de cálculo a partir de los perfiles. Con estas transecciones se obtiene un valor medio de 4,66, lo que daría un v_n de 105,97 empleando $(\pi/3)\bar{l}_0^3$, cuando se toman los valores de transección uno a uno y se obtiene posteriormente \bar{l}_0^3 , el valor de \bar{v}_n es de 108,66, o sea que independientemente de los valores de $v_1, v_2, v_3, \dots, v_n$; es posible calcular el valor medio por cualquiera de los dos mecanismos sin diferencia significativa y según como más convenga a la distribución de los datos en los ficheros.

A partir de nuestro sistema quisimos también comprobar la eficacia de los valores obtenidos en función del número de giros que se den al 'frame' y de medidas que se obtengan. Para ellos dispusimos empíricamente de 5 partículas esféricas de diámetros

10, 8, 6, 4, 2

y 5 partículas elipsoidales cuyos diámetros mayor y menor eran respectivamente

10, 8, 6, 4, 2

5, 4, 3, 2, 1

a partir de estos valores se obtienen unos volúmenes reales que son:
para las esferas

$$\frac{4}{3}\pi l^3 = 523,29; 268,08; 113,09; 33,51; 4,19$$

$$\bar{v}_n = 188,49$$

para los elipsoides

$$\frac{4}{3}\pi a^2 b = 261,79; 134,04; 16,75; 2,09$$

$$\bar{v}_n = 94,24$$

Se hicieron medidas aleatorias ponderadas sobre las partículas antedichas.

Si obtenemos ahora cada uno de los valores l_0^3 ,
 $l_1^3, l_2^3, l_3^3, \dots, l_n^3$ para cada serie se obtuvieron los valores para \bar{v}_n , que para las
esferas fue

$$\bar{v}_n = 182,27$$

y para los elipsoides

$$\bar{v}_n = 96,78$$

es decir, valores sensiblemente próximos a los reales con una variación
respectiva de 3,3% y 2,7%, lo cual supone cifras muy inferiores a los errores que
se cometen con otros métodos.

La forma de control del grosor del corte debe vigilarse inicialmente empleando microtomos adecuados. En nuestro caso, al emplear inclusiones en resina Spurr, un sistema meticoloso de igualdad en la realización de las mismas y un mecanismo de corte como el que proporciona el Pyramitome, obtenemos secciones muy uniformes. Con todo, es conveniente comprobar, cuando menos con el tornillo micrométrico del microscopio, el grosor del corte en varios puntos, y mejor si se dispone de un sistema medidor de desplazamientos; una interferometría resulta menos práctica y por supuesto más costosa.

En el presente trabajo se han llevado a cabo los cuidados anteriores, así como eliminado las modificaciones que puedan ocasionar las retracciones tisulares, pues al trabajar con métodos como el nucleador y el selector se eliminan esas posibles modificaciones.

Sobre los sistemas o procederes empleados en la experimentación

Tratemos ahora del proyecto experimental que ha sido llevado a cabo.

Siguiendo la técnica que se ha descrito en su lugar correspondiente, se emplearon embriones de pollo del estadio 13-15HH a los que se inyectó 0,1ml de una solución de colchicina (obtenida tras añadir a 100cc de solución Ringer 1mgr de la droga), habiéndose encontrado que para estas concentraciones lo más importante era el lugar de la inyección (cerca de la copa óptica y en la cavidad amniótica). La misma pauta de inyecciones se realizó sobre embriones que se encontraban en el estadio 17-19HH.

Las observaciones sobre el material derivado de los embriones se realizaron mediante extracciones de los mismos, que se efectuaron a las 1, 2, 4, y 8h tras

la inyección para embriones del estadio 13-15HH y a las 4 y 8h para los de estadio superior al 16HH.

Los preparados histológicos derivados de las correspondientes tomas fueron tratados alternativamente con los métodos de Feulgen y tinción con toluidina.

La intención del tratamiento con colchicina anteriormente descrito es la de producir acumulaciones celulares en metafase, teniendo en cuenta que en estos estadios la duración total es algo inferior a las 8hr y considerando los resultados al compararlos con embriones en situación normal.

Cuidados y consideraciones estereológicas

Como ha sido suficientemente demostrado (Gundersen, 1978, 1980, 1986, 1988; Weibel, 1980; Cruz Orive, 1986; Badley, 1986; Mattfeld, 1988; Nyengard, 1988; etc.), la mayor parte de las determinaciones cuantitativas y morfométricas realizadas con los métodos anteriores a 1980 suelen ofrecer datos considerablemente sesgados. La forma de evitar esas desviaciones sistemáticas de la media consiste en emplear, de un lado, los nuevos sistemas de análisis estereológico y, de otro, tener presente el concepto de que las secciones ofrezcan perfiles isotrópicos a los distintos estudios.

Siguiendo la reciente estereología, en el presente estudio hemos utilizado fundamentalmente la comprobación de métodos como el nucleador y el selector, con otros como el ya clásico método de Cavalieri para la determinación de los volúmenes de los espacios contenedores y el de De Hoff y Rhines (1961) para el cálculo del número de elementos.



La orientación de las células en el interior de la copa óptica es dependiente del lugar que se tome y por ello se hace necesario conocer la orientación real de los núcleos, para evitar medidas anisotrópicas. Conocida la orientación y al hacer girar adecuadamente los 'frames' estimadores se rompe esa anisotropía, siempre y cuando trabajemos sobre los perfiles mayores de la estructura y aleatoriamente (dado que se toman núcleos completamente contenidos).

La realidad de la afirmación anterior es fácil de entender desde el momento en que es igual tomar aleatoriamente transecciones sobre secciones IUR obtenidas a distintos niveles de la partícula que tomar la partícula entera y girar sobre ella los 'frames', tomando los distintos valores de \bar{l}_0 cuando las formas son elipsoidales y poniendo siempre el diámetro mayor en la misma dirección (paralela a la dirección del corte histológico).

Cuando las partículas son esféricas el proceder será igual, si bien aquí la estructura se ofrecerá isotrópica a cualquier dirección de corte y el único sentido que tiene el giro del 'frame' es la obtención de valores diferentes de l_0 , cuyas terceras potencias (al ser el valor x) darán opción a aplicar la fórmula $(\pi/3)\bar{l}_0^3$.

Un aspecto final a comentar en este apartado metodológico es el de la confección de programas para ordenador con los que podemos conseguir las ventajas de obtener y tratar un volumen de datos que sería imposible de cualquier otro modo.

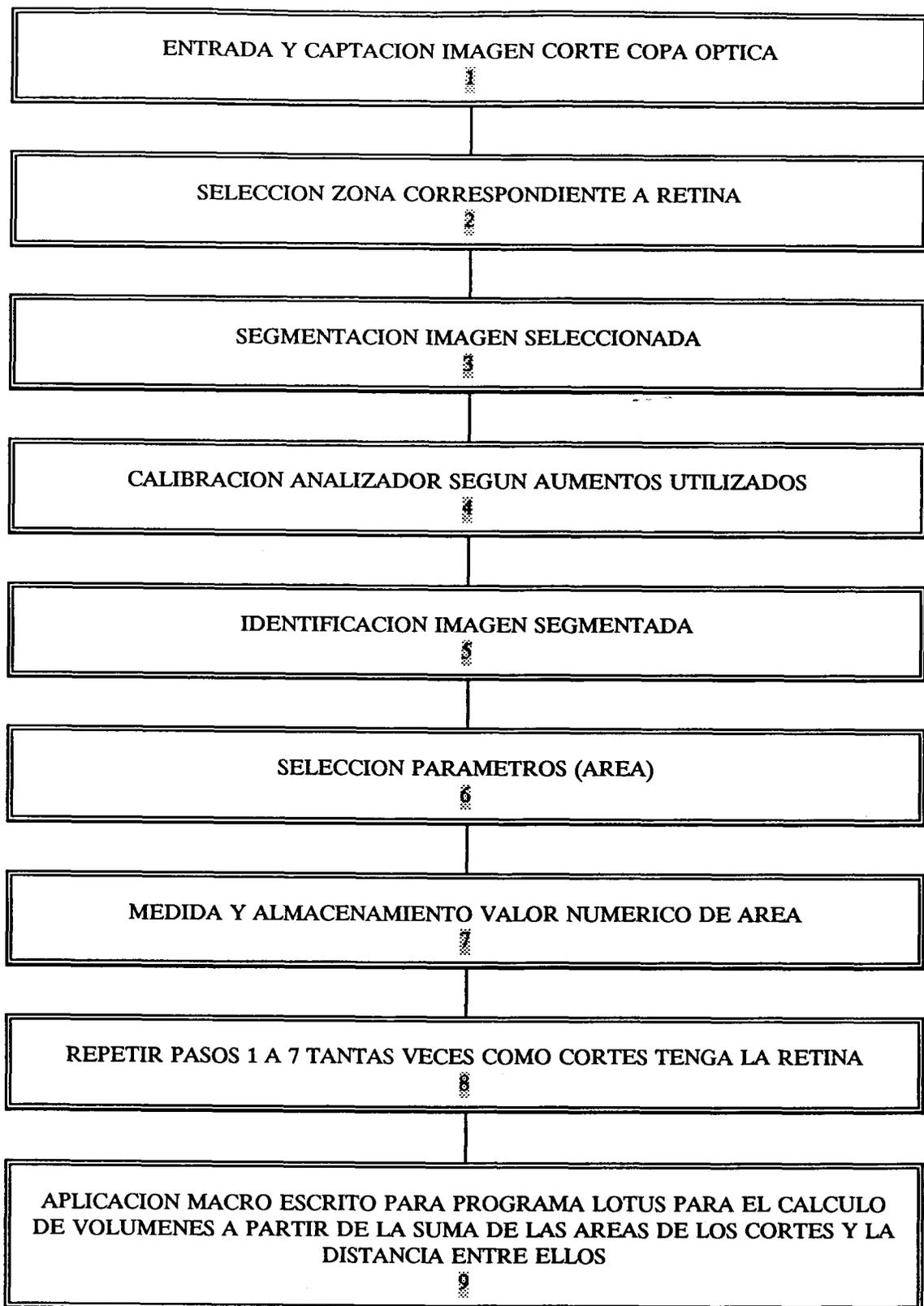
En la realización de las medidas que venimos relatando se ha discutido sobre la eficiencia del empleo de analizadores de imagen frente al de la microscopía convencional de proyección y plantillas. Pero el problema no está en la simple comparación sino en aprovechar las ventajas que ofrecen los analizadores de

imagen y de los ordenadores, con su posibilidad de cálculo, como es la de permitir la realización simultánea de varios tipos de medidas, haciéndose así indiscutible su rendimiento. Además, si se confeccionan programas de medida múltiple, la eficiencia aumenta considerablemente y el programa puede llevar un cierto tiempo, pero luego se dispone de él para todo el conjunto de medidas que se tengan que realizar en el mismo trabajo y en los sucesivos.

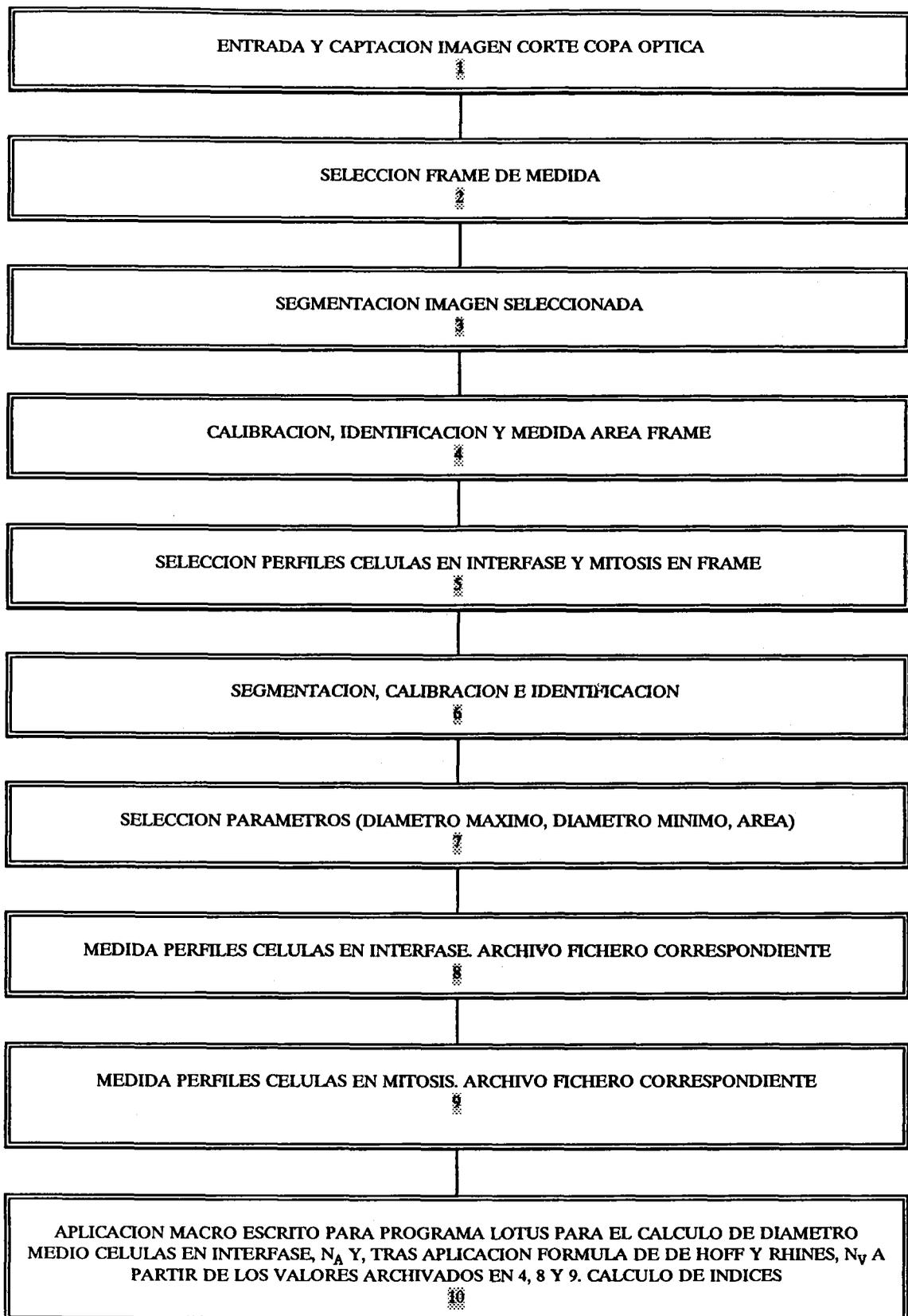
Conviene igualmente relatar el que los valores que se obtengan en cada caso proceden de un material en el que se ha podido fijar el momento de comienzo del tratamiento, pero no es seguro el grado exacto de desarrollo de cada animal y, por lo mismo, los resultados tienen un sentido de significación media y sobre todo al analizar su sentido general de la experiencia y la tendencia de las curvas. A las variaciones de desarrollo base, hay que sumar también la diferente influencia que podría ejercer la droga según las situaciones en que encuentre al animal, algo de cuyo análisis, se carece de información en la bibliografía.

También es de resaltar que en el presente trabajo, si bien se realizaron las medidas anteriormente reseñadas, al comprobar entre la fórmula de De Hoff y Rhines y las de Gundersen y Cruz-Orive su falta de diferencias (sobre los valores fundamentales a estudiar y sobre sus comparaciones), se utilizó preferentemente el método de De Hoff, que es de aplicación más directa a nuestro propósito, teniendo en tal caso valor de utilidad igual y sirviendo los sistemas de Gundersen y Cruz-Orive como de comprobación de la exactitud para los valores que se venían obteniendo por el otro sistema. Es decir, al realizar pruebas y en el estudio de los animales normales, se vio que para los propósitos presentes tanto nos daba un método como los otros, y se empleó, ante tal circunstancia, el más directo.

Para el presente estudio se confeccionaron y ejecutaron los programas cuyos diagramas se ofrecen en los cuadros 1 y 2.



Cuadro nº 1.- Esquema del proceder seguido en el cálculo del volúmen de las retinas objeto de estudio a partir de las áreas de sus cortes (método de Cavalieri), medidas con el analizador de imágenes



Cuadro nº 2.- Esquema del proceder seguido en el cálculo de la densidad numérica en volumen de células en interfase y en mitosis y de los índices correspondientes

II.- SITUACION BIBLIOGRAFICA

**A.- Sobre ciclo y diferenciación celulares
en relación con nuestro tema.**

**B.- Sobre los estadios de desarrollo en la
copa retiniana.**

C.- Estudios estereológicos.

A.- El ciclo y la diferenciación celulares en relación con nuestro tema

Como ya es sabido, el ciclo celular representa el conjunto de acontecimientos que, con un tiempo dado y para unos momentos de desarrollo, siguen las células en su período proliferativo anterior a la diferenciación. Su estudio se inició en torno a los comienzos del presente siglo.

Weissmann (1904), de acuerdo con Roux (1889), atribuye la diferenciación a variaciones existentes en los núcleos celulares, de tal modo que los productos derivados de las mitosis que tienen lugar durante la embriogénesis vienen a ser diferentes, aunque eso sí deben de actuar de una misma forma. Existen también otros factores debidos al ambiente citoplásmico. De acuerdo con esta misma idea se ofrecen las experiencias sobre micromerotomía celular de Spemann (1901, 1903) y los de trasplante nuclear de Briggs y King (1952), todos expresivos de un control nuclear y una interacción citoplásmica.

El proceso de diferenciación va acompañado de cambios significativos en la composición química de las células, cambios que van a depender de la existencia de enzimas determinadas; esto es como decir, que la diferenciación se asienta sobre "la producción de modelos enzimáticos" (como expresara Spiegelman en 1948). Por lo tanto, la relación proteína/DNA podría ser según exponen Davidson y Leslie (1950) una buena medida de apreciación cuantitativa del proceso.

El núcleo central de la diferenciación aparece relacionado según Holtzer y col. (1972) con aquellos mecanismos endógenos que dotan a las células hijas de una situación o información génica que no aparecía ciertamente disponible en su célula madre. Así las cosas, la diferenciación sería consecuencia de mecanismos de regulación en la actividad génica a través de los procesos de

inducción y/o represión de genes concretos, genes en los que muy posiblemente se encuentran implicadas las histonas (Stedman y Stedman, 1950; Huang y Bonner, 1962; Allfrey y col., 1963; Lyser, 1971). El origen de estos mecanismos residiría inicialmente en el citoplasma y consistiría en una desigual distribución de los materiales citoplásmicos del cigoto en la formación de las primeras blastómeras. Argumentos aportados a favor de esta idea son las experiencias de Wilson (1904) y Conklin (1905), así como las más recientes de Fischberg y Blackler (1970). En momentos posteriores a ese primer reparto aparecerían las acciones de sustancias exógenas y todo conjuntamente produciría la modificación de las expresiones génicas.

Sobre la forma de actuación de las señales rectoras o inductoras, Britten y Davidson (1969) exponen la existencia de grupos de genes reguladores y sospechan que la señal inicial conduce a un gen "sensor" que, mediante un "sistema regulador", produce moléculas de RNA activador que pondrán en marcha las secuencias disparadoras de los genes productores. Georgiev (1969, 1972), a diferencia del control positivo propuesto por Britten y Davidson, entiende la existencia de un control negativo, el cual supone que el mecanismo de base ocurriría mediante la represión de secuencias de control.

En los mecanismos de regulación de la diferenciación, Maclean (1976) indica la posibilidad de existencia de genes "directores" cuya misión es la de controlar todo el programa transcripcional de las células en diferenciación (su número no sería superior a 200, en concordancia con el número aproximado de diferentes tipos celulares). Contaríamos, por tanto, con unos 200 programas de distinta diferenciación y, en tal caso, la "determinación" consistiría en la elección de uno de esos programas. Probablemente, la molécula señal que penetra desde fuera en una célula "diana" se asocia en el citoplasma con algún tipo molecular concreto y el conjunto será el que se encargue de alcanzar el correspondiente

lugar de acción a nivel del DNA. En tal sentido, la molécula interna, o de asociación, actuaría como un "perro lazarillo" (Bonner, 1971), siendo su naturaleza un RNA, como propone el mismo Bonner, o un material protéico, según O'Malley y Means (1974).

Pero, ¿cómo es posible el que una célula produzca por división mitótica dos células hijas que vengan a poner de manifiesto condiciones que ella no expresaba?. Balinski (1978) comunica que una vez puesta en marcha la actividad génica se producen sustancias que actuarán sobre los genes, o sus productos de expresión, produciendo nuevos tipos de transcripción, que serán enviados como nuevos mensajeros (ARN) al citoplasma; esto tiene lugar de tal forma que, a medida que prosigue el desarrollo, la célula va empleando nuevos genes cuya novedad de expresión depende de la dirección que la diferenciación haya seguido en las fases anteriores. El problema central de la diferenciación depende, según Holtzer (1972), de mecanismos endógenos que hacen el que las células hijas dispongan de una información genética que no se encontraba realmente disponible en la célula madre; si bien el no estar disponible no supone negar la posibilidad de existencia previa.

Tras cada ciclo celular podemos encontrar dos resultados: a) la formación de dos células hijas prácticamente idénticas a la célula madre, o b) originarse dos células hijas (más o menos pronto) diferentes a la célula progenitora. Cuando los ciclos conducen a la duplicación del fenotipo materno se denominan "ciclos proliferativos", mientras que si se producen células con nuevas perspectivas son denominados "ciclos cuantales" en la expresión de Bishoff y Holtzer (1969) o "críticos" en la terminología de Koniukhov y Sazhima (1976). Un tipo celular diferenciado sólo hará aparición después de un determinado número de ciclos celulares críticos. Es decir, un pequeño número de ciclos de este tipo son responsables del establecimiento de sucesivos estados de

inaparente determinación en las células que se están diferenciando (Holtzer y cols., 1972). Esta situación está confirmada por experiencias de inhibición de la mitosis y de la síntesis del ADN, de tal modo que si esta situación antedicha no ocurriera tampoco tendría lugar el estado final de la diferenciación (Tsanev y Sendov, 1971).

En todo ciclo distinguimos la interfase del período mitótico. En éste observamos los cambios de estructura ocurridos fundamentalmente a nivel del núcleo, siendo mucho menos aparentes las modificaciones del citoplasma y membrana plasmática. Hay que distinguir, por tanto, dos acontecimientos: la mitosis, o división del núcleo, y la citocinesis, o división del citoplasma y estrangulación de la membrana. Fue Flemming (1882) quien realizó la primera descripción del proceso mitótico, si bien ya había sido observada previamente. La fase mitótica ha sido subdividida en cuatro fases denominadas: profase, metafase, anafase y telofase. Sabemos también que durante estas etapas tiene lugar la separación y distribución equivalente de los cromosomas, cuyo material había sido previamente duplicado durante la interfase.

Entre cada dos fases de período de división transcurre la interfase. En su transcurso se lleva a cabo la síntesis de las histonas, la duplicación del ADN, formación de otros materiales, como los precursores del huso acromático, y las acciones metabólicas necesarias para proveer de la energía que se haya de emplear en el proceso. De todas estas síntesis, la que mayor interés ha despertado es la del ADN, cosa, por otro lado, lógica ya que todo el proceso se presenta como orientado al reparto de este material. La metodología empleada para el conocimiento de la duplicación de este polinucleótido se ha basado en el empleo de isótopos radiactivos, marcadores de la división o técnicas citofotométricas, introducidas por Casperson (1940). Mediante éstas se puede conseguir la determinación cuantitativa en el desarrollo de la síntesis del ADN.

En 1941, Casperson comunicó que el contenido de ADN se incrementaba de manera continua durante la interfase para proseguir hasta la metafase. Posteriormente, Swift (1950) y Patau y Swift (1953) demostraron que la cantidad de ADN permanece constante a lo largo de la mitosis, concluyendo que la duplicación de este polinucleótido debía de tener lugar durante la interfase. Mediante estudios realizados sobre división celular con P^{32} , Howard y Pelc (1953) distinguen dentro de la interfase y en relación a la actividad de síntesis de ADN, tres períodos: uno postmitótico, durante el que no se detectaba incorporación del marcador y que denominaron " G_1 "; a continuación, un período en que sí se detectaba incorporación del marcador, en él ocurría la duplicación del ADN y se le dió el nombre período "S" y, finalmente, un " G_2 " (premitótico) durante el cual tampoco se detectaba incorporación del isótopo. El conjunto de estas tres etapas constituyen lo que se denominó interfase. Durante ésta las células parecen mostrar la misma imagen general, pero con modificaciones de tamaño.

Son varios los métodos que permiten analizar las fases del ciclo. Todos ellos, hagan uso o no de isótopos radiactivos, persiguen el "marcar" o señalar las células en momentos diversos. Un método consiste en emplear la cafeína; se debe a Kihlman (1955), quien, estudiando los efectos de la teofilina sobre poblaciones celulares, observó la aparición de células binucleadas, pensando entonces que tal situación podría ser empleada en estudios sobre ciclos de división. La duración del ciclo se determina por el tiempo correspondiente comprendido entre la aparición de dos picos consecutivos de mitosis (González-Fernández y cols., 1966).

Un proceso análogo al conseguido con la cafeína se basa en el método que utiliza la 5-bromo-deoxiuridina (BUdR). Este método, desarrollado por Wilt y Anderson (1972), aprovecha la condición de que ese compuesto, por ser análogo

a la timidina, es incorporado al ADN suplantando a la base pirimídica en aquellas células que se encuentran realizando la síntesis de la cadena polinucleotídica (Schwartzman y Gutiérrez, 1980; Gutiérrez y López-Sáez, 1982). Uno de los métodos más habitualmente empleados es el de Quastler y Sherman (1959); se basa en que las células que se encuentran sintetizando ADN incorporan la timidina- H^3 ; tal incorporación puede ponerse de manifiesto mediante citoautorradiografías, es decir, películas fotográficas impresionadas por la radiactividad que emite este precursor radiactivo del ADN. El producto es incorporado únicamente por las células que se encuentran en la fase "S" del ciclo. Tras dar un "pulso" (incubación en corto espacio de tiempo), el porcentaje de células que se marcó alcanzará un máximo transcurrido un tiempo concreto; a partir de ese momento, el porcentaje disminuirá, para más tarde experimentar otro ascenso hasta alcanzar un segundo máximo. El intervalo de tiempo transcurrido entre los dos máximos se corresponde con la duración del ciclo celular o "tiempo de generación". El modo práctico más conveniente de estudiar estos dos picos es tomando como momento de observación el correspondiente a las células que se encuentran en su estado de división. El proceso permite también calcular la duración de las fases, determinando los tiempos del ciclo tras el empleo de algún inhibidor mitótico como la colchicina (Morris y cols., 1979). Sin embargo, la técnica más ampliamente empleada consiste en la simultánea administración de colchicina y timidina- H^3 en los inicios del experimento y posteriores administraciones repetidas para que se pueda mantener el marcaje durante el tiempo que dura el ciclo celular. El conjunto de células en interfase que no han sido marcadas disminuye a lo largo de un período de tiempo de valor igual a G_1 y se corresponde con el porcentaje de células que no son proliferativas. Por otra parte, el porcentaje de metafases marcadas va aumentando hasta un máximo en un tiempo igual al del ciclo celular. Las metafases que quedan permanentemente sin marcar representan el porcentaje del ciclo ocupado por G_2 : La relación entre células no marcadas y

células marcadas desciende hasta un mínimo, empleándose en ello un tiempo igual al de la duración de la fase S. Se pueden también hacer cálculos deduciendo del tiempo total del ciclo la suma de las fases que se conozcan.

Del conjunto experimental con los diversos procederes se ha llegado a conocer que la duración del período G_1 es muy variable, en tanto que S y G_2 presentan, generalmente, un comportamiento más regular. G_1 es el período en el que se decide el futuro de la célula, en el sentido de que aquí se determina si va a seguir dividiéndose o iniciar el camino de la diferenciación, entrando en la fase denominada G_0 (Prescott, 1976; Brooks y cols., 1980). Scott y cols. (1982, 1984) han distinguido dentro del período G_1 cuatro subetapas: G_D , G_S , G_C y G_N ; en G_S y en G_N la célula es sensible a los nutrientes, en G_C a factores de crecimiento, mientras que en G_D la célula se mostraría sensible a determinadas sustancias que conducirían a una continuidad en G_0 y la definitiva instalación de la diferenciación.

Langman y cols. (1966) proponen para calcular la duración de la mitosis un método que parte del valor del índice mitótico de Leblond y Walker (1956) y Messier y Leblond (1960). El índice mitótico representa el número de células que, en una población homogénea, se encuentra en división frente al número existente en interfase en un momento dado; viene determinado por:

$$I_m = \frac{N_m}{N}$$

En esta fórmula I_m es el índice mitótico, N el número total de células de la población y N_m el número de células en mitosis. Como el índice mitótico es una función de la duración de la mitosis (t_m) y de la duración del ciclo celular (t_g), resultará que:

$$\frac{N_m}{N} = \frac{t_m}{t}$$

De los anteriores valores sólo es conocido I_m . Para el cálculo de t_m y t_g , Langman y cols. (1966) emplean el sulfato de vincristina (inhibidor mitótico que, al igual que la colchicina, detiene la mitosis en metafase) y desde aquí calculan el "índice de vincristina" (I_v) como:

$$I_v = \frac{N_{am}}{N} = \frac{t_v}{t_g}$$

en donde N_{am} es el número de células detenidas en metafase a un tiempo dado después del tratamiento (t_v).

Del conjunto se deduce que:

$$t_g = \frac{t_v \cdot N}{N_{am}}$$

Los estudios llevados a cabo en una población, observada durante las primeras fases del desarrollo de la copa óptica del pollo, se realizan sobre un conjunto que se encuentra prácticamente todo él en división. En nuestro estudio, y cuando en cada caso hablamos de porcentaje de duración, nos referimos a la participación que ese porcentaje representa en el índice correspondiente, pero hay que entender que los valores se obtienen a partir de una estructura que ofrece zonas en diferente estadio y células de diferente velocidad de ciclo, y, por ello, la conveniencia de distinguir sectores y zonas dentro de la totalidad de la copa.

Durante las primeras etapas del desarrollo se aprecia que las zonas prospectivas de Sistema Nervioso están inicialmente constituidas por células indiferenciadas que, después de varios ciclos de división, experimentan una serie concatenada de modificaciones que las transforman en elementos neuronales de transmisión y de soporte y facilitación metabólica o gliales.

Siguiendo la descripción clásica de His (1889, 1904), los lugares de diferenciación nerviosa pueden ofrecer las siguientes capas: (1) endimaria, que bordea la luz del tubo; (2) la del manto, abundante en células y (3) la capa marginal, con escasas células o incluso acelular. En la opinión de este autor, la capa endimaria aparecería a su vez integrada por dos regiones, una más interna, compuesta de células redondeadas en la que aparecen frecuentes figuras mitóticas (son las células germinales), y otra más exterior, que consta de células alargadas, denominadas espongioblastos. Hay células germinales que, emigrando hacia la capa del manto, se diferenciarían en neuroblastos, mientras que los espongioblastos darán lugar a las células gliales. Schaper (1897), en desacuerdo con His, sugiere que tanto células germinales como espongioblastos representan diferentes fases del ciclo de un mismo tipo celular.

Otros análisis llevados a cabo a lo largo de etapas iniciales del desarrollo son los de Sauer, quien en 1951 y realizando estudios citológicos, defiende, si bien indirectamente, la tesis de Schaper. Para Sauer, la capa endimaria es un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, en el cual las células integrantes se unen a las superficies externa e interna de la misma mediante barras terminales. Cuando las células están próximas a dividirse, ocurre el acercamiento de sus núcleos a la superficie luminal del tubo, entrando, a continuación, en la etapa de división, es decir, pasamos a una profase en la que encontramos aumento del volumen nuclear y del diámetro celular. En metafase, tiene lugar la retracción y desaparición de las proyecciones que anclaban a las células a la superficie

externa, observándose la esfericidad final de las mismas; por último, en telofase, aparece la regeneración del material de anclaje superficial, volviendo la célula a la configuración bipolar inicial, mientras los núcleos, alejándose de la superficie luminal, vuelven a situarse más centralmente en la capa. Este movimiento de los núcleos, denominado por Sauer (1935) "migración intercinética nuclear", parece que se realiza a velocidad constante tanto en su desplazamiento hacia la superficie luminal como en su vuelta.

Empleando venenos mitóticos como la colchicina, se ha podido comprobar, como hicieron Watterson y cols. (1956), que la teoría de Sauer es acertada y se cumple en una considerable variedad de los denominados epitelios embrionarios. Este parecer de Sauer (1936, 1937) ha sido confirmado por otros autores como Källen (1961, 1962). También se confirmó con el empleo de la citoautorradiografía, como hicieron Sauer y Walker (1959), Sidman y cols. (1959), Fujita (1963, 1965), Atlas y Bond (1965), Martin y Langman (1965), o utilizando sulfato de vincristina como hacen Langman y cols. (1966).

Es sabido que la capa superficial o capa endimaria fue denominada por Fujita (1963) capa matricial, mientras que Langman (1968) la denominaba capa neuroepitelial. Estas diferentes denominaciones vinieron a unificarse con la designación de "capa ventricular" a la capa endimaria de His y, a la capa del manto, "zona intermedia".

Con la denominación de "movimiento elevador" o de "vaivén" figura en el trabajo de Fujita en 1963 (este término es más bien debido a Sidman, 1961) el movimiento que realiza el núcleo antes, durante y tras la división celular. La razón de este acontecimiento permanece aún sin respuesta, si bien algunas opiniones como la de Jacobson (1978) indican que las migraciones podrían favorecer la entrada a los núcleos de factores citoplásmicos que inducirían la

puesta en marcha de una actividad génica diferencial. En relación con las variaciones de la forma que las células experimentan durante la realización de los movimientos antedichos, Sauer (1937) es de la opinión de que intervienen fuerzas interiores de la célula, viendo como responsables a las fibras citoplásmicas, similares a las del huso acromático, y que actuarían fundamentalmente durante la interfase. Otros autores, como Pearce y Zwaan (1970), encuentran que el redondeamiento celular lleva consigo la disociación de microtúbulos, que se vuelven a ensamblar en G_1 ; estos serían análogos a las fibras observadas por Sauer. Tras la desintegración microtubular, la célula podría redondearse debido a las condiciones geométricas de la esfera, que necesita para mantenerse menor energía de superficie. Messier y Auclair (1974) han propuesto que los movimientos de desplazamiento tienen lugar mediante procesos contráctiles, debido a la comprobación de que la citocalasina B es un inhibidor de la migración intercinética nuclear en el tubo neural de embriones de pollo.

Con la multiplicación celular, se vendrá produciendo un crecimiento poblacional en el que Morris y Cowan (1984) distinguen tres fases: una primera fase exponencial, durante la cual el número de células aumenta con este signo exponencial; en esta fase las dos células hijas producto de la mitosis de la célula madre mantienen su capacidad de división. Una segunda fase, de iniciación de diferenciación, en la cual aparece una retirada de células del ciclo de división y donde se puede apreciar que las células comienzan formalmente a diferenciarse, pero quedando todavía un grupo que continuará dividiéndose activamente; finalmente, una tercera fase, o última, en la que la población permanece casi constante e incluso disminuye por los procesos de migración (cuando exista) y muerte celular. La circunstancia de que una población se encuentre en cualquiera de las fases antedichas va a depender, según Dutting y cols. (1983), de su "índice de renovación", que se define como el porcentaje

de células que seguirán dividiéndose tras la división de las células madre. Estos valores pueden calcularse mediante citoautorradiografía; en caso de que la renovación sea superior al 50%, significa que el número de células proliferativas aumenta y que, consiguientemente, lo hará la población total; si fuera igual o menor al 50%, el número de células en proliferación se mantendrá o disminuirá, aunque el conjunto total seguirá aumentando, si bien la curva de crecimiento disminuye, y si, por último, el porcentaje de renovación fuera nulo, la población se mantendrá o disminuirá (caso de muerte, por ejemplo), en cuyo momento se puede decir que prácticamente todas las células entraron en G_0 y siguen ya el camino de la diferenciación final.

De los estudios antedichos sobre actividad mitótica se pueden obtener por observación microscópica directa: (a) el número medio de figuras mitóticas por área de sección (Hamburger y Kneefe, 1944; Hamburger, 1948); (b) el número de mitosis por cada cien células recontadas o "índice mitótico" (Coghill, 1924, 1933; Derrick, 1937; Fujita, 1964, 1967); (c) la media de mitosis por unidad de área ventricular o "densidad mitótica" (Hamburger, 1948), y en lo experimental los valores equivalentes a la acumulación metafásica.

En el conjunto de las diferentes medidas antedichas ya se ve que las más prácticas han de ser la "b" y la "c". El índice mitótico indica aproximadamente las células que se encuentran en mitosis en el espesor de la capa ventricular en un momento concreto (Källen, 1961); si el número de medidas o estudios realizados en una misma situación es suficiente, el valor del índice resultará significativo. La densidad mitótica puede tomarse directamente como el grado de acumulación de mitosis por todo el área ventricular y es un valor que podrá variar según el distinto carácter del desarrollo de la zona que se estudie.

Disponemos en la obtención de parámetros de métodos que nos permiten cuantificar la actividad mitótica, tales como los que utilizan la colchicina o marcaje de ADN con timidina tritiada. Se pudo comprobar que la colchicina produce alteraciones en el Sistema Nervioso Central del embrión de pollo (Paff, 1939; Overton, 1958; Källén 1962; Corliss y Robertson, 1963). A pesar de tales alteraciones, estos métodos son, como vimos anteriormente, los más empleados para determinar la duración de las distintas fases del ciclo celular. Los estudios vienen a concluir que el ciclo celular en los vertebrados se va alargando conforme la embriogénesis avanza (Kauffman, 1968). Así las cosas, resulta que las células matriciales, en las diferentes etapas del desarrollo, se comportan, según el parecer de Hoshino y cols. (1973), como si pertenecieran a conjuntos que en su diferenciación se encuadrarán como entidades distintas.

Cualquier variación detectada a lo largo del ciclo es producto del correspondiente retardo en una o varias de las fases que lo constituye. Así, se ha podido ver (Defendi y Mason, 1963; Cameron, 1964; Prescott, 1964) cómo en mamíferos la fase más afectada con el desarrollo es la G_1 , mientras que S, G_2 y M permanecen relativamente constantes. Autores como Wilson (1973, 1974) han podido ver cómo, en el techo óptico de embriones de pollo, G_2 y S permanecen constantes, mientras que se modifican con el desarrollo G_1 y M. Conforme el tiempo transcurre, llega un momento de la embriogénesis en que aparecen células que, separándose de su anclaje a la superficie luminal, se desplazan hacia la capa del manto y entran en G_0 .

Para Martin (1967) la orientación normal del plano de división en el conjunto neuroepitelial es la perpendicular a la superficie ventricular, lo cual implica, a su vez, una orientación paralela del propio huso. Cuando el plano de división es paralelo, el huso aparecerá perpendicular, con lo que una de las células hijas quedará más alejada del borde ventricular, dejará de estar anclada a esta

superficie y se encontrará más libre para realizar su migración hacia la capa del manto. Según Sechrist (1969), el futuro de las dos células hijas queda determinado antes de la división final de la célula progenitora. Esto podría ocurrir bien durante la interfase anterior, bien durante la mitosis, o bien durante ambas; el que pueda ocurrir algo durante la mitosis o bien el que la mitosis ofrezca manifestaciones de que el cambio ha tenido lugar constituye una de las hipótesis de nuestros trabajos. Hinds (1977) apunta la posibilidad de que en el Sistema Nervioso Central la decisión de una célula para entrar o no en división ocurre a finales de G_1 . En este sentido, Fujita (1963) cree en la posibilidad de que la diferenciación neuroblástica se determine en la capa matricial conforme la célula va descendiendo, pudiendo reconocerse signos de diferenciación cuando la célula ha abandonado la capa matricial; opina Fujita que la diferenciación neuroblástica ha de tener lugar antes de que la célula recién formada entre en el período de síntesis de ADN, coincidiendo, por tanto, con el período de parada postmitótico.

Una vez que se instala el proceso final de diferenciación hay que distinguir dos fases: una menos clara o "cover", y otra detectable u "over". Según Grobstein (1964), la primera fase comprende sucesos poco conocidos que nos llevan a la segunda, en la cual se hacen detectables las modificaciones intracelulares. Estas situaciones, claro está, dependerán de la metodología de que vayamos disponiendo y de los avances que vayan teniendo lugar. Los primeros cambios detectables en el neuroblasto son, según diversos autores: un desarrollo de retículo endoplásmico rugoso (Fujita y Fujita, 1963; Pannesse, 1968), una indentación del núcleo (Fujita y Fujita, 1963), la aparición de filamentos citoplásmicos (Lyser, 1964, 1968) y un incremento de la actividad acetilcolinesterásica (Strumia y Baima-Bollone, 1964; Burt, 1968; Miki y cols., 1981), cambios todos ellos que conducirán con porterioridad al desarrollo del axón, el cual, cuando se aproxime a otro neuroblasto, podría inducir en éste una serie de cambios de diferenciación, representando los momentos finales y definitivos.

B.- Sobre los estudios de desarrollo en la capa retiniana

Fue gracias a J. Kepler (1608) el que se llegara a concebir la retina como tejido totalmente sensible primario del ojo, debiéndose también a él la idea de comparar el ojo con una cámara, sobre cuya superficie posterior resultaba enfocada la imagen.

Los estudios sobre la constitución histológica de la capa retiniana comenzaron hace algo más de cien años. Fueron Müller (1857) y Kölliker (1867) quienes iniciaron tales estudios mediante el empleo del ácido crómico. A partir de entonces se ha podido ir viendo cómo Schultze (1867) descubría las gotas coloreadas en la retina de las aves, Hoffmann (1877) comunicaba la existencia en la retina de estos mismos animales de dos tipos de conos (los correspondientes actualmente a las formas simple y doble), Golgi (1873) daba a conocer sus iniciales técnicas, y Ramón y Cajal (1892, 1909 y 1911, 1932 y 1933) se ocupaba de exponer la organización histológica retiniana, que aún hoy conservamos como de gran utilidad.

Tras los análisis realizados con la microscopía electrónica se han podido ampliar los conocimientos del carácter más fino de los elementos retinianos (Morris y Shorey, 1967; Pedler, 1969; Meyer, 1973) que constituyen la zona.

A partir de las diferentes comunicaciones que se fueron recibiendo, se llegó al establecimiento de que la retina de aves consta de nueve estratos diferentes. Tales estratos pueden ser distinguidos ya a partir de los tres días de la eclosión, como Sheffield y Fishman (1970) comunican. En estos estratos distinguiremos seis tipos neuronales: conos y bastones (fotorreceptores), células bipolares, células horizontales y amacrinas, y, como último elemento de proyección, las células ganglionares. Entre las células fotorreceptoras, las horizontales y las

bipolares se establecen contactos intersinápticos a nivel del estrato plexiforme interno. También se establecen contactos sinápticos entre las bipolares, amacrinas y ganglionares, pero en este caso a nivel de la plexiforme externa. Junto a los elementos neuronales anteriores podemos detectar la existencia de las células gliales, conocidas como células de Müller. En cuanto a los análisis de tipo morfométrico o cuantitativo, encontramos comunicaciones como las de Morris (1970), Dütting y cols. (1983), Almendros y cols. (1982) y Abadía-Fenoll y cols (1983, 1984). Sobre la presencia o ausencia de áreas foveales en la retina del pollo se han establecido controversias: Chievitz (1891) y Slonaker (1897) describen un engrosamiento en la capa retiniana que se correspondería con el área lateral de otras especies (Meyer y May, 1973), en tal engrosamiento se daría una concentración del tipo de conos fotosensibles.

El desarrollo de la retina en sus primeras etapas

El inicio de la formación ocular parte de las vesículas ópticas primarias, que aparecen como evaginaciones de la región latero-inferior diencefálica (Pander, 1817). Constituyen las bolsas laterales de la porción rostral de los pliegues neurales (O'Rahilly y Meyer, 1959; Mann, 1969; O'Rahilly, 1975). La situación se corresponde con el estadio 9 de Hamburger y Hamilton cuyo número de somitas (7) prueba lo inicial del proceso.

La zona que pone en conexión cada vesícula óptica y el encéfalo se conoce como tallo óptico. Durante el crecimiento vesicular tiene lugar un desplazamiento dorsal de la formación óptica en desarrollo, lo que determina una posición ventral para el tallo. Hacia el final del estadio 13, comienzos del 14HH (23 somitas), tiene lugar la invaginación de la porción más lateral o externa, que, en su progreso irá formando una copa de paredes dobles, o

vesícula óptica secundaria (O'Rahilly y Meyer, 1959; O'Rahilly, 1966; Mann, 1969). Sobre las causas de este proceso, Slonaker (1921) describe la existencia de una mayor proliferación celular en la parte superior y periférica de la retina; mientras Hunt (1961) encuentra como razón de la invaginación la desaparición de los espacios intercelulares; por último, Brady y Hilfer (1982) opinan a favor de la existencia de un proceso contráctil dependiente de la presencia de iones Ca^{++} y el metabolismo correspondiente.

Si bien en las aves no aparece arteria hialoidea, la irregularidad de la invaginación de la copa determina la aparición de una hendidura en la parte más ventral de la misma. Posteriormente se constituye la fisura óptica (Silver y Hughes, 1973), quedando el tallo óptico unido a la porción nasal de la retina inferior (Grant, 1980). A partir del estadio 13-14 la retina neural inicia su conformación, ocurriendo paulatinamente un aumento en su grosor así como una expansión superficial (Cameron, 1902; Weyss y Burgess, 1906; Coulombre, 1955).

La proliferación y organización retiniana se ha clasificado en tres períodos:

- 1.- Período proliferativo.
- 2.- Período de adaptación o acoplamiento.
- 3.- Período de diferenciación de tipos celulares.

1.-Período proliferativo.-

En la población retiniana no existe migración de células fuera del sistema (Morris y Cowan, 1984). Todas las células constituyentes de la retina adulta proceden de divisiones del conjunto inicial. Entre las 60 y 96h de incubación aparecen, según Mishima y Fujita (1978), los primeros neuroblastos, situados

hacia el borde vítreo y procedentes del epitelio pseudoestratificado, cuyos núcleos se encontraban homogéneamente repartidos por toda la anchura de la capa retiniana. Contrariamente, las células que se encuentran en momento de división aparecen, en la retina, localizadas junto al borde ventricular.

En la maduración neuroblástica, y tal y como acontece en el resto del Sistema Nervioso Central, la célula neuroepitelial retiniana realiza la replicación de su ADN alejada del borde ventricular (es decir, alejada del lugar donde realizará el proceso de división); por lo tanto, en las zonas medias y profundas de la capa (Sidman y cols., 1959; Sauer y Walker, 1959; Fujita, 1962; Langman y cols., 1966). Con posterioridad a haber alcanzado el valor 4C, la célula se hace esférica, como relatan Stensaas y Stensaas (1968) y Hinds y Ruffet (1971), dirigiéndose entonces con su núcleo hacia la luz ventricular. Ahora tendrá lugar la división mediante el proceso mitótico, tras el cual la célula volverá a adquirir su carácter alargado y los núcleos de las células hijas emigrarán de nuevo hacia regiones más internas o vitreales en la capa.

A través de estudios cuantitativos y cualitativos autorradiográficos se ha podido observar que el número de células se incrementa en todas las zonas retinianas hasta momentos cercanos al séptimo día de incubación (Dütting y cols., 1983). Entre las 120 y 168h de desarrollo, la actividad proliferativa ha sido descrita como mayor en la región nasal (que es como considerar la zona anterior de las aves) que en la temporal. A partir de las 160h, la proliferación desciende, coincidiendo con una considerable entrada de células en G_0 . La zona central aparece más baja en proliferación (Calvente, 1985). Hasta las 96h de incubación la retina consta únicamente de células matriciales, con capacidad para la replicación del ADN según Fujita (1963) y Mishima y Fujita (1978). Según estos autores, en esos momentos aparecen los primeros neuroblastos con manifestación morfológica; Cowan y cols. (1968) y Kahn (1974) son de la

opinión de que los neuroblastos inician su aparición mucho antes; en nuestro Departamento (Calvente, 1985) consideramos que, independientemente del momento de aparición de unos primeros neuroblastos, éstos no significan estadísticamente una población a tener en consideración hasta pasado el estadio 19. Constituidos los neuroblastos, éstos migran hacia la parte interna de la capa matricial, constituyendo la llamada capa del manto. Este período, constituye la fase de crecimiento de la copa (Morris y Cowan, 1984) y representa los momentos proliferativos de sus células iniciales.

Como cabría esperar, las células que en la copa están situadas en las zonas periféricas se diferencian después de las localizadas en la porción central (Fujita y Horii, 1963). También hay que resaltar el hecho de que en cualquier región observada la diferenciación progresa desde la superficie vítrea hacia la escleral, es decir, desde la localización definitiva de las neuronas ganglionares hacia la ubicación de los fotorreceptores, teniendo lugar el que los elementos fotosensibles son los últimos en adquirir su madurez (Lopashov y Stroevea, 1964). Según Räger (1980), existe un tercer gradiente u orden de maduración, según el cual las regiones temporales van más avanzadas que las nasales. Altman (1970) y Jacobson (1970) encuentran que existe una relación entre aquel momento en que los neuroblastos se constituyen y la condición de su desarrollo posterior, de tal modo que neuroblastos que dejan de dividirse en los comienzos de la embriogénesis parecen diferenciarse en grandes neuronas, las cuales ofrecen un considerable grado de organización estereológica en sus conexiones. Por el contrario, las pequeñas neuronas prolongan más sus ciclos, tienen axones más cortos y constituyen una población de mayor porcentaje entre los tipos interneuronales. Según Kahn (1974), las primeras células que en la retina cesan en su división son las grandes células ganglionares, frente a éstas las pequeñas células bipolares lo hacen en último lugar del proceso.

Rapaport y Stone (1983) han encontrado en retina de embriones de gato diferencias entre profases y metafases en las regiones central y periférica, lo cual coincide con los trabajos de Abadía y cols. (1983-1984) en embriones de pollo. La región central se presenta como inferior en profases a la periférica, mientras que con las metafases ocurre todo lo contrario. Rapaport y Stone (1983) sugieren que la causa de esta situación estriba en un incremento de la duración relativa de las metafases, pudiendo todo ello guardar relación con una caída de la cinética responsable de la formación de los microtúbulos constitutivos del huso mitótico que llevarán a la anafase.

Según las afirmaciones de Jacobson (1968), las diferenciaciones tienen lugar (en su determinación) antes de que sean detectables variaciones morfológicas. Ya se dijo anteriormente que estos momentos de manifestación fenotípica ocurren para Fujita y Horii (1963) y Mishima y Fujita (1978) hacia el 5º día de incubación, mientras que otros autores opinan que el proceso puede aparecer ya hacia el final del 2º día o comienzos del 3º, específicamente en el fundus ocular (Kahn, 1973). Con este autor coinciden O'Rahilly y Meyer (1955), Rogers (1957), Sechrist y Lavelle (1966) y Goldberg y Coulombre (1972), si bien en cada caso conviene definir qué se cataloga como diferenciación.

Por lo tanto, de acuerdo con las distintas comunicaciones recibidas, la secuencia de diferenciación retiniana sería: ganglionares, amacrinas y horizontales, fotorreceptores (que podrían adelantarse) y, por último, bipolares y gliales de Müller, cuya diferenciación se establece con un cierto retraso (Sidman, 1961; Kahn, 1974) si se compara con la neuronal.

2.- Período de adaptación o acoplamiento.-

Existe un proceso según el cual al analizar el número de neuronas constitutivas de una retina adulta tras varios ciclos se ve que el valor resulta menor al que correspondería de acuerdo con el número de ciclos. La razón está en que se dan ajustes o disminuciones del número poblacional por muerte celular, muertes que, por otra parte, no son considerables en los primeros momentos. Según algunas comunicaciones, las degeneraciones en la retina de pollo empiezan a tener significación hacia el 8º día de incubación (Hughes y Lavelle, 1975; Rager, 1980). A partir de ese momento, el número de células perdido, según los mencionados autores, puede llegar a ser del 30 o incluso del 40% (pero el proceso en menor escala comienza en momentos más iniciales). Räger y Räger (1978) denominan "system-matching by degeneration" el sistema según el cual los ajustes finales de las redes neuronales tienen lugar a través de muerte celular como efecto de la instalación de contactos sinápticos irregulares entre los diversos terminales.

3.- Período de diferenciación de tipos celulares.-

Sobre los 10 días de incubación se pueden distinguir las cinco poblaciones detectables en el adulto, y aparecen ya dispuestas en capas, si bien estas células no han conseguido aún su estado definitivo (Sheffield y Fishman, 1970). Cercana a los 14 días de desarrollo cesa, según Coulombre (1955), la actividad mitótica en la copa. Alrededor del día 19º parece que la retina está en condiciones de ser fotosensible (Lindemann, 1947).

Los contactos sinápticos ocurren en la retina de modo análogo a como lo hacen en el resto del Sistema Nervioso Central, y acontecen de tal modo que

comienza por la formación de puntos de adhesión o *puncta adhaerentia*. El fenómeno se establece en el lugar de las llamadas capas plexiformes y en momentos cercanos a la primera quincena (Sheffield y Fishman, 1979). Posiblemente se trata de un proceso de reconocimiento químico o afinidad entre los neuroblastos y sus prolongaciones, como es el parecer de Weiss (1947) y Hughes y Lavelle (1974).

Aproximadamente a los siete días de incubación, tiene lugar el desarrollo de la capa de contactos que forman la plexiforme interna, y ésto ocurre simultáneamente con la formación de procesos dendríticos en las neuronas ganglionares (Coulombre, 1955; Shen y cols., 1956). Como las células amacrinas se observan a los seis días y, según Shen y cols. (1956), son seguidas por las bipolares en su diferenciación, la capa plexiforme externa (en la que se establecen los contactos sinápticos entre células visuales y células bipolares) se desarrollará sobre el 9º día de incubación. Estas uniones de la capa plexiforme externa se llevan a cabo tanto en la capa de los futuros fotorreceptores como entre los demás elementos que forman la citada capa (Hughes y Lavelle, 1974; Sheffield y Fishman, 1970). En cuanto a los segmentos internos de los conos y bastones, tal y como Walls y Judd (1933) y Wald y Zussman (1937, 1938) informaron, tales prolongaciones se detectan ya en el 10º día de incubación como bulbos en el extremo inferior de las células fotosensibles; a partir de ese momento van creciendo lentamente hasta el día 15º para, a continuación, sufrir una rápida conclusión de la diferenciación, la cual viene a presentarse funcionalmente apta hacia los días 19º y 20º. El proceso se inicia en las zonas centrales y se extiende hacia la periferia en los primeros días siguientes a la eclosión (Coulombre 1955). Según Shen y cols. (1956), las células horizontales aparecen en el 14º día; tal información está en discrepancia con la opinión de otros autores, quienes consideran que dicho acontecimiento ha de ocurrir de modo previo a la diferenciación de las células fotosensibles.

También nos parece de interés para tenerse en cuenta la información de Hughes y Lavelle (1974) demostrando que la diferenciación sigue una línea centrífuga de vesículas sinápticas en los elementos celulares retinianos, lo que anula la posibilidad de interpretación de que la función de los fotorreceptores es necesaria o influyente para la maduración de la cadena transneuronal que representa la línea de progresión en el sentido de la transmisión.

C.- Estudios estereológicos

Según es sabido la Estereología es esa parte de la ciencia que ofrece información sobre la disposición tridimensional de una estructura y los elementos contenidos en ella a partir de imágenes bidimensionales o perfiles que a ella pertenecen.

Como dice Gundersen y cols. (1988), los métodos estereológicos son herramientas precisas para la obtención de información cuantitativa sobre aspectos microestructurales en la disposición tridimensional. Realmente, la Estereología también ha de servir para analizar lo macroscópico. Igualmente, como ha sido repetidamente descrito (Weibel, 1983; Gundersen, 1988), las imágenes bidimensionales contienen información únicamente en un sentido estadístico.

En el quehacer estereológico se trata de emplear:

- a) Los métodos de determinación volumétrica y reconstrucción conseguidos sobre secciones histológicas seriadas.
- b) Procederes matemáticos que se emplean para la obtención de parámetros tridimensionales que pertenecen a la estructura y los de las partículas o células en ellas contenidas.

Los procedimientos clásicos de reconstrucción consistían en la obtención de dibujos o fotografías sobre la serie de cortes obtenidos a partir del material objeto de investigación. En tal desarrollo, propuesto por Gabe (1968), un elemento que se ha de tener en cuenta al verificar la reconstrucción es la distancia existente entre cada dos cortes de los analizados o parámetro "z". Para las situaciones en que por cualquier circunstancia se puede perder material, habrá de utilizarse el método de Sullivan (1972), consistente en grabar en una cara del bloque objeto de estudio un surco diagonal y dos paralelos, empleándose posteriormente para la alineación de las secciones los surcos paralelos y viniendo el parámetro "z" a estar representado por la posición del marcador diagonal en relación con los otros dos.

En los tiempos previos a la estereología automatizada se pusieron en marcha dos tipos de reconstrucción: la plástica y la gráfica. La reconstrucción plástica dejó de ser utilizada con la aparición de los modernos procedimientos de análisis de imagen. Para la reconstrucción gráfica se emplean analizadores en los que mediante un programa preestablecido se van digitalizando las imágenes bidimensionales. Tales programas utilizan, como puede entenderse, una matriz formada por las coordenadas (x,y) de cada uno de los puntos del perfil de la estructura cuya reconstrucción se persigue.

Medidas estereológicas

Parámetros estereológicos son los que, conseguidos a través de procedimientos matemáticos, se ocupan de recabar información acerca de mediciones sobre la estructura y sus objetos componentes. Constituyen lo que Underwood (1970) denomina como "Estereología Cuantitativa", si bien propiamente se trataría de una realidad más amplia.

Parámetros de estructura o estructurales son aquellos que vienen a caracterizarla como elementos geométricos tales como la densidad de volumen (V_V), que nos habla de la relación existente entre el volumen de los objetos y el del espacio contenedor, o la densidad de número de partículas (N_V) o número de elementos contenidos en el volumen de la estructura, etc.

De lo anterior se deduce, tal y como muestra la bibliografía (Weibel, 1980; DeHoff y Rhines, 1961; Mattfeld, 1988, etc.) que en el proceder estereológico hay dos aspectos que son de interés principal: la ausencia de sesgo al obtener la información y la eficiencia o bajo "costo", entendiendo por sesgo la desviación sistemática de la media y por eficaz el poder tener fácil acceso en cualquiera de sus aspectos.

Por otro lado, cabe decir que el sentido celular más exacto es el volumétrico, pero en ocasiones los valores cuadrados o bidimensionales tienen significación tanto para estudios que luego se conviertan en tridimensionales como en valores directos de ocupación media de áreas que ocupan el área contenedora.

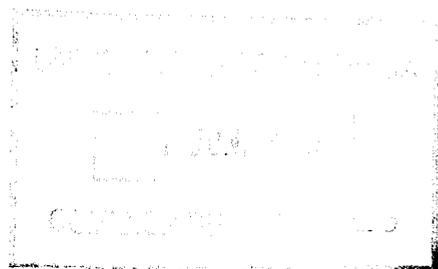
Los análisis llevados a cabo para los intereses del presente trabajo, y que, en relación a este apartado, nos han ofrecido especial interés, han sido los volúmenes de estructura, la densidad de partículas y la determinación de ubicación de las mismas en el espacio contenedor, así como sus variaciones a través de los tratamientos.

Los estudios en el cálculo de la densidad numérica en volumen (N_V) han experimentado un notable avance o cambio desde que, en 1848, Delesse anunciara los primeros cálculos para la solución del problema. El desarrollo básico ha venido empleando sucesivamente: la planimetría, la integración lineal de Rosiwal (1898), el recuento de puntos de muestreo de Thompson (1930) y Glagoleff (1933) y, finalmente, los analizadores de imagen (IBAS-Kontron, Leitz, etc.) y los programas de software correspondientes.

El cálculo de la densidad numérica (N_V) se puede obtener a partir de la fórmula debida a Wicksell (1925, 1926) y DeHoff y Rhines (1961).

Al emplear cualquiera de las diversas fórmulas de recuento disponibles, se ha de tener en cuenta el denominado "efecto Holmes" (Holmes, 1927); este efecto aparece por la posibilidad de contar dos o más veces una misma partícula que, debido a su tamaño, puede abarcar más de una sección. Se han propuesto como factores de corrección para el exceso de recuentos que suponen los perfiles sobre las partículas diversos métodos o fórmulas de entre las que destacan las de: Agdhur (1941), Floderus (1944), Abercrombie (1946), Ebbeson y Tang (1965), Haug (1967) y González-Pareja y col. (1975).

Con el fin de corregir este defecto, han sido propuestas, como acabamos de indicar, diversas fórmulas o procedimientos. El más efectivo y exacto en su conjunto, y que es el empleado en el presente trabajo, es una conjunción del proceder de



Floderus (1944) y De Hoff y Rhines (1961), pero el empleo de nuevos métodos como el disector de Sterio (1984), el selector (Cruz-Orive, 1987) o el nucleador (Gundersen, 1986-88) ya hemos dicho que fue como comprobación de su fiabilidad.

Entre los parámetros que caracterizan a un objeto, y siguiendo a Underwood (1983), tenemos: el tamaño, la superficie y su forma. El tamaño expresa una medida lineal, areal o de volumen. Las medidas lineales suelen ser el diámetro calibrador medio del objeto (Tomkeieff, 1945), la longitud de cuerda o intersección y el diámetro del círculo de área equivalente de Milles y Davy (1977). La superficie esférica de la partícula (S/V) resulta un parámetro bastante característico y de útil información sobre la condición del objeto. Su forma puede venir descrita a partir de diversos índices, como puedan ser el "factor de elongación" (Hausner, 1966; Medalia, 1967) o los de "rugosidad" (Mandelbrot, 1977).

En el recuento directo de elementos podemos encontrar, de acuerdo con la forma en que se haya obtenido la imagen, procedimientos de proyección de imagen y procedimientos micrométricos oculares, que actúan directamente sobre los materiales a estudiar.

En el procedimiento de proyección, los recuentos se realizan sobre la imagen proyectada de un corte histológico, cuyo área se subdivide en unidades en las que se determinan los elementos y cuyo volumen se calcula multiplicando por el grosor del corte. En el procedimiento micrométrico ocular, los recuentos se realizan directamente al microscopio utilizando una retícula interpuesta en el ocular (Haug, 1967, 1970, 1972) en su nivel más apropiado o con elementos ya así venidos de fábrica.

Si debido al tamaño de la estructura el número de recuentos resulta muy elevado, ha de elegirse una muestra representativa del total de la población. En líneas generales, se considera que una muestra es representativa cuando ofrece un coeficiente de variación (raíz cuadrada de la varianza dividida por la media) que no sea superior al 10-20% o que su intervalo de confianza al 95% no exceda del 20%. Sobre las fórmulas de muestreo y su aplicación práctica se pueden seguir los métodos descritos en textos como el de Azorín-Poch (1972) o seguir los nuevos sistemas a partir de los nuevos métodos antedichos.

Dentro del campo correspondiente a la disposición citoarquitectónica del Sistema Nervioso el establecimiento de la densidad neuronal ha ayudado a caracterizar diversas regiones del mismo. Diferentes autores se han ocupado del tema, pero habiendo tomado como unidad de recuento distintos elementos característicos y, con ello, variando también el mecanismo de corrección del efecto Holmes. Algunos han utilizado el soma neuronal y en sus comienzos no emplearon factores de corrección (Von Economo y Koskinas, 1925; Lassek, 1940; Silver, 1942; Chacko, 1948, y Sullivan y col., 1958); el núcleo neuronal y sin emplear corrección fue tomado como unidad de recuento por Hammarberg (1895), Thompson (1899), Numberger (1958) y Irwing y Harrison (1967), y, realizando correcciones, emplearon el núcleo Guild y col. (1931), Agduhr (1941), Flöderus (1944) y Abercrombie (1946). Mediante la utilización del nucléolo como elemento de recuento, que según Königsmark (1970) es la forma de conseguir menos errores, se han realizado multitud de trabajos, contándose entre los más iniciales con algunos como los de Pakkemberg (1966), Haug (1967) o Königsmark y col. (1969), etc. Con todo, encontramos trabajos relativamente recientes en los que no se llevó a cabo la corrección de sobrestimaciones (Hatai, 1902; Sheinin, 1930; Jones, 1937; Van Buskirk, 1945; Cavanaugh, 1951; Tower, 1954; Ebbeson, 1963; Hall, 1962, 1964; Altman, 1966; Moatamed, 1966).

Se puede considerar, siguiendo a Weibel (1979), que las muestras biológicas están constituidas por elementos contenidos en áreas pequeñas, cuadrados o rectángulos, repartidos por el material. La distribución y elección de la muestra se puede hacer siguiendo diferentes pautas:

- 1.- Lo que se conoce como simple muestreo al azar.
- 2.- El llamado muestro sistemático.
- 3.- El muestreo aleatorio estratificado.

1.- Muestreo simple al azar.-

En la obtención de una muestra de este tipo, la elección de cuadrículas se realiza de forma independiente mediante una tabla de números aleatorios. El método ofrece desventajas frente a los otros dos según la irregularidad regional de las partículas.

2.- Muestreo sistemático.-

Aquí se espacia de forma regular la elección aleatoria de cuadrículas. El mayor peligro del muestreo sistemático es, cuando por existir anisotropía en la estructura, la periodicidad pueda o no coincidir con el sistema de separación elegido.

3.- Sistema aleatorio estratificado.-

Para tal proceder, el material se divide inicialmente en regiones o estratos de tamaño similar, cada uno de los cuales se estudia de modo independiente y en la forma que se considere más oportuna. Este proceder, recomendado por Milles y Davy (1977), ofrece sus mayores ventajas cuando el sistema viene a ser aleatorio, estratificado y ponderado, lo cual representa el que una distribución regular de las secciones es seguida de una elección aleatoria de las mismas y,

posteriormente, dentro de cada unidad escogida, se determinan nuevamente de modo aleatorio las cuadrículas en las que se hayan de realizar los recuentos, siendo el número de éstas proporcional al valor del área contenedora. Con todo, en los nuevos métodos, al necesitarse de un número mucho menor de células o partículas para obtener una muestra significativa, estamos ante situaciones más simplificadas.

Hasta hace unos diez años (Gundersen, 1978), los recuentos de partículas en "frame" han tenido un sesgo, y para evitar tal situación lo más apropiado es eliminar aleatoriamente el número de elementos que contactan con el 50% de los bordes de "frame" (Gundersen, 1977).

En una estimación del valor medio del área o de los volúmenes de las partículas para emplear las fórmulas del nucleador y selector, el área media a puede calcularse partiendo del valor P/P (perfiles/sección) y la fórmula:

$$\bar{a} = \frac{P_{perf}}{P_{sec}} : \frac{Q_{perf}}{A_{frame}}$$

(es mejor no reducir la operación, sino dividir ambos porcentajes como es lógico).

Otro modo de determinar el valor de partículas contenidas en un espacio volumétrico o areal sería el cálculo de B_A , y sobre todo de b , que será un parámetro estimador del tamaño cuando se emplea para núcleos haciendo B_A/Q_A . El estimador compuesto de puntos líneas es el diseñado por Jensen y Gundersen (1982).

Las medidas necesarias en la estereología clásica son ciertamente abundantes, pero en la nueva estereología un recuento y estimación de entre 100 a 200 elementos es suficiente para el cálculo de a ($100 P_{perf}$ y $100 Q_{perf}$) (Gundersen y Østerby, 1981; Gundersen, 1986). A la simplificación en los

muestreos hay que añadir la mayor sencillez en la aplicación de las estimaciones. Así, con aplicaciones como las del nucleador (Gundersen, 1988) y el disector (Sterio, 1984) o selector (Cruz-Orive, 1987), se puede tener un acceso mucho más directo y eficaz al análisis morfométrico y de imagen de las estructuras en cuestión.

III.- OBSERVACIONES Y RESULTADOS

En la descripción de las observaciones y los correspondientes resultados de medidas que se han llevado a cabo sobre los embriones a estudiar según lo descrito en el capítulo de "Material y Método", vamos a seguir un orden que, al ir ocupándose, de los distintos grupos de animales lo hará primeramente de aquellos que sufrieron tratamiento y posteriormente de los que llamaremos normales (o sin tratar). En cada conjunto distinguiremos la situación de tres momentos o grados de desarrollo: estadio 13-14; estadio 16-17 y estadio 19-20, entendiéndose por tal la situación teórica en que se debía encontrar el animal de acuerdo con el momento en que se comenzó la experiencia y lo observado en las secciones histológicas. En este sentido, es necesario aclarar que el momento de comienzo de un estudio concreto más las horas de tratamiento ofrece un estadio de desarrollo más avanzado que el inicial pero que no necesariamente coincidirá con la situación teórica que supondría la suma de ambos tiempos, sino que vendrá modificado según ese tratamiento y, como consecuencia, de haber estado bajo la influencia de la acción de la colchicina. Esto es como decir que los tratamientos alterarán la situación de los desarrollos y en vez de la configuración propia de los estadios según el tiempo de incubación sufrido contaremos con variaciones.

Con arreglo a las diversas experiencias realizadas los distintos grupos de animales estudiados han sido denominados como:

- * 13col1h (animales cuyo tratamiento comenzó a las 48 horas de incubación y tuvo una duración de 1 hora)
- * 13col2h (igual al anterior pero tratamiento de 2 h.)
- * 13col4h (" " " " " " 4 h.)

- * 13col8h (" " " " " " 8 h.)
- * 16col4h (animales cuyo tratamiento comenzó a las 62horas y tuvo una duración de 4 horas)
- * 16col8h (iguales a los anteriores pero con tratamiento de 8 h.)
- * 13-14N (animales con incubación sin tratamiento y recogida a las 48 horas)
- * 16-17N (análogo a los anteriores pero recogida a las 60 horas)
- * 19-20N (como los anteriores pero con recogida a las 72 horas)

En la descripción de los estudios realizados y para cada conjunto de animales se seguirá una pauta de exposición que consistirá en:

- a) Situación y descripción de las variaciones en la morfología microscópica general de las copas retinianas.
- b) Situación y modificaciones en la morfocitoarquitectura de los elementos componentes de la copa retiniana en los diferentes grados de desarrollo analizados.
- c) Descripción de los datos obtenidos al realizar cuantificaciones de densidad de interfases y mitosis en los diferentes sectores y zonas de las copas ópticas estudiadas.
- d) Resultado obtenido de la comparación y relación deducida al analizar las analogías o diferencias existentes entre los datos ofrecidos por los animales pertenecientes a los distintos grupos.

OBSERVACIONES EN LOS EMBRIONES 13CO11H.-

a) Morfología general.-

Tras una hora de tratamiento a partir de la hora 48 de incubación, la afectación que ofrecen los embriones no es considerable y depende en buen grado de la exactitud que se haya conseguido en el lugar concreto de la inyección pues dada la brevedad de tiempo de tratamiento la difusión del producto encontrará mayor o menor dificultad en alcanzar su objetivo. También influye en los resultados el grado concreto de desarrollo en el que se encontraba el embrión cuando le alcanzó la droga y este grado, ya sabemos que no es totalmente exacto y depende de la temperatura de incubación, por ello hablamos más bien de estadio 13-14, 16-17 etc. porque esas variaciones aún con controles muy exactos de una buena incubadora no se pueden fijar. Con todo, se pueden ver y catalogar las diferencias entre un estadio 13 y un 17, por ejemplo, si el desarrollo se hizo con un fino control de temperatura de incubación y se ajustaron todo lo posible el momento de tratamiento y la duración del mismo.

En los animales de este grupo y ya a la observación microscópica, se aprecia, cuando se posee cierta experiencia, que el número de mitosis y, dentro de ellas, el de las metafases aparecen incrementados en relación con la situación observada en animales que no fueron tratados. Si el animal fué sorprendido por el tratamiento sobre un grado de desarrollo de los que podemos catalogar como "lento" la afectación del proceso evolutivo será mayor porque ocurrirá sobre una estructura más inmadura pero, en este caso, lo será del tal grado que afectará produciendo tal malformación que, ante esta circunstancia, nosotros desistimos de analizar por el momento tales situaciones. Se atendieron, por tanto, aquellos

estadios en que se podía ver, por su conformación, que la droga les alcanzó sobre un desarrollo 13-14 HH. y por ello, tras el tratamiento, nos encontraremos prácticamente con una situación de desarrollo en torno al estadio 14. Se tomó esta determinación porque el interés fundamental de las presentes experiencias es el de observar lo que ocurre con la distribución mitótica y metafásica (fundamentalmente) y no sobre las malformaciones orgánicas -aunque, según convenga, se hará alguna descripción general de la situación ofrecida por cada copa retiniana-.

La figura número 1 corresponde a una sección histológica posterior y frontal de una bolsa óptica perteneciente a un estadio 13-14 y se puede observar un conjunto de formaciones nucleares de pequeño tamaño y en su centro figuras metafásicas. Esta disposición de células y núcleos de reducida dimensión se puede observar también cuando se realizan secciones en sentido horizontal y ello nos indica que su tamaño no es consecuencia de una dirección anisótropa sino que realmente son así cualquiera que fuera la orientación que hubieramos dado. Las células de pequeño tamaño y sus consiguientes núcleos aparecen en estos y otros estadios en aquellos lugares y situaciones en las que los elementos constituyen sectores de mayor proliferación y, por tanto, también podemos decir que representan zonas más primitivas.

En la figura n° 2 apreciamos en una sección frontal postero mediana la situación de la copa muy abierta todavía y con leve inicio de la invaginación en la parte central enfrentada al comienzo de formación de un cristalino del que se distingue únicamente el aumento de grosor del ectodermo de revestimiento. Detalles de la situación celular podemos apreciar más fácilmente en la siguiente figura.

Al observar el detalle de los componentes de la estructura que encontramos en la figura 3 se nos permite distinguir en las células: sus núcleos ovalados tal

y como los ofrece una demostración con el método de Feulgen y también , en múltiples puntos, vemos pequeñas condensaciones (flechas "a") que, al ser Feulgen positivas, las catalogamos como partes de ácidos nucleicos correspondientes a posible disgregación de algún núcleo. La constancia en la localización de este producto -en los lugares donde aparece- así como el hecho de su ubicación periventricular, tanto retiniana como pigmentaria o diencefálica cerebral, parece eliminar la posibilidad de que se trate de un artefacto producido por la cuchilla al corte histológico. Por otra parte, podemos observar (flechas "b") en la limitante ventricular, la existencia de figuras mitóticas en subfase metafásica ofreciendo la imagen de condensación que resulta típica de la situación producida por la afectación de la colchicina.

La figura n° 4 ofrece la imagen de una sección frontal realizada justamente a nivel de la pared del tallo óptico. Aquí, es de destacar el pequeño tamaño de los núcleos celulares existentes a nivel de la pared, mostrando una característica que se repite cuando las secciones son horizontales, lo cual indica que se trata de núcleos y células de pequeño tamaño como se observa en aquellas regiones en las que la proliferación celular resulta exponente de crecimiento y expansión (Ver figuras 1 a 4).

b) Modificaciones en la citoarquitectura.-

Tal y como se puede apreciar en las imágenes anteriormente descritas, las células y sus núcleos constituyentes de la presente situación ofrecen diversidad de imagen y de distribución. En los sectores extremos anterior y posterior son de menor tamaño y más esféricos que en las regiones medias y centrales. La densidad celular semeja, por todo ello, ser menor en las zonas medias y lo

mismo puede decirse del número de mitosis y sus metafases. Se detecta todavía un considerable número de profases, no así de anafases y telofases; es posible que algunas de las situaciones catalogadas como de metafase puedan ser premetafases, pero tal situación es difícil de aclarar por el momento a falta de que pueda establecerse de modo más ajustado el completo mecanismo de acción de la droga. En cuanto a la situación de las metafases se puede distinguir, como ofrece la figura n° 3, una influencia de la colchicina sobre la disposición cromosómica al apreciarse las típicas imágenes en estrella. Los núcleos de la región central muestran una orientación perpendicular al eje supero-inferior de la copa lo que determina, junto a su perfil elíptico una distribución en empalizada que se corresponde con la de orientación de sus citoplasmas respectivos y es índice de proceder de mitosis con husos paralelos a la limitante ventricular. Entre estos núcleos se pueden, ya en estos momentos iniciales, distinguir algunos de menor tamaño y más esféricos, sin que podamos precisar su significado en estas regiones.

Fig. 1.- Imagen de una sección frontal posterior de un embrión de pollo perteneciente a un estadio 13-14 HH tras haber recibido una dosis de 1 mgr. de colchicina durante una hora y a partir de las 48 h. de incubación. En el centro (flecha), se ven figuras mitóticas especialmente de subfases metafásicas. Tinción método de Feulgen. Aumentos 160 x.

Fig. 2.- Sección frontal una zona posterior, cercana a zona media del mismo pollo de la figura anterior. Se aprecia la amplia comunicación entre la cavidad ventricular (flecha) de la copa y de la región diencefálica cerebral. El ectodermo prospectivo de la formación cristaliniiana aparece en sus inicios de constitución como una banda que está engrosada por el aumento celular proliferativo. Aumentos 160x.



Fig. 1



Fig. 2

Fig. 3.- Detalle de la figura anterior ofreciendo múltiples grumos Feulgen positivos (flechas "a") a nivel de las limitantes ventricular retiniana y pigmentaria; así como también se aprecian en la zona de la limitante ventricular de la pared cerebral (flecha "a"). En región superior (flecha "b") se distinguen metafases típicas del tratamiento recibido. Aumentos 400 x.

Fig. 4.- Imagen de una sección correspondiente a un embrión como los anteriores cuyo corte fue realizado a nivel de la pared del tallo óptico "t". Se aprecia el reducido tamaño de los núcleos celulares así como su abundancia. Aumentos iniciales 160 x.



Fig.3



Fig.4

c) Datos obtenidos en densidad celular: interfásica, mitótica y su disposición estereológica.-

Tal y como puede apreciarse en las tablas n° 1 y 2, los valores de interfases son más parecidos en las distintas zonas estudiadas que los de las mitosis en las que se aprecia más variación por sector y zona. La tabla n° 1 expone los datos obtenidos a partir de los recuentos verificados en los distintos sectores analizados de los 9 (superior a inferior y anterior a posterior) en que se dividió la copa retiniana para su análisis. Por Area M. se ha de entender el valor del "frame" aleatorio donde se hicieron las determinaciones (será por tanto un valor no uniforme y relativo); las interfases, las mitosis y los valores de sus correspondientes subfases mitóticas son referidos a tal Area M. Tales valores representan cifras de perfiles hallados y, por ésto, se ofrecen también los valores corregidos una vez eliminados los sobreestimados de acuerdo con las fórmulas dadas en "Material y Método". Los valores dados para los volúmenes son los reales tomados para cada sector y a partir de aquí y de las cifras corregidas de células por unidad de recuento se obtuvieron los definitivos totales.

La tabla n° 2 obtenida a partir de los datos expuestos en la tabla n° 1 ofrece los datos relativos a las densidades de interfases y mitosis por unidad de volumen (10.000 micras cúbicas). Estos valores nos pueden servir para las comparaciones que se quieran realizar después. También y a partir de estos valores, se calcularon los de los índices mitóticos y de subfases así como sus porcentajes correspondientes, que aparecen situados en la parte inferior de cada cuadro de la tabla.

Se puede apreciar que, de entre los distintos valores reflejados para sectores y zonas, las cifras más bajas las dan las de regiones centrales o medias menos para los índices de profases (Iprof.) . (Ver tablas 1 a 3).

d) Comparaciones con otras situaciones.-

Al equiparar los valores de las tablas anteriormente dadas con aquellos correspondientes a los conseguidos desde embriones sin tratar, es fácil comprobar cómo los índices mitóticos y de metafases doblan los valores, cuando menos en los animales tratados. Tal situación indica la afectación que se ha producido y el modo cómo las metafases se están acumulando en el borde limitante ventricular. Las comparaciones estadísticas y otras consideraciones al respecto serán realizadas posteriormente cuando comentemos y concluyamos la situación y cuando dispongamos de más datos al estudiar los otros grupos de embriones.

Las tablas (1 a 3 en este caso) de valores expuestos para estos embriones y las que se presenten posteriormente para el resto de medidas y experiencias, contienen:

1ª/ Valores encontrados en los sectores, 9 para cada retina, según los de los perfiles de células recontadas sin corregir y también tras realizar las oportunas correcciones ; valores medios para cada zona (6 en cada caso) resultante de la suma de cada tres sectores correspondientes y en la parte inferior de la tabla el resumen de valores totales para toda la retina de ese embrión.

2ª/ Valores medios resultantes de dividir las mitosis, o las metafases o las interfases etc. por el volumen correspondiente de la zona donde se encontraron e igualmente, para dicha zona, los valores de los índices de las mitosis y los de

las subfases correspondientes que las integran (aquí se adjuntan los valores Sd de cada caso con vistas a las comparaciones que posteriormente se realicen).

3ª/ Esta tabla contiene (al igual que las de su clase correspondiente en cada grupo) valores obtenidos como los de la tabla 2ª pero referidos en este caso a las situaciones globales de la retina de cada tipo experimental analizado.

POLLOS 13COL1H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR		Cor. Vt
	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	
S	AREA M.	11377,41		14149,19		12794,58	S
U	VOL		182038,6		226387,1		U VOL 204297,9
P	INTERF	126,99	561,2817	145,53	619,2765	164,43	692,3368 P INTERF 624,0798
E	MITOSIS	23,6	49,23076	10,6	22,11212	18,2	37,96610 E MITOSIS 36,42357
R	METAF.	20,7	43,18122	7,6	15,85397	13,6	28,37027 R METAF. 29,12496
I	PROF	3,1	6,466753	3	6,258148	4,6	9,595827 I PROF 7,437639
O	ANTF	0	0	0	0	0	0 O ANTF 0
R							R

	AREA M.	11222,90		12789,82		15890,50	
M	VOL		179566,4		204637,2		M VOL 212732,1
E	INTERF	129,24	571,2265	135,18	614,4545	154,53	661,0909 E INTERF 615,3752
D	MITOSIS	12,5	26,07561	17,1	35,67144	20,1	41,92959 D MITOSIS 34,54679
I	METAF.	9,5	19,81747	11,1	23,15514	16,1	33,58539 I METAF. 25,51040
O	PROF	2,5	5,215123	6	12,51629	4,1	8,552803 O PROF 8,758341
	ANTF	0	0	0	0	0	0 ANTF 0

I	AREA M.	8005,896		7354,233		11692,05	I
N	VOL		128094,3		117667,7		N VOL 144220,5
F	INTERF	84,6	345,3061	81,09	373,9020	127,44	572,7640 F INTERF 430,5066
E	MITOSIS	16,5	34,41981	7,6	15,85397	19,2	40,05215 E MITOSIS 30,09811
R	METAF.	14,6	30,45632	6,4	13,35071	19,2	40,05215 R METAF. 27,94328
I	PROF	2	4,172099	1,1	2,294654	0	0 I PROF 2,154830
O	ANTF	0	0	0	0	0	0 O ANTF 0
R							R

	TOTAL ANTERIOR			*TOTAL MEDIO*		*TOTAL POSTERIOR*	
	VOL	163167,8		182824,2		215258,6	
	INTERF	492,4323		535,6901		641,8392	
	MITOSIS	36,56260		24,53725		39,96862	
	METAF.	31,14077		17,44717		33,99070	
	PROF	5,282809		7,020575		6,047426	
	ANTF	0		0		0	

****TOTAL POLLO****

Corregidos

Val. medio S.D.

VOL	1683078,	84153,92
INTERF	5008,131	350,5692
MITOSIS	303,0993	27,27893
METAF.	247,6492	19,81193
PROF	55,03316	3,852321
ANTF	0	0

Tabla nº 1

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL1H

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	1,782776	0,142622	1,623876	0,129910	2,086845	0,166947
Met/Vol	1,425540	0,114043	1,199119	0,095929	1,937440	0,154995
Prof/Vol	0,364040	0,025482	0,411686	0,028818	0,149404	0,010458
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	30,54601	3,665521	28,92578	3,471094	29,84907	3,581889
Imit	5,514517	0,441161	5,315528	0,425242	6,534476	0,522758
Imet	4,409509	0,352760	3,925149	0,314011	6,066650	0,485332
Iprof	1,126056	0,078823	1,347598	0,094331	0,467826	0,032747
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	79,96183	9,595419	73,84305	8,861167	92,84064	11,14087
%prof	20,41984	1,633587	25,35211	2,028169	7,159353	0,572748
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL1H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,240685	0,179254	1,342055	0,107364	1,856679	0,148534
Met/Vol	1,908416	0,152673	0,954266	0,076341	1,578984	0,126318
Prof/Vol	0,323749	0,022662	0,383987	0,026879	0,280923	0,019664
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	30,17799	3,621359	29,29936	3,515923	29,81562	3,577875
Imit	6,911710	0,552936	4,379874	0,350389	5,862153	0,468972
Imet	5,886779	0,470942	3,114301	0,249144	4,985379	0,398830
Iprof	0,998650	0,069905	1,253165	0,087721	0,886969	0,062087
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	85,17110	10,22053	71,10481	8,532577	85,04347	10,20521
%prof	14,44866	1,155893	28,61189	2,288951	15,13043	1,210434
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 13COL1H		
	Media	S.D.

Mit/Vol	1,800682	0,144054
Met/Vol	1,471259	0,117700
Prof/Vol	0,326946	0,022886
Antf/Vol	0	0
Int/Vol	29,75280	3,570336
Imit	5,706762	0,456540
Imet	4,662746	0,373019
Iprof	1,036165	0,072531
Iantf	0	0
%met	81,70563	9,804676
%prof	18,15680	1,452544
%antf	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

OBSERVACIONES EN LOS EMBRIONES 13COL2H.-

a) Descripción de la morfología microscópica general.-

Tras las dos horas de tratamiento, las copas ópticas ofrecen un retraso en el desarrollo y ciertas deformaciones que se pueden apreciar en la fig. n° 10. Se observa agrandamiento de la cavidad ventricular y un abombamiento y exceso en la apertura de comunicación con el ventrículo cerebral. También apreciamos en algunos animales situaciones de mayor anomalía, las cuales consideramos que son la consecuencia de que la droga actuó sobre unos embriones que iban retrasados en su desarrollo; en estos casos, no se constituye una verdadera copa, su pared es delgada y las células ofrecen rasgos de marcada anormalidad. Todo parece indicar que, para que se produzcan acciones de la droga que modifiquen los desarrollos normales, ha de comenzar a ejercer su influencia a partir del estadio 13 HH. Acciones previas frenan la formación de copa.

b) Modificaciones en la citoarquitectura.-

Las variaciones ofrecidas por el aspecto celular se pueden detectar en toda la copa. Ya en los polos (Figs. 5 y 6) podemos apreciar un ligero incremento en el número de sus metafases y la diferencia en aspecto de los núcleos de las células en interfase. Figuras como las n° 7, 8 ó 9 ofrecen claras imágenes de la afectación mostrando el aumento de número de mitosis en la zona limitante ventricular. Las figuras mitóticas, constituidas casi exclusivamente por metafases, ofrecen (como nítidamente puede apreciarse en la figura n° 8) las típicas metafases en estrella, producto de una considerable condensación de los

cromosomas. Las metafases se acumulan en la limitante ventricular formando una línea casi continua pero, cuando el espacio ya está ocupado, se adosan para formar una segunda banda (figs. 7 y 9). Los núcleos de las células en interfase son alargados y bastante semejantes en las distintas zonas de la capa retiniana (superior, media e inferior) y otro tanto puede decirse que ocurre en la situación de la formación cristalina (figs. 11 y 12),

Fig. 5.- Sección frontal del polo posterior de la copa de un embrión que recibió un tratamiento de 1 mgr. de colchicina durante dos horas a partir de las 48 de incubación. Imagen demostración de la situación nuclear mediante técnica de Feulgen. Aumentos iniciales 400 x.

Fig. 6.- Detalle de la figura anterior en donde se puede apreciar la existencia de núcleos en interfase con diversa intensidad de reacción y figuras de metafases típicas de la acción de la droga. Se distingue también cierta falta de cohesión celular. Aumentos 630x.



Fig.5

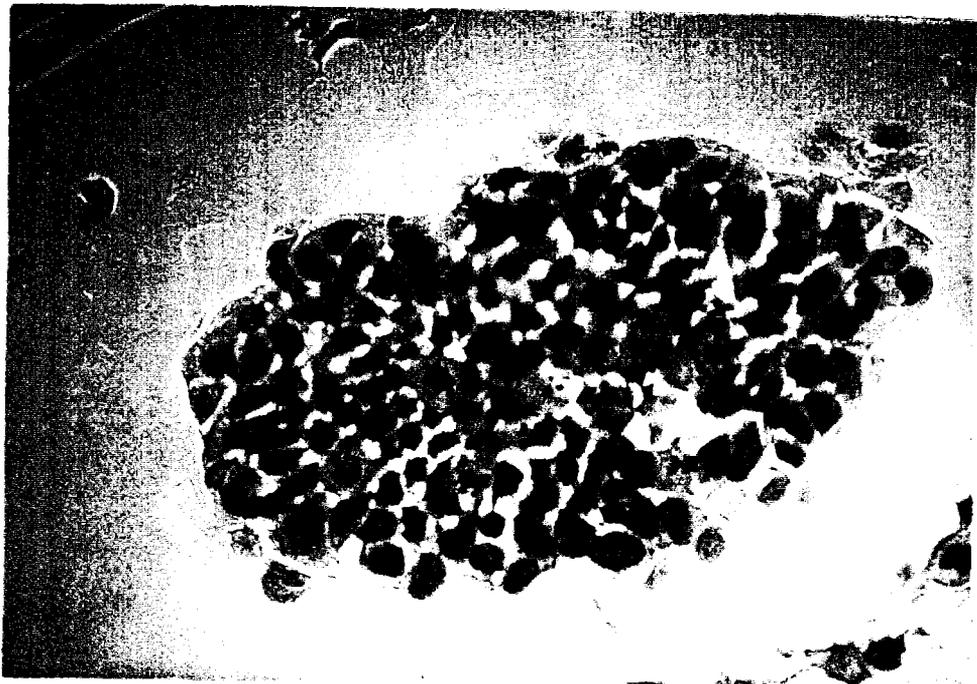


Fig.6

Fig. 7.- Sección frontal posterior de un embrión 13col2h., en donde se aprecia el aumento de típicas metafases de células afectadas por la droga. Es de destacar la patente condensación cromosómica. Ec= ectodermo. Aumentos 400 x.

Fig. 8.- Detalle de la figura anterior. Aumentos 1000 x.

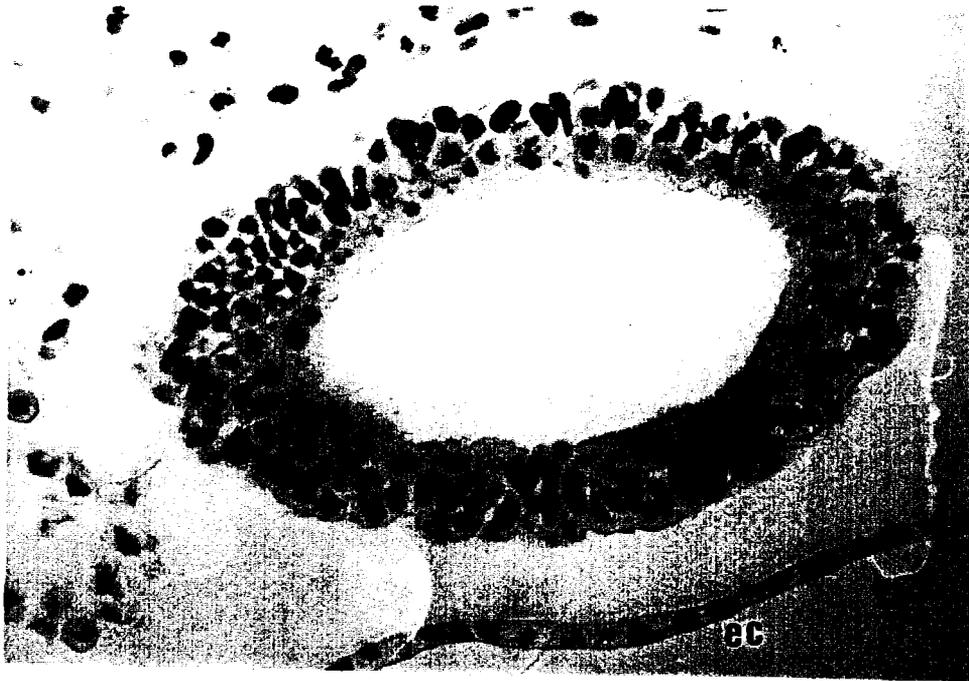


FIG. 7

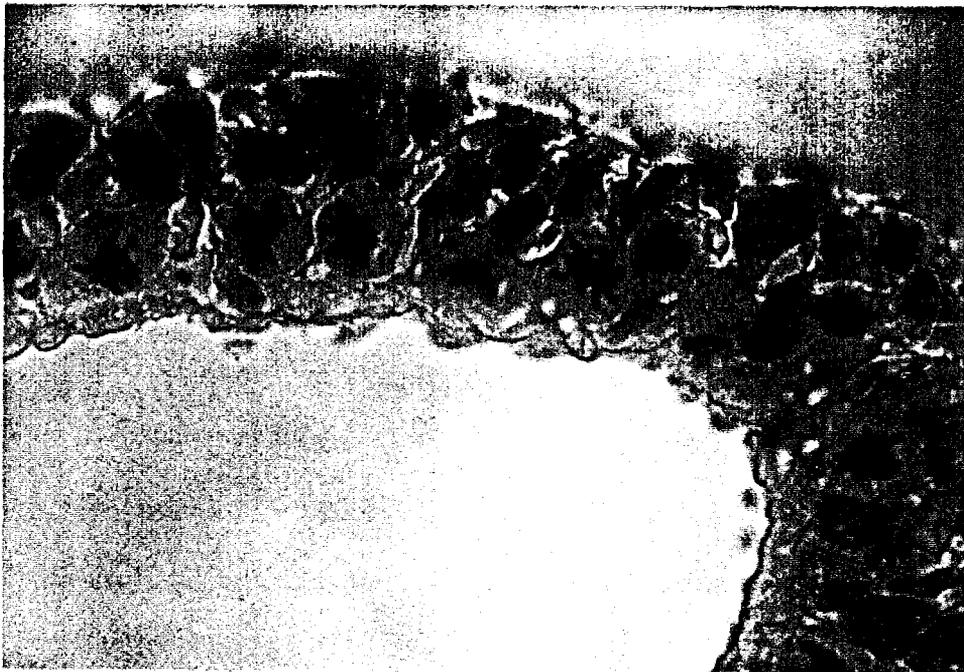


FIG. 8

Fig. 9.- Sección frontal posterior de copa en cúpula retiniana (re) y de la lámina pigmentaria, ofreciendo la afectación metafásica sobre todo en la región prospectiva correspondiente a retina. Aumentos iniciales 400 x.

Fig. 10.- Corte histológico frontal y central de un embrión tipo 13col2h. ofreciendo una considerable dilatación de su zona inferior (i). En ccr. podemos apreciar la invaginación y acción de la droga en la formación cristaliniiana. Aumentos 160 x.



FIG.11



FIG.12

Fig. 11.- Detalle ofreciendo la zona inferior de un corte como el anterior viéndose la afectación del cristalino y retina. Se observa diversidad de los tamaños en los núcleos celulares sobre todo en las esquinas o zonas de transición. Aumentos 400 x.

Fig. 12.- Detalle semejante al de la figura anterior pero correspondiente a la zona superior de la copa óptica. Se puede distinguir la diferencia de la disposición de los núcleos celulares al comparar sus láminas pigmentaria y retiniana. Aumentos 400x.

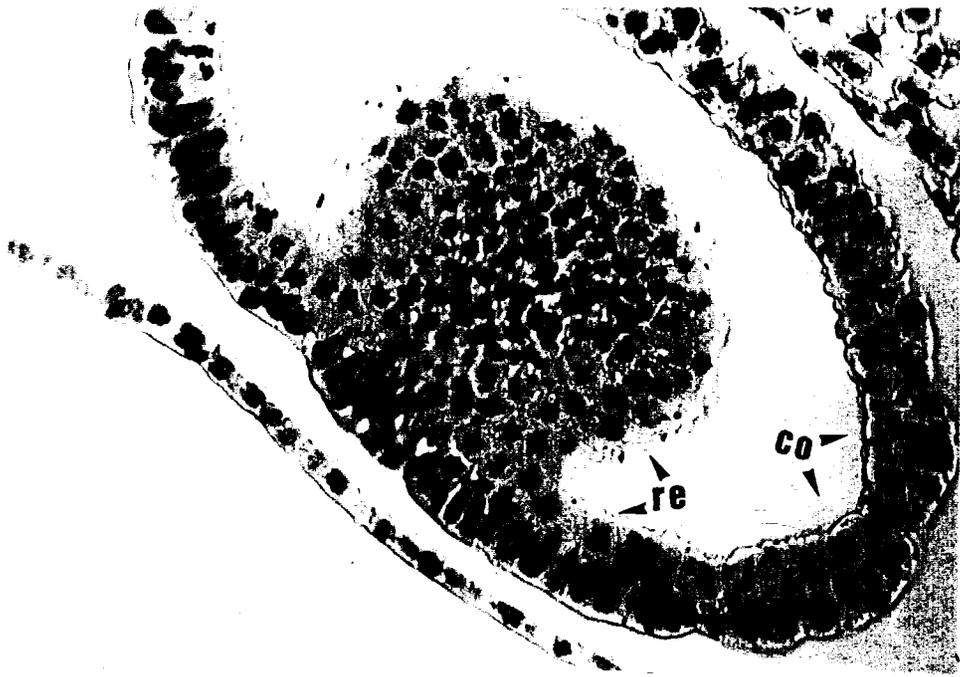


FIG.9



FIG.10

c) Datos obtenidos en densidad celular: interfásica, mitótica y su disposición estereológica.-

La tabla n° 4 recoge, al igual que en el embrión anterior, los valores que se obtuvieron en los 9 sectores constitutivos de la capa retiniana tanto para las interfases como para las diversas figuras mitóticas. Los valores, en cada sector, aparecen situados a la izquierda y referidos al valor del área (o frame) situado superiormente (y expresado como AREA M); son valores de perfiles recontados y, por lo tanto, en los que no se habían realizado todavía los correspondientes ajustes de corrección. A la derecha de los valores anteriores se sitúan los valores del volumen total (Vol.) calculado para ese sector (mediante el método de Cavalieri) y debajo aparecen anotados los valores medios de interfases y mitosis etc., una vez corregidos y referidos al volumen superiormente expresado. Se omite la escritura de las correspondientes desviaciones porque complicaría sin necesidad el cuadro y, en este lugar, no tienen utilidad práctica (más adelante, en otros valores, sí se dará la desviación, a fin de poder realizar las oportunas comparaciones). Junto al recuadro, a la derecha y en la parte inferior de los valores relatados para los distintos sectores, se expresan los valores medios de cada zona, como resultado de sumar los reseñados valores ya corregidos de los sectores que las constituyen y dividir por el número de valores (3-de Sup. a Inf. y de Ant. a Post.). En la parte inferior de la tabla se suman todos los valores derivados de los 9 sectores.

La tabla n° 5 (al igual que contenía la n° 2) nos da, para cada una de las 6 zonas determinadas, los cocientes en volumen de los índices mitóticos y de subfases de la división. En las especificaciones como : Mit/vol, etc. se expone el resultado de dividir las mitosis encontradas y expresadas en los valores de sector, del cuadro anterior, por los volúmenes también allí reseñados (junto a cada valor obtenido se señala su SD). Por debajo de estos valores se expresan

los de los índices mitóticos, que resultaron al aplicar las fórmulas correspondientes, así como los % relativos a estos valores. La tabla n° 6, al igual que las demás análogas pertenecientes a otras experiencias, muestran valores como los contenidos en la tabla n° 5, pero aquí están referidos a la situación global de toda la retina.

POLLOS 13COL2H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR		Cor. Vt
	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	
S	AREA M.	14289,45	13023,85		9534,222		S
U	VOL	228631,2	208381,6		152547,4		U VOL 196441,5
P	INTERF	187,9091 949,5105	147,9994	705,3504	111,9180	580,1871	P INTERF 744,7552
E	MITOSIS	46,7 97,41850	41,2	85,94524	46	95,95823	E MITOSIS 93,07473
R	METAF.	41,1 85,73662	36,9	76,97522	42	87,61403	R METAF. 83,41276
I	PROF	5,6 11,68187	4,5	9,387222	4	8,344194	I PROF 9,800999
O	ANTF	0 0	0	0	0	0	O ANTF 0
R							R

M	AREA M.	14985,63	12209,32		10510,24		
E	VOL	239770,0	195349,2		168163,9		M VOL 201013,9
D	INTERF	147,1879 737,6107	151,3557	729,1051	88,14739	462,6948	E INTERF 642,9118
I	MITOSIS	38,1 79,47848	29,7	61,95566	30,5	63,62451	D MITOSIS 68,32896
O	METAF.	32,1 66,96219	22,6	47,14471	27,4	57,15775	I METAF. 57,06824
	PROF	6 12,51629	7,1	14,81095	3,1	6,466753	O PROF 11,26072
	ANTF	0 0	0	0	0	0	ANTF 0

I	AREA M.	15227,54	13941,15		9974,907		I
N	VOL	243640,6	223058,4		159598,4		N VOL 208682,3
F	INTERF	180,7879 954,5127	75,01525	386,0145	149,2372	759,2810	F INTERF 699,6911
E	MITOSIS	39,2 81,77313	34,5	71,96870	31,6	65,91913	E MITOSIS 73,19469
R	METAF.	34,2 71,34288	29,1	60,70403	29	60,49540	R METAF. 64,15831
I	PROF	5 10,43024	5,4	11,26466	2,6	5,423726	I PROF 9,036382
O	ANTF	0 0	0	0	0	0	O ANTF 0
R							R

	TOTAL ANTERIOR		*TOTAL MEDIO*		*TOTAL POSTERIOR*		
	VOL	237252,3	208846,2		160039,2		
	INTERF	880,2364	606,6109		600,5107		
	MITOSIS	86,19319	73,26421		75,14098		
	METAF.	74,65442	61,58643		68,39845		
	PROF	11,53876	11,81680		6,742530		
	ANTF	0	0		0		

TOTAL POLLO
Corregidos
Val. medio S.D.

VOL	1818413,	127288,9
INTERF	6262,074	5635,867
MITOSIS	703,7952	57,00741
METAF.	613,9179	4,911343
PROF	90,29432	8,126488
ANTF	0	0

Tabla nº 4

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL2H

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	4,737801	0,379024	3,399044	0,271923	3,507294	0,280583
Met/Vol	4,245975	0,339678	2,838876	0,227110	3,074295	0,245943
Prof/Vol	0,498902	0,034923	0,560168	0,039211	0,432999	0,030309
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	37,91041	4,549250	31,98183	3,837820	33,52733	4,023279
Imit	11,10902	0,888721	9,607008	0,768560	9,470311	0,757624
Imet	9,955809	0,796464	8,023758	0,641900	8,301137	0,664090
Iprof	1,169807	0,081886	1,583250	0,110827	1,169174	0,081842
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	89,61911	10,75429	83,51983	10,02238	87,65432	10,51851
%prof	10,53024	0,842419	16,48016	1,318413	12,34567	0,987654
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 100000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL2H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	3,632793	0,290623	3,507870	0,280629	4,694925	0,375594
Met/Vol	3,146467	0,251717	2,948741	0,235899	4,273641	0,341891
Prof/Vol	0,486325	0,034042	0,565785	0,039604	0,421283	0,029489
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	37,09941	4,451929	29,04437	3,485324	37,52084	4,502501
Imit	8,918724	0,713497	10,77612	0,862090	11,12125	0,889700
Imet	7,724765	0,617981	9,058490	0,724679	10,12332	0,809866
Iprof	1,193958	0,083577	1,738085	0,121665	0,997929	0,069855
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	86,61290	10,39354	84,06072	10,08728	91,02682	10,92321
%prof	13,38709	1,070967	16,12903	1,290322	8,973173	0,717853
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 100000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 13COL2H		
	Media	S.D.

Mit/Vol	3,870186	0,309614
Met/Vol	3,375949	0,270075
Prof/Vol	0,496530	0,034757
Antf/Vol	0	0
Int/Vol	34,43530	4,132236
Imit	10,10347	0,808278
Imet	8,813227	0,705058
Iprof	1,296238	0,090736
Iantf	0	0
%met	87,22962	10,46755
%prof	12,82962	1,026370
%antf	0	0

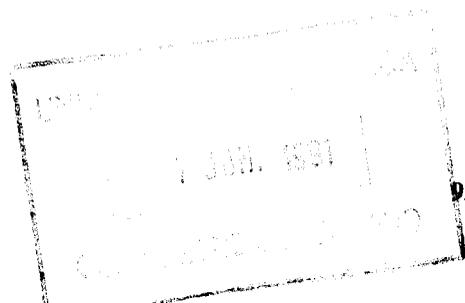
Unidad volumen 100000 micras cúbicas

d) Comparaciones entre las distintas situaciones tanto experimentales como normales.-

Al comparar los valores obtenidos en las tablas números 1, 2 y 3 con los de las 4,5 y 6 se aprecian ya, sin más comprobaciones, el incremento en el número de las mitosis y de metafases y se puede ver que el volumen total de la retina no se ha modificado sustancialmente, indicándose con ello que se ha producido un freno en los procesos de multiplicación celular.

Al observar los valores de la "T" de Student en el test n° 1, se ve que entre las distintas zonas se producen variedades de afectación, lo que determina que encontremos comparaciones cuyas diferencias no son significativas y otras en que lo son y con valores + o - según que la diferencia sea a favor o en contra del primer valor (o n-1). Se detectan algunas tendencias, como por ejemplo: las zonas medias son las que dan variaciones o índices más bajos indicándose con ello que son zonas menos proliferativas o, lo que es lo mismo, que son más antiguas y representan lugares de menor crecimiento. Una observación semejante se puede hacer cuando el estudio se verifica en los embriones tipo 13col2h que aparecen reflejados en el test n° 2 (si bien aquí las diferencias con las zonas medias son menos acusadas que en las de la tabla n° 1 (es una situación que podía esperarse porque al haber mayor afectación -2 horas de tratamiento- puede ocurrir cierto igualamiento en la situación de las distintas zonas ya que se va produciendo un freno en la división; con todo, siempre encontraremos los mayores índices de mitosis y metafases en los lugares que resulten ser más proliferativos o de mayor crecimiento).

El test n° 3 contiene las comparaciones entre la situación de los embriones 13col1h y los de tipo normal (sin tratar) 13-14 HH. Al detectarse diferencias significativas a favor de las zonas anterior e inferior, se nos está indicando que



ya, desde estos primeros momentos, encontramos en estos lugares un mayor índice de acumulaciones de mitosis (metafases).

Es de tener en cuenta, con relación a la variedad de cifras encontradas en estos primeros momentos, que: en los valores de índice mitótico que han resultado superiores para 13col1h vemos que el incremento lo ha sido a base de metafases, siendo así que hasta el estadio 16 HH. y, en condiciones normales, sabemos que son las profases las que dan una mayor participación en la construcción del índice mitótico. Por ésto resulta todavía más llamativo el encontrar cifras elevadas de metafases en estos primeros momentos del desarrollo, lo que nos indica el grado de afectación que se está produciendo y los lugares en los que se están dando ciclos más cortos y, según aumenta la cifra, un mayor grado de división por el más elevado índice de mitosis.

ZONAS

1

2

3

4

5

2	T +1,82 -* +0,73 -** +0,71 -***				
3	T -3,06 -* -3,48 -** +0,49 -***	T -4,90 -* -4,08 -** -0,15 -***			
4	T -4,50 -* -4,41 -** +0,16 -***	T -6,25 -* -5,16 -** -0,42 -***	T -1,40 -* -1,12 -** -0,14 -***		
5	T +5,50 -* +4,53 -** +0,55 -***	T +3,74 -* +3,84 -** -0,12 -***	T +8,41 -* +7,70 -** +0,16 -***	T +9,62 -* +8,71 -** +0,19 -***	
6	T -0,82 -* -1,21 -** +0,32 -***	T -2,65 -* -1,97 -** -0,15 -***	T +2,30 -* +2,15 -** +0,06 -***	T +3,69 -* +3,27 -** +0,07 -***	T -6,31 -* -5,76 -** -0,09 -***

Test nº 1 .- Comparación de medias entre las zonas constitutivas de los embriones tipo 13col1H cuyos valores de "t" corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

Relación de las zonas indicadas con cada uno de los números de catalogación:

1= Superior (horiz.) 2= Media (horiz.) 3= Inferior (horiz.)

4= Anterior (vert.) 5= Media (vert.) 6= Posterior (vert.)

ZONAS

	1	2	3	4	5
2	T +6,40 -* +2,88 ** +2,65 ***				
3	T +5,87 -* +3,15 *** +1,61 ***	T -0,57 -* +0,27 ** -0,62 ***			
4	T +5,17 -* +4,33 ** +0,28 ***	T -1,31 -* +1,48 ** -1,94 ***	T -0,73 -* +1,21 ** -1,33 ***		
5	T +5,87 -* +0,59 ** +3,46 ***	T -0,57 -* -2,27 ** +1,26 ***	T +0,01 -* -2,54 ** +1,88 ***	T +0,72 -* -3,73 ** +3,18 ***	
6	T +0,18 -* -0,03 ** +0,13 ***	T -6,25 -* -2,92 ** -2,09 ***	T -5,73 -* -3,17 ** -1,48 ***	T -4,99 -* -4,34 ** -0,15 ***	T -5,68 -* -0,63 ** -3,33 ***

Test nº 2 .- Comparación de medias entre las zonas constitutivas de los embriones tipo 13col2H cuyos valores de "t" corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

Relación de las zonas indicadas con cada uno de los números de catalogación:

1= Superior (horiz.) 2= Media (horiz.) 3= Inferior (horiz.)

4= Anterior (vert.) 5= Media (vert.) 6= Posterior (vert.)

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T -8,85 -* +0,33 -** -8,47 -***
MEDIO (horiz.)	T -2,18 -* +7,27 -** -8,05 -***
INFERIOR (horiz.)	T +4,99 -* +12,39 -** -7,05 -***

ANTERIOR (vert.)	T +8,58 -* +14,54 -** -4,99 -***
MEDIO (vert.)	T -5,83 -* +3,16 -** -6,59 -***
POSTERIOR (vert.)	T -8,83 -* +4,22 -** -11,17 -***

Test nº 3 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 13col1H y 13-14 HH.N. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

OBSERVACIONES EN LOS EMBRIONES TIPO 13COL4H.-

a) Descripción de la morfología microscópica general.-

Tras el tratamiento de 4 horas con colchicina, en los embriones que tuvieron una incubación previa de 48 horas, se aprecia reducción en el tamaño de la copa óptica y un cierto retraso en el cierre de la misma, cuya intensidad depende de que la droga haya alcanzado su destino sobre un material más o menos avanzado, dentro de la variedad de reacción que ofrecen los distintos animales.

Como es fácil de entender, una estructura que está siendo frenada en su proceso de multiplicación y muy posiblemente en la vitalidad de sus células ha de ver frenado su desarrollo y, por otro lado, también modificados los procesos de la normal conformación: menor tamaño con una estructura de constitución atrasada y aún deforme.

b) Variaciones citoarquitectónicas.-

De un extremo a otro de la retina se observa una disminución general en el tamaño de sus células y/o núcleos junto a un notable incremento de sus figuras mitóticas. Esta situación resulta ser más patente en los extremos de la copa, allí donde las zonas son más jóvenes y se está produciendo el crecimiento. Las figuras números 13 y 14 son clara expresión de lo que estamos diciendo. En estas imágenes, el número de estrellas metafásicas es considerable. La figura n° 13 pertenece a una sección frontal posterior y la 14 a la región anterior. En ambas figuras se aprecia una considerable cantidad de núcleos esféricos y pequeños y en la 14 podemos ver también la conexión con un tallo de estructura celular muy densa.

La figura n° 15 y su aumento, la 16, ofrecen la situación a nivel central, en donde se puede ver un cristalino anormalmente engrosado en relación con la retina que le rodea (re). La cavidad ventricular se presenta más amplia de lo normal para el estadio de desarrollo que debería observarse dadas las horas de incubación más tratamiento.

En las imágenes números 17 y 18 pertenecientes a un embrión análogo a los de las figuras anteriores ponen de manifiesto el posible paralelismo de acción de la droga en copa óptica y en el tubo neural (pv). Se aprecia que hay zonas de condensación de metafases y otras de relativo silencio. Igualmente, se puede detectar que, sobre todo en tubo neural, se alternan sectores engrosados y con muchas metafases (fig. 18) con otros en los que bruscamente se ve no sólo disminución de mitosis sino también una zona de tubo neural con distinto comportamiento en la disposición de sus interfases, como si se hubiera puesto de manifiesto, bajo el efecto del tratamiento, la existencia de regiones diferentemente marcadas.

En el espesor de la capa retiniana, y sobre todo en cortes centrales, podemos ver las diferencias de los núcleos según que se hallen situados en la zona media o en los extremos anterior o posterior de la sección histológica. Esta situación muestra que, en sus ciclos celulares, las células ofrecen diferente conformación y reacción nuclear según pertenezcan a zonas más recientes de desarrollo o más antiguas, tales circunstancias pueden ser observadas en la imagen de la figura n° 19 correspondiente a una sección media de un corte horizontal de un embrión como los anteriores.

Fig. 13.- Sección posterior frontal de un embrión tipo 13col4h. en donde se aprecia el grado de afectación producido por la droga. El tamaño de los núcleos en interfase es variable pero predominan los más reducidos. El número de metafases se ha incrementado en relación con las situaciones de menor tiempo de tratamiento. Aumentos 400 x.

Fig. 14.- Imagen de sección de un embrión semejante al de la figura anterior pero correspondiente a la región frontal anterior. A pesar de tratarse de un corte anterior, se observa la conexión con tubo neural en zona del tallo, lo que indica la modificación que ha sufrido el desarrollo general de la copa. El número de metafases se muestra muy intenso como reflejo del acumulado proceso de división en una zona que es de las más proliferativas. Aumentos 160 x.

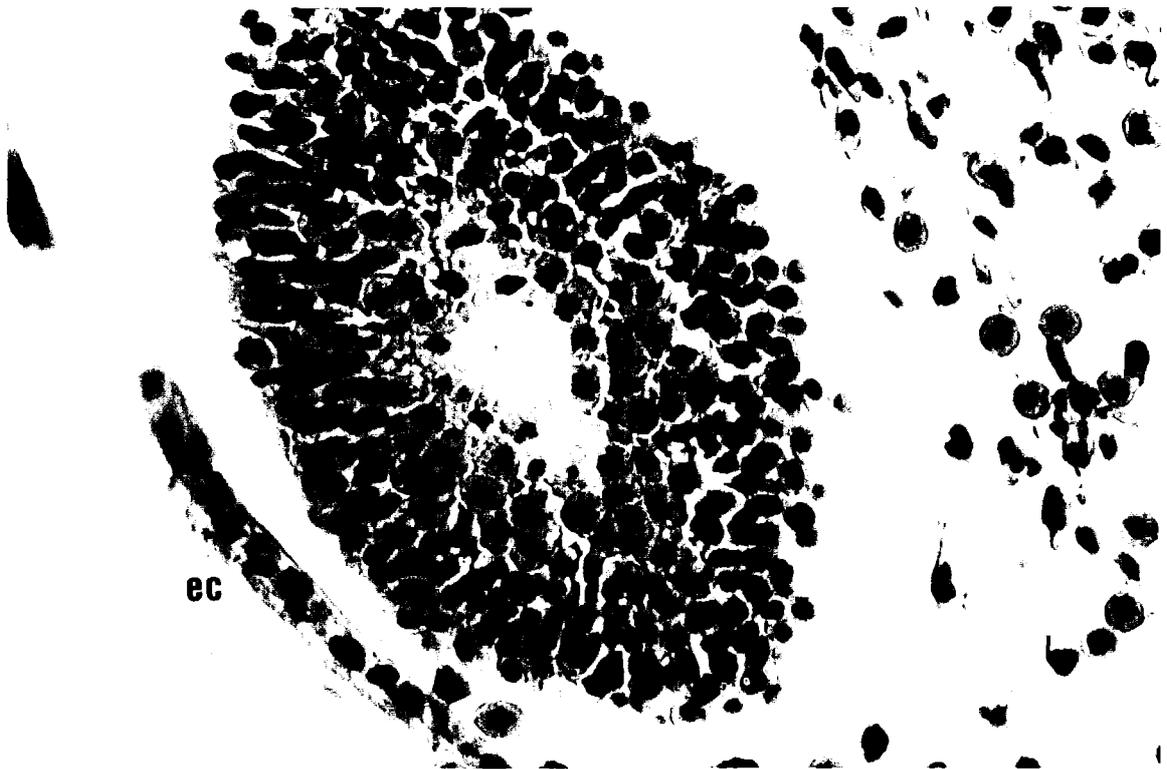


FIG.13



FIG.14

Fig. 15.- Sección central de copa óptica de un embrión 13col4h. en el que se aprecia una considerable comunicación interventricular lo cual supone un retraso en el desarrollo. En la lámina del cristalino también se detecta la afectación y la situación que ofrecen las metafases hacia el margen de la cavidad exterior. Es una sección de copa derecha. Aumentos 160 x.

Fig. 16.- Imagen análoga a la anterior pero ofreciendo en detalle la zona media central de la copa izda. Podemos ver que la afectación es muy similar a la ofrecida por la copa derecha y lo mismo puede decirse del aspecto cristaliniano. En el mismo centro de la capa retiniana (re) se aprecian abundantes grumos Feulgen positivos como posible índice de una mayor desintegración nuclear a este nivel. Aumentos 400 x.

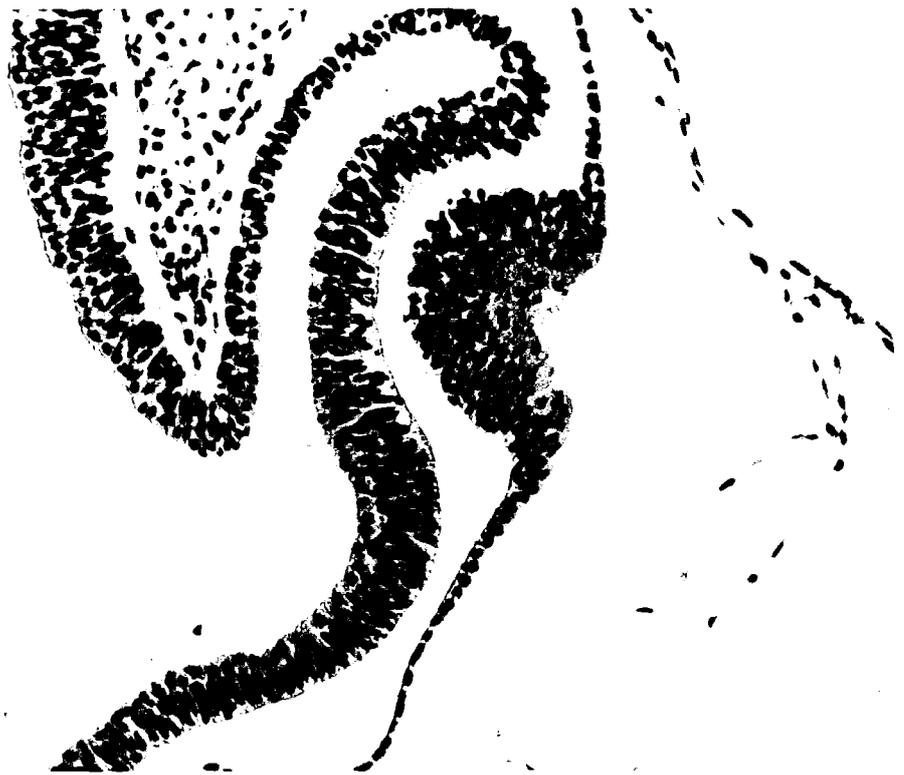


FIG.15



FIG.16

Fig. 17.- Imagen de una sección media frontal de un embrión tipo 13col4h. en donde se pone de manifiesto la simultánea afectación de la copa óptica y de la limitante ventricular del tubo neural (pv). Se puede distinguir también la diferente disposición y tamaño de los núcleos del tallo. Aumentos 160x.

Fig. 18.- Microfotografía de una zona semejante a la superior del tubo neural de la imagen anterior. Es una región, ésta superior del tubo (que constituye el techo físico del mismo) en la que se pone de manifiesto, al emplear la colchicina, una mayor proliferación que en otras regiones y por lo mismo un más intenso acúmulo de metafases. Aumentos 400 x.



FIG.17



FIG.18

Fig. 19.- En secciones horizontales, como la de la imagen presente, puede ponerse de manifiesto que tanto la afectación de las estructuras generales de la copa como las imágenes de los perfiles nucleares de las células son análogos a los que se pueden obtener en las secciones frontales. Con ello se nos confirma el que las diferencias de los tamaños de los núcleos no se deben, de forma decisiva, a la orientación del corte histológico sino a las propias variaciones de las células que hay en la zona o por efecto de la droga. Muy distinta sería la situación si lo que se hubieran realizado fueran secciones sagitales. La semejanza de perfiles en secciones frontales y horizontales es una confirmación de que esas distintas formas esferoidales o elipsoidales (de los perfiles) se corresponden con las de las partículas así catalogadas. Aumentos 160 x.



FIG. 19

c) Datos obtenidos en densidad celular interfásica, mitótica y en la disposición estereológica.-

La Tabla n° 7 contiene los valores obtenidos para los embriones tipo 13col4h en los 9 sectores analizados dentro de cada retina y para sus correspondientes zonas. A partir de estos datos se han elaborado los que se exponen en la Tabla n° 8. Ya, sin más comparaciones, se puede comprobar que los valores del índice mitótico y cantidad de metafases son superiores a los contabilizados hasta ahora con otras experiencias; el valor de las profases ha disminuido a valores considerables y no se detectaron anafases-telofases. La situación, que se hace extensiva para todos los sectores y zonas, se repite como es lógico para el estudio global de toda la retina, tal y como se observa en la Tabla n° 9.

POLLOS 13COL4H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR		Cor. Vt
	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	
S	AREA M.	11764,09		10159,21		14883,29	S
U	VOL		188225,5		162547,4		238132,6 U VOL
P	INTERF	120,8255	482,2920	98,47089	376,134	150,3814	642,5852 P INTERF
E	MITOSIS	34,6	72,17731	33,2	69,25684	65,8	137,2620 E MITOSIS
R	METAF.	32,2	67,17079	30,6	63,83311	62,3	129,9608 R METAF.
I	PROF	2,5	5,215123	2,6	5,423728	3,6	7,509778 I PROF
O	ANTF	0	0	0	0	0	0 O ANTF
R							R

	AREA M.	11704,49		13153,95		15545,36	
M	VOL		187271,8		210463,3		248725,8 M VOL
E	INTERF	88,02715	335,6276	169,4218	756,6236	156,2984	635,5221 E INTERF
D	MITOSIS	37,6	78,43546	47,6	99,29595	63,2	131,8383 D MITOSIS
I	METAF.	33,6	70,09126	43,1	89,90873	58,1	121,1994 I METAF.
O	PROF	4,1	8,552803	4,5	9,387222	5,1	10,63885 O PROF
	ANTF	0	0	0	0	0	0 ANTF

I	AREA M.	11455,56		10869,61		15183,05	I
N	VOL		183288,9		173913,8		242928,8 N VOL
F	INTERF	109,5850	389,7653	145,4323	617,6452	168,2315	694,7164 F INTERF
E	MITOSIS	38,7	80,73011	36,2	75,51499	68,2	142,2685 E MITOSIS
R	METAF.	36,6	76,34941	34,6	72,17731	62,3	129,9608 R METAF.
I	PROF	2	4,172099	1,6	3,337679	6	12,51629 I PROF
O	ANTF	0	0	0	0	0	0 O ANTF
R							R

	TOTAL ANTERIOR			*TOTAL MEDIO*		*TOTAL POSTERIOR*	
	VOL	186187,6		182235,3		243165,1	
	INTERF	402,4207		583,2634		657,3778	
	MITOSIS	77,08730		81,32745		137,0749	
	METAF.	71,17890		75,28003		126,9959	
	PROF	5,977915		6,047426		10,21806	
	ANTF	0		0		0	

****TOTAL POLLO****

Corregidos

Val. medio S.D.

VOL	1834030,	128484,8
INTERF	4927,460	4437,820
MITOSIS	886,1590	71,82915
METAF.	820,0775	6,565215
PROF	66,70686	6,007822
ANTF	0	0

Tabla nº 7

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL4H

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	4,732442	0,378595	4,788683	0,383094	4,974136	0,397930
Met/Vol	4,431351	0,354508	4,349828	0,347986	4,640441	0,371235
Prof/Vol	0,308175	0,021572	0,442081	0,030945	0,333694	0,023358
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	25,48814	3,058577	26,72664	3,207197	28,36256	3,403507
Imit	15,65966	1,252773	15,19477	1,215582	14,92090	1,193672
Imet	14,66335	1,173068	13,80226	1,104181	13,91992	1,113593
Iprof	1,019753	0,071382	1,402752	0,098192	1,000983	0,070068
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	93,63772	11,23652	90,83557	10,90026	93,29140	11,19496
%prof	6,511976	0,520958	9,231805	0,738544	6,708595	0,536687
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL4H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	4,140095	0,331207	4,462548	0,357003	5,636833	0,450946
Met/Vol	3,822775	0,305822	4,130718	0,330457	5,222360	0,417788
Prof/Vol	0,321053	0,022473	0,331830	0,023228	0,420189	0,029413
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	21,61264	2,593517	32,00446	3,840535	27,03285	3,243942
Imit	16,07633	1,286106	12,23722	0,978977	17,25401	1,380321
Imet	14,84415	1,187532	11,32727	0,906181	15,98533	1,278826
Iprof	1,246676	0,087267	0,909947	0,063696	1,286176	0,090032
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	92,33543	11,08025	92,56410	11,10769	92,64705	11,11764
%prof	7,754733	0,620378	7,435897	0,594871	7,454361	0,596348
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 13COL4H		
	Media	S.D.

Mit/Vol	4,831274	0,386501
Met/Vol	4,471002	0,357680
Prof/Vol	0,363680	0,025457
Antf/Vol	0	0
Int/Vol	26,86415	3,223698
Imit	15,24280	1,219424
Imet	14,10614	1,128491
Iprof	1,147423	0,080319
Iantf	0	0
%met	92,54293	11,10515
%prof	7,527640	0,602211
%antf	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

d) Comparaciones entre las distintas situaciones experimentales y normales encontradas.-

Comparando entre sí las distintas zonas de los mismos embriones se ve, como queda reflejado en el test nº 4, que existen más diferencias en las zonas horizontales (significación en gris) que entre las verticales (4, 5 y 6) .

Por otro lado, la zona media vertical que contiene la población celular más antigua (primitiva formación) es en la que aparecen los valores más inferiores.

Al comparar los valores de zona de mayor interés (Mitosis/Volumen; Índice mitótico e Interfases/Volumen) entre los correspondientes a los embriones 13col1h y 13col4h, queda patente, con valores de "t" muy a favor de 13col4h (test nº 5) el incremento de mitosis y metafases. De destacar es el que en relación con el número de interfases no se den prácticas diferencias significativas entre los dos tipos de experiencias, lo que viene a indicar, a falta de otras determinaciones, que se mantiene una densidad de interfases por unidad de volumen, aunque el número total se ha incrementado (comparar tablas nº 1 y 4). Una explicación, tal vez simple, sería la de que, al ser tratamientos cortos y tener que contar con el tiempo de difusión de la droga, actuamos sobre células que están mayoritariamente en G-2 y el resto (que son las más) pueden sufrir divisiones, pues al momento de la inyección (más la difusión) pudieron pasar de metafase y anafase; otras, todavía en mayor número, seguirán en G-1 y en fase "S" y, por otra parte, la relativa reducción de volumen total ayudará a mantener la densidad.

Cuando la comparación de la situación de los embriones tipo 13col4h se verifica con aquellos normales que se corresponderían con el tiempo total de incubación más experiencia nos encontramos, Test nº 6, con un abundante incremento de mitosis en volumen y de índice mitótico en los embriones



sometidos a experimentación, pero las diferencias son contrarias en lo que a interfase se refiere, lo que no sólo indica la realidad de la afectación -junto con los demás datos- sino que el proceso se está dando en toda la copa de forma proporcional (a juzgar por la semejanza en los valores de "t") y a pesar de estar incidiendo sobre zonas que ofrecen una base de competencia distinta.

ZONAS

	1	2	3	4	5
2	T -0,24 -* +0,60 -** -0,62 -***				
3	T -0,99 -* +0,95 -** -1,40 -***	T -0,75 -* +0,35 -** -0,78 -***			
4	T -2,63 -* +0,51 -** -2,16 -***	T -2,86 -* +1,11 -** -2,79 -***	T -3,60 -* +1,47 -** -3,53 -***		
5	T -1,16 -* -4,83 -** +2,97 -***	T -1,40 -* -4,25 -** +2,36 -***	T -2,13 -* -3,90 -** +1,58 -***	T +1,47 -* -8,44 -** +5,01 -***	
6	T +3,40 -* +1,98 -** +0,78 -***	T +3,20 -* +2,50 -** +0,15 -***	T +2,46 -* +2,86 -** -0,63 -***	T -5,96 -* -1,40 -** -2,92 -***	T -4,55 -* -6,63 -** +2,21 -***

Test n° 4 .- Comparación de medias entre las zonas constitutivas de los embriones tipo 13col4H cuyos valores de "t" corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

Relación de las zonas indicadas con cada uno de los números de catalogación:

1= Superior (horiz.) 2= Media (horiz.) 3= Inferior (horiz.)

4= Anterior (vert.) 5= Media (vert.) 6= Posterior (vert.)

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	-16,28 *
	-17,12 **
	+2,35 ***
MEDIO (horiz.)	T
	-17,64 *
	-17,78 **
	+1,04 ***
INFERIOR (horiz.)	T
	-14,81 *
	-14,44 **
	+0,67 ***

ANTERIOR (vert.)	T
	-11,30 *
	-14,58 **
	+4,30 ***
MEDIO (vert.)	T
	-18,53 *
	-16,73 **
	-1,16 ***
POSTERIOR (vert.)	T
	-17,81 *
	-17,47 **
	+1,29 ***

Test nº 5 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 13col1H y 13col4H. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	+9,06 *
	+21,09 **
MEDIO (horiz.)	T
	+14,86 *
	+21,96 **
INFERIOR (horiz.)	T
	+10,77 *
	+20,60 **
	+14,23 ***

ANTERIOR (vert.)	T
	+8,45 *
	+21,14 **
MEDIO (vert.)	T
	+7,43 *
	+20,32 **
POSTERIOR (vert.)	T
	+14,29 *
	+22,10 **
	+14,63 ***

Test nº 6 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 13col4H y 16-17 HH.N. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

OBSERVACION EN LOS EMBRIONES TIPO 13col8H.-

a) Descripción de la morfología microscópica general.-

En la observación general de las copas ópticas de los embriones de este tipo de experiencia se aprecia una disminución de tamaño, que se entiende por el hecho de que la prolongación del tratamiento, la reducción de los tamaños celulares, el incremento en la debilitación de la vitalidad celular con su posible destrucción y la casi anulación de los procesos de división no sólo frenan el desarrollo sino que lo reducen. La formación ofrece una estructura que ya escasamente recuerda a la de la copa normal para este tiempo de desarrollo (56-57 horas estadio en torno al 17 HH.); la cavidad ventricular está casi obliterada, como puede apreciarse en las figuras números 20 a 20 y se distinguen muy pocos núcleos en situación de interfase.

b) Modificaciones en la citoarquitectura.-

Como se puede observar en la figura n° 20 y su aumento (la 21), de zonas posteriores y corte frontal, la imagen aparece repleta de estrellas metafásicas; los pocos núcleos interfásicos que se detectan tienden a adoptar formas redondeadas y sus contornos son un tanto irregulares con lo que no se puede descartar cierto grado de afectación. De modo paralelo a la situación retiniana, en el tubo o zona prospectiva del desarrollo cerebral, se detecta una intensa afectación pero con una particularidad, consistente en que se distinguen dos formas de comportamiento zonal con netos y bruscos límites de separación entre ellas (aunque sin solución de continuidad); esa separación la señalamos en las figuras 20 a 22 con las letras "zt" y ofrece la transición entre una región (a la derecha) con aspecto semejante al de la retina y otra (a la izquierda de

"zt") señalada con "pv" que, si bien ofrece signos de afectación, tiene una constitución más normal, con núcleos en empalizada y engrosamiento general de la pared mucho más regular.

En figuras como la 22 y 23, que corresponden a secciones casi medias o centrales, se puede apreciar el reducido desarrollo del cristalino "ec" y el grado de desorganización que se puede ver tanto en su constitución como en la de la zona retiniana, donde queda de manifiesto la irregular asociación de las células.

En las figuras números 24 a 26 se pueden observar distintos detalles de la afectación celular en situaciones de experimentación como la que nos ocupa. Vemos la abundante acumulación de figuras de metafases, la separación que se detecta entre muchas de las superficies celulares, la disgregación que en muchas de ellas aparece en la cromatina nuclear (como pequeños grumos redondeados Feulgen positivos) y la disminución en tamaño y esfericidad de los núcleos en interfase. De destacar, tal y como se señala en la fig. n° 24, es la presencia, entre la superficie interna del rudimento cristalino y la limitante vitreal retiniana, de un material anhisto que ha ofrecido Feulgen positividad (material de posibles mucopolisacáridos) y que se señala como "lb".

Fig. 20.- Imagen microscópica de una sección posterior frontal de un embrión de pollo teñido por el método de Feulgen tras haber recibido durante 8 horas tratamiento con 1 mgr. de colchicina y después de 48 horas de incubación. Ec= ectodermo; pr = polo posterior retiniano; pv = pared de tubo neural. La afectación en copa retiniana es casi total. En "zt" se señala una zona de transición entre regiones del tubo neural que se nos presentan como muy afectadas y otras que lo son menos; sin que podamos aclarar si se trata de una diferente acción de la droga motivada por una peor vía de difusión o a un diverso modo de reacción por parte de zonas diferentes del tubo neural. Con todo, es el caso, de que en la región menos reactiva también podemos detectar un buen número de metafases lo que indica la llegada del producto inyectado. Aumentos 160 x.

Fig. 21.- Detalle de la imagen anterior. Llama la atención el escaso n° de los núcleos en interfase y la muy escasa afectación del ectodermo junto a un mesénquima y una copa retiniana que sí están afectados. Aumentos 400 x.

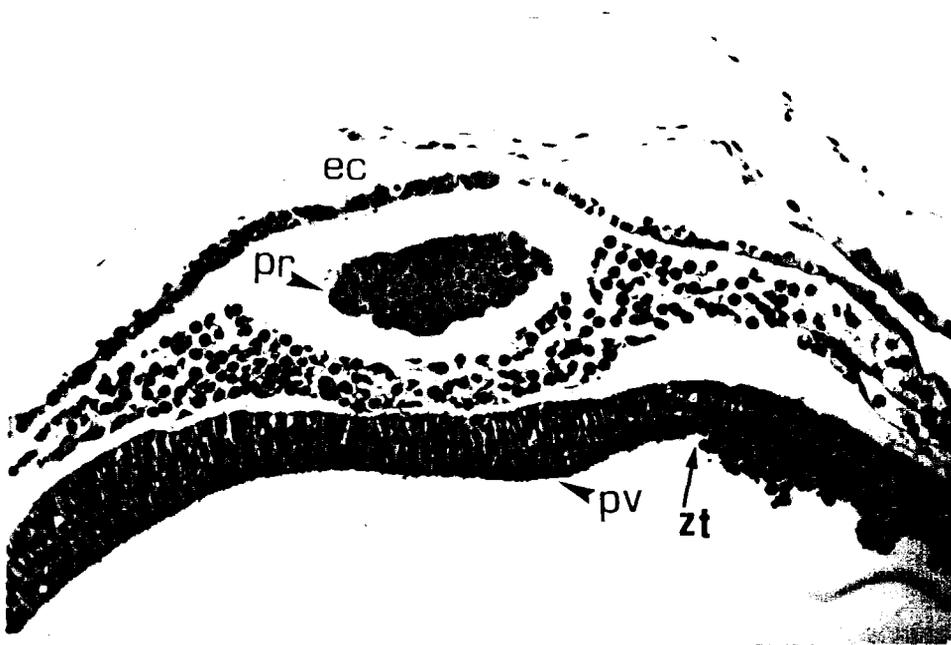


FIG. 20

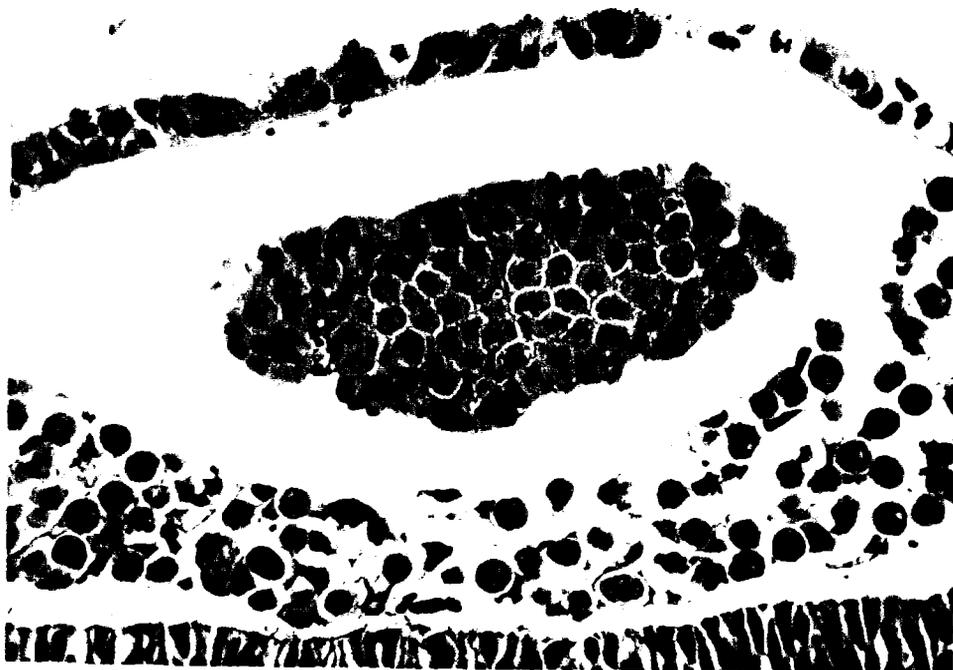


FIG. 21

Fig. 22.- Sección histológica frontal de la región posterior de la copa de un embrión tipo 13col8h. De destacar en él que, a pesar de ser un corte hecho a nivel central de la copa todavía no se aprecia una cavidad ventricular, ésta más bien se nos presenta como si estuviera obstruida. Aumentos 160 x.

Fig. 23.- Detalle de la imagen anterior. Es de destacar el irregular desarrollo de las células prospectivas del ectodermo cristalino -ec-. Aumentos 400 x.



FIG. 22



FIG. 23

Fig. 24.- Detalle de copa óptica semejante a la de la imagen anterior en donde puede apreciarse la casi total afectación tanto de la misma como del cristalino que se le enfrenta. Se ha utilizado un filtro de contraste verde para de este modo poder resaltar la densidad del espécimen y poner de manifiesto la fina membrana "lb" que aparece dispuesta entre copa y cristalino y que ha aparecido netamente revelada mediante este tipo de imágenes y su correspondiente tratamiento. Aumentos 630 x.



FIG. 24

Fig. 25.- Corte histológico central-anterior y frontal de un embrión tipo 13col8h. en donde se aprecia la irregularidad de la conformación de la copa óptica así como el reducido desarrollo del cristalino. Aumentos 160 x.

Fig. 26.- Zona análoga a la anterior pero que es correspondiente a tubo neural en su región superior. La disposición de las metafases y la regularidad de sus tamaños nos inducen a pensar en una sincronía del comportamiento de sus ciclos. Aumentos 630 x.

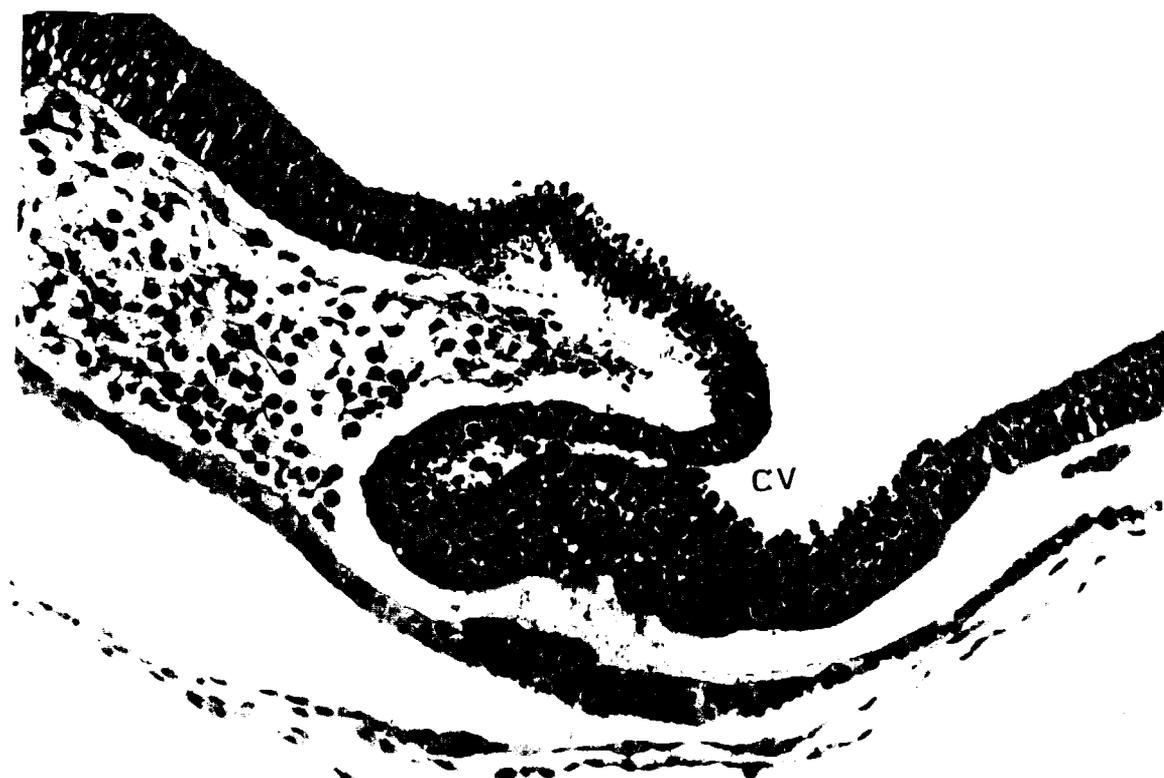


FIG. 25

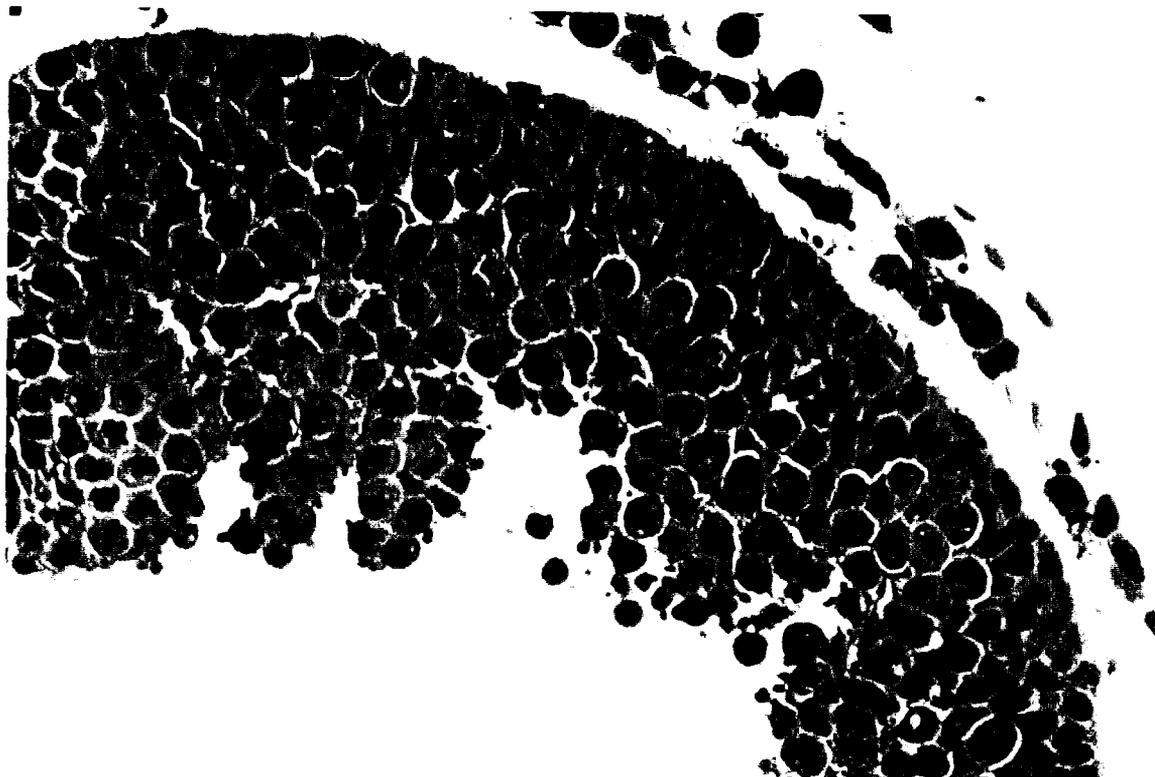


FIG. 26

c) Datos obtenidos sobre: densidad celular mitótica, interfásica y sus disposiciones estereológicas.-

Los datos cuantitativos correspondientes a las descripciones anteriormente reseñadas y pertenecientes a los embriones de estas experiencias se presentan en las tablas números 10 al 12 y ofrecen un estado análogo al de los embriones 13col4h pero con valores mucho más intensos para las metafases (e índices mitóticos) en esta situación de mayo actividad de la droga, propia del tipo de experiencia tipo 13col8h. Como es lógico, la situación se repite para los valores globales encontrados al analizar toda la retina en su conjunto.

POLLOS 13COL8H

	ANTERIOR				MEDIO		POSTERIOR		Cor. Vt
	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	
S	AREA M.	7479,9		22369,72		8951,67			S
U	VOL		89758,8		268436,7		107420,0		U VOL 155143,0
P	INTERF	42,19831	117,3061	148,9688	397,1583	79,12663	255,4976		P INTERF 256,5642
E	MITOSIS	85,3	133,4550	114,2	178,6701	72,2	112,9595		E MITOSIS 141,6453
R	METAF.	85,2	133,2985	113,2	177,1056	72,1	112,8031		R METAF. 141,0197
I	PROF	0,1	0,156453	1	1,564537	0	0		I PROF 0,573462
O	ANTF	0	0	0	0	0	0		O ANTF 0
R									R
M	AREA M.	7011,882		14970,42		8701,389			M VOL 122685,6
E	VOL		84142,58		179645,0		104416,6		E INTERF 285,8249
D	INTERF	43,87555	136,2216	132,8978	394,9634	100,2568	326,5899		D MITOSIS 90,19006
I	MITOSIS	69,2	108,2659	46,2	72,28161	57,6	90,11734		I METAF. 89,46020
O	METAF.	69,2	108,2659	45,3	70,87353	57,1	89,33507		O PROF 0,521329
	PROF	0	0	1	1,564537	0	0		O ANTF 0
	ANTF	0	0	0	0	0	0		
I	AREA M.	7911,882		22814,15		10668,13			I
N	VOL		94942,58		273769,8		128017,5		N VOL 165510,4
F	INTERF	49,68651	128,5821	255,6510	735,0800	73,41349	202,1910		F INTERF 355,1600
E	MITOSIS	54,1	84,64146	91,1	142,5293	72,2	112,9595		E MITOSIS 113,3371
R	METAF.	54,1	84,64146	90,3	141,2777	72	112,6466		R METAF. 112,8157
I	PROF	0	0	1	1,564537	0	0		I PROF 0,521329
O	ANTF	0	0	0	0	0	0		O ANTF 0
R									R
TOTAL ANTERIOR				*TOTAL MEDIO*		*TOTAL POSTERIOR*			
VOL	89578,81		240520,9		113239,4				
INTERF	127,3254		508,8890		261,3347				
MITOSIS	108,7494		131,1144		105,3086				
METAF.	108,6972		129,7068		104,8915				
PROF	0,052132		1,563989		0				
ANTF	0		0		0				

TOTAL POLLO
 Corregidos
 Val. medio S.D.

VOL	1330017,	93138,48
INTERF	2692,647	2424,231
MITOSIS	1035,517	83,90628
METAF.	1029,887	8,241981
PROF	4,848367	0,436505
ANTF	0	0

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL8H

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	9,129522	0,730361	7,350944	0,588075	6,847389	0,547791
Met/Vol	9,089200	0,727136	7,291457	0,583316	6,815892	0,545271
Prof/Vol	0,036961	0,002587	0,042491	0,002974	0,031496	0,002204
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	16,53643	1,984372	23,29617	2,795540	21,45739	2,574887
Imit	35,57054	2,845643	23,98576	1,918861	24,19163	1,935330
Imet	35,41344	2,833075	23,79165	1,903332	24,08035	1,926428
Iprof	0,144010	0,010080	0,138646	0,009705	0,111277	0,007789
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	99,55833	11,94700	99,19075	11,90289	99,54001	11,94480
%prof	0,404858	0,032388	0,578034	0,046242	0,459981	0,036798
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 13COL8H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	12,13947	0,971157	5,450997	0,436079	9,299176	0,743934
Met/Vol	12,13365	0,970692	5,392477	0,431398	9,262348	0,740987
Prof/Vol	0,005819	0,000407	0,065021	0,004551	0	0
Antf/Vol	0	0	0	0	0	0
Int/Vol	14,21307	1,705569	21,15672	2,538807	23,07690	2,769228
Imit	46,06565	3,685252	20,48652	1,638921	28,72236	2,297789
Imet	46,04356	3,683485	20,26658	1,621326	28,60861	2,288688
Iprof	0,022083	0,001545	0,244372	0,017106	0	0
Iantf	0	0	0	0	0	0
%met	99,95206	11,99424	98,92644	11,87117	99,60396	11,95247
%prof	0,047938	0,003835	1,192842	0,095427	0	0
%antf	0	0	0	0	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 13COL8H		
	Media	S.D.

Mit/Vol	7,785353	0,622828
Met/Vol	7,743022	0,619441
Prof/Vol	0,036451	0,002551
Antf/Vol	0	0
Int/Vol	20,24418	2,429302
Imit	27,77552	2,222042
Imet	27,62450	2,209960
Iprof	0,130047	0,009103
Iantf	0	0
%met	99,45627	11,93475
%prof	0,468207	0,037456
%antf	0	0

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

d) Comparaciones entre las distintas situaciones experimentales y normales analizadas.-

En el test de comparación de medias n° 7, que recoge los resultados análisis por parejas de los resultados en las zonas constitutivas de estos embriones tipo 13col8h, se pone de manifiesto el que casi todas las comparaciones dan diferencias significativas (de distinto signo, pero por encima del 95%) lo que expresa la gran variedad de comportamiento en las distintas regiones que componen la retina, situación que se ha hecho patente o más descubierta tras la aplicación de la droga.

Cuando, como se puede ver en el test n° 8, se hacen comparaciones entre los resultados de haber realizado tratamientos de 1 hora y 8 horas, resulta completamente claro que se ha producido una detención en las multiplicaciones celulares conforme aumentó el tiempo de actuación de la droga (valores negativos de "t" para embriones 13col1h), bajaron paralelamente los valores de interfases y de profases (valores positivos de "t") y nos desaparecieron las anafases telofases como corresponde a una acción en que las células quedan detenidas en metafase y el tiempo de tratamiento ha sido suficientemente largo.

Cuando se ponen en relación los resultados de haber realizado un tratamiento de 4 y 8 horas, cuya situación queda expuesta en el test n° 9, se obtiene algo semejante a lo descrito en el párrafo precedente pero lógicamente los valores de "t" son inferiores. Era de esperar tal situación a partir de la mera observación de las cifras y de la progresiva marcha de detención de células en metafase; pero quisimos hacer tales comparaciones para comprobar el paulatino progreso que se va desarrollando en la afectación y poder seguir el comportamiento de los sectores y la posible variación entre ellos. Se puede apreciar así, por ejemplo, cómo las zonas medias siguen siendo las que menos diferencias dan lo

que indica que representan lugares de menor actividad proliferativa y diferente comportamiento de sus interfases.

Por último y para poner de manifiesto que las mayores diferencias se producen entre animales normales y los que hemos sometido a tratamiento, se realizaron comparaciones como las ofrecidas en el test nº 10, en el que claramente se aprecia que tras 8 horas de tratamiento la variación en relación con los embriones normales es muy superior a las que se obtuvieron al hacer comparaciones con los resultados obtenidos para períodos inferiores de acción bajo la droga.

ZONAS

1

2

3

4

5

2	T +4,26 -* +7,57 -** -4,41 -***				
3	T +5,60 -* +7,41 -** -6,19 -***	T +1,42 -* -0,17 -** +1,28 -***			
4	T -5,54 -* -5,04 -** +1,98 -***	T -9,40 -* -11,90 -** +7,94 -***	T -10,61 -* -11,66 -** +5,25 -***		
5	T +9,70 -* -10,30 -** -3,21 -***	T +5,83 -* +3,11 -** +1,50 -***	T +4,46 -* +3,28 -** +0,18 -***	T +14,05 -* +14,21 -** -5,09 -***	
6	T -0,34 -* +4,19 -** +4,30 -***	T -4,59 -* -3,55 -** +0,14 -***	T -5,94 -* -3,38 -** -0,99 -***	T +5,19 -* +8,94 -** -6,11 -***	T -9,99 -* -6,55 -** -1,14 -***

Test nº 7 .- Comparación de medias entre las zonas constitutivas de los embriones tipo 13col8H cuyos valores de "t" corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

Relación de las zonas indicadas con cada uno de los números de catalogación:

1= Superior (horiz.) 2= Media (horiz.) 3= Inferior (horiz.)

4= Anterior (vert.) 5= Media (vert.) 6= Posterior (vert.)

**COMPARACION DE VALORES TOTALES DE INDICE
ENTRE LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

Mit/Vol	T 21,00
Met/Vol	T 22,22
Prof/Vol	T 31,50
Antf/Vol	T -----
Int/Vol	T 4,88

Test nº 8 .- Comparaciones entre los embriones tipo 13col1H y 13col8H de los valores totales que se obtuvieron en las retinas correspondientes para los parámetros que se indican: Mit/Vol (mitosis en volumen total); Met/Vol (metafasas en volumen); Prof/Vol (profases en volumen); Antf/Vol (anafases-telofases en volumen); Int/Vol (interfasas en volumen). Los valores de "t" con diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95 % aparecen sombreados en el cuadro.

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	-11,95 *
	-14,30 **
	+5,49 ***
MEDIO (horiz.)	T
	-8,15 *
	-8,64 **
	-1,79 -***
INFERIOR (horiz.)	T
	-6,18 *
	-9,10 **
	+3,60 -***

ANTERIOR (vert.)	T
	-17,45 *
	-17,15 **
	+5,33 -***
MEDIO (vert.)	T
	-3,89 *
	-9,62 **
	+5,26 -***
POSTERIOR (vert.)	T
	-9,45 *
	-9,56 **
	+2,07 -***

Test nº 9 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 13col4H y 13col8H. Los valores de "t" contenidos en los cuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

**COMPARACION DE VALORES TOTALES DE INDICE
ENTRE LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

Mit/Vol	T +18,46
Met/Vol	T +24,03
Prof/Vol	T +43,24
Antf/Vol	T -----
Int/Vol	T +17,57

Test nº 10 .- Comparaciones entre los embriones tipo 13col8H y 16-17HH.N de los valores totales que se obtuvieron en las retinas correspondientes para los parámetros que se indican: Mit/Vol (mitosis en volumen total); Met/Vol (metafases en volumen); Prof/Vol (profases en volumen); Antf/Vol (anafases-telofases en volumen); Int/Vol (interfases en volumen). Los valores de "t" con diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95 % aparecen sombreados en el cuadro.

OBSERVACIONES EN LOS EMBRIONES TIPO 16col4H.-

a) Descripción de la morfología microscópica general.-

Desde una primera observación, la disposición general de la copa óptica y con ella la de la retina ofrece, tal y como apreciamos en las figuras números 28, 29 y 33, un desarrollo regular poco diferente del ofrecido por los embriones sin tratar, con una concavidad apropiada, una reducción, hasta casi virtual, del espacio ventricular y una invaginación y cierre del cristalino que resulta propio del momento del desarrollo correspondiente a las horas totales transcurridas desde el comienzo de la incubación hasta la extracción y fijación de los animales.

Esta regularidad anteriormente descrita contrasta con lo que cabía esperar tras ver las modificaciones ocurridas después de 4 horas de tratamiento en los embriones 13col4h. No se repiten las anomalías allí encontradas y la configuración regular se puede observar también en el resto de desarrollos cerebrales no ópticos.

Es muy posible que la droga, dado que fué inyectada a las 60 horas de incubación normal, encontrara por lo avanzado del desarrollo una mayor dificultad a la difusión y que incluso pueda tener mayor importancia el hecho de que sea inyectada en un lugar más o menos próximo a la retina según sea su colocación en relación con la cavidad amniótica. Pero tanto en este tipo de experiencia como en el próximo (que relataremos) contamos con pruebas de que en alguna medida la droga alcanzó cuando menos parte de su objetivo, tanto por los índices posteriormente recontados como por las imágenes de afectación celular obtenidas con mayor o menor intensidad. El conjunto de datos nos lleva a la situación de entender, o cuando menos sospechar, que a partir de

aproximadamente esa hora 60 de desarrollo (estadio final 15 HH. o comienzos del 16) la retina ha modificado su situación de competencia y de avance en la diferenciación y, entonces, la llegada de la colchicina le afecta de modo distinto (aún sin que se pueda descartar que se cuente con mayores dificultades de difusión, que en alguna manera también serán debidas al desarrollo general alcanzado).

b) Modificaciones en la citoarquitectura.-

Observaciones a la microcopía óptica como las que se presentan en las figuras números 27 a 29 ofrecen una disposición celular muy semejante a la de los embriones normales; se pone en ellas de manifiesto que la relación entre la frecuencia de metafases (y/o figuras mitóticas) y la de las interfases no ofrece las modificaciones apreciables en los embriones tipo 13col4h. La situación puede verse más detalladamente en imágenes como las de las figs. 30 a 32, que son de una sección vertical central de la copa; la figura n° 30 ofrece los típicos núcleos interfásicos con perfil ovalado y periferia regular, las metafases se presentan ligeramente incrementadas (me) y, si bien su aspecto no es el de las típicas estrellas, sí que aparecen con una condensación e intensidad de reacción que resulta superior a la de las imágenes habituales en los embriones no tratados. El número de profases (pr) se nos ofrece en menor frecuencia, pero su presencia está indicando que posiblemente una variación del del ciclo celular esté facilitando esa mejor entrada o aparición de profases en relación con los otros tipos de tratamiento. Las figuras 31 y 32 muestran aspectos semejantes al anteriormente descrito.

En las imágenes ofrecidas por las figuras 33 a 36 se puede apreciar el aspecto de las secciones histológicas posteriores, en donde se pueden ver: la regularidad de forma e implantación del tallo, el normal cierre del cristalino, el ligero aumento de figuras metafásicas y en la figura n° 36 una situación que posteriormente comentaremos y que se refiere a la diferente intensidad de reacción que se distingue entre los núcleos interfásicos localizados en la región central retiniana y la corona periférica de núcleos pertenecientes al epitelio pigmentario.

Fig. 27.- Sección frontal anterior de embrión de un pollo que a las 60 horas de incubación recibió -1 miligramo- de colchicina durante un tiempo de 4 h. y fue posteriormente teñido por el método de Feulgen. Se puede apreciar cierto grado de afectación en algunas metafases pero muchas de las imágenes se nos muestran normales y así vemos el que a pesar del empleo de la droga aparece cierta falta de anomalía en el desarrollo general y asistimos a una configuración bastante parecida a la de los embriones sin tratar. Aumentos 160 x.

Fig. 28.- Sección de la región frontal anterior de un embrión análogo al de la imagen precedente en el que bien se observa, a pesar de las 4 horas de tratamiento, regularidad en su conformación. Otro tanto podemos decir del desarrollo cristaliniario y del tubo neural. Aumentos 160 x.

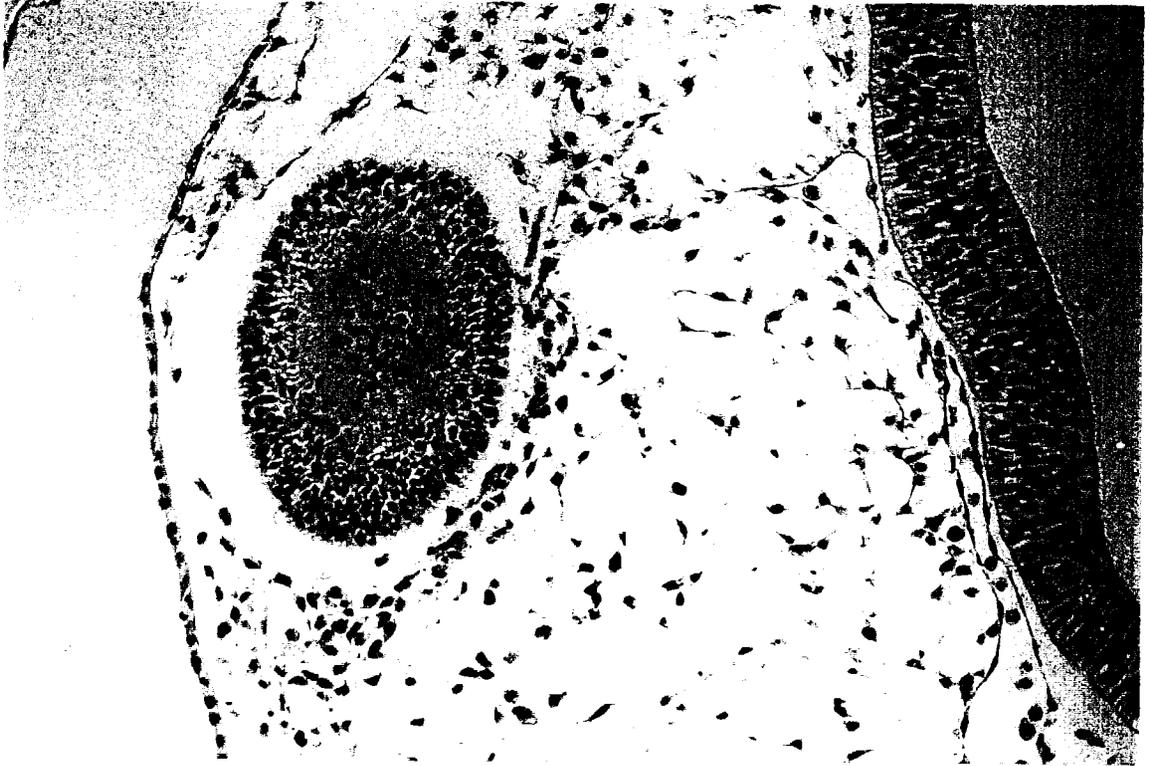


FIG.27

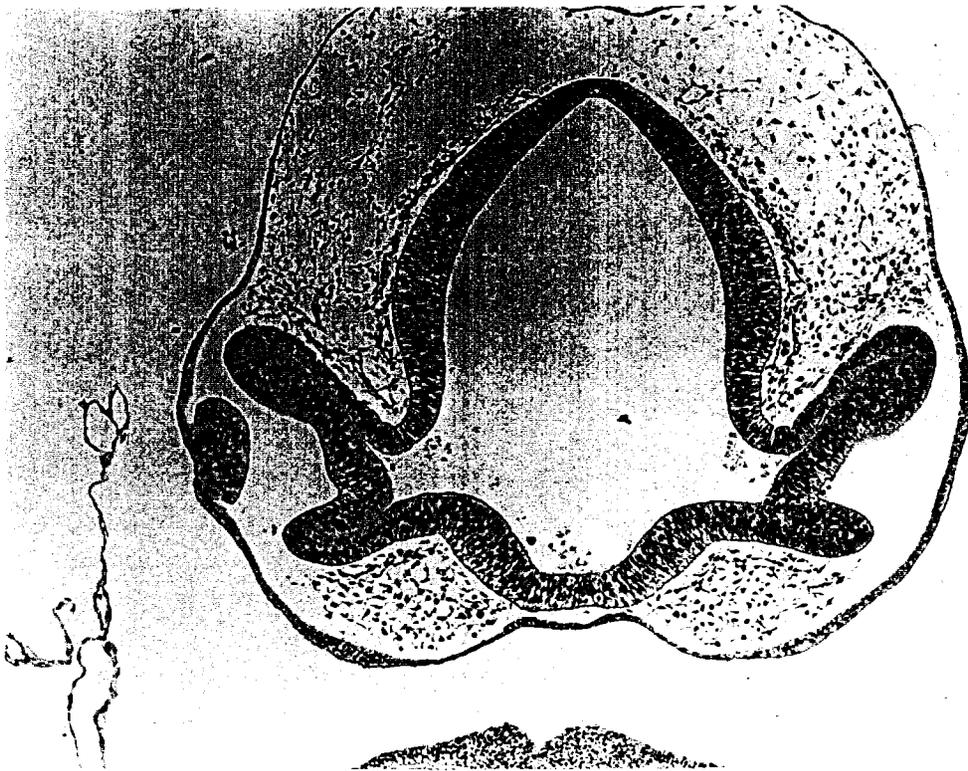


FIG.28

Fig. 29.- Imagen análoga a la anterior pero de zona central en donde se aprecia la misma regularidad de desarrollo y la adecuación en el cierre del epitelio cristalino; todo ello, es índice o bien de una dificultad en la difusión de la droga o bien de que, llegados a este estadio de desarrollo, asistimos a un mecanismo posiblemente distinto de comportamiento o de la reacción de las células a la acción de la droga, el hecho ocurre tanto en la retina como en las otras estructuras nerviosas de la zona. Aumentos 63.

Fig. 30.- Detalle de la imagen anterior en donde pueden apreciarse figuras de profase (pr) y de metafase (me) que por su disposición y número vienen a ofrecer cierta afectación. La forma de presentación de las imágenes, con figuras mitóticas en pequeños grupos, nos llama la atención, a pesar de que su configuración no sea la de aquella disposición de las típicas estrellas metafásicas producidas por la acción de la colchicina. La cavidad o surco ventricular -cv- aparece casi virtual e igualmente podemos detectar poca afectación en la lámina del epitelio pigmentario -ep-. Aumentos 400 x.

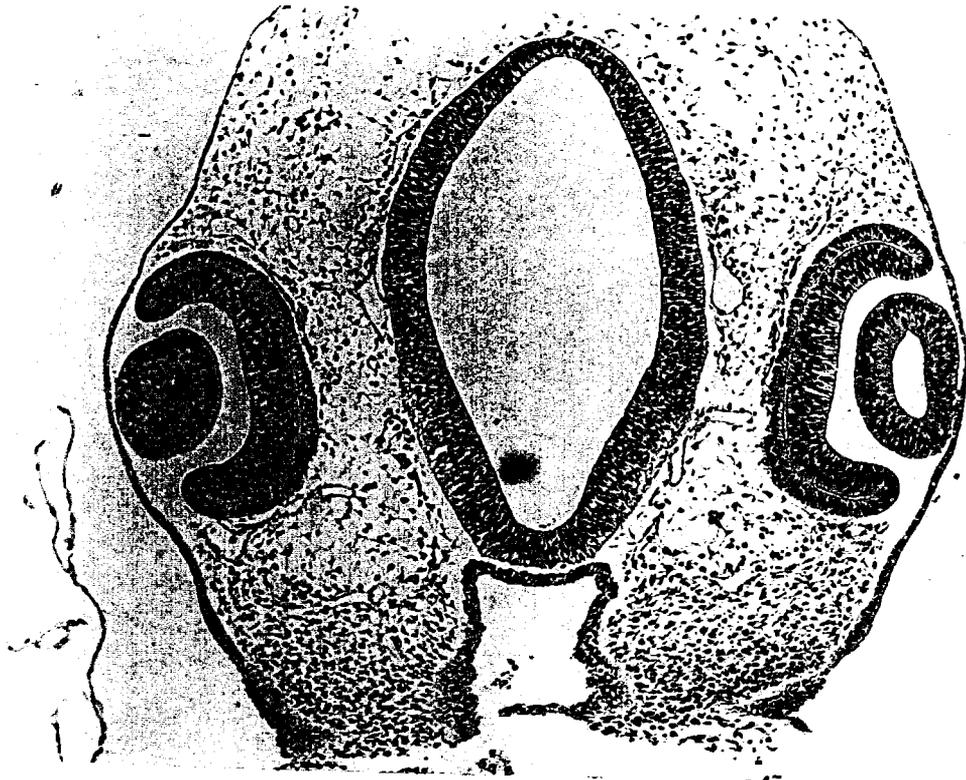


FIG. 29

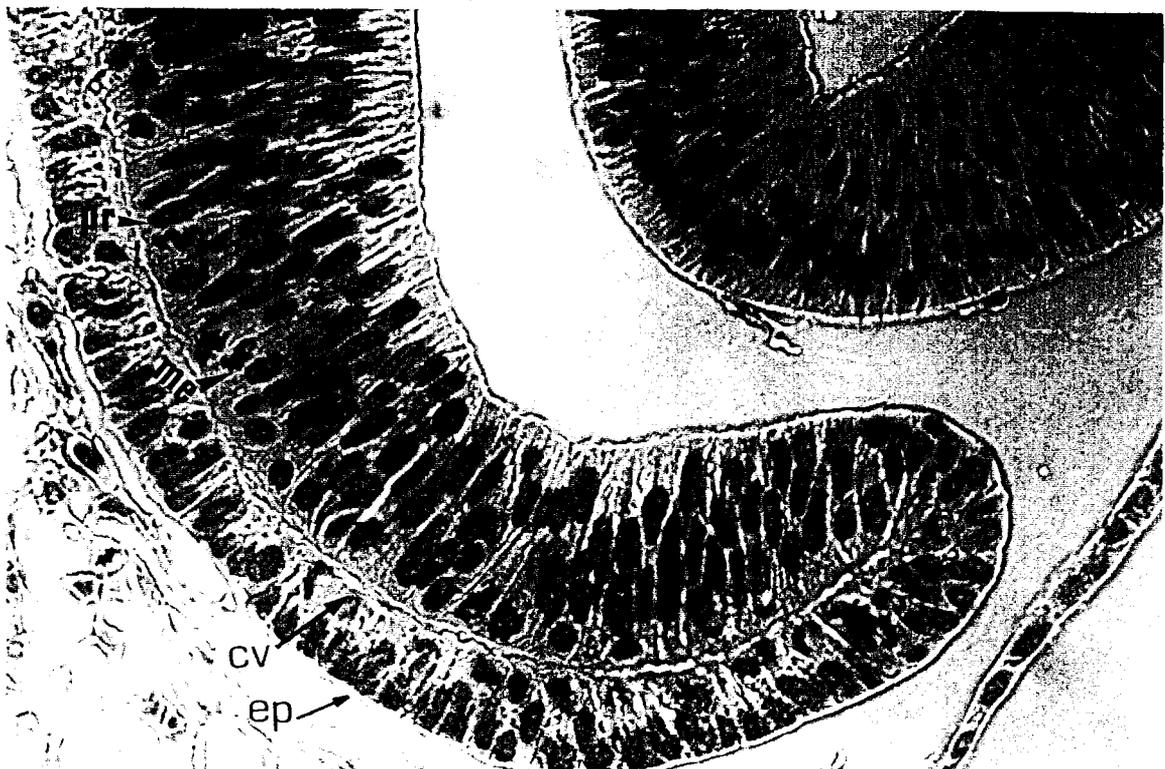


FIG. 30

Figs. 31 y 32.- Figuras de imágenes obtenidas con fotografía microscópica y pertenecientes a las zonas media e inferior del corte histológico de la figura anterior (29) y en donde se aprecian: la aceptable regularidad de su conformación y la uniformidad de los perfiles nucleares de las células -tanto en copa óptica como en el manto de un cristalino cuya cavidad central aparece ya muy reducida-. Aumentos 400 x.

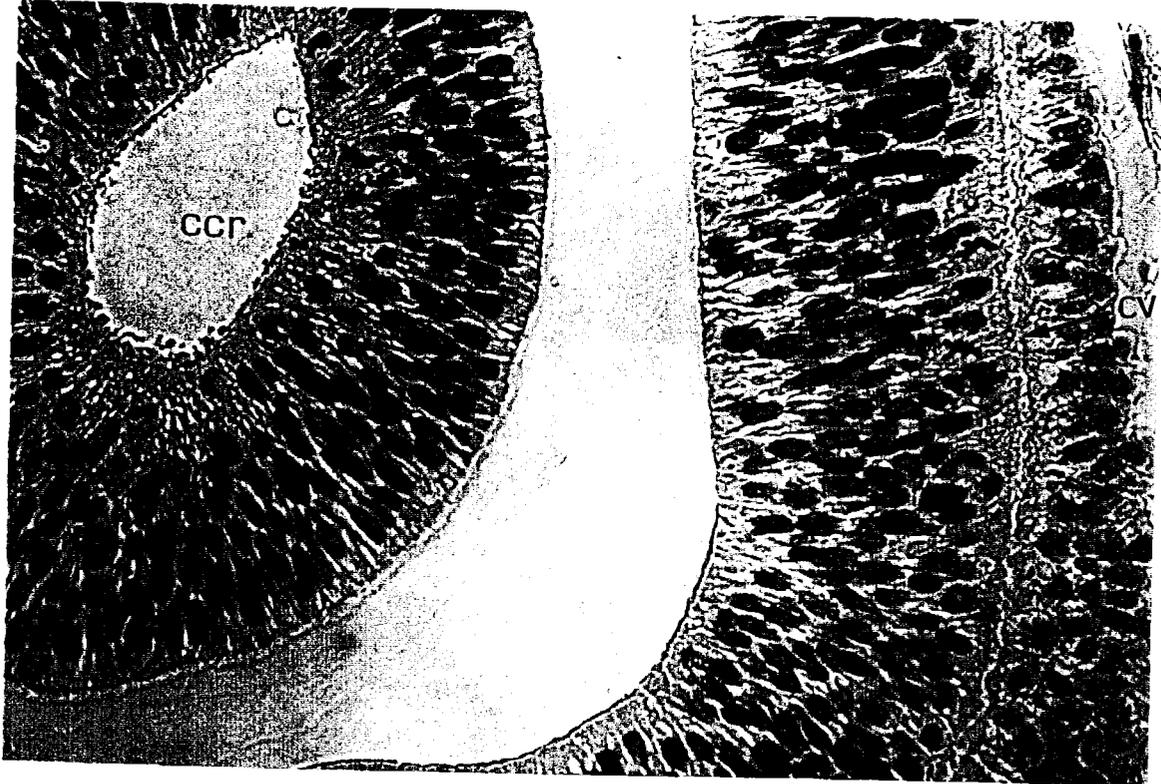


FIG.31

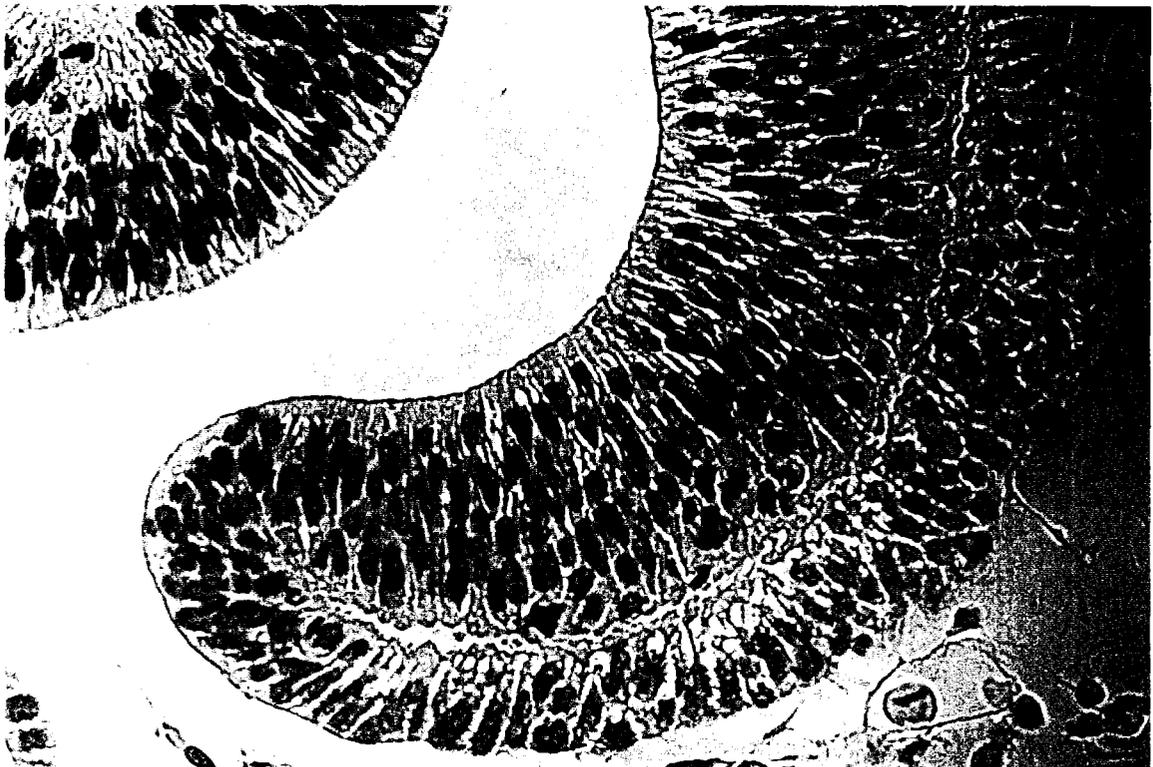


FIG.32

Fig. 33.- Microfotografía de una sección frontal posterior de un embrión tipo 16col4h. en el que podemos apreciar normalidad de la copa retiniana y cristalino así como en la inserción y conformación del tallo. Aumentos 63 x.

Fig. 34.- Imagen de una sección más posterior que la precedente y que corresponde a la zona donde la copa se incurva y queda el epitelio pigmentario como una lámina exterior que envuelve a un epitelio retiniano más denso en número de células y contenido de sus núcleos. Aumentos 160 x.

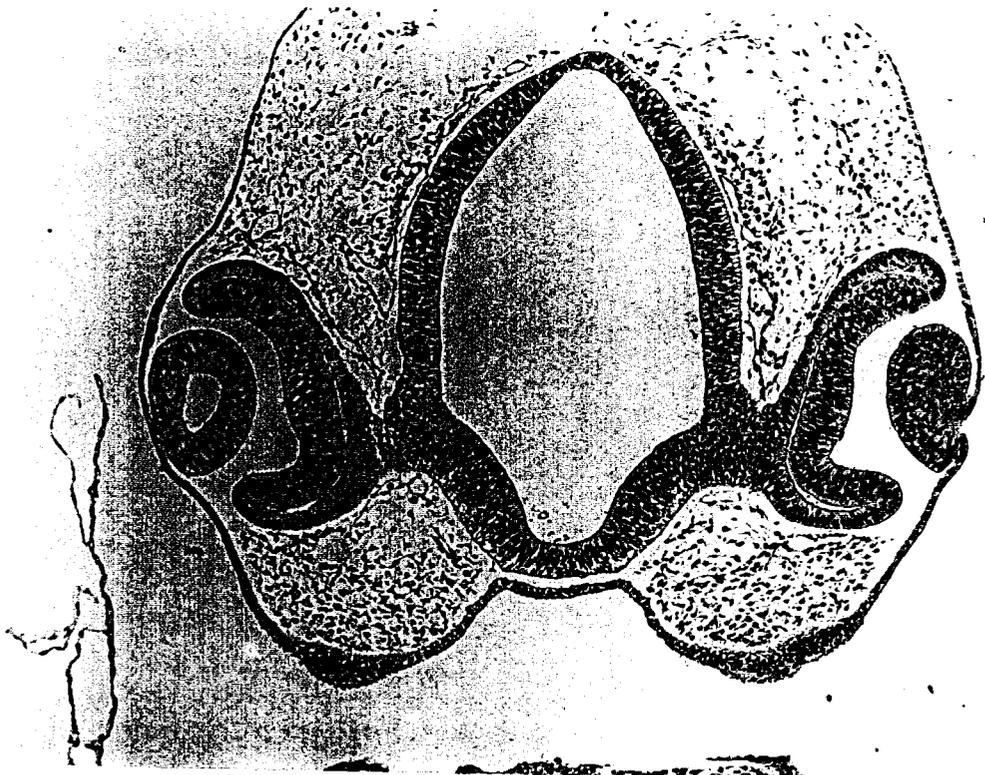


FIG.33

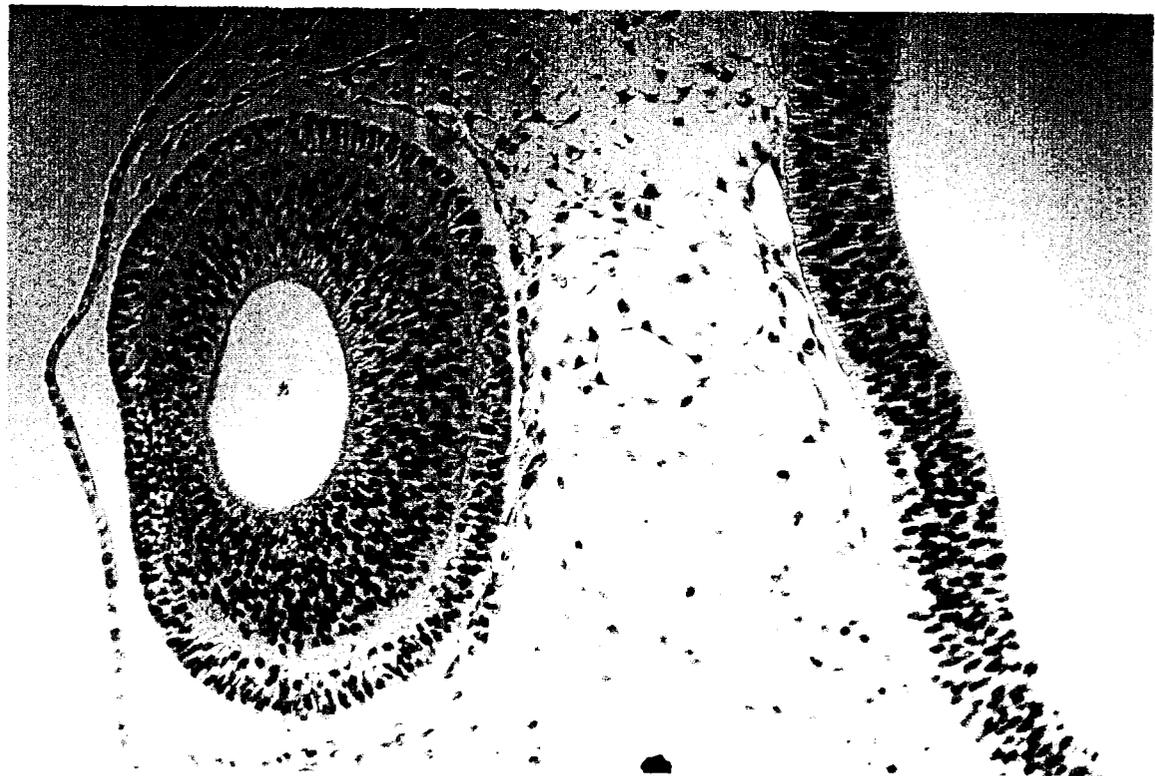


FIG.34

Figs. 35 y 36.- Secciones posteriores y frontales de embriones tipo 16col4h. en las que se distingue junto al grado de afectación metafásica una diversidad de tinción entre los núcleos ubicados en la pigmentaria y el polo retiniano que aparece rodeado por aquella. Aumentos 63 y 160 x.

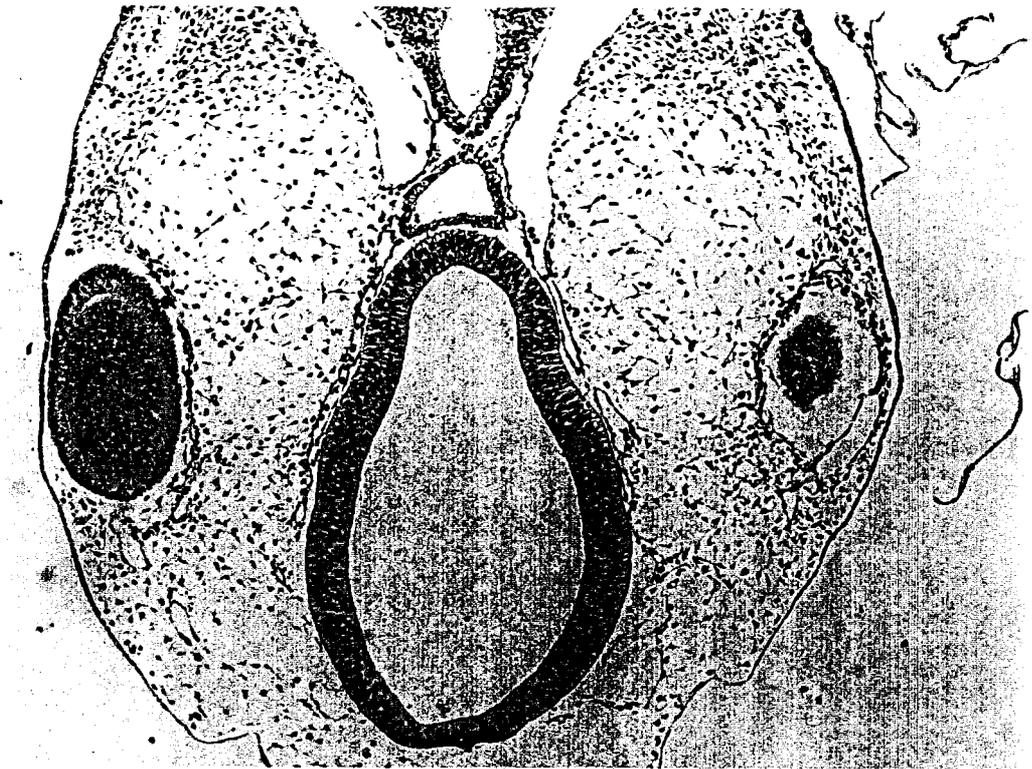


FIG.35

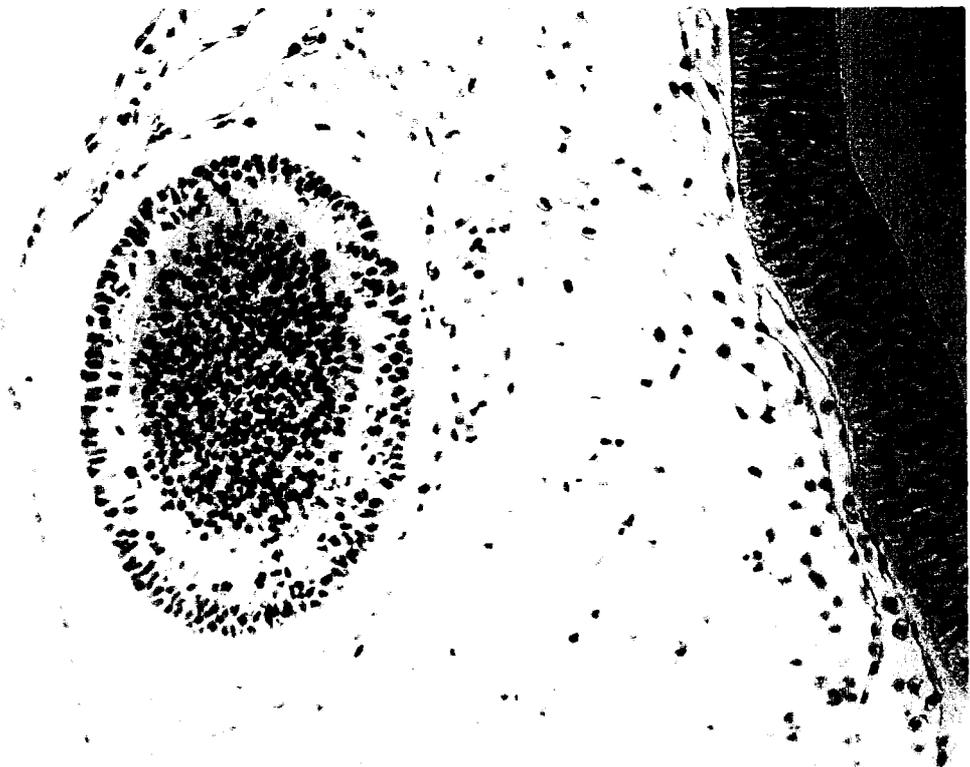


FIG.36

c) Datos obtenidos sobre: la densidad celular interfásica, la mitótica y su disposición estereológica.-

Las tablas números 13 al 15 contienen los resultados de las valoraciones morfométricas y de recuentos efectuados sobre las secciones histológicas pertenecientes a los embriones del presente tipo de experimentación. Se sigue en orden y contenido la misma pauta que en las descripciones anteriores. Es de destacar que se aprecia un número mayor de metafases que en los embriones sin tratar, a pesar de que el índice mitótico es muy ligeramente inferior; las profases dan cifras muy parecidas y las anafases telofases son casi inexistentes, todo lo cual nos está indicando que la droga ha producido cierto grado de afectación y que por lo tanto alcanzó a las células retinianas, pero que el conjunto de éstas ha ofrecido una forma de reacción diferente a la que pudimos observar tras cuatro horas de tratamiento a partir de las 48 de incubación.

El volumen total de la retina aparece aquí ligeramente inferior al de los normales, lo cual puede estar en relación con la afectación y modificaciones de grado menor que se han producido. Las interfases aparecen en menor número por unidad de volumen que en los embriones normales sin que podamos aquí, a tenor de las experiencias y valoraciones realizadas, determinar si esa variación es debida a un aumento real de los elementos recontados o a un incremento de los espacios intercelulares (¿ edema, extra o intracelular ?). Con todo y ante cualquier tipo de valoración, debe tenerse en cuenta que, si con menores volúmenes contenedores se producen menores índices y mayores diferencias con los normales o con otros parámetros, ello es expresión de las variaciones que se están produciendo y no de modificaciones extracelulares; por otro lado, el aumento de un índice mitótico o de cualquiera de sus subfases cuando simultáneamente se detecta una disminución en las interfases es expresión de que, al ser variaciones contradictorias, ha tenido lugar una tendencia a la

inversión de los porcentajes habituales del ciclo y de que, al menos la mayor parte de las variaciones detectadas son debidas a una modificación en el comportamiento celular y no básicamente a las alteraciones del espacio contenedor.

POLLOS 16COL4H

	ANTERIOR				MEDIO				POSTERIOR			
	Sin cor.		Cor. Vt		Sin cor.		Cor. Vt		Sin cor.		Cor. Vt	
S	AREA M.	25042,18		25613,43		24974,99				S		
U	VOL		400674,9		409814,9		399599,8		U VOL		403201,9	
P	INTERF	542,2212	2825,908	406,4482	2019,618	423,7712	2204,486		P INTERF		2349,182	
E	MITOSIS	46	95,95827	31,375	65,44980	42,625	88,91786		E MITOSIS		83,41277	
R	METAF.	32	66,75358	24,75	51,62972	32,625	68,05736		R METAF.		62,12514	
I	PROF	12,75	26,59713	7	14,60234	10,25	21,38200		I PROF		20,85319	
O	ANTF	0	0	0	0	0	0		O ANTF		0	
R									R			
M	AREA M.	28707,28		30665,88		32658,55			M VOL		490639,4	
E	VOL		459316,5		490654,0		522536,8		E INTERF		2179,971	
D	INTERF	404,3310	1892,160	330,9855	1582,432	591,5888	3067,611		D MITOSIS		73,50750	
I	MITOSIS	18,375	38,33116	42,75	89,17861	44,625	93,08996		I METAF.		46,57213	
O	METAF.	10,75	22,42503	26,5	55,28031	29,75	62,05997		O PROF		27,63048	
	PROF	8	16,68839	16,5	34,41981	15,25	31,81225		ANTF		0	
	ANTF	0	0	0	0	0	0					
I	AREA M.	29612,27		32299,51		25038,46			I			
N	VOL		473796,4		516792,2		400615,4		N VOL		463549,2	
F	INTERF	687,9457	3680,576	453,0886	2315,885	527,0276	2880,621		F INTERF		2957,992	
E	MITOSIS	39,5	82,39895	38,375	80,05215	57,125	119,1655		E MITOSIS		93,83937	
R	METAF.	27,125	56,58409	27,625	57,62711	38,875	81,09517		R METAF.		65,07934	
I	PROF	11,5	23,98956	9,75	20,33898	17,125	35,72359		I PROF		26,67471	
O	ANTF	0	0	1,375	2,868318	1,375	2,868318		O ANTF		1,911542	
R									R			
	TOTAL ANTERIOR			*TOTAL MEDIO*		*TOTAL POSTERIOR*						
	VOL	444418,1		472231,4		440741,0						
	INTERF	2798,568		1971,955		2716,622						
	MITOSIS	72,20418		78,19947		100,3559						
	METAF.	48,57056		54,82652		70,37953						
	PROF	22,41718		23,11229		29,62891						
	ANTF	0		0,955771		0,955771						

****TOTAL POLLO****

Corregidos

Val. medio S.D.

VOL	4072171,	285052,0
INTERF	22462,55	1797,004
MITOSIS	601,8533	42,12973
METAF.	417,0847	25,02508
PROF	18038,9	14431,12
ANTF	4,589308	0,367144

Tabla nº 13

EMBRIONES -TIPO POLLO 16COL4H

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,068656	0,165492	1,498123	0,119849	2,024265	0,161941
Met/Vol	1,540717	0,123257	0,949165	0,075933	1,403865	0,112309
Prof/Vol	0,517164	0,036201	0,563124	0,039418	0,575416	0,040279
Antf/Vol	0	0	0	0	0,041235	0,002474
Int/Vol	58,26025	4,719081	44,42901	3,598749	63,80863	3,892326
Imit	3,428962	0,274317	3,261956	0,260956	3,074854	0,245988
Imet	2,553862	0,204309	2,066676	0,165334	2,132468	0,170597
Iprof	0,857240	0,060006	1,226125	0,085828	0,874055	0,061183
Iantf	0	0	0	0	0,062635	0,003758
%met	74,47916	6,777604	63,35697	4,498345	69,35185	6,311018
%prof	25	2	37,58865	3,007092	28,42592	2,274074
%antf	0	0	0	0	2,037037	0,162962

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 16COL4H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	1,624609	0,129968	1,655873	0,132469	2,276869	0,182149
Met/Vol	1,092847	0,087427	1,160951	0,092876	1,596765	0,127741
Prof/Vol	0,504391	0,035307	0,489402	0,034258	0,672218	0,047055
Antf/Vol	0	0	0,020238	0,001214	0,021684	0,001301
Int/Vol	62,96837	5,667153	41,75614	3,758053	61,63452	5,547106
Imit	2,515147	0,201211	3,814320	0,305145	3,562540	0,285003
Imet	1,691898	0,135351	2,674262	0,213941	2,498405	0,199872
Iprof	0,780876	0,054661	1,127343	0,078914	1,051797	0,073625
Iantf	0	0	0,046619	0,002797	0,033928	0,002035
%met	67,26835	4,708784	70,11111	5,608888	70,12987	4,979220
%prof	31,04693	2,483754	29,55555	2,364444	29,52380	2,361904
%antf	0	0	1,222222	0,097777	0,952380	0,076190

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 16COL8H		
Media S.D.		

Mit/Vol	1,277332	0,102186
Met/Vol	0,886097	0,079748
Prof/Vol	0,283073	0,019815
Antf/Vol	0,110427	0,010832
Int/Vol	63,34751	5,010788
Imit	1,976534	0,158122
Imet	1,371141	0,123402
Iprof	0,438025	0,030661
Iantf	0,170874	0,016762
%met	69,37096	5,764727
%prof	22,16129	1,772903
%antf	8,645161	0,778064

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

d) Comparaciones entre los distintos datos obtenidos a partir de las situaciones experimentales y normales.-

El conjunto de la situación anteriormente descrita se puede verificar en los test que se presentan con los números 11 al 13. Se observa que entre las zonas superior (1), inferior (3) y posterior (6) es donde ocurren menores diferencias (o, si se prefiere, donde las modificaciones son más semejantes), lo que indica que son zonas de mayor expansión y más uniforme afectación por parte de la colchicina (test n° 11).

Al comparar los datos obtenidos en las zonas homólogas de los embriones tipo de tratamiento 13col4h y los 16col4h se aprecian, en todos los casos, diferencias altamente significativas a favor del tipo 13col4h en lo referente a los índices mitóticos y metafases y a favor de 16col4h en lo que a interfases se refiere (test n° 12). Los valores de las profases son muy semejantes pero también inferiores en los embriones tratados que en los normales. En lo que respecta a la comparación entre 16col4h y otros datos de los embriones normales (test n° 13) se observa que se ha producido variación, pero de mucha menor intensidad que la esperada para el tiempo de tratamiento que ha tenido lugar. Todo lo antedicho resulta indicativo de que a partir de un tratamiento realizado en la hora 60 de incubación se produce acción de la colchicina sobre la retina pero encontrando una base de influencia diferente, lo que determina el que las modificaciones sean muy distintas a las que se produjeron cuando la inyección se realizó a partir de la hora 48 de incubación.

ZONAS

	1	2	3	4	5
2	T +6,17 -* +0,99 -** +4,20 -***				
3	T +0,38 -* +2,19 -** -1,45 -***	T -5,83 -* -2,78 -** -5,57 -***			
4	T +4,69 -* +6,10 -*** -0,93 -***	T -1,60 -* +5,11 -*** -5,38 -***	T +4,29 -* +4,00 -*** +0,20 -***		
5	T +4,28 -* -2,09 -** +5,15 -***	T -1,97 -* -3,09 -*** +0,98 -***	T +3,92 -* -4,26 -*** +6,46 -***	T -0,37 -* -7,97 -*** +6,24 -***	
6	T -1,96 -* -0,41 -** -0,88 -***	T -8,00 -* -1,40 -** -5,60 -***	T -2,35 -* -3,10 -*** +0,54 -***	T -6,47 -* -6,82 -*** +0,33 -***	T -6,16 -* +1,35 -** -5,97 -***

Test nº 11 .- Comparación de medias entre las zonas constitutivas de los embriones tipo 16col4H cuyos valores de "t" corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

Relación de las zonas indicadas con cada uno de los números de catalogación:

1= Superior (horiz.) 2= Media (horiz.) 3= Inferior (horiz.)

4= Anterior (vert.) 5= Media (vert.) 6= Posterior (vert.)

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	+14,28 *
	+21,38 **
	+13,02 ***
MEDIO (horiz.)	T
	+18,46 *
	+21,38 **
	+8,20 ***
INFERIOR (horiz.)	T
	+15,31 *
	+21,79 **
	+15,34 ***

ANTERIOR (vert.)	T
	+15,88 *
	+23,22 ***
	+14,83 ***
MEDIO (vert.)	T
	+16,35 *
	+18,17 **
	+4,06 ***
POSTERIOR (vert.)	T
	+15,05 *
	+21,70 **
	+12,03 ***

Test nº 12 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 13col4H y 16col4H. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	-6,61 -*
	-1,88 -**
	-4,56 -***
MEDIO (horiz.)	T
	-8,46 *
	+1,29 -**
	-7,09 ***
INFERIOR (horiz.)	T
	-8,48 -*
	-5,10 -**
	-2,44 -***

ANTERIOR (vert.)	T
	-12,61 -*
	-9,25 **
	+2,16 -***
MEDIO (vert.)	T
	-7,10 *
	+4,56 -**
	-8,66 -***
POSTERIOR (vert.)	T
	-3,15 -*
	+0,58 -**
	-2,80 -***

Test nº 13 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 16col4H y 16-17 HH.N. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

OBSERVACIONES EN LOS EMBRIONES TIPO 16col8H.-

a) Descripción de la morfología microscópica general.-

La situación de los embriones de este tipo de tratamiento es en términos generales semejante a la encontrada en el tratamiento anterior, ofreciendo una regular conformación con signos de cierta afectación pero una organización de la estructura muy parecida a la que ofrecen los embriones normales de desarrollo superior al estadio 19 HH. Tanto la invaginación de cristalino como el cierre de la copa óptica y la obliteración ventricular dan la imagen correspondiente a estos niveles de incubación. La situación puede observarse en las distintas figuras expuestas entre los números 37 y 46.

b) Modificaciones en la citoarquitectura.-

Si bien a primera vista no se observan grandes diferencias con la constitución ofrecida por los embriones normales correspondientes a este estadio del desarrollo, sí se detectan algunas pequeñas variaciones cuando se realiza una observación detallada. Así podemos ver: un acúmulo de núcleos interfásicos a nivel del tallo (figs. n° 39 y 40), la existencia de restos proliferativos en los márgenes superior e inferior ofrecidos por la presencia de núcleos de pequeño tamaño (figs. n° 41 y 42) y las diferencias entre la positividad de reacción Feulgen entre las láminas retiniana y pigmentaria (figs. n° 43 al 46).

Figs. 37 y 38.- Microfotografías de embriones de pollo que tras 60-62 horas de incubación recibieron 1 mgr. de colchicina durante 8h. (16col8h.). La sección histológica es frontal y anterior. Como la tinción está hecha con toluidina se aprecian menos las diferencias de los núcleos de la lámina pigmentaria de los del conjunto retiniano interior. De destacar el incremento que se aprecia en el número de anafases (an). Aumentos 63 y 400 x.

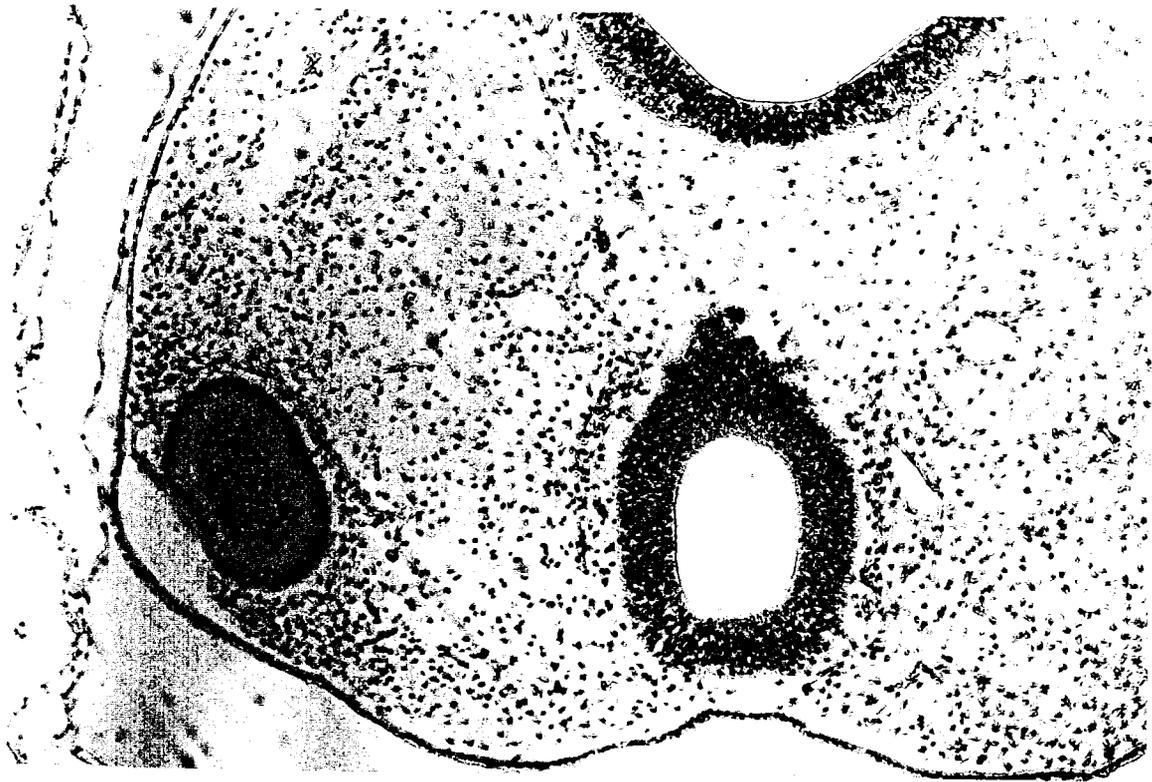


FIG.37

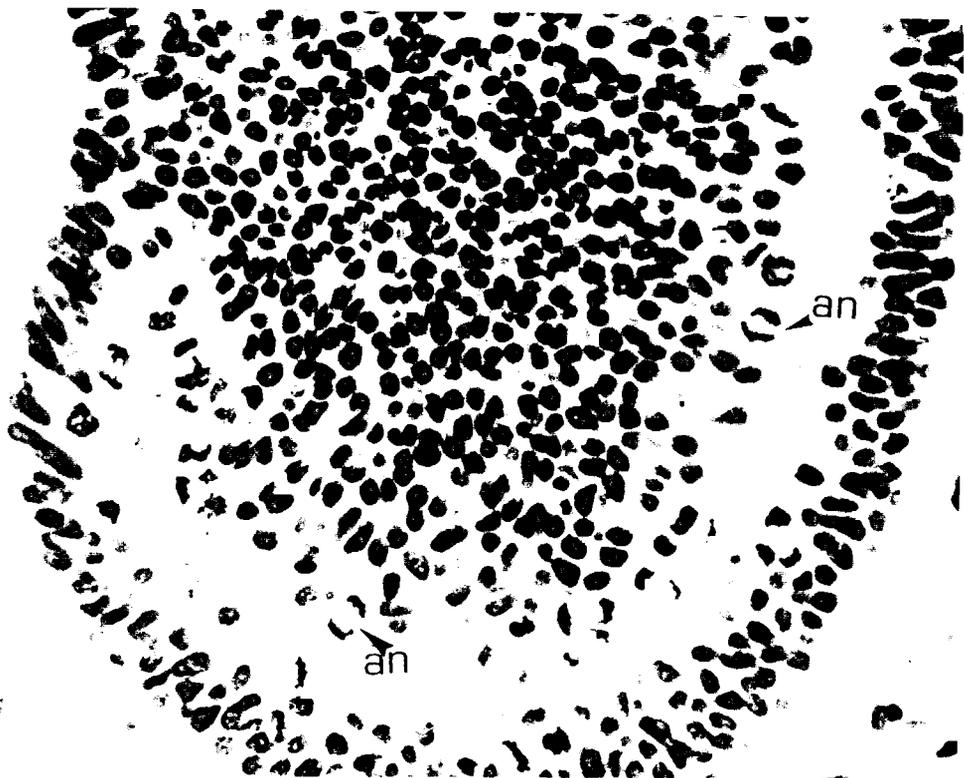


FIG.38

Figs. 39 y 40.- Sección frontal de un embrión tipo 16col8h. realizada a nivel medio (próximo anterior) que ofrece un desarrollo ordenado y análogo al de situaciones obtenidas sin tratamiento. LLama la atención el gran número de núcleos conglomerados a nivel de la unión entre la copa y el tubo neural (tallo). Aumentos 160 y 400 x.



FIG. 39



FIG. 40

Fig. 41.- Imagen de una sección análoga a la anterior pero correspondiente a una región más central. En su zona inferior se aprecian células más redondeadas y de menor tamaño. Aumentos 63 x.

Fig. 42.- Detalle de la imagen 41 en donde se aprecia más claramente el carácter de los elementos celulares constitutivos de la zona inferior. Aumentos 400 x.

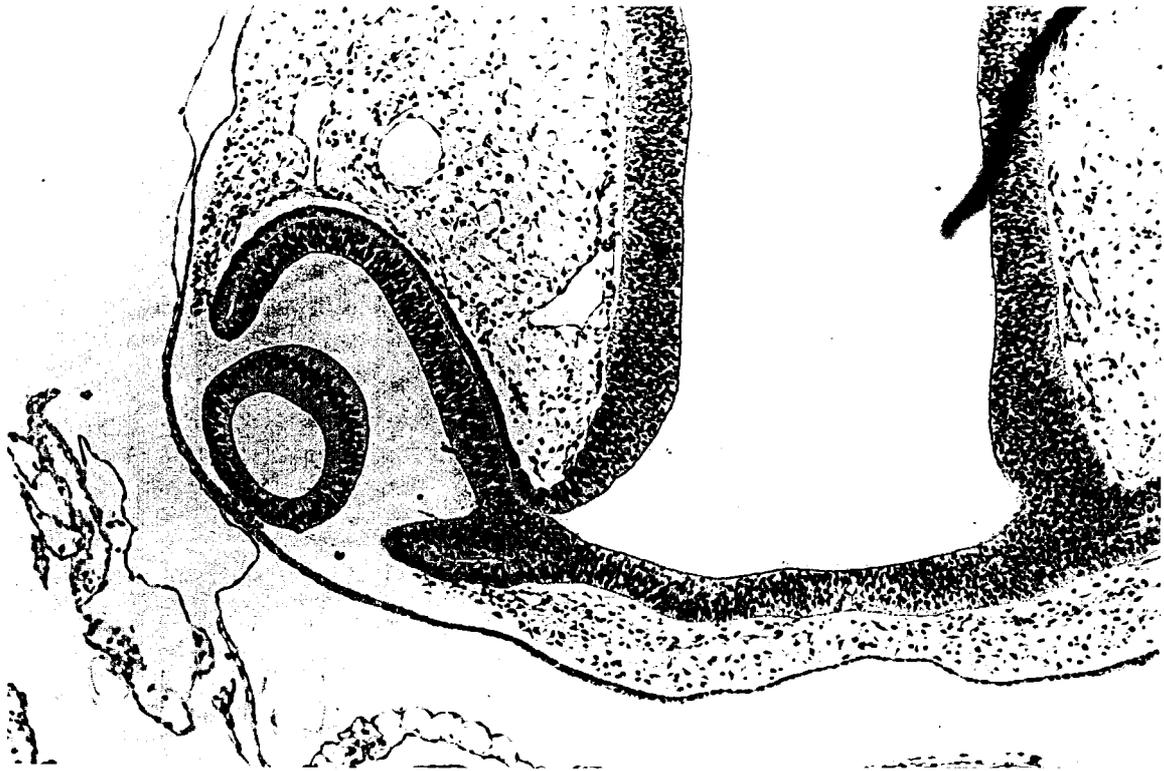


FIG.41

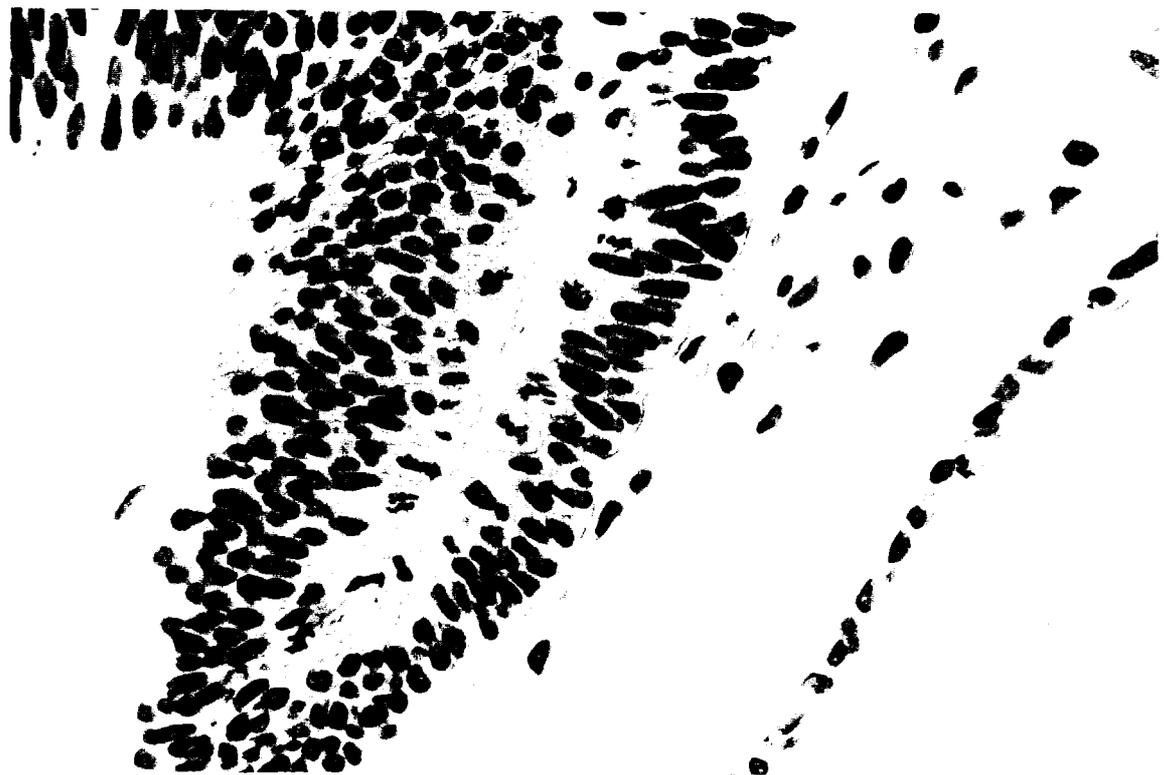


FIG.42

Figs. 43 y 44.- Imágenes aumentadas de las zonas central y superior de la figura n° 41 y en donde se distingue el carácter de sus núcleos celulares tanto en epitelio pigmentario como en lámina retiniana. La variación en tamaño y densidad expresan un diferente momento de ciclo. Aumentos 400x.

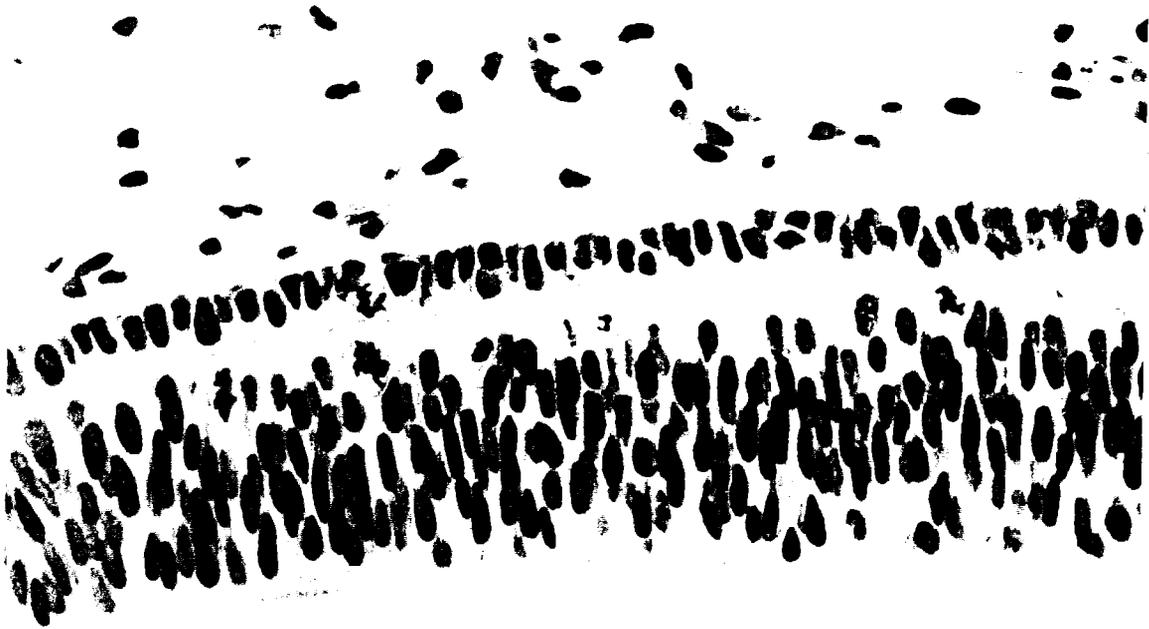


FIG.43

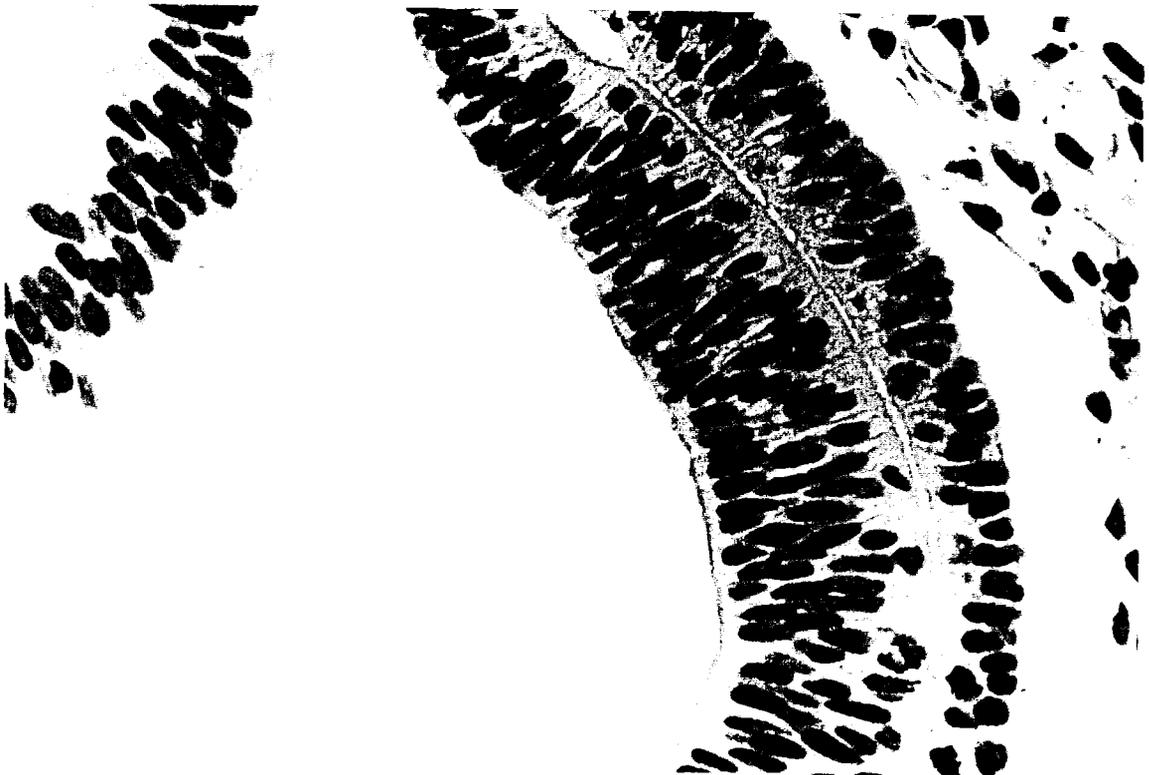


FIG.44

Fig. 45.- Sección frontal posterior teñida con toluidina de un embrión tipo 16col8h. en donde se aprecia la similitud de imagen; al compararla con la n° 37 nos expresa la regularidad que ofrece la copa en estos estadios (y ello a pesar del tratamiento). Aumentos 63 x.

Fig. 46.- Polo posterior de un embrión como el de la figura anterior. Destaca la regularidad y densidad celular así como la casi ausencia de figuras mitóticas. En tamaño y densidad nuclear se distinguen -al menos- dos tipos. Aumentos 400 x.

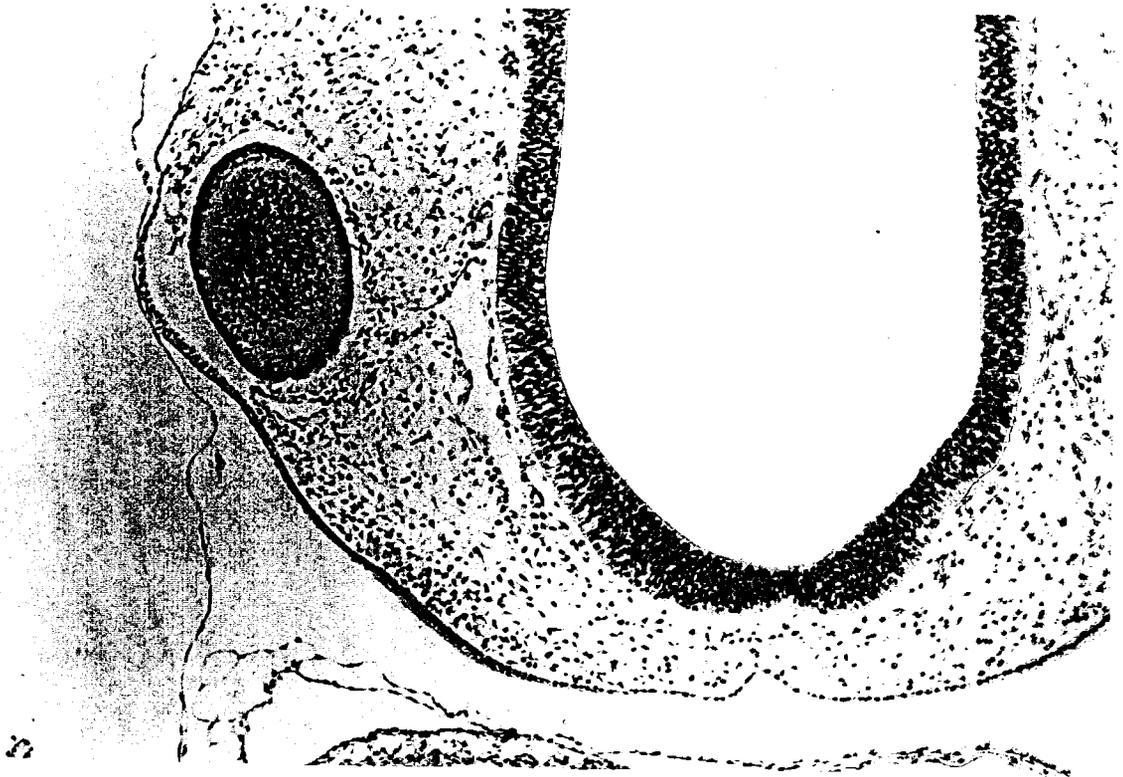


FIG. 45



FIG. 46

c) Datos obtenidos en la densidad celular: interfásica, mitótica y en sus disposiciones estereológicas.-

Los valores encontrados al verificar los recuentos y morfometría en los distintos sectores y zonas de estos embriones quedan recogidos en las tablas números 16 al 18. Aquí podemos observar lo anteriormente expresado al hablar de la descripción general y la situación en relación con el tratamiento de 4 horas. Tanto el tamaño global de la retina como su número de interfases se presentan con valores inferiores al de los embriones normales y, análogamente a lo también encontrado con anterioridad, las metafases son más abundantes aunque de manera poco intensa.

En relación con lo anteriormente descrito y su análoga repetición de comportamiento, entre los hallazgos en los tipos de tratamiento 16col4h y 16col8h hay que hacer notar que, a pesar de ser tan parecidos, se detecta una diferencia global consistente en que las respectivas divergencias con los embriones normales propias de su estado de desarrollo son algo más acusadas en este estadio del tipo 16col8h salvo en lo que a metafases se refiere, lo cual lleva a pensar en que el mayor tiempo de tratamiento ha ejercido algún tipo de influencia, pero sobre todo en lo referente al comportamiento de las células más diferenciadas o interfases de tipo más maduro.

POLLOS 16COL8H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR		Cor. Vt
	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	Sin cor.	Cor. Vt	
S	AREA M.	94719,88		99909,32		86502,19	S
U	VOL		2273277,		2397823,		U VOL 2248151,
P	INTERF	1783,713	15741,54	1690,461	13579,81	1357,570	P INTERF 13567,49
E	MITOSIS	122,496	383,2990	97,152	303,9958	98,816	E MITOSIS 332,0495
R	METAF.	90,496	283,1687	56,576	177,0305	70,656	R METAF. 227,0162
I	PROF	25,728	80,50482	31,616	98,92881	17,408	I PROF 77,94089
O	ANTF	6,4	20,02607	9,344	29,23807	11,008	O ANTF 27,89323
R							R
M	AREA M.	84303,14		86610,04		96628,95	M VOL 2139480,
E	VOL		2023275,		2078641,		E INTERF 12397,30
D	INTERF	1284,171	10662,18	1294,907	11137,78	1908,354	D MITOSIS 213,6701
I	MITOSIS	83,328	260,7395	49,152	153,8002	72,448	I METAF. 154,9475
O	METAF.	66,176	207,0696	32,256	100,9314	50,176	O PROF 41,77311
	PROF	12,288	38,45006	11,776	36,84797	16	ANTF 17,75023
	ANTF	5,248	16,42138	5,376	16,82190	6,4	
I	AREA M.	85447,11		87993,00		87918,68	I
N	VOL		2050730,		2111832,		N VOL 2090034,
F	INTERF	1934,188	16876,50	1205,507	9568,152	2070,467	F INTERF 15071,65
E	MITOSIS	98,944	309,6031	46,976	146,9913	124,288	E MITOSIS 281,7349
R	METAF.	68,48	214,2790	27,776	86,91316	87,936	R METAF. 192,0495
I	PROF	25,216	78,90273	13,056	40,85319	22,784	I PROF 63,66063
O	ANTF	5,248	16,42138	6,784	21,22764	12,8	O ANTF 25,89132
R							R
	TOTAL ANTERIOR			*TOTAL MEDIO*		*TOTAL POSTERIOR*	
	VOL	2114914,		2195220,		2167531,	
	INTERF	14421,69		11424,58		15190,17	
	MITOSIS	317,7693		201,5252		308,1601	
	METAF.	234,7569		121,5824		217,6739	
	PROF	65,92945		58,85605		58,58913	
	ANTF	17,61677		22,42135		31,49666	

****TOTAL POLLO****

Corregidos

Val. medio S.D.

VOL	19425226	1437466,
INTERF	123066,2	11605,14
MITOSIS	1938,668	143,0737
METAF.	1344,873	113,2383
PROF	429,6338	32,22254
ANTF	167,6009	15,83828

Tabla nº 16

EMBRIONES -TIPO POLLO 16COL8H

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	1,476915	0,118153	0,998651	0,079892	1,347924	0,107833
Met/Vol	1,009739	0,090876	0,724193	0,065177	0,918836	0,082695
Prof/Vol	0,346671	0,024267	0,195239	0,013666	0,304576	0,021320
Antf/Vol	0,124065	0,011289	0,082961	0,008055	0,123873	0,011037
Int/Vol	60,34655	5,491536	57,94249	4,113917	72,10840	6,561864
Imit	2,388923	0,191113	1,694318	0,135545	1,835001	0,146800
Imet	1,633263	0,146993	1,228672	0,110580	1,250860	0,112577
Iprof	0,560744	0,039252	0,331244	0,023187	0,414635	0,029024
Iantf	0,200677	0,018261	0,142973	0,014025	0,168635	0,015128
%met	68,36816	5,537821	72,51717	5,873891	68,16674	4,839838
%prof	23,47266	1,877813	19,55028	1,564022	22,59592	1,807674
%antf	8,400321	0,756028	8,307307	0,747657	9,189957	0,827096

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 16COL8H

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	1,502440	0,120195	0,917972	0,073437	1,421639	0,113731
Met/Vol	1,109950	0,099895	0,553823	0,049844	1,004198	0,090377
Prof/Vol	0,311720	0,021820	0,268096	0,018766	0,270290	0,018920
Antf/Vol	0,083293	0,007421	0,102132	0,010019	0,145303	0,012946
Int/Vol	68,18702	5,325406	52,04039	3,856193	70,07704	6,664327
Imit	2,155907	0,172472	1,733384	0,138670	1,988343	0,159067
Imet	1,592709	0,143343	1,045770	0,094119	1,404498	0,126404
Iprof	0,447298	0,031310	0,506240	0,035436	0,378034	0,026462
Iantf	0,119521	0,010649	0,192853	0,018918	0,203226	0,019936
%met	73,87652	6,434645	60,33112	5,490132	70,63663	6,081814
%prof	20,74758	1,659806	29,20529	2,336423	19,01255	1,521004
%antf	5,543889	0,498950	11,12582	1,001324	10,22087	0,919878

Unidad volumen 10000 micras cúbicas



TOTAL EMBR -TIPO POLLO 16COL8H		
	Media	S.D.

Mit/Vol	1,277332	0,102186
Met/Vol	0,886097	0,079748
Prof/Vol	0,283073	0,019815
Antf/Vol	0,110427	0,010832
Int/Vol	63,34751	5,010788
Imit	1,976534	0,158122
Imet	1,371141	0,123402
Iprof	0,438025	0,030661
Iantf	0,170874	0,016762
%met	69,37096	5,764727
%prof	22,16129	1,772903
%antf	8,645161	0,778064

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

d) Comparaciones entre los valores ofrecidos por las distintas situaciones experimentales y normales.-

En los test números 14 a 19 se recogen los datos para la experiencia tipo 16col8h y las diversas comparaciones con el resto de situaciones que nos ha parecido resultaba de interés comprobar.

En el test n° 14 aparecen los resultados de comparar entre sí las diferentes zonas constitutivas del propio tipo de experiencia 16col8h. Dado lo avanzado del desarrollo y la tendencia a unificación que ya sabemos va teniendo lugar con el mismo, apreciamos cómo entre muchas zonas ya no existen diferencias y las que tienen lugar se dan con las regiones más extremas o donde todavía existe alguna intensidad de fenómeno proliferativo.

El test n° 15 ofrece las diferencias con la situación de afectación entre estos embriones 16col8h y los del tipo 16col4h. La significación es a favor de los de 4 horas de tratamiento en lo que a metafases se refiere, lo cual es lógico pues es conocido que, conforme se llega al estadio 19 HH., el número de divisiones celulares decae considerablemente. El número de interfases aumenta, sin embargo, como corresponde a un material que además de ser afectado en menor grado va contando paulatinamente con células en G₀ que están aumentando en su número.

En el test n° 16 encontramos los resultados de comparar las zonas homólogas de esta experiencia con la de embriones sin tratar. Todas las comparaciones han resultado significativas a favor de los normales, menos en su número de metafases, coincidiendo con ello en lo que ya anteriormente habíamos relatado.

Al comparar los valores obtenidos tras 8 horas de tratamiento a partir de las 48 y 60 de incubación se ve claramente, como presenta el test n° 17, que entre sus zonas homólogas existe un alto coeficiente de significación que es superior, en cada caso, para los 16col8h en lo referente a los valores de: interfases, profases y anafases-telofases, y lo contrario ocurre en lo que hace referencia a las metafases. Con todo ello, se nos está poniendo de manifiesto el diferente grado de afectación que ha tenido lugar como consecuencia del distinto momento en que se inyectó la colchicina.

Finalmente las tablas números 18 y 19 ofrecen respectivamente las diferencias entre los embriones tipo 16col4h y tipo 16col8h con los valores de sus situaciones sin tratamiento. Su obtención no tuvo otra intención que la de la constatación de las modificaciones que, por otra parte, eran de esperar sin lugar a dudas.

ZONAS

1

2

3

4

5

2	T +7,52 -* +6,55 -** +0,63 -***				
3	T +1,81 -* +5,06 -** -2,79 -***	T -6,10 -* -1,58 -** -3,42 -***			
4	T -0,31 -* +1,94 -** +1,92 -***	T -8,07 -* -4,71 -** -2,56 -***	T -2,12 -* -3,17 -** -0,88 -***		
5	T +9,00 -* +3,56 -** +2,33 -***	T +1,60 -* -0,41 -** +1,69 -***	T +7,51 -* +1,13 -** +5,00 -***	T +9,38 -* +4,28 -** +4,21 -***	
6	T +0,76 -* +3,52 -** -2,35 -***	T -7,25 -* -3,15 -** -2,98 -***	T -1,04 -* -1,58 -** +0,45 -***	T +1,08 -* +1,59 -** -0,43 -***	T -8,46 -* -2,70 -** -4,68 -***

Test nº 14 .- Comparación de medias entre las zonas constitutivas de los embriones tipo 16col8H cuyos valores de "t" corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

Relación de las zonas indicadas con cada uno de los números de catalogación:

1= Superior (horiz.) 2= Media (horiz.) 3= Inferior (horiz.)

4= Anterior (vert.) 5= Media (vert.) 6= Posterior (vert.)

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	-6,52 -*
	-6,96 -**
	+0,55 -***
MEDIO (horiz.)	T
	-7,82 -*
	-11,95 -**
	+4,14 -***
INFERIOR (horiz.)	T
	-7,81 -*
	-9,87 -**
	+2,17 -***

ANTERIOR (vert.)	T
	-1,58 -*
	3,05 -**
	+1,26 -***
MEDIO (vert.)	T
	10,94 -*
	13,89 -**
	+3,45 -***
POSTERIOR (vert.)	T
	8,87 -*
	10,77 -**
	+2,02 -***

Test nº 15 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 16col8H y 16col4HH. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

**COMPARACION DE ZONAS HOMOLOGAS PERTENECIENTES
A LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

SUPERIOR (horiz.)	T
	+9,76 *
	-0,76 -**
	+8,21 -***
MEDIO (horiz.)	T
	+11,84 *
	+9,50 -**
	+3,75 -***
INFERIOR (horiz.)	T
	+12,98 *
	+7,70 -**
	+3,50 -***

ANTERIOR (vert.)	T
	+8,70 *
	+6,11 -**
	+1,81 -***
MEDIO (vert.)	T
	+13,49 -**
	+6,70 -**
	+7,79 -***
POSTERIOR (vert.)	T
	+12,26 *
	+0,09 -**
	+2,96 -***

Test nº 16 .- Comparación de medias entre los valores de las zonas homólogas que se indican para los embriones tipo 16col8H y 19-20 HH.N. Los valores de "t" contenidos en los recuadros corresponden a los parámetros: Densidad de mitosis en volumen -Mit/Vol- (*); Índice Mitótico -Imit- (**); Densidad de interfases en volumen -Int/Vol- (***). Las diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95% aparecen sombreadas en el cuadro.

**COMPARACION DE VALORES TOTALES DE INDICE
ENTRE LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

Mit/Vol	T 23,08
Met/Vol	T 24,57
Prof/Vol	T +29,52
Antf/Vol	T +22,36
Int/Vol	T +13,88

Test nº 17 .- Comparaciones entre los embriones tipo 16col8H y 13col8H de los valores totales que se obtuvieron en las retinas correspondientes para los parámetros que se indican:

Mit/Vol (mitosis en volumen total); Met/Vol (metafases en volumen); Prof/Vol (profases en volumen); Antf/Vol (anafases-telofases en volumen); Int/Vol (interfases en volumen).

Los valores de "t" con diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95 % aparecen sombreados en el cuadro.

**COMPARACION DE VALORES TOTALES DE INDICE
ENTRE LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

Mit/Vol	T 7,50
Met/Vol	T 4,21
Prof/Vol	T 10,65
Antf/Vol	T 77,64
Int/Vol	T 4,57

Test nº 18 .- Comparaciones entre los embriones tipo 16col4H y 16-17HHLN de los valores totales que se obtuvieron en las retinas correspondientes para los parámetros que se indican: Mit/Vol (mitosis en volumen total); Met/Vol (metafases en volumen); Prof/Vol (profases en volumen); Antf/Vol (anafases-telofases en volumen); Int/Vol (interfases en volumen). Los valores de "t" con diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95 % aparecen sombreados en el cuadro.

**COMPARACION DE VALORES TOTALES DE INDICE
ENTRE LOS EMBRIONES QUE SE INDICAN**

Mit/Vol	T 12,48
Met/Vol	T -0,38
Prof/Vol	T 20,17
Antf/Vol	T 75,25
Int/Vol	T 4,54

Test nº 19 .- Comparaciones entre los embriones tipo 16col8H y 19-20HH.N de los valores totales que se obtuvieron en las retinas correspondientes para los parámetros que se indican: Mit/Vol (mitosis en volumen total); Met/Vol (metafases en volumen); Prof/Vol (profases en volumen); Antf/Vol (anafases-telofases en volumen); Int/Vol (interfases en volumen). Los valores de "t" con diferencia significativa para un intervalo de confianza del 95 % aparecen sombreados en el cuadro.

RESUMEN DE LOS VALORES EN EMBRIONES SIN TRATAR.-

Con el fin de poder recordar y realizar las comparaciones correspondientes y para todas las aclaraciones y comprobaciones que pudieran querer realizarse, ofrecemos a continuación las tablas, test de comparación y figuras obtenidas a partir de embriones que se incubaron sin tratamiento alguno y para unos tiempos que se correspondían con los grados de desarrollo: 13-14 HH, 16-17 HH y 19-20 HH.

Las figuras números 47 al 50 ofrecen imágenes histológicas con el fin de poder recordar: la disposición de los perfiles celulares, tanto en interfases como en mitosis, de observar la normalidad de desarrollo en retina y cristalino y de apreciar la disposición de las células en el espacio.

Las tablas números 19 a 27 presentan, con el mismo tipo de estructura y significado que en los conjuntos anteriormente relatados, los valores obtenidos en sectores y zonas así como los de los índices que estamos considerando para los embriones tipo 13-14 HH. N, 16-17 HH.N y los 19-20 HH. N. Estos valores son los que en cada caso han sido empleados para las comparaciones que se han relatado en los apartados anteriores.

Figs. 47 y 48.- Imágenes demostrativas del aspecto regular normal del desarrollo de un embrión que se fijó a las 60-62 horas de incubación sin haber recibido tratamiento alguno. Los núcleos celulares muestran diversidad de constitución y tamaño según se trate de retina o coroides y en relación con el lugar que cada núcleo ocupa dentro del espesor epitelial. Se aprecia el reducido número de figuras de división celular. Aumentos 160 y 400 x.



FIG. 47

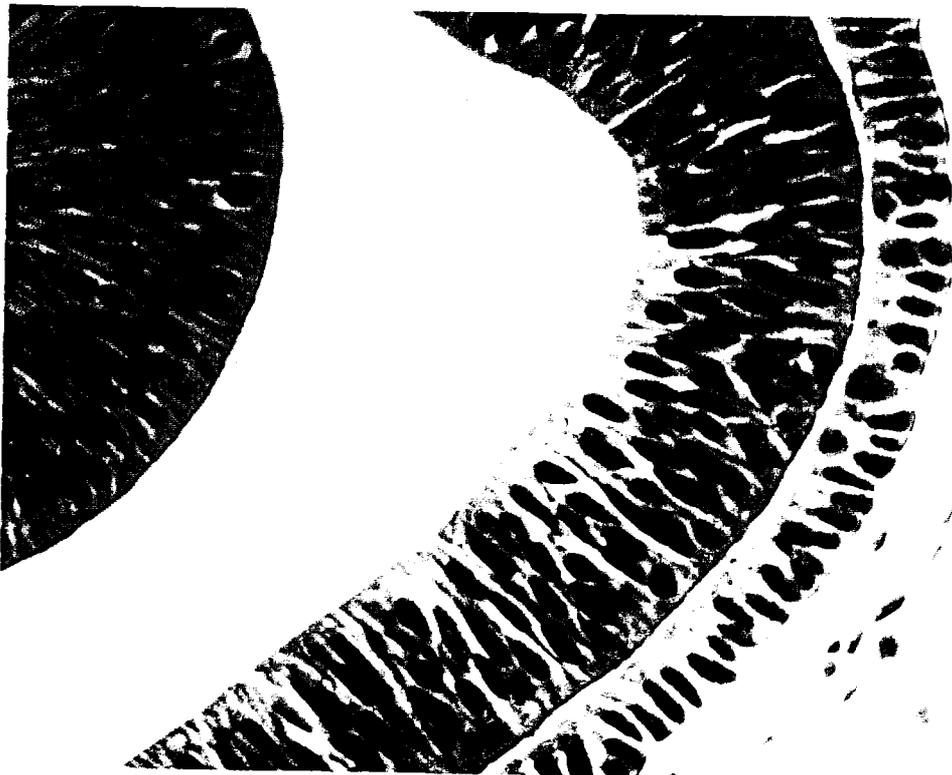


FIG. 48

Figs. 49 y 50.- Figuras de embrión de pollo correspondiente a un grado de desarrollo 19-20 HH. conseguido sin tratamiento alguno. En este caso se trata de secciones horizontales y podemos apreciar cómo los núcleos celulares ofrecen imágenes semejantes a las que se obtienen en secciones frontales lo que indica la ausencia de sesgo en la interpretación por causa de la anisotropía. Aumentos 160 y 400 x.



FIG.49

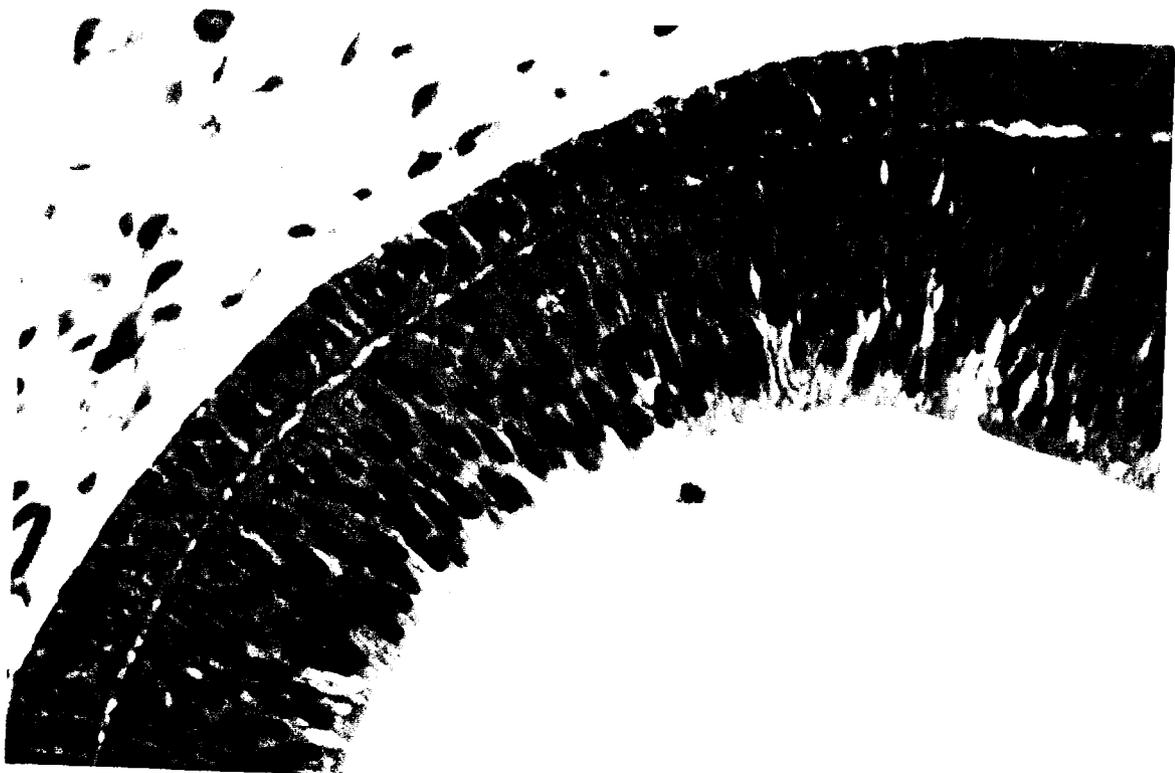


FIG.50

EMBRIONES -TIPO POLLO 13-14N HH

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,845684	0,227654	1,817223	0,145377	1,617577	0,129406
Met/Vol	0,700620	0,056049	0,676322	0,054105	0,590859	0,047268
Prof/Vol	1,373399	0,096137	0,790930	0,055365	0,719022	0,050331
Antf/Vol	0,771664	0,030866	0,349970	0,013998	0,307695	0,012307
Int/Vol	52,34581	6,281498	48,03443	5,764131	46,68169	5,601803
Imit	5,436316	0,434905	3,783169	0,302653	3,465121	0,277209
Imet	1,338445	0,107075	1,407995	0,112639	1,265719	0,101257
Iprof	2,623704	0,183659	1,646590	0,115261	1,540265	0,107818
Iantf	1,474166	0,058966	0,728583	0,029143	0,659135	0,026365
%met	24,62045	2,954454	37,21734	4,466081	36,52743	4,383291
%prof	48,26254	3,861003	43,52410	3,481928	44,45055	3,556044
%antf	27,11700	2,169360	19,25854	1,540683	19,02201	1,521761

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 13-14N HH

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	1,425075	0,114006	1,691101	0,135288	2,964375	0,237150
Met/Vol	0,508884	0,040710	0,520640	0,041651	0,968844	0,077507
Prof/Vol	0,675150	0,047260	0,668221	0,046775	1,423106	0,099617
Antf/Vol	0,241040	0,009641	0,502239	0,020089	0,572425	0,022897
Int/Vol	41,45223	4,974268	44,49770	5,339724	61,30100	7,356120
Imit	3,437872	0,275029	3,800425	0,304034	4,835770	0,386861
Imet	1,227641	0,098211	1,170039	0,093603	1,580470	0,126437
Iprof	1,628742	0,114011	1,501698	0,105118	2,321506	0,162505
Iantf	0,581489	0,023259	1,128687	0,045147	0,933793	0,037351
%met	35,70932	4,285119	30,78706	3,694447	32,68290	3,921949
%prof	47,37645	3,790116	39,51396	3,161117	48,00695	3,840556
%antf	16,91421	1,353137	29,69896	2,375917	19,31013	1,544810

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 13-14N		
	Media	S.D.

Mit/Vol	1,988271	0,159061
Met/Vol	0,653613	0,052289
Prof/Vol	0,901439	0,063100
Antf/Vol	0,433218	0,017328
Int/Vol	48,58059	5,829671
Imit	4,092727	0,327418
Imet	1,345420	0,107633
Iprof	1,855554	0,129888
Iantf	0,891751	0,035670
%met	32,87345	3,944814
%prof	45,33785	3,627028
%antf	21,78869	1,743095

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES-TIPO POLLO 16-17N HH

		ANTERIOR	MEDIO	POSTERIOR		
		Cor. Vt	Cor. Vt	Cor. Vt		Cor. Vt
S	AREA M.	10000	10000	10000	S	
U	VOL	449000	419000	246000	U VOL	371184,8
P	INTERF	3267,822	3242,222	1957,422	P INTERF	2821,500
E	MITOSIS	141,435	105,169	79,704	E MITOSIS	108,7312
R	METAF.	53,431	38,967	30,75	R METAF.	41,03496
I	PROF	49,39	29,749	24,354	I PROF	34,48559
O	ANTF	38,614	36,453	24,6	O ANTF	33,21070
R					R	
M	AREA M.	10000	10000	10000	M VOL	690390,4
E	VOL	673000	477000	922000	E INTERF	4652,796
D	INTERF	4697,54	2875,356	6390,382	D MITOSIS	147,9138
I	MITOSIS	146,041	83,952	213,904	I METAF.	60,52114
O	METAF.	57,878	47,223	76,526	O PROF	50,07546
	PROF	54,513	23,85	71,916	ANTF	37,31726
	ANTF	33,65	12,879	65,462		
I	AREA M.	10000	10000	10000	I	
N	VOL	388000	503000	195000	N VOL	361855,2
F	INTERF	2821,924	3630,151	1537,965	F INTERF	2662,414
E	MITOSIS	129,204	122,732	62,01	E MITOSIS	104,6120
R	METAF.	71,392	52,815	26,52	R METAF.	50,22474
I	PROF	34,92	41,749	18,915	I PROF	31,85018
O	ANTF	22,892	28,168	16,575	O ANTF	22,53710
R					R	
	TOTAL ANTERIOR		*TOTAL MEDIO*	*TOTAL POSTER		
	VOL	503132	466146,8	454151,6		
	INTERF	3594,503	3248,105	3294,102		
	MITOSIS	138,8447	103,9146	118,4978		
	METAF.	60,87901	46,31878	44,58305		
	PROF	46,25813	31,77154	38,38156		
	ANTF	31,70756	25,82429	35,53322		

****TOTAL POLLO****
 Corregidos
 Val. medi S.D.

VOL	4270291, 298920,3
INTERF	30410,13 27369,12
MITOSIS	1083,771 87,78549
METAF.	455,3425 3,642740
PROF	349,2337 31,43103
ANTF	279,1952 33,50342

EMBRIONES -TIPO POLLO 16-17N HH

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,929156	0,234332	2,142360	0,171388	2,890847	0,231267
Met/Vol	1,105457	0,088436	0,876578	0,070126	1,387909	0,111032
Prof/Vol	0,929021	0,065031	0,725284	0,050769	0,880147	0,061610
Antf/Vol	0,894676	0,035787	0,540497	0,021619	0,622790	0,024911
Int/Vol	76,00956	9,121148	67,39033	8,086840	73,57311	8,828773
Imit	3,710670	0,296853	3,081082	0,246486	3,780666	0,302453
Imet	1,400399	0,112031	1,260670	0,100853	1,815116	0,145209
Iprof	1,176889	0,082382	1,043084	0,073015	1,151061	0,080574
Iantf	1,133381	0,045335	0,777327	0,031093	0,814488	0,032579
%met	37,73980	4,528776	40,91647	4,909976	48,01048	5,761258
%prof	31,71635	2,537308	33,85447	2,708358	30,44600	2,435680
%antf	30,54384	2,443507	25,22905	2,018324	21,54351	1,723481

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 16-17N HH

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,759470	0,220757	2,229113	0,178329	2,609082	0,208726
Met/Vol	1,209940	0,096795	0,993602	0,079488	0,981628	0,078530
Prof/Vol	0,919357	0,064355	0,681543	0,047708	0,845084	0,059155
Antf/Vol	0,630172	0,025206	0,553967	0,022158	0,782369	0,031294
Int/Vol	71,43898	8,572677	69,67640	8,361168	72,52948	8,703538
Imit	3,719040	0,297523	3,100059	0,248004	3,472361	0,277788
Imet	1,630681	0,130454	1,381816	0,110545	1,306424	0,104513
Iprof	1,239052	0,086733	0,947832	0,066348	1,124701	0,078729
Iantf	0,849306	0,033972	0,770409	0,030816	1,041235	0,041649
%met	43,84683	5,261620	44,57388	5,348866	37,62351	4,514822
%prof	33,31645	2,665316	30,57466	2,445972	32,39009	2,591207
%antf	22,83670	1,826936	24,85145	1,988116	29,98638	2,398911

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL EMBR -TIPO POLLO 16-17N		
	Media	S.D.

Mit/Vol	2,537806	0,203024
Met/Vol	1,06625	0,0853
Prof/Vol	0,817780	0,057244
Antf/Vol	0,653775	0,026151
Int/Vol	71,20970	8,545164
Imit	3,441210	0,275296
Imet	1,445811	0,115664
Iprof	1,108892	0,077622
Iantf	0,886505	0,035460
%met	42,01462	5,041755
%prof	32,22392	2,577913
%antf	25,76144	2,060915

Unidad volumen 10000: micras cúbicas

EMBRIONES-TIPO POLLO 19-20N HH

	ANTERIOR	MEDIO	POSTERIOR	
	Cor. Vt	Cor. Vt	Cor. Vt	Cor. Vt
S	AREA M. 10000	10000	10000	S
U	VOL 1730000	2020000	2380000	U VOL 2042516
P	INTERF 13936,88	23064,36	23124,08	P INTERF 20034,75
E	MITOSIS 468,83	418,14	635,46	E MITOSIS 507,2990
R	METAF. 193,76	171,7	271,32	R METAF. 212,1857
I	PROF 117,64	96,96	168,98	I PROF 127,8152
O	ANTF 157,43	149,48	195,16	O ANTF 167,2980
R				R
M	AREA M. 10000	10000	10000	M VOL 2742236
E	VOL 3100000	2110000	3020000	E INTERF 19769,34
D	INTERF 22754	14404,97	22169,82	D MITOSIS 513,6468
I	MITOSIS 542,5	337,6	661,38	I METAF. 220,8360
O	METAF. 251,1	151,92	259,72	O PROF 122,1538
	PROF 133,3	82,29	151	ANTF 170,6569
	ANTF 158,1	103,39	250,66	
I	AREA M. 10000	10000	10000	I
N	VOL 1930000	2920000	1860000	N VOL 2235772
F	INTERF 14534,83	20623,96	15160,86	F INTERF 19769,34
E	MITOSIS 461,27	613,2	425,94	E MITOSIS 513,6468
R	METAF. 193	248,2	180,42	R METAF. 220,8360
I	PROF 125,45	148,92	115,32	I PROF 122,1538
O	ANTF 142,82	216,08	130,2	O ANTF 170,6569
R				R
	TOTAL ANTERIOR	*TOTAL MEDIO*	*TOTAL POSTER	
	VOL 2252432	2349060	2419032	
	INTERF 17069,26	19357,65	20144,53	
	MITOSIS 490,6948	456,1536	574,0590	
	METAF. 212,5455	190,5399	237,0703	
	PROF 125,4194	109,3517	145,0492	
	ANTF 152,7298	156,2619	191,9394	

****TOTAL POLLO****

Corregidos

Val. medi S.D.

VOL	21061572	1474310,
INTERF	169714,3	152742,9
MITOSIS	4562,722	369,5805
METAF.	1920,467	15,36374
PROF	1139,461	102,5514
ANTF	1502,793	180,3352

Tabla nº 25

EMBRIONES -TIPO POLLO 19-20N HH

	SUPERIOR		MEDIO		INFERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,483572	0,198685	1,873001	0,149840	2,236080	0,178886
Met/Vol	1,038792	0,083103	0,805273	0,064421	0,926408	0,074112
Prof/Vol	0,625742	0,043801	0,445431	0,031180	0,580760	0,040653
Antf/Vol	0,819037	0,032761	0,622296	0,024891	0,728912	0,029156
Int/Vol	98,08371	11,77004	72,08844	8,650613	74,99202	8,999043
Imit	2,469562	0,197565	2,532402	0,202592	2,895423	0,231633
Imet	1,032933	0,082634	1,088774	0,087101	1,199574	0,095965
Iprof	0,622212	0,043554	0,602248	0,042157	0,752006	0,052640
Iantf	0,814417	0,032576	0,841379	0,033655	0,943842	0,037753
%met	41,82655	5,019186	42,99374	5,159249	41,43000	4,971601
%prof	25,19524	2,015619	23,78169	1,902535	25,97223	2,077778
%antf	32,97819	2,638255	33,22456	2,657965	32,59775	2,607820

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

EMBRIONES -TIPO POLLO 19-20N HH

	ANTERIOR		MEDIO		POSTERIOR	
	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.
Mit/Vol	2,178402	0,174272	1,941758	0,155340	2,372975	0,189838
Met/Vol	0,943579	0,075486	0,811092	0,064887	0,979972	0,078397
Prof/Vol	0,556789	0,038975	0,465489	0,032584	0,599586	0,041971
Antf/Vol	0,678032	0,027121	0,665177	0,026607	0,793415	0,031736
Int/Vol	75,77767	9,093321	82,40182	9,888219	83,27101	9,992522
Imit	2,794397	0,223551	2,302200	0,184176	2,770743	0,221659
Imet	1,210399	0,096831	0,961652	0,076932	1,144239	0,091539
Iprof	0,714235	0,049996	0,551896	0,038632	0,700092	0,049006
Iantf	0,869762	0,034790	0,788651	0,031546	0,926411	0,037056
%met	43,31522	5,197826	41,77100	5,012520	41,29720	4,955664
%prof	25,55955	2,044764	23,97256	1,917805	25,26730	2,021384
%antf	31,12522	2,490017	34,25643	2,740514	33,43549	2,674839

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

TOTAL	EMBR	-TIPO	POLLO 19-20N
		Media	S.D.
Mit/Vol	2,166264	0,173301	
Met/Vol	0,911789	0,072943	
Prof/Vol	0,540987	0,037869	
Antf/Vol	0,713488	0,028539	
Int/Vol	80,57606	9,669127	
Imit	2,618085	0,209446	
Imet	1,101962	0,088156	
Iprof	0,653821	0,045767	
Iantf	0,862301	0,034492	
%met	42,09038	5,050846	
%prof	24,97327	1,997861	
%antf	32,93634	2,634907	

Unidad volumen 10000 micras cúbicas

DESCRIPCION DETALLADA DE ALGUNAS OBSERVACIONES DE LAS DESCRITAS A NIVEL CELULAR.-

A continuación, y en las figuras números 51 al 64, recogemos la imagen y sus comentarios sobre detalles de los que con anterioridad hemos descrito y que son los que nos han servido, en líneas generales, para una mejor valoración de la mayor parte de las deducciones que, a nivel de lo que venía aconteciendo, se han reseñado. Cada leyenda de las que acompañan a las figuras correspondientes resulta suficientemente explicativa como para no ser necesaria cualquier otra aclaración en este lugar. Por otro lado, resulta igualmente fácil, el referir o compaginar de forma adecuada cada comentario con aquellos lugares anteriores en los que se hacía referencia a la misma situación.

Fig. 51.- Imagen microscópica obtenida a considerable aumento de un embrión 16col8h. en donde se aprecian figuras metafásicas que resultan intermedias entre lo que sería una imagen normal y la de su correspondiente a formación de estrellas producto de la droga. LLama la atención la disposición de figuras asociadas en pequeños grupos. Aumentos 1000 x.

Fig. 52.- Imagen detallada de la situación nuclear observada en copa óptica de un embrión 16col4h. en donde se aprecia la disposición agrupada de profases (pr) y el distinto tamaño y condensación de los núcleos según el lugar que ocupan dentro del espesor epitelial. Aumentos 1000 x.

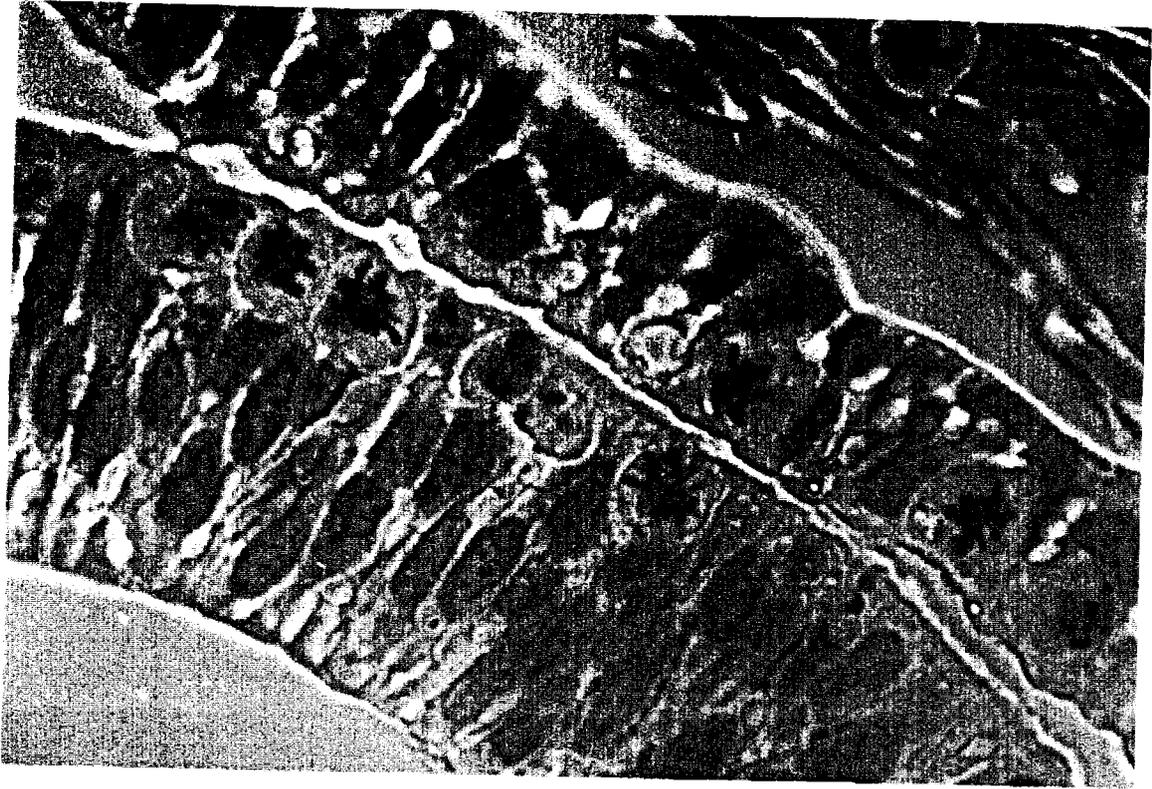


FIG.51

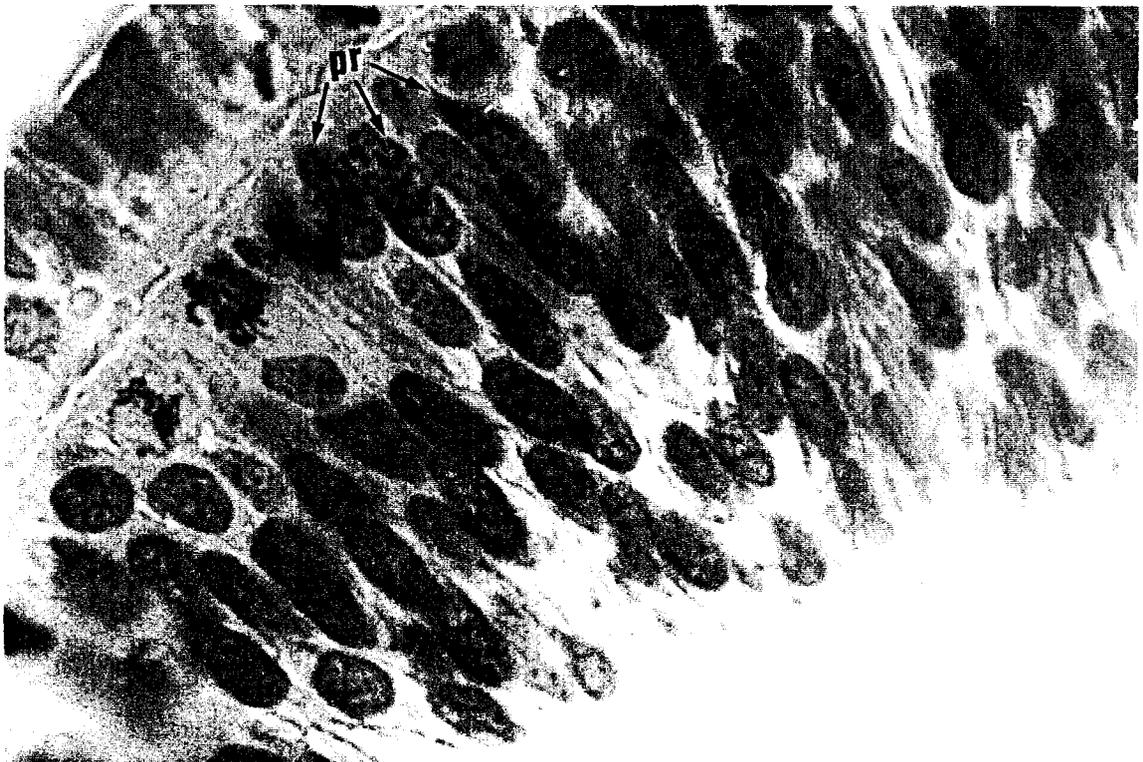


FIG.52

Fig. 53.- Detalle de los núcleos de células pertenecientes a zona extrema del polo posterior de un embrión 16col8h. Se aprecia que los núcleos celulares de mayor tamaño presentan una cromatina periférica más densa en torno a una región central menos condensada y en la que se pueden distinguir desde 1 a 4 o más grumos oscuros (nucléolos?). Se distinguen también dos formas generales de núcleos. Método de Feulgen. Aumentos 1000 x.

Fig. 54.- Imagen de una zona media-superior de una copa óptica de un embrión 16col8h. en donde se distingue la diferente configuración de los núcleos en retina y lámina pigmentaria. Se ve una imagen de anafase lo cual indicaría ausencia de acción de la droga a ese nivel. Las imágenes parciales de metafases son también muestra de la no afectación. Aumentos 1000 x.

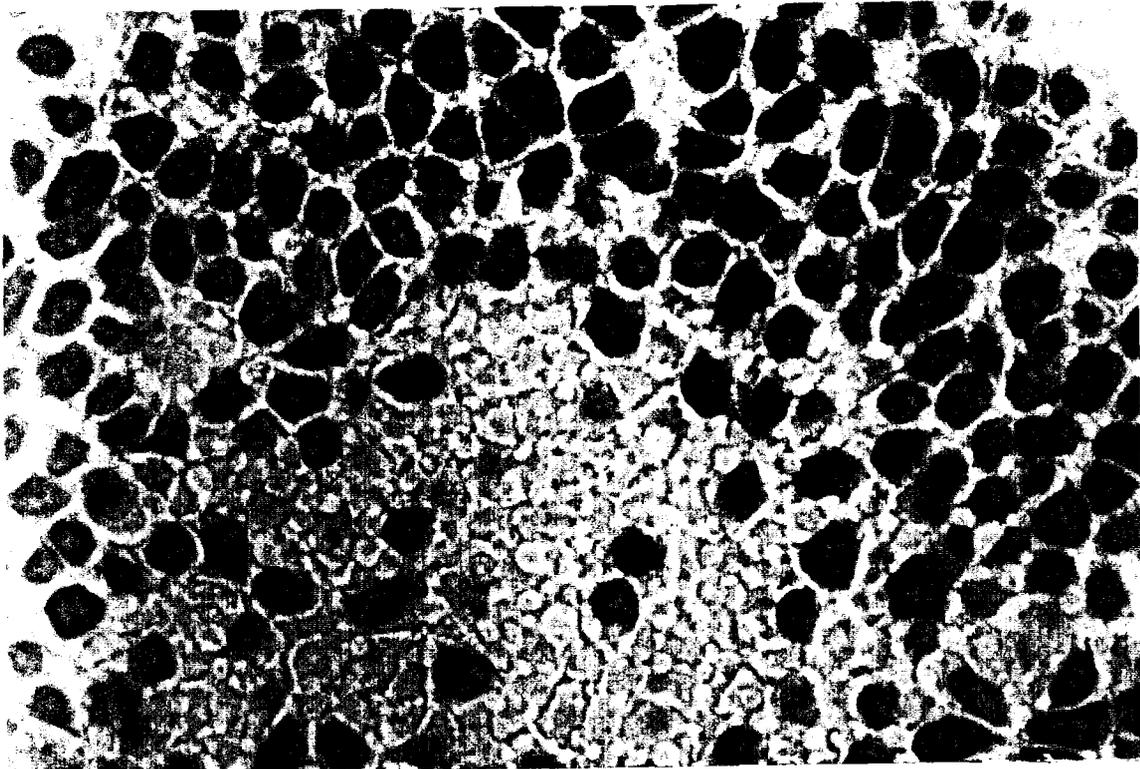


FIG. 53

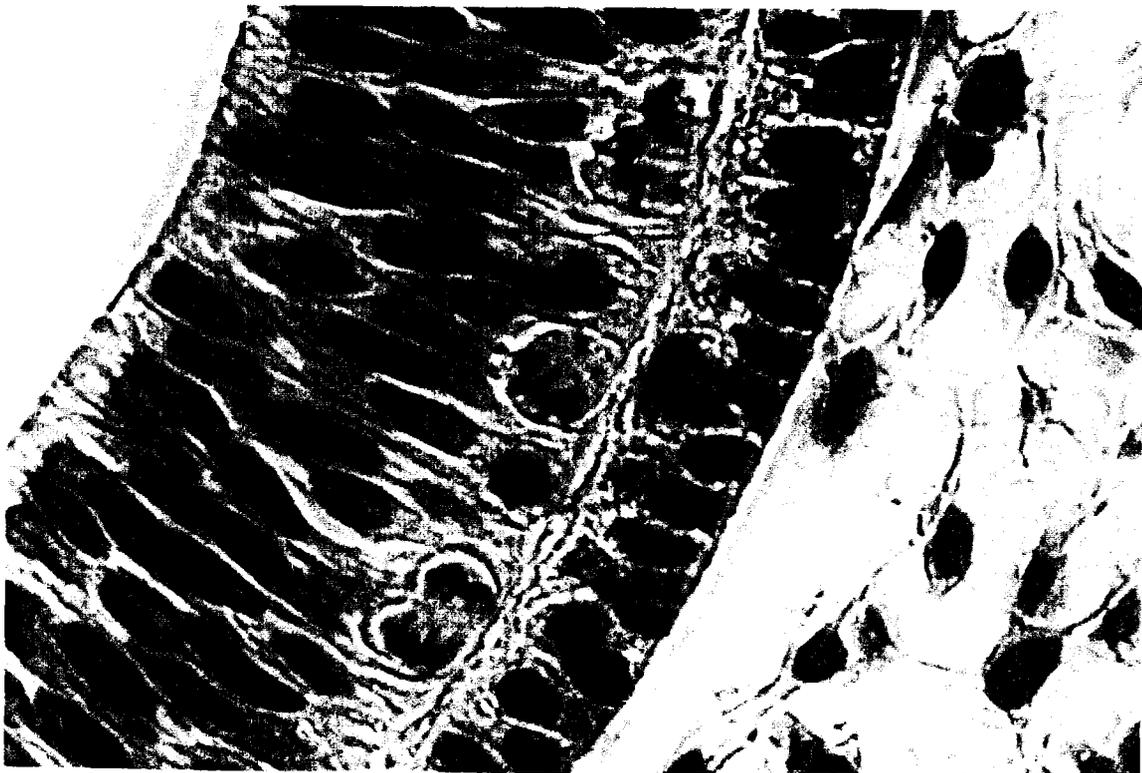


FIG. 54

Figs. 55 y 56.- Imágenes de figuras de núcleos en interfase y en división en donde podemos observar: diferente disposición metafásica y profásica. La amplitud de algunas metafases induce a pensar en conjuntos tetraploides. Es patente la diferente configuración de los núcleos de retina y epitelio pigmentario. Aumentos 1000x.

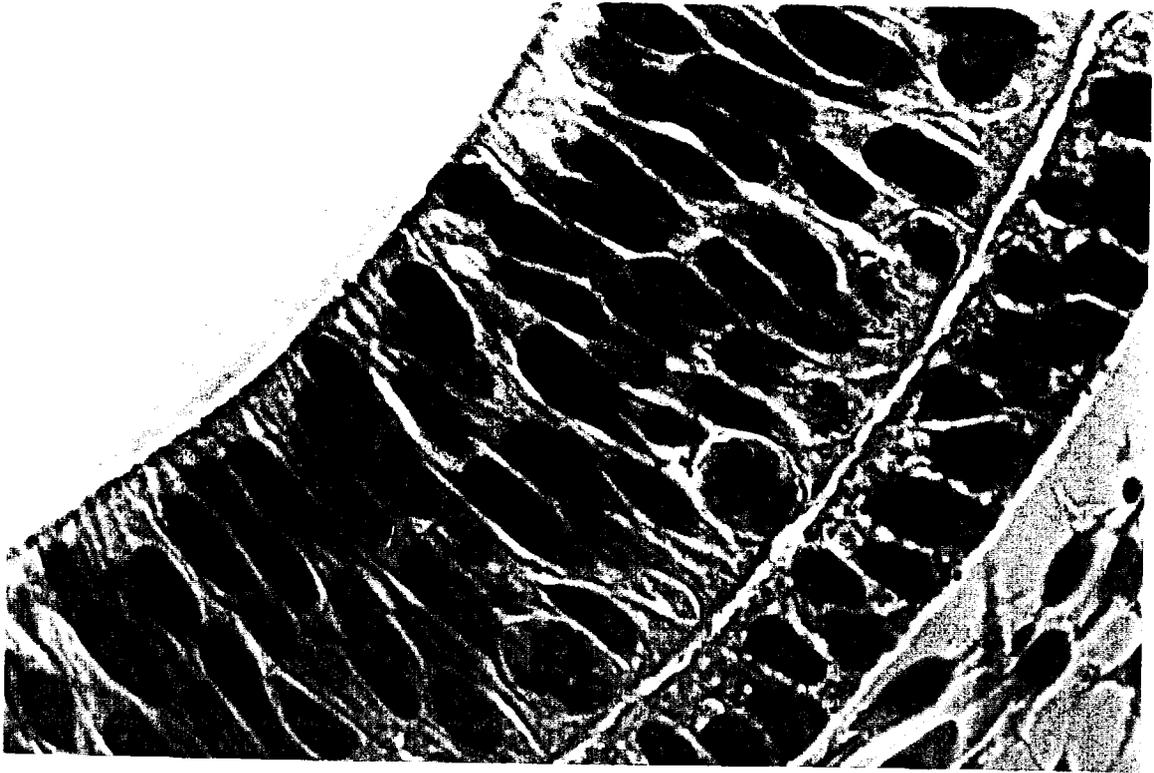


FIG. 55

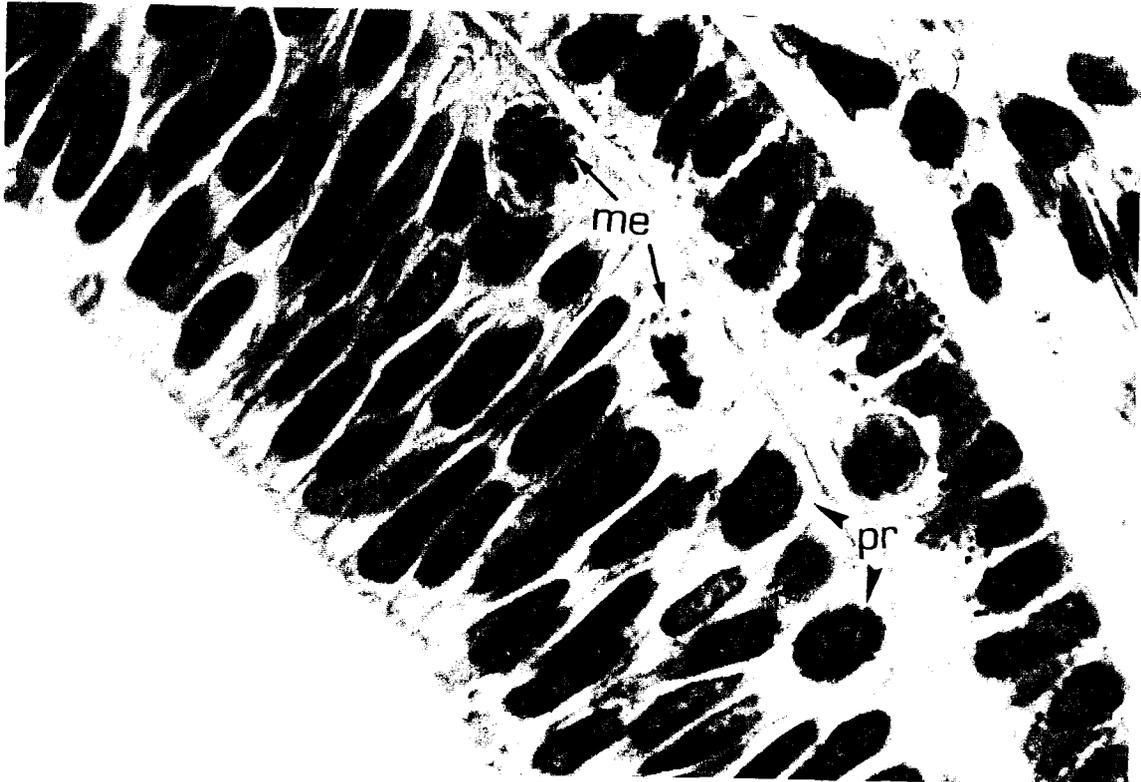


FIG. 56

Figs. 57 y 58.- Microfotografías de las zonas inferior y superior de una sección central de la copa óptica de un embrión de pollo tipo 13col8h. Se aprecia el que a pesar de un intenso grado de afectación, todavía en esta zona, aparece un considerable n° de interfases. Por otra parte, las metafases estrelladas se acumulan en los extremos indicando con ello el que son lugares de mayor turnover cíclico. Es de destacar: la tendencia de las células a aislarse de las vecinas y también el menor tamaño e incremento en el grado de condensación nuclear de los elementos que observamos a nivel del tallo de unión entre copa y tubo neural. Aumentos 630 x.



FIG.57

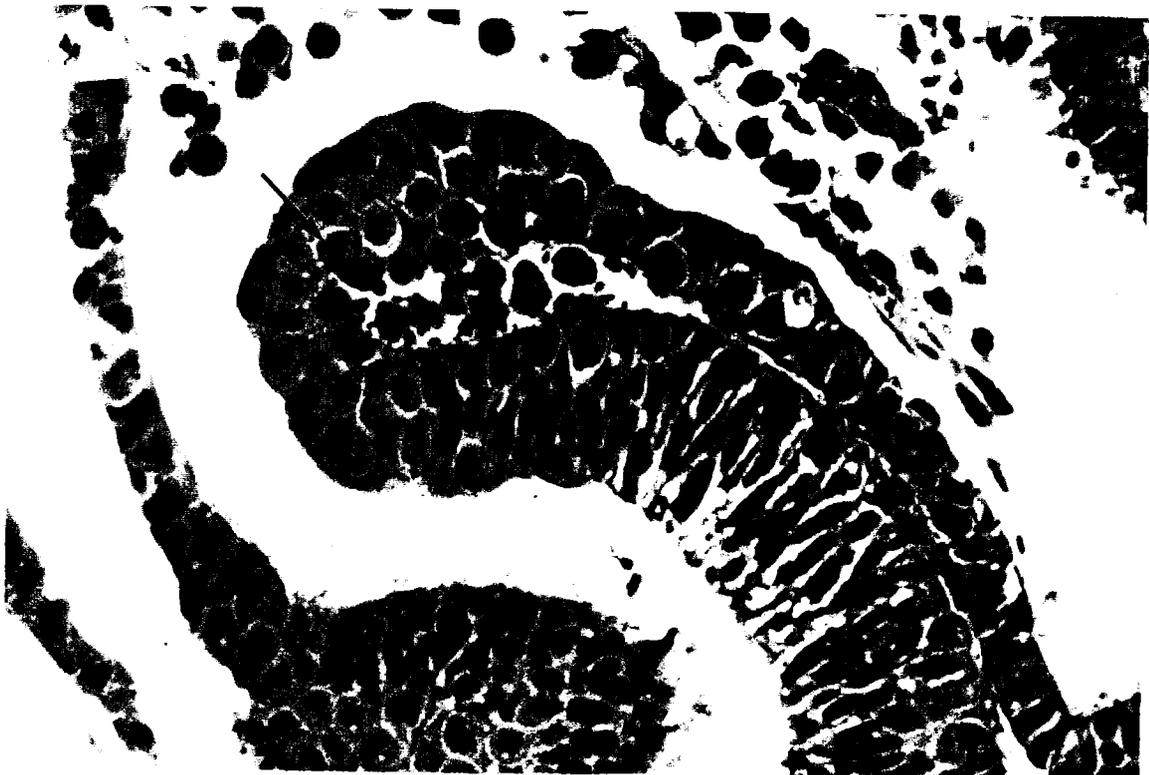


FIG.58

Fig. 59.- Imagen análoga a las anteriores en la que se ponen de manifiesto (flechas) distintos grumos cromáticos en el interior de pequeñas bolsas y/o conjuntos, todo como expresión de posible desintegración del material nuclear. Demostración con método de Feulgen. Aumentos 630 x.

Fig. 60.- Detalle de la disposición de los núcleos en células en interfase y división de una zona semejante a la de las figuras anteriores. Junto a la tendencia de las células a separarse de sus vecinas se aprecia el que algunas ofrecen incompleta separación de sus dotaciones cromosómicas (flechas) con lo que sugieren la imagen de conjuntos tetraploides. Aumento 1000 x.



FIG. 59

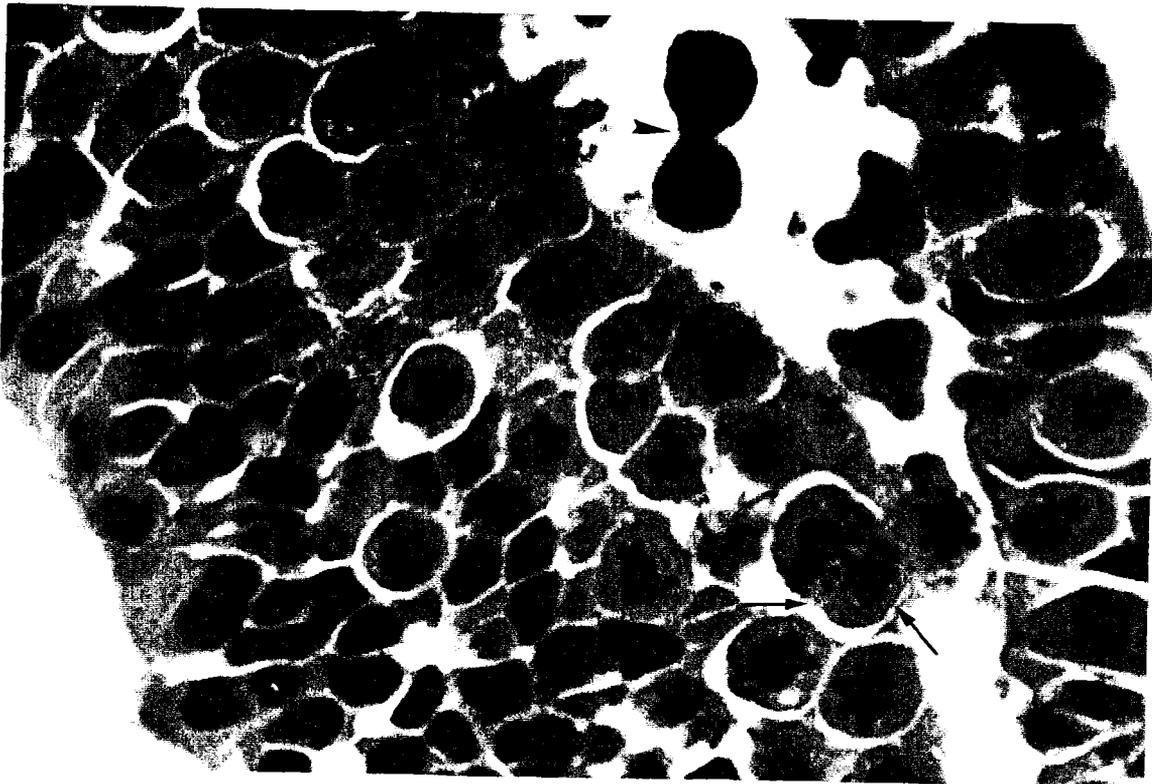


FIG. 60

Figs. 61 y 62.- Imágenes parciales ofreciendo la diferente configuración de los núcleos celulares pertenecientes al epitelio pigmentario y al de la retina. Es patente el tipo de afectación en pigmentaria al compararlo con las imágenes de metafases de aspecto normal en superficie ventricular retiniana. Con todo, en retina, se detectan algunos signos de afectación: existencia de grupos metafásicos y centralización en capa del epitelio de algunas de las profases que se ven. Aumentos 630 x.

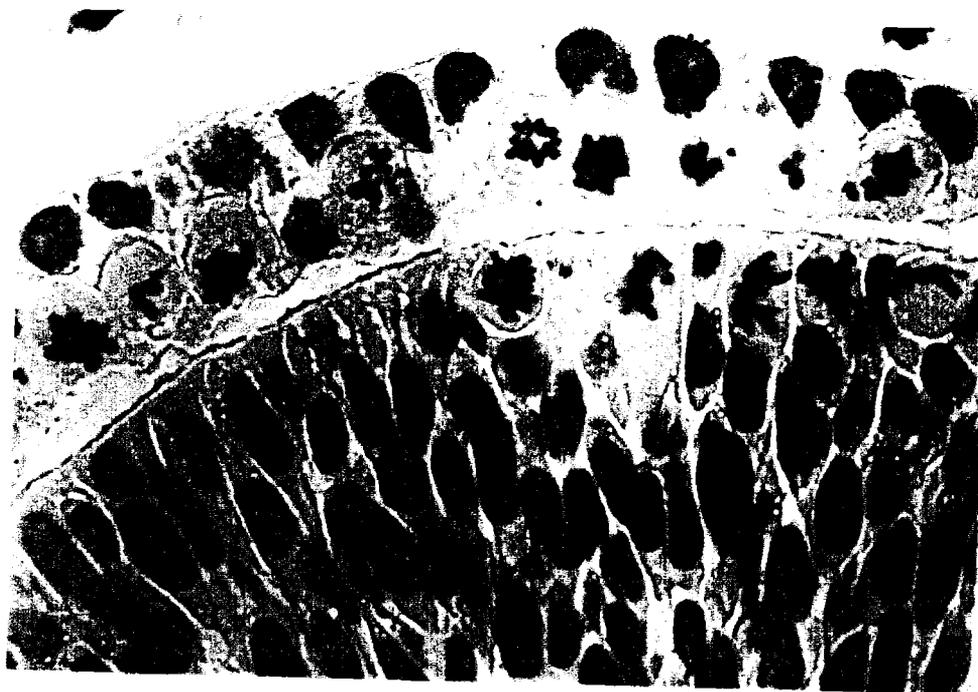


FIG. 61

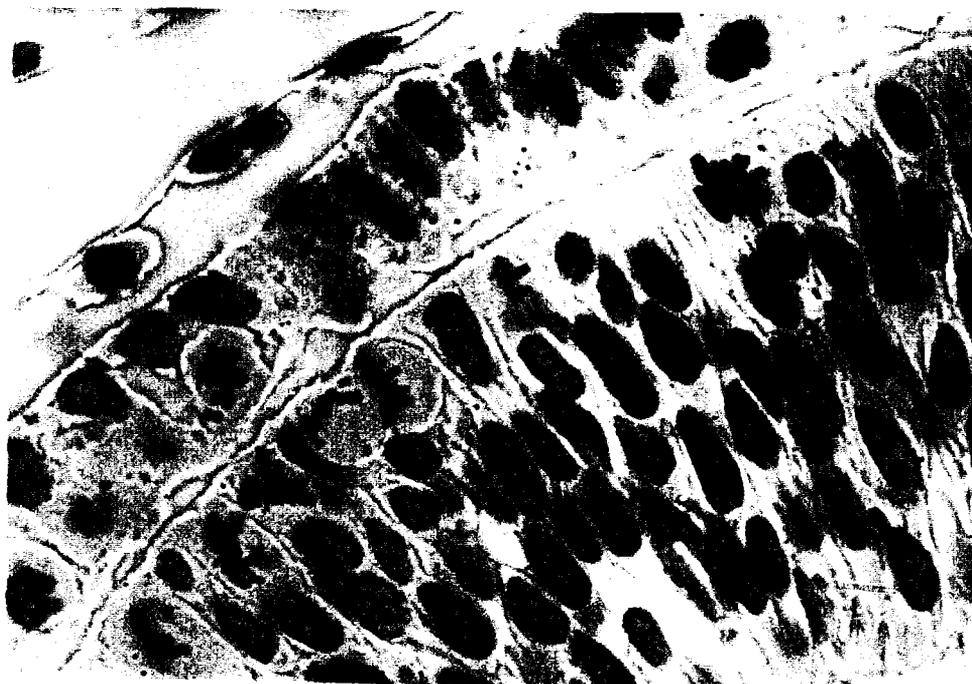


FIG. 62

1962
CORNING 1511

Fig. 63.- Imagen como las anteriores obtenida a menor aumento en la que de forma más panorámica se hace presente la diferencia de comportamiento entre los elementos de los epitelios pigmentario y retiniano (flechas). Son típicas las estrellas en pigmentaria así como la afectación por zonas o grupos. Tinción Feulgen. Aumentos 400 x.

Fig. 64.- Detalle de un preparado como el anterior en el que destaca un conjunto cromosómico (flecha) posiblemente tetraploide que al cambiar de foco no puso de manifiesto separación celular o asociación en sentido opuesto. Aumentos 630 x.

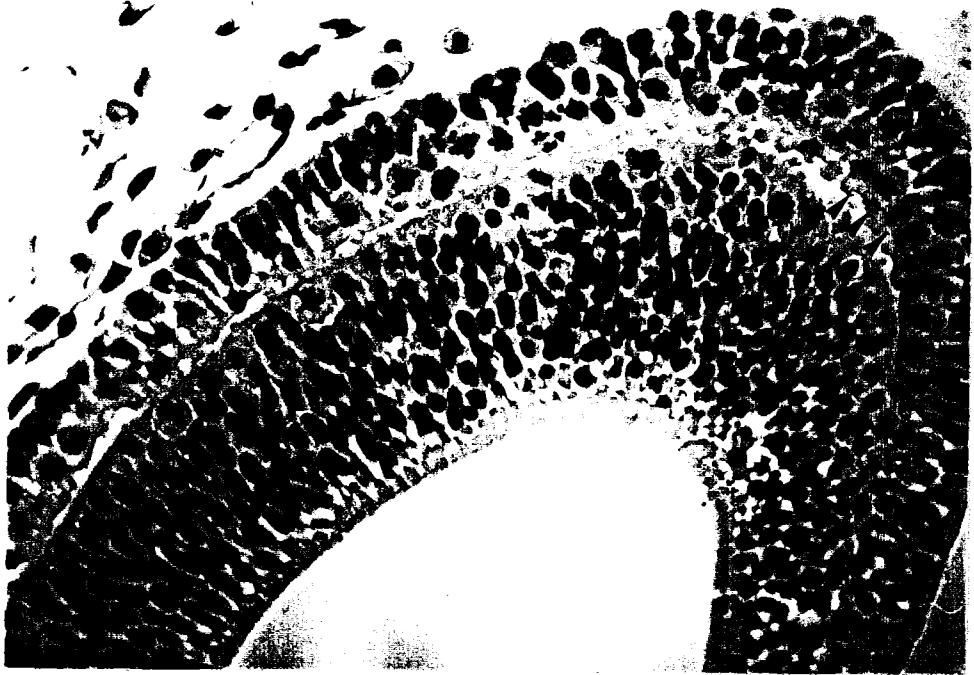


FIG. 63



FIG. 64

IV.- COMENTARIOS Y DEDUCCIONES

1.- Sobre la preparación del material objeto de estudio.-

Al programar las experiencias, se ha de tener en cuenta que estamos en presencia de un material en desarrollo que, de algún modo, va a actuar según una condición individual genética que hará el que, como es sabido, para un mismo tiempo de incubación se logren diferencias, de tal forma que unos embriones se encontrarán más avanzados que otros (Hamburger y Hamilton, 1951, Calvente, 1985). En nuestro caso, las incubaciones se efectuaron con temperatura y volteo controlados, con lo que, en la medida de lo posible, eliminamos las influencias exteriores al sistema. De todas formas se siguen dando variaciones y por ello es necesario trabajar con valores medios (O'Rahilly y Meyer, 1955, 1959). Esta situación hace, que estudios como el presente requieran más tiempo del habitual para los análisis, que si se quieren efectuar comparaciones de zonas o sectores, únicamente después de mucho tiempo se puede disponer de número suficiente de animales como para que se consigan unas posibilidades estadísticas realmente indicativas. En nuestro caso, contamos con una histoteca sobre el tema, con más de 80 embriones sin tratamiento alguno (catalogados como normales por su analogía con los datos bibliográficos) correspondientes a las etapas de desarrollo comprendidas entre el estadio 13 HH y el 20 HH. Todo esto nos permite, o bien realizar nuevas mediciones, como hemos hecho en el presente caso, sin tener que repetir el costoso trabajo de nuevas incubaciones y/o tinciones, o bien poder escoger y mezclar aleatoriamente las medidas que se realicen a título de testigos con las que ya se poseen.

Pero a pesar de la ayuda antedicha, en el presente estudio se proyectaban realizar experimentaciones de cuyos resultados carecíamos y, si bien conocíamos el patrón de desarrollo (Abadía-Fenoll y cols., 1984; Calvente, 1985; Abadía-Molina, 1987; Calvente y cols. 1988) y, de alguna forma,

diferenciación, no se poseía experiencia de lo que podía conseguirse desde un punto de vista estereológico, pues es claro que existía algo más que una sospecha de lo que a nivel celular podía acontecer al emplear la colchicina. Para la realización de la experimentación se han utilizado, tal y como ya hemos reseñado, 5 embriones de cada tipo; realmente, en las diferentes incubaciones se pusieron muchos más pollos de esta cifra, pero únicamente se han empleado los antedichos porque vienen a representar los considerados como más útiles de cada incubación (mínimo de 30) y tinción posterior, también porque a veces se comparte una misma incubación para dos trabajos diferentes con separación del conjunto de embriones y porque el número de mortalidad puede ser elevado (tanto en las experiencias normales como, mucho más, tras la incubación sumada al tiempo de dosis, más la manipulación que supone la inyección). Ya hemos dicho que se emplearon 5 embriones para cada tipo y que, al ser 6 las variantes experimentales, se alcanzó una cifra de 30. En esta cantidad, que consideramos apreciable, ha de entenderse que lo más significativo es su conjunto, es decir, que si bien se trata de 5 individuos en cada caso, al estudiar el sentido de la progresión de las variaciones (o datos del conjunto), el estudio toma más valor comparativo, como igualmente opinan O'Rahilly y Meyer (1955); de todas formas, en los test de comparación de cifras medias, se han tomado para, valores de "t" con coeficiente de significación o seguridad superior al 95%, unos valores de 2.31 (correspondiente a los 8 grados de libertad, en el menor de los casos).

En cuanto a la forma de administración de la droga se ensayaron varios procedimientos y el que dió mejores resultados fué el de inyección en las inmediaciones diencefálicas, lo que se consigue, tras realizar una pequeña apertura en la cáscara y sus membranas y localizar la región cefálica, mediante observación con lupa estereoscópica; de este modo, se procura alcanzar la zona deseada desde su parte inferior. El producto difunde así bien a ambas retinas

y a toda la vesícula cerebral, no encontrando otras dificultades que las que ofrezca la propia estructura embrionaria. Como se ha podido ver, una hora es tiempo suficiente para poder contar con un grado de afectación que resulte detectable a la simple observación microscópica. A efectos prácticos y para nuestros intereses actuales, no se verificaron tiempos de inyección inferiores a los 30 min., con el fin de dar lugar a que el producto difunda y alcance su objetivo. Por otro lado, interesaba de momento el poder duplicar los tiempos de acción hasta un total que fuera cercano al tiempo generacional (Morris y col., 1979).

En lo referente a la actuación de la droga hay que recordar o aclarar que, en estos tipos de acción "in vivo", una vez que se ha inyectado el producto no es fácil el poder retirarlo sin alterar las condiciones de incubación e incluso sin producir o acelerar la muerte del mismo. Por lo tanto, tras la inyección, la colchicina estará actuando hasta que se sacrifique el animal (sin que en el trabajo actual hayamos analizado el tiempo que resulta necesario para dejar de influir o agotarse la acción de la droga). Sí se ha podido ver, tal y como hemos reseñado con anterioridad, que a las 8 horas de acción su influencia es superior que a las 4. Para las experiencias en las que la inyección se realizó después de 60 horas de incubación normal, sólo se emplearon los tiempos de 4 horas y 8 horas porque, dada la mayor dificultad de conseguir afectación, llegados este momento del desarrollo, perdieron interés los estudios con 1 hora ó 2 de inducción que producían una débil influencia; ésto no quiere decir que no se hayan podido producir algunas acciones a nivel celular, pero de significado más fino o submicroscópico óptico; ya hemos dicho que, a los efectos cuantitativos y estereológicos, esas determinaciones mínimas no han formado parte de nuestro actual interés.

En lo que se refiere a la obtención de las secciones histológicas y su tinción, es de interés comentar que los grosores más apropiados para las actuales determinaciones fueron los de 4 micras. Grosos superiores dan exceso de núcleos celulares que se superponen, dan más dificultad a la cuantificación y tinciones de peor observación y medida. En lo que se refiere a secciones inferiores a las 4 micras, y para los presentes estudios, presentan la dificultad de seccionar excesivamente las partículas y además de aumentar el número y corrección de los perfiles, se siguen peor y dan imágenes menos completas que ofrecen mayor dificultad de catalogación.

En lo referente a la dosis inyectada, se ha escogido la concentración de 1mgr/litro por coincidir con las más habituales de la literatura (Källen, 1962). Se emplearon otras dosis superiores con el fin de poder catalogar la suficiencia de la antedicha y se vió que ésta resultaba conveniente. La dificultad de emplear concentraciones superiores está en la posibilidad de que se produzcan acciones tóxicas y, en tal caso, se pudieran estar detectando variaciones producidas por una artificial construcción de la población sobre bases de pérdida celular por un efecto tóxico, que se sumaría en este caso a la muerte celular natural (Glucksmann, 1951, 1965; García Porrero y Ojeda, 1979, Martín-Partido y col., 1986).

2.- Sobre las modificaciones generales de la estructura.-

En resumen, se puede comentar a este respecto que, tal y como representamos en el gráfico n° 15 (posteriormente ofrecido), la colchicina ha producido, con la detención de las divisiones celulares, una disminución del volumen que hasta las 4 horas de tratamiento se traduce fundamentalmente en una ausencia de crecimiento, pero que, con el tratamiento más prolongado, se culmina incluso en una reducción del volumen total, lo cual se tendría que achacar al incremento en la destrucción celular (tal vez porque para la dosis empleada y este tiempo -de 8 horas- estemos en los límites de la toxicidad). Tampoco se puede descartar, para el valor del volumen, una reducción en el tamaño de las células, sobre las que hemos observado cómo, conforme van siendo más afectadas, no sólo disminuyen sus dimensiones sino que van quedando menor número de elementos con valores normales.

De forma paralela a la reducción de tamaño, y a medida que se intensifica el tiempo de tratamiento, la copa va alterando su configuración, haciéndose más compacta y engrosada sobre todo en su porción superior; esta situación dificulta un tanto la catalogación de lo que propiamente sea zona central de lo que son zonas superior e inferior. En el presente estudio, cuya preocupación fundamental ha sido la de determinar las variaciones en la distribución celular y la incorporación de poblaciones metafásicas según se intensificaba el tratamiento, se realizaron los estudios de forma aleatoria ponderada pero sin prestar otro tipo de atenciones a la modificación estereológica de las zonas contenedoras. Ya es sabido (trabajos anteriores de nuestro grupo) que, cuando hablamos de tercio superior o zona inferior o posterior, nos referimos a una región que se corresponde con tal lugar, pero es el resultado de una división en tercios iguales de la extensión de la copa, no sobre algún sentido de catalogación funcional. Según ésto, y tras las modificaciones producidas por la droga, es lógico entender

que los volúmenes de las zonas contenedoras puedan variar independientemente según se vean afectados, pero esta circunstancia no influirá en las determinaciones ya que para nosotros cada región es un contenedor donde analizamos densidades de elementos por unidad estándar de volumen y, luego, trabajamos con valores relativos en la mayor parte de las comparaciones. Serán, pues, zonas concretas, aunque sin referencia al volumen total, las que ofrecemos cuando se dice, por ejemplo, sector central, zona anterior, etc.

En la configuración general del cristalino no se han realizado en el presente estudio cuantificaciones de la situación del mismo, pero sí queremos relatar, porque es de observación microscópica simultánea, que en su desarrollo ofrece modificaciones que se han de catalogar como de un retraso en la normal constitución y construcción del mismo, todo lo cual indudablemente habrá de influir en la interacción que esta placoda realiza con la retina. Tal vez su falta de estímulo sea una de las causas que determinan la reducción de volumen retiniano.

Por último, queremos comentar en este apartado el hecho de que las células constitutivas de la pared cerebral se hayan afectado simultáneamente a nuestro material de interés principal (retina neural). En este sentido es pues de destacar el que las modificaciones se repitan de manera análoga a como vemos que ocurre en la retina, aunque al no haber realizado todavía determinaciones cuantitativas, no podemos entrar en considerar análisis morfométricos ni paralelismos de ciclo, ya que sólo hemos prestado atención al aspecto iconográfico. La constatación de alteraciones a nivel de las regiones prospectivas de zonas cerebrales ha servido para comprobar la realidad de la acción y normal difusión de la droga. Sí queremos aquí resaltar, no obstante, el diferente comportamiento, por zonas, de territorios concretos del manto cerebral, p.e. zona superior (o de calota), que representan y ponen de manifiesto diferentes

formas de reacción y con ello, muy posiblemente, diverso estado de maduración y evolución celular.

3.- Sobre la diversa acción de la colchicina según el tiempo de tratamiento y el momento de su administración.-

En las reflexiones que podemos hacer sobre los resultados obtenidos tras la administración de la colchicina, se pueden hacer consideraciones sobre las zonas analizadas y sobre los valores globales pertenecientes a toda la retina, proceder que ya han empleado otros autores como Dütting y col. (1983). Las gráficas que a continuación se presentan están confeccionadas con los valores de las tablas anteriormente expuestas y sus tests correspondientes. En su conjunto, nos hemos preocupado por aquellos valores que hemos considerado de mayor interés.

Al representar gráficamente tanto en histograma como en curvas (gráficos n° 1 al 12) los valores de índices obtenidos en las experiencias tipo 13col, se puede observar que en todas las zonas se detecta un comportamiento celular análogo, con un incremento del índice mitótico y de metafases conforme avanza el tiempo de tratamiento (embriones inyectados a las 48 horas de incubación). Los valores más acusados los tenemos en las zonas superior y anterior (gráficos n° 1 y 7, curvas n° 2 y 8 respectivamente) y los menos intensos en las zonas medias horizontal y vertical que se representan en las gráficas n° 3 y 9, curvas n° 4 y 10. También puede apreciarse cómo, en todas las 6 zonas en que se dividió la retina, las profases y las anafases-telofases tienden a desaparecer; lógicamente y por el modo de acción de la droga, desaparecen antes las anafases, que ya a la hora de tratamiento dejan prácticamente de detectarse.

Como puede verse en la mayor parte de las curvas (gráficas n° 2, 4, 10, y 12), el número o índice de los porcentajes de metafases se eleva rápidamente hasta las dos primeras horas de tratamiento y después sigue haciéndolo, pero más suave, hasta la hora 8ª. Esta situación puede indicarnos la velocidad con que están desapareciendo las profases (principalmente). En efecto, si nos fijamos en

las gráficas n° 1, 3, 9 y 11 veremos que el índice metafásico va creciendo exponencialmente con la duplicación del tiempo de tratamiento, pero al expresar esta situación en curvas de porcentaje (gráficos n° 2, 4, 10 y 12) la curva está en función de la rapidez con que dejen de aportarse profases al cuadro general del ciclo concreto que se analiza. Ciertamente, y como era de esperar, las profases irán desapareciendo conforme la población de interfases que las proporciona va menguando; simultáneamente se va produciendo el aumento metafásico, pero ¿cuál es la razón para que las profases desciendan del modo como lo hacen?. La causa principal está, sin lugar a dudas, en el rápido ascenso del número de metafases, que se van acumulando. Pero no queremos dejar de apuntar la posibilidad de otras dos circunstancias: una es la de que, por efecto de la droga, se modifiquen de alguna manera las habituales imágenes de la profase, en lo que podríamos llamar imagen clásica, y nos aparezcan figuras que sean más difíciles de catalogar o teñir; la otra posibilidad es la de que la colchicina enlentezca, por el mecanismo que sea, la marcha del ciclo y entonces, como una consecuencia del incremento del tiempo intermitótico, las interfases tardan más en entrar en período de división y en alcanzar la profase, colaborando en su número, situación que no ocurrirá con las metafases porque se van acumulando en la parada "C-metafásica". Consideraciones análogas sobre duración de ciclo, pero sin variar las condiciones de desarrollo, encontramos en Fujita (1962) y Rapaport y Stone (1983), entre otros.

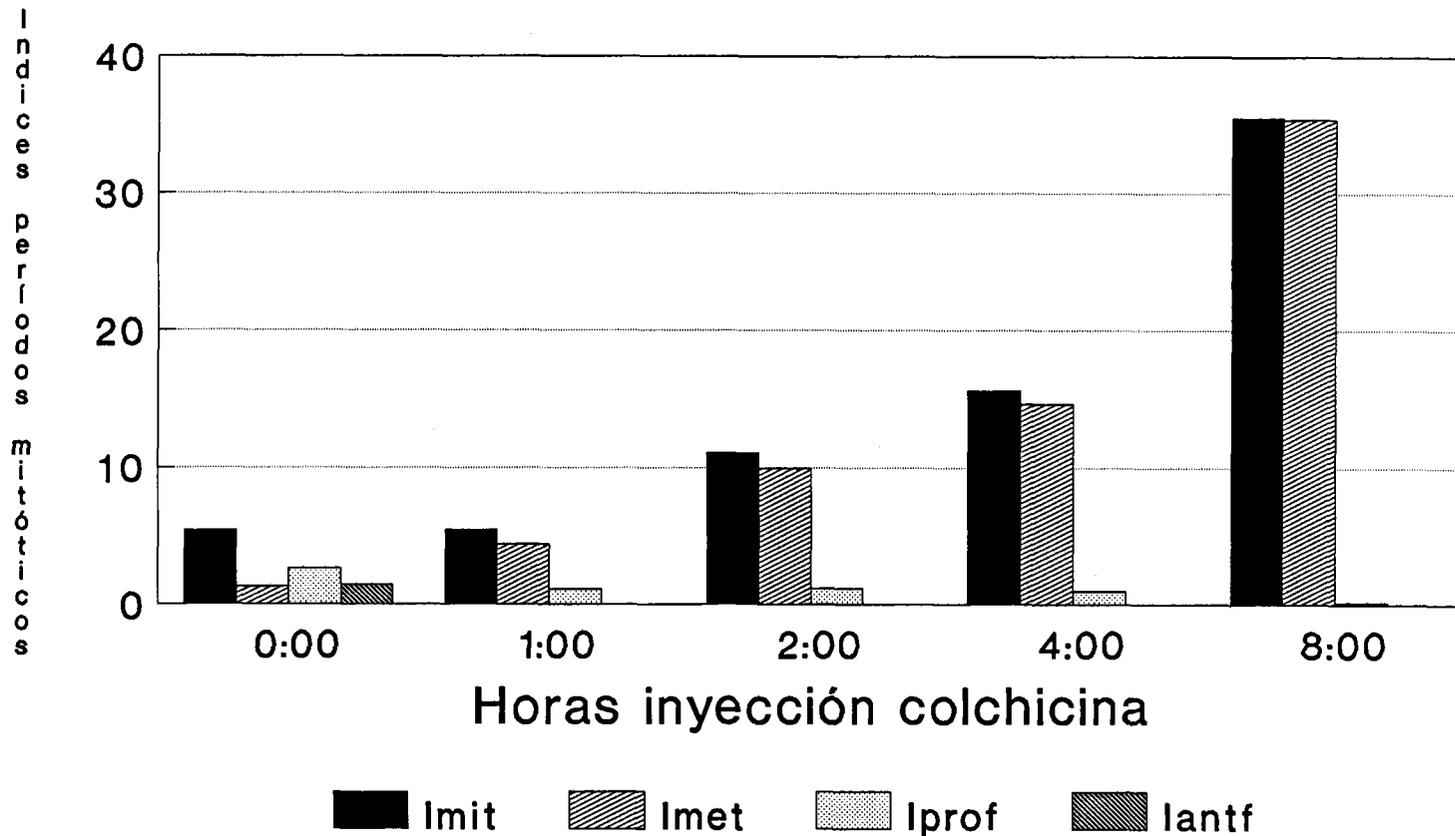
En el mismo sentido en que nos hemos expresado en el párrafo anterior, y como comentario que nos sirve para comprender los procesos que puede detectarse en las diversas zonas al estudiar los ciclos de sus células, queremos llamar la atención sobre lo que se observa en el gráfico n° 6. Aquí, en esta zona inferior de la retina, aparece hacia la hora 2 de tratamiento un ligero aumento de profases. Tal situación repercute, como es lógico, en el porcentaje

de metafases, que corresponde a la curva dispuesta inmediatamente encima. El número total de profases (y, en general, de figuras mitóticas para cada subíndice) es frecuentemente bajo en cada "frame" o unidad de recuento aleatorio y, a veces, basta que en algún animal, por la razón que sea, se produzca una anomalía para que se pueda producir una ligera variación; esto es en parte lo que aquí ha ocurrido y para una zona, la inferior que está sometida a las irregularidades que produce la aparición de la fisura óptica. Las variaciones de valores en esta zona han sido apuntadas, entre otros autores por Shook(1982). Por lo tanto, y dada la posibilidad de encontrarnos con pequeñas modificaciones regionales, ya se ha señalado anteriormente que, en estudios como los que nos ocupan, tiene más interés el análisis conjunto y el seguir la progresión de las variaciones, que los pequeños cambios puntuales (en cualquier caso, los test de comparación siempre deberán sacarnos de dudas).

En los primeros momentos del tratamiento, son las zonas anterior, posterior y superior las que, tal y como hemos visto en los test nº 1 al 3, nos dan las mayores diferencias significativas en número de metafases (y mitosis). Consecuentemente, cuando, como se expuso en el test nº 3, se comparan los valores de interfases entre animales tratados y normales se aprecia una significativa diferencia a favor del número de interfases en los no tratados. En este sentido se entiende que: valores altos en metafases (o mitosis) y muy bajos en interfases indican una población más homogénea o primitiva y valores altos en metafases e interfases representan zonas más proliférativas y posible alargamiento de los ciclos.

INDICES MIT. Y SUBFASES

Zona superior. Embr. tratados 13-14HH



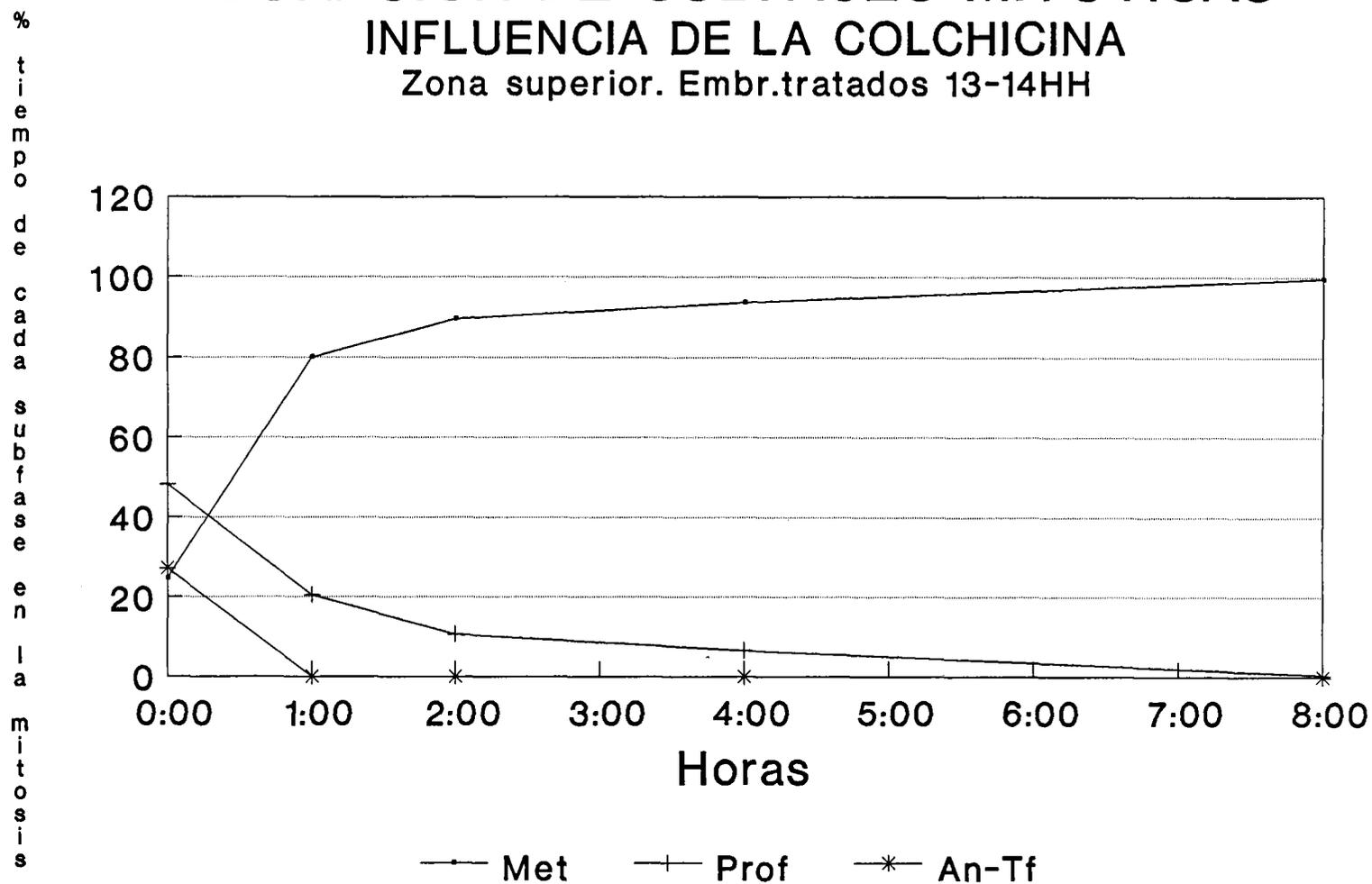
Influencia de la colchicina

Gráfico nº 1

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Zona superior. Embr.tratados 13-14HH

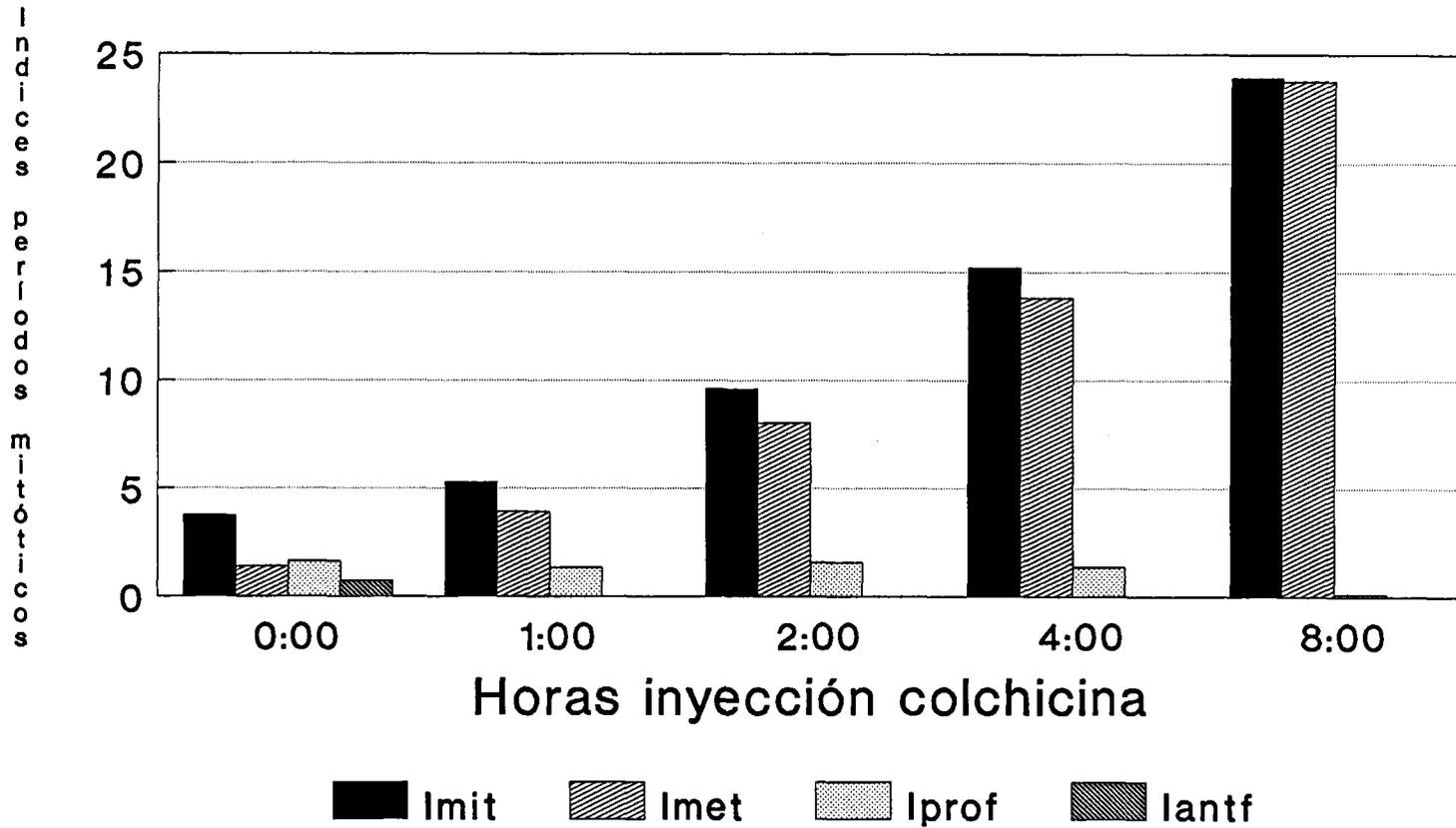


eje X: Horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 2

INDICES MIT. Y SUBFASES

Zona media horiz. Embr. tratados 13-14HH



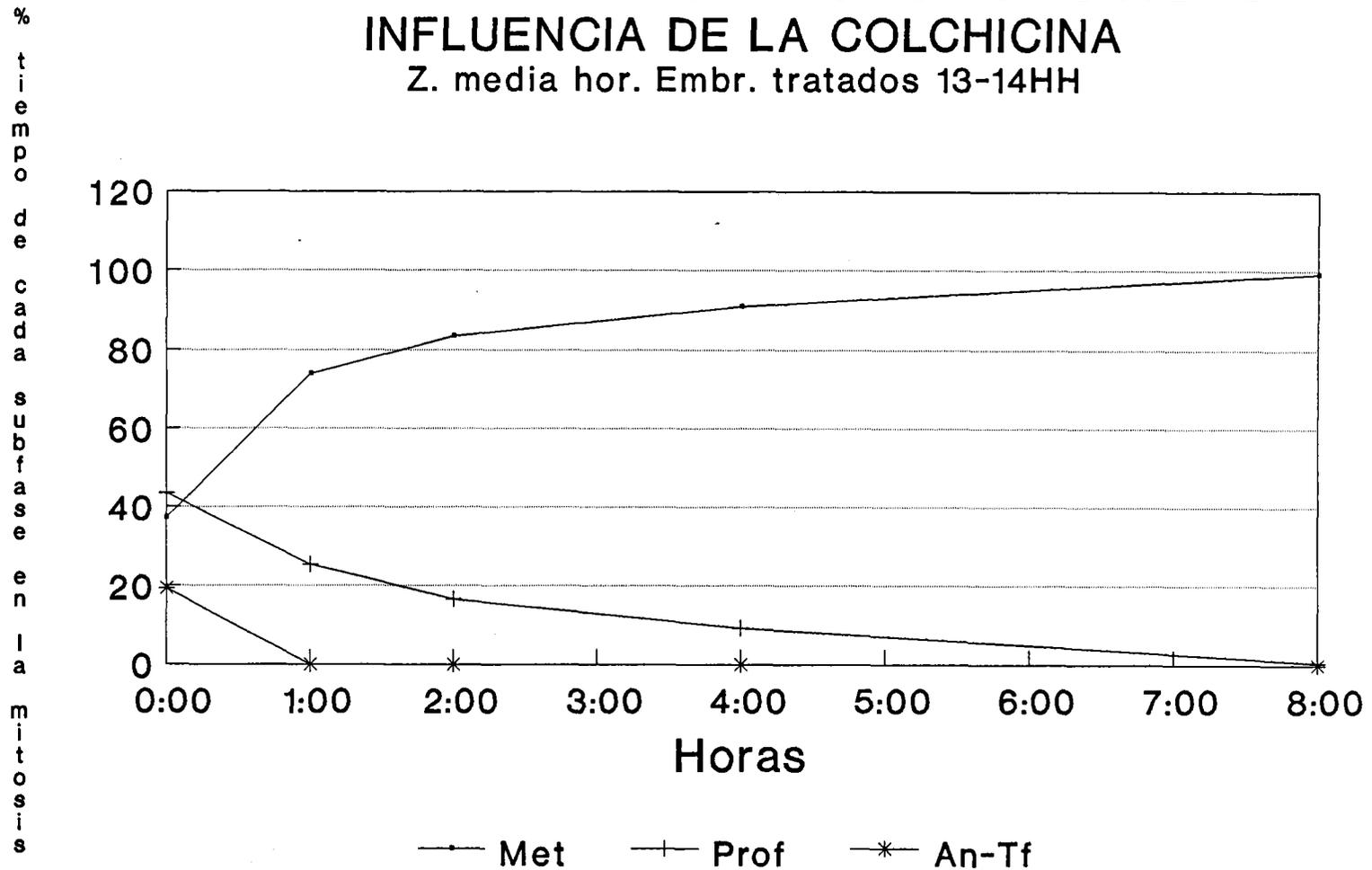
Influencia de la colchicina

Gráfico nº 3

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Z. media hor. Embr. tratados 13-14HH

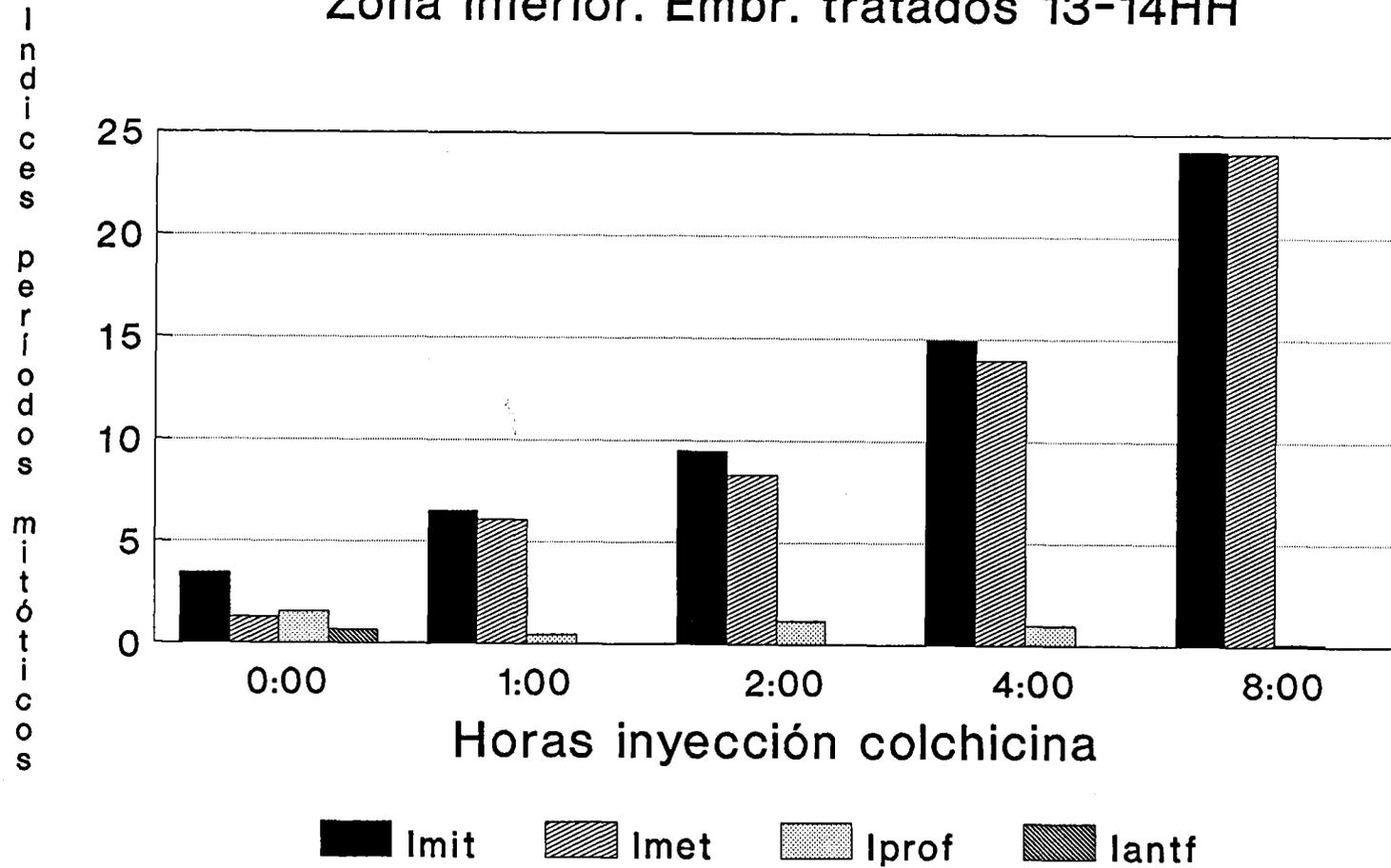


eje X: Horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 4

INDICES MIT. Y SUBFASES

Zona inferior. Embr. tratados 13-14HH



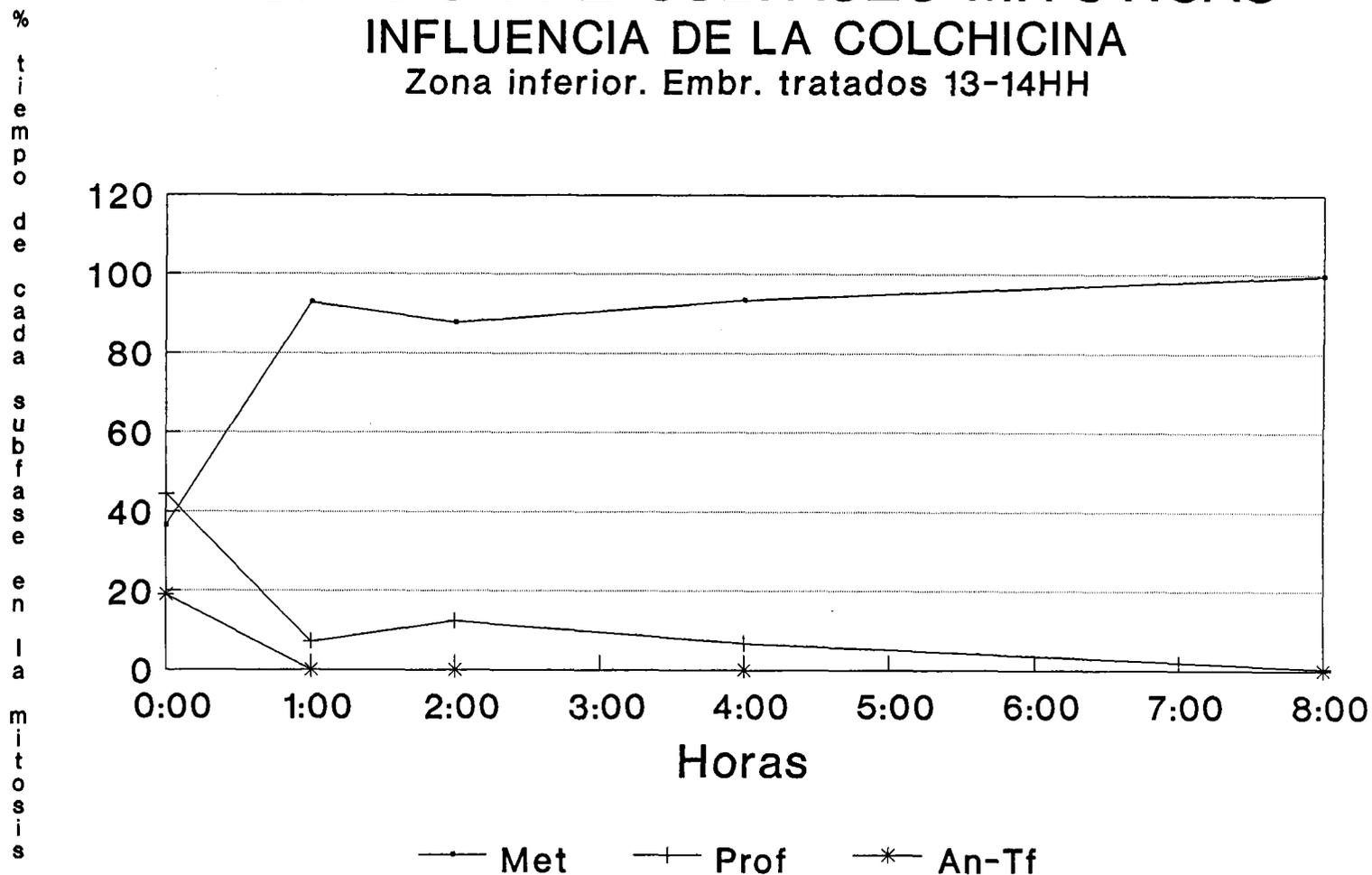
Influencia de la colchicina

Gráfico nº 5

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Zona inferior. Embr. tratados 13-14HH

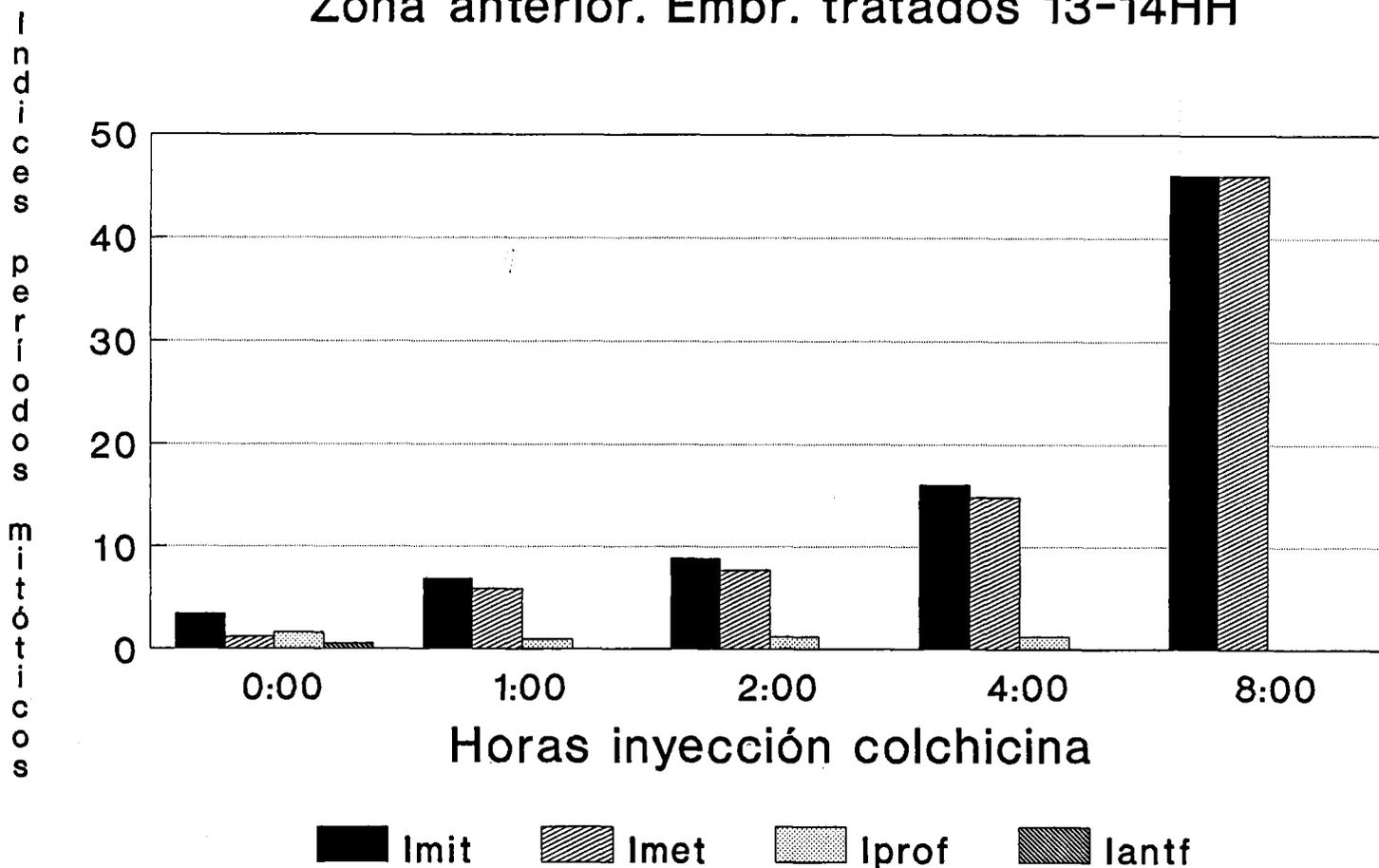


eje X: horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 6

INDICES MIT. Y SUBFASES

Zona anterior. Embr. tratados 13-14HH



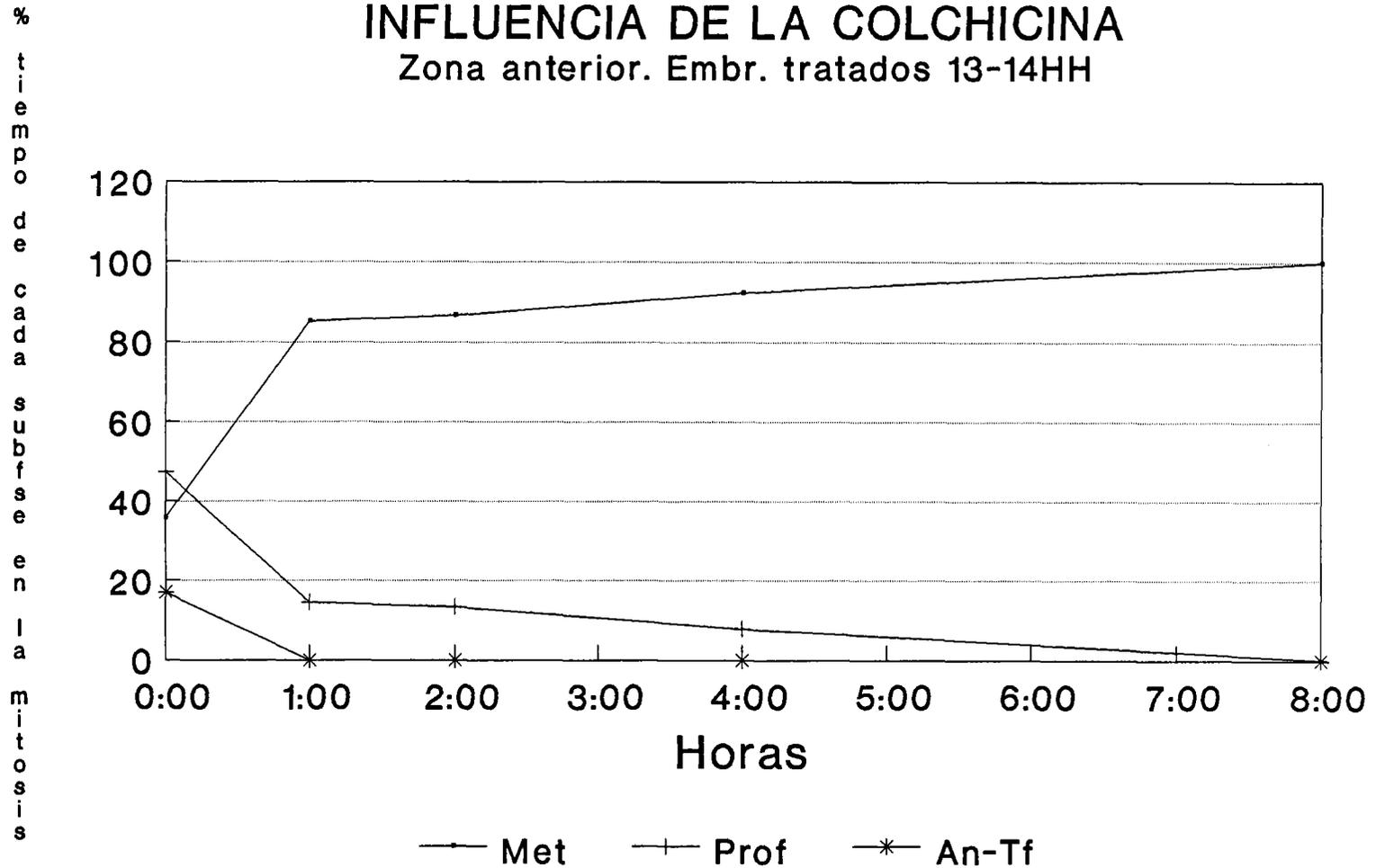
INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Gráfico nº 7

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Zona anterior. Embr. tratados 13-14HH

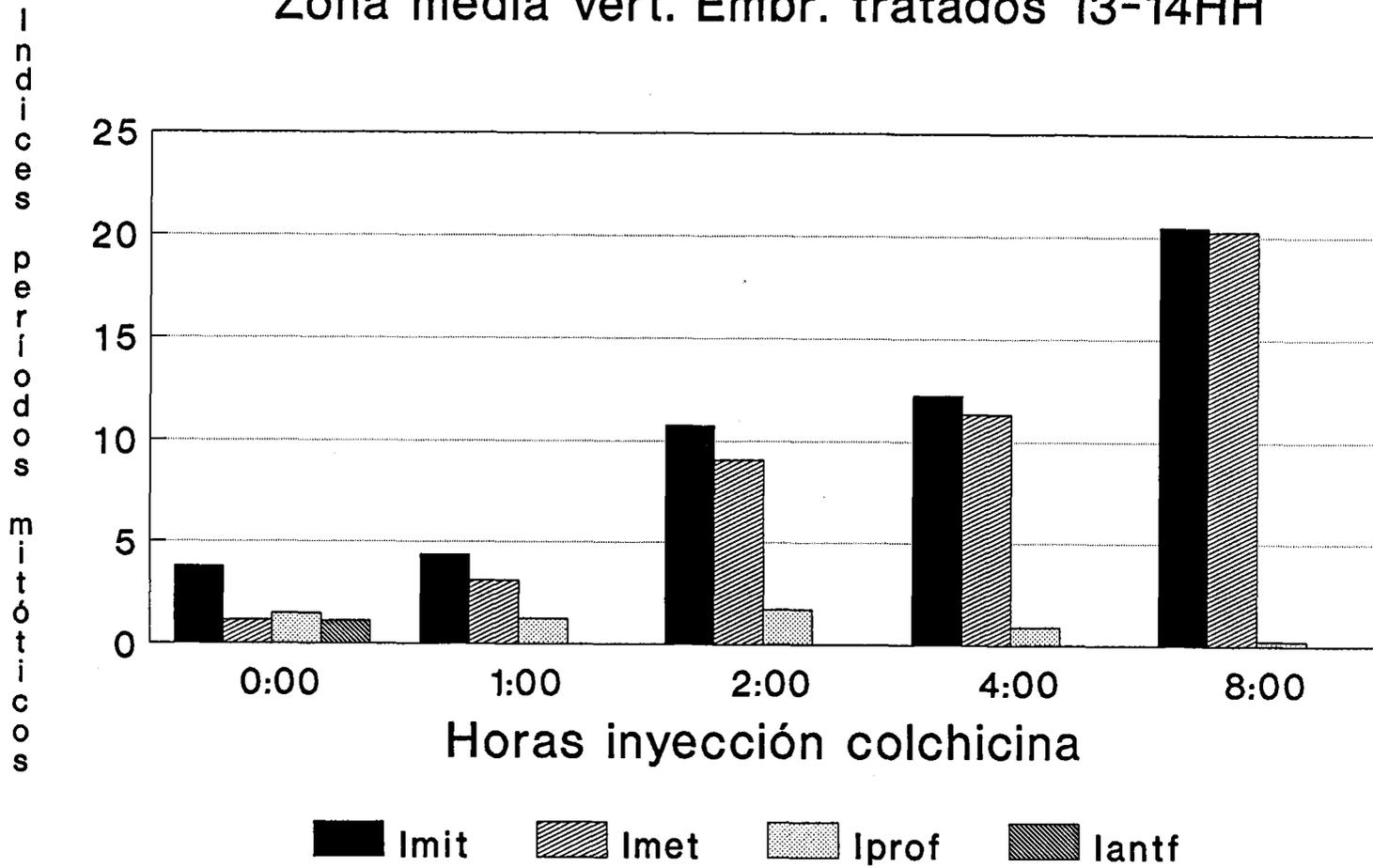


eje X: horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 8

INDICES MIT. Y SUBFASES

Zona media vert. Embr. tratados 13-14HH



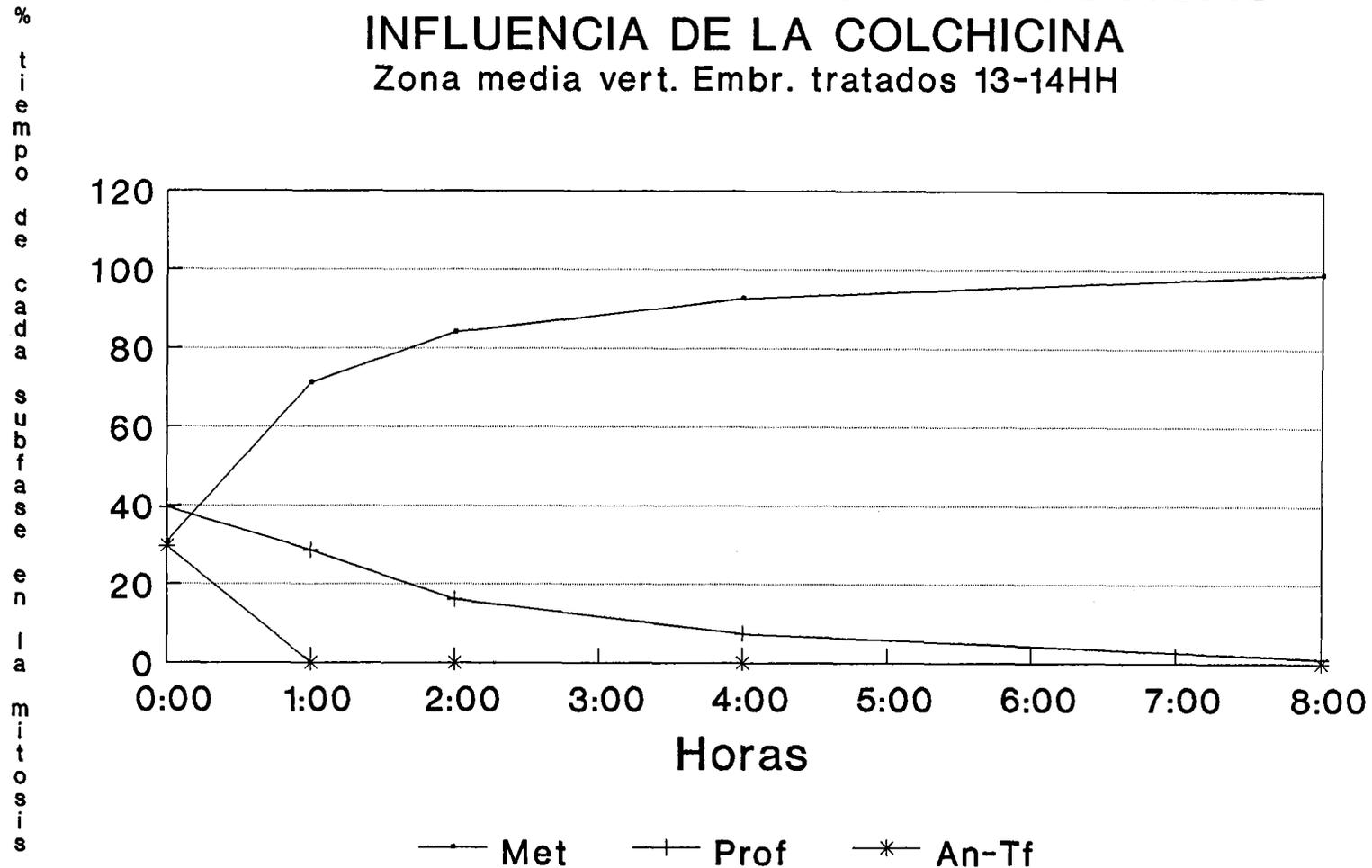
Influencia de la colchicina

Gráfico nº 9

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Zona media vert. Embr. tratados 13-14HH

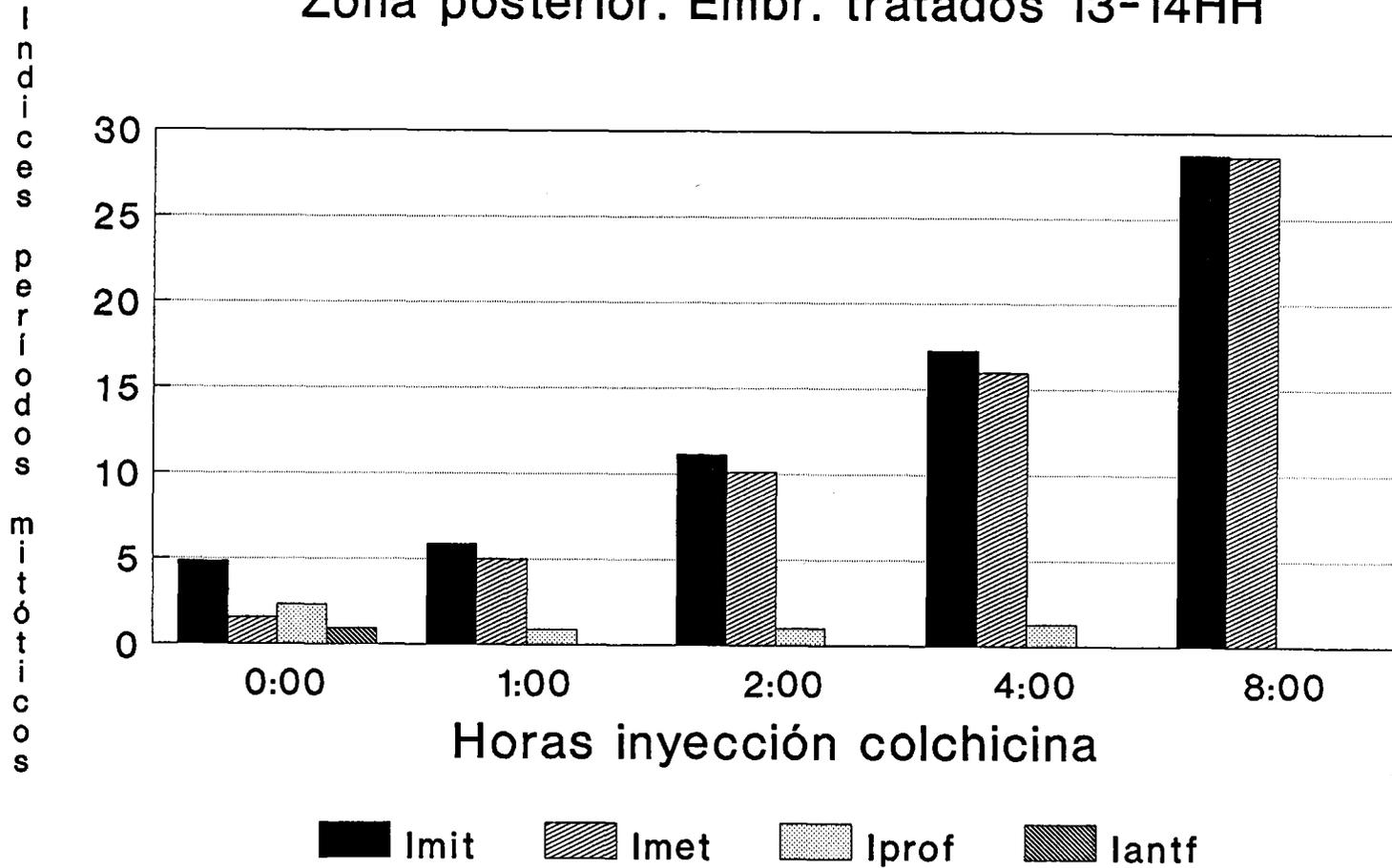


eje X: horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 10

INDICES MIT. Y SUBFASES

Zona posterior. Embr. tratados 13-14HH



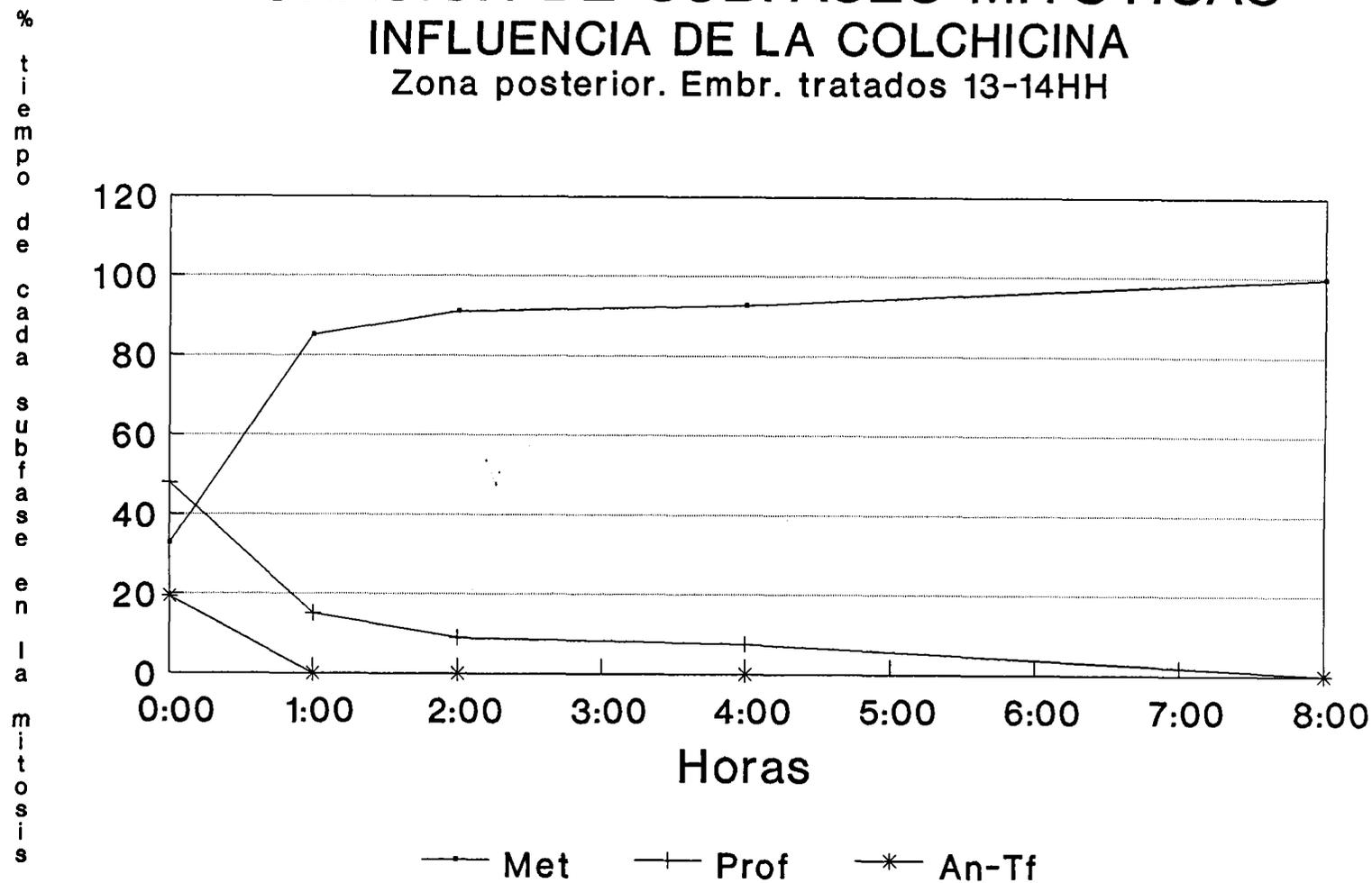
Influencia de la colchicina

Gráfico nº 11

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Zona posterior. Embr. tratados 13-14HH



eje X: horas inyección colchicina
 eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 12

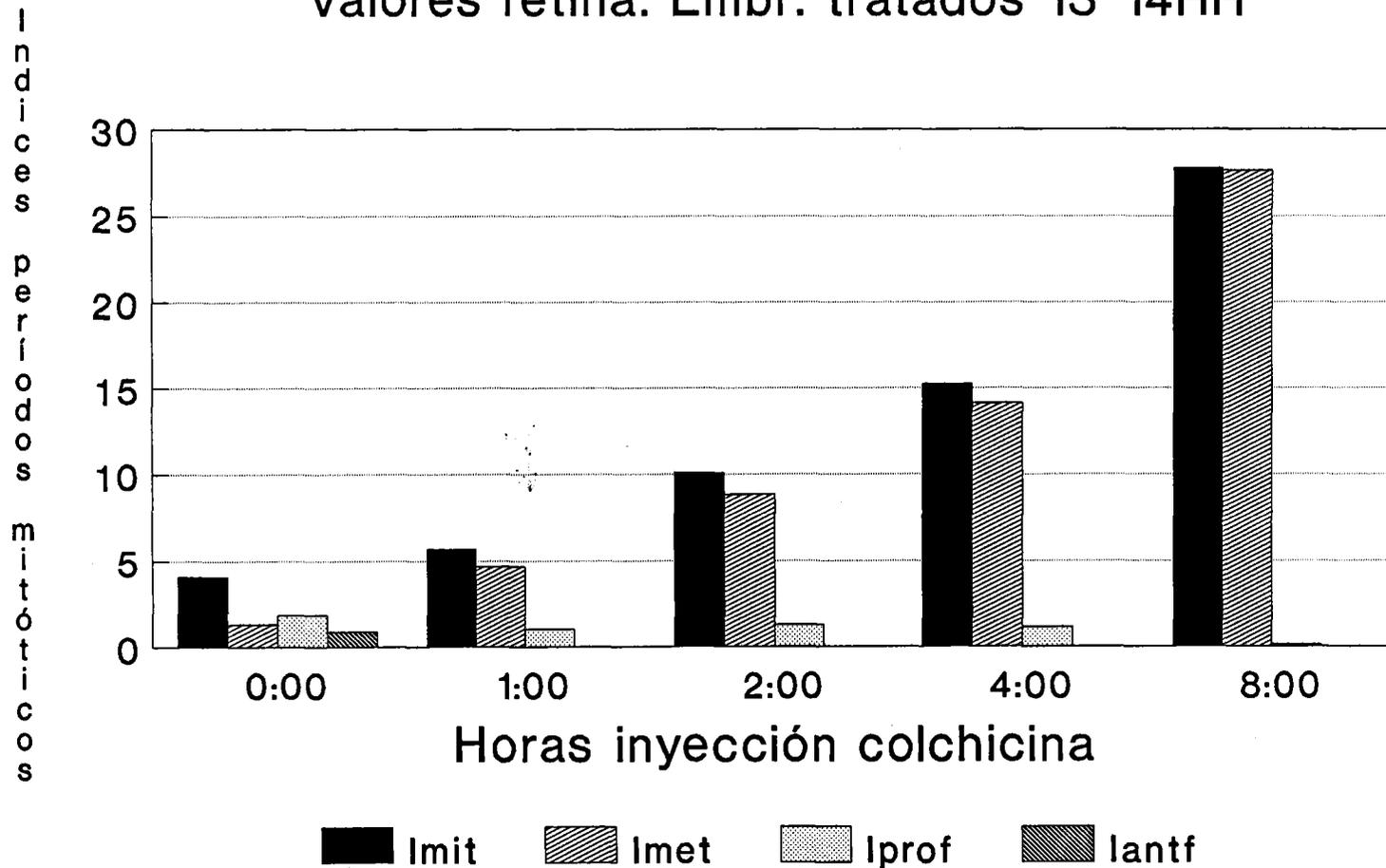
Cuando, como se representan en el histograma n° 13 y en las curvas del gráfico n° 14, se toman los valores globales obtenidos para toda la retina se puede comprobar que es válida la consideración general de que con el tratamiento se ha producido un incremento regular de metafases que cursa paralelo al tiempo de tratamiento y una disminución proporcional de las profases, que se hacen casi nulas a las 8 horas de tratamiento y que representa una acción de la droga sobre la situación del ciclo celular.

Con todo lo antedicho podemos entender que, con la prolongación regulada del tratamiento, se establece una pauta de modificaciones que permite seguir el ritmo de acumulación de las metafases y el proceso de incorporación de las profases y, con ello, dispondremos de un método para seguir las diversas poblaciones que cursan su evolución en cada período del desarrollo, porque la sucesiva acumulación nos está indicando las diferencias de progresión dentro del ciclo y los diferentes momentos de la diferenciación para el conjunto de elementos que constituyen la lámina retiniana en cada estadio.

El tipo de análisis realizado servirá igualmente, no sólo para poder distinguir la situación de las distintas regiones y su grado de maduración dentro de la retina, sino para conocer el patrón de constitución que venimos describiendo y con ello poder seguir en el futuro otros estudios sobre el destino celular tanto topográfico como temporalmente, sobre todo al añadir al procedimiento actual otros marcajes.

INDICES MIT. Y SUBFASES

Valores retina. Embr. tratados 13-14HH

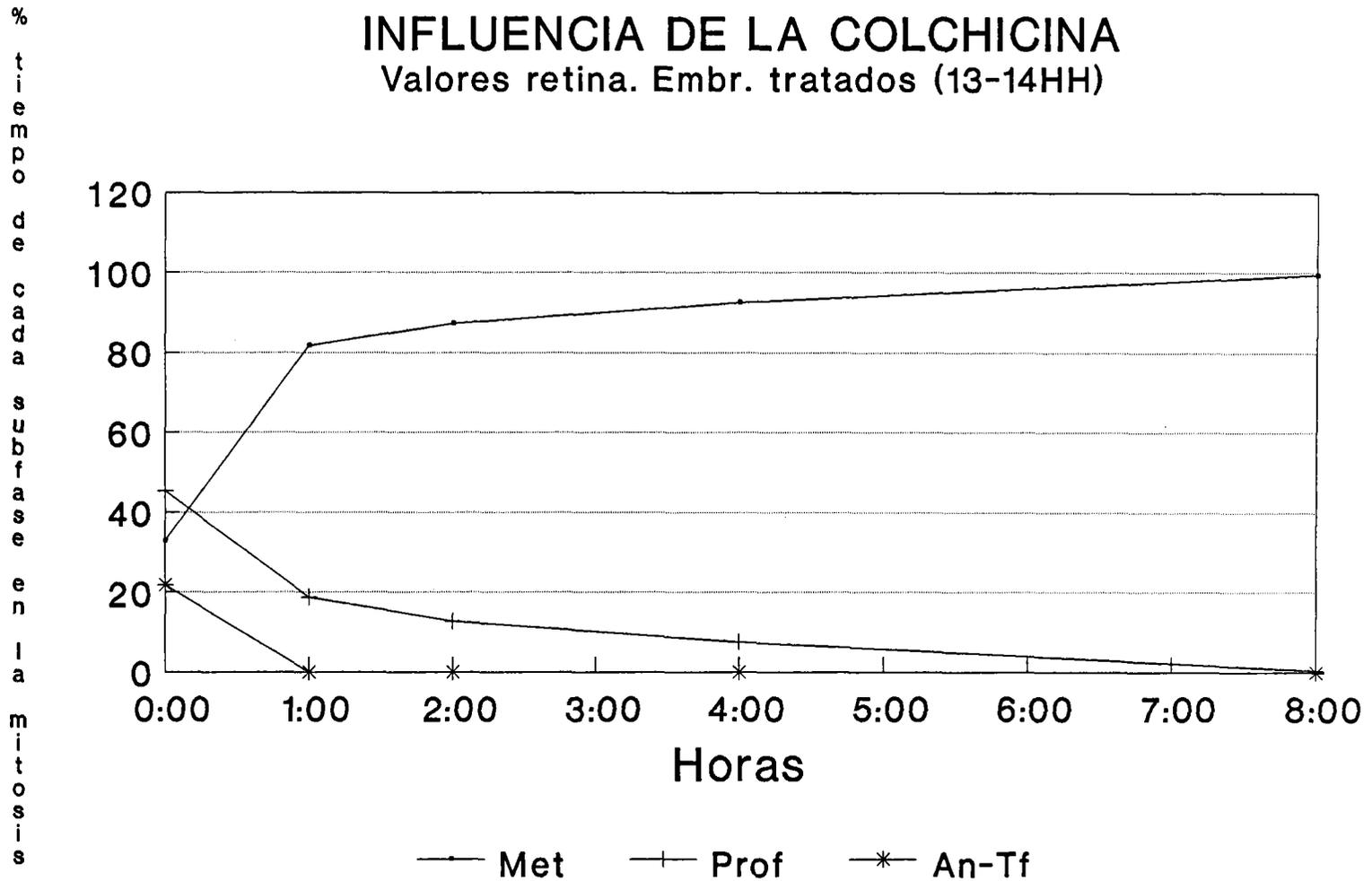


Influencia de la colchicina

Gráfico nº 13

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Valores retina. Embr. tratados (13-14HH)



eje X: Horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 14

EMBRIONES TRATADOS.

Volúmenes totales

Comienzo experiencia: Estadio 13-14HH.

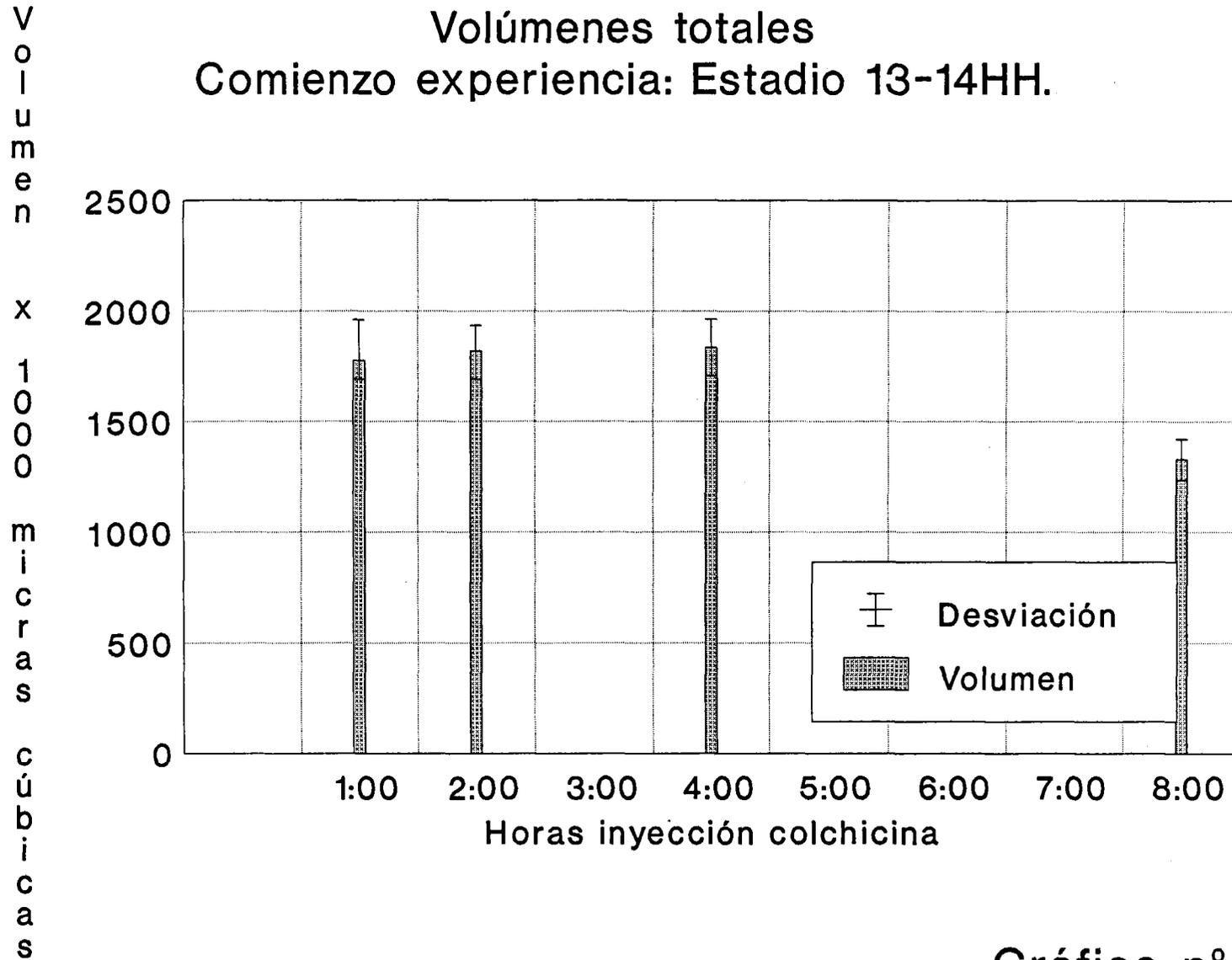


Gráfico nº 15

También a partir del conocimiento de lo que sucede con el comportamiento de las diferentes figuras mitóticas se pueden extraer otras consideraciones actuales, hipótesis y abrir caminos a futuras investigaciones. Así, vemos que del seguimiento de la presencia mayor o menor de profases, se puede ver el enlentecimiento que siga el ciclo y, junto con el análisis de los tamaños de los núcleos interfásicos, la forma de progresión celular dentro de la interfase. Combinando esta situación con el de la progresiva acumulación de metafases, se puede discriminar cuál es la situación de poblaciones y su grado de proliferación para el estadio o zona que interese estudiar. Interés similar sobre las variaciones de duración del ciclo en las primeras etapas del desarrollo aparece en los trabajos de Morris y Cowan (1984) y los ya mencionados de Fujita (1962), Kauffman (1968), Kahn (1973), Wilson (1974) y Calvente (1985). En el trabajo que aquí nos ocupa, y para no alargar excesivamente nuestra intención, solamente hemos querido profundizar en lo que hace referencia: a la distribución de proliferaciones, al conocimiento del patrón variable de divisiones mitóticas (según el momento y tiempo de tratamiento) y a la determinación de la intensidad en la producción celular para las regiones más activas. Con todo, podemos decir, a título de comunicación circunstancial, que de forma eventual (aunque en trabajos sin concluir) hemos realizado medidas: de tamaños celulares, de su distribución en el espesor retiniano y de su curva de frecuencias y que tales cuantificaciones pueden venir a representar en próximos trabajos un método, ciertamente cuidadoso, para lograr conocer el estado de los componentes retinianos de una zona o estadio del desarrollo. Esto será de un indudable valor para seguir el proceso de marcha de los ciclos y sugestivamente una forma de posible seguimiento de las fases "S" y "G₂".

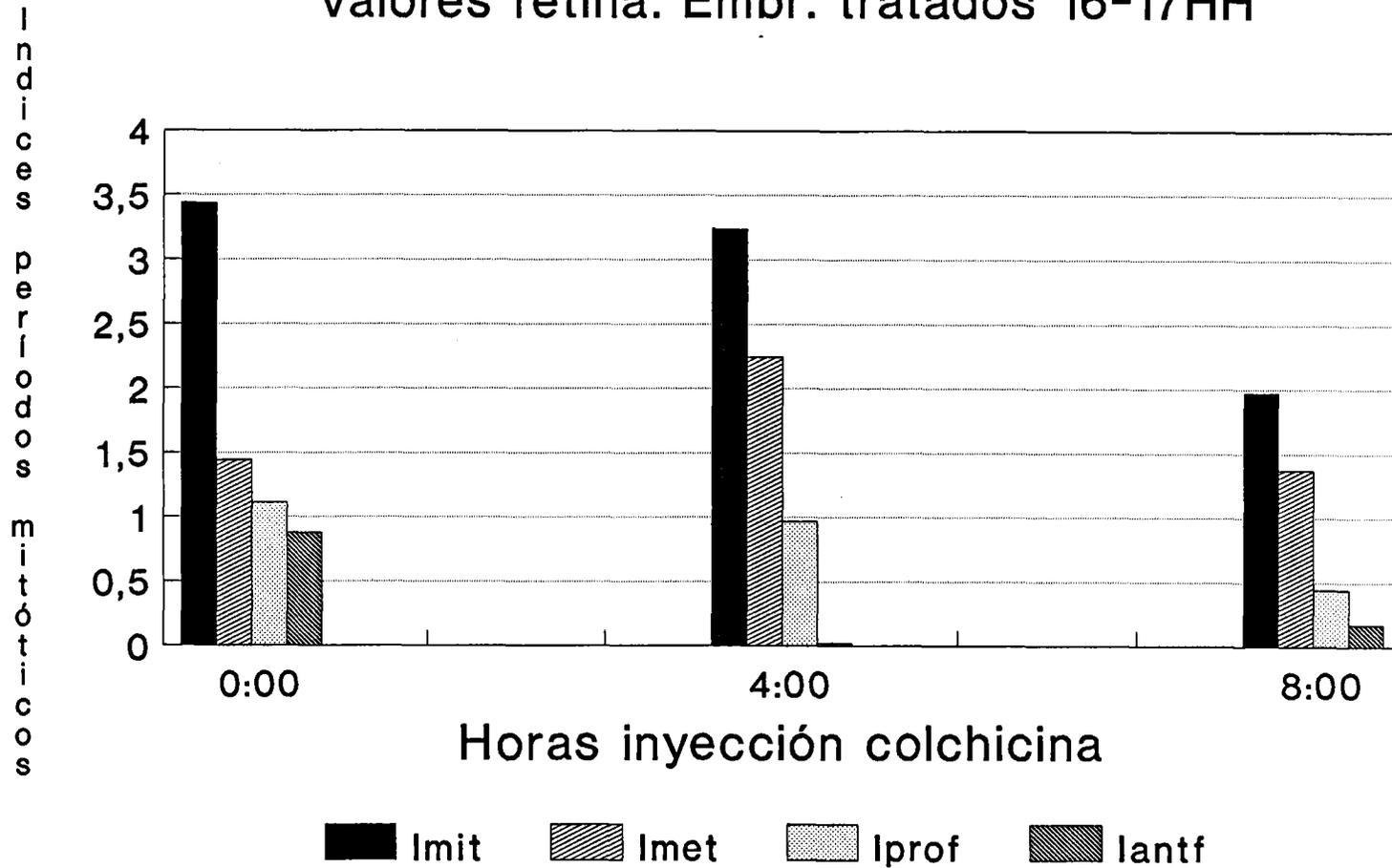
Cuando, como se recoge en los gráficos n° 16 y 17, se representan los histogramas y curvas de lo que ocurre al dar un tratamiento de 4 y 8 horas a partir de la hora 60 de incubación, apreciamos, como ya se relató en "Observaciones y resultados", que en los embriones tipo l6col4h el desarrollo e índice mitótico son parecidos a los de la situación normal y solamente resulta superior el valor de las metafases. Esta situación se puede entender al observar lo que acontece con las profases las cuales, como queda reflejado en las curvas del gráfico n° 17, apenas si se modifican en su número, a pesar del tratamiento. El mantenimiento de la cifra de profases y la ligera subida en el número de metafases (también compensada con la caída de las anafases) es lo que hace que se mantenga el índice mitótico. Pero la situación necesita de una explicación sobre el porqué se producen tales circunstancias.

Para contestar a la anterior cuestión podemos, o bien fijarnos en la situación numérica de cada índice y ver la manera real en que éste ha de influir sobre los valores globales (aclaración comprobada con el presente estudio), o bien se pueden aportar explicaciones de lo que, de alguna forma, tiene que haber ocurrido en las reacciones de las células, aunque en este caso nos falte la comprobación definitiva. En relación con la primera consideración, previamente tenemos que recordar cómo los embriones sin tratamiento al acercarse a la hora 60 de incubación comienzan a ofrecer un descenso paulatino en el número de profases, ascienden en el de anafase-telofase y se mantienen o suben ligeramente en el de metafases, y que, con las modificaciones de las profases, se produce un incremento proporcional y relativo del índice de metafases dentro de la mitosis. La situación descrita se va prolongando hasta el estadio 20 HH. de tal modo que, llegado este período del desarrollo, como las metafases van también disminuyendo, los valores de los tres subíndices se aproximan, y en su conjunto el índice mitótico desciende con cierta consideración, como corresponde a un estadio del desarrollo en el que se están produciendo unas apreciables

cantidades de células en G_0 (producto de la formación diferenciada de neuronas ganglionares), situaciones ya comentadas por autores como O'Rahilly y Meyer (1959), Kahn (1973) y Mishima y Fujita (1978), entre otros. Esta explicación es la que, a modo de resumen, y para los embriones sin tratar, se expone en la gráfica n° 18 .

INDICES MIT. Y SUBFASES

Valores retina. Embr. tratados 16-17HH



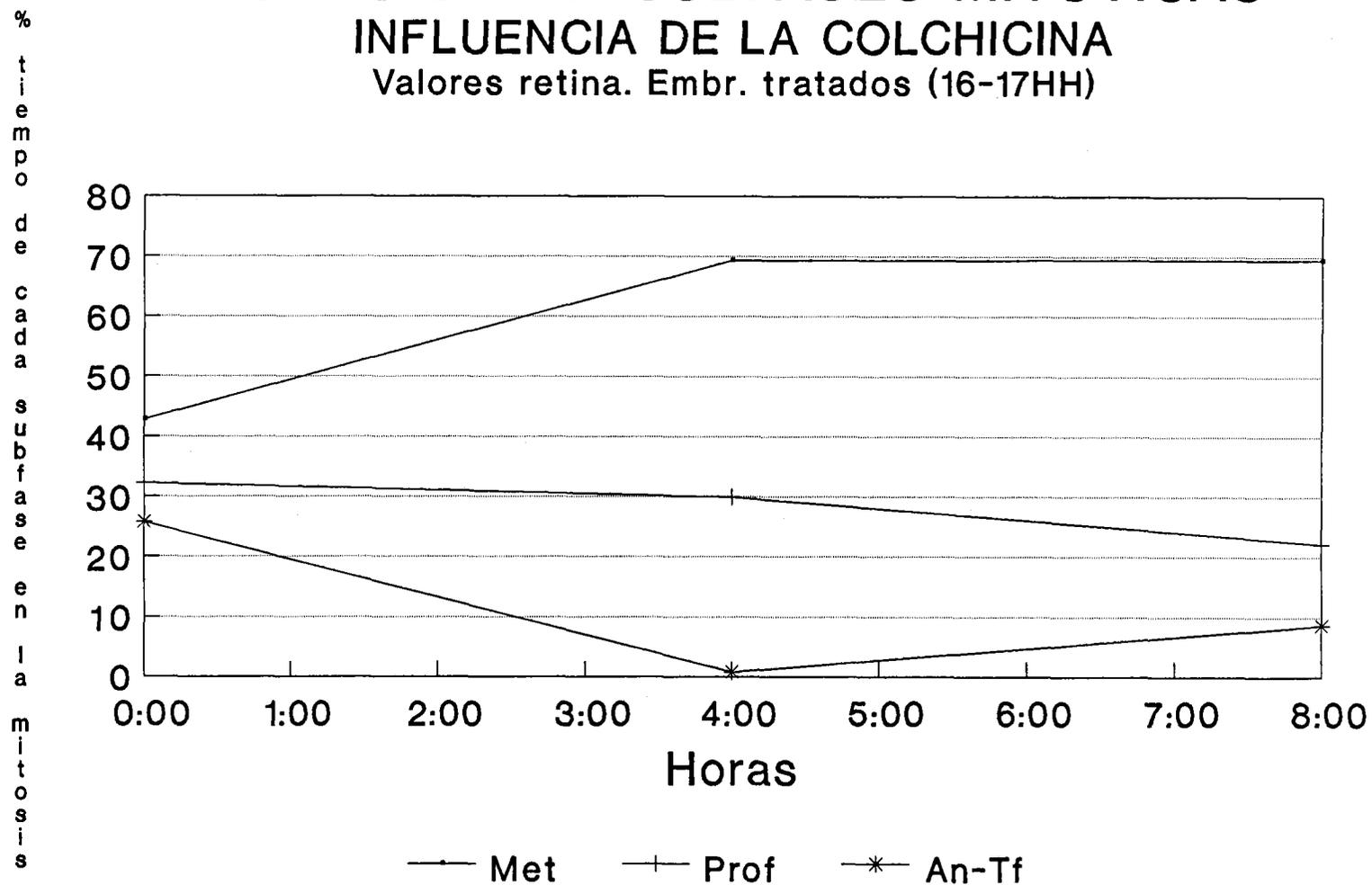
Influencia de la colchicina

Gráfico nº 16

DURACION DE SUBFASES MITOTICAS

INFLUENCIA DE LA COLCHICINA

Valores retina. Embr. tratados (16-17HH)



eje X: Horas inyección colchicina
eje Y: % Tmit ocupado por cada subfase

Gráfico nº 17

INDICE MITOTICO Y DE SUFASES

Valores normales para los estadios:

13-14HH, 16-17HH y 19-20HH

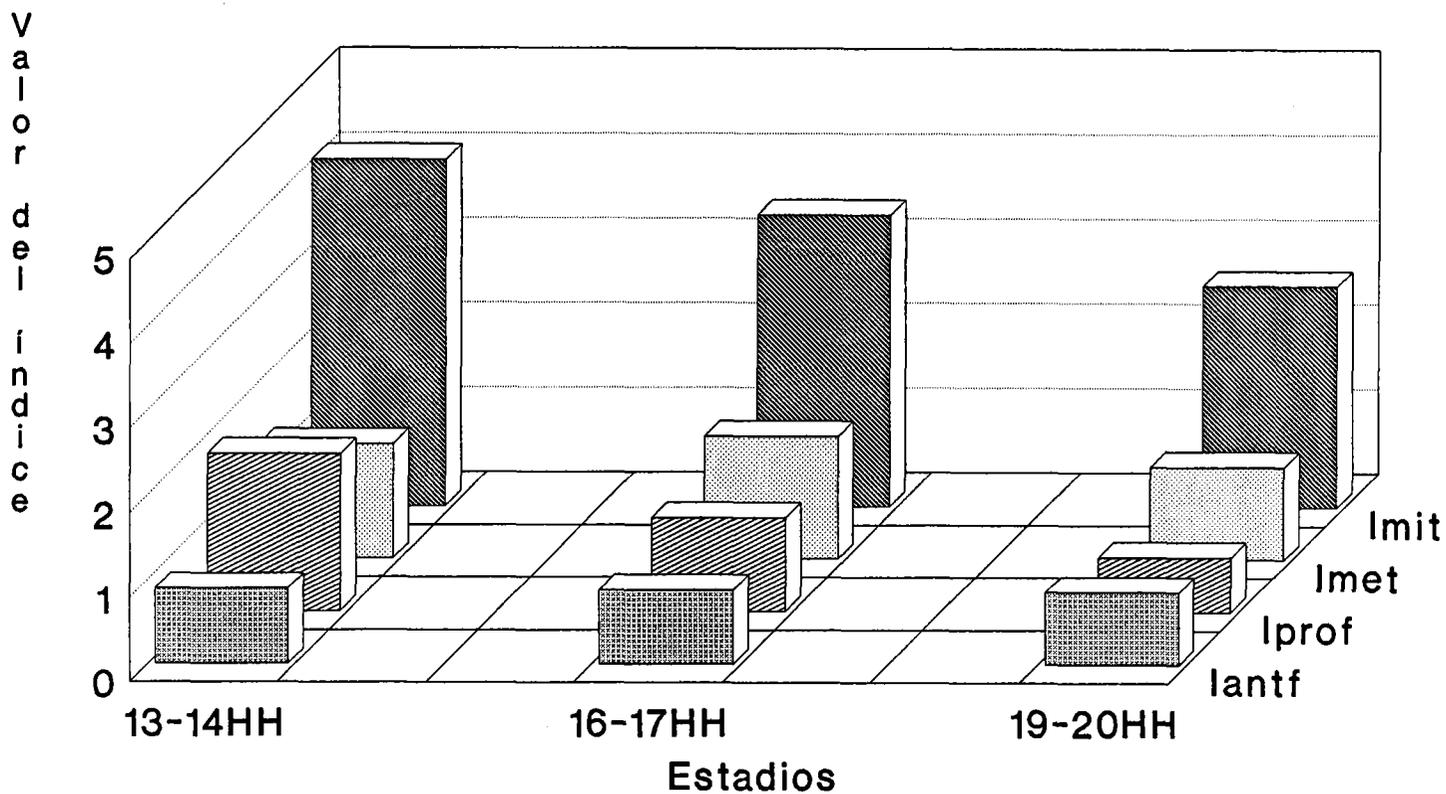


Gráfico nº 18

A partir de las anteriores consideraciones se puede entender que, cuando a las 60 horas de incubación se pone el material objeto de estudio bajo la acción de la droga, nos encontramos con unas células en distinto grado de competencia del que teníamos en los embriones 13col. Con ello, el número de células en posición de ser afectadas es considerablemente menor, y, por otro lado, el estado fijo (G_0) que van alcanzando muchas células incrementa el número de interfases, real y proporcionalmente, con lo que el índice de las divisiones tendrá que descender forzosamente. Cuando, sobre esta situación llegue la colchicina, su acción podrá frenar fundamentalmente la entrada en anafase-telofase, afectará menos a las profases, sobre todo en los tratamientos cortos, y y sí producirá simultáneamente un incremento en el número de metafases conforme el tratamiento se prolongue.

Con la anterior explicación, se comprende lo que tiene que haber ocurrido, desde un punto de vista cuantitativo, para que se produzcan las cifras encontradas y expuestas en tablas y test de comparación, pero no se aclara con ello, para estas experiencias tipo 16col y desde un punto de vista cualitativo, cuál pueda ser sobre las células en interfase la actuación íntima de una droga que apenas si parece que está influyendo, pero que indudablemente está llevando a cabo alguna acción desde el momento en que las anafases-telofases descienden y en metafases hay signos morfológicos de afectación. Por consiguiente, nos encontramos ante dos posibles explicaciones: la de una base de construcción celular con poblaciones diferentes sobre las que va a actuar la droga y (como se apuntó con anterioridad) la de una mayor dificultad a la llegada de la colchicina a su diana. Ambas situaciones se dan en realidad solapadamente y no cabe duda en que el substrato celular ha cambiado y el desarrollo de la copa cuenta con una estructuración que se encontrará más protegida de cualquier influencia exterior modificadora, pero, a pesar de la evidencia de estos hechos, será conveniente el profundizar más adelante en tales extremos con el fin de aclarar

el lugar y forma donde tales modificaciones y las mencionadas dificultades se están produciendo.

Los test de comparación n° 5 y siguientes (expuestos en el capítulo de "Observaciones") nos pusieron en evidencia la realidad de las diferencias encontradas con la variación del tratamiento en los índices analizados. Aquí y a partir de aquellos datos, hemos confeccionado los gráficos números 19 al 22, en los que se representan las combinaciones de los histogramas comparativos que nos han parecido de una mayor significación. Vienen a ser, como un resumen final de cuanto hemos estado feseñando.

En el gráfico n° 19, se expone la situación de variación en los cocientes o índices, dentro de la mitosis, para embriones sin tratar (hora "0") y los que recibieron un inicial tratamiento de una y dos horas. Se comprueban los paulatinos y regulares ascensos y disminuciones en los correspondientes valores. En las gráficas números 20 y 21 queda de manifiesto la considerable cifra o aumento que se produce en relación con la situación normal (estadio 16.17 HH.), cuando se prolonga sustancialmente el tratamiento (situación 13col8H). En el gráfico de la figura 21, se incluye también lo obtenido al llevar a cabo un tratamiento durante 4 horas a partir de las 60 de desarrollo y se aprecia con nitidez el diferente modo de actuación de la droga sobre unos embriones y otros. Por último, en el gráfico número 22, se puede comprobar que el largo tratamiento (8 horas a partir de la hora 60) ha producido un drástico freno en el desarrollo, que pese a la disminución que se produce en el número de interfases, proporciona valores de reducción en los índices, cuando se les compara con los que se alcanzarán al realizar las incubaciones sin la influencia de la colchicina. Indudablemente tiene que haberse producido una pérdida celular en número de elementos.

INDICE MITOTICO Y DE SUBFASES

Etapa de desarrollo: 13-14HH

Influencia de la colchicina

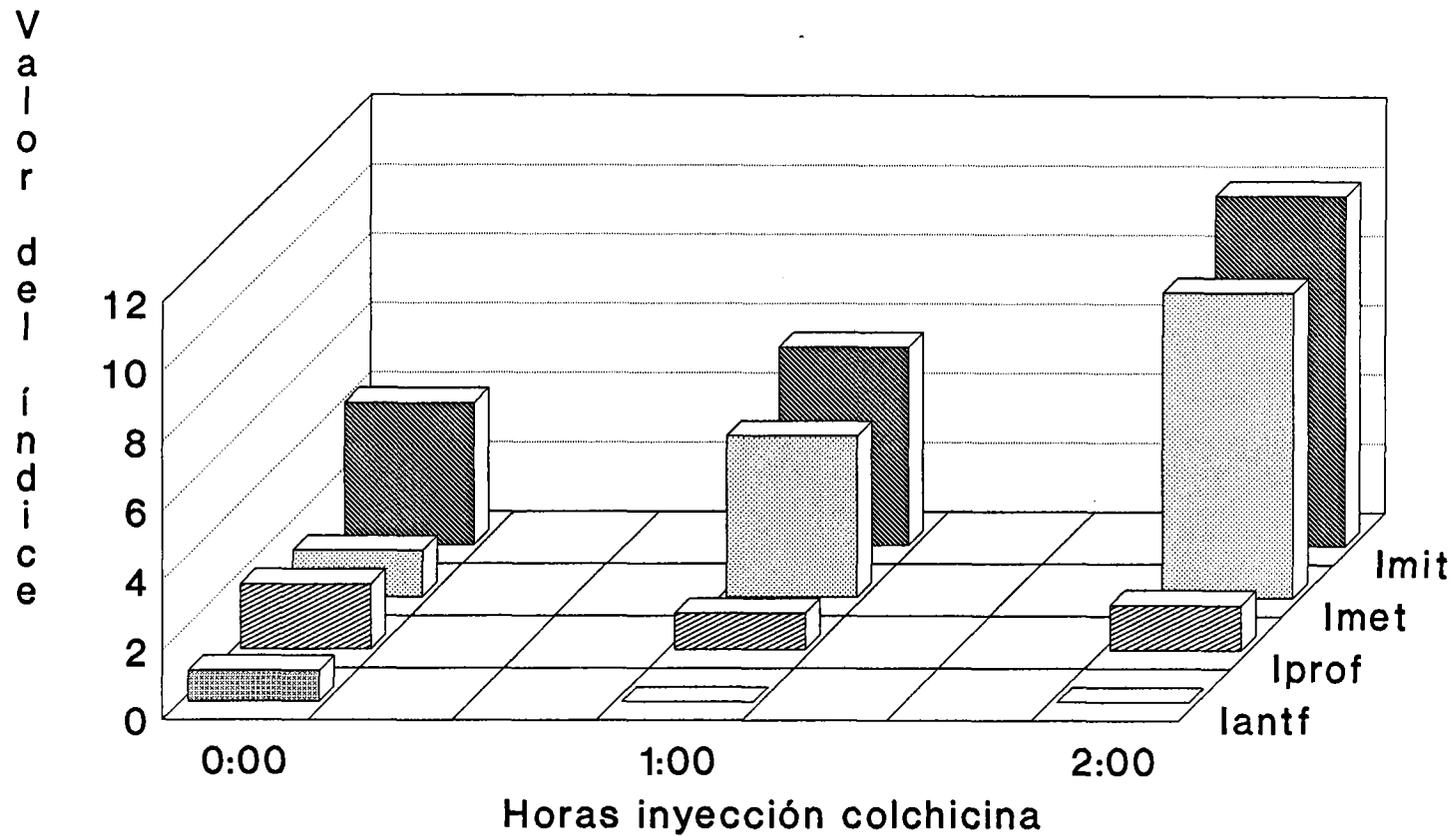


Gráfico nº 19

INDICE MITOTICO Y DE SUBFASES

Etapas: 13-14COL4H (15HH) Y 16-17HH.N
Influencia de la colchicina

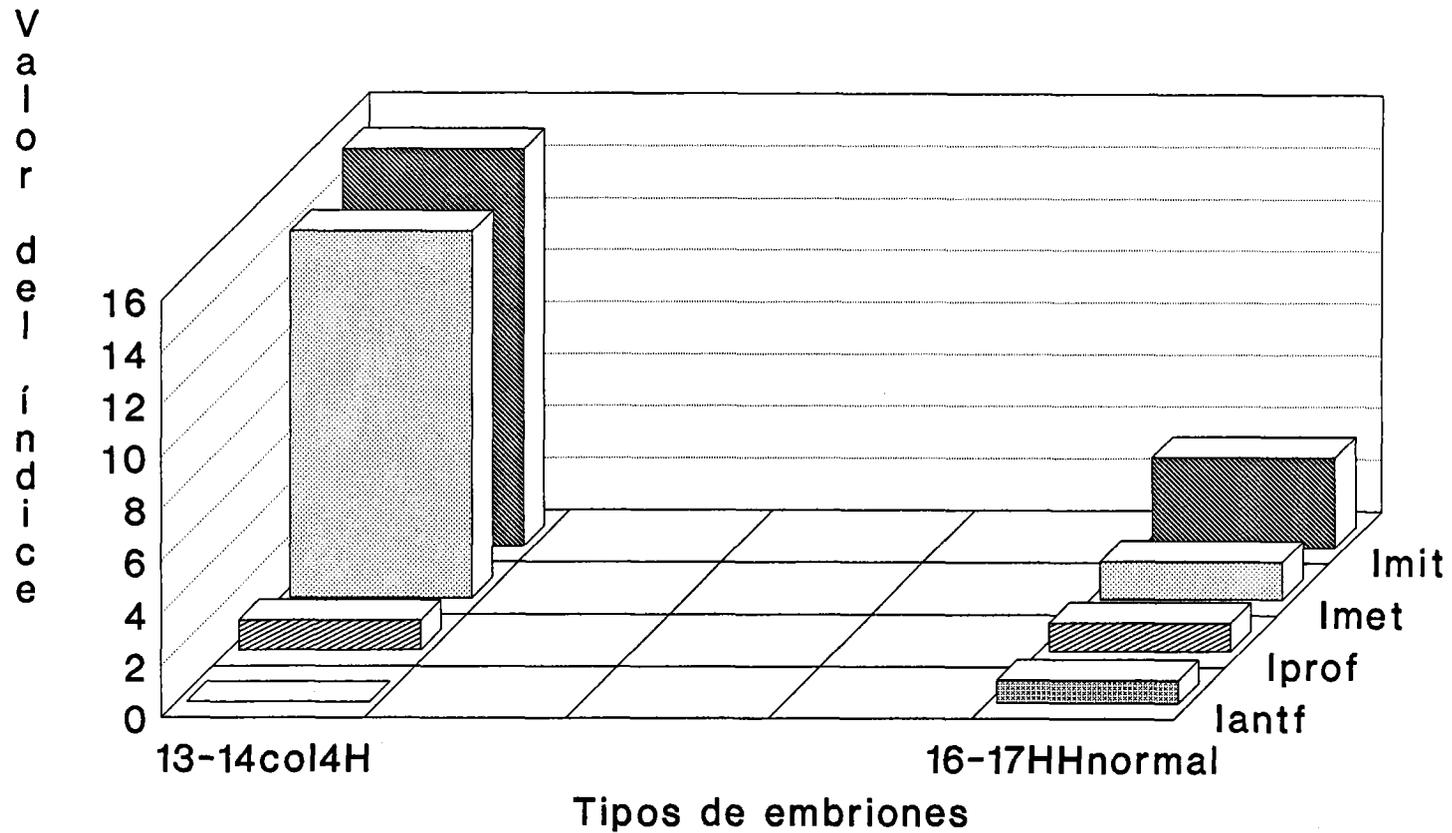


Gráfico nº 20

INDICE MITOTICO Y DE SUBFASES

Etapa desarrollo: 16-17HH

Influencia de la colchicina

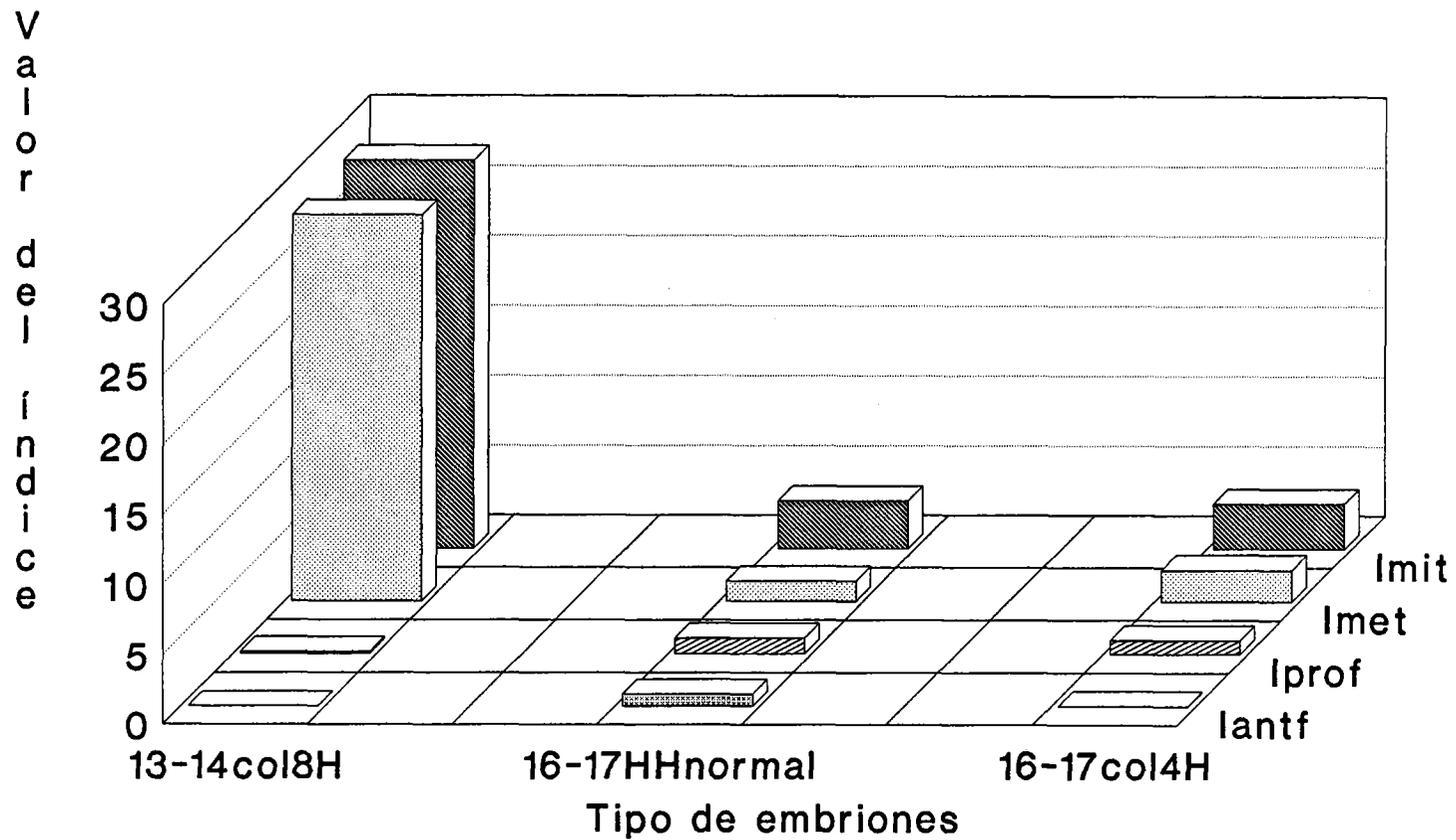


Gráfico nº 21

INDICE MITOTICO Y DE SUBFASES

Etapa desarrollo: 19-20HH

Influencia de la colchicina

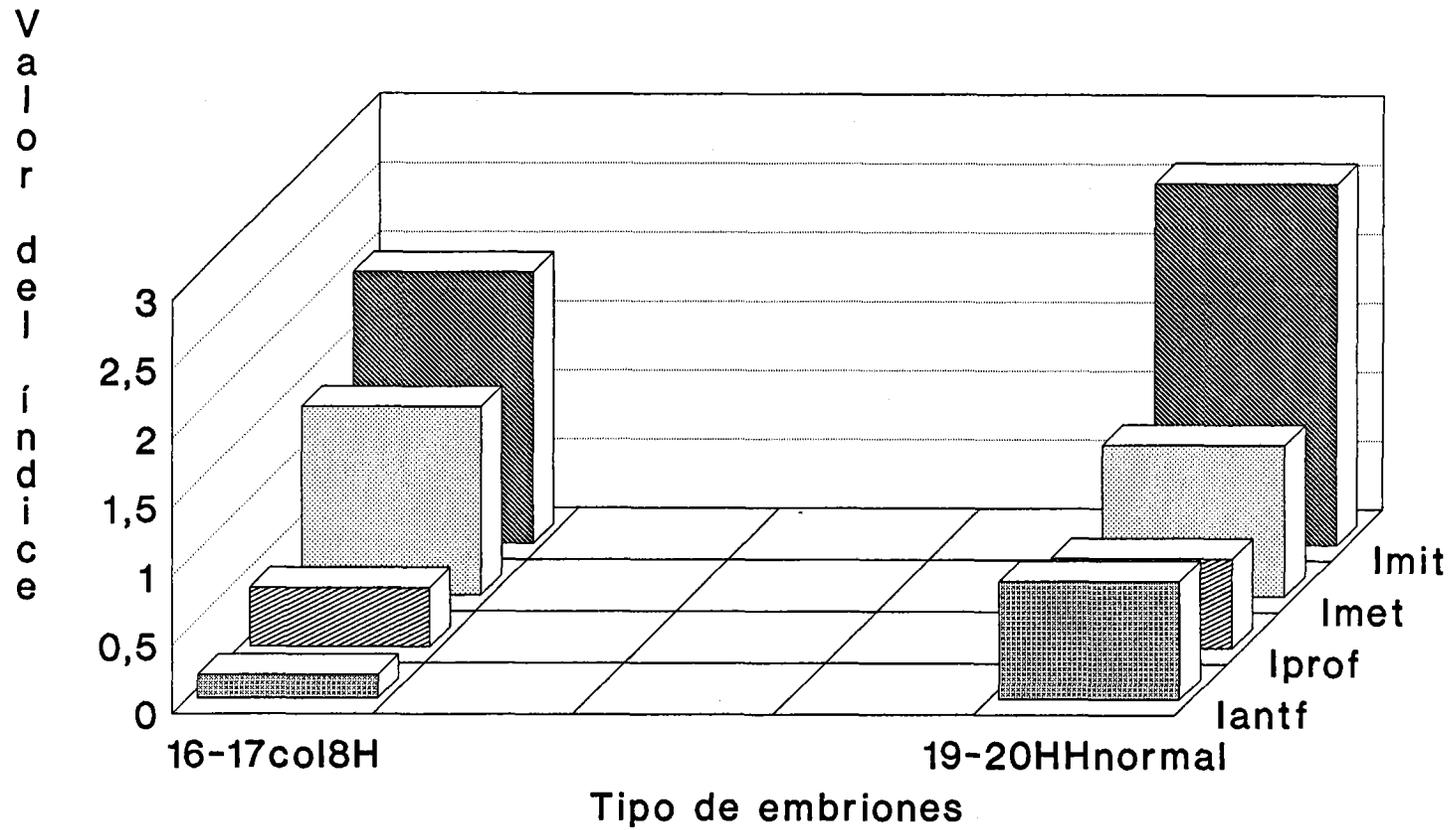


Gráfico nº 22

4.- Sobre el comportamiento celular particular y su significado en el entendimiento de los datos relatados con anterioridad.-

Relatemos, a continuación, algunas de las situaciones que ya se ofrecieron al describir la parte correspondiente a las observaciones microscópicas y que suponen aspectos puntuales de los encontrados a nivel celular individual.

Al realizar la reacción de Feulgen, se nos ha puesto de manifiesto el material desoxiribonucleico con la especificidad y limpieza habitual que produce esta reacción cuando se realiza apropiadamente. Con el método se ponen en evidencia tanto los cromosomas de las células en división, como la cromatina y los cromocentros de las células en interfase. El haber empleado este proceder para el estudio estereológico que nos ocupa, ha resultado de considerable utilidad, no sólo por su conveniencia cuando se quieran determinar estequiométricamente valoraciones de la cantidad de ADN en las distintas situaciones, sino también para las determinaciones morfométricas y recuentos, pues, además de proporcionar un material que hemos podido comprobar no da variedad de perfil con los resultados cuando se emplean anilinas, nos proporciona imágenes más limpias y de mejor significación en la diferenciación de zonas que muestran poseer un carácter distinto.

La reacción, ha puesto de manifiesto, tal y como se observa en la imágenes de las figuras n^o 3, 11, 12, etc. (en capítulo de "Observaciones"), la existencia de grumos positivos que interpretamos se corresponden con depósitos de nucleicos originados por la cariólisis celular. En situaciones y aumentos apropiados, como el ofrecido en la figura 59, estos grumos se detectan contenidos en pequeños grupos dentro de bolsas de membrana nuclear. La intensa aparición de los mismos ha de corresponder con un incremento de la muerte celular, en este caso seguida de la desintegración del material nucleico.

Pero no siempre la intensidad de muerte celular hay que adscribirla a estas imágenes, sino que al detenerse a observar las células se pueden apreciar figuras de condensación de la cromatina que, por su tamaño e intensidad de tinción, nos repiten la imagen de una picnosis como signo instaurado o próximo de muerte celular (en el presente estudio no se han llevado a cabo determinaciones de la cantidad que representaba esta situación en cada zona, porque suponía otro tipo de estudio, pero sí podemos afirmar que, sin quitar influencia al interés que tal estudio pueda tener, la cifra en sí no afecta de manera significativa a las variaciones estudiadas, toda vez que, los índices obtenidos se refieren a número de elementos en el espacio contenedor correspondiente, por tanto, conocer sobre las destrucciones celulares podrá suponer un objeto de interés para entender mejor la razón de determinadas variaciones, pero este conocimiento no es necesario para poder afirmar la realidad numérica de una variación, máxime cuando las cifras que se obtienen representan con frecuencia valores cruzados; es decir, que el descenso de unos elementos va seguido del aumento de otros.

Resulta de interés relatar, tal y como se aprecia en las metafases de las figuras números 13 a 18 y 19 a 26, que conforme aumenta el tiempo de tratamiento (sobre todo el lo embriones tipo 13col) las estrellas metafásicas aparecen más condensadas y con tal imagen queda de manifiesto que la colchicina no sólo ha producido una acción sobre las estructuras microtubulares del huso sino también alguna otra acción que ha incrementado la retracción cromosómica, ya sea directamente o a través de alguna otra mediación desconocida.

A partir de las observaciones realizadas sobre los embriones que tuvieron una incubación de 60 horas sin tratamiento y que posteriormente recibieron la colchicina, se puede apreciar que algunas figuras de profase y metafase ofrecen

imágenes peculiares de condensación cromática e incremento en el tamaño de las profases (fig. n° 52) y de aglomeración de cromosomas (conjunto tetraploide) en metafases, que no se aprecian en condiciones normales o en los estadios tratados 13col (ver figs. n° 55, 56 y 64). Esta situación pone de manifiesto que encontramos signos a nivel celular, que hacen sospechar la diferente situación básica que ofrecen las células a partir aproximadamente de la hora 60. Se da con ello un modo, posiblemente diverso, de acción de la colchicina sobre ellas. Por otro lado, como se aprecia en las imágenes números 54, 55 y 56, las células constitutivas de la lámina prospectiva del epitelio pigmentario ofrecen, al compararlas con las de la retina, una forma y momento de competencia diferente a la posible acción de la colchicina, lo que nos vuelve a indicar diversidad en los comportamientos celulares según el lugar y tiempo en que se estén produciendo las afectaciones. En este mismo sentido, y analizando los contenidos de una zona de alta proliferación, como es la del polo posterior ofrecido en la figura 53, se ha detectado diversidad de imágenes de la materia nuclear, lo que nos lleva a la pregunta de si tales figuras podrán representar la diferente situación de células que puedan encontrarse en momentos distintos de la diferenciación y, con ello, vengán a suponer los varios comportamientos que han de conducirnos a la consecución de células tan diversas como puedan ser las amacrinas o incluso las gliales.

En imágenes análogas a ésta representada en la fig. n° 53, nos llama también la atención la aparición de una condensación periférica de materiales cromáticos así como la de un incremento de grumos cromocéntricos, alguno de ellos de una repetida y curiosa localización central. Al relatar la imagen en la microfotografía correspondiente se escribe, allí, con interrogante la posibilidad de que se pudiera tratar de nucléolos, pero tal circunstancia carece aquí de sentido toda vez que se trata de una reacción de Feulgen. ¿Qué se puede pensar, entonces, ante la imagen?, que muy posiblemente estamos ante

la presencia de una acción de la colchicina más o menos directa sobre productos de la interfase.

Terminemos este comentario, haciendo algunas consideraciones sobre el sentido de algunas situaciones puntuales y su utilidad, para proseguir estudiando en un futuro sobre los múltiples aspectos en los que conviene obtener información. Se trata de ocuparnos, además de otras que ya hemos apuntado, de cuestiones como: El posible papel de las láminas basales (vistas en secciones como la de la figura 24, que claramente han podido ser puestas de manifiesto con el método seguido y representan un material de interés actual en la diferenciación); también es de interés seguir las causas de la esfericidad celular con tendencia a la retracción y aislamiento de las células vecinas (que se aprecian en figuras como la n^o 59 ó 60) o la frecuencia con la que, en estadios avanzados, las metafases afectadas se nos presentan en pequeños grupos (fig. n^o 63). También es de tener presente que, si bien las células para dividirse se acercan al borde ventricular, no parece que la situación física sea necesaria (tal vez sí algún tactismo o inducción) porque, cuando este borde limitante está ocupado por metafases acumuladas, se siguen depositando nuevas oleadas en alineaciones más interiores.

Todo lo dicho, nos lleva a considerar que es conveniente seguir realizando experiencias "in vivo" y estudiando las modificaciones en el lugar que se producen y que, si bien no se pueden desconocer las ventajas de los estudios "in vitro", los análisis como el presente resultan imprescindibles para conocer los modelos de desarrollo e incluso incrementar su utilidad, añadiendo otras técnicas de marcaje y determinación de valores morfométricos y densitométricos.

Realizados todos los anteriores comentarios pasamos a continuación a relatar las conclusiones definitivas que de todo cuanto se ha descrito y dicho se desprenden:

CONCLUSIONES.-

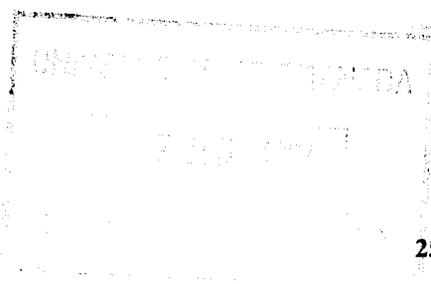
1ª.- Los análisis estereológicos son necesarios y válidos para poder seguir la evolución del desarrollo y la diferenciación celular en modelos que, como el presente de la copa óptica, suponen un espacio cerrado contenedor, con diversidad de líneas celulares o poblaciones a distinguir.

2ª.- El empleo de la colchicina, como medio de análisis durante el desarrollo de la copa óptica, ofrece una buena ayuda experimental, para el estudio de los fenómenos de construcción y diferenciación, que están teniendo lugar en las etapas iniciales del desarrollo.

3ª.- El método histoquímico de Feulgen, habitualmente empleado para la detección de ácido desoxirribonucleico, ha resultado ser un medio apropiado para el estudio de las poblaciones celulares, constituyentes de la retina de pollo, sobre todo, en sus primeros estadios del desarrollo.

4ª.- La colchicina, al frenar las divisiones celulares, interrumpe el desarrollo y con ello, las interacciones que han de realizarse entre la copa óptica y el cristalino lo cual producirá las consiguientes modificaciones mutuas.

5ª.- Las modificaciones que se producen en la pared cerebral, no sólo resultan de valor para poder confirmar que ha tenido lugar una correcta difusión de la droga, sino que pone de relieve, la variedad de comportamiento de clones celulares, que actúan como conjuntos poblacionales de diversa reacción o base de maduración para la influencia de la colchicina. Con ello, contamos con un método para poder diferenciar territorios dentro del conjunto estudiado.



6ª.- El empleo de la colchicina nos ha permitido, al modificar la situación de la evolución normal de las células de la retina de pollo, conocer la diversa constitución de las zonas de la misma en lo que a proliferación y estado de maduración de zonas se refiere. En este sentido y al igual que ya habíamos visto con otros estudios anteriores, las zonas medias o centrales son las más antiguas o maduras.

7ª.- Es posible que la droga modifique la longitud del periodo interfásico, enlenteciendo con ello la entrada de células en profase.

8ª.- Ante el tratamiento con colchicina, el epitelio pigmentario muestra un distinto modo de reacción en su forma y en el tiempo que aquel que se detecta en la retina. Sus células y núcleos ofrecen imágenes más esferoidales y su reacción ocurre, en general, más tardíamente.

9ª.- Con la variación e incremento de los tiempos de tratamiento, la acción de la colchicina nos permite confirmar la diferente marcha de sus células constituyentes, y nos ha proporcionado un modelo morfométrico y cuantitativo que servirá, en posteriores estudios, para seguir el destino de esas poblaciones (lógicamente modificando las experiencias y añadiendo otros tratamientos o marcajes).

10ª.- El análisis de las entradas de las células en profase junto con el estudio de los tamaños celulares y nucleares, proporciona un método con el que podremos posteriormente conocer la situación de células en los distintos periodos del ciclo (G_1 , S y G_2 , combinación de morfometría y densitometría).

11^a.- El incremento de metafases con alto número de interfases, representa allí donde tenga lugar, la existencia de regiones más proliferativas y por lo mismo lugares más recientes de aparición, con lo que sus células, suponen un material menos cercano a los ciclos cuantales.

12^a.- Tras la acción de la colchicina, los embriones de pollo han puesto de manifiesto la existencia de un período crítico comprendido entre los estadios 13 HH a 16 HH, que se muestra favorable para una interferencia de la colchicina deteniendo las divisiones celulares. A partir del estadio 16 HH la influencia de la droga es menos acusada y la estructura general de desarrollo se afecta sólo ligeramente.

13^a.- Como las zonas de mayor acúmulo o afectación de metafases son las más proliferativas, podemos mediante su estudio, detectar los lugares en los que se esté, en cada momento, produciendo la expansión de la copa y los últimos reductos de conformación. Conforme se avanza en el desarrollo, estas zonas van quedando confinadas a las regiones del tallo y a los polos extremos de la estructura.

14^a.- El empleo del método de Feulgen ha servido también para poner de manifiesto: las variaciones en la reacción cromosómica, los grumos reveladores de cariólisis, la positividad de láminas basales entre cristalino y retina, la existencia de reacción de las células por grupos y las diferencias y ventajas, que se pueden comprobar, de realizar estudios "in vitro" a hacerlo "in situ".

15ª.- Con el aumento del tiempo de tratamiento, se produce paulatinamente un incremento en la condensación de cada imagen metafásica, dando figuras cada vez más reducidas y oscuras que suponen una continuación de la acción de la colchicina más allá del ejercido sobre el citoesqueleto (se trata de un mecanismo que, directo o no, desconocemos por el momento).

16ª.- A nivel de la situación celular, el método seguido en el presente estudio, nos ha proporcionado, tras el tratamiento, una variedad de imágenes, que avalan la afirmación de que la colchicina produce otras modificaciones distintas a las ya conocidas sobre los microtúbulos en la división.

BIBLIOGRAFIA

ABADIA FENOLL, F; R. CALVENTE y R. CARMONA (1984).- A reconstruction of chick embryos optic cup and a study on the distribution of mitotic figures at 13th and 17th stages. *Acta Stereol* 31(1), 63-66.

ABADIA FENOLL, F; R. CALVENTE, M. V. OSTOS y R. CARMONA (1983).- Un método para la orientación y reconstrucción de estructuras histológicas (ejemplo, copa óptica). *Morf Norm y Patol Sec A* 7/3, 961-96

ABADIA MOLINA, F. (1987).- Análisis topográfico de la actividad proliferativa de los elementos neuroepiteliales en la diferenciación de la retina del embrión de pollo (*Gallus domesticus L.*). Tesina de Licenciatura. Universidad de Granada.

ABERCROMBIE, M. (1946).- Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94, 239-247.

AGDUHR, E. (1941).- A contribution to the technique of determining the number of nerve cells per volume unit or tissue. *Anat Rec* 80, 191-202.

ALLFREY, VG; V.C. LITAU y A.E. MIRSKY (1963).- On the role of histones regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 414-421.

ALMENDROS, A; J. NAVASCUES, R. CARMONA y F. ABADIA-FENOLL (1982).- Studies on the mitotic state in the development of the chick brain. *Z Mikrosk Anat* 96, 857-864.

ALTMAN, A.J. (1966).- Facial nucleus in Bell's Palsy. *Bull Johns Hopk* 118, 256-278.

- ALTMAN, A.J. (1979).**- Postnatal neurogenesis and the problem of neuronal plasticity. En "Developmental Neurobiology" (W.A. Himwich, ed.), Thomas Springfield, Illinois. pp 197-237.
- ANGEVINE, J.B.(Jr) (1970).**- Critical cellular events in the shaping of the neural centers. En "The Neurosciences", Vol II (F.O. Schmitt and T.Melnechuch, eds.) Rockefeller Univ Press, New York. pp 62-72.
- ANGEVINE, J.B.; D. BODIAN; A.J. COULOMBRE; V. HAMBURGER; M. JACOBSON; K.M. LYSER; M.C. PRESTIGE; R.L. SIDMAN; S. VARON y P.A. WEISS (THE BOULDER COMMITTEE) (1970).**- Embryonic vertebrate central nervous system: Revised terminology. *Anat Rec* 166,257-262.
- ARMENGOL, J.A.; F. PRADA y J.M. GENIS-GALVEZ (1979).**- Gotas de grasa de los foterreceptores de la retina de pollo: un posible mecanismo de génesis. *Morf Norm Patol* 3(3), 725-735.
- ATLAS, M. y V.P. BOND (1961).**- The cell generation cycle of the eleven day mouse embryo. *J Cell Biol* 26, 19-24.
- AZORIN POCH, F. (1972).**- "Curso de muestreo y aplicaciones". Aguilar. Madrid.
- BADELEY, A.J.; H.J.G. GUNDERSEN y L.M. CRUZ-ORIVE (1986).**- Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* 142, 259-276.
- BALINSKY, B.J. (1978).**- "Introducción a la Embriología". Ed. Omega,Barcelona (traducido de "An Introduction to Embryology". Filadelfia (USA). W.B. Saunders Co. por J. Janés y J. Ayala). pp. 478-517.

- BEACH, D.H. y M. JACOBSON (1979a).**- Patterns of cell proliferation in the retina of the clawed frog during development. *J comp Neurol* 183, 603-614.
- BEACH, D.H. y M. JACOBSON (1979b).**- Influences of Thyroxine on cell proliferation in the retina of the clawed frog at different ages. *J comp Neurol* 183,615-624.
- BEACH, D.H. y M. JACOBSON (1979c).**- Patterns of cell proliferation in the developing retina of the clawed frog in relation to blood supply and Position of the choroidal fissure. *J comp Neurol* 183, 625-632.
- BISCHOFF, B. y H. HOLTZER (1969).**- Mitosis and the processes of diferntiation of myogenic cells in vitro. *J Cell Biol* 41, 188-200.
- BONNER, J. (1971).**- En entrevista, citado en Editorial. *New Scientist and Sciences J.* Junio, 700-702.
- BORN (1898).**- Citado por M. Gabe en "Techniques histologiques". Ed Mason y Cie., París, 1968. pp 163-173.
- BORN (1900).**- Citado por M. Gabe en "Techniques histologiques". Ed Mason y Cie., París, 1968. pp 163-173.
- BRADY R.C. y S.R. HILFER (1982).**- Optic cup formation: A calcium regulated process. *Proc Natl acad Sci USA* 79, 5587-5592.

- BRIGGS, B. y T.J. KING (1952).**- Changes in the nuclei of differentiating endoderm cells as revealed by nuclear transplation. *J Morphol* 100, 269-312.
- BRIGGS, R. y T.J. KING (1952).**- Changes in the nuclei of differentiating endoderm cells as revealed by nuclear transplantation. *J Morph* 100, 269-312.
- BRITTEN, R.J. y E.H. DAVIDSON (1969).**- Gene regulation for higher cells: A theory. *Science* 165, 349-357.
- BROOKS, R.F.; D.C. BENNET y J.A. SMITH (1980).**- Mammalian cell cycles need two random transitions. *Cell* 19, 493-504.
- BROUWER, B. y W.P.C. ZEEMAN (1926).**- The projection of the retina in the primary optic neuron in the monkey. *Brain* 49, 1-35.
- BROWN, S.W. (1956).**- Heterochromatin. *Science* 151, 417-525.
- BURT, M.A. (1968).**- acetylcholinesterase and choline acetyl transferase activity in the developing spinal chord. *J Exp Zool* 169, 107-112.
- CALEY, D.W. (1971).**- Differentiation of the neural elements of the cerebral cortex in the rat. En "Cellular Aspects of Neural Growth and Differentiation" (Daniel C. Pearse, ed) U.C.L.A. Forum in Medical Sciencies N° 14, 73-91.
- CALVENTE, R. (1985).**- Estudio estereológico de la distribución mitótica en el desarrollo de la retina de *Gallus domesticus* L. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- CALVENTE, R.; M.V. OSTOS, A. ALMENDROS y F. ABADIA-FENOLL (1983).**-
Distribución de la mitosis y sus fases en el desarrollo de la copa óptica
en embriones de pollo. *Mof Norm y Patol Sec A* 713, 795-799.
- CAMERON, J. (1902).**- Citado por A. Romanoff en "The Avian
Embryo", MacMillan Co., Nueva York. 1960. pp 381-418.
- CAMERON, J.L. (1964).**- Is the duration of DNA synthesis in somatic cells of
mammals and birds a constant?. *J Cell Biol* 20, 185-188.
- CASPERSON, T. (1941).**- Studien über Eiweisumsatz der Zelle.
Naturwissenschaften 29, 33-43.
- CASPERSON, T. (1949).**- Methods for determination of the absorption spectra of
cell structures. *J Roy Microsc Soc* 60, 8-25.
- CHACKO, L.W. (1948).**- The laminar pattern of the lateral geniculate body in
the primates. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 71, 211-224.
- CHIEVITZ, J.H. (1891).**- Uber das Vorkommen der Area centralis retinal in der
vier höheren wirbeltierlassen. *Arch Anat Physiol* 15, 311-334.
- COGHILL, G.E. (1924).**- Correlated anatomical and physiological studies of the
growth of the nervous system of amphibians. IV. Rates of proliferation
and differentiation in the central nervous system of *Amblystoma*. *J Comp
Neurol* 37, 71-120.
- COGHILL, G.E. (1933).**- Correlated anatomical and physiological studies of the
growth of the nervous system of Amphibia. XI. The proliferation of cells

in the spinal cord as a factor in the individuation of the hind leg of *Amblystoma punctatum*. *J Comp Neurol* 57, 327-358.

CONKLIN, E.G. (1945).- The orientation and cell-lineage of the ascidian egg. *J Acad Nat Sci Philad Ser* 2, 13.

CORLISS, C.E. y G.C. ROBERTSON (1963).- The pattern of mitotic density in the early chick neural epithelium. *J Exp Zool* 153, 125-140.

COULOMBRE, A.J. (1955).- Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am J Anat* 96, 153-189.

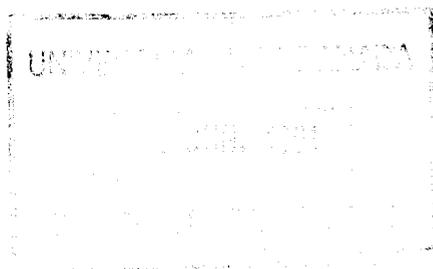
COULOMBRE, A.J. (1956).- The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. I. Control of eye size. *J exp Zool* 133, 211-226.

COWAN, W.M.; A.H. MARTIN y E. WENGER (1968).- Mitotic patterns in the optic tectum of the chick during normal development and after removal of the optic vesicle. *J exp Zool* 169, 71-92.

COWAN, W.M.; A.H. MARTIN y E. WENGER (1968).- Mitotic patterns in the optic tectum of the chick during normal development and after removal of the optic vesicle. *J Exp Zool* 169, 71-92.

CRUZ-ORIVE, L.M. (1987).- Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *J Microsc* 145, 121-142.

CRUZ-ORIVE, L.M. y E.B. HUNZINKER (1986).- Stereology for anisotropic cells: Applications to growth cartilage. *J Microsc* 143, 47-80.



- CROSSLAND, W.J.; W.H. COWAN; L.A. ROBERS y J.P. KELLY (1974).**- The specification of the retinotectal projection in the chick. *J comp Neurol* 155,127-164.
- CURTIS, A.S.G. y G.M. SEEHAR (1978).**- The control of cell division by tension or diffusion. *Nature* 274, 52-53.
- DAVIDSON, J.N. y I. LESLIE (1950).**- A new approach in the biochemistry of growth and development. *Nature* 165 49-53.
- DE HOFF, R.T. (1964).**- The determination of the geometric properties of aggregates of constant size particles from counting measurements made on random sections. *Trans AIME* 230, 764.
- DEFENDI, V. y L.A. MASON (1963).**- Analysis of the life-cycle of mammalian cells. *Nature* 198, 359-361.
- DERRICK, G.E. (1937).**- An analysis of the early development of the chick by means of mitotic index. *J Morphol* 61, 257-284.
- DOGIEL, A. (1888).**- Ueber das Verhalten der nervosen Elemente in der Retina der Granoiden, Reptilien, Vogel und Säugethiere. *Anat Anzeiger*.
- DOWLING, J.E. (1968).**- Synaptic organization of the frog retina. *Proc Roy soc B* 170, 205-228.
- DYKES, E. y F. AFSHAR (1982).**- Computer generated three-dimensional reconstruction from serial sections. *Acta Stereol* 1(2), 289-296.

- DUTTING, E.; A. GIERER y G. HANSMANN (1983).**- Self-renewal of stem cells differentiation of nerve cells in the developing chick retina. *Dev Brain Res* 10, 21-32.
- EBBESSON, S.O.E. (1963).**- A quantitative study of human superior sympathetic ganglia. *Anat Rec* 146, 353-356.
- EBBESSON, S.O.E. y D. TANG (1965).**- A method for estimating the number of cells in histological sections. *J Roy Micr Soc* 84, 449-464.
- EGAR, M.W. (1977).**- Interependymal channels and cell death in normal development of chick hindbrain. *Anat Rec* 187, 573.
- EGAR, M.W. y M. SINGER (1972).**-The role of ependyma in spinal cord regeneration in the urodele, *Triturus*. *Exp Neurol* 37, 422-430.
- FLEMMING, W. (1882).**- Zellsubstanz kern und Zellteilung. Vogel/Leipzig.
- FLODERUS, A. (1944).**- Untersuchungen über den bau des menschlichen Hypophyse mit besonder Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 53, 1.
- FISCHBERG, M. y A BLACKLER (1970).**- Cómo se especializan las células. En "La célula viva". Selecciones de Scient. Amer. 2ª ed. Ed. Blume, Madrid. pp 310-320.
- FISCHLSWEIGER, W. y R. O'RAHILLY (1966).**- The ultrastructure of the pecten oculi in the chick. *Acta Anat* 65, 561-578.
- FUJITA, S. (1962).**- Kinetics of cellular proliferation. *Exptl Cell Res* 20, 52-60.

- FUJITA, S. (1963).**- The matrix cell and cytogenesis in the developing central nervous system. *J Comp Neurol* 120, 37-42.
- FUJITA, S. (1964).**- Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 122, 311-328.
- FUJITA, S. (1965).**- The matrix cell and histogenesis of the nervous system. *Laval Med* 36, 125-130.
- FUJITA, S. (1967).**- Quantitative analysis of cell proliferation in the cortex of the postnatal mouse cerebellum. *J Cell Biol* 32, 277-287.
- FUJITA, S. y M. HORII (1963).**- Analysis of cytogenesis in chick retina by tritiated thymidine autoradiography. *Arch Histol Jap* 23, 369.
- GABE, M. (1968).**- "Techniques histologiques". Ed Mason et Cie., Paris. pp 163-173.
- GARCIA-PORRERO, J.A. y J.L. OJEDA (1979).**- Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study. *Experientia* 35(3), 375-376.
- GAZE, R.M. y W.E. WATSON (1967).**- Cell division and migration in the brain after optic nerve lesions. En "Growth of the Nervous System". A Ciba foundation Symposium (G.E.W. Wolstenholme y M. O'Connor, eds.). Little. Brown and Co., Boston. pp 53-76.
- GEORGIEV, G.P. (1969).**- On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells. *J Theor Biol* 25, 473-490.

- GEORGIEV, G.P. (1970).**- The structure of transcriptional units in eucaryotic cells. *Curr Top Develop Biol* 7, 1-60.
- GUILD, S.R.; S.J. CROWE; C.C. BUNCH y L.M. POLUOGT (1931).**- Correlations of differences in the density of innervation of organ of Corti with differences in the acuity of hearing, including evidence as to the location in the human cochlea of the receptor for certain tones. *Acta otolaryng. (Stockn.)* 15, 269-308.
- GLAGOLEFF, A.A. (1933).**- On the geometrical methods of quantitative mineralogic analysis of rocks. *Trans Inst Econ Mineral (URSS)* 59.
- GLUCKSMANN, A. (1951).**- Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26, 59-86.
- GLUCKSMANN, A. (1965).**- Cell death in normal development. *Arch Biol (Liège)* 76, 419-437.
- GOLDBERG, S. y A.J. COULOMBRE (1972).**- Topographical development of the ganglion cell fiber layer in the chick retina. A whole mount study. *J Comp Neurol* 146, 507-518.
- GOLGI, C. (1873).**- Sulla struttura della sostanza griglia dell cervello. *Grazz Med Ital Lombarda* 33, 244-246.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, A.; J.F. LOPEZ-SAEZ y G. GIMENEZ-MARTIN (1966).**- Duration of the division cycle in binucleate and mononucleate cells. *Exptl Cell Res* 43, 255-267.
- GONZALEZ PAREJA, A.C. (1976).**- Recuento neuronal y distinción de estirpes celulares. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

- GONZALEZ PAREJA, A.C.; F. ABADIA-FENOLL, J. AIJON y J. NAVASCUES (1975).**- Contribución a las fórmulas de recuento neuronal tomando el nucléolo como unidad de medida. *Trab Lab Inst Cajal Inv Biol* 67, 231-246.
- GRANT, P.; E. RUBIN y C. CIMA (1980).**- Ontogeny of the retina and optic nerve in *Xenopus laevis*. I Stages in the early development of the retina. *J Comp Neurol* 189, 593-613.
- GROBSTEIN, C. (1964).**- Cytodifferentiation and its controls. *Science* 143, 643-650.
- GUTIERREZ, C. y J.B. SCHVARTZMAN (1981).**- Sister-chromatid exchanges as a measure of the damage produced by visible light on BrdUrd-substituted chromosomes. En "Chromosome Damage and Repair". (E. Seeberg y K. Kleppe, eds.). Plenum Press. New York. pp 567-574.
- GUTIERREZ, C.; J.F. SCHVARTZMAN y J.F. LOPEZ-SAEZ (1981).**- The effect of growth temperature on the formation of sister-chromatid exchanges in BrdUrd-substituted chromosomes. *Exp Cell Res* 134, 73-79.
- GUNDERSEN, H.J.G. (1986).**- Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 143, 3-45.
- GUNDERSEN, H.J.G. BENDSTEN, T.F.; L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MØLLER, K. NIELSEN, J.R. NYENGARD, B. PAKKEMBERG, F.B. SØRENSEN, A. VESTERBY y M.J. WEST (1988).**- Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96, 379-394.

- GUNDERSEN, H.J.G.; M. BOYSEN y A. REITH (1981).**- Comparison of semiautomatic digitizer-tablet and simple point counting performance in morphometry. *Virchows Archiv* 37, 317-325.
- GUNDERSEN, H.J.G. y E.B. JENSEN (1985).**- Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J Microsc* 138, 127-142.
- GUNDERSEN, H.J.G. y E.B. JENSEN (1987).**- The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147, 229-263.
- GUTIERREZ, C. y J.F. LOPEZ SAEZ (1982).**- Oxigen dependence of sister-chromatid exchange. *Mut Res* 103, 295-302.
- HALL, J.G. (1962).**- A histological investigation of the auditory pathways in neonatal asphyxia. *Acta oto-laryng* 54, 369-375.
- HALL, J.G. (1964).**- On the neuropathological changes in the central nervous system following neonatal asphyxia with special reference to the auditory system in man. *Acta oto-laryng (Stockh.)* 56, 331-339.
- HAMBURGER, V. (1934).**- The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J Exp Zool* 68, 449-494.
- HAMBURGER, V. (1948).**- The mitotic patterns in the spinal cord of the chick embryo and their relation to histogenetic processes. *J Comp Neurol* 88, 221-283.
- HAMBURGER, V. y H. HAMILTON (1951).**- A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-90.

- HAMBURGER, V. y E.L. KEEFE (1944).**- The effects of peripheral factors on the proliferation and differentiation in the spinal cord of chick embryo. *J Exp Zool* 96, 223-242.
- HAMMARBERG, C. (1895).**- Studien über klinik und Pathologie der Idiotie. Upsala.
- HATAI, S. (1902).**- Number and size of the spinal ganglion cells and dorsal root fibers in the white rat at different ages. *J comp Neurol* 12, 107-124.
- HAUG, H. (1967).**- Die Länge der Internodien der Markfasern im Bereich der Schrinde der erwachsenen katze. *Z Zellforsch* 83, 265-278.
- HAUSSNER, H.H. (1966).**- Characterization of the powder particle shape. *Powder Metallurgy* 14, 75-84.
- HAYES, B.P. (1976).**- The distribution of intercellular gap junctions in the developing retina and pigment epithelium of *Xenopus laevis*. *Anat Embryol* 150, 99-111.
- HAYES, B.P. (1977).**- Intercellular gap junctions in the developing retina and pigment epithelium of the chick. *Anat Embryol* 151, 325-333.
- HEROPHILUS, 300 AC.**- Citado por J. Sigelman y V. Ozanics en "Ocular Anatomy, Embryology and Teratology". (F.A. Jacobieck, ed.). Harper y Pour (1982). pp 441-506.
- HINDS, J.W. (1972).**- Early neuron differentiation in the mouse olfactory bulb. I. Light microscopy. *J Comp Neurol* 146, 233-252.

- HINDS, J.W. y T.L. RUFFET (1971).**- Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and Golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z Zellforsch* 115, 226-264.
- HIS, W. (1889).**- Die Neuroblasten und Entstehung in embryonalen Marke. *Abhandl Klg Sachs Gess Wiss Matn Phys* 15, 313-372.
- HIS, W. (1904).**- Die Entwicklung des menschlichen Gehirn während der ersten Monate. S. Hirzel, Leipsig. pp 176.
- HOFFMANN, C.K. (1877).**- Zur Anatomie der Retina. III. Über den Bau der Retina bei den Vögeln. *Niederl Arch f Zool* 3, 217-231.
- HOLMES, A.H. (1927).**- Petrographic methods and calculations. Murby and Co, Londres.
- HOLTZER, H. (1963).**- Mitosis and cell transfromations. En "General Phisiology of cell specialization" (D. Maxia y A. Tyler, eds.). McGraw-Hill, New York. pp 80-90-
- HOLTZER, H. (1970).**- Myogenesis. En "Cell Proliferation". G. Schjeide y J. De Villiss, eds.). Van Nostrand y Rheinhold, New York. pp 476-503.
- HOLTZER, H.; H. WEINTRAUB, R. MAYNE y B. MACHAN (1972).**- The cell cycle, cell lineages and cell differentiation. *Cur top in Develop Biol* 7, 229-256.
- HOSHINO, K; T. MATSUZAWA y V. MURAKAMI (1973).**- Characteristics of the cell cycle of matrix cells in the mouse during histogenesis of telencephalon. *Exp Cell Res* 77, 89-94.

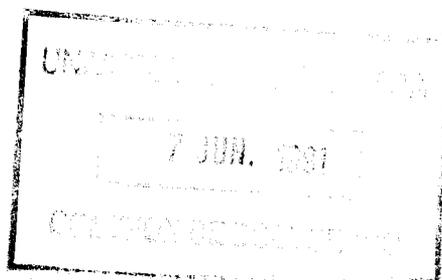
- HOWARD, A. y D.L. DEWEY (1961).**- Non-uniformity of labeling rate during DNA synthesis. *Esptl Cell Res* 24, 623-624.
- HSU, T.C. y C.E. SOMER (1961).**- Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proc natl Acad Sci U.S.A.* 47, 396-403.
- HUANG, R.C. y J. BONNER (1962).**- Histone, a suppresor of chromosome RNA synthesis. *Proc natl Acad Sci U.S.A.* 48, 1216-1222.
- HUGHES, W.F. y A. LAVELLE (1974).**- On the synaptogenic sequece in chick retina. *Anat. Rec.* 179, 279.
- HUGHES, W.F. y A. LAVELLE (1975).**- The effects of early tectal lesions in development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos. *J Comp Neurol* 163, 265-264.
- HUGHES, W.F. y S.C. Mc LOON (1979).**- Ganglion cell death during retinal development in the chick: comparison with cell death induced by early target field destruction. *Exp Neurol* 66, 587-601.
- HUNT, H.H. (1961).**- A study of the fine structure of the optic vesicle and lens placode of the chick embryo during induction. *Dev Biol* 3, 175-209.
- IRWING, R. y J.M. HARRISON (1967).**- The superior olivary complex and audition: A comparative study. *J Comp Neurol* 130, 77-86.
- JACOBSON, M. (1968).**- Development of neuronal specifity in retinal ganglion cells of *Xenopus*. *Develop Biol* 17, 202-218.
- JACOBSON, M. (1970).**- "Developmental Neurobiology". Holt, New York.

- JACOBSON, M. (1978).**- "Developmental Neurobiology". 2nd Ed. Plenum Press, New York.
- JENSEN, E.B. y H.J.G. GUNDERSEN (1982).**- Stereological ratio estimation based on counts from integral test systems. *J Microsc* 125, 161-166.
- JONES, R.L. (1937).**- Cell hyphen fiber ratios in the vague nerve. *J comp Neurol* 67, 469-482.
- KAHN, A.J. (1973).**- Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res* 63, 285-290.
- KAHN, A.J. (1974).**- An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick retina. *Develop Biol* 38, 29-40.
- KALLEN, B. (1961).**- Studies on cell proliferation in the brain of chick embryos with special reference to the mesencephalon. *Z Anat EntwGesch* 122, 388-401.
- KALLEN, B. (1962).**- Mitotic patterning in the central nervous system of chick embryos by colchicine method. *Z Anat Entwicklungsgesch* 123, 309-319.
- KONIGSMARK, B.W. (1970).**- Methods for the counting of neurons. En "Contemporary Research Methods in Neuroanatomy". (W.J. Nauta y S.O.E. Ebbesson, eds.) Springer Verlag, New York. pp 315-340.
- KONIGSMARK, B.W.; U.P. KALYANARAN; P. COREY y E.A. MURPHY (1969).**- An evaluation of techniques in neuronal populations estimates. The VIth nerve nucleus. *Johns Hopk med J* 125, 146-158.

- KRAYANEK, S. y S. GOLDBERG (1981).**- Oriented Extracellular channels and axonal guidance in the embryonic chick retina. *Dev Biol* 84, 41-50.
- LASSEK, A.M. (1940).**- The human pyramidal tract. *Arch Neurol Psychiat (Chic)* 44, 718-724.
- LYSER, K.M. (1964).**- Early differentiation of motor neuroblasts in the chick embryo as studied by electron microscopy. I: General aspects. *Dev Biol* 10, 433-466.
- LYSER, K.M. (1968).**- Early differentiation of motor neuroblasts in the chick embryo as studied by electron microscopy. II: Microtubules and neurofilaments. *Dev biol* 17, 117-142.
- LYSER, K.M. (1971).**- Early differentiation in the chick embryo spinal cord in organ culture: Light and electron microcopy. *Anat Rec* 169, 45-64.
- MACLEAN, N. (1976).**- "Control of gene expression". Academic Press, New York, pp 278-279.
- MAEKAWA, T. y J. TSUCHIYA (1968).**- A method for the direct estimation of the length of G₁, S and G₂ phases. *Exp Cell Res* 53, 55-64.
- MANDELBROT, B.B. (1977).**- "Fractals, Form, Chance and Dimension". Freeman and Co, San Francisco.
- MANN, I.C. (1924a).**- The pecten of *Gallus domesticus*. *Quart J microsc Soc* 68, 413-442.
- MANN, I.C. (1924b).**- The function of the pecten. *Brit J Ophthalm* 8, 209-226.

- MANN, I.C. (1969).**- "The development of the Human Eye". Grune and Stratton, New York.
- MARRABLE, A.W. (1962).**- The counting of cells and nuclei in microtome sections. *Quart J micr Sci* 103, 331-347.
- MARTIN, A.H. (1967).**- Significance of mitotic spindle orientation in the neural tube. *Nature* 216, 1133-1134.
- MARTIN, A.H. y J. LANGMAN (1965).**- The development of the spinal cord examined by autoradiography. *J Embryol Exp Morphol* 14, 23-35.
- MARTIN-PARTIDO, G.; I.S. ALVAREZ; L. RODRIGUEZ-GALLARDO y J. NAVASCUES (1986).**- Differential staining of dead and dying embryonic cells with a simple new technique. *J Microsc* 142, 101-105.
- MATSUSAKA, T. (1967a).**- The fine structure of the basal zone of the pigment epithelial cells of the chick retina. *Exp Eye Res* 6, 38-41.
- MATSUSAKA, T. (1967b).**- Lamellar bodies in the synaptic cytoplasm of the accessory cone in the chick retina. *J Ultrastructure Res* 18, 55-70.
- MATTFELDT, T (1988).**- Estimation of surface and length with the Orientator. (Citado por Gundersen y col., *APMIS* 96, 1988)
- MATTFELDT, T., H.J. MOBIUS y G. MALL (1985).**- Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *J Microsc* 139, 279-289
- MEDALIA, A.I. (1967).**- Morphology of Aggregates. *J Colloid Interface Sci* 24, 393-404.

- MENNER, E. (1938).**- Die Bedeutung des Pecten im Auge des Vögels für die Wahrnehmung von Bewegungen nebst Bemerkungen über seine Ontogenie und Histologie. *Zool Jahrb, Abt Allg Zool Physiol Tiere* 58, 481-538.
- MESSIER, B. y C. AUCLAIR (1974).**- Effect of cytochalasin B on interkinetic nuclear migration in the chick embryo. *Dev Biol* 36 218-223.
- MESSIER, B. y C.P. LEBLOND (1960).**- Cell proliferation and migration as revealed by autoradiography after injection of thymidine- H^3 into rats and mice. *Am J Anat* 106, 247-285.
- MEYER, D.B. y H.C. MAY, Jr, (1973).**- The topographical distribution of rods and cones in the adult chicken retina. *Exp Eye Res* 17, 347-355.
- MIKI, A.; Y. ATOJI y H. MIZOGUTI (1981).**- The relationship between the proliferating ability and acetylcholinesterase activity of the neural tube cells in early chick embryos. *Acta Histochem Cytochem* 14(5), 461-475.
- MILES, R.E. y P.I. DAVY (1977).**- On the choice of quadrats in stereology. *J Microsc* 110, 27.
- MISHIMA, H. y H. FUJITA (1978).**- Studies on the cytodifferentiation of the neuroblasts and visual cells in the chick embryo retina, using the electron-microscopic autoradiography of 3H -thymidine. *Albrecht v Graefes Arch Klin exp Ophthal* 206, 1-10.
- MOATAMED, F. (1966).**- Cell frequencies in the human inferior olivary nuclear complex. *J comp Neurol* 128, 109-116.



- MORRIS, V.B. (1970).**- Simmetry in a receptor mosaic demonstrated in the chick from frequencies, spacing and arrangement of the types of retinal receptors. *J comp Neurol* 140, 359-398.
- MORRIS, V.B. y R. COWAN (1984).**- A growth curve of cell numbers in the neural retina of embryonic chick. *Cell Tissue kinet* 17, 199-208.
- MORRIS, V.B.; R. COWAN y D. CULPIN (1979).**- Variability of cell cycle times measured "in vivo" in embryonic chick retina by continous labelling with BUdR. *Nature* 280, 68.
- MORRIS, V.B. y C.D. SHOREY (1967).**- An electron microscope study of types of receptor in the chick retina. *J comp Neurol* 129, 313-340.
- MULLER, H. (1857).**- Anatom. histologische Untersuchungen über die Retina beim Menschen und Wirbelthieren. *Zeitschr f Wissenschaft Zool*, Bd VIII.
- NATARAJAN, A.T.; I. CSUKAS y A.A. ZEELAND (1981).**- Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister-chromatid exchanges induced by inhibitors of poly-(ADP-ribose)-polymerase. *Mut Res* 84, 125-132.
- NEWTON, A.A. y P. WILDY (1959).**- Parasynchronous division of Hela cells. *Exp Cell Res* 16, 624-635.
- NISHIMURA, Y.; Y. INOUE y K. SHIMAI (1979).**- Morphological development of retinal ganglion cells in the chick embryo. *Exp Neurol* 64, 44-60.
- NUMBERGER, J.I. (1958).**- Direct enumeration of cells of the brain. En "Biology of Neuroglia". (W.F. Windle, ed.). Ch. C. Thomas, Springfield, Illinois. pp 193-211.

- O'MALLEY, B.M. y A.R. MEANS (1974).**- Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science* 183, 610-620.
- O'RAHILLY, R. (1966).**- The early development of the eye in staged human embryos. *Contr Embryol* 38, 1-42.
- O'RAHILLY, R. (1975).**- The prenatal development of the human eye. *Exp Eye Res* 21, 93-112.
- O'RAHILLY, R. y D.B. MEYER (1955).**- Correlation between the development of the eye and embryonic staging in the chick. *Anat Rec* 121, 346.
- O'RAHILLY, R. y D.B. MEYER (1959).**- The early development of the eye in chick *Gallus domesticus* (stages 8 to 25). *Acta Anat* 39, 20-58.
- OVERTON, J. (1958).**- Effects of colchicine on the early chick blastoderm. *J exp Zool* 139(2), 329-347.
- PAFF, G.H. (1939).**- The action of colchicine upon 48-hour chick embryo. *Am J Anat* 64(2), 331-349.
- PAKKENBERG, H. (1966).**- The number of nerve cells in the cerebral cortex of man. *J comp Neurol* 128(Suppl.), 275-293.
- PANDER, Chr. (1817).**- Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Hühnchens im Ei. Würzburg.
- PANNESE, E. (1968).**- Developmental changes of the endoplasmic reticulum and ribosomes in the nerve cells of the spinal ganglion of the domestic fowl. *J comp Neurol* 132, 331-364.

- PATAU, K. y H. SWIFT (1953).**- The DNA content (Feulgen) of nuclei during mitosis in root tip of onion. *Chromosome* 6, 149-169.
- PEARCE, T.L. y J. ZWAAN (1970).**- A light and electron microscopic study of cell behaviour and microtubules in the embryonic chicken lens using colcemid. *J Embryol Exp Morph* 23, 491-507.
- PEDLER, C. (1969).**- Rods and cones, a new approach. *Int Rev Gen Exp Zool* 4, 219-274.
- PELC, S.R. (1963).**- Incorporation of labelled precursors of DNA in nondividing cells. En "Cell Proliferation". (L.F. Lamerton and R.J.M. Fry, eds.). F.A. Davis Co., Philadelphia. pp 94-109.
- POLYAC, S.L. (1957).**- "The Vertebrate Visual System". University of Chicago Press, Chicago.
- POUYSESEGUR, J.; J.C. CHAMBARD; A. FRANCHI; S. PARIS y E. VAN OBBERGHEN-SHILLING (1982).**- Growth factor activation of an amiloide-sensitive Na^+/H^+ exchange system in quiescent fibroblast: Coupling to ribosomal protein S6 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 79, 3935-3939.
- PRADA, C.; L. PUELLES y J.M. GENIS-GALVEZ (1981).**- A Golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat Embryol* 161, 305-317.
- PRESCOTT, D.M. (1964).**- Comments on the cell life cycle. *Natl Cancer Inst Monogr* 14, 57-72.

- PRESCOTT, D.M. (1976).**- The cell cycle and the control of cellular reproduction. *Adv Genet* 18, 99-177.
- PUCK, T.T. y J. STEFFEN (1963).**- Life cycle analysis of mammalian cells. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemide and sublethal doses of X-irradiation. *Biophys* 3, 379-397.
- QUASTLER, H. y F.G. SHERMAN (1959).**- Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp Cell Res* 17, 420-438.
- RAGER, G.H. (1980).**- Development of retinotectal projection in the chicken. *Adv Anat Embryol and Cell Biol* 63, 1-93.
- RAGER, G.H. y V. RAGER (1978).**- Systems-matching by degeneration. 1. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. *Exp Brain Res* 33, 65-78.
- RAMON Y CAJAL, S. (1888).**- Estructura de la retina de las aves. *Rev trim Histol Norm Patol* 2.
- RAMON Y CAJAL, S. (1892).**- Sur la morphologie et les connexions des éléments de la rétine des oiseaux. *Anat Anzeiger* 4 (Cit *Histol Syst Nerv*, pg 325).
- RAMON Y CAJAL, S. (1892).**- La retina des vertébrés. *La Cellule* 9, 119-227.
- RAMON Y CAJAL, S.(1909-1911).**- Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés- Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

- RAMON Y CAJAL, S. (1929).**- "Etudes sur la neurogenese de quelques vertebrés". Madrid. (Traducido al inglés por L. Guth -1959- "Studies on Vertebrate Neurogenesis", Thomas Sprigfield, Illinois.
- RAPAPORT, D.H. Y J. STONE (1983).**- The topography of the cytogenesis in the developing retina of the cat. *J Neurosci* 3(9), 1824-1834.
- ROGERS, K.T. (1957).**- Early development of the optic nerve in the chick. *Anat Rec* 127, 97-104.
- ROMANOFF, A.L. (1960).**- "The Avian Embryo. Structural and Functional development". MacMillan Co., New York. pp 381-418.
- ROSIWAL, A. (1898).**- Ueber geometrische Gesteinsanalysen. *Verhandl Geol Reichsmant Wien* 6, 143.
- ROUX, W. (1889).**- Beiträge zur Entwicklungsmechanick des Embryo. 5. Ueber die Künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungskugeln, sowie über die Nachentwicklung (Post-generation) der fehlenden Köperhalfte. *Virchows Arch Path Anat Physiol* 64, 113-154.
- RUFOS DE EFESO (110 A.C.).**- Citado por J. Sigelman y V. Ozanics en "Ocular Anatomy, Embryology and Teratology". (F.A. Jacobieck, ed.) Harper y Pour, 1982. pp 441-506.
- SALTYKOV, S.A. (1946).**- *Factory Laboratory* 12(9-10), 816-825.
- SAUER, F.C. (1935).**- Mitosis in the neural tube. *J comp Neurol* 62,377-405.

- SAUER, F.C. (1936).**- The interkinetic migration of embryonic epithelial nuclei. J Morphol 60, 1-11.
- SAUER, F.C. (1937).**- Some factors of morphogenesis of vertebrate embryonic epithelia. J Morphol 61, 563-579.
- SAUER, M.E. y A.C. CHITTENDEN (1959).**- Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo. Evidence for intermitotic migration of nuclei. Exp Cell Res 16, 1-6.
- SAUER, M.E. y B.E. WALKER (1959).**- Radiographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. Proc Soc Exptl Biol Med 101, 557-560.
- SCHAPER, A. (1897a).**- Die frühesten Differenzierungsvorgänge in Centralnervesystem. Arch Entwicklunsmech Organ 5, 81-132.
- SCHAPER, A. (1897b).**- The earliest differentiation in the central nervous system of vertebrates. Science 5, 430-431.
- SCHVARTZMEN, J.B. y C. GUTIERREZ (1980).**- The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister chromatid exchanges. Mut Res 72, 483-489.
- SCOTT, R.E.; D.L. FLORINE; J.J. WILLE (Jr) y K. YUN (1982).**- Coupling of growth arrest and differentiation at distinct state in the G₁ phase of the cell cycle: G_D. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 79, 845-849.

- SCOTT, R.E.; L.W. MARJORIE y J.J. WILLE (Jr) (1984).**- Mechanisms for the initiation and promotion of carcinogenesis: A review and a new concept. Mayo Clin Proc 59, 107-117.
- SEAMEN, A.R. y H. STORM (1963).**- A correlated light and electron microscopic study on the pecten oculi of the domestic fowl. Exptl Eye Res 2, 163-172.
- SECHRIST, J.W. (1969).**- Neurocytogenesis. 1. Neurofibrils, neurofilaments and the terminal mitotic cycle. Am J Anat 124, 117-134.
- SECHRIST, J.W. y A. LAVELLE (1966).**- Neurofilaments and initial neuroblast differentiation. Am Zool 6, 530-531.
- SHEFFIELD, J.B. y D.A. FISCHMANN (1970).**- Intercellular junctions in the developing retina of the chick embryo. Z Zellforsch 104, 405-418.
- SHEININ, J.J. (1930).**- Typing of the cells of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in the dog based on Nissl-granule arrangement. J comp Neurol 50, 109-131.
- SHEN, S.C.; P. GREENFIELD y E.J. BOELL (1956).**- Localization of acetylcholinesterase in chick retinas during histogenesis. J comp Neurol 106, 433-462.
- SHOOK, P. (1982).**- Cell action and cell interaction during ocular morphogenesis. En "Ocular Anatomy, Embryology and Teratology". (F.A. Jacobieck, ed.) Harper y Pour. pp 121-141.
- SHULTZE, H. (1867).**- Uber Stäbchen und Zapfen der retina. Arch mikr Anat 3, 215-245.

- SIDMAN, R.L. (1961).**- Histogenesis of mouse retina studied with thymidine-H³.
En "The structure of the Eye". (G. Smelser, ed). Academic Press Inc, N York. pp 487-505.
- SIDMAN, R.L.; I.L. MIALE y N. FEDER (1959).**- Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exptl Neurol* 1, 322-333.
- SILVER, J. y A.F.W. HUGHES (1973).**- The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J Morphol* 140, 159-170.
- SILVER, J. y R.M. ROBB (1979).**- Studies on the development of the eye cup and optic nerve in normal mice and in mutants with congenital optic nerve aplasia. *Dev Biol* 68, 175-190.
- SILVER, J. y R.L. SIDMAN (1980).**- A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axons. *J comp Neurol* 189, 101-111.
- SILVER, M.L. (1942).**- The motor neurons of the spinal cord of the frog. *J comp Neurol* 77, 1-33.
- SLONAKER, J.R. (1897).**- A comparative study of the area of acute vision in vertebrates. *J Morphol* 13, 445-493.
- SLONAKER, J.R. (1918).**- A physiological study of the anatomy of the eye and its accessory parts in the English sparrow. *J Morphol* 31, 351-459.
- SLONAKER, J.R. (1921).**- The development of the eye and its accessory parts in the English sparrow (*Passer domesticus*). *J Morphol* 35, 263-357.

- SMART, J.H.M. (1973).**- Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of mouse neocortex: A pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat* 116, 67-91.
- SMITH, D.T. (1920).**- Citado por A. Romanoff en "The Avian Embryo. Structural and Functional Development". MacMillan Co, New York. pp 381-418.
- SOHAL, G.S. y C.H. NARAYANAN (1974).**- The role of afferent input on the development of the isthmo-optic nucleus. *Anat Rec* 178, 468.
- SPEMANN, H. (1901-1903).**- Entwicklungsphysiologische studiem am Tritonei. I, II, III. *Roux Arch* 12, 224-264; 15, 448-534; 16, 551-631.
- SPIEGELMAN, S. (1948).**- Differentiation as the controlled production of unique enzymatic patterns. *Symp Soc exp Biol* 2, 286-325.
- STEDMAN, E. y E. STEDMAN (1951).**- Cell specificity of histones. *Nature* 166, 780-781.
- STENSAAS, L.J.y S.S. STENSAAS (1968).**- An electron microscope study of cells in the matrix and intermediate laminae of the cerebral hemisphere of the 45mm rabbit embryo. *Z Zellforsch* 91, 341-365.
- STONE, L.S. (1960).**- Polarization of the retina and development of the vision. *J exp Zool* 145, 85-95
- STRUMIA, E. y P.L. BAIMA-BOLLONE (1964).**- AChE activity in the spinal ganglia of the chick embryo during development. *Acta Anat* 57, 281-293.

- STUBBELFIELD, E. (1975).**- Analysis of the replication pattern of chinese hamster chromosomes using 5-bromodeoxyuridine supression of 33258 Hoechst fluoresce. *Chromosoma* 53, 209-221.
- SUBURO, A.; N. CARRI y R. ADLER (1979).**- The environment of axonal migration in the developing chick retina: A scanning electron microscopic (SEM) study. *J comp Neurol* 184, 519-536.
- SULLIVAN, P.G. (1972).**- A method for the study of jaw growth using a computer-based three-dimensional technique. *J Anat* 112, 457-470.
- SULLIVAN, P.R.; J. KUTEN; M.S. ATKINSON; J.B. ANGEVINE y P.I. YAKOVLEV (1958).**- Cell count in the lateral geniculate nucleus of man. *Neurol* 8, 566-567.
- SWIFT, H.H. (1950).**- The deoxyribose nucleic acid and content of animal nuclei. *Physiol Zool* 23, 169-198.
- SZEKELY, G. (1945).**- Ausbildung der lokalen funktionelen Spezifitat der Retina. *Acta biol Acad Sci Hung* 5, 157-167.
- TANAKA, A. (1960).**- Electron microscopic study of the avian pecten. *Dobutsugaku Zasshi* 69, 314-317.
- TELLO, F. (1923).**- Les differenciations neuronales dans l'embryon du poulet pendant les premiers jours de l'incubation. *Trab Lab Rech Biol Univ Madrid* 21, 1-93.
- THE BOULDER COMMITTEE (1970).**- (Véase Angevine y cols., 1970).
- THOMPSON, E. (1930).**- Quantitative Microscopic Analysis. *J Geol* 27, 276.

- THOMPSON, H.B. (1899).**- The total number of functional cells in the cerebral cortex of man, and the percentage of the total volume of the cortex composed of nerve cells bodies, calculated from Karl Hammarberg's data; together with a comparison of the number of giant cells with the number of pyramidal fibers. *J comp Neurol* 9, 113-140.
- TOMKEIEFF, S.I. (1945).**- Linear intercepts, areas and volumes. *Nature* 155, 24.
- TOWER, D.B. (1954).**- Structural and functional organization of mammalian cerebral cortex. The correlation of neurone density with brain size. *J comp Neurol* 101,19-51.
- TSANEV, R. y B. SENDOV (1971).**- Possible molecular mechanism for cell differentiation in multicellular organisms. *J Theor Biol* 30, 337-393.
- UNDERWOOD, E.E (1970).**- "Quantitative Stereology". Addison Wesley Publ Ⓒ Reading, Massachussetts, U.S.A.
- UNDERWOOD, E.E. (1983).**- Stereological analysis of particle characteristics. *Acta Stereol* 2, 7-16.
- VAN BUSKIRK, C. (1945).**- The seventh nerve complex. *J comp Neurol* 82, 303-333.
- VOGEL, M. y K. MOLLER (1980).**-Cellular decay in the rat retina during normal post-natal development: A preliminary quantitative analysis of the basic endogenous rhythm. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 212, 243-260.

- VON SZILY, A. (1924).**- Die ontogenie der idiotypischen (erbbidlichen) Spaltbildungen des Auges des Mikrophthalmos und der Orbital cysten. *Z Anat Entwicklungsgesch* 74, 1-230.
- WALD, C. y H. ZUSSMANN (1937).**- Carotenoids of the chicken retina. *Nature* 140, 197.
- WALD, C. y H. ZUSSMANN (1938).**- Carotenoids in the chicken retina. *J Biol Chem* 122, 449-460.
- WALLS, G.L. (1942).**- The vertebrate eye and its adaptative radiation. Bloomfield Hills, Michigan. *Cranbrook Inst Sci Bull* 19.
- WALLS, G.L. y H.D. JUDD (1933).**- The intra-ocular colour filters of vertebrates. *Brit J Ophthalmol* 17, 641-675, 705-725.
- WATTERSON, R.L.; P. VENEZIANO y A. BARTHA (1956).**- Absence of a true germinal zone in neural tubes of young chick embryos as demonstrated by the colchicine technique. *Anat Rec* 124, 379.
- WEIBEL, E.R. (1979).**- "Stereological Methods. 1. Practical Methods for Biological Morphometry". Academic Press, Londres.
- WEIBEL, E.R. y D.M. GOMEZ (1962).**- A principle for counting tissue structures on random sections. *J appl Physiol* 17, 343.
- WEISS, P. (1947).**- The problem of specificity in growth and development. *Yale. J Biol Med* 19, 235-278.

- WEISS, P. y R. AMPRINO (1940).**- The effect of mechanical stress on the differentiation of scleral cartilage in vitro and in the embryo. *Growth* 4, 245-258.
- WEISSMANN, A. (1904).**- "Vorträge über Descendenztheorie". Jena. 2 vols.
- WEYSSE, A.W. y W.S. BURGESS (1906).**- Histogenesis of the retina. *Amer Nat* 40, 611-637.
- WICKSELL, S.D. (1925).**- The corpuscule problem. A mathematical study of a biometric problem. *Biometrika* 17, 84-99.
- WICKSELL, S.D. (1926).**- The corpuscule problem. Second memoir. Case of ellipsoidal corpuscules. *Biometrika* 18, 84.
- WILLIAMS, M.A. (1977).**- "Quantitative Methods in Biology". (A.M. Glauert, ed.) North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pp 5-83.
- WILSON, D.B. (1973).**- Chronological changes in the cell cycle of chick neuroepithelial cells. *J Embryol exp Morphol* 29, 745-751.
- WILSON, D.B. (1974).**- The cell cycle of ventricular cells in the overgrown optic tectum. *Brain Res.* 69, 41-48.
- WILT, F.H. y M. ANDERSON (1972).**- The action of 5-bromodeoxyuridine on differentiation. *Dev Biol* 28, 443-447.
- WINDLE, W.F. y M.F. AUSTIN (1936).**- Neurofibrillar development in the central nervous system of chick embryos up to five days' incubation. *J comp Neurol* 63, 431-463.

YEW, D.T. (1979).- Cell kinetic in retinal morphogenesis. *Neurosci Lett* 13, 173-176.

YOUNG, R.W. (1984).- Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J comp Neurol* 229(3), 362-373.

ZWAAN, J.; P.R. BRYAN (Jr) y T.L. PEARCE (1969).- Interkinetic nuclear migration during the early stages of lens formation in the chicken embryo. *J Embryol exp Morphol* 21(1), 71-83.
