

CLÍNICA QUIRÚRGICA UNIVERSITARIA. VALENCIA  
CÁTEDRA DE TRAUMATOLOGIA Y ORTOPEDIA

Jefe Servicio: Prof. F. GOMAR

## Efectos teratógenos de la radiación sobre las extremidades. Estudio experimental en el embrión de pollo

J. IBORRA BOSCH

### RESUMEN

Se han estudiado experimentalmente las malformaciones producidas en las extremidades del embrión de pollo mediante la irradiación con Co-60, con dosis de 500 a 1.500 rads en los distintos estadios del desarrollo embrionario, desde el comienzo de la incubación hasta los diez días. Se exponen las malformaciones obtenidas en los miembros inferiores y en las alas según el estadio embriológico y las dosis de radiación empleada.

Descriptores: Irradiación y malformaciones. Malformaciones de los miembros.

### SUMMARY

Experimental development limbs anomaly in the chick embryo by Co-60 radiation is reported along a period of time from hatching until ten days after birth. The malformations in the lower limbs and in the wings are described according to the embryological stage and the radiation dose used.

Key words: Experimental deformity of Co-60 radiation.

Considerando la «malformación congénita» como toda alteración anatómica presente en el momento del nacimiento, y que se encuentra fuera del margen de variación biológica normal de la especie humana (BECKER) (1); no es preciso que la dismorfia sea visible en el momento del nacimiento, sino que ésta puede aparecer en una fase posterior del desarrollo.

Una serie de malformaciones congénitas se originan de forma evidente por la acción teratógena de genes específicos, dando lugar a alteraciones de tipo hereditario, siendo éstas unas veces de tipo dominante (condrodisplasia, aracnodactilia, disostosis cleido-

craneal, etc.) que pasan directamente a la descendencia de generación en generación, salvo cuando se produce una mutación genética. Otras malformaciones son de transmisión recesiva (enf. de Morquio, gargolismo, etc.).

Ahora bien, en otras ocasiones la malformación se produce por la acción de agentes teratógenos externos, que actuando sobre el desarrollo embrionario van a dar lugar a la malformación.

Aunque se ha tratado de encontrar factores teratógenos ambientales, hasta el momento sólo se han identificado un reducido número de causas exógenas que ofrecen una

cierta relación etiológica relativamente clara con el desarrollo de malformaciones congénitas en la especie humana (FRASSER y FAINSTAD, 1951) (2). Estas causas se pueden esquematizar de la siguiente forma:

1.- Los efectos de los rayos X sobre el desarrollo ontogénico, especialmente en su aplicación terapéutica a las gestantes o por contaminación radioactiva.

2.- La acción de infecciones víricas sobre el desarrollo embrionario, especialmente la rubeola (GREG, 1941) (3).

3.- La influencia nociva de la carencia de oxígeno (hipoxia o anoxia) sobre el desarrollo embrionario. Una carencia de oxígeno atmosférico, por ejemplo, la estancia en elevadas alturas, puede dar lugar a alteraciones congénitas (INGALLS, 1958) (4).

4.- La acción de la aminopterina (ácido 4-aminopterilglutámico), en especial por lo que concierne a la administración a las embarazadas para inducir el aborto terapéutico (WARKANY, 1959) (5).

5.- La acción de la progesterona sintética sobre el desarrollo embrionario, particularmente en el tratamiento del aborto inminente.

6.- La acción teratogena de hipnóticos y tranquilizantes, como por ejemplo, la acción de la talidomida (ácido N-ftalil-imidoglutámico) sobre el desarrollo del embrión, como se pudo observar desde 1959 en varios países, especialmente en Alemania Federal, su acción como agente responsable de malformaciones es las extremidades (LENZ y KNAPP, 1962) (6).

La experiencia ha demostrado, por otra parte, que los factores teratógenos descritos no siempre desvían de su desarrollo normal a los embriones expuestos, y así, por ejemplo, sólo el 5-30 por 100 de las infecciones rubeólicas de las embarazadas durante el primer tercio del embarazo producen efectos teratógenos, y la ingestión de talidomida entre la cuarta y octava semana del embarazo

implica sólo un 20 por 100 de riesgo de lesionar el desarrollo ontogénico (6). Ello es debido a la sensibilidad específica del embrión en determinada fase del desarrollo ontogénico, y como señaló FRASSER (2) en un amplio grupo de malformaciones congénitas, los factores genéticos actúan modificando el umbral de sensibilidad de los embriones a las influencias teratógenas externas.

El mecanismo de acción de todos estos agentes ha podido comprenderse mejor gracias a los estudios de la teratología experimental, cuyo objetivo es el estudio de los efectos producidos por los agentes exógenos sobre el embrión en desarrollo. Se trata de modificar la armonía natural de la morfogénesis en un momento cronológico determinado y en ciertos casos hasta en territorios embrionarios selectivos.

Los agentes teratógenos utilizados en experimentación animal han sido recogidos por WILSON (1953) (7) en los siguientes apartados:

1.- Factores físicos, como las radiaciones ionizantes, utilizadas muy frecuentemente: RUSSELL (8) en embrión de ratón, GOFF (9), REYSS-BRION (10), KARNOFSKY (11), en embrión de pollo y DEHENHART (12) en embriones de ratas. También se han utilizado la hipotermia, la hipoxia (INGALLS y CURLEY, (15) sobre embrión de ratón y MURAKAMI (14) en ratas).

2.- Deficiencias alimentarias o privación total de alimentos (WARKANY y cols. 15), en ratas gestantes.

3.- El empleo de antimetabolitos como la asacerina (KARNOFSKY, 16), el 5-fluoracilo, el uretano, el 6-aminonicotinamida (DAGG, 17), etc. en el embrión de pollo.

4.- Hormonas como la cortisona y derivados (KARNOFSKY, 16), la insulina (LANDAUER, 18), estrógenos y andrógenos, etc.

5.- Las infecciones, habiéndose empleado el virus A de la influenza (HAMBUERGER

y HABEL, 19), el virus del herpes simple, el virus de Newcastle, etc.

6.— Otros diversos fármacos y quimioterápicos, como algunos oligoelementos, como el selenio y manganeso, que pueden ser teratógenos (GRUNDWALD, 20), la pilocarpina (LANDAUER, 18), y el cloruro de litio empleado por LEHMANN (21) en embriones de tritón alpestre.

Como resumen de todos los estudios experimentales realizados podemos decir que los diversos agentes teratógenos actúan produciendo una determinada malformación congénita según el momento cronológico de actuación sobre el desarrollo embrionario, debido a que la sensibilidad sobre los rudimentos embriogénicos dependen del grado de diferenciación alcanzado por éstos. Y es durante la fase de máxima organogénesis cuando la sensibilidad a los diversos agentes es máxima. Parece ser que el efecto sobre las fases tempranas del desarrollo embrionario consiste fundamentalmente en la modificación del curso de las mitosis dentro de los blastemas sensibles, provocando la muerte celular, de manera que si ésta sobrepasa los límites de la compensación se inicia una alteración de la organogénesis que se manifestará por una malformación congénita.

Nosotros hemos estudiado en este trabajo el efecto de la radiación sobre el desarrollo esquelético de los miembros en el embrión de pollo, empleando para ello la radiación gamma del tipo de la emitida por el Cobalto-60, debido a que en nuestra revisión bibliográfica no hemos encontrado trabajos realizados con este agente, ya que la mayoría de los autores utilizan la radioterapia de ortovoltaje de 200 a 250 KV, y hemos creído interesante el utilizar este tipo de radiación en teratología experimental.

El efecto de la radiación ionizante sobre el desarrollo embriológico ha sido estudiado exhaustivamente por diversos autores. Ya en 1904, sólo nueve años después del descubrimiento de ROENTGEN, GILLMAN (22) fue

el primero en señalar que los rayos X eran tóxicos para el embrión de pollo, produciendo retrasos en el crecimiento y anormalidades del desarrollo. Posteriormente cabe destacar los trabajos de ESSEMBERG en 1935 (23), estudiando los efectos de los rayos X sobre el desarrollo del embrión de pollo, en el que señala un período crítico de inducción de anomalías en los miembros a las 48 horas de incubación. KARNOFSKY, en 1950 (11) estudia la toxicidad de los rayos X en el embrión de pollo viendo que los efectos con muerte inmediata tienen un máximo de incidencia en el octavo día de la incubación, cosa que ha podido ser confirmada por nosotros (ZARAGOZA e IBORRA, 24). HICKS, en 1953 (25), estudia las alteraciones en el esqueleto de los miembros de las ratas irradiadas entre el 10.º y 13.º día de gestación. RUSSELL, en 1956 (8), realiza el más completo estudio de la radiación sobre embriones de ratón, irradiando ratas gestantes desde el 6 1/2 al 12 1/2 días de embarazo, época ésta de máxima organogénesis en el ratón. Este autor señala como cada anomalía observada en los ratones recién nacidos, puede producirse por irradiación sólo durante un corto período de tiempo, a veces un simple estadio de la organogénesis, al cual denomina «período crítico». Aumentando la dosis, el período de respuesta se puede aumentar al mismo tiempo que aumenta el grado de incidencia de las anomalías encontradas. REYS-BRION en 1956 (10), estudia la sensibilidad diferencial de los huevos entre las 12 y las 36 horas de incubación con dosis de 600 y 800 R, encontrando que en este período son los somitos, la notocorda y el sistema nervioso, provocando alteraciones del esqueleto axial variable según la cronología, siendo los esbozos en vía de diferenciación los más sensibles. GOFF, en 1962 (9), realiza un detallado estudio sobre la acción de los rayos X sobre el desarrollo de los miembros del embrión de pollo en los distintos estadios del desarrollo,

señalando la existencia de dos períodos de sensibilidad, precoz (entre los estadios 12 y 16) y tardío (a partir del estadio 20 y hasta el 31), separados ambos por una fase de relativa insensibilidad situado alrededor del estadio 18 del desarrollo y equivalente a los 2'5 días de incubación. En 1971 publicamos nosotros los efectos teratológicos de la radiación gamma emitida por el Cobalto-60 sobre el esqueleto axial del embrión de pollo (IBORRA, 26).

### Desarrollo del embrión de pollo

Previamente a estudiar la metódica empleada y los resultados obtenidos, creemos necesario hacer un breve repaso del desarrollo normal del embrión del pollo.

Se debe a HAMBURGER y HAMILTON (27) el haber realizado un estudio sistematizado y completo del desarrollo del embrión de pollo que abarca el período total de incubación y que se ha hecho clásico. Para lograr la identificación del estadio evolutivo, han tenido que basarse en unos elementos que fueran lo suficientemente fijos y al mismo tiempo que fueran visualizados fácilmente; y así adoptan como criterio guía a partir del segundo día el número de somitos existentes. Y es a partir del estadio 14, correspondiente a la existencia de 22 pares de somitos, cuando el comienzo del esbozo de los miembros, da una nueva base para establecer posteriores estadios de la evolución embriológica.

El estadio 1 de HAMBURGER y HAMILTON comienza en el momento de la incubación y se refiere a la fase anterior de la aparición de la línea primitiva. Durante el estadio 2, aparece el primer esbozo de lo que será la línea primitiva (tras 6 ó 7 horas de incubación). Esta se va desarrollando sucesivamente, hasta que en el estadio 4 (18-19 horas de incubación), ha alcanzado su máximo desarrollo en longitud (1'88 mm. según

SPRATT (28). Inmediatamente se va a formar el nódulo primitivo de Hensen, del que se deriva la notocorda, que comienza a desarrollarse durante el estadio 5 (19-22 h. incubación), alcanzando su completo desarrollo durante el estadio 6 (23-25 h.). A las 21 horas a partir de un engrosamiento del ectodermo se forma la «placa neural» que progresivamente se transformará en el «canal neural».

Durante el estadio 7 (25-26 h. incubación) comienza a expensas del mesodermo la segmentación primitiva, apareciendo con ello el primer par de somitos, período en el que el tubo neural es bien visible en la región cefálica. Progresivamente van aumentando el número de pares de somitos, que crecen en dirección cráneo-caudal.

En el estadio 12 (45-49 horas) y en el que existen 16 pares de somitos, de la pared ventral se expande una masa de medenquima denominada esclerotema, que rodeará a la notocorda y al tubo neural, para dar lugar a lo que será el esqueleto axial del embrión, el cual sufrirá posteriormente un proceso de neosegmentación. La notocorda se reabsorberá y de ella quedará como único vestigio el núcleo pulposo de la columna vertebral.

A partir de las 48 horas, el número de somitas va creciendo progresivamente al mismo tiempo que el embrión va aumentando de tamaño y se va acentuando la curvatura del dorso. En el estadio 14 (50-53 horas) existen 22 pares de somitas, pero a partir de este momento resulta difícil determinar con claridad el número de los mismos, debido a lo disperso del mesodermo en la parte anterior de los somitas y a la curvatura de la cola. Por este motivo, a partir de este momento, HAMBURGER y HAMILTON utilizan como criterio identificativo los esbozos de los miembros y otras estructuras visibles, como son los arcos viscerales, que en forma de surcos ectodérmicos situados a nivel del cuello empiezan a aparecer en este período.

Alrededor de las 50-55 horas de incubación, correspondientes al estadio 15, comienza a producirse una condensación del mesodermo a cada lado del tronco constituyendo las áreas prospectivas de lo que serán los esbozos de las alas, todavía no demarcadas. En este momento existen 24 a 27 pares de somitas, la flexura cervical aumenta y el tronco se delimita. En el estadio 16 (51-56 horas) los esbozos de las alas comienzan a hacer prominencia, mientras que los esbozos de los miembros inferiores están todavía representados por una condensación mesodérmica. Posteriormente entre las 52 y 54 horas (estadio 17), los esbozos de los miembros se distinguen perfectamente y son de un tamaño semejante a los de las alas. Durante los estadios 18 y 19 se produce un alargamiento simétrico de los esbozos de ambos miembros, siendo ya en este momento ligeramente más largos y voluminosos los correspondientes al miembro inferior (estadio 20), y haciéndose claramente manifiesto la tendencia al aflamamiento en sentido caudal en el estadio 22 (3'5 días de incubación).

A partir del estadio 24 (4 días), las patas son claramente más largas que anchas, la placa digital está ya claramente delimitada en las patas, aunque los dedos no lo están aún. En el estadio 25 (4'5 de incubación) se distinguen las articulaciones del codo y rodilla, pero aún no se han delimitado los dedos. En el estadio 27 (5 días), el contorno de la placa digital en la región del primer dedo es ya angular. Se inician surcos entre el 1.º, 2.º y 3.º dedos del ala. En el miembro inferior el primer dedo se proyecta sobre la región tarso-metatarsiana en ángulo obtuso. Aún no se delimita el extremo del tercer dedo. En el estadio 29 (6 días incubación), el ala aparece incurvada a nivel del codo. El 2.º dedo es claramente más largo que los otros. Existe un surco superficial entre el 1.º, 2.º y 3.º dedos. En los miembros inferiores al 2.º, 3.º y 4.º dedos aparecen como abultamientos separados por surcos bien vi-

sibles, con indicación de la membrana interdigital entre ellos. Se ve el rudimento del 5.º dedo.

En el estadio 31 (7 días), sólo queda una pequeña muestra de la membrana interdigital entre el 1.º y 2.º dedos del ala. Aún se observa el rudimento del 5.º dedo en la pata.

En el estadio 34 (8 días), se observa claramente el diferente crecimiento entre el 2.º y 3.º dedos del ala. El contorno de la membrana interdigital entre los dedos de la pata es cóncavo. En el estadio 35 (8-9 días): ha desaparecido la membrana interdigital entre los dedos del ala y pata. Las falanges de los dedos del pie se encuentran claramente delimitadas.

Durante los siguientes estadios del desarrollo, hasta el estadio 46, que se corresponde con los 21 días de incubación y nacimiento del pollo, no se produce la formación de ningún nuevo órgano, sino el desarrollo de los ya existentes, por ello para determinarlos recurren los autores a la medición del pico y a la longitud de los dedos de las patas. Junto a estos criterios básicos, existen una serie de detalles secundarios, que vienen a perfilar, junto con los otros caracteres esenciales mencionados el estadio del desarrollo del embrión.

En el embrión de pollo ya completamente constituido, a los 20 días de incubación el ala está ya completamente constituida, y está formada por el húmero, hueso largo y robusto, que cuando el ala está completamente plegada, se mantiene casi horizontalmente apoyado en la caja torácica, su extremidad inferior se dirige hacia atrás para articularse con dos huesos largos y potentes que constituyen el cúbito y el radio. Los huesos del carpo se han modificado considerablemente y han reducido su tamaño, o bien se han unido, quedando reducido sólo a dos, un carpometacarpal y un carpocubital. El desarrollo de la mano ha sufrido un importante proceso evolutivo, pues a partir de un

esbozo de mano pentodáctila que se puede observar en el embrión de 6 días (Fig. 1), la mano en el embrión evolucionado está re-

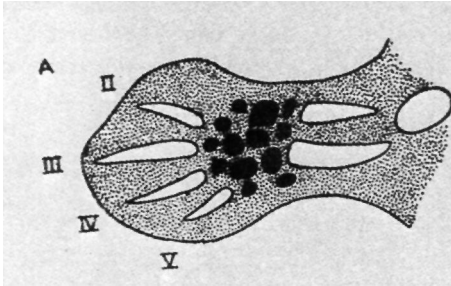


FIG. 1.— Desarrollo del ala. El esbozo del miembro en un ambrión de seis días de incubación muestra una organización típica pentadáctila en los rudimentos cartilagosos que preceden a la formación ósea y con representación del segundo al quinto dedos.

presentada por tres dedos representativos del 2.º, 3.º y 4.º del miembro pentadactílico. El tercer y cuarto metacarpianos están bien desarrollados y unidos próximo y distalmente, quedando un pequeño vestigio del 2.º y 5.º, que se unen junto con los anteriores a los huesos del carpo para formar el

carpo-metacarpo. Solamente el tercer dedo, central, está bien desarrollado y provisto de dos falanges bien constituidas. El 2.º dedo está representado por una pequeña falange proximal y otra distal. El cuarto dedo consta de una sola falange y es muy pequeño (Fig. 2).

La extremidad inferior del pollo está constituida por el fémur, que es un hueso largo y potente, ligeramente incurvado, y que presenta una posición casi horizontal. Proximalmente presenta una cabeza que penetra en el acetábulo. El extremo distal está constituido por una especie de polea, la troclea, que se continúa hacia atrás con los cóndilos. Alojado en el surco central de la troclea aparece la rótula. Articulándose con la extremidad inferior del fémur está la tibia, que en el pollo constituye el llamado tibio-tarso. El peroné es de tamaño reducido, abarcando solamente los 2/3 proximales del tibio-tarso. La extremidad inferior de la tibia se articula con el tarso-metatarso.

En el embrión a término, el primer metatarsiano queda libre y reducido a un pequeño hueso muy parecido a una falange, que se proyecta por detrás del extremo dis-

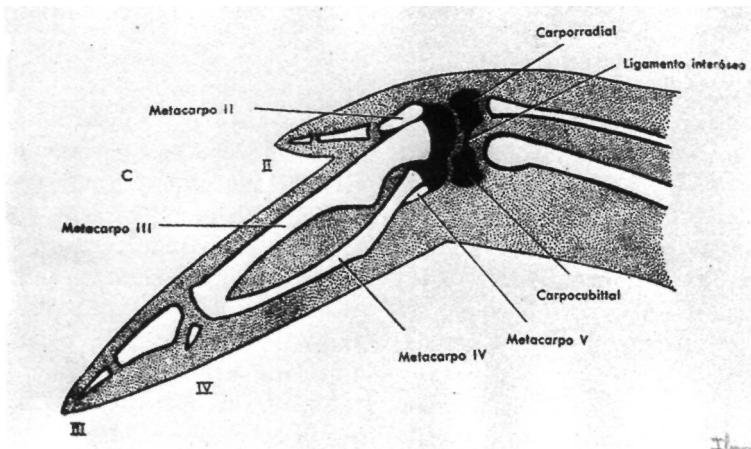


FIG. 2.— Esquema de la extremidad distal del ala ya constituida, en la que existen tres dedos representativos del segundo, tercero y cuarto del miembro pectadactílo, pero sólo el mediano (III) está bien desarrollado y va provisto de dos falanges manifiestas. El dedo anterior (II) viene representado por una pequeña falange proximal y otra distal emergiendo anteriormente. El dedo posterior (IV) consta de una sola falange y es muy pequeño.

tal del tarso-metatarso. Los tres grandes metatarsianos (2.º, 3.º y 4.º) quedan unidos entre sí excepto en sus extremos distales. Cada metatarsiano se articula con su dedo correspondiente. El primer dedo, implantado más proximalmente y dirigido hacia atrás, presenta dos falanges; mientras que los otros tres lo hacen hacia delante y presentan tres, cuatro y cinco falanges respectivamente (Fig. 3).

### Material y métodos

#### Planteamiento del problema

Como ya hemos podido ver, la acción teratogena de la radiación sobre los embriones se ha comprobado clínica y experimentalmente. Esta actúa provocando alteraciones en el desarrollo durante el período embriológico de mayor organogénesis, es decir, aquel durante el cual se diferencian los principales órganos y sistemas del embrión que luego no harán sino completar su desarrollo. Este «período crítico» comprende en el ratón, según RUSSELL (27), del 6.5 al 12.5 días, y en el pollo es mucho más precoz, oscilando entre las 18 horas y el 5.º día de incubación. En el embrión humano el período de máxima organogénesis se encuentra entre la 5.ª y 8.ª semanas de gestación.

También se ha podido demostrar que los agentes teratogénos, cuando actúan en un período temprano del desarrollo producen una mayor mortalidad del embrión, pero los embriones supervivientes son generalmente normales. Igualmente se ha demostrado, que el tipo de malformación inducido depende del momento embriológico sobre el que ha actuado el agente teratogénico, de modo que cierto tipo de malformaciones sólo se pueden producir durante un corto intervalo del desarrollo embriológico, a veces durante un simple estadio, el correspondiente a la organogénesis específica de dicha malformación, a lo que RUSSELL ha llamado «período crítico». Se puede observar que incrementando la dosis utilizada se puede alargar el período de respuesta, al tiempo que aumenta la incidencia y grado de anormalidad.

Nosotros hemos tratado de sistematizar la acción de la radiación sobre el desarrollo del embrión de pollo irradiando el huevo totalmente a través de la cáscara, a fin de evitar la posible acción teratogénica vinculada al hecho de abrir dicha cáscara durante estadios precoces. En esta técnica

no queda protegido ningún órgano, a diferencia de lo que ocurre con los métodos de radiación selectiva que concentran el foco en una determinada área para producir una lesión muy concreta. Esto explica, por otra parte, las cifras de mortalidad encontradas en los diferentes estadios para dosis de radiación elevadas.

#### Animal de investigación

Hemos utilizado huevos fecundados de gallina de una raza híbrida obtenida mediante el cruce de

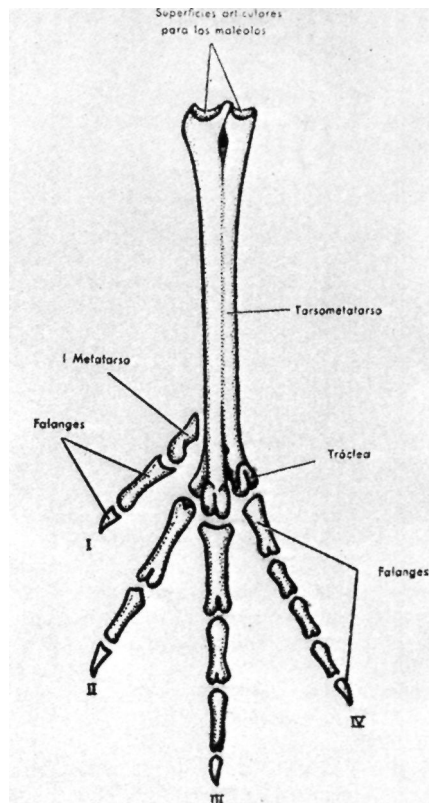


FIG. 3.—La porción distal del miembro inferior, está formada por los metacarpianos, de los cuales sólo el primero queda libre en forma de un pequeño hueso, parecido a una falange, que se proyecta hacia atrás. Los tres grandes metatarsianos (segundo, tercero y cuarto) quedan unidos, excepto en sus extremos distales, para constituir el tarsometatarso. Cada metatarsiano se articula con las falanges del dedo correspondiente. El primero de éstos está dirigido hacia atrás y presenta dos falanges, en tanto que los otros tres lo hacen hacia delante, presentando tres, cuatro y cinco falanges respectivamente.

la variedad White Mountain 978 con la Houbard 663, obtenidas de la granja comercial Houbard Levante. Los huevos fueron incuados en una máquina «Robbins automática» a una temperatura de 100° F., equivalentes a 37.77° C., y con una humedad relativa del 75 por 100.

Los huevos se han tomado en diferentes momentos de su desarrollo embriológico, y en todos los casos, una vez sometidos a la irradiación correspondiente, se han llevado de nuevo a la incubadora donde permanecen hasta los 18 días, fecha en la que se abre el huevo y se extrae el pollo para su estudio. El porcentaje de huevos no fecundados encontrados en el momento de la apertura fue del 2 por 100, lo cual es una cifra muy baja, debido a que se trata de una raza muy seleccionada y procedente de animales jóvenes, de edad aproximada a un año.

#### *Técnica de la irradiación*

Hemos irradiado los embriones con la radiación gamma procedente del aparato de telecobaltoterapia «Orbitrón», propiedad de la Facultad de Medicina-Junta Provincial del cáncer de Valencia. Hemos elegido este agente por dos razones: en primer lugar, porque las experiencias clásicas se han realizado casi siempre con radioterapia de 200 a 250 KV, no habiendo encontrado en nuestra revisión bibliográfica ningún trabajo en el que se haya empleado la radiación gamma del cobalto. Por otra parte, la utilización de este agente supone el empleo de una radiación de supervoltaje, con las ventajas consiguientes respecto a la calidad de la radiación y la homogeneidad en la absorción. Frente al espectro continuo de radiación proporcionado por el aparato de radioterapia clásico, el cobalto radioactivo emite radiación gamma de 1.17 y 1.33 Mev. Al absorberse estas radiaciones, lo hacen predominantemente por el efecto Compton, cuyo coeficiente básico de absorción es independiente del número atómico del material absorbente, dependiendo sólo del número de electrones de material, lo que asegura una mayor homogeneidad en la absorción de toda la estructura del huevo expuesto, pudiendo prescindir de la consideración de las diferencias de absorción motivadas por la interposición de la cáscara, que de todas formas serían de escasa importancia.

La irradiación la hemos realizado a una distancia de 65 cm. administrando dosis crecientes de 100 en 100 rads, comenzando por una dosis inicial de 500-r, considerada tras varias experiencias previas la dosis a partir de la cual pueden comenzar a encontrarse alteraciones morfológicas en el embrión; y hasta una dosis máxima de 1.500-R, dosis en la que la mortalidad del em-

brión es prácticamente del 100 por 100. Hemos tenido en cuenta la eficacia biológica relativa del Cobalto-60 que hemos considerado como de 0.9, calculando según ella la dosis en Rads a administrar.

Hemos irradiado, en conjunto, trescientos huevos a diferentes intervalos de la iniciación de la incubación, correspondientes a los estadios de desarrollo 1-2, 7, 12, 19, 27, 29, 31, 34 y 35, que oscilan desde las 3-6 horas de incubación hasta los 9 días de la misma, momento en el que la organogénesis del embrión de pollo está completamente concluida. Previamente a la irradiación confirmamos el estadio embriológico de los huevos a tratar mediante la observación macroscópica de un embrión testigo al que consideramos representativo del grupo.

#### *Técnica de preparación de los embriones*

Los huevos se abren a los 18 días de la incubación. El embrión se extrae, se pesa y examina macroscópicamente. Seguidamente se depluman y evisceran; y a continuación se preparan para su examen según la Técnica de tinción con rojo de alizarina de DAWSON, que se desarrolla según las siguientes fases:

1.<sup>a</sup>.— Fijación en alcohol de 95° durante 48 a 72 horas.

2.<sup>a</sup>.— Introducción en acetona pura durante 4 a 6 días con objeto de disolver la grasa.

3.<sup>a</sup>.— Maceración del embrión en solución de KOH al 1 por 100 durante los días suficientes para que los huesos se hagan visibles a través de las partes blandas transparentes.

4.<sup>a</sup>.— Tinción con sol. al 0.1 por 100 de rojo de alizarina en solución al 1 por 100 en KOH. Se mantiene hasta que los huesos toman la coloración roja de la intensidad deseada.

5.<sup>a</sup>.— Se aclara el sol. de DAWSON (Sol. de KOH y glicerina en agua destilada).

6.<sup>a</sup>.— Finalmente se pasa por concentraciones crecientes de glicerina hasta su aclaramiento.

Con este proceso obtenemos una preparación para la observación macroscópica por transparencia, en la que todo el tejido óseo se ha teñido de color rojo intenso, siendo visible a través de las partes blandas transparentes (Fig. 4), pudiéndose valorar las alteraciones óseas macroscópicamente existentes.

#### *Exposición de los resultados*

Vamos a describir los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en cuanto a malformaciones de





FIG. 4.— Detalle de los miembros inferiores de un embrión de pollo irradiado con 1.300-R en el estadio 2. En él se puede apreciar el acortamiento de ambos fémures, el acortamiento e incurvación de la tibia derecha, la malposición en hiperextensión de la articulación tibio-tarsometatarso. La falta del esbozo del primer metatarsiano, el acortamiento del segundo y las fusiones falángicas.

los miembros, haciéndolo por separado para el miembro inferior y para el superior o ala.

Tenemos que hacer constar, que los resultados son puramente cualitativos, puesto que aunque hemos irradiado tres embriones por estadio y dosis, creemos que tal número no autoriza a realizar ninguna conclusión estadística. Posiblemente en posteriores trabajos, irradiando un número superior de embriones por estadio, podamos dar una exacta relación porcentual de la frecuencia de las alteraciones encontradas en las diversas fases de desarrollo y dosis.

#### 1) *Malformaciones a nivel del miembro inferior*

La irradiación de los embriones de pollo durante los primeros estadios del desarrollo, correspondientes al estadio 1-2 de HAMBURGUER y HAMILTON (3 a 6 horas) y estadio 7 (24 horas) se han caracterizado por la producción de malformaciones que afectan fundamentalmente al esqueleto axial del embrión, dado que en estas fases

se produce la organogénesis de la columna vertebral. El estudio de estas alteraciones ya fue motivo de otro trabajo (IBORRA, 1971) (26).

En estos estadios precoces no se encontraron alteraciones significativas a nivel de los miembros inferiores. Solamente pudimos encontrar, en el estadio 1-2, un embrión irradiado con una dosis de 1.300-R, en el que se encontraron graves alteraciones: acortamiento de fémur, incurvación de tibia, acortamiento tarsometatarsiano, fusiones falángicas, etc. (Fig. 4), las cuales consideramos como una mutación genética provocada por la radiación, ya que escapa a todo patrón de alteración.

Durante el estadio 7 (24 a 26 horas), van a seguir dominando las alteraciones vertebrales, puesto que durante el mismo lo que domina es la segmentación primitiva del embrión bajo el efecto inductor de la notocorda y tubo neural.

En el estadio 12 (2 días incubación), las alteraciones a nivel del esqueleto axial son más raras y menos características. Las alteraciones a nivel de

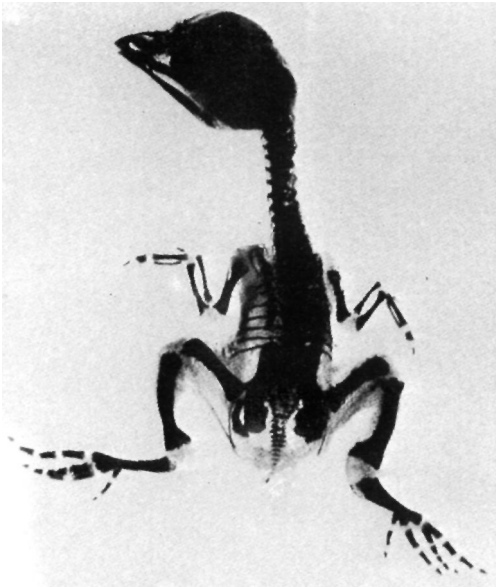


FIG. 5.—Embrión irradiado con una dosis de 1.300-R durante el estadio 12, en el que se observan alteraciones de «reducción» en ambos miembros inferiores, con acortamiento fémur, acortamiento e incurvación ambas tibias, agenesia peroné y acostamiento ambos tarsometatarsos. No se encuentran alteraciones a nivel dedos.

los miembros inferiores comienzan a aparecer a partir de la irradiación con 1.200-R, en la que observamos graves alteraciones en el pie izquierdo de un embrión nacido muerto. Con dosis de 1.300-R encontramos ya alteraciones de las que podemos calificar de «reducción» y que engloban malformaciones que van desde la agenesia al acortamiento del miembro o porción del mismo, a incurvación o adelgazamiento de alguno de sus componentes óseos. Así encontramos acortamiento de huesos largos, como el fémur, acompañado de incurvación de tibia y agenesia de peroné y acortamiento a nivel del tarsometatarso (Fig. 5). Con 1.400-R encontramos alteraciones de «reducción» a nivel del tarsometatarso. La dosis de 1.500-R fue letal para los embriones.

Durante el estadio 19 (3 días incubación) no encontramos alteraciones de los miembros inferiores hasta dosis de 900-R, en que encontramos adelgazamiento generalizado de todos los componentes óseos del miembro inferior. Con 1.100-R nos encontramos con una malformación a nivel de la articulación tibio-tarsometatarsiana, que se encuentra en acusado recurvatum, acortamiento del tarsometatarso y fusiones falángicas (Fig. 6 a y b). Con 1.200-R, junto con fusiones somáticas a nivel del raquis cervical, se observan acortamiento

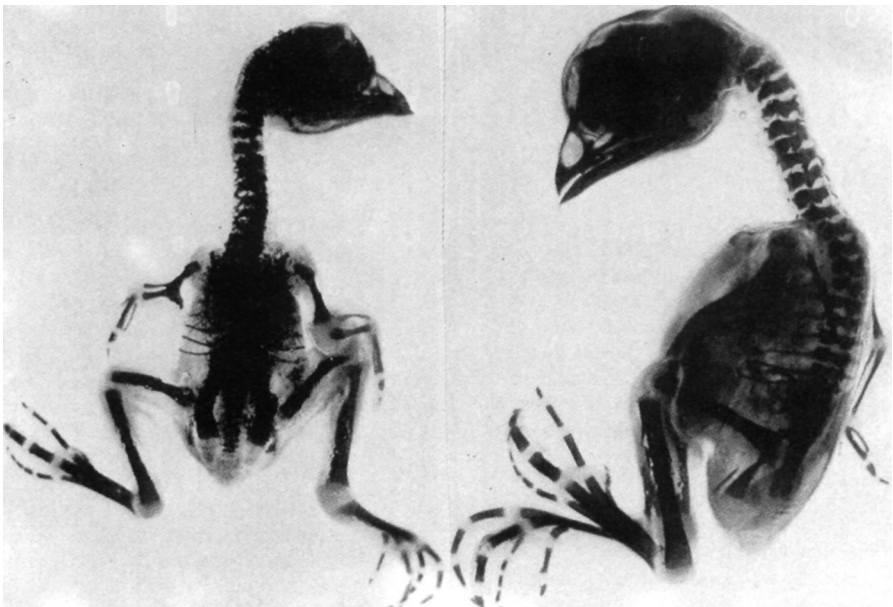


FIG. 6, a.—Embrión irradiado con una dosis de 1.100-R durante el estadio 19. En él se aprecia una malposición articulación tibio-tarsometatarso en recurvatum, acortamiento del tarso-metatarso y fusiones falángicas. A nivel del ala derecha se observa la hipoplasia del húmero, con fusión articulación húmero-radio-cubital (codo).

FIG. 6, b.—Perfil del mismo embrión en el que se pueden apreciar las alteraciones anteriormente descritas.

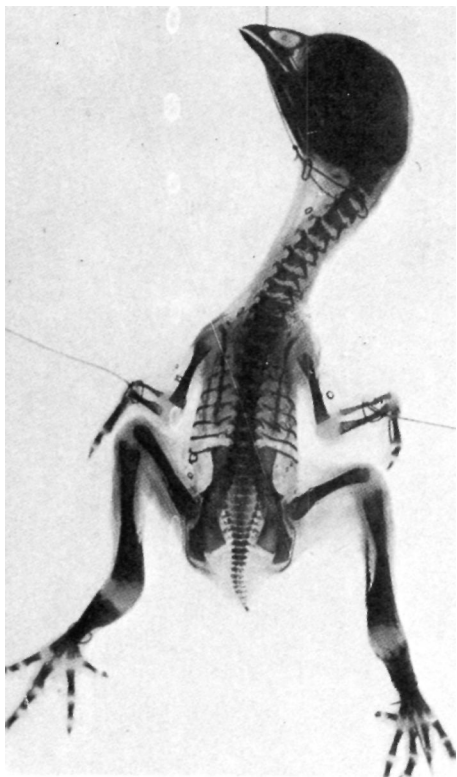


FIG. 7.— Embrión irradiado con 500-R durante el estadio 24 del desarrollo (4 días de incubación), en el que se observan alteraciones a nivel porción distal miembros inferiores en forma de acortamiento tarso-metatarso y polidactilia pata izquierda en la que aparece un quinto dedo y que parece corresponderse con un metatarsiano específico.

to del tarsometatar, dedos flexos y fusiones falán-gicas. A partir de 1.300-R la dosis resultó letal para los embriones.

La irradiación durante el estadio 24 (4 días de incubación) nos muestra la existencia de malformaciones más frecuentes e importantes a nivel del miembro inferior. Con dosis de 500-R encontramos ya alteraciones a nivel del tarsometatarso y dedos (polidactilia) (Fig. 7). Con 600 y 700-R no se encontraron malformaciones. Con 800-R encontramos la presencia de sindactilias. Con 900-R encontramos fenómenos de «reducción» con acortamientos tarsometatarsiano, hipofalangias y fusiones falán-gicas, todo ello con grave alteración morfológica de las patas. A partir de 1.000-R empezamos a encontrar gran acortamiento e incurvación aguda del tarsometatarso, hipofalangias y

fusiones falán-gicas (Fig. 8). Con 1.200-R la incurvación del tarsometatarso es tan intensa, que le dan a las patas el aspecto de «patas zambas», (Fig. 9), siempre acompañadas de hipofalangias y fusiones falanges. Con 1.300-R, junto con importante retardo del desarrollo ponderal e hipoplasia pélvica, encontramos alteraciones de «fusión» a nivel de la articulación femoro-tibial, importante acortamiento con incurvación tarsometatarso (patas zambas), hipofalangias y fusiones (Figuras 10 y 11 a y b). Con 1.400-R encontramos alteraciones de «reducción» con acortamiento a nivel del fémur, hemimelia tibia con hipoplasia peroné, gran hipoplasia e incurvación tarsometatarso, agenesia dedos con ectrodactilia y fusiones falán-gicas (Fig. 12). Con 1.500-R se encuentran alteraciones pélvicas con fusiones, articulaciones coxo-femorales,

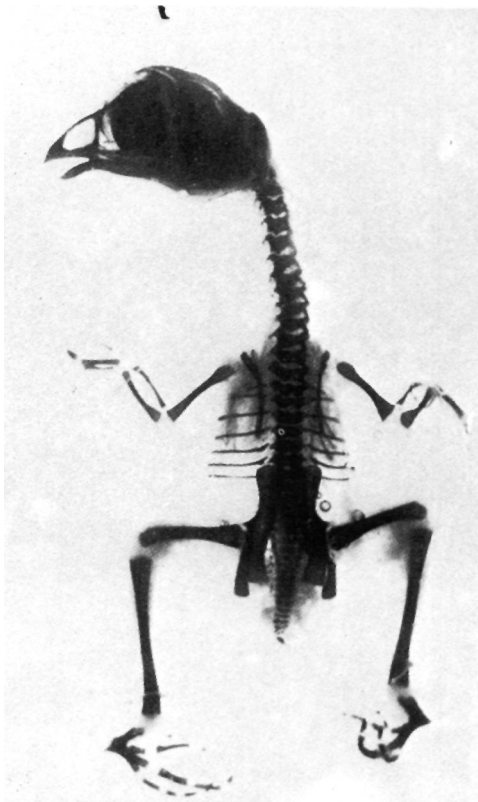


FIG. 8.— Embrión irradiado con 1.000-R durante el estadio 24, en el que se observa el acortamiento e incurvación del tarsometatarso de ambos miembros inferiores, que dan a las patas un aspecto de «patas zambas». Hipofalangias, fusiones falanges e incurvación de éstas.

acortamiento fémur, fusiones femoro-tibiales, acortamiento e incurvación tibias, agenesia tarso-metatarso y agenesias y fusiones a nivel dedos y falanges (Fig. 13 a y b).

Durante el estadio 27 (5 días incubación) dominan las alteraciones a nivel de las porciones distales de los miembros inferiores, que se empiezan a manifestar a partir de dosis de 800-R y se caracterizan fundamentalmente por lesiones de «reducción» en forma de hipofalangias y fusiones falanges. A partir de dosis de 1.300-R se produjo la muerte de los embriones (Fig. 14).

Durante el estadio 29 (6 días de incubación), las alteraciones encontradas fueron regulares, afectando a la totalidad de los embriones ya a partir de la dosis mínima de 500-R, y siendo la

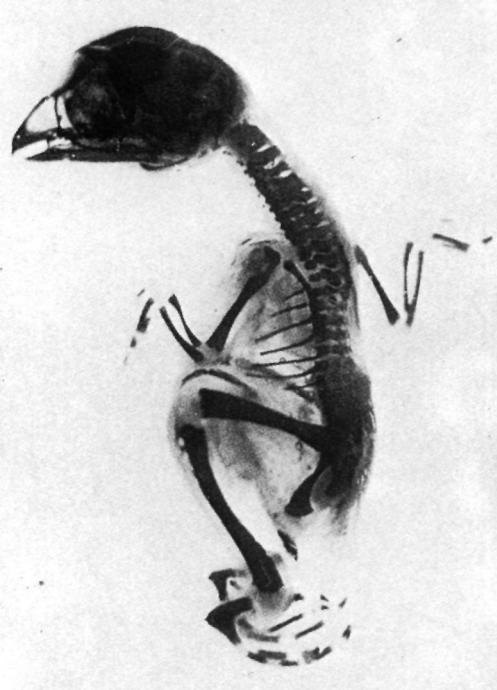


FIG. 9.— Embrión de pollo irradiado con una dosis de 1.200-R durante el estadio 24 del desarrollo, en el que se observa el acortamiento y gran incurvación del tarsometatarso de ambos miembros inferiores, con aspecto de «patas zambas». Hipofalangias y fusiones falanges. A nivel de las alas podemos observar la hipoplasia bilateral del cuarto metacarpiano. Se asocian múltiples fusiones somáticas a nivel raquis cervical.

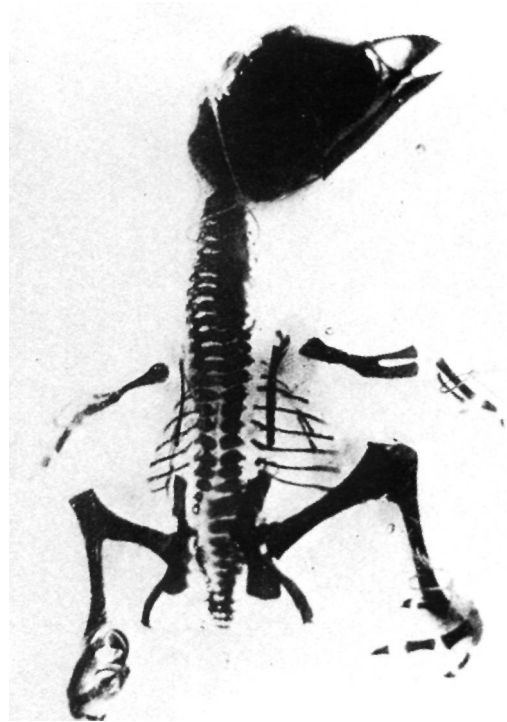


FIG. 10.— Embrión irradiado con 1.300-R durante el estadio 24 del desarrollo, en el que se observan a nivel de miembros inferiores una hipoplasia pélvica, con alteraciones de «fusión» a nivel articulación coxo-femoral derecha, femoro-tibial bilateral. Importante acortamiento e incurvación tarsometatarso con «patas zambas». Hipofalangias, fusiones falanges e incurvación de las mismas. A nivel de las extremidades superiores (alas) se pueden observar una «fusión» bilateral articulación húmero-cubito-radial (codo), con hipoplasia cuarto metacarpiano y ausencia esbozo del segundo dedo. Se asocian múltiples lesiones a nivel del raquis.

localización de las malformaciones la porción distal de las patas en forma de hipofalangias y fusiones falanges. La dosis fue letal a partir de 1.400-R.

Durante el estadio 31 (7 días de incubación), no se encontraron alteraciones de los miembros inferiores hasta llegar a la irradiación con dosis de 1.000-R, en la que se afectaron la porción distal de los mismos con lesiones del tipo de hipofalangias y fusiones falanges. A partir de 1.300-R la dosis resultó letal para los embriones.

Durante el estadio 34 (8.º día de incubación) no se encontraron alteraciones óseas ni en el esqueleto axial ni en el periférico, por estar en esta

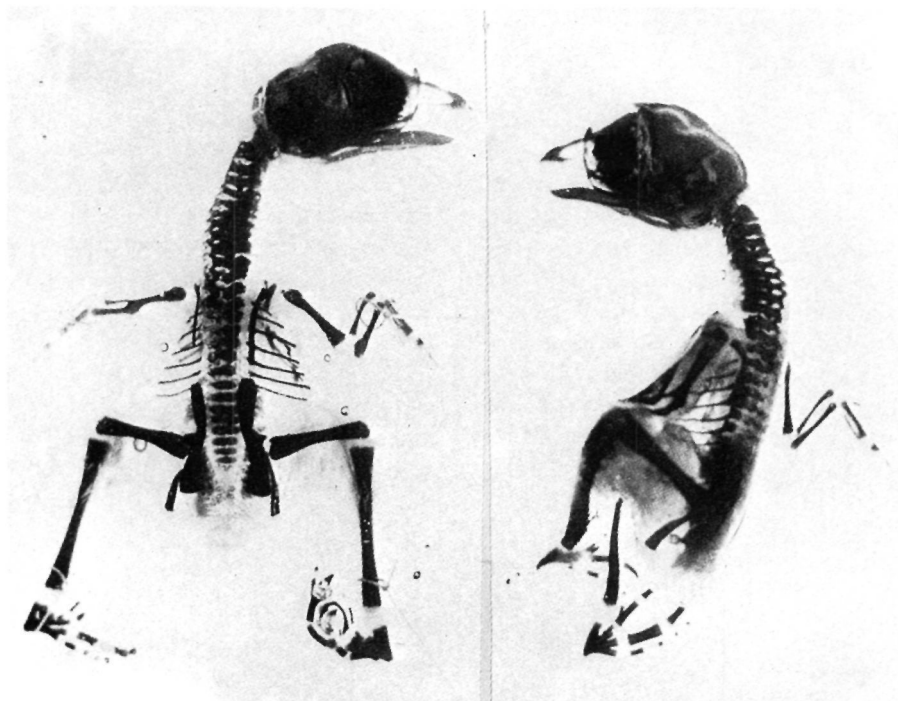


FIG. 11. *a.*— Se puede apreciar la vista antero-posterior de la preparación de un embrión irradiado con 1.300-R durante el estadio 24 del desarrollo. En él se puede apreciar a nivel de los miembros inferiores el acortamiento bilateral fémur, el acortamiento e incurvación tarsometatarso («patas zambas»), hipofalangias, fusiones falángicas con incurvación de las mismas. A nivel alas encontramos junto con una hipoplasia escápula, la hipoplasia húmero y cúbito derechos, asociadas a fusión codo del mismo lado.

FIG. 11. *b.*— Se observa la preparación de perfil del mismo embrión de la figura anterior, en la que se pueden apreciar las alteraciones anteriormente descritas.

fase ya terminada la organogénesis. Sin embargo, fue en este estadio en el que la mortalidad del embrión resultó mayor, pues a partir de 900-R, dosis con la que se obtuvo una mortalidad del 50 por 100, la radiación resultó letal para la totalidad de los embriones.

## 2) Malformaciones a nivel de las alas

Las malformaciones obtenidas por radiación con Co-60 a nivel de las alas, son mucho menos frecuentes y específicas que a nivel de los miembros inferiores.

En nuestra experiencia hemos obtenido malformaciones a nivel del ala, fundamentalmente en dos estadios:

- En el estadio 19 (3 días incubación).
- En el estadio 24 (4 días de incubación).

Sin que se hayan obtenido alteraciones significativas en otro período.

En el estadio 19, con dosis medias de 700-R se pueden observar pequeñas alteraciones distales como la falta de esbozo del segundo dedo del ala. A partir de 1.100-R nos encontramos alteraciones de «reducción» como acortamiento del húmero, y alteraciones de «fusión» como es la húmero-cubito-radial (codo) (Fig. 6 a y b). Con 1.200-R se vuelve a encontrar fusión a nivel del codo.

En el estadio 24, a partir de dosis altas de 1.200-R encontramos hipoplasias a nivel metacarpianos y falta de esbozos falanges, principalmente del 2.º dedo. Con 1.300 y 1.400 rads encontramos sistemáticamente como característica la fusión del codo (Figuras 10, 11 y 12). Con 1.500-R encontramos hipoplasia de la cintura escapular, fusiones codos e hipoplasia cúbito y radio (Fig. 13).

### Discusión

En cuanto a la inducción de malformaciones congénitas mediante la irradiación con Cobalto-60, a nivel de los miembros inferiores del embrión de pollo, encontramos un período de insensibilidad en los primeros estadios del desarrollo, estadios 1-2 y 7 de HAMBURGUER y HAMILTON, en los que son frecuentes e intensas las alteraciones a nivel del esqueleto axial, debido a que en estos estadios coincide el período de máxima organogénesis de la columna vertebral. Solamente de forma esporádica y atípica hemos podido encontrar un embrión con graves alteraciones a nivel de los miembros inferiores (Fig.

4), el cual por no estar dentro de los patrones de alteración, consideramos como una mutación genética producida por la radiación en esta fase del desarrollo.

Encontramos a partir del estadio 12 (48 horas de incubación), un período de sensibilidad a la radiación que coincide con las encontradas por ESSEMBERG (23) en sus experiencias. Las alteraciones durante este período se obtienen con dosis altas, a partir de 1.200-R, y se hacen más intensas con dosis crecientes de 1.300 y 1.400 rads. Estas malformaciones se manifiestan por alteraciones de las que GOFF (9) señala como de «reducción de tamaño o eliminación de parte del miembro». Estas, afectan a los huesos largos

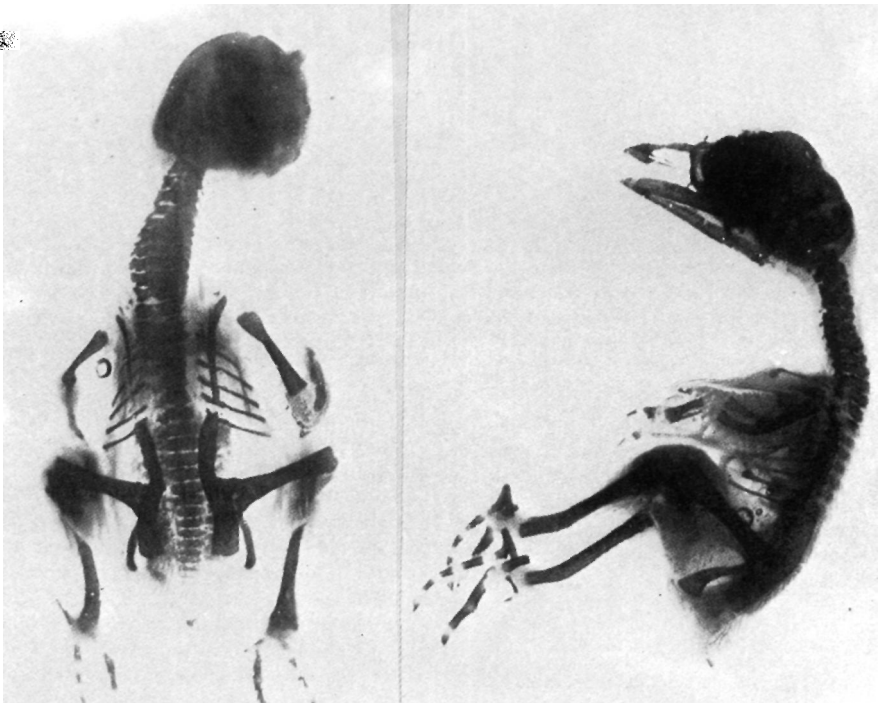


FIG. 12, a.— Vista anterior de la preparación de un embrión irradiado con 1.400-R durante el estadio 24 del desarrollo, en la que se observan alteraciones de «reducción» a nivel del fémur con acortamiento bilateral, hemimelia tibia con agenesia de peroné. Gran acortamiento e incurvación tarsometatarso. Agenesia dedos con ectrodactilia; y alteraciones de «fusión» a nivel coxo-femoral y falanges.

FIG. 12, b.— Vista de perfil del mismo embrión de la figura anterior, en la que junto a las alteraciones anteriormente descritas se puede apreciar la fusión a nivel codo. Todo ello acompañado de múltiples alteraciones raquídeas.

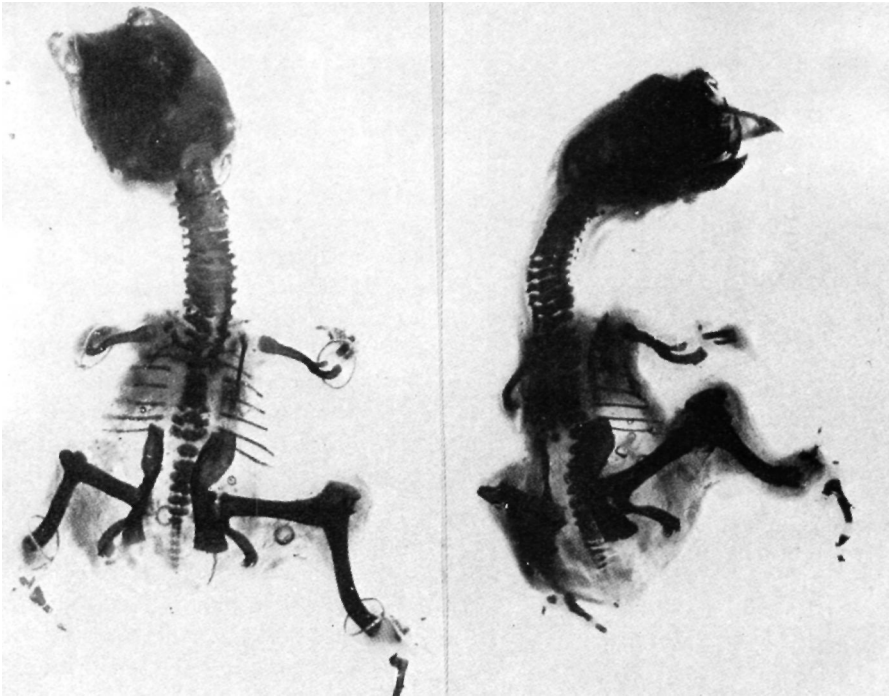


FIG. 13, *a*.— Vista anterior de un embrión irradiado con 1.500-R irradiado durante el estadio 24 del desarrollo, en la que se pueden observar lesiones de «reducción» a nivel de los miembros inferiores, con acortamiento fémur, acortamiento e incurvación bilateral tibias con agenesia de peroné. Agenesia tarsometatarso y agenesia dedos. Y lesiones de «fusión» a nivel articulaciones coxo-femorales, femoro-tibiales y falángicas. A nivel de las alas, se puede observar junto a hipoplasia escápula derecha y de ambos húmeros, fusión bilateral codos e hipoplasia e incurvación cúbito y radio.

FIG. 13, *b*.— Vista perfil embrión de la figura anterior en el que se pueden apreciar las alteraciones descritas junto a múltiples alteraciones raquídeas.

como el fémur, tibia y peroné, acompañadas muchas veces de incurvación de los mismos. Igualmente llegan a afectar al tarsometatarso, pero sin llegar nunca a la porción distal del miembro.

Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por GOFF (9) el cual encuentra un período de sensibilidad precoz, que establece entre los estadios 12 y 16 del desarrollo y con un máximo de respuesta durante el estadio 14 (50 a 53 horas incubación). Durante este período precoz dominan las alteraciones del tipo «reducción», no siendo frecuentes las del tipo «fusión».

Tras un período de relativa insensibilidad localizado entre los estadios 16 a 18,

con un máximo a nivel de este último, se produce otro período de sensibilidad que comienza en el estadio 19 (3 días de incubación) y que dura hasta el estadio 31 (7 días incubación), con una secuencia de radiosensibilidad próximo-distal, hasta el punto de que a partir del estadio 27 (5 días) las alteraciones sólo se producen en la porción distal del miembro (tarsometatarso y dedos). Y durante los estadios 29 y 31 (6.º y 7.º días), las malformaciones sólo afectan a los huesos más distales, las falanges.

Durante el estadio 19 (3 días) se producen alteraciones de «reducción» afectando al tarsometatarso a partir de 900-R.

Durante el estadio 24 (4 días) encontra-

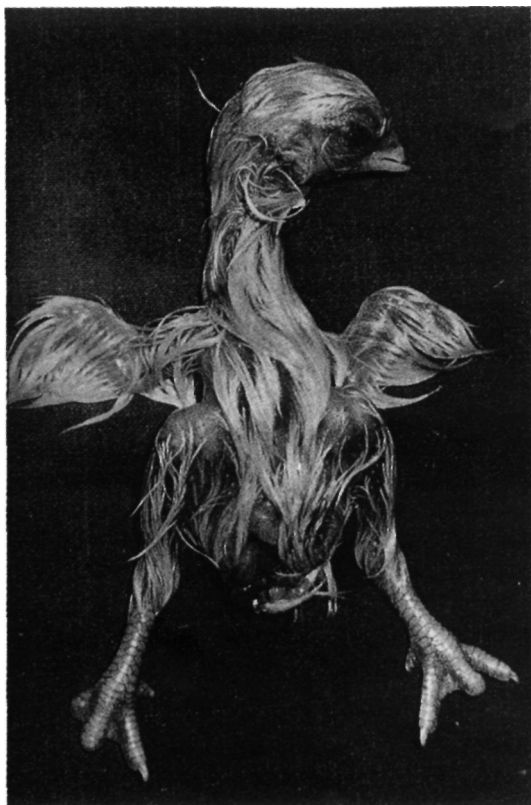


FIG. 14.—Fotografía de un embrión de pollo irradiado con una dosis de 1.000-R durante el estadio 27 (cinco días de incubación) en el que se observan agencias múltiples a nivel dedos de ambas patas.

mos que es el período de máxima sensibilidad para los miembros inferiores, por su frecuencia e intensidad de las lesiones, encontrándose ya a partir de la dosis mínima de 500-R afectando al tarsometatarso y dedos. Con dosis altas de 1.300-R, encontramos «fusiones» a nivel coxo-femoral y femoro-tibiales, acompañadas de intensas alteraciones de «reducción», que llegan a la hemimelia e incluso a la agenesia de la tibia, tarsometatarso y dedos.

La afectación del tarsometatarso, parte

especialmente sensible, es máxima en este estadio 24. Esto coincide igualmente con las experiencias de GOFF (9), el cual señala un período de sensibilidad específica entre el estadio 19 al 29, con un máximo a nivel del estadio 24.

Los efectos específicos sobre las falanges comienzan a verse a partir del estadio 19 (3 días) y persisten hasta el estadio 31 (7.º día), encontrándose un período de máxima afectación entre los estadios 27 y 29, en los que prácticamente todos los embriones irradiados tienen alteraciones a este nivel.

En cuanto a las malformaciones inducidas a nivel de las alas, éstas son mucho menos frecuentes y específicas que a nivel de los miembros inferiores. Igualmente éstas se producen en estadios más precoces y durante un período más corto.

En nuestra experiencia hemos encontrado malformaciones a nivel del ala en dos estadios, el 19 y 24:

— En el estadio 19 (3 días) encontramos con dosis medias de 700 a 800-R pequeñas alteraciones como hipoplasias distales o ausencia del esbozo del 2.º dedo del ala. A partir de 1.100-R encontramos acortamientos de los huesos largos, como el húmero, y fusiones a nivel del codo y radio-carpometacarpianos. Dosis superiores son letales para el embrión.

— En el estadio 24 (4 días), se encuentran a partir de 1.200-R hipoplasias metacarpianos y agencias falanges, especialmente del 2.º dedo. Con dosis de 1.300 y 1.400-R la alteración característica es la fusión del codo. Y con dosis máxima de 1.500-R aparecen alteraciones más intensas con hipoplasia escapular, hipoplasia a nivel del húmero, cúbito y radio, y fusiones de codo.

No se han obtenido alteraciones en las alas en períodos más precoces, ni tampoco en estadios posteriores.



## BIBLIOGRAFIA

1. BECKER, P. C. (1966): *Genética Humana*. T. II, Ed. Toray, S. A.
2. FRASSER, A. y FAINSTAD (1951): Causes of congenital defects. A review. *Am. J. Dis. Child.*, 82, 593.
3. GREGG, N. M. (1941): Congenital catarata following German measles in the mother. *Trast. Ophthal. Soc. Aust.*, 3, 35.
4. INGALLS, T. H. y PHILBROOK, F. R. (1958): Monstrosities induced by hipoxia. *New. Engl. J. Med.*, 259, 588.
5. WARKANY, J.; BEAUDRY, HORNSTEIN, S. (1959): Attempted abortion with n-aminopteroylglutamic acid (aminopterin); malformations of the child. *Amer. J. Dis. Child.*, 97, 274.
6. LENZ, W. y KNAPP, K. (1962): Die thalidomid embryopathie. *Dtsch. med. wschr.*, 87, 1232.
7. WILSON, J. G.; JORDAN, H. Ch. y BRENT, R. L. (1953): Effects of irradiation on embryonic development. *Am. J. Anat.*, 92, 153.
8. RUSSELL, L. B. (1956): X-ray induced developmental abnormalities in the mouse and their use in the analysis of embryological patterns. II. Abnormalities of the vertebral column and thorax. *J. Exp. Zool.*, 131, 329-395.
9. GOFF, R. A. (1962): The relation of developmental status of limb formation to X-radiation sensitivity in chick embryos. I. Gross Study. *J. Exp. Zool.*, 151, 177-200.
10. REYSS-BRION, M. (1956): La sensibilité différentielle de certaines ébauches de l'embryon de poulet aux rayons X a différents stades du développement. *Arch. Anat. Microscop. et Morphol.*, T. 45, n.º 4, pp. 342-353.
11. KARNOFSKY, D. A.; PATTERSON, P. A. and RIDWAY, L. P. (1950): The toxicity of roentgen rays to the chick embryo. *Am. J. Roentgenol.*, 64, 280-288.
12. DEHENHART, K. H. (1966): Malformaciones de la cabeza y columna vertebral. *Genética Humana* de BECKER, T. II. Ed. Toray.
13. INGALLS, T. H. and CURLEY, F. (1957): Principles governing the genesis of Congenital malformations induced in mice by Hipoxia. *The New Engl. J. of Med.*, vol. 257, n.º 33, pp. 1121-27.
14. MURAKAMI, Y. y KATO, T. (1954): Basic processes seen in disturbance of development of central nervous system. *Nagoya J. M. Sc.*, 17, 74-88.
15. WARKANY, J.; NELSON, R. E. and SCHRFFENBERGER, E. (1943): Congenital Malformations induced in rats by maternal nutritional deficiency. *J. Bone Joint Surg.* Vol. XXV, n.º 2, pp. 261-270.
16. KARNOFSKY, D. A. and LALON, C. R.: Effects of Drugs on the Skeletal Development of the chick Embryo. *Clinic. Orthop.*, n.º 33, pp. 59-70.
17. DAGG, C. P. and KARNOFSKY, D. A. (1955): Teratogenic effects of azaserine on the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 130, 155.
18. LANDAUER, W. (1953): The effect of time of injection and dosage on absolute and relative length of femur, tibio-tarsus and tarsometatarsus in chicken embryos treated with insulin or pilocarpine. *Growth*, 17, 87-107.
19. HAMBURGER, V. and HABEL, K. (1971): Teratogenic and lethal effects of influenza-A and mumps viruses on early chick embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 66, 608.
20. GRUNDWALD, D. (1956): Environmental causes of abnormal embryonic development. *Clin. Orthop.*, 8, 13.
21. LEHMANN, F. E. (1955): Die Embryonale Entwicklung. Entwicklungsphysiologie und experimentelle Teratologie. In Büchner/Letterer/Roulet. *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. T. VI / I. Springer. Berlin-Gotinge-Heidelberg.
22. GILLMAN, P. K. and BAETJER, F. H. (1904): Some effects of roentgen rays on development of embryos. *Am. J. Physiol.*, 10, 222-224.
23. ESSEMBERG, J. M. (1935): Effects of X-rays on developeng chick. *Radiology*, 25, 237-274.
24. ZARAGOZA, J. R. e IBORRA, J. (1972): Estudio de la mortalidad de embriones de pollo sometidos a irradiación con telecobaltoterapia. *Radiologia*, 14, 65-67.
25. HICKS, S. P. (1953): Developmental malformations produced by radiation. A timetable of their development. *Am. J. Roentgenol. Radium Therapy Nuclear Med.*, 69, 262-293.
26. IBORRA, J. (1971): Anormogénesis raquídeas. Estudio experimental en el embrión de pollo. *Rev. Esp. Cir. Ost.*, 6, 3-32.
27. HAMBURGER y HAMILTON, H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morpho.*, 88, 49-92.
28. SPRATT, N. T. (1955): Analysis of the organizer center in the early chick embryo. I. Localization of prospective notochord and somite cells. *J. Exp. Zool.*, 128.