

Estudio de la dinámica embrionaria aplicando técnicas de registro de vibraciones. Correlación morfofuncional del desarrollo articular del embrión de pollo

Manuel Llusá Pérez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA DINÁMICA EMBRIONARIA APLICANDO TÉCNI-
CAS DE REGISTRO DE VIBRACIONES. CORRELACIÓN MORFOFUN-
CIONAL DEL DESARROLLO ARTICULAR DEL EMBRIÓN DE POLLO.

TESIS PRESENTADA PARA ASPIRAR
AL GRADO DE DOCTOR

MANUEL LLUSÁ PÉREZ

BARCELONA 1985.



Fig. 30-. Amplificador de carga
Brüel & Kaer 2635.

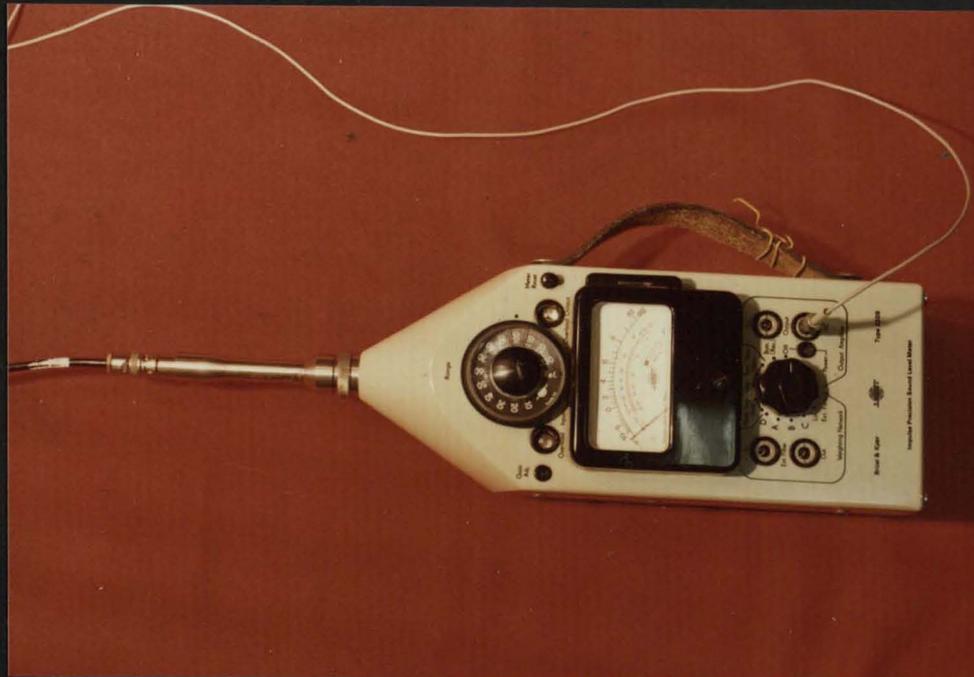


Fig. 31-. Filtro de ponderación C (so-
nómetro B & K 2209).

cias de resonancia que introducen estos muelles.

En el período de estudio del soporte, se observó que la influencia de las frecuencias de resonancia es creciente a medida que aumenta el nivel de actividad del embrión, ya que sus movimientos actúan como excitador del soporte, llegando a dar una medida del nivel equivalente de actividad superior en 15 dB a la obtenida eliminando la influencia de los muelles. Se ha de considerar también que la amplitud de los picos de resonancia no poseen una característica lineal como ha demostrado tener el disco cerámico, basta para ello ver, igual que en el cálculo de la linealidad del disco cerámico, las gráficas 12 y 13 (este razonamiento no se puede aplicar a las gráficas 10 y 11 ya que aquí se trata de ruido y no de señal), esto implica que el error en la medida no sería cuantificable, además habría que considerar el error que introduce la histéresis que se tiene en el desplazamiento obtenido en función de la fuerza aplicada en los mismos muelles.

Existe otro factor que actúa en detrimento de los muelles, y es que interesa que la experiencia pueda ser reproducida en otras investigaciones para lo cual sería necesario utilizar un soporte con las mismas características del utilizado en este trabajo, incluidas sus principales frecuencias de resonancia.

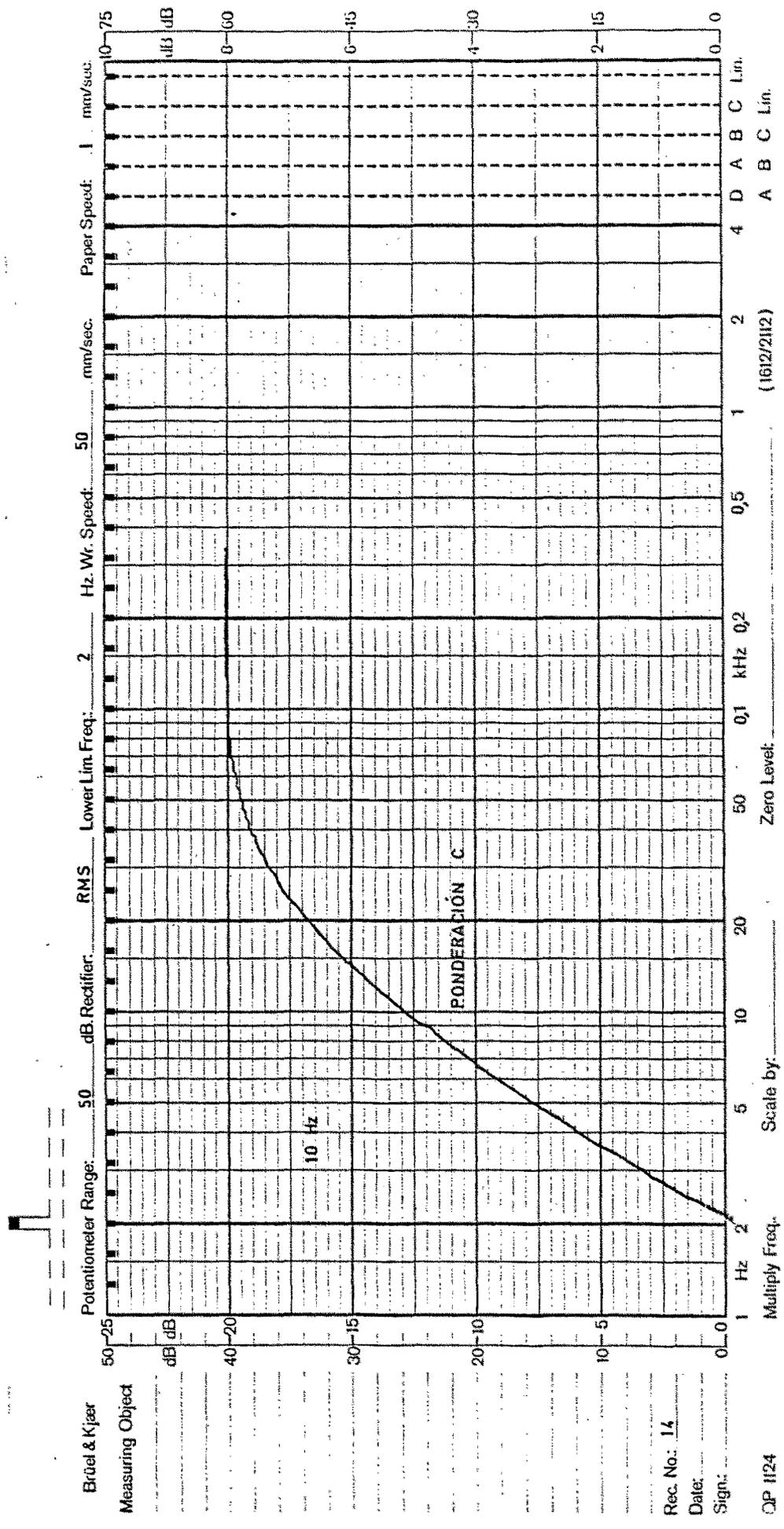
Dada la importancia de las razones mencionadas, se llega fácilmente a la conclusión de la necesidad de eliminar estas frecuencias mediante un fil

tro pasa-altos. Las principales frecuencias de resonancia están en 1,55 y 4,5 Hz y habiéndose probado varios filtros se ha obtenido que el filtro de ponderación C, cuya característica podemos ver en la gráfica 14, es el más adecuado. En las gráficas 15, 16 y 17 pueden verse los resultados obtenidos con el mismo embrión utilizando distintos filtros; ha de considerarse que se trabaja con una señal biológica, que por lo tanto no es constante, lo cual causa algunas diferencias entre estas medidas, aparte de la influencia del filtro.

Como se ve en las gráficas mencionadas se produce una gran alteración de las frecuencias inferiores a 17 Hz aproximadamente, estas frecuencias están generadas en parte por el embrión en estudio por lo que estamos disminuyendo ligeramente parte de la señal del mismo, sin embargo, el beneficio que se obtiene compensa sobradamente este efecto.

Analizador estadístico B & K 4426 (Figura 32)

Una de las metas de este trabajo es obtener una evaluación objetiva de los niveles de motilidad del embrión así como la distribución de sus movimientos en la escala de amplitudes, lo cual nos permitirá obtener unos parámetros de normalidad de la motilidad del embrión de pollo a lo largo de todo su proceso de incubación. En este aspecto la utilidad del analizador estadístico es clara ya que nos proporciona directamente los



Gráfica 14-. Función de transferencia de los filtros pasa altos de 10 Hz y ponderación C.

Brand & Type

Time Function Start

seconds

End:

seconds

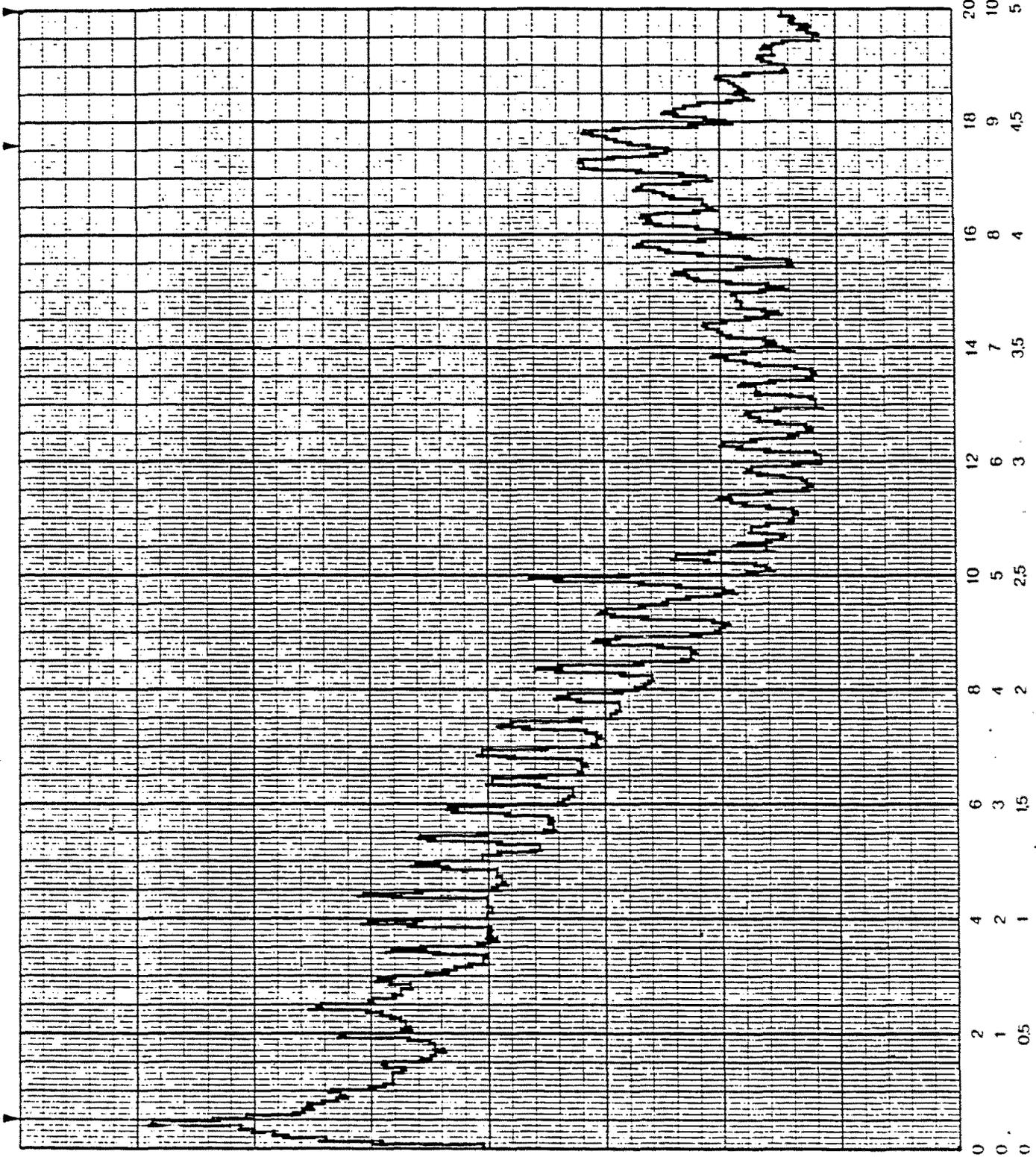
Not Expanded:

Expanded:

Full Scale Level 70 dB
 FS Frequency 200 Hz
 Weighting Hanning
 Average Mode Lineal
 No of Spectra 10

Comments:

Gráfica correspondiente al embrión 30-3 de 12 días de incubación sin utilizar ningun filtro en la medida; tiene un nivel equivalente de actividad de 62,2 dB.



Record No.: 15
 Date:
 Sign:

20 40 80
 1 1 1 1

0 0.5 1 2 3 4 6 8 10 12 14 16 18 20
 0 0.5 1 2 3 4 6 8 10 12 14 16 18 20
 0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5

Measuring Object:

QF 100?

Full Scale Level 70 dB
 F S Frequency 200 Hz
 Weighting Hanning
 Average Mode Lineal
 No of Spectra 10

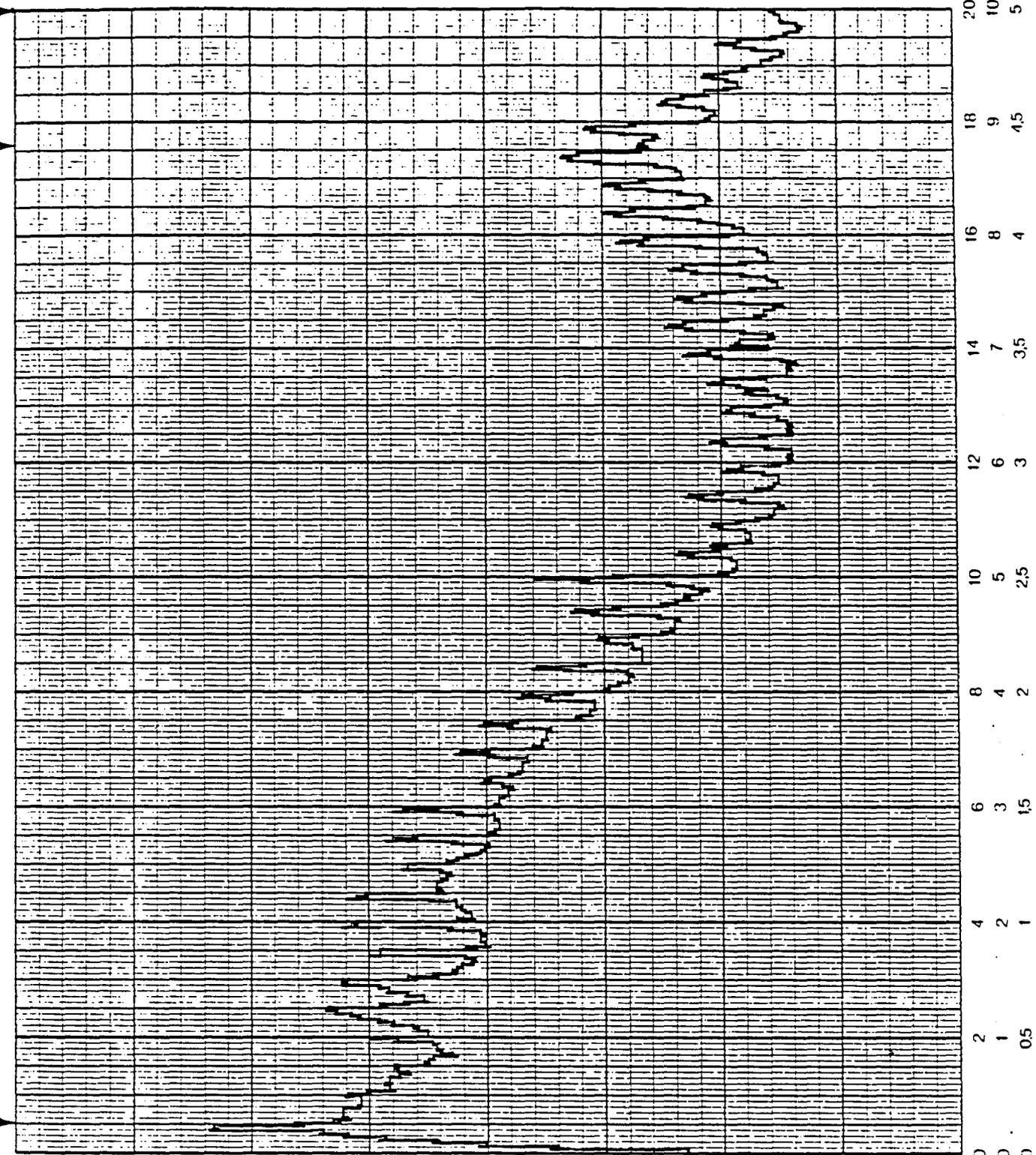
Comments:

Idem que la anterior
 pero utilizando un fil-
 tro pasa altos de 10 Hz.
 El nivel equivalente de 30
 actividad es de 56,6 dB.

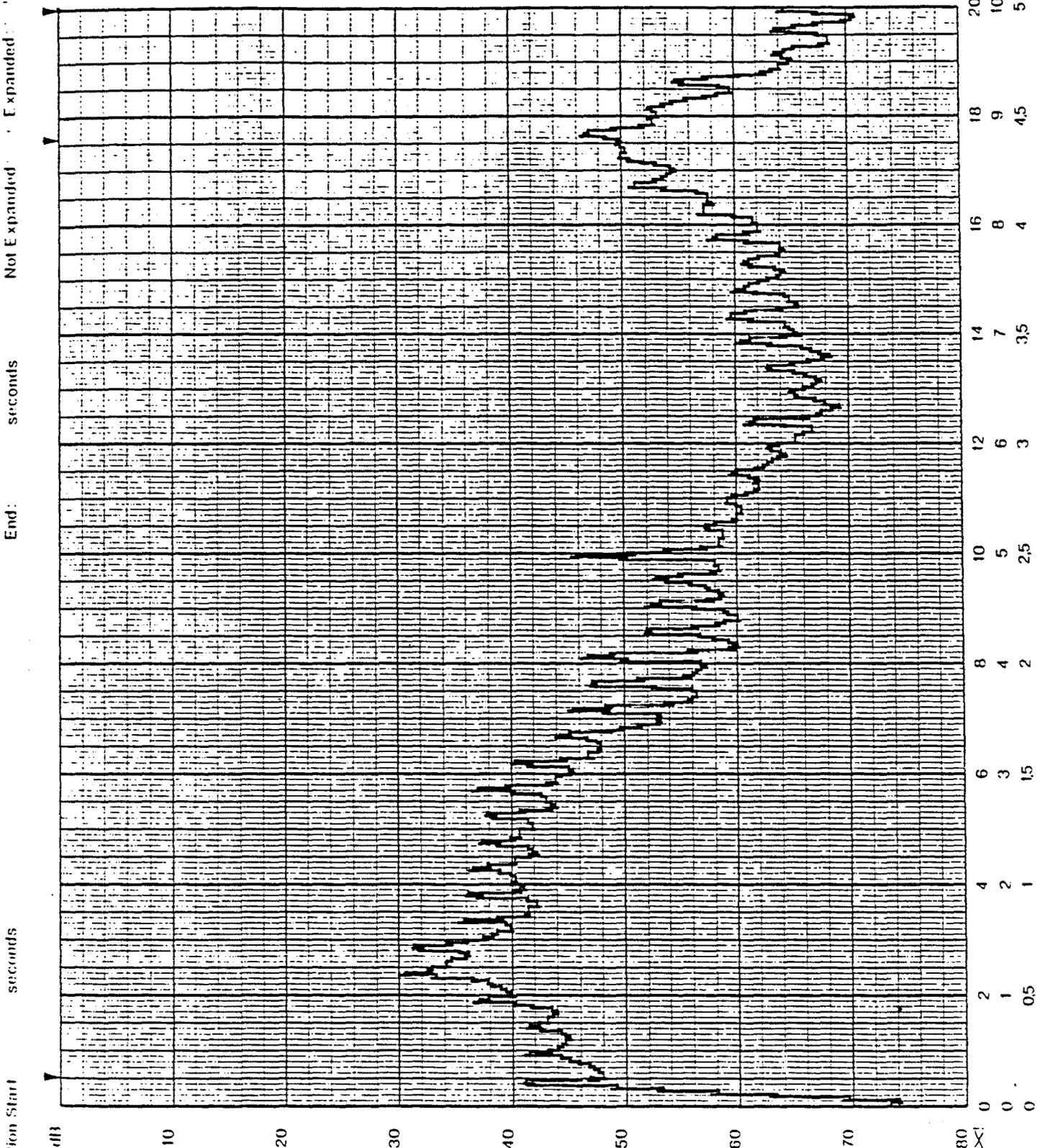
Record No : 16

Date :

Sign :



20 40 80
 1 1 1 1 X



Full Scale Level 70 dB
 1/3 Frequency 200 Hz
 Weighting Hanning
 Average Mode Lineal
 No. of Spectra 900

Comments:

Idem que la anterior
 pero utilizando un fil-
 tro pasa altos de pon-
 deración C. El nivel
 equivalente es de
 49,5 dB.

Record No.: 17

Date:

Sign:

20 40 80



Fig. 32-. Analizador estadístico. B & K 4426
 Nos informa de los niveles de actividad del embrión, así como de la distribución de sus movimientos en la escala de amplitudes.

dos parámetros buscados.

Amplificador de medida B & K 2610 y Registrador de nivel B & K 2307 (Figuras 33 y 34)

El segundo objetivo planteado es detectar la posible existencia de períodos de actividad y reposo de la motilidad del embrión y, en caso de existir, dar un patrón de ritmo en los diversos días de desarrollo embrionario, para lo cual es muy útil contar con gráficas representando la evolución temporal del nivel de los movimientos del embrión. El amplificador de medida acondiciona el nivel de la señal para adecuarla al registrador de nivel; asimismo se piensa que podría ser útil en la detección de algún patrón típico de movimiento (fasciculaciones musculares, contracciones tónicas musculares, contracciones del amnios, contracción cardíaca, etc.).

Analizador de Fourier B & K 2033 y Plotter (Figuras 35 y 36)

El ritmo cardíaco del embrión permite conocer su grado de bienestar en condiciones normales, así como su grado de sufrimiento en condiciones patológicas o al alterar su medio ambiente (variaciones de temperatura, variaciones de presión intra-ovo, administración de fármacos, inoculación de virus, etc...); además nos servirá para correlacionar la función cardíaca con la actividad embrionaria, cuyo interés estriba en la com



Fig. 33-. Amplificador de medida B & K
2610.



Fig. 34-. Registrador de nivel B & K
2307.

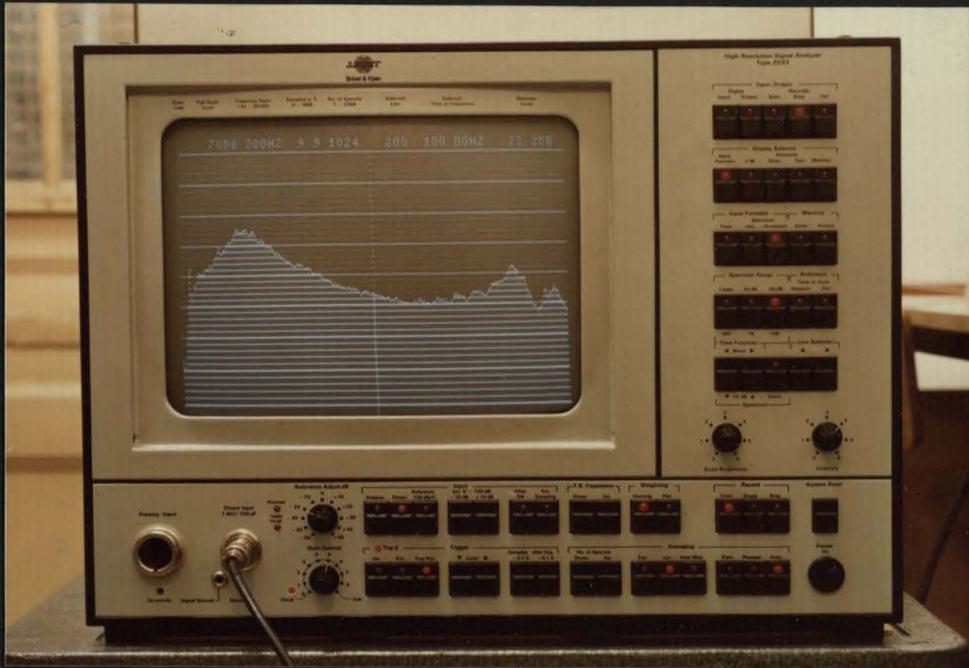


Fig. 35-. Analizador de FOURIER
B & K 2033.

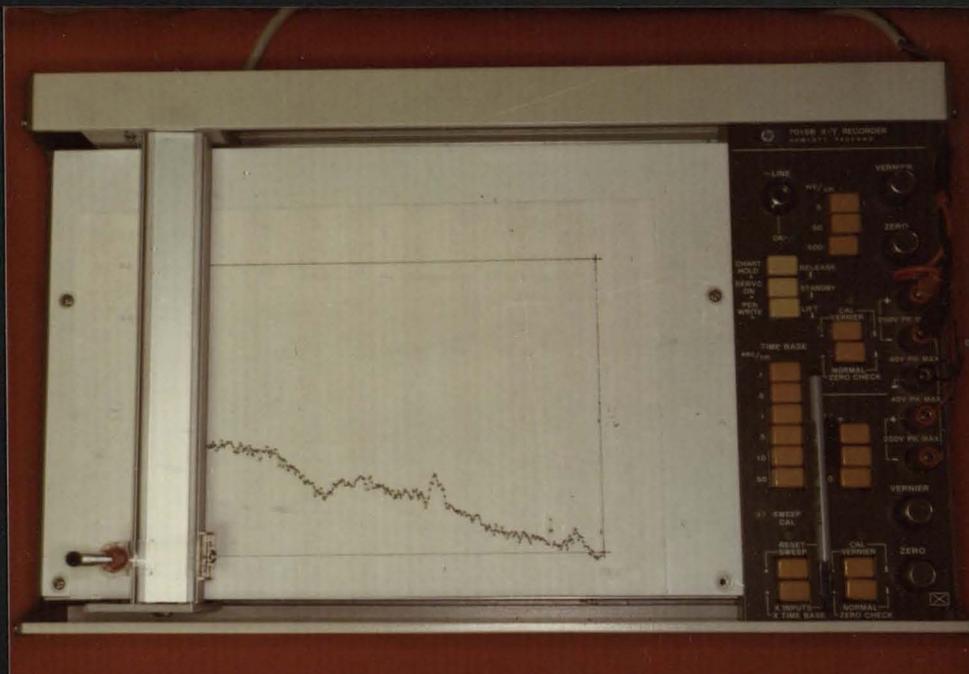


Fig. 36-. Plotter.Registrador X - Y.
Hewlett Packard.7015 B

probación de la hipótesis sustentada por diversos autores del desarrollo paralelo entre función cardíaca y grado de motilidad del embrión.

En el dominio temporal no es posible la obtención de este parámetro pues la señal producida por el corazón del embrión suele estar enmascarada por la correspondiente a sus movimientos, por lo cual es necesaria la obtención del espectro frecuencial de la señal por él producida en la que se aprecian fácilmente gran cantidad de armónicos correspondientes al impulso cardíaco, de donde podemos obtener el valor de la frecuencia fundamental.

El estudio de este parámetro no se encontraba en un principio entre los objetivos de este trabajo puesto que se suponía que el latido cardíaco quedaría enmascarado por el resto de los movimientos embrionarios o por el ruido, sin embargo, una vez se comprobó la posibilidad de obtener la frecuencia cardíaca del embrión se incluyó ésta entre los parámetros a estudiar.

Disponemos además, de una incubadora con ventilación forzada y volteo horario automático (marca Masalles, modelo 11 R), detalle de importancia al efectuar el estudio de los movimientos articulares pues en condiciones normales de incubación, ya sea natural por la gallina o artificialmente en las incubadoras, este volteo o movimiento del huevo evita que el embrión quede, a través de sus membranas, adosado al cascarón o no se desarrolle en posición fisiológica ade

cuada. Otra estufa incubadora (marca Selecta, modelo S-205) es utilizada para efectuar en su interior el registro o monitorización de los embriones durante períodos largos de tiempo, evitando de esta forma que las variaciones de temperatura influyan en la dinámica del embrión. La temperatura idónea de incubación es de 37,5-38°C y la humedad en el interior de la estufa de 65 y 75%.

La maquinaria de medición y registro de ondas vibratorias así como la cadena completa de medida ya nos es conocida; sólo hay que resaltar que el primer eslabón de esta cadena, el transductor o disco cerámico piezoeléctrico está situado en el interior de la incubadora de monitorización, localizada en una habitación anexa con el fin de evitar al máximo el ruido indeseable.

Se presenta como principal propósito la obtención de un método objetivo de registro y análisis de los parámetros de motilidad embrionaria, la realización de gráficas de referencia de los tipos de movimientos, rítmicos y arrítmicos, pero fundamentalmente de los movimientos articulares, bajo condiciones de normalidad a lo largo de todo el período de desarrollo del embrión de pollo. Para completar este estudio se correlacionan los datos dinámicos así obtenidos con los datos morfológicos que se aprecian en el estudio histológico de estos embriones, sacrificados en sucesivos estadios de desarrollo.

El método usado consiste en estudiar las vibra-

ciones que los movimientos del embrión producen en el cascarón del huevo.

Se ha logrado trabajar en condiciones que no han alterado en absoluto el medio ambiente del embrión de pollo, ya que hemos utilizado un sensor de vibraciones que no requería estar situado en el interior del huevo sino que simplemente bastaba colocar a éste sobre el sensor para poder captar las señales u ondas vibratorias producidas por el movimiento del embrión. Este hecho ha permitido conservar el cascarón intacto y no tener que realizar la técnica de Wolf. Recordemos que esta técnica consiste fundamentalmente en practicar un pequeño orificio en el polo agudo del huevo y extraer 2cc de albumen con una jeringa, lo que hace descender el saco vitelino y con él el disco embrionario; de esta forma evitamos lesionar el mencionado disco embrionario al abrir, en el punto más proclive, una ventana de unos 2 cm de diámetro que nos permitiría observar al embrión, estudiarlo y ver sus movimientos, así como determinar su estadio.

Se coloca el huevo intacto sobre el sensor de vibraciones mecánicas y se procede a efectuar un estudio dinámico y registros gráficos de determinados momentos del desarrollo embrionario. Las gráficas se realizan bajo condiciones de absoluta normalidad de temperatura, humedad y ventilación.

Se obtienen gráficas de los movimientos o actividad global del embrión; básicamente realizamos

dos tipos de registros gráficos con distinta significación:

1.- GRAFICAS DE ANALISIS ESPECTRAL DE FRECUEN -
CIAS.

Muestran el espectro de frecuencias de un promedio de señales temporales correspon -
dientes al nivel de vibraciones causadas por el embrión. *Nos informan del nivel de activi -
dad (intensidad y frecuencias) de los movi -
mientos del embrión.*

En el área de la Salud suelen utilizarse preferentemente las gráficas en las que el eje de las abscisas representa la función tiempo y el eje de las ordenadas representa cualquier otra función cuantitativa. Este es un concepto que tenemos que olvidar a la hora de interpretar gráficas de análisis espectral de frecuencias. En ellas (gráfica 18) el eje de abscisas representa la frecuencia en ciclos/segundo; pero además hay que resaltar que estas gráficas de análisis espectral de frecuencias *nos informan de las diversas frecuencias que componen un movimiento en un instante dado* (en realidad se realiza un promedio de las diversas muestras que se van tomando y se determina así el movimiento medio a estudiar). Hacia la izquierda encontraremos los componentes lentos (frecuencias bajas) del movimiento y hacia la derecha los componentes rápidos (frecuencias altas). En realidad estudiamos las diversas frecuencias

que componen un movimiento instantáneo, permitiéndonos saber si es un movimiento brusco y rápido (frecuencias altas) o por el contrario lento y suave (frecuencias bajas).

En el eje de ordenadas representamos la intensidad de cada componente del movimiento instantáneo, encontrándose diversas intensidades en cada una de las frecuencias. Recordemos que la intensidad está representada en decibelios-dB- (medida relativa logarítmica) y que pequeñas variaciones de éstos representan en realidad grandes variaciones de intensidad.

En el analizador de Fourier, además, aparecen las señales producidas por las contracciones del corazón del embrión, apreciándose, durante los períodos de reposo de los movimientos articulares, gran cantidad de armónicos correspondientes a estos impulsos cardíacos, pudiéndose finalmente calcular y obtener *gráficos que nos informan de la frecuencia y de la intensidad de estos latidos cardíacos.* (Gráfica 19).

2.- GRAFICAS DE MOVIMIENTO EN CADA INSTANTE DE TIEMPO REAL. (REPRESENTACION TEMPORAL).

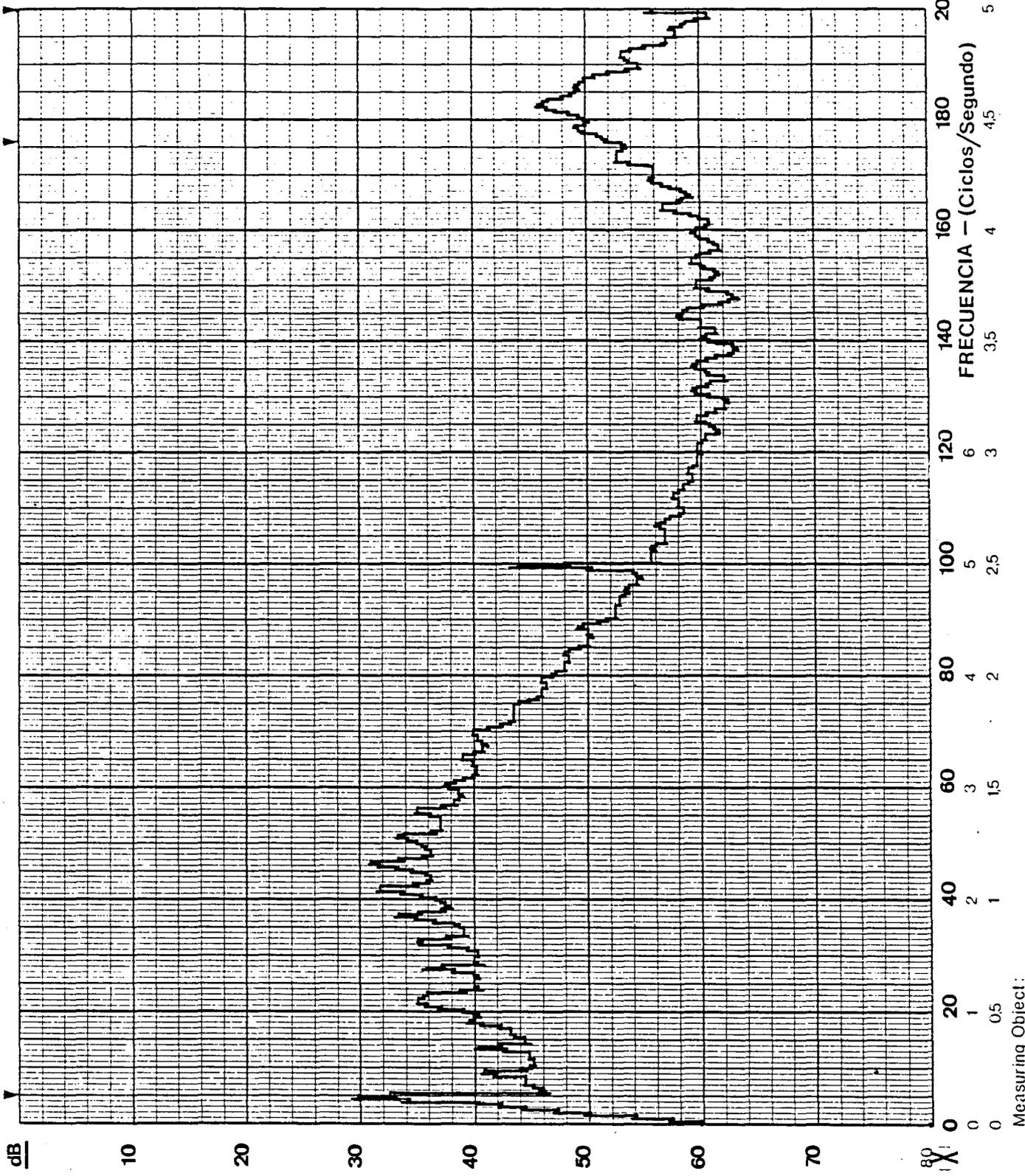
En ellas (gráfica 20) la función tiempo está representada en las abscisas, mientras que en las ordenadas tendremos representadas la intensidad del movimiento en función logarítmica (dB). Este tipo de gráficas per-

Bruel & Kjaer Time Function Start: seconds End: seconds Not Expanded Expanded

Full Scale Level: 70 dB
F. S. Frequency: 200 Hz
Weighting:
Average Mode:
No. of Spectra: 900
Comments: N 27-7

INTENSIDAD

Promedio espectral
de la actividad del
embrion.



Gráf. 18

Record No.:
Date:
Sign.:

Brüel & Kjær

Time Function Start:

seconds

End:

seconds

Not Expanded:

Expanded:

Full Scale Level: 70 dB

F. S. Frequency: 200 Hz

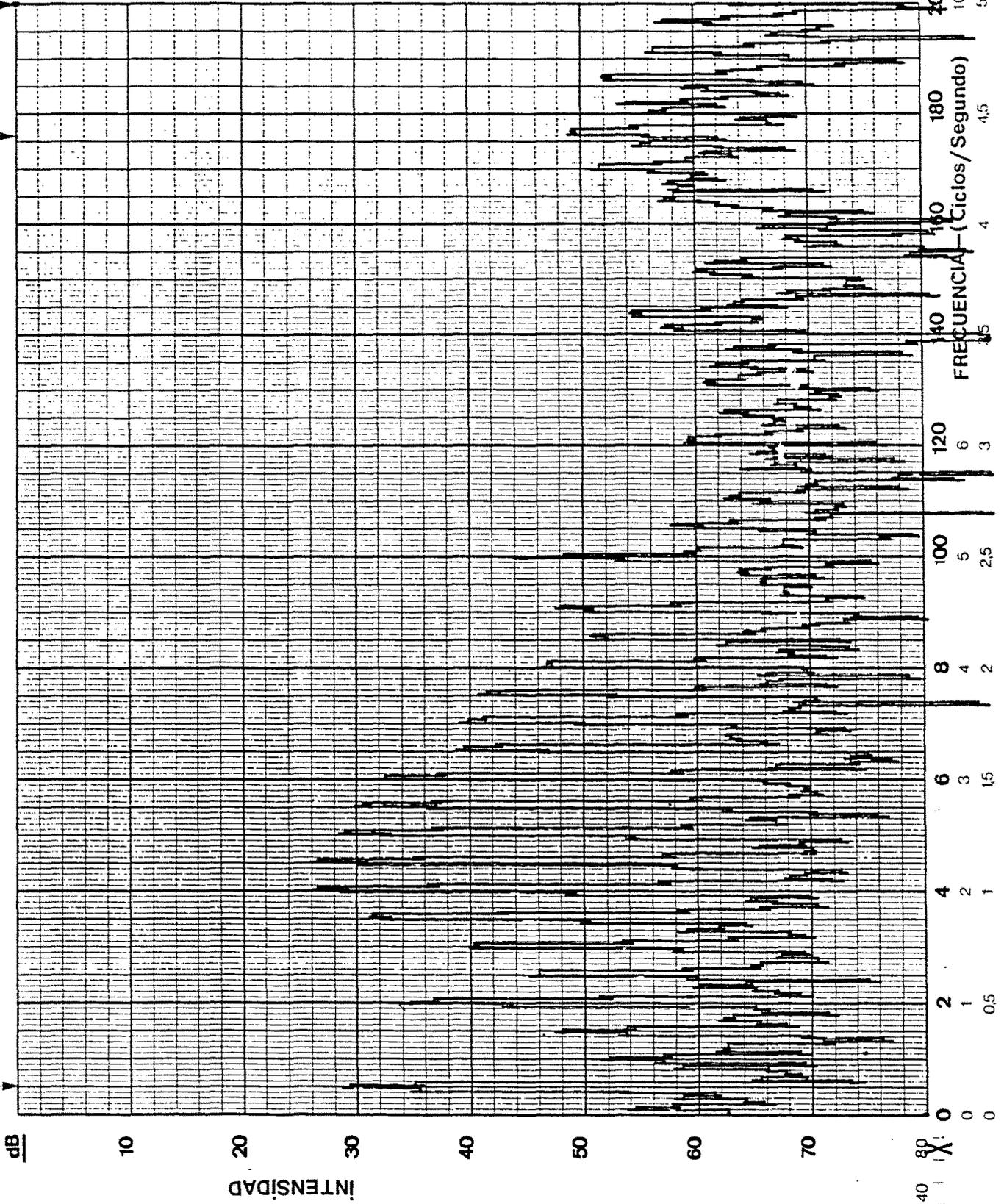
Weighting:

Average Mode:

No. of Spectra: 1

Comments: N 27-7

Frecuencia cardiaca
de 300 p/m



Gráf. 19

Record No.:

Date:

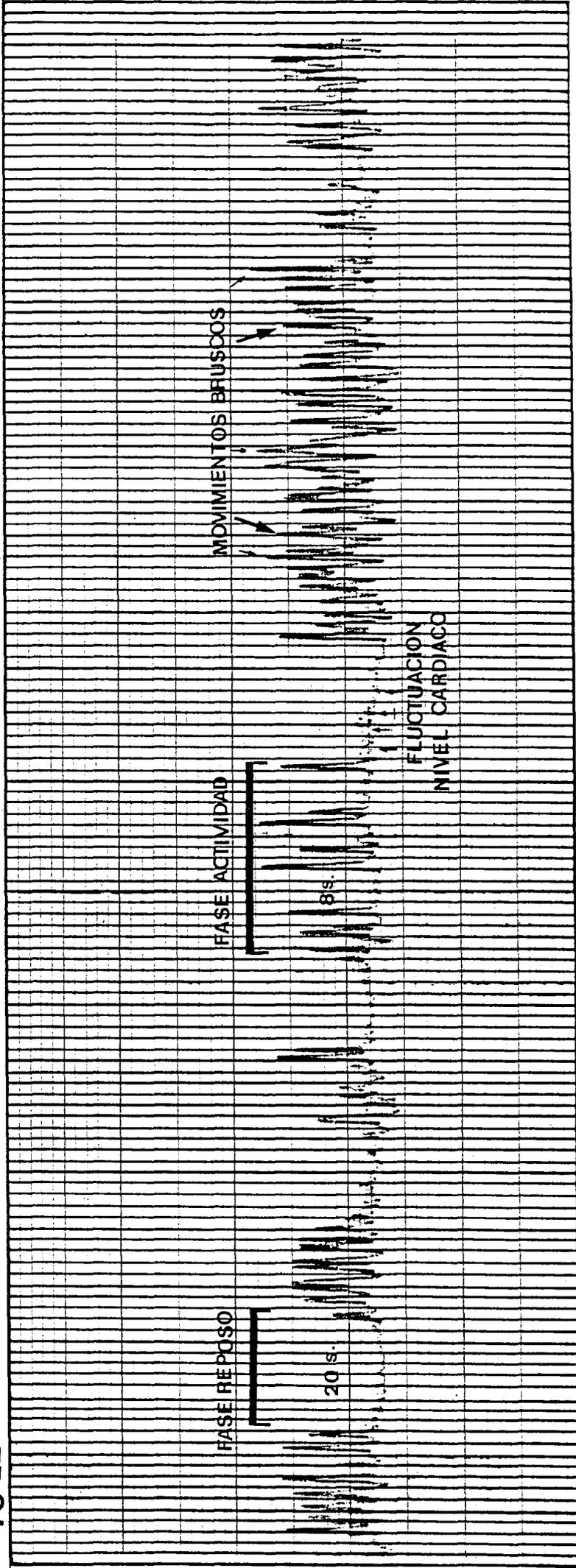
Sign.:

Measuring Object:

QP 1002

Brüel & Kjaer

70 dB



TIEMPO (1segundo = 1milimetro ; Separación entre línea y línea = 2 mm.)
OP 1102

20 dB

Gráfica 20--. Representación temporal. Nivel de actividad del embrión N 27-7 a los 11 días de incubación. (Gráfica de movimiento en cada instante de tiempo real)

miten extraer conclusiones del ritmo e intensidad de los movimientos y de la duración de las fases de actividad e inactividad. Siguiendo a Hamburger y Cols. (1965), y con el objeto de poder comparar resultados, hemos considerado de forma arbitraria que una fase de inactividad es un período de 10 segundos o más en que no ocurre ningún movimiento de intensidad suficiente para ser valorado; nosotros consideramos además que la señal ha de tener unas características determinadas propias de los movimientos articulares, y que como veremos inmediatamente habrá que diferenciar de las señales producidas por el corazón. Hay que tener esto presente pues durante una fase de actividad del embrión pueden existir períodos de reposo que separen movimientos de esa misma fase, considerándose que, si dos movimientos se suceden en un intervalo de 1 a 9 segundos formarán parte de la misma fase de actividad; si es de 10 segundos o más se considerará como una fase de inactividad. A partir de estos datos se puede calcular el porcentaje de tiempo en que el embrión ha estado activo durante el período de observación, que es lo que Hamburger y Cols. (1965) denominan "actividad global".

En las gráficas temporales se puede distinguir fácilmente los picos correspondientes a patadas o movimientos bruscos producidos por las contracciones musculoesqueléticas, en forma de espículas, de la señal en forma se

noidal correspondientes a variaciones de intensidad de la actividad cardíaca, que a veces recuerdan los dientes gastados de una sierra. (Gráfica 20).

En este tipo de gráficas *la velocidad de salida del papel es de 1 mm. por segundo.*

La realización de un estudio estadístico nos permite obtener la distribución de las intensidades de las vibraciones producidas por el embrión así como su nivel medio de actividad. (Gráficas 21 y 22).

Todos los niveles se expresan en dB, donde el nivel de referencia se calcula a partir de las condiciones de medida.

Sensibilidad de la cerámica: 250000 pC/N

En el amplificador de carga se ha indicado 2,5 pC/N puesto que el verdadero valor está fuera del margen del mismo; por esta causa obtendremos una señal 10^5 veces superior a su valor real. Teniendo en cuenta que el amplificador proporciona

10 mV/N

y que 1V corresponde a 90 dB, podemos hacer:

$$90 \text{ dB} = 20 \log \frac{V_2}{V_0}$$

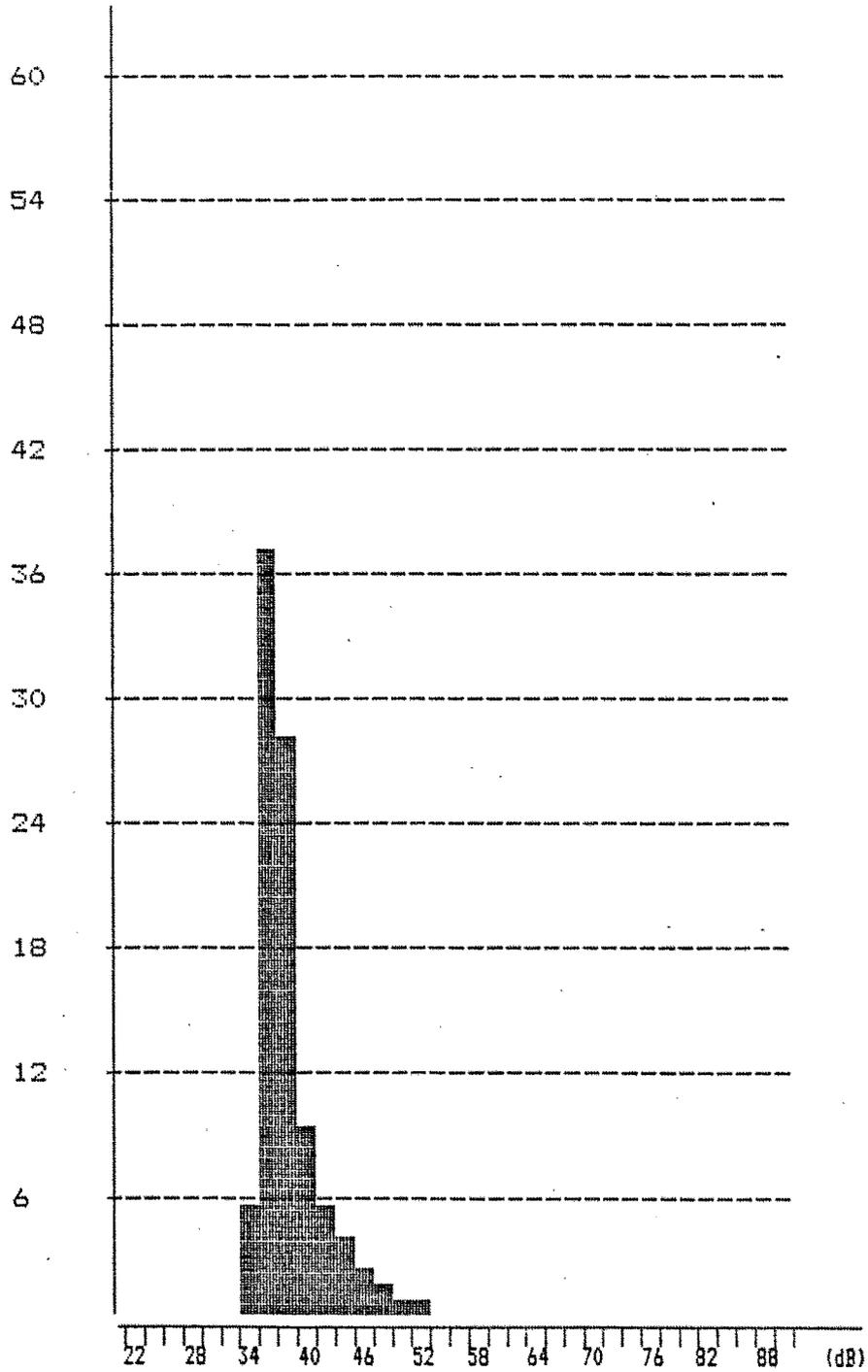
$$0 \text{ dB} = 20 \log \frac{V_1}{V_0}$$

dB \ D%	
30	0
32	0,1
34	5,6
36	37,0
38	28,4
40	9,7
42	5,5
44	3,9
46	2,6
48	1,9
50	1,2
52	0,8
54	0,7
56	0,5
58	0,1
60	0
62	
64	
66	
68	
70	
72	
74	
76	
78	
80	

L Eq (dB)	44
Nivel equivalente	
Número de muestras	9,000
Periodo de muestreo (Seg.)	0.1
L 10 (dB)	45,5
L 50 (dB)	38,5
L 90 (dB)	36,5

Gráf. 21-. Análisis estadístico. Distribución porcentual de los niveles de intensidad de los movimientos embrionarios correspondientes a las gráficas espectrales y temporales del embrión N 27 - 7 a los 11 días de incubación.

Distribucion (%)



Gráf. 22-. Histograma correspondiente al análisis estadístico anterior.

De estas dos ecuaciones obtenemos fácilmente que:

$$V_0 = V_1 = 0,0316 \text{ mV}$$

y donde V_1 es la tensión que corresponde al nivel de referencia y que por lo tanto la fuerza de referencia es

$$\frac{V_0}{10 \text{ mV/N}} = 3,16 \cdot 10^{-3} \text{ N}$$

Teniendo ahora en cuenta que el resultado es 10^5 veces el verdadero, podemos concluir que la fuerza de referencia es

$$0 \text{ dB} \text{ ————— } 3,16 \cdot 10^{-8} \text{ N}$$

Para dar una idea del nivel físico de actividad que alcanzan los embriones, basta calcular a qué fuerza corresponden algunos de los máximos niveles alcanzados:

$$\begin{aligned} 90 \text{ dB} & \text{ ——— } 10^{-3} \text{ N} \\ 100 \text{ dB} & \text{ ——— } 3,16 \cdot 10^{-3} \text{ N} \end{aligned}$$

De esta forma obtenemos un valor estimativo del nivel de actividad embrionaria, siendo un avance en la determinación de éste, sólo valorado hasta la fecha de "visu" y por lo tanto de forma subjetiva.

Dentro de los factores que producen ciertas limitaciones se encuentran los ya comentados de la frecuencia de resonancia del sistema huevo-disco

cerámico y las aproximaciones utilizadas en la calibración del transductor.

Debe tenerse en cuenta también, que la medida efectuada corresponde al nivel de actividad del embrión que se transmite al cascarón del huevo, lo cual introduce una diferencia entre los primeros y los últimos días de incubación, ya que en este segundo caso el embrión está en mayor contacto con el cascarón y por lo tanto hay un camino más directo de transmisión de los movimientos, mientras que en los primeros días el camino de transmisión lo forman el líquido amniótico y el albumen que protegen al embrión.

Todas nuestras observaciones han sido efectuadas sobre embriones de pollo pertenecientes a la raza DEKALB. Los huevos fecundados han sido suministrados por la misma granja de reproducción, procediendo del mismo grupo de reproductoras y recogida para que de esta forma la serie fuese homogénea y su desarrollo lo más paralelo posible. Además, se seleccionaron los huevos que tenían aproximadamente el mismo peso y volumen con el objeto de evitar al máximo las posibles variantes que pudiesen afectar los resultados.

El peso promedio de los huevos que se pusieron a incubar fue de 51,7 gr.

Tras proceder a su desinfección con agua y jabón se colocaron en la incubadora, con ventilación forzada, a 38°C (100°F), recordando que un

promedio alto de temperatura durante la incubación adelanta el desarrollo embrionario y nacimiento, mientras que un promedio bajo de temperatura lo atrasa; el error de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ repercute en ± 16.2 horas sobre el momento de la eclosión. La humedad se mantuvo entre 65 y 75%.

Durante los primeros 18 días del desarrollo embrionario se efectuó el volteo horario automático. El movimiento a derecha e izquierda del huevo hace que el embrión vaya adquiriendo las posiciones fisiológicas para llegar a la eclosión y no se adhiera, a través de sus membranas al cascarón.

A partir del cuarto día se procedía a monitorizar los embriones, período en el que ya se encuentra formado el corazón y se ha iniciado el proceso de condricación de los esbozos esqueléticos de los miembros. Para ello, se coloca el huevo intacto sobre el punto central del disco cerámico piezoeléctrico, que tal como hemos explicado, se encuentra sujeto en el soporte y está colocado en el interior de la estufa incubadora de monitorización para poder mantener la temperatura constante a 38°C durante el tiempo de preparación y registro.

Siguiendo a Hamburger y Cols. (1965), y con el objeto de poder comparar resultados, hemos realizado monitorizaciones durante períodos de 15 minutos para cada embrión. (Estos autores, tras haber efectuado registros durante varias horas, observaron que no había diferencias significativas

vas en las variaciones de las fases de actividad e inactividad sobre los períodos de 15 minutos). Los embriones han sido monitorizados dos veces al día, con una diferencia de 12 horas entre la primera y segunda vez.

Durante cada fase de monitorización se registró simultáneamente la distribución frecuencial de las vibraciones, la distribución temporal (fases de actividad e inactividad) y la distribución de las intensidades y nivel medio de las vibraciones producidas por los movimientos del embrión. Además, el analizador espectral de frecuencias permitió determinar varias veces la frecuencia cardíaca del embrión durante una monitorización. Nosotros lo hicimos al principio y al final en todos los embriones pero además, en algunos de ellos, lo efectuamos con más frecuencia con el objeto de estudiar la relación entre la frecuencia cardíaca y las fases de actividad e inactividad.

Después de cada monitorización el huevo era reemplazado a la incubadora inicial, de forma que continuaba su desarrollo normal. La sencillez e inocuidad del trato dado al huevo ha hecho posible el poder obtener registros del mismo embrión durante todos los días de su desarrollo a partir del quinto día (no antes debido a las limitaciones técnicas) y hasta el momento de la eclosión. Esto marca una diferencia importante con las observaciones que se realizan "de visu", pues la apertura de una ventana en el cascarón

del huevo permite la observación directa del em
brión sólo hasta el noveno o décimo día, y con
dificultad pues, por un lado la membrana corio-
alantoidea se va engrosando y vascularizando, y
llega un momento que es necesario abrirla para
poder observar al embrión, y por otra parte el
embrión va creciendo y cada vez es más difícil
apreciar la totalidad de su cuerpo, siendo nece
sario eliminar mayor superficie calcárea o con-
tentarse con apreciar únicamente una pata o un
ala. Cualquiera de estas alternativas, sección
de la membrana corioalantoidea o una mayor aper
tura y eliminación de la superficie calcárea,
conlleva un gran índice de mortalidad, ocurrien
do frecuentemente la muerte del embrión en ese
mismo día, no pudiéndose obtener los registros
consecutivos del mismo embrión a lo largo de to
do su desarrollo.

Procedimos a monitorizar diariamente y durante
quince minutos series de doce embriones de pollo,
desde el día cuarto hasta su eclosión. Además,
diariamente se monitorizaba un embrión de la mis
ma camada, habiendo previamente valorado se es-
tado de desarrollo a través de la similitud de
las características de los movimientos y frecuen
cia cardíaca con el resto de embriones que se es
tudiaban, y a continuación se sacrificaba para
ser utilizado como *embrión testigo del estado de*
desarrollo del sistema articular de ese día o es
tadio concreto. Al abrir el huevo se observaba
el aspecto general del embrión y las caracterís
ticas de sus movimientos, pasándose acto segui-
do a extraer el embrión del saco amniótico y de

terminar su estadio según los datos aportados por Hamburger y Hamilton (1951); tras ello se procedía a la fijación del embrión testigo en una solución de formol neutro al 10%.

Una vez finalizada esta fase de recolección de datos y gráficos se procedió a su estudio y valoración, de la forma que veremos en el apartado de observaciones, llegándose en esta misma etapa de recolección de datos a obtener algunos resultados que fueron luego correlacionados con los obtenidos del estudio histológico de las articulaciones de los embriones sacrificados en los sucesivos días de desarrollo (estudio a doble ciego).

Antes de procesar los embriones testigos se realizaron fotografías de todos ellos.

A partir del día 10 las piezas fueron decalcificadas.

Se procesaron para microscopía óptica, incluyéndose en bloques de parafina, y se realizaron cortes sagitales, principalmente de las articulaciones de la extremidad inferior, de 10μ de espesor. Tras ello se procedió a colorear las preparaciones. Las tinciones empleadas han sido hematoxilina-eosina para los portas impares y la triple coloración de Mallory para los pares.

De los cortes más interesantes y representativos se tomaron microfotografías.

Durante la observación de las preparaciones his
tológicas al microscopio o lupa se prestó espe-
cial atención a la secuencia de aparición y ca-
vitación de las articulaciones y a su estado de
desarrollo durante todos los días que se estudia
ron. En total se han observado 5.917 cortes, dis
tribuidos en 835 portas, correspondientes a los
bloques de los embriones testigos del desarrollo
articular desde el quinto día de incubación has
ta el veinteavo día en que se produjo la eclo -
sión.

Un embrión de cada serie se conservó vivo hasta
72 horas después de la eclosión, procediéndose
después a su sacrificio, procesamiento y estu -
dio histológico. Esto se efectuó con la idea de
observar si el polluelo tenía un desarrollo post
natal normal.

En resumen, lo que se ha hecho es correlacionar
y complementar:

A) Los datos dinámicos obtenidos a través de:

- distribución temporal de los movimientos,
dándonos los períodos de actividad e inac-
tividad, así como su intensidad. Gráficas
de movimiento en cada instante de tiempo
real.
- distribución frecuencial de las vibracio -
nes producidas por estos movimientos, lo
que nos ha permitido obtener, además, de una
forma precisa la frecuencia cardíaca. Grá-
ficas de análisis espectral de frecuencias.

- distribución de las intensidades de las vibraciones y nivel medio de las mismas. Análisis estadístico. Histograma.

B) con los datos morfológicos que se aprecian en el estudio histológico de estos embriones, sacrificados en sucesivos estadios de desarrollo.

Queríamos resaltar que la finalidad de obtener gráficos de normalidad, de frecuencia e intensidad, de los diversos tipos de movimientos em-brionarios, es servir de base y/o referencia a posteriores estudios y ofrecer un patrón de homogeneidad. Esto es importante porque en los últimos tiempos se ha pasado a prestar más importancia a los estudios dinámicos de los diferentes sistemas y aparatos constituyentes de un embrión normal, por permitirlo los medios técnicos, frente a los ya clásicos estudios de tipo únicamente morfológico.

DISCUSSION

Dada la gran diversidad de datos obtenidos en nuestro estudio, trataremos, en este capítulo de discusión y con el objeto de tener una idea más integral de los acontecimientos sucedidos, de correlacionar los lo máximo posible.

Previamente, debemos señalar que a pesar de que Hamburger y Balaban (1963) y Hamburger y Cols (1965, 1969) observan que a partir de los 3 1/2-4 días de incubación se pueden detectar ligeros movimientos ondulatorios de flexión de la cabeza y tronco, en los que intervienen 3 ó 4 somitos cervicales, no es hasta el día 6 1/2 cuando, y según estos mismos autores, se inician ligeros movimientos de abducción y adducción en las raíces de los miembros. No nosotros también hemos apreciado, directamente a través de una ventana abierta en el huevo, este tipo de movimientos previos al día 6 1/2-7 de incubación, pero tenemos que objetar que son discretísimas con tracciones muy localizadas a nivel del cuello, que a veces se traducen en un ligero temblor que se ex pande cráneocaudalmente en forma de ondas por el tronco del embrión, sin llegar en ningún momento a producirse movimientos activos de los miembros. En general lo que se aprecia son movimientos de flo tación del embrión en el líquido amniótico, en el cual está nadando libremente, y que por su mismo peso se hunde sobre el saco vitelino.

Además, a partir del 5º día de incubación, se añaden los movimientos pasivos del embrión que puedan resultar por transmisión de las contracciones de la musculatura lisa no inervada del amnios. La frecuencia de contracción de estas fibras, al igual que la de los movimientos de flotación, es tan baja (inferior a 1 Hz) que no se han podido aislar de los registros iniciales.

A pesar de apreciarse estos discretos movimientos corporales del embrión durante el 3 1/2-4 día de incubación, las primeras cavidades articulares no se formarían hasta el 5-6 día (estadío 25 a 28 de H-H), según Hamilton (1965) y Nardi (1976), o aún más tardíamente, en el 8-9 día de incubación (estadío 34-35 de H-H) según Romanoff (1960), Drachman y Sokoloff (1966) y Mitrovic (1982). Lo que es evidente es que en el día 5º de incubación (estadío 25 de H-H) se pueden observar macroscópicamente las inflexiones correspondientes a las articulaciones del codo y rodilla (Figura 37).

En el estudio histológico de nuestros embriones testigos del desarrollo articular, correspondientes al 5º y 6º día de incubación (estadío 25 a 28 de H-H), apreciamos como, ni entre los esbozos cartilaginosos de las vértebras ni entre los esbozos condrales del cótilo y fémur, se observan signos de de cavitación articular (Figuras 38, 39, 41 y 42), presentando la interzona un aspecto denso homogéneo. En los registros gráficos realizados correspondientes a estos mismos embriones no se reflejan señales que indiquen de forma clara la existencia

de movimientos corporales del embrión (Gráficas 108, 112 y 113).

Sin embargo, a partir del 5º día de incubación se captan con toda perfección, en el analizador de Fourier (FFT), los componentes armónicos correspondientes a los impulsos cardíacos de estos embriones (gráficas 107 y 111). Todo esto, nos permite deducir que las vibraciones producidas por los pequeños movimientos del tronco del embrión que se observan hasta el día 6-7, son de menos intensidad que los producidos por un latido del corazón del embrión (unos 29 dB de intensidad; gráficas 113, 114 y 115). Según Hamburger y Balaban (1963) a partir del día 6 1/2 (estadio 29 de H-H) comienzan a observarse ligeros movimientos de abducción y adducción a nivel de las raíces de los miembros, seguidos por pequeños movimientos de las partes distales de éstos; estos movimientos ocurren conjuntamente con los del tronco del embrión y solamente en raras ocasiones se han visto de forma aislada. A partir del día 7 1/2-8 de incubación (estadio 32-33 de H-H), la frecuencia de aparición de estos movimientos aislados de los miembros es mayor y además, cuando lo hacen, son más rápidos (Hamburger y Cols 1968, 1).

Nosotros hemos observado, por visualización directa, que en el día 7º, en algunas ocasiones, o más frecuentemente a partir del día 8º, se producen esporádicamente movimientos algo más bruscos del tronco, cabeza y segmentos proximales de las patas, que se transmiten de forma pasiva a los segmentos dis-

tales. Esto quedó reflejado cuando realizamos el estudio con el sistema de medida y registro que pusimos a punto. En las gráficas temporales 118 y 123, correspondientes a los embriones testigos del desarrollo articular del día 7 y 8, se aprecia como ocasionalmente existen amplias variaciones de la línea basal, en forma de picos de ascenso y descenso brusco, correspondientes a estos movimientos del embrión. Estas mismas gráficas nos aportan, además, un dato que no hemos encontrado referenciado en la bibliografía revisada; se trata de la intensidad de estos movimientos embrionarios. Así, en la gráfica 118 se muestra uno de estos picos, de 3 dB por encima de la línea basal, correspondiente a un movimiento brusco del embrión de una intensidad de 38.5 dB (35.5 dB de la línea basal + 3 dB) o en la gráfica 123 se registran picos que llegan a los 42 dB e incluso algunos a los 46 dB de intensidad. En este momento tenemos que recordar que los decibelios son una medida relativa donde el nivel de referencia se calcula a partir de las condiciones de medida, y que si interesa pueden ser transformados en unidades de fuerza (Newtons) según la siguiente fórmula:

$$\text{Fuerza (Nw)} = F_0 \cdot 10^{\left(\frac{n^{\circ} \text{ dB}}{20}\right)}$$

Siendo $F_0 = F$ referencia = $3.16 \cdot 10^{-8}$ Nw

$$0 \text{ dB} \longrightarrow F = F_0$$

Para dar una idea de la intensidad de estos movimientos

90 dB equivalen a 10^{-3} Nw

100 dB equivalen a $3.16 \cdot 10^{-3}$ Nw

Remarquemos también que los dB son una medida relativa logarítmica, lo que implica que pequeñas variaciones del número de decibelios representan grandes variaciones de la intensidad; así, por ejemplo, si un movimiento produce vibraciones de 10 dB de intensidad y en un momento determinado aumentan a 16 dB, en realidad no es que haya aumentado 6 unidades, sino que la intensidad de las vibraciones producidas se han doblado.

A pesar de que en el 72 día de incubación estén los tres segmentos de los miembros claramente diferenciados (figura 44) y se produzcan algunos movimientos rápidos e intensos del embrión (gráfica 118) siguen sin observarse signos de cavitación articular, ni en la columna vertebral, ni en la cadera (figu-ras 45 y 46). Las pequeñas fisuras que se aprecian en esta última articulación hay que considerarlas, por los bordes irregulares que presentan y tras haberlas valorado a mayor aumento, como defectos del procesamiento del material histológico.

Sin embargo, al 82 día de incubación (estadio 34 de H-H), las articulaciones intersomáticas muestran ya delimitados los discos intervertebrales (figura 50). En la cadera empieza a evidenciarse que el tejido mesenquimatoso que ocupa la futura articula-ción articular tiene un aspecto más laxo, apreciándose incipientes fisuras. Este hecho es fundamental pues, es precisamente en el día 82, cuando por primera vez, se observan esporádicas y cortas fases de actividad (gráfica 123). Estas, en la gráfica promedio dan un valor de 1% del período de observación

(gráfica 187). En este punto disentimos de Hamburger, Balaban, Oppenheim y Wenger (1965), quienes observan, por visualización directa, que en este día las fases de actividad ocupan el 39% del período de observación (gráfica 221).

Hay que destacar el hecho de que registramos movimientos embrionarios antes de observar la presencia de alguna articulación con cavidad articular presente o con signos de incipiente cavitación. A este respecto no podemos indicar referencias bibliográficas pues, tal como comentábamos en la introducción, es sorprendente observar la inexistencia de estudios morfológicos de la artrogenesis en correlación con el estudio de la frecuencia e intensidad de la motilidad embrionaria.

En nuestra serie de embriones testigos del desarrollo articular, el día 9º de incubación (estadio 35 de H-H) se observa por primera vez la existencia de una cavidad articular evidente, aunque no completa; se trata de la articulación de la cadera (figura 55). En este punto no coincidimos con autores como Hamilton (1965), Nardi (1976) o Teixidor (1982) quienes sitúan el inicio de la formación de las cavidades articulares en el día 5-6 de incubación (estadios 25 a 28 de H-H); nos aproximamos más a Romanoff (1960) que lo sitúa en el día 8 (estadio 34 de H-H) y coincidimos plenamente con Drachman y Sokoloff (1966) y Mitrovic (1982) quienes lo sitúan en el final del día 8 y día 9 (estadio 34-35) respectivamente. Los datos que podemos aportar nosotros respecto a la dinámica del embrión en este día 9 son, que se captan señales producidas por movi-

mientos bruscos, más frecuentes y más intensos que en días anteriores, alcanzándose frecuentemente los 44 dB de intensidad, tal como se puede apreciar en la gráfica 128. En esta misma gráfica podemos observar que además las fases de actividad han aumentado en frecuencia y duración, llegando a ocupar el 25.7% de todo el período de registro.

Este es pues, el primer día que se registran porcentajes significativos de fases de actividad del embrión, lo que traduce la mayor libertad de movimientos a nivel de las grandes articulaciones de las raíces de los miembros, ya cavitadas (figura 55). Estos movimientos se transmitirían de forma pasiva al resto de la extremidad.

A medida que va desarrollándose el embrión, la frecuencia y duración de las fases de actividad va en aumento; así, en el 10º día de incubación representan el 33.1% de todo el período de registro (gráfica 133). De igual forma, la intensidad de los picos (movimientos bruscos del embrión) también va en aumento (gráfica 133) llegando a medir 47 dB.

Mientras tanto ¿qué ha ocurrido con el desarrollo articular? La articulación de la cadera que había iniciado su cavitación durante el 9º día, muestra una más amplia cavidad articular, aunque pueden apreciarse aún restos de tejido mesenquimatoso en contacto con las superficies articulares (figura 60); a su vez, la rodilla presenta todavía el período de fisuración inicial, empezando a visualizarse la articulación femoropatelar (figura 61). En la articulación del tobillo (figura 62), sin embargo, se

observan como entre los esbozos cartilagosos del tibiotarsus y tarsometatarsus hay tejido mesenquimatoso, denso en la zona central y más laxo en la periferia donde incluso se aprecian pequeñas fisuras; también llama la atención que en esta articulación se halla iniciada la formación del sesamoideo tarsoplantar, antes incluso de que se formase la cavidad articular, dejando patente que su origen viene determinado de forma intrínseca. Coincidimos con Barnett (1954) en la gran similitud que existe entre el tobillo de las aves y la rodilla. Por lo que respecta al desarrollo de las pequeñas articulaciones, sorprende ver cuan atrasadas van en comparación con la cadera o rodilla, hallándose todavía en el período de interzona estratificada (Fig 63).

Tras el estudio de este día concreto podemos concluir que, tal como señala O'Kahilly (1978), la formación de las articulaciones se inician y se van desarrollando siguiendo un patrón próximo-distal. (Figuras 60, 61, 62 y 63)

En lo referente al calendario de aparición de las articulaciones de las patas, estamos completamente de acuerdo con Drachman y Sokoloff (1966) y especialmente con Mitrovic (1982), teniendo que disentir de los autores que señalan la aparición y formación de las cavidades articulares antes del 80 día de incubación (estadío 34 de H-H). A este respecto, había que preguntarse hasta qué punto influyen factores absolutos, como es el peso del huevo a incubar, raza, ... o factores relativos como son las condiciones de incubación, manipulaciones del huevo, etc.

En la gráfica 138, se aprecia un gran aumento del porcentaje de tiempo en que existen fases de actividad, habiéndose pasado del 33.1% del día 10 a un 71.3 del día 11; con la intensidad de los movimientos captados también ocurre lo mismo, y han pasado de 40 - 47 dB del día 10 a 44 - 54 dB del día 11. Hamburger y Cols (1965) encontraban que en el día 11, el porcentaje de tiempo que ocupaban las fases de actividad de los 15 minutos de observación visual, era del 69%.

El estado de desarrollo articular de este día puede resumirse diciendo que la cadera, al igual que la rodilla, están perfectamente cavitadas (figura 65 y 66), mientras que en el tobillo se aprecian signos claros de fisuración y en las articulaciones de los dedos estos son aún incipientes. (Figura 67 y 68).

Vale la pena señalar que hemos observado que el proceso de cavitación se inicia siempre en la periferia, por una o dos hendiduras; éstas se van expandiendo, hasta que finalmente confluyen en la parte central de la interzona. En las articulaciones del tobillo y de los dedos (figura 67 y 68) este hecho es más patente. Según Herickson y Cohen (1965) la cavitación de las articulaciones interfalángicas del embrión de pollo pueden empezar periféricamente o centralmente; Teixidor (1982), encuentra que la cavitación se inicia en el centro de la interzona progresando hacia la periferia; Mitovic describe el proceso contrario en las articulaciones interfalángicas, comienzan periféricamente y se expanden hacia el centro. Nuestras observaciones coinci

den con este último autor, habiéndose apreciado no sólo a nivel de las articulaciones interfalángicas, sino también a nivel de las metatarsofalángicas (figura 68) rodilla (figura 56) y tobillo (figura 57). No obstante donde mejor se observa es a nivel de las articulaciones metatarsofalángicas e interfalángicas de los pies; en las figuras 68, 73, 78, 83 y 87 correspondientes a los días 11, 12, 13, 14 y 15 respectivamente se muestra claramente este hecho.

A partir del día 11 en la cadera, 11-12 en la rodilla, 12-13 en el tarso y 14-15 en las metatarsofalángicas e interfalángicas, no se aprecian grandes cambios en el desarrollo de las articulaciones, debiendo destacar únicamente el modelamiento de las superficies articulares a medida que van aumentando los movimientos del embrión y entrando en funcionamiento las diferentes articulaciones.

El porcentaje del período de estudio que ocupan las fases de actividad del embrión va en constante aumento, pasando de 71.3% en el día 11, a 84% en el día 12, 89.3% en el día 13, hasta alcanzar el máximo porcentaje en el día 14, en el que el embrión presenta fases de actividad durante el 90.7% del período de registro (Gráfica 187).

En las figuras 65, 70 y 75 y en las figuras 67, 72 y 77 podemos apreciar el modelamiento que va ocurriendo en las superficies articulares que componen la articulación de la cadera y tobillo, respectivamente; la secuencia abarca a los días 11 (figuras 65 y 67) 12 (figuras 70 y 72) y 13 (figuras 75 y 77).

Los movimientos del embrión, no sólo van en aumento en cuanto al porcentaje de tiempo que ocupan las fases de actividad, sino también en la intensidad alcanzada. Así, el analizador estadístico revela que en el día 11 el 80% de las muestras están entre 39 y 47 dB (gráficas 138 a 140), en el día 12 están entre 42 y 51.3 (gráficas 143 a 145), en el día 13 entre 48 y 54 dB (gráficas 148 a 150) y en el día 14 el 80% de las muestras están entre 51 y 58 dB.

Todos estos datos referentes a los porcentajes de duración de las fases de actividad e intensidad de los movimientos corresponden a los embriones testigos del desarrollo articular. Los valores se adaptan a los conseguidos en las gráficas promedio (gráficas 187 y 201 a 208). La tendencia de los movimientos embrionarios a ir aumentando progresivamente en intensidad queda reflejada en las gráficas de la evolución del promedio de las distribuciones de las muestras de cada uno de los días estudiados (gráficas 189 a 220), así como en la gráfica de la evolución del promedio de los niveles equivalentes de la actividad global del embrión (gráfica 188). Se puede apreciar que este incremento constante se mantiene hasta el día 20, llegándose entonces incluso a valores de 87 dB de intensidad.

El porcentaje del período de registro que ocupan las fases de actividad del embrión, habíamos visto que iba siendo cada vez mayor, alcanzando su máximo el día 14 de incubación (gráfica 187) en que ocupaba el 90.7% del mismo. A partir de este día y hasta el día 18, este porcentaje se mantenía más

o menos estable entre el 85% y 90% para, y de forma característica, ir descendiendo durante los días 19 y 20, en los que ocupan el 60.3% y el 45.8% del total del período de registro.

Sorprendentemente, en las gráficas temporales o de movimiento en tiempo real de los días 19 y 20 de incubación, se evidenciaba claramente un cambio en el patrón hasta ahora presente; en las gráficas 99, 104, 178 y 183 correspondientes a estos días, se pueden ver coexistiendo una serie de pequeñas señales similares unas a otras, y de una frecuencia de 60 u 80 ciclos por minuto según el registro, con algunos picos muy esporádicos y correspondientes a movimientos del embrión de gran intensidad, que a veces se agrupan formando cortas fases de actividad.

¿Cómo se interpretan estos datos?

Hamburger (1963, 1968.1 y 2, 1969) Hamburger y Cols (1965) y Decker y Cols (1967) ya habían observado, por visualización directa del embrión a través de una ventana practicada en el cascarón, que en el día 17 de incubación se producía un cambio en el tipo de movimientos que, hasta ahora se habían manifestado en forma de sacudidas más o menos bruscas, de poca amplitud y periódicas, alternando fases de actividad con fases de reposo. Según refieren estos autores, hasta el día 17 no existe coordinación entre las diferentes partes del cuerpo que se mueven. En el día 17, sin embargo, son más esporádicos y menos rápidos, presentando además coordinación entre las diferentes partes del cuerpo que se mueven.

Para estos autores, este último tipo de movimientos denotan control por el sistema nervioso central, en maduración, y los denominan movimientos preecl_osi_on. Estos han sido estudiados especialmente por psicofisiólogos interesados en la formación de los patrones del comportamiento.

Según Hamburger (1968, 2), el tipo de movimientos fortuitos bruscos, en forma de periódicas sacudidas irregulares, son debidos a descargas generadas espontáneamente en las neuronas de la médula espinal; a medida que va madurando el sistema nervioso, el cerebro transmitiría estímulos a la médula, influyendo en el inicio de los movimientos coordinados y organizados.

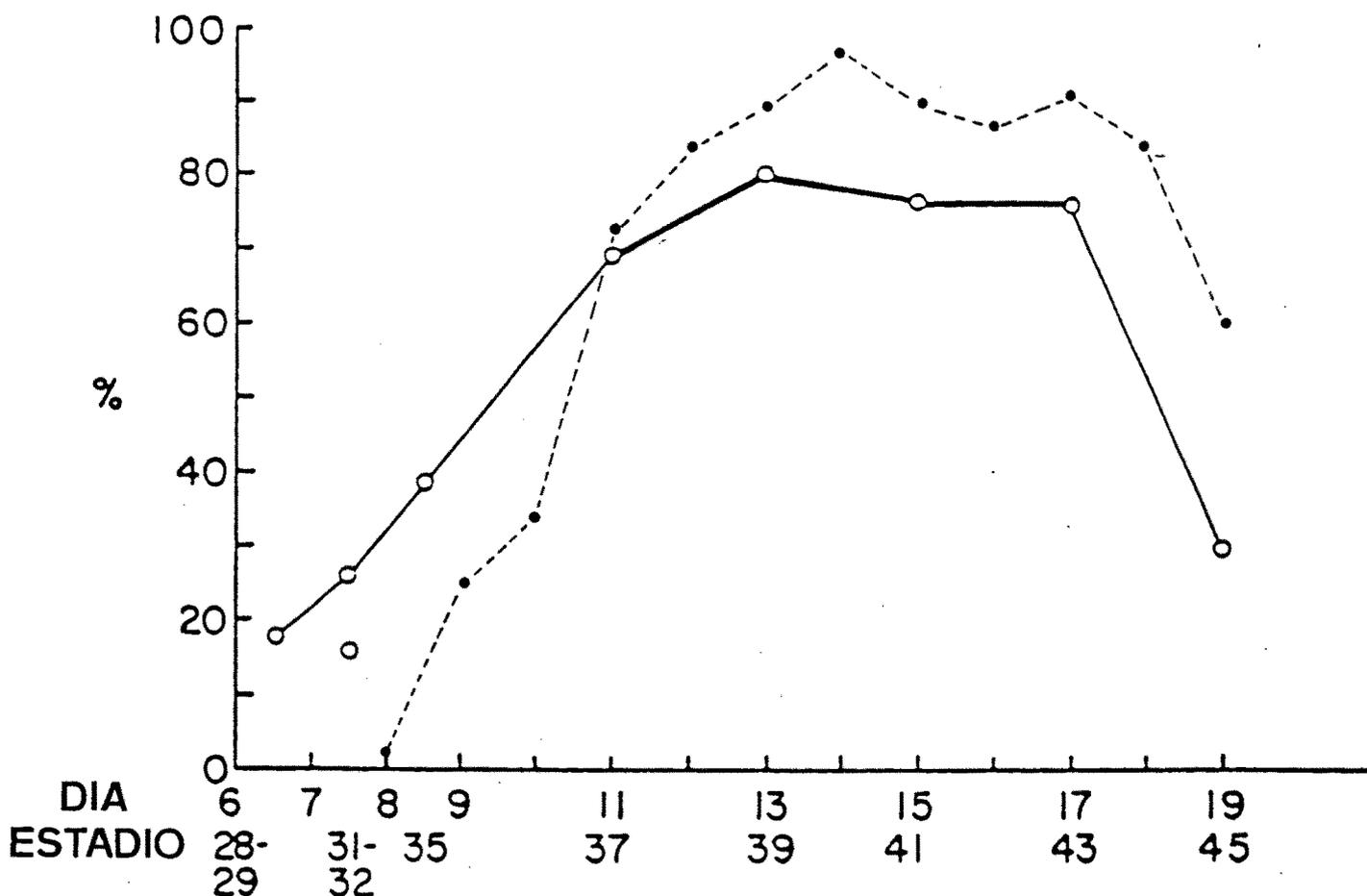
Coincidimos con Hamburger (1968, 1) y Drachman y Sokoloff (1966), en que este tipo de movimientos en forma de sacudidas, ocurren cronológicamente en el período que tiene lugar el desarrollo articular. Nosotros, además, hemos apreciado una clara relación entre las fechas en que aumenta más la actividad del embrión y los días en que se observa el modelamiento de las superficies articulares de la cadera, rodilla y tarso. (Gráficas 138, 143, 148, 153 y figuras 65 a 67, 70 a 72, 75 a 77 y 80 a 82, correspondientes a los días 11, 12, 13 y 14 de incubación).

También hemos observado, como queda patente en las gráficas 99, 104, 178 y 183 este cambio en el tipo de movimientos del embrión. Según Hamburger y Oppenheim (1967) esto ocurre en el día 17-18. Nosotros lo hemos observado en el día 19. Esta discre-

pancia en la fecha no nos sorprende. En la gráfica 221, se representan comparativamente los valores y evolución del promedio de los porcentajes que las fases de actividad ocupan de los 15 minutos que dura el período de observación visual directa, obtenidos por Hamburger y Cols (1965), o de registro, obtenido por nosotros; la similitud en la forma del trazado es evidente. Hay que destacar la existencia de un desfase de un día entre los datos obtenidos por Hamburger y los nuestros.

¿A qué se debe esta discordancia en las fechas?

Tenemos que tener en cuenta, a la hora de tratar de explicar estas diferencias, que las condiciones en que se desarrollaron los embriones no eran las mismas. Hasta el momento, la objetivación de los movimientos embrionarios o, en el caso de que se pretendiese paralizar al embrión, el grado de inmovilización conseguido, se ha efectuado por medio de control visual directo. Para ello, se requiere la apertura de una ventana en el punto más proclive del huevo; con el objeto de no lesionar el disco embrionario, hay que hacer descender el saco vitelino. Esto se logra mediante la extracción de 2 cc de albumen por el polo agudo (técnica de Wolff), o efectuando un pequeño orificio en el cascarón del polo obtuso y depleccionando la cámara de aire (Mitrovic, 1982). Estas maniobras perturban de alguna manera el desarrollo del embrión (aumento o descenso de la temperatura intraovo, alteración de la superficie calcárea de intercambio gaseoso, etc). La metodología empleada por nosotros elude todos estos



Gráf. 221-. Valores y evolución del promedio de los porcentajes que ocupan las fases de actividad de los 15 minutos que dura el periodo de estudio. En trazo continuo, datos obtenidos por Hamburger y Cols (1965) por visualización directa; trazo discontinuo, datos obtenidos por nosotros con las técnicas de registro de vibraciones.

factores relativos de distorsión.

Quedan por comentar los pequeños picos que hemos observado en las gráficas temporales de los días 19^o y 20^o (gráfica 99, 104, 178 y 183). Pensamos que podrían ser expresión del inicio de los movimientos respiratorios del embrión pues coinciden con estos tanto en la fecha de aparición como en la frecuencia que presentan. Según Romanoff (1960), Rahn (1979), Ribera (1980), en el día 19 el embrión pica la membrana de la cámara de aire e inicia la verdadera respiración pulmonar. La frecuencia de los movimientos respiratorios es, según Romanoff, de 70 a 90 por minuto; ésta se registró insertando un tubo de plástico en la cámara aérea, estando conectado por el otro extremo a un Kimografo. Nosotros, registramos una frecuencia de 60 a 80 ciclos por minuto.

Si centramos ahora nuestra atención en las gráficas temporales de los días 8^o y 9^o (gráficas 123 y 128) observaremos que la línea basal de la gráfica 128, durante las fases de reposo es prácticamente recta mientras que en la gráfica 123 presenta una serie de ondas senoidales de baja frecuencia, características. El significado de este hecho será analizado a continuación. Durante las fases de reposo, al no existir movimientos del embrión, se captan las vibraciones producidas por los impulsos cardíacos, y es precisamente debido a esto que la línea basal, en estos períodos de reposo, no desciende a valores mínimos sino que al contrario va aumentando su nivel a medida que se va desarrollando el embrión

y la intensidad de sus impulsos cardíacos; así, por ejemplo, hemos visto como en el 7º día de incubación la línea basal se sitúa en aproximadamente 35 dB de intensidad, en el día 8 fluctúa entre 36 y 40 dB o en el día 9 entre 38 y 40 dB.

En resumen, la línea basal da una medida de la intensidad de los impulsos cardíacos.

La intensidad, también puede detectarse de forma dinámica en el analizador de Fourier (FFT); cuando la intensidad de los impulsos cardíacos disminuye, por ejemplo, al exponer al embrión a una temperatura inferior a la de incubación o lesionar algún vaso sanguíneo corioalantioideo, las señales captadas tanto con el FFT como la línea basal de la gráfica temporal, también lo hacen.

¿Por qué aparecen entonces estas ondas senoidales en la gráfica temporal del día 8? (Gráfica 123)

No podemos explicar con certeza la causa o causas de estas ondas, pero creemos que, debido a que las fechas en que se observan estas variaciones de la línea basal (frecuentemente desde el día 6º al día 10º de incubación) coinciden con el período de mayor actividad de la musculatura lisa del amnios, y también debido a la lenta frecuencia que presentan y al carácter rítmico irregular, probablemente el amnios juegue un papel indirecto en la génesis de estas ondas.

Sin embargo, en la gráfica temporal del día 11 la línea basal permanece estable entre las fases de

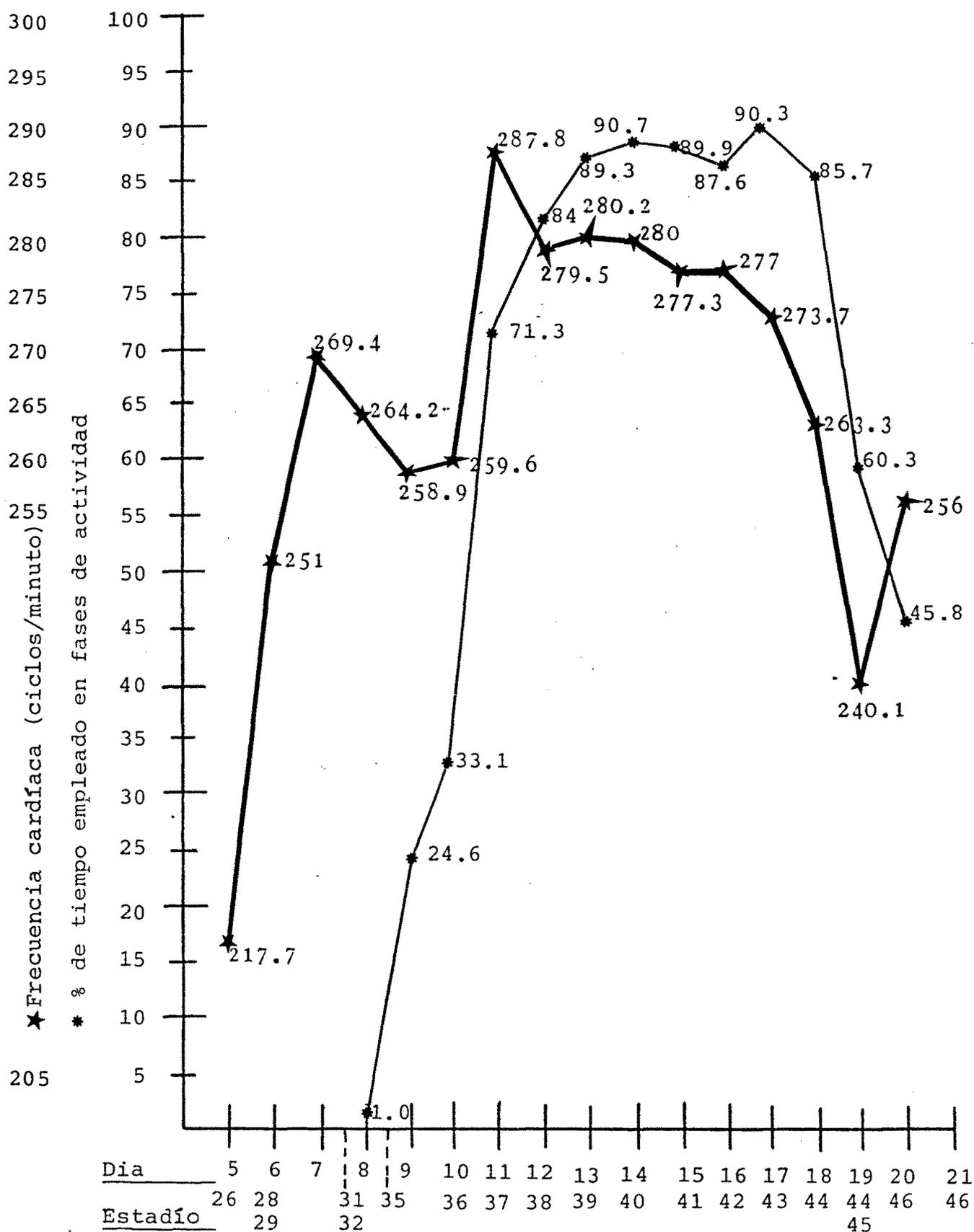
actividad. Esto nos permitió determinar la frecuencia cardíaca varias veces durante un mismo registro; nosotros calculamos la frecuencia cardíaca del embrión en un momento concreto de algunas de las fases de actividad y fases de reposo, según lo permitiese el trazado gráfico. La finalidad de realizar estas determinaciones no era otra que verificar la hipótesis que postula que el desarrollo cardiovascular corre paralelo a las necesidades de irrigación y, fundamentalmente, a las necesidades de oxigenación por parte de la musculatura esquelética. Observamos que en una fase de actividad, tras un período más o menos largo de movimientos bruscos e intensos (producidos por contracciones musculares) la frecuencia cardíaca captada era de 14 a 37 pulsaciones más rápida que durante las fases de reposo. Este tipo de determinaciones sólo es posible practicarlas, en embriones, durante los días 11 y 12 (gráficas 59 y 138), pues en fechas anteriores a éstas, la línea basal está alterada por las fluctuaciones senoidales que hemos descrito previamente (gráfica 123), y en fechas posteriores apenas existen fases de reposo o inactividad lo suficientemente largas como para que se produzcan variaciones en la frecuencia cardíaca (gráfica 163).

En la bibliografía no hemos encontrado referencias a este hecho en el embrión de pollo; sí que existen referencias en el feto humano, pero no en la fase embrionaria. Autores tales como Dawes y Cols (1981), Patrick y Cols (1982), Timor-Tritsch y Cols (1978), Richardson y Cols (1982) han publicado trabajos en que relacionaban la frecuencia cardíaca

fetal con los movimientos del feto humano, tratando de buscar un significado pronóstico en caso de existir aceleraciones o deceleraciones de la frecuencia cardíaca fetal y/o aumento o descenso de la actividad corporal del embrión en las fases preparto.

La existencia de los llamados síndromes cardio-digitales en patología humana, refuerzan la idea del paralelismo funcional entre al actividad cardíaca y la del músculo esquelético. El paralelismo anatómico durante el desarrollo embriológico es ya conocido y la existencia de estos síndromes cardio-digitales es buena prueba de ello.

Hemos podido comprobar que, tal como comentaba Kuo en 1933 (citado por Romanoff, 1960), el período de máxima actividad corporal del embrión coincidía con el período en que el corazón alcanzaba sus máximas frecuencias. Si se superponen las gráficas 186 y 187 podrá apreciarse con claridad la correlación existente. Este hecho sería debido al aumento de las necesidades de oxígeno en las fases de máxima actividad. Además, y como observación propia, hemos encontrado que los días en que la actividad corporal es menor, coinciden con los períodos de mínimas frecuencias cardíacas. La excepción ocurre en el 20o día de la eclosión en que la actividad del embrión desciende y sin embargo la frecuencia cardíaca aumenta. La interpretación de este último fenómeno es difícil de realizar pues, por un lado, la desviación standard del promedio de las frecuencias cardíacas de este día no es significativa (D.S. = 39,2) y por otro lado, aunque la actividad del em-



Superposición de la gráfica 186★(evolución de la frecuencia cardíaca del embrión de pollo) sobre la gráfica 187*(evolución del porcentaje de tiempo empleado en fases de actividad por el embrión de pollo a lo largo de su desarrollo).

brión es baja, los esporádicos movimientos alcanzan intensidades grandiosas (Gráficas 104 y 183) que podrían repercutir en la dinámica del corazón.

En la gráfica 186, del promedio de los valores obtenidos por nosotros, la frecuencia cardíaca aumenta desde 217 pulsaciones por minuto en el día 5º de incubación a 269 en el día 7º; desde este último día y hasta el 9º día de incubación desciende a 258. El 11º día de incubación experimenta un aumento a 287 pulsaciones por minuto para, a partir de entonces ir descendiendo lentamente hasta los 263 ciclos/minuto del día 18. De forma característica, el 19º día de incubación se produce un brusco descenso de la frecuencia, hasta los 240 ciclos/minuto. En el día de la eclosión, la frecuencia cardíaca vuelve a situarse sobre las 256 pulsaciones por minuto. Estos datos difieren de los indicados en la bibliografía, donde se cita como máximo 220 latidos por minuto en el 8º día de desarrollo, manteniéndose constante, entre 190 a 200 latidos por minuto, durante el resto del desarrollo (Romanoff, 1960; Hamilton, 1952). La discordancia entre estos valores se explica en base a que la frecuencia cardíaca del embrión de pollo está en función directa de la temperatura a la que éste se encuentra sometido. En las observaciones preliminares ya hicimos hincapié en las grandes variaciones de la frecuencia cardíaca en relación con las variaciones de temperatura y tiempo en que a ellas se expone, especialmente los rápidos descensos que se producen al disminuir ésta.

La determinación de la frecuencia cardíaca se ha

llevado a cabo o bien a través de observación visual directa, o de filmaciones, o más recientemente, a través de la aplicación del microelectrodos. (Romanoff, 1960; Ruckman y cols 1981). Todas estas técnicas requieren la apertura del huevo, alterándose el medio natural del embrión. Con nuestra metodología todo esto se obvia; creemos pues, que el analizador de Fourier puede ser muy útil en la investigación de la función cardíaca del embrión de pollo pues permite determinar de forma precisa, sencilla y rápida la frecuencia e intensidad relativa de los latidos cardíacos bajo condiciones de absoluta normalidad.

Finalmente, queda por explicar el brusco descenso de la frecuencia cardíaca que se produce el 19º día de incubación. Creemos que es debido a factores hemodinámicos relacionados con la ley de Frank-Starling de la fisiología cardíaca, según la cual, la frecuencia de contracción intrínseca del tejido marcapaso está en función directa con la tensión existente en las paredes del miocardio. Según Hamburger y Oppenheim (1967) antes de iniciarse la última fase de la eclosión, los grandes vasos corioalantoideos empiezan a cerrarse a nivel de la región umbilical. Esto no ocurre de una forma repentina y en un único acto, sino que se van reabriendo y cerrando hasta que finalmente se ocluyen de forma definitiva. Esto repercute en un menor aporte de volumen sanguíneo, a través de la vena cava posterior, a la aurícula derecha; disminuye la tensión en las paredes del miocardio y subsecuentemente la frecuencia de contracción. En nuestras observaciones preliminares ya confirmamos el funciona-

miento de la ley de Starling. En embriones de 10 a 16 días, al seccionar un pequeño vaso corioalantoideo el corazón respondía con una bradicardia en lugar de con una taquicardia compensadora (falta de control vagal y funcionamiento de la ley de Starling).

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral, tras analizar de forma individual y en conjunto los datos obtenidos en las series de registros gráficos realizados, y estudiar detenidamente los cortes histológicos articulares, llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1) Hasta el 6º día de incubación (estadio 28-29 de H-H.), los movimientos corporales que presenta el embrión de pollo son de bajísima frecuencia (<1 Hz) e intensidad ($<25-30$ dB). Durante el 7º día (estadio 31-32 de H-H), se registran los primeros movimientos esporádicos, un promedio de 9 cada 15 minutos, y de poca intensidad (entre 36 y 42 dB).
- 2) A partir del 8º día de incubación (estadio 34 de H-H.), se registran movimientos corporales del embrión más frecuentes e intensos (entre 40-46 dB). Es el primer día en que se aprecian movimientos formando fases de actividad intercaladas con fases de reposo. La duración de las fases de actividad es del 1.0% de los 15 minutos que dura el período de registro.
- 3) Desde el 8º y hasta el 18º día de incubación el embrión mantiene el mismo patrón de movimientos, alternando fases de actividad y fases de reposo, sin presentar ritmo manifiesto.
- 4) El porcentaje de tiempo empleado por el embrión en fases de actividad va en aumento, hasta alcan

zar su máximo en el día 14º de incubación en que ocupa el 90.7%. Se mantiene un nivel entre 90.7% y 85.7% hasta el día 18º inclusive.

- 5) El aumento progresivo a partir del 8º día del porcentaje de tiempo empleado en fases de actividad, medido en las gráficas temporales, coincide con el período de inicio y formación de la cavitación de las grandes articulaciones.
- 6) El proceso de cavitación lo hemos observado siempre iniciándose en la periferia de la articulación, para posteriormente expandirse y confluir en la parte central de ella.
- 7) El proceso de cavitación articular se inicia en la cadera al final del 8º día o comienzo del 9º (estadio 34-35 de H-H.), en el 9º día (estadio 35 de H-H.) en la rodilla y en el 10º-11º día (estadio 36-37 de H-H.) en el tobillo.
- 8) El proceso de cavitación de las articulaciones de los dedos se inicia el 11º día (estadio 37 de H-H.) en las metatarsofalángicas y en el 12º-13º día (estadio 38-39 de H-H.) en las interfalángicas.
- 9) La formación de las articulaciones se inicia y va desarrollando siguiendo un patrón o secuencia próximo-distal.
- 10) A partir del 11º día, en la cadera, 11º-12º en la rodilla, 12º-13º en el tobillo y 15º en las metatarso e interfalángicas, se puede dar por finalizado el proceso de desarrollo.

- 11) Posteriormente a estas fechas, las superficies articulares únicamente se modelan y hacen congruentes, coincidiendo con el aumento, en intensidad y frecuencia, de los movimientos embrionarios registrados.
- 12) La finalización de la cavitación no implica un cambio de patrón de movimientos. Se mantiene el mismo tipo hasta el 18º día de incubación.
- 13) El 19º día y 20º día, período de preeclusión, se invierte el porcentaje de duración de las fases de actividad y reposo, captándose esporádicas señales de gran intensidad.
- 14) La intensidad de los movimientos embrionarios va progresivamente en aumento desde el día 7º (42 a 48 dB.) hasta el 20º día inclusive (70-88 dB.).
- 15) La línea basal de las gráficas temporales da, durante las fases de reposo, una medida relativa de la intensidad de los impulsos cardíacos. Esta, va aumentando progresivamente a lo largo de todo el período de incubación a medida que se va desarrollando el embrión y su actividad cardíaca. (Desde 26-30 dB. en el 5º día, hasta 54-70 dB. en el día de la eclosión).
- 16) Las fases de máxima actividad corporal del embrión coinciden con el período en que el corazón alcanza sus máximas frecuencias, existiendo una estrecha correlación entre los períodos de actividad del embrión y la frecuencia cardíaca presentada en ese momento.

- 17) En condiciones basales, la frecuencia cardíaca del embrión de pollo va aumentando progresivamente hasta el 11º día de incubación. A partir de entonces va descendiendo lentamente hasta el 18º día, para, de forma característica, sufrir un descenso brusco en el 19º. En el día de la eclosión, se inicia la recuperación de la frecuencia a los valores normales del polluelo recién nacido.
- 18) El descenso de la frecuencia cardíaca observado en el 19º día, es debido a una disminución del volumen sanguíneo de retorno al corazón por cierre de los vasos corioalantoideos en la región umbilical, cumpliéndose la ley de Starling de la fisiología cardíaca.
- 19) El corazón del embrión de pollo es muy sensible a las variaciones de temperatura; pequeños descensos de ésta repercuten en una considerable disminución de la frecuencia cardíaca.
- 20) En el 19º día se registran, en las gráficas temporales, una serie de pequeños picos, similares unos a otros, con una frecuencia de 60 a 80 ciclos por minuto, correspondientes a los movimientos respiratorios del embrión.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER R S, GLASE O: J Exptl. Zool. 87: 17-30, 1941. (Citado por Romanoff, 1960).
- ALLEN E R, PEPE R A: Ultrastructure of developing muscle cells in the chick embryo. Am. J. Anat 116: 115-148, 1965.
- AMPRINO R: Aspects of limb morphogenesis in the chicken. En Organogenesis. Holt, Rinehart and Winston, NY, 1965.
- ANDERSEN Y BRO-RASMUSEN. Histochemical studies on the histogenesis of the joints in human fetuses with special reference to the development of the joint cavities in the hand and foot. Am. J. Anat. 108: 111-122, 1961.
- ANGGÅRD L, BERGSTROEM R, BERNHARD D G: Analysis of prenatal spinal reflex activity in sheep. Acta Physiologica Scandinavica. 53: 128-136, 1961.
- ARCHER CH W, HORNBRUCH A, WOLPERT L: Growth and morphogenesis of the fibula in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morph. 75: 101-116, 1983.
- AREY L B: Developmental anatomy. W.B. Saunders Co., Phil. and London, 1965.
- BALINSKY B I: An introduction to embryology. W. B. Saunders Co. Phil. and London, 1965.
- BANKER B Q, VICTOR M, ADAMS R D: Arthrogryposis multiplex due to congenital muscular dystrophy. Brain, 80: 319, 1957.
- BARNETT C H: A Comparison of the human knee and avian ankle. J. Anat. 88: 59, 1954. (Citado por Drachman y Sokoloff, 1966).
- BARRY A: J. Exptl. Zool 88: 1-15, 1941. (Citado por Romanoff, 1960).
- BARRY A: Circulation 1: 1362-1368, 1950. (Citado por Romanoff, 1960).
- BERANEK L L: Noise and vibration control. Mc. Graw-Hill Book Company, New York, 1971.
- BERGER C S, TRIGG P: The measurement of fetal movement using a strain-gauge transducer. IEEE Transactions on bio-medical engineering. Vol. 28, 11: 788-789, 1981.

- BERGMAN R A, AFIFI A K: Atlas of microscopic anatomy. W.B. Saunders Company, 1974.
- BODEMER C W: Embriología moderna. Ed. Interamericana. México, 1972.
- BODIAN D: Development of fine estructura of spinal cord in monkey fetuses. I. The motoneuron neuropic at the time of onset of reflex activity. Bull. Johns Hopkins Hosp. 119: 129-149, 1966. (Citado por Hamburger, 1968,1)
- BOGUE J Y: Exptl. Zool. 9: 351-358, 1932. (Citado por Romanoff, 1960).
- BOREUS L O: Fetal pharmacology. Raven Press. New York, 1973.
- BROWN L M, ROBSON M J, SHARRARD W J W: The pathophysiology of arthrogryposis multiplex congenita neurologica. J. Bone & Joint Surg. 62 A, 3: 291, 1980.
- BROWNE D: Congenital deformities of mechanical origin. Arch. Dis. Chil, 1954.
- BRUEL & KJAER: Vibration Testing. Denmark, 1983.
- BRUEL & KJAER: Medida de las vibraciones. Denmark, 1983.
- BULLOCK T H, HORRIDGE G A: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Freeman, San Francisco, 1965. (Citado por Hamburger, 1968).
- CARPENTER M B: Human neuroanatomy. 7 Tth Ed. Baltimore; Williams and Wilkins Co., 1976.
- CRELIN E S: Development of the musculoskeletal system. Clinical Symposia. Ciba, vol 33-1, 1981.
- CRUL J: Anestesia con Dehydrobenzperidol y Fentanest (Thalamonal) Panel primero: anestesia intravenosa. Mesa Redonda Internacional celebrada en St. Paul de Vence (Francia) del 26 a 28 de marzo, 1974. Instituto Farmacológico Latino, S. A.
- CRUZ M: Pediatría. Quinta edición. Editorial Espaxs. Barcelona, 1984.
- DAWES G S, VISSER G H A, GORMAN: Numerical analysis of the Human fetal heart-rate modulation by breathing and movement. Am. Jour. Obst & Gyn. Vol 140, 5: 535-544, 1981.
- DECKER J D: Motility of the turtle embryo. Chelyda Serpentina (Linné) Science, 157: 952-954, 1967.

- DRACHMAN D B, BANKER B: Arthrogryposis Multiplex Congenita. Case due to disease of the anterior horn cells. Arch. Neurol. 5: 89-105, 1961.
- DRACHMAN D B: Atrophy of skeletal muscle in chick embryos treated with botulinum toxin. Science, Vol 145, 719-721, 1964.
- DRACHMAN D B: Normal development and congenital malformation of joints. Bull. Rheum. Dis. 19: 536-540, 1969.
- DRACHMAN D B, COULOMBRE A J: Experimental clubfoot and arthrogryposis multiplex congenita. The Lancet, 1962.
- DRACHMAN D B, COULOMBRE A J: A method for infusion of fluids into the vascular compartment of the chick embryo. Science, 138: 144, 1962.
- DRACHMAN D B, SOKOLOFF L: The role of movements in embryonic joint development. Devel. Biol. 14: 401-420, 1966.
- DRACHMAN D B, WEINER L P, PRICE D L, CHASE J: Experimental Arthrogryposis caused by viral myopathy. Arch. Neurol. Chicago, 33: 362-367, 1976.
- DUBOUSSET J: Arthrogrypose. Encycl. Med Chir. Paris, Appareil Locomoteur, 15201 A 10-4.7.09.
- DUNN P M: Oligohydramnios due to premature rupture of the membranes and congenital deformities. J Bone & Joint Surg. 53 B: 50-54, 1971.
- EDWARDS D D, EDWARDS J J: Fetal movement: Development and time course. Science, 169: 95-97, 1970.
- FELL H B y CANTI R B: Experiments on the development in vitro of the avian knee joint. Proc. Roy. Soc. B 116: 316, 1934. (Citado por Romanoff, 1960).
- FERRE J C, HELARY J L, LUMINEAU J P, LEGOUX R: The application of modern engineering methods to anatomical research. Anatomia Clinica 4: 189-196, 1982.
- FISAS GRAUPERA J P: Variaciones de forma y posición de los huesos del tarso posterior durante el desarrollo embrionario. Su interés en el estudio de la patogenia del pie equinovaro congénito. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 1974.
- FISHER et al: Arthrogryposis multiple congenita: A clinical investigation. J. Pediatr. 76: 255-261, 1970.

- FLYN A M, KELLY J, MANSFIELD H, NEEDHAM P, O'CONNOR M, VIEGAS O: A Randomised controled trial of non - stress ante-partum cardiotocography. Br. J. Obstet. Gynaecol. 89: 427-33, 1982.
- FULLER D J: Immobilisation of fetal joints as a cause of progressive prénatal deformity. J. Bone and Joint Surg. 57 B: 115, 1975.
- GENIS GALVEZ J M: Biología del desarrollo. Ed. Espax. Barcelona, 1970.
- GIBSON D A, URS N D K: Arthrogryposis multiplex congénita. J. Bone and Joint. Surg. 52 B: 483-493, 1970.
- GOTTLIEB G, KUO Z Y: Development of behavior in the duck embryo. J. Comp. Physiol. Psychol. 59: 183-188, 1965.
- GRANT A, CHALMERS I: Randomised trial of fetal movement counting. Lancet, II: 501, 1982.
- GUELIN-SHEDRINA A: Comp. Rend. Soc. Biol. 121: 214-215, 1936. (Citado por Romanoff, 1960).
- HAM A W: Tratado de Histología. Séptima edición. Ed. Interamericana, 1975.
- HAMBURGER V: Some aspects of the embryology of behavior. Quart. Rev. Biol. 38: 342-365, 1963.
- HAMBURGER V: The beginning of co-ordinated movements in the chick embryo. Ciba Found. Sym. Growth Nervous System Litre Brown, Boston, Massachusetts, 1968, 1.
- HAMBURGER V: Emergence of nervous coordination. Originis of integrated behavior. Develop. Biol. Supplement 2: 251-271, 1968, 2.
- HAMBURGER Y WAUGH: The primary development of the skeleton in nerveless and poorly innervated limb transplants of chick embryos. Physiol. Zool. 13: 367, 1940.
- HAMBURGER V, HAMILTON H L: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. 88: 49, 1951.
- HAMBURGER V, BALABAN M, OPPENHEIM R, WENGER E: Periodic motility of normal and spinal chick embryos between 8 and 17 days of incubation- Jour. Exptl. Zool. 159: 1-14, 1965.
- HAMBURGER V, WENGER E, OPPENHEIM R: Motility in the chick embryo in the absence of sensory input. J. Exptl. Zool. 162: 133-160, 1966.

- HAMBURGER V, OPPENHEIM R: Prehatching motility and hatching behavior in the chick. J. Exptl. Zool. 166: 171-204, 1967.
- HAMBURGER V, BALABAN M: Observations and experiments of spontaneous rhythmical behavior in the chick embryo. Develop. Biol. 7: 533-545, 1968.
- HAMILTON H L: Lillie's. Development of the chick. Holt, Rinehart and Winston. New York. 1965.
- HAMILTON W J, BOYD J D, MOSSMAN H W: "Articulaciones" en Embriología Humana. Ed. Inter- Médica. Buenos Aires, 1964.
- HENRIKSON R C, COHEN A S: Light and electron microscopic observations of the developing chick interphalangeal joint. J. Ultrastruct. Res. 13: 129-162, 1965.
- HINCHLIFFE J R, THOROGOOD P V: Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid³ (ta³) mutant chick embryos. J. Embryol. Morphol. 31: 747-760, 1974.
- HOLDER N: An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. J. Embryol. Exp. Morph. 39: 111-127, 1977.
- HOUILLON C: Embriología. Ed Omega. Barcelona, 1975.
- HUGHES A F W: J. Exptl. Zool. 19: 232-237, 1942. (Citado por Romanoff, 1960).
- IONASESCU V, ZELLWEG H, FILER L J: Increased collagen synthesis in arthrogryposis multiplex congenita. Arch Neurol. 23: 128, 1970.
- JAGO R M: Arthrogryposis following treatment of maternal tetanus with muscle relaxants. Arch. Dis. Child. 45: 227, 1970.
- KÄLLEN B: Early morphogenesis and pattern formation in the central nervous system in "Organogénesis" (R. L. De Haan and Ursprung, H, Eds.), 107-128, 1965.
- KASAI T, OKI T, OSUGA T, NOGAMI H: Familial Arthrogryposis with distal involvement of the limbs. Clin. Orthop. And. Rec. Res. 166: 182-184, 1982.
- KUO Z Y: Exptl. Zool. 61: 395-430, 1932. (Citado por Romanoff, 1960).

- KUO Z Y: Ontogeny of embryonic behavior in aves. XII. Stages in the development of physiological activities in the chick embryo. *Am. J. Psychol.* 51: 361-379. 1938. (Citado por Drachman y Sokoloff, 1966)
- LAFITA F, MATA H: Vibraciones mecánicas en ingeniería. I. N. T. A. Madrid, 1964.
- LAMOREUX W F, HUTT F B: *Poultry Sci.* 18: 70-75, 1939. (Citado por Romanoff, 1960).
- LANGMAN J: *Medical embryology.* William and Wilkins Co. Baltimore, 1975.
- LEBENTHAL E, SHOCHET S B, ADAM A, et al: Arthrogryposis multiplex congenita: 23 cases in an Arab Kindred. *Pediatrics* 46: 891-899, 1970.
- LLOYD-ROBERTS G C, LETTIN A W F: Arthrogryposis multiplex congenita. *J. Bone & Joint Surg.* 52 B: 3, 1970.
- MAILLET M: *Histología e histofisiología humanas. Tejidos de sostén.* Ed. AC, 1980.
- MARSA J: Contribución al estudio de los factores que intervienen en la conformación y evolución del molde cartilaginoso de las extremidades. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1980.
- MEAD N G, LITHGOW W C: Arthrogryposis multiplex congenita. *J. Bone & Joint Surg.* 40 A: 1285, 1958.
- MICHELSON M J, ZEIMAL EV: *Acetylcholine: an approach to the molecular mechanism of action.* 187-201. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall, Oxford, 1973.
- MINKOWSKI M: Reflexes et mouvements de la tête, du tronc et des extrémités, du fœtus humain, pendant la première moitié de la grossesse. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 83: 1202, 1920 (Citado por Drachman y Sokoloff, 1966).
- MITROVIC D: Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo. Morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am. J. Anat.* 150: 333-348, 1977.
- MITROVIC D: Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. *Am. J. Anat.* 151: 475-486, 1978.
- MITROVIC D: Development of the articular cavity in paralyzed chick embryos and in chick embryo limb buds cultured on chorioallantoic membranes. *Acta Anat.* 133: 313-324, 1982.

- MOFFET B C: The morphogenesis of joints. In organogenesis. Holt, Rinehart and Winston. New York, 1965.
- MORE K L: The developing human. W. B. Saunders Co. Philadelphia and London, 1973.
- MUMENTHALER M, ENGEL W K: Cytological location of cholinesterase in developing chick embryo muscle. Acta Anat. 47: 274-299, 1961.
- MURATORI G, FRANCESCHINI M: Sulla morfogenesi dell'articolazione dell'anca del pollo, con particolare riguardo alla struttura del mesenchima intermedio. Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Art. Cl. Sci. Mat. Nat. 104: 259-274, 1945. (Citado por Romanoff, 1960)
- MURATORI G, MUNARON G: Contributo istochimico allo studio dello sviluppo delle diartrose. Minerva Ortop. 6: 1-8, 1955.
- MURILLO-FERROL N L: Influencia de la extirpación de la capa calcárea del huevo de las aves sobre el desarrollo del embrión. An. Desarr. 15-36; 219-228, 1968.
- MURRAY P D F: An experimental study of the development of the limbs of the chick. Proc. Linnean Soc. 51: 187, 1926. (Citado por Nardi, 1976)
- NARDI J: Analisis experimental del desarrollo de las articulaciones. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1976.
- NATALE R, CLEWLOW F, DAWES G S: Measurement of fetal movements in the lamb utero. Am. J. Obstet. & Gynecol. 140: 545-551, 1981.
- NATHANIELSZ P W, YU H K, CABALUM T C: Effect of abolition of fetal movement on fetal intravascular PO₂ and incidence of tonic myometrial contractures in the pregnant ewe at 114 to 134 day's gestation. Am. J. Obstet. Gynecol. 144, 5: 674, 1982.
- NELDAM S: Fetal movements as an indicator of fetal well-being. Lancet, I: 1222-24, 1980.
- NELSON W E, WAUGHAN W C, M^c KAY R J: Tratado de Pediatría. Sexta edición. Editorial Salvat. 1975.
- NISHIMURA H, OKAMOTO N: Sequential atlas of human congenital malformations. Igaku Shoin Ltd. Tokyo, 1976.
- OPPENHEIM R W: Amniotic contraction and embryonic motility in the chick embryo. Science, 152: 528-529, 1966.

- O'RAHILLY R, GARDNER E: The development of the knee joint of the chick and its correlation with embryonic staging. *J. Morphol*, 98: 49-87, 1956.
- O'RAHILLY R, GARDNER E, GRAY D J: The skeletal development of the foot. *Clin. Orthop.* 16: 7, 1960.
- O'RAHILLY R, GARDNER E: El desarrollo de las articulaciones en "Lecciones de Anatomía Humana" por Luis Gómez Oliveros. Vol 1. Editorial Marban. Madrid, 1964.
- O'RAHILLY R, GARDNER E: The embryology of movable joints. In "The joints and sinovial fluid". Sokoloff L. 1: 49-103, 491. Academic Press, N. Y, 1978.
- ORTS-LLORCA F: Anatomía Humana. Tomo I. Ed. Científico-Médica. Barcelona, 1970.
- PAI A C: Developmental genetics of a lethal mutation, muscular dysgenesis (mdg), in the mouse. II Developmental Analysis. *Dev. Biol.* 11: 93-109, 1965.
- PATRICK J, NATALE R: Fetal heart rate and fetal body movements. *Am. J. Obstr. Gynecol.* 144, 6: 741, 1982.
- PATTEN B M: *Anat. Record* 30: 53-60, 1925. (Citado por Romanoff, 1960).
- PATTEN B M: Early embryology of the chick. Fifth edition. Mc Graw-Hill, 1971.
- PEARSON J F, WEAVER J B: Fetal activity and fetal well-being: An evaluation. *Br. Med. J.* 1:1305, 1976.
- PHILIPS COMPANY: Piezoelectrics ceramics. Permanent magnet materials. Components and materials, part.16.Data Handbook, 1982.
- PIERCE M E: The amnion of the chick as an independent effector. *J. Exptl. Zool.* 65: 443-473, 1933. (Citado por Hamilton, 1965).
- POUS J G et cols: L'arthrogrypose pendant l'enfance. *Chir. Pediatr.* 22, 5: 289-364, 1981.
- PREYER W: Spezielle physiologie des embryo. Leipzig: Griesen, 1885. (citado por Hamburger, 1968)
- RAHN H, AR A, PAGANELLI C: Cómo respiran los huevos de las aves. *Investigación y Ciencia*, 1979.
- REMOTTI E: *Boll. Mus. Lab. Zool. e Anat. Comp.* 12 (No 59) Univ. Genova, 1932. (Citado por Romanoff, 1960).

- RICHARDSON B, PATRICK J, NATALE R: Fetal heart rate and fetal body movements. Am. J. Obstet. Gynecol. 144: 741, 1982.
- RIBERA CANUDAS M V: Análisis experimental de las variaciones del equilibrio ácido-base del embrión de pollo a lo largo de su desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1980.
- ROBERTS A B, LITTLE D, COOPER D, CAMPBELL S: Normal patterns of fetal activity in the third trimester. Br. J. Obstet. Gynecol. 86: 4, 1979.
- ROBERTSON et al: Human fetal movement: spontaneous oscillations near one cycle per minute. Science, 218: 1327, 1982.
- ROMANOFF A L, LAUFER H: The effect of injected thiourea on the development of some organs in the chick embryo. Endocrinology, 59: 611-619, 1956.
- ROMANOFF A L: The avian embryo. Mc Millan Co. New York, 1960.
- RUANO-GIL D: Algunos aspectos de la morfogénesis de los miembros. Discurso leído por el Académico Electo, el 11 de junio de 1.978 en el acto de su recepción. Real Academia de Medicina de Barcelona, 1978.
- RUANO GIL D, NARDI J, TEJEDO A: Influence of extrinsic factors in the development of the articular system. Acta Anatómica 101: 36, 1978.
- RUANO D, NARDI J, TEJEDO A: Influencia de los movimientos embrionarios en el desarrollo de las articulaciones. Rev. Quir. Española. Vol 6, nº 2: 84, 1979.
- RUBIN A: Arthrogryposis multiplex congénita. Handbook of congenital malformations. W.B. Saunders Company, 1967.
- SADOVSKY E, LAUFER N, ALLEN J W: The incidence of different types of fetal movements during pregnancy. Br. J. Obstet. Gynaecol. 86: 10, 1979.
- SAN GABRIEL A: Patología de la incubación y enfermedades del polluelo. Edit. Aedos. Barcelona, 1980.
- SAUNDERS J W: The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exp. Zool. 108: 363-403, 1948.
- SAUNDERS J W, GASSELING M T, SAUNDERS L C: Cellular death in morphogenesis of the avian wing. Develop. Biol. 5: 147, 1962.

- SAUNDERS J W: Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 193: 29-42, 1972.
- SEDLACEK J: Development of spontaneous motility in chick embryos. Interaction of reserpine and apomorphine. *Physiol. Bohemoslov.* 29: 21, 1980.
- SHARRARD W J W: Muscle paralysis in poliomyelitis. *Br. J. Surg.* 44: 471-780, 1957.
- SIGRIST G V M, KLEINEBECKEL D K E: An implantable myography electrode for recording muscle activity in freely moving small animals. A new technological approach. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering*, 29: 730-736, 1982.
- SISSONS H A: The growth of bone. Academic Press. New York and London, 1956.
- SMITH A, BRUTON J: Atlas a color de técnicas de coloración histológica. Year Book Medical Publishers, Inc. Londres, 1977.
- SOUTEYRAND-BOULENGER J D: Arthrologie en "Traite de Zoologie" de Pierre P. Grase. XVI, fascicule III. Ed. Masson et Cie Editeurs, 1971.
- SPERRY R W: Embriogénesis of behavioral nerve nets. In "Organogenesis" (R. L. De Haan and H. Ursprung, Eds), 161-186, 1965.
- STELZNER D J, MARTIN A H, SCOTT G L: Early stages of synaptogenesis in the cervical spinal cord of the chick embryo. *Z. Zellforsch.* 138: 475-488, 1973.
- SUMNER-SMITH G: Bone in clinical orthopaedics. A study in comparative osteology. W. B. Saunders Company, 1982.
- SUSO VERGARA S: Efecto de la electrocoagulación selectiva del esbozo de los miembros del embrión de pollo, sobre el crecimiento de las extremidades. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1976.
- SWINYARD CH A: Concepts of multiple congenital contractures (arthrogryposis) in man and animals. *Teratology*, 25-2: 247-258, 1982.
- SZEKELY G: Development of limb movements: embryological, physiological and model studies. Ciba Found. Symp. Growth nervous system. Little Brown, Boston, Massachusetts, 1968.

- TEIXIDOR A: Influencia de la movilidad embrionaria en el desarrollo del sistema articular. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1982.
- TIMONER VIDAL J: Análisis experimental de la composición del líquido alantoideo en el embrión de pollo. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1983.
- TIMOR-TRITSCH I, ZADOR I, HERTZ R H, RUSEN M G: Classification of human fetal movement. Am. J. Obstet. Gynecol. 126: 70, 1976.
- TIMOR-TRITSCH I E, DIERKER L J, ZADOR I, HERTZ R H, ROSEN M G: Fetal movements associated with fetal heart rate accelerations and decelerations. Am. J. Obstet. Gynecol. 131: 276, 1978.
- TIPLER P A: Física. Edit. Reverté, S. A. Vol.1, 1978.
- VIÑAS SALAS J: Valor clínico de la ecocardiografía abdominal. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1976.
- VISINTINI F, LEVI-MONTALCINI R: Relazione tra differenziazione strutturale o funzionale dei centri e delle vie nervose nell' embrione di pollo. Arch. Suisse Neurol. Psychiat 43: 1-45, 1939. (Citado por Hamburger y Balaban, 1963)
- WATTERSON R L: Structure and mitotic Behavior of the early neural tube. In "Organogénesis" (R. L. De Haan and Ursprung, H., Eds), 129-159, 1965.
- WATTERSON R L, SWEENEY R M: Laboratory studies of chick, pig and frog embryos. Burgess Publishing Company. Minnesota, 1973.
- WARKANY J: Congenital malformations. Year Book Medical Publishers Inc. Chicago, 1971.
- WILLIS R A: "The bordeland of embryology and pathology". Ed. Butterworths, 1962.
- WINDLE W F, ORR D W: The developmen of behavior in chick embryos: Spinal cord structure correlate with early somatic motility. J. Comp. Neurol. 60: 287-307, 1934. (Citado por Hamburger y Balaban).
- WOLF E: Les bases de la teratogénèse expérimentale des vertèbres amniotes d'après les resultats de methodes directes. Arch. Anat. Histolog. Embryol. 22:1, 1936.
- WYNNE-DAVIES R, LLOYD-ROBERTS G C: Arthrogryposis multiplex congenita: Search for prenatal factors in 66 sporadic cases. Arch. Dis. Child. 51: 618, 1976.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

CENTRE DE PUBLICACIONS

INTERCANVI CIENTÍFIC I EXTENSIO UNIVERSITÀRIA :

**ESTUDIO DE LA DINAMICA EMBRIONARIA
APLICANDO TECNICAS DE REGISTRO DE
VIBRACIONES. CORRELACION MORFOFUN-
CIONAL DEL DESARROLLO ARTICULAR
DEL EMBRION DE POLLO.**

Resumen de la Tesis presentada para aspirar
al grado de Doctor en Medicina por

MANUEL LLUSÁ PÉREZ



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Tesis Doctoral del Dr. D. Manuel LLUSA PEREZ

TEMA: "Estudio de la dinámica embrionaria aplicando técnicas de registro de vibraciones. Correlación morfofuncional del desarrollo articular del embrión de pollo"

T R I B U N A L

Presidente: Dr. D. Francisco GONZALEZ FUSTE

Facultad Medicina
Universidad Barcelona

Vocales: Dr. D. Domingo RUANO GIL

Facultad Medicina
Universidad Barcelona

Dr. D. Antonio NAVARRO QUILIS

Facultad Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona

Dr. D. Antonio SALVA LACOMBE

Facultad Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona

Secretario: Dr. D. Antonio TEJEDO MATEU

Facultad Medicina
Universidad Barcelona

Suplente: Dr. D. Daniel NAVAJAS NAVARRO

Facultad Medicina
Universidad Barcelona

Realizada la presentación y lectura de la Tesis en fecha 13-11-1985 obtuvo la calificación de APTO "CUM LAUDE".

Barcelona, 30 de enero de 1986

Sello Facultad

El Decano,

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA DINÁMICA EMBRIONARIA APLICANDO TÉCNI-
CAS DE REGISTRO DE VIBRACIONES. CORRELACIÓN MORFOFUN-
CIONAL DEL DESARROLLO ARTICULAR DEL EMBRIÓN DE POLLO.

MANUEL LLUSÁ PÉREZ

BARCELONA 1985.

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Anatomía Humana de la -- Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, que dirige el Profesor Dr. Domingo Ruano Gil y en el Departamento de Acústica de la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica de Tele-- comunicaciones La Salle Bonanova de -- Barcelona, que dirige el Hno. Josep -- Martí Roca.

La realización de esta Tesis, ha contado con el apoyo económico de una de las "Ayudas al estudio, a la forma- - ción y a la investigación", concedida por la Obra Social de la CAJA DE --- BARCELONA en el año 1983.

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

La embriología experimental ha permitido comprobar que el movimiento embrionario es esencial para el desarrollo normal y mantenimiento de las articulaciones; la inmovilización de éstas durante su periodo de formación, o algo después, aboca en fusiones fibrosas o en ocasiones cartilaginosas, muy similares a las que se observan en lo que en patología humana se conoce como síndrome de artrogriposis múltiple congénita (Hamburger y Waugh 1940, Drachman y Sokoloff 1966, Mitrovic 1977 y 1982, Ruano, Nardi y Tejedo 1978).

Pensamos que el conocimiento de los factores que influyen y condicionan los movimientos del embrión, desde las contracciones músculo-esqueléticas, hasta los movimientos extrínsecos al huevo, pasando por las contracciones de la musculatura lisa del amnios, debería ser un paso previo a la valoración de cualquier estudio morfológico experimental del desarrollo del sistema articular.

Sorprende observar la falta de correlación existente entre los estudios morfológicos de la artrogénesis y los que hacen referencia a los movimientos embrionarios, a pesar de la abundancia de datos disponibles en cada uno de estos campos considerados independientemente.

Por otra parte, los movimientos del embrión no han sido estudiados con métodos cuantitativos, sino que simplemente se han llevado a cabo mediante visualización directa. Hamburger y cols. (1965), registraban los movimientos embrionarios controlando manualmente un polígrafo, señalando cada vez que veían un movimiento que

ellos consideraban de suficiente magnitud para ser tenido en cuenta. A la vez, tomaban notas sobre las cualidades de estos movimientos, definiéndolos como bruscos, suaves, periódicos, etc., según apreciaban.

La falta de métodos objetivos a la hora de obtener datos sobre los movimientos, ya fuese de embriones normales, manipulados o patológicos, ha sido causa de diferencias entre los estudios realizados por diversos autores que trabajando con postulados y metodología similares, obtenían resultados heterogéneos. A ello también ha contribuido el hecho de que hasta el momento actual, como hemos indicado, sólo se habían estudiado los movimientos embrionarios por visualización directa o films, lo que siempre implicaba tener que efectuar la apertura de una ventana en el cascarón del huevo, con los efectos que ello conlleva de disminución de la temperatura, alteración de la superficie calcárea y del intercambio gaseoso a través de ella y de las membranas embrionarias, ausencia de los movimientos rotatorios que imprime la gallina sobre el huevo (evitando de esta forma la adhesión del embrión a través de las membranas que lo envuelven, al cascarón), etc.

Para poder comparar resultados se necesita tener unos puntos de referencia. En el caso que nos ocupa, creímos esencial disponer de datos obtenidos de forma objetiva, acerca del tipo, frecuencia e intensidad de los movimientos que realiza el embrión de pollo, bajo condiciones normales, durante su desarrollo y especialmente durante el periodo de la artrogénesis y posterior mantenimiento de las superficies y cavidades articulares.

Dado que el embrión se encuentra inmerso en un medio líquido, pensamos que sus movimientos podrían ser transmitidos a través de éste, y recogidos en la superficie calcárea. En colaboración con el Departamento de Acústica de la Escuela de Telecomunicaciones La Salle de Barce-

lona, tras haber analizado conjuntamente la problemática existente, concluimos que las técnicas de registro de vibraciones podrían aportar una gran ayuda en solventar los dos puntos principales del planteamiento:

- Obtener un método objetivo de análisis y registro de la dinámica embrionaria.

- Respetar lo máximo posible las condiciones normales de desarrollo del embrión de pollo.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

El primer punto que se planteó fué la elección del transductor a utilizar, lo que estuvo supeditado al tipo de señal que se iba a estudiar y la banda de frecuencias que abarcaría.

El transductor más útil resultó ser el de tipo disco cerámico piezoeléctrico (Philips nº4322-020-08840), pues se adaptaba mejor a las ondas producidas por el embrión. Las vibraciones en el cascarón del huevo, de origen embrionario, corresponden a lo que en acústica se conoce como ondas transversales: La vibración es perpendicular a la dirección de propagación de la misma (o sea a la su perficie del cascarón).

El principio de funcionamiento, consiste en que cuando se aplica una tensión a un disco cerámico piezoelétri

co polarizado, éste se deforma modificando su superficie y grosor, en función de la tensión aplicada. De la misma manera, si el disco cerámico es sometido a una deformación mecánica, se obtiene una tensión entre sus dos caras, pudiéndose relacionar la tensión obtenida, aplicando una fuerza determinada, con la salida eléctrica. Es decir, se establece una relación fuerza-tensión.

Era importante que el punto de contacto entre el huevo y el disco fuese el centro de éste, para lo que se ideó un sistema de fijación que, mediante hilos elásticos, mantuviese el huevo en la posición correcta sin ejercer presión adicional sobre el sensor.

La calibración del transductor era indispensable para conocer el índice de motilidad del embrión en unidades de fuerza, Newtons. Esta calibración se realizó como un sensor de fuerza y de forma comparativa con otros cuya respuesta era completamente conocida (el transductor de fuerza Bruel & Kaer 8001), pudiéndose comprobar de esta forma que el conjunto formado por el soporte y el disco cerámico presentaba una buena linealidad.

La cadena de medida quedó constituida por (Fig. 1):

* El transductor tipo disco cerámico piezoeléctrico, sobre el que se colocaba el huevo a analizar. Este primer eslabón de la cadena se encontraba situado en el interior de una incubadora de monitorización, localizada en una habitación anexa al laboratorio para evitar ruidos indeseables.

* La señal era conducida a un amplificador de carga, que adaptaba las impedancias a un nivel adecuado para la instrumentalización de medida y análisis.

* De aquí pasaba a través de un sonómetro o filtro pasa-altos, lográndose eliminar las frecuencias de resonancia más bajas.

A partir de este punto, la señal era distribuida simultáneamente en tres líneas:

- El analizador estadístico nos proporcionaba directamente los niveles de actividad del embrión y la distribución de sus movimientos en la escala de amplitudes.

- En una segunda línea, la señal pasaba a través de un amplificador de medida, que la condicionaba para adecuarla al registrador de nivel.

- Finalmente, en una tercera línea la señal era conducida al analizador de Fourier (FFT), en el que se obtenía el espectro frecuencial de la señal y el valor de las frecuencias fundamentales.

De esta forma se lograron datos dinámicos que se representaron en gráficas.

Las gráficas de análisis espectral de frecuencias (Gráf. 1), nos informaban de las diversas frecuencias que componían un movimiento en un instante dado (en realidad se realizaba un promedio de las diversas muestras que se iban tomando y se determinaba así el movimiento medio a estudiar). El eje de abscisas representa la frecuencia en ciclos/segundo. Hacia la izquierda encontraremos los componentes lentos del movimiento (frecuencias bajas), y hacia la derecha los componentes rápidos (frecuencias altas). El eje de ordenadas registra la intensidad de cada componente del movimiento en decibelios (dB). Remarquemos que los dB son una medida relativa logarítmica, lo que implica que pequeñas variaciones del número de dB representan grandes variaciones de la intensidad.

El analizador de Fourier nos permitió, además, detectar y calcular la frecuencia de las vibraciones producidas por los latidos cardíacos.

Las gráficas de movimiento en cada instante de tiempo real o gráficas temporales (Gráf. 2), tienen representadas en el eje de abscisas la función tiempo y en el eje de ordenadas la intensidad del movimiento en función logarítmica (dB).

La realización del estudio estadístico ha permitido obtener la distribución de las intensidades de las vibraciones producidas por el embrión, así como su nivel medio de actividad. La representación en forma de histograma facilitó su estudio.

Diariamente se procedió a monitorizar durante 15 minutos cada uno de los embriones de pollo (raza DEKALB), de las series sometidas a estudio, desde el día 5° hasta la eclosión. Además, diariamente se monitorizaba un embrión de la misma camada, que a continuación se sacrificaba para ser utilizado como embrión testigo del desarrollo del sistema articular en ese día concreto. Se observó el aspecto general del embrión, con el objeto de descartar la existencia de malformaciones o anomalías; además se determinaba su estadio de desarrollo según los datos aportados por Hamburger-Hamilton (1951). Se procesaron para microscopia óptica y se realizaron cortes sagitales de las principales articulaciones de la extremidad inferior, de 10 micras de espesor.

En resumen, lo que se ha hecho es correlacionar y complementar:

A) Los datos dinámicos, obtenidos a través de:

- distribución temporal de los movimientos, dándonos los periodos de actividad e inactividad,

así como su intensidad. Gráficas de movimiento en cada instante de tiempo real.

- Distribución frecuencial de las vibraciones producidas por estos movimientos, lo que nos ha permitido obtener, además, de una forma precisa la frecuencia cardíaca. Gráficas de análisis espectral de frecuencias.
- Distribución de las intensidades de las vibraciones y nivel medio de las mismas. Análisis estadístico e histograma.

B) Con los datos morfológicos que se aprecian en el estudio histológico de las articulaciones de estos embriones sacrificados en sucesivos estadios de desarrollo.

O B S E R V A C I O N E S

Y

-

D I S C U S I O N

De forma sistemática fuimos analizando las características de los registros realizados diariamente durante el desarrollo de cada uno de los embriones estudiados, así como de los embriones testigos de la evolución del desarrollo articular:

- Datos dinámicos de la evolución diaria de un mismo embrión, desde el día 5° hasta la eclosión.

- Datos dinámicos y morfológicos de la evolución diaria de los embriones testigos del desarrollo articular, desde el día 5° hasta la eclosión.

En los embriones de 5 y 6 días de incubación, los registros gráficos no reflejaban señales que indicasen de forma clara la existencia de movimientos corporales del embrión (Gráf. 3). Sin embargo, en el FFT se captaban con toda perfección los componentes armónicos correspondientes a los impulsos cardíacos de estos embriones. Todo esto, nos permitió deducir que las vibraciones producidas por los pequeños movimientos corporales del embrión eran de menor intensidad que las producidas por un latido del corazón del embrión. En el estudio histológico correspondiente a estos embriones, apreciamos como no existían signos de cavitación articular entre los esbozos cartilagosos de las vértebras, ni tampoco entre los esbozos condrales del fémur y cótilo.

En las gráficas temporales correspondientes a los embriones testigos del desarrollo articular del día 7 se apreció como ocasionalmente aparecían una serie de picos producidos por los movimientos bruscos del embrión, pudiéndose, además, registrar la intensidad que llegaban a alcanzar estos movimientos (Gráf. 4). A pesar de que en el 7° día de incubación se producían estos movimientos y de que los tres segmentos de los miembros estaban ya claramente diferenciados, no se observaron signos de cavitación articular entre los esbozos condrales de la columna vertebral ni entre los de la cadera.

Al 8° día de incubación, se encontraban ya delimitadas las articulaciones intersomáticas y los discos intervertebrales. En la cadera se empezó a evidenciar que el tejido mesenquimatoso que ocupaba la futura cavidad articular tenía un aspecto más laxo y con incipientes fisuras

(Fig. 2). En la rodilla, el estado de desarrollo se encontraba más retrasado, siendo esto más evidente a nivel del tobillo, donde ni siquiera se delimitaban las superficies articulares de los esbozos condrales. Era precisamente en este día cuando por primera vez se detectaron esporádicas y cortas fases de actividad, ocupando el 1% del periodo total de observación, 15 minutos (Gráf. 5). En este punto, disintimos de Hamburger, Balaban, Oppenheim y Wenger (1965), quienes apreciaron por visualización directa que estas fases ocupaban el 39% del período de observación (también 15 minutos).

Los datos que podemos aportar respecto a la dinámica del embrión en el día 9, es que se captaban señales, producidas por movimientos bruscos, más frecuentes y más intensas que en días anteriores. Las fases de actividad habían aumentado en frecuencia y duración, llegando a ocupar el 25% de todo el período de registro (Gráf. 6). Era pues, el primer día que se registraban porcentajes significativos de fases de actividad. En los cortes histológicos se observaron, también por primera vez, la existencia de unas cavidades articulares evidentes, aunque no completas, a nivel de las articulaciones de la cadera (Fig. 3). En el resto de las articulaciones, se estaba todavía iniciando el período de fisuración.

A medida que se desarrollaba el embrión, la frecuencia y duración de las fases de actividad iban en aumento; así, en el 10° día de incubación representaban el 33,1% de todo el período de registro (Gráf. 8). De igual forma, la intensidad de los picos (movimientos bruscos del embrión), también aumentaba.

Mientras tanto, ¿qué ha ocurrido con el desarrollo articular?. La articulación de la cadera que había iniciado su cavitación durante el 9° día, mostraba una más amplia cavidad articular, aunque aún podían apreciarse restos de tejido mesenquimatoso, en contacto con las su-

perfiles articulares (Fig. 4); a su vez, la rodilla presentaba todavía el período de fisuración inicial, empezando a visualizarse la articulación fémoropatelar (Fig. 5). En la articulación del tobillo (Fig. 6), sin embargo, se observaba cómo entre los esbozos cartilagosos del tibiotarsus y tarsometatarsus existía tejido mesenquimatoso, denso en la zona central y más laxo en la periferia donde incluso se apreciaban pequeñas fisuras; también nos llamó la atención que en esta articulación se había iniciado la formación del sesamoideo tarsoplantar, antes incluso de que se formase la cavidad articular. Coincidimos con Barnett (1954), en la gran similitud que existía entre el tobillo de las aves y la rodilla humana. Por lo que respecta al desarrollo de las pequeñas articulaciones, sorprendía ver cuán atrasadas iban en comparación con la cadera o rodilla, hallándose todavía en el período de interzona estratificada (Fig. 7).

Tras el estudio de este día concreto, pudimos concluir que, tal como señalaba O'Rahilly (1978), la formación de las articulaciones se inician y se van desarrollando siguiendo un patrón próximo-distal.

En lo referente al calendario de aparición de las articulaciones de las patas, estamos completamente de acuerdo con Drachman y Sokoloff (1966) y especialmente con Mitrovic (1982), teniendo que disentir de los autores que señalan la aparición y formación de las cavidades articulares antes del 8º día de incubación (estado 34 de II-II). A este respecto, habría que preguntarse hasta qué punto influyen factores absolutos, como es el peso del huevo al incubarse, raza, ... o factores relativos como son las condiciones de incubación, manipulaciones del huevo, etc.

En el 11 día se apreció un gran aumento del porcentaje de tiempo en que existían fases de actividad, pasán

dose del 33,1% del día 10, a un 71,3% en el día 11 (Gráf. 8). Con la intensidad de los movimientos captados también ocurría lo mismo, y pasaban de 40-47 dB del día 10° a 44-54 dB en el día 11. Hamburger y Cols (1965), encontraban que en el día 11, el porcentaje de tiempo que ocupaban las fases de actividad del total de los 15 minutos del periodo de observación visual, era del 69%.

El estado de desarrollo articular de este día, puede resumirse diciendo que la cadera, al igual que la rodilla, estaba perfectamente cavitada, mientras que en el tobillo se apreciaban signos claros de fisuración y en las articulaciones de los dedos éstas eran aún incipientes.

Vale la pena señalar que hemos observado que el proceso de cavitación se iniciaba siempre en la periferia, por una o dos hendiduras (Fig. 6); éstas se iban expandiendo hasta que finalmente conflúan en la parte central de la interzona. En las articulaciones del tobillo y de los dedos, este hecho era más patente. Según Herickson y Cohen (1965), la cavitación de las articulaciones interfalángicas del embrión de pollo, puede empezar periféricamente o centralmente; Teixidor (1982), encuentra que la cavitación se inicia en el centro de la interzona, progresando hacia la periferia; Mitrovic describe el proceso contrario en las articulaciones interfalángicas, comienzan periféricamente y se expanden hacia el centro. Nuestras observaciones coinciden con este último autor, habiéndose apreciado no sólo a nivel de las articulaciones interfalángicas, sino también a nivel de las metatarsofalángicas, rodilla y tobillo. No obstante, donde mejor se observaban era a nivel de las articulaciones metatarsofalángicas e interfalángicas.

A partir del día 11 en la cadera, 11-12 en la rodilla, 12-13 en el tarso y 14-15 en las metatarsofalángicas

e interfalángicas, no se apreciaron grandes cambios en el desarrollo de las articulaciones, debiendo destacar únicamente el modelamiento de las superficies articulares a medida que iban aumentando los movimientos del embrión y entrando en funcionamiento las diferentes articulaciones.

El porcentaje del período de estudio que ocupaban las fases de actividad del embrión, iba en constante aumento (Gráf. 8), pasando de 71,3% en el día 11, a 84% en el día 12, 89,3% en el día 13, hasta alcanzar el máximo porcentaje en el día 14, en el que el embrión presentaba fases de actividad durante el 90,7% del período de registro. A partir de este día, y hasta el día 18°, este porcentaje se mantenía más o menos estable entre el 85% y 90% para, y de forma característica, ir descendiendo durante los días 19 y 20, en los que ocupan el 60,3% y el 45,8% del total del período de registro.

Sorprendentemente, en las gráficas temporales o de movimiento en tiempo real de los días 19 y 20 de incubación, se evidenciaba claramente un cambio en el patrón hasta ahora presentado; en la gráfica 7, correspondiente a uno de estos días, se pueden ver coexistiendo una serie de pequeñas señales similares unas a otras, y de una frecuencia de 60 u 80 ciclos por minuto, según el registro, con algunos picos muy esporádicos y correspondientes a movimientos del embrión de gran intensidad, que a veces se agrupan formando cortas fases de actividad.

¿Cómo se interpretan estos datos?.

Hamburger (1963, 1968 1 y 2, 1969), Hamburger y Cols. (1965) y Decker y Cols. (1967) ya habían observado por visualización directa del embrión a través de una ventana practicada en el cascarón, que en el día 17 de incubación se producía un cambio en el tipo de movimientos que, hasta entonces, se habían manifestado en forma

de sacudidas más o menos bruscas, de poca amplitud y periódicas, alternando fases de actividad con fases de reposo. Según refieren estos autores, hasta el día 17 no existe coordinación entre las diferentes partes del cuerpo que se mueven. En el día 17, sin embargo, son más esporádicos y menos rápidos, presentando además coordinación entre las diferentes partes del cuerpo que se mueven.

Para estos autores, este último tipo de movimientos denota control por el sistema nervioso central en maduración, y los denominan movimientos preeclusión. Estos han sido estudiados especialmente por psicofisiólogos interesados en la formación de los patrones del comportamiento.

Según Hamburger (1968, 2), el tipo de movimientos fortuitos bruscos, en forma de periódicas sacudidas irregulares, son debidos a descargas generadas espontáneamente en las neuronas de la médula espinal; a medida que va madurando el sistema nervioso, el cerebro transmitiría estímulos a la médula, influyendo en el inicio de los movimientos coordinados y organizados.

Coincidimos con Hamburger (1968,1) y Drachman y Sokoloff (1966), en que este tipo de movimientos en forma de sacudidas, ocurren cronológicamente en el período que tiene lugar el desarrollo articular. Nosotros, además, hemos apreciado una clara relación entre las fechas en que aumenta más la actividad del embrión, y los días en que se observa el modelamiento de las superficies articulares de la cadera, rodilla y tarso (días 11 a 14 ó 15 de incubación).

También hemos observado, como queda patente en la gráfica 7, este cambio en el tipo de movimientos del embrión. Según Hamburger y Oppenheim (1967), esto ocurre en el día 17-18. Nosotros lo hemos observado en el día

19. Esta discrepancia en la fecha no nos sorprende. En la gráfica 9, se representan comparativamente los valores y evolución del promedio de los porcentajes que las fases de actividad ocupaban de los 15 minutos que duraba el período de observación visual directa, obtenidos por Hamburger y Cols. (1965), o de registro, obtenido por nosotros; la similitud en la forma del trazado es evidente. Hay que destacar la existencia de un desfase de un día entre los datos obtenidos por Hamburger y los nuestros.

¿A qué se debe esta discordancia en las fechas?.

Tenemos que tener en cuenta, a la hora de tratar de explicar estas diferencias, que las condiciones en que se desarrollaron los embriones no eran las mismas. Hasta el momento, la objetivación de los movimientos embrionarios o, en el caso de que se pretendiese paralizar al embrión, el grado de inmovilización conseguido, se ha efectuado por medio de control visual directo. Para ello, se requiere la apertura de una ventana en el punto más proclive del huevo. Con el objeto de no lesionar el disco embrionario, hay que hacer descender el saco vitelino; esto se logra mediante la extracción de 2 cc. de albumen por el polo agudo (técnica de Wolff), o efectuando un pequeño orificio en el cascarón del polo obtuso y depleccionando la cámara de aire (Mitrovic, 1982). Estas maniobras perturban de alguna manera el desarrollo del embrión (aumento o descenso de la temperatura intraovo, alteraciones de la superficie calcárea de intercambio gaseoso, etc.). La metodología empleada por nosotros elude todos estos factores relativos de distorsión.

Quedan por comentar los pequeños picos que hemos observado en las gráficas temporales de los días 19° y 20° (Gráf. 7). Pensamos que podrían ser expresión del inicio de los movimientos respiratorios del embrión, pues coinciden con estos, tanto en la fecha de aparición como en la frecuencia que presentan. Según Romanoff (1960),

Rahn (1979), Ribera (1980), en el día 19 el embrión pica la membrana de la cámara de aire e inicia la verdadera respiración pulmonar. La frecuencia de los movimientos respiratorios es, según Romanoff, de 70 a 90 por minuto; ésta se registró insertando un tubo de plástico en la cámara aérea, estando conectado por el otro extremo a un Kimógrafo. Nosotros registramos una frecuencia de 60 a 80 ciclos por minuto.

En la gráfica 10, del promedio de los valores de la frecuencia cardíaca obtenidos por nosotros, ésta aumentaba desde 217 pulsaciones por minuto en el día 5° de incubación, a 269 en el día 7°; desde este último día y hasta el 9° día de incubación, descendía a 258. El 11° día de incubación experimentaba un aumento a 287 pulsaciones por minuto para, a partir de entonces, ir descendiendo lentamente hasta los 263 ciclos/minuto del día 18. De forma característica, el 19° día de incubación se producía un brusco descenso de la frecuencia, hasta los 240 ciclos/minuto. En el día de la eclosión, la frecuencia cardíaca volvía a situarse sobre las 256 pulsaciones por minuto. Estos datos difieren de los indicados en la bibliografía, donde se cita como máximo 220 latidos por minuto en el 8° día de desarrollo, manteniéndose constante entre 190 a 200 latidos por minuto, durante el resto del desarrollo (Romanoff, 1960; Hamilton, 1952). La discordancia entre estos valores se explica en base a que la frecuencia cardíaca del embrión de pollo está en función directa de la temperatura a la que éste se encuentra sometido.

Pudimos registrar grandes variaciones de la frecuencia cardíaca del embrión, en relación con las variaciones de temperatura y tiempo en que a ella se exponía.

La determinación de la frecuencia cardíaca se ha llevado a cabo o bien a través de observación visual directa, o de filmaciones, o más recientemente, a través

de la aplicación de microelectrodos (Romanoff,1960; Ruckman y Cols., 1981). Todas estas técnicas requieren apertura del huevo, alterándose el medio natural del embrión. Con nuestra metodología, todo esto se obvia; creemos pues, que el analizador de Fourier puede ser muy útil en la investigación de la función cardíaca del embrión de pollo, pues permite determinar de forma precisa, sencilla y rápida, la frecuencia e intensidad relativa de los latidos cardíacos, bajo condiciones de absoluta normalidad.

Querríamos resaltar que la finalidad de obtener gráficos de normalidad, de frecuencia e intensidad, de los diversos tipos de movimientos embrionarios, sería servir de base y/o referencia a posteriores estudios y ofrecer un patrón de homogeneidad. Esto es importante, porque en los últimos tiempos, se ha pasado a prestar más importancia a los estudios dinámicos de los diferentes sistemas y aparatos constituyentes de un embrión normal, por permitirlo los medios técnicos, frente a los ya clásicos estudios de tipo únicamente morfológico.

C O N C L U S I O N E S

En la presente Tesis Doctoral, tras analizar de forma individual y en conjunto los datos obtenidos en las series de registros gráficos realizados, y estudiar detenidamente los cortes histológicos articulares, llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1) Hasta el 6° día de incubación (estadio 28-29 de H-H), los movimientos corporales que presenta el embrión de pollo son de bajísima frecuencia (<1 Hz.) e intensidad (<25-30 dB). Durante el 7° día (estadio 31-32 de H-H), se registran los primeros movimientos esporádicos, un promedio de 9 cada 15 minutos, y de poca intensidad (entre 36 y 42 dB).
- 2) A partir del 8° día de incubación (estadio 34 de H-H), se registran movimientos corporales del embrión más frecuentes e intensos (entre 40-46 dB). Es el primer día en que se aprecian movimientos formando fases de actividad intercaladas con fases de reposo. La duración de las fases de actividad es del 1% de los 15 minutos que dura el periodo de registro.
- 3) Desde el 8° y hasta el 18° día de incubación, el embrión mantiene el mismo patrón de movimientos, alternando fases de actividad y fases de reposo, sin presentar ritmo manifiesto.
- 4) El porcentaje de tiempo empleado por el embrión en fases de actividad va en aumento hasta alcanzarse el día 14° de incubación, en el que ocu

pa el 90,7%. Se mantiene un nivel entre 90,7% y 85,7% hasta el día 18, inclusive.

- 5) El aumento progresivo a partir del 8° día del porcentaje de tiempo empleado en fases de actividad, medido en las gráficas temporales, coincide con el período de inicio y formación de la cavitación de las grandes articulaciones.
- 6) El proceso de cavitación lo hemos observado siempre iniciándose en la periferia de la articulación, para posteriormente expandirse y confluir en la parte central de ella.
- 7) El proceso de cavitación articular, se inicia en la cadera, al final del 8° día o comienzo del 9° (estadio 34-35 de H-H), en el 9° día (estadio 35 de H-H) en la rodilla y en el 10°-11° día (estadio 36-37 de H-H) en el tobillo.
- 8) El proceso de cavitación de las articulaciones de los dedos se inicia en el 11° día (estadio 37 de H-H) en las metatarsofalángicas y en el 12°-13° día (estadio 38-39 de H-H) en las interfalángicas.
- 9) La formación de las articulaciones, se inicia y va desarrollando siguiendo un patrón o secuencia próximo-distal.
- 10) A partir del 11° día en la cadera, 11°-12° en la rodilla, 12°-13° en el tobillo y 15° en las metatarso e interfalángicas, se puede dar por finalizado el proceso de desarrollo.
- 11) Posteriormente a estas fechas, las superficies articulares únicamente se modelan y hacen congruentes, coincidiendo con el aumento, en inten-

sidad y frecuencia, de los movimientos embrionarios registrados.

- 12) La finalización de la cavitación no implica un cambio de patrón de movimientos. Se mantiene el mismo tipo hasta el 18° día de incubación.
- 13) El 19° día y 20° día, período de preeclusión, se invierte el porcentaje de duración de las fases de actividad y reposo, captándose esporádicas señales de gran intensidad.
- 14) La intensidad de los movimientos embrionarios va progresivamente en aumento desde el 7° día (42 a 48 dB) hasta el 20° día inclusive (70-88 dB).
- 15) En condiciones basales, la frecuencia cardíaca del embrión de pollo va aumentando progresivamente hasta el 11° día de incubación. A partir de entonces, desciende lentamente, hasta el 18° día, para, de forma característica, sufrir un descenso brusco el 19° día. En el día de la eclosión, se inicia la recuperación de la frecuencia a los valores normales del polluelo recién nacido.
- 16) En el 19° día se registran, en las gráficas temporales, una serie de pequeños picos, similares unos a otros, con una frecuencia de 60 a 80 ciclos por minuto, correspondientes a los movimientos respiratorios del embrión.

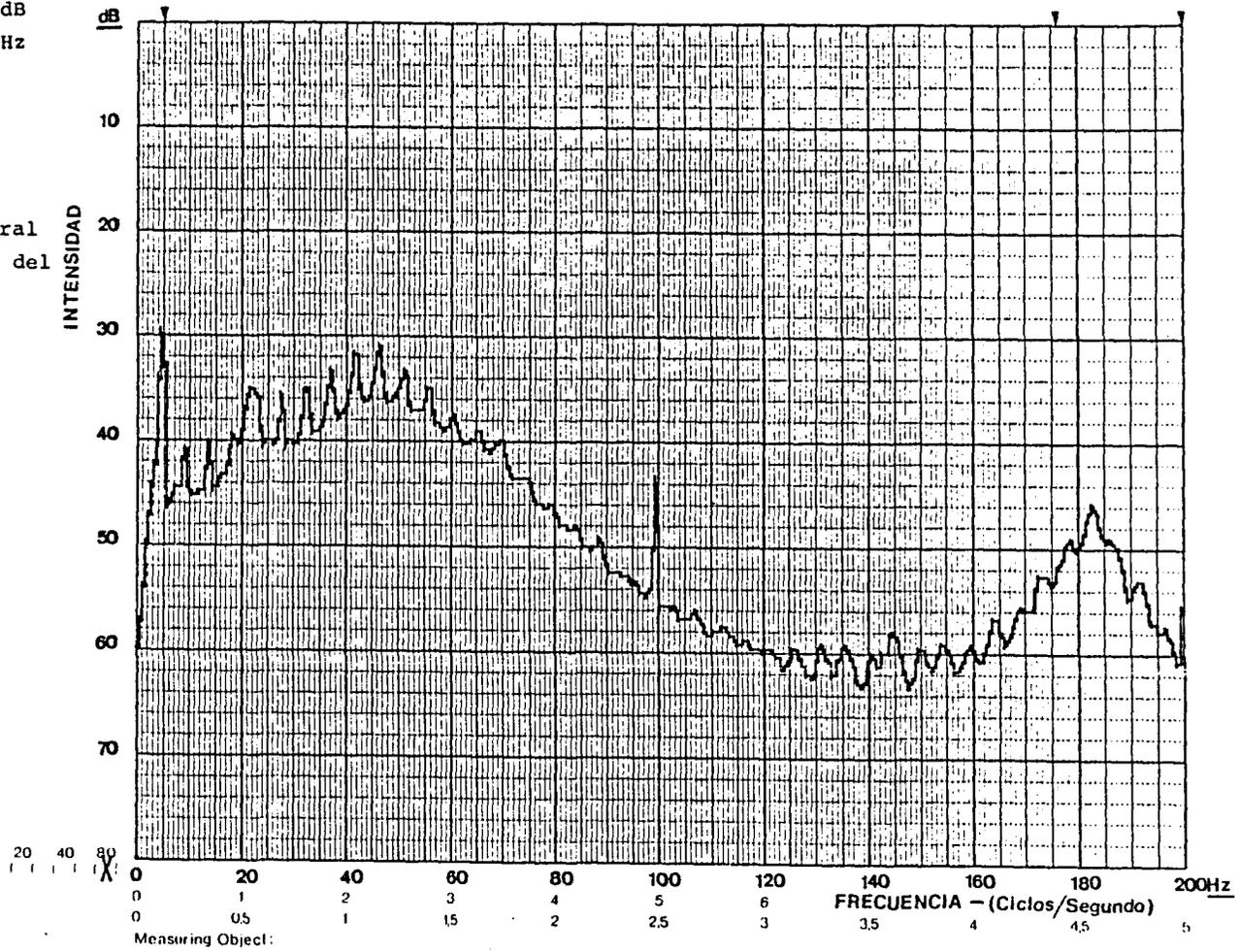
Bruel & Kjaer Time Function Start: seconds End: seconds Not Expanded Expanded

Full Scale Level 70 dB
 F. S Frequency 200 Hz
 Weighting
 Average Mode
 No of Spectra: 900
 Comments: N 27-7

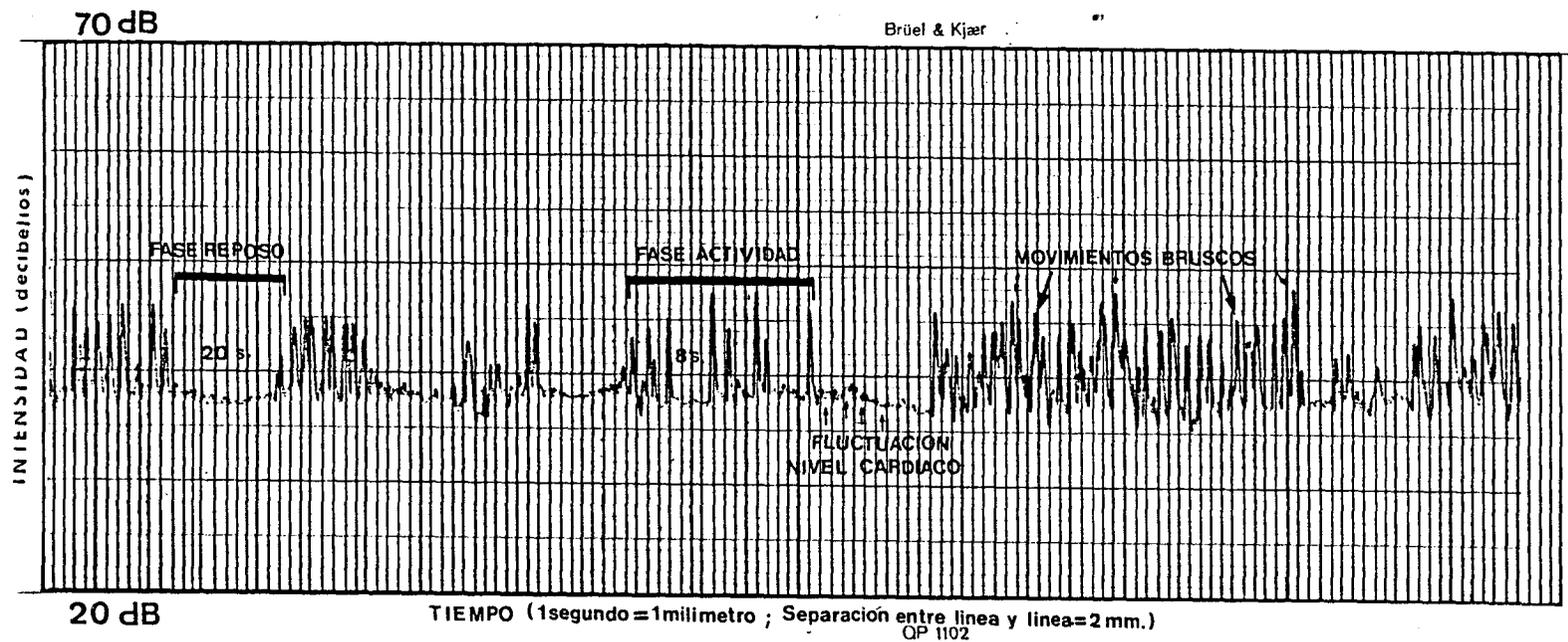
Promedio espectral
 de la actividad del
 embrión.

Gráf. 1

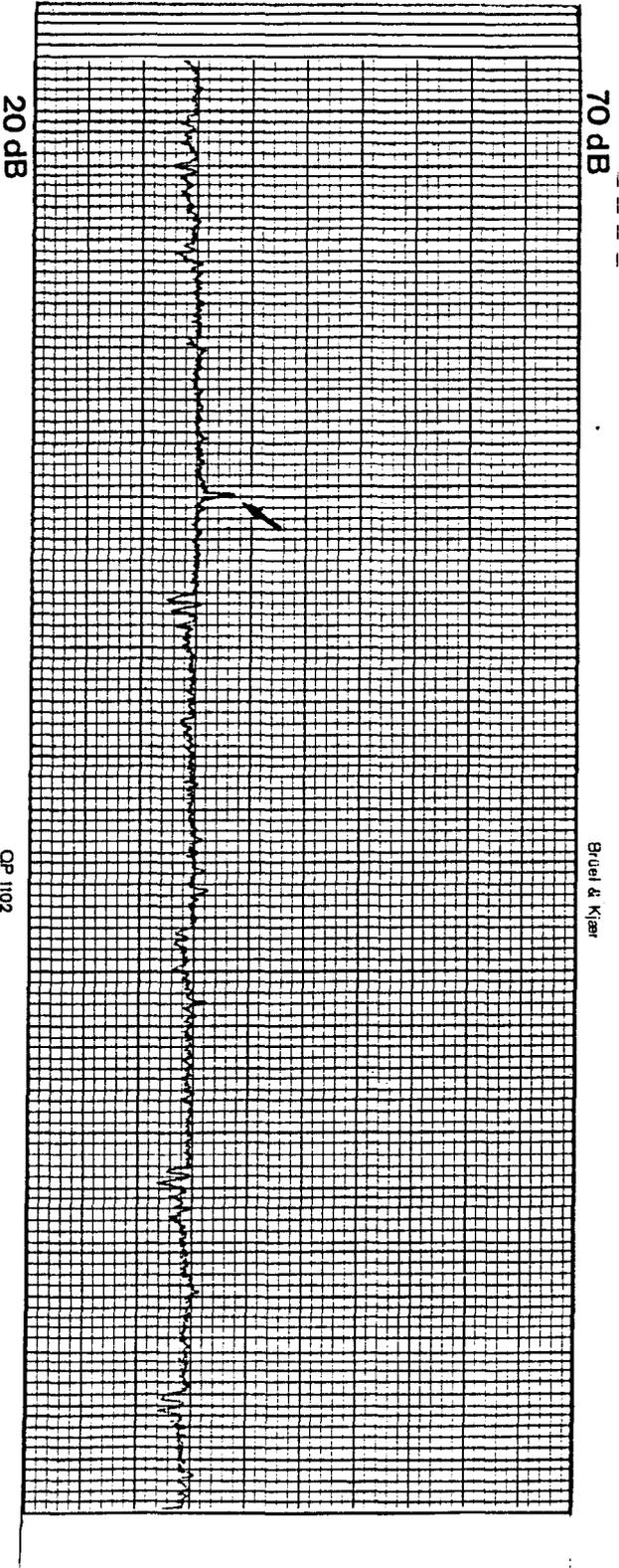
Record No.:
 Date:
 Sign:



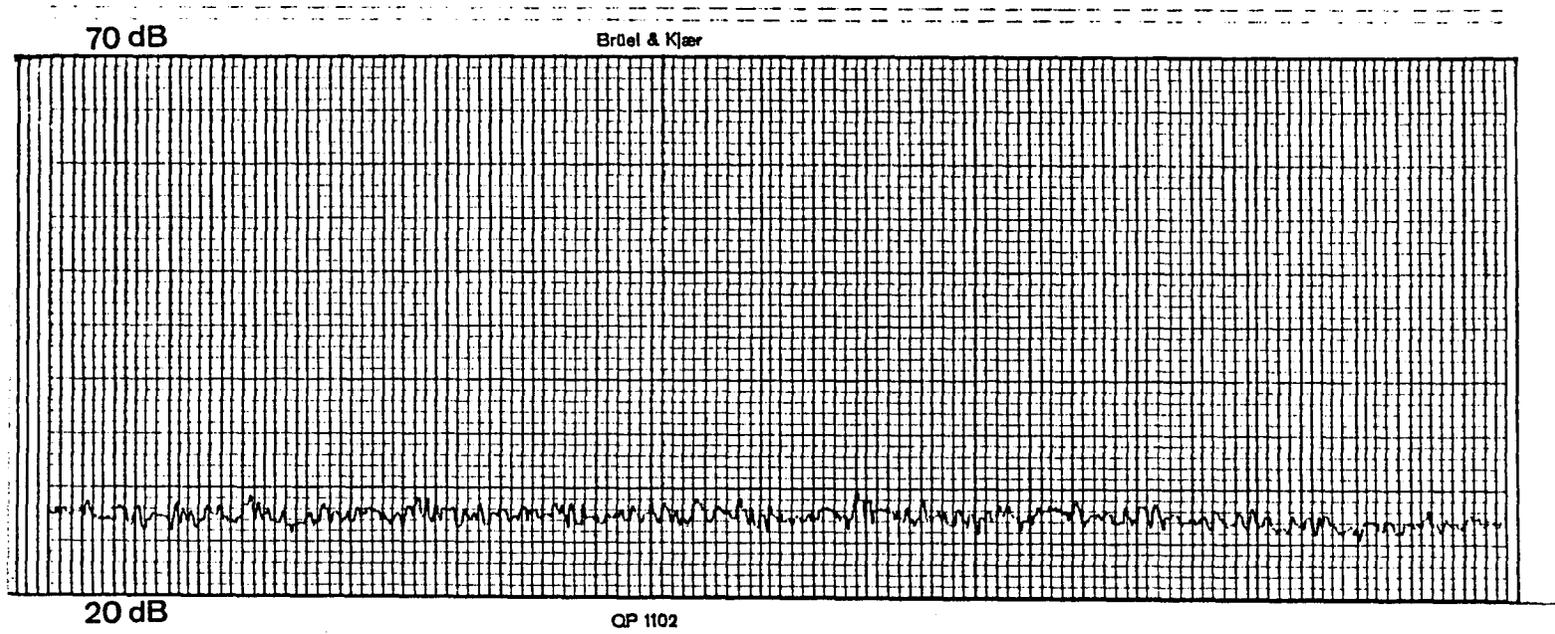
OP 1002



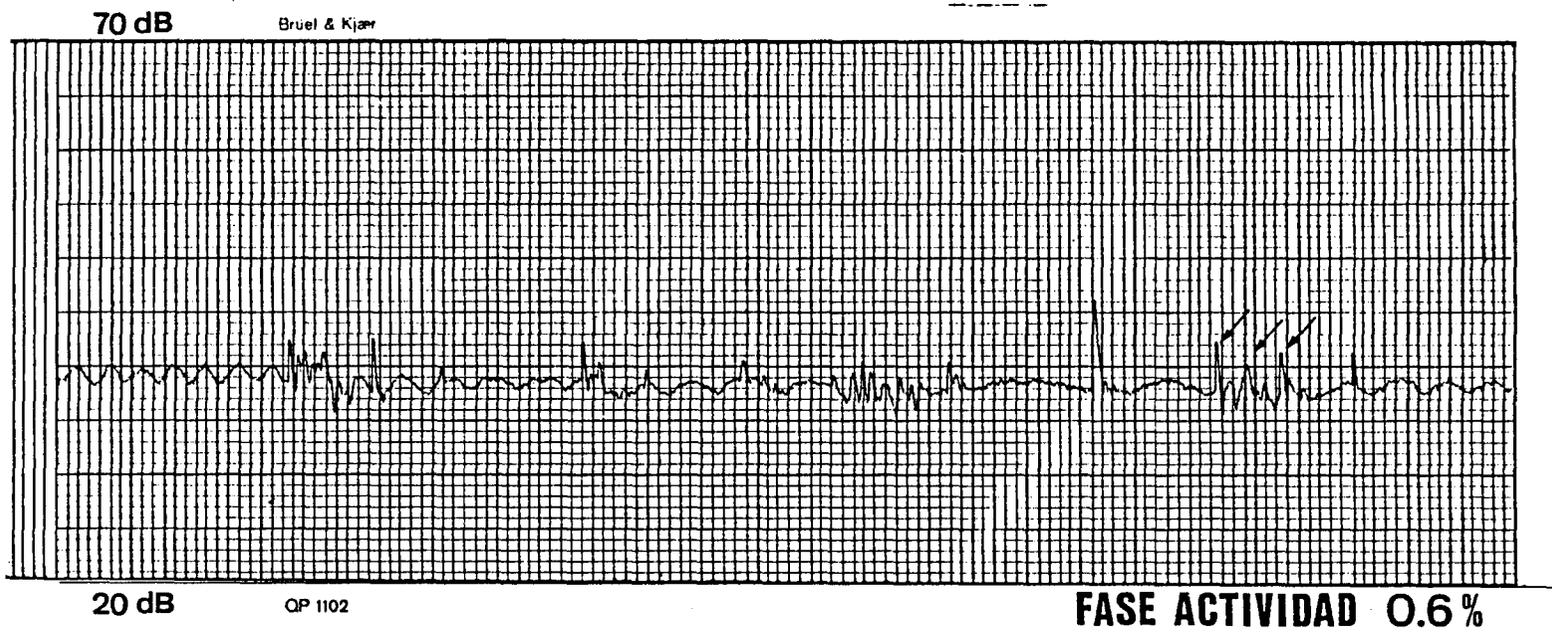
Gráfica 2 -. Representación temporal. Nivel de actividad del embrión N 27-7 a los 11 días de incubación. (Gráfica de movimiento en cada instante de tiempo real)



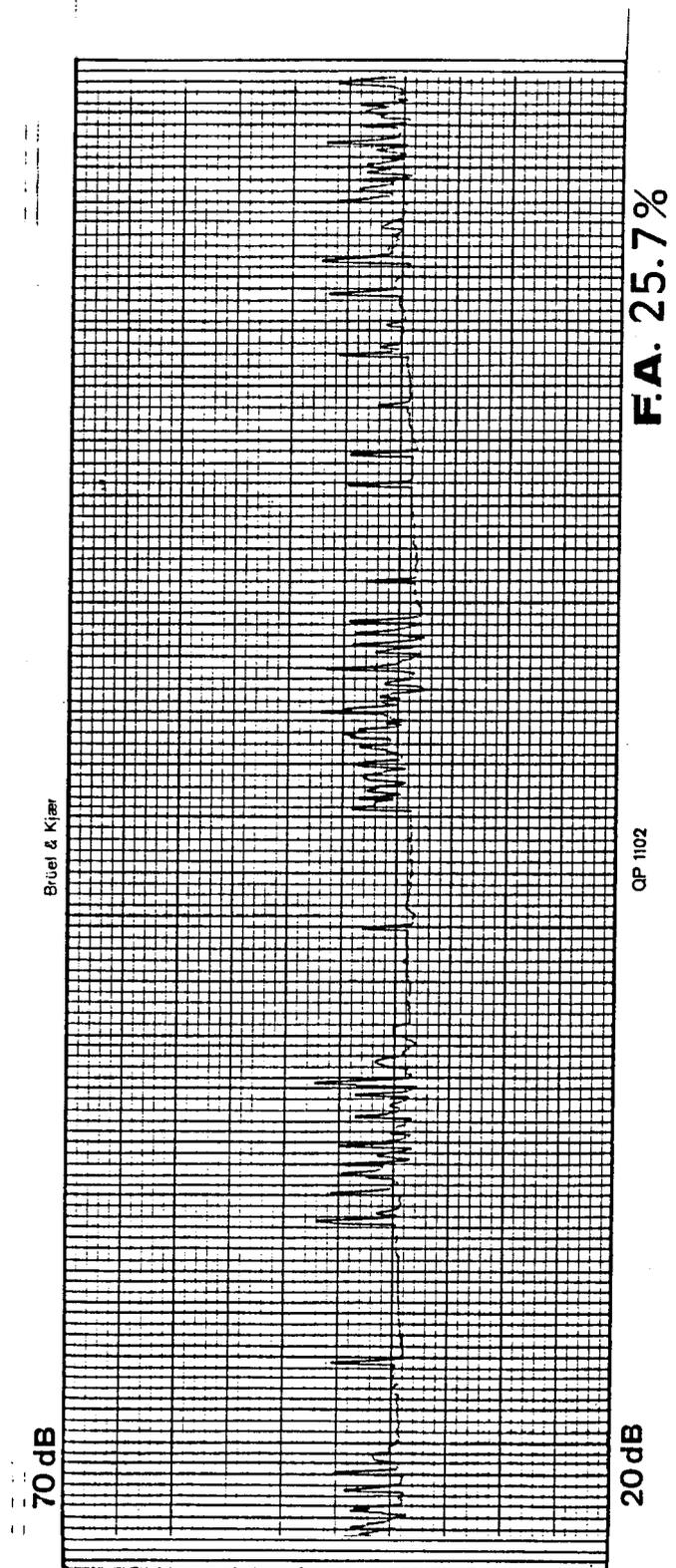
Gráfica 4 -- Nivel de actividad del embrión N 31-18 a los 7 días de incubación.



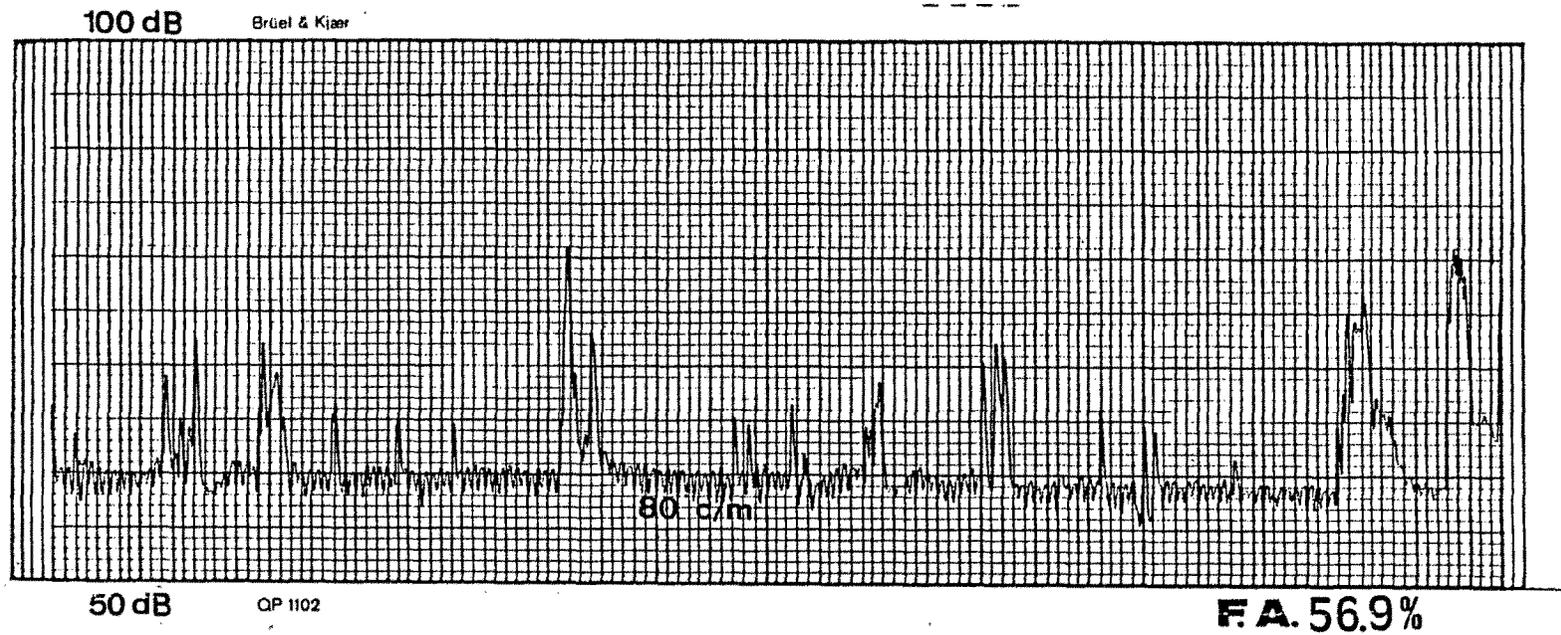
Gráfica 3 -. Nivel de actividad del embrión N 31-16 a los 6 días de incubación.



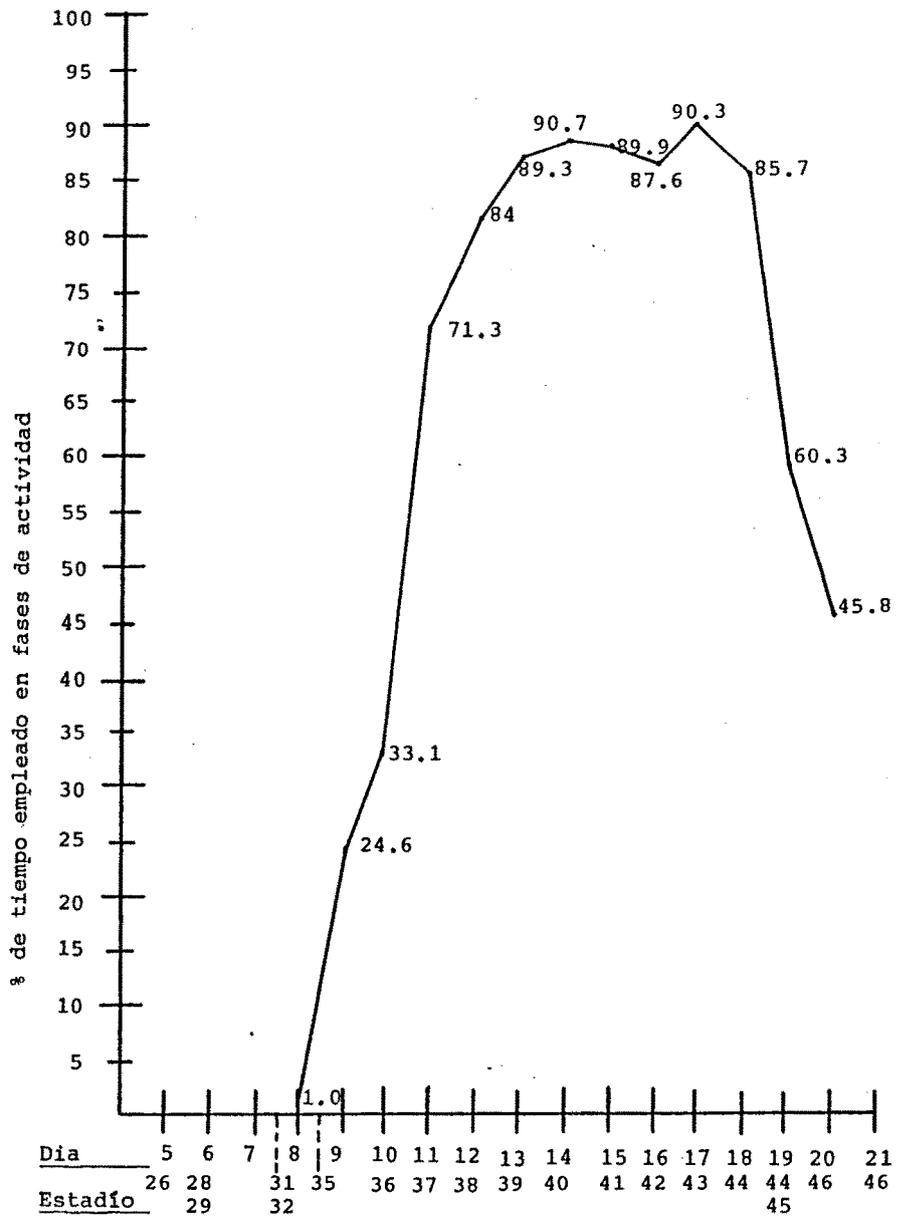
Gráfica 5 -. Nivel de actividad del embrión N 31-5 a los 8 días de incubación.



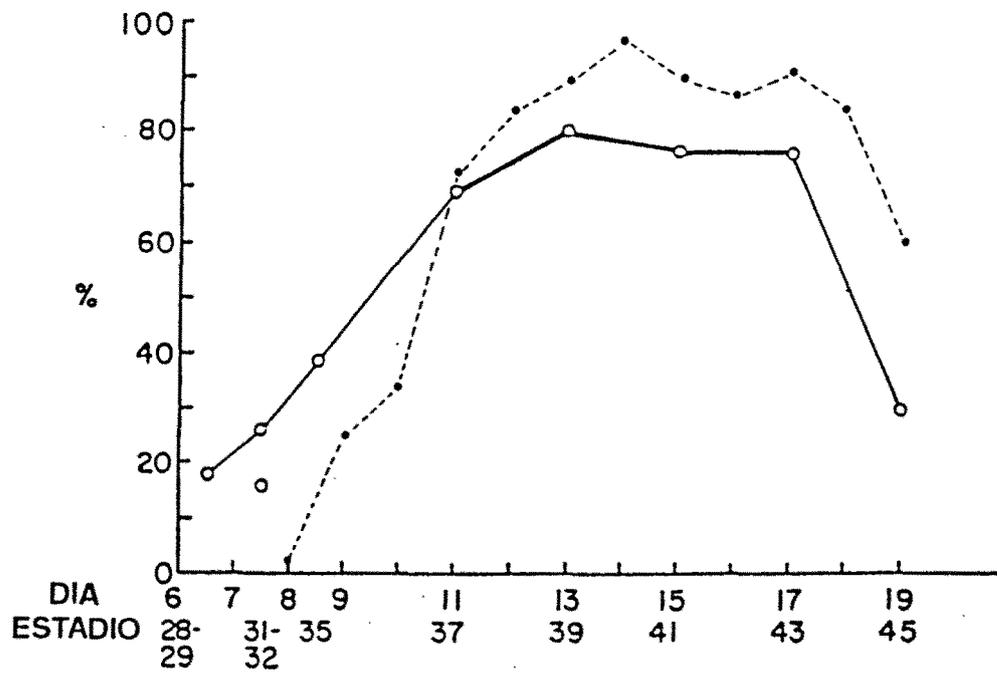
Gráfica 6 - Nivel de actividad del embrión N 31-6 a los 9 días de incubación.



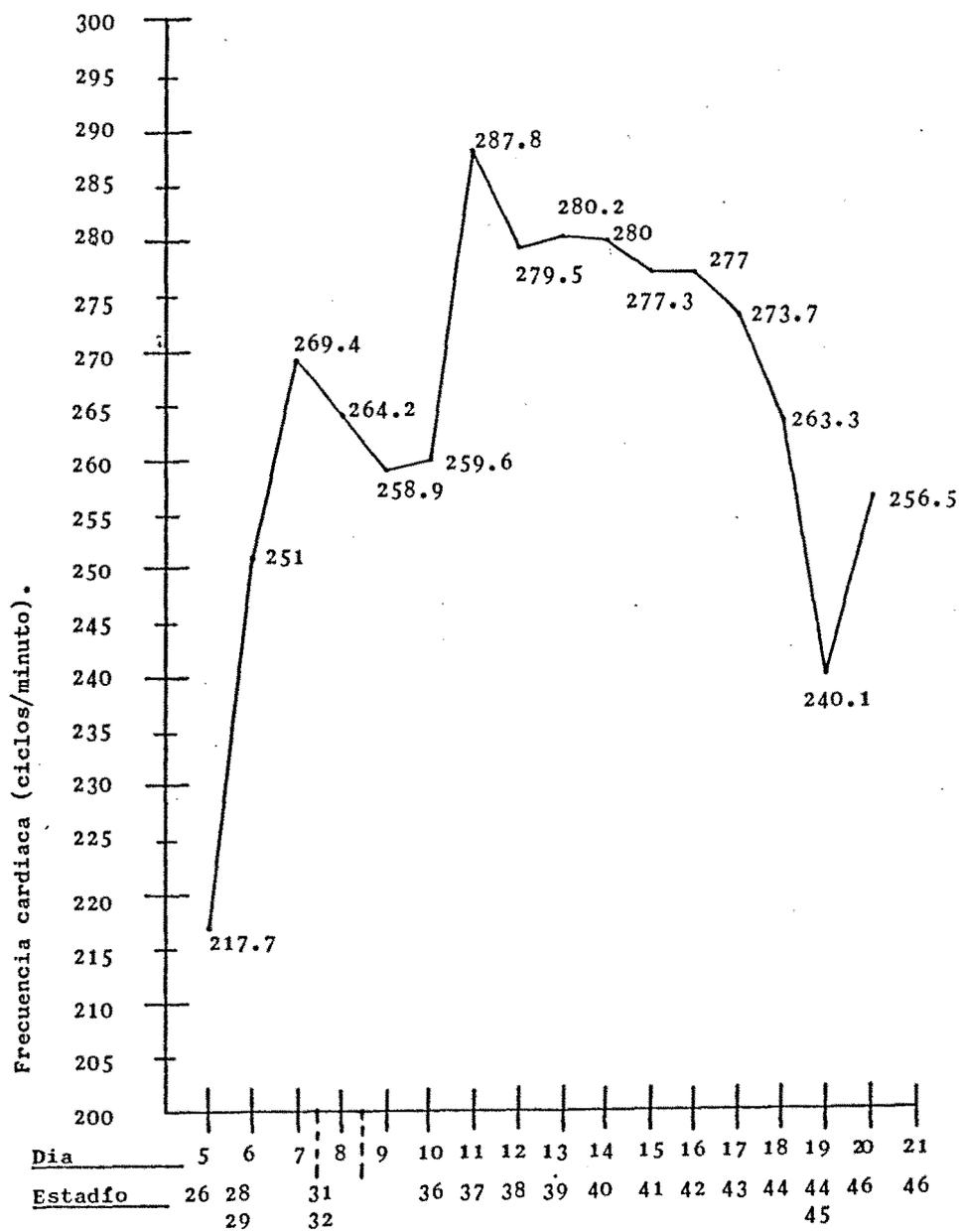
Gráfica 7 -. Nivel de actividad del embrión N 27-5 a los 19 días de incubación.



Gráf. 8 -. Evolución del porcentaje de tiempo empleado en fases de actividad por el embrión de pollo a lo largo de su desarrollo (promedio de 12 embriones).



Gráf. 9 -. Valores y evolución del promedio de los porcentajes que ocupan las fases de actividad de los 15 minutos que dura el periodo de estudio. En trazo continuo, datos obtenidos por Hamburger y Cols (1965) por visualización directa; trazo discontinuo, datos obtenidos por nosotros con las técnicas de registro de vibraciones.



Gráf. 10 -. Evolución de la frecuencia cardiaca del embrión de pollo a lo largo de su desarrollo (promedio de 12 embriones).

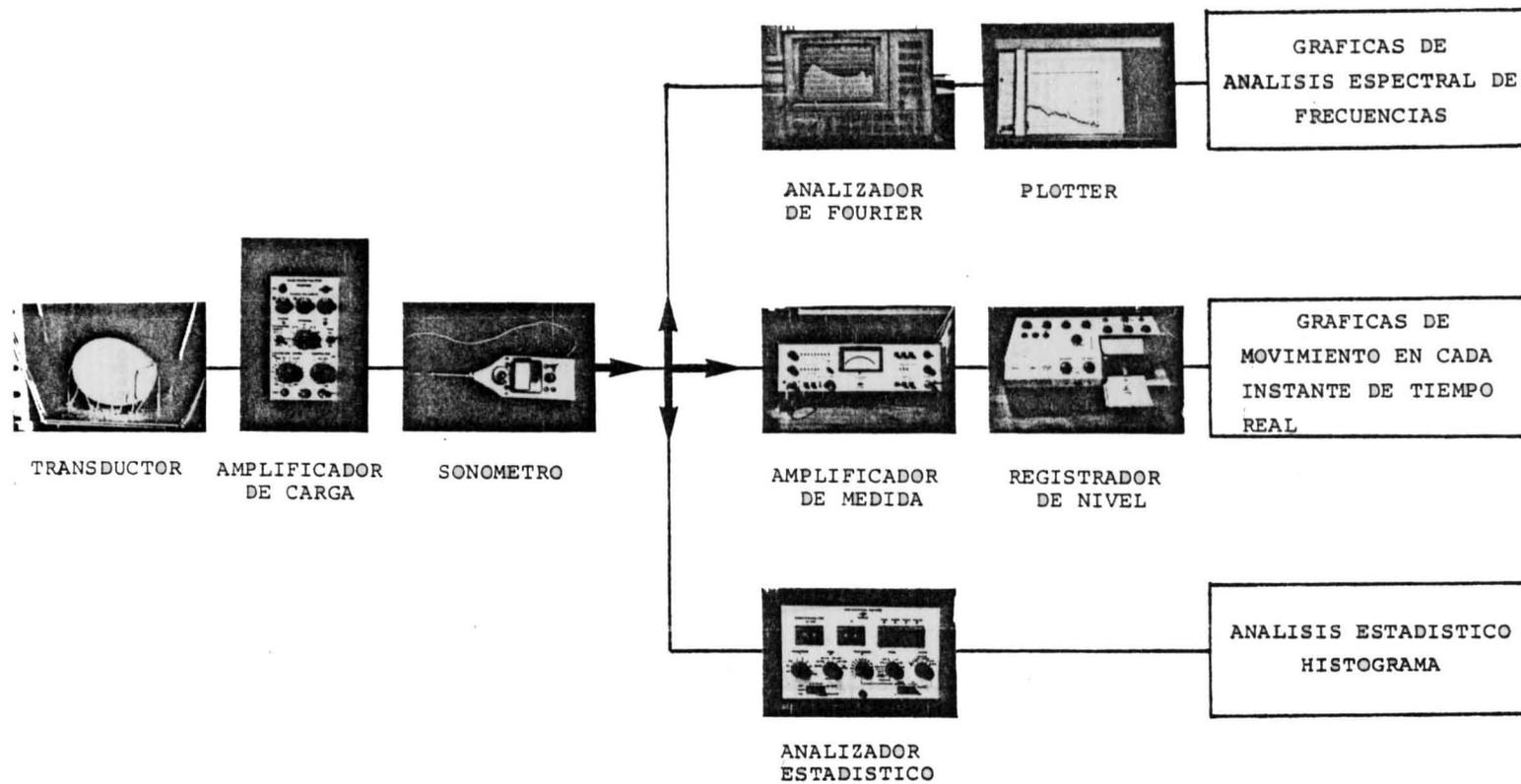


Fig.1 Cadena completa de medida.



Fig.2- Articulación de la cadera. Día 8º de incubación.

- 1-Cabeza femoral
- 2-Cótilo
- 3-Interzona articular
- 4-Ganglio raquideo
- 5-Ramas plexo sacro

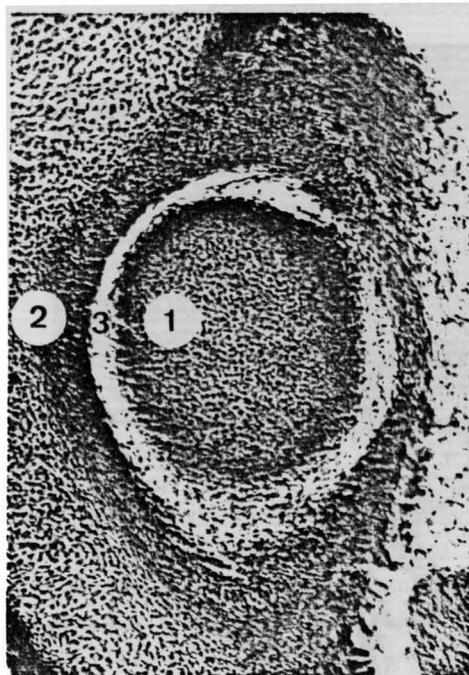


Fig.3- Articulación de la cadera. Día 9º de incubación.

- 1-Cabeza femoral
- 2-Cótilo
- 3-Cavidad articular

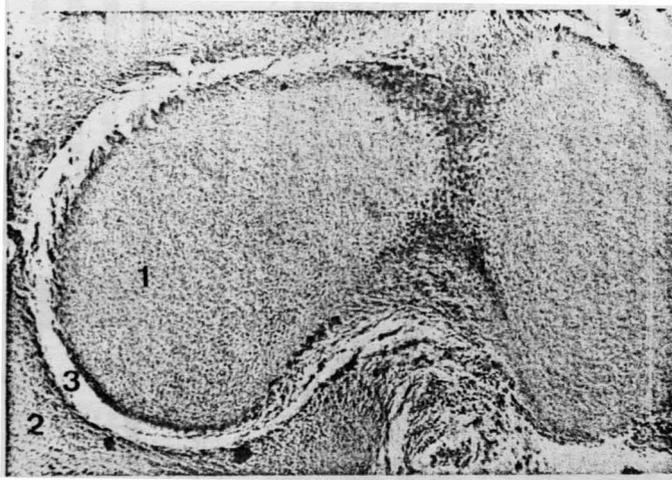


Fig.4- Corte sagital de la articulación de la cadera. Día 10º de incubación.

- 1-Cabeza femoral
- 2-Cótilo
- 3-Cavidad articular.

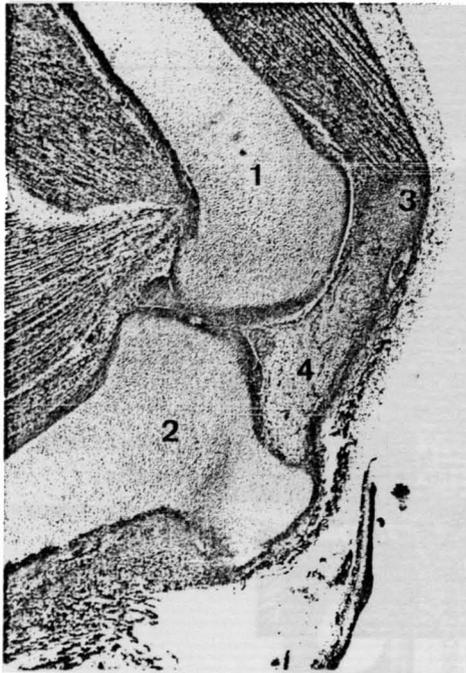


Fig.5- Corte sagital de la articulación de la rodilla. Día 10º de incubación.

- 1-Fémur
- 2-Tibia
- 3-Patela
- 4-Paquete adiposo infrapatelar

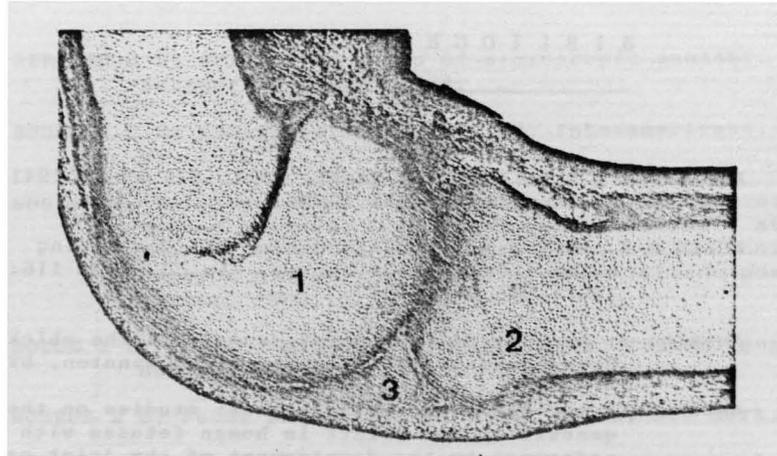


Fig.6- Corte sagital de la articulación del tobillo. Día 10º de incubación.

- 1-Tibiotarsus
- 2-Tarsometatarsus
- 3-Sesamoideo tarsoplantar

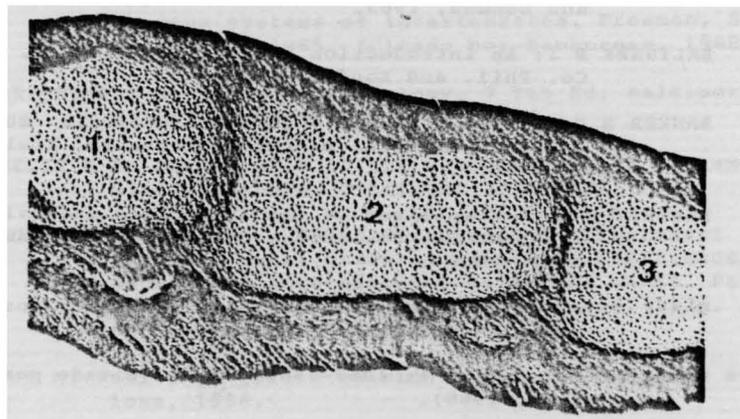


Fig.7- Corte sagital de las articulaciones interfalángicas. Día 10º de incubación.

- 1-Primera falange
- 2-Segunda falange
- 3-Tercera falange

B I B L I O G R A F I A .

- ALEXANDER R S, GLASE O: J Exptl. Zool. 87: 17-30, 1941. (Citado por Romanoff, 1960).
- ALLEN E R, PEPE R A: Ultrastructure of developing muscle cells in the chick embryo. Am. J. Anat 116: 115-148, 1965.
- AMPRINO R: Aspects of limb morphogenesis in the chicken. En Organogenesis. Holt, Rinehart and Winston, NY, 1965.
- ANDERSEN Y BRO-RASMUSEN. Histochemical studies on the histogenesis of the joints in human fetuses with special reference to the development of the joint cavities in the hand and foot. Am. J. Anat. 108: 111-122, 1961.
- ANGGÅRD L, BERGSTROEM R, BERNHARD D G: Analysis of prenatal spinal reflex activity in sheep. Acta Physiol. Scand. 53: 128-136, 1961.
- ARCHER CH W, HORNBRUCH A, WOLPERT L: Growth and morphogenesis of the fibula in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morph. 75: 101-116, 1983.
- AREY L B: Developmental anatomy. W.B. Saunders Co., Phil. and London, 1965.
- BALINSKY B I: An introduction to embryology. W. B. Saunders Co. Phil. and London, 1965.
- BANKER B Q, VICTOR M, ADAMS R D: Arthrogryposis multiplex due to congenital muscular dystrophy. Brain, 80: 319, 1957.
- BARNETT C H: A Comparison of the human knee and avian ankle. J. Anat. 88: 59, 1954. (Citado por Drachman y Sokoloff, 1966).
- BARRY A: J. Exptl. Zool 88: 1-15, 1941. (Citado por Romanoff, 1960).
- BARRY A: Circulation 1: 1362-1368, 1950. (Citado por Romanoff, 1960).
- BERANEK L L: Noise and vibration control. Mc. Graw-Hill Book Company, New York, 1971.
- BERGER C S, TRIGG P: The measurement of fetal movement using a strain-gauge transducer. IEEE Transactions on bio-medical engineering. Vol.28, 11: 788-789, 1981.

- BERGMAN R A, AFIFI A K: Atlas of microscopic anatomy. W.B. Saunders Company, 1974.
- BODEMER C W: Embrilogía moderna. Ed. Interamericana. México, 1972.
- BODIAN D: Development of fine structure of spinal cord in monkey fetuses. I. The motoneuron neuropic at the time of onset of reflex activity. Bull. Johns Hopkins Hosp. 119: 129-149, 1966. (Citado por Hamburger, 1968,1)
- BOGUE J Y: Exptl. Zool. 9: 351-358, 1932. (Citado por Romanoff, 1960).
- BOREUS L O: Fetal pharmacology. Raven Press. New York, 1973.
- BROWN L M, ROBSON M J, SHARRARD W J W: The pathophysiology of arthrogryposis multiplex congenita neurologica. J. Bone & Joint Surg. 62 A, 3: 291, 1980.
- BROWNE D: Congenital deformities of mechanical origin. Arch. Dis. Chil, 1954.
- BRUEL & KJAER: Vibration Testing. Denmark, 1983.
- BRUEL & KJAER: Medida de las vibraciones. Denmark, 1983.
- BULLOCK T H, HORRIDGE G A: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Freeman, San Francisco, 1965. (Citado por Hamburger, 1968).
- CARPENTER M B: Human neuroanatomy. 7 Tth Ed. Baltimore; Williams and Wilkins Co., 1976.
- CRELIN E S: Development of the musculoskeletal system. Clinical Symposia. Ciba, vol 33-1, 1981.
- CRUL J: Anestesia con Dehydrobenzperidol y Fentanest (Thalamonal) Panel primero: anestesia intravenosa. Mesa Redonda Internacional celebrada en St. Paul de Vence (Francia) del 26 a 28 de marzo, 1974. Instituto Farmacológico Latino, S. A.
- CRUZ M: Pediatría. Quinta edición. Editorial Espaxs. Barcelona, 1984.
- DAWES G S, VISSER G H A, GORMAN: Numerical analysis of the Human fetal heart-rate modulation by breathing and movement. Am. Jour. Obst & Gyn. Vol 140, 5: 535-544, 1981.
- DECKER J D: Motility of the turtle embryo. Chelyda Serpentina (Linné) Science, 157: 952-954, 1967.

- DRACHMAN D B, BANKER B: Arthrogryposis Multiplex Congenita. Case due to disease of the anterior horn cells. Arch. Neurol. 5: 89-105, 1961.
- DRACHMAN D B: Atrophy of skeletal muscle in chick embryos treated with botulinum toxin. Science, Vol 145, 719-721, 1964.
- DRACHMAN D B: Normal development and congenital malformation of joints. Bull. Rheum. Dis. 19: 536-540, 1969.
- DRACHMAN D B, COULOMBRE A J: Experimental clubfoot and arthrogryposis multiplex congenita. The Lancet, 1962.
- DRACHMAN D B, COULOMBRE A J: A method for infusion of fluids into the vascular compartment of the chick embryo. Science, 138: 144, 1962.
- DRACHMAN D B, SOKOLOFF L: The role of movements in embryonic joint development. Devel. Biol. 14: 401-420, 1966.
- DRACHMAN D B, WEINER L P, PRICE D L, CHASE J: Experimental Arthrogryposis caused by viral myopathy. Arch. Neurol. Chicago, 33: 362-367, 1976.
- DUBOUSSET J: Arthrogrypose. Encycl. Med Chir. Paris, Appareil Locomoteur, 15201 A 10-4.7.09.
- DUNN P M: Oligohydramnios due to premature rupture of the membranes and congenital deformities. J Bone & Joint Surg. 53 B: 50-54, 1971.
- EDWARDS D D, EDWARDS J J: Fetal movement: Development and time course. Science, 169: 95-97, 1970.
- FELL H B y CANTI R B: Experiments on the development in vitro of the avian knee joint. Proc. Roy. Soc. B 116: 316, 1934. (Citado por Romanoff, 1960).
- FERRE J C, HELARY J L, LUMINEAU J P, LEGOUX R: The application of modern engineering methods to anatomical research. Anatomia Clinica 4: 189-196, 1982.
- FISAS GRAUPERA J P: Variaciones de forma y posición de los huesos del tarso posterior durante el desarrollo embrionario. Su interés en el estudio de la patogenia del pie equinovaro congénito. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 1974.
- FISHER et al: Arthrogryposis multiple congenita: A clinical investigation. J. Pediatr. 76: 255-261, 1970.

- FLYN A M, KELLY J, MANSFIELD H, NEEDHAM P, O'CONNOR M, VIEGAS O: A Randomised controled trial of non - stress ante-partum cardiotocography. Br. J. Obstet. Gynaecol. 89: 427-33, 1982.
- FULLER D J: Immobilisation of fetal joints as a cause of progressive prenatal deformity. J. Bone and Joint Surg. 57 B: 115, 1975.
- GENIS GALVEZ J M: Biología del desarrollo. Ed. Espax. Barcelona, 1970.
- GIBSON D A, URS N D K: Arthrogryposis multiplex congénita. J. Bone and Joint. Surg. 52 B: 483-493, 1970.
- GOTTLIEB G, KUO Z Y: Development of behavior in the duck embryo. J. Comp. Physiol. Psychol. 59: 183-188, 1965.
- GRANT A, CHALMERS I: Randomised trial of fetal movement counting. Lancet, II: 501, 1982.
- GUELIN-SHEDRINA A: Comp. Rend. Soc. Biol. 121: 214-215, 1936. (Citado por Romanoff, 1960).
- HAM A W: Tratado de Histología. Séptima edición. Ed. Interamericana, 1975.
- HAMBURGER V: Some aspects of the embryology of behavior. Quart. Rev. Biol. 38: 342-365, 1963.
- HAMBURGER V: The beginning of co-ordinated movements in the chick embryo. Ciba Found. Sym. Growth Nervous System Litre Brown, Boston, Massachusetts, 1968, 1.
- HAMBURGER V: Emergence of nervous coordination. Originis of integrated behavior. Develop. Biol. Supplement 2: 251-271, 1968, 2.
- HAMBURGER Y WAUGH: The primary development of the skeleton in nerveless and poorly inervated limb transplants of chick embryos. Physiol. Zool. 13: 367, 1940.
- HAMBURGER V, HAMILTON H L: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. 88: 49, 1951.
- HAMBURGER V, BALABAN M, OPPENHEIM R, WENGER E: Periodic motility of normal and spinal chick embryos between 8 and 17 days of incubation- Jour. Exptl. Zool. 159: 1-14, 1965.
- HAMBURGER V, WENGER E, OPPENHEIM R: Motility in the chick embryo in the absence of sensory input. J. Exptl. Zool. 162: 133-160, 1966.

- HAMBURGER V, OPPENHEIM R: Prehatching motility and hatching behavior in the chick. J. Exptl. Zool. 166: 171-204, 1967.
- HAMBURGER V, BALABAN M: Observations and experiments of spontaneous rhythmical behavior in the chick embryo. Develop. Biol. 7: 533-545, 1968.
- HAMILTON H L: Lillie's. Development of the chick. Holt, Rinehart and Winston. New York. 1965.
- HAMILTON W J, BOYD J D, MOSSMAN H W: "Articulaciones" en Embriología Humana. Ed. Inter- Médica. Buenos Aires, 1964.
- HENRIKSON R C, COHEN A S: Light and electron microscopic observations of the developing chick interphalangeal joint. J. Ultrastruct. Res. 13: 129-162, 1965.
- HINCHLIFFE J R, THOROGOOD P V: Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid³ (ta³) mutant chick embryos. J. Embryol. Morphol. 31: 747-760, 1974.
- HOLDER N: An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. J. Embryol. Exp. Morph. 39: 111-127, 1977.
- HOUILLON C: Embriología. Ed Omega. Barcelona, 1975.
- HUGHES A F W: J. Exptl. Zool. 19: 232-237, 1942. (Citado por Romanoff, 1960).
- IONASESCU V, ZELLWEG H, FILER L J: Increased collagen synthesis in arthrogryposis multiplex congenita. Arch Neurol. 23: 128, 1970.
- JAGO R M: Arthrogryposis following treatment of maternal tetanus with muscle relaxants. Arch. Dis. Child. 45: 227, 1970.
- KÄLLEN B: Early morphogenesis and pattern formation in the central nervous system in "Organogénesis" (R. L. De Haan and Ursprung, H, Eds.), 107-128, 1965.
- KASAI T, OKI T, OSUGA T, NOGAMI H: Familial Arthrogryposis with distal involvement of the limbs. Clin. Orthop. And. Rec. Res. 166: 182-184, 1982.
- KUO Z Y: Exptl. Zool. 61: 395-430, 1932. (Citado por Romanoff, 1960).

- KUO Z Y: Ontogeny of embryonic behavior in aves. XII. Stages in the development of physiological activities in the chick embryo. *Am. J. Psychol.* 51: 361-379. 1938. (Citado por Drachman y Sokoloff, 1966)
- LAFITA F, MATA H: Vibraciones mecánicas en ingeniería. . . I. N. T. A. Madrid, 1964.
- LAMOREUX W F, HUTT F B: *Poultry Sci.* 18: 70-75, 1939. (Citado por Romanoff, 1960).
- LANGMAN J: Medical embryology. William and Wilkins Co. Baltimore, 1975.
- LEBENTHAL E, SHOCHET S B, ADAM A, et al: Arthrogryposis multiplex congenita: 23 cases in an Arab Kindred. *Pediatrics* 46: 891-899, 1970.
- LLOYD-ROBERTS G C, LETTIN A W F: Arthrogryposis multiplex congenita. *J. Bone & Joint Surg.* 52 B: 3, 1970.
- MAILLET M: Histología e histofisiología humanas. Tejidos de sostén. Ed. AC, 1980.
- MARSA J: Contribución al estudio de los factores que intervienen en la conformación y evolución del molde cartilaginoso de las extremidades. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1980.
- MEAD N G, LITHGOW W C: Arthrogryposis multiplex congenita. *J. Bone & Joint Surg.* 40 A: 1285, 1958.
- MICHELSON M J, ZEIMAL EV: Acetylcholine: an approach to the molecular mechanism of action. 187-201. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall, Oxford, 1973.
- MINKOWSKI M: Reflexes et mouvements de la tête, du tronc et des extrémités, du foetus humain, pendant la première moitié de la grossesse. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 83: 1202, 1920 (Citado por Drachman y Sokoloff, 1966).
- MITROVIC D: Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo. Morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am. J. Anat.* 150: 333-348, 1977.
- MITROVIC D: Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. *Am. J. Anat.* 151: 475-486, 1978.
- MITROVIC D: Development of the articular cavity in paralyzed chick embryos and in chick embryo limb buds cultured on chorioallantoic membranes. *Acta Anat.* 133: 313-324, 1982.

- MOFFET B C: The morphogenesis of joints. In organogenesis. Holt, Rinehart and Winston. New York, 1965.
- MORE K L: The developing human. W. B. Saunders Co. Philadelphia and London, 1973.
- MUMENTHALER M, ENGEL W K: Cytological location of cholinesterase in developing chick embryo muscle. Acta Anat. 47: 274-299, 1961.
- MURATORI G, FRANCESCHINI M: Sulla morfogenesi dell'articolazione dell'anca del pollo, con particolare riguardo alla struttura del mesenchima intermedio. Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Art. Cl. Sci. Mat. Nat. 104: 259-274, 1945. (Citado por Romanoff, 1960)
- MURATORI G, MUNARON G: Contributo istochimico allo studio dello sviluppo delle diartrose. Minerva Ortop. 6: 1-8, 1955.
- MURILLO-FERROL N L: Influencia de la extirpación de la capa calcárea del huevo de las aves sobre el desarrollo del embrión. An. Desarr. 15-36; 219-228, 1968.
- MURRAY P D F: An experimental study of the development of the limbs of the chick. Proc. Linnean Soc. 51: 187, 1926. (Citado por Nardi, 1976)
- NARDI J: Analisis experimental del desarrollo de las articulaciones. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1976.
- NATALE R, CLEWLOW F, DAWES G S: Measurement of fetal movements in the lamb utero. Am. J. Obstet. & Gynecol. 140: 545-551, 1981.
- NATHANIELSZ P W, YU H K, CABALUM T C: Effect of abolition of fetal movement on fetal intravascular PO₂ and incidence of tonic myometrial contractures in the pregnant ewe at 114 to 134 day's gestation. Am. J. Obstet. Gynecol. 144, 5: 674, 1982.
- NELDAM S: Fetal movements as an indicator of fetal well-being. Lancet, I: 1222-24, 1980.
- NELSON W E, WAUGHAN W C, M^{CD} KAY R J: Tratado de Pediatría. Sexta edición. Editorial Salvat. 1975.
- NISHIMURA H, OKAMOTO N: Sequential atlas of human congenital malformations. Igaku Shoin Ltd. Tokyo, 1976.
- OPPENHEIM R W: Amniotic contraction and embryonic motility in the chick embryo. Science, 152: 528-529, 1966.

- O'RAHILLY R, GARDNER E: The development of the knee joint of the chick and its correlation with embryonic staging. *J. Morphol*, 98: 49-87, 1956.
- O'RAHILLY R, GARDNER E, GRAY D J: The skeletal development of the foot. *Clin. Orthop.* 16: 7, 1960.
- O'RAHILLY R, GARDNER E: El desarrollo de las articulaciones en "Lecciones de Anatomía Humana" por Luis Gómez Oliveros. Vol 1. Editorial Marban. Madrid, 1964.
- O'RAHILLY R, GARDNER E: The embryology of movable joints. In "The joints and sinovial fluid". Sokoloff L. 1: 49-103, 491. Academic Press, N. Y, 1978.
- ORTS-LLORCA F: Anatomía Humana. Tomo I. Ed. Científico-Médica. Barcelona, 1970.
- PAI A C: Developmental genetics of a lethal mutation, muscular dysgenesis (mdg), in the mouse. II Developmental Analysis. *Dev. Biol.* 11: 93-109, 1965.
- PATRICK J, NATALE R: Fetal heart rate and fetal body movements. *Am. J. Obstr. Gynecol.* 144, 6: 741, 1982.
- PATTEN B M: *Anat. Record* 30: 53-60, 1925. (Citado por Romanoff, 1960).
- PATTEN B M: Early embryology of the chick. Fifth edition. Mc Graw-Hill, 1971.
- PEARSON J F, WEAVER J B: Fetal activity and fetal wellbeing: An evaluation. *Br. Med. J.* 1:1305, 1976.
- PHILIPS COMPANY: Piezoelectrics ceramics. Permanent magnet materials. Components and materials, part.16. Data Handbook, 1982.
- PIERCE M E: The amnion of the chick as an independent effector. *J. Exptl. Zool.* 65: 443-473, 1933. (Citado por Hamilton, 1965).
- POUS J G et cols: L'arthrogrypose pendant l'enfance. *Chir. Pediatr.* 22, 5: 289-364, 1981.
- PREYER W: *Specielle physiologie des embryo.* Leipzig: Griesen, 1885. (citado por Hamburger, 1968)
- RAHN H, AR A, PAGANELLI C: Cómo respiran los huevos de las aves. *Investigación y Ciencia*, 1979.
- REMOTTI E: *Boll. Mus. Lab. Zool. e Anat. Comp.* 12 (Nº 59) Univ. Genova, 1932. (Citado por Romanoff, 1960).

- RICHARDSON B, PATRICK J, NATALE R: Fetal heart rate and fetal body movements. Am. J. Obstet. Gynecol. 144: 741, 1982.
- RIBERA CANUDAS M V: Análisis experimental de las variaciones del equilibrio ácido-base del embrión de pollo a lo largo de su desarrollo. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1980.
- ROBERTS A B, LITTLE D, COOPER D, CAMPBELL S: Normal patterns of fetal activity in the third trimester. Br. J. Obstet. Gynecol. 86: 4, 1979.
- ROBERTSON et al: Human fetal movement: spontaneous oscillations near one cycle per minute. Science, 218: 1327, 1982.
- ROMANOFF A L, LAUFER H: The effect of injected thiourea on the development of some organs in the chick embryo. Endocrinology, 59: 611-619, 1956.
- ROMANOFF A L: The avian embryo. Mc Millan Co. New York, 1960.
- RUANO-GIL D: Algunos aspectos de la morfogénesis de los miembros. Discurso leído por el Académico Electo, el 11 de junio de 1.978 en el acto de su recepción. Real Academia de Medicina de Barcelona, 1978.
- RUANO GIL D, NARDI J, TEJEDO A: Influence of extrinsic factors in the development of the articular system. Acta Anatómica 101: 36, 1978.
- RUANO D, NARDI J, TEJEDO A: Influencia de los movimientos embrionarios en el desarrollo de las articulaciones. Rev. Quir. Española. Vol 6, nº 2: 84, 1979.
- RUBIN A: Arthrogyposis multiplex congénita. Handbook of congenital malformations. W.B. Saunders Company, 1967.
- SADOVSKY E, LAUFER N, ALLEN J W: The incidence of different types of fetal movements during pregnancy. Br. J. Obstet. Gynaecol. 86: 10, 1979.
- SAN GABRIEL A: Patología de la incubación y enfermedades del polluelo. Edit. Aedos. Barcelona, 1980.
- SAUNDERS J W: The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. J. Exp. Zool. 108: 363-403, 1948.
- SAUNDERS J W, GASSELING M T, SAUNDERS L C: Cellular death in morphogenesis of the avian wing. Develop. Biol. 5: 147, 1962.

- SAUNDERS J W: Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 193: 29-42, 1972.
- SEDLACEK J: Development of spontaneous motility in chick embryos. Interaction of reserpine and apomorphine. *Physiol. Bohemoslov.* 29: 21, 1980.
- SHARRARD W J W: Muscle paralysis in poliomyelitis. *Br. J. Surg.* 44: 471-780, 1957.
- SIGRIST G V M, KLEINEBECKEL D K E: An implantable myography electrode for recording muscle activity in freely moving small animals. A new technological approach. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering*, 29: 730-736, 1982.
- SISSONS H A: The growth of bone. Academic Press. New York and London, 1956.
- SMITH A, BRUTON J: Atlas a color de técnicas de coloración histológica. Year Book Medical Publishers, Inc. Londres, 1977.
- SOUTEYRAND-BOULENGER J D: Arthrologie en "Traite de Zoologie" de Pierre P. Grase. XVI, fascicule III. Ed. Masson et C^{ie} Editeurs, 1971.
- SPERRY R W: Embriogénesis of behavioral nerve nets. In "Organogenesis" (R. L. De Haan and H. Ursprung, Eds), 161-186, 1965.
- STELZNER D J, MARTIN A H, SCOTT G L: Early stages of synaptogenesis in the cervical spinal cord of the chick embryo. *Z. Zellforsch.* 138: 475-488, 1973.
- SUMNER-SMITH G: Bone in clinical orthopaedics. A study in comparative osteology. W. B. Saunders Company, 1982.
- SUSO VERGARA S: Efecto de la electrocoagulación selectiva del esbozo de los miembros del embrión de pollo, sobre el crecimiento de las extremidades. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1976.
- SWINYARD CH A: Concepts of multiple congenital contractures (arthrogryposis) in man and animals. *Teratology*, 25-2: 247-258, 1982.
- SZEKELY G: Development of limb movements: embryological, physiological and model studies. Ciba Found. Symp. Growth nervous system. Little Brown, Boston, Massachusetts, 1968.

- TEIXIDOR A: Influencia de la movilidad embrionaria en el desarrollo del sistema articular. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, 1982.
- TIMONER VIDAL J: Análisis experimental de la composición del líquido alantoideo en el embrión de pollo. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1983.
- TIMOR-TRITSCH I, ZADOR I, HERTZ R H, RUSEN M G: Classification of human fetal movement. An. J. Obstet. Gynecol. 126: 70, 1976.
- TIMOR-TRITSCH I E, DIERKER L J, ZADOR I, HERTZ R H, ROSEN M G: Fetal movements associated with fetal heart rate accelerations and decelerations. AM. J. Obstet. Gynecol. 131: 276, 1978.
- TIPLER P A: Física. Edit. Reverté, S. A. Vol.1, 1978.
- VIÑAS SALAS J: Valor clínico de la ecocardiografía abdominal. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1976.
- VISINTINI F, LEVI-MONTALCINI R: Relazione tra differenziazione strutturale o funzionale dei centri e delle vie nervose nell' embrione di pollo. Arch. Suisse Neurol. Psychiat 43: 1-45, 1939. (Citado por Hamburger y Balaban, 1963)
- WATTERSON R L: Structure and mitotic Behavior of the early neural tube. In "Organogénesis" (R. L. De Haan and Ursprung, H., Eds), 129-159, 1965.
- WATTERSON R L, SWEENEY R M: Laboratory studies of chick, pig and frog embryos. Burgess Publishing Company. Minnesota, 1973.
- WARKANY J: Congenital malformations. Year Book Medical Publishers Inc. Chicago, 1971.
- WILLIS R A: "The borderland of embryology and pathology". Ed. Butterworths, 1962.
- WINDLE W F, ORR D W: The development of behavior in chick embryos: Spinal cord structure correlate with early somatic motility. J. Comp. Neurol. 60: 287-307, 1934. (Citado por Hamburger y Balaban).
- WOLF E: Les bases de la teratogénèse expérimentale des vertébrés amniotes d'après les résultats de méthodes directes. Arch. Anat. Histolog. Embryol. 22:1, 1936.
- WYNNE-DAVIES R, LLOYD-ROBERTS G C: Arthrogyposis multiplex congenita: Search for prenatal factors in 66 sporadic cases. Arch. Dis. Child. 51: 618, 1976.

Dipòsit Legal B.: 43.512-1985
BARCELONA – 1985

publicacions
edicions
universitat
de barcelona

