

- 10) CUADRAS, C. M. (1982). *Problemas de probabilidad y estadística*. (4.ª Ed.) Ed. Eunibar. Barcelona.
- 11) CUMMING, I. A. (1979). Synchronization of ovulation. *Sheep Breeding*. (2.ª Ed.) Butterworth and Co Publister. London.
- 12) Departamento Técnico Lab. Intervet, S. A. *Chrono-gest Caprins* (Métode I.N.R.A.) B.P. 253-49002 Angers Codex (Francia).
- 13) DHINSA, D. S.; HOBERLAND, A. S. and METCALFE, J. (1969). Oestrus control in goats with cronolone sponges and PMSG. *J. Anim. Sci.* 29, 187-188.
- 14) DHINSA, D. S.; HOBERLAND, A. S. and METCALFE, J. (1971). Reproductive performance in goats treated with progestogen impregnated sponges and gonadotrophins. *J. Anim. Sci.* 32, 301-305.
- 15) FLETCHER, I. C. and LINDSAY, D. R. (1970). Effect of rams on the duration of oestrous behaviour in ewe. *J. Reprod. and Fert.* 25, 253-259.
- 16) FORREST, D. W.; FLEEGER, J. L.; LONG, C. R.; SORENSEN, A. M. y HARMS, P. G. (1980). *Biol. Reprod.* 22, 197-201. Citado por LOPEZ SEBASTIAN, A. (1985). Inhibición de la ovulación. Fallo ovulatorio. *Bovis.* 6, 25-34.
- 17) GALINDEZ, F. J.; PRUD'HON, M. and REBOULT, G. (1977). Reproductive performance of group synchronized Merinos d'Arles and Romanov cross bred ewes. A note on the effect of lactation on fecundity. *Animal Production* 24, 113-116.
- 18) HARESING, W.; McLEOD, B. J. and WEBSTER, G. M. (1983). Endocrine control of reproduction in the ewe. *Sheep Production*. Butterworth and Co (Publister). London.
- 19) LAHLOU-KASSI, A. (1980). Seasonal variation in oestrus and ovarian activity of two morrocan breeds: D'man and Thimhadite. *IX Congr. Inter. Reprod. and A. I.* Madrid. III, 186-189.
- 20) LINDSAY, D. R. (1979). Mating behaviour in sheep. *Sheep Breeding*. (2.ª Ed.) butterworth and Co (Publister). London.
- 21) LINDSEY, D. R.; COGNIE, Y.; PELLETIER, J. and SIGNORET, J. P. (1975). *Physiol Behav.* 15, 423-426. Citado por BON DURANT, R. H. et al. (1981). Photoperiod induction of fertile oestrus and changes in LH and progesterone concentrations in yearling dairy goats. *J. Reprod. Fert.* 63, 119.
- 22) LOPEZ SEBASTIAN, A. (1985). Inhibición de la ovulación. *Bovis.* 6, 25-33.
- 23) LOTHAR SACHS, (1978). *Estadística Aplicada*. Ed. Labor. Barcelona.
- 24) LYGSET, O. (1968). Studies of reproduction in goat. III. Functional activity of ovaries of the goat. *Acta Vet. Scand.* 9, 268-276.
- 25) McNATTY, K. P.; KATHERINE, B.; GIBB, M.; HUDSON, N. and THURLEY, D. C. (1982). Induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes with exogenous GnRH. *J. Reprod. Fert.* 64, 93-96.
- 26) MORROS, J. (1967). *Elementos de fisiología* (2.ª Ed.) Ed. Científico-Médica. Barcelona.
- 27) NALBANDOV, A. V. (1969). *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- 28) PARSON, S. D. and HUNTER, G. C. (1967). *J. Reprod. Fert.* 14, 61. Citado por LINDSAY, D. R. (1979). Mating behaviour in sheep. *Sheep Breeding*. Butterworth and Co (Publister). London.
- 29) PELLETIER, J. and THIMONIER, J. (1975). Interactions between ovarian steroids or progestagens and LH release. *Ann. Biol. anim. Biosch. Bioph.* 15, 131-146.
- 30) PEREZ Y PEREZ, F. (1969). *Fisiopatología de la Reproducción Animal*. Ed. Científico-Médica. Barcelona.
- 31) RESTALL, B. J. and RADFORD, H. M. (1974). The induction of reproductive activity in lactating ewes with gonatrophin-releasing hormone (GnRH). *J. Reprod. Fert.* 36, 475-476.

## ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y ESTRUCTURALES DE AGREGADOS DE CELULAS ENDODERMICAS EN EMBRION DE POLLO

Por C. García (1)

M. Arias (1)

J. M. Villar (1)

### INTRODUCCION

Las distintas propiedades de las células endodérmicas aisladas, han sido estudiadas en varias especies por distintos investigadores<sup>23, 15</sup>, observando que el comportamiento de extensión y locomoción celular «in vitro», es reflejo del comportamiento en el embrión. Sin embargo, no conocemos estudios que analicen los procesos de agregación en células endodérmicas.

Es conocido que las células embrionarias disociadas unas de otras, adquieren movilidad y pueden formar agregados<sup>3, 23, 24, 14</sup>. Los procesos de agregación «in vitro» a partir de células en suspensión, proporcionan importantes sistemas de cultivo para consideraciones de adhesión intercelular y comportamiento cooperativo, esenciales para la diferenciación celular típica<sup>22, 20, 14</sup>.

Por otra parte, la imagen tridimensional y de alta resolución que proporciona el microscopio electrónico de barrido, hacen de él un instrumento óptimo que permite la observación y análisis de las características de superficie de las células aisladas y agregadas. Dichas características pueden referirse a la conducta adhesiva, de extensión y locomoción<sup>24, 2, 4</sup>.

Teniendo en cuenta además, que el endodermo subyacente a las áreas cardiogénicas parece estar implicado en los movimientos activos de las células precardiacas<sup>5, 12</sup>, el propósito de este trabajo es realizar un estudio de las características morfológicas y estructurales que manifiestan los agregados, obtenidos a partir de células endodérmicas subyacentes a las áreas cardiogénicas.

(1) Dpto. de Biología Celular y Anatomía.

## MATERIAL Y METODOS

### *Cultivos celulares*

Se utilizan embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) de estadio 5 de H.H. <sup>11</sup>, procediéndose mediante microdissección a la recogida de fragmentos correspondientes a las áreas cardiogénicas. A continuación se someten los fragmentos a la acción enzimática de la colagenasa (0,03% en solución Tirode a 37°C. 70-80 min.) <sup>8, 9, 10, 13</sup>. Posteriormente se separa el endodermo bajo lupa estereoscópica y con la ayuda de una microaguja. A continuación se lavan en una mezcla de suero y Tirode para inactivar el enzima y finalmente en Tirode solo. Se realiza la disociación mediante un pipeteado suave y un conteo celular en una cámara Burkner.

### *Cultivos en medio líquido*

Las células endodérmicas se cultivan en medio de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino y 6% de Tc glutamina, al cual se le adicionan 100 U.I. de penicilina y 100 ug de estreptomycin por ml. de medio. La suspensión celular se prepara sembrando  $5-6 \times 10^6$  células/ml. de medio.

### *a.- Cultivos en monocapa*

Se realizan sobre cubres de plástico estériles en tubos Leighton con 1 ml. de medio. La duración de estos cultivos es de 24 h. a 37°C. Los cultivos obtenidos mediante esta técnica se fragmentan en cuatro partes para su procesado y posterior observación al microscopio electrónico de barrido.

### *b.- Cultivos en rotación continua*

Las células utilizadas para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión se cultivan en un ml. y medio y se incuban en un agitador orbital para conseguir la agregación celular. Se mantienen durante 24 h., a razón de 70 ciclos/min. a 37°C.

### *Cultivos en medio sólido*

Los agregados obtenidos en el cultivo anterior se someten a una segunda agregación en medio semisólido de Wolff y Haffen, consistente en siete partes de solución de Bacto-Agar al 1% en líquido de Gey, tres partes de solución Tirode y tres partes de extracto embrionario de pollo de nueve días. La duración de este cultivo es de cuatro días.

## MICROSCOPIA ELECTRONICA

### *a.- Microscopia electrónica de barrido*

Las muestras obtenidas de los cultivos en monocapa, se fijan en una solución de glutaraldehído al 1% en tampón fosfato (0,1 M y pH 7,4) a 37°C durante 1 h. La postfixación se realiza con  $O_3$  al 1% en tampón fosfato (0,1 M), durante 1 h. y a temperatura ambiente. Las muestras se deshidratan mediante series sucesivas de etanol, se sumergen en isoamilacetato y se desecan por el método del punto crítico en un desecador CPD 010 (Balzers), recubriéndolas seguidamente con una capa de oro paladio. Los cultivos fueron observados en un microscopio electrónico de barrido JEOL 35 C a 20 kv.

### *b.- Microscopia electrónica de transmisión*

Los agregados procedentes de los cultivos en medio sólido, se someten a una primera fijación durante 30 min. a 4°C, con glutaraldehído al 2% en 0,1 M buffer-fosfato a pH 7,4 y a una postfixación con tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón durante 1 h. a 4°C. Después de la deshidratación con alcoholes y óxido de propileno, las piezas se incluyen en Epon 812. Los cortes obtenidos se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinan en un microscopio electrónico JEOL 10 CX, operando a 60 kv.

## RESULTADOS

Los cultivos analizados al microscopio electrónico de barrido, demuestran la presencia de agregados a las 24 h. de cultivo, formados por el crecimiento y multiplicación de las células endodérmicas, las cuales, cuando están aisladas, presentan como característica principal su aspecto redondeado y escasa actividad protrusiva en su superficie.

Las células endodérmicas que pasan a formar parte de los agregados alteran sus características morfológicas modificando ligeramente su aspecto redondeado. Dichos agregados se localizan preferentemente en las zonas centrales de los cubres y en número de 4-6 por cultivo. Presentan un tamaño medio aproximado de 350-400 u de diámetro mayor y aunque su contorno es más o menos irregular, su aspecto es generalmente circular o ligeramente ovalado. (Fig. 1).

El análisis de las características celulares de superficie de estos agregados, pone de manifiesto la presencia de proyecciones celulares tipo filopodio y lamelipodio únicamente en los bordes libres de las células situadas en la periferia del agregado, si bien, no todos presentan este tipo de proyecciones. Solamente el 30% de los agregados observados mostraron proyecciones en superficie, siendo los filopodios más frecuentes que los lamelipodios. Estos filopodios se localizan tanto en el borde celular como en el borde libre de los lamelipodios. Sin embargo, estas proyecciones no se observan en los bordes celulares que forman parte del agregado. En estos casos se pueden observar claramente los límites de las células en la superficie del agregado, destacando asimismo, la presencia de numerosos contactos activos, representados principalmente por puentes intercitoplasmáticos, formados al unirse las células que previamente habían sido disociadas. (Fig. 2).

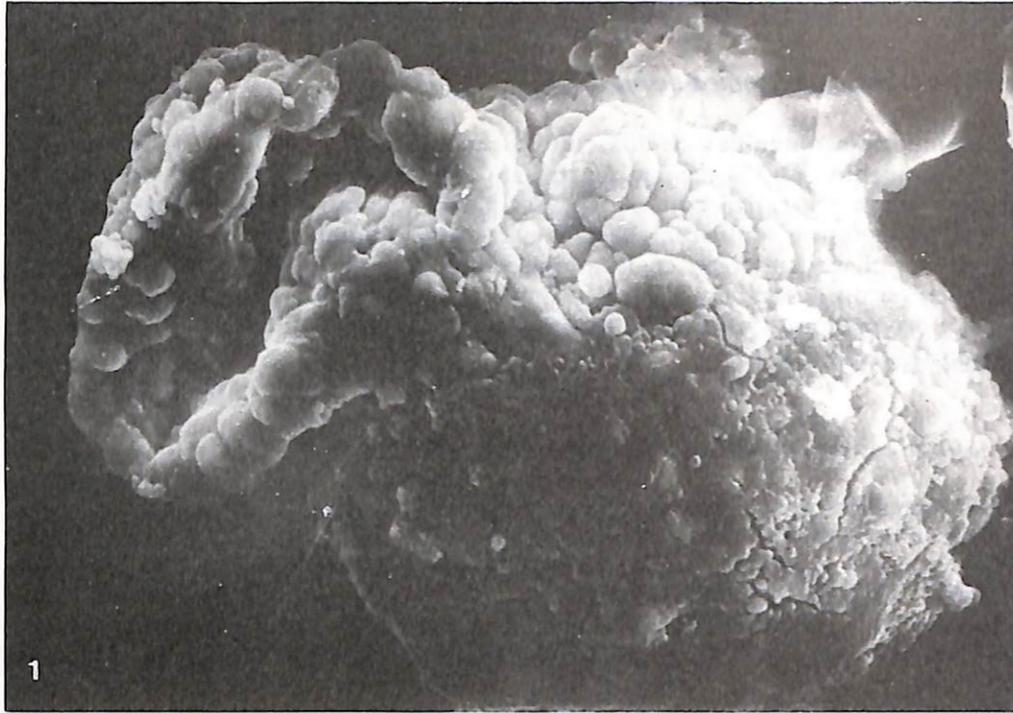


Figura 1.- Agregado de células endodérmicas. 1000 x.

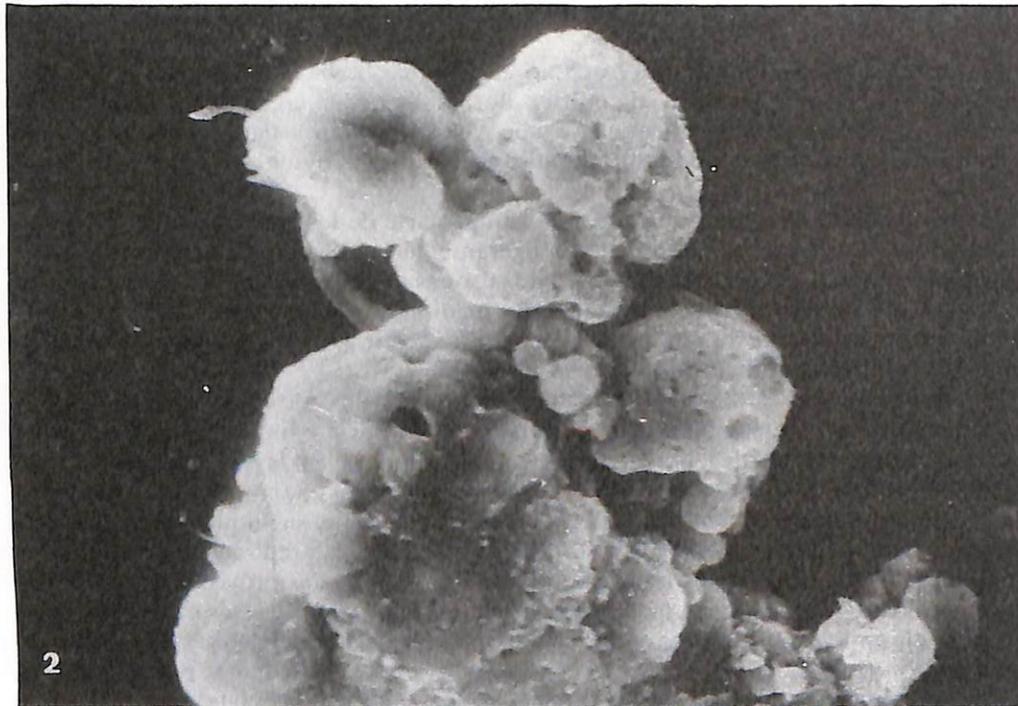


Figura 2.- Detalle de un agregado de células endodérmicas en el que se aprecian contactos celulares. 1750 x.

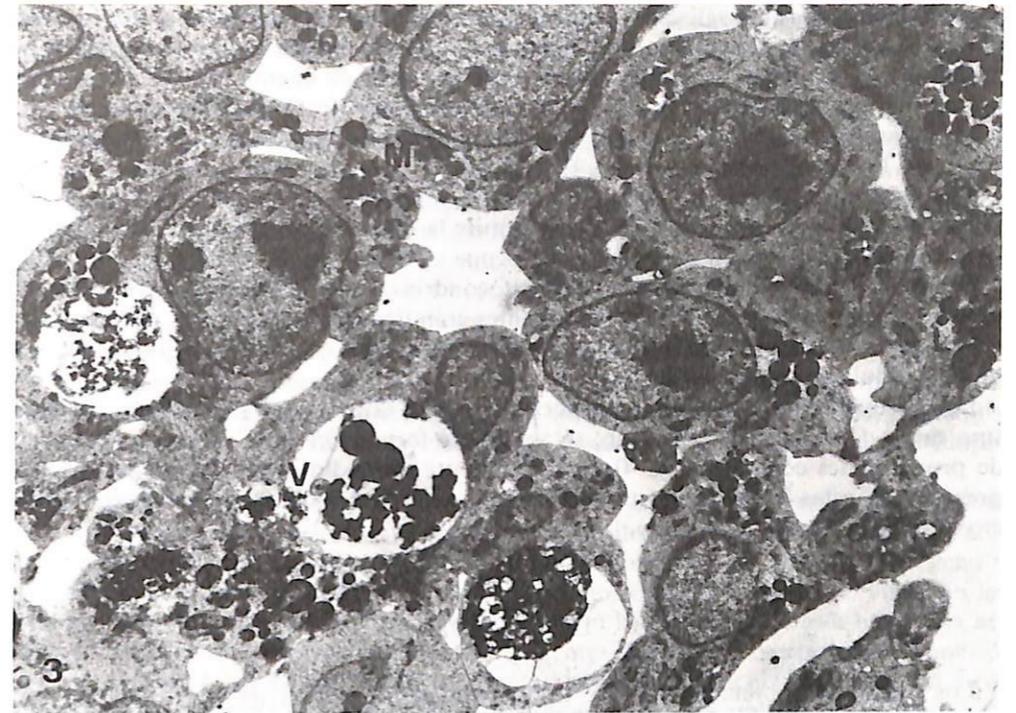


Figura 3.- Micrografía de las células endodérmicas de un agregado donde se observan grandes núcleos. En el citoplasma se aprecian mitocondrias (M), cuerpos lipídicos (L) y gránulos de vitelo (V). 9200 X.

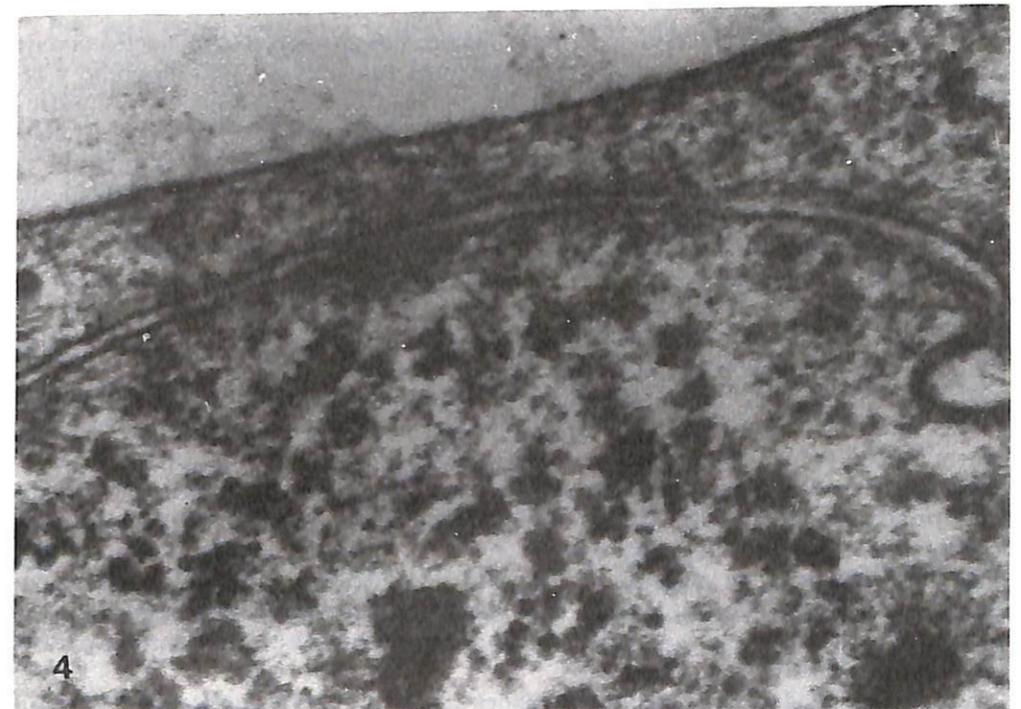


Figura 4.- Detalle de un filopodio de la membrana externa, observado al M.E.T. 40000 X.

En algunas zonas del agregado, se puede apreciar la presencia de blebs y microvillis, si bien, estas protrusiones de la superficie celular, son muy escasas y se observan solamente en un pequeño número de células. Hay que tener en cuenta que en el agregado existen poblaciones celulares que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular, lo cual juntamente con las condiciones de cultivo, influye en la presencia de estas protrusiones en la superficie de las células.

Por otra parte, el análisis al microscopio electrónico de transmisión de los agregados cultivados en medio sólido (Fig. 3), permite la observación de células endodérmicas con un núcleo alargado u ovalado que ocupa su mayor parte.

En el citoplasma celular se observan mitocondrias, gránulos de glucógeno y abundantes cuerpos lipídicos, así como abundantes gránulos de vitelo. Asimismo, se observan pequeños segmentos de retículo endoplásmico rugoso, que indica la gran actividad de estas células endodérmicas.

En las superficies de membranas apuestas, destaca la presencia de uniones celulares tipo gap y desmosomas. Asimismo, se observa la formación en la membrana externa de proyecciones celulares (Fig. 4), principalmente filopodios, cilios y microvillis. La presencia de estas formaciones se corresponde con los datos obtenidos mediante el microscopio electrónico de barrido.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que al igual que ocurre con otras células embrionarias, las células endodérmicas de embrión de pollo, subyacentes a las áreas cardiogénicas, una vez disociadas, son capaces de agregarse en el medio de cultivo.

En los agregados de células endodérmicas, analizados al microscopio electrónico de barrido, es de destacar la pérdida de prolongaciones celulares del tipo filopodio y lamelipodio en los puntos de contacto entre las células. Ello implica que éstas, no utilizan las superficies celulares como sustrato para la locomoción. La inhibición por contacto de la locomoción ha sido previamente descrita por Abercrombie<sup>1</sup>, Trinkaus<sup>25</sup> y Sanders y Prasat<sup>21</sup>, los cuales indican que en este proceso, las células pierden sus proyecciones de superficie como filopodios y lamelipodios y por tanto su capacidad de locomoción, ya que estas proyecciones están implicadas directamente en la locomoción celular. Sin embargo observan también, que otras poblaciones celulares a diferencia de lo que ocurre con las células endodérmicas analizadas, muestran una tendencia extremadamente fuerte a permanecer aisladas, es decir, sin agregarse y sin que la actividad de sus membranas disminuya.

Todas las superficies correspondientes a las células internas de los agregados obtenidos en nuestros cultivos, son capaces de adherirse a otras células. Sin embargo, no ocurre así con las células aisladas, ni con las células localizadas en la superficie externa de los agregados, que presentan bordes con proyecciones implicadas en la locomoción, principalmente del tipo filopodio y lamelipodio. Estos resultados coinciden con los observados por otros investigadores<sup>20, 7</sup>, los cuales sugieren que la adhesión celular tiene lugar por medio de contactos de pequeñas áreas de membranas apuestas con pocos procesos citoplasmáticos. Estos autores determinan que las fuerzas de adhesión de las células en los agregados, son presumiblemente lugares de baja resistencia para el acoplamiento eléctrico celular.

Estudios realizados sobre células epiteliales<sup>1, 26</sup>, demuestran que la actividad protrusiva de las células desaparece debido a contactos celulares, sugiriendo que este fe-

nómeno es debido a una importante fuerza de guía para los movimientos morfogénéticos. En este sentido nuestras observaciones son consecuentes con los estudios de estos autores.

Por otra parte Icardo<sup>12</sup>, en una revisión del proceso de la cardiogénesis indica la relación existente entre la formación del intestino primitivo y la migración de los primordios cardiacos hacia la línea media. En estos cambios de posición parecen estar implicados los activos movimientos de las células precardiacas en relación con el endodermo<sup>5</sup>. Los filopodios y lamelipodios observados tanto al microscopio electrónico de transmisión como al de barrido, en las células endodérmicas presentes en nuestros cultivos, pueden ser considerados como estructuras que orientan a las células mesodérmicas precardiacas mediante un proceso de guía por contacto. Aunque es difícil comparar los resultados «in vitro» con el comportamiento «in situ», hay que considerar que las células mesodérmicas «in vivo» emigran como parte de los movimientos morfogénéticos, usando la superficie interna de otras hojas embrionarias. England y Cowper<sup>6</sup>, observan que en el embrión de pollo «in situ» el endodermo emite filopodios que contactan con el mesodermo.

El estudio al microscopio electrónico de transmisión de los agregados celulares obtenidos en nuestros cultivos, muestra como detalles estructurales más importantes la presencia en el citoplasma de abundantes mitocondrias, gránulos de glucógeno y principalmente gran cantidad de gránulos de vitelo. Esta gran reserva de vitelo en las células endodérmicas, puede estar relacionada con la capacidad de esta hoja para actuar como mediadora en el transporte de nutrientes durante el desarrollo embrionario. En este sentido Litke y Low<sup>16</sup>, demuestran que pequeñas partículas de vitelo son fagocitadas continuamente por células de la superficie ventral del embrión en estadios precoces, lo cual, explica la presencia de gran número de vacuolas en estas células que serían producidas por la fagocitosis de los gránulos de vitelo.

Por otra parte hemos de señalar, que no se ha observado ningún tipo de diferenciación específica de epitelio de origen endodérmico. Algunos autores<sup>17, 18, 19, 13</sup>, comprueban la capacidad de autodiferenciación del endodermo en epitelios, principalmente, de tipo digestivo. Sin embargo hay que tener en cuenta que los cultivos son realizados siempre a partir de explantes. La ausencia de capacidad de diferenciación, en nuestro caso, puede ser debida a las modificaciones que se producen en la matriz extracelular durante los procesos mecánicos que intervienen en la disociación.

Estos hechos sugieren que las células endodérmicas, subyacentes a las áreas cardiogénicas, una vez aisladas de sus conexiones naturales, son capaces de poner en marcha sus mecanismos de locomoción y fijación, que les permite unirse al sustrato y a las células vecinas, formando agregados típicos. Sin embargo, dichas células son incapaces de asumir sus propiedades diferenciales a partir de estadios tan precoces, no habiéndose observado en ellas ningún detalle estructural característico de los tejidos de naturaleza endodérmica.

## RESUMEN

Mediante técnicas de cultivos celulares «in vitro» se realiza un estudio de las células endodérmicas del embrión de pollo del estadio 5, subyacentes a las áreas cardiogénicas, observando que dichas células son capaces de formar agregados en el medio de cultivo.

Los agregados obtenidos, se analizan mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, con objeto de estudiar sus características morfológicas y estructurales.

Las proyecciones celulares observadas, son principalmente del tipo filopodio y lamelipodio y se localizan únicamente en los bordes libres de las células situadas en la periferia del agregado. Estas proyecciones se interpretan en relación con la adhesión y locomoción celular.

Se estudia, asimismo, la capacidad de diferenciación de las células endodérmicas disociadas y agregadas en relación con las características estructurales que muestran.

## STUDY OF MORPHOLOGICAL AND STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF ENDODERMIC CELL AGGREGATES IN CHICKEN EMBRYO

### SUMMARY

A study of the endodermic cells subjacent to cardiogenic areas of stage-5 chicken embryo is made by means of techniques for «in vitro» cellular cultures, observing that said cells are able to form aggregates in culture medium.

The aggregates obtained are analyzed by sweep and transmission electronic microscope to study their morphological and structural characteristics. The cellular projections observed are mainly phyllopodium and lamellipodium types and are located only at the free edges of the cells situated on the aggregate periphery. These projections are interpreted in connection with the cellular adhesion and locomotion.

The differentiation capacity of dissociated and aggregated endodermic cells with reference to the structural characteristics showed by them is likewise studied.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) ABERCROMBIE, M. (1970). Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro*, 6: 128-142.
- 2) ARIAS, M.; CHAMORRO, C.; GARCIA, C.; RAMOS, J.; FERNANDEZ, J. C. y VILLAR, J. M., (1984). Características de la superficie celular en reagregados de ectoblasto neurogénico de embrión de pollo. *An. Fac. Vet. León* 30: 51-59.
- 3) BEN-SHAUL, Y.; MOSCONA, A. A. (1975). Scanning electron microscopy of aggregating embryonic neural retina cells. *Exp. Cell Res.* 95: 191-204.
- 4) CHAMORRO, C., (1985). La membrana celular y su papel morfogenético en el embrión de pollo en neurulación. Análisis morfométrico de las diferentes proyecciones de la membrana celular y otras características morfológicas de las células neuroectodérmicas y mesodérmicas en cultivo y su evolución durante el desarrollo. *Tesis doctoral* Fac. Vet. León.
- 5) DE HAAN, R. L., (1963). Migration patterns of the precardiac mesoderm in the early chick embryo. *Exp. Cell Res.* 29: 544-560.
- 6) ENGLAND, M.; COWPER, S. V. (1975). Primary neural induction as studied by scanning electron microscopy. *Experientia*, 31: 1449.
- 7) FOUCAUD, B.; GOMBOS, G. (1985). Equilibrium-driven mechanism for preferential adhesion between chick embryo cells. *Exp. Cell Res.* 156: 164-174.
- 8) FUKUDA, S. (1979). The development of hepatogenic potency in the endoderm of quail embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 52: 49-62.
- 9) FUKUDA-TAIRA, S. (1981 a) Hepatic induction in the avian embryo. Specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J. Embryol. exp. Morph.* 63: 111-125.
- 10) FUKUDA-TAIRA, S. (1981 b). Location of pre-hepatic cells in the early developmental stages of quail embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 64: 73-85.
- 11) HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88: 49-92.
- 12) ICARDO, J. M., (1984). The growing heart: An Anatomical perspective. *Growth of the Heart in Health and Disease*. Rado-van Zak, Raven Press, New York: 41-79.
- 13) ISHIZUYA, A. (1983). Electron microscopical study of self-differentiation potency in the chick embryonic endoderm cultured «in vitro». *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 192: 171-178.

- 14) KURAI, A. R. y TANISSTREET, M. (1984). Scanning electron microscopy of the reaggregation of cells from *Xenopus* early embryos. *Cytobios* 40: 177-187.
- 15) LE BLANC, J.; BRICK, I. (1981). Morphologic aspects of adhesion and spreading behaviour of amphibian blastula and gastrula cells. *J. Embryol. exp. Morph.* 61: 145-163.
- 16) LITKE, L. L.; LOW, F. N. (1975). Scanning electron microscopy of yolk absorption in early chick embryos. *Am. J. Anat.* 142: 527-530.
- 17) MIZUNO, T., (1982). Etude sur la différenciation de l'endoderme au moyen de cultures organotypiques. *Monogr. Sc. Moisson* 4: 32-37.
- 18) MIZUNO, T.; SUMIYA, M. (1974). Utilisation de la membrane vésiculaire de l'oeuf de poulet pour l'étude de la différenciation de l'épithélium endodermique. *Ann. Biol.* 13: 111-115.
- 19) MIZUNO, T.; SUMIYA, M. (1977). Différenciation latente de l'endoderme de jeune embryon de poulet. *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris*, 284: 473-476.
- 20) NAG, A. C. (1979). Reconstruction of mammalian heart tissue from embryonic heart cell suspension with reference to the aggregation of adult heart cells. *Cytobios*, 23: 199-223.
- 21) SANDERS, E. J.; PRASAD, S. (1981). Contact inhibition of locomotion and the structure of homotypic and heterotypic intercellular contacts in embryonic epithelial cultures. *Exp. Cell Res.* 135: 93-102.
- 22) SHIMADA, Y.; MOSCONA, A. A.; FISCHMAN, D. A. (1974). Scanning electron microscopy of cell aggregation: cardiac and mixed retina-cardiac cell suspension. *Develop. Biol.* 36: 428-446.
- 23) STANISSTREET, M.; SMITH, J. L. (1978). Scanning electron microscopy of cell isolated from amphibian early embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 48: 215-223.
- 24) STANISSTREET, M.; JUMAH, H. (1982). The effects of colchicine, vinblastine and cytochalasin B on the scanning electron microscopical appearance and aggregation of cells isolated from *Xenopus* early embryos. *Acta Embryol. Morph. Exper.* 3: 3-13.
- 25) TRINKAUS, J. P. (1976). On the mechanism of metazoan cell movements. En: *The cell surface in animal embryogenesis and development* (Eds. G. Poste y G. L. Nicholson). Amsterdam, North-Holland.
- 26) TRINKAUS, J. P.; ERICKSON, C. A. (1983). Protrusive activity, mode and rate of locomotion, and pattern of adhesion of *Fuotulus* deep cells during gastrulation. *J. Exp. Zool.* 228: 41-70.