

# IMPLICACIONES MORFOGENETICAS DE LAS CORRELACIONES ENTRE DATOS ESTEREOLOGICOS QUE DEFINEN LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS CELULAS DEL EMBRION DE POLLO EN NEURULACION\*

Por P. de Paz (1)  
C. A. Chamorro (2)  
J. G. Fernández (3)  
J. M. Villar (2)

## INTRODUCCION

El cálculo de las densidades de volumen de los órganos celulares a partir de las microfotografías electrónicas, proporciona a menudo más información acerca de las propiedades biológicas y los procesos bioquímicos de las células **que** cuando se realiza una descripción morfológica subjetiva<sup>9</sup>. En este sentido, CECH y SEDLACKOVA<sup>3</sup> sugieren que las fracciones de volumen y la ultraestructura cuantitativa de los diferentes compartimentos celulares, así como sus variaciones, reflejen el estado de diferenciación y la actividad metabólica de las células embrionarias.

Teniendo en cuenta estas consideraciones metodológicas, se han realizado varios análisis de diferentes parámetros estereológicos en distintos tipos celulares del embrión de pollo en neurulación<sup>11, 12, 13, 15</sup>. Definidos por nosotros<sup>15</sup> algunos de estos parámetros, y considerando la coordinación citofisiológica de los distintos compartimentos celulares, en el presente trabajo se estudian las diferentes correlaciones existentes entre estos parámetros al objeto de estudiar la interdependencia entre estos compartimentos celulares durante la neurulación.

## MATERIAL Y METODOS

Para este estudio fueron utilizados 30 embriones de cada uno de los estadios 5, 6, 7 y 8<sup>o</sup> de los cuales se recogió su región cefálica (porción prenatal estadios 5 y 6 y

\* Una parte de este estudio ha sido presentada en el European Developmental Congress (Southampton, 2-8 septiembre 1984) y publicada en el Journal of Embryology and experimental Morphology, Congress Supplement 1: 208 (1984).

(1) Servicio de Microscopía Electrónica, Universidad de León.

(2) Departamento de Anatomía y Embriología, Facultad de Veterinaria, León.

(3) Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, León.

*An. Fac. Vet. León*, 1981, 30, 41-50.

porción presomítica estadios 7 y 8). Las muestras así obtenidas se fijaron en glutaraldehído al 2% con rojo rutenio (1%) en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora a 4<sup>o</sup> C; se postfijaron durante 3 horas a temperatura ambiente en una solución de tetraóxido de osmio (1%) y rojo rutenio (1%) en el mismo tampón<sup>10</sup>. Finalmente se deshidrataron en series sucesivas de etanol y fueron incluidas en Epon 812. Se utilizaron secciones de 1  $\mu$ m teñidas con azul de toluidina en solución alcalina para la selección de las áreas adecuadas en las diferentes hojas embrionarias. Las secciones ultrafinas obtenidas de los bloques seleccionados fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas en un microscopio electrónico Jeol 100 CX a 60 Kv.

#### *Método de muestreo*

WEIBEL y col.<sup>22</sup> han descrito la necesidad de un sistema de muestreo al azar, cuando solamente una pequeña proporción del material biológico disponible puede ser examinado ultraestructuralmente. El embrión de pollo puede ser considerado como una población celular estratificada (en hojas embrionarias), por lo cual es necesario orientarlo de forma tal que las secciones pasen a través de todas las hojas<sup>21, 2</sup>. Por todo ello, las porciones del embrión fueron orientadas según el eje cefalocaudal durante las primeras etapas de la inclusión. Las secciones semifinas se obtenían transversalmente al bloque, y en ellas se comprobaba la orientación del embrión (secciones perpendiculares al eje cefalocaudal embrionario) y se seleccionaban las áreas de interés. Cinco bloques bien orientados, según los criterios señalados, se seleccionaron mediante una tabla digital al azar y cinco secciones ultrafinas de rejillas así obtenidos para cada estadio se observaron en el microscopio electrónico muestreando independientemente cada tejido (epiblasto, neuroepitelio, mesodermo y endodermo). La célula, en su conjunto, y el núcleo se observaron a 2.600 x (nivel I), obteniéndose 12 microfotografías en el ángulo superior izquierdo de cada malla de las rejillas. Cuando la hoja embrionaria considerada no estaba presente en dicho ángulo, otro consecutivo era fotografiado. Los distintos compartimentos citoplasmáticos (mitocondrias, cuerpos lipídicos y gránulos de vitelo) fueron evaluados en el nivel II (8.300 x) y asimismo se realizaron 12 microfotografías dentro del área de las microfotografías anteriores.

#### *Métodos estereológicos*

Las microfotografías fueron analizadas por planimetría<sup>24</sup> mediante un sistema semiautomático de análisis de imágenes Leitz ASM. El volumen nuclear (Vn) era obtenido a partir del área de esta estructura sobre las secciones y considerándolo de forma aproximadamente esférica (relación axial 1-1,5). El coeficiente de forma celular era calculado mediante la fórmula  $CF = 4\pi \text{área}/(\text{perímetro})^2$ . La densidad de volumen del núcleo era obtenida según la relación  $V_{vn} = A_n/A_c$  ( $A_n$  = área del núcleo sobre la sección y  $A_c$  = área celular), y a partir de estos valores se calculó el volumen celular como  $V_c = V_n/V_{vn}$ .

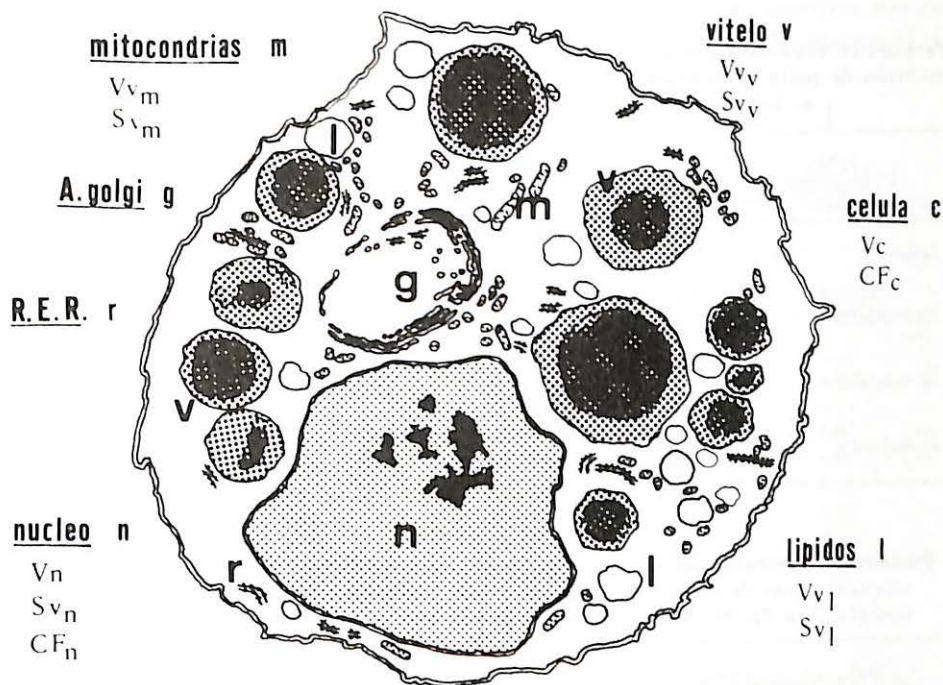


Figura 1.—Esquema general de una célula embrionaria de pollo (estadio 5) en el que se presentan todos los compartimentos citoplasmáticos, así como los distintos parámetros estereológicos analizados en este estudio.  $V_c$  = Volumen celular.  $CF_c$  = Coeficiente de forma celular.  $V_n$  = Volumen nuclear.  $S_{vn}$  = Densidad de superficie nuclear.  $CF_n$  = Coeficiente de forma nuclear.  $V_v$  = Densidad de volumen de un orgánulo (m = mitocondria, l = cuerpos lipídicos y v = gránulos de vitelo).



La densidad de volumen y la de superficie de los diferentes compartimentos se obtuvieron respecto al área celular según las ecuaciones de WEIBEL y BOLENDER<sup>23</sup> y WILLIAMS<sup>24</sup>. Este conjunto de cálculos estereológicos se realizó mediante un programa en Basic desarrollado por nosotros a tal efecto<sup>16</sup>.

El conjunto de valores obtenidos para cada tipo celular se analizó al objeto de conocer una serie de coeficientes de correlación.

## RESULTADOS

El conjunto de medias ( $\pm$  desviación estándar) de los distintos parámetros estereológicos analizados en este estudio en cuatro tipos celulares (epiblasto, neuroepitelio, mesodermo y endodermo) del embrión de pollo, se presentan en las tablas 1 y 2. De estos valores se deduce la específica identidad citométrica de cada uno de los tipos celulares estudiados.

**TABLA N.º 1**  
Parámetros estereológicos generales (célula y núcleo) de cuatro tipos celulares del embrión de pollo en neurulación (estadios 5 a 8). Se presentan las medidas ( $\pm$ d.e.) y se indican las correspondientes unidades de cada parámetro

TIPOS CELULARES	PARAMETROS				
	Vc ( $\mu\text{m}^3$ )	Cfc (—)	Vn ( $\mu\text{m}^3$ )	SVn ( $\mu\text{m}^3/\text{m}^3$ )	CFn (—)
Epiblasto	433,46 (219,22)	0,489 (0,111)	140,58 (68,17)	0,301 (0,050)	0,609 (0,118)
Neuroepitelio	361,64 (99,79)	0,504 (0,100)	132,70 (40,56)	0,340 (0,072)	0,619 (0,107)
Mesodermo	325,75 (161,30)	0,643 (0,117)	112,32 (58,03)	0,366 (0,104)	0,6141 (0,146)
Endodermo	431,82 (200,60)	0,531 (0,134)	126,87 (56,46)	0,294 (0,080)	0,6313 (0,129)

**TABLA N.º 2**  
Parámetros estereológicos (medidas  $\pm$  d.e.) correspondientes a los compartimentos citoplasmáticos de cuatro tipos celulares del embrión de pollo en neurulación (estadios 5 a 8). Se indican las correspondientes unidades de cada parámetro.

TIPOS CELULARES	PARAMETROS					
	Vvm( $\text{n.}^\circ/\mu\text{m}^3$ )	Svm( $\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )	Vve( $\text{n.}^\circ/\mu\text{m}^3$ )	Sve( $\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )	Vvv( $\text{n.}^\circ/\mu\text{m}^3$ )	Svv( $\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )
Epiblasto	0,054 (0,022)	0,579 (0,228)	0,073 (0,044)	0,346 (0,196)	0,073 (0,029)	0,261 (0,109)
Neuroepitelio	0,062 (0,026)	0,658 (0,219)	0,069 (0,034)	0,342 (0,182)	0,063 (0,0273)	0,223 (0,124)
Mesodermo	0,071 (0,029)	0,655 (0,227)	0,059 (0,030)	0,351 (0,198)	0,075 (0,037)	0,305 (0,139)
Endodermo	0,046 (0,020)	0,529 (0,236)	0,101 (0,058)	0,472 (0,199)	0,122 (0,063)	0,305 (0,157)

El resultado más notable obtenido en este trabajo es la elevada correlación existente entre  $V_c$  y  $V_n$  (tabla n.º 3), que en los cuatro tipos celulares aquí estudiados alcanza un nivel de significación elevado ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, hemos de señalar que no se observa correlación significativa alguna entre el tamaño ( $V$ ) y la forma ( $CF$ ) tanto de la célula como del núcleo (tabla n.º 4). La densidad de superficie del núcleo ( $S_{vn}$ ) y el tamaño celular ( $V_c$ ) presentan una correlación negativa (tabla n.º 5) muy significativa en todos los tipos celulares, de forma que las células de menor tamaño presentan mayores densidades de superficie nuclear.

Una correlación muy característica que se presenta en la tabla n.º 6, es la existente entre la densidad de volumen ( $V_{vi}$ ) y la de superficie ( $S_{vi}$ ) de cada uno de los compartimentos intracitoplasmáticos considerados en este estudio. Por el contrario, estas densidades del núcleo ( $V_{vn}/S_{vn}$ ) no presentan un coeficiente de correlación significativo (tabla n.º 7). Asimismo, la correlación observada entre los volúmenes y la densidad de superficie de los distintos compartimentos carecen de significación estadística (tabla n.º 6). Solamente la densidad de superficie nuclear presenta correlaciones significativas con determinadas densidades de volumen ( $V_{vi}$ ) en algunos tipos celulares (tabla n.º 7).

**TABLA N.º 3**  
**Coefficientes de correlación ( $r$ ) entre tamaños celulares ( $V_c$ ) y nuclear ( $V_n$ ) y contenidos (densidad de volumen) de los diferentes compartimentos citoplasmáticos. En cuatro tipos celulares de embrión de pollo.**

PARAMETROS	TIPOS CELULARES							
	Epiblasto		Neuroepitelio		Mesodermo		Endodermo	
	$r$	(a)	$r$	(a)	$r$	(a)	$r$	(a)
$V_c/V_n$	0,94	***	0,89	***	0,81	***	0,89	***
$V_c/V_{vm}$	-0,05	—	-0,07	—	-0,02	—	-0,13	—
$V_c/V_{ve}$	0,19	—	0,14	—	0,01	—	0,05	—
$V_c/V_{vv}$	-0,06	—	0,05	—	0,14	—	0,06	—
$V_n/V_{vm}$	0,03	—	0,11	—	0,10	—	-0,12	—
$V_n/V_{ve}$	0,09	—	0,08	—	-0,18	—	0,05	—
$V_n/V_{vv}$	-0,03	—	0,02	—	-0,07	—	-0,05	—

(a) Nivel de significación \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

**TABLA N.º 4**  
**Coefficiente de correlación entre tamaños ( $V$ ) y coeficiente de forma ( $CF$ ) de la célula y el núcleo. En cuatro tipos celulares del embrión de pollo.**

PARAMETROS	TIPOS CELULARES							
	Epiblasto		Neuroepitelio		Mesodermo		Endodermo	
	$r$	(a)	$r$	(a)	$r$	(a)	$r$	(a)
$V_c/CF_c$	-0,21	—	0,16	—	0,14	—	-0,25	—
$V_n/CF_c$	-0,20	—	0,19	—	0,26	—	-0,13	—
$V_c/CF_n$	0,18	—	0,21	—	0,23	—	0,23	—
$V_n/CF_n$	0,20	—	-0,25	—	0,19	—	-0,18	—

(a) Nivel de significación (ver tabla n.º 3).



**TABLA N.º 5**

**Coefficiente de correlación (r) entre tamaño celular (Vc) y la densidad de superficie (Svi) de diferentes compartimentos celulares (i). En cuatro tipos celulares del embrión de pollo.**

PARAMETROS	TIPOS CELULARES							
	Epiblasto		Neuroepitelio		Mesodermo		Endodermo	
	r	(a)	r	(a)	r	(a)	r	(a)
Vc/Svn	-0,37	***	-0,41	***	-0,46	***	-0,39	***
Vc/Svm	-0,32	**	-0,21	—	-0,09	—	-0,29	*
Vc/Sve	-0,02	—	-0,03	—	-0,10	—	-0,13	—
Vc/Svv	-0,06	—	-0,06	—	-0,20	—	-0,05	—

(a) Nivel de significación (ver tabla n.º 3).

**TABLA N.º 6**

**Coefficiente de correlación (r) entre las densidades de volumen (Vvi) y las de superficie (Svi) de diferentes compartimentos citoplasmáticos (i). En cuatro tipos celulares del embrión de pollo**

PARAMETROS	TIPOS CELULARES							
	Epiblasto		Neuroepitelio		Mesodermo		Endodermo	
	r	(a)	r	(a)	r	(a)	r	(a)
Vvm/Svm	0,60	***	0,56	***	0,43	***	0,87	***
Vvm/Sve	0,05	—	0,06	—	-0,04	—	-0,13	—
Vvm/Svv	0,07	—	0,06	—	-0,20	—	-0,21	—
Vve/Svm	-0,15	—	-0,12	—	0,09	—	-0,06	—
Vve/Sve	0,58	***	0,59	***	0,58	***	0,64	***
Vve/Svv	-0,21	—	-0,11	—	0,12	—	0,07	—
Vvv/Svm	0,18	—	0,20	—	-0,22	—	-0,14	—
Vvv/Sve	-0,23	—	-0,16	—	0,02	—	-0,04	—
Vvv/Svv	0,36	***	0,38	***	0,55	***	0,85	***

(a) Nivel de significación (ver tabla n.º 3).

**TABLA N.º 7**

**Coefficiente de correlación (r) entre la densidad de superficie nuclear (Svn) y el volumen de los diferentes compartimentos celulares (Vvi). En cuatro tipos celulares del embrión de pollo**

PARAMETROS	TIPOS CELULARES							
	Epiblasto		Neuroepitelio		Mesodermo		Endodermo	
	r	(a)	r	(a)	r	(a)	r	(a)
Svn/Vvn	-0,20	—	-0,16	—	0,07	—	-0,12	—
Svn/Vvm	0,60	***	0,09	—	0,19	—	-0,04	—
Svn/Vve	-0,15	—	-0,17	—	-0,35	**	-0,33	**
Svn/Vvv	0,18	—	-0,14	—	-0,49	***	-0,21	—

(a) Nivel de significación (ver tabla n.º 3).

Por último, el tamaño celular ( $V_c$ ) y nuclear ( $V_n$ ) no presenta correlaciones significativas (tabla n.º 3) con los contenidos ( $V_v$ ) de mitocondrias (m), lípidos (e) y vitelo (v). Solamente en un caso para las células ectodérmicas ( $V_c/V_{ve}$ ) se observa un coeficiente de correlación con un bajo nivel de significación ( $P < 0,05$ ). Las correlaciones entre densidades de volumen de los diferentes compartimentos carecen de significación estadística (tabla n.º 8).

**TABLA N.º 8**  
**Coefficiente de correlación ( $r$ ) entre las densidades de volumen ( $V_{vi}$ )**  
**de diferentes compartimentos citoplasmáticos (i).**  
**En cuatro tipos celulares del embrión de pollo**

PARAMETROS	TIPOS CELULARES							
	Epiblasto		Neuroepitelio		Mesodermo		Endodermo	
	$r$	(a)	$r$	(a)	$r$	(a)	$r$	(a)
$V_{vm}/V_{ve}$	0,02	—	-0,05	—	-0,10	—	-0,12	—
$V_{vm}/V_{vv}$	-0,05	—	-0,12	—	-0,21	—	-0,19	—
$V_{ve}/V_{vv}$	-0,04	—	0,16	—	0,15	—	0,06	—

(a) Nivel de significación (ver tabla n.º 3).

## DISCUSION

La elevada correlación positiva observada entre  $V_c/V_n$  en estos cuatro tipos celulares del embrión de pollo, es decir, el hecho de que a mayor volumen celular siempre le corresponde un mayor volumen nuclear, podría interpretarse sobre la base de una fuerte estabilidad estructural del núcleo. Este compartimento celular sufre durante la segmentación una notable reducción de su tamaño respecto al de la célula<sup>6</sup>, mientras que los resultados antes comentados demuestran que durante la neurulación, el núcleo presenta un tamaño estable respecto al de la célula. Esta estabilidad ha podido ser analizada en eritrocitos de diferentes especies de anfibios durante el desarrollo<sup>7</sup>. Así, estos autores han descrito una fuerte correlación lineal entre el valor  $C$  (cantidad de DNA en el conjunto de sus cromosomas, es decir, tamaño de su genoma) y el volumen nuclear. En general, FAWCETT<sup>5</sup> señala que existe una estrecha correspondencia entre el tamaño del núcleo y la cantidad de material genético que contiene. Las células aquí analizadas se encuentran en un proceso inequívoco y/o presuntivo de diferenciación dentro de una primera etapa de determinación durante el desarrollo precoz<sup>20</sup>, y en el cual hemos observado que se ha estabilizado su relación nucleocitoplasmática. Esto nos permite deducir, en función de las observaciones anteriores, que el núcleo de estas células ha alcanzado un volumen estable durante la neurulación, el cual presentará una relación directa con el tamaño de su genoma. No obstante, esta observación contrasta con lo descrito por SUZUKI y MIKI<sup>19</sup> para las células neuroectodérmicas de anfibios, en las cuales la relación nucleocitoplasma no está aún establecida en las primeras etapas de la neurulación.



En este sentido es preciso tener en cuenta la falta de correspondencia entre el tamaño de la célula y el núcleo, y los correspondientes coeficientes de forma. Este hecho matiza el fenómeno generalmente conocido de los cambios de forma y del tamaño de los tipos celulares del embrión de pollo en diferenciación, en el sentido de que no existe una correlación directa entre forma y tamaño celular. Esta observación podría relacionarse con la falta de homogeneidad en la forma de estas estructuras biológicas<sup>1</sup>. En cuanto a la membrana nuclear, la densidad de superficie del núcleo no presenta correspondencia directa con el volumen nuclear, aunque sí se observa esta correlación cuando se estudia el caso  $V_c/S_{vn}$ . Dicha correlación presenta valores negativos de elevada significación estadística, de forma que a las células de mayor tamaño les corresponde una menor densidad de superficie nuclear. El hecho de que el núcleo no presente correlación significativa para el  $S_v/V_n$  nos indica que una variación en la densidad de superficie del núcleo es independiente de su tamaño. Esta variación de la superficie nuclear tendría su razón de ser en el proceso de determinación que están sufriendo estos tipos celulares<sup>20</sup> durante un período en el cual es preciso el trasvase de moléculas reguladoras del núcleo al citoplasma<sup>14, 5</sup>.

Los compartimentos citoplasmáticos presentan una visible correlación positiva entre la correspondiente densidad de volumen y la de superficie, lo cual permite suponer que se trata de unidades citológicas que configuran una población notablemente homogénea en cuanto a la forma individual (elipsoidal para mitocondrias y esférica para lípidos y vitelo), aunque pueden presentar notables variaciones en sus tamaños. La correlación observada entre la densidad de volumen y la de superficie de las mitocondrias coincide con la descrita por MATHIEU y MESSIER<sup>12, 13</sup> en el neuroectodermo del embrión de pollo. Estos autores describen asimismo la existencia de una correlación negativa entre el tamaño medio de estos orgánulos y la relación superficie/volumen obtenida.

Por último, se observa que el tamaño celular no presenta una correspondencia directa con el contenido de mitocondrias e inclusiones vitelinas (cuerpos lipídicos y partículas de vitelo) en ninguno de los cuatro tipos celulares estudiados. Sin embargo, destaca la significativa correlación negativa que presentan las células epiblasticas y endodérmicas entre el tamaño celular y la densidad de superficie mitocondrial. Hemos de considerar esta correlación teniendo en cuenta el movimiento de expansión que estas hojas embrionarias sufren en este período del desarrollo<sup>4</sup> (expansión que está basada en una intensa proliferación celular<sup>18</sup>, en una reducción de su tamaño<sup>15</sup> y en un notable cambio de forma<sup>4</sup>), y el papel energético de las mitocondrias en la célula.

## RESUMEN

Se ha realizado un estudio citométrico, por medio de métodos estereológicos, de distintos parámetros en cuatro tipos celulares del embrión de pollo en neurulación, analizándose a continuación las correlaciones lineales entre alguno de ellos. Los resultados obtenidos demuestran una elevada correlación positiva entre el volumen



celular y nuclear, así como entre el tamaño y la superficie de cada uno de los compartimentos citoplasmáticos. El volumen y la superficie nuclear no presentan ninguna correlación significativa, lo que se piensa está relacionado con el papel que la membrana nuclear juega en los procesos de diferenciación celular. Asimismo, no se observa una correlación significativa entre la forma y el tamaño de la célula y del núcleo. El volumen celular presenta una correlación negativa con la densidad de superficie del núcleo y de las mitocondrias. Estos valores son interpretados en relación con algunos aspectos de los mecanismos morfogenéticos propuestos para la neurulación.

## MORPHOGENETIC IMPLICATIONS OF THE CORRELATIONS BETWEEN STEREOLOGICAL DATA WHICH CHARACTERIZE THE ULTRASTRUCTURE OF CHICK EMBRYO CELLS AT NEURULATION

### SUMMARY

A cytometrical study of several parameters of four cellular types of early chick embryo is realised by stereological methods and some correlation coefficients have been calculated.

The results obtained show a high correlation between the cellular and the nuclear volume as well as between the size and the surface density of each compartments. The nuclear volume and surface densities not show any significant correspondence which is discussed according to the role that the nuclear membrane plays in the cellular differentiation process.

Likewise, a significant correlation between the size and shape of the cell and the nucleus is not observed. The cellular volume shows a negative correlation respect to the nuclear and mitochondrial surface density. These values are discussed in relation to several aspects of the morphogenetic mechanisms proposed about the neurulation.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) BOOKSTEIN, F. L. (1984).—A statistical method for biological shape comparisons. *J. theor. Biol.*, **107**, 475-520.
- 2) BOYSEN, M., y REITH, A. (1983).—Discrimination of various epithelia by simple morphometric evaluation of the basal cell layer. A light microscopic analysis of pseudostratified, metaplastic and dysplastic nasal epithelium in nickel workers. *Virchows Arch. (Cell Patol.)*, **42**, 173-184.
- 3) CECH, S., y SEDLACKOVA, M. (1983).—Ultrastructure and morphometric analysis of preimplantation mouse embryos. *Cell Tissue Res.*, **230**, 661-670.
- 4) DOWNIE, J. R. (1976).—The mechanism of chick blastoderm expansion. *J. Embryol. exp. Morph.*, **35**, 559-575.
- 5) FAWCETT, D. W. (1981).—*The Cell*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- 6) HAMBURGER, V., y HAMILTON, H. L. (1951).—A series of normal stages in the development of chick embryos. *J. Morph.*, **88**, 49-92.

- 7) HORNER, H. A., y MACGREGOR, H. C. (1983).—C value and cell volume: their significance in the evolution and development of amphibians. *J. Cell Sci.*, **63**, 135-146.
- 8) KARP, G., y BERRIL, N. J. (1981).—*Development*. McGraw-Hill Book Co., New York, 178-180.
- 9) LINDBERG, L. G., y VORWERK, P. (1970).—On calculating volumes of transected bodies from two-dimensional micrographs. *Labor. In est.*, **23**, 315-317.
- 10) LUFT, J. H. (1971).—Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347.
- 11) MATHIEU, O., y MESSIER, P. E. (1975).—Stéréologie: aspects pratiques des principes et méthodes appliqués a l'étude du development embryonnaire. *Union Med. Canada*, **104**, 1077-1084.
- 12) MATHIEU, O., y MESSIER, P. E. (1976).—Stereological analysis of the neural organogenesis in the chick embryo. *Fourth Int. Cong. Stereol. Nat. Bur. Stand. (US), Spec. Publ.*, **431**, 393-396.
- 13) MATHIEU, O., y MESSIER, P. E. (1977).—A stereological approach to the study of neural organogenesis in *Xenopus laevis*. *Anat. Embryol.*, **150**, 319-333.
- 14) NAGL, W. (1977).—Nuclear structures during cell cycles. En ROST, T. L. y GIFFORD, E. M.: *Mechanisms and control of cell division*. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsburg.
- 15) PAZ, P. (1983).—Análisis estereológico de la diversificación ultraestructural en el embrión de pollo durante la neurulación. Estudio de los primeros indicios de regionalización en el epitelio neural. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de León. León, 1983.
- 16) PAZ, P., y BARRIO, J. P. (1985).—Stereological parameters from the analysis of the cell micrographs either by manual point-counting methods or by using a semi-automatic system: A basic program for ZX-Spectrum personal computer. *Comput. Biol. Med.*, **15**, 153-158.
- 17) RENAU-PIQUERAS, J.; PÉREZ-SERRANO, M. D., y MARTÍNEZ-RAMÓN, A. (1983).—Stereological study of murine myeloma and hybridoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Submicrosc. Cytol.*, **15**, 607-618.
- 18) ROSENQUIST, G. C. (1982).—Endoderm/mesoderm multiplication rates in stage 5-12 chick embryos. *Anat. Rec.*, **202**, 95-103.
- 19) SUZUKI, A. S., y MIKI, K. (1983).—Cellular basis of neurulation of induced neuroectoderm in amphibian embryogenesis: changes in cell shape, cell size, and cytodifferentiation of the neuroectoderm after neural induction. *Develop. Growth Differ.*, **25**, 289-297.
- 20) TRINKAUS, J. P. (1976).—*Cell surface review, vol. 1 the cell surface in animal embryogenesis and development*. North-Holland, Amsterdam.
- 21) WEIBEL, E. R. (1979).—*Stereological Methods, Vol. 1, Practical methods for biological morphology*. Academic Press, New York.
- 22) WEIBEL, E. R.; STAUBLI, W.; GNAGI, H. R., y HESS, F. A. (1969).—Correlated morphometric and biochemical studies on the rat liver cell. I. Morphometrical model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell Biol.*, **42**, 68.
- 23) WEIBEL, E. R., y BOLENDER, R. P. (1973).—Stereological techniques for electron microscopy morphometry. En HAYAT, M. A.: *Principles and techniques of electron microscopy, Vol. 3*. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- 24) WILLIAMS, M. (1977).—Stereological techniques. En GLAUERT, A. M.: *Practical methods in Electron microscopy, Vol. 6*. North-Holland, Amsterdam.