

TRABAJO FIN DE MASTER

**Estudio de los vasos
extraembrionarios en el
embrión de pollo**
(Gallus gallus domesticus)

presentada por: Amaya Loidi Castillo

Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza



Universidad
Zaragoza

CERTIFICACIÓN



Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza

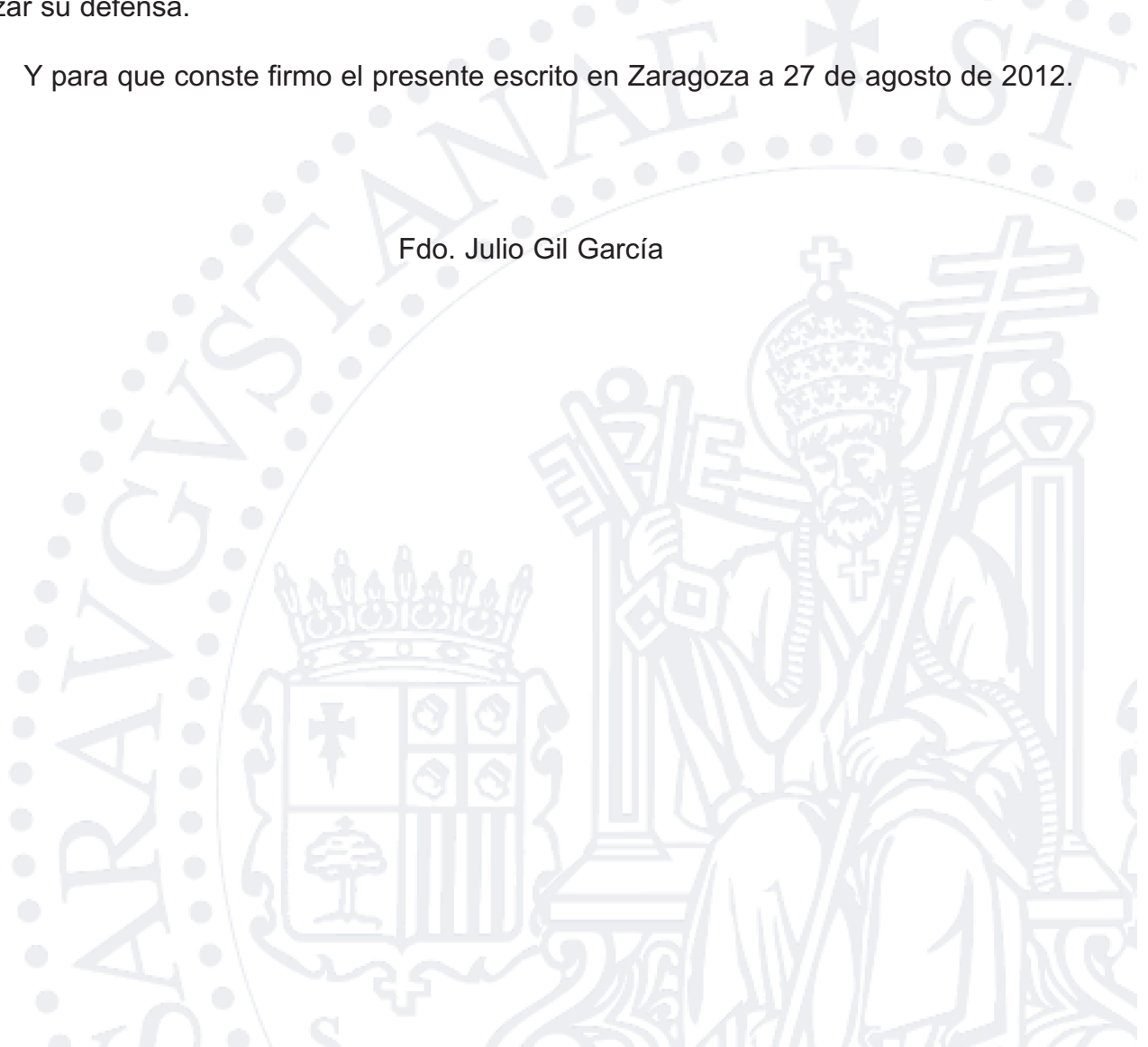
D. Julio Gil García, Profesor Titular de Universidad en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

Certifica:

Que el trabajo titulado, **Estudio de los vasos extraembrionarios en el embrión de pollo** (*Gallus gallus domesticus*), que se recoge en el presente Trabajo Fin de Máster, ha sido realizado bajo mi dirección por D. Amaya Loidi Castillo, en los laboratorios del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal. Estando en condiciones de realizar su defensa.

Y para que conste firmo el presente escrito en Zaragoza a 27 de agosto de 2012.

Fdo. Julio Gil García



DEDICATORIA / AGRADECIMIENTOS

Agradezco al grupo SADA por los ejemplares donados para la realización de este trabajo.

Y a la Dra. Teresa Tejedor, sus sugerencias para escoger las pruebas estadísticas más adecuadas a los datos obtenidos.

Quiero dedicar este trabajo a mi familia y amigos por haber estado siempre a mi lado, apoyándome, escuchándome y ayudándome cuando veían que les necesitaba.

A mis compañeras de departamento por hacerme el trabajo más ameno.

Y finalmente al director del mismo, el Dr. Dn. Julio Gil García por la paciencia y comprensión mostrada, su dedicación y el trato recibido.

ÍNDICE

Introducción	1
- Formación de los vasos sanguíneos extraembrionarios.	3
- La circulación corioalantoidea.	5
- Objetivo del trabajo.	6
Material y métodos	7
- Embriones.	9
- Estadio 14 de desarrollo.	9
- Estadio 15 de desarrollo.	10
- Estadio 16 de desarrollo.	11
- Estadio 17 de desarrollo.	12
- Estadio 18 de desarrollo.	13
- Protocolo de incubación.	14
- Material gráfico.	15
- Codificación de los vasos.	17
- Medida de la densidad vascular.	20
- Análisis estadístico.	23
- Filmación del desarrollo.	24
- Bloqueo de los vasos.	25
Resultados	29
- Material gráfico.	31
- Medida de la densidad vascular.	31
- Correlación dentro de cada estadio.	35
- Correlación entre estadios.	45
- Test de Kolmogorov-Smirnov.	51
- Filmación del desarrollo.	61
- Bloqueo de los vasos.	61
Discusión	63
Conclusiones	69
Bibliografía	73

INTRODUCCIÓN

La historia del embrión de pollo (*Gallus gallus domesticus*) como modelo experimental se remonta al antiguo Egipto, pasa por Aristóteles y continúa hasta nuestros días (Stern, 2004).

En él se han estudiado muchas incógnitas embrionarias ya que es un modelo experimental con un desarrollo rápido y de fácil manejo a la par que poco costoso.

Se han probado dos procesos involucrados en la formación de vasos sanguíneos durante del desarrollo embrionario: a) la vasculogenesis, es decir el desarrollo de vasos sanguíneos a partir del desarrollo in situ de las células endoteliales; b) la angiogenesis, que es el proceso mediante el cual un nuevo vaso crece a partir de otro preexistente. (Risau and Lemmon, 1988, Risau et al., 1988, Pardanad et al., 1989, Poole and Coffin, 1989).

Los vasos del embrión de pollo (*Gallus gallus domesticus*), intraembrionarios y extraembrionarios, vienen utilizándose experimentalmente para estudiar la diferenciación arteriovenosa y su futuro uso en cirugía (Noble et al., 2004); ciertas toxicidades (Rosenbruch and Holst, 1990); así como en la angiogénesis con el objetivo de conseguir resultados extrapolables para el control tumoral (por ejemplo: Siambilis et al., 1996; Nikiforidis et al., 1999; Zhang et al., 2008; Vargas et al., 2007; Ribatti, 2008)

FORMACIÓN DE LOS VASOS SANGUÍNEOS EXTRAEMBRIONARIOS.

En el embrión de pollo (*Gallus gallus domesticus*) los primeros vasos sanguíneos que se forman son los extraembrionarios. Se desarrollan en las membranas extraembrionarias sobre el vitelo, y se denominan vasos onfalomesentéricos o vitelinos.

Se encargan de transportar la sangre entre el saco vitelino y el embrión para que a este le lleguen los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Romanoff en 1960 secuenció un patrón de formación de los vasos sanguíneos del saco vitelino en las siguientes etapas:

Aproximadamente en el estadio 8 del desarrollo, a partir de grupos aislados de células mesodérmicas en el área opaca se forman los islotes sanguíneos. Las células periféricas de cada islote se transformarán en endotelio mientras que las células restantes se diferencian en corpúsculos sanguíneos (Balinsky, 1983).

Los islotes sanguíneos comienzan a crecer hasta fundirse con los adyacentes para formar una red de vasos intercomunicados. La unión de los islotes comienza entre los de la parte proximal del área opaca con los de la parte distal del área pelúcida (Bellairs y Osmond, 2005).

Alrededor del embrión y de sus vasos extraembrionarios se forma el seno terminal que delimita el área vascular del área vitelina.

Los capilares que se forman cerca del cuerpo son relativamente anchos y se transforman en unos mayores, las arterias onfalomesentéricas derecha e izquierda. La sangre pasa de la Aorta Dorsal a las arterias onfalomesentéricas a la altura del par decimotavo de somitos. La sangre circula por una serie de arterias cada vez más pequeñas hasta que finalmente se mueve a través de una malla de finos capilares que se extienden sobre la parte proximal del área vascular. La sangre es recogida por las venas onfalomesentéricas anterior y posterior ya sea directamente o por medio del seno terminal. Estas venas se reúnen en un conducto impar venoso, el ducto venoso, que entra en el seno venoso del corazón (Bellairs and Osmond, 2005).

Aunque el patrón general de los vasos onfalomesentéricos es parecido en distintos individuos, los detalles de la red vascular muestran muchas variaciones. Aquellos capilares, a través de los cuales la sangre fluye más rápidamente llegan a ser vasos grandes (Hughes, 1937).

De acuerdo con Romanoff (1960), los cambios en la circulación durante el tercer día producen que algunos capilares que eran originariamente arteriales se transformen en venas y que el seno terminal comience una regresión sobre el cuarto día (estadio 20). Al final del quinto día se ha formado una densa red de vasos sanguíneos.

LA CIRCULACIÓN CORIOALANTOIDEA.

La membrana corioalantoidea se forma por la fusión del corión y el alantoides. Esta membrana tiene un sistema vascular compuesto por un par de arterias y un par de venas alantoideas (Bellairs and Osmond, 2005)

Las arterias alantoideas salen de la aorta dorsal en un punto mucho más caudal que el punto de partida de las arterias vitelinas.

Las venas vitelinas entran por los conductos de Cuvier derecho e izquierdo. Sin embargo, la arteria umbilical derecha y la vena umbilical derecha desaparecen, adquiriendo la vena umbilical izquierda una nueva conexión central y uniéndose a la vena hepática. (Balinsky, 1983)

El patrón que siguen estos vasos ha sido objeto de numerosos estudios (DeFouw et al., 1989).

La red vascular se extiende con un crecimiento continuo. El alantoides es capaz de producir células endoteliales y hematopoyéticas (Caprioli et al., 2001).

A los 16 días, la membrana corioalantoidea es tan grande que cubre la mayoría del saco vitelino aunque las dos circulaciones permanecen separadas (Romanoff, 1960)

Los vasos de la membrana corioalantoidea llegan hasta la cáscara y sus membranas lo que permite que se pueda producir el intercambio de gases entre la sangre y el exterior (Freeman and Vince, 1974; Paganelli, 1991).

Otra función de estos vasos es transportar los iones de calcio absorbidos de la cáscara cuando las necesidades embrionarias aumentan (Tuan et al., 1991).

La circulación continúa por el alantoides hasta que el pollo rompe la cáscara del huevo y empieza a respirar al aire libre. Entonces los vasos umbilicales se cierran, la circulación cesa y el alantoides se seca y queda separado del cuerpo del embrión (Balinsky, 1983).

La localización inicial de los vasos sanguíneos parece estar determinada genéticamente, y además parece ser que también influyen factores epigenéticos como el metabolismo, la mecánica o la hemodinámica, que juegan un papel significativo en la formación de vasos sanguíneos (Hudlicka, 1991).

Experimentalmente, en áreas del lecho vascular que fueron dañadas o amputadas de forma irreversible, la restauración de la circulación fue llevada a cabo por el crecimiento de nuevos capilares para reestablecer una nueva red vascular (Shoefel, 1964).

Objetivo del trabajo.

De lo expuesto en los anteriores párrafos se concluye que el estudio del desarrollo de la vascularización sobre el modelo que nos ofrece el embrión de pollo (*Gallus gallus domesticus*), es una activa e interesante área de investigación, con importantes potenciales aplicaciones, clínicas y otras integradas dentro de la Biología del Desarrollo.

En el conjunto de estudios ya realizados, hay importantes carencias sobre el conocimiento morfológico del desarrollo de los vasos extraembrionarios.

Objetivo de este trabajo experimental será contribuir a un mejor conocimiento de los aspectos morfológicos que se puedan observar en algunos estadios precoces del desarrollo embrionario.

Metodológicamente el objetivo del trabajo se centrará en intentar averiguar si:

- Las respectivas densidades vasculares intraembrionarias y extraembrionarias siguen alguna pauta.
- El bloqueo de un vaso extraembrionario, compatible con la supervivencia del embrión, provoca algún tipo de compensación vascular detectable densitométricamente y/o morfológicamente.

MATERIAL y MÉTODOS

Embriones

Se han utilizado embriones procedentes de huevos fértiles de gallina (*Gallus gallus domesticus*, Linneo 1758) variedad Ros con 38-40 semanas de edad. En total se han utilizado 606 huevos que habitualmente se manipulaban en lotes de 30.

Los embriones utilizados se incubaron entre los estadios 14 y 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915), que morfológicamente están caracterizados por:

Estadio 14. 22 somitos. 50-53 horas.

En la flexura craneal los ejes del prosencéfalo y del rombencéfalo forman un ángulo casi recto. La flexión cervical describe una amplia curva. La rotación del cuerpo se produce a la altura de los somitos 7-9. Detrás de este nivel, aparece una ligera flexura conocida como la ***flexura del tronco***.

Los arcos viscerales 1 y 2 y las hendiduras 1 y 2 se definen. Los arcos posteriores no están definidos.

La vesícula óptica primaria comienza a invaginarse; la lente se forma. Se abren los conductos auditivos. La bolsa de Rathke se puede reconocer. La torsión ventricular del corazón se encuentra ventral al canal atrio-ventricular.

El amnión se extiende por los somitos 7-10.



Figura 1: Estadio 14 (Hamburger y Hamilton, 1915)

Estadio 15. 50-55horas.

Los pliegues laterales del cuerpo se extienden hasta los somitos 15-17.

Las posibles áreas donde se desarrollaran las extremidades todavía no están demarcadas. Existe una discreta condensación de mesodermo a la altura de la futura ala.

Hay unos 24-27 somitos.

El amnión se extiende por los somitos 7-14.

En la flexura craneal: los ejes del prosencéfalo y del romboencéfalo forman un ángulo agudo. Los contornos ventrales de ambos están casi paralelos. La flexura cervical describe una amplia curva. El tronco está definido. La rotación se extiende de los somitos 11 a 13.

El arco visceral 3 y la hendidura 3 se definen. Este último es más corto que la hendidura 2 y normalmente tiene forma oval.

La copa óptica está completamente formada; un doble contorno se define en la región del iris.



Figura 2: Estadio 15 (Hamburger y Hamilton, 1915)

Estadio 16. 51-56horas.

Los pliegues laterales del cuerpo se extienden por los somitos 17-20, entre las alas y las patas.

Las alas se forman a partir de blastodermo de los pliegues laterales del cuerpo, se observa una cresta. El primordio de la pierna está todavía plano, representado por una condensación de mesodermo.

Hay unos 26-28 somitos.

El amnión se extiende por los somitos 10-18.

Todas las flexuras están más acentuadas que en el estadio 15. La rotación se extiende por los somitos 14-15.

El primordio de la cola es un cono corto y recto, delimitado por blastodermo.

La tercera hendidura todavía tiene forma oval.

Alargamiento del prosencéfalo; las constricciones entre las partes del cerebro se acentúan. La epífisis está indefinida o sin formar todavía.



Figura 3: Estadio 16 (Hamburger y Hamilton, 1915)

Estadio 17. 52-64horas.

Los pliegues laterales del cuerpo se extienden alrededor de toda la circunferencia del cuerpo.

Los primordios de las alas y de las patas se forman a partir de blastodermo de los pliegues laterales del cuerpo. Ambos están definidos por una zona inflamada de igual tamaño.

Hay unos 29-32 somitos.

Existe una considerable variabilidad en el amnión; el tronco posterior y la cola desde aproximadamente el somito 26 están sin cubrir excepto en un orificio oval sobre los somitos 28-36.

La flexura craneal no cambia. La flexura cervical está más curvada que en estadios anteriores pero su ángulo todavía es mayor de 90°. La flexura del tronco se define en el nivel braquial. La rotación se extiende a los somitos 17-18.

El primordio de la cola se curva centralmente. Está formado por mesodermo.

La epífisis se define como una protuberancia. Existen indicios de las fosas nasales.

El alantoides no está todavía formado.



Figura 4: Estadio 17 (Hamburger y Hamilton, 1915)

Estadio 18: 65-69horas.

Los primordios de las extremidades se agrandan; los primordios de las piernas crecen más ligeramente que los primordios de las alas.

Hay unos 30-36 somitos.

El amnión normalmente está cerrado, a veces aparece un orificio oval en la región lumbar.

En la flexura cervical, el eje de la medula forma, aproximadamente, un ángulo recto con el eje del tronco posterior. La flexura del tronco se desplaza a la región lumbar. La rotación se extiende a la parte posterior del cuerpo.

El primordio de la cola se gira a la derecha formando un ángulo de unos 90° con el eje del tronco posterior.

El proceso maxilar está ausente o no se aprecia. La cuarta hendidura está sin definir o ausente.

El alantoides es una bolsa pequeña y gruesa, todavía no es vesicular.

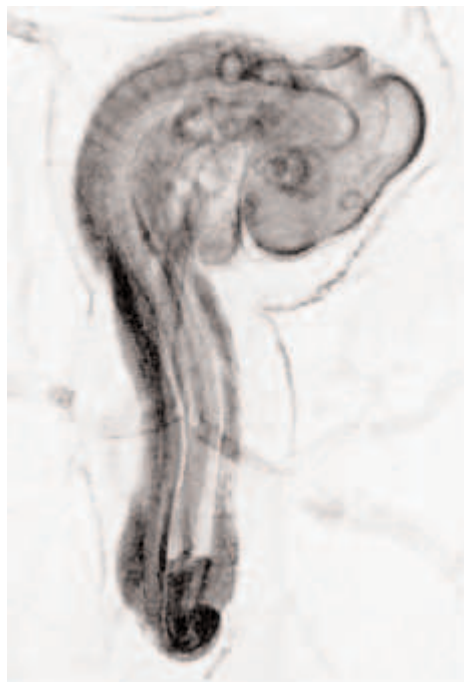


Figura 5: Estadio 18 (Hamburger y Hamilton, 1915)

Protocolo de incubación.

El protocolo de trabajo conlleva las siguientes fases:

- La cáscara del huevo se limpiaba con agua y etanol (Panreac) al 90%.
 - De cada huevo se extraían unos 7ml de albúmina, mediante un orificio practicado en el polo más agudo del huevo. Orificio que luego se cerraba con cinta adhesiva. Con esto se consigue disminuir el nivel hidrostático del albumen que envuelve al embrión, quedando protegido en manipulaciones subsiguientes.
 - Incubación (incubadora marca Memmert) durante un máximo de tres días, a 38°C y humedad a saturación, mediante la inclusión de recipientes con agua dentro de la incubadora. Los huevos se disponían sobre regletas de madera con una marca en su parte superior, destinada a mantener localizable la parte donde encontraremos el embrión en la mayoría de casos según la regla de von Baer (Von Baer, 1828).
 - El segundo día de incubación se procedía a la apertura de una ventana en la parte superior del huevo por la que se podía observar y manipular el embrión. Esta ventana era cubierta con cinta adhesiva transparente antes de retornar el huevo a la incubadora, para evitar la deshidratación del embrión.
 - En el tercer día de incubación se retiraba el celo para obtener información gráfica sobre el desarrollo embrionario.
- Como consecuencia de la manipulación y del transporte se apreció un desfase de unas 6 horas entre el desarrollo observado y el descrito en los libros. Así, en los libros, a las 72 horas de incubación se obtienen embriones de 35 somitos en el estadio 18. Sin embargo, los que se iban obteniendo durante la investigación estaban alrededor de los estadios 14, 15, 16 o 17. Este desfase puede considerarse normal y asignable a un tiempo de activación preciso tras la latencia en que quedan sometidos los embriones por la falta de continuidad entre la puesta y el comienzo de la incubación.
- En algunos lotes de huevos se prolongó la incubación un día más, y así disponer de información comparativa sobre etapas posteriores a las que focalizaron la experimentación.

Material Gráfico

Para la obtención de todas las fotografías y vídeos se ha usado un microscopio digital (Reflecta DigiMicroscope USB de 200 aumentos y resolución de 2 megapíxeles) capaz de almacenar las filmaciones en un ordenador (Acer Extensa 5620Z) a través de un puerto USB.

Otros procedimientos como: microscopía de fluorescencia y laser doppler (ver Figuras 1, 2 y 3), se mostraron inadecuados a nuestro objetivo. Bien por alterar la morfología normal de los vasos embrionarios; bien por carecer de sensibilidad para detectar el flujo vascular en estos estadios embrionarios tempranos.

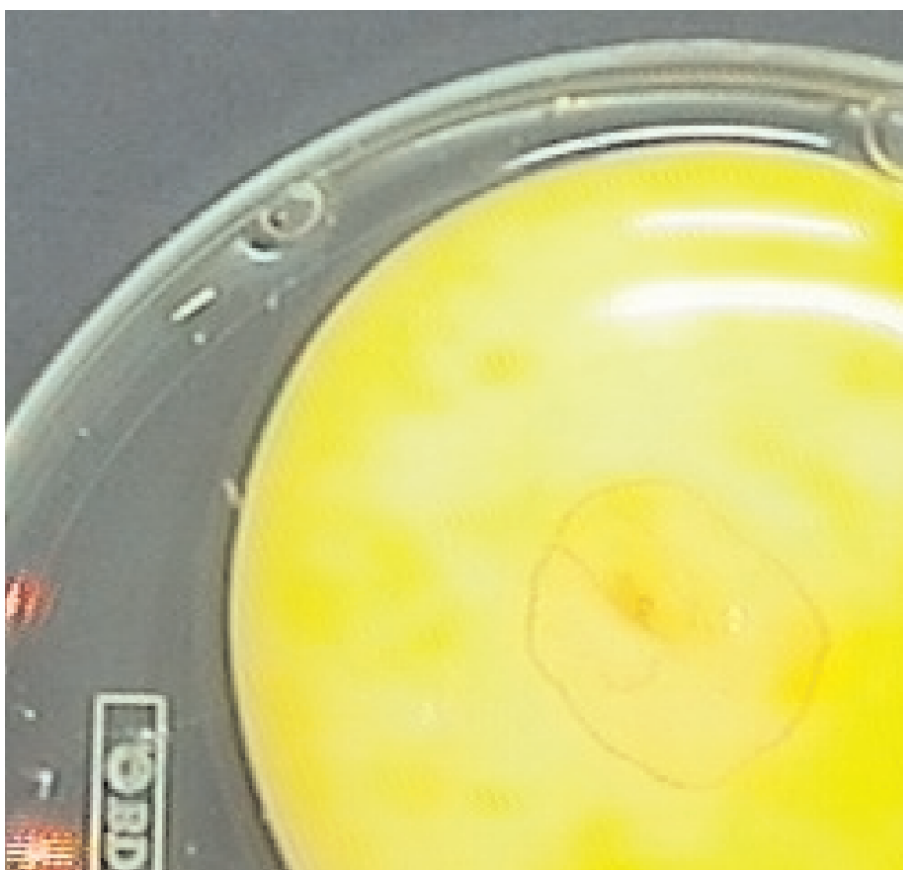
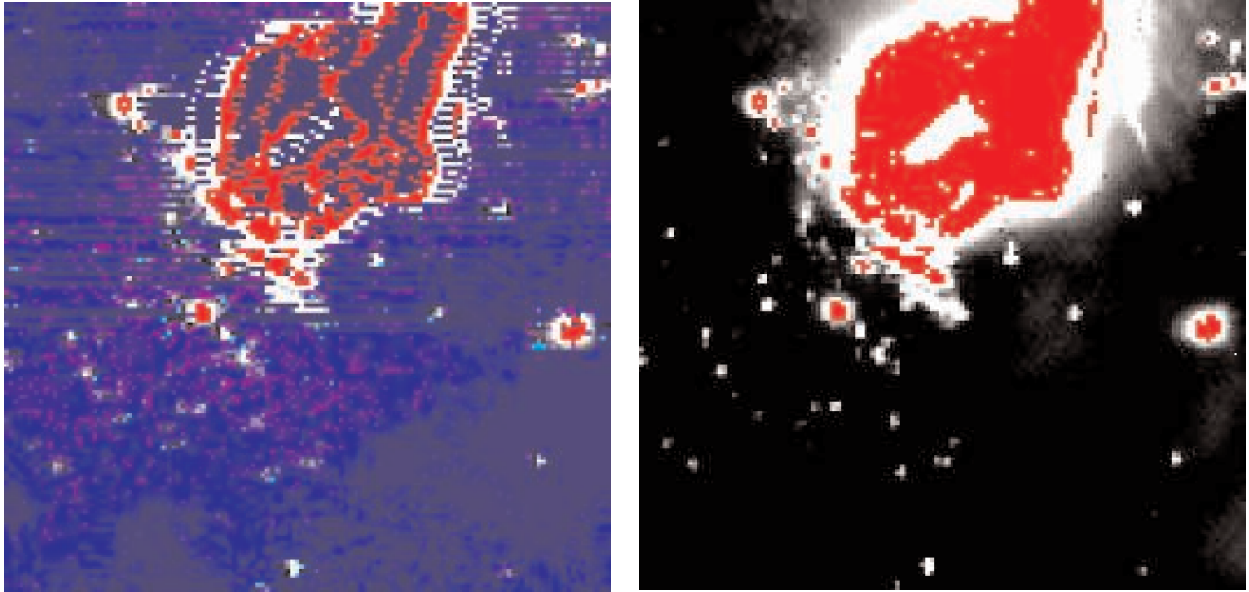


Figura 1: embrión fotografiado con la cámara del laser doppler.



Figuras 2 y 3: imágenes obtenidas aplicando el laser doppler. En ninguna de ellas se aprecia el flujo sanguíneo. En la imagen de la izquierda los artefactos que se aprecian están producidos por los latidos del corazón del embrión.

Las imágenes obtenidas mediante el microscopio USB se clasificaron según el estadio embrionario, tal y como se referencian por Hamburger y Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1915), determinado a partir de la morfología del embrión y de sus vasos corioalantoideos, así como en los intraembrionarios, especialmente en el número de arcos aórticos ya que debido a la resolución de las imágenes determinar el número de somitos no era posible, por quedar enmascarados bajo otras estructuras embrionarias.

Codificación de los vasos

Para esta fase del trabajo, y muy especialmente para las que vendrán en años posteriores, es esencial identificar morfológica y semánticamente los vasos. En ausencia de una referencia normalizada para los vasos extraembrionarios hasta el nivel de ramificación que estudiamos, decidimos establecer un sistema que codificaba los vasos. Este sistema utiliza el siguiente código alfanumérico, mediante el que se pueden nombrar los vasos en un lenguaje interpretable por un autómata finito (ver Figuras 5 y 6).

- Cada rama se identificó con una letra que hace referencia a su orientación con respecto a la de referencia (U, L, D o R)
- Los números son enteros y hacen referencia tanto a la rama como al orden de ramificación.
- Del embrión parten los vasos principales que identificamos como U1, L1, D1 y R1.
- Cada uno de estos se consideró como una referencia independiente de los otros vasos principales. Y respecto a él se estableció una orientación para todas sus ramas.
- Los números se colocaban en orden correlativo. Los más altos se adjudicaban a niveles de ramificación más alejados. En puntos donde emergían varios vasos, todos obtenían el mismo número y solo diferían en la letra que indicaba su orientación.

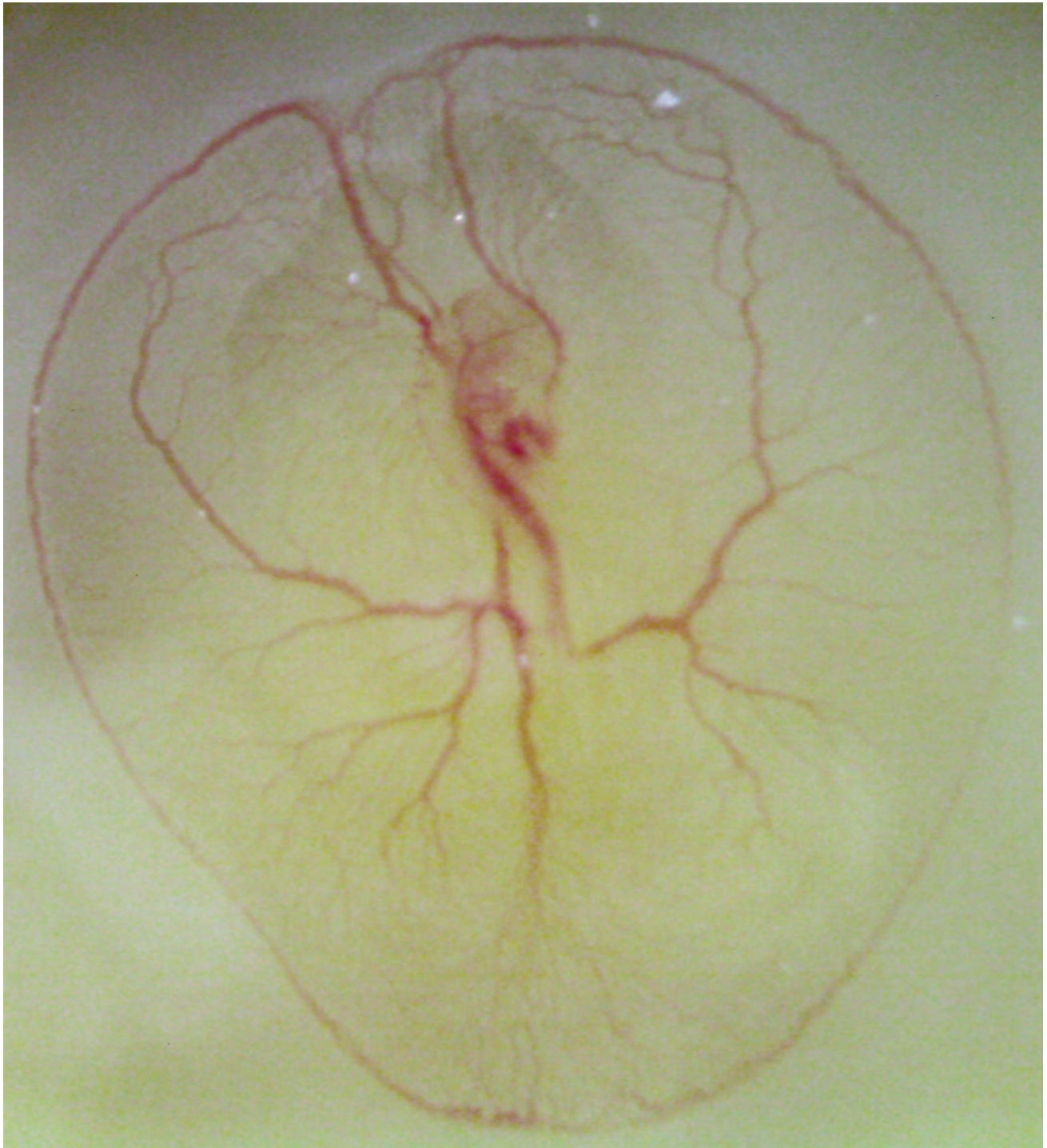


Figura 5: fotografía obtenida con el microscopio USB.

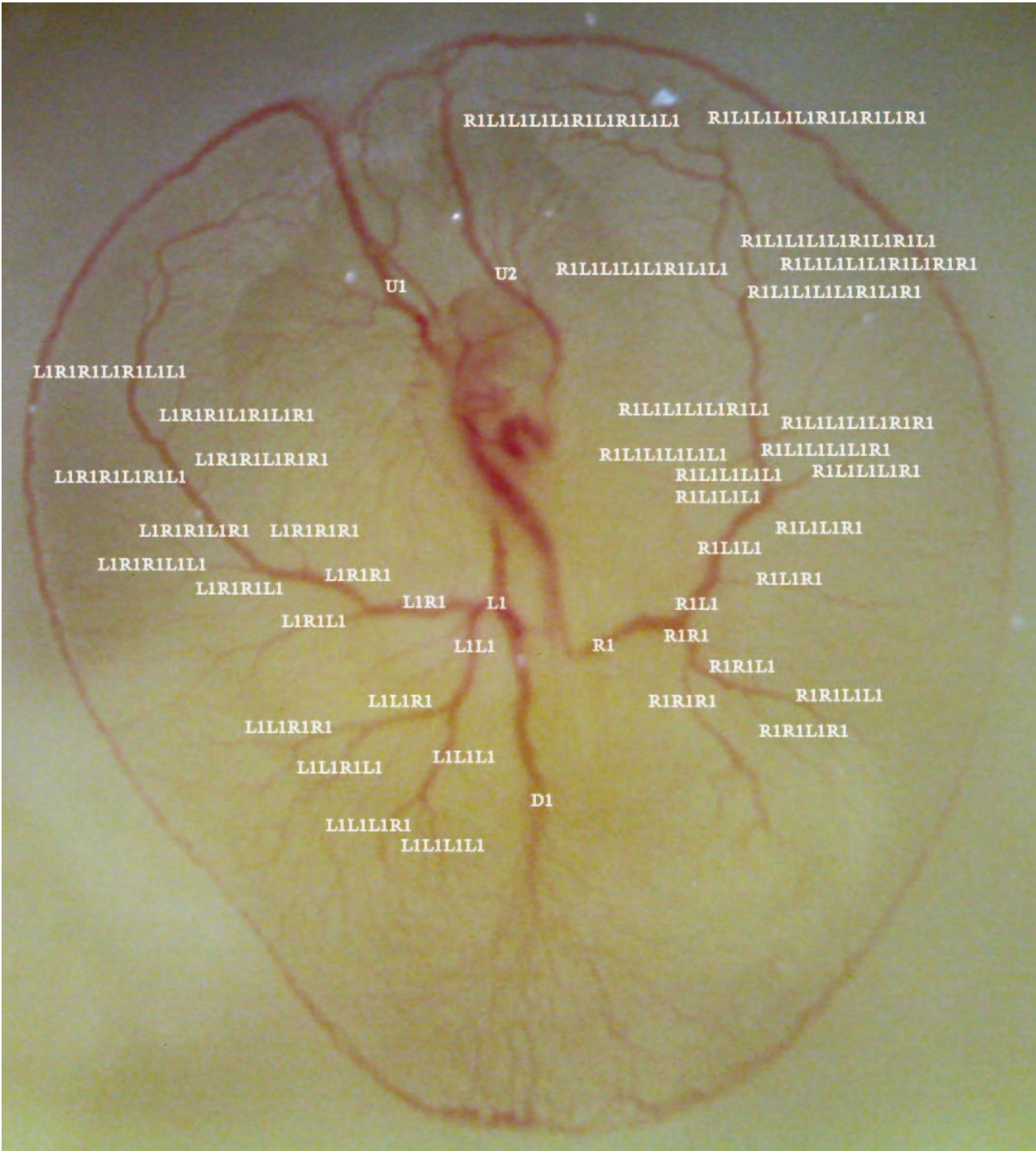


Figura 6: Embrión con su codificación de vasos superpuesta.

Medida de la Densidad Vascular.

Con las imágenes conseguidas se procedió a medir la densidad vascular de cada embrión.

Para ello, cada imagen se analizó empleando las prestaciones que ofrece el programa Adobe PhotoShop 8.0.1 como analizador de imágenes (ver Figuras 7, 8 y 9). La rutina que se siguió fue:

- A cada imagen se le aplicó el filtro “Fotocopia” con el detalle al máximo y la medida de la oscuridad hacia la mitad. Con esto se conseguía visualizar todas las zonas vascularizadas.
- A continuación, se recortaba el área donde se localizaba el embrión y su membrana corioalantoidea. Y se pegaba en un documento en blanco.
- Con la ayuda de la herramienta “Varita mágica” se seleccionaba toda la zona no ocupada por los vasos sanguíneos. Y se anotaban los píxeles ocupados.
- Se invertía la selección y se anotaban los píxeles ocupados. La suma de los dos valores correspondía con el área total del árbol vascular.
- A partir de la primera imagen se separaba el embrión de la MCA y se repetían los pasos para calcular el área ocupada por los vasos intraembrionarios y la ocupada por los extraembrionarios.



Figura 7: densidad total del árbol vascular.



Figura 8: densidad vascular de la membrana corioalantoidea.



Figura 9: densidad vascular del embrión.

Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos se estudió la posible correlación entre la densidad vascular observada en el embrión y en la membrana corioalantoidea dentro de cada estadio. Este estudio se llevo a cabo calculando el coeficiente de correlación de Pearson entre ambos datos (George D and Mallery P, 2011).

Así mismo, aunque todos los embriones están fotografiados a la misma escala, para corregir las diferencias en el desarrollo embrionario de cada embrión se ha relativizado la densidad vascular de la membrana corioalantoidea al tamaño del embrión, valorado en función de su densidad vascular. De este modo se ha conseguido estudiar la posible correlación entre los distintos estadios fotografiados. El estudio de esta posible correlación se ha realizado aplicando la prueba T (George D and Mallery P, 2011).

Para poder detectar las diferencias entre estadios se han analizado dos a dos los resultados obtenidos mediante un test de Kolmogorov-Smirnov (George D and Mallery P, 2011).

La parte mecánica del análisis estadísticos se llevó a cabo mediante el programa estadístico SPSS 19.0 fabricado por IBM. Las pruebas estadísticas se calibraron para un nivel de seguridad del 95% (George D and Mallery P, 2011).

Filmación del desarrollo.

Para disponer de una visualización de los cambios continuos que acontecen entre los estadios estudiados, conseguimos una filmación del desarrollo vascular extraembrionario. Se utilizó el microscopio USB conectado al ordenador que iría registrando imágenes en intervalos fijos de tiempo. Posteriormente estas imágenes se unirían en una película. Para un mejor control de la filmación, se construyó una incubadora para la obtención de las imágenes (ver Figuras 10 y 11)



Figura 10: interior de la incubadora en el que se aprecia la fuente de calor.

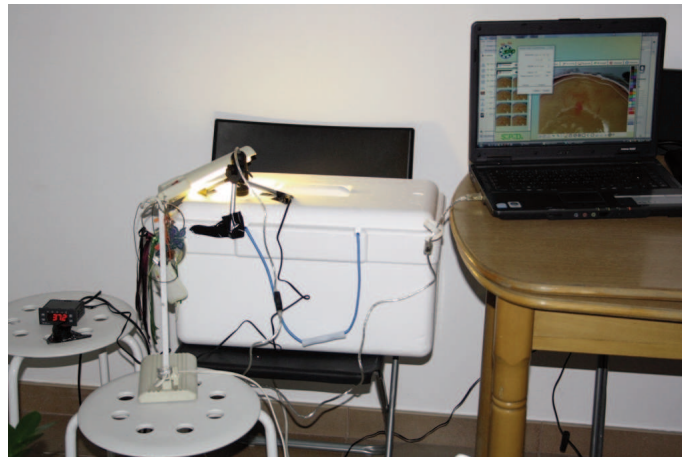


Figura 11: toma de imágenes.

La toma de imágenes comenzó a las 55 horas de incubación. El microscopio se programó para que captase una imagen del embrión cada tres minutos.

Bloqueo de los vasos

Algunos vasos principales se bloquearon selectivamente para estudiar las posibles consecuencias vasculares derivadas de esta acción. La manipulación previa antes de la incubación se realizó de igual modo que en la primera experiencia. Los huevos se abrían aproximadamente a las 55 horas de incubación y se procedía a bloquear, o anular, ciertos vasos bien referenciados por nuestro sistema de codificación. Después se devolvían a la incubadora.

Al día siguiente se procedía a bloquear los vasos de los embriones cuyo desarrollo había sido más lento y aquellos que no habían sido correctamente realizados el día anterior. Se continuaba con su incubación y al día siguiente se comprobaban los resultados obtenidos.

El bloqueo de los vasos se comenzó a realizar cauterizándolos con una aguja al rojo. Sin embargo, este método implicaba una alta mortalidad de los embriones por lo que se decidió cambiar de técnica y bloquear los vasos mediante compresión de los mismos con unas pinzas el tiempo suficiente para conseguir anular la vascularización vehiculada por dicho vaso (ver Figuras 12, 13, 14, 15 y 16)

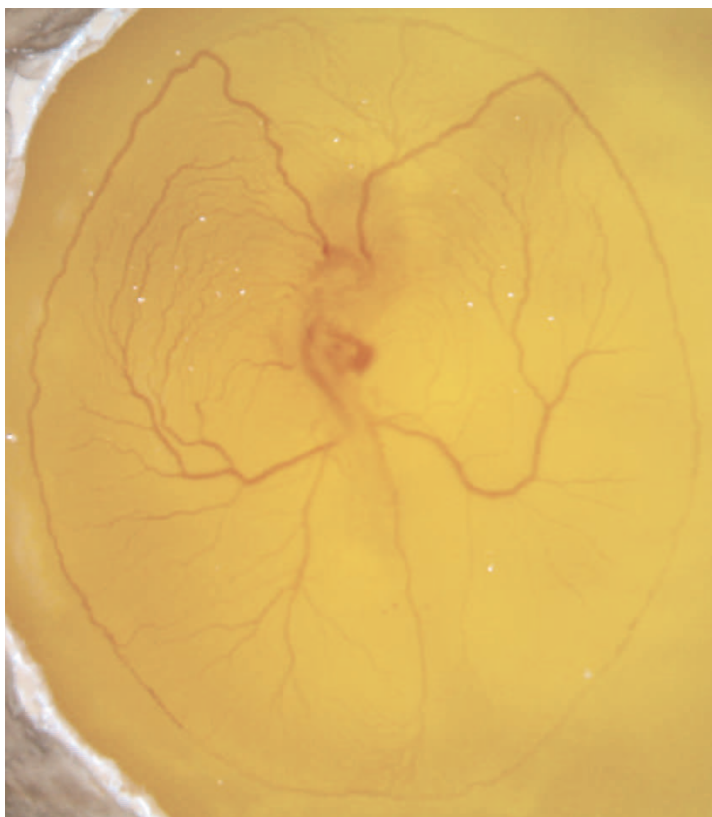


Figura 12: embrión en estadio 15.

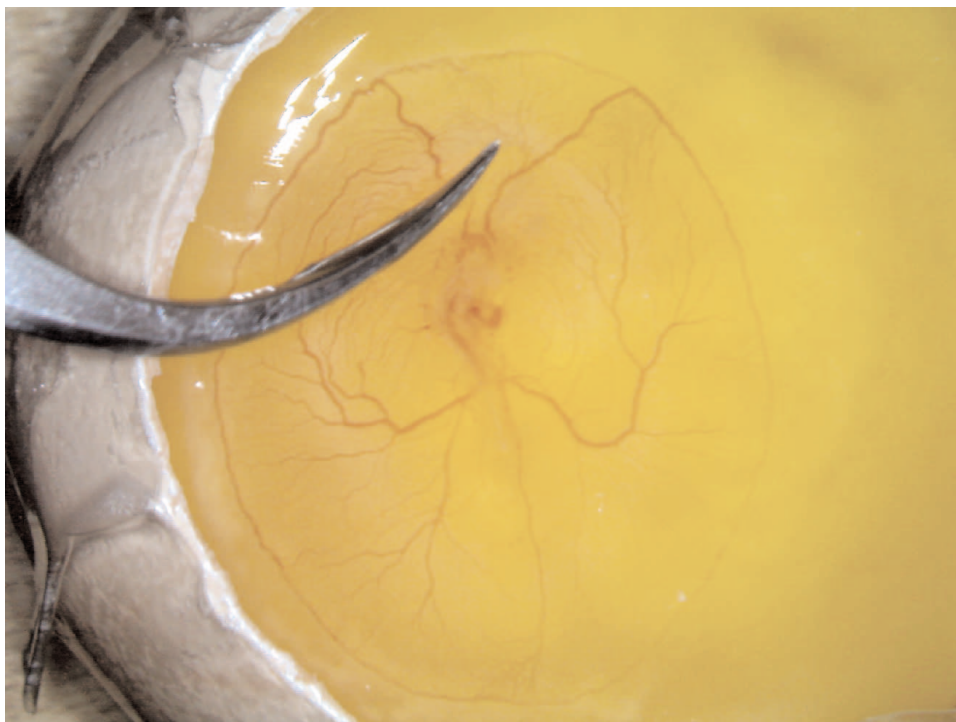


Figura 13: bloqueo por compresión.



Figura 14: venas vitelinas craneales derecha e izquierda bloqueadas.

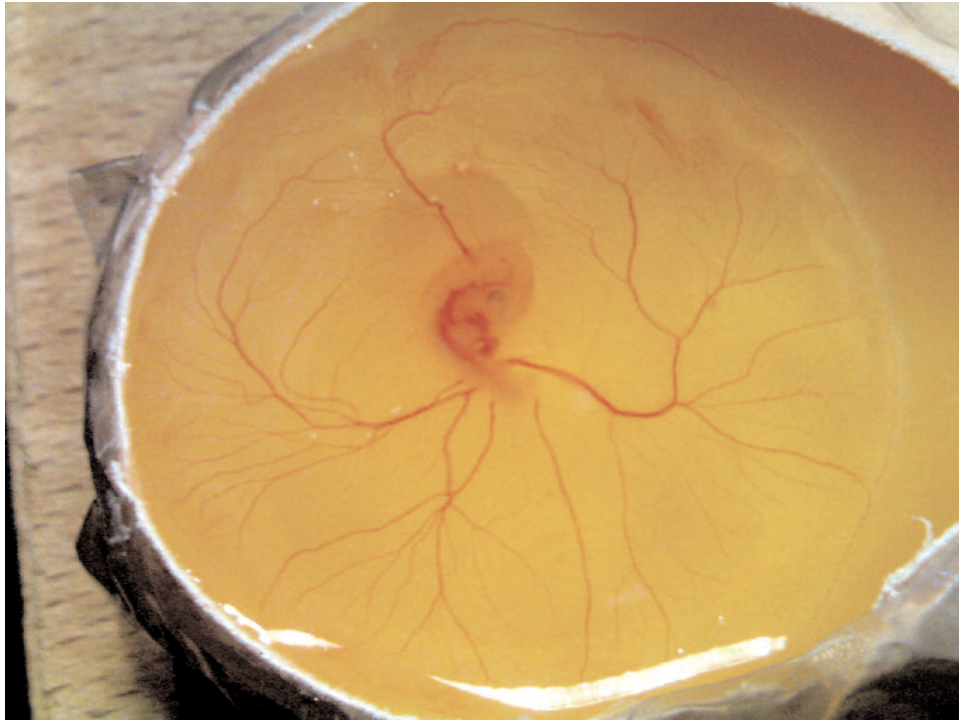


Figura 15: resultado del bloqueo.

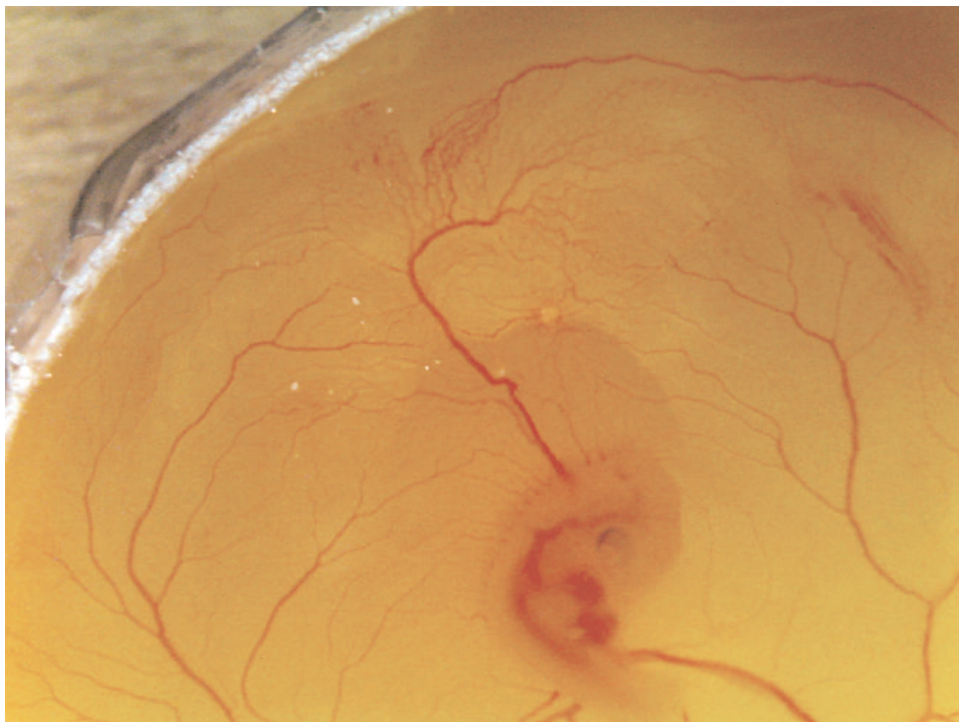


Figura 16: detalle de las venas vitelinas craneales inmediatamente después del bloqueo.

RESULTADOS

Material Gráfico

Se obtuvieron 99 imágenes de embriones en distintos estadios embrionarios:

- Once embriones en el estadio 14.
- Veintinueve embriones en el estadio 15.
- Veintiséis embriones en los estadios 16 y 17.
- Siete embriones en el estadio 18.

Cada una de estas imágenes se codificó según lo explicado en el apartado material y métodos. Las codificaciones recogidas para cada embrión servirán como base para futuros análisis morfométricos sustentados en la medida de la complejidad vascular según su entropía.

Las imágenes obtenidas están recogidas en el CD que acompaña a este trabajo (Anexo I).

Medida de la Densidad Vascular.

Después de aplicar el procedimiento descrito en el apartado anterior, las densidades vasculares medidas en píxeles obtenidas fueron las que se detallan en la Tabla 1 para la el árbol vascular (D.V. ÁRBOL VASCULAR), el embrión (D.V. EMBRIÓN) y la membrana corioalantoidea (D.V. MCA).

Las imágenes a partir de las cuales se obtuvieron las distintas densidades vasculares están recogidas en el CD que acompaña a este trabajo (Anexo II).

Tabla 1.

EMBRIÓN	D.V. ÁRBOL VASCULAR	D.V. EMBRIÓN	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA	ESTADIO
1	118576	134791	118591	1.136603958	15
2	116174	147986	116272	1.272756984	15
3	395376	409395	395625	1.034805687	14
4	104421	137316	104405	1.315224367	15
5	231286	245907	231410	1.062646385	16
6	237095	243382	237229	1.025936964	14
7	185617	194524	186095	1.04529407	14
8	312611	326635	312854	1.044049301	15
9	174655	181391	174208	1.04123232	17
10	315331	325286	315336	1.031553644	15
11	209126	223457	208701	1.070704022	16
12	273804	280709	274420	1.022917426	16
13	268732	282420	268798	1.05067746	16
14	313446	330713	313553	1.05472759	16
15	306159	315768	306244	1.031099385	17
16	240809	257723	240670	1.070856359	17
17	193256	211094	193362	1.091703644	16
18	203558	211162	203632	1.036978471	16
19	193233	197024	193304	1.019244299	14
20	145435	165726	145206	1.141316475	16
21	244509	270834	244570	1.107388478	17
22	248895	254023	248963	1.020324305	15
23	172284	177568	172339	1.030341362	14
24	239912	247113	239995	1.029658951	15
25	313161	325283	313072	1.039003807	16
26	258128	265243	258036	1.027930211	17
27	218161	229240	218227	1.050465799	16
28	224684	233145	224811	1.03707114	17
29	203029	220303	203116	1.084616672	16
30	182539	188334	182511	1.031904926	14
31	305978	312190	305717	1.021173176	15
32	336248	347917	336278	1.034611244	16
33	219736	229921	218841	1.050630366	15

34	275261	280643	275362	1,019178391	16
35	278146	284637	278151	1,02331827	16
36	282980	297203	283121	1,049738451	17
37	305780	324788	305808	1,062065087	17
38	344543	353286	344132	1,026600258	16
39	315598	331359	315215	1,051215837	17
40	389090	397809	389183	1,02216438	17
41	277911	286577	278124	1,030392918	14
42	296190	306995	296232	1,036333009	17
43	323706	337011	324154	1,039663246	16
44	263303	269544	263458	1,023100456	15
45	268298	278292	268383	1,036921116	16
46	269992	280822	270079	1,03977725	17
47	138621	146033	138715	1,05275565	15
48	163676	172245	163714	1,052109166	15
49	233062	244229	233105	1,047720984	17
50	188241	195836	188440	1,039248567	17
51	269075	284796	269346	1,057361164	16
52	292301	302660	292363	1,035219915	17
53	137662	144532	137797	1,048876245	15
54	325443	338552	325537	1,039980094	15
55	299595	309169	299708	1,031567392	16
56	377672	395498	377591	1,047424329	16
57	313471	330201	314192	1,050952921	15
58	108121	128738	108164	1,190211161	17
59	375340	397679	375261	1,059739754	14
60	342365	351390	342447	1,02611499	14
61	270860	279640	270734	1,032895757	15
62	302890	317353	303076	1,047106996	15
63	230172	236971	230336	1,028805745	15
64	357001	367182	357058	1,028353937	15
65	112834	133885	112912	1,185746422	17
66	339686	352761	339824	1,038069707	16
67	168469	180804	168374	1,07382375	14
68	360916	373598	362138	1,031645395	16
69	318115	327156	317867	1,029222914	15

RESULTADOS

70	291207	296487	291262	1,017939175	15
71	248050	254635	248328	1,025397861	16
72	167319	172632	167391	1,031309927	14
73	207031	212608	207134	1,026427337	15
74	179367	185744	179436	1,035154596	15
75	348025	355364	348125	1,020794255	15
76	330121	345184	330039	1,045888516	16
77	315741	323747	315501	1,026136209	15
78	290134	295255	290089	1,017808328	15
79	103226	120753	103257	1,169441297	16
80	271606	281167	272081	1,033394467	17
81	235311	241720	235375	1,026956984	16
82	286857	297708	286906	1,037649962	17
83	347297	368506	347338	1,060943519	18
84	341891	353667	342026	1,034035424	17
85	121867	131947	121950	1,08197622	17
86	119700	145878	119727	1,21842191	18
87	335922	348937	336085	1,038240326	15
88	249151	261050	249174	1,047661474	17
89	315847	322278	315425	1,021726242	15
90	371131	378964	371163	1,02101772	17
91	111268	128751	111298	1,15681324	15
92	294842	302845	294681	1,027704535	17
93	330858	343416	330889	1,037858617	18
94	253524	273615	253532	1,07921288	17
95	380385	387718	379962	1,020412568	18
96	100169	111068	100168	1,108817187	18
97	347841	380106	347919	1,092512912	18
98	285114	294139	284826	1,032697155	18
99	395832	406214	396538	1,024401192	17

Aunque todos los embriones fueron fotografiados a la misma escala, para corregir las diferencias en el desarrollo embrionario de cada embrión se ha relativizado la densidad vascular de la membrana corioalantoidea al tamaño del embrión valorado en función de su densidad vascular. Este valor se refleja en la columna D.V CORREGIDA.

Centrándonos en los datos sobre densidad vascular en el embrión y en la membrana corioalantoidea, se procedió a estudiar la posible correlación existente dentro de cada estadio (ver Tablas 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 6.1 y 6.2 y Figuras 17, 18, 19, 20 y 21)

Correlación en el estadio 14 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915).

Tabla 2.1.

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EN EL ESTADIO 14				
EMBRIÓN	D.V. EMBRIÓN	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA	ESTADIO
3	409395	395625	1.034805687	14
6	243382	237229	1.025936964	14
7	194524	186095	1.04529407	14
19	197024	193304	1.019244299	14
23	177568	172339	1.030341362	14
30	188334	182511	1.031904926	14
41	286577	278124	1.030392918	14
59	397679	375261	1.059739754	14
60	351390	342447	1.02611499	14
67	180804	168374	1.07382375	14
72	172632	167391	1.031309927	14

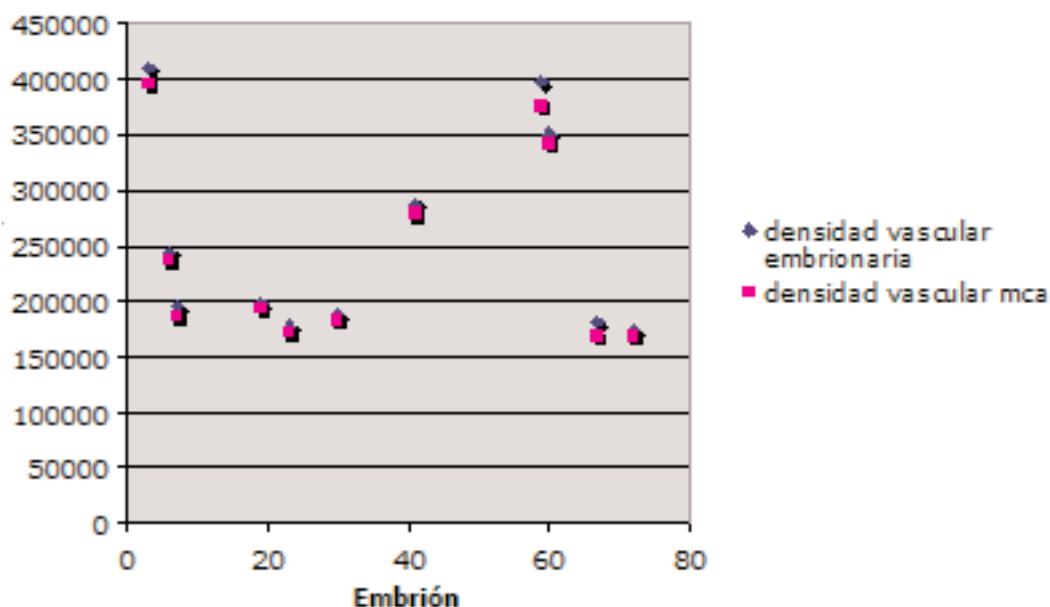


Figura 17: correlación en el estadio 14.

Tabla 2.2. El valor de la correlación de Pearson es de 0.999.

Estadísticos descriptivos			
	Media	Desviación típica	N
D.V.EMBRIÓN	254482,64	91849,580	11
D.V.MCA	245336,36	88050,867	11

Correlaciones			
		D.V.EMBRIÓN	D.V.MCA
D.V.EMBRIÓN	Correlación de Pearson	1	,999**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	11	11
D.V.MCA	Correlación de Pearson	,999**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	11	11
**. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).			

Correlación en el estadio 15 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915).

Tabla 3.1.

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EN EL ESTADIO 15				
EMBRIÓN	D.V. EMBRIÓN	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA	ESTADIO
1	134791	118591	1,136603958	15
2	147986	116272	1,272756984	15
4	137316	104405	1,315224367	15
8	326635	312854	1,044049301	15
10	325286	315336	1,031553644	15
22	254023	248963	1,020324305	15
24	247113	239995	1,029658951	15
31	312190	305717	1,021173176	15
33	229921	218841	1,050630366	15
44	269544	263458	1,023100456	15
47	146033	138715	1,05275565	15
48	172245	163714	1,052109166	15
53	144532	137797	1,048876245	15
54	338552	325537	1,039980094	15
57	330201	314192	1,050952921	15
61	279640	270734	1,032895757	15
62	317353	303076	1,047106996	15
63	236971	230336	1,028805745	15
64	367182	357058	1,028353937	15
69	327156	317867	1,029222914	15
70	296487	291262	1,017939175	15
73	212608	207134	1,026427337	15
74	185744	179436	1,035154596	15
75	355364	348125	1,020794255	15
77	323747	315501	1,026136209	15
78	295255	290089	1,017808328	15
87	348937	336085	1,038240326	15
89	322278	315425	1,021726242	15
91	128751	111298	1,15681324	15

RESULTADOS

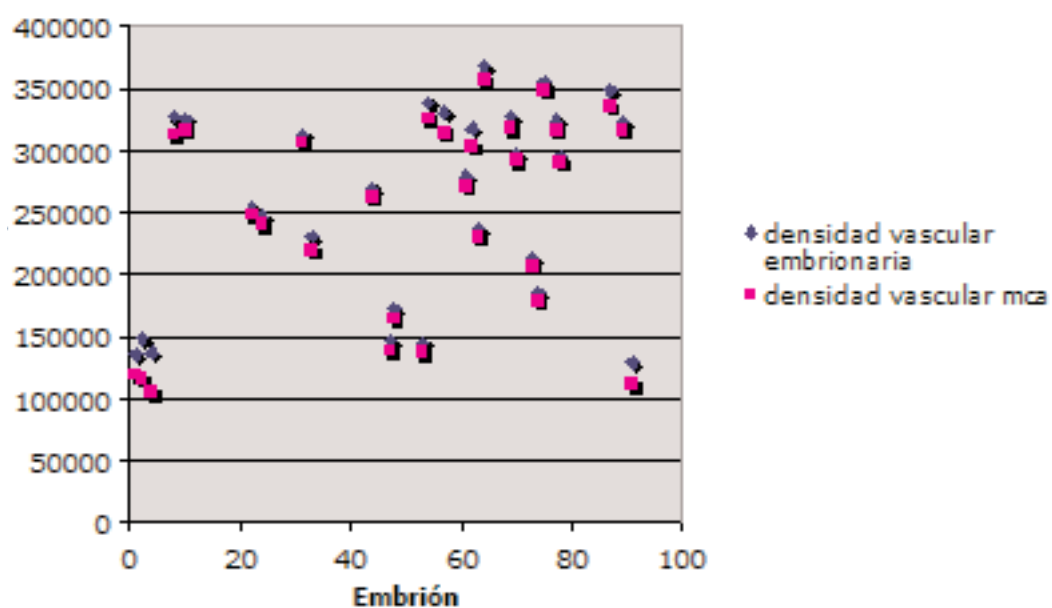


Figura 18: correlación en el estadio 15.

Tabla 3.2. El valor de la correlación de Pearson es de 0,997.

Estadísticos descriptivos			
	Media	Desviación típica	N
D.V.EMBRIÓN	259097,97	78764,366	29
D.V.MCA	248200,45	81449,742	29

Correlaciones			
		D.V.EMBRIÓN	D.V.MCA
D.V.EMBRIÓN	Correlación de Pearson	1	,997**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	29	29
D.V.MCA	Correlación de Pearson	,997**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	29	29

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlación en el estadio 16 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915).

Tabla 4.1.

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EN EL ESTADIO 16				
EMBRIÓN	D.V. EMBRIÓN	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA	ESTADIO
5	245907	231410	1,062646385	16
11	223457	208701	1,070704022	16
12	280709	274420	1,022917426	16
13	282420	268798	1,05067746	16
14	330713	313553	1,05472759	16
17	211094	193362	1,091703644	16
18	211162	203632	1,036978471	16
20	165726	145206	1,141316475	16
25	325283	313072	1,039003807	16
27	229240	218227	1,050465799	16
29	220303	203116	1,084616672	16
32	347917	336278	1,034611244	16
34	280643	275362	1,019178391	16
35	284637	278151	1,02331827	16
38	353286	344132	1,026600258	16
43	337011	324154	1,039663246	16
45	278292	268383	1,036921116	16
51	284796	269346	1,057361164	16
55	309169	299708	1,031567392	16
56	395498	377591	1,047424329	16
66	352761	339824	1,038069707	16
68	373598	362138	1,031645395	16
71	254635	248328	1,025397861	16
76	345184	330039	1,045888516	16
79	120753	103257	1,169441297	16
81	241720	235375	1,026956984	16

RESULTADOS

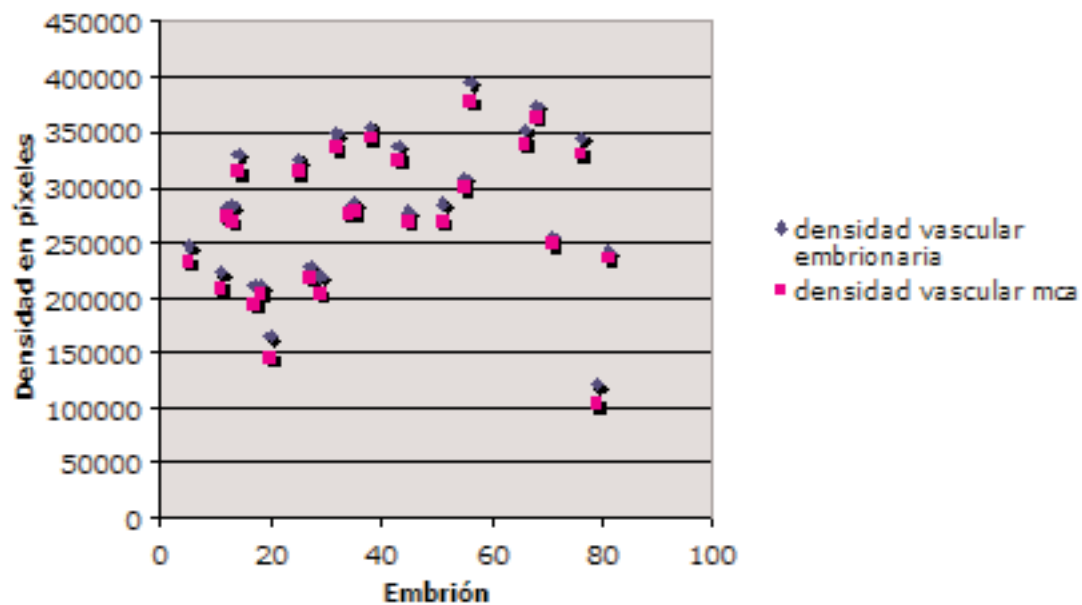


Figura 19: correlación en el estadio 16.

Tabla 4.2. El valor de la correlación de Pearson es de 0,998.

Estadísticos descriptivos			
	Media	Desviación típica	N
D.V.EMBRIÓN	280227,46	66608,316	26
D.V.MCA	267906,27	67447,832	26

Correlaciones			
		D.V.EMBRIÓN	D.V.MCA
D.V.EMBRIÓN	Correlación de Pearson	1	,998**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	26	26
D.V.MCA	Correlación de Pearson	,998**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	26	26

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlación en el estadio 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915).

Tabla 5.1.

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EN EL ESTADIO 17				
EMBRIÓN	D.V. EMBRIÓN	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA	ESTADIO
9	181391	174208	1,04123232	17
15	315768	306244	1,031099385	17
16	257723	240670	1,070856359	17
21	270834	244570	1,107388478	17
26	265243	258036	1,027930211	17
28	233145	224811	1,03707114	17
36	297203	283121	1,049738451	17
37	324788	305808	1,062065087	17
39	331359	315215	1,051215837	17
40	397809	389183	1,02216438	17
42	306995	296232	1,036333009	17
46	280822	270079	1,03977725	17
49	244229	233105	1,047720984	17
50	195836	188440	1,039248567	17
52	302660	292363	1,035219915	17
58	128738	108164	1,190211161	17
65	133885	112912	1,185746422	17
80	281167	272081	1,033394467	17
82	297708	286906	1,037649962	17
84	353667	342026	1,034035424	17
85	131947	121950	1,08197622	17
88	261050	249174	1,047661474	17
90	378964	371163	1,02101772	17
92	302845	294681	1,027704535	17
94	273615	253532	1,07921288	17
99	406214	396538	1,024401192	17

RESULTADOS

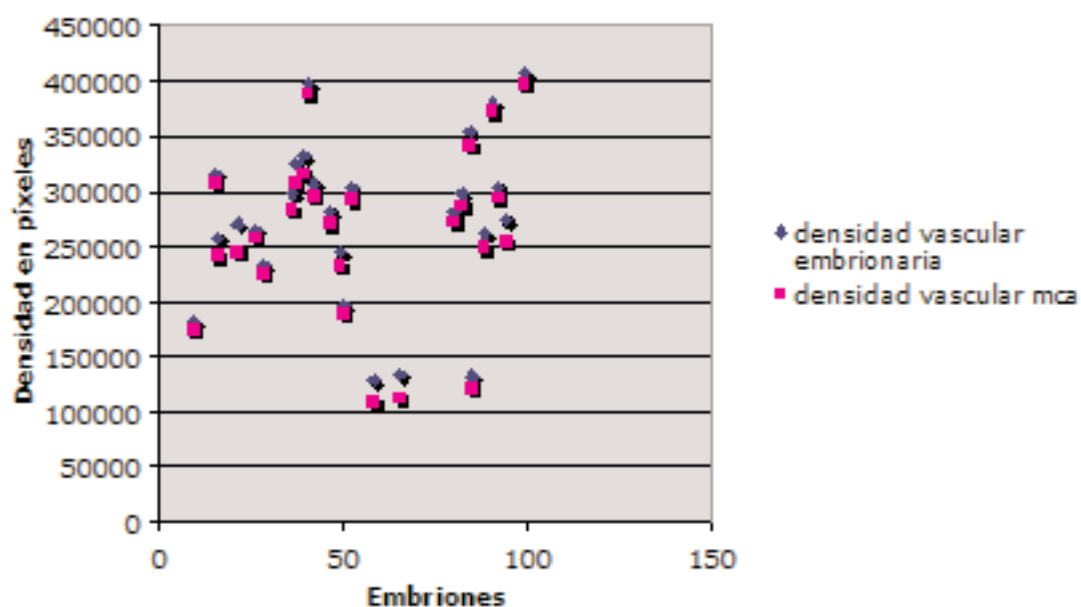


Figura 20: correlación en el estadio 17.

Tabla 5.2. El valor de la correlación de Pearson es de 0,998.

Estadísticos descriptivos			
	Media	Desviación típica	N
D.V.EMBRIÓN	275215,58	74930,063	26
D.V.MCA	262738,92	76299,414	26

Correlaciones			
		D.V.EMBRIÓN	D.V.MCA
D.V.EMBRIÓN	Correlación de Pearson	1	,998**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	26	26
D.V.MCA	Correlación de Pearson	,998**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	26	26

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlación en el estadio 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915).

Tabla 6.1.

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EN EL ESTADIO 18				
EMBRIÓN	D.V. EMBRIÓN	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA	ESTADIO
83	368506	347338	1,060943519	18
86	145878	119727	1,21842191	18
93	343416	330889	1,037858617	18
95	387718	379962	1,020412568	18
96	111068	100168	1,108817187	18
97	380106	347919	1,092512912	18
98	294139	284826	1,032697155	18

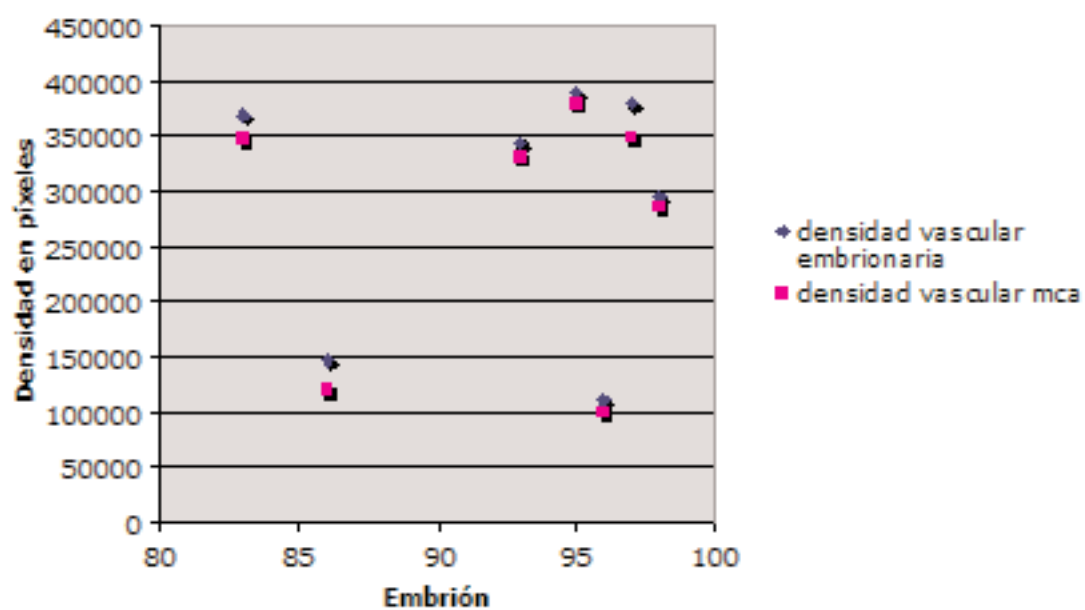


Figura 21: correlación en el estadio 18.

Tabla 6.2. El valor de la correlación de Pearson es de 0,997.

Estadísticos descriptivos			
	Media	Desviación típica	N
D.V.EMBRIÓN	290118,71	115100,828	7
D.V.MCA	272975,57	115061,117	7

Correlaciones			
		D.V.EMBRIÓN	D.V.MCA
D.V.EMBRIÓN	Correlación de Pearson	1	,997**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	7	7
D.V.MCA	Correlación de Pearson	,997**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	7	7

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

A continuación, se procedió a estudiar la posible correlación existente entre estadios. Para ello se utilizó la densidad vascular corregida (ver Tabla 7). Como el tamaño de cada muestra era diferente se optó por una prueba T para calcular la correlación (ver Tablas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Tabla 7.

ESTUDIO DE LA POSIBLE CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE ESTADIOS				
d.corregida e14	d.corregida e15	d.corregida e16	d.corregida e17	d.corregida e18
1,034805687	1,136603958	1,062646385	1,04123232	1,060943519
1,025936964	1,272756984	1,070704022	1,031099385	1,21842191
1,04529407	1,315224367	1,022917426	1,070856359	1,037858617
1,019244299	1,044049301	1,05067746	1,107388478	1,020412568
1,030341362	1,031553644	1,05472759	1,027930211	1,108817187
1,031904926	1,020324305	1,091703644	1,03707114	1,092512912
1,030392918	1,029658951	1,036978471	1,049738451	1,032697155
1,059739754	1,021173176	1,141316475	1,062065087	
1,02611499	1,050630366	1,039003807	1,051215837	
1,07382375	1,023100456	1,050465799	1,02216438	
1,031309927	1,05275565	1,084616672	1,036333009	
	1,052109166	1,034611244	1,03977725	
	1,048876245	1,019178391	1,047720984	
	1,039980094	1,02331827	1,039248567	
	1,050952921	1,026600258	1,035219915	
	1,032895757	1,039663246	1,190211161	
	1,047106996	1,036921116	1,185746422	
	1,028805745	1,057361164	1,033394467	
	1,028353937	1,031567392	1,037649962	
	1,029222914	1,047424329	1,034035424	
	1,017939175	1,038069707	1,08197622	
	1,026427337	1,031645395	1,047661474	
	1,035154596	1,025397861	1,02101772	
	1,020794255	1,045888516	1,027704535	
	1,026136209	1,169441297	1,07921288	
	1,017808328	1,026956984	1,024401192	
	1,038240326			
	1,021726242			
	1,15681324			

RESULTADOS

Tabla 8: Estudio de la correlación entre el estadio 14 y el 15 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,327.

Estadísticos de grupo					
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
D.V.CORREGIDA	14	11	1,03717351346	,016275218008	,004907162864
	15	29	1,05921291870	,072358958036	,013436721182

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
				F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
		Inferior	Superior							
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	3,481	,070	-,993	38	,327	-,022039405240086	,022192313427072	-,066965395025550	,022886584545378
	No se han asumido varianzas iguales			-1,541	34,261	,133	-,022039405240086	,014304744790567	-,051102001443574	,007023190963402

Tabla 9: Estudio de la correlación entre el estadio 14 y el 16. El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,189.

Estadísticos de grupo					
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
D.V.CORREGIDA	14	11	1,03717351346	,016275218008	,004907162864
	16	26	1,05230011236	,035663730294	,006994232949

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
				F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
		Inferior	Superior							
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	2,182	,149	-1,341	35	,189	-,015126598894420	,011283804316586	-,038033939498344	,007780741709503
	No se han asumido varianzas iguales			-1,770	34,669	,085	-,015126598894420	,008543976939344	-,032477719407594	,002224521618754

Tabla 10: Estudio de la correlación entre el estadio 14 y el 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,172.

Estadísticos de grupo									
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media				
D.V.CORREGIDA	14	11	1,03717351346	,016275218008	,004907162864				
	17	26	1,05623357039	,043818730154	,008593560004				

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
									Inferior Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	3,068	,089	-1,393	35	,172	-,019060056929573	,013682870409172	-,046837760628452 ,008717646769307
	No se han asumido varianzas iguales			-1,926	34,730	,062	-,019060056929573	,009895934566004	-,039155453573754 ,001035339714609

Tabla 11: Estudio de la correlación entre el estadio 14 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,138.

Estadísticos de grupo									
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media				
D.V.CORREGIDA	14	11	1,03717351346	,016275218008	,004907162864				
	18	7	1,08166626696	,068380626000	,025845447270				

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
									Inferior Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	8,377	,011	-2,101	16	,052	-,044492753491965	,021180217183713	-,089392808138374 ,000407301154443
	No se han asumido varianzas iguales			-1,691	6,435	,138	-,044492753491965	,026307173774186	-,107823049969095 ,018837542985164

RESULTADOS

Tabla 12: Estudio de la correlación entre el estadio 15 y el 16 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,661.

Estadísticos de grupo					
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
D.V.CORREGIDA	15	29	1,05921291870	,072358958036	,013436721182
	16	26	1,05230011236	,035663730294	,006994232949

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	2,824	,099	,441	53	,661	,006912806345666	,015669521397510	-,024516273445933	,038341886137264
	No se han asumido varianzas iguales			,456	41,793	,651	,006912806345666	,015148094622677	-,023661781833627	,037487394524958

Tabla 13: Estudio de la correlación entre el estadio 15 y el 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,856.

Estadísticos de grupo					
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
D.V.CORREGIDA	15	29	1,05921291870	,072358958036	,013436721182
	17	26	1,05623357039	,043818730154	,008593560004

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	1,412	,240	,182	53	,856	,002979348310513	,016365703675419	-,029846096297011	,03580479291803
	No se han asumido varianzas iguales			,187	46,818	,853	,002979348310513	,015949757041791	-,029110724327233	,03506942094826

Tabla 14: Estudio de la correlación entre el estadio 15 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,462.

Estadísticos de grupo									
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media				
D.V.CORREGIDA	15	29	1,05921291870	,072358958036	,013436721182				
	18	7	1,08166626696	,068380626000	,025845447270				

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
									Inferior Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	,058	,812	-,744	34	,462	-,022453348251880	,030182728353623	-,083792032224751 ,038885335720991
	No se han asumido varianzas iguales			-,771	9,532	,459	-,022453348251880	,029129583257280	-,087792180222174 ,042885483718415

Tabla 15: Estudio de la correlación entre el estadio 16 y el 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. bilateral***, su valor es de 0,724.

Estadísticos de grupo									
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media				
D.V.CORREGIDA	16	26	1,05230011236	,035663730294	,006994232949				
	17	26	1,05623357039	,043818730154	,008593560004				

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
									Inferior Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	,445	,508	-,355	50	,724	-,003933458035152	,011080097838420	-,026188489511475 ,01832157344117
	No se han asumido varianzas iguales			-,355	48,020	,724	-,003933458035152	,011080097838420	-,026211249549298 ,01834433347899

RESULTADOS

Tabla 16: Estudio de la correlación entre el estadio 16 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla sig. bilateral, su valor es de 0,127.

Estadísticos de grupo									
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media				
D.V.CORREGIDA	16	26	1,05230011236	,035663730294	,006994232949				
	18	7	1,08166626696	,068380626000	,025845447270				

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
									Inferior Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	4,170	,050	-1,570	31	,127	-,029366154597545	,018710413963608	-,067526295463962 ,008793986268872
	No se han asumido varianzas iguales			-1,097	6,902	,310	-,029366154597545	,026775108574188	-,092861726683248 ,034129417488158

Tabla 17: Estudio de la correlación entre el estadio 17 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla sig. bilateral, su valor es de 0,237.

Estadísticos de grupo									
	ESTADIO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media				
D.V.CORREGIDA	17	26	1,05623357039	,043818730154	,008593560004				
	18	7	1,08166626696	,068380626000	,025845447270				

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias					
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
									Inferior Superior
D.V.CORREGIDA	Se han asumido varianzas iguales	1,981	,169	-1,206	31	,237	-,025432696562393	,021091691841750	-,068449485680886 ,01758409255610
	No se han asumido varianzas iguales			-,934	7,378	,380	-,025432696562393	,027236674139001	-,089173717057888 ,03830832393310

Por último se quisieron detectar las diferencias entre estadios. Para ello se analizaron dos a dos, los resultados de los estadios mediante un test de Kolmogorov-Smirnov (Tablas 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27)

Tablas 18: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 14 y el 15 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. asintót. (bilateral)***, su valor es de 0,608; 0,608 y 0,873.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	14	11
	15	29
	Total	40

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,270
	Positiva	,241
	Negativa	-,270
Z de Kolmogorov-Smirnov		,761
Sig. asintót. (bilateral)		,608
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	14	11
	15	29
	Total	40

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,270
	Positiva	,241
	Negativa	-,270
Z de Kolmogorov-Smirnov		,761
Sig. asintót. (bilateral)		,608
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	14	11
	15	29
	Total	40

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,210
	Positiva	,176
	Negativa	-,210
Z de Kolmogorov-Smirnov		,593
Sig. asintót. (bilateral)		,873
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 19: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 14 y el 16 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. asintót. (bilateral)***, su valor es de 0,067; 0,067 y 0,211.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	14	11
	16	26
	Total	37

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,469
	Positiva	,182
	Negativa	-,469
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,303
Sig. asintót. (bilateral)		,067

a. Variable de agrupación: ESTADIO

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	14	11
	16	26
	Total	37

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,469
	Positiva	,157
	Negativa	-,469
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,303
Sig. asintót. (bilateral)		,067

a. Variable de agrupación: ESTADIO

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	14	11
	16	26
	Total	37

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,381
	Positiva	,063
	Negativa	-,381
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,060
Sig. asintót. (bilateral)		,211

a. Variable de agrupación: ESTADIO

Tablas 20: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 14 y el 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla **sig. asintót. (bilateral)**, su valor es de 0,157; 0,248 y 0,132.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V. EMBRION	14	11
	17	26
	Total	37

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V. EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,406
	Positiva	,119
	Negativa	-,406
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,128
Sig. asintót. (bilateral)		,157

a. Variable de agrupación: ESTADIO

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V. MCA	14	11
	17	26
	Total	37

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V. MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,367
	Positiva	,157
	Negativa	-,367
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,021
Sig. asintót. (bilateral)		,248

a. Variable de agrupación: ESTADIO

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V. CORREGIDA	14	11
	17	26
	Total	37

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V. CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,420
	Positiva	,024
	Negativa	-,420
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,167
Sig. asintót. (bilateral)		,132

a. Variable de agrupación: ESTADIO

Tablas 21: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 14 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla **sig. asintót. (bilateral)**, su valor es de 0,375; 0,375 y 0,248.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V. EMBRION	14	11
	18	7
	Total	18

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V. EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,442
	Positiva	,442
	Negativa	-,286
Z de Kolmogorov-Smirnov		,913
Sig. asintót. (bilateral)		,375
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V. MCA	14	11
	18	7
	Total	18

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V. MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,442
	Positiva	,442
	Negativa	-,286
Z de Kolmogorov-Smirnov		,913
Sig. asintót. (bilateral)		,375
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V. CORREGIDA	14	11
	18	7
	Total	18

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V. CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,494
	Positiva	,494
	Negativa	-,052
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,021
Sig. asintót. (bilateral)		,248
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 22: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 15 y el 16 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla **sig. asintót. (bilateral)**, su valor es de 0,650; 0,737 y 0,349.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	15	29
	16	26
	Total	55

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,199
	Positiva	,199
	Negativa	-,098
Z de Kolmogorov-Smirnov		,737
Sig. asintót. (bilateral)		,650
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	15	29
	16	26
	Total	55

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,199
	Positiva	,199
	Negativa	-,098
Z de Kolmogorov-Smirnov		,737
Sig. asintót. (bilateral)		,650
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	15	29
	16	26
	Total	55

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,252
	Positiva	,252
	Negativa	-,069
Z de Kolmogorov-Smirnov		,933
Sig. asintót. (bilateral)		,349
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 23: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 15 y el 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. asintót. (bilateral)***, su valor es de 0,772; 0,907 y 0,211.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	15	29
	17	26
	Total	55

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,179
	Positiva	,179
	Negativa	-,149
Z de Kolmogorov-Smirnov		,663
Sig. asintót. (bilateral)		,772
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	15	29
	17	26
	Total	55

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,153
	Positiva	,153
	Negativa	-,153
Z de Kolmogorov-Smirnov		,565
Sig. asintót. (bilateral)		,907
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	15	29
	17	26
	Total	55

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,286
	Positiva	,286
	Negativa	-,069
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,061
Sig. asintót. (bilateral)		,211
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 24: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 15 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla **sig. asintót. (bilateral)**, su valor es de 0,169; 0,169 y 0,240.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	15	29
	18	7
	Total	36

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,468
	Positiva	,468
	Negativa	-,148
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,111
Sig. asintót. (bilateral)		,169
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	15	29
	18	7
	Total	36

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,468
	Positiva	,468
	Negativa	-,148
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,111
Sig. asintót. (bilateral)		,169
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	15	29
	18	7
	Total	36

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,433
	Positiva	,433
	Negativa	-,069
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,029
Sig. asintót. (bilateral)		,240
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 25: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 16 y el 17 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. asintót. (bilateral)***, su valor es de 0,918; 0,918 y 0,995

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	16	26
	17	26
	Total	52

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,154
	Positiva	,115
	Negativa	-,154
Z de Kolmogorov-Smirnov		,555
Sig. asintót. (bilateral)		,918
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	16	26
	17	26
	Total	52

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,154
	Positiva	,077
	Negativa	-,154
Z de Kolmogorov-Smirnov		,555
Sig. asintót. (bilateral)		,918
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	16	26
	17	26
	Total	52

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,115
	Positiva	,115
	Negativa	-,077
Z de Kolmogorov-Smirnov		,416
Sig. asintót. (bilateral)		,995
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 26: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 16 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla ***sig. asintót. (bilateral)***, su valor es de 0,503; 0,406 y 0,503.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	16	26
	18	7
	Total	33

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,352
	Positiva	,352
	Negativa	-,247
Z de Kolmogorov-Smirnov		,826
Sig. asintót. (bilateral)		,503
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	16	26
	18	7
	Total	33

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,379
	Positiva	,379
	Negativa	-,247
Z de Kolmogorov-Smirnov		,890
Sig. asintót. (bilateral)		,406
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	16	26
	18	7
	Total	33

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,352
	Positiva	,352
	Negativa	-,104
Z de Kolmogorov-Smirnov		,826
Sig. asintót. (bilateral)		,503
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Tablas 27: Test de Kolmogorov-Smirnov entre el estadio 17 y el 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915). El p-valor se encuentra en la casilla **sig. asintót. (bilateral)**, su valor es de 0,291; 0,291 y 0,652.

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.EMBRION	17	26
	18	7
	Total	33

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.EMBRION
Diferencias más extremas	Absoluta	,418
	Positiva	,418
	Negativa	-,170
Z de Kolmogorov-Smirnov		,981
Sig. asintót. (bilateral)		,291
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.MCA	17	26
	18	7
	Total	33

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.MCA
Diferencias más extremas	Absoluta	,418
	Positiva	,418
	Negativa	-,209
Z de Kolmogorov-Smirnov		,981
Sig. asintót. (bilateral)		,291
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Frecuencias		
	ESTADIO	N
D.V.CORREGIDA	17	26
	18	7
	Total	33

Estadísticos de contraste ^a		
		D.V.CORREGIDA
Diferencias más extremas	Absoluta	,313
	Positiva	,313
	Negativa	-,143
Z de Kolmogorov-Smirnov		,735
Sig. asintót. (bilateral)		,652
a. Variable de agrupación: ESTADIO		

Filmación del desarrollo.

Al término de la incubación se obtuvieron 1652 fotografías con las que se montó una película en la que se puede apreciar el desarrollo embrionario.

Las imágenes obtenidas están recogidas en el CD que acompaña a este trabajo (Anexo III). La película también puede encontrarse en el CD (Video I)

Bloqueo de los vasos.

La inferencia de conclusiones basada solo en los resultados de los estadios normales, es meramente especulativa. Ello cambia cuando se introducen datos experimentales procedentes de la alteración controlada del desarrollo normal, que dado el objetivo del trabajo, se centro en el bloqueo de ciertos vasos.

De los 70 bloqueos realizados en embriones han sobrevivido 34 con bloqueos en las venas vitelinas craneales derecha e izquierda, en la arteria umbilical, en los vasos vitelinos izquierdos y en los vasos vitelinos derechos.

En algunos casos los vasos bloqueados desaparecían y los cercanos crecían hacia el espacio dejado por ellos. En otros casos se producía una reorganización de los vasos bloqueados.

En total de los 34 embriones:

- 12 sufrieron una revascularización de la zona a través de vasos de nueva formación.
- 4 tuvieron asociada a esa revascularización un crecimiento de los vasos más cercanos.
- En 6 embriones, el vaso bloqueado desapareció y su vascularización fue suplida por los que estaban cerca.
- En 2 casos, el bloqueo desapareció pero la zona se revascularizó con vasos de nueva formación y con ramas de los cercanos.
- En 8 embriones aparentemente no tuvo efecto la anulación del vaso. El trayecto del mismo se veía modificado pero no se apreciaba la formación de nuevos vasos o un mayor crecimiento de los existentes hacia esa zona.

Las imágenes obtenidas están recogidas en el CD que acompaña a este trabajo (Anexo IV).

DISCUSIÓN

La membrana corioalantoidea es una membrana fina que posee una extensa red vascular. Los métodos que se suelen usar para detectar alteraciones en ella suelen estar limitados a técnicas *in vitro* (DeFouw et al., 1989; Strick et al., 1991; Nguyen, Shing, Folkman 1994) Existen otros métodos como la técnica DSA para el análisis *in vivo* (Siambilis et al., 1996; Nikiforidis et al., 1999)

En este trabajo se han obtenido y analizado densitométricamente 99 imágenes del desarrollo vascular normal de la membrana corioalantoidea, entre los estadios, 14 y 18 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1915); así como de 34 embriones donde se alteró experimentalmente y de forma controlada el normal desarrollo vascular de la membrana corioalantoidea.

La técnica que se ha utilizado para medir las densidades vasculares en este trabajo tiene como principal ventaja la no introducción de sustancias extrañas que puedan afectar el desarrollo embrionario normal, así como una agresividad muy limitada ya que no necesita cateterizaciones del embrión ni medios de contraste como ocurre en el DSA. Cuando estos medios de contraste no difunden a través de la totalidad del sistema vascular las partes distales de los vasos de la membrana corioalantoidea y especialmente los vasos pequeños no se visualizan (Nikiforidis et al., 1999) Por otro lado, en la técnica usada en este trabajo solo se debe aplicar un filtro para preparar la imagen y dejar al descubierto los píxeles que ocupan las distintas densidades vasculares frente a otras técnicas de procesamiento de imagen que incorporan sustancias extrañas al embrión. (Nikiforidis et al., 1999).

Las medidas que se han obtenido después de aplicar el tratamiento de las imágenes han sido la densidad total del árbol vascular, la densidad vascular del embrión y la densidad vascular de la membrana corioalantoidea.

Al comparar los datos obtenidos para la densidad vascular del embrión y para la densidad vascular de la membrana corioalantoidea dentro de cada estadio investigado se ha obtenido una correlación muy alta entre ellos (ver Tabla 28), lo que confirma la uniformidad en las características morfológicas medidas en los embriones usados para cada estadio. Ello también dará consistencia a las inferencias estadísticas procedentes de las comparaciones entre estadios embrionarios distintos.

Tabla 28: datos extraídos de las tablas 2.2, 3.2, 4.2, 5.2 y 6.2.

	Estadio 14	Estadio 15	Estadio 16	Estadio 17	Estadio 18
Correlación de Pearson	0,999	0,997	0,998	0,998	0,997

Para comparar estadios se ha elegido una prueba T ya que las muestras tenían distinto tamaño. Esta prueba se realizó con las densidades vasculares corregidas.

Observando que los valores de significación para la prueba de Levene son mayores que 0,05 (ver Tabla 29) asumimos que las varianzas de las densidades corregidas de los distintos estadios son iguales. Sin embargo, el valor para la comparación entre el estadio 14 y el 18 indica que no podemos asumir que sus varianzas sean iguales.

Fijándonos en el p-valor que nos aporta la prueba T, tanto si se asumen varianzas iguales como si no se asume este supuesto, (ver Tabla 29), observamos que los datos obtenidos son mayores que nuestro nivel de significación (0,05) por lo que no se rechaza la hipótesis nula que presumía una igualdad entre las medias. Esto confirma que existe una correlación entre los diferentes estadios.

Tabla 29: datos extraídos de las tablas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17.

	Prueba de Levene	Prueba T
Estadio 14 – Estadio 15	0,07	0,327
Estadio 14 – Estadio 16	0,149	0,189
Estadio 14 – Estadio 17	0,089	0,172
Estadio 14 – Estadio 18	0,011	0,138
Estadio 15 – Estadio 16	0,099	0,661
Estadio 15 – Estadio 17	0,240	0,856
Estadio 15 – Estadio 18	0,812	0,462
Estadio 16 – Estadio 17	0,508	0,724
Estadio 16 – Estadio 18	0,05	0,127
Estadio 17 – Estadio 18	0,169	0,237

Para estudiar las posibles diferencias entre estadios se analizaron dos a dos los resultados de los estadios mediante un test de Kolmogorov-Smirnov. Observando que los niveles críticos bilaterales obtenidos en este test (ver Tabla 30) son mayores que 0,05 podemos concluir que los estadios no difieren significativamente para las densidades vasculares corregidas, las del embrión y las de la MCA.

Tabla 30: datos extraídos de las tablas 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27.

	Test de Kolmogorov - Smirnov		
	D.V. EMBRION	D.V. MCA	D.V. CORREGIDA
Estadio 14 – Estadio 15	0,608	0,608	0,873
Estadio 14 – Estadio 16	0,067	0,067	0,211
Estadio 14 – Estadio 17	0,157	0,248	0,132
Estadio 14 – Estadio 18	0,375	0,375	0,248
Estadio 15 – Estadio 16	0,650	0,650	0,349
Estadio 15 – Estadio 17	0,772	0,907	0,211
Estadio 15 – Estadio 18	0,169	0,169	0,240
Estadio 16 – Estadio 17	0,918	0,918	0,995
Estadio 16 – Estadio 18	0,503	0,406	0,503
Estadio 17 – Estadio 18	0,291	0,291	0,652

En el trabajo de Nikiforidis et al. (Nikiforidis et al., 1999) los resultados que obtuvieron, aplicando la técnica DSA unida a un análisis de las imágenes por ordenador, fueron que el área total vascular aumenta hasta el día 14 de incubación mientras que la longitud total de los vasos se incrementa hasta el día 12 después del cual parece que se produce una reducción. Además, la relación entre el área y la longitud proporciona un instrumento para medir las variaciones del diámetro vascular. Encontraron que el diámetro vascular aumenta hasta el día 14 de incubación. Estos resultados son complementarios a los aquí presentados, ya que se obtuvieron de estadios de desarrollo embrionario de pollo (*Gallus gallus domesticus*) posteriores a los de este trabajo.

De los datos obtenidos a partir del bloqueo vascular selectivo, se ha observado que de los 34 embriones a los que se les ha sometido a un bloqueo doce han generado una revascularización de la zona, que en muchos casos llevaba asociada la unión de los dos extremos separados mediante otros vasos de menor calibre, cuyo origen, morfológicamente se observó no siempre era igual.

En algunos casos esta revascularización iba acompañada de hipertrofia de los vasos cercanos hacia la zona afectada. En otras ocasiones el vaso bloqueado desaparecía y se observa hiperplasia vascular con origen en vasos cercanos.

Ribatti (Ribatti, D. 1994) seccionaba parte de un vaso seleccionado eliminándolo por completo, tras lo que observó la reorganización de la red vascular siguiendo un esquema que era diferente del original, permitiendo la reconexión del muñón principal al distal mediante una ruta diferente en el tiempo más corto posible (Ribatti, D. 1994).

Sin embargo, en nuestro estudio era frecuente observar una revascularización de las zonas por un mayor crecimiento de los vasos cercanos. En estos casos el vaso bloqueado desaparecía, se atrofiaba o emitía pequeñas ramas que unían los dos extremos y los vasos cercanos no bloqueados emitían ramas que llegaban hasta la zona sin vascularización.

Las diferencias encontradas podrían basarse en las distintas metodologías empleadas en el bloqueo de los vasos y en el tiempo en el que se producían las observaciones. En el estudio de Ribatti et al observaban las consecuencias de sus bloqueos entre las 24 y 72 horas y en nuestro estudio las revascularizaciones se observaban entre las 24 y las 48 horas postbloqueo. En este periodo de tiempo se alcanzaban los estadios que previamente habíamos codificado. Es posible que si se hubiesen observado durante más tiempo se habría comprobado que los pequeños vasos que a veces aparecían conectando directamente el muñón principal al distal, una vez que la continuidad de los dos muñones quedaba garantizada, por el proceso descrito previamente, el vaso más pequeño regresaba.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se han estudiado los vasos sanguíneos extraembrionarios entre los estadios 14 de Hamburger y Hamilton (50-53 horas de incubación) y 18 de Hamburger y Hamilton (65-69 horas de incubación) (Hamburger y Hamilton, 1915).

Las pruebas estadísticas realizadas con las medidas obtenidas sobre las densidades vasculares extraembrionarias, muestran que ha habido homogeneidad en los embriones de cada estadio. Dato que apoya la hipótesis asumida acerca de la existencia de un patrón para el desarrollo vascular, en cuyo origen no hemos entrado.

Las pruebas estadísticas realizadas con las medidas obtenidas sobre las densidades vasculares extraembrionarias, muestran que las modificaciones cuantificadas sobre los cambios que manifiestan los embriones dentro del intervalo de estadios investigados, son gradualmente homogéneas. Ello apoya la hipótesis del vínculo existente entre el número de vasos extraembrionarios y la biomasa del cuerpo del embrión.

Los datos procedentes del bloqueo experimental y selectivo de vasos extraembrionarios, indican la existencia de revascularización mediante algún estímulo que afecta a los vasos más cercanos. También apoya a la anterior conclusión en lo referente a la existencia de una relación entre biomasa embrionaria y densidad vascular extraembrionaria.

La codificación sobre los vasos extraembrionarios aquí presentada es indispensable para medir la entropía vascular, dentro de nuestros actuales trabajos en curso. Trabajos en los que se incorporarán otros procedimientos de manipulación vascular, como su bloqueo mediante pulsos de laser de alta intensidad.

La vascularización extraembrionaria en el embrión de pollo muestra ser un modelo adecuado de experimentación para estudios como el aquí expuesto.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

- Balinsky BI. Introducción a la Embriología. Barcelona: Ed. Omega. 1983. pp. 307, 308, 313.
- Bellairs R, Osmond M. The atlas of chick development. London. Elsevier. 2005, pp. 51, 52, 55, 116, 117.
- DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld RN and Feinberg RN Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. Microvasc. Res. 1989. 38:136-47.
- Freeman BM and Vince MA Development of the Avian Embryo. London. Chapman and Hall. 1974.
- George D and Mallery P. IBM SPSS Statistics 19 Step by Step: A simple guide and reference. Pearson. 2011.
- Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. 1915. 88 : 49 - 92.
- Hudlicka O. What makes blood vessels grow? Am. J. Physiol. 1991. 444: 1-24.
- Hughes AFW. Studies on the area vasculosa of the embryo chick. The influence of the circulation on the diameter of the vessels. J. Anat. 1937. 72: 1-17.
- Nguyen M, Shing Y, Folkman J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. Microvasc Res 1994;20:531-9.
- Nikiforidis G, Papazafiropoulos D, Siablis D, Karnabatidis D, Hatjikondi O, Dimopoulos J. Quantitative assessment of angiogenesis in the chick embryo and its chorioallantoic membrane by computerised analysis of angiographic images. European Journal of Radiology. 1999 Feb; 29 (2): 168-179
- Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Bréant C, Fleury V, and Eichmann A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. Development. 2004. 131 (2): 361-375

Paganelli CV The avian eggshell as a mediating barrier: respiratory gas fluxes and pressure during development. In *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles* (eds. D.C. Deeming and M.W.J. Ferguson), Cambridge University Press, Cambridge. 1991 pp. 261-76.

Pardanauo I, Yassine F and Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haematopoiesis during avian ontogeny. *Development*. 1989. 105:473-485.

Poole TJ and Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis. Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J. Exp. Zool.* 1989. 251: 224-251.

Ribatti D. Chapter 5 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2008. 270: 181-224

Ribatti D. Reorganization of blood vessels after their partial section in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Int. J. Dev. Biol.* 1994. 38: 117-120

Risau W and Lemmon V. Changes in vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev. Biol.* 1988. 125: 441-450.

Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kempler R and Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem-cell-derived embryonic bodies. *Development*. 1988. 102:471-478.

Romanoff, A.L. The avian embryo structure and functional development. New York. MacMillan. 1960

Rosenbruch M, Holst A. The chick embryo yolk-sac blood vessel system as an experimental model for irritation and inflammation. *Toxicology in Vitro*. 1990. 4(4-5): 327-331

Schoefl GI. Electron microscopic observations on the regeneration of blood vessels after injury. *Ann. NY Acad. Sci.* 1964. 116: 789-902.

Siamblis D, Karnabatidis D, Hatjikondi O, Kalogeropoulou C, Kardamakis D, Dimopoulos D. A novel radiological approach for the experimental study of angiogenesis: angiography of the chick embryo and its chorioallantoic membrane. *European Journal of Radiology*. 1996 Feb; 21(3): 220-224.

Stern CD. The chick embryo – past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanisms of Development*. 2004 Sept. 121 (9): 1011-1013

Strick DM, Waycaster RL, Montani J-P, Gay WJ, Adair TH. Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: effects of hypoxia and hyperoxia. *Am J Physiol*. 1991;260:H1385–9.

Tuan RS, Ono T, Akins RE and Koide M. Experimental studies on cultured, shell-less fowl embryos: calcium transport, skeletal development and cardio-vascular functions. In *Egg Incubation: its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. (eds. D.C. Deeming and M.J. Ferguson), Cambridge University Press. 1991. pp. 419-33.

Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 Sept. 59 (11): 1162-1176

Von Baer Ke. *Veber entwicklungsgeschichte der thiere. Beobachtung und reflexion*. I. Theil. Königsberg. ed. Bointrager. 1828

Zhang Y, He L, Meng L, Luo W. Taspine isolated from *Radix et Rhizoma Leonticis* inhibits proliferation and migration of endothelial cells as well as chicken chorioallantoic membrane neovascularisation. *Vascular Pharmacology*. 2008 Feb-Mar. 48(2–3): 129-137.