

## Bestiario biomédico y el principio de Krogh

Hasta hace unos años los animales utilizados en las ciencias biomédicas, sin incluir a nuestros pacientes los primates, eran perros, conejos, cobayos, ratas, ratones, aves, sapos y ranas, y la indispensable mosquita de la fruta. De los vertebrados son aún mayoría ratones y ratas; no se cuentan los invertebrados en EE.UU. y Europa, no hay las leyes que regulen su empleo. Era inusual utilizar las alas de los murciélagos o las bolsas de las mejillas (abazones), para estudiar los vasos sanguíneos *in vivo*, sumergir patos para estudiar reflejos respiratorios, jirafas para estudiar la regulación de la presión arterial, salamandras que regeneran miembros, planarias que regeneran todo. Generaciones de estudiantes de medicina debimos memorizar sin aprender la segmentación del huevo y la gastrulación con ejemplos del *Amphioxus lanceolatus*, “animal que muchos investigadores consideran como antepasado de los vertebrados”<sup>1</sup>.

August Krogh (1874-1949), en 1929 dijo: “Para un gran número de problemas habrá un animal de elección o unos pocos animales en los cuales pueden ser, muy convenientemente, estudiados. Hace muchos años, cuando mi maestro Christian Bohr [1855-1911] estaba interesado en el mecanismo respiratorio del pulmón e inventó un método de estudiar el cambio en cada pulmón por separado, encontró que una cierta clase de tortuga poseía una tráquea con el bronquio principal dividido en la parte alta del cuello, y nosotros decíamos, como broma de laboratorio, que este animal había sido creado expresamente para los propósitos de la fisiología respiratoria. No tengo duda que hay un buen número de animales similarmente “creados” para propósitos fisiológicos especiales, pero me temo que la mayoría de ellos son desconocidos para aquellos que han sido “creados” y nosotros debemos pedir a los zoólogos que los encuentren y poner nuestras manos sobre ellos”<sup>2</sup>. Este es el principio de Krogh.

Años después, Hans A. Krebs (1900-1981) vuelve sobre el principio en un artículo cuyo título resume el concepto de Krogh: *The August Krogh Principle: “For Many Problems There is an Animal on Which It Can Be Most Conveniently Studied”*, y lo ilustra con ejemplos de la bioquímica, fisiología, biología celular, medicina experimental, etología y botánica<sup>3</sup>.

A los conocidos animales de experimentación en biomedicina se han sumado nuevos protagonistas, e incluso plantas, hongos y bacterias. En orden de popularidad son: un gusano, el *Caenorhabditis elegans*, el pez cebra, *Danio rerio*, un crustáceo, la pulga de agua *Daphnia*, el *Amphioxus* (*Branchiostoma lanceolatus*), una planta, la mostaza silvestre, *Arabidopsis thaliana*, la levadura del pan, el vino y la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, y varias bacterias. Apenas nos atreveremos en esta nota con el Reino Vegetal y los unicelulares.

Meros médicos curiosos, nos interesa enterarnos qué son estos organismos, el porqué de su utilidad como organismos modelos y qué particularidades tienen estos nuevos protagonistas, particularidades que ni las imaginamos ni soñamos, porque “la zoología de los sueños es más pobre que la zoología de Dios”<sup>4</sup>.

Empezamos con el *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) sobre el cual hay numerosa y calificada información libre *online*<sup>5, 6, 7</sup>. Es un gusano redondo (nematode), transparente, no segmentado, de alrededor de 1 mm, independiente, no es un parásito, vive en los suelos de temperatura moderada y se alimenta de las bacterias desarrolladas en la descomposición de la materia vegetal, *Escherichia coli*, por ejemplo. Tiene dos sexos: uno hermafrodita y una reducida población de machos, alrededor del 0.05%

del total. Están cubiertos por una cutícula de colágeno, tiene boca, faringe, intestino, y gónadas. Los hermafroditas tienen dos ovarios, oviductos, espermateca y un solo útero; los pocos machos tienen una gónada, vasos deferentes y una cola especializada para aparearse. Los hermafroditas se fertilizan a sí mismos o se aparean con los machos y ponen los huevos. Después de incubados dan origen a larvas que pasan por cuatro estadios, pero cuando están hacinadas o faltas de alimento entran en un alternativo tercer estadio larval llamado estado de *dauer*, en el que resisten el estrés y no envejecen. Los hermafroditas producen toda su esperma en el último estadio larval, 150 espermatozoides por brazo gonadal, luego producen los oocitos. El esperma se guarda en la misma zona de la gónada que los oocitos hasta que el primer oocito empuja el esperma hasta la espermateca, una cámara donde los oocitos se fertilizan con el esperma. Los machos pueden inseminar un hermafrodita, ambos tipos de esperma se depositan en la espermateca. Cuando auto-inseminado, el gusano produce unos 300 huevos, cuando es el macho el que lo insemina los huevos son más de 1000. La cepa de laboratorio tiene un promedio de vida de 2-3 semanas y su ciclo se completa en 3 ½ días. El *C. elegans* tiene cinco pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. El sexo está determinado en un sistema XO, el hermafrodita tiene un par de cromosomas iguales (XX) y el macho sólo un cromosoma sexual (XO). El *C. elegans* fue el primer organismo multicelular del cual se secuenció el genoma completo en octubre del 2002, tiene cerca de 97 millones de pares de bases nitrogenadas, y, aproximadamente, 20 000 genes.

Sydney Brenner introdujo en 1974 el *C. elegans* como organismo modelo. En su Conferencia Nobel dijo: "El título de mi conferencia es *Nature's gift to Science*. Y no es una conferencia acerca de una revista científica pagando respetos a otra (*Nature* a *Science*) sino acerca de cómo la gran diversidad del mundo viviente puede a la vez inspirar y servir de innovación en la investigación biológica. Las ideas actuales de los usos de Organismos Modelos surgen del ejemplo del pasado, y escoger el correcto organismo para nuestra investigación es tan importante como encontrar los correctos problemas en los que trabajar. En toda mi investigación estas dos decisiones han estado ceñidamente entrelazadas. Sin duda el cuarto ganador del premio Nobel de este año es *Caenorhabditis elegans*; merece todo el honor pero, por supuesto, no será capaz de compartir la retribución monetaria". El Premio Nobel de Fisiología o Medicina del 2002 lo compartieron, en partes iguales, Brenner, John E. Sulston y H. Robert Horwitz "por sus descubrimientos que conciernen a la regulación genética del desarrollo de los órganos y a la muerte celular programada"<sup>8</sup>.

Andrew Z. Fire y Craig C. Mello, discípulos de Brenner, utilizaron el *C. elegans* y recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2006: "por su descubrimiento del ARN de interferencia (ARNi) silenciando los genes con ADN de doble cadena". En suma, silenciaron la función de genes específicos sumergiendo o inyectando el gusano con una solución de ARN de cadena doble (ARNdc) complementario del gen que buscaban desactivar, o lo alimentaron con bacterias genéticamente transformadas que expresaban el ADN de doble cadena que les interesaba<sup>9</sup>. Y, en el 2008, otro miembro de la "comunidad" del gusano, Martin Chalfie, recibió, compartido, el Premio Nobel de Química por sus trabajos con la proteína verde fluorescente (*GFP*) en el *C. elegans*<sup>10,11</sup>. El *C. elegans* es un modelo especial en genética del desarrollo porque: 1) Es transparente toda su vida, lo que facilita la observación de su desarrollo con el microscopio; 2) Es hermafrodita, esto favorece la obtención y mantenimiento de individuos con mutaciones recesivas; 3) Es muy simple, el linaje de todas sus células es conocido, muy útil para estudiar la diferenciación celular. Se conoce el desarrollo, destino y ubicación de cada una de sus células somáticas, 959 en el hermafrodita y 1031 en el macho, adultos. En los dos sexos hay un número adicional de células, 131 en el hermafrodita, la mayoría de las cuales se hubieran transformado en neuronas; se eliminan por apoptosis. El sistema nervioso está compuesto por 302 neuronas, sus conexiones se conocen, forman una pequeña red, y se han explorado los mecanismos neurales para varias de las conductas del gusano: quimiotaxis, termotaxis, transducción mecánica, conducta sexual del macho; 4) Es fácil y

barato de mantener y criar en el laboratorio; se pueden congelar, mantenerlos así por largo tiempo y, cuando se descongelan, siguen siendo viables. Son astronautas duros de matar: los especímenes de *C. elegans* sobrevivieron, en febrero del 2003, al desastre del trasbordador Columbia, y han sido mandados, en enero de este año 2009, por dos semanas, a la *International Space Station* para estudiar el efecto de la falta de la gravedad sobre el músculo<sup>5</sup>. Pero se envían con la nicotina con respuestas “paralelas” a las de los mamíferos (respuesta aguda, tolerancia, abstinencia y sensibilización)<sup>12</sup>.

El gusano ha sido, dijo Brenner, un regalo de la naturaleza a la ciencia y a los científicos. En la Conferencias Nobel los varios premiados con su ayuda no compartieron las coronas suecas, pero siempre lo mencionaron agradecidos; el gusano sigue a dieta de *E. coli*.

El pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan, 1822) es una nueva estrella. Nativo del sudeste de las Himalayas, vive en aguas dulces corrientes y estancadas, es un pez común de acuarios, fácil de mantener y criar. El cuerpo tiene cinco rayas horizontales azules, uniformes, separadas por bandas doradas. El macho tiene forma de torpedo, las hembras tienen una panza más grande y blanca, llegan a medir hasta 6.4 cm de largo, viven alrededor de 5 años y producen de 300 a 500 huevos por puesta. El pez cebra es útil como modelo para estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados y la función de los genes. Los embriones se desarrollan rápido y son grandes, robustos, los huevos pasan a larvas en pocos días, a los 21-29 días miden 7.8 mm, embriones y larvas son transparentes y, como en todos los peces, se desarrollan fuera de la madre, lo que facilita la manipulación y observación. Son fáciles de teñir y las drogas pueden añadirse directamente al acuario; se han filmado desde el primer día del desarrollo hasta que son reconocibles la espina dorsal y el corazón. A los huevos no fecundados se los puede dividir y las dos células fusionarse en una sola creando así un embrión homocigota. Por otra parte este pececito regenera las aletas, la piel, el corazón y el cerebro (en el estado larval), los fotorreceptores y las neuronas de la retina, se emplea para estudiar la biología de la pigmentación, el desarrollo del corazón, y como biosensor<sup>13, 14</sup>. Las larvas transparentes han servido, por ejemplo, en patología, para estudiar el reclutamiento de las células que forman los visibles granulomas causados por micobacterias<sup>15</sup>.

Para estudiar el pez cebra se introdujeron los descubrimientos de Fire y Craig<sup>9</sup>. Con técnicas de genética inversa (*reverse*) se modifica o silencia la expresión de genes. Deduce la función de un gen hipotético a partir de su silencio. La genética inversa indaga la función de un gen en sentido opuesto a la genética clásica o directa (*forward*): En lugar de buscar el gen de un fenotipo, busca el fenotipo y la función a partir de una secuencia génica específica de ADN, ARNm, o secuencia de proteína. Para noquear, o modificar la expresión de un gen, se bloquea o silencian los genes blancos. La técnica más común *anti-sense* para noquearlos en el pez cebra es con los oligonucleótidos sintéticos, *Morpholinos*, que bloquean pequeñas regiones del ARN y su función, o la técnica TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*). Son efectivas en sistemas libres de células, en un tubo de ensayo, cultivos de tejidos, embriones y animales adultos. El lector interesado puede acudir al sitio indicado, ZFIN, y saciar su curiosidad: hay 851 publicaciones sobre el pez registradas desde 1822 a mayo del 2009. Más aún, desde el 2004 aparece una revista trimestral: *Zebrafish*.

De las pulgas de agua, el modelo más utilizado es la *Daphnia Magna*; del género *Daphnia* (Müller, 1785), que incluye subgéneros y muchas especies. Son crustáceos del placton, miden entre 0.2 y 5 mm de largo, nadan dando saltos, como las pulgas comunes, viven en aguas dulces, estancadas o corrientes. No están segmentados, el cuerpo y la cabeza inclinada hacia abajo, separados por una hendidura, están casi fusionados. En la mayoría el cuerpo está cubierto por un carapacho con una abertura ventral donde se alojan 5 o 6 pares de patas. Tienen ojos compuestos, antenas y un par de *setae* (pelos) abdominales. En muchas especies el carapacho es transparente y a través de él pueden verse, con el microscopio, las vísceras: el tubo digestivo, el corazón que late a alrededor de 180 latidos por minuto, los

corpúsculos sanguíneos circulando. La mayoría de las *Daphnia* se alimentan filtrando del agua algas unicelulares, detritos orgánicos, protistas y bacterias, unas pocas se alimentan de crustáceos más pequeños. Batiendo unas patas crea una corriente a través del carapacho que lleva material al tracto digestivo y con las otras patas aleja las partículas demasiado grandes para ingerir; el ano está ubicado en la zona ventral del último segmento. Salta con la fuerza proporcionada por las antenas del segundo par de patas, más desarrolladas que el primero. Se reproducen de la primavera hasta el fin del verano, por partenogénesis; el resultado: individuos genéticamente idénticos. Uno o dos individuos se desarrollan en una bolsa de incubar; las nuevas *Daphnia* incubadas mudan varias veces, en alrededor de dos semanas, antes del estado adulto y las jóvenes son copias pequeñas de las adultas. Las hembras maduras pueden producir una nueva camada cada diez días, el proceso reproductivo continúa si las condiciones del ambiente lo permiten. En el invierno o en ambientes desfavorables la producción de hembras cesa y se producen, por partenogénesis, machos. Los machos son menos de la mitad de la población, de algunas especies directamente se desconocen. Los machos son más chicos que las hembras y tienen un apéndice abdominal especializado para agarrar a las hembras por detrás, abrir el carapacho e insertar una espermateca para fertilizar los huevos. Estos huevos, de invierno, tienen una cubierta adicional de quitina que los protege de las malas condiciones ambientales hasta la primavera, cuando el ciclo reproductivo se inicia de nuevo. El ciclo sexuado permite una mayor variación genética, útil en condiciones imprevistas. La vida de las *Daphnia* es corta, 3 o 4 semanas, depende de la temperatura del agua donde viven, a menor temperatura viven más días que a mayores; son muy fecundas, maduras se reproducen cada 48 horas. Son fáciles de criar en el laboratorio. Por su sensibilidad se usan para detectar toxinas en los ecosistemas, donde éstas producen mortandad, alteración de la reproducción o crecimiento<sup>16</sup>. Entre nosotros se desarrolla el Proyecto BID-CONICET 230 “Conservación y manejo de ecosistemas acuáticos continentales: contaminación y acuicultura”, en el Instituto Nacional de Limnología (INALI) de Santa Fe<sup>17</sup>.

Antes que se usaran como “canarios del agua”, Mechnikov estudió la infección de las *Daphnia* por un hongo y confirmó lo que ocurría en los embriones de la estrella de mar: la acumulación de células móviles, equivalentes a nuestros glóbulos blancos, alrededor de las esporas que, después de ser ingeridas, atraviesan el intestino y pasan a la cavidad corporal. A las células móviles las bautizó fagocitos y al proceso fagocitosis. “La descripción [de la fagocitosis] es en un animal viviente y puede ser observada en cada estado bajo el microscopio con tal precisión que difícilmente pueda mejorarse”<sup>18</sup>.

Unas pocas líneas, por simpatía, para el *Amphioxus lanceolatus*, *Branchiostoma lanceolatum*, subphylum Cephalochordata (Owen, 1846), objeto científico menos popular, por ahora, que en el siglo XIX. Es un cordado primitivo que se supone eslabón entre los vertebrados e invertebrados. Lanceolado, mide hasta 5 cm de largo, vive, y se encuentran, enterrados en la arena de las partes poco profundas de los mares templados o tropicales. En Asia se utilizan como alimentos de humanos y otros animales domésticos. Importa porque es un “fósil viviente” y puede proveer indicación sobre el origen de los vertebrados, es acráneo<sup>19</sup>. Además, descubrimiento reciente, tiene proteínas fluorescentes verdes endógenas<sup>20</sup>.

Menos líneas aún, no vamos a “diversificar nuestro portafolio”, para la planta modelo predominante: *Arabidopsis thaliana*. Un ensayo sostiene que: “Muchos descubrimientos con directa relevancia a la salud humana y la enfermedad se han elaborado usando *Arabidopsis*, y varios procesos importantes para la biología humana son más fácilmente estudiados en ella”<sup>21</sup>.

Sólo mencionaremos la humilde levadura del pan, el vino y la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, que se propone como modelo para el estudio del plegamiento de las proteínas que tanto importa en las enfermedades de Parkinson, Huntington y las producidas por priones<sup>22</sup>.

La revista de la que tomamos la última noticia, *Disease Models & Mechanisms* apareció en 2008, publica “reportes de investigaciones usando organismos modelos para entender los mecanismos subya-

centes en la enfermedad humana y desarrollar nuevos diagnósticos y terapéuticos”. Hojeando al azar el número de mayo-junio del 2009 encontramos un artículo sobre medicación psiquiátrica estudiada en la ameba “social” *Dyctyostelium*, otro sobre el *C. elegans* como modelo emergente para el estudio de la biología básica de la obesidad. Es ritual terminar estos artículos con estas o parecidas palabras: “Este sistema modelo depara gran promesa para ayudar a desenredar la complicada red de genes que mantiene un correcto balance energético” o “Este camino puede ser importante en la patogénesis y tratamiento de...”. Estos finales justifican subsidios de investigaciones promovidas como investigación o medicina traslacional, aún lejanas de la meta: la aplicación médica. Algún día llegará.

El principio de Krogh es fácil de trasladar a organismos con parecidos anatómicos o fisiológicos a los vertebrados mamíferos que somos ¿Pero, qué tenemos los humanos en común con gusanos, insectos, plantas, levaduras y aun con bacterias casi-mitocondrias como el *Paracoccus denitrificans*? Compartimos genes homólogos que, en núcleo y mitocondrias, cumplen iguales o parecidas funciones a las nuestras cuando se expresan. El principio actualizado se leería así: “Si la meta de un investigador fuera definir un proceso fisiológico del nivel de genes a todo el animal, el organismo modelo óptimo para utilizar, [...] sería el genético y molecularmente tratable. En otras palabras, un organismo en el cual los análisis genéticos directo y reverso se puedan llevar a cabo sin inconvenientes, rápida y económicamente”<sup>23</sup>.

Experimentar con estos animales, plantas, amebas, bacterias, es menos ingrato que con primates, perros, ratas y ratones. Cuando los organismos menos se nos parecen mejor dispuestos estamos a utilizarlos, y menos son las pesadillas donde ratas o ratones experimentan con nosotros. Si creemos que a todas las formas de vida no debemos infligirles dolor, cuando más sencillo tienen el sistema nervioso, menos culpa cargamos, y ninguna cuando son sólo células y no lo tienen.

Juan Antonio Barcat

e-mail: jabarcat@yahoo.com.ar

**Agradecimientos:** A los Drs. Damasia Becú-Villalobos y Carlos J. Pirola por la lectura y observaciones sobre el manuscrito.

1. Fischel A. Compendio de embriología humana. Barcelona: Labor, 1951. Traducción española de la segunda edición alemana (1937) por E. Pons Tortella. Blastogénesis. p 19-79.
2. Krogh G. The progress of physiology. *Amer J Physiol* 1929; 90: 243-51.
3. Krebs HA. The August Krogh Principle: “For many problems there is an animal on which it can be most conveniently studied”. *J Exp Zool* 1975;194: 221-6).
4. Borges JL, Guerrero M (1954). Manual de zoología fantástica. México DF: Fondo de Cultura Económica, 1957. Prólogo. p 7-9.
5. *C. elegans* II. In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=ce2.TOC>; consultado el 28-5-09.
6. WormBook. En: <http://www.wormbook.org/>; consultado el 28-5-09.
7. *Caenorhabditis elegans*. En: [http://en.wikipedia.org/wiki/Caenorhabditis\\_elegans](http://en.wikipedia.org/wiki/Caenorhabditis_elegans); consultado el 28-5-09.
8. Brenner S. Nature's gift to Science. En: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2002/brenner-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/brenner-lecture.html); consultado el 27-5-09.
9. Jaim Etcheverry G. Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006. El silencio de los genes. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67: 92-5.
10. GFP: Lighting Up Life. En: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/chalfie-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/chalfie-lecture.html); consultado el 27-5-09.
11. Millán MI, Becú-Villalobos D. La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *Medicina (Buenos Aires)* 2009; 69: 370-4.
12. Feng Z, Li W, Ward A, et al. A *C. elegans* Model of Nicotine-Dependent Behavior: Regulation by TRP-Family Channels. *Cell* 2006; 127: 621-33.
13. Zebra fish. <http://en.wikipedia.org/wiki/Zebrafish>; consultado el 28-5-09.
14. The Zebrafish Information Network (ZFIN). [http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mval=aa-ZDB\\_home.apg](http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mval=aa-ZDB_home.apg); consultado el 30-5-09.
15. Boldt TD, Ernst JD. Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? *Cell* 2009; 136: 179.
16. Daphnia. En: <http://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia>; consultado el 30-5-09.
17. Paggi JC, Paggia SJ de. DAPHNIA MAGNA: EL “CANAN-

- RIO<sup>n</sup> DE LAS AGUAS. En: <http://www.ceride.gov.ar/servicios/comunica/canario.htm>; consultado el 30-5-09..
18. Ilya Mechnikov. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908 Nobel Lecture. Nobel Lecture, December 11, 1908. On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases. En: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-lecture.html); consultado el 16 Feb 2008.
  19. Stokes MD, Holland ND: The Lancet. *Am Sci* 1994; 86: 552-601.
  20. Deheyn DD, Kubokawa K, McCarthy JK, et al. Endogenous Green Fluorescent Protein (GFP) in *Amphioxus*. *Biol Bull* 2007 213: 95-100.
  21. Jones AM, Chory J, Dangl JL, et al. The Impact of Arabidopsis on Human Health: Diversifying Our Portfolio. *Cell* 2008; 133: 939-43.
  22. Kain K. Using yeast to understand protein folding diseases: an interview with Susan Lindquist. *Dis Model Mech* 2008; 1, 17-19.
  23. Strange K. Revisiting the Krogh Principle in the post-genome era: *Caenorhabditis elegans* as a model system for integrative physiology research. *J Exp Biol* 2007; 210: 1622-31.

-----

*Thus I conclude as I began. General pathology should go hand in hand with zoology or rather with biology, and form one branch of it, that of comparative pathology. This science is only in its infancy, and yet it is already in a position to render good service to medicine. By facilitating the analysis of the reactive phenomenon, it indicates the elements which should be especially protected and reinforced in the conflict of the organism against its enemies, and thus contributes to the solution of one of the great problems of humanity.*

Así, concluyo como comencé. La patología general debiera ir de la mano con la zoología o mas bien con la biología, y formar una rama de ella, la *patología comparada*. Esta ciencia está en su infancia, y, sin embargo, ya está en una posición de rendir buenos servicios a la medicina. Al facilitar el análisis de los fenómenos reactivos indica los elementos que debieran especialmente protegerse y reforzarse en el conflicto del organismo contra sus enemigos, y así contribuir a la solución de uno de los grandes problemas de la humanidad.

Eli Metchnikoff [Ilya Mechnikov] (1845-1916)

Lectures on the comparative pathology of inflammation. Delivered at the Pasteur Institute in 1891. Translated from the French by F. A. Starling and E. H. Starling. With a new introduction by Arthur M. Silverstein. Dover: New York, 1968. Lecture XII, p 97