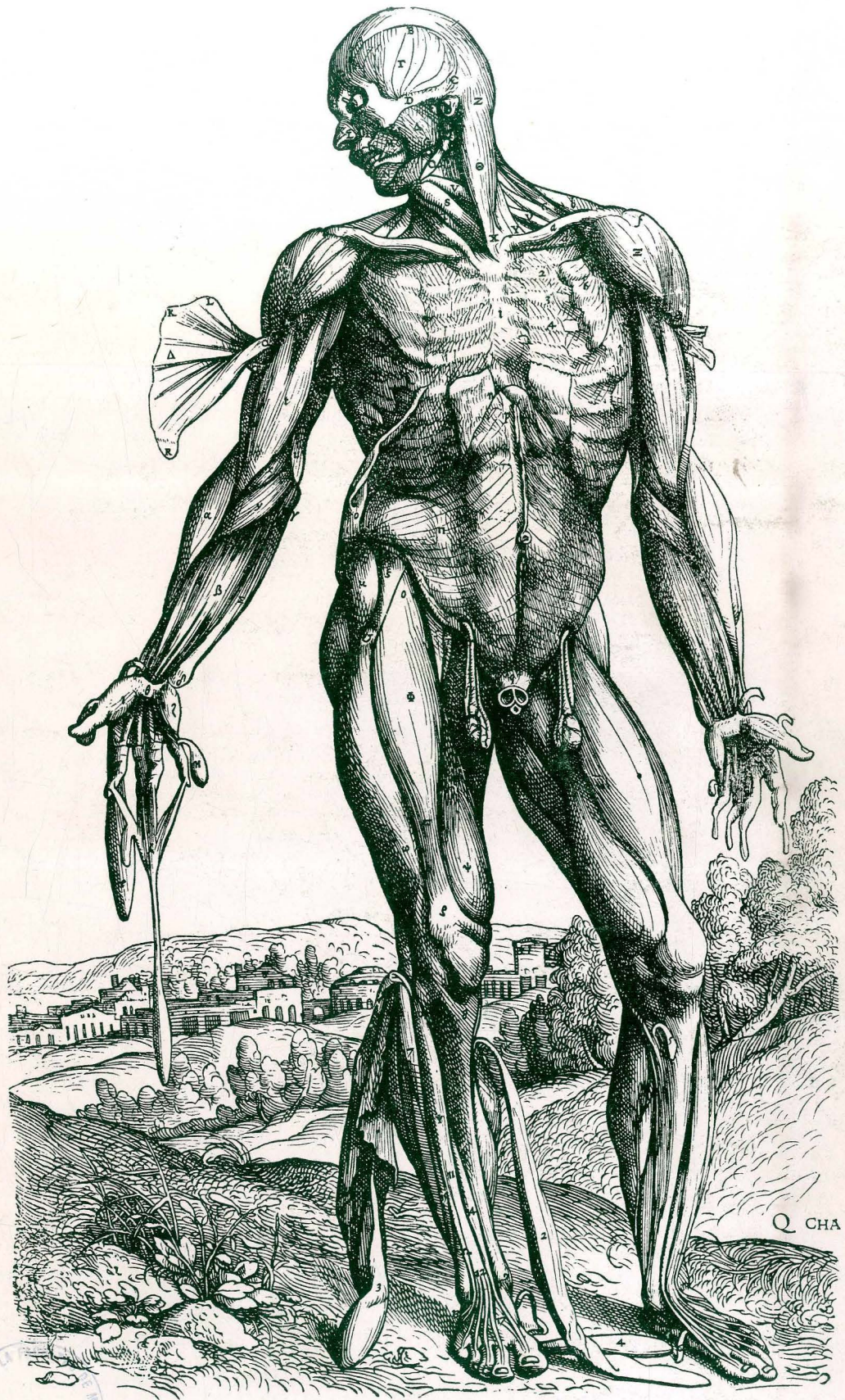


ANNALES DE ANATOMIA



ANALES DE ANATOMIA

Fundador:
J. ESCOLAR

Director:
R. SARRAT

Secretario de Redacción:
J.L. NIETO AMADA

Consejo de Redacción:

E. Agüera (Córdoba)
P. Amat (Salamanca)
J. Astruc (Richmond, U.S.A.)
G. Bernal (Córdoba)
A. Carrato (Madrid)
F. Doñate (Bilbao)
E. Ferres Torres (Valencia)
R. Ferres Torres (La Laguna)
L.M. Gonzalo Sanz (Pamplona)
M. Guirao (Granada)
J. Jiménez Castellanos (Sevilla)
R. Krstic (Lausana)
M. Lafarga (Santander)
J.L. Lancho (Córdoba)
I. Lawzewitsch (Argentina)
A. Llamas (Madrid)
F. Marín Girón (Málaga)
L. Martínez Millán (Bilbao)
E. Martínez Moreno (Madrid)
P. Mestres (Hamburg, R.F.A.)

A. Mitro (Checoslovaquia)
M. Montesinos (Valencia)
L. Muñoz Barragán (Salamanca)
N. Murillo (Zaragoza)
G. Palomero (Oviedo)
Chr. Pilgrim (R.F.A.)
F. Reinoso (Madrid)
J.M. Rivera Pomar (Bilbao)
S. Rodríguez García (Soria)
D. Ruano (Barcelona)
F. Sánchez del Campo (Alicante)
J. Sandoval (León)
J. Sanz Esponera (Madrid)
J.M. Smith-Agreda (Málaga)
V. Smith-Agreda (Valencia)
J. Soler Viñolo (Granada)
R. Vázquez (Salamanca)
J.L. Velayos (Madrid)
A. Vera (Zaragoza)

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

Composición de textos: M^º. M. Guerrero, M.^ºA. Roncero

Maquetación: F. Rincón

Coordinación: C. Relancio

Edita y Distribuye: Secretariado de Publicaciones
Universidad de Zaragoza

Con la colaboración financiera de:

Universidad de Alcalá
Universidad de Barcelona (Central)
Universidad de Córdoba
Universidad de Oviedo
Universidad de Salamanca
Universidad de Zaragoza

Printed in Spain

ANALES DE ANATOMIA

Volumen XXXV

Diciembre 1989

Núm. 92

13 FEB. 1990



DESARROLLO POSTNATAL DE LA INERVACION DEL INTESTINO EN *GALLUS gallus*
POSTNATAL DEVELOPMENT OF THE INTESTINE INNERVATION OF *GALLUS gallus*

J. AISA, M.J. AZANZA y M.T. PEG

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se ha estudiado el desarrollo postnatal de la inervación del intestino de *Gallus gallus* mediante demostración de la actividad colinesterásica; método FIF para las catecolaminas e inmunohistoquímica para VIP y SP.

En el intestino delgado la inervación colinérgica se va desarrollando a lo largo de las 20 primeras semanas del desarrollo, mientras que en el recto queda establecida en las primeras 4 semanas. La inervación noradrenérgica definitiva del intestino delgado se consigue ya a las 4 semanas del nacimiento, mientras que en el recto no se completa hasta las 20 semanas. Es totalmente extrínseca. La inervación tipo VIP, igual que la inervación tipo SP, parecen establecerse totalmente en la primera semana del desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Aves, inervación del intestino, inervación vegetativa, inervación de *Gallus gallus*.

SUMMARY

The innervation pattern postnatal development of *Gallus gallus* intestine has been studied by the following methods: demonstration of cholinesterase activity; FIF method for catecholamines, and immunohistochemistry for VIP and SP.

The small intestine cholinergic innervation development takes the 20 first weeks after hatching while in the rectum it is fully developed in 4 weeks. The small intestine noradrenergic innervation is fully developed 4 weeks after hatching, while in the rectum it takes 20 weeks. It is from extrinsic origin. The VIP and SP type innervation are completely developed in the first week after hatching.

KEY WORDS: Birds, intestine innervation, vegetative innervation, *Gallus gallus* innervation.

Introducción

La inervación extrínseca del intestino de las aves llega con los nervios autónomos que confluyen en el nervio de Remak. Este nervio, típico de las aves, es un tronco mixto simpático-parasimpático que corre por el mesenterio inmediatamente por encima del duodeno, yeyuno e íleon, y, a mayor distancia, del recto (Akester, 1979). El recto

recibe además fibras nerviosas desde el plexo pélvico (plexo rectal) y desde el nervio esplácnico pélvico (nervio pudendus). La inervación intrínseca está representada por el sistema nervioso entérico que forma los plexos intramurales: mientérico o de Auerbach y submucoso o de Meissner.

En trabajos anteriores hemos descrito la inervación intrínseca del digestivo anterior de *Gallus gallus*, estableciendo una comparación entre proventrículo y molleja con la inervación del esófago y buche (Aísa y Col. 1987 a). Hemos descrito además el desarrollo postnatal del Sistema Nervioso Entérico del proventrículo y molleja (Aísa y Col. 1987 b) así como del esófago y buche de *Gallus gallus* (Aísa y Col. 1988). En esta línea continuamos con el presente trabajo en el que nos hemos propuesto estudiar el desarrollo postnatal de la inervación del intestino de *Gallus gallus* en sus componentes colinérgico, catecolaminérgico, para el VIP y para la SP.

Material y Métodos

Se utilizaron 30 ejemplares de *Gallus gallus*, que se sacrificaron en las etapas siguientes: 6 al primer día de la eclosión; 6 a la semana; 6 al mes; 6 a los cinco meses después de la eclosión; y los 6 animales restantes en lotes de dos ejemplares, a los seis, nueve y doce meses.

La organización histológica básica se estudió con el método convencional de hematoxilina-eosina.

Las técnicas histoquímicas utilizadas fueron las siguientes.

Determinación del componente colinérgico.— Se utilizó ioduro de acetiltiocolina (Sigma) para demostrar la actividad acetilcolinesterásica (AChE) de acuerdo con el método de El Badawi y Schenk (1967). Las muestras se congelaron con metil-butano inmerso en nitrógeno líquido. De ellas se obtuvieron secciones de 20 μm . Después de dejarlas secar a temperatura ambiente durante 30 min. se fijaron por espacio de 15 min. en formaldehído al 10% en PBS (pH 7.1-7.4) a 4°C. Después de tres lavados en agua destilada, se incubaron durante 1,5 a 2 horas a 37°C. Los sitios de actividad colinesterásica positiva se reconocen por la formación de un precipitado marrón. Se realizaron dos tipos de control: 1) incubación en un medio libre de sustrato y 2) incubación en un medio con tetraisopropilpirofosforamida (ISOOMPA, Sigma).

Determinación del componente catecolaminérgico.— Las fibras adrenérgicas fueron visualizadas por el método combinado del ácido glioxílico-paraformaldehído de Falck y Owman (1965) (FIF). El tejido fue fijado por inmersión en ácido glioxílico al 2% en PBS (pH 7.1-4) durante 3 h. Se congeló en metilbutano y, tras someterlo a deshidratación en un liofilizador por periodos de 12 a 14 h., se expuso a los vapores de paraformaldehído (1 h. a 80°C). Una vez incluido en parafina, cortes de 15-20 μm se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia Leitz Orthoplan. La noradrenalina produce una fluorescencia verde-manzana.

Determinación del componente peptidérgico (VIP y SP).— Se hizo mediante el método de inmunofluorescencia indirecta (IF).

Hemos introducido una modificación al método de Costa y col. (1971) para testar los antisueros en preparaciones "in toto" a fin de examinar la distribución tridimensional de las fibras peptidérgicas. Las muestras de tejido se fijaron por inmersión en una solución de ácido pícrico al 15% con formaldehído al 2% en PBS (pH 7.1-7.4) durante 18 h. a 4°C. Se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes (de 80%, 96% y absoluto) manteniéndolas 30 min. en cada solución. Tras clarificarlas en xilol (30 min.) se rehidrataron manteniéndolas de nuevo 30 min. en cada uno de los alcoholes de 100%, 90%, 80%, 70% y 30% y finalmente en PBS otros 30 min. a 4°C. Seguidamente se realizó la delaminación para poner de relieve tanto el plexo mientérico como el submucoso.

Las láminas, extendidas sobre portas, se colocaron en cámaras húmedas y se incubaron con los antisueros primarios durante 20 h. a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 min. en PBS (pH 7.4) se incubaron durante 1 h., a temperatura ambiente, con FITC conjugado. Tras 15 min. de lavado en PBS se montaron en glicerol y se observaron al microscopio de luz ultravioleta.

Resultados

Los resultados los unificamos, ya que no hemos encontrado diferencias notables entre duodeno, yeyuno e íleon. Del intestino grueso, nuestro estudio se ha limitado al colon y al recto.

Las variaciones observadas en el desarrollo postnatal de las estructuras histológicas del intestino afectan principalmente al espesor relativo de las capas y al número de glándulas. En los recién nacidos las musculares son muy finas en comparación con la mucosa. No obstante, se aprecian los ganglios en sus localizaciones típicas (Fig. 1). En los animales de 2 semanas se observa una migración de células ganglionares desde el plexo mientérico al submucoso, con lo que ambas formaciones quedan intercomunicadas.

Tanto en el intestino delgado como en el recto, la inervación colinérgica es abundante. En el intestino delgado del recién nacido pueden verse ya en el seno de la muscular longitudinal, o entre las dos musculares, ganglios y troncos nerviosos. En el adulto, la muscular longitudinal sigue escasamente inervada; comparativamente la circular presenta una amplia red de fibras que se distribuyen principalmente por el conectivo interfascicular hasta la submucosa (Fig. 2A). Las fibras nerviosas atraviesan la muscularis mucosae interconectando el plexo submucoso con la lámina propia. Un amplio plexo se dispone en torno a la base de las glándulas (Fig. 2B). Las fibras siguen la trayectoria de las vellosidades hasta el epitelio sin penetrar en él. En el recto hay abundantes ganglios que se localizan: entre la serosa y la muscular longitudinal, en el seno de la longitudinal; entre la muscular longitudinal y la circular, en el seno de la circular y en la submucosa (Fig. 3). Los ganglios de la submucosa son pequeños; desde ellos parten fibras cuya distribución coincide con la descrita para el intestino delgado. En relación con el desarrollo postnatal de la inervación colinérgica no hay variaciones en la muscular longitudinal. En la circular del intestino delgado la inervación experimentó un incremento desde los animales de 4 a los de 20 semanas. La inervación de la submucosa, abundante ya en los animales de 1 día, se mantuvo sin variaciones en las etapas posteriores. Tanto en la muscularis mucosae como en la lámina propia, los recién nacidos presentan inervación escasa, que aumentó en los de 1 semana y se hizo abundante en los de 4 semanas. En el recto la inervación se incrementó en los animales de 1 semana en todas las capas, excepto en la muscularis mucosae, donde el aumento no se apreció hasta las cuatro semanas.

La inervación noradrenérgica del intestino delgado parece ser más pobre que en las otras porciones del tubo digestivo. En la serosa las fibras fluorescentes se aprecian rodeando los capilares. Algunas fibras atraviesan la longitudinal perpendicularmente. A nivel de los plexos mientéricos se distinguen fibras en torno a ganglios y vasos (Fig. 4A). Las fibras atraviesan la muscular circular y llegan hasta la submucosa, donde se localizan principalmente alrededor de los vasos y de paso hacia la mucosa, alcanzando la base de las glándulas y siguiendo las vellosidades (Fig. 4B). Durante el desarrollo postnatal la inervación noradrenérgica del intestino delgado se mantuvo escasa, observándose un ligero aumento en la inervación de la circular a las 4 semanas. En el recto la inervación es más abundante que en el intestino delgado, y la distribución de las fibras es similar, destacando en la circular, submucosa y lámina propia. A través de las distintas etapas estudiadas, la densidad de fibras aumentó hasta los animales de 20 semanas, que presentan características de adulto. No se observaron células fluorescentes en ninguna localización del intestino delgado o grueso.

En el plexo mientérico del intestino delgado las fibras inmunorreactivas para el VIP son escasas y faltan células positivas (Fig. 5). El plexo submucoso está constituido por haces y fibras aisladas y varicosas que se distribuyen formando una red tridimensional en cuyos nudos se localizan los cuerpos celulares. En cuanto a la evolución, se observó un incremento en los animales de 1 semana, y a las 4 semanas aumentó la inervación en la submucosa. En el recto no se observaron grandes variaciones en comparación con el intestino delgado, salvo que se presentan células en el plexo mientérico, la circular está más inervada, y faltan cuerpos celulares en la submucosa. El desarrollo total se alcanzó en la primera semana.

En relación con la inmunorreactividad para la SP, se observan fibras y células positivas tanto en el plexo mientérico como en el submucoso. La densidad de fibras es mayor en el mientérico. Fibras y células se observaron ya en el recién nacido y aumentan en los de 1 semana sin pasar de ser moderados (Fig. 6). La distribución de la inervación tipo SP es similar en el intestino delgado y en el grueso, salvo una menor densidad de células en el plexo submucoso. Las fibras tipo SP son más finas que las de tipo VIP-érgico. El patrón típico queda ya establecido en los animales de 1 semana.

Sobre preparaciones de hematoxilina-eosina se cuantificó el número de neuronas por sección de ganglio mientérico y submucoso del intestino delgado y del grueso. La cuantificación se efectuó sobre secciones aleatorias para cada caso, y las medias de los resultados obtenidos pueden verse en las tablas I y II.

Las distintas etapas del desarrollo cuantificadas se compararon por medio de la *t* de Student. A lo largo del desarrollo, y tanto en el intestino delgado como en el grueso, se observa que el número de neuronas es mayor en los ganglios del plexo mientérico que en los del submucoso. En los ganglios del plexo mientérico del intestino delgado, el aumento del número de neuronas entre los recién nacidos y los de 1 semana es dudoso que sea estadísticamente significativo ($0.05 > P > 0.01$); no obstante, sí lo es entre los de 1 semana y los de 4 semanas ($P < 0.01$). Entre los de 4 semanas y 20 semanas el aumento deja de ser significativo ($P > 0.05$), y lo mismo sucede entre los de 20 semanas y los de 24 o más semanas. Parece pues, que en estos ganglios el aumento del número de neuronas sólo se produce hasta las 4 semanas. En el plexo submucoso del intestino delgado, el aumento del número de neuronas fue similar al del mientérico, ya que entre los recién nacidos y los de 1 semana es dudoso que sea estadísticamente significativo ($0.05 > P > 0.01$), mientras que sí lo es entre los recién nacidos y los de 4 semanas ($P < 0.01$) y entre los de 1 y los de 4 semanas ($P > 0.01$). Entre los de 4 y 20 semanas $P > 0.05$, quedando detenido en esta edad el aumento en el número de neuronas, ya que entre 20 y más de 24 semanas tampoco el aumento es estadísticamente significativo ($P > 0.05$).

En el intestino grueso los resultados estadísticos coinciden con los del intestino delgado respecto al aumento en el número de neuronas de los ganglios, tanto mientéricos como submucosos. Desde los recién nacidos hasta los de 4 semanas el aumento es dudoso que sea estadísticamente significativo ($0.05 > P > 0.01$). Mientras que a las 20 semanas ya es estadísticamente significativo ($P < 0.01$). A partir de las 20 semanas el aumento deja de ser significativo estadísticamente, ya que entre los de 20 y los de más de 24 semanas, $p > 0.05$.

Discusión

La inervación colinérgica del intestino tiene características comunes a todo el tubo digestivo (Aísa y Col. 1987 a y b, 1988) además de algunas peculiaridades e incluso algunas diferencias regionales. La inervación colinérgica intrínseca aparece en el intestino delgado del embrión de pollo entre los días 13 y 14 (Keller, 1976). Ali y McLelland (1978) en un estudio del intestino delgado y grueso del *Gallus domesticus* analizan la inervación colinérgica y noradrenérgica desde las 4 semanas a los 4 meses. Con nuestro trabajo hemos completado el periodo desde la eclosión a las 4 semanas y hasta el adulto. Los patrones de distribución tanto de los plexos colinérgicos como de los noradrenérgicos son totalmente coincidentes en las edades comprendidas en su estudio, y siguen así mismo el patrón general de la inervación intestinal demostrada para los mamíferos (Gabella, 1972 a y b, 1981). Ambos plexos (mientérico y submucoso), así como la inervación de la muscular longitudinal, parecen estar más desarrollados en el intestino grueso que en el delgado e incluso más que en el resto del digestivo.

La escasa inervación colinérgica de la longitudinal del intestino delgado parece ser una característica común para los vertebrados en general. Además de en aves lo hemos demostrado en anfibios (Junquera y Col. 1987). Consideramos que, tal como Gershon sugirió (Gershon y Erde, 1981), la liberación de transmisores a nivel del plexo mientérico podría controlar la funcionalidad de la capa muscular longitudinal, que es muy fina a todos los niveles del digestivo. Kanazawa y Col. (1980), mediante técnicas farmacológicas y electrofisiológicas aplicadas al intestino del pollo, llegaron a la conclusión de que los cuerpos neuronales no colinérgicos excitatorios que inervan el músculo liso del recto del pollo están localizados en los ganglios del nervio de Remak. Esta observación es interesante, ya que, a nivel de los plexos mientéricos del intestino en su conjunto, no hemos encontrado imágenes de cuerpos celulares negativos para la AChE como hemos descrito, por ejemplo, en el proventrículo y molleja (Aísa y Col. 1987 b). Pudiera ser que al menos una parte de la inervación intrínseca sea sustituida en esta zona por la inervación extrínseca del nervio de Remak.

Al igual que en las porciones anteriores del digestivo (Aísa y Col. 1987 a y b), la inervación adrenérgica es de naturaleza extrínseca, lo que contrasta con las descripciones realizadas en el colon proximal de cobaya, donde se han encontrado células fluorescentes (Costa y Col. 1971). Según describen Bennet y Malmfors (1970), gran parte de la inervación adrenérgica intestinal del pollo deriva del nervio de Remak. Como hemos dicho anteriormente, la

inervación noradrenérgica del intestino delgado parece ser más pobre que en el resto del digestivo de las aves, incluido el recto. Esta observación, que coincide con la de Ali y McLelland (1978), sería comparable a la descrita en la *Taenia coli* del cobaya (Gabella y Costa, 1967) o en el recto del cobaya, perro y gato (Furness y Costa, 1974; Burnstock, 1969). Es de destacar, coincidiendo con Ali y McLelland (1978) que las glándulas de la porción distal están más innervadas que las de la porción proximal.

Es interesante la observación de que, mientras hemos encontrado células positivas para el VIP en el plexo mientérico de las distintas partes del digestivo (Aísa, 1987 a y b), faltan en el intestino delgado. Sin embargo, sí las encontramos en el plexo submucoso, observación que se repite en el buche (Aísa, 1987 a 1988). Coinciden estos datos del intestino de las aves con los relativos a mamíferos en los que cuerpos celulares tipo VIP se han descrito exclusivamente en el plexo submucoso (Jessen y Col. 1980; Schultzberg y Col. 1980).

La distribución de las células ganglionares y las fibras positivas para la SP coinciden con las descripciones de Brodin y Col. (1981) y de Saffrey y Col. (1982).

El desarrollo postnatal tanto de la innervación colinérgica como de la noradrenérgica es irregular y varía de unas capas a otras. Bennet y Malmfors (1970) describen no encontrar diferencias claras en animales de edades comprendidas entre 1 día y 6 meses. Como queda reflejado en nuestros resultados, es también en el intestino donde hemos apreciado menos variaciones en la evolución postnatal de la innervación noradrenérgica.

El patrón de innervación VIP-érgico aparece según Saffrey y Col. (1982) a los 11 días de incubación, y se alcanza el patrón adulto en la primera semana después de la eclosión. Según Fontaine-Perus (1984) la innervación tipo VIP surge en el embrión de pollo en el día 10 del desarrollo, observándose células positivas justo antes de la eclosión. Nuestros resultados son coincidentes, puesto que el recién nacido muestra un patrón constituido por fibras y células. Hemos comprobado asimismo que el patrón típico que muestra el adulto se alcanza ya una semana después de la eclosión.

En comparación con otras porciones del digestivo, el desarrollo de la innervación tipo SP parece ser más rápido, ya que aparece completa en la primera semana del desarrollo, mientras que en esófago y buche se prolonga hasta la cuarta semana (Aísa y Col. 1988) y en proventrículo y molleja se extiende hasta las 20 semanas (Brodin y Col. 1981).

BIBLIOGRAFIA

- AISA, J., AZANZA, M. J., JUNQUERA, C., PEG, M. T. y GARIN, P. (1987 a) "Intrinsic innervation in birds anterior gut". En: *Frontiers of Hormone Research* **16**, 30-42. Editor E. Blázquez, Karger, Basel, Suiza.
- AISA, J., AZANZA, M. J., PARRA, P., PEG, M. T., JUNQUERA, C. y GARIN, P. (1987 b) "Desarrollo postnatal del sistema nervioso entérico del proventrículo y molleja de *Gallus-gallus*". *Acta Microscópica* **10** (3), 323-337.
- AISA, J., AZANZA, M. J., PEG, M. T., JUNQUERA, C. y GARIN, P. (1988) "Desarrollo postnatal de la innervación del esófago y buche de *Gallus-gallus*". *Histología Médica*, **IV**, (1), 59-68.
- AKESTER, A. R. (1979) "The autonomic nervous system". En: King A. S., McLelland, J.: *Form and Function in Birds*, London, Acad. Press.
- ALI, H. A. y McLELLAND, T. (1978). "Avian enteric nerve plexuses. A histochemical study". *Cell. Tiss. res.* **189**(3) 537-548.
- BENNET, T. y MALMFORS, T. (1970) "The adrenergic nervous system of the domestic fowl (*Gallus-gallus domesticus*)". *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* **106**, 22-50.
- BRODIN, E., ALUMETS, J., HAKANSON, R., LEANDER, S. and SUNDLER, F. (1981) "Immunoreactive substance P in the chicken gut: distribution, development and possible functional significance". *Cell. Tiss. Res.* **216**, 455-469.
- BURNSTOCK, G. (1969) "Evolution of the autonomic innervation of visceral and cardiovascular systems in Vertebrates". *Pharmacol. Rev.* **21**, 247-324.
- COSTA, M., FURNESS, J. y GABELLA, G. (1971) "Catecholamine containing nerve cells in the mammalian myenteric plexus". *Histochem.* **25**, 103-106.
- EL-BADAWI, A y SCHENK, E. A. (1967) "Histochemical methods for separate consecutive and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephrine in criostat sections." *J. Histochem. Cytochem.*, **15**, 580-588.
- FALCK, B. y OWMAN, C. (1965). "A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic amines". *Acta Univ. Lund., Sectio 11*, **7**, 1-25.
- FONTAINE-PERUS, J. (1984) "Development of VIP in the peripheral nervous system of avian embryo". *Peptides* **8**, 195-200.
- FURNESS, J. B. y COSTA, M. (1974). "The adrenergic innervation of the gastrointestinal tract". *Ergebn. Physiol.* **60**, 1-15.
- GABELLA G. y COSTA M. (1967). "Le fibre adrenergiche nel canale alimentare". *Giornale dell' Accademia di Medicina di Torino*, **130**: 3-23.

- GABELLA, G. (1972 a) "Innervation of the intestinal muscular coat". *J. Neurocytol.* **1**: 341-362.
- GABELLA, G. (1972 b) "Fine structure of the myenteric plexus in the guinea pig ileum". *J. Anat. (Lond.)* **111**, 69-97.
- GABELLA, G. (1981) "Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract". New York, Raven Press.
- GERSHON, M. D., and ERDE, S.M. (1981) "The nervous system of the gut". *Gastroenterology* **80**, 1571-1594.
- JESSEN, K.R., POLAK, J.M., VAN NORDEN, S., BLOOM, S.R. y BURNSTOCK, G. (1980) "Peptide-containing neurons connect the two ganglionated plexuses of the enteric nervous system". *Nature (Lond.)* **283**, 391-393.
- JUNQUERA, C., AZANZA, M.J., PARRA, P., PEG, M.T. and GARIN, P. (1987) "The autonomic innervation of *Rana ridibunda* intestine". *Comp. Biochem. Physiol.* **87C** (2), 335-344, 1.
- KANAZAWA, T., OHASKI, H., TAKEWAKI, T. (1980) "Evidence that cell bodies of non-cholinergic excitatory neurones which supply the smooth muscle of the chicken rectum are located in the ganglia of Remak's nerve". *Br. J. Pharmacol.* **71**, 519-524.
- KELLER, H. (1976) "The development of the intramural nerve plexus of the gastrointestinal tract". *Anat. Embryol. (Berl.)*, **150** 1: 1-6.
- SAFFREY, M.J., POLAK, J.M. y BURNSTOCK, G. (1982). "Distribution of vasoactive intestinal polipeptide -substance P- enkephalin and neurotensin-like immunoreactive nerves in the chicken gut during development". *Neuroscience (England)* **7**, 279-293.
- SCHULTZBERG, M., HOKFELT, T., NILSSON, G., TERENIUS, L., REHFELD, J.F., BROWN, M., ELDER, R., GOLDSTEIN, M. y SAID, S.T. (1980). "Distribution of peptide and catecholamine-containing neurons in the gastrointestinal tract of the rat and guinea-pig. Immunohistochemical studies with polypeptide, enkephaline, somatostatine, gastrin/CCK, neurotensin and dopamine 1-hydroxylase". *Neuroscience* **5**, 689-744.

Correspondencia: Dra. Julia Aísa
 Dept. de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
 Domingo Miral s/n.
 50009 Zaragoza. España

TABLA I

Edad	0	1	4	20	>24
GANGLIOS MIENTERICOS	3,15 ± 0,167	4,85 ± 0,182	6,6 ± 0,234	7,95 ± 0,303	8 ± 0,341
GANGLIOS SUBMUCOSOS	1,5 ± 0,154	1,7 ± 0,147	3,3 ± 0,333	3,9 ± 0,161	4 ± 0,229

INTESTINO DELGADO. Número de neuronas por sección de ganglio (Media desviación típica. Edad en semanas).

TABLA II

Edad	0	1	4	20	>24
GANGLIOS MIENTERICOS	3 ± 0,29	5,1 ± 0,271	6,85 ± 0,319	7,9 ± 0,270	8,1 ± 0,25
GANGLIOS SUBMUCOSOS	1,75 ± 0,119	3,30 ± 0,176	4,67 ± 0,251	5,25 ± 0,289	5,35 ± 0,302

INTESTINO GRUESO. Número de neuronas por sección de ganglio (Media desviación típica. Edad en semanas).

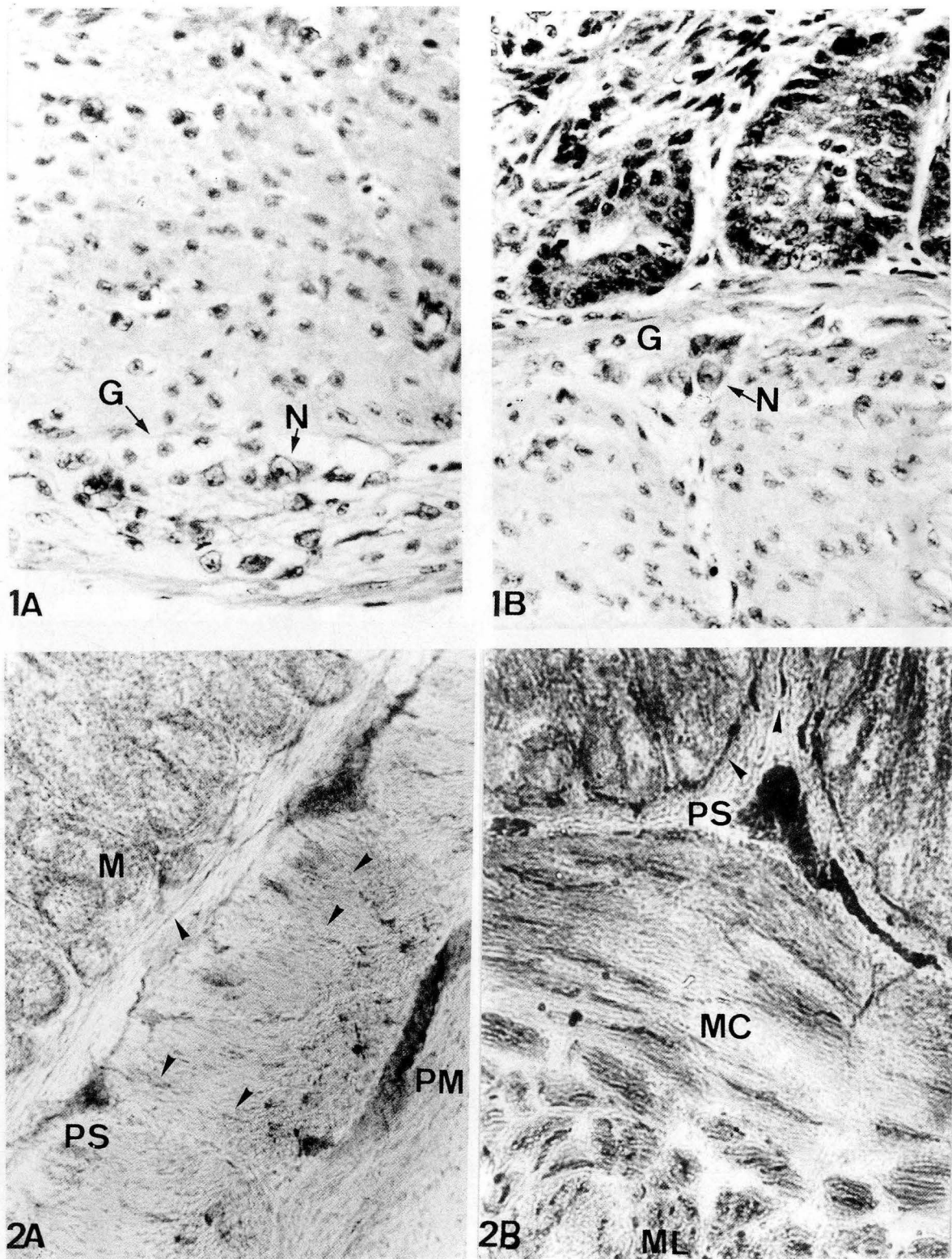


FIGURA 1 A. Intestino delgado. 1 día. H.E. Ganglio mientérico (G) entre las musculares longitudinal y circular, con neuronas (N). 25x. **B.** Intestino delgado. 1 día. H.E. Ganglio submucoso (G) con neuronas (N). 25x.

FIGURA 2 A. Intestino delgado. 20 semanas. AChE. Conexiones (↑) entre el plexo mientérico (PM), el submucoso (PS) y la mucosa (M). 10x. **B.** Intestino grueso. 20 semanas. AChE. Plexo submucoso (PS). Muscular longitudinal (ML). Muscular circular (MC). Troncos nerviosos (↑) colinérgicos innervando la base de las glándulas. 10x.

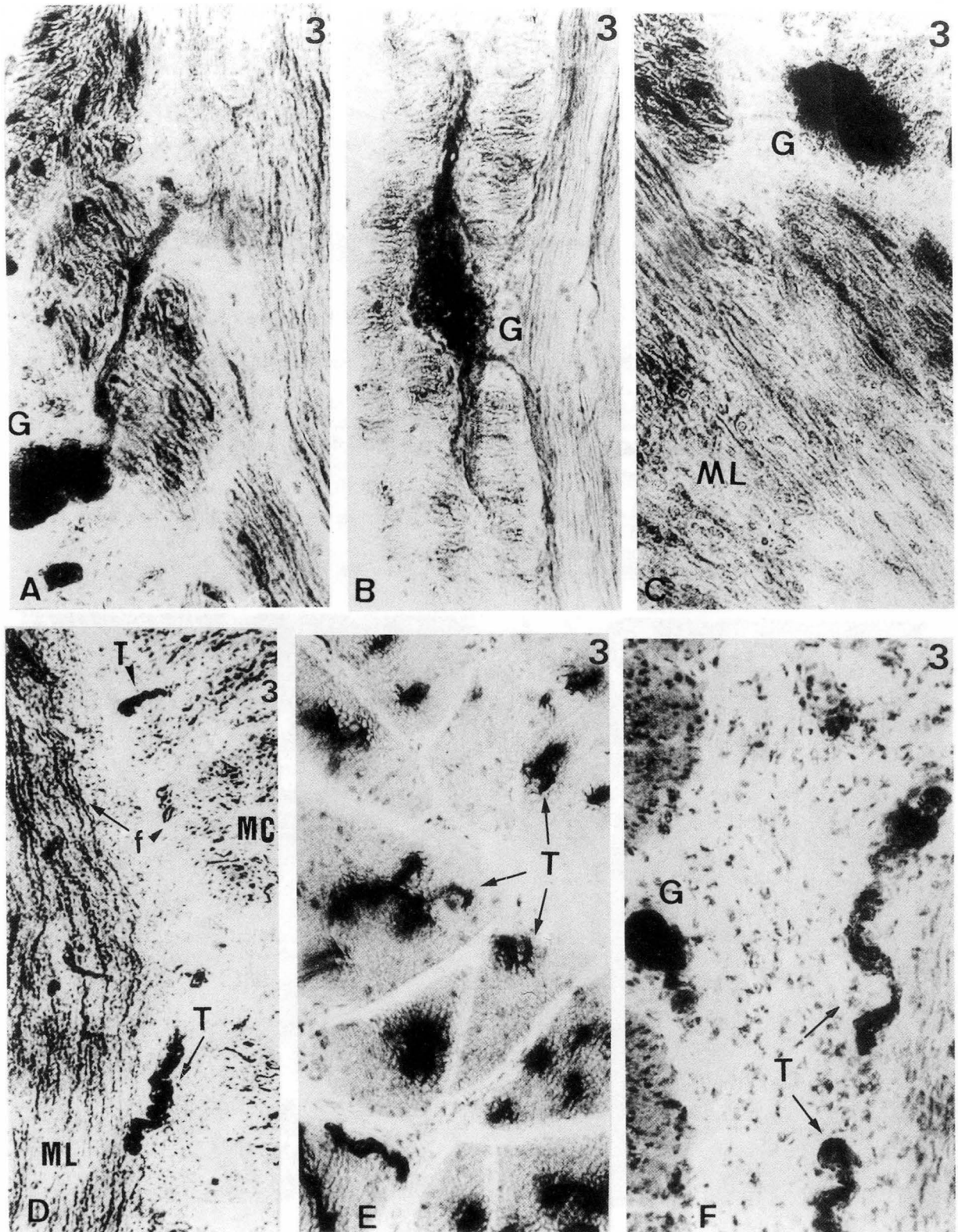
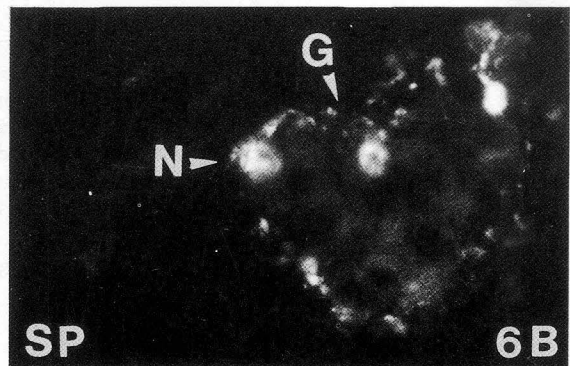
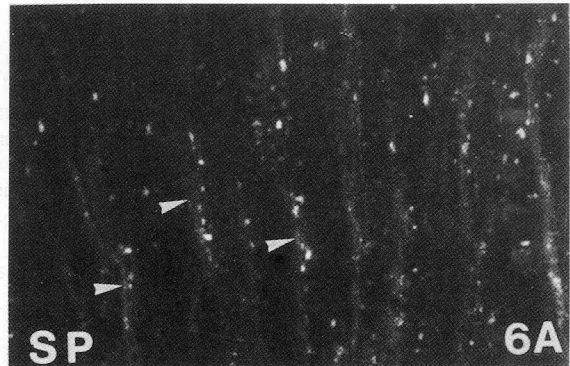
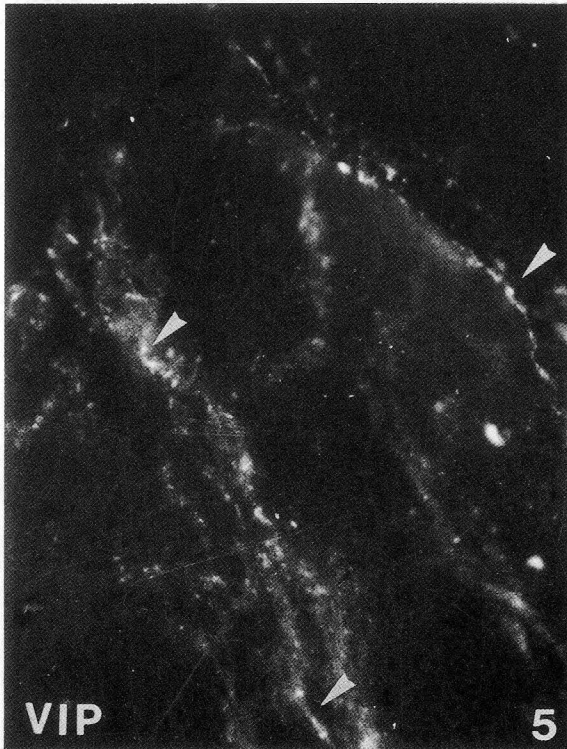
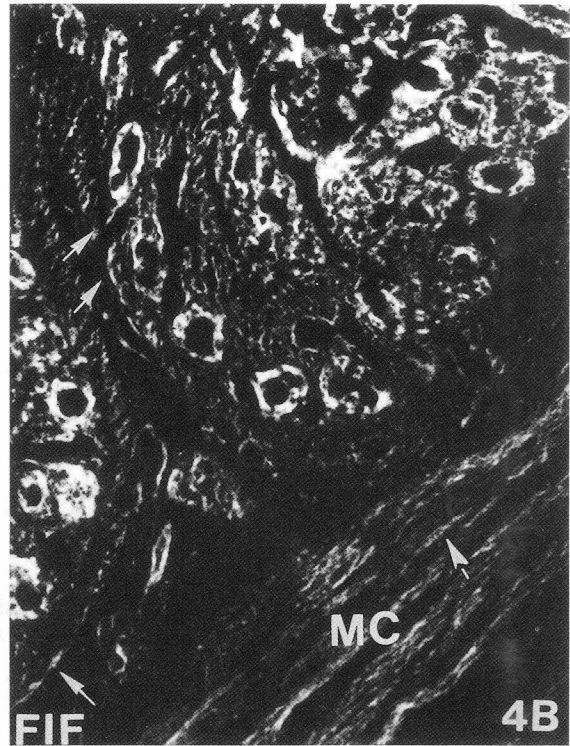
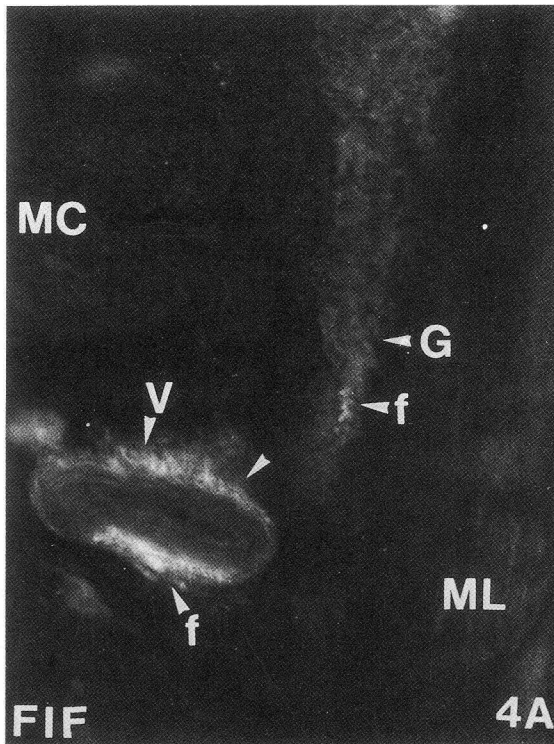


FIGURA 3 Intestino grueso. 20 semanas. AChE. Ganglios (G): **A.** Entre la serosa y la muscular longitudinal. 25x. **B.** En el seno de la muscular longitudinal. 25x. **C** Entre la longitudinal (ML) y la circular. 25x. **D.** Fibras (f) en el seno de las musculares longitudinal (ML) y circular (MC). Troncos nerviosos (T) entre ambas capas musculares. 10x. **E.** Troncos (T) intrafasciculares en la muscular circular. 40x. **F.** Ganglio (G) y troncos nerviosos en la submucosa. 25x.



- FIGURA 4 A** Intestino delgado. 4 semanas. FIF. Fibras (f) rodeando a un vaso (V) y a un ganglio (G) entre las musculares longit. (ML) y circular (MC). 25x. **B** Intestino grueso. 4 semanas. FIF. Fibras (↑) en la muscularis mucosae y en la base de las glándulas. 10x.
- FIGURA 5** Intestino delgado. 1 semana. IF. Haces de fibras (↑) VIPérgicas del plexo mientérico. 25x.
- FIGURA 6** Inervación tipo SP. 1 semana. IF. **A** Fibras del plexo mientérico del intestino delgado (↑). 25x. **B** Intestino grueso. Ganglio (G) mientérico con neuronas (N) positivas. 25x.

CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LA INERVACION DEL INTESTINO DE *GALLUS gallus*

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE INTESTINE INNERVATION OF *GALLUS gallus*

J. AISA, P. PARRA y M.J. AZANZA

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Universidad de Zaragoza

RESUMEN

El sistema nervioso entérico del intestino de las aves está muy desarrollado. Algunas fibras mielínicas acompañan a los troncos de axones amielínicos y se distribuyen hasta la mucosa. El número de células gliales es aproximadamente el doble que el de neuronas en el plexo mientérico. En el plexo submucoso, no es tan alto el número de células gliales, pero sigue siendo superior al de neuronas. En la capa muscular circular aparecen neuronas aisladas acompañando a troncos nerviosos inter e intrafasciculares. Los contactos sinápticos directos en los somas neuronales son frecuentes, pero no hemos observado especializaciones sinápticas. Las varicosidades más prominentes se observaron en los axones periféricos de los troncos nerviosos y contienen vesículas colinérgicas, peptidérgicas o, bien, mixtas de ambos tipos.

PALABRAS CLAVE: Ultraestructura del intestino de las aves, inervación del intestino de *Gallus gallus*, vesículas colinérgicas y peptidérgicas, inervación autónoma.

SUMMARY

The enteric nervous system of birds intestine is very well developed. Myelin fibers are seen in the nervous trunks distributing up to the mucous layer. Glial cells duplicate the number of neurons in the myenteric plexuses. In the submucous plexuses their number decreases but it is always higher than the neurons one. Isolated neurons are widely spreaded in the circular muscle coat accompanying the nervous trunks which can be inter and intrafascicularly located. The most prominent varicosities observed either along the peripheric nervous trunks axons or directly laying on the soma membranes are those containing peptidergic vesicles or mixed with cholinergic and peptidergic vesicles. We have observed synaptic specializations.

KEY WORDS: Birds gut innervation ultrastructure, *Gallus gallus* gut innervation, Cholinergic and peptidergic vesicles, Autonomic innervation.

Introducción

En trabajos anteriores hemos descrito la inervación del digestivo anterior de aves: esófago, buche, proventrículo, y molleja (Aísa 1986, Aísa et al. 1987 a); el desarrollo postnatal del sistema nervioso entérico del proventrículo y molleja (Aísa et al. 1987 b); el desarrollo postnatal de la inervación del esófago y buche (Aísa y col. 1988) además

del desarrollo postnatal de la inervación del intestino (Aisa y col. 1989 a) y las características ultraestructurales de la inervación del digestivo anterior (Aisa y col. 1989 b). Hasta el presente se han realizado muy pocos estudios ultraestructurales sobre el sistema nervioso entérico de las aves. En relación con el intestino son de destacar las descripciones de las varicosidades catecolaminérgicas del intestino delgado (Young, 1983) y del recto (Young, 1989) llevadas a cabo con técnicas específicas de fijación cromafín y con permanganato potásico. Estas fueron las razones que nos impulsaron a llevar a cabo el estudio, a nivel ultraestructural, de la inervación del intestino siguiendo en la línea de nuestros trabajos anteriores realizados a nivel de microscopía óptica, a fin de contrastar los resultados obtenidos a uno y otro nivel.

Material y Metodos

Se sacrificaron 20 animales adultos y se tomaron muestras de aproximadamente 1 mm cúbico a las que se aplicó el método convencional para microscopía electrónica: fijación en una mezcla de glutaraldehído en buffer de Milloning (pH 7,3) postfijación en OsO_4 al 2%, tinción con acetato de uranilo al 70%, deshidratación y finalmente inclusión en araldita. Las secciones ultrafinas se montaron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo. La observación se realizó en un M.E., Phillips modelo 301, en el que se impresionaron las placas fotográficas.

Resultados

Los componentes nerviosos, neuronas, células gliales y troncos nerviosos tienen una rica representación en las paredes del intestino de las aves.

La muscular longitudinal está atravesada por gruesos troncos nerviosos, que sin duda provienen en su mayoría del nervio ganglionado de Remak. Este nervio característico de las aves es mixto, es decir, contiene ramas simpáticas y parasimpáticas y corre por el mesenterio, inmediatamente encima del duodeno, yeyuno e íleon y algo más separado del recto.

Los fascículos nerviosos están acompañados por células de Schwann y aparecen rodeados por fibras de colágena. Predominan en ellos los axones amielínicos; no obstante, en la periferia de los troncos nerviosos se observan fibras mielínicas pregangliónicas, en escaso número, que pueden observarse llegando hasta la mucosa. Los plexos mientéricos presentan una localización típica entre las dos capas musculares externas y en ellos el número de células gliales duplica al de neuronas; en los plexos submucosos, si bien el número de células gliales disminuye, sigue siendo superior al de neuronas.

A nivel de la muscular circular los troncos de fibras se disponen en el tejido conectivo entre los haces musculares y pueden ser intrafasciculares (Fig. 1 y 2) o interfasciculares. Con mucha frecuencia presentan neuronas asociadas.

A medida que los troncos nerviosos atraviesan la pared del intestino van dando ramificaciones que inervan las estructuras histológicas a su paso. Por esta razón, a nivel de la submucosa los troncos nerviosos presentan calibre medio. En la mucosa no hemos encontrado contactos directos con las glándulas; no obstante, se localizan finos haces de fibras nerviosas en sus proximidades (Fig. 3).

Los axones situados en la periferia de los troncos nerviosos muestran varicosidades con diferentes tipos de vesículas, predominando las de tipo peptidérgico (Figs. 2, 3 y 4), las colinérgicas y las mixtas con vesículas de tipo colinérgico y peptidérgico (Fig. 2 y 5). Puesto que no hemos utilizado métodos específicos para la determinación de catecolaminas a nivel ultraestructural, los perfiles con vesículas noradrenérgicas son muy escasos y de dudosa confirmación.

Las neuronas muestran grandes núcleos de formas diversas: redondeadas (Fig. 1), irregulares (Figs. 2 y 4) y todas ellas con cromatina marginal muy patente. Con mucha frecuencia aparecen rodeados de fibras de colágena o varicosidades en íntimo contacto con la membrana neuronal (Fig. 4).

Se observa que las fibras musculares lisas próximas a la estructuras nerviosas muestran numerosas cavéolas siempre cerca de los elementos nerviosos (Fig. 2). En el intestino delgado las neuronas son más pequeñas que en el recto, donde se presentan variaciones más amplias en el tamaño de los somas neuronales.

Discusión

Las imágenes de microscopía electrónica que hemos obtenido confirman nuestros resultados a nivel óptico. (Aísa et al. 1989 a).

Es de destacar la presencia de neuronas aisladas en la muscular circular. Estas neuronas parecen ser una prolongación del plexo mientérico y una estación de relays mediadora de la transmisión bioeléctrica entre los plexos de Auerbach y de Meissner. De hecho, en el desarrollo embrionario del hombre se han encontrado neuronas que migran desde el plexo mientérico hacia el submucoso (Okamoto y Veda, 1967).

La clasificación de los tipos de neuronas en los plexos entéricos de mamíferos sigue siendo materia controvertida. Se han realizado diversos intentos de clasificación (Gabella, 1971 a; Cook y Burnstock, 1976; Yamamoto, 1977). Debido a su situación las neuronas entéricas son afectadas considerablemente por la actividad mecánica de la pared muscular (Gabella, 1982). Se ha sugerido, por otra parte, que las diferencias en tamaño y forma pudieran reflejar diferencias funcionales.

Las células gliales intramurales llamadas "células gliales entéricas" por Gabella (1971 b, 1981) son más pequeñas que las neuronas, algunas se disponen rodeando las neuronas aunque de forma incompleta. Debido a la intensa actividad mecánica a la que están expuestos los ganglios entéricos, se considera que las células gliales tienen una importante función de soporte mecánico de los mismos (Gabella, 1981).

Los vasos sanguíneos no penetran en el interior de los ganglios entéricos (Gershon y Bursztajn, 1978). Aparte de no haber utilizado métodos específicos, ésta podría ser otra razón por la que encontramos muy pocas vesículas noradrenérgicas. En su trabajo sobre la determinación de vesículas catecolaminérgicas Young (1989) distingue, por ejemplo, entre dos localizaciones: el plexo perivascular y las regiones no vasculares. Concluye que la localización a nivel ultraestructural de perfiles catecolaminérgicos en el recto del pollo depende del fijador utilizado (fijación con permanganato potásico o fijación cromafín). En los trabajos de microscopía óptica realizados (Aísa et al. 1989 a) hemos observado que la inervación noradrenérgica se extiende fundamentalmente alrededor de los vasos sanguíneos, es más escasa alrededor de los ganglios entéricos y las fibras noradrenérgicas se distribuyen formando un fino plexo en la mucosa, en la base de las glándulas. Hemos observado además que el patrón de distribución de los plexos noradrenérgicos no es tan continuo como el de los plexos colinérgicos e incluso los peptidérgicos.

Las varicosidades más abundantes son las clasificadas como tipo AGV con vesículas pequeñas agranulares, descritas como de tipo colinérgico, y las de tipo LDV grandes y opacas descritas como de tipo peptidérgico (Komuro, Baluk y Burnstock, 1982).

Nuestros resultados de microscopía óptica muestran que la inervación colinérgica y peptidérgica es abundante en el intestino (Aísa et al. 1989 a). En correspondencia, las varicosidades más abundantes encontradas son las de tipo peptidérgico y mixtas de tipo peptidérgico y colinérgico.

Nuestras observaciones sobre la inervación adrenérgica a nivel de microscopía óptica coinciden con las descripciones de Young (1983) utilizando la fijación cromafín específica para los terminales típicos catecolaminérgicos (CA) definidos como SGV (pequeñas vesículas granulares de 30-60 nm de diámetro). En el recto del pollo Young describe que se localizan muy pocos axones con perfiles SGV en los plexos no vasculares. En un estudio más reciente, Young (1989) utilizando dos métodos de fijación específicos para los terminales CA encuentra que el número de perfiles SGV y LGV (vesículas grandes granulares) reveladas a microscopía electrónica depende del fijador empleado. Tras fijación con permanganato potásico, los axones-CA contienen vesículas principalmente del tipo SGV, tanto en los plexos vasculares como en los no vasculares. En contraste, después de fijación cromafín los axones-CA de los plexos no vasculares contienen pocas vesículas SGV en el recto y en el intestino delgado son escasos tanto en los plexos no vasculares como en los vasculares. Demuestra que cada sistema de fijación destruye selectivamente las vesículas pequeñas o grandes y sugiere que podrían reflejar dos subpoblaciones conteniendo noradrenalina o

adrenalina. No obstante, faltan estudios bioquímicos que pudieran confirmar la existencia de axones capaces de sintetizar adrenalina en el intestino de las aves.

BIBLIOGRAFIA

- AISA, J. (1986): Tesis Doctoral. Pub. Universidad de Zaragoza, 69.
- AISA J., AZANZA, M.J., JUNQUERA, C., PEG, M.T. y GARIN, P. (1987 a): *Intrinsic Innervation in Birds Anterior Gut*. Front Horm. Res. **16**: 30-42 (Karger, Basel).
- AISA, J., AZANZA, M.J., PARRA, P., PEG, M.T., JUNQUERA, C. y GARIN, P. (1987 b): *Desarrollo postnatal del sistema nervioso entérico del proventrículo y molleja de Gallus gallus*. Acta Microscópica. **10**: 323-337.
- AISA, J., AZANZA, M.J., PEG, M.T., JUNQUERA, C. y GARIN, P. (1988): *Desarrollo postnatal de la inervación del esófago y buche de Gallus gallus*. Histología Médica, **4**: 59-68.
- AISA, J., AZANZA, M.J. y PEG, M.T. (1989 a): *Desarrollo postnatal de la inervación del intestino en Gallus gallus*. Anales de Anatomía. En prensa.
- AISA, J., PARRA, P. y AZANZA, M.J. (1989 b): *Ultrastructural characteristics of Gallus gallus anterior gut innervation*. Histol. and Histopathol. (enviado para su publicación).
- COOK, R.D. y BURNSTOCK, G.J. (1976): *The Ultrastructure of Auerbach's plexuses in the guinea-pig. I.—Neuronal elements*. J. Neurocytol. **5**: 171-194.
- GABELLA, G. (1971 a): *Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat*. J. Anat. **109**: 81-95.
- (1971 b): *Glial cells in the myenteric plexus*. Zeit Naturforsch, **26 b**: 244-245.
- (1972 a): *Innervation of the intestinal muscular coat*. J. Neurocytol. **1**: 341-362.
- (1972 b): *Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum*. J. Anat. (Lond) **111**: 69-97.
- (1981): *Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: The enteric glial cells*. Neuroscience, **6**: 425-436.
- (1982) *On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia*. Scand. J. Gastroent. **17**: 15-26.
- GERSHON, M.D. y BURSZTAJN, S. (1978): *Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa*. J. Comp. Neurol. **18 b**: 467-488.
- KOMURO, T., BALUK, P. y BURNSTOCK, G. (1982): *An structural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon*. Neuroscience. **7**: 295-305.
- OKAMOTO, T. y VEDA, M. (1967). *Innervation of the intestinal muscular coat*. J. Neurocytol. **1**: 341-362.
- YAMAMOTO, M. (1977): *Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and rat*. Arch. Histol. Jap. **40**: 171-201.
- YOUNG, H.M., (1983): *Ultrastructure of catecholamine-containing axons in the intestine of the domestic fowl*. Cell Tissue Res. **234**: 411-425.

Correspondencia: J. Aísa. Cátedra de Biología.
Dpto. de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Domingo Miral s/n. 50 009 Zaragoza, España.

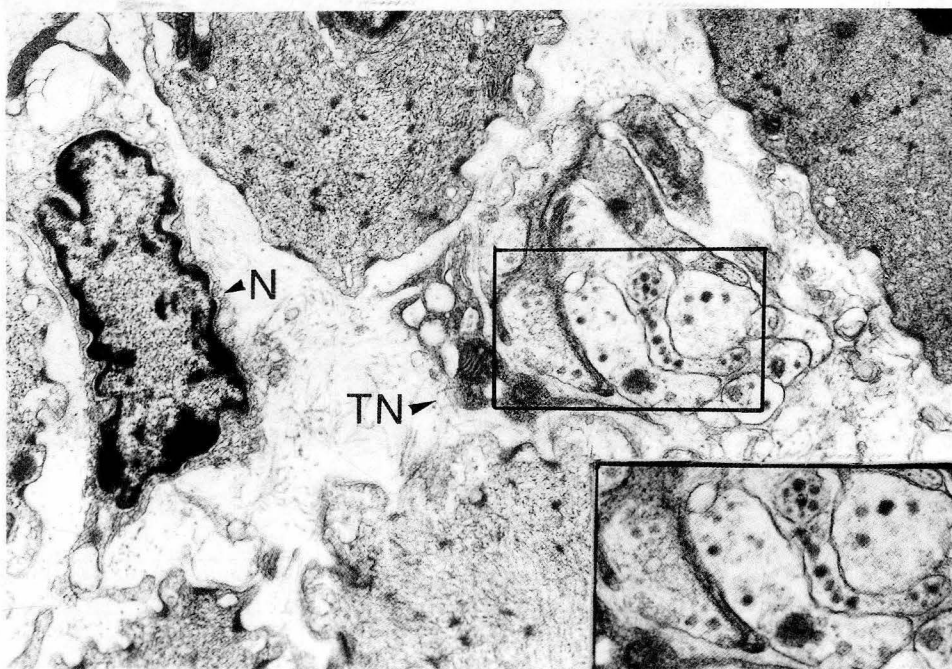
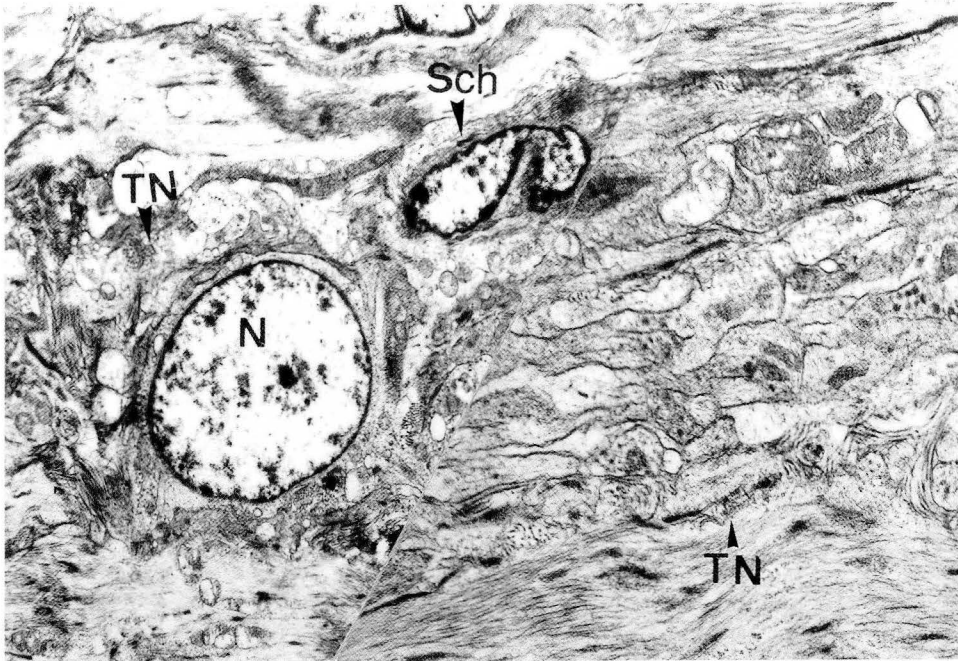


FIGURA 1 Intestino grueso. Tronco nervioso (TN) intrafascicular en el seno de la capa muscular circular. Neurona (N) con núcleo redondeado y célula de Schwan (Sch). 3.800x.

FIGURA 2 Intestino delgado. Tronco nervioso (TN) intrafascicular en la musculatura circular. Vesículas predominantemente peptidérgicas (p) y mixtas [colinérgicas (ch) y peptidérgicas (p)]. Neurona (N) con núcleo de forma irregular. Se observan las caveolas en la superficie de las fibras musculares próximas a los troncos nerviosos. 9.100x, 18.200x.



FIGURA 3 Mucosa del recto. Troncos nerviosos (TN) de calibre medio localizados en la base de las glándulas. Predominan las varicosidades peptidérgicas (p) y mixtas (colinérgicas (ch) y peptidérgicas (p)). 1.900x, 18.200x.

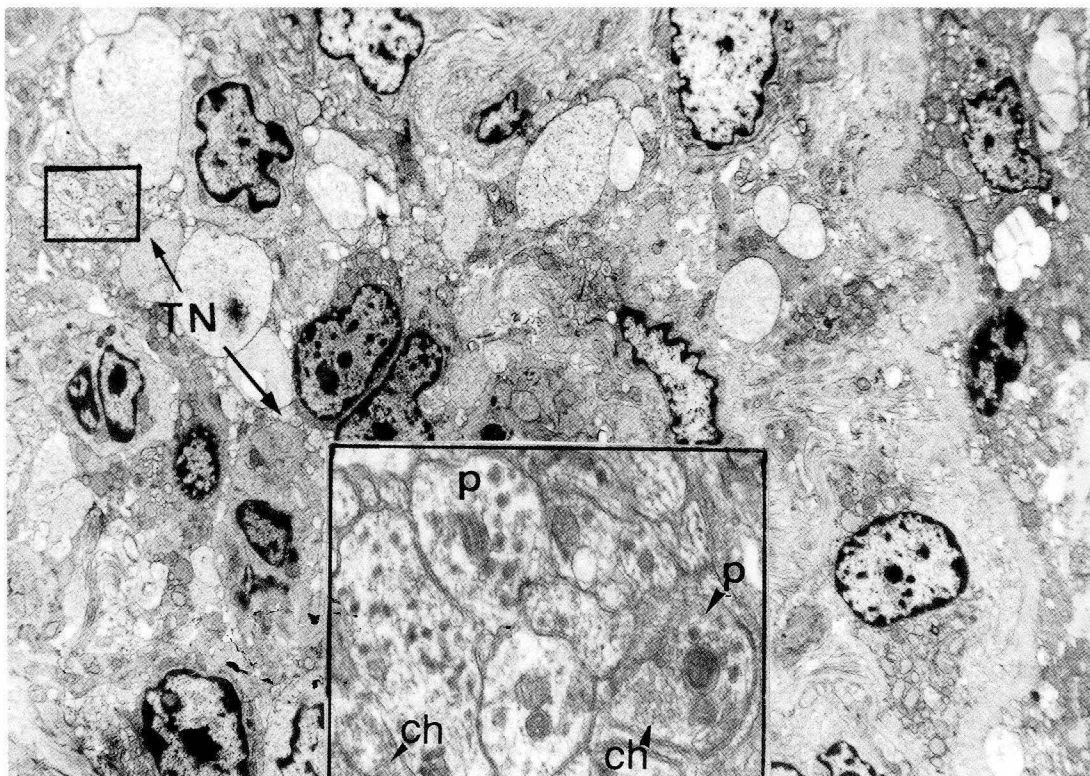
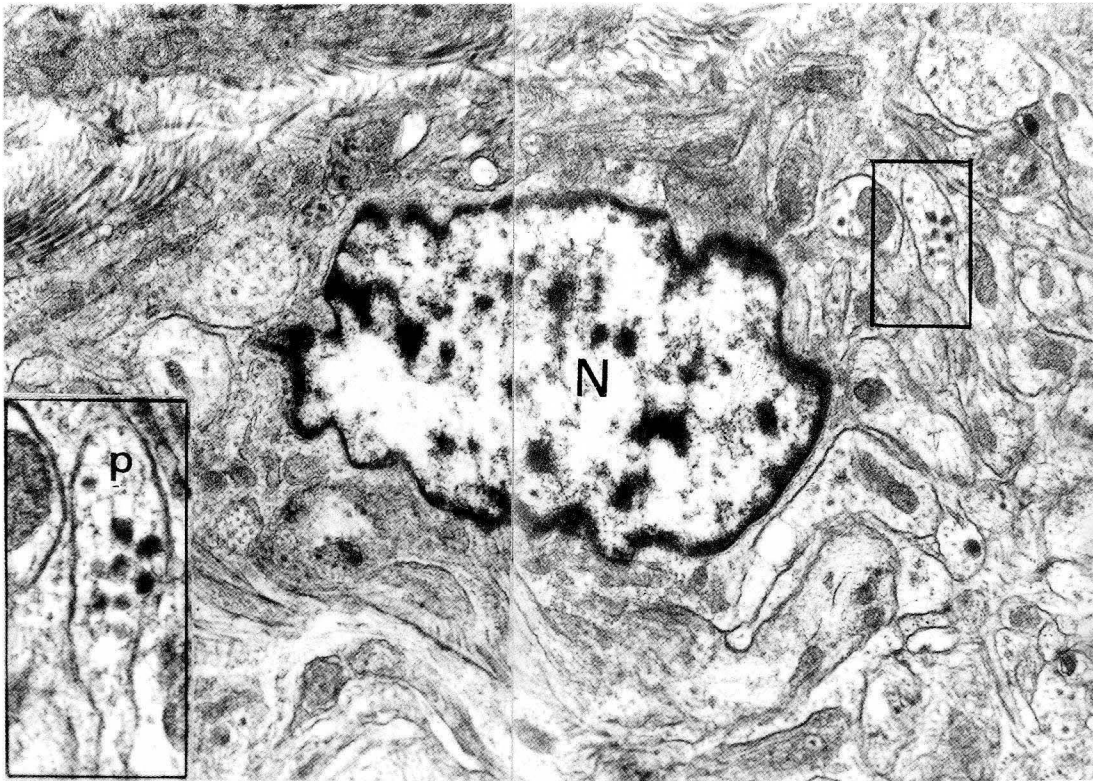


FIGURA 4 Recto. Neurona (N) de núcleo oval de contorno irregular entre los fascículos de la capa muscular circular. Está rodeada de fibras de colágena y de varicosidades cerca del soma neuronal que contienen vesículas, fundamentalmente de tipo peptidérgico (p). 9.100x, 19.000x.

FIGURA 5 Mucosa del intestino delgado. Tronco nervioso (TN) en la base de una glándula. Varicosidades con vesículas peptidérgicas (p), colinérgicas (ch) y mixtas (colinérgicas (ch) y peptidérgicas (p)). 1.900x, 15.000x.

EL EPENDIMO DE LA REGION TUBEROINFUNDIBULAR DEL TERCER VENTRICULO Y SUS RELACIONES CON LOS MECANISMOS NEUROENDOCRINOS (*)

THE EPENDYMUS OF THE TUBEROINFUNDIBULAR REGION OF THE THIRD VENTRICLE AND ITS RELATIONSHIPS WITH NEUROENDOCRINE MECHANISMS

P. AMAT

Departamento de Investigación del Hospital Clínico Universitario y
Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

RESUMEN

La presencia de botones nerviosos terminales y de otras estructuras que contienen péptidos en el interior del tercer ventrículo sugiere la posibilidad de que estas sustancias sean segregadas al líquido cefalorraquídeo (LCR) y transportadas a diversos lugares de actuación. Esta es la hipótesis de la vía ventricular de secreción y transporte de neurohormonas. Uno de estos lugares de actuación es la región tuberoinfundibular del hipotálamo, en la que se encuentra el núcleo arcuato. A través del epéndimo de esta región, las sustancias transportadas por el LCR pueden intervenir en mecanismos neuroendocrinos hipofisarios. Algunas células endimarias alargadas de la región tuberoinfundibular, llamadas tanicitos, se extienden entre la superficie ventricular y el espacio de los capilares de la eminencia media, relacionando así el LCR con la adenohipófisis. Esta relación también puede ser mediada por el núcleo arcuato. La ausencia de una capa subependimaria glial en la pared lateral del receso infundibular del tercer ventrículo explica la posibilidad de una influencia directa del LCR sobre la parte medial del núcleo arcuato. Pero la relación del LCR con el núcleo se lleva a cabo no solamente sobre su parte medial, sino también sobre su parte inferior por medio de una hendidura que prolonga hacia afuera el ángulo lateral del receso infundibular. Esta hendidura, repleta de microvellosidades y con algún cilio, abraza por abajo al núcleo arcuato y es tan estrecha que solamente es perceptible con el microscopio electrónico.

PALABRAS CLAVE: Hipotálamo mediobasal. Receso infundibular. Tercer ventrículo. Epéndimo. Tanicitos. Núcleo arcuato.

SUMMARY

The presence of axon terminals and other peptide—and neurohormone—containing structures within the third ventricle suggests the possibility that such substances might be secreted into the cerebrospinal fluid (CSF) and from there transported to different targets. This is the hypothesis of the ventricular route of secretion and hormone transport. One of these targets is the hypothalamic tuberoinfundibular region, in which the arcuate nucleus is located. Through the ependymus of this region, substances transported by the CSF may participate in hypophyseal neuroendocrine mechanisms. Some elongated ependymary cells of the tuberoinfundibular region, called tanocytes, course between the ventricular surface and the perivascular space of the capillaries of the median eminence, thus relating the CSF with the adenohipophysis. This relationship may also be mediated by the arcuate nucleus. The absence of a subependymary glial layer in the lateral wall of the infundibular recess of the third ventricle would account for the possibility of a direct effect of CSF on the medial part of the arcuate nucleus. However, the topographic

(*) Trabajo presentado en el simposio-homenaje al Prof. Vicente Pozuelo Escudero, celebrado en el Colegio de Médicos de Madrid el 21 de octubre de 1988.

relationship between the CSF and the nucleus is not only on the medial part of the nucleus but also on its lower part through a cleft that extends the lateral angle of the infundibular recess outwards. This cleft, filled with microvilli and a few cilliae, encompasses the arcuate nucleus from below and is so narrow that it can only be visualized with the electron microscope.

KEY WORDS: Mediobasal hypothalamus. Infundibular recess. Third ventricle. Ependymus. Tanycytes. Arcuate nucleus.

El epéndimo de la región tuberoinfundibular del tercer ventrículo y sus relaciones con los mecanismos neuroendocrinos

En la *región tuberoinfundibular*, que forma parte del hipotálamo mediobasal, se encuentra el *núcleo arcuato*, cuya pared medial está próxima al epéndimo. Este epéndimo, al igual que el de otras regiones ventriculares, está constituido por una capa de células endimarias cuboides, que son los *ependimocitos comunes*.

No obstante, el epéndimo de esta región es estructuralmente diferente al de otras regiones ventriculares (Brawer, 1972). Sus características estructurales diferenciales más notables son las siguientes:

1. La práctica ausencia de *cilios*.
2. La presencia de *tanicitos*, que son células endimarias especiales, alargadas, de las que nos ocuparemos más adelante.
3. La existencia de *yemas citoplasmáticas*, de diámetro variable y de escaso contenido, que se proyectan hacia la luz ventricular desde el polo apical de los endimocitos. Estas yemas o bulbos citoplasmáticos son elementos transitorios, es decir, que aparecen y desaparecen en relación con diferentes situaciones fisiológicas, tales como el desarrollo y el ciclo estral (véase Knowles, 1982)
4. La presencia de *elementos supraependimarios* (fibras y botones nerviosos, así como las llamadas *células supraependimarias*). (Véanse Amat y col. 1981, Pastor y col. 1982a).
5. La falta de una capa subependimaria glial, lo cual permite un contacto más directo del núcleo arcuato con el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Todas estas circunstancias han determinado que, desde hace ya tiempo, muchos investigadores consideren que *el epéndimo de la región tuberoinfundibular funciona como una glándula endocrina invadida y que pueda liberar diversos factores reguladores* (Brawer, 1972). Las aportaciones más recientes confirman en parte este concepto (Kozlowzki y Coates, 1985; Krisch, 1986; Leonhardt y col. 1987).

Así pues, el epéndimo no solamente forma una barrera entre el LCR interno o ventricular y el tejido nervioso subyacente, sino que también tiene funciones de absorción, de secreción, de intervención en los mecanismos neuroendocrinos, etc. Es más, la relación del epéndimo con el LCR lo convierte en mediador entre este líquido y las neuronas del núcleo arcuato, la eminencia media y los capilares sanguíneos del sistema porta hipofisario.

La importancia del papel del epéndimo en los mecanismos neuroendocrinos se acrecienta si se admite la hipótesis de la *vía ventricular de secreción y de transporte de neurohormonas y otros neuropéptidos*, que son liberados hacia el LCR y transportados por éste hasta zonas más o menos alejadas, tales como la región tuberoinfundibular.

Admitida esta hipótesis (y son innumerables las publicaciones sobre neuropéptidos y otras sustancias, detectados en el LCR, que la confirman), la *región tuberoinfundibular* sería una importante encrucijada de información por dos vías, la nerviosa y la ventricular, con lo cual el epéndimo, especialmente sus tanicitos, serían elementos imprescindibles para los mecanismos neuroendocrinos.

Nuestro grupo ha estudiado el epéndimo de esta región con el microscopio electrónico de transmisión y de barrido en varias especies de animales. En este trabajo, exponemos algunos aspectos ultraestructurales del epéndimo de la región tuberoinfundibular y su relación con el *sistema hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis* y con la *vía neurosecretora LHRH preóptico-infundibular*.

Relación del epéndimo de la región tuberoinfundibular con el sistema hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis

La presencia de neurohormonas efectoras, tales como la oxitocina (OX) y la vasopresina (VP), y de otros péptidos cerebrales en el LCR es conocida desde hace tiempo.

Los primeros en denunciar en el LCR la existencia de un principio activo del lóbulo posterior de la hipófisis que aumentaba la presión sanguínea cuando se inyectaba a un animal, fueron Cushing y Goetsch en el año 1910, si bien este hallazgo fue rebatido por varios investigadores (véase Kozlowski, 1982).

También Marañón estaba convencido de la posibilidad de que en el LCR hubiese principios activos, convencimiento que expresó en una comunicación del año 1916 a la Real Academia Nacional de Medicina con estas palabras: "Es, pues, seguro que la secreción interna de la porción intermedia de la hipófisis no se vierte en la sangre como las demás secreciones, sino que se desliza a través del tallo pituitario, y se vierte en el LCR" (Marañón, 1916).

En lo referente a la OX y la VP, hace años que se ha demostrado que están presentes en el LCR (Heller, 1968; Vorherr y col. 1968). Incluso se sabe que en la rata la VP presente en el LCR tiene un marcado ritmo circadiano, que es regulado preferentemente por el núcleo supraquiasmático (Jolkkonen y col. 1988).

Estos hallazgos vienen a demostrar la íntima asociación estructural y funcional del sistema neurosecretor hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis (formado por los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, ambos magnocelulares, que sintetizan la OX y la VP así como sus proteínas transportadoras, las neurofisinas) con el sistema ventricular cerebroespinal, incluidos los plexos coroideos (para referencias, véase Kozlowski, 1982). En efecto, en el interior del ventrículo se han visto estructuras, que son inmunorreactivas a las neurofisinas, de aspecto parecido a los cuerpos de Herring (HB).

Con el microscopio electrónico de transmisión (MET) nuestro grupo ha detectado la presencia de estructuras semejantes a los HB (Fig. 1) en el receso infundibular (RINF) del tercer ventrículo (III), y en algunos casos hemos visto ahí *HIB-terminales* (Fig. 2) (Pastor y col. 1982b; Amat y col. 1985).

Desde el punto de vista estructural, los *HIB-terminales* se diferencian de los HB convencionales porque en aquéllos hay un acúmulo de vesículas semejantes a las sinápticas, y desde el punto de vista funcional porque son los que liberan su producto a los capilares sanguíneos del lóbulo posterior de la hipófisis. Por lo tanto, se puede sugerir que los *HIB-terminales* del RINF deben segregar sus hormonas OX y VP y sus neurofisinas hacia el interior del III.

Relación del epéndimo de la región tuberoinfundibular con la vía neurosecretora LHRH preóptico-infundibular

Otro sistema que está en íntima relación con el epéndimo del III es el constituido por los haces de la vía neurosecretora LHRH preóptico-infundibular, descrita por vez primera por Barry y col. (1973), cuyos axones terminan preferentemente en la eminencia media (EM), aunque lo hacen también en el órgano vascular de la lámina terminal y en el órgano subfornical (Bennet-Clarke y Joseph, 1982). Algunos de los axones que terminan en la EM, concretamente los que forman el haz medial de esa vía neurosecretora (Bennet-Clarke y Joseph, 1982), atraviesan el estrato periventricular del III y caminan en los canalículos de los endimocitos.

La presencia de fibras nerviosas amielínicas de pequeño calibre, detectadas por el microscopio electrónico de transmisión, muy próximas a la luz ventricular, llamó la atención sobre su posible significado (Brawer, 1972). Más tarde, con técnicas inmunocitoquímicas se comprobó la existencia de *material-LHRH* en muchas de estas fibras, y se formuló la hipótesis de la vía ventricular de secreción de LHRH.

Esta hipótesis presupone la existencia de terminaciones nerviosas intraventriculares en el interior del ventrículo. En efecto, las hay (como ejemplo, los ya citados *HIB-terminales*), pero la inmunocitoquímica aplicada a cortes ultrafinos para microscopía electrónica de transmisión no ha permitido hasta el momento detectar *material-LHRH* inmunorreactivo en el interior de terminaciones axónicas intraventriculares.

La no detección de *botones nerviosos terminales-LHRH* en el interior del III está en relación con la prácticamente ausencia de LHRH en el LCR, comprobada con métodos de radioinmunoensayo en varias especies animales. En un trabajo sobre 36 mujeres, sólo en siete de ellas se observó la existencia de LHRH en el LCR, pero en cifras inferiores a 0.95 pg/ml (para referencias bibliográficas, véase Kozłowski y Coates, 1985).

En 1982, Kozłowski se planteaba esta cuestión: "*Si la hipótesis de la vía ventricular de transporte de neuropéptidos fuese comprobada correctamente, ¿qué significado fisiológico podría ser atribuido a un sistema de transporte de acción lenta como es éste? Este sistema—se contestaba él mismo—sería un medio de proporcionar una activación continua a los receptores de las células tróficas, manteniéndolas en un estado de preparación constante para una rápida respuesta a la actuación brusca de péptidos bioactivos liberados por las terminaciones nerviosas en los vasos de la EM*".

Los tanicitos de la región tuberoinfundibular

La hipótesis de la vía ventricular de secreción obliga a mencionar un especial tipo de células endimarias, caracterizado por su morfología, que fue descrito por Horstmann (1954) con el nombre de *tanicitos*. A diferencia de la mayor parte de los endimocitos convencionales, los tanicitos carecen prácticamente de cilios, y tienen una característica forma alargada, con un soma, que forma parte de la capa endimaria y, por lo tanto, está en contacto con el LCR, y con una prolongación basal que penetra en el neuropilo y suele ramificarse; los extremos de estas ramificaciones, o sea, los *pies tanicitarios*, terminan en el espacio que rodea a capilares de endotelio fenestrado. Los tanicitos se encuentran en los *órganos circunventriculares*, que son los lugares en donde falta la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, existen en la EM, puesto que es un órgano circunventricular.

Los *tanicitos de la región tuberoinfundibular*, cuyas prolongaciones basales pueden llegar a la EM, son una especie de puente entre el LCR y la sangre de los capilares porta hipofisarios. Esta especial disposición de los tanicitos permitió casi desde su descubrimiento atribuirles la función de transportar intracelularmente sustancias desde la EM al LCR o en sentido contrario. También se les ha asignado una función secretora, pudiendo estar implicados en el control hipotalámico de la adenohipófisis. Algunos autores han descrito diferencias sexuales de los tanicitos de esta región, y asimismo variaciones morfológicas y de su contenido de inclusiones durante las diferentes fases de la vida sexual (Brawer, 1972; Kozłowski, 1982; Kozłowski y Coates, 1985; Krisch, 1986; Leonhardt y col. 1987).

Una hipótesis de interés, formulada por varios investigadores (véase Kozłowski y Coates, 1985), es la posible función de los tanicitos en la orientación y guía de las neuronas, especialmente de sus axones, durante su emigración; esta función tiene una gran semejanza con las interacciones neurogliales que tienen lugar en el desarrollo embrionario.

En efecto, Rakic (1981) demostró la importancia de las *células gliales radiales* en la orientación, desplazamiento y posición de las neuronas en el desarrollo de la corteza cerebral. Las células gliales radiales tienen un soma en la superficie ventricular, y una prolongación basal que recorre toda la pared nerviosa hasta llegar a la superficie periférica. Es curiosa la coincidencia morfológica de los tanicitos con estas células gliales, pues aquéllos al igual que éstas, tienen el soma en la luz ventricular y su prolongación basal, incurvada, recorre todo el neuropilo.

La forma alargada de los tanicitos, especialmente los de la región tuberoinfundibular, es característica de los epéndimos murales embrionarios; son células poco diferenciadas (menos que los endimocitos comunes, que poseen muchos cilios), que no maduran hasta el 22º día de la vida postnatal (véase Leonhardt y col., 1987), pudiéndose observar mitosis de los mismos después del nacimiento.

Los tanicitos de la región tuberoinfundibular están muy relacionados con las *fibras nerviosas-LHRH*, a las que guían y orientan, desde los canalículos de los endimocitos por donde caminan, hasta los espacios perivasculares de los vasos porta hipofisarios, en donde terminan y liberan la LHRH.

La relación funcional entre los tanicitos de la región tuberoinfundibular y las *fibras nerviosas-LHRH* es mucho más sofisticada. A propósito de los *contactos sinaptoides* en las prolongaciones basales tanicitarias que se han descrito, concretamente contactos de las *fibras nerviosas-LHRH*, éstas ejercerían sobre aquéllos influencias que, en definitiva, tendrían que ver con la liberación de la neurohormona. Teóricamente, los impulsos que desde los contactos sinaptoides pasan a las prolongaciones basales de los tanicitos, determinan el cambio de la forma y del volumen de

los mismos, lo que es de gran importancia a nivel de los espacios perivascuales de los capilares sanguíneos del sistema porta hipofisario. En dichos espacios los *botones nerviosos terminales-LHRH* están más o menos alejados de la lámina basal parenquimatosa y separados del espacio perivascular por los pies de los tanicitos que forman una *barrera glial*, la cual, según esta hipótesis, es funcional, es decir, que se abre o se cierra según las necesidades de LHRH. Por lo tanto, la barrera está controlada por las propias *fibras nerviosas-LHRH*.

Kozlowski y Coates (1985) aseguran que la cantidad de barrera glial que se opone a los *botones nerviosos terminales-LHRH*, está en relación con el estadio reproductor del animal, y se han permitido predecir que dicha barrera debe variar drásticamente en la tarde del proestro o después de la castración, cuando existe un aumento de la liberación de LHRH.

Las variaciones en la extensión de los pies tanicitarios en el espacio perivascular por mecanismos dopaminérgicos y colinérgicos fueron demostradas por Lichtensteiger y col. (1978). En la motilidad de la barrera glial puede intervenir también la *DARPP-32* o *fosfoproteína regulada por dopamina y adenosina monofosfato*, que está presente en neuronas y otras células que poseen receptores D1 de dopamina, y que también se ha detectado en los tanicitos (véase Everitt y col., 1986).

Por lo tanto, los ependimocitos que forman los canalículos por donde caminan las *fibras nerviosas-LHRH*, y los tanicitos con todas esas funciones, están en relación con el ciclo sexual.

El epéndimo no es, pues, exclusivamente una barrera inerte de separación del LCR y el tejido nervioso, sino que participa activamente en los mecanismos neuroendocrinos.

Cisternas de la región tuberoinfundibular y la hendidura que prolonga lateralmente el receso infundibular

Hay otras estructuras que aparentemente no tienen que ver con el epéndimo, pero que también ha sido relacionadas con las *fibras nerviosas-LHRH*. Es el caso de una serie de *cisternas* (algunas de gran diámetro que sobrepasan los 60 μm), que se encuentran en la región tuberoinfundibular de la rata y cuya estructura, ordenación tridimensional y ontogenia han sido estudiadas por Bodoky y col. (1979). El conjunto de estas cisternas, según estos autores, se ordena de acuerdo a un patrón típico a lo largo de los márgenes de la EM, y se sitúan en paralelo a algunos haces de la *vía neurosecretora LHRH preóptico-infundibular*.

¿Están estas cisternas relacionadas con el epéndimo? Nuestros hallazgos ultraestructurales demuestran que pueden estarlo.

En los cortes frontales del hipotálamo mediobasal de la rata (Fig. 3), que pasan por la región posterior del túbér, la luz ventricular tiene una forma triangular. Con el microscopio óptico los ángulos laterales inferiores de esta sección frontal del III aparentan terminar en sus vértices. El microscopio electrónico de transmisión ha permitido distinguir que esos vértices se prolongan lateralmente formando hendiduras estrechas (Fig. 3 y 4), que pueden alcanzar e, incluso, sobrepasar los 100 μm de longitud. Son *hendiduras que prolongan lateralmente el RINF*. Estas hendiduras están repletas de microvellosidades (Fig. 5 y 7), que en algunos puntos prácticamente obturan la luz, y de estrechas prolongaciones citoplasmáticas; en ellas se ven también tallos ciliares.

En las proximidades de la luz de la hendidura se observan gran número de *complejos de unión intercelular* (Fig. 7), del tipo de las *zonulae adhaerentes*, que unen las células que forman la pared de dicha hendidura. Se trata de complejos de unión permeables, distintos estructural y funcionalmente de las *zonulae occludentes*.

En el polo apical de las células limitantes de la hendidura, entre otros organitos destacan mitocondrias muy largas (algunas miden 4 μm), gotas de lípidos, escasos cuerpos basales ciliares y granos de glucógeno, lo que nos hace sospechar que algunas de estas células sean los *astrocitos ricos en glucógeno*, mencionados por Leonhardt y col. (1987).

Esta hendidura puede llegar hasta las cisternas antes citadas, con lo que el LCR del compartimento ventricular llenaría esas cavidades, algunas de las cuales están situadas en pleno neuropilo.

Fibras nerviosas amielínicas de pequeño calibre se encuentran muy próximas a la luz de la hendidura y a la de las cisternas; en algunos casos están separadas de la luz (y por lo tanto del LCR) por lengüetas citoplasmáticas, cuyo espesor no alcanza los 50 nm (Fig. 6).

Esta hendidura que prolonga el ángulo lateral del receso infundibular y que, en consecuencia, está llena de LCR, abraza por abajo al núcleo arcuato del hipotálamo, que es uno de los núcleos más versátiles y de los más implicados en las funciones neuroendocrinas, el cual puede jugar un papel clave en la integración del mundo emocional y de las funciones autónomas y homeostásicas, así como integrar la información sensorial con la endocrina (Chronwall, 1985). Pues bien, este núcleo, según Krisch (1986), necesita del LCR para los impulsos nerviosos, y la *hendidura prolongadora del receso infundibular* le proporciona una posibilidad de mayor contacto con este medio.

En resumen, la *vía ventricular de secreción y de transporte de neurohormonas y de otras sustancias* requiere la existencia de endimocitos especiales, los tanicitos, que relacionan este líquido con la sangre de los vasos del plexo porta hipofisario. La hendidura descrita por nosotros es una prolongación de esta vía, por medio de la cual el LCR rellena el sistema de cisternas, ampliándose con ello los contactos del núcleo arcuato con el LCR.

BIBLIOGRAFIA

- AMAT, P.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y PASTOR, F.E. (1981): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato. I) Características morfológicas del epitelio. *Morf. Norm. Patol., Sec. A*, **5**: 1-12.
- AMAT, P.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D. y MUÑOZ BARRAGAN, L. (1985): Estudio ultraestructural de las terminaciones nerviosas de los sistemas neurosecretorios hipotalámicos. *Acta Microscópica*, **8**: 367-378.
- BARRY, J.; DUBOIS, M.P. y POULAIN, P. (1973): LFR producing cells of the mammalian hypothalamus. *Z. Zellforsch.*, **146**: 351-366.
- BENNET-CLARK, C. y JOSEPH, S.A. (1982): Immunocytochemical distribution of LHRH neurons and processes in the rat: Hypothalamic and extrahypothalamic locations. *Cell Tissue Res.*, **221**: 493-504.
- BODOKY, M.; KORITSANSZAKY, S. y RETHELYI, M. (1979): A system intraependymal cisternae along the margins of the median eminence in the rat: Structure, three-dimensional arrangement and ontogeny. *Cell Tissue Res.*, **196**: 163-173.
- BRAWER, J.R. (1972): The fine structure of the ependymal tanocytes at the level of the arcuate nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **145**: 25-42.
- CHRONWALL, B.M. (1985): Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, **6**: suppl. **2**: 1-11.
- CUSHING, H. y GOETSCH, E. (1910): Concerning the secretion of the infundibular lobe of the pituitary body and its presence in the cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.*, **27**: 60-86. (Citado por Kozłowski, 1982).
- EVERITT, B.J.; MEISTER, B.; HOKFELT, T.; MELANDER, T.; TERENIUS, L.; ROKAEUS, A.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; DOCKRAY, G.; EDWARDSON, J.; CUELLO, C.; ELDE, R.; GOLDSTEIN, M.; HEMMING, H.; OUIMET, C.; WALAAS, I.; GREENGARD, P.; VALE, W.; WEBER, E.; WU, J.-Y.; CHANG, K.-J. (1986): The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: Immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence of dopamine neurons. *Brain Research Reviews*, **11**: 97-155.
- HELLER, H.; HASAN, S.H. y SAIFI, A.Q. (1968): Antidiuretic activity in the cerebrospinal fluid. *J. Endocr.*, **41**: 273-280.
- HORSTMANN, E. (1954): Die Faserglia des Selachiergehirns. *Z. Zellforsch.*, **39**: 588-617.
- JOLKKONEN, J.; TUOMISTO, L.; WIMERSMA GREIDANUS, Tj. Van y RIEKKIENEN, P.J. (1988): Vasopressin levels in the cerebrospinal fluids of rats with lesions of the paraventricular and supra-chiasmatic nuclei. *Neuroscience Letters*, **86**: 184-188.
- KOZŁOWSKI, G.P. (1982): Ventricular route hypothesis and peptide-containing structures of the cerebroventricular system. *Front. Horm. Res.*, **9**: 105-118.
- KOZŁOWSKI, G.P. y COATES, P.W. (1985): Ependymoneuronal specializations between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res.*, **242**: 301-311.
- KRISCH, B. (1986): Ultrastructure of regulation neuroendocrine neurons and functionally related structures. En: *Morphology of hypoth. connections*. Edit. D. Ganten y D. Pfaff, p. 251.
- LEONHARDT, H.; KRISCH, B. y ERHARDT, H. (1987): Organization of the neuroglia in the midsagittal plane of the central nervous system: a speculative report. En: *Functional morphology of neuroendocrine systems*. B. Scharer, H.W. Korf, H.G. Hartwig (Eds), pp. 175-187. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- LICHTENSTEIGER, W.; RICHARDS, J.G. y KOPP, H.G. (1978): Possible participation of non-neuronal elements of median eminence in neuroendocrine effects of dopaminergic and cholinergic systems. En: *Brain endocrine interaction III. Neural hormones and reproduction*, 3rd Int. Symp. Würzburg 1977, Karger Basel, pp. 251-262.
- MARAÑÓN, G. (1916): Observaciones clínicas y experimentales acerca de la acción de la secreción interna de la hipófisis sobre la diuresis. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, págs. 272-280.
- PASTOR, F.E.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y AMAT, P. (1982a): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato. II) Células supraependimarias. *Morf. Norm. Patol., Sec. A*, **6**: 73-86.

- PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y AMAT, P. (1982b): Localization of the terminal Herring bodies in the hypothalamus-hypophysis. *Neuroscience Letters*, suppl. **10**: S376.
- RAKIC, P. (1981): Neuronal-glial interaction during brain development. *Trends Neurosci.*, **4**: 184-187.
- VORHERR, H.; BRADBURY, M.W.B.; HOGHOUGH, M. y KLEEMAN, C.R. (1968): Antidiuretic hormone in cerebrospinal fluid during endogenous and exogenous changes in its blood level. *Endocrinology*, **83**: 246-250.

Correspondencia: Dr. Pedro Amat
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Avda. del Campo Charro s/n
Salamanca. España.

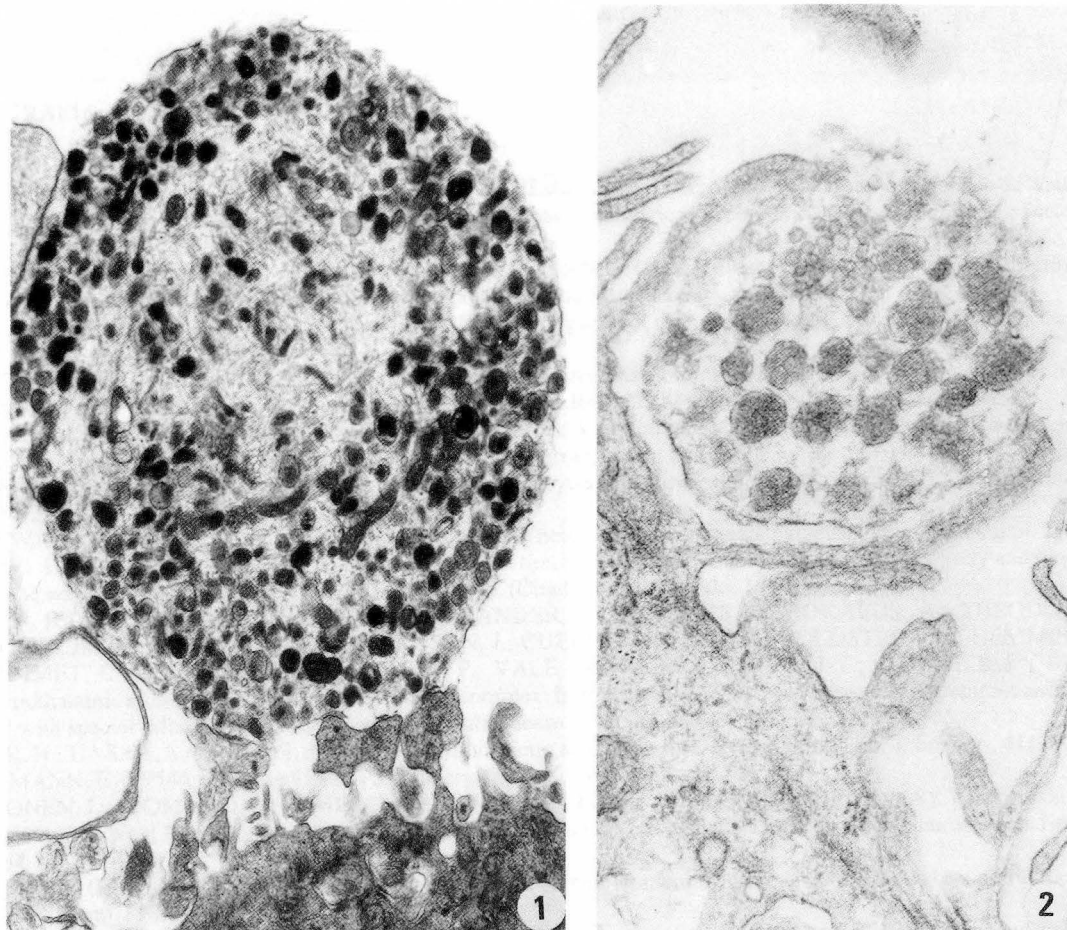
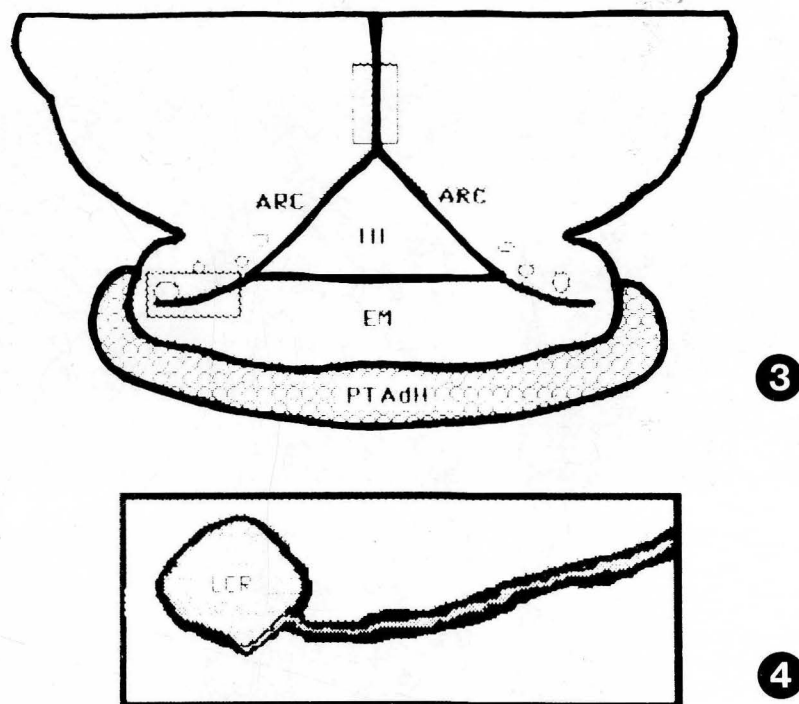
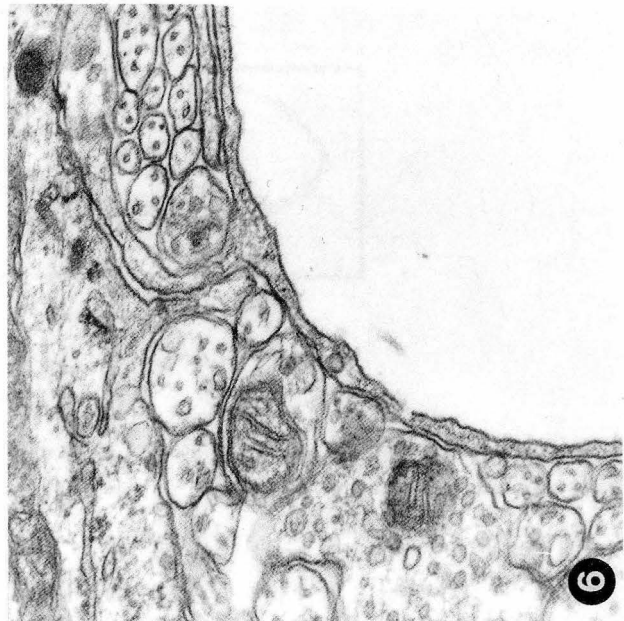


FIGURA 1. Estructura semejante a un cuerpo de Herring en la luz del receso infundibular del tercer ventrículo de rata. Aumentos: 16.000x.

FIGURA 2. Estructura semejante a un cuerpo de Herring-terminal en la luz del receso infundibular del tercer ventrículo de rata. Aumentos: 45.500x.



- FIGURA 3** Dibujo esquemático de un corte frontal del hipotálamo mediobasal de rata. La sección del tercer ventrículo (III) es triangular; en la pared lateral se encuentra el núcleo arcuato (ARC), y en el suelo la eminencia media (EM). Por debajo de ésta se ve la pars tuberalis de la adenohipófisis (PTAdH). El ángulo lateral del receso infundibular se prolonga lateralmente por medio de una hendidura muy estrecha, solamente visible con el microscopio electrónico de transmisión.
- FIGURA 4.** Dibujo que representa la hendidura vista a mayor tamaño, mostrando su conexión con una cisterna de la región tuberoinfundibular.



- FIGURA 5.** Extremo lateral de la hendidura de la figura anterior vista al microscopio electrónico. Aumentos: 22.000x. Las cabezas de flecha blancas señalan el trayecto de la hendidura, la cual está repleta de microvellosidades. Obsérvese que la hendidura termina en una cisterna de la región tuberoinfundibular.
- FIGURA 6.** Detalles de la pared de la cisterna, correspondientes a la zona señalada con una flecha negra en la figura anterior. Aumentos: 45.500x. Obsérvese la proximidad de fibras y botones nerviosos a la luz de la cisterna, estando separados de ella por su pared, constituida por delgadas lengüetas citoplasmáticas, cuyo espesor no llega a los 50 nm.
- FIGURA 7.** Tramo de la hendidura de la fig. 6, más próximo al receso infundibular. Aumentos: 45.000x. Se ven las microvellosidades y el tallo de un cilio (flecha), cortado transversalmente, en el que se distingue el par central de microtúbulos, y 7 pares periféricos (1+7).

RELACION GLIO-VASCULAR EN LA FIMBRIA DEL HIPOCAMPO DEL TORO DE LIDIA GLIO-VASCULAR RELATIONSHIP IN FIMBRIA HIPPOCAMPI OF FIGHTING BULL

J. ARROYO-GUIJARRO, A. PRATS-GALINO, C. COSTA-LLOBET y D. RUANO-GIL

Departamento de Anatomía Humana. Facultad de Medicina.
Universidad de Barcelona

RESUMEN

En el presente trabajo estudiamos con ayuda del microscopio electrónico, las relaciones que las células gliales de la fimbria del Hipocampo del toro de lidia tienen con los elementos vasculares, poniendo de manifiesto la presencia de prolongaciones protoplasmáticas de los astrocitos fibrosos en contacto con la pared capilar, cuya membrana basal tiene una disposición compleja. En estas prolongaciones, se han detectado gránulos de glucógeno que expresan el grado de stress a que se somete al animal durante la lidia. Respecto a las prolongaciones de los oligodendrocitos, demostramos que no tienen relaciones íntimas con los vasos.

PALABRAS CLAVE: Membrana basal. Capilar. Células gliales. Toro de lidia. Microscopía electrónica.

SUMMARY

In this study, we examine, with the aid of the electron microscope, the relationship that the glial cells of the fimbria hippocampi of the fighting bull have with the vascular elements, showing the presence of protoplasmic processes of the fibrous astrocytes in contact with the capillary wall, the basement membrane of which has a complex arrangement. In these processes, glycogen granules have been detected, which show the degree of stress undergone by the bull during the fight.

With regard to the oligodendrocyte processes, we demonstrate that they have no close relationship with the vessels.

KEY WORDS: Basement membrane. Capillary. Glial cells. Fighting bull. Electron microscopy.

Introducción

Mediante el microscopio óptico se han estudiado las prolongaciones de los astrocitos que contactan con los capilares (N. Achúcarro, 1913; S. Ramón y Cajal, 1914). A pesar de que diferentes autores han investigado mediante microscopía electrónica estas relaciones inmediatas, así como las de los oligodendrocitos y microglía (M.G. Farqhar and J.F. Hartmann, 1956, 1957; E.A. Maynard et al., 1957; E. de Robertis et al., 1961), existen, no obstante, pocos estudios de esta índole.

En el presente trabajo analizamos con el microscopio electrónico los aspectos morfológicos de las relaciones de los diferentes tipos de células gliales de la fimbria del hipocampo del toro de lidia con sus elementos vasculares. Si nuestra información es correcta, es la primera vez que se efectúa una investigación de este género en un animal



de este tipo, si bien en un estudio anterior (J. Arroyo-Guijarro et al., 1987) describimos las peculiaridades de las células gliales de esta región.

Material y Metodos

Utilizamos cuatro hipocampos del toro de lidia disecados de la masa cerebral inmediatamente después de su muerte. De ellos, se tomaron muestras de la fimbria que fueron fijadas en glutaraldehído y procesadas con arreglo a las técnicas habituales para su subsiguiente examen en secciones transversales con microscopía electrónica.

Asimismo, en los casos que consideramos interesantes realizamos en algunas preparaciones tinciones con la Tiosemi-carbacida-proteinato de plata, método de Thiery, para poner de manifiesto la presencia de glucógeno.

Resultados

El estudio de las preparaciones de la fimbria del hipocampo del toro de lidia nos ha permitido establecer las relaciones existentes entre las células de la glia y los capilares.

En lo que hace referencia a los astrocitos fibrosos hemos apreciado abundantes prolongaciones de los mismos en contacto con la pared capilar. En la Fig. 1 mostramos las células endoteliales de la pared capilar que están unidas íntimamente, por lo que forman una cubierta continua, y en su vecindad prolongaciones de astrocitos.

En estas prolongaciones citoplasmáticas de los astrocitos fibrosos que rodean o discurren paralelamente al vaso, hemos detectado la presencia de gránulos electrodensos de glucógeno (Fig. 2).

Particularmente interesante es la disposición de la membrana basal de los capilares de esta región. Dicha membrana, que presenta en todas las preparaciones una zona más densa y oscura en el centro delimitada por unas bandas más claras o láminas raras externa e interna respectivamente (E. Reale, 1984), muestra frecuentes desdoblamientos que determinan la formación de compartimentos (Fig. 3). En estos compartimentos, a cuyo nivel la membrana basal desdoblada está en contacto con los astrocitos fibrosos, observamos la presencia de vesículas de retículo endoplasmático lisas y rugosas o fibras de colágeno (Fig. 4).

Respecto a los oligodendrocitos, observamos (Fig. 5) la presencia de prolongaciones simples de su cuerpo celular, paralelas al axón, que presentan una gran riqueza de polirribosomas en forma de rosetas y microtúbulos. Consideramos interesante resaltar que no hemos encontrado contactos íntimos entre estas prolongaciones y los vasos.

Discusión

El examen de la fimbria del hipocampo del toro de lidia con microscopio electrónico ha puesto de manifiesto, como señalaron Achúcarro (1913) y Ramón y Cajal (1914) en otros lugares de la sustancia blanca del sistema nervioso, la presencia constante de prolongaciones protoplasmáticas de los astrocitos fibrosos en contacto con la pared capilar, que con el microscopio de transmisión son de morfología muy simplificada, pues tienen una disposición paralela o bien rodean el trayecto del vaso.

La existencia en las mismas de abundantes gránulos de glucógeno puestos de manifiesto con la Tiosemi-carbacida-proteinato de plata, interpretamos que refleja los diferentes grados de stress sufridos por el animal durante la lidia. Creighton (1972) ha descrito idénticos datos en ratones sometidos a factores externos no fisiológicos (cambios de temperatura, radiaciones, drogas).

Asimismo, la membrana basal capilar integrada por las láminas rara externa e interna y la zona densa (según la terminología de Reale, 1984), se desdobra determinando compartimentos que contienen diferentes elementos citoplasmáticos, representados por vesículas de retículo endoplasmático liso o rugoso. Su significado es confuso. Farquar y Hartmann (1956) y Maynard (1957) lo relacionan con la contractilidad capilar o con la presencia de células microgliales. Interpretamos que pueden corresponder a células endoteliales o a prolongaciones protoplasmáticas de astrocitos fibrosos y protoplasmáticos.

Las prolongaciones de los oligodendrocitos se disponen paralelamente al trayecto de los axones. Luse (1956) señala se localizan en la vecindad de los vasos sanguíneos. Nuestros estudios demuestran que las mismas no tienen relaciones íntimas con los vasos, si bien Schaltenbrand y Bailay (1928) describen su existencia y Cammenmeyer (1960) señala que en la fimbria de los carnívoros, roedores y marsupiales los oligodendrocitos tienen frecuentemente una disposición perivascular.

BIBLIOGRAFIA

- ACHUCARRO, N. (1913): Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglía y en particular de la neuroglía de la corteza cerebral humana. *Trab. Lab. Invest. Biol.* **XI**: 187-217.
- ARROYO GUIJARRO, J.; PRATS GALINO, A.; COSTA LLOBET, C.; RUANO GIL, D. (1987): Aspects of the glia in the fimbria of the fighting bull's hippocampus. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* **92** (2): 103-114.
- CAMMERMERYER, J. (1960): Distribution of oligodendrocytes in cerebral grey and white matter of several mammals. *Am. J. Anat.* **107**: 107-127.
- CREIGHTON, H.P. (1972): Barbiturate induced accumulation in brain. An electron microscopy study. *Brain Press.* **39**: 225-234.
- DE ROBERTIS, E.; GERSCHENFELD, H.M. (1961): Submicroscopic morphology and function of glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* **3**: 1-61.
- FARQUHAR, M.G. and HARTMANN, J.F. (1957): Neuroglial structure and relationships as revealed by electron microscopy. *J. Neuropathol.* **16**: 18-39.
- LUSE, S.A. (1956): Electron microscopic observation of the Central Nervous System. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* **2** (5): 531-541.
- MAYNARD, E.A.; SHULTZ, R.L.; PEASE, D.C. (1957): Electron microscopy of the vascular bed of cerebral cortex. *Am. J. Anat.* **110**: 409-433.
- RAMON Y CAJAL, S. (1914): Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trab. Lab. Inves. Biol.* **XI**: 255-315.
- REALE, E. (1984): Electron microscopy of the basement membranes. In: *Ultrastructure of the connective tissue matrix*. Martinus Nighoff Publishers. Boston.
- SCHALTENBRAND, C.; BAILAY, P. (1928): Die perivaskuläre piagial Membran des Gehirns. *Psychol. Neurol. Lzp.* **35**: 199.

Correspondencia: J. Arroyo Guijarro
Departamento de Anatomía Humana. Facultad de Medicina.
Universidad de Barcelona.
Avda. Diagonal, s/n 08028-BARCELONA

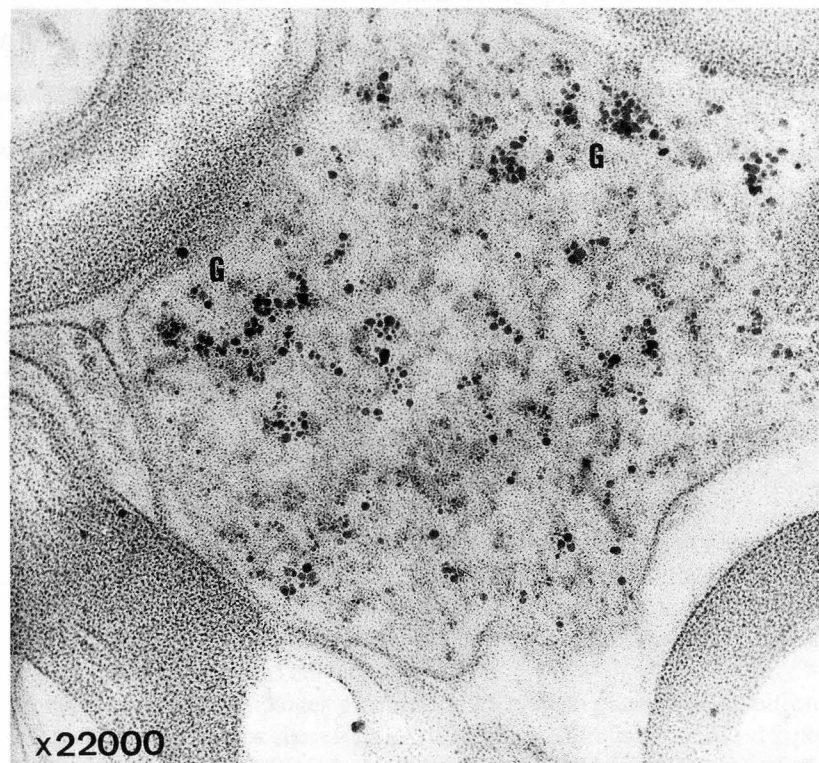
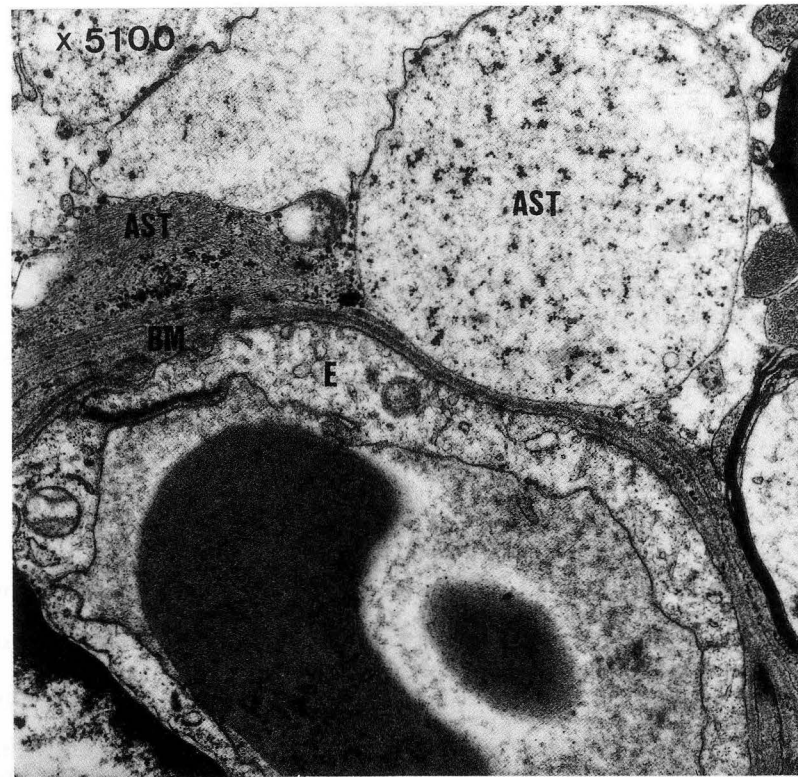


FIGURA 1. E: Endotelio capilar. BM: Membrana basal en contacto con astrocitos (AST). x 5100.
FIGURA 2. G: Gránulos electrodensos de glucógeno detectados según el método de Thiery. x 22000.

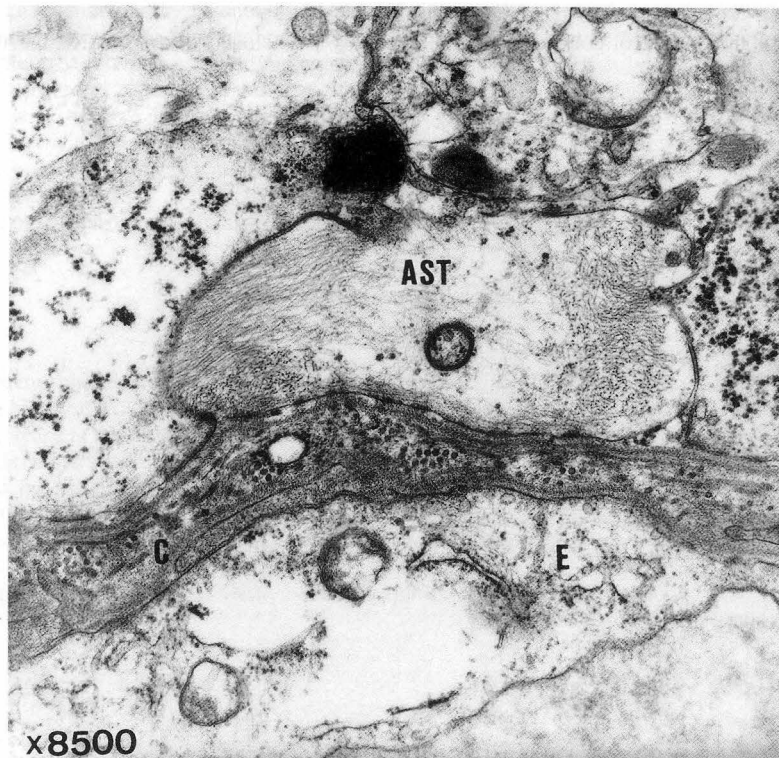
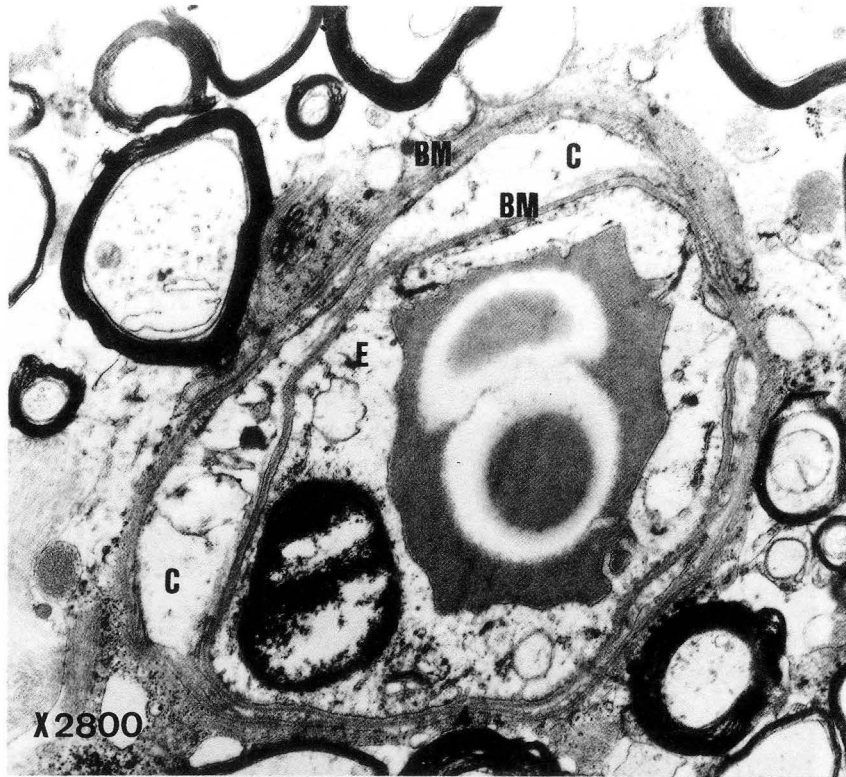


FIGURA 3. E: Endotelio capilar. BM: Membrana basal desdoblada en compartimentos (C). x 2800.

FIGURA 4. E: Endotelio capilar. C: Compartimentos de la membrana basal que contiene vesículas de retículo endoplasmático y fibras colágenas. AST: Astrocito en contacto con la membrana basal. x 8500.



FIGURA 5. Prolongaciones de oligodendrocitos (OP) en curso paralelo a los axones (AX). x 17000.

ESTUDIO MORFOMETRICO DE LAS CELULAS FOLICULARES DE LA GLANDULA TIROIDES DE RATAS TRATADAS CON METIMAZOL

MORPHOMETRIC STUDY OF THE FOLLICULAR CELLS OF THE THYROID GLAND OF RATS TREATED WITH METHYMAZOL

J. CARRETERO, F. SANCHEZ, J. L. TORRES, M. MONTERO, E. BLANCO, J.M. RIESCO
y R. VAZQUEZ

Departamento de Ciencias Morfológicas. Anatomía Humana. Facultad
de Medicina. Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca. España.

RESUMEN

Se analizan morfológica y morfométricamente los folículos tiroideos y las células foliculares que los delimitan, de ratas tratadas con Metimazol y se comparan con los de animales normales. El tratamiento con Metimazol provoca un aumento del diámetro folicular medio y del área celular, fundamentalmente a nivel de la porción media de la glándula, siendo menos llamativo en los polos de los lóbulos tiroideos. El aumento del área celular está causado por un aumento del área citoplásmica y, más llamativamente, por un aumento del área nuclear, apareciendo núcleos gigantes. Este efecto es más claro en los machos que en las hembras. Aunque las diferencias son menos manifiestas, también puede observarse un aumento de la altura epitelial. Todos estos hallazgos semejan signos de hiperplasia y modificaciones preadenomatosas de la glándula.

PALABRAS CLAVE: Glándula Tiroides. Células foliculares. Metimazol. Morfometría.

SUMMARY

A morphological and morphometric analysis was made of the follicles and follicular cells of the thyroid gland delimiting them from rats treated with Methymazol. The results were compared with those obtained with normal animals. Treatment with Methymazol induces an increase in the mean diameter of the follicles and cell area, mainly at the level of the middle portion of the gland; such an increase is less striking on the poles of the lobes of the thyroid gland. The increase in cell area is due to an increase in the cytoplasmic area and, more strikingly so, by an increase in the nuclear area, accompanied by the presence of giant nuclei. This effect was more patent in males than in females. Although the differences are less pronounced, an increase in epithelial height was also observed. All these findings suggest signs of hyperplasia and preadenomatose modifications in the gland.

KEY WORDS: Thyroid gland. Follicular cells. Methymazol. Morphometry.

Introducción

El folículo tiroideo de la rata está bien definido; sus paredes están constituidas por células foliculares y parafoliculares. Las primeras, son las más numerosas (Stux y col., 1961), poseen una polaridad clara con un núcleo

dispuesto basalmente y un polo apical dirigido hacia la luz folicular. Presentan una altura epitelial muy uniforme (Nadler y col., 1955) y su citoplasma muestra, en condiciones de normalidad, gotitas de coloide que se ponen de manifiesto con la reacción del PAS (Nadler, 1977).

Estas células foliculares responden a los influjos hormonales, principalmente de la hormona TSH, produciendo hormonas tiroideas (Williams y col., 1971) y modificando su morfología (Wollman, 1969; Dumont, 1971; Dumont y col., 1971). El Metimazol afecta a la hormonogénesis tiroidea impidiendo la formación de yodo libre por inhibición de las peroxidases tiroideas (Morris y Hager, 1966; Taurog, 1976; Michot y col., 1979).

Aunque el efecto del Metimazol sobre las tasas séricas de hormonas tiroideas está bien establecido, son muy escasos los trabajos que analizan morfométricamente las células foliculares y el folículo tiroideo en ratas tratadas con Metimazol, durante un periodo de tiempo suficiente para producir su efecto antitiroideo sin que se originen lesiones tumorales de la glándula. Ello nos indujo a realizar este estudio en el que comparamos los folículos tiroideos y las células foliculares de los animales normales con los de ratas tratadas con Metimazol, por vía oral.

Material y Metodos

Animales utilizados. Se han empleado 20 ratas Wistar, adultas, de ambos sexos, mantenidas en condiciones standard de animalario, divididas en dos grupos: *Grupo 1.* Animales mantenidos a temperatura controlada (20 2 C), humedad relativa del aire del 50 5% y alimentadas con dieta equilibrada y agua *ad libitum*. (5 por sexo), considerados como normales. *Grupo 2.* Animales (5 por sexo) mantenidos de forma similar a los del grupo 1, pero que fueron tratados durante 21 días con Metimazol, según el proceder descrito por Stoll y col. (1978). A los 21 días de iniciado el tratamiento se procedió al sacrificio de los animales.

Procesado de las muestras. Tras el sacrificio de los animales, se extrajo la glándula tiroidea que fue fijada en Bouin-Hollande durante cinco días y, posteriormente, incluida en parafina y cortada a 5 μ m para su estudio histológico con la técnica del PAS.

Morfometría. Para el estudio de la glándula tiroidea, diferenciamos dos regiones, una media y otra apical y, dentro de cada una de ellas, dos zonas distintas: periférica y central. De cada una de las zonas así delimitadas se eligieron al azar 100 células foliculares por grupo a estudiar, a las que se les calculó el área celular (AC), el área nuclear (AN) y el área citoplásmica (ACit), empleando para ello un planímetro digital Apple, conectado mediante un sistema de video RCA a un microscopio Leitz Dialux EB-20. De forma similar se calculó la altura epitelial (AE) o diámetro máximo entre el polo luminal y el basal de las células foliculares. Además, se determinaron los diámetros máximo y mínimo de 100 folículos tiroideos de cada una de las zonas estudiadas, obteniéndose a partir de ellos el diámetro folicular medio (DFM) de cada zona.

Resultados

Los folículos tiroideos presentan modificaciones en su forma y DFM, dependiendo de su localización intraglandular así como del grupo de animales estudiado (Tabla 1).

En los animales normales los folículos de mayor DFM se sitúan en las zonas periféricas de la glándula, existiendo diferencias entre las zonas central y periférica, mucho más acentuadas en los machos que en las hembras (Tabla 1). Las hembras presentan mayor irregularidad en sus folículos, por lo que los valores medios muestran diferencias menos acentuadas, existiendo folículos de gran diámetro (159.70 μ m), junto a otros muy pequeños (9.43 μ m), estando el 88% de los folículos comprendidos entre 9 y 75 μ m. En ambos sexos, los DFM de mayor tamaño se encuentran en la zona periférica de la región apical de los lóbulos tiroideos.

El tratamiento con Metimazol afecta de diferente manera a las hembras que a los machos. Las primeras presentan DFM muy similares en las cuatro zonas estudiadas, siendo en todos los casos superiores a los encontrados en las hembras normales; no obstante, los mayores aumentos se observan en las zonas centrales de las regiones estudiadas. Los machos siguen mostrando diferencias entre las zonas periféricas y las centrales; sin embargo, se

observa un aumento manifiesto en las zonas centrales con respecto a los animales normales y es llamativa la disminución encontrada en la zona periférica de la región apical.

Los cambios descritos para los DFM se acompañan de cambios en las células foliculares. En los animales normales, machos y hembras, son células con un polo luminal globuloso, de citoplasma claro con gotas PAS positivas y núcleo generalmente de disposición basal (Fig. 1). Las hembras tratadas con Metimazol presentan una AE superior a la de las hembras normales, en todas las zonas estudiadas; en los animales machos los cambios son menos llamativos, no alcanzando en ninguno de los dos sexos variaciones significativas (Tabla 2).

El AC de las células foliculares se ve incrementada tras el tratamiento con Metimazol en ambos sexos, si bien aquí las diferencias en las hembras son más claras que las observadas en los DFM (Tabla 3). Este aumento, aunque se realiza en parte por el aumento del AC_{it}, se debe principalmente a un aumento del AN que en los machos llega a alcanzar valores dos veces superiores a los observados en los machos normales (Tabla 4). En ambos sexos aparecen núcleos gigantes (Fig. 2), junto a otros de menor tamaño, que en su mayoría siguen siendo superiores a los observados en los animales normales. También es llamativa la no aparición de gotas PAS positivas en el citoplasma celular, a diferencia de los animales normales.

Discusión

Está totalmente demostrado que la TSH produce un efecto directo sobre las células foliculares de la glándula tiroides, estimulando la secreción hormonal (ver Dummont y Lamy, 1980); efecto que se realiza específicamente a nivel de la transcripción del DNA al RNA (De Nayer y Caucheteux, 1978).

Existen diversas descripciones sobre las modificaciones sufridas por las células foliculares en situaciones experimentales de estímulo y de inhibición de la síntesis y liberación hormonal que afectan principalmente al número y tamaño de las células foliculares y de los folículos (Vázquez y col., 1974; Amat y Carnicero-Pardal, 1967; Palomero, 1970, 1972), así como a las organelas intracelulares. Se puede considerar el estado morfológico de las células foliculares como un reflejo de las tasas séricas de TSH (Halmi, 1966), aunque se ha discutido si el examen histológico de la glándula tiroides es o no suficiente para valorar el estado funcional de la misma (Turner y Bagnara, 1976). A la vista de los resultados, pensamos que, si el estudio se acompaña de un análisis morfométrico, puede ser útil.

Los cambios observados en las células foliculares de la glándula tiroides, coincidiendo con la opinión de otros autores (Nadler y col., 1970; Stoll y col., 1978), son explicables por una acción hiperplasiante de la TSH segregada en exceso como reacción a la carencia hormonal; sin embargo, hemos encontrado modificaciones ya a los 21 días, las cuales según Stoll y col. (1978) aparecen en periodos mucho más largos de tiempo. Es cierto, sin embargo, que las modificaciones de hiperplasia obtenidas por nosotros no pueden en ningún momento ser calificadas como adenomatosas, ni como quistes tiroideos.

Como se deduce de los trabajos de Nemeroff y col. (1980) e Iversen y Laurberg (1985), el hipotiroidismo primario provoca un aumento de TRH continuo, pero en bajas concentraciones, de manera que estimula la producción hipofisaria de TSH, sin desensibilizar a las células tirotropas ni alterar el turnover de receptores para TRH, lo que concuerda con las conclusiones obtenidas por De Vito y col. (1987), con los hallazgos morfométricos e inmunocitoquímicos observados previamente en las células tirotropas adenohipofisarias tras el tratamiento con Metimazol (Carretero y col., 1989) y con los datos morfométricos expuestos en el presente trabajo a nivel de la glándula tiroides.

Una explicación factible de la no aparición de gotas PAS positivas en el citoplasma celular tras la administración de Metimazol vendría dada por los hallazgos de Rocmans y col. (1978), que señalan la inexistencia de gotas coloidales en las células foliculares tras su estimulación continua con TSH, por modificarse el mecanismo de producción hormonal de fagocitosis apical a micropinocitosis y es coincidente con hallazgos anteriores obtenidos en nuestro Departamento por Vázquez y col. (1974), aunque empleando otros antitiroideos.

Los resultados parecen concluir que existen unos cambios morfológicos que afectan principalmente al núcleo de las células foliculares, previos a la aparición de lesiones adenomatosas ante el déficit de hormonas tiroideas en situaciones de normalidad hipotálamo-hipofisaria, lo cual podría ser típico en hipotiroidismos incipientes o de corta evolución. Ya en 1929, Florentin y Crujic afirmaron que la aparición de núcleos gigantes puede ser un paso previo a la regulación folicular.

BIBLIOGRAFIA

- AMAT, P. y CARNICERO PARDAL, H. (1967): Evolución del residuo tiroideo en cobayas parcialmente tiroidectomizados. *An. Anat.*, **16**: 189-206.
- CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; TORRES, J.L.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VAZQUEZ, R. (1989): Study of h-TSH adenohypophyseal immunoreactive cells after treatment with Methimazol. *Histol. Histopathol.*, **4**: 71-76.
- DENAYER, P. y CAUCHETEUX, D. (1978): Effects de la TSH sur les acides ribonucléiques thyroïdiens. *Ann. Endocr.*, **39**: 131-132.
- DE VITO, W.J.; CONNORS, J.M. y HEDGE, G.A. (1987): The pituitary TSH response to TRH is inversely related to the plasma TSH concentration and directly related to the pituitary TSH content during hypothyroidism in the rat. *Acta Endocrinol.*, **114**: 27-36.
- DUMONT, J.E. (1971): The action of thyrotropin in thyroid metabolism. *Vitam. Horm.*, **29**: 287-412.
- DUMONT, J.E. y LAMY, F. (1980): The regulation of thyroid cell metabolism, function, growth and differentiation. En: *The thyroid gland*. (M. de Visscher, ed.). Raven Press. New York.
- DUMONT, J.E.; WILLIAMS, C.; VAN SANDE, J. y NEVE, P. (1971): Regulation of the release of thyroid hormones: Role of cyclic AMP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **185**: 291-316.
- FLORENTIN, P. y CRUJIC, M. (1929): Nouvelles observations sur les mecanismes de la régénération des follicules chez le cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, **100**: 1139-1141.
- HALMI, N.S. (1966): Thyroid gland. En: *Histology*; 2ª ed. (McGraw-Hill) New York.
- IVERSEN, E. y LAURBERG, P. (1985): Thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and hormone secretion from the follicular and C-cells of perfused dog thyroid lobes. *Acta Endocrinol.*, **109**: 499-504.
- MICHOT, J.L.; NUÑEZ, J.; JOHNSON, M.; IRACE, G. y EDELHOCH, H. (1979): Iodide binding and regulation of lactoperoxidase activity toward thyroid goitrogens. *J. Biol. Chem.*, **254**: 2205-2209.
- MORRIS, D.R. y HAGER, L.P. (1966): Mechanism of the inhibition of enzymatic halogenation by antithyroid agents. *J. Biol. Chem.*, **241**: 3582-3589.
- NADLER, N.J. (1977): Anatomía e histoquímica del tiroides: Anatomía comparada. En: *El tiroides. Conocimientos básicos y clínica*. (Werner, S.C.; Ingbar, S.H.; eds.). Salvat. Barcelona, pp.7-19.
- NADLER, N.J. y LEBLOND, C.P. (1955): The site and rate of the formation of thyroid hormone, En: *The thyroid*. Brookhaven Sympos. Biol.; **7**: 40.
- NADLER, N.J.; MANDAVIA, M. y GOLDBERG, M. (1970): The effect of hypophysectomy on the experimental production of rat thyroid neoplasms. *Cancer Research*, **30**: 1909-1911.
- NEMEROFF, C.B.; BISSETTE, G.; MARTIN, J.B.; BRAZEAU, P.; VALE, W.; KIZER, J.S. y PRANGE, A.J., Jr. (1980): Effect of chronic treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) or an analog of TRH (linear β -alanine TRH) on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Neuroendocrinology*, **30**: 193-199.
- PALOMERO, G. (1970): Desarrollo embrionario y evolución regenerativa de la glándula tiroides del cobaya. *An. Anat.*, **19**: 99-102.
- (1972): Estudio de la regeneración experimental de la glándula tiroides del gato. *An. Anat.*, **21**: 181-188.
- ROCMANS, P.; KETELBANT BALASSE, P. y NEVE, P. (1978): Hypertrophie et hyperplasie des cellules thyroïdiennes hyperactives: La sécrétion hormonale est indépendante de la phagocytose apicale. *Ann. Endocr.*, **39**: 135-136.
- STOLL, R.; FAUCOUNAU, N. y MARAUD, R. (1978): Les adénomes à cellules folliculaires et parafolliculaires de la thyroïde du rat soumis au thiamazole. *Ann. Endocr.*, **39**: 179-189.
- STUX, M.; THOMPSON, B.; ISLER, H. y LEBLOND, C.P. (1961): The light cells of the thyroid gland in the rat. *Endocrinology*, **68**: 292.
- TAUROG, A. (1976): The mechanism of action of the thiourenylene antithyroid drugs. *Endocrinology*, **98**: 1031-1046.
- TURNER, C.D. y BAGNARA, J.T. (1976): *General Endocrinology*. (Saunders, pub.). Philadelphia.
- VAZQUEZ, R.; GUTIERREZ, J.L. y AMAT, P. (1974): Morfología del residuo tiroideo. I. Estudio histológico. *An. Anat.*, **23**: 271-287.
- WILLIAMS, J.A. y WOLFF, J. (1971): Thyroid secretion in vitro: Multiple actions of agents affecting secretion. *Endocrinology*, **88**: 206-217.
- WOLLMAN, S.H. (1969): Secretion of thyroid hormones. Dans: *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol. 2, Ed. by J.T. Dingle and H.B. Fell. North Holland Publishing Co. Amsterdam, London, pp: 483-521.

Correspondencia: Dr. J. Carretero
 Dpto. Ciencias Morfológicas (Anatomía Humana)
 Facultad de Medicina
 Avda. del Campo Charro, s/n. 37007 Salamanca. España.

TABLA 1 Diámetros foliculares medios obtenidos en los distintos grupos y regiones estudiados, expresados en micras. (H.: hembras, M.: machos, NOR: normales, MET: Metimazol). Los valores se expresan como la media aritmética la desviación típica. (*: $p < 0,05$, •: $p < 0,01$, en relación con los normales).

	APICAL		MEDIA	
	Periférica	Central	Periférica	Central
H. NOR	33,62 ± 15,41	18,87 ± 8,40	31,26 ± 13,21	26,31 ± 9,12
M. NOR	62,15 ± 19,51	11,68 ± 4,03	48,70 ± 19,90	10,66 ± 3,46
H. MET	40,12 ± 12,06	34,25 ± 9,74 *	38,51 ± 13,17	39,36 ± 10,15 *
M. MET	49,22 ± 12,34 *	28,22 ± 12,34 *	52,56 ± 18,19	42,29 ± 17,64 •

TABLA 2. Altura epitelial media obtenida en los distintos grupos y regiones estudiados, expresadas en micras (H.: hembras, M.: machos, NOR: normales, MET: Metimazol). Los valores se expresan como la media aritmética la desviación típica.

	APICAL		MEDIA	
	Periférica	Central	Periférica	Central
H. NOR	9,36 ± 2,13	12,00 ± 1,81	11,52 ± 2,77	11,47 ± 2,96
M. NOR	11,54 ± 2,36	12,42 ± 2,31	10,97 ± 2,63	11,00 ± 2,21
H. MET	13,62 ± 6,72	13,12 ± 3,37	13,81 ± 2,95	13,20 ± 2,84
M. MET	12,56 ± 4,08	12,49 ± 2,81	12,75 ± 2,90	11,90 ± 3,13

TABLA 3. Area celular media obtenida en los distintos grupos y regiones estudiados, expresada en micras cuadradas. (H.: hembras, M.: machos, NOR: normales, MET: Metimazol). Los valores se expresan como la media aritmética la desviación típica. (* $p < 0,05$, • $p < 0,01$).

	APICAL		MEDIA	
	Periférica	Central	Periférica	Central
H. NOR	95,99 ± 21,46	86,67 ± 24,69	80,65 ± 22,20	91,98 ± 20,69
M. NOR	92,51 ± 33,45	90,87 ± 18,46	92,23 ± 20,03	82,56 ± 16,19
H. MET	104,37 ± 22,65	92,65 ± 18,14	107,70 ± 30,16 *	125,13 ± 41,92 *
M. MET	151,73 ± 38,12 •	139,63 ± 34,65 •	140,02 ± 41,83 •	128,39 ± 46,87 •

TABLA 4. Area nuclear media obtenida en los distintos grupos y regiones estudiados, expresada en micras cuadradas. (H.: hembras, M.: machos, NOR: normales, MET: Metimazol). Los valores se expresan como la media aritmética la desviación típica. (*: $p < 0,05$, • $p < 0,01$).

	APICAL		MEDIA	
	Periférica	Central	Periférica	Central
H. NOR	20,92 ± 5,17	20,86 ± 5,60	20,04 ± 4,36	20,54 ± 4,53
M. NOR	18,27 ± 3,95	22,49 ± 3,66	19,27 ± 2,90	18,95 ± 4,50
H. MET	28,66 ± 6,02 *	31,02 ± 5,85 *	35,93 ± 12,69 •	37,29 ± 9,17 •
M. MET	33,71 ± 4,86 •	38,19 ± 6,32 •	44,12 ± 16,32 •	44,12 ± 18,06 •

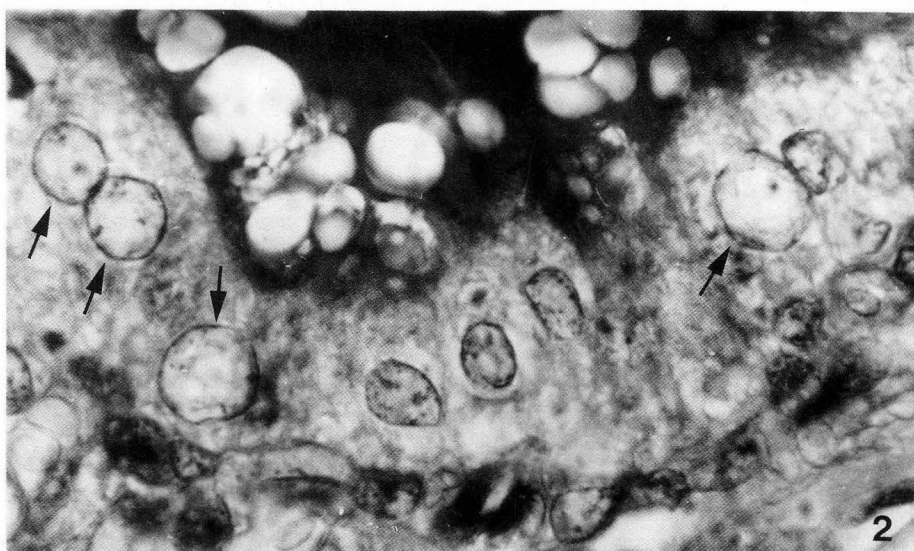


FIGURA 1. Micrografía perteneciente a un animal normal, en la que se observa un folículo tiroideo típico, rodeado de células foliculares con un núcleo basal y un citoplasma claro con gotas PAS positivas dispuestas supranuclearmente. (x 2500).

FIGURA 2. Micrografía perteneciente a un animal tratado con Metimazol, en la que se observa parcialmente un folículo tiroideo cuyas células foliculares aparecen menos definidas que en los normales. Las flechas señalan núcleos gigantes. (x 2500).

ESTUDIO CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO DE LAS CELULAS SUPRAEPENDIMARIAS DEL ORGANO VASCULOSO DE LA LAMINA TERMINAL (O.V.L.T.) DE GATO Y PERRO

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY STUDY OF THE SUPRAEPENDYMARY CELLS OF THE ORGANUM VASCULOSUM LAMINAE TERMINALI (O.V.L.T.) OF THE CAT AND DOG

J.A. JUANES, J.M. RIESCO, F. SANCHEZ, J. CARRETERO, E. BLANCO y R. VAZQUEZ

Departamento de Ciencias Morfológicas, Biología Celular y Anatomía Patológica. (Anatomía Humana I). Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

RESUMEN

Se analizan morfológicamente, con el microscopio electrónico de barrido, las células supraependimarias de la superficie ventricular del Organum Vasculoso de la Lámina Terminal, en dos especies de animales: gato y perro. Se describen diferencias morfológicas que afectan al número, tipo, tamaño y distribución de las células supraependimarias en las dos especies analizadas. En el gato hay predominio de células supraependimarias de cuerpo ovalado o elipsoide, con prolongaciones gruesas y cortas ramificadas. En el perro predominan las células de aspecto bipolar con prolongaciones cortas, formando un sincitio reticular con las células vecinas.

PALABRAS CLAVE: OVLT, células supraependimarias, perro, gato, MEB.

SUMMARY

A morphological study was made using the Scanning Electron Microscope of the supraependymary cells of the ventricular surface of the *organum vasculosum laminae terminalis* in two animal species: the cat and the dog. Morphological differences affecting the number, types size and distribution of the supraependymary cells are described in both species. In the cat there is a predominance of supraependymary cells with oval or ellipsoid somata, with short thick branched prolongations. In the dog, cells with a bipolar aspect predominate, with short prolongations forming a reticular syntecium with neighbouring cells.

KEY WORD: OVLT, supraependymary cells, dog, cat, SEM

Introducción

Dentro de los Organos Circumventriculares (OCV) descritos por Hoffer (1958), el más rostral es el Organum Vasculoso de la Lámina Terminal (OVLT).

Autores como Mestres (1978), Card y Mitchell (1978), Riesco y col. (1988) han observado, sobre la superficie de los endimocitos de este órgano, diversas estructuras intraventriculares supraependimarias, entre las que destacan: fibras y botones nerviosos, células supraependimarias y yemas citoplasmáticas propulsadas desde el polo apical de los endimocitos del OVLT.

La superficie ventricular del OVLT ha sido analizada con el microscopio electrónico de transmisión (Rohlich y Wegner, 1969; Noach, 1972; Coates, 1978), describiéndose siempre células supraependimarias; sin embargo, la descripción hecha con esta técnica no permite obtener una visión en conjunto de estas células, ni describir su morfología, su amplitud o su distribución.

Aunque se conoce la existencia de terminaciones nerviosas en el tercer ventrículo (Bleier, 1975; Mestres, 1975, 1976; Bleier y Marsch, 1978), sin embargo, falta una descripción sobre la distribución y relaciones endimarias de las formaciones nerviosas supraependimarias. El microscopio electrónico de barrido (MEB) permite estudiar zonas amplias y examinar sistemáticamente las características morfológicas de la superficie ventricular y por ello nuestro propósito, en este trabajo, es el realizar un estudio morfológico con el MEB de los diferentes tipos de células supraependimarias en dos especies animales y comparar los patrones de distribución, así como las diferencias estructurales existentes en ambas especies.

Material y Metodos

Para el estudio de las células supraependimarias del OVLT hemos utilizado animales adultos: 6 perros cimarrones (3 machos y 3 hembras) y 4 gatos (2 machos y 2 hembras).

Todos los animales se encontraban en condiciones controladas de laboratorio (ritmo luz-oscuridad: luz diurna y oscuridad nocturna 7-20 horas; temperatura: 20 ± 2 C; humedad relativa del aire: $50 \pm 5\%$; libre acceso a dieta equilibrada y agua).

Los animales, previa anestesia con Ketamina (10 mg/kg de peso), fueron perfundidos por vía intraventricular, a presión controlada, con una solución salina isotónica a 36°C , seguida de una solución fijadora tipo Karnovsky. Una vez fijado el animal, se decapitó y se abrió el cráneo, extrayendo el cerebro completo, recortándose éste en bloques que contenían el órgano a estudiar. Tras una nueva fijación, por inmersión, en Karnovsky (3-6 horas), se lavó el material, durante 8 a 12 horas, en tampón fosfato (0.1 M y pH 7.4) y se prosiguió al tallado del III ventrículo en bloques de tejido no superiores a $1 \times 1 \times 0.5$ cm, que fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 1%, deshidratados en acetona de porcentaje progresivo y secados, mediante el procedimiento del punto crítico, en dióxido de carbono. Una vez recubiertas las piezas de una capa de oro de 10 nm, fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido Philips SEM-500.

Resultados

En las dos especies de animales estudiadas por nosotros, las células supraependimarias observadas presentaron un patrón morfológico diferente.

En el OVLT del *gato*, las células supraependimarias son numerosas y de gran tamaño. Se distribuyen, fundamentalmente, por la zona de transición y en la periferia del órgano. Por lo general, en estas zonas, forman acúmulos de elementos celulares redondeados (Fig. 1), con prolongaciones que se fusionan y constituyen un entramado (Fig. 1) sobre la superficie apical de los endimocitos.

En el centro del OVLT, las células supraependimarias son escasas, están aisladas y no forman acúmulos; en esta zona del órgano existe el tipo celular más frecuente, células supraependimarias con el cuerpo ovalado o elipsoide (Fig. 2), partiendo de su soma de 2 a 4 prolongaciones gruesas, cortas, con varicosidades, que se deslizan sobre la superficie apical de varios endimocitos (de 6 a 10) y terminan ramificándose en forma palmeada (Fig. 2). En

ocasiones, las células pueden estar aisladas o fusionarse con otras vecinas a través de sus prolongaciones (Fig. 3). Estas células, de aspecto estrellado, no se orientan de una forma determinada sino irregularmente, entrecruzándose unas con otras. Por otra parte, encontramos acúmulos poliglobulares en forma de "coliflor", de aspecto fuertemente blanquecino, sobre la superficie celular intraventricular de los endotelios del OVLT del gato (Fig. 4).

El OVLT del *perro* se asienta sobre un área cribosa vascular y destaca la gran cantidad de células supraependimarias que se sitúan de forma dispersa en la periferia del órgano, en su zona de transición, y formando grandes acúmulos, en la parte central del mismo (Fig. 5). Estas células presentan una forma estrellada con cuerpo bulboso o globuloso y prolongaciones relativamente cortas (Fig. 6).

Además, existen células globulosas (Fig. 7), que poseen cortas prolongaciones a manera de filopodia (Fig. 7). Sin embargo, la gran mayoría están constituidas por células bipolares; tanto el cuerpo celular como las prolongaciones son las más voluminosas de todas las células supraependimarias estudiadas y sus prolongaciones terminan a corta distancia, pero siempre en forma palmeada, presentando conexiones con otras vecinas, formando un verdadero sincitio reticular (Fig. 8).

Discusión

A través del MEB se han hecho visibles nuevos aspectos en la distribución de perfiles de superficie en los ventrículos cerebrales, revelándonos que el epéndimo del OVLT difiere marcadamente del epéndimo cuboidal que recubre las paredes ventriculares en otras partes del cerebro.

Aunque existen diferentes aportaciones sobre la morfología (Fleischaver, 1961; Allen y Low, 1973; Mestres y col., 1975; Coates, 1975; Walsh y col., 1978; Card y Mitchell, 1978; Amat y col., 1981) y clasificación (Coates, 1972 y 1973; Scott y col., 1977; Pastor y col., 1982) de las células supraependimarias, todas ellas tienen rasgos comunes, con pequeñas desviaciones o matizaciones.

Coates (1972, 1973) y Scott y col. (1977) clasifican a las células supraependimarias presentes en el III ventrículo del mono, en dos tipos: células supraependimarias tipo I, caracterizadas por poseer un cuerpo celular pequeño, de morfología redondeada, ovalada, romboidal o estrellada, de superficie lisa, pudiendo tener prolongaciones ramificadas bipolares o multipolares, que arrancan del soma celular, y el tipo II, formado por células por lo general pequeñas y con el cuerpo esférico, aunque a veces puede ser pleomórfico y con la superficie rugosa, con modificaciones en su membrana.

De acuerdo con las características morfológicas obtenidas con el MEB, estos autores sugieren que las células tipo I derivarían del tejido nervioso y constituirían neuronas y glía; mientras que las células tipo II serían probablemente macrófagos (Coates, 1973; Scott y col., 1977; Bleier, 1975).

En nuestro estudio, tanto en el OVLT de gato como en el de perro, observamos un patrón celular similar, con pequeñas variaciones, al descrito por estos autores en el mono. Así, en el gato predominan las células con el cuerpo ovalado con prolongaciones en forma palmeada; mientras que en el perro, las células son más voluminosas y de aspecto bipolar.

Pastor y cols. (1982) clasifican las células supraependimarias del receso infundibular de diferentes animales en dos tipos: I y II, si bien subdividen al tipo II en dos clases: A y B.

Las células tipo I presentan un cuerpo redondeado u ovalado, de superficie lisa y con prolongaciones de pequeño diámetro; el tipo II A estaría integrado por células de superficie lisa o rugosa, con prolongaciones que muestran expansiones laminares membranosas o ramificaciones palmeadas, mientras que el tipo II B lo constituyen células de forma esférica, sin prolongaciones y de superficie esférica.

En el OVLT de las especies analizadas pero nosotros, aparecen los principales tipos de células supraependimarias descritos por otros autores, si bien, no encontramos todas en la misma especie animal.

La mayor proporción celular fue hallada en el OVLT de perro, y la variedad morfológica más amplia, en el órgano vasculoso del gato. En éste, las células con mayor número de prolongaciones y con aspecto típicamente neuronal, se encontraban preferentemente en la zona de transición entre el epéndimo ciliado y el no ciliado.

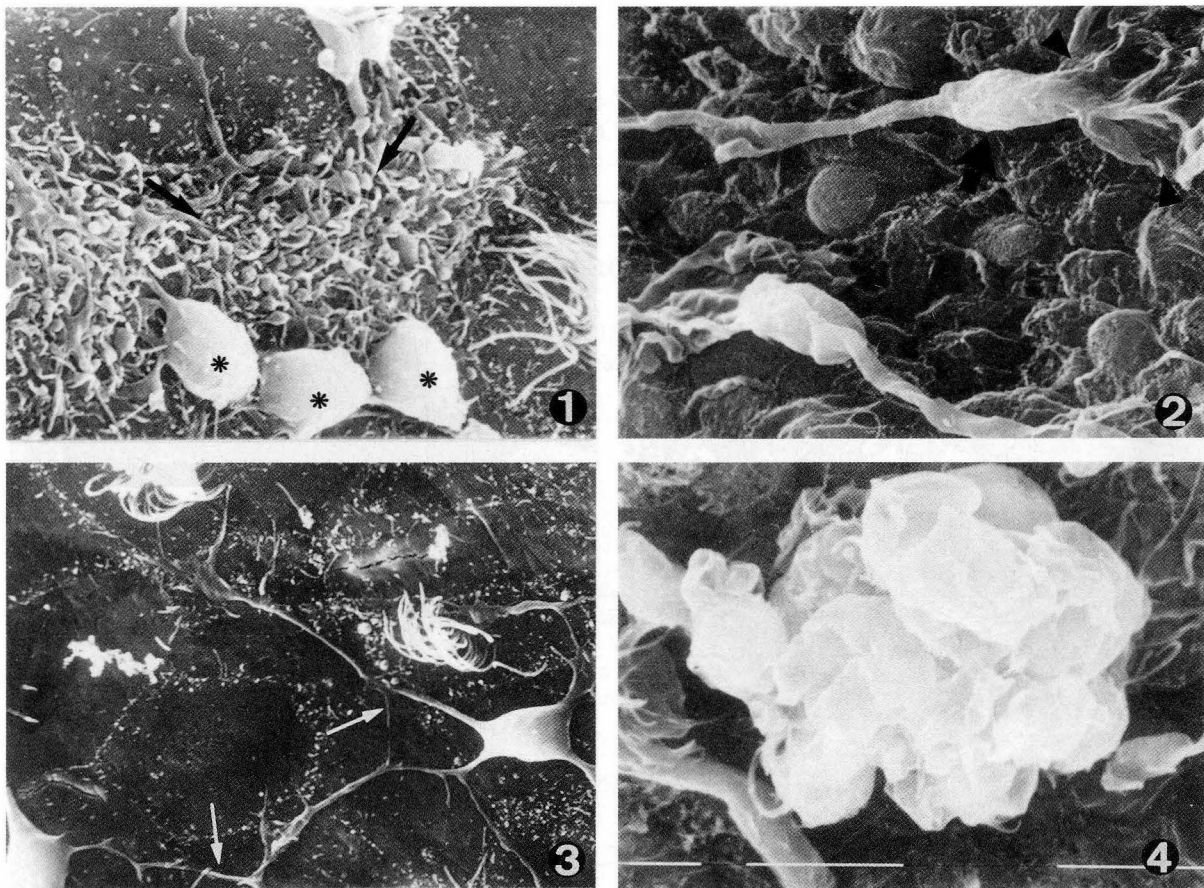
Aunque el papel de estas células aún no está esclarecido, se apunta la hipótesis de que estas células supraependimarias ejercerían un control regulador sobre la función de las células endimarias. Además se sugirió que son las responsables de los componentes bioactivos en la luz ventricular (Scott y col., 1977).

A través de los resultados expuestos podemos concluir que las células supraependimarias del OVLT de las dos especies analizadas por nosotros presentan diferencias morfológicas que afectan al tipo, tamaño y distribución dentro de este órgano, dato sólo posible de aclarar con el MEB.

BIBLIOGRAFIA

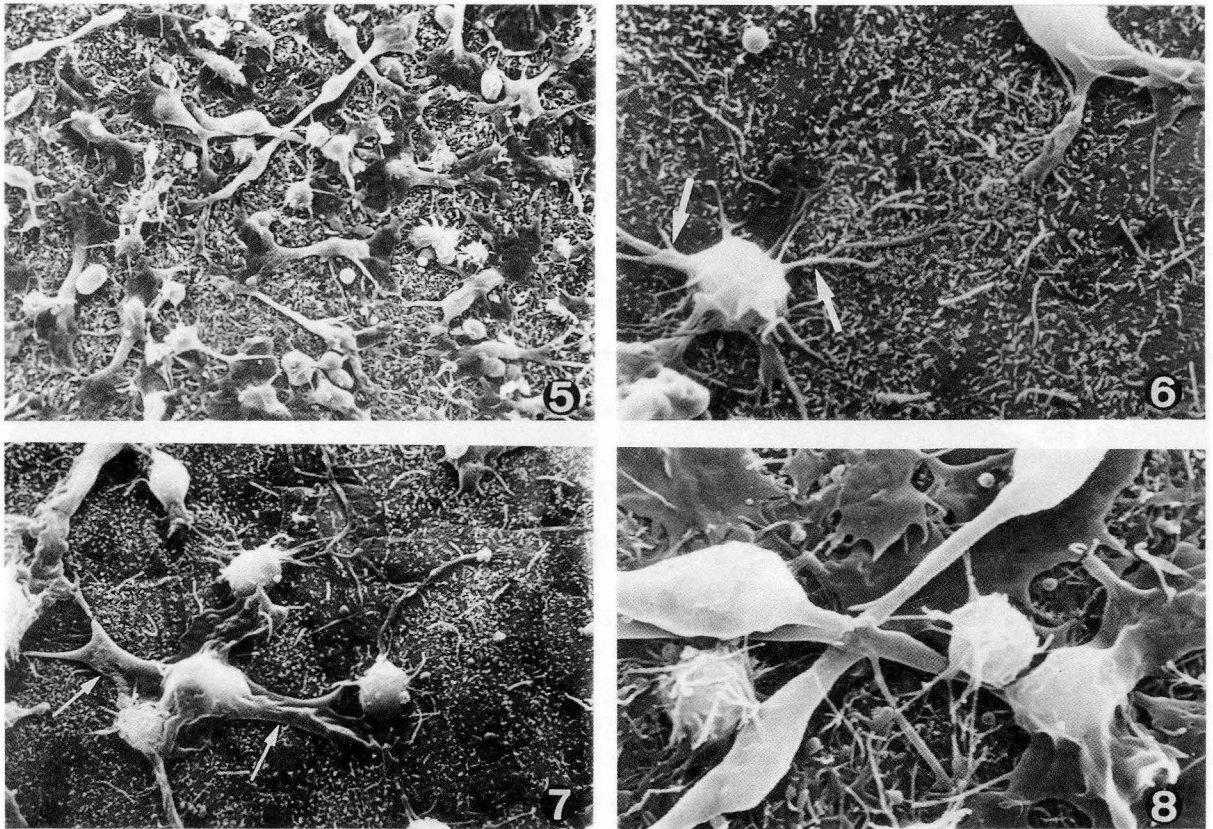
- ALLEN, D.J. y LOW, F.N. (1973): The ependymal surface of the lateral ventricle of the dog as revealed by scanning electron microscopy. *Am. J. Anat.*, **137**: 483-489.
- AMAT, P.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y PASTOR, F.E. (1981): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato. I). Características morfológicas del epitelio. *Morfología Normal y Patológica. Sec. A.5*, 1-12.
- BLEIER, R. (1975): Surface fine structure of supraependymal elements and ependyma of hypothalamic third ventricle of mouse. *J. Comp. Neur.*, **161**: 555-568.
- BLEIER, R. y MARSH, R. (1978): Reaction of third ventricle ependyma and supraependymal cells to vascular stomatitis virus. *SEM/II. USA.*, pp. 29.
- CARD, J.P. y MITCHELL, J.A. (1978): Scanning electron microscopy observations of supraependymal elements overlying the OVLT of the hamster. *SEM/II.*, USA, p. 803-809.
- COATES, F.W. (1972). Scanning electron microscopic studies of third ventricle from infant monkey brains disclose supraependymal cells. *J. Cell. Biol.*, **55**: 47a.
- (1973): Supraependymal cells in recesses of monkey third ventricle. *Am. J. Anat.*, **136**: 533.
- (1975): Scanning electron microscopy of a second type of supraependymal cell in the monkey third ventricle. *Anat. Rec.*, **182**: 275.
- (1978): Supraependymal cells and fiber processes in the fetal monkey third ventricle correlated scanning and transmission electron microscopy. *SEM/II. USA.*, pp. 143-150.
- FLEISCHAUER, K. (1961): Regional differences in the structure of the ependyma and subependymal layers of the cerebral ventricles of the cat. In: *Regional neurochemistry* (eds. S. Kety and J. Elkes), pp. 279-283. London: Pergamon Press.
- HOFFER, H. (1958): Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Verh. Dtsch. Zool. Ges. Zool. Anz. Suppl.*, **22**: 202-251.
- MESTRES, P.; MITCHELL, J.A. y HAFEZ, E. (1975): Morphologie of ependyma of third ventricle of male and female macaque: a scanning electron microscopy study. *Anat. Rec.*, **181**: 425-426.
- MESTRES, P. (1976): The supraependymal cell of the rat hypothalamus: Changes in their morphology and cell number during the ovarian cycle. *Experientia.*, **32**: 1329-1331.
- (1978): Old and new about circumventricular organs: an overview. *SEM/II. USA.*, p. 137.
- NOACH, W. (1972): Scanning and electron microscopical investigations of the surface of the lateral ventricles in the cat. *Brain Res.*, **46**: 121-129.
- PASTOR, F.E., MUÑOZ BARRAGAN, L. y AMAT, P. (1982): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato. II). Células supraependimarias. *Morfología Normal y Patológica. Sec. A.6*, 73-86.
- RIESCO, J.M.; JUANES, J.A.; CARRETERO, J. y VAZQUEZ, R. (1988): Ultrastructure of the surface of the organon vasculosum laminae terminalis in different animals species. *J. Submicrosc. Cytol.*, **20**: 363-369.
- ROHLICH, P. y WEGNER, T. (1969): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an organum vasculosum laminae terminalis der Ratte. *Z. Zellforsch.*, **102**: 483-506.
- SCOTT, D.E.; KROBISCH-DUDLEY, G.; PAUL, W. y KOZLOWSKI, G.P. (1977): The ventricular system in neuroendocrine mechanism. III Supraependymal neuronal networks in the primate brain. *Cell Tiss Res.*, **179**: 235-254.
- WALSH, R.J.; BRAWER, J.R. y LIN, P.S. (1978): Supraependymal cells in the third ventricle of the neonatal rat. *Anat. Rec.*, **190**: 257.

Correspondencia: Dr. Juan Antonio Juanes Méndez
Dpto. Ciencias Morfológicas (Anatomía Humana).
Facultad de Medicina.
Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca. España



FIGURAS 1 a 4. Células Supraependimarias del OVLT de gato.

- FIGURA 1.** Región periférica del OVLT de gato. Células supraependimarias de somas redondeados (asteriscos), cuyas prolongaciones constituyen un entramado sobre la superficie endimaria del órgano (flechas). Aumentos: 2500 x.
- FIGURA 2.** Región central del OVLT de gato. Células de cuerpo ovalado (flecha) con prolongaciones que terminan en forma palmeada (cabeza de flecha). Aumentos: 2500 x.
- FIGURA 3.** Zona de transición entre el OVLT de gato y el epéndimo ciliado. Aspecto estrellado de una célula supraependimaria con largas prolongaciones que se anastomosan entre sí y con otras de células vecinas (flechas). Aumentos: 1250 x.
- FIGURA 4.** Acúmulo de células supraependimarias globulosas, de superficie rugosa, que le confieren un aspecto en "coliflor". Aumentos: 5000 x.



FIGURAS 5 a 8. Células Supraependimarias del OVLT de perro.

- FIGURA 5.** Región central del OVLT de perro. Células bipolares con prolongaciones cortas y palmeadas que se anastomosan dando una imagen reticular. Aumentos: 640 x.
- FIGURA 6.** Región periférica del OVLT de perro. Células supraependimarias de superficie espinosa con prolongaciones cortas, (flechas). Aumentos: 2500 x.
- FIGURA 7.** Zona de transición del OVLT de perro. Células globulosas con cortas prolongaciones a manera de filopodia (flechas). Aumentos: 1250 x.
- FIGURA 8.** Células bipolares, con prolongaciones distales cortas y de forma palmeada, constituyendo un sincitio reticular; entre estas células se aprecian otras de aspecto globuloso con prolongaciones cortas. Aumentos: 2500 x.

ESTUDIO INMUNOCITOQUIMICO DE LOS ELEMENTOS REACTIVOS A LA PROTEINA GLIAL FIBRILAR ACIDA EN LA EMINENCIA MEDIA DE LA RATA

IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF ELEMENTS REACTIVE TO GLIAL FIBRILLARY ACID PROTEIN IN THE MEDIAN EMINENCE OF THE RAT

J.A. JUANES, J.M. RIESCO, J. CARRETERO, F. SANCHEZ, E. BLANCO y R. VAZQUEZ

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

RESUMEN

Se realiza un estudio inmunocitoquímico de la distribución topográfica de las células inmunorreactivas a la proteína glial fibrilar ácida en la Eminencia Media de ratas adultas. Las células inmunorreactivas a esta proteína se caracterizan por poseer un soma fuertemente teñido, emitiendo prolongaciones en todas las direcciones. Su distribución a lo largo de la Eminencia Media no es uniforme: desde la región retroquiasmática hasta el tallo infundibular son escasas y están situadas en la capa fibrilar de la zona interna de la Eminencia Media; en la región caudal, posterior al tallo hipofisario, son más abundantes estas células reactivas, predominando en la zona externa de la Eminencia Media.

PALABRAS CLAVE: Eminencia Media, Inmunocitoquímica, Proteína Glial Fibrilar Ácida.

SUMMARY

An immunocytochemical study was carried out to determine the topographic distribution of cells reactive to glial fibrillary acid protein in the Median Eminence of adult rats. The cells reactive to this protein are characterized by displaying a strongly stained soma, which gives off projections in all directions. Their distribution throughout the Median Eminence is not uniform. From the retrochiasmatic region to the infundibular stalk they are scanty and located in the fibrillary layer of the internal zone of the Median Eminence. In the caudal region, behind the hypophyseal stalk, such reactive cells are more abundant, and predominate in the external zone of the Median Eminence.

KEY WORDS: Median Eminence, Immunocytochemistry, Glial Fibrillary Acid, Protein.

Introducción

La proteína glial fibrilar ácida (GFAP) se caracteriza por localizarse exclusivamente en el citoplasma de los astrocitos (fibrosos y protoplasmáticos), siendo por tanto propia del sistema nervioso central (Moore, 1965; Moore y Pérez, 1968; Dahl y Bignami, 1973; Bignami y col., 1974; Ludwin y col., 1976; Gambetti, 1980; Onteniente y col., 1983).

La estructura de las fibras nerviosas y de la neuroglía en la Eminencia Media (EM) ha sido estudiada en animales adultos, normales o sometidos a stress (Wittkowski, 1972, 1974; Monroe y Paull, 1974; Zaborszky y Schiebler, 1978); sin embargo, son aún escasos los estudios de la EM que analizan las células gliales utilizando para su descripción y localización la GFAP, siendo éste el objeto de estudio de nuestro trabajo.

Material y Metodos

Se emplearon para el presente estudio 14 ratas (7 machos y 7 hembras), cepa Sprague-Dawley, de peso entre los 250-300 g. Fueron sacrificadas mediante decapitación y la EM, una vez extraída, fue fijada por inmersión en Bouin Hollande e incluida en parafina. En 10 animales se obtuvieron cortes frontales seriados de 5 μ m, en los 4 animales restantes se practicaron cortes frontales de 12 μ m de grosor, con el fin de poder visualizar las células inmunorreactivas en conjunto.

Las muestras se estudiaron con el método inmunocitoquímico enzimático PAP (Sternberger y col., 1970), utilizando suero de conejo anti-GFAP a dilución 1:500 (Dako A-334), suero de cerdo anti-inmunoglobulina de conejo (Dako, Z-196) a dilución 1:100 y complejo soluble PAP, obtenido en conejo (Dako, Z-113), a dilución 1:100. Para reducir el fondo de la tinción se empleó suero normal de cerdo (Dakopatts, Z-180) a dilución 1:30 y se inhibió la peroxidasa endógena tisular con metanol-agua oxigenada, según el proceder descrito por Streefkerk (1972). Se empleó como tampón de lavado y de dilución el tampón TRIS 5×10^{-3} M (Trizma base, Sigma, T-1503), con un 0,8% de NaCl, pH: 7,5. La reacción se visualizó con 3-3'-Diaminobenzidina y se contrastó con hematoxilina ácida de Mayer.

El estudio de la distribución regional de GFAP en la EM se realizó con arreglo a la sistemática descrita por Rodríguez y col. (1979), empleando un microscopio Zeiss-Axiophot.

Resultados

En la rata adulta, de ambos sexos, la inmunorreactividad a la GFAP es diferente en el hipotálamo basal lateral a la observada en la EM (Fig. 1). En la EM, los elementos celulares inmunorreactivos presentan un patrón de distribución desigual. Así, en la región rostral de la EM, desde la región retroquiasmática hasta el tallo infundibular, las células inmunorreactivas se sitúan aisladamente y sobre todo a nivel de la capa fibrilar de la zona interna (Fig. 1); en la región caudal de la misma, por detrás del tallo hipofisario, lo hacen, preferentemente, en la capa empalizada de la zona externa (Fig. 2).

En el hipotálamo basal lateral, la reactividad aparece marginalmente dispuesta, a ambos lados, por fuera de la EM apareciendo una banda de células reactivas en íntima relación con la piamadre (Fig. 3), que desaparece justo a nivel del límite lateral de la EM (Fig. 3).

Las células inmunorreactivas observadas presentan un soma irregular del que parten prolongaciones citoplásmicas en distintas direcciones, estando el núcleo libre de tinción (Fig. 4).

Discusión

La mayoría de los trabajos existentes sobre la GFAP tratan de esclarecer problemas patológicos como el de la clasificación de tumores cerebrales y su grado de malignidad (Dahl y Bignami, 1973; Bignami y col., 1974; Gambetti, 1980). En la actualidad existen pocos trabajos que analicen los elementos gliales inmunorreactivos a GFAP en la EM de la rata.

Basco y col. (1981) realizaron un estudio sobre los tanicitos de la EM del ratón, tomando como marcador inmunorreactivo de estas células la GFAP. En nuestro estudio no hemos encontrado inmunorreactividad a nivel de los tanicitos de la EM de la rata adulta, en ninguna de las regiones estudiadas.

La ausencia de inmunorreactividad en las células endimarias de la EM de la rata adulta está en consonancia con los trabajos realizados por Anderson y col., (1984) y Bullon y col., (1984) en el epéndimo humano y en la médula espinal de la rata, respectivamente. Estos autores señalan la presencia exclusiva de reactividad a GFAP en las células endimarias durante los estadios precoces del desarrollo y no en las células endimarias maduras; lo que parece indicar una diferenciación funcional distinta a lo largo del desarrollo.

Las características morfológicas de las células inmunorreactivas observadas en nuestro trabajo confirman la localización exclusiva de GFAP en el citoplasma de los astrocitos y sus prolongaciones, como señalaron Bignami y Dahl, 1973, 1974; Dhal y Bignami, 1973; Bignami y col. 1974; Ludwin y col. 1976, en la médula espinal, en el nervio óptico y en nervios periféricos.

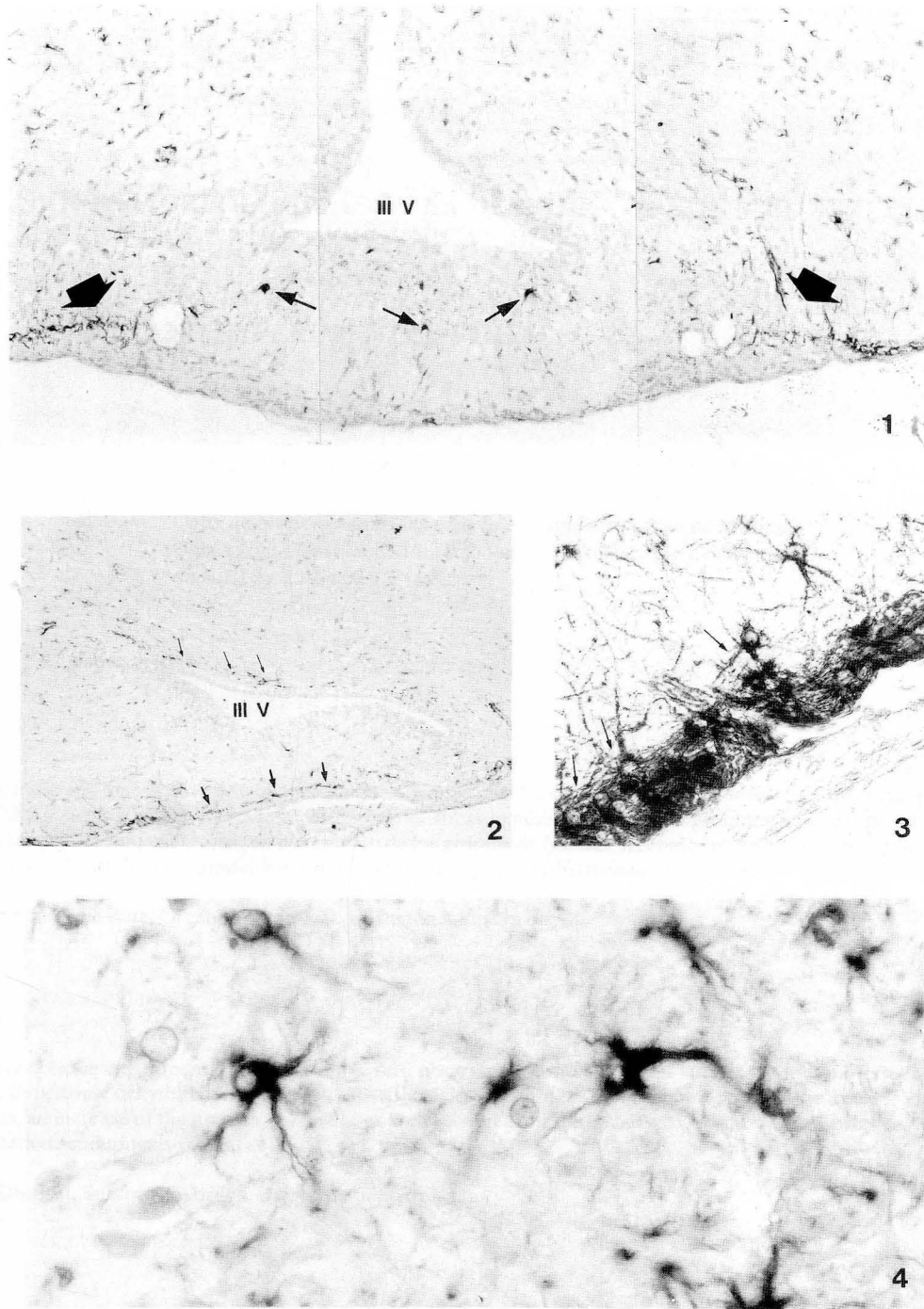
La desaparición de inmunorreactividad a GFAP en la capa externa de la porción rostral de la EM podría estar relacionada con las características especiales que reúnen los vasos porta hipofisarios a este nivel: capilares fenestrados, y la terminación de fibras nerviosas transportadoras de neuropéptidos y neurotransmisores hipotalámicos que fundamentalmente se realizan en esta zona.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, M.J.; SWANSON, K.A.; WAXMAN, S.G. y ENG, L.F. (1984): Glial fibrillary acidic protein in regenerating teleost spinal cord. *J. Histochem Cytochem.*, **10**: 1099-1106.
- BASCO, E.; WOODHAMS, P.L.; HAJOS, F. y BALAZS, R. (1981): Immunocytochemical Demonstration of Glial Fibrillary Acidic Protein in Mouse Tanycytes. *Anat. Embryol.*, **162**: 217-222.
- BIGNAMI, A. y DAHL, D. (1973): Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.*, **49**: 393-402.
- (1974): Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J. Comp. Neurol.*, **153**: 27-38.
- BIGNAMI, A.; ENG, L.F.; DAHL, D. y UYEDA, C.T. (1974): Localization of the glial fibrillary acidic Protein in Astrocytes by Immunofluorescence. *Brain Res.*, **43**: 429-435.
- BULLON, M.M.; GAGO, T.A.; RUIZ, B.F. y AGUIRRE, C. (1984): Glial fibrillary acidic protein (GRAP) in spinal cord of postnatal rat. An immunoperoxidase study in semithin sections. *Develop Brain Res.*, **14**: 129-133.
- DAHL, D. y BIGNAMI, A. (1973): Immunohistochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.* **61**: 279-293.
- GAMBETTI, P. (1980): Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Res.*, **200**: 13-21.
- LUDWIN, S.K.; KOSEK, J.C. y ENG, L.F. (1976): The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: An immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.*, **165**: 197-208.
- MONROE, B.G. y PAULL, W.K. (1974): Ultrastructural changes in the hypothalamus during development and hypothalamic activity: the median eminence. *Prog Brain Res.*, **41**: 185-208.
- MOORE, B.W. (1965): A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**: 739-744.
- MOORE, B.W. y PEREZ, V.J. (1968): Specific acidic proteins of the nervous system. En *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. F.D. Carlson Ed. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 343-359.
- ONTENIENTE, B.; KIMURA, H. y MAEDA, T. (1983): Comparative Study of the Glial Fibrillary Acidic Protein in Vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, **215**: 427-436.
- RODRIGUEZ, E.M.; GONZALEZ, C.B. y DELANNDY, L. (1979): Cellular organization of the Lateral and Postinfundibular Regions of the median eminence in the rat. *Cell Tiss Res.*, **201**: 377-408.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J. y MEYER, H.G. (1970): The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- STREPKERK, J.G. (1972): Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment hydrogen peroxide following methanol. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 829

- WITTKOWSKI W. (1972): Zur Ultrastruktur der Gefäßfortsätze von Ependym und Gliazellen im infundibulum der Ratte. *Z. Zellforsch*, **130**: 58-69.
- WITTKOWSKI, W. (1974): Functional changes of the neuronal and glial elements at the surface of the external layer of the median eminence. *Z. Anat Entwickl Gesch*, **143**: 255-262.
- ZABORSZKY, L. y SCHIEBLER, T.H. (1978): On the glial of the median eminence in rats. *Z. Mikrosk Anat Forsch*, **92**: 781-799.

Correspondencia: Juan Antonio Juanes Méndez
Dpto. de Anatomía Humana. Facultad de Medicina.
Avda. Campo Charro s/n. 37007 Salamanca. España.



- FIGURA 1.** Sección frontal de la región de la EM de la rata. III V (3^{er} ventrículo). Nótese la inmunorreactividad a nivel de la capa fibrilar de la zona interna de la EM (flechas), existiendo lateralmente a la misma, en los márgenes del hipotálamo basal lateral (flecha gruesa), la mayor proporción de células reactivas a GFAP. Aumentos: 150 x.
- FIGURA 2.** Región caudal de la EM. Células inmunorreactivas a la GFAP en la capa en empalizada de la zona externa de la EM (flechas). Obsérvese, además, una pequeña banda de células reactivas (flechas finas) a nivel del techo del tercer ventrículo (III V). Aumentos: 150 x.
- FIGURA 3.** Detalle de la banda de células inmunorreactivas (flechas), en íntima relación con la piamadre, que desaparece a nivel del límite lateral de la Eminencia Media (EM), como se observa en la Fig. 1 (flecha gruesa). Aumentos: 350 x.
- FIGURA 4.** Astrocitos inmunorreactivos a GFAP observados en un corte frontal de la EM de 12 μ m de grosor. Nótese la reactividad manifiesta a nivel del soma y sus prolongaciones. Aumentos: 700 x.

REPERCUSIONES MORFOLOGICAS DE LA DESHIDRATAACION Y EL STRESS EXPERIMENTAL SOBRE EL ORGANO SUBFORNICAL DE RATA

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SUBFORNICAL ORGAN OF THE RAT AFTER DEHYDRATATION AND EXPERIMENTAL STRESS

L. LOPEZ ARIZTEGUI, R. SARRIA y J. LOSADA

Dpto. de Neurociencias. Sección de Anatomía. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. 48940. Leioa. Vizcaya. España

RESUMEN

Hemos realizado un estudio experimental en rata albina, con el fin de observar las modificaciones sufridas por el órgano subfornical (O.S.F.) tras la deshidratación hipertónica y el stress experimental. Con la deshidratación existe un aumento del tamaño del núcleo y del soma neuronal, un incremento de los grumos de NISSL, así como rotura de la barrera endimaria, con salida de neuronas al líquido cefalorraquídeo. Con el stress, son típicas las dilataciones vasculares y las mitosis en células gliales.

PALABRAS CLAVE: Rata. Organó subfornical. Deshidratación. Stress.

SUMMARY

We have done an experimental study in albino rats, observing the modifications suffered by the subfornical organ, after experimental hypertonic dehydration and stress. After the dehydration, an increase in the size of the nucleus and cytoplasm of the neurons, an increase of the grumes of NISSL, as well as a break of the ependymal fence, can be observed. Stress caused vascular dilatations and mitosis in glial cells.

KEY WORDS: Rat. Subfornical organ. Dehydration. Stress.

Introducción

El órgano subfornical (O.S.F.) es un pequeño tubérculo ovoideo de pequeñas dimensiones, que sobresale en la luz del III ventrículo a nivel del agujero interventricular tapado en parte por los plexos coroideos.

Las primeras referencias acerca de la existencia de este órgano se remontan a 1896, año en que Wilder describió el hallazgo de un órgano al que llamó "crista fornicis".

En años posteriores este órgano recibió diversas denominaciones como núcleo coroideo anterior o núcleo marginal, hasta llegar a 1918 en el que Spiegel lo denominó órgano subfornical, haciendo un detallado estudio morfológico del mismo.

Fecha importante en el estudio de este órgano es el comienzo de los años 60, cuando Hofer introduce el concepto de órgano circunventricular, siendo el órgano subfornical parte integrante de este.

Contribuye al estudio histoquímico de este tubérculo Sarrat en 1968, demostrando la existencia de glucosa 6 fosfodehidrogenasa en el interior del mismo.

En 1968, Palkovits, realizando estudios morfométricos en el O.S.F., relaciona este órgano con cambios en el equilibrio hidromineral.

Dellman en 1979, con su trabajo titulado "El órgano subfornical", realiza una revisión exhaustiva acerca de todas y cada una de las características de este órgano, confirmando los hallazgos anteriores a microscopía electrónica.

El órgano subfornical es una estructura del cerebro que carece de la normal barrera hematoencefálica y que ha sido implicada en el control del balance del fluido corporal. Debido a esta ubicación fuera de la barrera hematoencefálica es accesible a hormonas peptídicas, sugiriendo muchas evidencias que la angiotensina activa receptores en esta estructura (Simpson, 1981).

Utilizando técnicas neuroanatómicas con trazadores de tractos (Lind y cols 1982; Miselis, 1981; Renaud, 1983; Swachenko y Swanson, 1983) se ha visto que el O.S.F. proyecta directamente a tres regiones prosencefálicas: componentes parvocelular y magnocelular del núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo supraóptico y núcleo mediano. Estas estructuras prosencefálicas han sido implicadas en la mediación de la liberación de arginina vasopresina (Mangiapané y cols 1984), del incremento de la presión arterial (Gutman y cols, 1985) y de la respuesta de bebida (Lind y Johnson, 1982), observadas durante la estimulación del O.S.F.

Massi, M. (1986) demuestra que el núcleo mediano del área preóptica contiene terminales angiotensinérgicos, que provienen de células del O.S.F., asumiéndose que es un lugar de relevo esencial para la actividad neuronal originada por la acción de la angiotensina sobre el órgano subfornical.

Sposito (1987) sugiere que la detección de la angiotensina ocurre principalmente en la región ventromedial del órgano subfornical. En esta región la densidad capilar y el área de superficie son particularmente grandes, conteniendo las células endoteliales abundantes fenestraciones y vesículas. Todos estos factores en conjunto son importantes para la facilitación de la permeabilidad capilar para la angiotensina.

Entre las conexiones aferentes al O.S.F. que se han podido demostrar recientemente, se encuentran proyecciones neurales directas desde el núcleo del tracto solitario (Zardetto, 1987). Este hallazgo ofrece la posibilidad de que las neuronas del núcleo del tracto solitario que proyectan directamente al O.S.F. puedan servir para transmitir información cardiovascular, para modular la acción del O.S.F.

Tanaka en 1988 establece que el O.S.F. posee múltiples conexiones eferentes y aferentes con varias regiones cerebrales que se piensa están involucradas en la regulación central de la homeostasis del fluido corporal y de la función cardiovascular. También Tanaka en 1988 describe que las neuronas de la zona lateral hipotalámica y zona incerta tienen proyecciones ascendentes al O.S.F., pudiendo transportar información, desde elementos osmorreceptivos, para la modulación de las acciones del O.S.F. Por último, señalar que Sibbald en 1988 encuentra neuronas del O.S.F. especializadas en la detección de cambios en la presión osmótica extracelular.

A la vista de estos antecedentes, nos propusimos con el presente trabajo mostrar algunas de las transformaciones sufridas por este órgano, a microscopía óptica, en animales sometidos a modificaciones del medio interno, como la deshidratación hipertónica y el stress experimental.

Material y Metodos

Cerebros de rata entre 1 y 2 meses de edad, raza Wistar de un peso aproximado entre 150 y 200 gramos, constituyen el material del presente trabajo, dividido en tres grupos.

El primer grupo formado por 10 ratas sirvió de control. 10 ratas de un segundo grupo fueron sometidas a deshidratación, al darles en su dieta agua con cloruro sódico al 2%. Por último un tercer grupo de 10 ratas fue sometido a stress mediante restricción del espacio vital e inmersión en agua las últimas 6 horas antes del sacrificio, según la técnica de Bonfils.

El primer grupo fue perfundido con glutaraldehído-formaldehído y tras ser extraídos los cerebros fueron incluidos unos en parafina y otros en celoidina y teñidos con técnicas de Golgi y Klüver-Barrera.

El grupo de ratas sometidas a deshidratación fueron sacrificadas por decapitación entre la primera y segunda semana de tratamiento. A continuación se procedió a recoger los cerebros en los que, una vez tallados y fijados en líquido de Bouin y tras ser incluidos en parafina, se procedió a realizar cortes seriados a 9 micras, que posteriormente fueron teñidos según el método de Klüver-Barrera.

El tercer grupo de ratas, que fueron sometidas a inmovilización por restricción del espacio vital, se subdividió, estudiándose unos cerebros tras inclusión en parafina y tinción con Klüver-Barrera, mientras que otras ratas de este grupo fueron inoculadas por vía intraperitoneal con $3 \mu\text{Cu}/\text{gr.}$ de peso de timidina H^3 , siendo sacrificadas 1/2 hora después de la inoculación. Recogidos los cerebros y tallados para su estudio autorradiográfico, fueron incluidos en parafina previa fijación según el método de Cowan, emulsión Ilkford K5 (dilución 1:1, 43 grados centígrados) y revelado Kodak D-19, siendo teñidos con violeta de cresilo.

Resultados

La estructura microscópica del órgano subfornical de rata, al igual que el resto del sistema nervioso, está constituida por una variada población de células y fibras nerviosas, así como células de neuroglía y vasos sanguíneos. Por ser un tubérculo que sobresale en la luz del tercer ventrículo está tapizado por células del epitelio endimario.

En una representación esquemática del O.S.F. del animal control (Fig. 1a), los tipos neuronales más frecuentes hallados en nuestro estudio han sido: horizontales, fusiformes, pleomórficas estrelladas y neurogliformes.

Los animales sometidos a deshidratación hipertónica por administración de agua y cloruro sódico poseen severas modificaciones neuronales en el interior del O.S.F., tanto en lo que se refiere a su contenido secretor como a la propia estructura citoplasmática. El aumento de tamaño del núcleo, así como el incremento de los grumos de NISSL, son propios de los primeros estadios de la deshidratación (Fig. 1b).

Posteriormente (Fig. 1c), las neuronas tienden a abandonar su distribución laminar por el órgano para buscar la periferia del mismo. Asimismo, se observa el quebranto de la barrera de células endimarias que revisten el órgano por una neurona de gran tamaño que trata de salir al líquido cefalorraquídeo. Previamente (Fig. 1d), los plexos coroideos se han aproximado a la pared del órgano por la zona donde la barrera perdió su continuidad, para así poder incluir neuronas, que con las modificaciones propias de los primeros estadios de la deshidratación son vertidas al líquido cefalorraquídeo.

En ocasiones a medida que progresa la deshidratación las neuronas sufren fenómenos de plegamiento (Fig. 2a), con incremento progresivo de la picnosis y muerte celular (Fig. 2b), antes de poder ser eliminadas al LCR. En estos animales son frecuentes los fenómenos de vacuolización a nivel protoplasmático y nuclear (Figs. 2c y 2d), espacios que son pronto rellenos por elementos gliales.

Los hallazgos más demostrativos en el órgano subfornical de los animales sometidos a stress por restricción del espacio vital e inmersión en agua, fueron localizados a nivel vascular y en sus proximidades. En una imagen panorámica del O.S.F. de un animal "estresado" (Fig. 3a) se observan formaciones vasculares intensamente dilatadas, fenómenos propios de las últimas fases de stress. El espesor del órgano muestra elementos neuronales con una menor repercusión morfológica que tras la deshidratación, siendo el soma neuronal de un tamaño próximo a la normalidad y con un contenido neurosecretor escaso o nulo. Nótese por último en dicha figura dos imágenes mitóticas observadas en el órgano subfornical de estos animales stressados. A la vista de estos hallazgos, y con el fin de demostrar si las imágenes eran realmente mitosis, decidimos inocular a estos animales en situación de stress timidina tritiada por vía intraperitoneal. Como muestra la figura 3b, múltiples impactos autorradiográficos fueron observados en células en mitosis que, dispersas por todo el órgano subfornical, creemos son células de neuroglía emigradas de los vasos.

Discusión

La vasopresina es segregada tras la deshidratación y con el aumento de la osmolaridad extracelular, presentándose esta como respuesta coordinada del sistema nervioso y, en concreto de la neurohipófisis, para la retención de agua. En 1988, Sibbald demuestra la existencia de neuronas del O.S.F. especializadas en la detección de cambios en la presión osmótica extracelular. Los recientes hallazgos de Zardetto (1987) y Tanaka (1988), que relacionan el O.S.F. con el núcleo del tracto solitario, sugieren que información cardiovascular pudiera ser transmitida desde los barorreceptores al O.S.F., regulando la homeostasis.

Con nuestros hallazgos hemos querido tan solo mostrar la estrecha relación que existe entre las modificaciones del medio interno, provocadas por la deshidratación y el stress experimental, y las transformaciones morfológicas sufridas por el O.S.F.

En condiciones de deshidratación, el O.S.F. aumenta en su conjunto de tamaño, así como los somas neuronales los cuales presentan una distribución anular de los grumos de NISSL. Existe plegamiento y picnosis neuronal, con gran cantidad de vacuolas en el espesor del parénquima, rotura de la barrera endimaria que recubre al órgano y por último aproximación de los plexos coroideos a las neuronas que perdieron su distribución uniforme por el órgano y fueron desprendidas al líquido cefalorraquídeo.

La situación de stress por nosotros provocada ha sido responsable de modificaciones morfológicas en el O.S.F., como son: escasa repercusión sobre el soma y núcleo neuronal, disminución considerable de los grumos de NISSL, ausencia de fenómenos de vacuolización en el espesor de la glándula, pero intensas dilataciones vasculares propias de los últimos estadios del stress. La aparición de células en mitosis, probablemente emigradas desde los vasos y que nosotros hemos interpretado como células gliales tipo pituitico, ya fue observada por Gómez Palacios y Sarrat en 1979, en condiciones similares, a nivel hipofisario.

BIBLIOGRAFIA

- DELLMAN, H.D. (1979): The subfornical organ. *Internat. Rev. of Cytology*. **58**: 333-421.
- GOMEZ PALACIOS, A.; SARRAT, R. (1979): Ulcera de stress. Estudio experimental y clínico. *Gaceta Médica de Bilbao*. **76**: 286-330.
- GUTMAN, M.B.; CIRIELLO, J.; MOGENSEN, G.J. (1985): Effect of paraventricular nucleus lesions on cardiovascular responses elicited by stimulation of the subfornical organ in the rat. *Can. J. Physiol Pharmacol*. **563**: 816-824.
- HOFFER, H. (1969): In *Zirkumventrikuläre Organe und Liquor*. 77-88.
- LIND, R.W.; JOHNSON, A.E. (1982): Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. *J. Neurosci*. **2**: 1043-1051.
- LIND, R.W.; VAN HOESEN, G.V.; JOHNSON, A.E. (1982b). An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J. Comp. Neurol*. **210**: 265-277.
- MANGIAPANE, M.L.; THRASHER, T.N.; KEIL, L.C.; SIMSSON, J.B.; GANONG, W.F. (1984): Role of the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res. Bull*. **13**: 43-47.
- MASSI, M.; DE ACRO, G.; MAZZARELLA, M.; EPSTEIN, A.N. (1986): The role of the subfornical organ in the drinking behaviour of the pigeon. *Brain Res*. **381**: 289-299.
- MISELIS, R. (1981): The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res*. **230**: 1-24.
- PALKOVITS, M. (1968): Über die funktionelle Bedeutung des subfornikal rgans. *Symp. Zirkumventrikuläre Organe und Liquor*. 95-98.
- RENAUD, L.P.; ROGERS, J.; SGRO, S. (1983): Terminal degeneration in the supraoptic nucleus following subfornical organ lesions: ultrastructural observations in the rat. *Brain Res*. **275**: 365-368.
- SARRAT, R. (1968): Enzymhistochemische Untersuchung am Subfornikalorgan der Ratte. *Experientia*. **24**: 1234.
- SIBBALD, J.R.; HUBBARD, J.I.; SIRETT, N.E. (1988). Responses from osmosensitive neurons of the rat subfornical organ in vitro. *Brain Res*. **46**: 205-214.
- SIMPSON, J.B.; EPSTEIN, A.N.; CAMARDO, S.J. Jr. (1978): The localization of dipsogenic receptors for angiotensin in the subfornical organ. *J. Comp. Physiol*. **92**: 581-608.
- SPOSITO, N.M.; GROSS, P.M. (1987): Topography and morphometry of capillaries in the rat subfornical organ. *J. Comp. Neurol*. **260**: 36-46.

- SWACHENKO, P.E.; SWANSON, L.W. (1983): The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* **218**: 121-144.
- TANAKA, J.; SETO, S. (1988): Neurons in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subformal organ in the rat. *Neurosci. Lett.* **89**: 152-155.
- TANAKA, J.; SETO, S. (1988): Neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta with ascending projections to the subformal organ area in the rat. *Brain Res.* 397-400.
- ZARDETTO SMITH, A.M.; GRAY, S.T. (1987): A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subformal organ in the rat. *Neurosci. Lett.* **80**: 163-166.

Correspondencia: R. Sarría
Departamento de Neurociencias.
Sección de Anatomía. Facultad de Medicina.
Universidad del País Vasco.

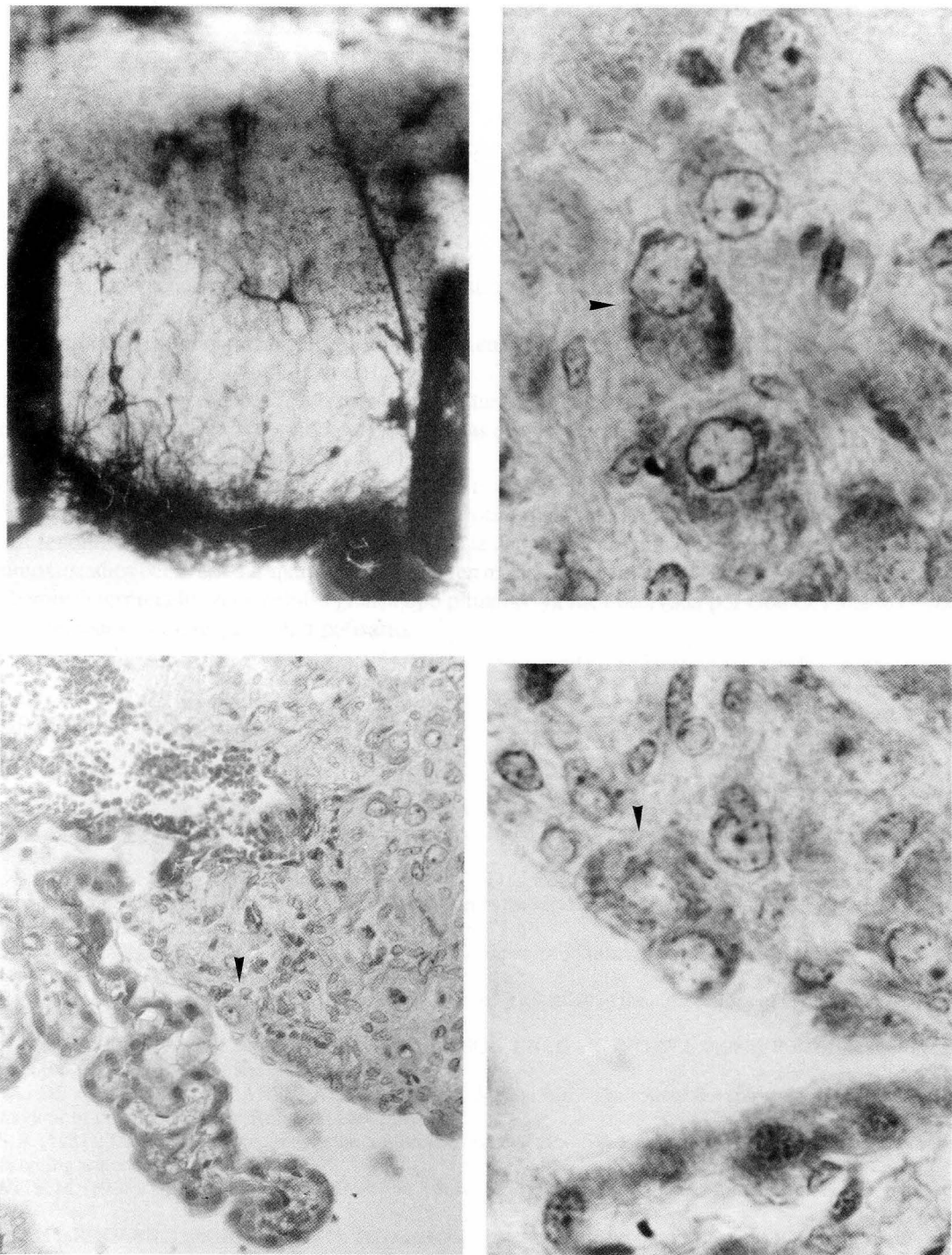
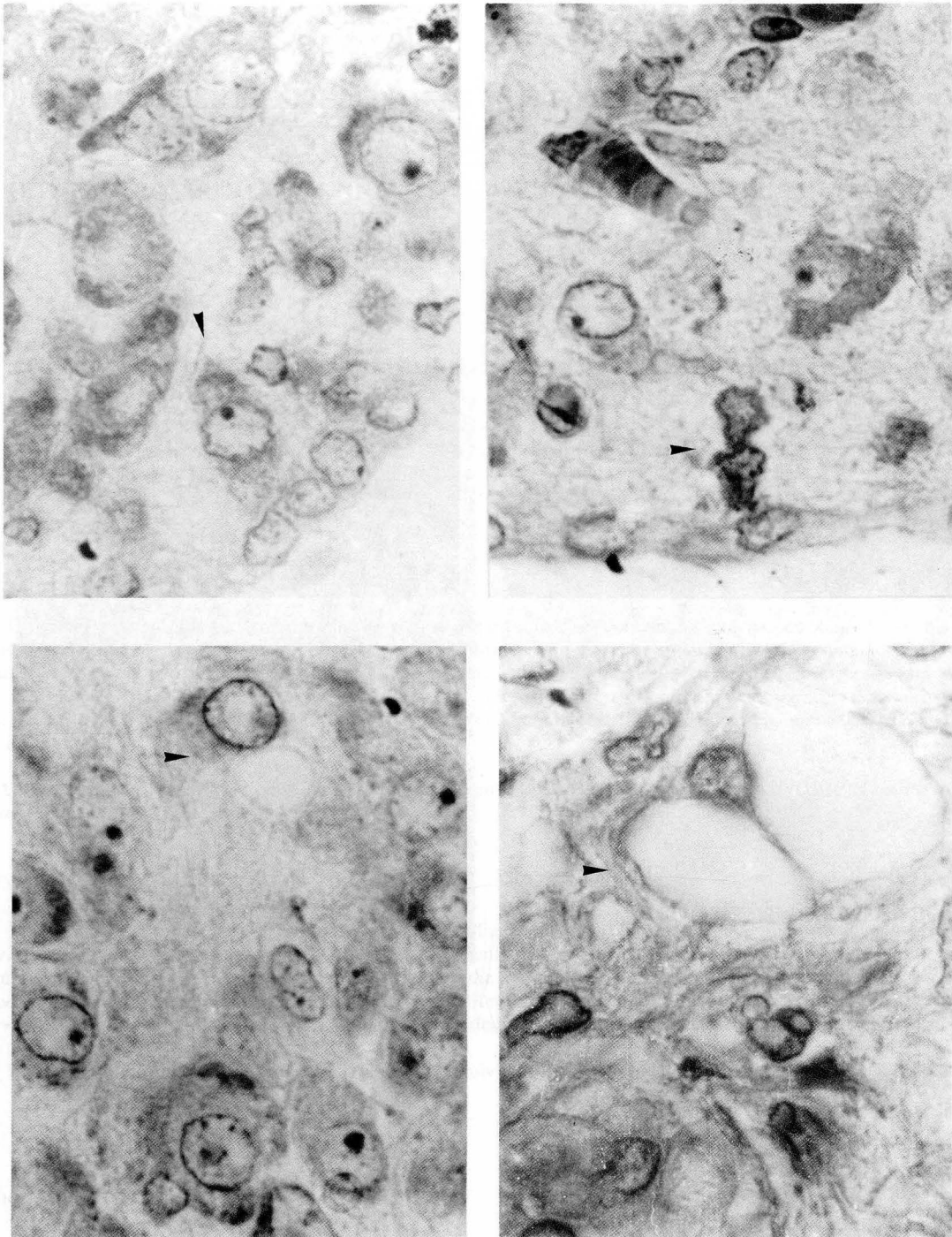


FIGURA 1a. O.S.F. Rata. Control. Imagen panorámica del órgano subfornical, donde se muestran los elementos neuronales que lo componen. Golgi 25 x.

FIGURA 1b. O.S.F. Rata. Deshidratación. Nótese las modificaciones neuronales a nivel citoplásmico, así como de su contenido neurosecretor. Klüver Barrera 40 x.

FIGURA 1c. O.S.F. Rata. Deshidratación. Obsérvese una neurona quebrantando la cubierta endimaria del órgano. Kliver Barrera. 25 x.

FIGURA 1d. O.S.F. Rata. Deshidratación. Neurona con intensa actividad protoplásmica saliendo del O.S.F. al L.C.R. 40 x.



FIGURAS 2a y 2b O.S.F. Rata. Deshidratación. Neuronas en distintas fases de degeneración. Klüver Barrera 40 x.

FIGURAS 2c y 2d. O.S.F. Rata. Deshidratación. Fenómenos de vacuolización celular tras la degeneración neuronal, tanto a nivel protoplásmico como nuclear. Klüver Barrera 40 x.

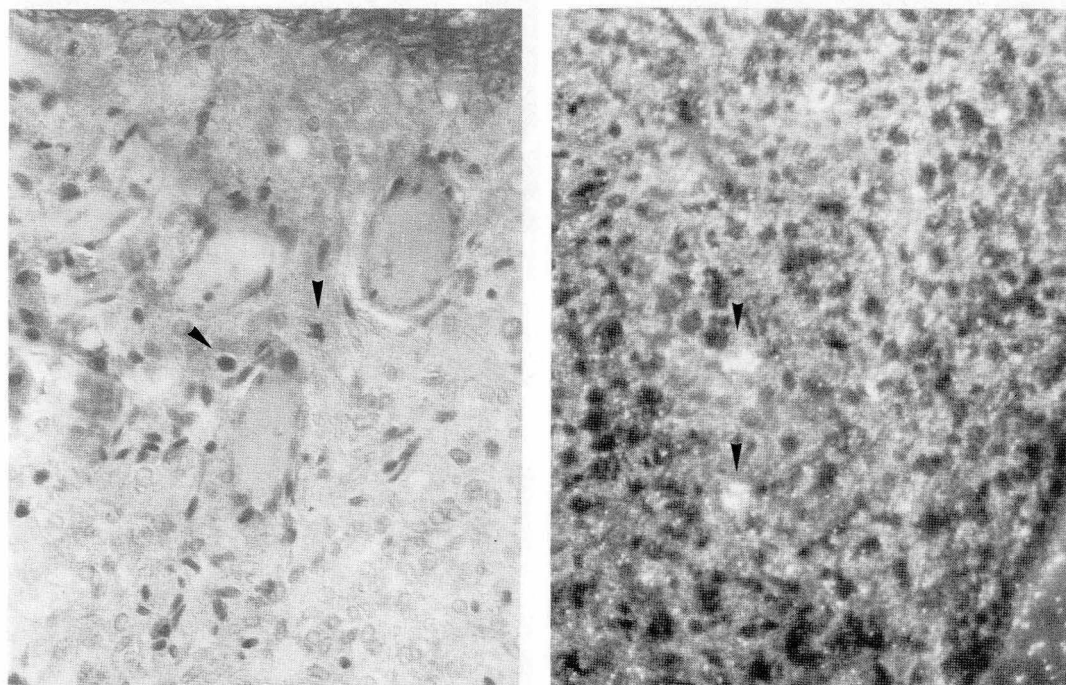


FIGURA 3a. O.S.F. Rata. Stress. Intensa dilatación capilar. Figuras mitóticas perivasculares. Klüver Barrera 40 x.

FIGURA 3b. O.S.F. Rata. Stress. Impactos autorradiográficos en el espesor del órgano subformal como signos de actividad mitótica. Autorradiografía. Timidina H³. 40 x.

ESTUDIO DE CONEXIONES RECIPROCAS ENTRE EL TALAMO Y EL CORTEX AUDITIVO EN EL CONEJO

A STUDY OF RECIPROCAL CONNECTIONS BETWEEN THE THALAMUS AND THE AUDITORY CORTEX IN THE RABBIT

C. MARTINEZ-CIRIANO, J. BLASCO, J. L. NIETO, J. GARUZ y L. MARTINEZ-MILLAN

Dpto. de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Utilizando marcadores retrógrado y anterógrado, se han estudiado las conexiones talamocorticales y corticotalámicas en el conejo, pudiendo comprobar la reciprocidad de este sistema de conexiones a nivel del cuerpo geniculado medial (NGM) fundamentalmente; siendo en la porción caudal de dicho núcleo la subdivisión ventral, con todas sus partes, la que está en conexión recíproca con el córtex auditivo, y en su porción rostral, las subdivisiones dorsal y ventral. Se encuentran algunas matizaciones respecto a esto, en dependencia a que la reciprocidad sea en el área AI o, bien, en la AII. También existe esta reciprocidad de conexiones a nivel del N. Pulvinar del Tálamo.

PALABRAS CLAVE: Córtex auditivo. Cuerpo geniculado medial (NGM). N. Pulvinar. Peroxidasa (HRP). Leucina tritiada (^3H -Leucine) conejo.

SUMMARY

Using retrograde and anterograde markers, we have studied thalamocortical and corticothalamic connections in the rabbit, verifying the reciprocity of this system, mainly at the medial geniculate body (MGB); being the ventral subdivision, in the caudal part of that nucleus, the one that connects reciprocally with the auditory cortex; and in the rostral part, the dorsal and ventral subdivisions, finding some slight variations about it whether it refers to the primary auditory area or the associative ones. There is, as well, this reciprocity of connections at the pulvinar nucleus of the thalamus.

KEY WORDS: Auditory cortex. Medial geniculate body. Pulvinar. Peroxidase. ^3H -Leucine. Rabbit.

Introducción

Al igual que ocurre en otros sistemas sensoriales, en el sistema auditivo existe una estación talámica fundamental, que recibe y envía conexiones al córtex auditivo. Es el núcleo geniculado medial (NGM). Este núcleo es complejo y se ha subdividido en otros, basándose en criterios citoarquitectónicos (18, 19, 20) o electrofisiológicos (6, 7), comprobándose, así mismo, que en él hay una representación tonotópica detallada (1, 2, 3).

La organización de la conexión entre el NGM y el córtex auditivo se ha establecido clásicamente por métodos de degeneración axonal (8), tras lesionar las distintas parcelas que componen el córtex auditivo. Las lesiones limitadas a una porción del NGM van seguidas de degeneración anterógrada de los axones geniculocorticales y de otros eferentes del geniculado medial a otros núcleos talámicos.

La puesta de manifiesto de estas alteraciones degenerativas ha llevado a conocer las conexiones de los componentes del sistema auditivo.

Mediante el empleo del marcador peroxidasa, Winer y col. (17) fueron capaces de parcelar las proyecciones de las distintas partes del NGM y núcleos posteriores en el gato. La parte laminada y principal de la división ventral del NGM proyecta sólo a AI. Las demás subdivisiones talámicas, a dos o más subdivisiones corticales.

En un estudio completo con métodos autorradiográficos Fitzpatrick e Imig (10) vieron que en algunos monos las áreas auditivas envían axones a las divisiones principal y magnocelular del NGM, así como a la región dorsomedial y a la porción laminada del núcleo central del colículo inferior y al núcleo Pulvinar medial.

La proyección corticogeniculada es recíproca con la geniculocortical en el tree shrew (*tupaia glis*) (14, 15). También está demostrada la reciprocidad de las conexiones entre el giro temporal y el núcleo Pulvinar en el squirrel monkey (16).

Toda la bibliografía revisada aboga por esta reciprocidad, pero hemos querido ponerla de manifiesto en otra especie animal, siendo esta el conejo, ya que es el animal utilizado habitualmente para nuestros experimentos, pudiendo comparar así nuestros hallazgos con los de investigadores anteriores y observar las similitudes y diferencias en las diversas especies estudiadas.

Material y Métodos

Se han utilizado 40 conejos, no albinos, de ambos sexos y de un mes a mes y medio de edad, y con un peso aproximado entre 1.300 a 2.000 gramos. La anestesia empleada fue Ketolar, administrado subcutáneamente (40 mg./Kg. de peso) y Uretano intraperitoneal (0,75 gr./Kg).

Tras el trépano en la región ósea temporal, debiendo en algunos casos proceder desarticulando la mandíbula y realizando una exéresis de la rama ascendente de dicha zona esquelética, se efectuó la inyección de un marcador retrógrado en 20 de los animales experimentales y otro marcador anterógrado en el resto de los animales. El marcador retrógrado utilizado fue la horseradish peroxidase (HRP, Sigma tipo VI), empleando una microjeringuilla Hamilton. Ayudándonos con un microscopio de operación Zeiss (OPMI 9), se reseco la duramadre y aracnoides, procediéndose a inyectar en diferentes zonas del córtex temporal una cantidad de 0,05 µl de una solución de HRP al 30% en suero fisiológico. Tras una sobrevivencia de 24 a 36 horas, se anestesió de nuevo al animal, para perfundirlo percardiacamente con una solución fijadora que contenía paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4, empleando aproximadamente 750 ml. de este fijador, previo lavado con suero fisiológico del árbol circulatorio, transcurriendo dicha perfusión en un tiempo de 30 a 45 minutos.

Obtenidas las cabezas por decapitación se descalotaron los encéfalos y se colocaron en solución fijadora añadiéndoles sucrosa al 30%, durante unas horas. Con ayuda de una lupa WILD se dibujaron los cerebros a escala, señalando el lugar exacto de la inyección; tras esto, se obtuvieron los bloques donde se hallaba el tálamo, para cortarlos de forma seriada en un microtomo de congelación a 40 µm, y los cortes se depositaron en unos pocillos que contenían buffer fosfato 0,1 M, en dos series paralelas. Ambas se procesaron mediante la técnica histoquímica de la peroxidasa utilizando como cromógeno la tetrametilbenzidina (TMB) (12, 13), se montaron en portas gelatinizados, y una de las series se contrastó con rojo neutro.

Las secciones son examinadas en un microscopio con un plotter incorporado, permitiendo dibujar lo visualizado y mediante un sistema de coordenadas señalar las células marcadas en cada sección y permitirnos así una reconstrucción exacta de la localización de las células origen de la proyección estudiada a nivel del cuerpo geniculado medial.

El marcador anterógrado usado fue un precursor proteico tritiado. Se procedió en cuanto a la anestesia y acceso a la zona cortical del mismo modo que con el lote anterior, y también, gracias a una microjeringuilla Hamilton, se

inyectaron 0,4 µl de una solución concentrada de leucina tritiada (60 µC/µl); transcurrida una sobrevivencia de 24 a 48 horas, se anestesió al animal con hidrato de cloral al 20% (4 ml./Kg. de peso) intraperitonealmente para llevar a cabo la perfusión percardiaca con formol neutro al 10%. El encéfalo extraído se incluyó en Paraplast y se obtuvieron cortes seriados de 10 µm que fueron procesados por la técnica de autorradiografía para microscopía de luz. Se utilizó una emulsión Kodak NTB2 diluida al 20% en agua destilada y mantenida a una temperatura constante de 40° C. El tiempo de exposición a la emulsión fué de un mes, durante el cual los portaobjetos estuvieron herméticamente cerrados y mantenidos a 4° C. Después fueron revelados con el revelador Kodak T19 y fijados con un fijador standar de fotografía. Una vez contrastados con una solución de tionina al 1%, deshidratados y cubiertos, se observaron con un fotomicroscopio Zeiss II y una lupa binocular WILD con campo oscuro incorporado. Los atlas utilizados tanto para la localización del lugar de inyección, como para realizar las reconstrucciones de los datos obtenidos, fueron: para el córtex cerebral el de Fleischlauer (9) y para el tálamo el de Gerhard (11).

Resultados

Proyección Tálamo-Cortical

Las inyecciones del enzima peroxidasa (HRP) se localizan en diversos territorios de las áreas corticales temporales. Las que hemos utilizado para este trabajo corresponden a las zonas Te 1, Te 2.2 y Te 3 del córtex (9) y abarca a todas las capas de dicho córtex.

Las células origen de la proyección se observan a nivel del núcleo geniculado medial talámico, así como en el núcleo pulvinar (11). La proyección más intensa corresponde a la zona Te 1 (área auditiva primaria). Al estudiar cortes seriados del tálamo se aprecian células marcadas origen de la proyección genículo-cortical, en varias subdivisiones del NGM, en toda su extensión rostro-caudal.

En la Figura 1A podemos apreciar la topografía de su localización. En la parte más caudal del núcleo, las células marcadas se hallan en parte del subnúcleo dorsal, toda la división ventral, conforme observamos cortes más rostrales, encontramos cómo en la subdivisión Vc y Vm (Ventral central y Ventral medial) va perdiéndose la celularidad.

En la Figura 4A se presenta una imagen donde las células marcadas ocupan la porción más periférica del NGM, y en la figura 4B un detalle de unas de estas células intensamente marcada, permitiéndonos observar claramente su morfología.

Las proyecciones hacia Te 2.2 son más escasas, localizándose los somas neuronales en la porción más caudal del NGM, y únicamente en algunas de las subdivisiones de su subnúcleo ventral, con la exclusión del subnúcleo central (Vc) (Fig. 2A).

Las células que proyectan a Te 3 son muy escasas y se distribuyen en la porción más caudal del NGM, por la zona más lateral de la subdivisión dorsal y ventral, haciéndose más mediales en el tercio más rostral del citado núcleo (Fig. 3A).

Respecto al núcleo pulvinar talámico, observamos que manda sus axones fundamentalmente al área Te 1 del córtex temporal, y lo hace desde la porción centro caudal y rostromedial del mismo, apreciando en nuestro material cómo forma una banda oblicua de células en esta última porción (Fig. 1A, 4C y 4D).

Proyección Córtico-Talámica

Las inyecciones de leucina tritiada (³H-Leucine) se practicaron en todo el córtex temporal; las utilizadas para este trabajo se sitúan en Te 1, Te 2.2 y Te 3 de dicho córtex.

Los terminales axónicos provenientes de Te 1 se observan a nivel del NGM en toda su extensión rostro-caudal, abarcando toda la porción lateral de dicho núcleo. En los niveles más caudales del núcleo, se observa todo él con el marcado autorradiográfico, y hacia la zona más rostral se aprecia este marcado más abundante e intenso en las subdivisiones dorsal y ventral, con la excepción de la porción Vc (Ventral central) (Fig. 1B).

A nivel del NGM los terminales que provienen de Te 2.2 son muy abundantes distribuyéndose el marcado autorradiográfico por todas las subdivisiones del NGM, aunque sin hallarlas tampoco en Vc (Ventral central) (Fig. 2B).

Por último, referente a la proyección desde Te 3 del córtex auditivo, difieren si esta proviene de la parte anterior o posterior de dicha zona cortical. Así, cuando la inyección se produce en las partes más rostrales del área Te 3, los terminales axónicos a nivel del NGM son cuantiosos a lo largo de su extensión rostro-caudal, quedando libre de marcado la porción central de la subdivisión ventral del núcleo (Fig. 3B). Algo más tenue es el marcado autorradiográfico cuando la proyección parte, de la zona anterior de Te 3.

Este intenso marcado del que hemos hablado podemos observarlo en las fig. 5A, 5B y 5C, correspondiente al NGM fotografiado desde niveles rostrales a caudales.

La conexión con el núcleo pulvinar es también manifiesta. Desde Te 1, ocupa la porción centrocaudal y ventromedial del mismo. Esta misma topografía encontramos en la proyección desde Te 2.2, aunque más intensa que la observada desde Te 1 (Fig. 1B, 2B). La proyección desde Te 3 es más tenue en nuestros resultados, pero sigue presentando la misma disposición en banda en la porción ventromedial de dicho núcleo (Fig. 3B y 5D).

Discusión

A la vista de nuestros resultados, podemos concluir diciendo que en líneas generales estamos de acuerdo en afirmar que el núcleo geniculado medial (NGM) y el núcleo Pulvinar mantienen conexiones recíprocas con el córtex temporal en el conejo, hecho este estudiado ya en el gato (4) con técnicas de transporte anterógrado y retrógrado utilizadas simultáneamente.

Nosotros encontramos que estas conexiones son claramente recíprocas en lo referente al área Te 1, donde tanto la intensidad como la localización de las células y terminales axónicos en el NGM son superponibles en los niveles caudales de dicho núcleo, habiendo reciprocidad de conexiones a nivel del subnúcleo ventral (4), porciones Vi (ventral intermedia), Vc (ventral central) y Vv (ventral ventral), y aunque se observa proyección genículo-cortical desde Vm (ventral medial), no se observa en nuestro material proyección córtico-geniculada en estos niveles caudales.

En los niveles rostrales, existe reciprocidad en el subnúcleo ventral, en todas las subdivisiones, aunque con mayor intensidad en Vv y Vm, siendo esto similar a lo observado en otras especies animales estudiadas (5, 14, 15), sobre todo ampliamente documentadas por Winer (17) en sus trabajos con gatos.

Referente a las áreas Te 2.1 Te. 2.2 y Te 3 del conejo, observamos que sus conexiones recíprocas, aunque existen, no son tan intensas, y hay una disparidad manifiesta entre la proyección córtico-geniculada, que es muy intensa (8, 10), y la genículo-cortical, que es escasa y restringida a la porción ventral (Vv) de la subdivisión ventral del NGM.

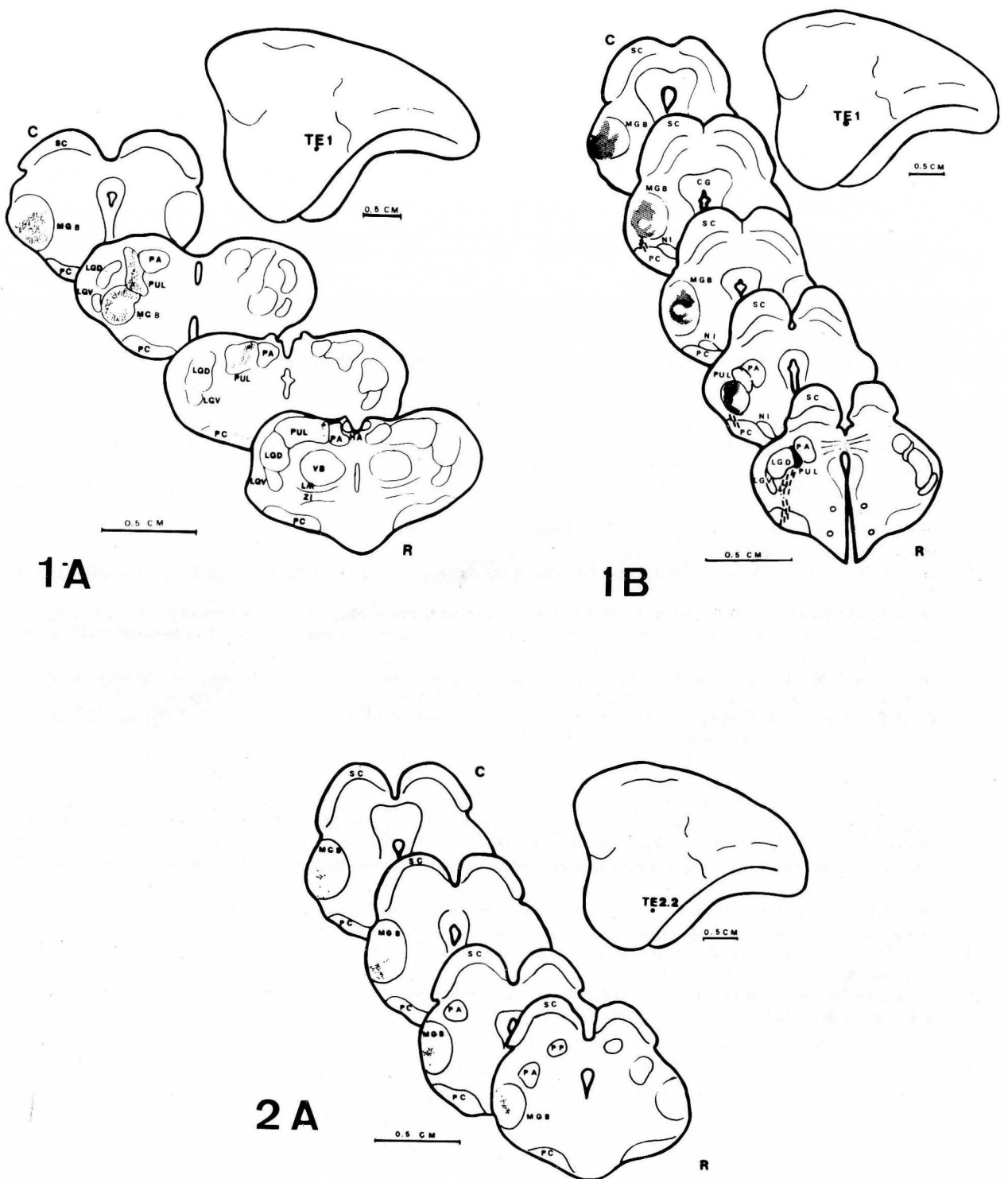
En cuanto a la reciprocidad a nivel del núcleo Pulvinar, ya Trojanowsky (16) describe en el squirrel monkey este hecho, utilizando HRP y Leucina (^3H) combinadas. Nosotros encontramos la reciprocidad del n. pulvinar con el área Te 1 del córtex del conejo. En cuanto a las áreas Te 2 y Te 3, la proyección córtico-tálamica es manifiesta e intensa, pero en nuestro material la proyección tálamo-cortical no se ha podido estudiar en estas áreas, puesto que la porción más ventral del tálamo no se estudió con técnicas de peroxidasa. Queda, por tanto, completar un estudio más detallado de estas regiones.

BIBLIOGRAFIA

1. AITKIN, L. M.; W.R. WEBSTER (1972): "Medial geniculate body of the cat: Organization and responses to tonal stimuli of neurons in ventral division". *J. Neurophysiol.* **35**: 365-380.
2. AITKIN, L.M. (1973): "Medial geniculate body of the cat: Responses to tonal stimuli of neurons in medial division". *J. Neurophysiol.* **36**: 275-283.
3. AITKIN, L. M.; M. B. CALFORD; C.E. KENYON; W. R. WERSTER (1981): "Some facets of the organization of the principal division of the cat medial geniculate body. In *Neuronal Mechanism of Hearing*". J. Syk. and L. M. Aitkin eds. p. 163-181 Plenum Press; New York.
4. ANDERSEN and cols. (1980): "The thalamocortical and corticothalamic connections of AI, AII and the anterior auditory (AAF) in the cat: Evidence for two largely segregated systems of connections". *J. Comp. Neurol.* **194**: 663-701.
5. BURTON and cols. (1976): "The posterior thalamic regio and its cortical projection in new world and old world monkeys". *J. Comp. Neurol.* **168**: 249-302.
6. CALFORD, M. B. (1983): "The parcellation of the medial geniculate body of the cat. Defined by the auditory response properties of single units". *J. of Neuroscience*, vol. 3, nº **11**, pp. 2350-2364.
7. CALFORD, M. B. and L.M. AITKIN (1983): "Ascending projections to the medial geniculate body of the cat: Evidence for multiple, parallel auditory pathways through thalamus". *J. of Neuroscience*, vol. 3, nº **11**, pp. 2365-2380.
8. DIAMOND, I. T.; CHOW K. L.; NEEF W. D. (1958): "Degenerations of caudal medial geniculate body following cortical lesions ventral to auditory area II in cat". *J. Comp. Neurol.* **109**: 349-362.
9. FLEISCHHAUER, K. and cols. (1980): "A revised cytoarchitectonic map of the neocortex of the rabbit". *Anat. Embryolog.* Berlin **161**: 121-143.
10. FITZPATRICK, K. A. and T. J. IMIG (1978): "Projections of auditory cortex upon the thalamus and midbrain in the owl monkey". *J. Comp. Neurol.* **177**: 537-556.
11. GERHARD (1968): "Atlas des Mittel und Zwischenhirns des Kaninchens". Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
12. MESULAM, M. M. (1978): "Tetramethyl Benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents". *J. of Histochem. and Cytochem.* vol. 26, pp. 106-117.
13. MESULAM, M. M. and D. L. ROSENE, (1978): "Sensitivity in horseradish peroxidase Neurohistochemistry: A comparative and quantitative study of nine methods". *J. of Histochemistry and Cytochem.*, vol. 27, nº **3** pp. 763-773.
14. OLIVER, D. L. and W. C. HALL (1978): "The medial geniculate body of the tree shrew: tupaia glis. I. Cytoarchitecture and midbrain connections". *J. Comp. Neurol.* **182**: 423-459.
15. OLIVER, D. L. and W. C. HALL (1978): "The medial geniculate body of the tree shrew. Tupaia glis. II Connections with the neocortex". *J. Comp. Neurol.* **182**: 459-493.
16. TROJANOWSKY and JACOBSON (1975): "A combined horseradish peroxidase-autoradio-graphic investigation of reciprocal connections between superior temporal gyrus and Pulvinar in Squirrel Monkey". *Brain Research*, **85**, pp. 347-353.
17. WINER, J. A.; I. T. DIAMOND and RACZKOWSKY (1978): "Subdivisions of the auditory cortex of the cat: The retrograde transport of horseradish peroxidase to the medial geniculate body and posterior thalamic nuclei". *J. Comp. Neurol.* **176**: 387-418.
18. WINER, J. A. and D. K. MOREST (1983): "The neuronal architecture of the dorsal division of the medial geniculate body of the cat. A study with the Rapid Golgi Methods". *J. Comp. Neurol.*, vol. 221, nº **1**, pp. 1-30.
19. —" The medial division of the medial geniculate body of the cat. Implications for thalamic organization". *J. of Neuroscience*, vol. 13, nº **12**, pp. 2629.
20. —(1984): "Axons of the dorsal division of the medial geniculate body of the cat. A study with the rapid Golgi method". *J. Comp. Neurol.* **224**: 344-370.

Correspondencia: Carmen Martínez Ciriano
 Dpto. Ciencias Morfológicas
 Facultad de Medicina
 C/ Domingo Miral s/n
 50009 ZARAGOZA

CG	Sustancia gris central	NI	Sustancia negra	PUL	Pulvinar
HA	Habénula	OT	Tracto óptico	RN	Núcleo rojo
LGD	Geniculado lateral dorsal	PA	N. Pretectal anterior	SC	Coículo superior
LGV	Geniculado lateral ventral	PP	N. Pretectal posterior	VB	Ventro basal
LM	Lemnisco medial	PC	Pedúnculo cerebral	ZI	Zona incerta
MG	Geniculado medial				



- FIGURA 1A** Reconstrucción en cortes seriados rostrocaudales del tálamo de un animal cuyo lugar de inyección de peroxidasa (HRP) se localiza en Te 1 del córtex temporal, señalando con punteado la localización de las neuronas marcadas en el NGM y en el Núcleo Pulvinar.
- FIGURA 1B** Reconstrucción en cortes seriados como en la Figura 1a; el lugar de inyección de leucina tritiada se localiza en Te 1, señalando con sombreado oscuro los terminales axónicos a nivel del NGM y N. Pulvinar.
- FIGURA 2A** Igual que Fig. 1a. Lugar de inyección en Te 2.2.

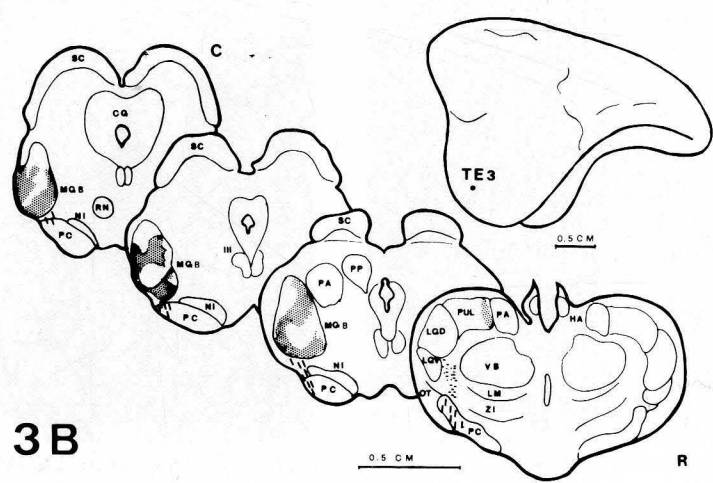
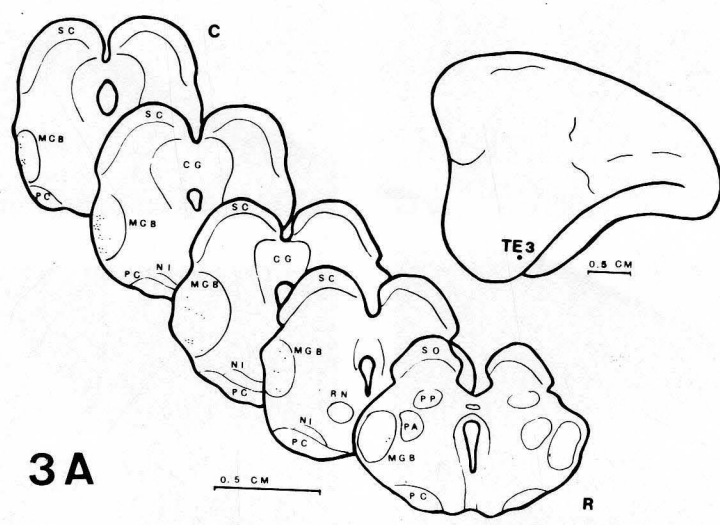
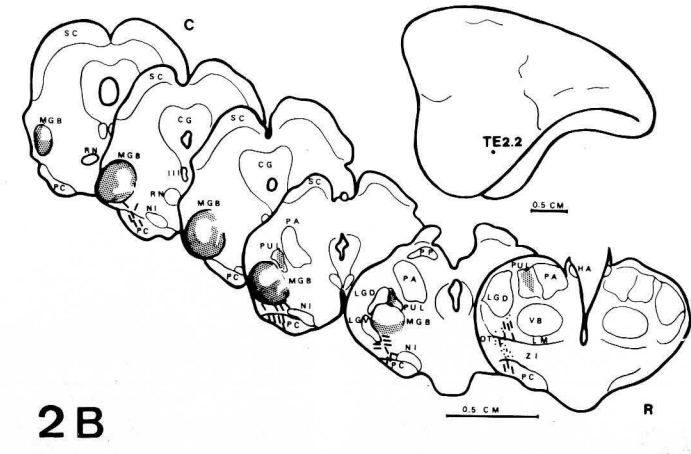
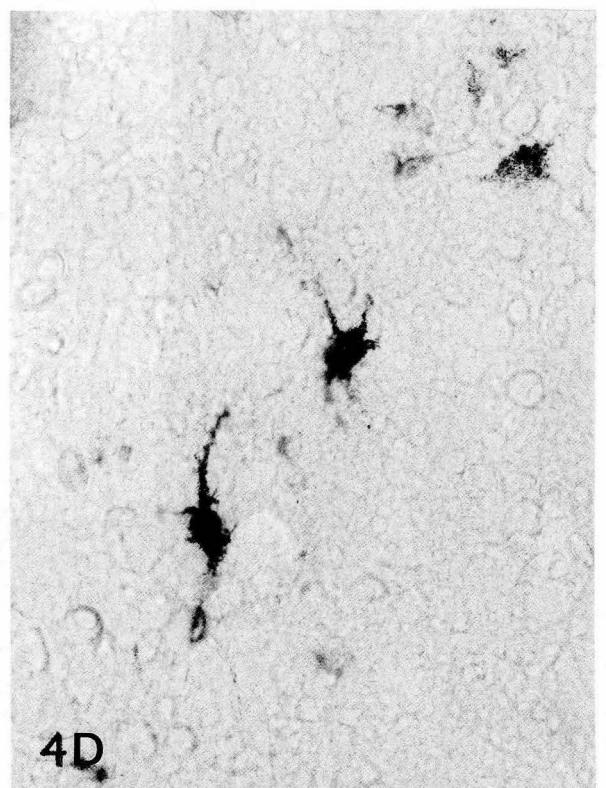
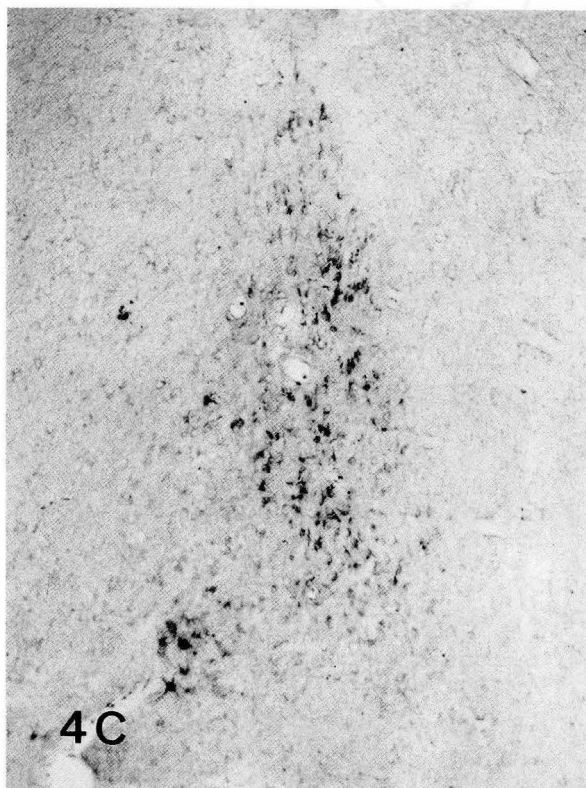
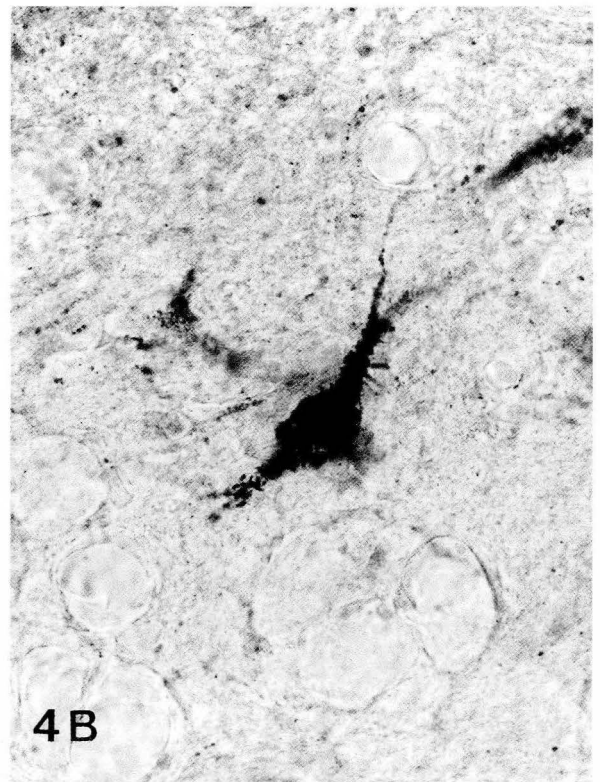
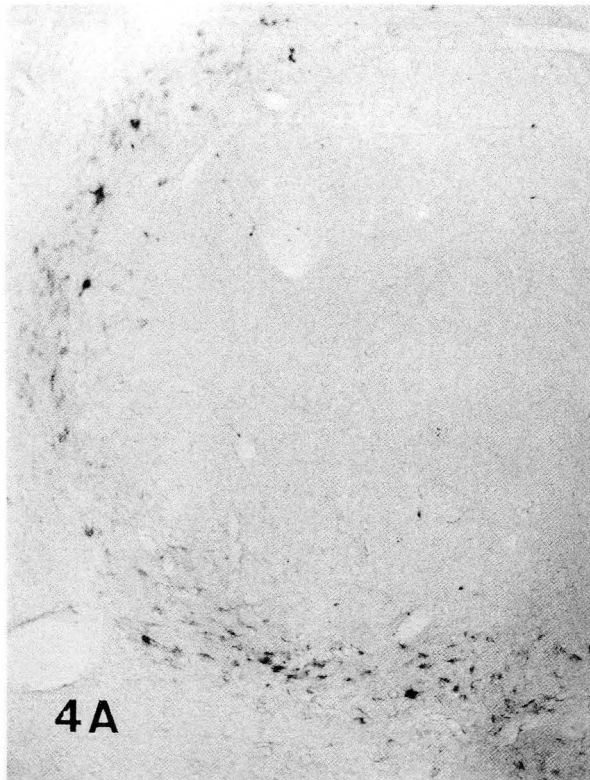


FIGURA 2B Igual que Fig. 1b. Lugar de inyección en Te 2.2.
 FIGURA 3A Igual que Fig. 1a. Lugar de inyección en Te 3.
 FIGURA 3B Igual que Fig. 1b. Lugar de inyección en Te 3.



- FIGURA 4A.** Microfotografía donde se observan células marcadas con peroxidasa en el NGM.
FIGURA 4B. Aumento de un campo de la Fig. 4A, donde se aprecia una célula del NGM.
FIGURA 4C. Microfotografía del n. pulvinar, donde se observan las células marcadas.
FIGURA 4D. Detalle de la Fig. 4C. Neurona marcada del N. Pulvinar.

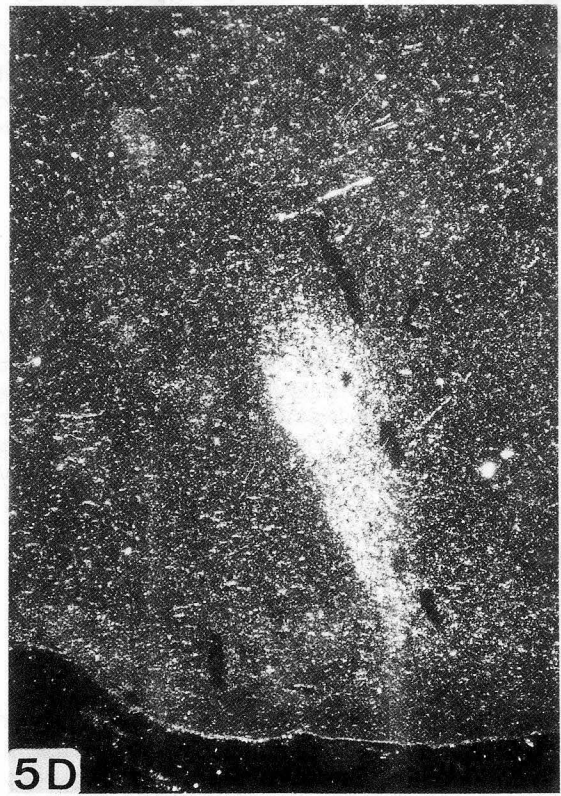
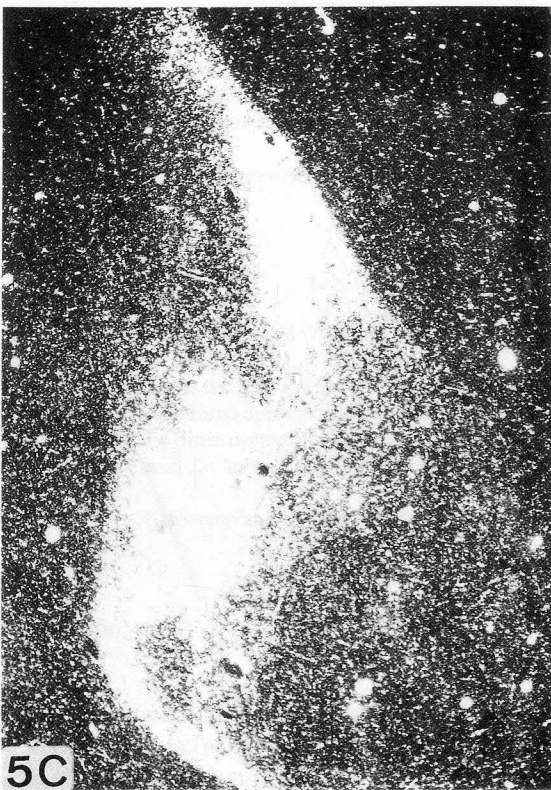
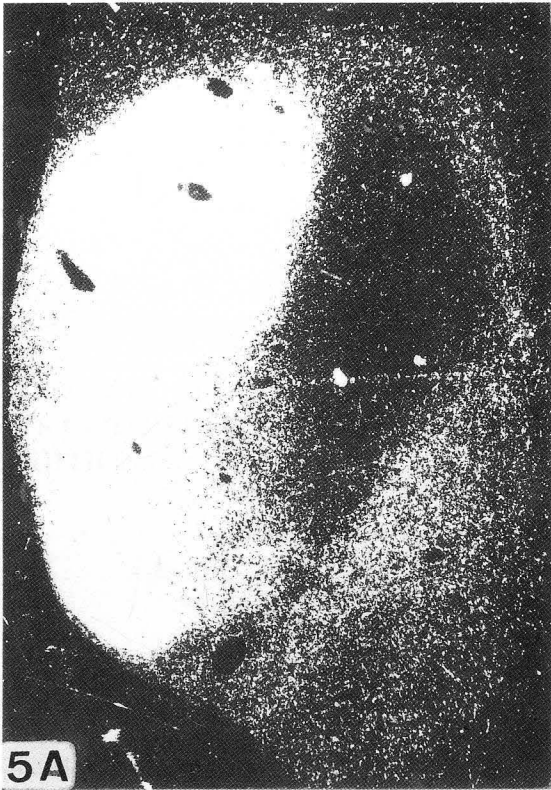


FIGURA 5A. Fotografía del n. Genuculado Medial con marcado autorradiográfico (porción caudal).
 FIGURA 5B. Igual que Fig. 5A. Porción intermedia del NGM.
 FIGURA 5C. Igual que Fig. 5A. Porción rostral del NGM.
 FIGURA 5D. Igual que Fig. 5A. Núcleo Pulvinar.

ESTUDIO HISTOENZIMOLOGICO DE LA ACTIVIDAD L.D.H. EN EL CEREBELO DEL POLLO (*Gallus domesticus*, L.) EN DIFERENTES CONDICIONES FISICOQUIMICAS

HISTOENZYMOLOGICAL STUDY OF THE L.D.H. ENZYME ACTIVITY IN THE CHICKEN'S CEREBELLUM (*Gallus domesticus*, L.) IN DIFFERENT PHYSICAL AND CHEMICAL CONDITIONS

G. MORATALLA, M. ROSETY y F.J. FERNANDEZ TRUJILLO

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Universidad de Cádiz. España.

RESUMEN

Se estudió la actividad Lactato deshidrogenasa (L- Lactato: NAD⁺ oxidorreductasa. 1.1.1.27) en cortes de cerebelo de pollo (*Gallus domesticus*, L.), en distintos estadios de su desarrollo, así como en el animal adulto, en diversas condiciones fisicoquímicas. Como punto de partida se empleó la técnica de la sal de tetrazolio de Lodja (1979). A partir de los resultados obtenidos con este método, las condiciones fisicoquímicas se modificaron para obtener las condiciones óptimas de detección de la actividad LDH en el cerebelo del pollo. Fue considerado el papel de activadores como la dinitrofenilhidracina e inhibidores como la urea y la acetona. Por otra parte se estudió el efecto de ciertos metales pesados como el Mg²⁺ y el Zn²⁺ en forma de cloruros.

PALABRAS CLAVE: Histoenzimología, cerebelo

SUMMARY

The activity of the Lactate dehydrogenase (L- Lactate: NAD⁺ oxidoreductase 1.1.1.27) was studied in sections of chicken's cerebellum (*Gallus domesticus*, L.), at several stages of its development, as well as in the adult stage, in different physical and chemical conditions. As a starting point the tetrazolium salt of Lodja (1979) technique, the physical and chemical conditions were modified to obtain the most appropriated conditions for the detection of the LDH activity in the chicken's cerebellum. The role of activators like the dinitrophenylhydrazine and inhibitors like urea and acetone; on the other hand, the effect of certain heavy metals like Mg²⁺ and Zn²⁺ in the form of chlorides was studied.

KEY WORDS: Histoenzymology, cerebellum

Introducción

La importancia que la LDH tiene en el metabolismo de los órganos del sistema nervioso es considerable, pues, siendo la glucosa la fuente de energía de dichos órganos, la existencia de la enzima supone un aporte adicional de glucosa a partir del lactato sanguíneo por vía de la gluconeogénesis.

No obstante, los estudios y resultados histoquímicos pueden variar enormemente dependiendo de la metodología empleada, de tal suerte que muchos autores han hecho hincapié en este tema. Así, Burstone (1958) realiza un estudio del efecto de la fijación en la determinación histoquímica de enzimas hidrolíticas. Novikoff y Masek (1958) estudian, así mismo, el efecto de la fijación con formol-calcio en la determinación de la actividad LDH. Friede y col.

(1963) realizan un mapeo de enzimas en el cerebelo teniendo en cuenta los aspectos metodológicos. En 1977, Hardonk y col. estudiaron la influencia de la fijación y el tratamiento con tampones en la actividad de diversas enzimas, ya que los iones que contienen muchos tampones pueden actuar como inhibidores de algunas enzimas.

Tóledano y Martínez Rodríguez (1977) realizaron un estudio del papel de los fijadores en la determinación de algunas enzimas en el cerebelo de la rata. Otro grupo de autores como Altman (1971-72-76) Butcher (1971) Pearse (1972) Andersen y Hoyer, la importancia de la metodología. Los últimos realizaron un estudio extenso sobre aspectos metodológicos en la histoquímica de ciertas deshidrogenasas en el cerebelo de la rata.

Más recientemente González de Canales y col. (1986) han publicado un estudio del comportamiento de la fosfatasa alcalina en diferentes condiciones fisicoquímicas, en neutrófilos de peces.

Así pues, nosotros hemos estudiado la actividad LDH en cortes de cerebelo de pollo en diferentes condiciones fisicoquímicas, con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de determinación histoquímica de la actividad de dicha enzima para este animal, ya que disponemos de células grandes (células de Purkinje) frente a extensas estructuras neuropilares (capa molecular).

Material y Métodos

Se ha elegido el cerebelo del pollo recién nacido y adulto para nuestro estudio. Los ejemplares fueron sacrificados por decapitación realizándose bloques de 3-5 mm. de sección sagital. Las piezas fueron incubadas en mezcla de HOLT durante 48 horas. Después del lavado, efectuado a 4°C, las piezas fueron rociadas con freón e incluidas en el medio de congelación, realizándose cortes de criomicrotomo de 10 μ m de espesor, a una temperatura de -15 C.

Las primeras incubaciones se hicieron siguiendo como técnica base el método de la sal de tetrazolio de Lodja (1965). Como control se incubó sin el coenzima (NAD⁺) y para la inhibición del tipo M se empleó acetona al 50% y urea 3M. La determinación de la actividad enzimática se hizo por un sistema semicuantitativo, empleando como órgano test el hígado, al cual se le asignó la máxima actividad.

En una segunda etapa, pasamos a modificar las condiciones fisicoquímicas del método con objeto de encontrar las condiciones óptimas de detección para el órgano motivo de estudio. El efecto del pH fue comprobado con medios de incubación tomados de la técnica base, tamponándolos a 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9. Con el pH óptimo obtenido (entre 7.2-7.5) se estudió el efecto de la temperatura en dos vertientes. En primer lugar aplicamos temperaturas desde 25°C hasta 90°C añadiendo el medio de incubación inmediatamente después de depositar las preparaciones en la estufa, con lo cual pretendíamos acelerar el tiempo de obtención de la actividad máxima por medio de altas temperaturas en poco tiempo. En segundo lugar hicimos pretratamientos de varios minutos en baños de temperaturas desde 30°C a 70°C y posterior incubación para explorar el grado de termolabilidad de la enzima.

El estudio de la influencia de la concentración de sustrato ([S]) se hizo a pH óptimo y a temperatura óptima, oscilando las concentraciones entre 2mM, 4mM, 7mM, 10mM, 20mM, 40mM, 70mM y 90mM. La influencia del tiempo de incubación se estudió entre los 5 min. y 12 horas.

Como activadores se emplearon el cloruro de magnesio a bajas concentraciones y la dinitrofenilhidracina al 0.1%. El Mg²⁺ se empleó como inhibidor a altas concentraciones, así como el cloruro de cinc. Como inhibidores del tipo M de las cadenas que forman las isoenzimas de la LDH se emplearon la urea 3M y la acetona al 50%.

Resultados

1. Efecto del pH

Los cortes incubados a pH=6 mostraron una débil actividad de la enzima en las células de Purkinje, y muy débil en el resto de las estructuras, tanto en el adulto como en el recién nacido.

A pH=6.5 aparece una débil actividad en las células de Purkinje, capa molecular y neuronal de la sustancia blanca, manteniéndose muy débil en la capa de granos. Los resultados también fueron paralelos en el recién nacido y adulto.

En los cortes incubados a pH=7, encontramos en el cerebro del recién nacido una moderada actividad en las células de Purkinje, así como en la molecular y neuronas de la sustancia blanca. La capa de granos mostró actividad intermedia entre débil y moderada. En cambio, en el adulto interpretamos actividades moderadas en las células de Purkinje y neuronas de la sustancia blanca, entre débil y moderada en la capa molecular y débil en la capa de granos.

Con valores de pH entre 7.2.-7.5 obtuvimos resultados semejantes. Tanto en recién nacido como en adulto encontramos la máxima actividad en las células de Purkinje y neuronas de la sustancia blanca. La capa molecular y la capa de granos mostraron actividad entre moderada y máxima.

A partir de pH=8 comenzó a decrecer la actividad en todas las estructuras, llegando a registrarse actividades muy débiles con valores de pH=8.5.-9.

2. Efecto de la temperatura

Hemos observado que temperaturas moderadamente más altas que las referidas en la técnica de origen, producen la reacción máxima a menor tiempo, el cual no debemos sobrepasar, pues aparece con gran frecuencia difusión de los productos de reacción. A temperaturas altas (entre 60-70°C) puede encontrarse un aparente aumento de la actividad, debido a la difusión, impidiendo la valoración del patrón enzimático.

Cuando sometíamos los cortes a un pretratamiento con baños de agua a temperaturas crecientes, los resultados son diferentes. Aquí la inactivación de la enzima se produce antes de que pueda reaccionar con el medio de incubación. En los pretratamientos entre 37-38°C la actividad se conservó íntegra y máxima, mientras que a 60°C no existía actividad alguna. Conviene reseñar una disminución del contraste de actividad entre las células de Purkinje y las capas vecinas en el pollo recién nacido.

3. Efecto de la concentración de sustrato

Con concentraciones de lactato del orden de 2mM la actividad fue negativa en todas las estructuras. A 4mM se observó una debilísima actividad en el recién nacido, pero sin ningún patrón enzimático evidenciable, en tanto que en el adulto apenas se observó actividad.

Cuando el medio de incubación tenía una concentración de sustrato de 7mM encontramos una débil actividad en todas las capas del córtex del recién nacido. Para el adulto la actividad enzimática detectada fue muy débil en todas las estructuras.

A 10mM se registró actividad máxima en ambas edades y en todas las estructuras, intensidad que se mantuvo a 20mM en el recién nacido, mientras que en el adulto bajó discretamente en las capas molecular y de granos.

A partir de 40mM los resultados varían según las capas del córtex. Así en la capa de células de Purkinje la actividad decreció muy poco a 40mM, manteniéndose así hasta 90mM. Las capas molecular y granulosa mostraron cambios absolutamente paralelos. Así a 40mM decrecieron muy poco ambas actividades, bajando más de 50 a 70mM hasta estabilizarse en una intensidad débil. Es decir, la actividad decreció más en dichas capas que en la de células de Purkinje. Las neuronas de la sustancia blanca y de los núcleos cerebelosos siguieron la misma evolución que las células de Purkinje.

4. Efecto del tiempo de incubación

En las condiciones óptimas obtenidas hasta el momento, se estudió la actividad LDH en el cerebro del pollo, programando diferentes tiempos de incubación.

A los cinco minutos no se observó actividad alguna en ambas edades. Una débil actividad en las células de Purkinje y neuronas de la sustancia blanca se observó a los diez minutos, mientras que en las capas molecular y de granos la actividad fue muy débil. Esta intensidad se mantuvo después de veinte minutos.

Transcurridos treinta minutos desde el inicio de la incubación, las células de Purkinje y neuronas de la sustancia blanca y núcleos mostraban una actividad que se aproximaba al máximo. El resto de las estructuras daban una actividad moderada.

A los cuarenta y cinco minutos se obtuvo el máximo de actividad en las células de Purkinje y neuronas de la sustancia blanca y núcleos. En la molecular y granulosa se observó actividad de moderada a intensa. Estas actividades se mantuvieron a los sesenta minutos sin difusión apreciable.

A partir de este punto comenzó a aparecer la difusión y así a los noventa minutos parecía haber más actividad global, hecho que se debía exclusivamente a la difusión de los productos de reacción.

5. Estudio de activadores e inhibidores

La inhibición del tipo M con acetona al 50% mostró paradójicamente un aumento de la actividad. Esto podría deberse al efecto fijador de la acetona que impediría que parte de la enzima escapase al medio de incubación.

En cambio, con urea 3M se observó un cambio de la actividad de las capas molecular y granular en el sentido de una disminución hasta actividad débil. Sin embargo, las células de Purkinje y las neuronas de la sustancia blanca mantienen su nivel de actividad casi al máximo.

Al añadir dinitrofenilhidracina al medio de incubación (concentración=0.1%) comprobamos un efecto activador, más patente en las estructuras que menos actividad mostraban "per se".

En cuanto a los metales, el Mg^{++} actuó como activador a las concentraciones referidas en la técnica de Lodja, pero a altas concentraciones se mostró como un inhibidor. El Zn^{++} demostró un marcado efecto inhibidor a todas las concentraciones empleadas.

Discusión

En 1978, Contestabile y Andersen estudiaron diversas enzimas (succinato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa), valorando la influencia de diversos factores en la intensidad de las mismas, en el cerebelo de la rata. Algunos datos de interés son estudiados para la LDH: por ejemplo, al emplear urea 3M se obtiene una disminución de la actividad más significativa en la capa de granos, seguida por la molecular y la capa de células de Purkinje, lo que concuerda con nuestros hallazgos en el cerebelo del pollo. Por otro lado consideran que el empleo de la acetona conlleva un efecto fijador, impidiendo que parte de la enzima escape al medio de incubación, hecho éste que hemos comprobado en el pollo cuando probamos la acetona al 50% como inhibidor del tipo M. Estos autores encontraron que los tipos H y M de las cadenas que componen las diferentes isoenzimas de la LDH, coexistían en las tres capas corticales, siendo prevalente el tipo H. El tipo M alcanzaba su nivel más alto en los glomérulos sinápticos (capa de granos), seguido por las estructuras de la capa molecular y en último término en las células de Purkinje, lo que concuerda con los resultados que obtuvimos con la inhibición del tipo M con urea 3M. En este sentido, pensamos que el estudio histoquímico de las diversas isoenzimas podría apoyarse en métodos fisicoquímicos. Por último, ellos no encuentran actividad en la glía de Bergman de la rata, hecho discordante con nuestros hallazgos en el pollo.

Hemos desarrollado nuestro trabajo al igual que lo hicieran González de Canales y cols. El efecto de la fijación, si bien ha sido estudiado por varios autores, como hemos mencionado al principio, no lo contemplamos, pues normalmente obtenemos buenos resultados con muestras no fijadas, con lo cual pretendemos evitar en lo posible la interferencia de factores externos innecesarios.

Como puede comprobarse, pocos son los autores que recogen en sus trabajos las modificaciones de las condiciones fisicoquímicas para comprobar si están trabajando en condiciones óptimas. Así nosotros, que partimos de la técnica de la sal de tetrazolio de Lodja, hemos obtenido, en el cerebelo del pollo, mejores resultados modificando algunas de las condiciones de la técnica patrón.

Habida cuenta de los resultados obtenidos, para el cerebelo del pollo proponemos reajustar el método inicial de Lodja a las siguientes condiciones:

- Temperatura de incubación: 40°C
- Tiempo de incubación: 45-60 minutos
- Concentración de sustrato: 20-40 mM
- pH óptimo: 7.2-7.4.

Como conclusiones finales, después de la aplicación del método de Lodja reajustado destacamos:

- la actividad LDH es mayor en las células de Purkinje, glia de la sustancia blanca y neuronas de los núcleos, encontrando igualmente intensa actividad en la glia de Bergman.
- en la capa molecular se aprecia moderada actividad para hacerse máxima en algunas arterias terminales y en las dendritas de las células de Purkinje.
- en la granulosa la mayor actividad se localiza a nivel de los glomérulos sinápticos, siendo mínima en los granos.

Agradecemos a A.E. Rosety Plaza y M.T. Fernández Llebrez su colaboración técnica en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- ALTMAN F.P. (1976): "Tetrazolium salts and formazan". Prog. Histochem. Cytochem. **9**: 1-56.
- ANDERSEN, H.; HOYER, P.E. (1974): "Simplified control experiments in the histochemical study of coenzyme-linked dehydrogenase". Histochemistry. **38**: 71,83.
- ANDERSEN, H.; CONTESTABILE, A. (1977): "The pyridine nucleotide and non-pyridine nucleotide dependence of L-glutamate dehydrogenase in the histochemical system". Histochemistry **53**: 117-133.
- ARVI, L. (1966): "Cerebellar enzymology" Int. Rev., Cytol. **20**: 277-359.
- BRODY, I.A. (1964): "Isoenzyme histochemistry: A new method for the display of selective lactate dehydrogenase isoenzymes or an electrophoretic pattern". Nature **201**: 685-687.
- BRUMBERG, V.A. (1976): "Cyto photometric determination of the ratio of the main isoenzymatic forms of lactate dehydrogenase in the neuron neuroglia units in different functional states of the nervous system". Tsitología **18 (4)**: 494-498.
- BURSTONE, M.S. (1958): "The relationship between fixation and technique for the histochemical of hydrolytic enzymes". J. Histochem. Cytochem. **6**: 322-339.
- BUTCHER, R.G. (1971): "Tissue stabilization during histochemical reaction: the use of collagen polypeptides". Histochemie. **28**, 231-235.
- CONTESTABILE, A. and ANDERSEN, H. (1978): "Methodological aspects of the histochemical localization and activity of some cerebellar dehydrogenases". Histochemistry **56/2**: 117-132.
- FRIEDE, R.L.; FLEMING, L.M. and KNOLLER, M. (1963): "A comparative mapping of enzymes involved in hexose monophosphate shunt and citric cycle in the brain". J. Neurochem. **10**: 263-277.
- FRIEDE, R.L.; FLEMING, L.M. and KNOLLER, M. (1963): "A quantitative appraisal of enzyme histochemical methods in brain tissue" J. Histochem. Cytochem. **11**: 232-245.
- GONZALEZ DE CANALES; M.L.; SARASQUETE, M.C.; BLASCO, J. y GUTIERREZ, M. (1986): "Caracteres fisicoquímicos de la fosfatasa alcalina del granulocito neutrófilo de *Halobatrachus didactylus*, S (1801) (Teleostei: Halobatrachidae). Inv. Pesq. **50 (2)**: 227-236.
- HARDONK, M.J.; HAARSMA, T.J.; DIJKHUIS, F.W.J. et al (1977) "Influence of fixation and buffer treatment on the release of enzymes from the plasma membrane". Histochemistry **54/1**: 57-66.
- HENDERSON, B. (1982): "The sensitivity to light solutions of phenazine methosulphate: A quantitative cytochemical study". Histochem. J. **14/4**: 649-653.
- IJIMA, K. (1977): "Histochemical studies on the morphology of the Golgi apparatus and on the distribution of some enzymes concerned with carbohydrates metabolism in the rat cerebellum". Acta Histochem. (Jena) **58/1**: 163-186.
- JOHNSON, M.K. and WITTAKER, V.P. (1963): Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain". Biochem. J. **88**: 804-809.
- LOJDA, A.; GOSSRAU, R. and SCHIEBLER, T.H. (1979): "Enzyme Histochemistry. A laboratory Manual". Springer Verlag. Berlin. Heidelberg.
- MARKOV, R.M. (1977): "Histochemistry of glucose-6-phosphate and lactate dehydrogenases in nerve cells of chick embryo". Arch. Anat. Gistol. Embryol. **72/5**: 50-52.
- McMILLAN, P.J. (1967): "Differential demonstration of muscle and heart type lactic dehydrogenase of rat muscle and kidney". J. Histochem Cytochem. **15**: 21-31.

- NOVIKEFF, A.B. and ARASE, M.M. (1958): "The intracellular localization of lactic dehydrogenase studies by biochemical and staining methods". *J. Histochem. Cytochem.* **6**: 397-000.
- NOVIKOFF, A.B. and MASEK, B. (1958): "Survival of lactic dehydrogenase and DNP-H-Diaphorase activities after formal calcium fixation". *J. Histochem. Cytochem.* **6**: 21-000.
- PEARSE, A.G.E. (1980): *Histochemistry. Theoretical and applied.* Edited by Churchill, Livingstone 4th Ed.
- TEWARI, H.B. and BOURNE, G.H. (1962): "Histochemical studies on the histochemical distribution of oxidative enzymes in the cerebellum of the rat". *J. Histochem.* **10**: 619-627.
- THOLEY, G.; ROTH-SCHECHTER, B.F. and MANDEL, P. (1980): "Development of glial cells in primary cultures: Energy metabolism and lactate dehydrogenase isoenzymes". *Neurochem. Res.* **5/8**: 847-854.
- THOMAS, G. and PEARSE, A.G.E. (1961): "The fine localization of dehydrogenases in the nervous system". *Histochemie* **2**: 266-282.
- TOLEDANO, A. and MARTINEZ RODRIGUEZ, R. (1977): "Some data of the role of the fixation toward the histochemical activity of some enzymes in the cerebellum". *Cell. Mol. Biol.* **22/3-4**: 395-406.
- ZIVKOVIC, R.V. and DKIROCOC, B.M. (1975): "Regional distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in adult rat and brain". *Experientia (Basel)* **31(11)**: 1258-1260.

G. MORATALLA

Dept. de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Universidad de Cádiz. España

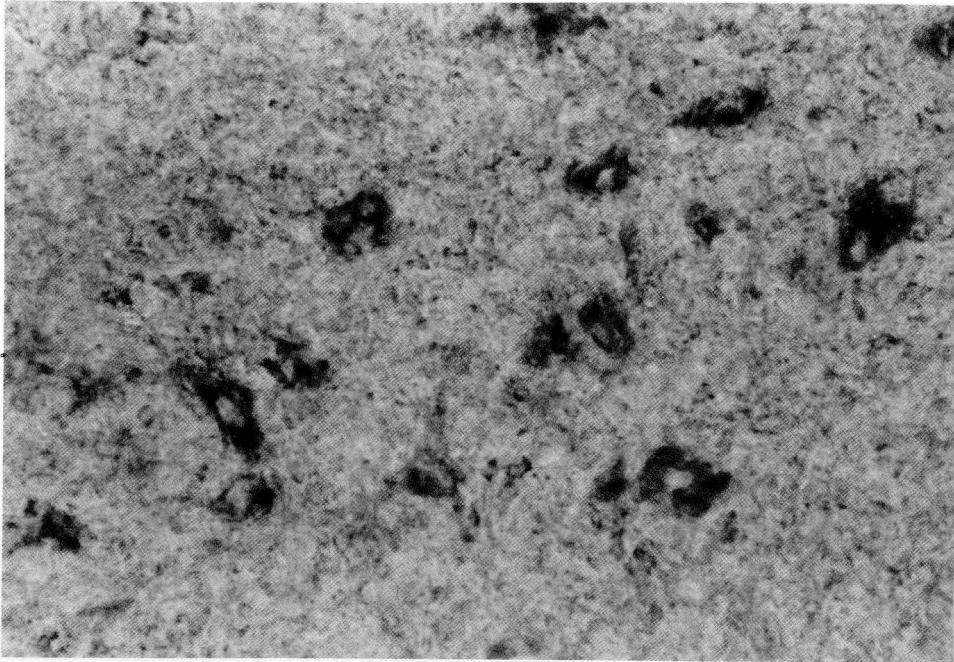


FIGURA 1. Cerebelo pollo recién nacido. Células de la sustancia blanca. L.D.H. pH =7.

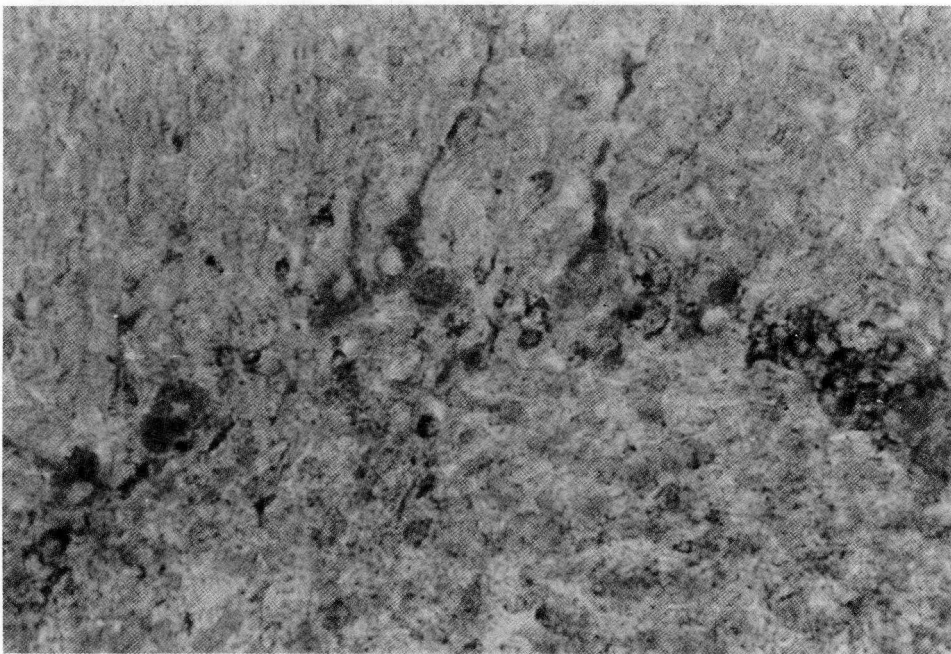


FIGURA 2. Cerebelo pollo adulto. Córtex y glía de Bergman. L.D.H.

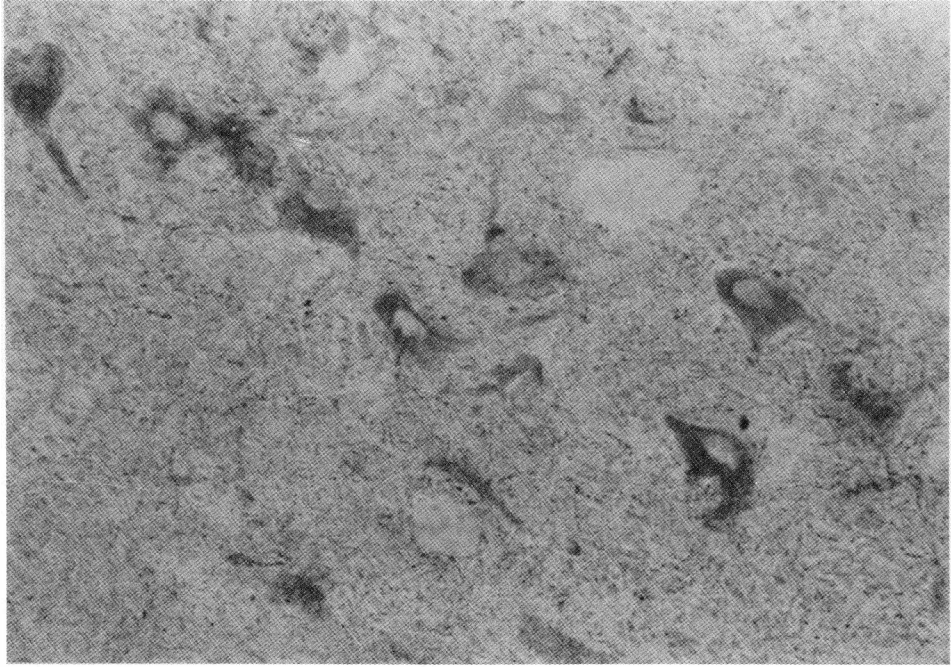


FIGURA 3. Cerebelo de pollo recién nacido. Células nucleares. Determinación. Condiciones óptimas.

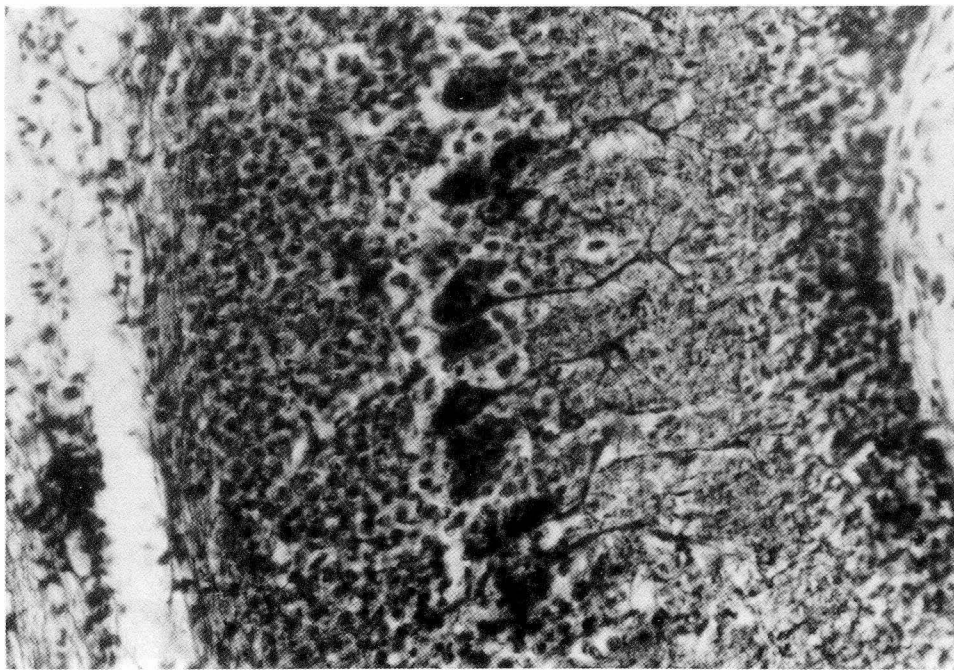


FIGURA 4. Cerebelo de pollo adulto. Impregnación argéntica de Fitzgerald.

APORTACION AL ESTUDIO CITOENZIMOLOGICO DE LA VAGINA

CONTRIBUTION TO THE HISTOENZYMATIC STUDY OF THE VAGINA

J. L. NIETO Y A. M^a TORRES

Dpto. Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en el epitelio vaginal de la rata blanca con algunas técnicas histoenzimáticas (fosfatasa alcalina, ácida, glucosa-6- fosfatasa, ATP-asa, LDH, SDH y NAD). Se demuestra positividad en todos los estratos vaginales, sobre todo en los profundos. El estudio forma parte de una investigación más extensa que intenta establecer un modelo de los principales ciclos metabólicos durante el ciclo normal de la vagina.

PALABRAS CLAVE: Epitelio vaginal, enzimas.

SUMMARY

Presentation of the results obtained in the vaginal epithelial of the white rat with various histoenzymatic techniques (alkaline phosphatase, acid phosphatase, G-6-P-ase, ATP-ase, LDH, SDH and NAD). Positive reactions are exhibited in all vaginal layers, particularly in deep ones. The study forms a part of a more extense investigation that attempts to establish a model of the principal metabolic cycles during the normal cycle of the vagin.

KEY WORDS: Vagina, Histochemistry.

Introducción

La citoenzimología vaginal intenta describir el comportamiento fisiológico y patológico de este órgano a través de la localización celular de sus actividades metabólicas. Los primeros estudios se inician con la aplicación del método de Gomori (7) para la localización de fosfatasas alcalinas. Los resultados iniciales de estas investigaciones fueron muy contradictorios, señalando Gerard (6) que, mientras autores como Matter (13) no encuentran actividad fosfatásica en vagina, hay otros como Sani, Lang, Rakoff y Gross (10) que describen su actividad en estas células.

Tampoco hay acuerdo al señalar el momento de máxima actividad fosfatásica, que coincide para Sani (19) con la fase folicular del ciclo, mientras los restantes autores citados la observan durante la fase progestacional y durante el embarazo. Trabajos posteriores de Botella y Nogales (2), Kazimierz (9), Herovici (8), Fortak y Mazenka (5), Cymeris (4), Celener (3) y Trimboli (21) han confirmado la presencia de fosfatasa alcalina en los estratos vaginales.

La fosfatasa ácida ha sido estudiada por Matter (13). Esta es positiva en las células basales y débil en los estratos parabasal y porción más profunda del intermedio. Para este autor la máxima actividad se encuentra en la zona central del estrato vaginal medio, desde donde disminuye en dirección a las células más superficiales.

En fecha reciente Trimboli (21), ampliando investigaciones de Estévez, Balbiani y Rossi (1), ha estudiado en vagina y exocervix la presencia de algunas fosfatasas específicas, señalando para la glucosa-6-fosfatasa y para la ribosa-5-fosfatasa una actividad superior a la encontrada para diversas ATP-*asas* alcalinas. Entre las fosfatasas ácidas específicas de las células vaginales, Celener (3) ha descrito la presencia de fosfoamidasa.

Entre las carboxi-éster-hidrolasas, Lencioni (11) tras recabar información de Fishman y Mitchel (5) confirma la presencia de lipasa en estas células, si bien limita su actividad a las más superficiales. Otras hidrolasas, estudiadas por Trimboli (21) en exocervix, tales como la leucil y la alanilaminopectidasa y la β -glucuronidasa, no presentan actividad en estas células. Otra hidrolasa, la fosforilasa, ha sido descrita por Lencioni (11) en las células vaginales.

Diversas deshidrogenasas demuestran actividad en el epitelio vaginal. Rua y Cabrini (18) señalan la presencia de succinodeshidrogenasa en las células vaginales más profundas. También Celener (3) destaca esta actividad enzimática en las capas basal, parabasal e intermedia de la vagina, coincidiendo con Lencioni en que los estratos superficial y de Dierks carecen de esta actividad. Trimboli (21) describe además la actividad de otras deshidrogenasas en vagina y exocervix, señalando intensa actividad de la lactodeshidrogenasa, de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y de la 6-fosfogluconatodeshidrogenasa; la succinodeshidrogenasa demuestra una actividad moderada, y la malicodeshidrogenasa, bastante débil. La misma autora estudia otras oxirreductasas, encontrando intensa positividad del NAD, menor de NADPH y falta de actividad de monoaminoxidasa.

Material y Métodos

En este trabajo hemos utilizado quince ratas blancas, en diversos momentos del ciclo estral, a las que hemos extirpado todo el bloque genital bajo anestesia etérea. Inmediatamente hemos congelado estos tejidos con nitrógeno líquido ($-1\ \mu 60^{\circ}$) con el fin de preservar todos los componentes enzimáticos del tejido. Los cortes de cada órgano, los hemos realizado a $10\ \mu\text{m}$ en un microtomo de congelación Frigomobil Jung. Una vez seleccionados los cortes se procedió a la investigación de diferentes enzimas (fosfatasas alcalina y ácida, G-6-P, ATP-*asa*, LDH, SDH y NAD) según las técnicas recomendadas por Pearse (16) y por Martínez R. (12). En cada animal hemos realizado además coloraciones histológicas de rutina (hematoxilina-eosina).

Resultados

A. Hidrolasas

La fosfatasa alcalina inespecífica presenta escasa actividad en el epitelio vaginal de la rata blanca. La máxima actividad la hemos encontrado en el estrato intermedio (grado ++). La fosfatasa ácida, por el contrario, demuestra una gran actividad en las células de la capa profunda (grado +++), perdiendo la reacción intensidad conforme ascendemos a los estratos más superficiales, a cuyo nivel la actividad enzimática es mínima (grado +).

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-P) presenta actividad en todas las células vaginales. La coloración marrón que aparece en los lugares con actividad enzimática adquiere su máxima intensidad en los estratos intermedio y superficial de la vagina (grado ++). La actividad de las células profundas es más discreta (grado +).

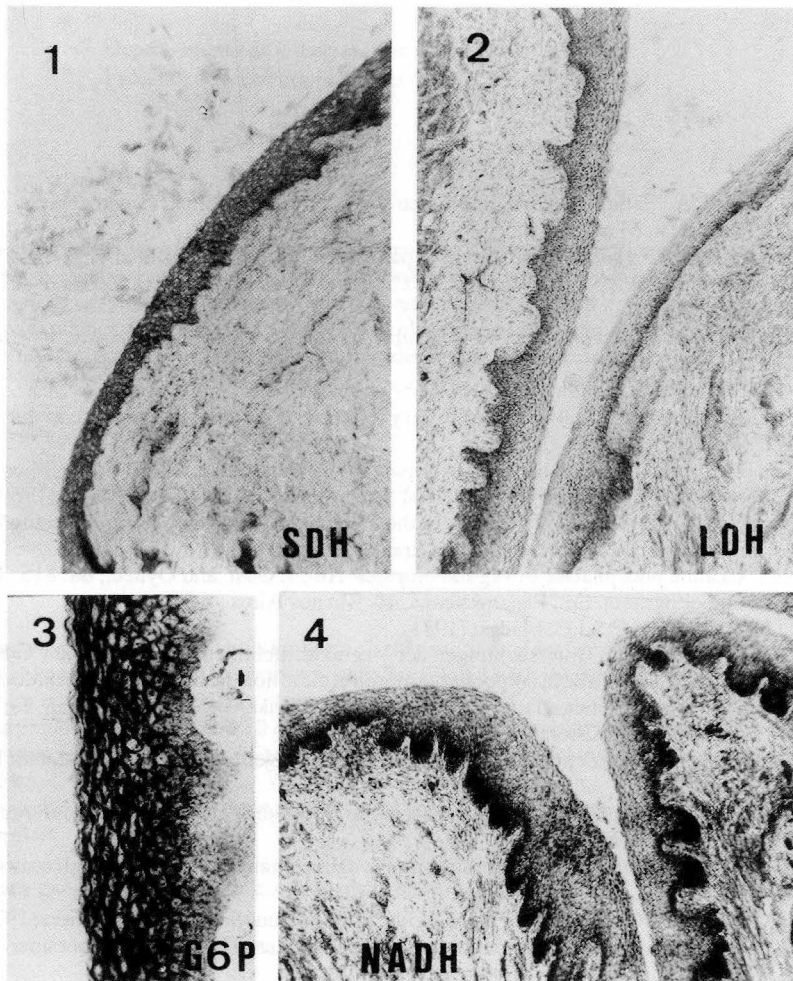
La adenosintrifosfatasa alcalina (ATP-*asa*) también está presente en estas células. Según nuestro estudio, su actividad es similar en los diferentes estratos de la mucosa vaginal (grado ++).

B. Oxirreductasas

La actividad de la lacticodeshidrogenasa (LDH) es máxima en las células vaginales del estrato profundo (grado ++). Las células del estrato superficial o funcional, aunque más activas que las intermedias, no alcanzan la coloración de las profundas (grado +).

La succinodeshidrogenasa (SDH) posee una actividad muy intensa en todas las células de la vagina (grado +++). Esta actividad no varía de intensidad en los diferentes estratos de la mucosa vaginal.

Por último, la reacción demostrativa de NAD colorea a las células profundas más intensamente (grado +++), que a las intermedias y superficiales (grado ++).



Discusión

Esta investigación histoenzimológica de la vagina intenta complementar nuestros estudios anteriores, dedicados a demostrar en las células vaginales la presencia de diversos principios inmediatos (Nieto, 14, 15). Los resultados expuestos indican que algunas hidrolasas y oxirreductasas desarrollan una intensa actividad en el epitelio vaginal, actividad que se acentúa en las capas más profundas del órgano (células basales y parabasales), donde se aprecian precipitados de sulfuro de amonio o de formazan bastante manifiestos. Sólo la glucosa-6-fosfatasa, demuestra a este nivel una actividad enzimática más discreta.

En general, estos resultados confirman la actividad enzimática hasta ahora reseñada en las células vaginales. Sólo la localización de succinodeshidrogenasa en la capa superficial de la vagina discrepa de las localizaciones anteriores (18, 3). Señalemos por último que los datos presentados en este trabajo sólo constituyen una primera aportación a este tema, lo que, unido a la escasa bibliografía publicada, dificulta de momento la interpretación funcional de estos resultados histoquímicos. Confiemos en que podamos despejar estas incógnitas y podamos adentrarnos en el estudio de los diversos ciclos metabólicos que ocurren en las células vaginales. La fisiología y la patología de este órgano serán mejor comprendidas entonces.

BIBLIOGRAFIA

1. BALBIANI, R. y ROSSI, A.: Estudio histoenzimológico comparado de endometrio, ectocervix y endocervix. I Congreso Mundial de Patología cervical. Mar del Plata (1972).
2. BOTELLA, J. y NOGALES, F.: Actas de la Soc. Esp. para el Estudio de la Fertilidad. **3**: 5 (1955).
3. CELENER, D.: Histoquímica del tubo uterovaginal. En Citología ginecológica de G. Terzano y C. Ghinelli. Panamericana, **122**. Buenos Aires (1974).
4. CYMERIS, Z.: Zachowanie sie fosfatazy zasa doweig substancyu PAS w blonie sluv zowec w przwiegu cyxlu miesiaczkowego ciazzy. Endoc. Pol. **17**: 5 (1966).
5. FISHMAN, W. y MITCHEL, G.: Studies on vaginal enzymologie. Ann. of N.Y. Acad. of Science, **83** (1959).
6. GERARD, G.: La citología vaginal en el ciclo menstrual y sus caracteres histoquímicos. Actas del III Congreso Uruguayo de Tocogin. **1**: 421. (1960).
7. GOMORI, G.: The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. J. Cell Comp. Physiol. **17**: 71 (1941).
8. HEROVICI, C.: Histo and Cytochemistry of superficial and intermediate cell. Cytol., **4**: 54 (1960).
9. KAZIMIERS, D. y KOSPOROWSKA, J.: Increase of the alkaline phosphatase activity in vaginal epithelium cultures in vitro as a highly specific response ta oestradiol. Acta End. Suplm. **51**: 991 (1960).
10. LANG, W. y cols.: Alkaline phosphatase in vaginal biopsies. Am. J. Obst. and Gynec., **68**: 815 (1954).
11. LENCIONI, L.: El colpocitograma. Edt. Panamericana, **40**. Buenos Aires (1971).
12. MARTINEZ, R.: Histoquímica. C.S.I.C. Madrid (1981).
13. MATTER, R.: Über histochemistre Untersuchungen der Vaginalschleimhaut. Zeit Geburtsh. Gynäkol., **151**: 3 (1958).
14. NIETO, J.L.: Contribución al estudio de la colpocitoquímica en el ciclo normal de la mujer. Tesis doctoral. Zaragoza (1971).
15. NIETO, J.L.: Algunas consideraciones en torno a la citoquímica vaginal. Gaceta Méd. Bilbao, **73**: 639 (1976).
16. PEARSE, A.E.G.: Histochemistry. Churchill ed. London (1972).
17. ROSA, C. Y VELARDO, J.T.: Histochemical location of vaginal enzymes and mucines. Ann. of N.Y. Acad. of Science, **88**: 122, 159.
18. RUA, I. y CABRINI, R.: Distribución citoquímica de la succinodeshidrogenasa en los extendidos vaginales y cervicales. Bol. Soc. Obst. Gine., **39**: 389 (1961).
19. SANI, G.: Studio istochimico della fosfatasa alcalina, nella vagina umana in rapporto con gli ormoni sessuali. Quad. Clin. Obst. Gin., **7**: 247 (1952).
20. TERZANO, G. y GHINELLI, G.: Citología ginecológica. Edit. Panamericana. Buenos Aires, 1974.
21. TROMBOLI, O.: Importancia de la citoenzimología en clínica humana. III Congreso Iberamer. Citología. Santiago de Compostela, 1981. Inédito.

Correspondencia: Dr. José L. Nieto Amada
Dpto. de Ciencias Morfológicas
Universidad de Zaragoza

DIFERENCIAS EN EL DESARROLLO DE LOS GANGLIOS CILIARES *IN VITRO* DEPENDIENTES DEL SUBSTRATO Y DE LA EDAD. I. COLAGENO

DIFFERENCES ON THE DEVELOPMENT *IN VITRO* OF CILIARY GANGLIA DEPENDENT OF THE SUBSTRATUM AND AGE. I. COLLAGEN

F. PADILLA, F. PUERTA y M. BUSTOS

Departamento de Ciencias Morfológicas.
Facultad de Veterinaria Universidad de Córdoba

RESUMEN

Hemos estudiado el comportamiento de los explantos de ganglios ciliares de embriones de pollo de 7, 8, 10, 12, 14 y 15 días, cultivados *in vitro* sobre colágeno. La emisión y génesis de células no neuronales están relacionadas con la edad, y a mayor edad embrionaria, menor es el desarrollo neurítico observado así como la capacidad para unirse al substrato.

Cuando cultivamos explantos ganglionares de 7, 8 y 10 días observamos un mismo patrón de desarrollo neurítico, comenzando por la emisión de neuritas ramificadas que posteriormente se unen entre sí en las zonas próximas a los explantos. En los explantos de 12, 14 y 15 días no se observa la fasciculación de las neuritas.

En las coronas de crecimiento hemos identificado tres tipos celulares de diferente morfología y que suponemos corresponden a neuronas, células de glía y fibroblastos y similares.

PALABRAS CLAVE: Ganglio ciliar, cultivo de tejidos, substrato de colágeno, embrión de pollo.

SUMMARY

We have studied *in vitro* the behavior of chick embryo ciliary ganglia explant from 7, 8, 10, 12, 14 and 15 days old on a collagen substratum. The emission and genesis of non neuronal cells are related with the age, and at major embryo age, poorer neuritic development and ability to bind the substratum is observed.

When the ganglia explants from 7, 8 and 10 days are cultivated, we observe an only one neuritic development model, wich beginning by the emission of branch neurites that subsequently join near the explants. On the 12, 14 and 15 days old explants we did not observe this fact.

On the growth halo, we have identified three morphological cells types wich we suppose correspond to neurons, glial cells and fibroblast and similars.

KEY WORDS: Ciliary ganglion, tissue culture, collagen substratum, chick embryo.

Introducción

En el desarrollo del sistema nervioso tiene una gran importancia el estudio de las relaciones que se establecen entre las neuronas y las células no neuronales, así como las interacciones de estos tipos celulares con la matriz extracelular. Para el estudio de estas relaciones se recurre frecuentemente a las técnicas de cultivos *in vitro*, ya que las placas de

cultivo constituyen sistemas cerrados que Jordano (15) denominó neuroecosistemas, éstas son más accesibles que el organismo completo y es posible mantener unas condiciones relativamente simples y controladas.

La supervivencia neuronal y emisión de neuritas por las neuronas ganglionares en cultivo dependen principalmente de dos factores, que son el substrato utilizado para el cultivo y el aporte de agentes extrínsecos, como son los factores neurotróficos y las glicoproteínas que componen la matriz extracelular [Davis et al. (10) y Hammarback et al. (13)].

Belford et al. (4), Ebendal et al. (11), Henderson et al. (14) y Lindsay et al. (17) encuentran que la mayoría de los extractos de tejidos contienen factores neurotróficos, Lindsay et al. (17) encuentran que la concentración de estos factores no es constante sino que varía con la edad. Varon et al. (24) encontraron que las neuronas de los ganglios ciliares (GC) podían sobrevivir *in vitro* y emitir neuritas, con una combinación de suero y extractos de embrión de pollo. Posteriormente Tuttle et al. (23) encontraron que para estas neuronas cultivadas *in vitro* el extracto de pollo era esencial, teniendo el suero un efecto beneficioso; así mismo estos autores encontraron que las células no neuronales que forman el GC incrementan la supervivencia de las neuronas en cultivo.

Las células no neuronales no solo influyen sobre la supervivencia neuronal, ya que Roufa et al. (21) en sus estudios sobre el ganglio cervical superior de rata hallaron que las células no neuronales tienen una gran influencia sobre el desarrollo neurítico.

Letourneau (16) encuentra que el substrato sobre el que viven las neuronas es importante, ya que la firme adhesión al mismo incrementa la probabilidad de emisión de neuritas, así como su tamaño y número de ramificaciones.

El presente trabajo es el primero de una serie de dos con los que pretendemos estudiar la influencia de la edad y del tipo de substrato sobre el comportamiento de los ganglios ciliares en cultivo.

En el desarrollo embrionario la edad tiene una gran importancia, ya que los comportamientos celulares se modifican en relación con ésta; respecto al substrato también hay que considerar que posee una gran importancia, ya que si los substratos de cultivo presentan diferentes propiedades (el colágeno constituye un buen substrato natural para la adhesión de las células, aunque tiene una baja capacidad para fijar los factores neurotróficos, propiedad que sí presenta la poliornitina, aunque esta sea un substrato "artificial" [Bustos et al. (8)], es lógico el pensar que puedan influir en el comportamiento celular.

Material y Métodos

Hemos utilizado GC procedentes de embriones de pollo de 7, 8, 10, 12, 14 y 15 días de incubación. La extracción de los ganglios se realizó según la técnica de Bustos et al. (7).

Los GC de 7 y 8 días se cultivaron enteros, los de 10 días se cortaron en dos trozos y los de 12, 14 y 15 días en cuatro; con este procedimiento se facilita la adhesión de los ganglios de mayor edad y se evita el posible efecto negativo de la cápsula ganglionar sobre la emisión de células y neuritas [Roufa et al. (22)].

Se colocaron 5 ganglios o trozos en cada placa Petri para cultivo de tejidos de 35 mm de diámetro, previamente revestidas de colágeno obtenido según el método de Bornstein (6).

El medio de cultivo utilizado fue F¹² de Ham modificado por Spooner, suplementado con un 10% de suero de caballo y un 10% de extracto de embriones de pollo de 8 días de incubación, obtenido según la técnica descrita por Paul (19).

La incubación se realizó durante 14 días en una estufa para cultivos de tejidos a 37 °C con atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. Las observaciones se realizaron diariamente durante la primera semana de cultivo y cada 48 horas en la segunda semana; los cambios de medio se realizaron cada 5 días.

Los datos estudiados son los procedentes de las observaciones realizadas sobre los explantos que se adhirieron al substrato en dos días de cultivo contados a partir del día en el que se adhiere el primer explanto ganglionar, rechazándose los datos procedentes de los explantos que se adhieren posteriormente.

Los datos proceden de las observaciones realizadas como mínimo en 20 ganglios o trozos de éstos en cada experimento, llegando a los 40 trozos en las mayores edades estudiadas. Las mediciones se realizaron con oculares micrométricos, midiéndose los radios de las coronas de crecimiento. En cada medición se tomaron dos datos que hemos denominado radios mayor y menor.

Los datos se analizaron mediante la utilización del paquete de programas SAS (*Statistical Advanced System*) existente en el Centro de Cálculo de la Universidad de Córdoba.

Resultados

Ganglios ciliares de 7 días

Cuando cultivamos GC procedentes de embriones de pollo de 7 días de incubación, todos los ganglios se encuentran adheridos al sustrato a las 24 horas de cultivo y ha comenzado la emisión de neuritas y células ganglionares, que forman un anillo de crecimiento alrededor de los mismos. Los anillos observados son homogéneos, formados por neuritas ramificadas, cuyas porciones distales se encuentran en muchas ocasiones sobre el sustrato de cultivo; las células emitidas forman un tapiz homogéneo perdiéndose esta homogeneidad en las zonas más distales de las coronas de crecimiento.

En el 2º día de cultivo las neuritas se comienzan a observar unidas en su origen y ramificadas en las zonas más alejadas del ganglio (Fig. 2). En el 3º día, de cultivo se mantiene la morfología descrita anteriormente aunque el grado de unión de las neuritas se incrementa en las zonas próximas a los ganglios (Fig. 2) y todas las neuritas se encuentran situadas sobre las células de origen ganglionar. En el 4º día de cultivo se comienza a evidenciar la pérdida de las neuritas emitidas, proceso que llega al 87% de los ganglios estudiados en el 5º día de cultivo, día en el que parece estabilizarse la pérdida de éstas, manteniendo algunos ganglios neuritas remanentes hasta el 14º día de cultivo.

El radio de la corona de crecimiento (Fig. 1) se incrementa progresivamente desde el 1º día de cultivo hasta el 13º día, en el que se estabiliza el crecimiento. También hemos observado que el tapiz celular se encuentra formado por dos tipos celulares morfológicamente diferentes: unas células son alargadas de aspecto fusiforme, y otras, triangulares situadas generalmente en las proximidades de los ganglios; así mismo hemos observado a partir del 10º día de cultivo la presencia en los anillos de crecimiento de células redondeadas con los somas muy refringentes y que presentaban una morfología típica de neuronas.

Ganglios ciliares de 8 días

Los GC procedentes de embriones de pollo de 8 días de incubación solo se mantuvieron durante 7 días en cultivo; el comportamiento observado fue muy parecido al descrito para los ganglios de 7 días, con la salvedad de que desde el primer día de cultivo las neuritas se sitúan generalmente sobre las células procedentes de los explantos y que la pérdida de neuritas comienza a los 3 días de cultivo; no se observó ninguna neurita remanente a los 7 días de cultivo.

Ganglios ciliares de 10 días

Cuando cultivamos explantos ganglionares procedentes de embriones de pollo de 10 días observamos que el desarrollo neurítico y el grado de unión de las neuritas es menor que el observado en las edades anteriores; así mismo a partir de las 24 horas de cultivo, la práctica totalidad de las neuritas emitidas se sitúan sobre células ganglionares. La pérdida de neuritas comienza en el 3º día de cultivo, llegándose a la no observación de neuritas en el 79% de los ganglios estudiados a los 6 días de cultivo y al 100% a los 12 días. La presencia de células con morfología de neuronas (Fig. 3) se detectó a partir de los 4 días de cultivo.

También hemos observado, a partir de los 6 días de cultivo, la presencia en algunos anillos de crecimiento de zonas sin células; y a partir de los 8 días la presencia de unas formaciones celulares radiales que hemos denominado "cordones celulares" debido a que parecen cordones de células dispuestos radialmente y que se diferencian morfológicamente del aspecto general de las coronas de crecimiento.

Ganglios ciliares de 12 días

En los cultivos de explantos procedentes de ganglios de 12 días de edad encontramos que a las 24 horas de cultivo se han adherido el 60% de los explantos sembrados; todos presentan emisión de células y cortas neuritas (Fig. 3) aunque en algunos casos no llegan a formar una corona de crecimiento homogénea. En el 2º día de cultivo la proporción de explantos que se han adherido al sustrato y han emitido células y neuritas se eleva al 77%, manteniéndose esta proporción en el 3º día de cultivo.

En estos cultivos se observa un desarrollo neurítico escaso sin que se observe la unión de las neuritas, encontrándose las neuritas situadas sobre células ganglionares; aunque el desarrollo neurítico era escaso, al finalizar el tiempo de cultivo se observan los mayores radios de coronas de crecimiento (Fig. 1) junto con los medidos cuando cultivamos explantos procedentes de ganglios de 10 días, pero en este caso se observan dentro de las coronas de crecimiento zonas sin células. La pérdida de neuritas se comienza a observar a los 3 días de cultivo, no observándose ninguna neurita presente en los cultivos a los 5 días; así mismo a partir de los 4 días de cultivo se comienzan a observar en las coronas de crecimiento células con morfología de neuronas y a partir de los 8 días la presencia de "cordones celulares".

Ganglios ciliares de 14 días

Cuando cultivamos explantos ganglionares procedentes de embriones de 14 días de incubación, se adhieren al sustrato a las 24 horas de cultivo el 40% de los ganglios sembrados, de los que solamente un 10% han emitido células (que generalmente no forman una corona de crecimiento homogénea) y cortas neuritas, encontrándose éstas sobre las células ganglionares. En el 2º día de cultivo se han adherido el 54% de los explantos sembrados, de los que un 48% presentan una corona de crecimiento uniforme aunque poco densa en células y que crece por delante de las neuritas.

La pérdida de neuritas comienza a los 3 días de cultivo y no se observan neuritas a los 5 días. La presencia de células en las coronas de crecimiento con morfología de neuronas se comienza a observar a los 4 días de cultivo y la presencia de "cordones celulares" a los 8 días. En estos experimentos se observa el menor tamaño final de la corona de crecimiento, presentando las mismas zonas sin células. Los menores diámetros medidos corresponden a esta edad (Fig. 1).

Ganglios ciliares de 15 días

En los cultivos de explantos procedentes de GC de 15 días de edad observamos que a las 24 horas de cultivo solamente un 33% de los ganglios se encuentran adheridos al sustrato; estos explantos en su mayoría han emitido algunas células y pequeñas neuritas que se encuentran sobre ellas, pero no han formado una corona de crecimiento uniforme. A los 2 días de cultivo se han adherido al sustrato el 55% de los explantos sembrados y la mayoría han desarrollado una corona de crecimiento homogénea pero poco densa en células y con cortas neuritas que se comienzan a perder a los 3 días de cultivo y desaparecen totalmente el 4º día; a partir de este día se observan células con morfología de neuronas en las coronas de crecimiento.

'Estudio estadístico de los datos

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento GLM (*General Linear Models*). En el modelo planteado por nosotros las medidas realizadas (radios mayor y menor) dependían de la edad de los ganglios, del día de cultivo y de la interacción entre la edad y el día.

El resultado del análisis muestra que el modelo utilizado es óptimo, presentando una influencia altamente significativa la edad de los ganglios, el día de cultivo y la interacción entre estos dos factores. Para detectar entre qué edades existían diferencias significativas se aplicó la dócima de Tukey, mostrando que existen diferencias significativas entre todas ellas excepto entre 7↔12, 8↔12 y 14↔15 días.

Discusión

De los datos obtenidos se desprende que la emisión de células y el desarrollo neurítico están relacionados con la edad, y que a mayor edad embrionaria, menor es el desarrollo neurítico observado; estos datos son coincidentes con las observaciones de Argiro et al. (3) y Roufa et al. (21) realizadas sobre el crecimiento del ganglio cervical superior de rata, y las de Collins et al. (9) realizadas sobre el ganglio ciliar de pollo.

Adler et al. (1) encuentran que, para los GC procedentes de embriones de pollo de 8 días (cultivados en presencia del factor neurotrófico ciliar), existe una correlación entre la emisión de células ganglionares y la emisión de neuritas, observando que en las primeras 24 horas de cultivo no hay emisión de células y neuritas y que las neuritas crecen sobre las células emitidas previamente. Nosotros bajo nuestras condiciones de cultivo sí observamos la emisión de células y neuritas a las 24 horas de cultivo, coincidiendo con estos autores en que el crecimiento neurítico se encuentra asociado al de las células no neuronales. Solamente cuando cultivamos ganglios de 7 días observamos que el primer día de cultivo las neuritas crecen en general por delante de las células emitidas; creemos que este hecho puede ser debido a la gran potencialidad que poseen los ganglios de esta edad para desarrollar sus neuritas.

Cuando cultivamos ganglios o explantos procedentes de embriones de 7, 8 y 10 días observamos un mismo patrón de crecimiento neurítico, que comienza con la emisión de neuritas ramificadas que posteriormente se van uniendo en las zonas próximas a los ganglios; esta unión se asocia a la presencia en la superficie de las neuritas de la molécula de adhesión celular (CAM) y para Argiro et al. (3) es el resultado de una baja tasa de crecimiento neurítico. En los cultivos de explantos de 12, 14 y 15 días no se observa la fasciculación de las neuritas; creemos que este hecho es debido al bajo desarrollo neurítico obtenido con estas edades.

El hecho de que las neuritas crezcan asociadas a las células no neuronales plantea la cuestión de que estas células sean consideradas (i) como mero soporte físico, lo que coincidiría con la hipótesis de Adler et al. (1), según la cual los factores promotores de neuritas no se unen al substrato de colágeno, pero sí se podrían depositar sobre la superficie de las células no neuronales, o bien (ii) como agentes que interactúan con las neuritas, posibilidad coincidente con las observaciones de Roufa et al. (22).

La pérdida evidente de neuritas en todas las edades estudiadas, excepto en una (7 días), comienza al tercer día de cultivo; cuando se cultivan explantos procedentes de GC de 7 días esta pérdida comienza a ser evidente el 4º día de cultivo, aunque, debido a la no realización de medidas cuantitativas, la pérdida de neuritas pudo comenzar anteriormente.

Tanto si la pérdida de neuritas comienza al 3º como el 4º día, la coincidencia en todas las edades nos sugiere que este hecho pudo estar motivado por las condiciones de cultivo, o, bien, que unido al proceso de pérdida de neuritas parte de ellas quedaran enmascaradas por la proliferación de las células no neuronales, que en algunos casos formarían lo que nosotros hemos denominado cordones celulares, estos cordones estarían constituidos por una cubierta celular en cuyo interior se situarían las neuritas. Este modelo nos ayudaría a explicar las observaciones realizadas sobre la pérdida de neuritas en las diferentes edades estudiadas, ya que los explantos de 7, 8 y 10 días presentan unas coronas de crecimiento muy homogéneas y compactas, lo que dificulta la observación de las neuritas.

Si presuponemos que la pérdida de neuritas está relacionada con el desarrollo obtenido y con la edad de los explantos, cuando cultivamos GC de 12, 14 y 15 días (los de menor desarrollo) la pérdida sería temprana (entre el 4º y 5º día), sin embargo en los explantos de 7, 8 y 10 días la pérdida sería tardía, o bien se conservarían (en forma no evidente) durante todo el tiempo de cultivo.

En las observaciones realizadas hemos encontrado células con morfología de neuronas; estas mismas células fueron encontradas por Alcaín et al. (2) cultivando GC y ganglios de la raíz dorsal de embriones de pollo, evidenciando la emisión de neuritas por las mismas. La emisión de estas neuronas fuera de los explantos puede ser (i) mecánica, es decir, ser arrastradas por las células que salen de los explantos, o bien (ii) asociada a las células que proceden de éstos.

Respecto a los dos tipos morfológicos encontrados de células no neuronales, Rohrer et al. (20) informan de la existencia en los GC de dos poblaciones de células no neuronales, una de ellas constituida por las células de glía y la otra formada por los fibroblastos y células similares; si aplicamos esta clasificación a las observaciones realizadas, podríamos pensar que las células que presentan un aspecto fusiforme corresponden a los fibroblastos y las triangulares a las células de glía.

También hemos observado la pérdida de la capacidad de adhesión al substrato conforme se incrementaba la edad de los ganglios. Este efecto puede estar motivado por cambios en las características adhesivas de los explantos. Gundersen et al. (12) encuentran que la adhesión de los conos de crecimiento de las neuritas al substrato es debida a sustancias producidas y segregadas por los ganglios. Pensamos que estas sustancias también podrían participar en la adhesión de los explantos al substrato.

BIBLIOGRAFIA

1. ADLER, R. and VARON, S. (1981): Neuritic guidance by nonneuronal cells of ganglionic origin. *Develop. Biol.* **86**: 69-80.
2. ALCAIN, F.J. y BUSTOS, M. (1978): Diferencias en el crecimiento entre ganglios ciliares y ganglios de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados. *Trab. Inst. Cajal.* **70**: 39-46.
3. ARGIRO, V. and JOHNSON, M.I. (1982): Patterns and kinetics of neurite extension from sympathetic neurons in culture are age dependent. *J. Neurosci.* **2**: 503-512.
4. BELFORD, D.A. and RUSH, R.A. (1983): A survival factor for sympathetic neurons from avian smooth muscle. *Develop. Brain Res.* **6**: 304-307.
5. BENNETT, M.R. and NURCOMBE, V. (1979): The survival and development of cholinergic neurons in skeletal muscle conditioned media. *Brain Res.* **173**: 543-548.
6. BORNSTEIN, M.B. (1958): Reconstituted rat-tail collagen used as a substrate for tissue cultures on coverlips in Maximov slides and roller tubes. *Lab. Invest.* **7**: 134-137.
7. BUSTOS, M.; ALCAIN, F.J.; NIÑO, F. y JORDANO, D. (1979): Influencia de distintos medios cardio-condicionados sobre cultivos celulares de ganglio ciliar de embrión de pollo. *Arch. Zootec.* **28**: 271-284.
8. BUSTOS, M.; PADILLA, F. y ALCAIN, F.J. (1981): Rendimientos del colágeno, poliornitina (tipos: IB, IIB y IC) y colágeno más poliornitina IB, como substratos para el cultivo de ganglios ciliares disociados de embrión de pollo. *Arch. Zootec.* **30**: 297-306.
9. COLLINS, F. and LEE, M.R. (1982): A reversible developmental change in the ability of ciliary ganglion neurons to extend neurites in culture. *J. Neurosci.* **2**: 424-430.
10. DAVIS, G.E.; MANTHORPE, M. and VARON, S. (1985): Parameters of neuritic growth from ciliary ganglion neurons *in vitro*: influence of laminin, schwannoma polymithine-binding neurite promoting factor and ciliary neurotrophic factor. *Develop. Brain Res.* **17**: 75-84.
11. EBENDAL, T.; STROMBERG, I.; OLSON, L. and SEIGER, A. (1985): Parasympathetic neurotrophic activity in the rat iris: determination after different denervations. *Neurosci.* **16**: 181-185.
12. GUNDERSEN, R.W. and BARRETT, J.N. (1984): Neurite growth cone-substratum adherence increases *in vitro*. *Develop. Brain Res.* **12**: 21-26.
13. HAMMARBACK, J.A.; PALM, S.L.; FURCHT, L.T. and LETOURNEAU, P.C. (1985): Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorber laminin. *J. Neurosci. Res.* **13**: 213-220.
14. HENDERSON, C.E.; HUCHET, M. and CHANGEUX, J.P. (1984): Neurite-promoting activities for embryonic spinal neurons and their developmental changes in the chick. *Develop. Biol.* **104**: 336-347.
15. JORDANO, D. (1979): Cultivos de neuronas de ganglios ciliares de embrión de pollo sobre poliornitina. *Arch. Zootec.* **28**: 201-220.
16. LETOURNEAU, P.C. (1975): Possible roles for cell-to-substratum in neuronal morphogenesis. *Develop. Biol.* **44**: 77-91.
17. LINDSAY, R.M. and TARBIT, J. (1979): Developmentally regulated induction of neurite outgrowth from immature chick sensory neurons (DRG) by homogenates of avian or mammalian heart, liver and brain. *Neurosci. Lett.* **12**: 195-200.
18. McLENNAN, I.S. and HENDRY, I.A. (1978): Parasympathetic neuronal survival induced by factors from muscle. *Neurosci. Letters.* **10**: 269-273.
19. PAUL, J. (1970): Cell and tissue culture. Ed. Livingstone, Great Britain.
20. ROHRER, H. and SOMMER, I. (1983): Simultaneous expression of neuronal and glial properties by chick ciliary ganglion cells during development. *J. Neurosci.* **3**: 1683-1693.
21. ROUFA, D.G.; JOHNSON, M.I. and BUNGE, M.B. (1983): Influence of ganglion age, nonneuronal cells and substratum on neurite outgrowth in culture. *Develop. Biol.* **99**: 225-239.
22. ROUFA, D.; BUNGE, M.B.; JOHNSON, M.I. and CORNBROOKS, C.J. (1986): Variation in content and function of non-neuronal cells in the outgrowth of sympathetic ganglia from embryos of differing age. *J. Neurosci.* **6**: 790-802.
23. TUTTLE, J.B.; SUSZKIW, J.B. and ARD, M. (1980): Long-term survival and development of dissociated parasympathetic neurons in culture. *Brain Res.* **183**: 161-180.
24. VARON, S.; MANTHORPE, M. and ADLER, R. (1979): Cholinergic neurotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res.* **173**: 29-45.

VALORES DE LOS RADIOS DE LAS CORONAS DE CRECIMIENTO

<i>Edad</i>	<i>Día</i>	<i>R. mayor</i>	<i>R. menor</i>	<i>Edad</i>	<i>Día</i>	<i>R. mayor</i>	<i>R. menor</i>		
7 días	1	1,205	1,095	8 días	1	1,071	0,944		
	2	2,076	1,885		2	3,099	2,875		
	3	3,929	3,586		3	3,874	3,468		
	4	4,025	3,598		4	4,305	3,919		
	5	5,217	4,382		5	5,183	4,596		
	6	5,176	4,661		6	5,594	4,911		
	7	6,284	5,515		7	6,206	5,391		
	8	6,516	5,832						
	10	7,491	6,727						
	12	9,050	8,084						
	14	9,058	8,081						
	<hr/>								
	<i>Edad</i>	<i>Día</i>	<i>R. mayor</i>		<i>R. menor</i>	<i>Edad</i>	<i>Día</i>	<i>R. mayor</i>	<i>R. menor</i>
	10 días	1	1,662		1,527	12 días	1	1,207	1,021
2		2,929	2,599	2	1,850		1,537		
3		4,046	3,895	3	2,765		2,348		
4		4,672	4,174	4	3,129		2,591		
5		5,347	4,855	5	4,269		3,352		
6		5,772	4,954	6	4,463		3,719		
7		6,275	5,556	7	5,619		4,855		
8		7,435	6,625	8	6,083		5,964		
10		8,498	7,866	10	8,077		6,932		
12		9,701	8,755	12	9,746		8,719		
14		11,960	10,712	14	12,155		10,121		
<hr/>									
<i>Edad</i>		<i>Día</i>	<i>R. mayor</i>	<i>R. menor</i>	<i>Edad</i>		<i>Día</i>	<i>R. mayor</i>	<i>R. menor</i>
14 días		1	0,869	0,790	15 días		1	-----	-----
	2	1,354	1,160	2		1,204	1,115		
	3	1,577	1,398	3		1,303	1,039		
	4	1,990	1,607	4		2,018	1,756		
	5	2,560	1,899	5		2,539	2,099		
	6	3,288	2,616	6		3,365	2,959		
	7	3,705	2,825	7		3,818	3,404		
	8	4,747	4,187	8		5,942	5,424		
	10	5,628	5,180	10		8,342	7,552		
	12	7,116	6,194	12		8,666	7,678		
	14	8,005	7,485	14		10,035	8,654		

FIGURA 1. Medias en milímetros de los valores obtenidos en las mediciones realizadas sobre los explantos cultivados



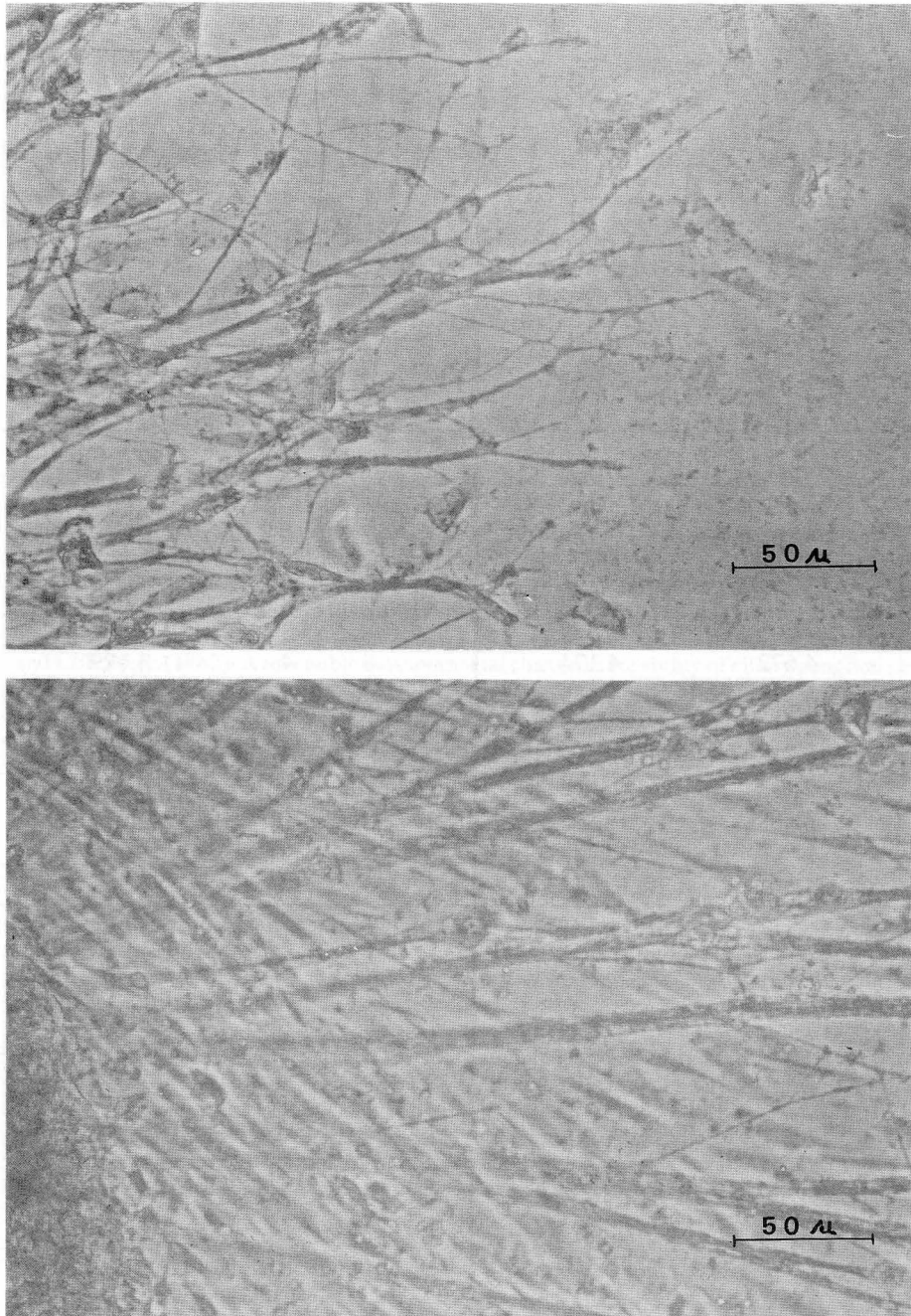


FIGURA 2. Cultivos *in toto* de GC procedentes de embriones de pollo de 7 días de edad. a: aspecto de las porciones terminales de las neuritas a los dos días de cultivo. b: zona próxima al explanto a los tres días de cultivo.

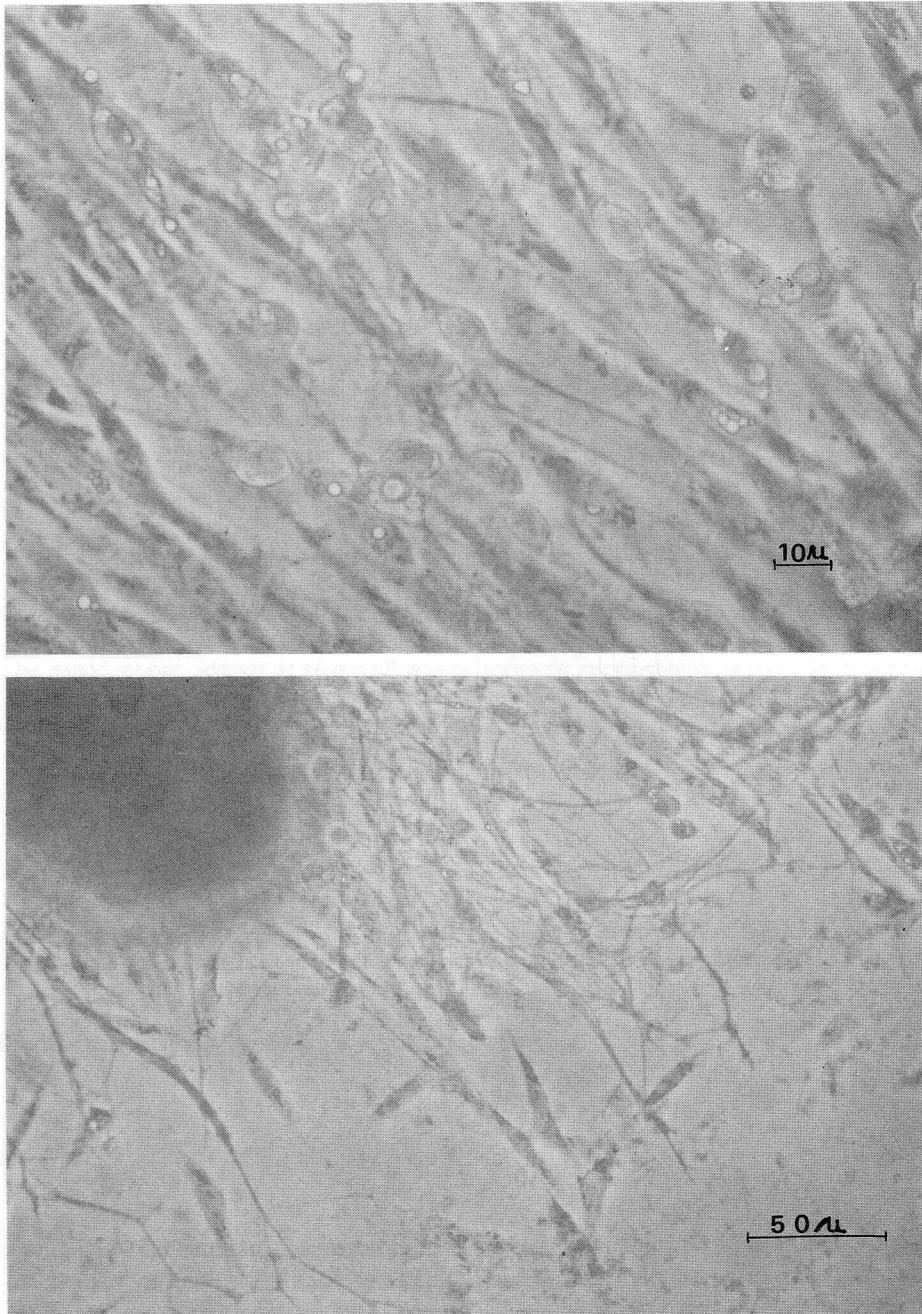


FIGURA 3. Cultivos de GC. a: aspecto de una corona de crecimiento con presencia de neuronas en un explanto procedente de GC de diez días a los cuatro días de cultivo. b: explanto de GC de doce días con su corona de crecimiento el primer día de cultivo.

EFECTO DE LA ADRIAMICINA SOBRE LAS CELULAS GONADOTROPAS DE RATA NORMAL

EFFECT OF ADRIAMYCIN ON GONADOTROPE CELLS OF THE NORMAL RAT

C. ROJAS, M^a S. POBLADOR, A. RAYA, J.A. CASARES y J.L. LANCHO

Dpto. de Ciencias Morfológicas (Cátedra de Anatomía Humana
- Neuroanatomía).
Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba

RESUMEN

La adriamicina administrada a la dosis de 0.1 mg/g.p.v., durante 5 y 10 días, provoca modificaciones ultraestructurales y de actividad funcional.

Las células ganodotropas, además de signos ultraestructurales de incremento de la actividad funcional presentan unas concentraciones hormonales que nos permiten diferenciar un aumento de los niveles de FSH y LH en los animales tratados con respecto a los controles de la primera a la segunda semana de tratamiento.

PALABRAS CLAVE: Rata. Células Gonadotropas. Adriamicina. Ultraestructura.

SUMMARY

The ganodotrope cells besides presenting ultrastructural signs of increments of the functional activity also presents hormonal concentrations that permit us to differentiate an increase in the levels of ganodotrope cells in the animals treated with respect to the control of the first to the second week of treatment.

KEY WORDS: Rat. Ganodotrope Cells. Adriamycin. Ultrastructure.

Introducción

La adriamicina o doxorubicina es un antibiótico antitumoral del grupo de la antraciclina que actúa sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos inhibiendo su síntesis. Fue descubierta a partir de la fermentación aerobia del *Streptomyces peucetius* variedad *caesius* por Di Marco, Gaetani y Scarnipato (1969).

En el plano celular el citostático adriamicina ejerce sobre la mitosis un efecto inhibitorio inmediato y dosisdependiente; a dosis bajas provoca una inhibición de la profase precoz y a dosis más elevadas el bloqueo de la mitosis es total.

Lawrence y Terz (1977), utilizando timidina tritiada, comprueban que los antibióticos antineoplásicos actúan en todas las fases del ciclo G₁, S y G₂, es decir, son drogas no específicas del ciclo.

Lancho Alonso (1976 y 1977), en sendos estudios morfológicos y de citofotometría cuantitativa, comprobó que la adriamicina provoca alteraciones nucleares, nucleolares y cromosómicas en fibroblastos de embrión de pollo

cultivados "in vitro" a las 24 horas de iniciado el tratamiento. Así mismo, el antibiótico provoca una inhibición de la síntesis de DNA y RNA nucleolar y un bloqueo en la fase G₂ del ciclo celular en la que tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas. Estos efectos pueden ser espontánea y simultáneamente reversibles, pero la actividad mitótica no vuelve a recuperarse (Bassleer, De Paermentier y Lancho Alonso, 1977).

Los efectos tóxicos de la adriamicina son dosisdependientes, previsibles y reversibles. Entre los más importantes cabe destacar la mielodepresión y la cardiotoxicidad, además de estomatitis, alopecia y manifestaciones gastrointestinales, entre otras (Bonadonna, Monfardini y De Lena, 1972).

La adriamicina es un antibiótico antitumoral ampliamente utilizado en la clínica humana y su acción beneficiosa se ejerce principalmente sobre las neoplasias hematológicas (leucemias y linfomas), tumores gastrointestinales, genitourinarios, cáncer de pulmón, carcinoma de mama, etc. (Grohn, Heinoken, Klefstron y Tarkkanen, 1984; De Gramon, Rioux, Drolet y Delage, 1985, etc.)

Material y Métodos

Se han utilizado ratas machos agrupadas en dos lotes (I y II); cada uno de ellos consta de seis animales tratados, dos animales control y dos animales normales. La diferencia entre ambos lotes es la duración del tratamiento, y consecuentemente la fecha del sacrificio.

Los animales tratados del lote I han recibido una dosis diaria de adriamicina de 0.1 mg/g.p.v., durante 5 días consecutivos. Los animales control recibieron el mismo tratamiento pero a base de disolvente fisiológico, y los animales normales estuvieron en las mismas condiciones pero sin inyección alguna.

La pauta de administración para el lote II ha sido la misma que para el lote I. En ambos se comenzó a inyectar al mismo tiempo, pero al sexto día el lote I fue sacrificado, y al lote II, tras un período de descanso de dos días, se le continuó administrando adriamicina siguiendo la directriz anteriormente descrita, siendo lógicamente el sacrificio al día décimotercero de la primera dosis.

La inyección se hizo por vía intraperitoneal (Ishizuka, Takayama, Takeuchi y Umezawa, 1967; Ohnuma, Selawry y Holland, 1972; Ohnuma, Holland y Masuda, 1974).

El sacrificio tuvo lugar por decapitación, previa anestesia con pentobarbital sódico.

En un segundo tiempo se repitió la experimentación con otro grupo de ratas macho, seis tratados y tres controles en cada uno de los lotes, a los que se les añadieron dos animales, macho y hembra, que estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales y de dieta y que fueron sacrificados a la misma hora que el lote II, pero en esta ocasión por decapitación sin anestesia previa, para no interferir sobre los niveles plasmáticos de las hormonas gonadotropas FSH, LH y PRL, cuyas determinaciones iban a ser practicadas mediante la técnica de radioinmunoensayo (R.I.A.) de doble anticuerpo.

Tras la decapitación del animal procedimos a la extracción de la glándula. La fijación se realizó por inmersión en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4.

La hipófisis se cortó siguiendo un plano sagital obteniendo dos mitades, cada una de las cuales recibió dos cortes transversos resultando tres partes (rostral, intermedia y caudal), obteniéndose seis porciones de cada glándula (protocolo habitual en nuestro departamento) y, tras la inclusión en araldita, los bloques se cortaron en un ultramicrotomo LKB entre 500-700 Å de espesor, finalizando el proceso según el método de Reynolds.

El estudio ultraestructural ha sido realizado en un microscopio electrónico de transmisión Phillips EM-300 del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Universidad.

Las micrografías electrónicas se han obtenido en placas Agfa Gevaert tipo Scientia y en película Kodak Eastman de 35 mm. sin perforar. Los positivos se han realizado a los mismos aumentos de ampliación.

Las gráficas fueron realizadas en un plotter 74-75A conectado a un ordenador Hewlet-Packard 86A.

Resultados

Las células gonadotropas junto con las células PRL son los tipos celulares que más modificaciones ultraestructurales nos han presentado.

El signo ultraestructural más llamativo de las células gonadotropas de rata tratada durante 5 días con adriamicina es la presencia de grandes dilataciones de RER que ocupan la práctica totalidad del citoplasma, apareciendo el núcleo aislado y los gránulos ocupan islotes citoplasmáticos concentrados en acúmulos.

Los núcleos de estas células ofrecen una morfología variada en cuanto a su densidad electrónica, acúmulos de cromatina más o menos electrodensos dispersos por el citoplasma. Así mismo, en muchas ocasiones son evidentes los nucleolos.

El RER y sus dilataciones llegan a ser realmente importantes, llegando incluso a configurar las denominadas "células en anillo de sello" o "células de la castración" (Fig. 2).

La observación de imágenes de exocitosis ha sido frecuente, por lo que cabe suponer que la liberación hormonal es abundante (Fig. 2).

Los diferentes aspectos ultraestructurales del Aparato de Golgi de las células gonadotropas nos muestran en mayor o menor grado datos ultraestructurales indicativos de actividad funcional, pero todos ellos dentro de un marco de síntesis que invita a pensar que las células gonadotropas están produciendo hormonas puesto que, en el borde trans, se observa empaquetamiento de gránulos, gránulos inmaduros, vesículas espiculadas, etc. y, en muchas ocasiones, cuerpos densos de aspecto lisosomal, así como cuerpos multivesiculares y cuerpos multilaminares, estadios estos últimos de excesiva acción de síntesis y liberación hormonal.

En el lote II las células gonadotropas presentan alteraciones más ostensibles.

Es prácticamente generalizada la dilatación del RER y la disminución numérica de los gránulos de secreción, así como la aparición de numerosos gránulos inmaduros.

En cambio, otras células gonadotropas de configuración poligonal, núcleo alargado y algo excéntrico se nos presentan con una ultraestructura que va desde la escasez de retículo, granulaciones y alteraciones mitocondriales hasta la más completa degeneración citoplasmática (Fig. 3 y 4).

A efectos de valoración de los datos ultraestructurales obtenidos, que indican una actividad funcional importante en este tipo celular en nuestras condiciones experimentales, hemos procedido a la obtención de valoraciones hormonales en sangre por R.I.A.

En la Tabla I ofrecemos los valores correspondientes a la hormona FSH en ratas macho. La Tabla II muestra los pertenecientes a la LH así mismo en ratas macho.

Los valores medios indicados en las tablas han sido llevados a sendas gráficas.

La gráfica correspondiente a la hormona FSH (Gráfica I) muestra que al finalizar la primera semana de tratamiento la diferencia entre los animales tratados, 409.11 $\mu\text{g/ml}$, y los controles, 355 $\mu\text{g/ml}$, es manifiesta, y con una notable diferencia numérica. La concentración hormonal desciende en los animales tratados mientras que asciende en los animales control, llegando a una aproximación en los valores de los animales del lote II, es decir, en aquellos que han recibido 10 dosis de adriamicina.

La Gráfica II corresponde a la hormona LH; es totalmente opuesta con la anteriormente descrita por cuanto los animales tratados con 5 dosis presentan valores mínimos por debajo de los controles. Esto es: a mayor concentración de FSH, menor concentración de LH.

Al final de las dos semanas de tratamiento la cantidad de LH ha aumentado considerablemente en los animales tratados mientras que en los animales control se mide un descenso gradual. Tanto unos como otros valores responden perfectamente a lo ya descrito para la hormona FSH, es decir, a menor concentración de FSH, mayor concentración de LH, y en el caso de los animales control a mayor cantidad de FSH, menor cantidad de LH. Podemos resumir, fácilmente, diciendo que tanto en los animales tratados con 5 dosis como en los animales tratados con 10 dosis existe una función gonadotrópica importante con abundante liberación de hormona que concuerda con los datos ultraestructurales observados.

Discusión

Resulta difícil poder comparar los resultados obtenidos con nuestro modelo de experimentación con los aportados por otros autores, ya que, exceptuando los trabajos previos realizados por nosotros con este antibiótico, (Lancho Alonso, Rojas, Raya, García y Poblador, 1983) y con otros como la bleomicina (Raya, Rojas, Poblador y Lancho Alonso, 1987) y la ciclofosfamida (Poblador, Rojas, Raya, Quiralte, Casares y Lancho Alonso, 1989), la ausencia bibliográfica con respecto al tema es prácticamente absoluta.

Las células ganodotropas presentan signos ultraestructurales de una fuerte actividad funcional de síntesis y liberación hormonal por efecto de la administración de adriamicina, puesto que, tanto morfológica como funcionalmente, las células de los animales control y normales no poseen esos mismos datos.

Las células ganodotropas, tanto ultraestructural como funcionalmente, son hiperactivas, abundando las descripciones como tipo I que en este caso tendrían una acción FSH liberadora que desciende gradualmente a lo largo de las dos semanas de tratamiento. En consonancia con esta disminución gradual va aumentando la acción LH a lo largo del mismo tiempo, pues, de acuerdo con Sheridan, Loras y Heuson-Stiennon (1983), las gonadotropas tipo I liberan LH y FSH y son las células que podemos denominar "estimuladas".

Recordemos que las células ganodotropas tipo I son aquellas que poseen cisternas dilatadas de RER.

El estado "estimulado" de las células gonadotropas llega a ser máximo en aquellas que presentan la morfología de las células en "anillo de sello" o "células de la castración".

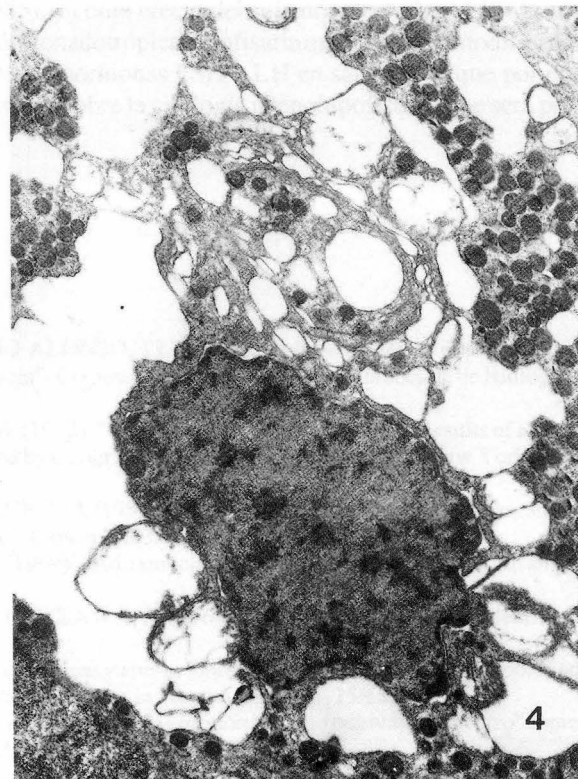
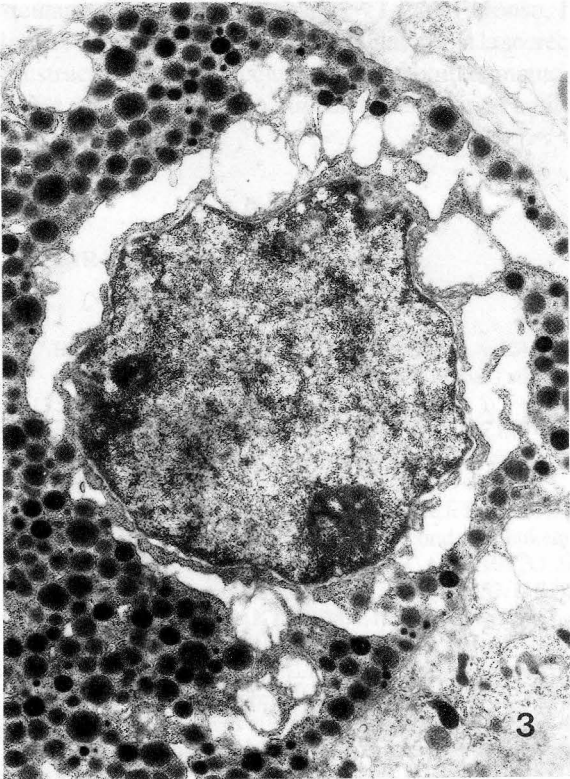
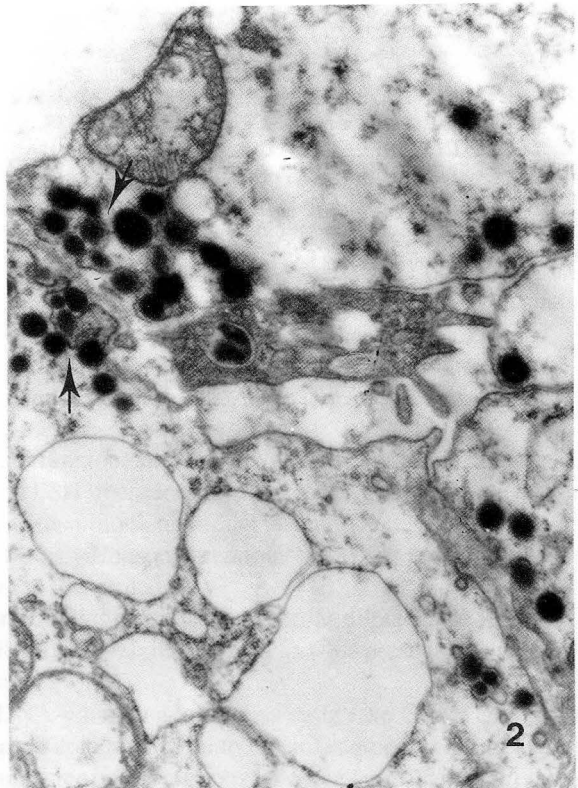
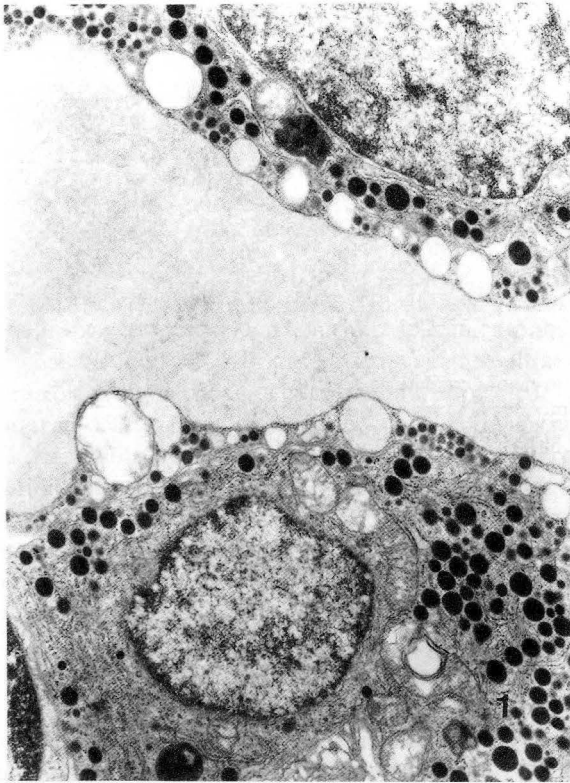
Sabiendo que la adriamicina inhibe la síntesis de DNA y bloquea la mitosis en la fase G₂ del ciclo celular, podemos suponer que, al ser las células adenohipofisarias de crecimiento lento o células quiescentes, el ataque de la adriamicina no se ejerce directamente sobre el DNA celular sino que como consecuencia de probables alteraciones testiculares (Raya, Rojas, Poblador y Lancho Alonso, 1985), y como efecto del sufrimiento corporal por la acción del antibiótico, se produzca una estimulación de la secreción gonadotrópica hipofisaria que comporta modificaciones ultraestructurales de las células, así como un aumento de las hormonas FSH y LH en sangre, sin que por ello se descarte una posible acción directa del antibiótico antitumoral sobre la citología adenohipofisaria, que será preciso dilucidar.

BIBLIOGRAFIA

1. BASSLEER, F.; DE PAERMENTIER, G. y LANCHO ALONSO, J.L. (1977): "Inhibition reversible de la fonction nucleolaire des fibroblastes traités in vitro par l'adriamycin". *Comptes rendus des sciences de la société de Biologie*. **171/3**: 669-674.
2. BONADONNA, G.; MONFARDINI, S. y DE LENA, M. (1972): "Clinical trials with adriamycin". Results of a three year study, in *International Symposium on adriamycin*, edited by Carter, S.K., Di Marco, A., Guione, M. New York. Springer Verlag. 139-152.
3. DE GRAMONT, A.; RIOUX, E.; DROLET, J. y DELAGE, J.M. (1985): "Erythrocyte Mean Corpuscula volumen during cytotoxic therapy and the Risk of Secondary Leukemie". *Cancer*, **55/3**: 493-495.
4. DI MARCO, A.; GAETANI, M. y SCARNIPATO, B. (1969): "Adriamycin (NSC-123, 127), new antibiotic antitumor activity". *Cancer Chemotherapy Reports*, **153/1**: 33-37.
5. ISHIZUKA, M.; TAKAYAMA, H.; TAKEUCHI, T. y UMEZAWA, H. (1967): "Activity and toxicity of bleomycin". *J. Antibiotic*. **20**: 15-24.
6. LANCHO ALONSO, J.L. (1976): "Modificaciones morfológicas y alteraciones cromosómicas provocadas por la acción de la adriamicina sobre fibroblastos de embrión de pollo cultivados in vitro". *Ana. Anat.*, **25/65**: 347-357.
7. —(1977): "Análisis citoquímico cuantitativo del DNA de fibroblastos de embrión de pollo cultivados "in vitro" sometidos a tratamiento con adriamicina". *Ana. Anat.*, n° extraordinario.
8. LANCHO ALONSO, J.L.; ROJAS, C.; RAYA, A.; GARCIA, J. y POBLADOR, M.S. (1983): "Aspectos ultraestructurales de la citología de la pars distalis adenohipofisaria de rata normal tras la administración de adriamicina". *Oncología*, **VI/6**: 35-43.
9. LAWRENCE, N. y TERZ, J.J. (1977): "Cancer Management". Grune y Stratton. New York.
10. OHNUMA, T.; SELAWRY, O.S y HOLLAND, J.F. (1972): "Clinical study with bleomyein tolerance to twice seekly dosage" *Cancer*, **30**: 914-922

11. OHNUMA, T.; HOLLAND, J.F. y MASUDA, H. (1974): "Microbiological assay of bleomycin inactivation tissue distribution and clearance". *Cancer*, **33**: 1230-1238.
- 12.. POBLADOR, M.S.; ROJAS, C.; QUIRALTE, J.; CASARES, J.A. y LANCHO ALONSO, J.L. (1989): "The effects of Cyclophosphamide on the prolactin cells of the normal rat". *Histol. Histopath.*, **4**: 27-30.
13. RAYA, A.; ROJAS, C.; POBLADOR, M.S. y LANCHO ALONSO, J.L. (1987): "Ultraestructura de la adenohipófisis de rata tratada con Bleomicina". *Acta Microscópica*, **X/1-2**: 29-40.
14. RAYAS, A.; ROJAS, C.; POBLADOR, M.S. y LANCHO ALONSO, J.L. (1985): "Aspectos ultraestructurales del testículo de rata sometida a tratamiento con Bleomicina". *Histología Médica*, **I/1**: 103-108.
15. SHERIDAN, R.; LORAS, B. y HEUSON-STIENON, J.L. (1983): "Morphologie ultrastructurale des cellules ganadotropes en culture organotypique". *Arch. Biol.* **94**: 285-300.

Correspondencia; Dra. C. Rojas
Dpto. de Ciencias Morfológicas
(Cat. Anatomía Humana - Neuroanatomía)
Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.



- FIGURA 1.** Animal tratado macho. Lote I. Parte rostral izquierda adenohipófisis. Aumentos del negativo: 7752x.
FIGURA 2. Animal tratado macho. Lote I. Parte rostral derecha adenohipófisis. Aumentos del negativo: 18240x.
FIGURA 3. Animal tratado macho. Lote II. Parte rostral izquierda adenohipófisi. Aumentos del negativo: 7252x.
FIGURA 4. Animal tratado hembra. Lote II. Parte intermedia derecha adenohipófisis. Aumentos del negativo: 7252x.

FSH ♂

N: 324.52 ng/ml

PRIMERA SEMANA		SEGUNDA SEMANA	
A ₂ : 412,24	A ₃ : 380,10	D ₂ : 350,10	D ₃ : 390,00
B ₂ : 415,10	B ₃ : 370,29	E ₂ : 340,24	E ₃ : 410,00
C ₂ : 400,00	C ₃ : 315,64	F ₂ : 450,20	F ₃ : 309,64
\bar{X} : 409,113	\bar{X} : 355,343	\bar{X} : 380,18	\bar{X} : 369,88

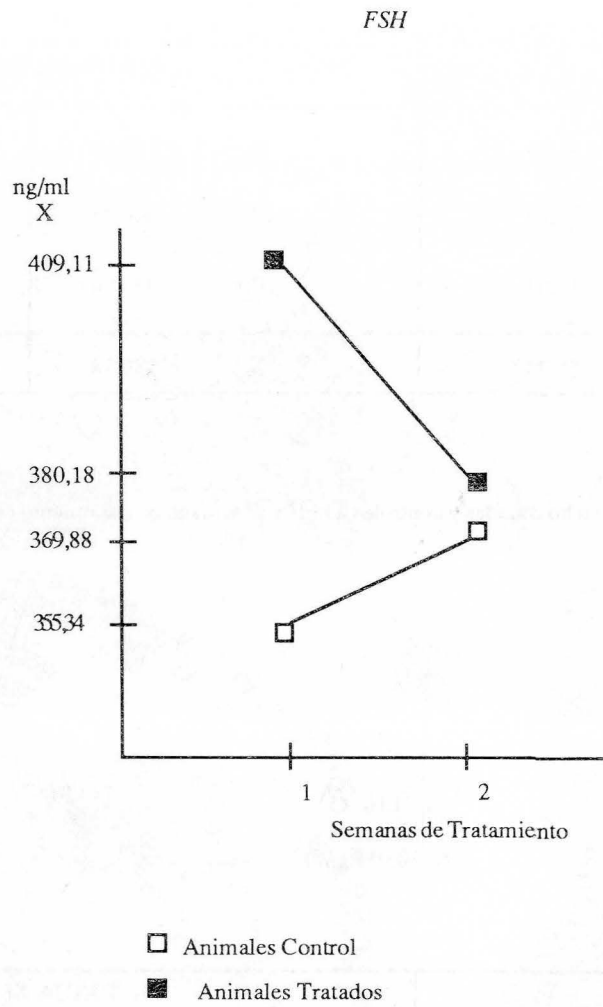
TABLA I. Niveles de FSH en ratas macho tratadas y controles a la 1ª y 2ª semana de tratamiento con adriamicina.

LH ♂

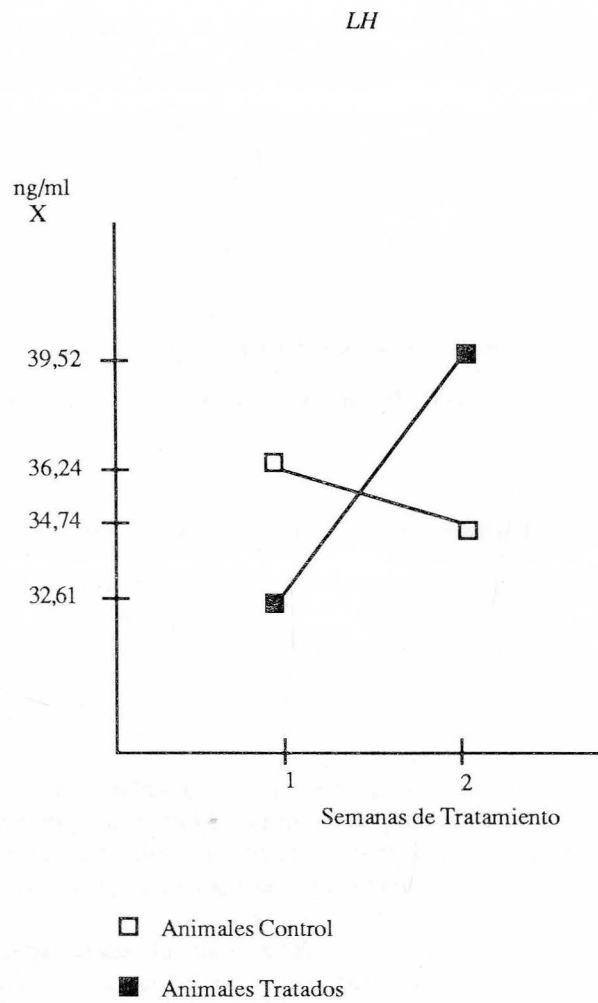
N: 30,05 ng/ml

PRIMERA SEMANA		SEGUNDA SEMANA	
A ₂ : 28,41	A ₃ : 35,20	D ₂ : 37,45	D ₃ : 40,05
B ₂ : 28,90	B ₃ : 34,73	E ₂ : 42,21	E ₃ : 35,07
C ₂ : 40,52	C ₃ : 38,80	F ₂ : 38,92	F ₃ : 29,11
\bar{X} : 32,61	\bar{X} : 36,243	\bar{X} : 39,526	\bar{X} : 34,743

TABLA II. Niveles de LH en ratas macho tratadas y controles a la 1ª y 2ª semana de tratamiento con adriamicina.



GRAFICA I. Valores medios de FSH en ratas machos tratadas y controles a la 1ª y 2ª semana de tratamiento con adriamicina.



GRAFICA II. Valores medios LH en ratas machos tratadas y controles a la 1ª y 2ª semana de tratamiento con adriamicina.

APORTACION AL ESTUDIO DE LOS HUESOS ACCESORIOS DEL PIE
CONTRIBUTION TO KNOWLEDGE OF ACCESSORY BONES OF FOOT

**A. SUANES CABELLO, R. RIBES BLANQUER, P. CARPINTERO BENITEZ
Y M. MESA RAMOS.**

Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.

RESUMEN

Hemos estudiado la incidencia y otros caracteres de los huesos accesorios del pie en un grupo de 630 pacientes.

PALABRAS CLAVE: Pie, hueso accesorio, hueso supernumerario, sesamoideo.

SUMMARY

The frequency and others traits on accessory bones of foot in a group of 630 patients are studied.

KEY WORDS: Foot, accessory bone, supernumerary bone, sesamoid

Introducción

D. Trolle (1948) definió a los huesos accesorios del pie en estos términos: "Los huesos accesorios son huesos inconstantes, independientes y bien definidos, en un pie desarrollado normalmente, cuya existencia no se debe a una reciente fractura menor u otra condición definitivamente patológica; no importando si tienen una más o menos íntima relación con los huesos constantes, o reemplazan enteramente a aquéllos, a causa de la división de los últimos en varios segmentos".

Aunque esta descripción cuenta con mucha aceptación, si se revisa la bibliografía se encontrarán varias definiciones y, en función de cada una, se incluyen unos u otros huesos como accesorios e incluso se aplican diversas denominaciones a un mismo hueso. Esto ha originado una variada sinonimia y conllevado cierta confusión. El origen de las discrepancias está, fundamentalmente, en la no existencia de una etiología completamente aclarada, y en la consideración, o no, según los autores, de algunos de estos osículos como huesos sesamoideos.

En este trabajo hemos seguido el criterio de autores como Giannestras (1979) y Henderson (1963), quienes clasifican a los huesos accesorios en dos grupos: uno de huesos accesorios sesamoideos y otro de huesos accesorios verdaderos o supernumerarios propiamente dichos. Entre los huesos accesorios sesamoideos hemos incluido sólo a aquellos unánimemente aceptados como sesamoideos. Entre éstos, O'Rahilly (1953) y Viladot (1976) incluyen a los sesamoideos interfalángicos y metatarsofalángicos.

La observación en radiografías del pie de huesos accesorios, algunos de los cuales planteaban problemas de diagnóstico diferencial suscitó nuestro interés. Al consultar la bibliografía comprobamos la escasez de trabajos

recientes, así como referencias a aspectos de los huesos accesorios (bilateralidad, asociación entre huesos accesorios y otros) de interés para facilitar el diagnóstico entre los mismos y alteraciones patológicas del pie. Todo ello nos ha conducido a realizar un trabajo sobre algunos aspectos de estos huesos, como son: la incidencia de los diferentes tipos de huesos accesorios en nuestro medio, relación con el sexo y el estudio de ciertos caracteres facilitadores de su diagnóstico diferencial aplicables a la clínica humana.

Material y Métodos

Hemos estudiado a 630 personas, 315 varones y 315 hembras, atendidas en el Servicio de Traumatología del Hospital General y Clínico de Córdoba.

Se han determinado diferentes variables en relación con la presencia de huesos accesorios del pie. Para ello hemos seguido la siguiente sistematización;

- I) Estudio de la historia clínica del paciente. Obteniéndose datos referentes a la anamnesis y exploración física.
- II) Exámenes radiográficos. Se han realizado a los pacientes radiografías en proyecciones dorsoplantar y lateral de ambos pies.

Entre las variables estudiadas hemos incluido: la presencia de hueso accesorio y tipo del mismo, sexo, bilateralidad del hueso accesorio y diferentes asociaciones entre ellos.

Para el análisis estadístico bivariante, a los diferentes niveles de significación, se han empleado los estadísticos de Pearson (Prueba Chi-cuadrado), estadístico de Pearson Corregido, Cociente de verosimilitudes o Test G, en función de las frecuencias observadas.

Resultados

Se ha constatado la existencia de hueso accesorio en 265 pacientes (42.063%), de los cuales 180 (28.571 % del total de pacientes y el 67.924 % de los pacientes con hueso accesorio) tenían un hueso accesorio propiamente dicho o verdadero (no sesamoideo).

De los diferentes tipos de hueso accesorio verdadero descritos en la literatura sólo hemos encontrado doce. La relación de los mismos con sus frecuencias absolutas y relativas se exponen en la Tabla I.

Los sesamoideos metatarsofalángicos bipartitos del hallux se han encontrado en 71 pacientes (11.269%). De éstos, 63 (10% del total de pacientes) tenían bipartito el sesamoideo medial; 7 (1.11 % del total de pacientes), el sesamoideo en posición lateral, y en un paciente (0.158% del total) ambos sesamoideos eran bipartitos.

Los sesamoideos interfalángicos del hallux han aparecido en 9 pacientes (1.428% del total de pacientes).

Los sesamoideos metatarsofalángicos del II dedo se presentaron en 13 pacientes (2.063 %); de estos 10 (1.58%) tenían el sesamoideo en posición medial, uno (0.1658 %) en lateral y dos (0.317 %) con sesamoideo medial y lateral.

Los sesamoideos metatarsofalángicos del III dedo han aparecido en dos pacientes (0.317 %), ambos eran mediales.

Los sesamoideos metatarsofalángicos del IV dedo se han encontrado en 6 personas (0.952 %), de las cuales 5 (0.793 %) tenían sesamoideos mediales y una (0.1587 %) un sesamoideo lateral.

Los sesamoideos metatarsofalángicos del V dedo se han apreciado en 52 personas (8.253 %), de las que 43 (6.825 % del total de pacientes) presentaban un sesamoideo medial; una (0,15 %), sesamoideo, lateral y 8, (1.26 %) ambos.

Un hueso accesorio bilateral se ha apreciado en 104 pacientes (16.507% del total). Esto supone que en el 39.245% de los pacientes con hueso accesorio éste es bilateral. Si se considera sólo a los pacientes con hueso accesorio verdadero, el porcentaje asciende al 57.77 %.

La asociación entre huesos accesorios verdaderos se ha visto en 27 personas (4.285% del total, 15% de los pacientes con hueso accesorio verdadero).

La asociación entre los sesamoideos bipartitos del hallux y los huesos accesorios verdaderos se comprueba en 19 pacientes (3.01 %). No hay diferencia significativa ($p = 0.826$) entre la proporción (10.55 %) de pacientes con hueso accesorio verdadero y sesamoideo bipartito del hallux y la proporción (11.55 %) de personas sin hueso accesorio pero con sesamoideo bipartito del hallux. Tampoco se ha obtenido correlación significativa al nivel del 0,05 entre la variable presencia de sesamoideos bipartitos del hallux y otras variables como: presencia de hueso peroneo, hueso accesorio bilateral, presencia de varios huesos accesorios.

En los pacientes con hueso peroneo aparece el sesamoideo metatarsofalángico del V dedo en el 18.64 %, mientras que en los que no tienen este hueso lo hace en el 7.18%. Esta diferencia de proporciones es significativa ($p = 0.0051$). La significación se pierde ($p = 0.1388$) para la relación del hueso peroneo con la asociación entre varios sesamoideos metatarsofalángicos.

La asociación entre sesamoideos metatarsofalángicos la encontramos en 13 personas, lo cual supone el 2.063% del total y el 9.923% de los sujetos con sesamoideos metatarsofalángicos.

La proporción de varones con hueso accesorio verdadero ha sido del 23.81% y del 33,33 % en las hembras; esta diferencia es significativa al nivel de confianza del 0.05.

El hueso accesorio bilateral ha aparecido en el 20.95 % de hembras frente al 12.06% en varones (diferencia estadística significativa con $p = 0.0038$).

La predominancia del sexo femenino también se ha observado en otros apartados como: la aparición de varios huesos accesorios con el 6.67% para la mujer y el 1.90% del varón ($p = 0.0059$); la presencia del hueso peroneo con el 12.06% y el 6.67% ($p = 0.028$); la existencia de hueso escafoides accesorio con un 13.97% y el 4.76% ($p = 0.0001$).

No ha existido correlación entre la variable sexo y las variables sesamoideos bipartitos del hallux o metatarsofalángicos.

Discusión

La frecuencia de huesos accesorios verdaderos observada (28.57%) está entre los márgenes (20 al 75%) que cita O'Rahilly (1953) para su aparición. Siendo, además, muy próxima a las cifras del 20 al 25% que dan la mayoría de autores (Pfitzner, 1986; Tachdjian, 1976).

Debe tenerse en cuenta que en algunas de las citas sobre frecuencia de huesos accesorios no se refiere el número de pacientes empleado para la obtención del dato, lo cual dificulta una comparación estadística rigurosa.

No obstante, Bizarro (1921) los encuentra en 21 de 100 pacientes, proporción no diferente significativamente de la obtenida por nosotros.

Las cifras sobre frecuencia del hueso peroneo halladas en la bibliografía son muy variadas, aunque autores como Testut y cols. (1977) y Lelievre (1976) aportan cifras del 7 al 10% similares a la nuestra; otros como Douglas (1973) o Dameron (1975) dan frecuencias del 14 al 26% y el 15%, respectivamente.

La proporción, 9.36% de pacientes con hueso escafoides accesorio es semejante a las reseñadas por muchos autores (Caffey, 1982 GEIST, 1925; Borrachero del Campo, 1984) que varían entre el 10 y el 15%.

Las frecuencias para el hueso trígono aportadas en la literatura varían entre el 3% de McDougall (1955) y el 47.61% de Paulov (1983), aunque la mayoría están comprendidas entre el 7 y el 13% (Orts Llorca, 1981; O'Rahilly, 1953) similar a la observada en este trabajo. El resultado para el hueso intermetatarsiano (2.063%) no difiere significativamente del 1.24% de Shands (1931), el 1.33% de Henderson (1963) o el 1.10% de Capecci y cols. (1968). Sin embargo, Reichmister (1980) proporciona una frecuencia del 5.53%, significativamente diferente a la de nuestro estudio.

Los resultados del resto de huesos accesorios verdaderos no se mencionan en este apartado por ser equiparables a los encontrados en la literatura y, en general, de poca significación.

Para los sesamoideos bipartitos del hallux nuestro resultado es similar al 10% de Claustre (1982), el 10.7% de Colwill (1969) y el 11.11% de Scranton (1980). Empero, otros resultados como el 31.9% de Kewenter (1936) y el 43.7% de Schnitzer (1974) difieren significativamente del nuestro. La mayor frecuencia del sesamoideo medial

bipartito frente al lateral coincide con la mayoría de autores como Viladot (1975), Jahss (1981), Brock (1980) y Nuber (1982).

El porcentaje de aparición de los sesamoideos interfalángicos del hallux es inferior al de autores como Bizarro, 1921 (5%) y Burman y cols., 1931 (13%).

Los datos conseguidos sobre sesamoideos metatarsofalángicos de los cuatro últimos dedos, en general, son comparables a los de la mayoría de autores (Patterson, 1937; Bizarro, 1921).

Aunque hay diferencias con trabajos como el de Lapidus (1940), quién da una frecuencia para el sesamoideo metatarsofalángico del V dedo del 19.2%, significativamente mayor a la nuestra. La observación de sesamoideos metatarsofalángicos en los dedos III y IV contrasta con la afirmación de Testut y cols. (1977) de que en el ser humano las articulaciones metatarsofalángicas de los dedos III y IV del pie nunca tienen un sesamoideo.

La bilateralidad es citada (Orts Llorca, 1981; Lelievre, 1976; Mouchet y cols. 1925) a menudo como una característica de los huesos accesorios útil como ayuda diagnóstica, e incluso indicador de su origen hereditario. No obstante, en los trabajos consultados esta característica es muy variable, no sólo entre los diferentes tipos de huesos accesorios, sino también para uno dado. Esta observación, así como el resultado conseguido, nos hace tener presente la opinión de Feldman (1970) y Butel (1967), quienes consideran a la bilateralidad como una característica que sólo debe utilizarse con muchas reservas en los problemas de diagnóstico diferencial y que en ningún caso será el apoyo fundamental del mismo.

Feldman (1970) considera la asociación entre sesamoideos bipartitos del hallux y los huesos accesorios verdaderos una evidencia que apoya el diagnóstico de sesamoideo bipartito del hallux frente al de fractura sesamoidal. Sin embargo, en nuestra serie no hemos encontrado correlación significativa entre la presencia de hueso accesorio verdadero y el sesamoideo bipartito del hallux. Esto nos hace pensar que la existencia de esta asociación no es un dato totalmente fiable como base del diagnóstico diferencial entre sesamoideo bipartito y fractura sesamoidal. Este razonamiento también es aplicable a la asociación de huesos accesorios verdaderos entre sí, o a la asociación entre sesamoideos metatarsofalángicos.

La asociación del hueso peroneo y el sesamoideo metatarsofalángico del V dedo, aunque no se mantiene al interrelacionarlo con la asociación entre sesamoideos metatarsofalángicos, puede apoyar la opinión de autores como Caffey (1982), Gardner (1971) y Meschan (1978) que consideran al hueso peroneo un hueso sesamoideo.

Para la relación entre el sexo y los diferentes huesos accesorios hay gran disparidad de resultados según los trabajos. Autores como Mygind (1953) y Ray (1983) encuentran en sus series preponderancia del sexo femenino para el hueso escafoides accesorio; este resultado coincide con el nuestro. No obstante, ninguno de los autores consultados encuentra explicación a esta tendencia.

El resultado obtenido para la relación sexo y huesos sesamoideos bipartitos del hallux está en la línea de los de Francis (1940) y Hubay (1949), quienes no encontraron diferencia significativa entre la presencia de estos huesos en varones y hembras. Sin embargo, Kohler (1959) los encuentra con mayor frecuencia en el sexo femenino y Sawtell (1931), por contra, en los varones.

BIBLIOGRAFIA

- BIZARRO, A.H. (1921). On sesamoid and supernumerary bones of the limbs. *J. Anat. Londres* **55**: 256-268.
- BORRACHERO DEL CAMPO, J. (1984). Dolor en parte media y posterior del pie. *Rheuma* **20**: 20-25.
- BROCK, J.G., MEREDITH, H.C. (1980). Case report 102. Osteomyelitis of hallux sesamoid. *Skeletal Radiol.* **4**: 236-239.
- BURMAN, M.S., LAPIDUS, P.W. (1931). The functional disturbances caused by the inconstant bones and sesamoids of the foot. *Arch. Surg.* **22**: 936-975.
- BUTEL, J., WITVOET (1967). Les fractures et les luxations de l'astragale. *Revue Chir. Orth.* **53**: 527-528.
- CAFFEY, J. (1982). Diagnóstico radiológico pediátrico, 1023-1084. Salvat eds. Barcelona.
- CAPECCHI, V., CICALA, G., CRISAFULLI, A. (1968). Le ossa sopranumeraria del piede. *Acta Orthop. Ital.* **10**: 1-18.
- CLAUSTRE, J. et al. (1978). Aspects de la pathologie sesamoidienne du premier metatarsien. *Rev. Rheum. Mal. Osteoartic.* **45**: 479-486.
- COLWILL, M. (1969). Osteomyelitis of the metatarsal sesamoids. *J. Bone Jt. Surg.* **51 B**: 464-468.

- DAMERON, T.B. (1975). Fractures and anatomical variations of the proximal portion of the fifth metatarsal. *J. Bone Jt. Surg.* **57 A**: 788-792.
- DOUGLAS, B.M., SULLIVAN, R.C. (1973). Fracture of the os peroneum. *J. Bone Jt. Surg.* **55 A**: 1529-1530.
- FELDMAN, F., POCHACZEVSKEY, R. et al. (1970). The case of the wandering sesamoid and other sesamoid affections. *Radiology* **96**: 275-283.
- FRANCIS, C.C. (1940). The appearance of centers of ossification from 6 to 15 years. *Amer. J. Phys. Anthrop.* **27**: 127-138.
- GARDNER, E., GRAY, D.J., O'RAHILLY, R. (1971). Anatomía, 220-258. Salvat eds. Barcelona.
- GEIST, E.S. (1925). The accessory scaphoid bone. *J. Bone Jt. Surg.* **7**: 570-575.
- GIANNISTRAS, N.J., HARTY, M. (1979). Transtornos del pie, 39-53. Salvat eds. Barcelona.
- HENDERSON, R.S. (1963). Os intermetatarsium and a possible relationship to hallux valgus. *J. Bone Jt. Surg.* **45 B**: 117-121.
- HUBAY, C.A. (1949). Sesamoid bones of the hands and feet. *Amer. J. Roentgen* **61**: 493-505.
- JAHSS, M.H. (1981). The sesamoids of the hallux. *Clin. Orthop.* **157**: 88-97.
- KEWENTER, Y. (1936). Die Sesambeine des I Metatarsophalangealgelenks des Menschen. *Acta Orthop. Scand. Supl. II*: 1-113.
- KOHLER, A., ZIMMER, E.A. (1959). Roentgenología: límites entre lo normal y lo patológico en las imágenes roentgenológicas del esqueleto. Ed. Labor. Barcelona.
- LAPIDUS, P.W. (1940). Sesamoids beneath all the metatarsal heads of. *Both J. Bone Jt. Surg.* **22**: 1059-1062.
- LELIEVRE, J. (1976). Patología del pie, 31-34. Toray-Masson. Barcelona.
- MCDUGALL, A. (1955). The os trigonum. *J. Bone Jt. Surg.* **35 B**: 257-265.
- PATTSCHAN, I. (1978). Radiología General. Compendio Analítico semiológico, 45-46 Ed. AC. Madrid.
- MOUCHET, A., MOUTHIER, G. (1925). Osselets surnuméraires du tarse (tarsalia). *Press. Méd.* **33**: 369-374.
- MYGIND, H. (1953). The accessory tarsal scaphoid. *Acta Orthop. Scand.* **23**: 142-148.
- NUBER, G. W. (1982). Acute osteomyelitis of the metatarsal sesamoid. *Clin. Orthop.* **167**: 212-213.
- O'RAHILLY, R. (1953). A survey of carpal and tarsal anomalies. *J. Bone Jt. Surg. (Am)* **35**: 626-642.
- ORTS LLORCA, F. (1981). Anatomía Humana, 421-424. Ed. Científica-Médica. Barcelona.
- PATTERSON, R. (1937). Multiple sesamoids of the hands and feet. *J. Bone Jt. Surg.* **19**: 531-532.
- PAULOV, H. et al. (1983). Tarsal navicular stress fractures: radiographic evaluation. *Radiology* **148**: 641-645.
- PFITZNER, W. (1896). Beiträge zur Kenntnis menschlichen Extremitätenskelets VII. Die Variationen im Aufbau des Fußskelets. *Schwalbes Morphol. Arb.* **6**: 245-276.
- RAY, S. et al. (1983). Surgical treatment of the accessory navicular. *Clin. Orthop.* **177**: 61-66.
- REICHMISTER, J.P. (1980). The painful os intermetatarsium: a brief review and case reports. *Clin. Orthop.* **153**: 201-203.
- SAWTELL, R.O. (1931). Irregular ossification of the extremities of boys and girls. *Amer. J. Roentgen.* **25**: 330-335.
- SCHNITZER, J.S., HOEFLER, D.F. (1974). The distribution and etiology of foot disorders in a Navy Recruit Population. *J. Amer. Podiat. Ass.* **64**: 845-853.
- SCRANTON, P.E. et al. (1980). Anatomic variations in the first ray: part II. Disorders of the sesamoids. *Clin. Orthop.* **151**: 256-264.
- SHANDS, A.R. (1931). The accessory bones of the foot. An X-ray study of the feet of 1054 patients. *Southern Med. and Surg.* **93**: 326-334.
- TACHDJIAN, M. (1976). Ortopedia Pediátrica, 1253-1259. Ed. Interamericana. México.
- TESTUT, L., LATARJET, A. (1977). Tratado de Anatomía Humana, 436-440. Salvat eds. Barcelona.
- TESTUT, L., LATARJET, A. (1977). Tratado de Anatomía Humana, 451-455. Salvat eds. Barcelona.
- TROLLE, D. (1948). Accessory bones of the human foot. A radiological, histoembryological, comparative-anatomical and genetic study. Timar Munksgaard eds. Copenhagen.
- VILADOT, A. (1975). Patología del antepié, 66-81. Toray eds. Barcelona.
- VILADOT, A., ALAEZ, J. (1979). Diez lecciones sobre patología del pie, 66-77. Toray eds. Barcelons.

Correspondencia: Dr. A. Suanes Cabello
P. Belalcázar, nº 6
14013 - Córdoba. España

<i>TIPO DE HUESO</i>		<i>FRECUENCIA</i>	<i>FRECUENCIA</i>
<i>ACCESORIO VERDADERO</i>		<i>ABSOLUTA</i>	<i>RELATIVA</i>
H.	PERONEO	59	0.093651
H.	ESCAFOIDES ACCESORIO	59	0.093651
H.	TRIGONO	44	0.069841
H.	INTERMETATARSIANO	13	0.020635
H.	SUPRAESCAFOIDEO	10	0.015873
H.	VESALIANO	5	0.007937
H.	SUBTIBIAL	4	0.006349
H.	ASTRAGALO ACCESORIO	2	0.003175
H.	SUPRASTRAGALINO	2	0.003175
H.	CALCANEEO SECUNDARIO	2	0.003175
H.	INFRAESCAFOIDEO	1	0.001587
H.	INTERCUNEIFORME	1	0.001587

TABLA I

VALORACION MEDIANTE T.A.C. DE ALTA RESOLUCION DE LOS LIGAMENTOS Y ARTICULACIONES DE LA UNION CRANIO-RAQUIDEA

C.T. EVALUATION OF LIGAMENTS AND JOINTS OF CRANEO-RAQUIDEAL UNION

S. SUAREZ, S. COSTILLA, A. ALVAREZ-ARENAL, V.J. CABAL y F. AGUADO

Dpto. de Morfología y Biología Celular.
Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo

RESUMEN

Se realizó un estudio radiográfico con un "Scanner" de alta resolución llevándose a cabo 300 exploraciones centradas en la columna cervical, con cortes tomográficos de 1-2 mm., con o sin contraste, si se requería.

Hemos podido observar todas las estructuras ligamentosas de la unión cráneo-raquídea, a excepción de los pequeños refuerzos capsulares de las articulaciones de la región: articulación occipito-atloidea, articulación atloido-axoidea media; articulaciones atloido-axoideas laterales, y syndesmosis occipito-axoidea. Dando unas imágenes más perfectas que las obtenidas, incluso en las cuidadosas disecciones cadavéricas.

El estudio de esta región mediante T.A.C. permite también un diagnóstico precoz de toda la patología de esta zona, permitiendo por tanto una más rápida y correcta terapéutica.

PALABRAS CLAVE: Scanner. Articulación. Ligamentos. Atlas. Axis. Occipital.

SUMMARY

We have realized 300 radiographic explorations with scanner CT centred in cervical spine making 1 - 2 mm. tomographic sections, with or without contrast, if it was required.

We have observed all ligaments structures of crano- raquideal union, except the little capsulary reinforcements of regional joints: Occipito- atloidea joint, Middle Atloido-azoidea joint, Lateral y Atloido-axoidea joint and Occipito-axoidea syndesmosis. The tomographic images were more perfect than those obtained with the most carefully cadaveric dissections.

The CT exploration of this region provides an early diagnostic of crano-raquideal union pathology that permits a most quickly and correctl y therapeutics.

KEY WORDS: Scanner CT. Joint. Ligament. Atlas. Asis. Occipital.

Introducción

Los métodos de imagen convencional de exploración y diagnóstico (R-x simple, tomografías, serografías, etc. permiten en la región crano-raquídea la visualización de estructuras óseas, interlíneas, articulaciones, conducto medular, etc., pero no de otros elementos anatómicos muy importantes como pueden ser la médula, sus envolturas y los numerosos ligamentos de la región que tanta importancia tienen no sólo como limitadores y moduladores de los movimientos de la cabeza, sino como protectores de la médula y bulbo raquídeo al constituir un anillo osteofibroso alrededor del diente del axis, que lo mantiene dentro de un plano frontal y sin posibilidades de desplazamientos importantes, hacia delante y hacia atrás, en el curso de los movimientos de la cabeza, e incluso, en caso de fracturas.

Hasta la llegada del T.A.C. y más recientemente de la R.M. la observación de tales estructuras blandas solo era posible, en el cadáver, mediante una disección cuidadosa de la zona que permite aislar los diferentes ligamentos y restantes estructuras ósteo-articulares, pero, por supuesto, sin ninguna aplicación terapéutica posterior. El estudio de la región mediante T.A.C. permite no solo el diagnóstico de una fractura vertebral, su extensión o la invasión del conducto raquídeo por restos fracturados, sino también, cualquier otro tipo de patología e incluso afectación patológica de los ligamentos de esta región, facilitando un diagnóstico precoz y claro para instaurar una correcta terapéutica Kassel y Cols., 1983; Meyer y col., 1984; Houn field y col., 1973 y Johansen y col., 1983).

El presente trabajo pretende, aprovechando la posibilidad de que se puede estudiar la unión cráneo-raquídea y la columna cervical no solo en sentido horizontal, sino también frontal, al poder introducir el cuello en hiperextensión en el Gantry del "Scanner", efectuar una observación anatómo-radiológica de todos los ligamentos de la unión cráneo-raquídea y sobre todo señalar que el empleo del T.A.C. en esta región permite objetivar la integridad, o no, de cualquier ligamento de las articulaciones cráneo-raquídeas alteradas en caso de traumatismos, artritis reumatoide o cualquier otro tipo de patologías que atenten contra el normal funcionamiento de las citadas articulaciones. El diagnóstico así efectuado conducirá al correcto empleo de una terapéutica que solucione, o prevenga, las posibles alteraciones neurológicas por lesión medular o bulbar.

Material y Métodos

El estudio radiográfico se efectuó con un "Scanner" de alta resolución SOMATO DR2. en el servicio de radiodiagnóstico del H. G. Princesa Sofía de León. Se realizaron un total de 300 exploraciones, centradas en columna cervical, con cortes tomográficos de 1 y 2 mm., con o sin contraste, si el caso lo requería. Del total de cortes efectuados en distintos planos se seleccionaron los más representativos, donde se objetivaban los ligamentos a estudiar.

Resultados

I. Articulaciones occípito-atloidea. (*Articulación atlanto-occipitalis*)

A) *Plano óseo*. En los cortes horizontales efectuados con T.A.C. y centrados a nivel de las cavidades glenoideas del atlas y de los cóndilos del occipital y utilizando ventana ósea, se observa con claridad la morfología típica de las superficies articulares craneales de las masas laterales del atlas, de aspecto reniforme, eje mayor oblicuo de atrás adelante y de fuera a dentro. La cortical ósea aparece siempre en mayor claridad (blanco) y en menor densidad la zona central de hueso esponjoso (en color grisáceo) (Fig. 1). A nivel de los cóndilos occipitales la imagen es semejante destacando su forma ovalada (Fig. 2). Cuando se efectúan cortes frontales es posible evaluar en su totalidad la altura e integridad anatómica de las masas laterales del atlas y occipital; el grosor, calidad y regularidad del hueso que constituyen las superficies articulares, la orientación de sus ejes y la anatomía de la interlínea articular (Fig. 3).

B) *Plano ligamentoso*. No es posible la visualización de la cápsula articular ni del fascículo fibroso que refuerza su sector posterior interno (ligamento occípito-atloideo lateral), pero sí es posible identificar los otros dos refuerzos denominados: a) *membrana occípito-atloidea anterior* o membrana del arco anterior de Lauth, extendida a la manera de una línea blanca entre el borde superior del arco anterior del atlas y la apófisis basilar del occipital (Fig. 4); b) *membrana occípito-atloidea posterior* o membrana fibrosa del arco posterior de Lauth extendido entre el borde superior del arco posterior del atlas y el borde posterior del *foramen magnum* del occipital, apareciendo en secciones horizontales como una especie de línea blanca arqueada en unión indivisa con la duramadre raquídea, que delimita posteriormente el c. vertebral y que se ve realizado con el uso de contraste una vez que las arterias vertebrales han penetrado en el espacio subaracnoideo (Fig. 4). Si se efectúa una reconstrucción sagital de la zona, una línea blanca que representa esta membrana se ve extendida entre sus lugares habituales de inserción (Fig. 5).

2. Articulaciones atlóido - axoideas

La unión entre el atlas y el axis se realiza a través de 4 articulaciones denominadas genéricamente articulaciones atlóido-axoideas que se subdividen en dos articulaciones centrales, denominadas articulaciones del diente de axis o articulación atlóido-axoidea media, de gran importancia biomecánica y clínica, y en dos articulaciones laterales denominadas articulaciones atlóido-axoideas laterales o articulaciones atlóido-axoideas propiamente dichas.

De estas últimas, los cortes horizontales del T.A.C. nos permiten apreciar la morfología típicamente ovalada de sus superficies articulares, así como la calidad de su soporte óseo. (Figs. 4 y 4 bis), e incluso la interlínea articular ocupada por el cartílago de revestimiento y la cavidad articular (Fig. 3). No es posible visualizar la cápsula articular, ni sus refuerzos ligamentosos, en especial el engrosamiento interno, denominado *lig. atlóido-axoideo interno o lateral de Arnold*, extendido entre la cara interna de la masa lateral del atlas a la cara posterior del cuerpo del axis. Si bien carece de importancia, pues los casos de inestabilidad vertebral, rotura ligamentosa o patología degenerativa o inflamatoria en esta articulación es más bien escasa y rara.

Las art. del diente del axis o art. atlóido-axoidea media, de gran importancia clínica y biomecánica en los movimientos de la cabeza, están constituidas por la *art. syndesmo-dentis* y por la *art. atlanto-dentis*. En esta última articulación el T.A.C. nos permite ver con claridad no solo las superficies articulares tanto del diente como del arco anterior del atlas con sus particularidades óseas, sino, y lo que es más importante, nos permite valorar "in situ" la interlínea articular, medir su anchura y valorar si existe inestabilidad vertebral, luxaciones o subluxaciones atlóido-odontoideas (Fig. 4 bis).

La art. syndesmo dentis o transversa axoidea efectuada entre la cara posterior del diente del axis y el ligamento transversa del atlas (extendido entre las caras internas de sus masas laterales), ambas revestidas de cartílago articular, es valorable nítidamente en los cortes del T.A.C. que interesen a la zona, y no sólo las particularidades de la articulación, sino que nos permite observar en su totalidad el ligamento transversa, con lo que tendríamos información de la integridad, o no, de este anillo ósteo-fibroso, que rodeando a la apófisis odontoides facilita sus movimientos, previene e impide sus luxaciones y como consecuencia de ello protege a la médula y bulbo raquídeo.

El ligamento transversa aparece en los cortes axiales del T.A.C. como un arco blanquecino extendido entre sus lugares de inserción habitual, a la vez que abraza la cara posterior del diente del axis. La imagen se realiza cuando se emplea contraste intravenoso (Fig. 9). En los cortes frontales también es posible identificar el ligamento transversa, y no solo él, sino también sus prolongaciones superior e inferior, para formar la típica imagen del *ligamento cruciforme*. Este ligamento se muestra como una especie de placa densa, blanca, de la cual salen 4 prolongaciones a modo de brazos: dos laterales y dos ligamentos transversos; uno superior, el ligamento occípito-transverso, y un brazo inferior, el ligamento transversa-axoideo (Fig. 10).

3. Syndesmosis occípito-axoidea

Englobado dentro de la denominación genérica de las articulaciones que unen la cabeza y el raquis, destacamos el conjunto de formaciones fibro-ligamentosas que constituyen la sindesmosis occípito-axoidea, formada por la membrana tectoria del raquis y por los *ligamentos occípito-odontoideos*.

La Membrana tectoria o *ligamentum latum axiale de Mac Alister* Está formada por tres bandas fibrosas: una central (*lig. occípito-axoideo medio*) y dos laterales (*ligs. occípito-axoideos laterales*). Se extiende desde el borde anterior del *foramen magnum*, y cara interna de los cóndilos occípitales, hasta la cara posterior del cuerpo del axis, a la vez que se interpone entre el ligamento vertebral común posterior, que esta por detrás y el ligamento transversa, que se encuentra por delante.

Cuando se realizan los cortes axiales con el "Scanner" a nivel de la apófisis odontoides, se ven con claridad, fusionados (si el estudio se realiza con contraste intravenoso) la membrana tectoria, el *lig. vertebral común posterior* y la *duramadre raquídea*, a la manera de un arco blanquecino, que circunda el diente y las masas laterales de C-1. (Fig. 11). Si se realiza una serie de cortes horizontales a distancia entre 2-3 mm. que abarquen C-1 y C-2, identificamos plenamente las estructuras citadas, como queda dicho. Mas si procedemos ahora a una reconstrucción sagital, todo el conjunto aparece como una línea blanquecina, extendida por detrás del axis (Fig. 12).

Los ligamentos occípito-odontoideos Situados entre la membrana occípito-atloidea anterior y la prolongación superior del ligamento cruciforme, es un conjunto de tres ligamentos: uno medio llamado *ligamentum apicis dentis* o *superior del diente*, y dos laterales llamados *ligamentos alares u occípito-odontoideos laterales*. Estos, cortos, gruesos y resistentes, se extienden desde el sector lateral superior del diente del axis hasta la cara interna del cóndilo del occipital. En secciones del T.A.C. que interesen el vértice y en general la apófisis odontoides, se visualizan perfectamente. El medio se nos presenta como una fina línea extendida entre el vértice del diente y el borde anterior del *foramen magnum* (Fig. 13). Los ligamentos alares, más gruesos y más fáciles de diferenciar, aparecen a la manera de dos gruesos cordones extendidos entre sus lugares de inserción (Fig. 14).

Discusión

En la actualidad todas las estructuras anatómicas componentes del raquis, tanto superficies articulares como ligamentos, tejido óseo y estructuras nerviosas y vasculares, pueden ser demostradas por T.A.C. de alta resolución, lo que convierte a la técnica en un importante medio auxiliar de diagnóstico Applbaum y cols. (1984); Haykal y cols. (1984); David y cols. (1983); Dublin y cols. (1983); Floch-Prigent y cols. (1983); Guerra y cols. (1984); Haykal y cols. (1984); Kaiser y cols. (1983); Miyasaka y cols. (1982) y Pech y cols. (1985).

En la reunión cráneo-cervical y en general en toda la columna vertebral, las imágenes que ofrece el T.A.C. de las estructuras ósteo-articulares, son más perfectas que las obtenidas por cualquier otro método de imagen disponible, sobre todo si se utilizan cortes finos de 2-3 mm. de grosor, y con aparato de alta resolución. Ello permite el diagnóstico y evaluación inicial de fracturas a nivel de C-1 y de C-2, tan difíciles de obtener por radiología convencional, al poder observar con toda nitidez la totalidad del atlas, axis las superficies articulares del occipital, tanto en secciones transversales como en las horizontales, permitiendo también el diagnóstico precoz de artrosis, así como la existencia de luxaciones y subluxaciones atloido-odontoideas por observación directa de la interlínea articular, e inferir si la causa es ósea o ligamentosa, de tanto interés en el cuadro nosológico de la artritis reumatoide.

Todo el aparato ligamentoso de la unión cráneo-raquídea es perfectamente demostrable por T.A.C., bien por cortes frontales y/o horizontales, pues ello es posible en esta región, desde las membranas occípito-atloideas hasta la membrana tectoria, pasando por los ligamentos occípito-odontoideos y ligamento cruciforme en su totalidad. Como ya ha quedado expuesto, y coincidiendo con lo comunicado por otros autores como David y cols. (1983) y Floch-Prigent y cols. (1983).

Esta posibilidad de observación permite el diagnóstico de distensiones, elongaciones o roturas de algunos de estos ligamentos, sobre todo del transverso, y conocer así la causa real de una luxación o subluxación atloido-odontoidea actuando en consecuencia para evitar lesiones medulares o bulbares, restableciendo el equilibrio biomecánico de la zona.

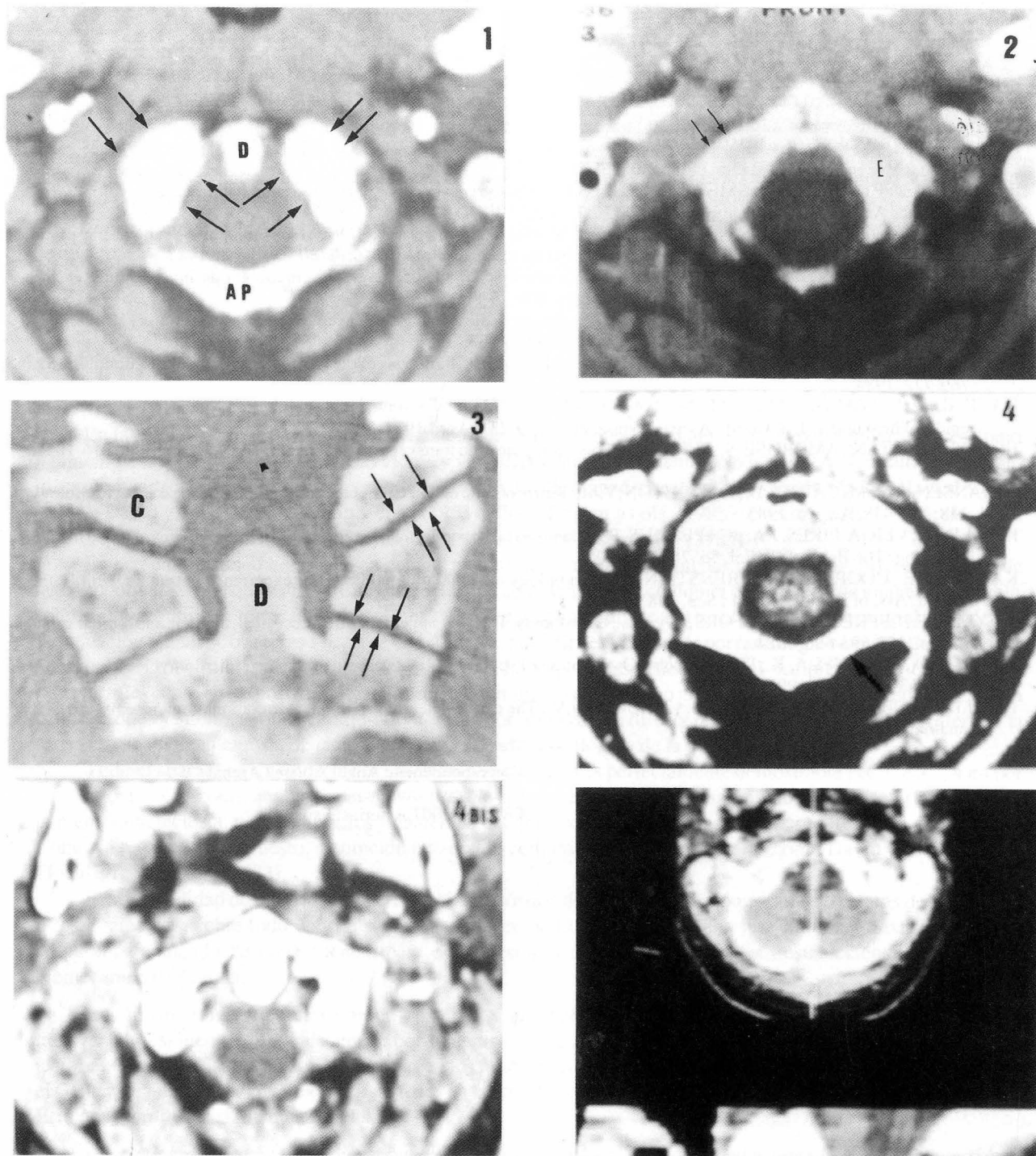
Los ligamentos vertebrales común posterior y anterior, es posible observarlos con T.A.C. en secciones transversales, si bien es difícil el anterior por su escaso grosor; el posterior suele verse fusionado con la membrana tectoria. Cuando existe la posibilidad, como en los niños de talla inferior a 70 cm., de introducir todo el cuerpo en el Gantry, se pueden obtener imágenes sagitales en las cuales se observan en casi su totalidad los ligamentos citados. Esto nos permite las siguientes conclusiones.

- Todas las estructuras anatómicas conocidas de la unión cráneo-raquídea pueden identificarse mediante T.A.C.
- La mayor parte de los ligamentos de las articulaciones que unen cabeza y raquí; son identificables por T.A.C., a excepción de los pequeños refuerzos capsulares.
- Los ligamentos occípito-odontoideos y el ligamento transverso del atlas, con sus prolongaciones formando el ligamento cruciforme, son observables con nitidez.
- Ningún otro método de imagen ha demostrado los ligamentos de la unión cráneo-raquídea con tanta claridad como el T.A.C..

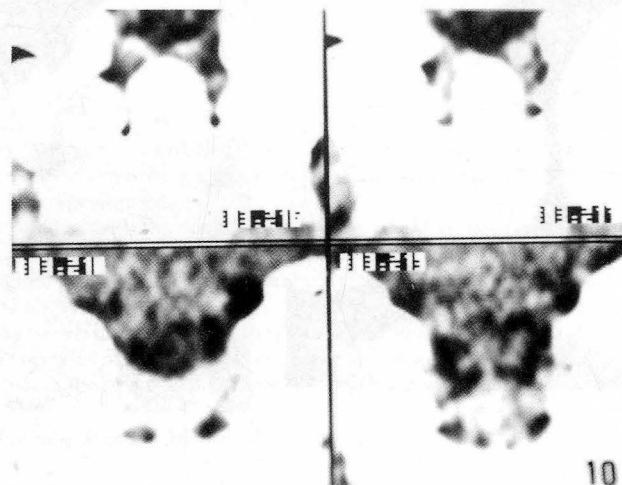
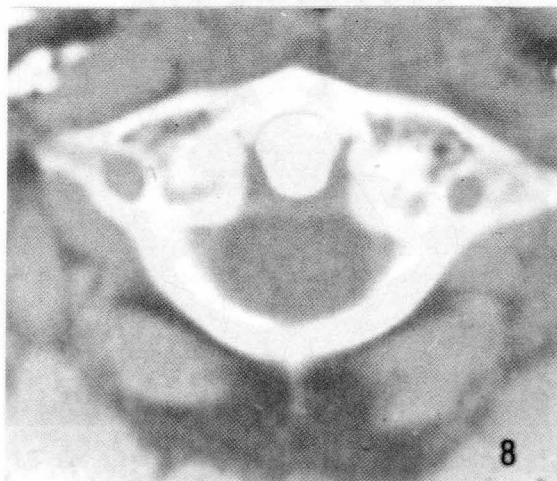
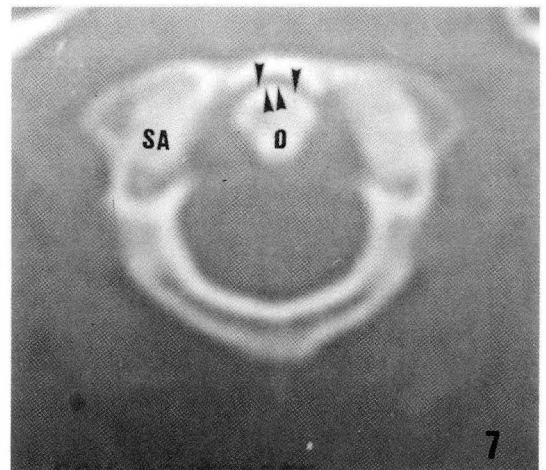
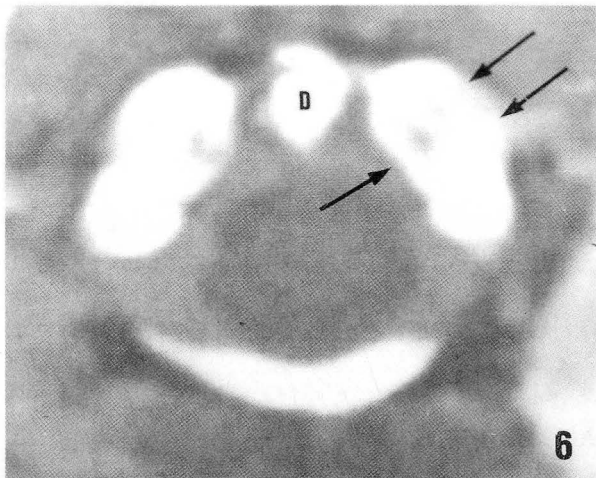
BIBLIOGRAFIA

- APPLBAUM, Y.; GERAD, P. y BRYK, D.: Elongation of the anterior tubercle of a Cervical Vertebral Transverse Process: An Unusual Variant. *Skeletal Radiol* (1983) **10**: 265-267.
- BOEECK, M de; PTVLIEGE, F. y SMEDT, E.: The Accesory Costotransverse Foramen: A. Radioanatomical Study, *Journal of Computer Assisted Tomography* **8** (1) : 117-120. February, 1984.
- DAVID, L.; DANIELS, M. D.; ALAN, L.; WILLIAMS, M. D.; VICTOR, M.; HAUGHTON, M.D.: Computed Tomography of the articulations and ligaments of the occipito-atlanto axial region. *Radiology* **146**: 709-716. March. 1983.
- DUBLIN, A.B.; McGATHAN, J.P. y REID, M. : The value of computed tomographic metrizamide myelography en the neuroradiological evaluation of the spine. *Radiology*, **146**: 79-86, Jan. 1983.
- FLOCH-PRIGENT, L.: Scannographie horizontale du rachis cervical: Comparaison avec les coupes anatomiques. *Bulletin de l'association des Anatomistes*. Vol. 67, número 197. Junio 1983.
- GUERRA, J.; GARFIN, S.R. y RESNIK, D.: Vertebral burst fractures: CT analysis of the retropulsed fragment. *Radiology*, **153**: 769-772. 1984.
- HAYKAL, H.A.; WANG, A.M.; ZAMANI, A.A. y RUMBAUGH, C.L.: Computed tomography of spontaneous acute cervical epidural hematoma. *J. of Comp. Assist. Tomog.* **8**(2): 229-231. April 1984.
- HOUNSFIELD, G.N.; AMBROSE, S.; PERRY, J. y cols.: computerized transverse axial scanning. *Br. J. Radiol.* **46**: 1016-1051. 1973.
- JOHANSEN, J.G.; McCARTY, D.; HAUGHTON, V.M.: Retrosomatic clefts: Computed tomographic Appearance. *Radiology* **148**: 447-448; August. 1983.
- KAISER, M.; VEIGA-PIRES, J.A. y CAPESSIUS, P.: Atlanto-axial impaction and compression of the medula evaluated by C.T. Scanning. *The Br. J. of Radiol.* **56**: 764-766. 1983.
- KASSEL, E.E.; COOPER, W. RUBENSTEIN, J.D.: Radiology of spinal trauma. Practical experience in trauma. *Unit. J. the Canad. Ass. of Radiol.* Vol 34 : Sep. 1983.
- MEYER, J.E.; LEPKE, R.A.; LINDFORS, H. y cols.: Chordomas: Their CT appearance in the cervical, thoracic and lumbar spine. *Radiol.* **153**: 693-696. 1984.
- MIYASAKA, H.; KANELA, K.; ITO, T. y cols.: Ossification of spinal ligaments causing thoracic radiculomyelopathy. *Radiol* **143**: 463-468. May. 1982.
- PECH, P.; DANIELS, D.; WILLIAMS, H. y HAUGHTON, V.: The cervical neural foramina: Correlation of microtomy and C.T. anatomy. *Radiol* **155**: 143-146, 1985.

Correspondencia: Angel Alvarez Arenal
C/ Cardenal Cienfuegos 10, 6º - A
Oviedo 33007 Asturias. España



- FIGURA 1.** Sección horizontal de T.A.C. a nivel de las articulaciones occípito-atloideas. —Superficies articulares superiores del atlas (entre flechas). D: Vértice del diente. A.P.: Arco posterior del atlas.
- FIGURA 2.** Sección horizontal de T.A.C. interesando los cóndilos del occipital (C). (Ventana ósea) E: Esponjosa.
- FIGURA 3.** Sección frontal de T.A.C. (con ventana ósea) Articulaciones Occípito-atloideas y atloido-axoideas laterales (entre flechas). C: Cóndilos del occipital. D: Diente.
- FIGURA 4.** Sección en 4 mm. craneal a la occípito atloidea. — Membrana occípito-atloidea (flecha).
- FIGURA 4bis** Sección horizontal de T.A.C. (ventana de partes blandas) a nivel del atlas.
- FIGURA 5** Reconstrucción sagital en línea media obtenida de múltiples imágenes horizontales desde el occipital a la base de C2.



- FIGURA 6 y 7.** Sección horizontal a nivel de las articulaciones axoideas en T.A.C. – Superficies articulares superiores del atlas (flechas). D. Diente. – Articulación atloido-odontoidea (dobles flechas). S.A.: Sección de las superficies articulares superiores del axis.
- FIGURA 8.** Sección horizontal del T.A.C. (con ventana ósea) a nivel de la articulación atloido-odontoidea.
- FIGURA 9.** Sección horizontal del T.A.C. (con ventana ósea) a nivel de la articulación atloido-odontoidea (ventana de partes blandas).
- FIGURA 10.** Cuatro secciones frontales de T.A.C. de 2 mm. de grosor realizadas cada 2 mm., de delante a atrás, desde el apex del diente al margen posterior del mismo..

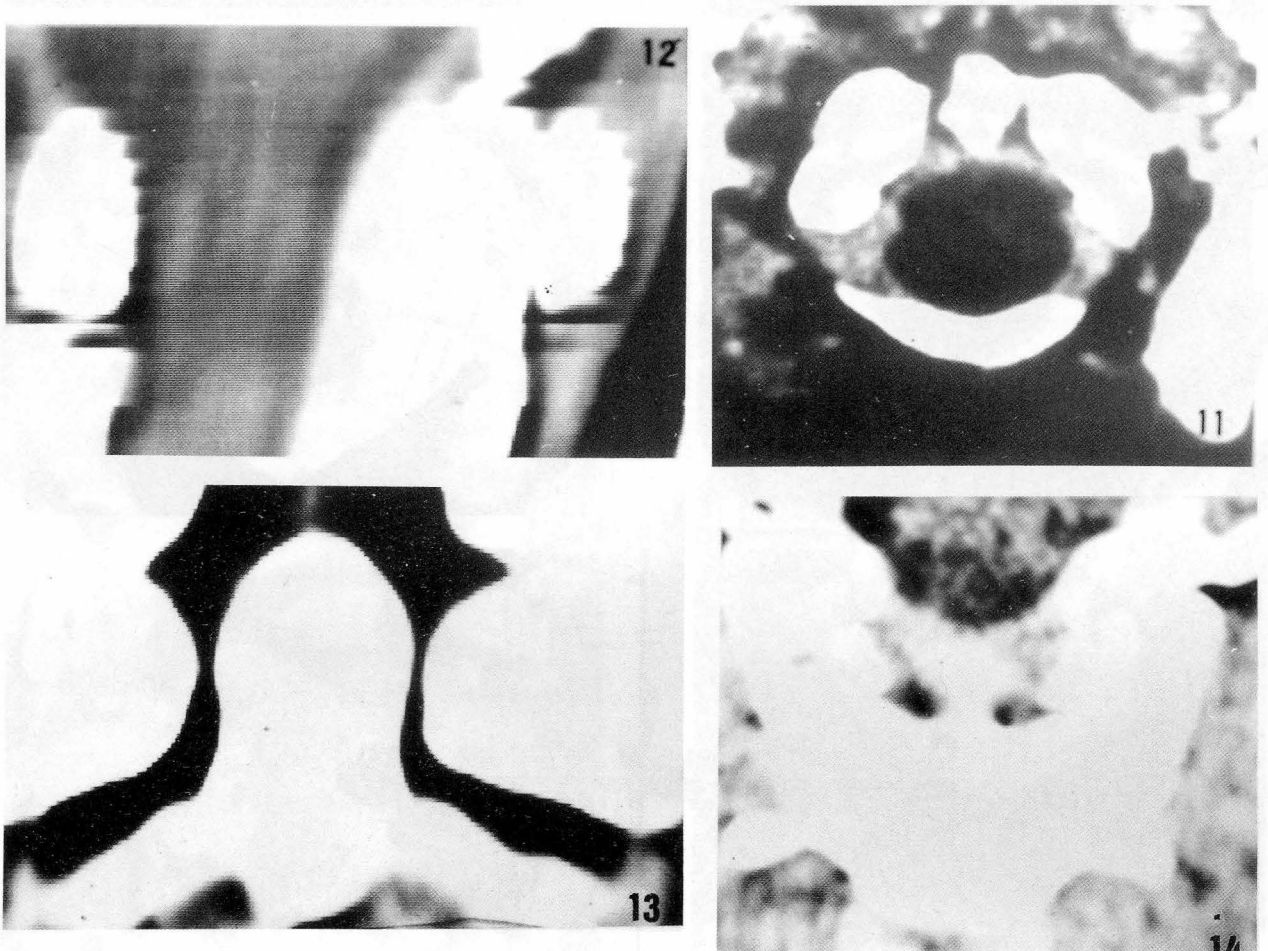


FIGURA 11. Sección horizontal de T.A.C. a nivel de la articulación occípito-atloidea (con ventana de partes blandas).

FIGURA 12. Reconstrucción sagital en línea media desde el occipital a la base de C2.

FIGURA 13. Secciones frontales de T.A.C. que incluyen el vértice del diente y el fino ligamento occípito-odontoiideo.

FIGURA 14. Sección frontal de T.A.C. de 2 mm. de grosor.

MORFOLOGIA DEL AGUJERO OCCIPITAL (*FORAMEN MAGNUM*) HUMANO

MORPHOLOGY OF THE HUMAN *FORAMEN MAGNUM*

A.R. VELILLAS., A. TORRES y R. SARRAT

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Universidad de Zaragoza (España)

RESUMEN

Se ha realizado un estudio sobre la morfología del agujero occipital (*foramen magnum*), utilizando los métodos antropológicos de medidas convencionales, revisando un conjunto de 300 cráneos secos pertenecientes a diversas colecciones anatómicas. También se han añadido estudios radiológicos de rutina y TAC.

El estudio aporta que, junto a la morfología "ovalada" del foramen, clásicamente descrita y aceptada que viene a representar un 58,6% del total, existen otras formas de agujero occipital entre las que se citan las siguientes: "corazón de naípe francés" (12%), "circular" (13,4%), "triangular" (4%) y "rómica-poligonal" (8%); quedando un porcentaje cercano al 4-5% de cráneos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los tipos descritos.

Los autores achacan a la tipología general del cráneo y al grado de protrusión de los cóndilos del occipital la variabilidad morfológica del *foramen magnum*; y sugieren una posible implicación de esa forma en el desarrollo de patología neurológica a nivel troncoencefálico en procesos de enclavamiento de las amígdalas cerebelosas.

PALABRAS CLAVE: *Foramen magnum*. Humano. Morfología. Variedades.

SUMMARY

A study has been carried out on the morphology of the occipital hole (*foramen magnum*), using anthropological methods involving conventional measures and examining a group of 300 skulls coming from various anatomical collections. Radiological routine and TAC studies were also performed.

The study shows that together with the "oval" morphology of the *foramen*, classically described and accepted, which represents 58.6% of the total, other forms of occipital foramen exist among which are included the following: "French card heart" (12%), circular (13.4%), triangular (4%) and polygonal-romboid (8%), leaving around 4-5% of skulls which could not be included in any of the groups described above.

The authors attribute the varied morphology of the *foramen magnum* to the general tipology of the skull and to the degree of protrusion of the occipital condyles, and suggest a possible implication of his shape in the development of the neurological pathology at the brainstem level in the process of siting of the cerebellar amygdales.

KEY WORDS: *Foramen Magnum*. Human. Morphology. Varieties.

Introducción

El agujero occipital ("*foramen magnum*") (F.M.) es uno de los accidentes óseos más importantes de la base del cráneo; con todo y a pesar del interés neurológico y antropológico que posee, no ha sido estudiado con la profundidad que merece. Prueba de ello es que las descripciones clásicas, tan exhaustivas, apenas se limitan a dar de él escuetas referencias.



El propio Testut y Latarjet (1951) indica textualmente: "... este orificio es de forma oval, con diámetro mayor anteroposterior en cuanto a orientación y dirección, y mide un promedio de 35 mms de longitud por 30 de anchura; poniendo en comunicación la cavidad craneal con la medular, dando paso en estado fresco a su través, a..."

Tandler (1928) dirá: "El agujero occipital es de forma ovalada longitudinalmente; Cunningham (1987) indica: "el agujero occipital es de forma ovoidea con la parte más estrecha hacia adelante y su \emptyset anteroposterior varía entre 30 y 40 mm."; Lockhart (1965) describe: "El agujero occipital tiene aproximadamente 38 mm. de \emptyset anteroposterior y 25 mm. de \emptyset trasverso y contiene la porción inferior del tallo cerebral"; Rouviere (1987) refiere: "El agujero occipital es ovalado, de extremo grueso posterior por el que se establece comunicación entre la cavidad craneal y el conducto raquídeo"; Spalteholz (1987) escribe: "El agujero occipital, llamado también "foramen magnum", es un orificio impar, de forma oval, situado en el hueso craneal del mismo nombre"; Gray (1985) indica: "El agujero occipital proporciona una amplia comunicación entre la fosa craneal posterior y el conducto raquídeo; su parte posterior, más ancha, da paso al extremo inferior del bulbo...", con algunas indicaciones sobre inserciones ligamentosas y musculares.

Trabajos basados en la TAC han aportado datos sobre los accidentes de la base del cráneo, sobre todo en relación con intervenciones quirúrgicas en ORL, pero sin concretar nada con respecto al agujero occipital. En este sentido puede citarse los trabajos de Kazan y Sazy (1982), los de Ratner y Quencer (1983) y los de Furuya y cols. (1984).

La colosal aportación antropológica de Olivier (1965-75 y 76) arroja luz sobre la interpretación de los datos obtenidos en nuestro estudio; y describe el "plano foraminal", de extremada utilidad comparativa entre los diversos grupos étnicos, pero no añade a las descripciones clásicas ningún parámetro de interés sobre la morfología del *foramen magnum*.

Material y Métodos

A la vista de los antecedentes reseñados, nos propusimos realizar un estudio sobre el agujero occipital que abarcó 3 vertientes: la puramente anatómica, la radiológica convencional y la de TAC. En el primer apartado estudiamos un total de 300 cráneos, pertenecientes a distintas colecciones; elegimos 100 sujetos sin patología para la radiología y el TAC, a los que se practicó las proyecciones convencionales.

En todos los casos se realizó un estudio de la morfología del *foramen* y se tomaron las medidas usuales en craneometría, destacando los diámetros anteroposterior y trasversal.

Resultados

Cuando se estudia la morfología del *foramen magnum* (F.M.), se advierte enseguida que ésta es consecuencia en parte de la tipología general del cráneo y que su primitivo contorno se ve modificado por el grado de prominencia que los cóndilos del occipital se realiza sobre él.

De esta manera no será difícil comprender cómo además de la forma *ovalada* clásica (58,6%), asignada al F.M., coexisten otras muy frecuentes cuales son las que se observan en la Fig. 1. En ella puede apreciarse que una de las siluetas más típicas del F.M. es la denominada "en corazón de naipe francés" (1). En este grupo cuyo porcentaje asciende al 12%, se enmarcan todos aquellos F.M. que, siendo primitivamente redondos o redondeados, tienen los cóndilos del occipital bastante juntos oralmente, y estos hacen marcada prominencia en el interior del F.M., deformando anterolateralmente su silueta.

En (2) podemos apreciar la variedad "circular" (13,4%), frecuente patrimonio de cráneos braquicéfalos, con un contorno del agujero occipital totalmente redondo y con un diámetro aproximado de 35 mm. Suelen ser cráneos gráciles con los cóndilos "retirados" y con un reborde óseo del F.M. poco relevante.

MORFOLOGIA DEL AGUJERO OCCIPITAL (*FORAMEN MAGNUM*) HUMANO

En el apartado (3) podemos observar la habitual morfología propuesta como standar en las descripciones clásicas, es decir, la forma *oval* (58,6%), observada frecuentemente en cráneos de la variedad dolicocefala, aunque no exclusiva de ellos, de contorno limpio, sin protrusión condílea y con un diámetro longitudinal entre los 40-46 mm., frente a diámetros transversos de 25-30 mm. en los casos extremos.

La variedad (4) denominada "triangular" (4%) es rara pero muy llamativa cuando se observa. Se trata de un F.M. con una separación condílea considerable y con un contorno oral del mismo ligeramente incurvado formando la base del triángulo, que se contrapone al vértice, situado en la horquilla posterior del agujero. Son forámenes amplios, pertenecientes a cráneos robustos mesocéfalos.

Las variedades "rómbrica" (5) y "poligonal" (6), con porcentajes de un 8% en conjunto, son difíciles de delimitar, ya que se trata de F.M. con contornos rectilíneos a tramos, formando entre ellos angulaciones diversas. Hemos visto estas variedades en distintas tipologías craneales sin preferencia por ninguna de ellas.

Las morfologías del F.M. que acabamos de expresar tienen sin duda un matiz subjetivo de apreciación no ya en las medidas, sino en la adjudicación de una determinada forma. Con todo hay un porcentaje de cráneos, cercano al 4% según las series, que hemos renunciado a etiquetar por no poderse incluir en ninguna de las variedades descritas.

Discusión

Los resultados del presente estudio indican la variabilidad morfológica del F.M. y que, como ocurre casi siempre que se revisa un dato anatómico consagrado por el tiempo, pueden añadirse matices de interés. Es cierto que el F.M. es habitualmente ovalado en sentido anteroposterior, pero no son raras las demás morfologías que hemos aportado, y que, en algunos casos, superan por separado el 10%.

La morfología craneal y la posición en los cóndilos occipitales son dos datos a tener en cuenta a la hora de determinar las características del *Foramen magnum*. Aunque las formas ovales o redondeadas son patrimonio de cráneos dolicocefalos y braquicefalos respectivamente, no puede tampoco este hecho ser definitivo, ya que un grupo significativo de cráneos no cumplen esa relación.

La morfología del F.M. se nos antoja de importancia para el neurólogo y el neurocirujano a la hora de valorar la predisposición al enclavamiento de amígdalas cerebelosas en caso de descensos del tronco cerebral, ya que los diámetros transversos grandes (agujeros redondos y triangulares) concederán mayor permisividad en los casos antecitados y serán menos propensos a crear problemas de espacio, que serán por ende más frecuentes y graves en F.M. de morfología oval.

BIBLIOGRAFIA

- FURUYA, Y. et al.: Computerized tomography of cranial sutures. *J. Neurosurg.* **61**: 53-58, 1984.
 LOCKHART, R. D.: Anatomía Humana. Ed. Interamericana. México, 1965.
 OLIVIER, G.: Anatomie Anthropologique. Ed. Vigot Frères. París. 1965.
 — Biometry of the human occipital bone. *J. Anat.* **120**: 507-518. 1975.
 — Biometrie de la base du crâne. *Anthropologie (París)* **80**: 277-299. 1976.
 RATNER, L.M. and QUENCER, R. M.: Nonunited ossification center of the presphenoid bone, pseudomeningioma. *Amer. J. Radiol.* **141**: 503-506. 1983.
 ROMANES, G.J.: Cunningham Tratado de Anatomía. 12ª ed. Ed. Interamericana. Madrid. 1987.
 ROUVIERE, H. y DELMAS A.: Anatomía Humana. Ed. Masson, S.A. Barcelona. 1987.
 SPALTEHOLZ, W.: Atlas de Anatomía Humana. Ed. Labor, S.A. Barcelona. 1987.
 TANDLER, J.: Anatomía sistemática. Ed. Salvat. Barcelona. 1928.
 TESTUT, L. y LATARJET, A.: Tratado de Anatomía Humana. Ed. Salvat. Barcelona. 1951.
 WILLIAMS, P.L. y WARWICK, R.: Gray Anatomía. Ed. Salvat, S.A. Barcelona. 1985.

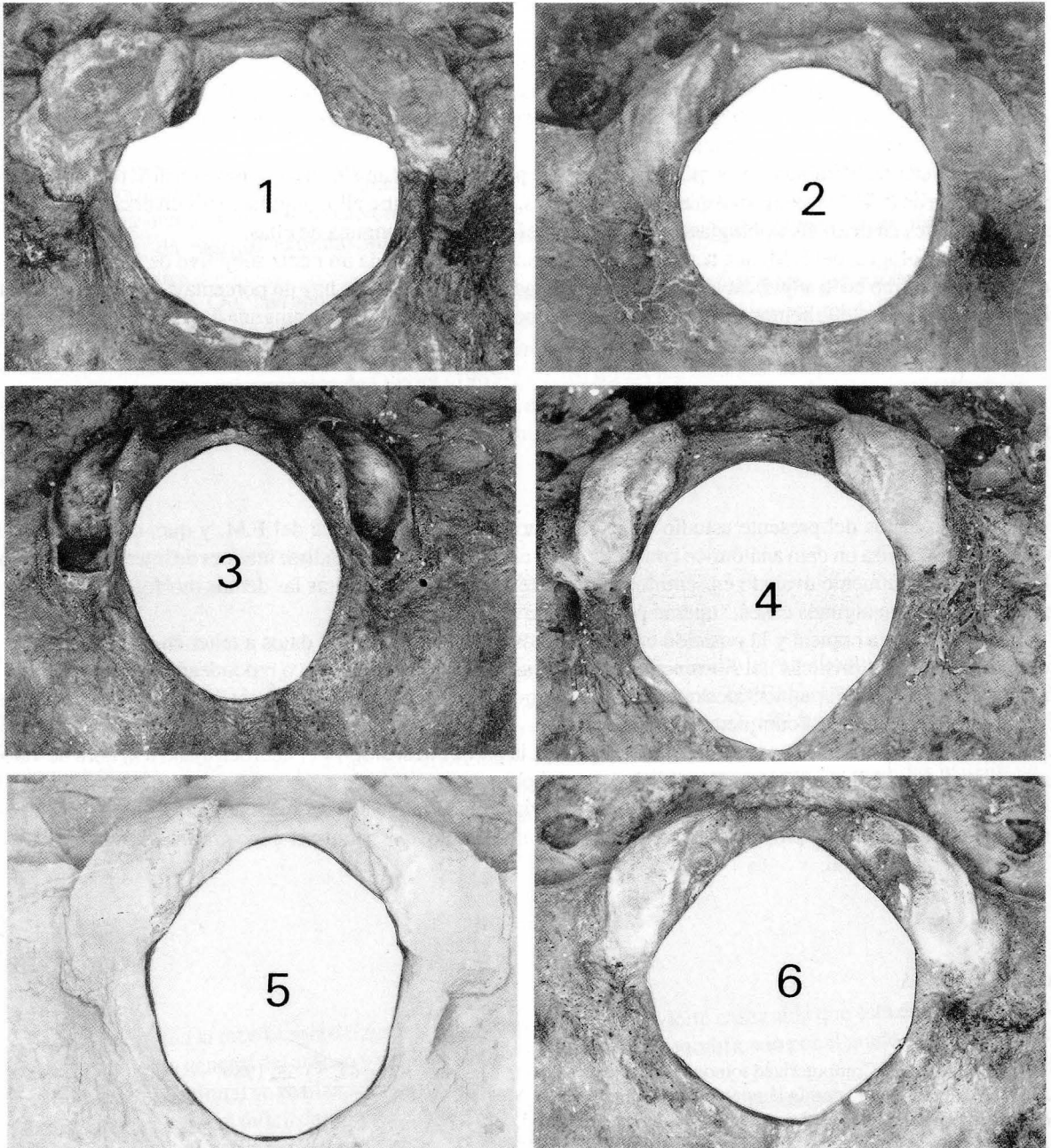


FIGURA 1. Diversos aspectos de la morfología del *Foramen magnum* humano: 1. En "corazón de naipe francés". 2. Circular. 3. Oval. 4. Triangular. 5. Rómbico. 6. Poligonal.

Index

	Págs
AISA, J.; AZANZA, M.J.; PEG, M.T.: Postnatal development of the intestine innervation of gallus	3
AISA, J.; PARRA, P.; AZANZA, M.J.: Ultrastructural characteristics of the intestine innervation of gallus	13
AMAT, P.: The ependymus of the tuberoinfundibular region of the third ventricle and its relationships with neuroendocrine mechanisms	21
ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; COSTA-LLOBET, C.; RUANO-GIL, D.: Glio-vascular relationship in fimbria hippocampi of fighting bull	31
CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; TORRES, J.L.; MONTERO, M; BLANCO, E; RIESCO, J.M.; VAZQUEZ, R.: Morphometric study of the follicular cells of the thyroid gland of rats treated with methimazol	37
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, E.; VAZQUEZ, R.: Scanning electron microscopy study of the supraependymary cells of the organum vasculosum laminae terminali (O.V.L.T.) of the cat and dog	45
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; BLANCO, E.; VAZQUEZ, R.: Inmunocytochemical study of elements reactive to glial fibrillary acid protein in the median eminence of the rat	51
LOPEZ ARIZTEGUI, L.; SARRIA, R.; LOSADA, J.: Morphological changes in the subformal organ of the rat after dehydration and experimental stress	57
MARTINEZ CIRIANO, C.; BLASCO, J.; NIETO, J.L.; GARUZ, J.; MARTINEZ-MILLAN, L.: A study of reciprocal connections between the thalamus and the auditory cortex in the rabbit	65
MORATALLA, G.; ROSETY, M.; FERNANDEZ TRUJILLO, F.J.: Histoenzymological study of the L.D.H. enzyme activity in the chicken's cerebellum (<i>Gallus domesticus</i> , L.) in different physical and chemical conditions	75
NIETO, J.L.; TORRES, A.M ^a : Contribution to the histoenzymatic study of the vagina	83
PADILLA, F.; PUERTA, F.; BUSTOS, M.: Differences on the development <i>in vitro</i> of ciliary ganglia dependent of the substratum and age. I. collagen	87
ROJAS, C.; PÒBLADOR, M ^a . S.; RAYA, A.; CASARES, J.A.; LANCHO, J.L.: Effect of adriamycin on gonadotrope cells of the normal rat	97
SUANES CABELLO, A.; RIBES BLANQUER, R.; CARPINTERO BENITEZ, P.; MESA RAMOS, M.: Contribution to knowledge of accessory bones of foot	107
SUANES, S.; COSTILLA, S.; ALVAREZ-ARENAL, A.; CABAL, V.J.; AGUADO, F.: C.T. Evaluation of ligaments and joints of cráneo-raquídeal union	113
VELILLAS, A.R.; TORRES, A.; SARRAT, R.: Morphology of the human <i>foramen magnum</i>	121

NORMAS DE PUBLICACION

La revista ANALES DE ANATOMIA es una publicación que edita trabajos originales de Ciencias Morfológicas. Estos deberán ser inéditos y no podrán ser presentados simultáneamente en otras publicaciones.

Los trabajos, con un máximo de 10 folios, a doble espacio, por una cara debidamente mecanografiados, serán enviados, por duplicado, al Director de ANALES DE ANATOMIA, Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, calle Domingo Miral, s/n, 3ª planta, 50009 Zaragoza.

El conjunto del trabajo se presentará según el siguiente orden: página identificativa del trabajo, resumen en castellano y palabras clave, resumen en inglés y palabras clave, texto ordenado en sus correspondientes apartados, bibliografía. Al final del trabajo, se hará constar la dirección postal del primer firmante. Todas las hojas irán numeradas correlativamente en el ángulo superior derecho.

En la primera hoja se indicarán los siguientes datos y en este orden: título del artículo, traducción del título al inglés, iniciales y apellidos de los autores, centro donde se ha realizado el trabajo y, en su caso, universidad a la que pertenece. No se harán constar los cargos académicos de los firmantes.

La iconografía irá numerada de manera correlativa y conjunta como figuras. Solo se aceptarán fotografías en blanco y negro, exigiéndose la adecuada calidad y en número que no exceda de tres planchas de composición. Estas estarán compuestas por láminas enteras de 23 x 16 cms. Al dorso de cada fotografía se anotará suavemente con lápiz el título abreviado del trabajo.

Los gráficos se dibujarán con tinta china u otras técnicas de impresión fuerte y clara. Las tablas se presentarán en hoja aparte, admitiéndose una sola tabla por hoja. En ambos casos se tendrá en cuenta el tamaño de los números y letras para su correcta lectura una vez compuesta la revista.

La bibliografía se dispondrá ordenando las citas por orden alfabético de autores, de acuerdo con el siguiente ejemplo: OSMAN, D.I. y PIONEN, L. (1978). The Mammalian tubuli... Anat. Rec. 192 1-18. Cuando se trate de libros: WILLIAMS, R.H. (1974). Endocrinology, 524-526. B. Saunders Co. Philadelphia.

El Comité de Redacción acusará recibo de los trabajos enviados a ANALES DE ANATOMIA e informará a los autores acerca de la aceptación de los originales o de las modificaciones que juzgue necesario introducir para su publicación. El autor firmante en primer lugar recibirá separatas de su trabajo libres de todo gasto. En caso de no ser aceptadas para su publicación, las colaboraciones serán devueltas a sus autores.

El autor firmante en primer lugar recibirá unas pruebas impresas del artículo para su corrección, que deberá devolver una vez revisadas al Director de la revista en el plazo de siete días.



Indice

	Págs.
AISA, J.; AZANZA, M.J.; PEG, M.T.: Desarrollo postnatal de la inervación del intestino en Gallus	3
AISA, J.; PARRA, P.; AZANZA, M.J.: Características ultraestructurales de la inervación del intestino de Gallus	13
AMAT, P.: El ependimo de la región tuberoinfundibular del tercer ventrículo y sus relaciones con los mecanismos neuroendocrinos	21
ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; COSTA-LLOBET, C.; RUANO-GIL, D.: Relación Glio-vascular en la fimbria del hipocampo del toro de lidia	31
CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; TORRES, J.L.; MONTERO, M; BLANCO, E; RIESCO, J.M.; VAZQUEZ, R.: Estudio morfométrico de las células foliculares de la glándula tiroidea de ratas tratadas con metimazol	37
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, E.; VAZQUEZ, R.: Estudio con el microscopio electrónico de barrido de las células supraependimarias del organo vasculoso de la lámina terminal (O.V.L.T.) de gato y perro	45
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; BLANCO, E.; VAZQUEZ, R.: Estudio inmunocitoquímico de los elementos reactivos a la proteína glial fibrilar ácida en la eminencia media de la rata	51
LOPEZ ARIZTEGUI, L.; SARRIA, R.; LOSADA, J.: Repercusiones morfológicas de la deshidratación y el stress experimental sobre el órgano subfornical de la rata	57
MARTINEZ CIRIANO, C.; BLASCO, J.; NIETO, J.L.; GARUZ, J.; MARTINEZ-MILLAN, L.: Estudio de conexiones recíprocas entre el tálamo y el córtex auditivo en el conejo	65
MORATALLA, G.; ROSETY, M.; FERNANDEZ TRUJILLO, F.J.: Estudio histoenzimológico de la actividad L.D.H. en el cerebelo del pollo (<i>Gallus domesticus</i> , L.) en diferentes condiciones fisicoquímicas	75
NIETO, J.L.; TORRES, A.M ^a : Aportación al estudio citoenzimológico de la vagina	83
PADILLA, F.; PUERTA, F.; BUSTOS, M.: Diferencias en el desarrollo de los ganglios ciliares <i>in vitro</i> dependientes del substrato y de la edad. I. Colágeno	87
ROJAS, C.; POBLADOR, M ^a . S.; RAYA, A.; CASARES, J.A.; LANCHO, J.L.: Efecto de la adriamicina sobre las células gonadótropas de rata normal	97
SUANES CABELLO, A.; RIBES BLANQUER, R.; CARPINTERO BENITEZ, P.; MESA RAMOS, M.: Aportación al estudio de los huesos accesorios del pie	107
SUANES, S.; COSTILLA, S.; ALVAREZ-ARENAL, A.; CABAL, V.J.; AGUADO, F.: Valoración mediante T.A.C. de alta resolución de los ligamentos y articulaciones de la unión craneo-raquídea	113
VELILLAS, A.R.; TORRES, A.; SARRAT, R.: Morfología del agujero occipital (<i>foramen magnum</i>) humano	121