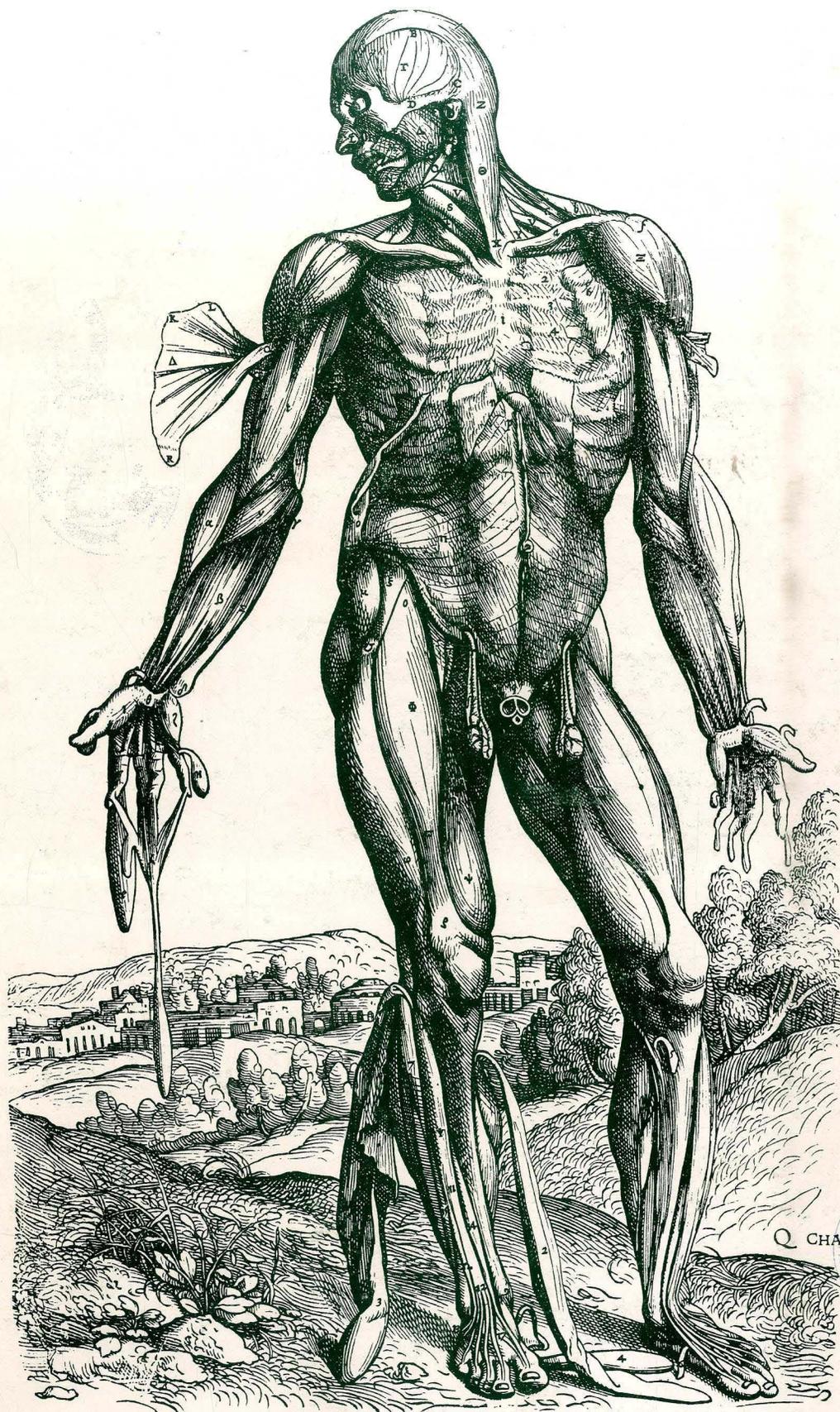


ANAIRES DE ANATOMIA



08 AGO. 1990
BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
ZARAGOZA - ESPAÑA

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 y maquetación de textos: M^a José Lisa, Antonio M. Montañés

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 XXXVI

Junio 1990

Núm. 93



SUPERFICIE EPENDIMARIA DEL CUARTO VENTRICULO DE RATA VISTO CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO

EPENDYMARY SURFACE OF THE RAT FOURTH VENTRICLE STUDIED WITH THE SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

A.J. ALVAREZ-MORUJO, F.E. PASTOR, D. TORANZO, J.L. BLAZQUEZ y P. AMAT

Departamento de Anatomía e Histología humanas y Departamento de Investigación y Microscopía Electrónica. Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

RESUMEN

Se ha estudiado la superficie endimaria del techo y del suelo del cuarto ventrículo de la rata adulta con el microscopio electrónico de barrido (MEB). Se describen las estructuras intraventriculares que son propias de los endimocitos, los elementos supraendimarios y otras formaciones que siendo intraventriculares no se demuestran que sean propias de los endimocitos o que sean supraendimarios. Entre los primeros se analizan: los cilios, las microvellosidades y las yemas o protrusiones; poniéndose de manifiesto las diferencias regionales, en cuanto a la distribución de los cilios, sus zonas de abundancia, de escasez y las transicionales. Las microvellosidades visibles en las zonas no muy abundantes en cilios también muestran patrones diferentes en la forma de agruparse. En estas mismas zonas escasas en cilios se estudian las yemas o protrusiones y las peculiares conexiones de estas con la superficie apical de los endimocitos. De los elementos supraendimarios se analizan, tanto las fibras como las células, sus agrupaciones, la densidad, y su morfología; encontrándose en las células semejanzas con los tipos descritos en el tercer ventrículo; y en las fibras, bastante abundantes, unas singulares agrupaciones. Por último se estudian elementos, de muy peculiar morfología que no son catalogables claramente en ninguno de los grupos anteriores, con la MEB. Se valora la posibilidad de que las diferentes variaciones en número y forma de elementos pueden estar en relación con el momento funcional de los endimocitos, y la posibilidad de existir un sistema rápido de comunicación intraventricular a través de las fibras supraendimarias. Asimismo las protrusiones o yemas podrían ser un paso previo para liberación intraventricular de productos desde los endimocitos.

PALABRAS CLAVE: Epéndimo, cuarto ventrículo, elementos supraendimarios, microscopio electrónico de barrido, rata.

SUMMARY

The endymary surface of the roof and floor of the fourth ventricle of adult rats was studied with a scanning electron microscope; the following are described: 1) intraventricular structures characteristic of the endymocytes (cilliae, microvilli and buds); 2) supraendymary elements (supraendymary cells and beaded fibres similar to axons); 3) other formations, difficult to identify as pertaining to either of the above groups.

Regional differences in the distribution of these elements in the fourth ventricle were manifest only in the case of the cilliae. The medial and lateral zones of the floor were highly cilliate, whereas there were few cilliae in the paramedial zone. On the roof, the medial zones were the richest in cilliae but the number of these decreased towards the periphery, such that the lateral zones were practically free of these structures.

Supraendymary cells were observed on both the floor and roof of the fourth ventricle, with no preferential trend for any particular zone. Their morphology was variable and they resembled those of third ventricle. The beaded nerve fibres did not show any specific distribution; in some cases they seemed to converge into the apical pole of an endymocyte.

Other elements in the form of thin pedicule with polymorphous endings were also detected; these were different to the cilliae, microvilli and buds, and thus difficult to identify as structures characteristic of the ependymary cells or as supraependymary elements independent of them.

KEY WORDS: Ependyma, fourth ventricle, supraependymal elements, scanning electron microscopy, rat.

Introducción

El epitelio de recubrimiento de los ventrículos cerebrales, el epéndimo, ha sido estudiado por numerosos autores mediante diversas técnicas. Desde el inicio de estas investigaciones se puso de manifiesto la existencia de diferencias regionales (Stundnicka, 1900) y la presencia de varios tipos celulares que constituyen la capa ependimaria (Knowles, 1972). Los cilios, las diferentes formas de agruparse las células y sus singulares propiedades en las distintas regiones (Duvernoy y Korite, 1965), así como el contacto de prolongaciones y somas neuronales con el líquido céfalo-raquídeo (LCR) (Cajal, 1909) y la existencia de células dentro de los ventrículos (Kolmer, 1921) son hechos que pudieron ser demostrados con la microscopía óptica y corroborados por abundantes trabajos, en el ventrículo diencefálico por la microscopía electrónica de transmisión (MET) (Clementi y Morno, 1972; Bruni y cols., 1972; Peters y cols., 1976) y de barrido (MEB), particularmente efectiva para la investigación de las formaciones supraependimarias (Scott y cols., 1973; Coates, 1973; Leslie y cols., 1978).

Los estudios de la superficie ependimaria del cuarto ventrículo con el MEB son muchos más escasos que los llevados a cabo en el tercero, si se exceptúa los referentes a zonas muy concretas, como el área postrema, considerada el órgano circunventricular del cuarto ventrículo (Hoffer, 1958).

El área postrema ha sido estudiada en diversas clases y especies animales como en aves (Hirunagi y Yasuda 1979), en roedores (Torack y Finke, 1971), y en otros mamíferos incluido el hombre (Klara y Brizze, 1977; Scott y cols., 1973). Además de esta región, otros autores han visto mediante estudios con MET y MEB características morfológicas semejantes a los órganos ventriculares en el receso colicular y en el órgano del receso colicular (Stumpf y cols., 1977; Mitro y Kiss, 1978), así como en el receso rombencéfalico (Krisch y Leonhardt, 1978).

Algunas regiones del suelo del cuarto ventrículo han sido estudiadas con el MEB en la rata (Stumpf y Barbero, 1978; Singh y cols., 1980), en el ratón (Yamadori, 1975), en el mono (Shing y cols., 1980), y en embriones y en fetos humanos (Scott y cols., 1973). Los escasos estudios del techo del cuarto ventrículo con el MEB han sido hechos en los anfibios (Jones, 1979) y en las aves (Hirunagi y Yasuda, 1979); en los mamíferos, únicamente en el ratón (Oda y Nakanishi, 1987) ha sido examinada la parte posterior de dicho techo.

La escasez de trabajos con el MEB sobre el cuarto ventrículo, arriba indicada, justifica la realización del presente trabajo en el que exponemos nuestras observaciones sobre el suelo y el techo de este ventrículo con el MEB, varias de las cuales han sido dadas previamente a conocer en algunas comunicaciones a congresos (Alvarez-Morujó y cols., 1986; 1987).

Material y Métodos

Para el presente estudio se han utilizado 15 ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley: 7 hembras y 8 machos, con edades de 2 a 3 meses que habían permanecido en un estabulario, con ritmo luz diurna-obscuridad nocturna, temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, humedad relativa del aire $68 \pm 5\%$, dieta equilibrada y agua ad libitum.

Todos los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una dosis única de pentobarbital sódico (30 mgr./kgr. de peso). Posteriormente, mediante presión controlada, fueron perfundidos intraventricularmente con suero fisiológico heparinizado a temperatura corporal. Completada la limpieza del árbol vascular, se introdujo a través de la misma vía glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0,1 M a un pH de 7,4. Una vez finalizada la perfusión fijadora, se extrajeron los cerebros, que fueron inmersos en la misma suspensión fijadora

durante 12 horas, a 4° C; después se procedió a la separación del techo y el suelo del cuarto ventrículo mediante la sección de los pedúnculos cerebelosos, la tela coroidea y el velo medular anterior. De cada una de las dos piezas resultantes, techo y suelo, se obtuvo, mediante dos cortes transversales, tres porciones: caudal, media y craneal. Estas porciones fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1%, deshidratadas con acetonas crecientes, desecadas mediante el punto crítico y finalmente metalizadas con oro. Todas las muestras así obtenidas fueron observadas con el MEB Philips PSEM-500.

Resultados

El examen de nuestro material ratifica en parte las observaciones expuestas anteriormente en comunicaciones a congresos, y permite, además, aportar nuevos datos. Sintetizaremos los resultados en una serie de apartados.

1. Descripción de estructuras intraventriculares que son propias de los endimocitos

Entre las estructuras intraventriculares propias de los endimocitos cabe señalar los cilios, las microvellosidades, y las yemas o protrusiones, por regla general esféricas, que están unidas al polo apical del endimocito por un pedículo.

Los elementos más sobresalientes son, sin duda, los cilios, cuyo número difiere de unos territorios a otros. Hay territorios de gran densidad ciliar, otros desprovistos de ellos, y otros en los que las zonas calvas alternan con zonas ciliadas. Nuestros resultados con respecto a esta diferente densidad de cilios y a su distribución son:

A) *Cilios*. En el suelo del cuarto ventrículo las zonas más densamente ciliadas son las del surco medio en toda su longitud. En la región caudal esta zona densa cubre también las eminencias determinadas por el núcleo del haz solitario (Fig. 1) de ambos lados, terminando por tanto en la línea de encuentro con el techo; más cranealmente, los límites laterales de la zona ciliada densa son los territorios del épendimo levantados por los núcleos vestibulares. En las regiones anteriores, las zonas densas en cilios se alargan hasta cerca del ascenso del epitelio endimario por los pedúnculos cerebelosos.

Los territorios paramedianos (Fig. 2), interpuestos entre las zonas más mediales y las laterales, y el inicio del receso lateral (Fig. 6), son los más escasos en cilios, bien por existir endimocitos con escasos penachos ciliares o bien porque hay células aciliadas que alternan con otras ciliadas.

En las regiones más externas del receso lateral, el epitelio vuelve a ser denso en cilios, pero menos que en las zonas mediales.

En el techo del cuarto ventrículo las zonas más ciliadas son las mediales, incluyendo el receso cerebeloso, perdiendo densidad a medida que las zonas se hacen más laterales. La transición puede ser brusca (Fig. 5) hacia territorios completamente carentes de cilios, o más gradual intercalándose entre ellos territorios con cilios, pero más escasos (Fig. 8).

Tanto en el épendimo del velo medular anterior como en el posterior, los cilios son abundantes. Ni en los plexos coroideos ni en la membrana tectoria se han encontrado cilios (Fig. 12), exceptuando algunos penachos, muy ocasionales, en las porciones de inicio de esta membrana. Lo mismo ocurre en el área postrema, que es un territorio también aciliado (parte superior de la figura 1).

B) *Microvellosidades*. Como es lógico, en las zonas densamente ciliadas, los cilios impiden la visión del polo apical del endimocito y por lo tanto la de las microvellosidades que puedan existir. Por ello hemos estudiado las microvellosidades en las zonas escasas en cilios y en las aciliadas, las cuales no muestran un patrón homogéneo de distribución.

En determinadas zonas, como la membrana tectoria (Figs. 5 y 3), las microvellosidades tapizan completamente la superficie apical de las células endimarias. Por el contrario, algunos lugares del techo carecen de microvellosidades (Fig. 8). En otras regiones, las microvellosidades sólo tapizan parcialmente a la superficie apical del endimocito, unas veces formando franjas periféricas alrededor de un centro liso cupulado hacia la luz, lo que es

frecuente en el epéndimo del recubrimiento cerebeloso (Fig. 4); otras veces coincidiendo en una misma célula las microvellosidades, los espacios lisos y un penacho ciliar (Fig. 2).

C) *Protrusiones o yemas intraventriculares*. En las zonas escasas en cilios, tanto en el techo como en el suelo del cuarto ventrículo, se pueden ocasionalmente ver yemas o protrusiones intraventriculares que sobresalen de los endimocitos. Estas yemas son de diferentes tamaños; unas veces están conexas con los endimocitos mediante un pedículo (Fig. 2) y otras brotan desde ellos en una forma sésil.

2. Elementos supraependimarios

Los elementos supraependimarios son los que yacen sobre el epéndimo; son independientes de los endimocitos, es decir que no son estructuras propias de los mismos. Se trata, por lo tanto, de elementos intraventriculares, bañados por el LCR.

A) *Células supraependimarias*. Los elementos supraependimarios más conspicuos son, sin duda, las células supraependimarias. Estas células existen en el suelo y en el techo del cuarto ventrículo de rata (Figs. 6 a 9), y su número es menor que en otras especies animales. En el caso de la rata son más escasas en el cuarto que en el tercer ventrículo. No se ha encontrado ningún tipo de preferencia en cuanto a situarse en zonas de una densidad específica en cilios, habiéndolas encontrado en las zonas calvas y en las moderadamente ciliadas. Sin embargo, obviamente resaltan más donde los cilios son escasos o no existen.

La forma de las células supraependimarias puede ser cilíndrica, ovoidea o estrellada, con prolongaciones que varían en número, grosor y longitud (Figs. 6 a 9). Las prolongaciones de estas células son difíciles de seguir en las zonas ciliadas por ocultarse en seguida bajo los cilios. En las células supraependimarias estudiadas en las zonas carentes de cilios, se observa que sus prolongaciones confluyen, aparentando uniones, para formar redes (Fig. 9). Las superficies de estas células pueden ser lisas (Fig. 8), o ligeramente arrugadas con pequeñas espículas aisladas (Fig. 6).

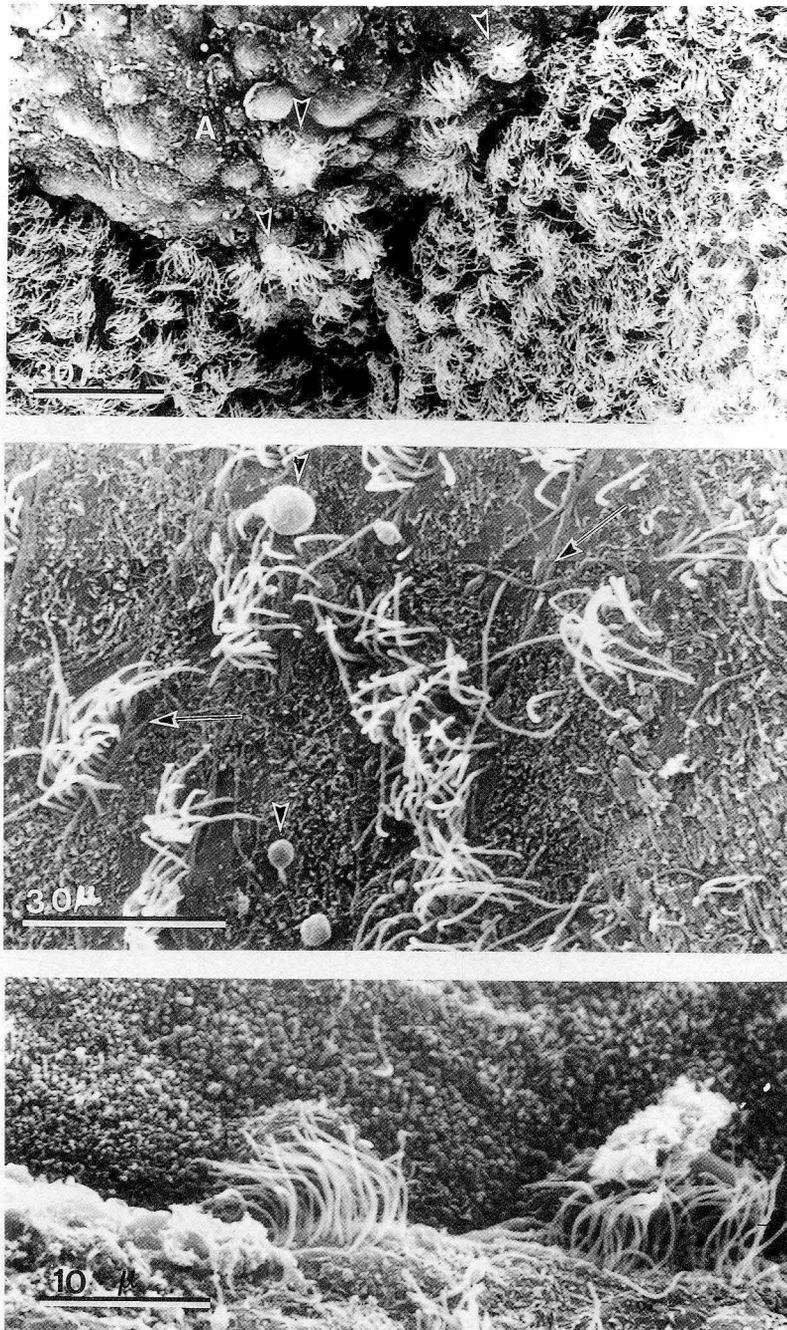
B) *Fibras arrosariadas semejantes a axones*. Otros elementos clásicamente considerados supraependimarios son las fibras arrosariadas semejantes a axones, que por su aspecto se ha sugerido sean neurosecretoras. Estas fibras son muy numerosas en el cuarto ventrículo. En muchas ocasiones se observan entrecruzándose unas con otras, dando la apariencia de redes, profusamente distribuidas por amplias zonas de la superficie endimaria (Figs. 2, 6 y 7). En contraste con la distribución anterior, existen zonas, principalmente en el techo ventricular, donde varias de estas fibras arrosariadas confluyen en el polo apical de un endimocito (Fig. 4). El origen y terminación de estas fibras no es claro, pero a veces parecen emerger o concluir en las propias células del epéndimo, por lo que quizá estas fibras se podrían incluir en el apartado siguiente.

Se debe insistir que todos estos elementos son más visibles en los territorios poco ciliados, pero ello no significa que no existan en los otros.

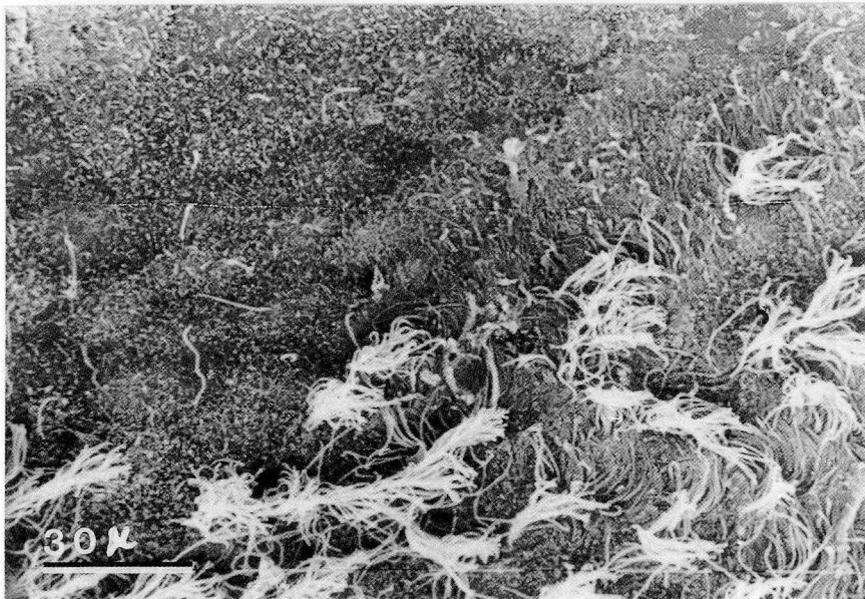
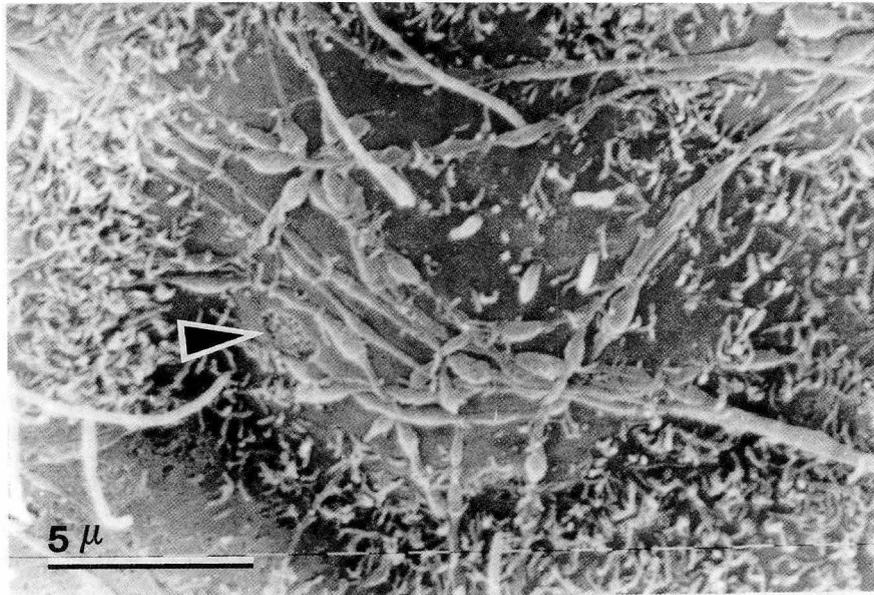
3. Elementos que son intraventriculares, pero que no hay evidencias de que sean propios de los endimocitos o sean supraependimarios

Nos referimos a unas finas prolongaciones cuyos extremos acaban en ensanchamientos polimorfos (unos en forma de corazón, otros lanceolados, en forma de racimo, etc.), tan abundantes que ocultan la superficie de los endimocitos subyacentes, por lo que no se puede afirmar ni negar la dependencia de aquéllos al endimocito. Estas prolongaciones son de escaso calibre, algo mayor al de los cilios, y se han localizado en el surco craneomedial a la eminencia levantada por el núcleo del haz solitario (Fig. 10 y 11).

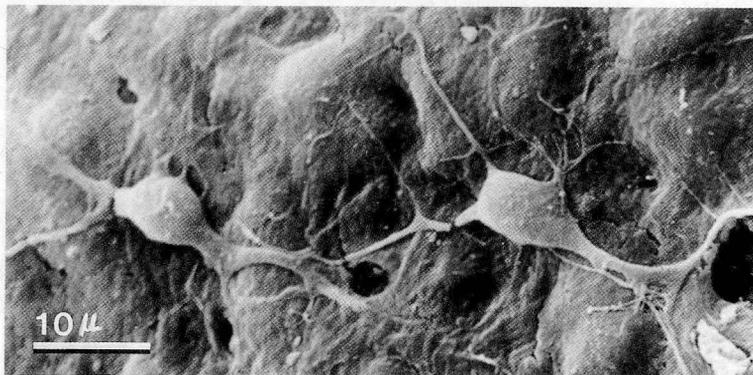
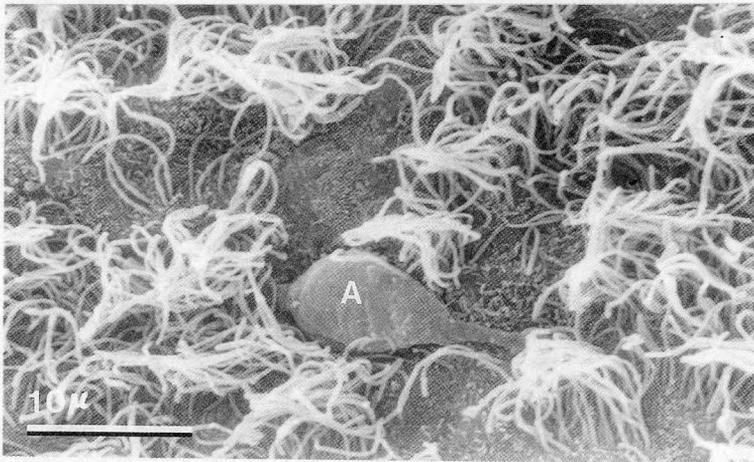
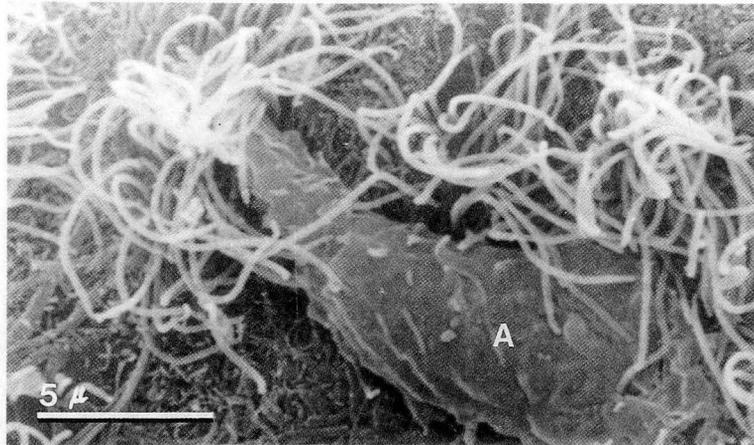
Por último, entre estos elementos hay unas células o protrusiones, de morfología muy particular, que hemos encontrado en la unión del velo medular posterior y la membrana tectoria. En este último se observa una zona cuya superficie está completamente tapizada por numerosas expansiones redondas, que le dan semejanza a una mora y que contrasta con la superficie de los endimocitos adyacentes, cubiertos por microvellosidades filiformes de menor tamaño (Fig. 12). En este mismo territorio pero en el velo medular resalta un relieve, que probablemente corresponda al polo apical de un endimocito herniado hacia la luz ventricular. Este relieve, que mide aproximadamente 17 6



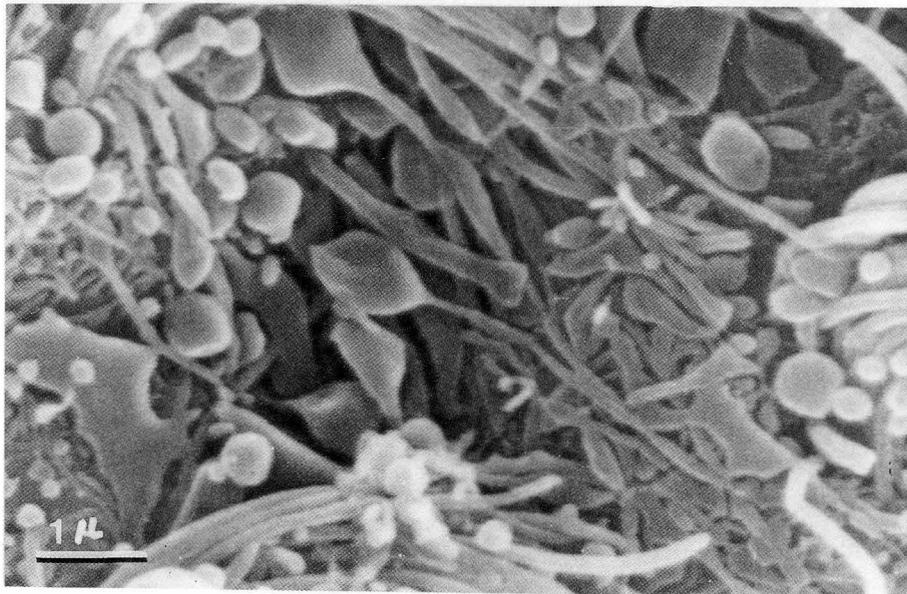
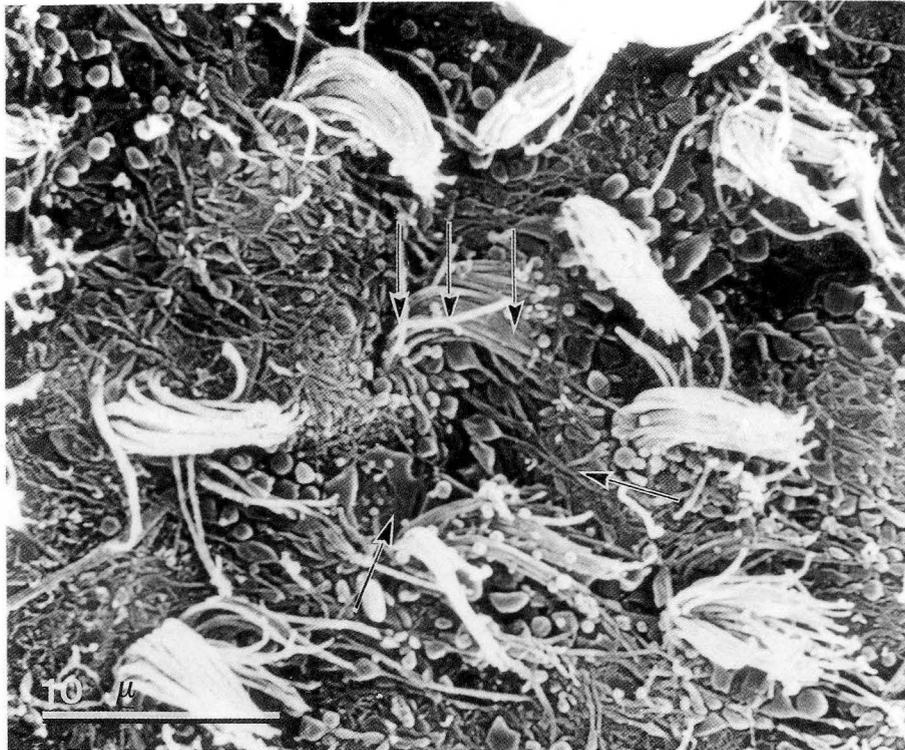
- FIGURA 1.** Zona media del territorio caudal del suelo del cuarto ventrículo y epéndimo del área postrema de rata. El área postrema (A) carece prácticamente de cilios, con excepción de los escasos penachos ciliares (puntas de flecha). Por el contrario, la zona media del territorio caudal del suelo del cuarto ventrículo es muy rica en cilios.
- FIGURA 2.** Suelo del cuarto ventrículo de rata a la altura del núcleo vestibular. En esa zona del suelo, escasa en cilios, pueden verse bulbos grandes (punta de flechas), de unos 3 μm . de diámetro, anclados a la superficie por delgados pedículos. Fibras semejantes a axones (flechas) cruzan la superficie ependimaria.
- FIGURA 3.** Zona de contacto entre la lámina tectoria del techo y el suelo del cuarto ventrículo de rata. La lámina tectoria (parte superior de la figura) carece de cilios; en ella abundan las microvellosidades uniformemente repartidas. En el suelo (parte inferior de la figura) se observan penachos ciliares.



- FIGURA 4.** Techo del cuarto ventrículo de rata. Esta es una zona carente de cilios, pero abundante en microvellosidades. Obsérvense fibras intraventriculares semejantes a axones, con dilataciones a lo largo de su trayecto. La punta de flecha señala una pequeña zona areolar en el polo apical del endimocito.
- FIGURA 5.** Velo medular posterior del techo del cuarto ventrículo de rata. Obsérvense la brusca transición entre una zona relativamente rica en cilios a otra prácticamente carente de ellos. En esta última existen cortas microvellosidades y algún cilio solitario.



- FIGURA 6.** Suelo del receso lateral del cuarto ventrículo de rata. Obsérvese la célula supraependimaria (A) en forma de bulbo con un extremo más estrecho; su superficie presenta pequeños salientes.
- FIGURA 7.** Techo del cuarto ventrículo a la altura de la lín-gula cerebelosa de rata. Obsérvese una célula supraependimaria (A) con dos prolongaciones que emergen de cada uno de los polos del soma; una de ellas queda inmediatamente cubierta por los penachos ciliares.
- FIGURA 8.** Territorio lateral del techo del cuarto ventrículo de rata. En este territorio, totalmente carente de cilios, se observan dos células supraependimarias de forma estrellada y con finas prolongaciones que aparentan conectar entre sí.



- FIGURA 9.** Suelo del cuarto ventrículo de rata a la altura de la depresión situada rostromedialmente al núcleo del haz solitario. Entre los penachos ciliares se observan estructuras pediculadas largas y estrechas (de menor calibre que el de los cilios), muchas de las cuales terminan en un ensanchamiento ovalado.
- FIGURA 10.** Detalle a mayores aumentos de la zona señalada con flechas en la figura anterior. Obsérvese el denso conjunto de estructuras pediculadas intraventriculares, que terminan en extremos bulbosos polimorfos.

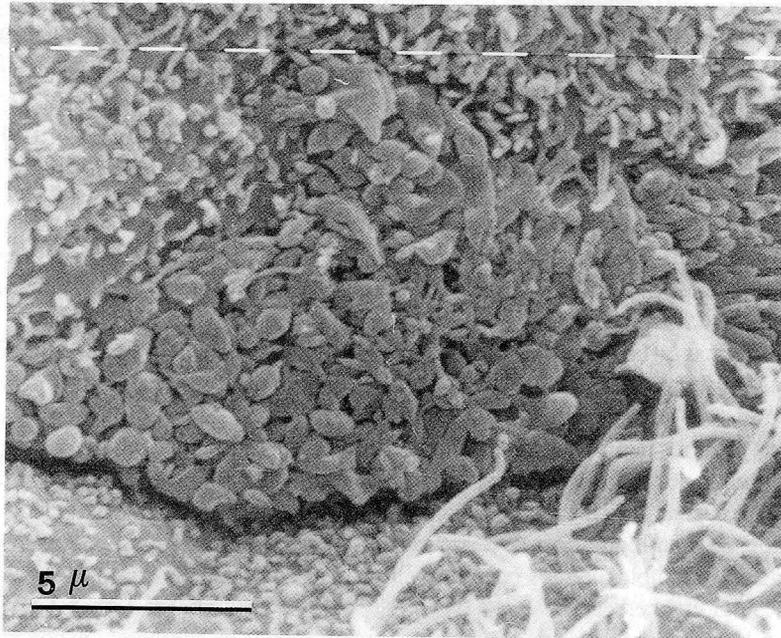
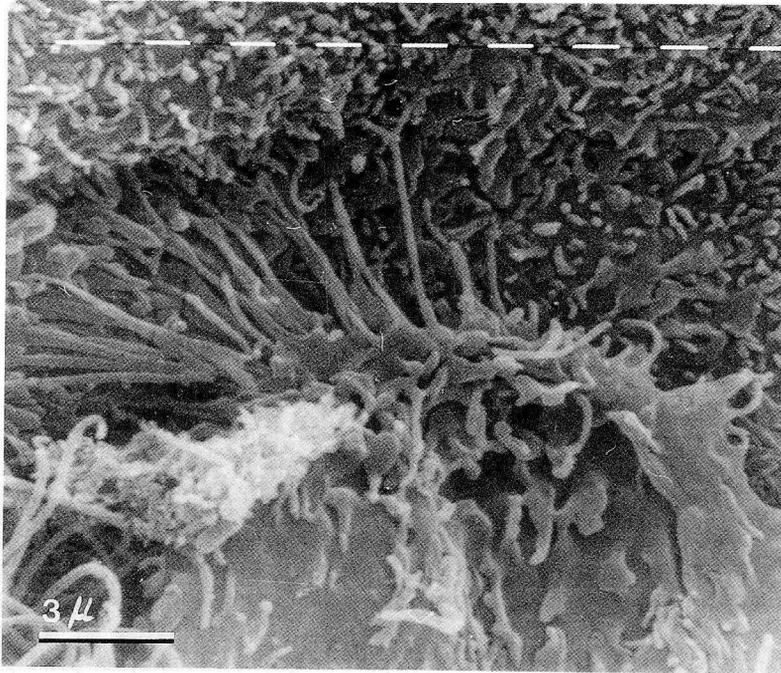


FIGURA 11. Territorio posterior del receso cerebeloso de rata. La parte superior de la figura corresponde a la lámina tectoria, y la inferior, al velo medular posterior. El relieve que aparece en la parte inferior de la figura es el polo apical de un ependimocito que hace prominencia en la luz, o una célula supraependimaria; está situado en el velo medular posterior y aparentemente está unido por delgados cordones a la lámina tectoria.

FIGURA 12. Territorio posterior del receso cerebeloso de rata. Es una región vecina a la de la figura anterior. En el territorio de la lámina tectoria hay una zona de superficie ependimaria que hace hernia en la luz ventricular, en la que hay una gran cantidad de elementos intraventriculares ovalados o redondos, que no pueden ser identificados con estructuras pertenecientes a los ependimocitos subyacentes.

12 μm ., está rodeado de cilios y tiene una superficie rugosa; de su periferia salen una serie de prolongaciones finas alargadas (Fig. 12), que parecen finas cuerdas y que lo unen a los endimocitos de la membrana tectoria, donde aparentemente se introducen (Fig. 12, recuadro).

Discusión

Estudios previos con el M.E.B., efectuados en el cuarto ventrículo, demuestran que la superficie endimaria no es morfológicamente uniforme en las diferentes especies animales estudiadas (Stumpf y Barbero, 1978; Kiss y Mitro, 1978; Jones, 1979; Hirunagi y Yasuda, 1979; Singh y cols., 1980, 1982) ni tampoco lo es en las distintas etapas del desarrollo ontogénico (Gona y Hauser, 1982; Oda y Nakanishi, 1987; Tanaka y cols., 1987), notándose también claras diferencias regionales, al igual que ocurre en los otros ventrículos (Stundnick, 1900; Peter y cols., 1976; Singh y cols., 1980, 1982; STUMPF y BARBERO, 1978). Las observaciones efectuadas con MEB en el suelo del cuarto ventrículo (Singh y cols., 1980) no son concordantes en lo referente a la distribución de cilios y microvellosidades con las encontradas en el presente trabajo, lo que hace suponer que esta distribución sea variable y esté en relación con el momento funcional del neuropilo subyacente, como ya sugirieron algunos investigadores (Stumpf y Lamb, 1977; Mestres, 1978).

La amplia distribución de las redes de fibras arrosariadas semejantes a axones, con posible papel neurosecretor que algunos investigadores han descrito en el tercer ventrículo (Coates, 1978), se observa también en las zonas desprovistas de cilios del cuarto ventrículo de ratas; su convergencia en determinados endimocitos, desde donde aparentan emerger o concluir, podría significar un sistema de comunicación rápido intraventricular. Esta comunicación se puede llevar a cabo a través del contacto sináptico (Janet y cols., 1976) o mediante la liberación de sustancias transportadas por estas fibras arrosariadas, sumándose al posible papel regulador del movimiento ciliar y de los mecanismos de absorción y reabsorción del LCR sugeridos por Ribas (1977).

En fibras semejantes, halladas en otros ventrículos, con las técnicas de fluorescencia e inmunohistoquímica, ha sido demostrada la presencia de serotonina (Tramu y cols., 1983), por lo que al conjunto epéndimo-L.C.R. se podría también incluir dentro de los sistemas serotoninérgicos. Además hay que tener en cuenta la relación íntima entre las prolongaciones de los tanicitos del cuarto ventrículo y los núcleos monoaminérgicos de la protuberancia (Felten y cols., 1981) con el papel trófico que esto acarrea sobre la maduración del tejido nervioso.

Las dilataciones esféricas intraventriculares que están unidas al polo apical de los endimocitos por un pedículo (visibles en algunas zonas escasas en cilios y observadas en el cuarto ventrículo del feto humano por Tanaka y cols., 1987), así como los ensanchamientos de mucho menor tamaño que han sido descritos por Yamadori y Yagihashi (1975) en el ratón y que nosotros hemos visto en la rata, pueden indicar diferentes estadios de un proceso de secreción endimario que culminaría con la presencia de formaciones globulares libres en el L.C.R. (Stumpf y cols., 1977).

La existencia de pequeñas descamaciones circulares de membrana sería la expresión de mecanismos de absorción o reabsorción. La gran abundancia de pequeñas burbujas citoplasmáticas en determinadas zonas, las cuales cubren completamente el polo apical de los endimocitos, podría entenderse como la expresión morfológica de alguna secreción o absorción de efecto local.

Hemos de resaltar la escasa presencia de células supraendimarias en comparación con otras especies y con el tercer ventrículo de la rata. No obstante, son visibles tanto en el suelo como en el techo en los territorios con escasos cilios; estas células supraendimarias están dispersas y no muestran preferencias regionales. El soma de estas células puede aparecer liso o con crestas o espículas en su superficie, y de él nacen prolongaciones que varían en número, en grosor y en distribución, asemejándose el conjunto del cuerpo y sus prolongaciones unas veces a las células supraendimarias del tercer ventrículo descritas como de estirpe neural (Scott y cols., 1977; Coates, 1978; Pastor y cols., 1982), y otras a las de carácter histiocitario en sus distintas variedades (Mestres, 1976; Pastor y cols., 1982).

En este apartado hemos de resaltar las características peculiares de las probables células supraendimarias ancladas en el epéndimo de unión del techo y del suelo, con una apariencia de conjunción directa de estas células con el epéndimo mediante sus prolongaciones.

El área postrema, que ha sido el territorio del cuarto ventrículo más estudiado con el MEB y con otras técnicas, en el caso de las ratas de nuestra casuística se muestra como una región formada por polos apicales de endimocitos lisos, de contornos irregulares con muy escasas y cortas microvellosidades y sin cilios. Estos hallazgos contrastan con los de Torack y Finke (1971), quienes hablan de diferencias regionales de cilios en el área postrema. Tampoco en la región del área postrema hemos hallado protusiones ni células supraependimarias que han sido descritas en otros mamíferos (Weindl y Schniko, 1977). Es cierto que hemos observado algunos penachos ciliares en las partes ventrales del área postrema. A este propósito citamos hallazgos idénticos de Klara y Brizze (1977), los cuales afirman que la presencia del penacho de cilios coincidía con vasos sanguíneos subyacentes.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ-MORUJO, A.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E. et AMAT, P. (1986): Etude au microscope électronique à balayage de la superficie endymarie du quatrième ventricule chez le rate. I. Bull. Assoc. Anat. **70** (211 bis): 48.
- ALVAREZ-MORUJO, A.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E. et AMAT, P. (1987): Etude au microscope électronique à balayage du quatrième ventricule de plusieurs espèces de mammifères. Bull. Assoc. Anat. **71** (215 bis): 22.
- COATES, P.W. (1973): Supraependymal cells: Light an transmission electron microscopy extends scanning electron microscopy demonstration. Brain res. **57**: 502-507.
- COATES, P.W. (1978): Supraependymals cells and fiber processes in the fetal monkey third ventricle: correlated scanning and transmission electron microscopy. SEM/II, pp. 143-150 (SEM, AMF, O'Hare 1978).
- DUVERNOY, H. and KORITE, J.G. (1965): Contribution à l'étude de l'angioarchitectonie des organes circumventriculaires. Arch. Biol. **75**: 849-904.
- FELTEN, D.L.; CUMMINGS, J.P. and BURNET, B.T. (1981): Ontogeny of caudal fourth ventricular tanycytes in the rabbit: A Golgi study. Anat. Rec. **200**: 321-330.
- GONA, A.G. and HAUSER, K.E. (1982): Ultrastructural studies on the ventricular surfaces of the frog cerebellum. Cell Tiss. Res. **225**: 443-448.
- HIRUNAGI, K. and YASUDA, H. (1979): Fine structure of the ependymal cells in the area postrema of the domestic fowl. Cell Tiss. Res. **200**: 45-51.
- HOFFER, H. (1958): Zur Morphologie der circumventrikulären Organe des Zwirnenhirnes der Säugetiere. Verh. Deutsch. Zool. Ges. **8**: 202-251.
- JANET, J.; DUKE, E. and SMITH, G.S. (1976): Axo-axomatic and ependymal relationship in the median eminence. J. Anat. proceeding. **121**: 420.
- JONES, H.C. (1979): Fenestration of the epithelium lining the roof of the fourth cerebral ventricle in amphibia. Cell Tiss. Res. **198**: 129-136.
- KISS, A. and MITRO, A. (1978): Ependyma and supraependymal structures in some areas of the fourth ventricle in the rat. Acta Anat. **100**: 521-531.
- KLARA, P.M. and BRIZZE, K.R. (1977): Tanycytic ependyma in the mammalian. IV ventricle. Anat. Rec. **187**: 626.
- KNOWLES, F. (1972): Ependyma of the third ventricle in relation to pituitary function. Progr. Brain Research, vol. **38**: 479-495.
- KOLMER, W. (1921): Über eine eigenartige Beziehung von Wendernzellen zu dem choroidal plexus des Gehirns der Wirbeltiere. Anat. Anz. **54**: 15-19.
- KRISCH, B. and LEONHARDT, H. (1978): The rombencephalic recess in the rat a light and electron microscopy study. Cell Tiss. Res. **189**: 479-495.
- MESTRES, P. (1976): The supraependymal cells of the rat hypothalamus: change in their morphology and cell number during the ovarian cycle. Experientia **32**: 1329-1331.
- MITRO, A. and KISS, A. (1977): Histological observations on the ependyma of the ventriculus mesencephali in the guinea pig. Acta Anat. **97**: 248-256.
- ODA, Y. and NAKANISHI, I. (1987): Ultrastructure of the caudal portion of the fourth ventricular roof the mouse. J. comp. neurol. **256**: 299-302.
- 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. 1982. Morf. Nom. Patol., **A6**: 73-86.
- PETER, A.; PALAY, S. and WEBSTER, H.F. (1976): The fine structure of the nervous system. The neurons and supporting cells. W. B. Sunder company. Philadelphia-London-Toronto.
- RAMON y CAJAL, S. (1909): Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. I. Généralités, moelle, ganglions rachidiens, bulbe et protuberance. Maloine, Paris.
- RIBAS, J. L. (1977): Correlative scanning and transmission electron microscopy of supraependymal nerves. Cell Tiss. Res. **182**: 1-16.

- SCOTT, D.E.; KROBICH-DUDLEY, G.; PAUL, W. K. (1977): The ventricular system in neuroendocrine mechanisms. III. Supraependymal neuronal network in the primate brains.
- SCOTT, D.E.; KOZLOWSKI, G.P. and SHERIDAN, M. N. (1973): Scanning electron microscope in the ultrastructural analysis of the mammalian cerebral ventricle system. *Int. Rev. Cytol.* **37**: 349-388.
- SHING, D.R.; BAJPAI, V.K.; MAITRA, S.C. and SHIPSTONE, A.C. and HASAN, M. (1982): Scanning and transmission electron microscopy of the ependyma of the fourth ventricle in the monkey brain. *Acta Anat.* **112**: 365-375.
- SINGH, D.R.; HASAN, M.; BAJPAI, V.K. and MAITRA, S.C. (1980): Surface fine structure of the ependymal lining of the rat fourth ventricle. *Acta Anat.* **107**: 198-204.
- STUMPF, W.E. and BARBERO, M.G. (1978): SEM studies of the ependyma of the fourth ventricle: collicular recess, sulcus medianus, recess of the locus ceruleus and lateral recess. *SEM/vol. II*, pp. 811-816 (SEM, AMF, O'Hare, 1978).
- STUMPF, W.E.; HELLREISCH, M.A.; AUMÜLLER, G.; LAMB, J.L. and SAR, M. (1977): The collicular recess organ: evidence for structural and secretory specialisation ventricular lining in the collicular recess. **184**: 24-44.
- STUNDNICKA, F. (1900): Untersuchungen über dem Band des Ependyms der nervösen Centralorgane. *Anat. A.* **15**: 303-430.
- TANAKA, O.; HIROKI, O. and KATSUKUNI, F. (1987): Fourth ventricular floor in human embryos scanning electron microscopic observations. *Am. J. Anat.* **178**: 193-203.
- TORACK, R.M. and FINKE, E.H. (1971): Evidence for a sequestration of function within the area postrema based on scanning electron microscopy and the penetration of horseradish peroxidase. *Z. Zellforsch.* **118**: 85-96.
- TRAMU, G.; POLLET, A. and LEONARDELLI, J. (1983): Serotonin axon of the ependyma and circumventricular organs of the fore brain of the guinea pig. An immunohistochemical study. *Cell Tiss. Res.* **228**: 297-311.
- WEINDL, A. and SCHINKO, I.: SEM of circumventricular organs (CVO). *Scanning Electron Microscopy/1977*, vol. II, pp. 559-566. II T. Research. Inst., Ill., USA.
- YAMADORI, T. and YAGIHASHI, S. (1975): A scanning electron microscopic observations of the fourth ventricular floor in the mouse. *Archv. Histol. Jap.* **37**: 415-432.

Correspondencia: Antonio-Jesús Alvarez-Morujo Suárez
Dpto. Anatomía. Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca. España

SINAPSIS ABIERTAS O COMUNICANTES. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL EN EL NUCLEO ARCUATO DE RATAS NORMALES

OPEN OR COMMUNICATING SYNAPSES. ULTRAESTRUCTURAL STUDY IN THE ARCUATE NUCLEUS OF NORMAL RATS

P. AMAT, A. J. ALVAREZ-MORUJO, F.E. PASTOR, D. TORANZO, J.L. BLAZQUEZ, B. PELAEZ, A. SANCHEZ y G. AMAT-PERAL

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

RESUMEN

El estudio ultraestructural del territorio hipotalámico del núcleo arcuato de ratas normales demuestra que en algunas sinapsis hay una comunicación entre el botón nervioso terminal y el elemento postsináptico; a través de esta comunicación se ponen en contacto los citoplasmas de las dos neuronas que forman la sinapsis. En el presente trabajo las comunicaciones intersinápticas se han detectado axosomáticas y axoaxónicas. Estas comunicaciones son idénticas a los puentes intercelulares verdaderos, tales como los que existen entre células espermatogénicas vecinas hasta la etapa de espermátides maduras. A este tipo de sinapsis Amat y col. (1981) les dieron el nombre de sinapsis abiertas; con posterioridad otros investigadores las han denominado sinapsis comunicantes. Los autores sugieren que las sinapsis abiertas son originadas por el tráfico de membranas en ciertos momentos del incremento de la actividad neuronal, y que debe ser un fenómeno transitorio y reversible.

PALABRAS CLAVE: Ultraestructura, hipotálamo, núcleo arcuato, sinapsis, sinapsis abiertas o comunicantes.

SUMMARY

Ultrastructural study of the hypothalamic territory of the arcuate nucleus of normal rats shows that in certain synapses there is communication between the terminal bouton and the postsynaptic element; through this communication the cytoplasm of the two neurons forming the synapse enter into contact. In the present work we report on the intersynaptic communications that have been observed in axosomatic and axoaxonic synapses. These communications are identical to true intercellular bridges such as those existing among neighbouring spermatogenic cells until late spermatogenic stage. This kind of synapses was given the name of *open synapses* by Amat et al. (1981). Later, other researchers have called them *communicating synapses*. The authors suggest that the open synapses are originated by membrane traffic at certain moments involving increases in neural activity and that the event must be transient and reversible.

KEY WORDS: Ultrastructure, Hypothalamus, Arcuate Nucleus, Synapse, Open or Communicating synapses.

Introducción

El descubrimiento de que el tejido nervioso, al igual que los otros tejidos, está constituido por células, las neuronas, representó el triunfo definitivo de la teoría celular, así como el fracaso y el olvido de la teoría reticular del sistema nervioso central, reemplazada por la teoría neuronal de Cajal. Las neuronas son células independientes, incluso en las sinapsis, o sea, en las zonas donde contactan y transmiten la información. La falta de continuidad del citoplasma de una neurona con otra es un hecho admitido y demostrado.

La microscopía electrónica de transmisión confirmó de forma rotunda la teoría neuronal (es decir, la individualidad morfológica de las neuronas); y, así, el estudio ultraestructural de la sinapsis química (el tipo más frecuente de sinapsis) demostró la independencia de las membranas presináptica y postsináptica, separadas entre sí por la hendidura sináptica. Incluso en las sinapsis eléctricas, tampoco se establece continuidad del citoplasma de una neurona con otra, a pesar de que en el complejo membranoso sináptico las membranas se unan formando un *nexus*. Por todo ello resulta llamativa y aparentemente heterodoxa la existencia de comunicaciones intercitoplasmáticas entre un botón nervioso terminal y el soma sobre el que hace sinapsis.

Recientemente, con el nombre de sinapsis comunicante (*communicating synapse*) González Santander y col. (1988) han descrito una de esas comunicaciones en una sinapsis axosomática de una neurona de la sustancia gris periependimaria del mesencéfalo de gato.

Desde varios años antes de la publicación últimamente mencionada, en los núcleos supraóptico y arcuato del hipotálamo de ratas castradas y en el de otras sometidas a diversos experimentos (especialmente, administración de neurolépticos), nosotros hemos descrito, con abundancia de imágenes ultraestructurales, la existencia de estas comunicaciones intersinápticas, a las que hemos denominado sinapsis abiertas (*open synapses*). Estas descripciones han aparecido en dos publicaciones en revistas científicas (Amat y col., 1981a; Ledesma-Jimeno y col., 1982) y en las actas de algunos Congresos (Amat y col., 1981b; Amat y col., 1987).

En el presente trabajo, aportamos nuevas imágenes ultraestructurales de sinapsis abiertas en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas normales de ambos sexos, e intentamos explicar su génesis a partir de otras imágenes de sinapsis, que si bien no son abiertas, presumen pasos previos en su formación.

Material y Métodos

Como animal de experimentación hemos utilizado 35 ratas albinas normales, de ambos sexos, de la cepa Sprague-Dawley. En realidad hemos empleado las ratas normales que sirvieron como testigos de experimentos llevados a cabo en el Departamento. Este número de ratas se distribuye, según la edad y el sexo, en los siguientes grupos, cada uno de ellos de cinco animales: 1) machos de once días de edad; 2) machos de 34 días; 3) machos de 124 días; 4) machos de dos meses; 5) machos de cuatro meses; 6) hembras de dos meses; 7) hembras de cuatro meses. Desde el nacimiento todos los animales utilizados han estado sometidos a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas y a temperatura ambiental constante (18-20° C), disponiendo libremente de alimento y agua.

Previamente al sacrificio, los animales fueron anestesiados con tiopental sódico por vía intraperitoneal (5/mg/Kg de peso), perfundidos a través del ventrículo izquierdo con suero fisiológico heparinizado a 37° C y después con glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 a 4° C. Inmediatamente después de la perfusión, se extrajo el encéfalo, se recortó el bloque hipotalámico, el cual a su vez fue tallado en bloques de tamaño adecuado para su procesamiento por las técnicas para microscopía electrónica de transmisión, según las siguientes pautas: inmersión durante 12 horas en la solución de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato (pH 7.4) a 4° C; postfijación en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón; deshidratación con acetona de gradación ascendente e inclusión en aralditas. Se obtuvieron cortes semifinos de control que fueron teñidos con azul de toluidina; y, por último, se hicieron cortes ultrafinos que fueron contrastados según el método de Reynolds (1963) y estudiados en un microscopio electrónico Philips EM-201.

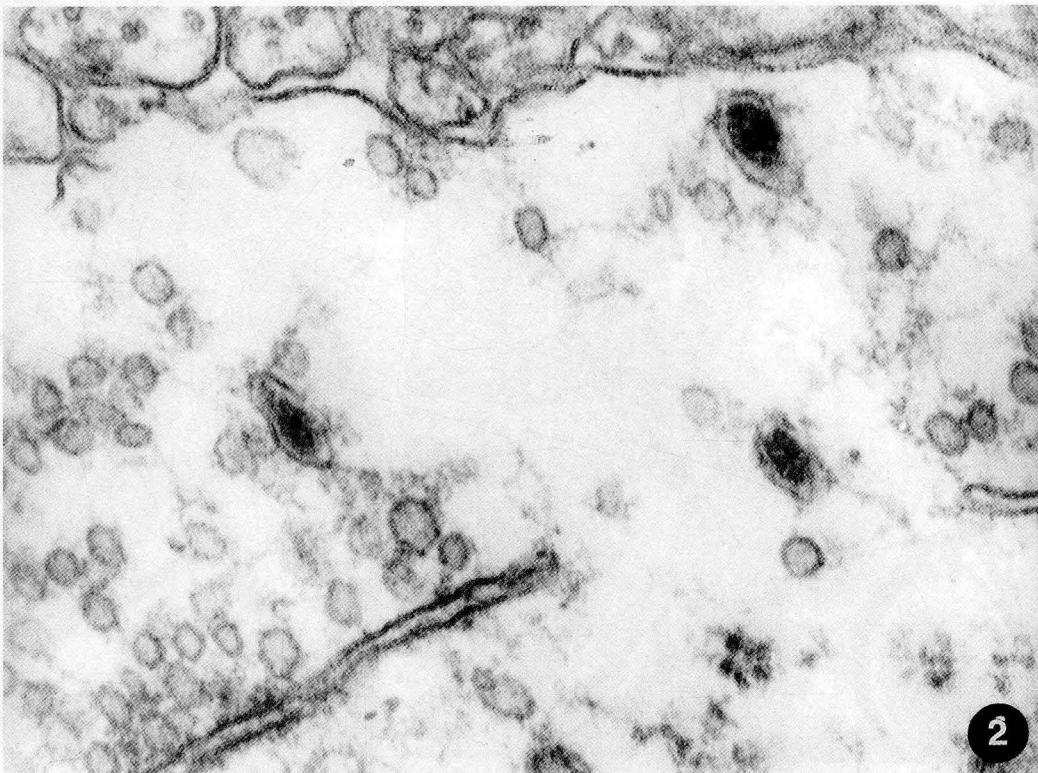
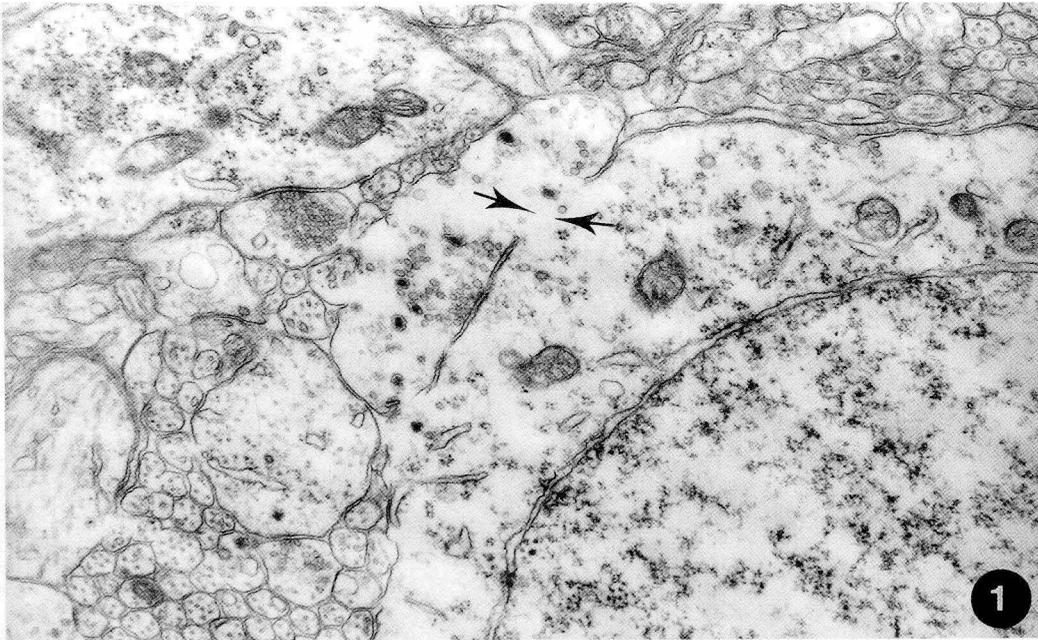
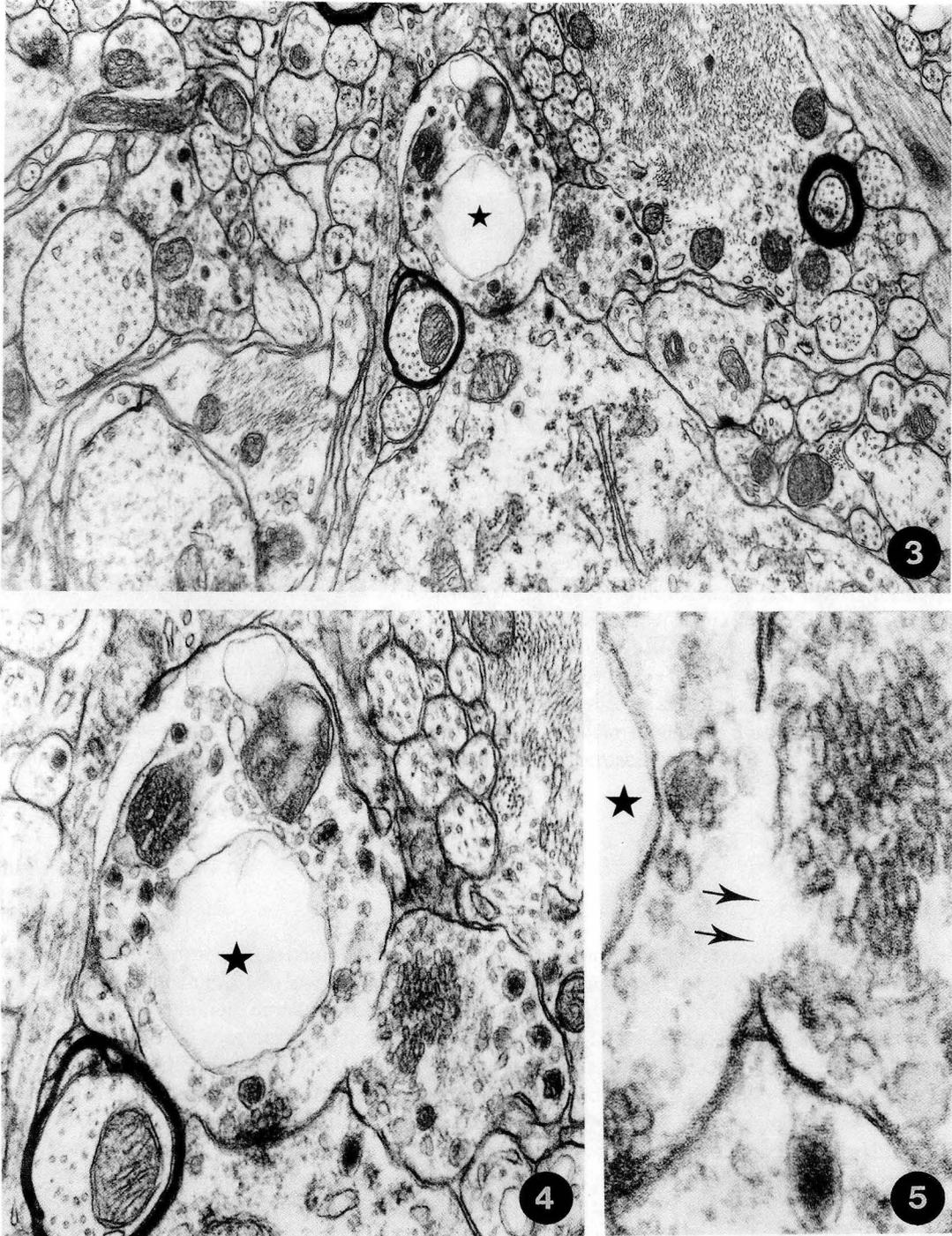


FIGURA 1 Sinapsis axosomática en una neurona del núcleo arcuato del hipotálamo de una rata macho normal de once días de edad. Aumentos: 21.900x. Entre las flechas se sitúa un gran poro (diámetro: $0.530\ \mu\text{m}$) de comunicación entre el botón nervioso terminal y el soma neural.

FIGURA 2 Visión a mayores aumentos (103.000x) de una zona de la figura anterior. Obsérvese que, en los bordes del poro, la membrana presináptica se continúa limpia y perfectamente con la postsináptica.



FIGURAS 3, 4 y 5 Territorio posterior de la región tuberoinfundibular de una rata macho normal de cuatro meses de edad. Aumentos: 21.900x (figura 3), 45.500x (figura 4) y 103.000x (figura 5). Las figuras muestran una sinapsis axoaxónica abierta. En el botón nervioso terminal postsináptico, hay una gran cisterna (señalada con una estrella). Las flechas de la figura 5 apuntan a un poro a través del cual se comunican ambos botones; este poro mide aproximadamente unos 1.750 Å.

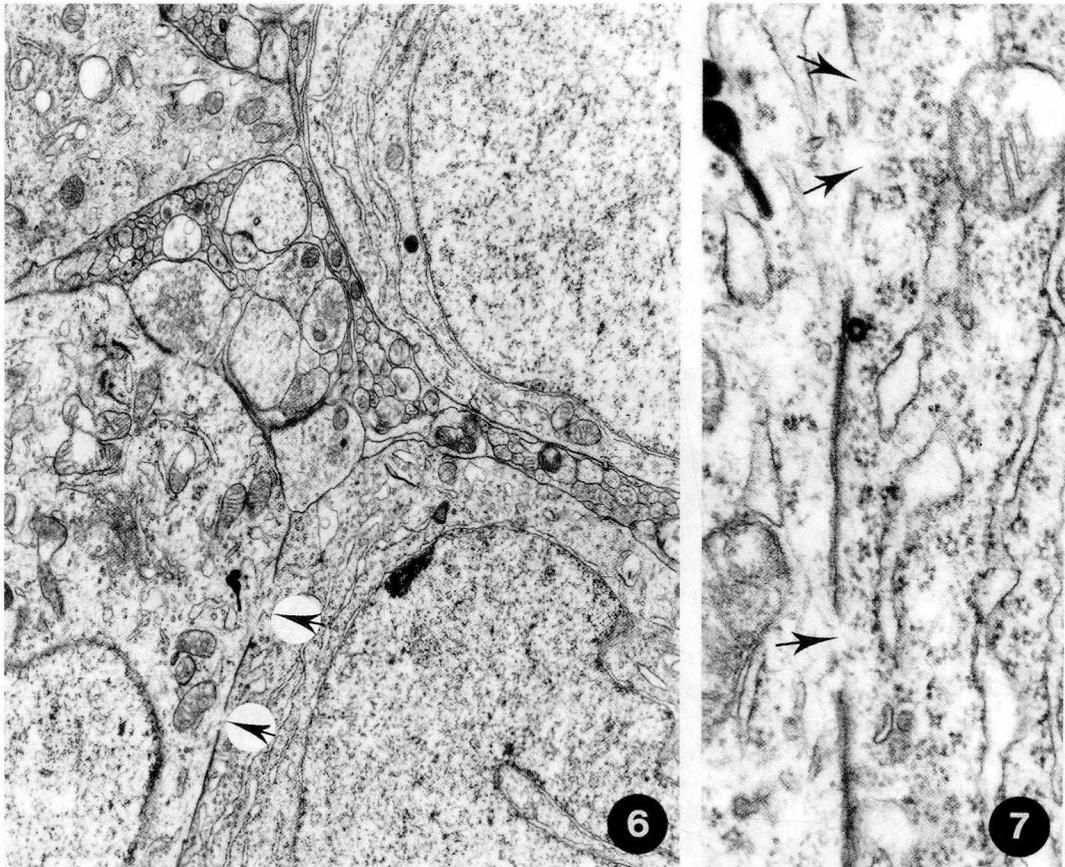
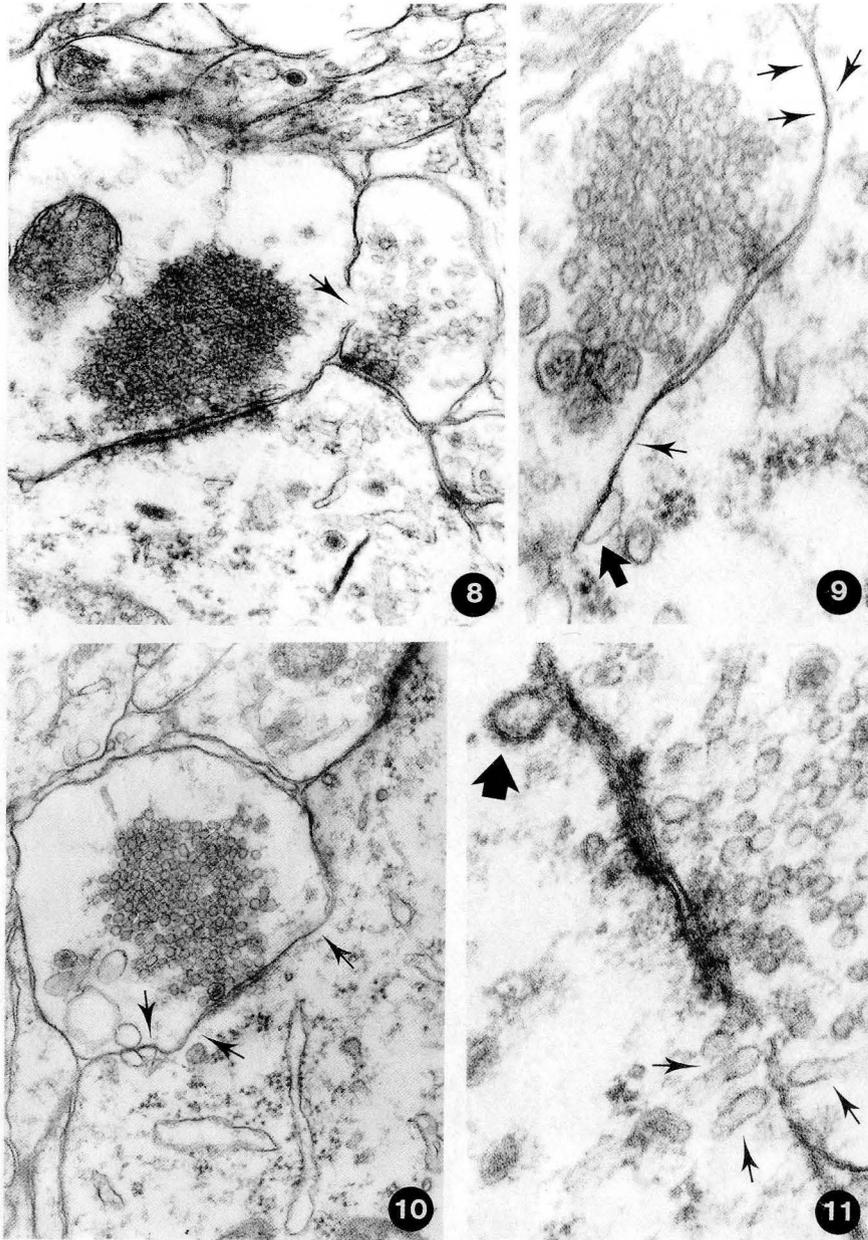


FIGURA 6 Territorio posterior de la región tuberoinfundibular de una rata de dos meses de edad. Aumentos: 11.200x.

FIGURA 7 Visión a mayores aumentos (103.000x) de la zona señalada con flechas en la figura anterior. Las flechas de esta figura señalan varias comunicaciones intersomáticas entre neuronas vecinas del núcleo arcuato.



- FIGURA 8** Comunicación intercitoplasmática (flecha) entre dos botones nerviosos terminales que hacen sinapsis en una neurona del núcleo arcuato de una rata macho, de cuatro meses de edad. Aumentos: 45.500x.
- FIGURA 9** Sinapsis axosomática en una neurona del núcleo arcuato de una rata macho de cuatro meses de edad. Aumentos: 103.000x. La flecha gruesa señala una vesícula alargada de retículo liso (eje mayor: 1.000 Å), situada del lado postsináptico, la cual contacta directamente con la zona en donde las membranas sinápticas se han fusionado. Las flechas finas señalan el territorio en donde las membranas sinápticas fusionadas forman una unidad de membrana.
- FIGURA 10** Sinapsis axosomática en una neurona del núcleo arcuato de una rata hembra, de cuatro meses de edad. Aumentos: 45.500x. Las flechas señalan el territorio en donde las membranas sinápticas fusionadas, forman una unidad de membrana. Obsérvense dos vesículas que contactan con esa zona de fusión de las membranas sinápticas.
- FIGURA 11** Sinapsis axosomática en una neurona del núcleo arcuato de una rata hembra, de cuatro meses de edad. Aumentos: 103.000x. La flecha gruesa apunta a una vesícula espiculada, que forma una figura en omega. Obsérvense que a la altura de una zona de las membranas sinápticas, en donde éstas están aparentemente difuminadas, se detecta la presencia de túbulos de retículo endoplásmico liso a uno y otro lado de la sinapsis (flechas finas).

Resultados

En este capítulo nos limitaremos a describir ordenadamente y sistemáticamente las figuras de nuestra iconografía.

La figura 1 muestra una sinapsis axosomática sobre una neurona del núcleo arcuato del hipotálamo de una rata macho normal de once días de edad. El botón nervioso terminal es grande (en la figura, su eje mayor mide aproximadamente $2.4\ \mu\text{m}$) y contiene escasos elementos presinápticos, entre los que destacan unas pocas vesículas-granulares elípticas (eje mayor: $1.450\ \text{Å}$), diseminadas, y vesículas de tipo sináptico (diámetro: $400\text{-}500\ \text{Å}$), no abundantes, acumuladas en el punto activo de la sinapsis. Llama la atención la existencia de un gran poro de comunicación entre la terminación axónica y el soma neuronal (Fig. 2); este poro mide unos $0.530\ \mu\text{m}$ (¡algo más de media micra!) y a su través se establece una amplia comunicación entre el botón nervioso terminal y el soma neuronal. A la altura de ese poro se observa una vesícula granular y otra semejante a las sinápticas; la primera hacia el lado del botón nervioso, y la segunda hacia el lado postsináptico. En los bordes del poro, la membrana presináptica se continúa limpia y perfectamente con la postsináptica (Fig. 2), lo que parece descartar la posibilidad de que ese poro sea debido a un artefacto de la técnica. Si se acepta que no es un artefacto, se puede afirmar que es una sinapsis axosomática abierta.

En la figura 3, que corresponde al territorio posterior de la región tuberoinfundibular de una rata macho normal de cuatro meses de edad, puede verse el neuropilo y un fragmento del soma de una neurona del núcleo arcuato, sobre el que está haciendo sinapsis un botón nervioso terminal. En este botón, en el que resalta la presencia de una gran cisterna, hay también (figura 4) mitocondrias de matriz oscura, unas pocas vesículas granulares, redondas o elípticas (diámetro $850\text{-}1.000\ \text{Å}$), y vesículas del tipo de las sinápticas, varias de ellas diseminadas, y otras acumuladas en un punto de la membrana presináptica, que es el punto activo. A su vez, se observa otro botón nervioso, contiguo al anterior, y vecino al soma neuronal. Este segundo botón nervioso, que también es terminal y tiene características ultraestructurales similares al anterior (vesículas granulares y vesículas de tipo sináptico), está en relación de vecindad con el soma neuronal, pero no hace sinapsis sobre éste sino sobre el otro botón, como se deduce por la orientación del acúmulo de vesículas sinápticas. Se trata, pues, de una sinapsis axoaxónica, en la que existe un poro a través del cual se comunican ambos botones; este poro mide aproximadamente unos $1.750\ \text{Å}$ (figura 5). Es otro ejemplo de sinapsis abierta; en este caso es una sinapsis axoaxónica.

La comunicación entre neuronas vecinas se hace no solamente en las sinapsis sino también en los somas. Así, en las figuras 6 y 7 se aprecian varias comunicaciones intersomáticas entre dos neuronas vecinas del núcleo arcuato de una rata de dos meses de edad.

Estas ventanas en puntos no sinápticos, que son como puentes intercelulares a través de los cuales hay una conexión entre los citoplasmas de las neuronas vecinas, han sido vistas por nosotros no solamente entre los somas neuronales, sino también entre botones nerviosos terminales contiguos. Tal es el caso que se muestra en la figura 8, en la que se distinguen dos terminaciones axónicas vecinas, que hacen sinapsis sobre el pericarion de una neurona arcuata de una rata macho normal de cuatro meses de edad. En las membranas laterales de estos botones se está insinuando un poro (diámetro aproximado: unos $1.100\ \text{Å}$) por el que se comunica el axoplasma de ambos botones nerviosos terminales.

Las figuras 9 a 11 corresponden a sinapsis axosomáticas del núcleo arcuato de ratas normales de cuatro meses de edad machos (Fig. 9) y hembras (Figs. 10 y 11), y tienen por finalidad mostrar las relaciones de los organitos presinápticos y postsinápticos con las membranas sinápticas.

En las sinapsis axosomáticas que aparecen en las figuras 9 y 10, hay un punto activo (hacia adonde se orienta el acúmulo de vesículas sinápticas), y a su nivel se observa perfectamente la hendidura sináptica que queda entre ambas membranas. A uno y a otro lado de la hendidura y del punto activo, las membranas sinápticas están fusionadas. Se trata de una auténtica fusión, de la que resulta una única unidad de membrana que separa los componentes presináptico (botón nervioso terminal) y postsináptico (soma neuronal). No se trata de un *nexus* (*gap junction*), o sea, de una unión haptolaminar; sabido es que en el *nexus*, que es característico de las sinapsis eléctricas, se pueden distinguir perfectamente la membrana presináptica, la postsináptica y el espacio intercelular (en el *nexus*, el espacio intercelular sustituye a la hendidura sináptica). Debe insistirse que en esos territorios donde se han fusionado los componentes membranosos sinápticos, se ha formado una única unidad de membrana. Obsérvese (figuras 9 y 10) que,

en las proximidades a la zona de fusión, el botón nervioso carece de vesículas sinápticas. Sin embargo, a ese nivel pueden verse vesículas sinápticas de retículo endoplásmico liso que están en contacto con la unidad de membrana resultante de la fusión. En efecto, en la Fig. 9 la flecha gruesa apunta a una vesícula alargada (eje mayor: 1.000 Å), situada del lado postsináptico, que contacta directamente con la zona en donde las membranas sinápticas se han fusionado. En el caso de la sinapsis de la figura 10, hay vesículas redondas de retículo endoplásmico liso (diámetro aproximado: 1.000 Å) a uno y otro lado del territorio en donde se han fusionado las membranas sinápticas. Dichas vesículas, que están contactando con esa parte de la unidad de membrana resultante de la fusión, tienen características ultraestructurales muy distintas a las sinápticas de uno u otro tipo; dicho con otras palabras: no se trata de vesículas sinápticas o granulares, sino de elementos membranosos pertenecientes a las propias membranas sinápticas.

En la figura 11, la flecha gruesa apunta a una vesícula espiculada que está en contacto con la membrana postsináptica de una sinapsis axosomática de una neurona del núcleo arcuato del hipotálamo de una rata normal hembra de cuatro meses de edad; en realidad, esa vesícula es una *figura en omega*. Obsérvese que a la altura de una zona de las membranas sinápticas, en donde éstas están aparentemente difuminadas, se detecta la presencia de túbulos de retículo endoplásmico liso a uno y a otro lado de la sinapsis.

Discusión

¿Existen las sinapsis abiertas? Durante varios años, con las técnicas convencionales de microscopía electrónica, en algunas sinapsis axosomáticas y axodentríticas nosotros observamos poros de comunicación entre el axoplasma del botón nervioso terminal y el elemento postsináptico (soma neuronal o dedrita) y les dimos el nombre de sinapsis abiertas (Amat y col., 1981b). Detectamos la presencia de estas sinapsis abiertas en algunos núcleos del hipotálamo estudiados por nosotros, tales como el supraóptico (Amat y col., 1981a y 1987) y especialmente el núcleo arcuato de ratas a las que se les había administrado clorpromazina (Amat y col., 1981a; Ledesma-Jimeno y col., 1982) o en ratas castradas (Amat y col., 1981b y 1987). En el año 1985, Valzelli y Ledesma publicaron un libro sobre "Psicofarmacología", en cuyo último capítulo aparecen impresas varias imágenes ultraestructurales de sinapsis abiertas de algunos de nuestros trabajos (en dos de ellos había colaborado el Prof. Ledesma, que es uno de los autores del citado libro).

González Santander y col. (1988) describieron hace poco la existencia de una comunicación entre un botón nervioso terminal y el soma de una neurona de la sustancia gris periependimaria del mesencéfalo del gato; estos investigadores destacaron la perfecta continuidad de la membrana presináptica con la postsináptica, formándose así un poro pequeño, cuyo diámetro aproximado es unas tres veces mayor que el de una vesícula sináptica. Por ese poro se establece conexión entre ambas neuronas, por lo que estos investigadores propusieron que a este tipo de sinapsis se las designe con el nombre de sinapsis comunicantes (*Communicating synapses*).

Las sinapsis comunicantes son idénticas a nuestras sinapsis abiertas (véanse las figuras 1 a 5 de este trabajo las que aparecen en nuestras publicaciones anteriores: Amat y col., 1981a; Ledesma-Jimeno y col., 1982).

En relación con las sinapsis abiertas, mantuvimos siempre una cierta cautela para darlas a conocer en publicaciones por el temor de que fueran originadas por artefactos de la técnica. No obstante, la continuidad de la membrana presináptica con la postsináptica nos permitió descartar esa posibilidad. Por tanto, podemos contestar afirmativamente a la pregunta que nosotros mismos nos hemos formulado: *existen sinapsis abiertas*, al igual que existen comunicaciones entre los somas neuronales.

En algunas sinapsis abiertas, mostradas en las iconografías de publicaciones anteriores (Amat y col., 1981a; Ledesma-Jimeno y col., 1982), el diámetro del poro es pequeño, parecido al de la sinapsis comunicante de González-Santander y col. (1988), pero en esas mismas publicaciones presentamos otras sinapsis abiertas con comunicaciones mucho mayores. En el presente trabajo, la comunicación entre el botón nervioso terminal y el soma neuronal de las figuras 1 y 2 tiene un diámetro muy grande, algo superior a la media micra.

La existencia de sinapsis abiertas es un fenómeno aparentemente revolucionario y heterodoxo, porque parece rebatir la teoría neuronal de Cajal. González Santander y col., (1988) afirman que es muy difícil la interpretación de la imagen ultraestructural de la sinapsis comunicante si se acepta la teoría neuronal, y proponen que la existencia de

este tipo de sinapsis representa una excepción a tal teoría; esta propuesta se refleja, incluso, en el propio título del trabajo (*Exceptions to Cajal's Neuron Theory: Communicating Synapses*).

Precisamente, en el 69^{ème} Congrès de l'Association des Anatomistes, celebrado en Tesalónica en mayo de 1987, presentamos una comunicación sobre un estudio ultraestructural de las sinapsis de los núcleos arcuato y supraóptico del hipotálamo de rata (Amat y col., 1987), en la que dimos a conocer varias imágenes ultraestructurales de sinapsis abiertas. Esta comunicación al citado Congreso desencadenó una acalorada discusión posterior, centrada fundamentalmente en la contradicción que representa la existencia de tales sinapsis y la teoría neuronal de Cajal.

Estamos de acuerdo con González Santander y sus colaboradores sobre la gran dificultad que entraña la interpretación funcional de las comunicaciones entre un botón nervioso terminal y el soma sobre el que hace sinapsis. Sin embargo, no tiene por qué representar un ataque a la teoría neuronal, y por ende a la teoría celular. Téngase en cuenta que los sincitios (por ejemplo, el sincitiotrofoblasto) representan una excepción a la teoría celular sin que por ello esta teoría se resienta en su parte esencial.

La existencia de sinapsis abiertas (o, lo que es lo mismo, de sinapsis comunicantes) podría ser una excepción a la teoría neuronal, excepción que confirmaría la regla. No obstante, creemos que tales sinapsis abiertas ni siquiera constituyen esa excepción, sino que pueden representar ciertos estadios funcionales de la actividad de las sinapsis.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que, en la organización estructural de algunos tejidos y órganos, existen puentes intercelulares. No nos referimos a los *puentes intercelulares falsos*, como es el caso de las espinas de las células del estrato espinoso de la epidermis, que se creía que representaban continuidades citoplasmáticas entre elementos celulares vecinos; el microscopio electrónico de transmisión echó por tierra esta creencia, al demostrar que tales espinas están fuertemente unidas por desmosomas. Nos referimos a los *puentes intercelulares verdaderos*, tales como los que existen en el epitelio seminífero (entre espermatogonias, por ejemplo) en el que hay comunicaciones idénticas a las de las sinapsis abiertas entre dos células vecinas; en los bordes de estas comunicaciones el plasmalema de una célula se continúa con la de la vecina. Por regla general, estos puentes intercelulares aparecen entre células procedentes de un mismo tronco celular matriz, como resultado de una citoquinesis incompleta o detenida en algún estadio. Los puentes intercelulares verdaderos en nada contradicen a la teoría celular, a pesar de que aparentemente puedan ser la expresión de un discreto sincitio. En el caso del epitelio seminífero, al finalizar la espermatogénesis, los espermatozoides resultantes son independientes de sus "hermanos".

En el sistema nervioso central, estos puentes intercelulares verdaderos no son infrecuentes. Uno de nosotros (Amat, 1978) demostró la presencia de interrupciones de la membrana plasmática de células endiméricas vecinas que establecían puentes de unión de los citoplasmas de ambos endimocitos. Incluso, estas comunicaciones se han descrito entre somas neuronales vecinos del núcleo arcuato del hipotálamo de ratas normales y de ratas sometidas a diversos experimentos en varias tesis doctorales, realizadas en nuestro Departamento (Domínguez, 1981; Peláez, 1989). En las figuras 6 y 7 pueden verse estas comunicaciones intersomáticas en el núcleo arcuato de una rata de dos meses de edad. El mismo carácter de puente intercelular tiene la comunicación que se está insinuando entre dos botones nerviosos terminales que hacen sinapsis sobre un soma, que presentamos en la Fig. 8.

Estos puentes intercelulares que unen somas neuronales, pueden estar en relación con un aumento de la actividad funcional de la célula nerviosa (obsérvese la gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso de la neurona de la figura 7, que destaca más si se tiene en cuenta que en el pericarion de las neuronas del núcleo arcuato, por regla general, hay escasez de organitos, entre ellos de retículo endoplásmico rugoso) y en relación también con la plasticidad estructural de algunos núcleos del hipotálamo; de esta plasticidad es especialmente protagonista la glía. Por ejemplo, en ciertas circunstancias funcionales los somas neuronales de los núcleos supraóptico y paraventricular pueden estar separados por finas prolongaciones gliales; pero en otras circunstancias tramos de estas prolongaciones gliales desaparecen y se establece así una yuxtaposición de los plasmalemas del pericarion de neuronas vecinas (véase Swanson y Kuypers, 1980). Montagnese y col. (1987) han observado en ratas parturientas y lactantes que grandes porciones de las neuronas oxitocinérgicas del núcleo supraóptico están yuxtapuestas, lo que posibilitaría una mayor sincronización de la función, particularmente en las células de la oxitocina que participan en el reflejo de la eyección de la leche.

Estas yuxtaposiciones de los plasmalemas que permiten un mayor contacto de célula con célula, fueron descritas también por Van den Pool (1980) en el núcleo supraquiasmático. Para este autor, el contacto de un soma neuronal con otro puede ser la expresión de un incremento de la interacción (*emphatic interaction*) entre neuronas así conectadas. En el espacio intercelular puede haber, según Van de Pool, material que actúa sujetando las membranas

en algunos sitios, y que en las preparaciones se detecta como puntos del espacio extracelular de mayor densidad electrónica; en esos sitios, en preparaciones fuertemente fijadas, las membranas pueden romperse y formar así comunicaciones intercelulares (puentes intercelulares).

En nuestros trabajos anteriores (Amat y col., 1981; Ledesma-Jimeno y col., 1982), exponíamos la dificultad que entraña la interpretación de las sinapsis abiertas, si bien llegamos a sugerir una remota posibilidad de relacionar su aparición con el tratamiento con clorpromazina, porque el número de estas sinapsis, siempre escaso, era algo mayor (o, al menos, así nos parecía) en ratas a las que se les había administrado aquel fármaco que en las ratas castradas (Ledesma-Jimeno y col., 1982). En el presente trabajo se demuestra la existencia de las sinapsis abiertas en ratas normales de ambos sexos, lo que permite sugerir que la aparición de dichas sinapsis es un fenómeno relativamente frecuente, reversible por las razones que expondremos más adelante, de duración muy breve y que puede expresarse, como ya se ha dicho, una especial actividad de la sinapsis. Esta actividad en un determinado momento puede ocurrir en unas sinapsis y no en otras.

También debe destacarse la mayor frecuencia de aparición de este fenómeno en sinapsis axosomáticas que en las axoaxonales y las axodendríticas; no obstante, existen en cualesquiera de ellas. En este trabajo presentamos una sinapsis abierta entre un botón nervioso terminal y un soma neuronal (Fig. 1) y entre dos botones nerviosos terminales (Fig. 3). En un trabajo anterior (Amat y col., 1987), describimos comunicaciones en una sinapsis axodendrítica; precisamente en ese trabajo, que fue una comunicación al Congreso de Tesalónica, intentábamos explicar la génesis de las sinapsis abiertas en una secuencia de imágenes ultraestructurales que están resumidas en las figuras 9 a 11 de este trabajo. A continuación pasamos a exponer sucintamente esta explicación.

Se sabe que en la hendidura sináptica hay material (proteínas y mucopolisacáridos) que unen las membranas presináptica y postsináptica, como ocurre en el espacio intersomático de las neuronas del núcleo supraquiasmático de la rata (véase, más arriba, el comentario al trabajo de Van den Pool). Estas membranas pueden fusionarse en algunas zonas (Figs. 9 y 10), y en esa zona de fusión, en donde el botón nervioso terminal y el soma de la neurona están separados solamente por una unidad de membrana, hemos observado en algunos casos vesículas de retículo endoplásmico liso que contactan con ella (Figs. 9 y 10). Estas vesículas son distintas a las de tipo sináptico o a otras relacionadas con neurotransmisores, que también forman parte del contenido específico de algunas terminaciones axónicas. Las vesículas contactantes, que no son las propias y características de los botones nerviosos terminales, parece que no están relacionadas con neurotransmisores sino con las mismas membranas sinápticas, y más concretamente con lo que puede denominarse *tráfico de membranas*, que pasamos a exponer.

Durante su actividad funcional el botón nervioso presináptico y el elemento postsináptico recuperan las pérdidas de membrana formando vesículas que pasan a su interior. La vesícula espiculada de la figura 11, unida a la membrana postsináptica formando una figura en omega, puede representar la recuperación de la membrana de superficie (que en este caso es la postsináptica del soma neuronal) por endocitosis (Palade, 1975). Pues bien, si la actividad a nivel de la sinapsis se incrementa, también debe incrementarse el tráfico de membranas.

En el caso de que haya hiperactividad, una vesícula que contacte con la única unidad de membrana resultante de la fusión de las membranas sinápticas, puede interiorizarse bien hacia un lado de la sinapsis (el botón nervioso terminal) o bien hacia el otro (soma neuronal o dendrita); en uno y otro caso puede llevarse consigo la zona de fusión de membranas sinápticas y de este modo originar un poro de comunicación, es decir, una sinapsis abierta.

Nosotros sospechamos que las sinapsis abiertas representan un estadio transitorio de hiperactividad sináptica, pasado el cual deben restaurarse las membranas presináptica y postsináptica, desapareciendo así el poro de comunicaciones. Expresado de otro modo: la existencia de una comunicación intercitolplasmática entre un botón nervioso terminal y el elemento postsináptico, comunicación que forma, un puente intercelular verdadero al que hemos denominado sinapsis abierta, es la expresión morfológica, efímera, transitoria y reversible de un proceso de hiperactividad en la sinapsis. Creemos que después de este proceso de hiperactividad, las membranas sinápticas se restauran y así se restablece la individualidad morfológica de las neuronas. En resumen, *la existencia de sinapsis abiertas no contradice en absoluto la teoría neuronal de Cajal.*

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a D. Valentín Alonso, D^a Soledad García, D^a María Manteca y D^a Olvido Martín por su asistencia técnica.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 288/84).

BIBLIOGRAFIA

- AMAT, P. (1978): Ultraestructura del epitelio endimario del hipotálamo neurosecretor. *Phronesis*, **38**: 43-45.
- AMAT, P., LEDESMA JIMENO, A., BLAZQUEZ, J.M., LLORCA, G. y PÉREZ URDANIZ, A. (1981a): Neuroleptic induced ultrastructural alterations in the rat neuroendocrine system. Preliminary study. *Phronesis*, **4**: 231-234.
- AMAT, P., MUÑOZ BARRAGÁN, L., DOMÍNGUEZ, F. J. y PASTOR, F.E. (1981b): Modificaciones de la sinapsis axo-somáticas en ciertas circunstancias experimentales: Sinapsis abiertas. *Actas de la II Reunión de Neurobiólogos Españoles*, pág. 27.
- AMAT, P., ÁLVAREZ-MORUJO, A.J., TORANZO, D., BLAZQUEZ, J.L. y PASTOR, F.E. (1978): Etude ultrastructurale des synapses des régions des noyaux arqué et supra-optique de l'hypothalamus chez le rat castré en différentes conditions experimentales. *Bull. Ass. Anat.*, **71**: 23.
- DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ, F. J. (1981): Aportaciones al conocimiento del hipotálamo mediobasal. Estudio con el microscopio electrónico. Tesis Doctoral de Medicina. Universidad de Salamanca.
- GONZÁLEZ-SANTANDER, R., MARTÍNEZ CUADRADO, G. y RUBIO, M. (1988): Exceptions to Cajal's neuron theory: Communicating synapses. *Acta anat.* **132**: 74-76.
- LEDESMA-JIMENO, A., DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ, F. J. PASTOR, F.E., LLORCA, G., BLÁZQUEZ, J.M. y AMAT, P. (1982): Comparative effects of castration and chlorpromazine in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the rat. *Actas Luso-Esp. Neurol Psiquiatr.*, **10/6**: 351-358.
- MONTAGNESE, C.M., POULAIN, D.A., VINCENT, J.D. y THEODOSIS, D.T. (1987): Structural plasticity in the rat supraoptic nucleus during gestation, post-partum and suckling-induced pseudogestation and lactation. *J. Endocr.*, **115**: 97-105.
- PALADE, G. (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**: 347-358.
- PELAEZ PEZZI, M.B. (1989): Estudio del hipotálamo mediobasal tras la castración o la administración del glutamato monosódico en ratas impúberes. Tesis doctoral de Medicina. Universidad de Salamanca.
- REYNOLDS, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**: 208-212.
- SWANSON, L.W. y KUYPERS, H.G.J.N. (1980): The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labelling methods. *J. Comp. Neurol.*, **194**: 555-570.
- VALZELLI, L. y LEDESMA, A. (1985): Estudios ultraestructurales con psicofármacos y su importancia para la clínica. En: *Psicofarmacología*, págs. 145-149. Jarypo Editores, S.A. Madrid.
- VAN DEN POL, A.N. (1980): The hypothalamic supra-chiasmatic nucleus of rat: Intrinsic Anatomy. *J. Comp. Neurol.*, **191**: 661-702.

Correspondencia: Dr. Pedro Amat
Dpto. de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina
Avda. del Campo Charro, s/n. 37007 Salamanca. España

DISTRIBUCION TOPOGRAFICA DE LAS NEURONAS OXITOCINERGICAS DURANTE LA GESTACION TARDIA Y LACTACION EN EL CEREBRO DE LA RATA

TOPOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF OXYTOCINERGIC NEURONS DURING LATE PREGNANCY AND LACTATION IN THE RAT BRAIN

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

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

RESUMEN

Cerebros de ratas gestantes a término y a los 2 y 9 días de lactación fueron analizados inmunocitoquímicamente, con el fin de observar los cambios en la topografía de las neuronas secretoras de oxitocina. Ratas nulíparas ovariectomizadas sirvieron como controles. En todos los grupos de animales se observaron somas y procesos inmunorreactivos a nivel de los núcleos magnocelulares supraóptico y paraventricular, así como en los islotes intersupraóptico-paraventriculares y en la eminencia media. En el día 22 de gestación fueron localizadas neuronas inmunorreactivas adicionales en la región preóptica, núcleo subcomisural anterior, región perifornical y zona incerta. Durante los 2 primeros días de lactación (postparto) fueron hallados, además, somas y procesos oxitocinérgicos intensamente teñidos en el núcleo periventricular, localizándose algunas neuronas en el núcleo del lecho de la estría terminal y en el ansa lenticular. Tras 9 días de lactación, la distribución topográfica de estas células fue comparable a la de los animales controles. Estos cambios sugieren que, en estas situaciones fisiológicas, la oxitocina podría actuar como mediador de los importantes cambios fisiológicos y de conducta existentes, por su posible liberación desde estas diversas regiones del cerebro.

PALABRAS CLAVE: Oxitocina, gestación tardía, lactación, rata.

SUMMARY

Brains of late pregnant rats and after 2 and 9 days of lactation were analyzed immunocytochemically with a view to observing changes occurring in the topography of the oxytocin-secreting neurons. Ovariectomized nulliparous rats served as controls. In all the groups of animals cell bodies and immunoreactive processes were observed in the supraoptic and paraventricular magnocellular nuclei and also in the intersupraoptic-paraventricular islands and in the median eminence. On day 22 of gestation additional immunoreactive neurons were found in the preoptic region, the anterior subcommissural nucleus, the perifornical region and the zona incerta. During the first days of lactation (postpartum), intensely stained cell bodies and oxytocinergic processes were found in the periventricular nucleus, some neurons also being found in the bed nucleus of the stria terminalis and the ansa lenticularis. At 9 days of lactation the topographical distribution of these cells was comparable to that of the control animals. These changes suggest that under such physiological situations, oxytocin might act as a mediator of the important changes occurring in the physiology and behaviour of the animals owing to its possible release from these different regions of the brain.

KEY WORDS: Oxytocin, late pregnancy, lactation, rat.

Introducción

La oxitocina (OT), hormona almacenada en el lóbulo neural de la hipófisis, es también una sustancia neuroactiva central implicada en la regulación de la conducta reproductiva (Pedersen et al., 1982; Fahrbach et al., 1985; Pedersen y Prange, 1985). Por medio de técnicas de radioinmunoensayo e inmunocitoquímicas a microscopía óptica, han sido demostrados cambios en la inmunorreactividad a OT en diversas regiones hipotalámicas, en ratas gestantes, parturientas y durante la lactación. Estos cambios consistieron en niveles inmunorreactivos de OT aumentados a nivel de los núcleos magnocelulares hipotalámicos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV), así como en el septum ventral y en otras zonas extrahipotalámicas (Greer et al., 1986; Caldwell et al., 1987).

Además de existir en el clásico sistema hipotálamo-neurohipofisario, los procesos de neuronas oxitocinérgicas están ampliamente distribuidos dentro del sistema límbico (Bujis y Swaab, 1979), el tronco del encéfalo y la médula espinal (Sofroniew y Schrell, 1981). Han sido reconocidas neuronas OT con proyecciones centrales, originándose de la porción dorsocaudal del NPV (Rhodes et al., 1981a), del núcleo comisural anterior, de la región preóptica (Scott et al., 1986) y de la zona incerta (Smithson y Hatton, 1986).

La topografía y el contenido de OT de los sistemas oxitocinérgicos del cerebro están influenciados por los esteroides ováricos (Caldwell et al., 1988). El tratamiento con estrógenos aumenta la actividad eléctrica de las neuronas de OT (Akaishi y Sakuma, 1985) y altera la distribución inmunocitoquímica de las mismas en el cerebro (Rhodes et al., 1981b; Jirikowski et al., 1988). En la gestación tardía la OT parece actuar como un neurotransmisor o neuromodulador facilitando el efecto de los esteroides ováricos sobre la iniciación de la conducta maternal (Pedersen et al., 1982; Fahrbach et al., 1985; Van Leengood et al., 1987).

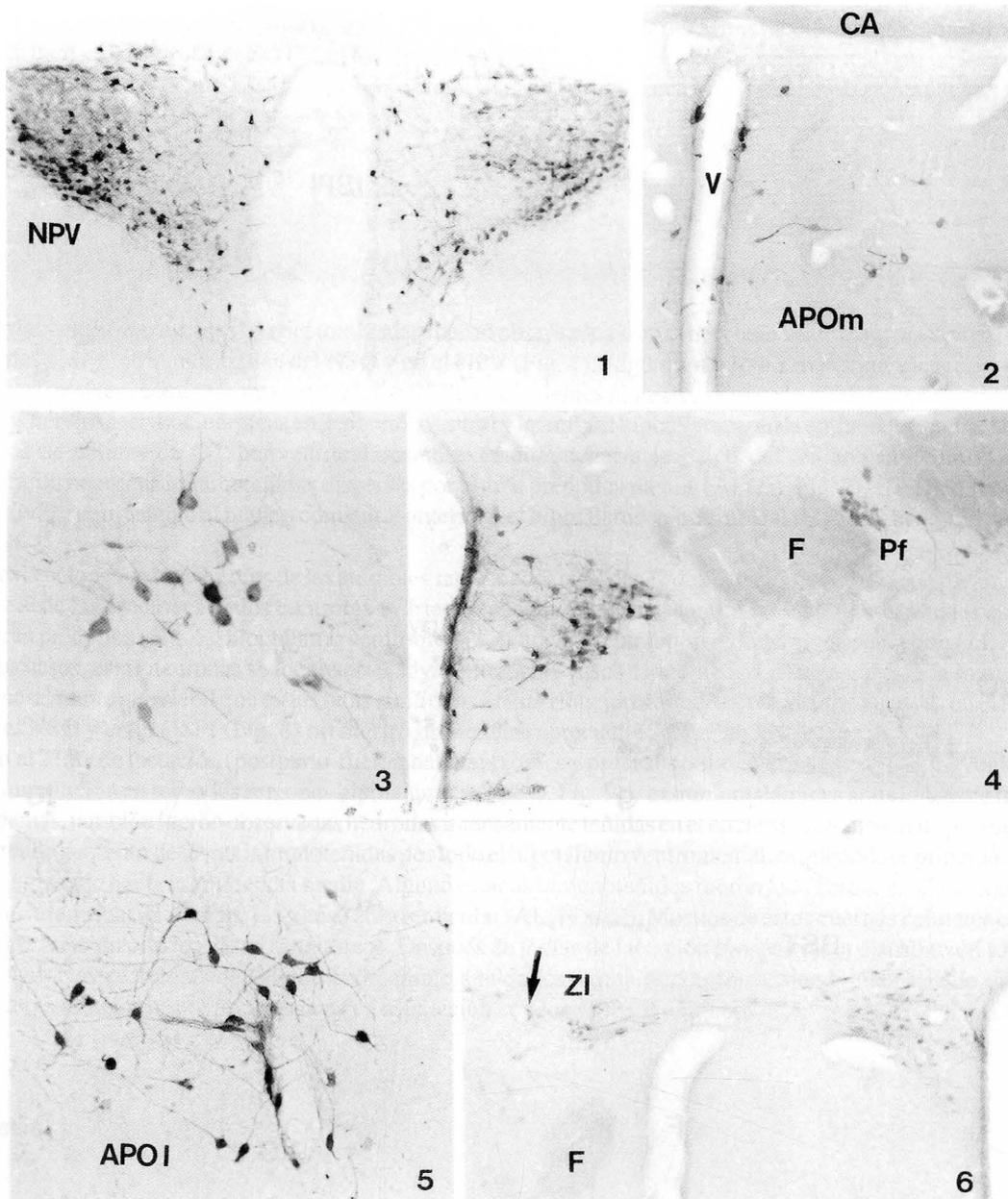
El propósito de este estudio fue analizar los cambios en la topografía de las neuronas inmunorreactivas a OT durante la gestación tardía y la lactación, cuando existen importantes cambios fisiológicos y conductuales.

Material y Métodos

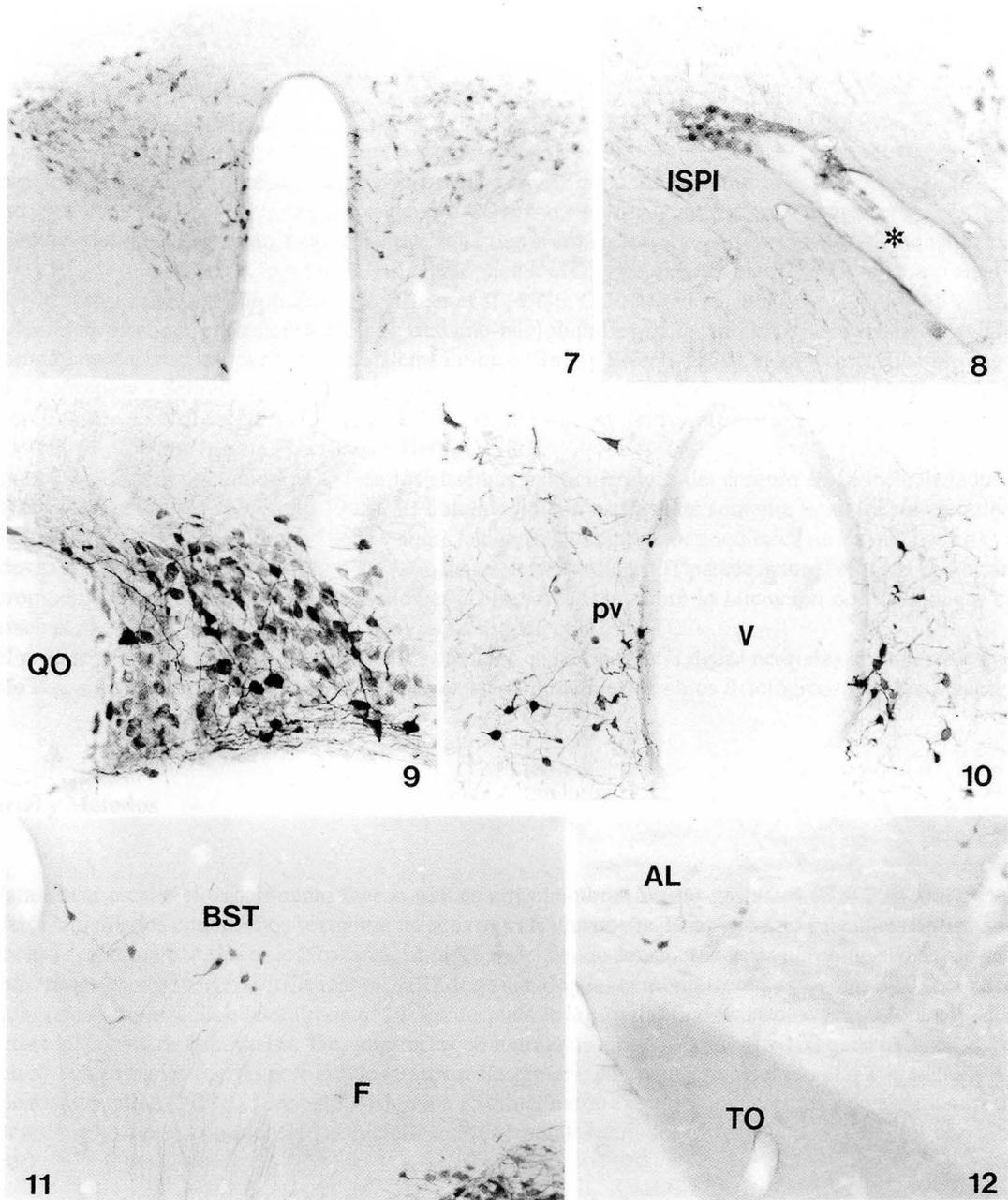
Para llevar a cabo el experimento fueron usadas ratas hembras Wistar gestantes (200-300 g). Los animales estuvieron enjaulados con machos sexualmente activos toda una noche. El estado de preñez fue confirmado por la presencia de espermatozoides en los frotis vaginales diarios, siendo considerado este día como el día 0 de gestación. Las hembras gestantes fueron sacrificadas el día 22 de gestación y las hembras lactantes los días 2 y 9 postparto. Ratas nulíparas ovariectomizadas bilateralmente (14 días después de la cirugía) sirvieron como grupo control. Cada grupo experimental constó de 6 animales. Tras anestesia con hidrato de cloral (40 mg. por 100 g. de peso en suero salino isotónico), los animales fueron perfundidos transcárdiacamente con paraformaldehído al 4% + sucrosa al 7% en tampón fosfato salino (PBS, 0.1 M, pH 7.4) durante 15 min. Fueron extraídos los cerebros y post fijados en el mismo fijador toda la noche. A continuación se hicieron cortes frontales seriados (50 μ m.) de los cerebros con vibratomo (Lancer)

Técnica inmunocitoquímica

Los antisueros contra OT sintética (Sigma) fueron conseguidos en conejos por inmunización intradérmica con OT acoplada a tiroglobulina por paraformaldehído. Para detalles sobre la preparación y caracterización de los antisueros, ver Jirikowski et al. (1988). Las secciones de vibratomo fueron incubadas toda la noche en suero anti-OT diluido 1:1.000 en PBS con 0.05% de Triton X-100, a 4° C. El antisuero primario fue usado preabsorbido con argvasopresina sintética (100 mg./ml.) y arg-vasotocina sintética (100 mg./ml., ambos péptidos obtenidos de Sigma). Después de la incubación con IgG anti-conejo (DAKO) a dilución 1:100 en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente, las secciones fueron incubadas con complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) de conejo (DAKO) diluido 1:50 en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente. Los inmunoprecipitados fueron teñidos con 3,3'-diaminoben-



- FIGURAS 1 A 4.** Hembras nulíparas ovariectomizadas.
- FIGURA 1.** Neuronas inmunorreactivas a oxitocina visibles en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). x 150.
- FIGURA 2.** Sección frontal del hipotálamo anterior, donde pueden verse algunas neuronas oxitocinérgicas dispersas por el área preóptica medial (APOm). CA = comisura anterior; V = 3^{er} ventrículo. x 250.
- FIGURA 3.** Neuronas y procesos neuronales localizados a nivel del hipotálamo ventromedial. x 550.
- FIGURA 4.** Lateralmente con respecto al núcleo paraventricular, existe un grupo neuronal inmunorreactivo en la región perifornical (Pf). F = fórnix. x 250.
- FIGURAS 5 y 6.** Animales sacrificados en el día 22 de gestación. Obsérvense neuronas bien teñidas en la porción lateral del área preóptica (Fig. 5, APOl) y un grupo de células localizadas en la zona incerta (ZI) (Fig. 6), con proyecciones hacia el núcleo paraventricular. Algunas de ellas están en estrecha relación con un vaso sanguíneo (flecha). F = fórnix. Fig. 5: x 450; Fig. 6: x 250.



- FIGURA 7** En el día 22 de gestación, la inmunorreacción en el núcleo paraventricular fue generalmente más débil en relación con los animales ovariectomizados. x 150.
- FIGURA 8** Grupo de neuronas inmunorreactivas de un animal en el último día de gestación, que corresponde a los islotes intersupraóptico-paraventriculares (ISPI). Nótese que las neuronas se encuentran adyacentes a un vaso sanguíneo (*). x 550.
- FIGURAS 9 a 12** Animales sacrificados en el 2º día de lactación (postparto). La inmunotinción fue generalmente más intensa, como puede observarse a nivel del núcleo supraóptico (Fig. 9) y del núcleo periventricular (pv, Fig. 10). Otras neuronas inmunorreactivas a oxitocina fueron localizadas en el núcleo del lecho de la estria terminal (BST, Fig. 11) y en el ansa lenticular (AL, Fig. 12). V = 3º ventrículo; F = fórnix; QO = quiasma óptico; TO = tracto óptico). Fig. 9: x 400. Fig. 10: x 400. Fig. 11: x 250. Fig. 12: x 250.

cidina y agua oxigenada al 0.02% en tampón Tris-CIH 0.05 M. Los controles inmunocitoquímicos fueron realizados con antisuero preabsorbido con OT sintética (100 mg./ml. Sigma) o con suero preinmune en lugar de suero anti-OT. Las secciones teñidas fueron lavadas en agua, deshidratadas en series ascendentes de etanol, montadas con Entellan® y examinadas con un fotomicroscopio Zeiss.

Resultados

En las hembras controles ovariectomizadas fueron observados somas neuronales inmunorreactivos a OT, en las porciones pre- y retroquiasmática del NSO y en el NPV (Fig. 1). Algunas neuronas oxitocinérgicas aparecieron en los islotes intersupraóptico-paraventriculares (ISPI, equivalentes al *nucleus circularis*). Fueron observados haces de fibras nerviosas oxitocinérgicas en la porción ventral y lateral del hipotálamo y en la eminencia media. Unos pocos procesos de células de OT periventriculares se extendieron hacia la pared del tercer ventrículo. También se encontraron neuronas inmunoteñidas dispersas por el área preóptica medial (APOm, Fig. 2), el núcleo subcomisural lateral (NSL, equivalente al núcleo comisural anterior), el hipotálamo ventromedial (Fig. 3) y la región perifornical (Pf, Fig. 4).

Las secciones de los cerebros de los animales sacrificados en el día 22 de gestación mostraron un patrón de tinción similar al de las secciones de los controles ovariectomizados. Neuronas inmunorreactivas adicionales aparecieron en el área preóptica (Fig. 5), hipotálamo ventromedial, el núcleo septohipotalámico y la zona incerta (ZI, Fig. 6). En muchos casos, estas neuronas se localizaron adyacentes a los vasos sanguíneos. La intensidad de la inmunotinción fue generalmente más débil que en las ratas controles. La distribución de neuronas inmunorreactivas en el NVP (Fig. 7), en el NSO y en los ISPI (Fig. 8) no mostró diferencias apreciables entre ambos grupos.

En el 2º día de lactación (postparto) fueron hallados somas y procesos oxitocinérgicos con una mayor intensidad de inmunotinción en todas las regiones hipotalámicas (NSO, Fig. 9) y extrahipotalámicas anteriormente mencionadas; además, también fueron observadas neuronas intensamente teñidas en el núcleo periventricular (pv, Fig. 10), con un marcado aumento de fibras inmunoteñidas por todo el hipotálamo ventromedial, originándose principalmente del NPV y cursando hacia la eminencia media. Algunos somas inmunoteñidos fueron localizados en el núcleo del lecho de la estría terminal (BST, Fig. 11) y en el ansa lenticular (AL, Fig. 12). Muchos de estos cuerpos celulares estuvieron en íntima relación con los vasos sanguíneos. Después de 9 días de lactación (posparto), la distribución topográfica de las neuronas secretoras de OT fue comparable a la de los animales controles, siendo más aislado el hecho de encontrar estas neuronas oxitocinérgicas en asociación con los vasos sanguíneos.

Discusión

La distribución de neuronas y fibras nerviosas inmunorreactivas a OT, observada en los controles ovariectomizados y en las ratas en el 9º día de lactación, fue muy similar a la topografía de inmunotinción para OT descrita previamente por otros autores en ratas normales (Rhodes et al., 1981a; Sofroniew y Schrell, 1981). Mientras que la distribución de neuronas inmunoteñidas en los clásicos núcleos magnocelulares NSO y NPV fue similar en todos los grupos experimentales, se observaron cambios en la topografía oxitocinérgica fuera de estos núcleos.

Ha sido demostrada la aparición de neuronas adicionales inmunorreactivas a OT agrupadas en torno a los vasos sanguíneos, en diferentes regiones del hipotálamo de ratas parturientas (Jirikowski et al., 1989). La existencia de estas neuronas oxitocinérgicas indica un papel significativo de la OT perivascular durante el parto, cuando esta neurohormona es liberada a la circulación portal-hipofisaria y sistémica (Fuchs y Saito, 1971; Fuchs y Dawood, 1980; Fuchs et al., 1983).

La aparición de neuronas inmunorreactivas a OT ampliamente distribuidas en asociación con vasos sanguíneos, durante la gestación tardía y primeras etapas de la lactación, puede estar facilitada por cambios en los niveles de los

esteroides ováricos que acontecen al final de la gestación y durante el parto (Bridges, 1984). El tratamiento con estrógenos aumentó el número de neuronas de OT que proyectan hacia el área preóptica, núcleo subcomisural lateral, hipotálamo ventromedial y núcleo periventricular (Jirikowski et al., 1988). La localización de neuronas de OT dentro de estas áreas del cerebro fue muy similar en ratas tratadas con estrógenos y en el postparto. Por ello es probable que el incremento de inmunorreactividad de las neuronas oxitocinérgicas fuera de los clásicos núcleos magnocelulares durante el postparto sea facilitado por los altos niveles de estrógenos existentes en torno al parto. La inmunotinción más débil y la presencia disminuida de varicosidades puede reflejar una actividad secretora alta en todas las neuronas de OT durante el periodo del parto.

Estos cambios en los sistemas oxitocinérgicos del cerebro indican la existencia de neuronas secretoras de OT accesorias situadas en zonas hipotalámicas y extrahipotalámicas durante la gestación tardía y las primeras etapas de la lactación, cuando existen cambios importantes en los niveles endógenos de esteroides ováricos y cuando emerge la conducta maternal (Pedersen et al., 1982). Estos cambios pueden estar mediados por la liberación de OT desde estas zonas accesorias del cerebro.

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Dr. G.F. Jirikowski por habernos cedido gentilmente el suero anti-oxitocina usado para el estudio inmunocitoquímico. El Dr. E. Blanco ha sido becario del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS 87/2245).

BIBLIOGRAFIA

- AKAISHI, T. y SAKUMA, Y. (1985): Estrogen excites oxytocinergic but not vasopressinergic cells in the paraventricular nucleus of female rat hypothalamus. *Brain Res.* **355**: 302-305.
- BRIDGES, R.S. (1984): A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology* **114**: 930-940.
- BUIJS, R.M. y SWAAB, D.F. (1979): Immunoelectron microscopic demonstration of vasopressin and oxytocin synapses in the limbic system of the rat. *Cell Tissue Res.* **204**: 355-365.
- CALDWELL, J.D.; GREER, E.R.; JOHNSON, M.F.; PRANGE, A.J. Jr. y PEDERSEN, C.A. (1987): Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic sites in late pregnant and postpartum rats. *Neuroendocrinology* **46**: 39-47.
- CALDWELL, J.D.; JIRIKOWSKI, G.F.; GREER, E.R.; STUMPS, W.E. y PEDERSEN, C.A. (1988): Ovarian steroids and sexual interaction after oxytocinergic content and distribution in the basal forebrain. *Brain Res.* **446**: 236-244.
- FAHRBACH, S.; MORELL, J.I. y PFAFF, D.W. (1985): Possible role for oxytocin in estrogen facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* **40**: 526-532.
- FUCHS, A.R. y DAWOOD, M.Y. (1980): Oxytocin release and uterine activation during parturition in rabbits. *Endocrinology* **107**: 1.117-1.126.
- FUCHS, A.R. y SAITO, S. (1971): Pituitary oxytocin and vasopressin content of pregnant rats before, during and after parturition. *Endocrinology* **88**: 574-578.
- FUCHS, A.R.; GOESCHEN, K.; HUSSLEIN, P.; RASMUSSEN, A.B. y FUCHS, F. (1983): Oxytocin and the initiation of human parturition. III. Plasma concentrations of oxytocin and 13, 14 dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2a} in spontaneous and oxytocin-induced labor at term. *Am. J. Obstet.* **147**: 497-502.
- GREER, E.R.; CALDWELL, J.D.; JIRIKOWSKI, G.F.; STUMPF, W.E.; PRANGE, A.J. Jr. y PEDERSEN, C.A. (1986): Changes in oxytocin and vasopressin content and distribution in the brain across late pregnancy and early postpartum. *Soc. Neurosci. Abs.* **12**: 298.
- JIRIKOWSKI, G.F.; CALDWELL, J.D.; PEDERSEN, C.A. y STUMPF, W.E. (1988): Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neuroscience* **25**: 237-248.
- JIRIKOWSKI, G.F.; CALDWELL, J.D.; PILGRIM, Ch.; STUMPF, W.E. y PEDERSEN, C.A. (1989): Changes in immunostaining for oxytocin in the forebrain of the female rat during late pregnancy, parturition and early lactation. *Cell Tissue Res.* **256**: 411-417.
- PEDERSEN, C.A. y PRANGE, A.J. Jr. (1985): Oxytocin and mothering behavior in the rat. *Pharmac. Ther.* **28**: 287-288.
- PEDERSEN, C.A.; ASCHER, J.A.; MONROE, Y.L. y PRANGE, A.J. Jr. (1982): Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. *Science* **216**: 648-649.

- RHODES, C.H.; MORREL, J.I. y PFAFF, D.W. (1981a): Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin oxytocin and vasopressin. *J. Comp. Neurol.* **198**: 45-64.
- RHODES, C.H.; MORREL, J.I. y PFAFF, D.W. (1981b): Distribution of estrogen-concentrating, neurophysin-containing magnocellular neurons in the rat hypothalamus as demonstrated by a technique combining autoradiography and immunohistology in the same tissue. *Neuroendocrinology* **33**: 18-23.
- SCOTT, D.A.; WEISS, M.L. y MISELIS, R.R. (1986): Septal projections to accessory magnocellular neurons of the preoptic-hypothalamic region. *Soc. Neurosci. Abs.* **12**: 314.17.
- SMITHSON, K.G. y HATTON, G.I. (1986): Evidence for zona incerta projections to the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus. *Soc. Neurosci. Abs.* **12**: 341.19.
- SOFRONIEW, M.V. y SCHRELL, U. (1981): Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: Immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced in the same neuron. *Neurosci. Lett.* **22**: 211-217.
- VAN LEENGOOD, E.; KERKER, E. y SWANSON, H.H. (1987): Inhibition of post-partum maternal behavior in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J. Endocrinol.* **112**: 275-282.

Correspondencia: Dr. E. Blanco
Dpto. de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Av. Campo Charro s/n
37007 Salamanca. España

**INERVACION DOPAMINERGICA DEL ESTRIADO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON:
DATOS ACTUALES APORTANDO NUESTRA EXPERIENCIA PERSONAL**

**DOPAMINE-CONTAINING INNERVATION OF THE STRIATUM AND PARKINSON'S
DISEASE. CURRENT DATA INCLUDING OUR OWN PERSONAL EXPERIENCE**

A. CARMONA, C.J. CATALINA y J. JIMENEZ-CASTELLANOS

Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Sevilla

RESUMEN

En el presente trabajo pretendemos aportar una serie de datos sobre la subdivisión anatómica y neuroquímica del complejo dopaminérgico mesencefálico en relación con las proyecciones mesoestriadas que el complejo nigral envía al estriado, haciendo a la vez unos apuntes sobre las potenciales implicaciones aplicativas de estos hallazgos sobre la patología parkinsoniana. Los autores no han pretendido realizar una revisión exhaustiva del tema, que sobrepasaría los límites de espacio disponibles, sino aportar su propia experiencia, junto a la de otros investigadores para tratar de mostrar una visión clara y concisa sobre el tema.

PALABRAS CLAVE: Sustancia negra, estriado, sistemas mesoestriados, gato, mono.

SUMMARY

In the present paper a number of data on the anatomical and neurochemical subdivision of the mesencephalic dopamine-containing cell complex in relation to the mesostriatal projection systems are reviewed. At the same time the potential clinical implications of these findings are briefly considered. The authors did not pretend to make an exhaustive revision on the subject but to report their own experience together with that from other groups in order to present a clear, brief but actual view of the problem.

KEY WORDS: Substantia nigra, striatum, mesostriatal systems, cat, monkey.

Introducción

Las relaciones entre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y las neuronas del estriado han sido y son materia de intensas investigaciones quizá porque la patogénesis de la enfermedad de Parkinson ha sido claramente asociada a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas del complejo nigral. La implicación que posee la degeneración neuronal observada, no solo en la enfermedad de Parkinson idiopática, sino también en otros síndromes parkinsonianos, es que el profundo déficit motor en el movimiento voluntario y otras alteraciones de la esfera motora, característicos del parkinsonismo, son, probablemente, atribuibles a la disfunción de la inervación nigro-estriada. Por

tanto, el examen de las relaciones funcionales entre estas neuronas dopaminérgicas y el estriado añadirá datos importantes para conocer cómo la información que llega al estriado, que es procesada y que sale del mismo, en último extremo es capaz de afectar al control del comportamiento motor voluntario.

El sistema dopaminérgico mesencefálico

Además de las clásicas subdivisiones topográficas de la sustancia negra (pars compacta, pars reticulata y pars lateralis), las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en la región del complejo nigral son clasificadas igualmente en varios grupos. La segregación de las células monoaminérgicas fue primeramente descrita por Dahlstrom y Fuxe (1964). Estos grupos neuronales dopaminérgicos mesencefálicos fueron denominados A8, A9 y A10, y corresponden al área retrorrubral, a la pars compacta de la sustancia negra y al área tegmental ventral respectivamente. Adicionalmente se creía que en estos grupos neuronales se originaban dos principales sistemas de proyección: el sistema de proyección nigroestriado (originándose en A9 y terminando en el estriado, núcleo caudado y putamen, con exclusividad), y el sistema mesolímbico (originado en A10 y terminando en una amplia gama de estructuras "límbicas" del prosencéfalo). Pronto se hizo evidente, no obstante, gracias a las técnicas neuroanatómicas basadas en el transporte axonal anterógrado o retrógrado, que la distinción entre sistema nigroestriado y sistema mesolímbico no era absoluta. Por ejemplo, el estriado no recibe proyecciones exclusivamente del grupo A9, sino que también las recibe, abundantemente, del grupo A8, e incluso el grupo A10 también proyecta, al menos, a la porción más ventral del caudoputamen (estriado ventral de Heimer y Wilson, 1975).

De acuerdo a una visión más actualizada, las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo se consideran como formando parte de una única banda de células dopaminérgicas con campos de proyección amplios y que ciertamente se solapan entre sí. Así, los sistemas mesencefálicos de proyección son referidos actualmente en relación a sus campos o áreas de proyección terminal: sistemas mesoestriado, mesocortical (o mesolímbocortical), mesodiencefálico y mesopontino. Estos sistemas reflejan la distribución de fibras nerviosas desde el complejo A8-A9-A10 hasta: 1) el núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens septi y globus pallidus; 2) áreas corticales y prosencefálicas "límbicas", como el bulbo olfatorio, núcleos olfatorios anteriores, islotes de Calleja, núcleo septal lateral, núcleo de la estría terminal, corteza piriforme, complejo amigdalino, corteza entorrinal ventral, hipocampo, corteza suprarrenal, corteza anteromedial pregenual, corteza perirrinal y corteza temporal de asociación; 3) el núcleo subtalámico y la habénula lateral, y 4) el locus coeruleus (Bjorklund y Lindvall, 1984). Dentro de estos sistemas mesencefálicos de proyección también hay neuronas que no contienen dopamina. Por ejemplo, alrededor del 15% de las neuronas del área tegmental ventral que proyectan al estriado ventral no son dopaminérgicas (Swanson, 1982). Sin embargo, menos del 5% de las neuronas mesencefálicas que proyectan al núcleo caudado son no-dopaminérgicas (Van der Kooy et al., 1981).

Nuevas subdivisiones anatómicas y neuroquímicas de la sustancia negra

En los primates existe la evidencia de que las neuronas de la pars compacta de la sustancia negra que proyectan al estriado se hallan segregadas en grupos funcionalmente distintos. El grupo de Parent (Parent et al., 1983; Smith y Parent, 1986) ha demostrado que las neuronas de proyección nigroestriada en los primates proyectan, casi con exclusividad, bien al núcleo caudado o al putamen, y que estos grupos neuronales se interdigitan en la pars compacta de la sustancia negra. De igual modo las fibras caudo-nigrales y putámico-nigrales se hallan bastante segregadas a nivel de su terminación en la sustancia negra, principalmente en la pars reticulata, pero también en la pars compacta. Análogamente se pueden diferenciar grupos de neuronas nigrales que proyectan al estriado por sus patrones distintivos de inervación del núcleo caudado y putamen. Cuando se efectúan inyecciones de trazadores anterógrados en la sustancia negra se ha observado un marcaje terminal no homogéneo en el estriado de la rata, gato y mono (Wright y Arbuthnott, 1981; Moon-Eldey y Herkenham, 1983; Beckstead, 1985; Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1985, 1986, 1987a, 1987b; Feigenbaum y Graybiel, 1988; Langer y Graybiel, 1989). En el mono, el grupo A8 y la pars mixta proyectan predominantemente al compartimento extraestriado o matriz del estriado, caracterizada por su riqueza en actividad acetilcolinérgica. Las neuronas más mediales del grupo A10 proyectan

preferentemente al núcleo accumbens. La pars compacta de la sustancia negra, al menos la porción lateral de la porción más densa celularmente hablando, proyecta abundantemente al compartimento estrioso del estriado, caracterizado por su menor actividad acetilcolinérgica frente a la matriz extraestriosa. Estos hallazgos sugieren que existirían distintos canales de proyección mesoestriada que regularían de modo diferencial a los demás sistemas aferentes y eferentes del estriado (Graybiel, 1984).

Lo que hoy se conoce sobre la heterogeneidad neuroquímica de la sustancia negra está basado ampliamente en los datos que se poseen sobre la naturaleza bioquímica de las aferencias que llegan a la sustancia negra, así como en los componentes neuronales intrínsecos de la misma. La sustancia negra recibe conexiones aferentes desde una amplia gama de estructuras aparte del estriado (Graybiel y Ragsdale, 1979), y, quizá con excepción de este último, la mayoría de las aferencias están dirigidas a la pars compacta. Las fibras estriónigrales contienen GABA, sustancia P y dinorfina. Además, otros neurotransmisores, neuropéptidos y compuestos han sido detectados en las terminales de las demás aferencias que llegan a la sustancia negra, como el ácido glutámico, serotonina, GABA, sustancia P, somatostatina, encefalina, etc. (Graybiel y Ragsdale, 1983). Entre los compuestos contenidos no en las aferencias, sino en las propias neuronas de la sustancia negra podemos citar, aparte de la dopamina, a la acetilcolinesterasa (interneuronas), GABA, encefalina, colecistokinina, neurotensina, etc., si bien estas dos últimas no han sido detectadas en el mono sino en la rata. Muchas de estas sustancias se distribuyen de un modo no homogéneo en la sustancia negra. El significado de estos patrones de distribución neuroquímica está aún por aclarar, si bien es posible que pudieran representar subdivisiones anatómicas diferenciadas. Por ejemplo cuando Jiménez-Castellanos y Graybiel (1987a) describen en el gato zonas histológicamente diferentes de actividad acetilcolinérgica (AChE) en la pars compacta de la sustancia negra, que recuerdan en apariencia a la compartimentación estriosa observada en el estriado, no solo muestran que las regiones del neuropilo ricas y pobres en AChE corresponden a grupos de neuronas inmunorreactivas a la enzima de síntesis catecolaminérgica tirosina hidroxilasa (TH) diferenciables igualmente en material procesado por la técnica de Nissl, sino también que estos grupos de neuronas proyectan preferentemente al sistema estrioso o a la matriz extraestriosa. En la pars compacta del mono se observa una compartimentación acetilcolinérgica si cabe más compleja, donde no se ha podido demostrar convincentemente si estos compartimentos histológicos nigrales están relacionados o no desde el punto de vista de sus conexiones con la compartimentación estriosa observable en el estriado, si bien en muchos casos se ha visto que las neuronas de proyección nigroestriada se disponen respetando los límites de los compartimentos observados en las preparaciones nigrales procesadas para detectar la actividad acetilcolinérgica (Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1987b, 1989a).

Compartimentación en el sistema de proyección mesoestriada

El estriado constituye un heterogéneo y complejo sistema de circuitos funcionales topográficamente organizados y que poseen una compartimentación relacionada con las conexiones aferentes, eferentes e intrínsecas, así como con la distribución de los substratos de su propia neuroquímica. Originalmente la compartimentación estriatal fue descubierta en el estriado inmaduro (Olson et al., 1972; Tennyson et al., 1972). En el estriado adulto se ha observado que la compartimentación también está presente, y que zonas pobres en actividad acetilcolinérgica (estriosomas) se hallan inmersas en una matriz extraestriosa más rica en actividad acetilcolinérgica (Graybiel y Ragsdale, 1978). Desde este hallazgo pionero se ha demostrado que los estriosomas corresponden a zonas estriales que se caracterizan además por sus concentraciones diferencialmente altas o diferencialmente bajas de la mayoría de los neurotransmisores y/o enzimas relacionadas, neuropéptidos (ver Graybiel y Ragsdale, 1983; Graybiel, 1989) e incluso con la localización de lugares de ligamento para opioides (Moon-Edley y Herkenham, 1983) y para receptores dopaminérgicos (Beckstead, 1987; Besson et al., 1988). Utilizando técnicas de transporte axonal se ha demostrado que la compartimentación estriatal está igualmente relacionada con la proyección dopaminérgica que arriba al estriado (Moon-Edley y Herkenham, 1983; Jiménez-Castellanos y Graybiel, 1985, 1987a; Langer y Graybiel, 1989). Por último, la inmunoreactividad fibrilar frente a tirosina hidroxilasa (TH) en el estriado adulto se ha visto que tampoco está distribuida de un modo homogéneo, correspondiendo a las zonas estriales una inmunoreactividad más reducida en comparación con la inmunoreactividad más intensa observada en las zonas de la matriz

extraestriósomica (Graybiel et al., 1987). Como sugieren estos últimos autores, este heterogéneo patrón de distribución de la inmunoreactividad frente a TH podría indicar la presencia de unos subsistemas dopaminérgicos que se podrían distinguir por sus diferencias en regulación enzimática o actividad neuronal.

Potenciales implicaciones clínicas

La importancia de las conexiones entre la sustancia negra y el estriado procede en gran medida del gran esfuerzo investigador realizado para dilucidar la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Como contábamos en la introducción, en esta enfermedad las neuronas de la sustancia negra se encuentran degeneradas. Igualmente se ha observado una importante pérdida neuronal en la sustancia negra de pacientes que poseen un síndrome parkinsoniano inducido por un agente neurotóxico, la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP). Estudios recientes en pacientes afectados de la enfermedad de Parkinson y en animales tratados experimentalmente con la droga MPTP indican que la pérdida neuronal en el complejo nigral no es en modo alguno uniforme (Deutch et al., 1986; Hirsch et al., 1988; German et al., 1988). Aparentemente sólo un grupo específico de neuronas dopaminérgicas son selectivamente vulnerables en la enfermedad de Parkinson y en los animales lesionados. Incluso existen algunos datos que parecen indicar que estos grupos neuronales específicamente vulnerables podrían ser identificados por las proyecciones que envían al estriado. Así, en perros tratados con MPTP, los grupos neuronales de la sustancia negra que proyectan al sistema estriósomico o a la matriz extraestriósomica parecen encontrarse diferencialmente afectados (Wilson et al., 1987; Turner et al., 1988). Todos estos datos, muchos aún en fase preliminar, en definitiva resaltan la importancia potencial de proseguir las investigaciones para identificar funcionalmente distintos grupos neuronales en el complejo dopaminérgico mesencefálico a través de sus conexiones mesoestriadas.

BIBLIOGRAFIA

- BECKSTEAD, R.M. (1985): Complementary mosaic distributions of thalamic and nigral axons in the caudate nucleus of the cat: double anterograde labelling combining autoradiography and wheat germ-HRP histochemistry. *Brain Res.* **335**: 153-159.
- BECKSTEAD, R.M.; WOOTEN, G.F. y TRUGMAN, J.M. (1988). Distribution of D1 and D2 receptors in the basal ganglia of the cat determined by quantitative autoradiography. *J. Comp. Neurol.* **268**: 131-145.
- BESSON, M.J.; GRAYBIEL, A.M. y NASTUK, M.A. (1988): (3H)-SCH23390 binding to D1 dopamine receptors in the basal ganglia of the cat and primate: delineation of striosomal compartments and pallidal and nigral subdivisions. *Neuroscience* **26**: 101-119.
- BJORKLUND, A. y LINDVALL, O. (1984): Dopamine-containing systems in the central nervous system. En *Handbook of clinical Neuroanatomy*. Vol. 2. Classical transmitters in the central nervous system. Elsevier Press, Amsterdam.
- DAHLSTROM, A. y FUXE, K. (1964): Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* **62**: 1-55.
- DEUTCH, A. Y.; ELSWORTH, J.D.; GOLDSTEIN, M.; FUXE, K.; REDMOND, D.E.; SLADEK, J.R. y ROTH, R.T. (1986): Preferential vulnerability of A8 dopamine neurons in the primate to the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Neurosci. Lett.* **68**: 51-56.
- GERMAN, D.C.; DUBACH, M.; ASKARI, S.; SPECIALE, S.G. y BOWDEN, D.M. (1988): 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism syndrome in *Macaca fascicularis*: which midbrain dopaminergic neurons are lost? *Neuroscience*. **24**: 161-174.
- GRAYBIEL, A.M. (1984): Neurochemically specified subsystems in the basal ganglia. En *Functions of the basal ganglia*. Pitman, London.
- GRAYBIEL, A.M. (1989): Dopaminergic and cholinergic systems in the striatum. En *Neural mechanisms in disorders of movement*, 3-15. Libbey, London.
- GAYBRIEL, A.M.; HIRSCH, E.C. y AGID, Y.A. (1987): Differences in tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity characterize the nigrostriatal innervation of striosomes and extra-striosomal matrix. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* **84**: 303-307.
- GRAYBIEL, A.M. y RAGSDALE, C.W. (1978): Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylcholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 5723-5726.
- GRAYBIEL, A.M. y RAGSDALE, C.W. (1979): Fiber connections of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* **51**: 239-283.
- GRAYBIEL, A.M. y RAGSDALE, C.W. (1983): Biochemical anatomy of the striatum. En *Chemical neuroanatomy*, 427-504. Raven Press, New York.

- HEIMER, L. y WILSON, R.D. (1975). The subcortical projections of the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the pyriform cortex, and the neocortex. En Golgi Centennial Symposium. Proceedings, 177-193. Raven Press, New York.
- HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A.M. y AGID, Y.A. (1988): Melanized neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **344**: 345-348.
- JIMÉNEZ-CASTELLANOS, J. y GRAYBIEL, A.M. (1985): The dopamine-containing innervation of striosomes: nigral subsystems and their striatal correspondents. *Soc. Neurosci. Abstr.* **11**: 1249.
- JIMÉNEZ-CASTELLANOS, J. y GRAYBIEL, A.M. (1986): Innervation of striosomes and extrastriosomal matrix by different subdivisions of the midbrain A8-A9-A10 dopamine-containing cell complex. *Soc. Neurosci. Abstr.* **12**: 1327.
- JIMÉNEZ-CASTELLANOS, J. y GRAYBIEL, A.M. (1987a): Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. *Neuroscience* **23**: 223-242.
- JIMÉNEZ-CASTELLANOS, J. y GRAYBIEL, A.M. (1987b): Subdivisions of the primate substantia nigra pars compacta detected by acetylcholinesterase activity. *Brain Res.* **437**: 349-354.
- JIMÉNEZ-CASTELLANOS, J. y GRAYBIEL, A.M. (1989a): Evidence that histochemically distinct zones of the primate substantia nigra pars compacta are related to patterned distributions of nigrostriatal projection neurons and striatonigral fibers. *Exp. Brain Res.* **74**: 227-238.
- JIMÉNEZ-CASTELLANOS, J. y GRAYBIEL, A.M. (1989b): Compartmental origins of striatal efferent projections in the cat. *Neuroscience* **32**: 297-321.
- LANGER, L.F. y GRAYBIEL, A.M. (1989): Distinct nigrostriatal projection systems innervate striosomes and matrix in the primate striatum. *Brain Res.* (en prensa).
- MOON-EDLEY, S. y HERKENHAM, M. (1983): Heterogeneous dopaminergic projections to the neostriatum of the rat: nuclei of origin dictates relationship to opiate receptor patches. *Anat. Rec.* **205**: 120A.
- OLSON, L.; SEIGER, A. y FUXE, K. (1972): Heterogeneity of striatal and limbic innervation: highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Res.* **44**: 283-288.
- PARENT, A.; MACKAY, A. y DEBELLEFEUILLE, L. (1983): The subcortical afferents to caudate nucleus and putamen in primate: a fluorescence retrograde double labeling study. *Neuroscience* **10**: 1137-1150.
- SMITH, Y. y PARENT, A. (1986): Differential connections of caudate nucleus and putamen in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Neuroscience* **18**: 347-371.
- SWANSON, L.W. (1982): The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescent study in the rat. *Brain Res. Bull.* **9**: 321-353.
- TENNYSON, V.M.; BARRET, R.E.; COHEN, G.; COTE, L.; HEIKKILA, R. y MYTILINEOU, C. (1972): The developing neostriatum of the rabbit: correlation of fluorescence histochemistry, electron microscopy, endogenous dopamine levels and (³H)-dopamine uptake. *Brain Res.* **46**: 251-285.
- TURNER, B.H.; WILSON, J.S.; MCKENZIE, J.C. y RICHTAND, N. (1988): MPTP produces a pattern of nigrostriatal degeneration which coincides with the mosaic organization of the caudate nucleus. *Brain Res.* **473**: 60-64.
- VAN DER KOOY, D.; COSCINA, D.V. y HATTORI, T. (1981): Is there a non-dopaminergic nigrostriatal pathway? *Neuroscience* **6**: 345-357.
- WILSON, J.S.; TURNER, B.H.; MORROW, G.D. y HARTMAN, P.J. (1987): MPTP produces mosaic-like pattern of degeneration in the caudate nucleus of dog. *Brain Res.* **423**: 329-332.
- WRIGHT, A.K. y ARBUTHNOTT, G.W. (1981): The pattern of innervation of the corpus striatum by the substantia nigra. *Neuroscience.* **6**: 2063-2067.

Correspondencia: Amparo Carmona Bono
Dpto. de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
41009-Sevilla. España

REFERENCIAS EXOCRANEANAS DE PROYECCION BASIENCEFALICA EN CINCO RAZAS DE OVEJA

EXOCRANIAL REFERENCES OF THE PROJECTION OF THE BASE OF THE CRANIUM IN FIVE SHEEP BREEDS

J.G. MONTERDE, F. MIRO, E. AGÜERA, S. AGÜERA

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica comparadas.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba

RESUMEN

Sobre un total de 48 ovejas pertenecientes a 5 razas diferentes, se realiza un estudio radiográfico sobre la proyección exterior de la base del cráneo. Esta proyección se realiza con el fin de obtener datos aplicativos en la orientación estereotáxica de la cabeza en esta especie. En los resultados se obtiene que la línea paralela a la base del cráneo a nivel del meato acústico externo es ligeramente ventral al borde supraorbitario. De este modo, el borde supraorbitario y el meato acústico resultan las mejores referencias externas en la proyección basicraneana. Por otro lado, el análisis de varianza entre razas no ofreció diferencias significativas, lo que nos permite expresar los resultados de todo el colectivo estudiado sin hacer distinción de razas.

PALABRAS CLAVE: Base craneana, referencias exocraneanas, oveja.

SUMMARY

We obtained lateral radiographs from forty eight ewes of five different breeds to study the projection in the exterior of the base of the cranium with the aim of finding applicative dates in the stereotaxic orientation (situation) of the head in this species.

The margo supraorbitalis and the meatus acusticus resulted to be the best external references in this projection.

The parallel line to the base of the cranium at the level of the meatus acusticus was lightly ventral to the margo supraorbitalis (3°). The analysis of variance between the five breeds did not show significative differences which allowed us to express the results of a unique group.

KEY WORDS: Cranial base, external references, sheep.

Introducción

Cuando Escolar (1950 y 51) definió el eje retroptin-quiasmático, posibilitó una referencia válida en el estudio comparativo del encéfalo de distintas especies (Escolar, 1962). No obstante, la proyección exocraneal de dicho eje varía ampliamente según las particularidades del cráneo de cada especie. En este sentido, González (1975) estudió la proyección encefálica en diferentes especies domésticas, incluida la oveja. Posteriormente, Robina (1982 a y b) estableció el paralelismo existente en los mamíferos domésticos entre los ejes basiencefálico y basicraneal, debido al escaso desarrollo de las cisternas interpeduncular y basilar. Por ello, la base interna del cráneo, definida por la línea tangencial a las superficies óseas que limitan el suelo de la cavidad craneana, puede usarse en radiografías laterales de la cabeza como referencia en la orientación basiencefálica.

Basándonos en todo lo expuesto, hemos aprovechado buena parte del material que sirvió para la elaboración de una tesis doctoral sobre topometría cefálica en diferentes razas ovinas (Agüera, 1987) a fin de intentar obtener datos sobre la proyección basicraneal y, por ende, de la orientación basiencefálica en la oveja. Concretamente, nos pareció de interés establecer la proyección de la base del cráneo respecto al meato acústico y bordes supra e infraorbitario, dado que las referencias auditivas y orbitarias son las de más uso en la orientación estereotáxica de la cabeza. Con ello, intentamos ofrecer datos útiles en la situación estereotáxica de la cabeza en la especie ovina, ya que la orientación del eje basiencefálico y su fijación respecto a un sistema de coordenadas es premisa indispensable en este tipo de metodología.

Material y Métodos

Para la realización de este estudio hemos utilizado un total de 48 ovejas: 11 de raza merina, 10 de raza churra, 11 segureñas, 9 talaveranas y 7 manchegas.

De cada oveja se obtuvo una radiografía lateral de la cabeza (Fig. 1) con una programación radiológica comprendida entre 80-85 kilovoltios y 80-100 miliamperios/segundo.

Posteriormente se procedió al estudio del material radiográfico consistente en el trazado del eje basicraneal y su prolongación hasta la órbita (b, Fig. 2); localización del meato acústico externo (mae), y trazado del eje paralelo al basicraneal a nivel de dicho meato (pb); trazado de los ejes entre meato acústico y bordes supraorbitario e infraorbitario y medida de los ángulos que forman la paralela basicraneal con respecto a los ejes anteriormente citados (α y β respectivamente). Para facilitar estos trazados y mediciones, utilizamos unas láminas de acetato transparente que, superpuestas a las radiografías, permiten la copia de la silueta craneana y posterior definición de las estructuras y de los ejes y ángulos que interesan (Fig. 2).

Los valores obtenidos para los ángulos α y β en cada animal se someten a un análisis biomatemático a fin de obtener los estadísticos básicos; asimismo se realiza un análisis de varianza (prueba F de Snedecor) entre los colectivos estudiados, con el objetivo de comprobar si estos grupos (razas) ofrecían diferencias para estos parámetros.

Resultados

En las radiografías estudiadas, la base interna del cráneo siempre se proyectó como una línea secante que cortaba a la órbita en su mitad dorsal (b, Fig. 1).

Por su parte, la proyección del meato acústico (mae) tiene en esta especie una situación dorsal respecto a la base del cráneo (b). En cuarenta de los casos estudiados la línea paralela a la basicraneal trazada a nivel de dicho meato cortó a la órbita ligeramente ventral al borde supraorbitario (valores del ángulo α positivos); en seis casos se situó dorsal a la órbita (valores del ángulo α negativos); mientras que en los otros dos casos la paralela basicraneal coincidió con el borde supraorbitario (valor 0 del ángulo α). En consonancia con la anteriormente apuntado la paralela basicraneal formó con la línea desde el meato al borde infraorbitario un ángulo de valores más amplios (tabla 2).

En las tablas 1 y 2 se recogen los estadísticos básicos realizados por grupos, pero dado que el análisis de varianza no demostró diferencias significativas entre grupos ($P > 0.05$) hemos considerado asimismo los estadísticos básicos globales para todo el colectivo con el objeto de mostrar los resultados conjuntamente.

TABLA 1. Estadísticos básicos (expresados en grados) relativos a los valores del ángulo α , por especies y en conjunto

RAZA ESTADISTICOS	CHURRA	MANCHEGA	MERINA	SEGREÑA	TALAVERANA	TOTAL
Nº datos	10	7	11	11	9	48
MEDIA	1,85	1,85	4,18	2,81	3,5	2,96
DESV. TIP.	2,41	2,70	2,30	2,13	1,58	2,33
ERROR TIPICO	0,76	1,02	0,69	0,64	0,52	0,33
VALOR MAX.	5,00	4,50	8,50	5,6	6,50	8,50
VALOR MIN.	-1,00	-2,50	0,00	-1,50	1,50	-2,5

TABLA 2. Estadísticos básicos (expresados en grados) relativos a los valores del ángulo β , por especies y en conjunto

RAZA ESTADISTICOS	CHURRA	MANCHEGA	MERINA	SEGREÑA	TALAVERANA	TOTAL
Nº datos	10	7	11	11	9	48
MEDIA	29,30	31,21	29,36	30,90	30,88	30,30
DESV. TIP.	3,43	2,30	2,02	2,21	2,63	2,57
ERROR TIPICO	1,08	0,87	0,31	0,66	0,87	0,37
VALOR MAX.	34,00	35,00	34,00	36,50	35,00	36,50
VALOR MIN.	22,00	28,00	27,00	29,00	25,50	22,00



FIGURA 1. Radiografía lateral de cabeza de oveja merina. Programación: 80-85 Kv. y 80-100 mAp/s.

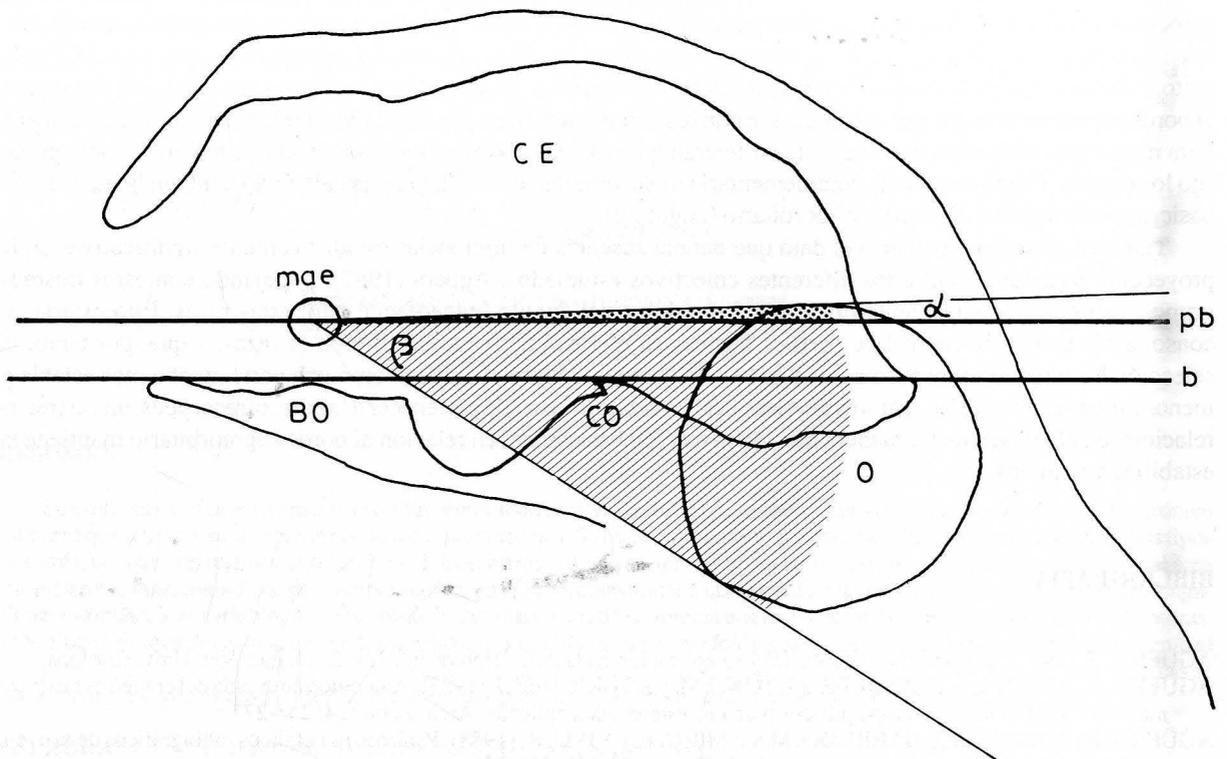


FIGURA 2. Representación esquemática de las principales estructuras craneanas, ejes y ángulos estudiados.

- b, eje basicraneal
- mae, meato acústico externo
- pb, línea paralela al eje basicraneal

- BO, Basioccipital
- CE, cavidad encefálica
- CO, canal orbitario
- O, órbita

- α , ángulo entre la línea pb y la línea meato acústico-borde supraorbitario
- β , ángulo entre la línea pb y la línea meato acústico-borde infraorbitario

Discusión

Dado que la mayor parte de los sistemas de fijación estereotáxica de la cabeza emplean unas barras auditivas que se introducen en los meatos acústicos externos, hemos referido la proyección de la base interna del cráneo en relación a dichos meatos. Con ello estamos proyectando el eje longitudinal del sistema de coordenadas estereotáxicas que se utiliza en la proyección encefálica.

En este sentido, sin restar importancia al tratamiento estadístico de los resultados, queremos resaltar la práctica coincidencia de la proyección de la paralela basicraneal a nivel del meato acústico externo con el borde supraorbitario; ello nos ofrece una referencia rápida y directa en la orientación de la proyección encefálica en esta especie. Por lo tanto, cabe destacar en la oveja como mejor referencia externa a fin de graduar la adecuada inclinación del rostro, el borde supraorbitario, ya que su alineación con los meatos acústicos posibilita detectar la orientación basicraneal. Para mayor precisión sería necesario elevar ligeramente (3°) la cabeza en sentido dorsal manteniendo como punto fijo los meatos. Como referencia complementaria a esta orientación cefálica se ha calculado también la inclinación basicraneana respecto del borde infraorbitario (ángulo β).

También merece comentario el dato que denota ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la proyección basicraneal entre los diferentes colectivos estudiados. Agüera (1987), trabajando con estos mismos grupos, estimó estadísticamente diferentes los valores del ángulo craneofacial para estas razas. Ello estaría en consonancia con la diversidad de perfiles faciales en que han derivado las diferentes razas, y que, por tanto, la selección ha actuado sobre todo a nivel de la cara, manteniéndose el cráneo como una parte mucho más estable y menos influenciada por los factores ambientales. La órbita, a pesar de pertenecer a la cara, ofrece, pues, una estrecha relación con el cráneo, de tal manera que la proyección basicraneal en relación al borde supraorbitario mantiene la estabilidad apuntada.

BIBLIOGRAFIA

- AGÜERA, S. (1987): Topografía craneofacial y su aplicación en la definición racial. Tes. Doct. Fac. Vet. Univ. Córdoba.
- AGÜERA, S.; ROBINA, A.; VAZQUEZ-AUTON, J.M. y RODRIGUEZ, I. (1983): Anatomorradiología del cráneo ovino (raza merina) y sus fundamentos topográficos para una estereotaxis aplicada. Arch. Zootec. **4**: 255-277.
- AGÜERA, S.; RODRIGUEZ-BARBUDO, M.V.; MIRO, F. y VIVO, R. (1988): Parámetros cefálicos radiográficos de la oveja merina y segureña y su aplicación racial. Arch. Zootec. **37**/138: 115-128.
- GONZALEZ, J. M. (1975): Topografía craneoencefálica en los ungulados domésticos. Tes. Doct. Fac. Vet. Univ. Córdoba.
- ESCOLAR, J. (1950): Aportaciones a la estereotaxis encefálica humana. Actual. Humana. Granada.
- ESCOLAR, J. (1951): Aportaciones a la estereotaxis encefálica experimental. Un nuevo modelo cartesiano para aplicar electrodos, tipo Hess. Clínica y Laboratorio. **308**: 358-363.
- ESCOLAR, J. (1962): Topografía encefálica considerada ontogénica y filogenéticamente. Una aproximación de las bases topográficas en la estereotaxis clínica y experimental. Anal. Anat. **11**: 213-280.
- GRIESS, D. (1961): Topographie de l'isthme encéphalique chez les petits ruminants domestiques. Thèse doct. med. Vet. Toulouse.
- McKENZIE, J. S. et SMITH, M.M. (1973): Stereotaxic method and variability data for the brain of Merino sheep. J. Hirnforsch. **14**: 354-366.
- RICHARD, P. (1967): Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.
- ROBINA, A. (1982, a): Topografía craneoencefálica del vacuno de raza Frisona, por métodos radiológicos. Arch. Zootec. **119**: 51-72.
- ROBINA, A. (1982, b): Topografía craneoencefálica del caballo (raza española) basada en métodos radiológicos. Anat. Histol. Embriol. **11**: 2-18.
- TARTELIN (1968): A method of accurately locating deep seated structures in the brain stem of sheep. J. Physiol. London. **196**: 22-23.
- WELENTO, J. (1969): Observation on the stereotaxic configuration of the hypothalamus nuclei in the sheep. Ann. Anz. **124**: 1-27.

Correspondencia: J.G. Monterde
Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas
Facultad de Veterinaria
Avda. Medina Azahara, s/n. 14005 Córdoba. España

ESTUDIO MORFOMETRICO DE LAS CELULAS ADENOHIPOFISARIAS INMUNOREACTIVAS A h-ACTH DE RATAS SOMETIDAS A ESTRES

MORPHOMETRIC STUDY OF THE ACTH-IMMUNOREACTIVE ADENOHYPHYSARY CELLS

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

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

RESUMEN

Se estudian morfológicamente las células inmunorreactivas a ACTH de la pars distalis de ratas sometidas a estrés crónico y a estrés quirúrgico y se comparan con las de ratas normales. Se ha comprobado una participación de estas células en ambos tipos de estrés, aunque con respuestas diferentes. Tras el estrés crónico se aprecia un aumento del área nuclear y un descenso del área citoplásmica, manteniéndose, por compensación, un área celular similar a las normales; las células sin irregulares con prolongaciones citoplásmicas variables de unas a otras. Tras el estrés agudo se aprecia una respuesta más brusca y evidente en las hembras, a los cinco minutos del estrés, que en los machos. Las modificaciones morfológicas en este tipo de estrés afectan claramente al área citoplásmica, que disminuye y provoca un descenso del área celular, y, en las hembras, las prolongaciones citoplásmicas se hacen menos evidentes después del estrés, discutiéndose la importancia funcional de los cambios morfológicos.

PALABRAS CLAVE: Adenohipofisis, células ACTH-Inmunorreactivas

SUMMARY

ACTH-immunoreactive cells of pars distalis of rats after chronic and surgical stress were studied with morphometric methods and compared with cells of normal animals. These cells were modified after both kinds of stress, but in a different way. An increase of nuclear area with a decrease of cytoplasmic area appeared following chronic stress, without modification of the cellular area. Five minutes after surgical stress a more quick and evident response in female than in male rats was found. In female there were a decrease in cytoplasmic and cellular area and the cytoplasmic prolongations were less evident. The functional importance of morphometrical differences were discussed.

KEY WORDS: Adenohipofysis, ACTH-Inmunoreactive cells

Introducción

El estrés es un factor que afecta a la secreción de varias hormonas hipofisarias (ver Tilders y Berkenbosch, 1986). En la rata, el estrés agudo por pinchazo aumenta la secreción de ACTH (Engeland y col., 1977), al igual que el estrés crónico por inmovilización (Du Ruisseau y col., 1979); el estrés con éter induce un incremento de los niveles de corticosterona en suero y glándulas adrenales (Meserve y Leathem, 1981) y de ACTH sérica a través del CRF (Van Oerst y col., 1989).

Los estudios de Nicholson y col. (1984) demuestran una gran elevación de ACTH en plasma y corticosterona adrenal después del estrés, que es abolida por el tratamiento con dexametasona, hallazgos que confirman los obtenidos anteriormente por otros autores (Hodges y col., 1962; Jobin y col., 1975). El papel ejercido por la ACTH en el estrés queda confirmado al inhibirse la respuesta del sistema hipófo-adrenal inducida por el estrés, después del tratamiento con ACTH (Stark y col., 1981).

Actualmente son inexistentes las valoraciones morfométricas y muy escasos los estudios inmunocitoquímicos de las células hipofisarias inmunorreactivas a ACTH ante distintos tipos de estrés y, por ello, se plantea un estudio, a microscopía óptica, de este tipo celular adenohipofisario empleando técnicas inmunocitoquímicas y morfométricas bajo condiciones de estrés crónico por pinchazo y de estrés quirúrgico agudo.

Material y métodos

Animales utilizados. Se han empleado 40 ratas Sprague-Dawley, de pesos comprendidos entre 200 y 250 gramos, divididas en cuatro lotes de 10 animales cada uno (5 por sexo): *Grupo 1.* Animales considerados como normales, sometidos a condiciones estándar de estabulario ($20 \pm 2^\circ \text{C}$, $50 \pm 5\%$ de humedad relativa, luz desde las 8:00 a las 20:00 horas, dieta equilibrada Panlab y agua "ad libitum"). *Grupo 2.* Animales sometidos a estrés crónico, provocado mediante pinchazo con aguja estéril y administración intramuscular de 100 μl de suero fisiológico por dosis, en la cara interna del muslo (una dosis diaria) durante 15 días y que fueron sacrificados a las 6 horas de la última dosis, para evitar el efecto agudo del último pinchazo. *Grupo 3.* Animales sometidos a estrés quirúrgico agudo, bajo anestesia rápida con una dosis mínima de éter-etílico, tras la que se hizo una incisión en el cuero cabelludo y un trépano en el hueso parietal derecho, siendo sacrificados a los cinco minutos. *Grupo 4.* Animales sometidos a estrés quirúrgico agudo de forma similar a los del grupo anterior, pero sacrificados a los diez minutos.

Procesado de muestras. Tras el sacrificio de los animales por decapitación, se extrajo la hipófisis que fue fijada en Bouin-Hollande durante cinco días. Posteriormente, fue incluida en parafina y cortada serialmente a 5 μm para su estudio con el método inmunocitoquímico PAP (Sternberger y col., 1970), utilizando suero primario anti-ACTH humana (Dako A-570), obtenido en conejo, a dilución 1:1.200; suero de cerdo anti-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 "background" de la tinción se empleó suero normal de cerdo (Dako, X-901) a dilución 1:30, y se inhibió la peroxidasa endógena tisular con metanol y agua oxigenada; se empleó como tampón de lavado y de dilución el tampón TRIS $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ con un 8% de NaCl a pH:7.4. La reacción se visualizó con 3-3'-diaminobencidina y se contrató con hematoxilina ácida de Mayer. La especificidad de la reacción se comprobó mediante la realización de los siguientes tests de control: dilución de los sueros utilizados, sustitución del suero primario por suero normal de conejo y tampón de lavado y preabsorción con hormona ACTH de rata (NIH, gentilmente cedida por el Dr. Sánchez-Franco y la Dra. Cacicedo del Hospital Ramón y Cajal de Madrid) y ACTH (1-24) sintética (Sigma).

Morfometría. Mediante un planímetro digital (Apple) conectado a un sistema de vídeo RCA se procedió a calcular el área celular (AC), nuclear (AN) y citoplásmica (ACit), así como la relación área nuclear/área citoplásmica (AN/ACit), de 500 células reactivas elegidas al azar de todas las regiones de la hipófisis, siguiendo una sistemática similar a la descrita por Carretero y col. (1989), por grupo y sexo. Los resultados aparecen expresados en la tabla 1 como la media aritmética ($\pm \text{SD}$). Las diferencias observadas fueron analizadas empleando un ANOVA y el test T de Student, siendo considerados como significativos los valores inferiores a $p < 0.05$.

Resultados

Hallazgos morfológicos. En los animales normales, machos y hembras, las células de ACTH tienen una morfología muy variable, con prolongaciones que se dirigen hacia los vasos. Su núcleo es grande su citoplasma posee

un reacción muy intensa en la mayoría de las células, que, a veces, tienen aspecto granular, sobre todo en las prolongaciones (Fig. 1). Estas células predominan en el polo anterior, centro y porciones ventrales de la hipófisis, en las tres regiones estudiadas; la zona dorsal, en contacto con la caverna hipofisaria, apenas presenta células reactivas a ACTH.

Las células inmunorreactivas a ACTH de los animales sometidos a estrés crónico son irregulares, con un núcleo ovalado y generalmente desplazado del centro de la célula. Su citoplasma aparece teñido de forma heterogénea con prolongaciones más o menos anchas que discurren hacia los vasos sanguíneos (Fig. 2). Al igual que en los animales normales, las células aparecen diseminadas, siendo más numerosas en el centro de la glándula y más escasas en la zona dorsal y en el polo posterior.

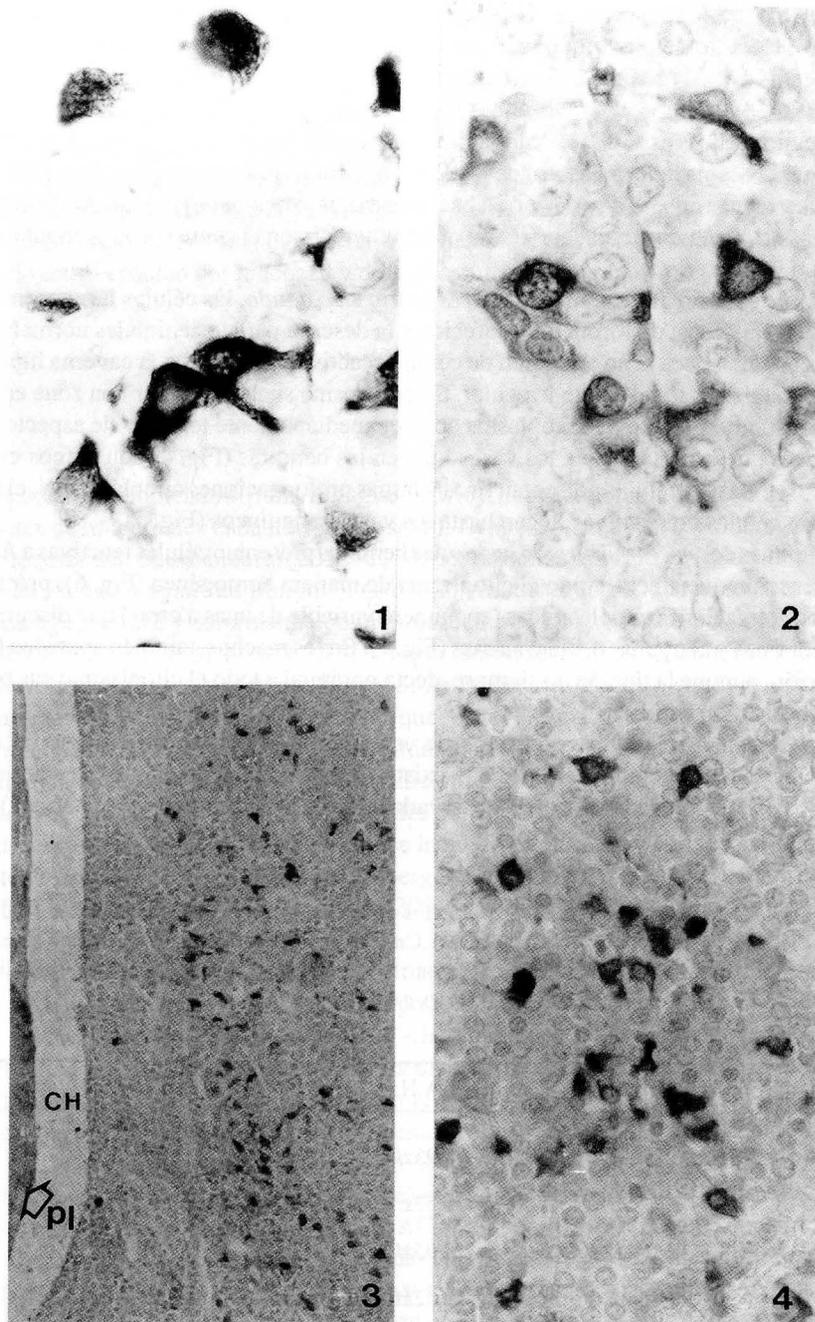
A los cinco minutos de someter al animal a *estrés quirúrgico agudo*, las células inmunorreactivas a ACTH se disponen, dentro de la hipófisis, de forma muy parecida a la descrita para los animales normales y, como en ellos, la característica más llamativa es la no aparición de células reactivas próximas a la caverna hipofisaria (Fig. 3). La morfología de estas células es típicamente irregular. Su citoplasma suele presentar una zona ensanchada donde se localiza un núcleo redondo. El resto del citoplasma aparece medianamente teñido y de aspecto granular. Desde él parten prolongaciones que caminan hacia los vasos, que en las hembras (Fig. 4) son menos evidentes que en los machos; en éstos, casi todas las células presentan finas y largas prolongaciones citoplásmicas, claramente reactivas, que caminando entre células no reactivas llegan hasta los vasos sanguíneos (Fig. 5).

Diez minutos después del *estrés quirúrgico agudo*, las hembras presentan células reactivas a ACTH intensamente teñidas, con una reacción que afecta a todo el citoplasma de manera homogénea (Fig. 6); prácticamente todas las células presentan prolongaciones citoplásmicas (en número variable de unas a otras) que discurren hacia los vasos, las cuales pueden ser finas y alargadas o, bien, anchas (Fig. 7). En los machos, también aparecen las células con gran intensidad de reacción, aunque la tinción no siempre afecta por igual a todo el citoplasma; sus prolongaciones, por lo general, son anchas y bien teñidas (Fig. 8).

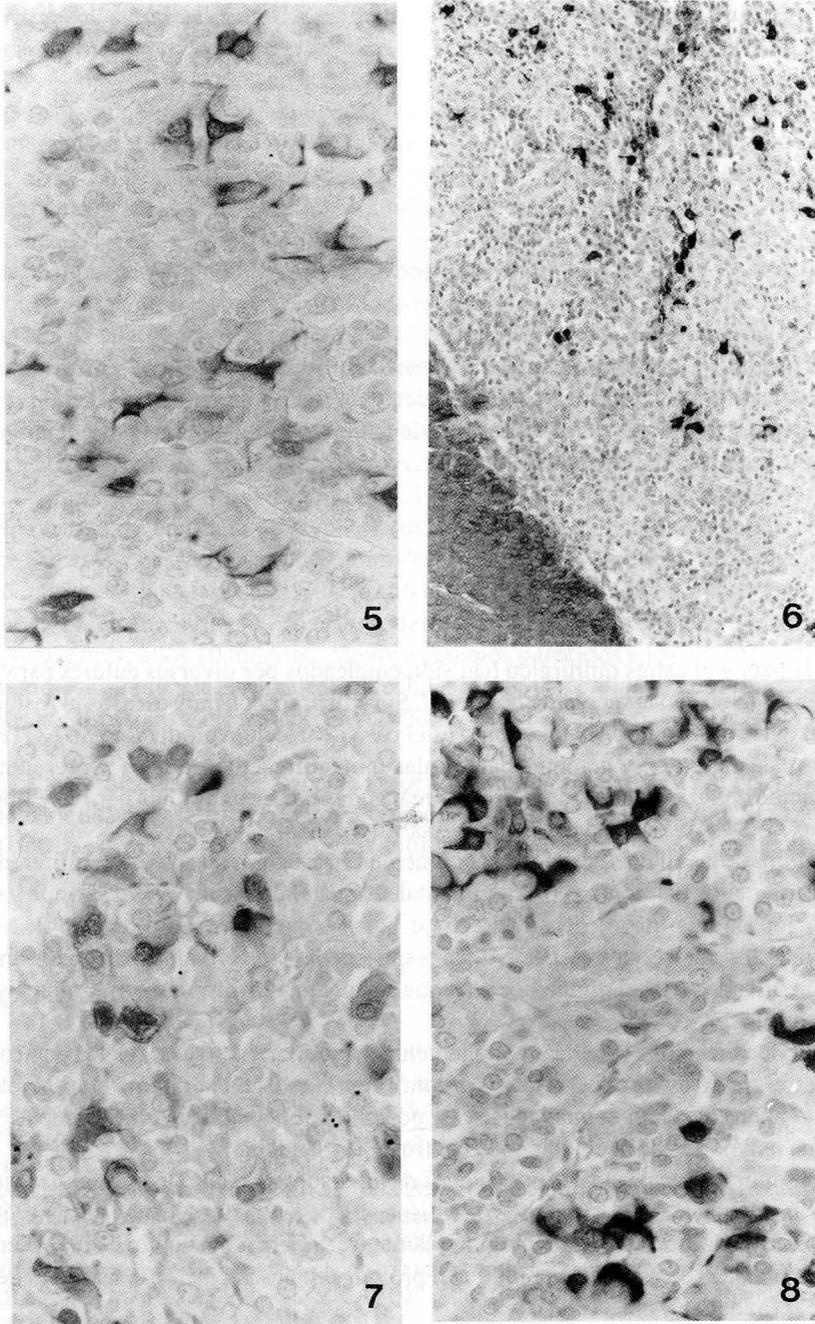
Hallazgos morfométricos. Los distintos tipos de estrés empleados han influido sobre el tamaño celular, citoplásmico y nuclear de diferente manera, sin que existan grandes diferencias o diferencias significativas entre machos y hembras, a excepción de la respuesta observada tras el estrés quirúrgico (ver tabla 1).

Tabla 1. Valores morfométricos medios(\pm S.D) encontrados en los distintos grupos de animales estudiados (expresados en μm^2). A. Cel.: Área celular, A.N.: Área nuclear, A.Cit.: Área citoplásmica, R. AN/ACit.: Relación área nuclear / área citoplásmica, H.: Hembras, M.: Machos, E. Cron.: Estrés crónico, E. Q. 5: Estrés quirúrgico de 5 minutos, E. Q. 10: Estrés quirúrgico de 10 minutos, *: $p < 0.05$, #: $p < 0.01$, $^{\circ}$: $p < 0.001$

	A. Cel.	A.N.	A. Cit.	R AN/ACit.
H. Normales	97,98 \pm 24,78	20,95 \pm 05,54	77,03 \pm 20,79	0,28 \pm 0,06
H. E. Cron.	99,41 \pm 32,68	29,53 \pm 10,04 #	69,88 \pm 25,91 *	0,45 \pm 0,16 $^{\circ}$
H. E. Q. 5	65,25 \pm 21,12 *	18,95 \pm 06,98	46,30 \pm 15,56 *	0,42 \pm 0,12 *
H. E. Q. 10	79,29 \pm 24,09 *	19,42 \pm 04,60	59,87 \pm 22,88 *	0,38 \pm 0,19 *
M. Normales	100,56 \pm 23,51	22,17 \pm 06,37	78,39 \pm 19,89	0,29 \pm 0,08
M. E. Cron	92,00 \pm 20,21	28,04 \pm 06,32 #	63,95 \pm 16,20 *	0,45 \pm 0,12 $^{\circ}$
M. E. Q. 5	78,96 \pm 27,42 *	22,63 \pm 06,72	56,33 \pm 23,12 #	0,45 \pm 0,18 $^{\circ}$
M. E. Q. 10	73,29 \pm 21,95 *	19,11 \pm 08,63	54,18 \pm 17,73 #	0,37 \pm 0,16 $^{\circ}$



- FIGURA 1.** Micrografía perteneciente a un animal normal en la que se aprecia la morfología irregular y el aspecto granular, principalmente en las prolongaciones citoplásmicas, de las células inmunorreactivas a ACTH. x 3000
- FIGURA 2.** Imagen típica de las células inmunorreactivas a ACTH en un animal sometido a estrés crónico. Son células irregulares, con un citoplasma heterogéneamente teñido y prolongaciones citoplásmicas, que se dirigen hacia los vasos sanguíneos. x 3000.
- FIGURA 3.** Panorámica de la hipófisis de un animal sometido a estrés quirúrgico (5 minutos). Se observa la ausencia de células reactivas en la zona dorsal próxima a la caverna hipofisaria (CH). (PI: pars intermedia) x 600.
- FIGURA 4.** Células inmunorreactivas a ACTH de una hembra sometida a estrés quirúrgico (5 minutos). Son irregulares, con prolongaciones casi siempre degranuladas semejando proyecciones citoplásmicas. x 1800.



- FIGURA 5.** Micrografía perteneciente a un macho sometido a estrés quirúrgico (5 minutos), mostrando células inmunorreactivas a ACTH con finas prolongaciones citoplásmicas que, a diferencia de las hembras, aquí están bien teñidas. x 1800.
- FIGURA 6.** Zona dorsal de la región lateral de la hipófisis de una hembra sometida a estrés quirúrgico (10 minutos), en la que apenas hay células reactivas. Las células del centro de la glándula aparecen bien teñidas. x 600.
- FIGURA 7.** Células inmunorreactivas a ACTH, algunas vacuolizadas, otras con procesos citoplásmicos, anchos o finos. x 1800.
- FIGURA 8.** Micrografía de un macho sometido a estrés quirúrgico (10 minutos), en la que se aprecian células inmunorreactivas a ACTH, con prolongaciones, bien teñidas. x 1800

Tras el estrés crónico no aparecen diferencias significativas del AC, en relación con los normales, debido a que, a pesar de existir una disminución significativa ($p < 0.05$) del ACit, se produce un aumento considerable ($p < 0.01$) del AN. Todo ello se traduce en un gran incremento ($p < 0.01$) de la relación AN/ACit.

Morfométricamente se comprueba una reacción diferente ante el estrés quirúrgico agudo (a los 5 y a los 10 minutos), en relación con los animales normales y los sometidos a estrés crónico, de manera que el AC desciende significativamente ($p < 0.05$). Este descenso se hace a expensas de una disminución del ACit ($p < 0.01$), manteniendo el AN valores similares a los de los animales normales. Estos cambios provocan, lógicamente, un aumento de la relación AN/ACit ($p < 0.001$).

El estrés quirúrgico parece afectar a las células inmunorreactivas a ACTH de distinta manera a los 5 y 10 minutos del estrés, según el sexo. En las hembras se observa una respuesta más brusca a los 5 minutos, donde las AC y ACit son menores que a los 10 minutos ($p < 0.05$) y la relación AN/ACit, mayor ($p < 0.05$); en los machos, la respuesta es menos intensa a los 5 que a los 10 minutos si bien las diferencias no alcanzan valores significativos estadísticamente hablando. De esta manera se observa cómo existe una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre el tamaño celular de las hembras y los machos sometidos a estrés quirúrgico de 5 minutos; las primeras presentan un AC menor que la de los machos, a expensas, principalmente, de un menor, ACit ($p < 0.01$).

Discusión

El pinchazo en la pata y el estrés quirúrgico han sido empleados por diversos autores para analizar cambios, fundamentalmente en relación con la secreción hormonal. Sin embargo, son muy escasos los estudios morfológico-morfométricos de un determinado tipo celular, como es el caso de la célula productora de ACTH.

En animales normales, machos y hembras, las células inmunorreactivas a ACTH presentan una morfología irregular, lo que coincide con las descripciones previas realizadas por otros autores para este tipo celular (Häusler y col., 1984; Dacheux, 1984; Shirasawa y col., 1985; Asa y col., 1986).

Los distintos estudios de las células corticotropas coinciden en asegurar que no existen diferencias entre machos y hembras, en distintos estados fisiológicos o experimentales (Chatelain y col., 1979; Sakuma y col., 1984; Cinti y col., 1985), a excepción de una mayor densidad celular para las hembras (Girotrd, 1984). Nuestros resultados concuerdan con los de estos autores, a excepción de la respuesta del área citoplásmica en los animales estresados quirúrgicamente y sacrificados a los 5 minutos, en los que se aprecia una respuesta más rápida y acentuada en las hembras que en los machos.

No se han descrito localizaciones precisas para las células inmunorreactivas a ACTH dentro de la pars distalis de la rata; sin embargo, nuestros resultados parecen confirmar la existencia de una zona, próxima a la caverna hipofisaria, en la que apenas existen células reactivas, posibilidad mencionada anteriormente por Yoshimura y Nogami (1981), y una mayor densidad celular en el centro de la glándula.

Las características morfológicas que definen estados de hiperactividad en este tipo celular, han sido estudiadas preferentemente tras la adrenalectomía (Siperstein y Allison, 1965; Kurosumi y Kobayashi, 1966; Pelletier, 1970; Bowie y col., 1973), caracterizándose inmunocitoquímicamente, a microscopía óptica, por presentar un citoplasma medianamente teñido (velado) de aspecto granular, con prolongaciones anchas y un aumento de las áreas celular, citoplásmica y nuclear (Sánchez y col., 1988).

De gran importancia es la valoración de los procesos citoplásmicos que aparecen en las células corticotropas. Kurosumi (1968) planteó una clasificación de estas células diferenciando dos tipos con arreglo a sus procesos citoplásmicos: las células tipo I presentarían grandes procesos y corresponderían a una fase de almacenamiento, mientras que las células tipo II presentarían procesos finos y representarían una fase de depleción hormonal.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio parecían demostrar que los mayores procesos citoplásmicos aparecen en los animales adrenalectomizados bilateralmente y, por lo tanto, en la fase de mayor actividad sintética y liberadora de hormona, mientras que los procesos finos serían característicos de fases menos activas (Sánchez y col., 1988). En el presente trabajo hemos comprobado que el estrés crónico, por pinchazos repetidos, y el estrés quirúrgico agudo provocan una gran pluralidad morfológica que afecta a las prolongaciones citoplásmicas, unas veces anchas, otras finas, difíciles de definir en un estado funcional característico.

Al contrario de lo que ocurre con las características morfológicas, los datos morfométricos nos permiten establecer un patrón homogéneo de respuesta ante el estrés crónico, consistente en un mantenimiento del AC por descenso del ACit y aumento del AN, lo que parece indicar un estímulo de la síntesis (aumento del AN) y de la liberación hormonal (descenso del ACit), como se deduce de las valoraciones morfológicas de Carretero y col. (1988 y 1989).

Vernikos-Danellis (1963, 1965) estudió la dinámica del factor liberador de corticotropina (CRF) y de la ACTH bajo condiciones de estrés y encontró que el aumento de la liberación hormonal está asociado a una síntesis acelerada. Así, la aplicación de estrés por éter provoca un aumento de la actividad de CRF en la Eminencia Media, seguido de un incremento del contenido adenohipofisario y de los niveles plasmáticos de ACTH, alcanzando los valores máximos a los 5-30 minutos de haber aplicado el estrés.

Estos resultados tienen su expresión morfológica en nuestros hallazgos tras el estrés quirúrgico, en los que, a los cinco minutos, se observan células con un aspecto granular y velado, con prolongaciones menos patentes en las hembras y claramente teñidas en los machos. El descenso de la intensidad de reacción y el aspecto granular podrían indicar un aumento en la liberación hormonal, similar al descrito en las células gonadotropas por Watanabe (1987). Esta afirmación se ve corroborada por un marcado descenso del AC debido a un descenso del ACit.

El hecho de que, en el estrés quirúrgico agudo, el AN permanezca inalterada al compararla con la de los animales normales, sería indicativo de una falta de respuesta de síntesis, seguramente debida al corto espacio de tiempo transcurrido entre el estrés y el sacrificio de los animales. Además, hay que tener en cuenta que, para este periodo de tiempo, se apunta una velocidad de respuesta diferente entre los machos y las hembras que se manifiesta morfológicamente por el mantenimiento de las prolongaciones citoplásmicas en los machos.

El mismo tipo de estrés, a los 10 minutos, provoca cambios parecidos a los encontrados a los 5 minutos, pero con matices diferentes, ya que aparece un aumento de células reactivas y prolongaciones citoplásmicas en los machos. Ello parece sugerir la existencia de diferencias en relación con el sexo, en lo que podríamos llamar la respuesta ante el estrés agudo.

En resumen, cabe destacar la participación de las células inmunorreactivas a ACTH situadas en la pars distalis de la hipófisis, ante los dos tipos de estrés, agudo y crónico, con respuestas morfológicas y morfométricas distintas, dependiendo del tipo de estrés y con una respuesta más brusca ante el estrés agudo en las hembras que en los machos.

BIBLIOGRAFIA

- ASA, S.L.; KOVACS, K.; LASZLO, F.A.; DOMOKOS, I. y EZRIN, C. (1986): Human fetal adenohipophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology* **43**: 308-316.
- BOWIE, E.P.; WILLIAMS, G.; SHIINO, M. y RENNELS, E.G. (1973): The corticotroph of the rat adenohipophysis: a comparative study. *Am. J. Anat.* **138**: 499-520.
- CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VAZQUEZ, R. (1988): Analysis of immunoreactive PRL-cells following treatment with Met-enkephalin. *Z. Mikrok.-anat. Forschung.* **102**: 711-720.
- CARRETERO, J.; SANCHEZ, F.; TORRES, J.L.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VAZQUEZ, R. (1989): Study of h-TSH immunoreactive adenohipophyseal cells following treatment with methimazole. *Histol. Histopath.* **4**: 71-76.
- CINTI, S.; SBARBATI, A.; MARELLI, A. y OSCULATI, F. (1985): An ultrastructural morphometric analysis of the adenohipophysis of lactating rats. *Anat. Rec.* **212**: 381-390.
- CHATELAIN, A.; DUPOY, J.P. y DUBOIS, M.P. (1979): Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, Prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: Influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res.* **196**: 409-427.
- DACHEUX, F. (1984): Differentiation of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, α - and β -endorphin GH and PRL) in the fetal porcine anterior pituitary. *Cell Tissue Res.* **235**: 615-621.
- DU RUISSEAU, P.; TACHE, Y.; BRAZEAU, P.; COLLU, R. (1979): Effects of chronic immobilization on pituitary hormone secretion, on hypothalamic factor levels, and on pituitary responsiveness to LHRH in female rats. *Neuroendocrinology* **29**: 90-99.
- ENGELAND, W.C.; SHINAKO, J.; WINGET, C.M.; VERNIKOS-DANELIS, J. y DALLMAN, M.F. (1977): Circadian patterns of stress-induced ACTH secretion are modified by corticosterone responses. *Endocrinology* **100**: 138-147.
- GIROD, Ch. (1984): Fine structure of the pituitary pars distalis. En: *Ultrastructure of endocrine cells and tissues*. Motta, P. (eds.). Boston: 12-29.

- HAUSLER, A.; OBERHOLZER, M.; BAUMANN, J.B.; GIRARD, J. y HEITZ, P.U. (1984): Quantitative analysis of ACTH-immunoreactive cells in the anterior pituitary of young spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Cell Tiss. Res.* **236**: 229-235.
- HODGES, J.R.; JONES, M.T. y STOCKHAM, M.A. (1962): Effect of emotion on blood corticotrophin and cortisol concentrations in man. *Nature, Lond.* **193**: 1187-1188.
- JOBIN, M.; FERLAND, L.; COTTE, J. y LABRIE, F. (1975): Effect of exposure to cold on hypothalamic TRH activity and plasma levels of THS and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology* **18**: 204-212.
- KOROSUMI, K. (1968): Functional classification of cells types of the anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy. *Arch. Histol. Jap.* **29**: 329-362.
- KOROSUMI, K. y KOBAYASHI, Y. (1966): Corticotrophs in the anterior pituitary glands of normal and adrenalectomized rats as revealed by electron microscopy. *Endocrinology* **78**: 745-758.
- MESERVE, L.A. y LEATHEM, J.H. (1981): Development of hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress in rats made hypothyroid by exposure to thiouracil from conception. *J. Endocrinol.* **90**: 403-409.
- NICHOLSON, S.; CAMPBELL, S.; TORRELLAS, A.; BECKFORD, V.; ALTANER, R.; SANDFORD, R.; SCRAGS, R.; GILLMAN, B. y JONES, M. (1984): Recovery of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the rat after long-term dexametason treatment. *Neuroendocrinology* **39**: 343-349.
- PELLETIER, G. (1970): Identification en microscopie electronique des cellules corticotropes chez le rat intact: résultat de la surrénalectomie associée ou non à un traitement par la dexaméthasone. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **270**: 2836-2838.
- SAKUMA, A.; SHIRASAWA, N. y YOSHIMURA, F. (1984): A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohipophysial cells in immature and mature castrated rats. *J. Endocr.* **100**: 323-328.
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, RIESCO, J.M.; JUANES, J.A. y VAZQUEZ, R. (1988): Efecto de una dosis alta de colchicina administrada intracerebroventricularmente sobre el eje cortitropo hipotálamo-hipofisario de la rata. Estudio inmunocitoquímico. *An. Anat.* **34**: 91-99.
- SHIRASAWA, N.; KIHARA, H. y YOSHIMURA, F. (1985): Fine structural and immunohistochemical studies of goat adenohipophysial cells. *Cell Tissue Res.* **240**: 315-321.
- SIPERSTEIN, E.R. y ALLISON, F. (1965): Fine structure of the cells responsible for secretion of adrenocorticotrophin in the adrenalectomized rat. *Endocrinology* **76**: 70-79.
- STARK, E.; KARTESZI, M.; RAPPAY, G. y MAKARA, G.B. (1981): Effects of treatment with adrenocorticotrophin on the hypothalamo-pituitary-adrenal system. *J. Endocrinol.* **88**: 131-139.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H. Jr.; 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.
- TILDERS, F. J. H. y BERKENBOSCH, F. (1986): CRF and catecholamines; their place in the central and peripheral regulation of the stress response. *Acta Endocrinológica, sup.*: **276**.
- VAN OERS, J.W.A.M.; TILDERS, F.J.H.; BERKENBOSCH, F. (1989): Acute and long-term supression of stress-induced ACTH secretion by a rat monoclonal antibody to corticotrophin releasing factor. En: *Neuroendocrine Perspectives*, vol. 6 (Müller, E.E. and MacLeod, R. M., eds.). Springer-Verlag. New York, pp. 287-292.
- VERNIKOS-DANELIS, J. (1963): Effect of acute stress on the pituitary gland: changes in blood and pituitary ACTH concentrations. *Endocrinology.* **72**: 574-581.
- VERNIKOS-DANELIS, J. (1965): Effect of stress, adrenalectomy, hypophysectomy and hydrocorticosterone on the CRF activity of the median eminence. *Endocrinology* **76**: 122-126.
- WATANABE, Y. G. (1987): A comparative in vitro study on LHRH responsiveness of LH cells of the pars distalis. *Cell Tissue Res.* **245**: 369-375.
- YOSHIMURA, F. y NOGAMI, H. (1981): Fine structural criteria for identifying corticotrophs. *Cell Tiss. Res.* **219**: 221-228.

Correspondencia: Dr. R. Vázquez
Dpto. Anatomía e Histología Humana
Universidad de Salamanca. España

ESTUDIO BIOMETRICO DEL CRANEO Y DE LA MANDIBULA EN UNA POBLACION ESPAÑOLA

SKULL AND JAWS ANTHROPOMETRIC STUDY OF A SPANISH POPULATION

J.L. NIETO y J.L. ALVAREZ

Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se presenta un estudio de 605 calvarias y 401 mandíbulas de ambos sexos de una población adulta española (Aragón). en las que se han determinado 111 parámetros y 32 índices antropológicos. Entre los caracteres observados en los varones destacan la dolichocrania (74,5%), ortocrania (71,5%) y leptoprosopia (55,3%). Así mismo, son hipsiconquios (86,6%), mesorrinos (47,1%) y leptostafilinos (79,9%). La mandíbula es mesognata (89,9%). La biometría femenina resulta comparable a la masculina, aunque con valores absolutos uniformemente más pequeños.

PALABRAS CLAVE: Antropometría, cráneo, mandíbula.

SUMMARY

Is presented a study of 605 skull'-caps and 401 jaws of a spanish (Aragon) adult sample, of both sexes, in which had been determined 111 parameters and 32 anthropological indexes. Among the observed characters in males, stands out the dolichocrania (74,5%), orthocrania (71,5%) and leptoprosopia (55,3%). In the same manner, there are hypsiconchios (86,6%), mesorrhinos (47,1%) and leptostaphylin (79,9%). The jaw is mesognata (89,9%). The female biometry is comparable to the male, even though, with uniformly smaller absolute values.

KEY WORDS: Anthropometry, skull, jaw.

Introducción

La Antropología ha puesto siempre un énfasis especial en identificar las variaciones morfológicas de la cabeza. Se entiende así, el esfuerzo por establecer las primeras colecciones de crania, iniciados por Morton con la publicación de la "Crania americana" (1839) y la "Crania aegyptiaca" (1844) y seguidas por la "Crania británica" (Thurnan y Davis, 1856), la "Crania selecta" (Von Baer, 1859), la "Crania helvética" (His y Rutimeyer, 1865) y la "Crania germánica" (Ecker, 1865).

La publicación en 1912 de las Unidades y constantes de la Crania Hispánica (Aranzadi y Hoyos, 1912) marca el apogeo de estos estudios en España. A estas descripciones clásicas debemos añadir las referidas a algunas de sus poblaciones más representativas, entre las que destacan las de Aranzadi (1913, 1917, 1919, 1922), Eguren (1914) y más recientemente de De la Rúa (1984), sobre la morfología, dimensiones e índices del cráneo vasco y los de Alcobe (1934, 1945, 1946, 1950, 1954), Vallois (1950), Fusté (1954, 1966) y Pons (1962), en las poblaciones pirenaicas. Otras poblaciones extensamente revisadas han sido la catalana (Pons, 1945, 1950), la cacereña (Aranzadi, 1897), la alpujarreña (Del Pino, 1964), las del valle del Ebro, en especial la riojana (Martínez-Flórez, 1983; Nieto, 1983) y la aragonesa (Nieto, 1980, 1982, 1983; Alvarez, 1989), la gallega (Carro, 1978; Masa, 1988) y la canaria (Fusté, 1958, 1959; Giménez y Schwidetzky, 1958, 1974).

Material y Métodos

Este trabajo recoge la determinación antropológica de 91 parámetros craneales y 20 mandibulares en una colección de 605 calvarias y 401 mandíbulas, de individuos adultos de ambos sexos y de presumible origen aragonés, recogidas personalmente en distintos osarios de esta región. La muestra ha procurado incluir suficiente número de piezas de todas las comarcas aragonesas. A estas piezas debemos añadir 104 calvarias y 83 mandíbulas procedentes de la osteoteca del Departamento de Ciencias Morfológicas de Zaragoza, utilizadas, sobre todo, como modelos de comparación.

En ellas se ha determinado diversos diámetros, curvas, arcos, cuerdas y ángulos tanto del neurocráneo como del esplanocráneo, calculándose a partir de ellos distintos índices craneales. A estas determinaciones se ha añadido la capacidad y el peso de las piezas. Del mismo modo se han obtenido diámetros, ángulos, espesores y peso de las mandíbulas, completando su estudio mediante el cálculo de diversos índices mandibulares.

Para este trabajo hemos utilizado el siguiente material antropológico:

- Cranióforo de Mollison
- Cefalómetro
- Tres calibres milimetrados
- Varias cintas métricas de hule y de metal
- Goniómetros occipital, facial, mandibular y de Mollison, específicos para la determinación de ángulos craneales y mandibulares
- Balanzas Mettler AJ 100 y P163, utilizadas para el pesaje de piezas superiores a 310 gr. e inferiores a 160 gr

En este estudio, las medidas craneométricas han sido escogidas en razón de su interés anatómico y antropológico, siguiendo los criterios del Seminario Universitario de Antropología de la Universidad de Zaragoza. En su obtención hemos seguido los principios teóricos y las normas técnicas aconsejados en los tratados antropológicos de Martín, Saller (1928) y Olivier (1960). Los índices antropológicos de proporcionalidad craneal confeccionados a partir de estas medidas absolutas han sido interpretados según el criterio antropológico de Olivier (1960).

Los datos recogidos en el transcurso de esta investigación, han sido tratados estadísticamente en un ordenador VAX 11 / 780 de 8 Mb. de memoria central. Todos los datos acumulados en los listados, han sido tratados con el paquete estadístico SPSS, desarrollado por la Universidad de Stanford y de uso generalizado en las ciencias biomédicas.

Resultados

Los resultados biométricos obtenidos los hemos recogido en las siguientes tablas:

NEUROCRANEO. VARONES

DIAMETROS SAGITALES

Longitud máxima	186,2 mm.
Longitud glabelo - infaca	179,2 mm.
Longitud glabelo - lambdaidea	179,9 mm.
Longitud de la base (nasio - basilar)	101,1 mm.
Longitud nasion - opistion	135,2 mm.
Long. agujero occip.(foramen magnun)	35,7 mm.

DIAMETROS TRANSVERSALES

Anchura máxima	138,5 mm.
Anchura frontal mínima	95,3 mm.
Anchura frontal máxima	116,5 mm.
Anchura de la base (biauricular)	121,0 mm.
Anchura biastérica	110,1 mm.
Anchura bimastoidea	102,3 mm.

CURVAS

Circunferencia horizontal	519,1 mm.
Curva transversal	306,7 mm.
Curva sagital total	374,1 mm.

CUERDAS

Cuerda frontal	112,3 mm.
Cuerda parietal	114,2 mm.
Cuerda occipital total	97,8 mm.
Cuerda occipital cerebral	66,0 mm.
Cuerda occipital cerebelosa	48,8 mm.
Cuerda lambda - basion	118,1 mm.
Cuerda bregma - asterion	135,5 mm.
Cuerda bregma - esfenion	94,1 mm.
Cuerda lambda - asterion	87,2 mm.

ANGULOS

Angulo de inclinación frontal.	47,6°
Angulo de inclinación occipital.	56,3°
Angulo de angulación occipital.	120,3°
Angulo inclinación escama occipital.	81,3°
Angulo bregma-nasion-inion.	60,6°
Angulo de Schwalbe.	58,3°
Angulo bregma-nasion-lambda.	38,9°
Angulo bregma-glabela-lambda.	36,8°
Angulo occipital de Broca	15,6°
Angulo occipital de Daubenton	2,3°
Angulo basilar de Broca	22,5°

DIAMETROS VERTICALES

Altura basiobregmática	132,9 mm.
Altura opistiobregmática	144,7 mm.
Altura auriculobregmática	111,3 mm.
Máxima altura auricular	114,6 mm.

INDICES

Indice craneal	74,5 %
Indice vertico-longitudinal	71,5 %
Indice vertico-transversal	96,2 %
Indice auriculo-longitudinal	59,8 %
Indice auriculo-transversal	80,5 %
Indice transverso-frontal	81,9 %
Indice fronto-parietal	68,9 %
Indice parieto-occipital	79,4 %

ARCOS

Arco sagital frontal	127,2 mm.
Arco sagital parietal	127,0 mm.
Arco sagital occipital	119,7 mm.
Arco sagital occipital cerebral	69,4 mm.
Arco sagital occipital cerebeloso	50,2 mm.

INDICES

Indice sagital total	36,2 %
Indice sagital frontal	88,4 %
Indice sagital parietal	89,9 %
Indice sagital occipital	81,9 %
Indice sagital occipital cerebral	95,4 %
Indice sagital occipital cerebeloso	97,8 %
Indice de la curva frontal	33,9 %
Indice de la curva parietal	33,9 %
Indice de la curva occipital	32,0 %

Angulo nasion-bregma-lambda	104,1°
Angulo bregma-lambda-basion	70,8°
Angulo nasion-basion-lambda	108,2°
Angulo nasion-bregma-basion	48,2°
Angulo de Klaastch	89,2°
Angulo auriculo-craneal facial	42,3°
Angulo auriculo-craneal frontal	66,4°
Angulo auriculo-craneal parietal	64,5°
Angulo auriculo-craneal occipital	71,3°
Angulo auriculo-craneal cerebral	39,6°
Angulo auriculo-craneal cerebeloso	31,7°

ESPLACNOCRANEO. VARONES.

DIAMETROS

Longitud de la cara (basioalveolar)	94,3 mm.
Longitud lateral	69,4 mm.
Anchura bicigomática	128,2 mm.
Anchura biyugal	110,1 mm.
Anchura bimaxilar	91,1 mm.
Altura cara superior (nasioalveolar)	70,7 mm.
Altura espinoalveolar	20,2 mm.

INDICES

Indice facial superior	55,3 %
Indice transverso-cigomático	92,6 %
Indice fronto-cigomático	74,3 %
Indice gnático	93,3

ORBITA Y REGION INTERORBITARIA

Anchura interorbitaria interna	21,6 mm.
Anchura interorbitaria externa	95,6 mm.
Anchura biorbitaria	94,5 mm.
Anchura orbitaria	38,7 mm.
Altura orbitaria	33,5 mm.

REGION NASAL

Anchura nasal	23,8 mm.
Altura nasal	50,7 mm.
Longitud de los huesos nasales	25,2 mm.
Anchura mínima de los huesos nasales	6,2 mm.
Anchura máxima de los huesos nasales	12,4 mm.

ANGULOS

Angulo del perfil total	84,9°
Angulo del perfil nasal	84,7°
Angulo del perfil alveolar	85,0°
Angulo opistion -nasion - prostion	70,1°
Angulo facial de Martin	73,7°
Angulo intrafacial	64,2°
Angulo postfacial	42,4°

CAPACIDAD Y PESO CRANEAL

Capacidad craneal	1469 cc.
Peso craneal	625 gr.

MAXILAR SUPERIOR

Longitud máxiloalveolar	52,5 mm.
Anchura máxiloalveolar	59,3 mm.
Longitud del paladar	46,3 mm.
Anchura del paladar	35,2 mm.

INDICES

Indice orbitario	86,6 %
Indice nasal	47,1 %
Indice maxilo-alveolar	113,7 %
Indice palatino	76,4 %

MAXILAR INFERIOR. VARONES*DIAMETROS*

Longitud máxima	105,8 mm.
Longitud del cuerpo mandibular	93,4 mm.
Longitud pogonion-gonion	84,3 mm.
Anchura bigoniaca	100,1 mm.
Anchura bicondílea externa	118,0 mm.
Anchura bicoronoidea	94,1 mm.
Anchura bimental	45,2 mm.
Anchura mínima de la rama	31,2 mm.
Anchura máxima de la rama	43,0 mm.
Altura de la sínfisis	35,5 mm.
Altura del agujero mentoniano	16,5 mm.
Altura de la rama	62,8 mm.
Profundidad escotadura sigmoidea	13,7 mm.
Longitud del condilo mandibular	20,3 mm.
Anchura del cóndilo mandibular	9,0 mm.

ESPESOR Y ANGULOS

Espesor de la sínfisis	14,2 mm.
Espesor del cuerpo	15,5 mm.
Angulo gonfaco	122,2°
Angulo de la sínfisis	66,4°
Peso mandibular	77,2 gr.

INDICES

Indice mandibular	89,9 %
Indice gonio-condíleo	84,7 %
Indice de la rama	50,1 %
Indice de Sergi	29,6 %
Indice de robustez	40,8 %

NEUROCRANEO. MUJERES.*DIAMETROS SAGITALES*

Longitud máxima	177,4 mm.
Longitud glabelo - infacia	170,1 mm.
Longitud glabelo - lambdoidea	171,6 mm.
Longitud de la base (nasio - basilar)	96,0 mm.
Longitud nasion - opistion	129,4 mm.
Long. agujero occip.(foramen magnun)	34,5 mm.

DIAMETROS TRANSVERSALES

Anchura máxima	134,6 mm.
Anchura frontal mínima	93,0 mm.
Anchura frontal máxima	114,1 mm.
Anchura de la base (biauricular)	116,0 mm.
Anchura biastérica	105,9 mm.
Anchura bimastoidea	97,7 mm.

CURVAS

Circunferencia horizontal	502,8 mm.
Curva transversal	297,6 mm.
Curva sagital total	359,7 mm.

DIAMETROS VERTICALES

Altura basiobregmática	126,8 mm.
Altura opistiobregmática	139,2 mm.
Altura auriculobregmática	106,9 mm.
Máxima altura auricular	109,7 mm.

INDICES

Indice craneal	75,9 %
Indice vertico-longitudinal	71,5 %
Indice vertico-transversal	94,3 %
Indice auriculo-longitudinal	60,3 %
Indice auriculo-transversal	79,4 %
Indice transverso-frontal	81,6 %
Indice fronto-parietal	69,2 %
Indice parieto-occipital	78,6 %

ARCOS

Arco sagital frontal	124,0 mm.
Arco sagital parietal	121,3 mm.
Arco sagital occipital	114,4 mm.
Arco sagital occipital cerebral	67,3 mm.
Arco sagital occipital cerebeloso	47,1 mm.

CUERDAS

Cuerda frontal	108,3 mm.
Cuerda parietal	109,9 mm.
Cuerda occipital total	94,5 mm.
Cuerda occipital cerebral	63,2 mm.
Cuerda occipital cerebelosa	46,6 mm.
Cuerda lambda - basion	113,2 mm.
Cuerda bregma - asterion	129,6 mm.
Cuerda bregma - esfenion	90,9 mm.
Cuerda lambda - asterion	84,5 mm.

ANGULOS

Angulo de inclinación frontal	47,7°
Angulo de inclinación occipital	56,0°
Angulo de angulación occipital	122,1°
Angulo inclinación escama occipital	80,0°
Angulo bregma-nasion-inion	60,5°
Angulo de Schwalbe	58,7°
Angulo bregma-nasion-lambda	39,3°
Angulo bregma-glabela-lambda	37,4°
Angulo occipital de Broca	13,5°
Angulo occipital de Daubenton	0,3°
Angulo basilar de Broca	20,5°

INDICES

Indice sagital total	36,0 %
Indice sagital frontal	87,4 %
Indice sagital parietal	90,7 %
Indice sagital occipital	82,7 %
Indice sagital occipital cerebral	94,1 %
Indice sagital occipital cerebeloso	99,2 %
Indice de la curva frontal	34,4 %
Indice de la curva parietal	33,7 %
Indice de la curva occipital	31,7 %

ESPLACNOCRANEO. MUJERES.*DIAMETROS*

Longitud de la cara (basioalveolar)	89,4 mm.
Longitud lateral	66,3 mm.
Anchura bicigomática	120,1 mm.
Anchura biyugal	104,2 mm.
Anchura bimaxilar	87,5 mm.
Altura cara superior (nasioalveolar)	67,2 mm.
Altura espinoalveolar	19,0 mm.

INDICES

Indice facial superior	56,0 %
Indice transverso-cigomático	89,2 %
Indice fronto-cigomático	77,4 %
Indice gnático	93,2 %

ANGULOS

Angulo del perfil total	85,3°
Angulo del perfil nasal	85,9°
Angulo del perfil alveolar	84,1°
Angulo opistion -nasion - prostion	69,5°
Angulo facial de Martin	73,7°
Angulo intrafacial	64,1°
Angulo postfacial	42,6°

CAPACIDAD Y PESO CRANEAL

Capacidad craneal	1335 cc.
Peso craneal	552 gr.

ORBITA Y REGION INTERORBITARIA

Anchura interorbitaria interna	21,0 mm.
Anchura interorbitaria externa	91,4 mm.
Anchura biorbitaria	91,2 mm.
Anchura orbitaria	37,2 mm.
Altura orbitaria	33,7 mm.

REGION NASAL

Anchura nasal	22,6 mm.
Altura nasal	48,3 mm.
Longitud de los huesos nasales	24,3 mm.
Anchura mínima de los huesos nasales	5,8 mm.
Anchura máxima de los huesos nasales	11,7 mm.

MAXILAR SUPERIOR

Longitud máxiloalveolar	49,9 mm.
Anchura máxiloalveolar	56,8 mm.
Longitud del paladar	44,1 mm.
Anchura del paladar	34,4 mm.

INDICES

Indice orbitario	91,0 %
Indice nasal	47,0 %
Indice maxilo-alveolar	114,4 %
Indice palatino	78,2 %

MAXILAR INFERIOR. MUJERES.*DIAMETROS*

Longitud máxima	99,2 mm.
Longitud del cuerpo mandibular	88,1 mm.
Longitud pogonion-gonion	79,1 mm.
Anchura bigoniaca	91,6 mm.
Anchura bicondílea externa	111,2 mm.
Anchura bicoronoidea	88,4 mm.
Anchura bimental	43,0 mm.
Anchura mínima de la rama	29,3 mm.
Anchura máxima de la rama	40,5 mm.
Altura de la sínfisis	34,2 mm.
Altura del agujero mentoniano	15,5 mm.
Altura de la rama	57,4 mm.
Profundidad escotadura sigmoidea	12,9 mm.
Longitud del condilo mandibular	18,9 mm.
Anchura del cóndilo mandibular	8,3 mm.

ESPESOR Y ANGULOS

Espesor de la sínfisis	13,3 mm.
Espesor del cuerpo	14,6 mm.
Angulo goníaco	124,0°
Angulo de la sínfisis	66,4°
Peso mandibular	63,7 gr.

INDICES

Indice mandibular	89,4 %
Indice gonio-condíleo	82,8 %
Indice de la rama	51,5 %
Indice de Sergi	29,6 %
Indice de robustez	39,5 %

Discusión de los resultados*a) Modelo masculino*

El índice craneal, relación entre la máxima longitud y anchura del cráneo, constituye el parámetro fundamental de estas investigaciones antropológicas (Aranzadi y Hoyos, 1912). De acuerdo con éste, en Aragón predominan los cráneos masculinos alargados o dolicoocráneos (índice de 74,5%), característicos de las poblaciones mediterráneas, destacando en ellos la notable longitud antero-posterior que presentan (186,2 mm.). Su anchura máxima, de 138,5 mm. de media, puede ser considerada como moderada.

Junto a los diámetros máximos citados, sin duda los más representativos de la calvaria, la craneometría establece otras importantes medidas sagitales y transversales. Entre las primeras cabe destacar la glabeloiníaca (179,2 mm.) que marca la posición relativa de cerebro y cerebelo, la nasiobasilar (101,1 mm.) y la nasioopistíaca (135,2 mm.).

Entre los diámetros transversales o anchuras destacan la frontal mínima, de 93,3 mm. y la frontal máxima, de 116,5 mm., que además de informarnos sobre la amplitud absoluta de la frente, pueden relacionarse entre sí o con la anchura máxima del neurocráneo. De los índices así establecidos, el más utilizado es el frontoparietal, relación porcentual entre la anchura frontal mínima y la anchura máxima o biparietal y cuyos valores de 68,9%, permiten clasificar a estos cráneos entre los metriometopos o de frente intermedia, próximos a las frentes anchas o eurimetopos. El índice transversofrontal, obtenido al relacionar las dos anchuras frontales entre sí, con una media de 81,9%, indica el carácter moderadamente divergente de la frente.

De los diámetros transversos de la base, el de valor más fijo y determinado es el trazado entre los puntos astéricos de cada lado y cuyo valor medio de 110,1 mm. indica la anchura máxima del hueso occipital. Su relación con la anchura máxima craneal o índice parietooccipital se utiliza para definir a la cabeza desde el plano posterior. En los cráneos aragoneses el valor de este índice es de 79,5%.

Los diámetros verticales o alturas de la cabeza son varios. La basiobregmática es considerada como la altura verdadera del neurocráneo. Su relación con los diámetros máximo anteroposterior y transversal del cráneo se utiliza para establecer la proporcionalidad de estas dimensiones en los tres planos del espacio. Los valores de estos índices, denominados verticolongitudinal (71,5%) y verticotransversal (96,2%), colocan a los cráneos aragoneses entre las categorías intermedias de ortocráneos y metriocráneos respectivamente, propias de las mediterráneas gráciles.

La altura auriculobregmática, menos representativa que la anterior, tiene la ventaja de ser aplicable al individuo vivo. Los índices de proporcionalidad establecidos con ella confirman la moderada altura de estos cráneos.

La curvatura del cráneo se estudia mediante el cálculo de cuerdas o líneas rectas y arcos o curvas craneales. Su determinación, de escaso interés individual, ayuda a establecer, mediante los índices sagitales, la curvatura de las regiones frontal, parietal y occipital, máxima en esta última. Por su parte los índices de las regiones frontal (33,9%), parietal (33,9%) y occipital (32,0%) nos indican el porcentaje de participación de estos huesos en la curva sagital total del neurocráneo, muy equilibrado en nuestra muestra. Por último las curvas craneales totales sagital –entre las europeas más elevadas– transversal y horizontal –inferiores, en estos casos, a los promedios europeos– terminan de definir la curvatura del neurocráneo en sus distintas normas de observación.

La morfología facial constituye otro de los caracteres antropológicos fundamentales. Su forma general se expresa a través del índice facial. Uno de sus parámetros, la altura superior de la cara o nasioalveolar de Kollmann, mide 70,7 mm. en los cráneos aragoneses. La anchura, representada para Kollmann por la bicigomática y para Virchow por la bimaxilar, sería de 128,2 mm. y de 91,1 mm. respectivamente. Calculando el índice facial superior de Kollmann, el más exacto de todos, comprobamos que los cráneos aragoneses pertenecen a la categoría de leptoprosopos (por encima de 55,0%), próximos a la mesoprosopia (55,3%), algo superior a la de otras poblaciones mediterráneas, pero muy similar al otorgado por Hoyos (55,5 %) para los españoles.

La distancia basioalveolar representa la longitud antero-posterior o profundidad de la cara. El valor obtenido por nosotros es de 94,3 mm. Su relación con la altura nasioalveolar permite establecer el índice gnático de Flower, cuyo promedio de 93,3 %, sitúa a estos cráneos en la categoría de los ortognatos (menores de 97,9%).

Otro índice, el craneofacial transversal o transversal-cigomático, relaciona la anchura cefálica con la máxima de la cara o bicigomática y expresa el estrechamiento anterior de la cara en el plano horizontal. Por su valor, los cráneos aragoneses son de cara media o mesópsidos (92,6%). Por otro lado, el estrechamiento facial superior descrito por el índice frontocigomático (74,3%) expresa el carácter micrópsido de esta porción de la cara aragonesa, debido, sin duda, a la considerable anchura bicigomática.

La biometría de determinadas regiones craneofaciales (orbitaria, facial, palatina y maxiloalveolar) resulta fundamental para separar, en grupos diferentes, cráneos de similares características generales. El índice orbitario o relación porcentual entre la anchura orbitaria (38,7 mm.) y la altura (33,5 mm.) resulta elevado en estos cráneos (86,6%), considerados claramente hipsiconquios y representativos de las extensas órbitas de los mediterráneos gráciles.

La morfología de la nariz viene definida a través del índice nasal. El valor de este índice en Aragón (47,1%) incluye a estos cráneos entre los mesorrinos, muy próximos a los leptorrinos o de nariz estrecha y alargada. Sus valores absolutos de anchura (23,8 mm.) y altura nasal (50,7 mm.) vienen a confirmar esta morfología. Estos resultados

conducen con los de Nieto (1982), situándose un tanto alejados de la plitirrinia otorgado por Aranzadi (1912) a los aragoneses. Recordemos, sin embargo, que las variaciones individuales de estas mediciones en una comunidad, superan, en ocasiones, a las realizadas entre grupos étnicos dispares.

El paladar aragonés, con un índice palatino de 76,4%, pertenece a la categoría de los leptostafilinos o estrechos (menores de 79,9%), con valores absolutos de 46,3 mm. de longitud oral-estafilina y de 35,2 mm. de anchura biendomalar. Por último, el índice maxiloalveolar, obtenido por comparación entre la anchura (59,3 mm.) y la longitud maxiloalveolar (52,5 mm.), es de 113,7%, porcentaje incluido entre los cráneos mesouránicos o de arcada alveolar media.

El estudio antropológico del cráneo requiere el establecimiento de ángulos en distintas regiones anatómicas. La inclinación de la región frontal viene definida por el ángulo formado por la línea nasion-bregma con el plano aurículo-orbitario ($47^{\circ}6$), así como por el definido por los puntos bregma-nasion-inion ($60^{\circ}6$).

La inclinación del occipital se mide mediante el ángulo formado por la línea lambda-opistion con el plano aurículo-orbitario ($56^{\circ}3$). Los ángulos constituidos por lambda-inion-plano aurículo-orbitario ($81^{\circ}3$) y lambda-inion-opistion ($120^{\circ}3$) reflejan la inclinación de la región escamosa del occipital, el primero con relación al plano horizontal mencionado y el segundo a la región basilar.

La inclinación del agujero occipital tiene un interés especial por corresponder, con bastante exactitud, con la actitud del sujeto. Su determinación se recoge en los ángulos occipital de Broca ($15^{\circ}6$) y occipital de Daubenton ($2^{\circ}3$). El basilar de Broca ($22^{\circ}5$) mide la inclinación del foramen magnum respecto a la base del cráneo.

La prognatia designa a la prominencia excesiva de los bordes alveolares del maxilar, en oposición a la ortognatia, que expresa la verticalidad de la cara. Su determinación mediante el ángulo facial ($84^{\circ}7$) define el prognatismo de la cara superior. Otros ángulos complementarios los del perfil nasal ($84^{\circ}7$) y alveolar ($85^{\circ}9$) definen, respectivamente, el prognatismo nasal y subnasal. Estos resultados clasifican a los aragoneses como mesognatos por sus perfiles total y nasal, y ortognatos (por encima de 85°) por su perfil alveolar o subnasal.

El triángulo facial de Rivet, con vértices en los puntos nasion, prosthion y basion, resulta de gran utilidad en el estudio del prognatismo. Los valores del ángulo anterior de este triángulo o ángulo facial ($73^{\circ}7$) reflejan, en este caso, el carácter ortognato de los cráneos aragoneses.

El peso medio de los cráneos masculinos aragoneses es de 625,2 gr. La capacidad craneal, de 1.469 c.c. Estas cifras, junto a los valores del índice calvario-cerebral (42,5%) calculado a partir de éstas, sirven para clasificar a estos cráneos entre los eucéfalos de Sasarin, respecto a la capacidad, e intermedios en cuanto al peso.

b) Modelo femenino

La biometría del neurocráneo femenino resulta comparable a la obtenida en los cráneos masculinos. Como era de esperar, los valores absolutos de estas series resultan uniformemente más pequeños, con valores entre un 4-5% más bajos para los diámetros y entre un 3-4% para las curvas neurocraneales.

Así sucede con la anchura (134,6 mm.) y la longitud máxima de la cabeza (177,4 mm.) y con las alturas basiobregmática (126,8 mm.) y auricular (106,9 mm.). En cambio, los índices relativos de ambas series coinciden, en general, con bastante exactitud. La craneometría femenina confirma, así, el carácter mesocéfalo-subdolicocéfalo (índice craneal 75,9%) y la altura moderada de la cabeza aragonesa (índices verticolongitudinal y verticotransversal de 71,5% y 94,3% respectivamente). Por otra parte, la anchura absoluta y relativa de la frente y de la región occipital confirman el carácter medio de estas regiones neuro-craneales.

En cuanto a la participación de las porciones frontal (34,4%), parietal (33,7%) y occipital (31,7%) en la curva sagital total, así como la curvatura de cada una de estas regiones, coinciden plenamente con el modelo masculino.

El esplanocráneo femenino también resulta proporcional al masculino. De nuevo los valores absolutos femeninos de altura (67,2 mm.) y anchura facial (120,1 mm.), altura (48,3 mm.) y anchura nasal (22,6 mm.), son inferiores a los correspondientes masculinos. Sólo la altura orbitaria, como ya señalaba Testut, resulta mayor en las mujeres que en los hombres (33,7 mm.).

De esta forma, los índices femeninos del esplanocráneo resultan similares a los del grupo masculino. El ligero aumento hacia la leptoprosopia (índice facial de 56,0%), el incremento de la hipsiconquia orbitaria (índice orbitario de 91,0%) o incluso el mayor equilibrio de la morfología de la cara superior reflejado en los valores de los índices

fronto-cigomático y transverso-cigomático (77,4% y 89,2% respectivamente), no resultan determinantes para establecer diferencias entre uno y otro grupo. Por otra parte, las proporciones nasales (índice nasal de 47,0%) y palatinas (índice maxiloalveolar de 114,4% y palatino de 78,2%) coinciden en las dos series.

Los ángulos frontales, parietales y faciales apenas muestran dimorfismo sexual. Sólo cabe destacar la mayor inclinación femenina de la escama occipital (ángulo lambda-inion-opistion de 122°) y la menor del foramen magnum (ángulos occipital y basilar de Broca de 13°5 y 20°5 respectivamente y occipital de Daubenton de 0°30). También es de señalar un ligero aumento del prognatismo alveolar de los cráneos femeninos (ángulo del perfil alveolar de 84°1).

Como era de esperar, el peso (552,7 gr.) y la capacidad craneal (1.335 c.c.) medios de las calvarias femeninas aragonesas son sensiblemente inferiores a los del varón. Sin embargo, al relacionarlos, el índice calvario-cerebral (41,4%) los clasifica entre los mesocéfalos, como también ocurría en los masculinos.

c) Mandíbula masculina

La mandíbula aragonesa presenta valores moderados en los diámetros anteroposteriores pogonion-gonion (84,3 mm.), el cuerpo mandibular (93,4 mm.) y total de la mandíbula (105,8 mm.). La relación de este último con el bicondíleo externo (118 mm.) nos ha permitido establecer el índice mandibular (89,9%) y confirman el carácter intermedio o mesognato de estos maxilares inferiores, aunque con valores muy próximos a la dolicrognatia (superiores al 90%).

Las dimensiones transversales de la mandíbula están representadas por diversos diámetros. El más importantes de éstos, el bigoníaco (101,1 mm.), representa la anchura inferior de la cara. Su relación con el bicondíleo externo, mencionado más arriba, mediante el índice gonio-condíleo (84,7%) permite describir la inclinación de las ramas verticales entre los planos horizontales superior e inferior del hueso.

La biometría de determinadas regiones mandibulares (rama ascendente, cóndilos, escotadura sigmoidea) resulta importante para la completa descripción del hueso. La morfología de la porción ascendente se expresa por el índice de la rama, relación porcentual entre la altura (61,8 mm.) y la anchura mínima de la misma (31,2 mm.). El valor aragonés de este índice (50,1%) está dentro de los considerados normales entre los caucasicos.

La anchura mínima de la mandíbula interviene también en el cálculo del índice de Sergi, relacionada con su máxima longitud total. Sus valores (29,6%) reflejan el equilibrio morfológico de la mandíbula aragonesa.

Los cóndilos mandibulares y la escotadura sigmoidea se definen principalmente por la longitud (20,3 mm.) y anchura de los cóndilos (9,0 mm.) y por la profundidad de la escotadura sigmoidea (13,7 mm.), medidas todas ellas de enorme variabilidad, a pesar de sus reducidas dimensiones. El índice de robustez, calculado a nivel de la sínfisis mentoniana, con valores considerados moderados en Aragón (40,8%), se obtiene relacionando el espesor (14,2 mm.) y la altura de la sínfisis (35,5 mm.).

Entre los ángulos mandibulares, el más importante es el goníaco o mandibular, con un valor medio entre los aragoneses de 122°2. El ángulo de la sínfisis, con una media de 66°4, muestra la mesognonia o prominencia moderada del mentón aragonés.

Por último citemos que el peso medio de la mandíbula masculina, con la dentadura completa, es, en Aragón, de 77,2 gr.

d) Mandíbula femenina

Las dimensiones absolutas de la mandíbula femenina también son inferiores a sus homólogas masculinas, con diferencias entre un 6% y un 9%. Así sucede con los diámetros bigoníaco (91,6 mm.), bicondíleo (111,2 mm.), antero-posterior máximo (99,2 mm.) y la altura (57,4 mm.) y anchura de la rama ascendente (29,3 mm.). Los menores valores de estos diámetros, en especial el bigoníaco y el bicondíleo, contribuyen a proporcionar la morfología oval de las caras femeninas.

De nuevo los índices obtenidos a partir de estas medidas absolutas resultan superponibles a los de la serie masculina, confirmando el carácter mesognato de la prominencia mentoniana y las proporciones equilibradas de estas

mandíbulas aragonesas (índice mandibular de 89,4% y de Sergi de 29,6%). El índice de robustez (39,5%), como parece lógico, es algo más de una unidad menor en las hembras que en el varón.

En cambio, el índice gonio-condíleo de las aragonesas (82,8%), en contra de lo que sucede en otras poblaciones caucásicas, también es inferior al masculino (84,7%), lo que confiere una mayor divergencia a las ramas ascendentes de estas mandíbulas femeninas, circunstancia común a otras poblaciones mediterráneas. Por su parte, el índice de rama femenino (51,5%) es superior al masculino en algo más de una unidad, lo que aporta mayor infantilismo a las piezas femeninas (Olivier, 1960).

En cuanto a la longitud y anchura de los cóndilos mandibulares, los valores femeninos son inferiores a los masculinos, circunstancia característica de los caucásicos y que no se observa, sin embargo, en los negroides, con valores similares (Porowski y Bruska, 1978)

Respecto a los ángulos goníaco (124°) y de la sínfisis ($66^\circ 4'$), los valores del grupo de mujeres resultan, en el primer caso, superiores, y en el segundo, iguales a los de sus homólogos masculinos.

Para terminar, señalemos que el peso medio de estos huesos, con la totalidad de los dientes, es, en la mujer aragonesa, de 63,7 gr., inferior en 14,5 gr. al obtenido en los varones.

BIBLIOGRAFIA

- ARANZADI, T. y HOYOS-SAINZ, L. (1912): "Unidades y constantes de la Crania Hispánica".
Asoc. Esp. Progr. Ciencias. Congreso de Granada, t. V, 29-60.
- CARRO, J. (1978): "Aportaciones a la cefalometría de poblaciones homogéneas".
Comunicación al X Congreso de la Sociedad Anatómica Española. Zaragoza.
- DELFINO, V. P. (1982): "Evaluation of the variations of facial relief of the human skull". (Texto italiano).
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **58/3-4**: 87-93.
- FUSTE, M. y PONS, J. (1962): "La población aragonesa. Estudio antropológico".
Institución "Fernando el Católico". Zaragoza, 1-89.
- HOLLAND, T. D. (1986): "Sex determination of fragmentary crania by analysis of cranial base".
Am. J. Phys. Anthropol. **70/2**: 203-208)
- LAVELLE, C. (1985): "An analysis of craniofacial form; the need for new analytic techniques".
Anat. Anz. **160**: 157-166.
- MACHO, G. (1986): "Cephalometric and craniometric age changes in adult humans".
Ann. Hum. Biol. **13/1**: 49-61.
- MARTINEZ-FLOREZ, J. (1983): "El riojano actual".
Actas I Jornadas Antropológicas del Valle del Ebro pp. 34-45. Ayuntamiento de Logroño. Logroño.
- MASA, M. C.; NOGUEIRA, M. L.; CASTAÑO, M. T. y col. (1988): "Introducción al estudio del índice cefálico de la población gallega actual".
Actas XIII Congreso Nacional Soc. Anat. Española, p. 123. Oviedo.
- NIETO, J. L. y SIMON, E. (1982): "Contribución a la Crania Aragonesa. Valores absolutos e índices del neurocráneo y esplanocráneo".
Comunicación al XI Congreso de la Sociedad Anatómica Española, pp. 86-87 Espax Edt. Barcelona.
- NIETO, J. L. (1983): "Aproximación al conocimiento bioantropológico de la población aragonesa".
Estado actual de los Estudios sobre Aragón. Actas V Jornadas, vol. I, pp. 55-63. I.C.E. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
- OLIVIER, G. (1965): "Anatomie Anthropologique".
Vigot Frères. Paris.
- OLIVIER, G. (1969): "Pratique Anthropologique". Vigot Frères. Paris
- OLIVIER, G. (1970): "Anthropologie de la France. IV. Données sur le crâne des Français". Bull. Soc. Anthr. Paris **12/3**: 307-310.
- PINO A., del (1964): "Antropología física en los alpujarreños, según los escritos del Prof. Oloriz".
Ana. Des. **12**: 26-28.
- RUA, C. de la (1984): "Correlaciones estructurales y mecánica craneofacial en la morfología del cráneo vasco".
Tesis doctoral. Universidad de Bilbao. Bilbao.

- SCHWIDETZKY, I.; CHIARELLI, B. y NECRASOV, O. (1980): "Physical Anthropology of European Populations".
Mouton Publishers. The Hague, París. New York.
- SUSANNE, C.; GUIDOTTI, A. y HAUSPIE, R.(1985): "Age changes of skull dimensions".
Anthropol. Anz. 43/1: (31-36).

Correspondencia: Dr. José L. Nieto
Dpto. Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza
Domingo Miral s/n.
50009 Zaragoza. España

EL NUCLEUS CIRCULARIS DEL HIPOTALAMO DE RATA

THE NUCLEUS CIRCULARIS OF THE HYPOTHALAMUS OF THE RAT

F.E. PASTOR, J.L. BLAZQUEZ, M.T. HERNANDEZ, D. TORANZO, A. SANCHEZ,
A.J. ALVAREZ-MORUJO, L. MUÑOZ-BARRAGAN y P. AMAT

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio del nucleus circularis del hipotálamo de rata con microscopía de luz (Kluver-Barrera e inmunohistoquímica) y microscopía electrónica de transmisión. El nucleus circularis es un hallazgo constante en los cortes de parafina y se localiza en una zona equidistante entre los núcleos supraóptico y paraventricular. Está constituido por neuronas magnocelulares estrechamente agrupadas, la mayoría de las cuales son inmunorreactivas para la vasopresina. A nivel ultraestructural cabe destacar la alta frecuencia con que puede apreciarse yuxtaposición directa de dos o más somas neuronales. Las neuronas de este núcleo muestran un gran desarrollo de los organitos relacionados con la síntesis, empaquetamiento y secreción de proteínas (retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, vesículas granulares). También son abundantes los cuerpos densos de tipo lisosomal. El territorio del nucleus circularis se encuentra muy vascularizado. Los capilares son de endotelio continuo y muestran una intensa actividad de micropinocitosis.

PALABRAS CLAVE: Nucleus circularis, hipotálamo, rata.

SUMMARY

A study was carried out on the nucleus circularis of the hypothalamus of the rat with the light (Kluver-Barrera and immunohistochemistry) and transmission electron microscope. The nucleus circularis is a constant finding in paraffin sections and is located equidistantly between the supraoptic and paraventricular nuclei. It contains tightly packed magnocellular neurons, most of which are vasopressin-reactive. At ultrastructural level an outstanding finding is the high frequency of direct apposition of two or more cell bodies. The neurons of this nucleus exhibit well-developed organelles related with the synthesis, packaging and secretion of proteins (rough endoplasmic reticulum, Golgi complex, granular vesicles). There are also numerous lysosomal dense bodies. The territory of the nucleus circularis is highly vascularized. The capillaries show a continuous endothelium and intense micropinocytotic activity.

KEY WORDS: Nucleus circularis, hypothalamus, rat.

Introducción

Los núcleos magnocelulares accesorios son agrupaciones neuronales hipotalámicas que proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis, al igual que lo hacen los núcleos accesorios supraóptico y paraventricular. La importancia

de los núcleos accesorios radica en la alta proporción de somas magnocelulares que poseen. Para Fisher y col. (1979) representan aproximadamente la mitad de las neuronas magnocelulares hipotalámicas y para Rhodes y col. (1981) una tercera parte.

La sistematización de los núcleos magnocelulares accesorios es extraordinariamente compleja, debido en gran parte a la diferente terminología empleada por distintos autores. Buenas descripciones anatómicas de estos núcleos se han realizado en la rata (Peterson, 1966; Burlet y col., 1974; Sherlock y col., 1975; Fisher y col., 1979; Rhodes y col., 1981; Ju y col., 1986), y en el gato (Reaves y Hayward, 1978, 1979; Caverson y col., 1987). Dentro de los núcleos magnocelulares accesorios destaca el *nucleus circularis*, que está constituido por un acúmulo de neuronas localizado entre el núcleo supraóptico y el núcleo paraventricular. Aunque pueden encontrarse referencias a esta estructura ya en los trabajos de Bođian y Maren (1951) y de Ford y Kantounis (1957), el primer autor que realizó una amplia descripción del *nucleus circularis* —dándole además este nombre— fue Peterson (1966). Con posterioridad otros investigadores han confirmado su existencia (Burlet y col., 1974; Sherlock y col., 1975; Hatton, 1976; Reaves y col., 1978; Fisher y col., 1979; Ju y col., 1986; Caverson y col., 1987), empleando algunos de ellos el término núcleo supraóptico accesorio (Bandaranayake, 1971; Antunes y Zimmerman, 1978).

El interés del estudio del *nucleus circularis* radica en la posibilidad de que pueda actuar como un osmorreceptor dentro del cerebro (Hatton, 1976; Tweedle y Hatton, 1976), siendo llamativa la escasez de estudios ultraestructurales sobre este núcleo. Nosotros sólo tenemos noticias de los trabajos de Tweedle y Hatton (1976, 1977). En el presente trabajo, cuyos resultados han sido comunicados parcialmente con anterioridad (Pastor y col., 1986a, b), realizamos una aportación al mejor conocimiento del *nucleus circularis* del hipotálamo de la rata.

Material y Métodos

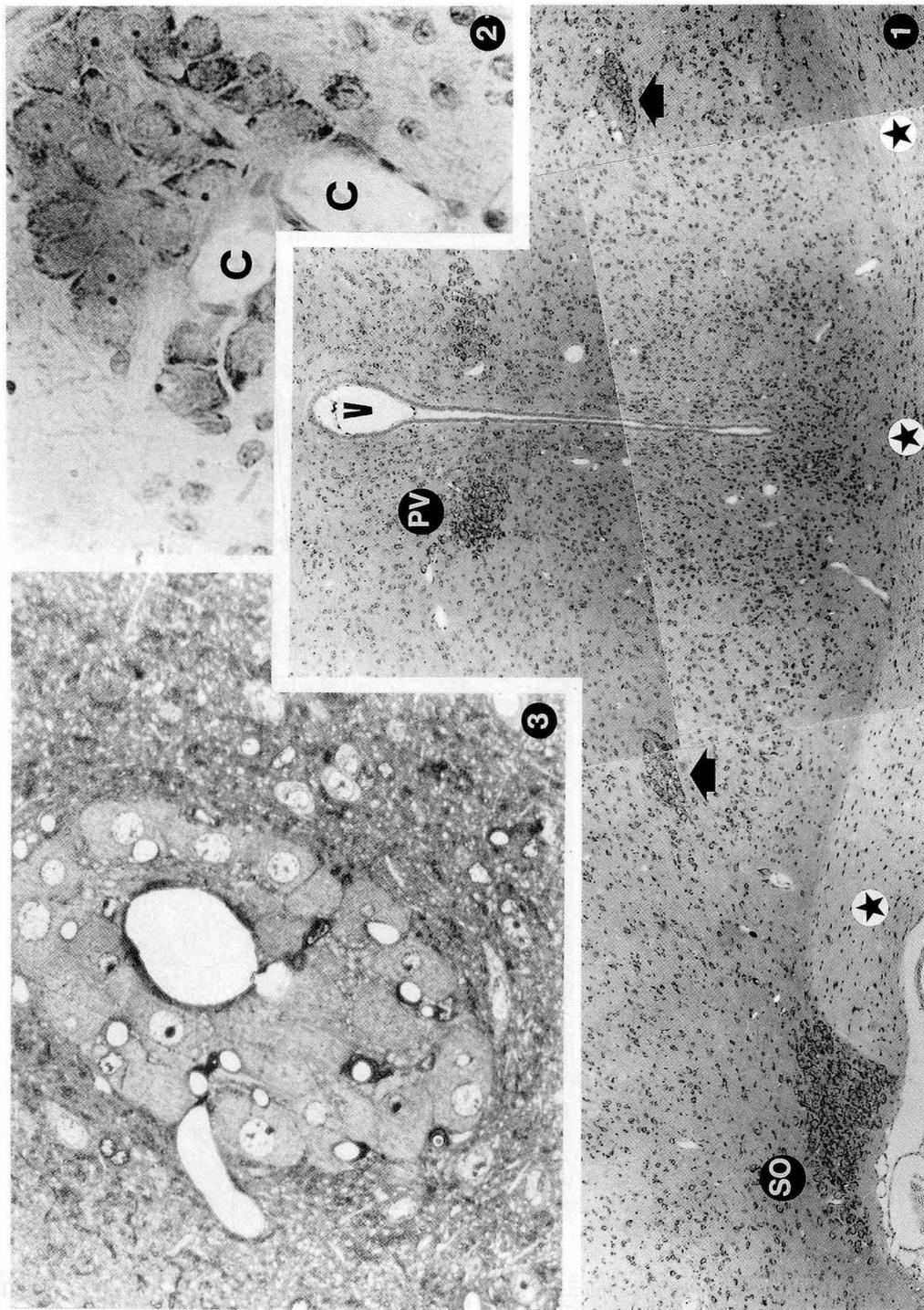
Para nuestro estudio hemos utilizado 12 ratas machos albinas de la cepa Sprague-Dawley, de dos meses de edad. Hasta el momento del sacrificio los animales han dispuesto libremente de alimento y agua.

Seis animales fueron sacrificados mediante perfusión a través del ventrículo izquierdo de Bouin-Hollande-sublimado. Tras la perfusión los bloques diencefálicos permanecieron durante 48 horas en el mismo fijador, siendo posteriormente deshidratados e incluidos en parafina, siguiendo las pautas habituales en técnica histológica. Se obtuvieron cortes coronales seriados de 7 μm de espesor, que fueron teñidos alternativamente con el método de Kluver-Barrera y con la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa, con el fin de poner de manifiesto la presencia de vasopresina. En esta última técnica hemos utilizado antisuero primario antivasopresina obtenido en conejo (gentilmente proporcionado por el Dr. Sánchez Franco, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; dilución 1:500), antisuero secundario cabra-anticonejo (1:100, EY), peroxidasa-antiperoxidasa (1:50, DAKO); como marcador se ha utilizado 3,3' diaminobencidina (SIGMA).

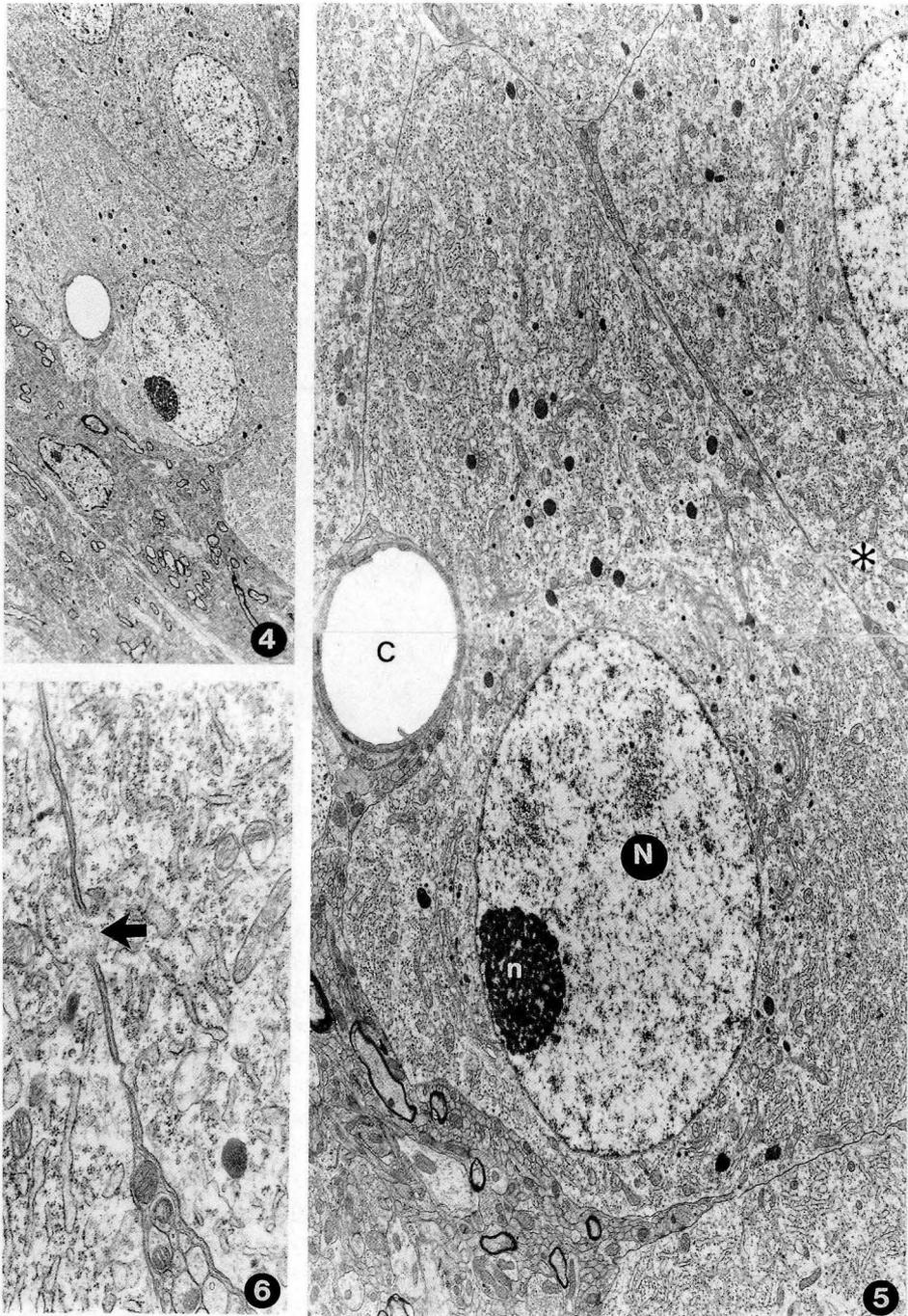
Los seis animales restantes fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4, a 4° C. Finalizada la perfusión, se tallaron los hipotálamos en bloques del tamaño apropiado que contuviesen el *nucleus circularis*, siguiendo la pauta de Pastor (1983). Tras permanecer 12 horas en la solución fijadora, los bloques fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 1% en el tampón antes descrito, deshidratados con acetonas de gradación creciente e incluidos en Durcupan (Fluka). Se obtuvieron cortes semifinos de control con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800, que fueron teñidos con azul de toluidina. Los cortes ultrafinos se contrastaron según el método de Reynolds (1963) y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 201.

Resultados

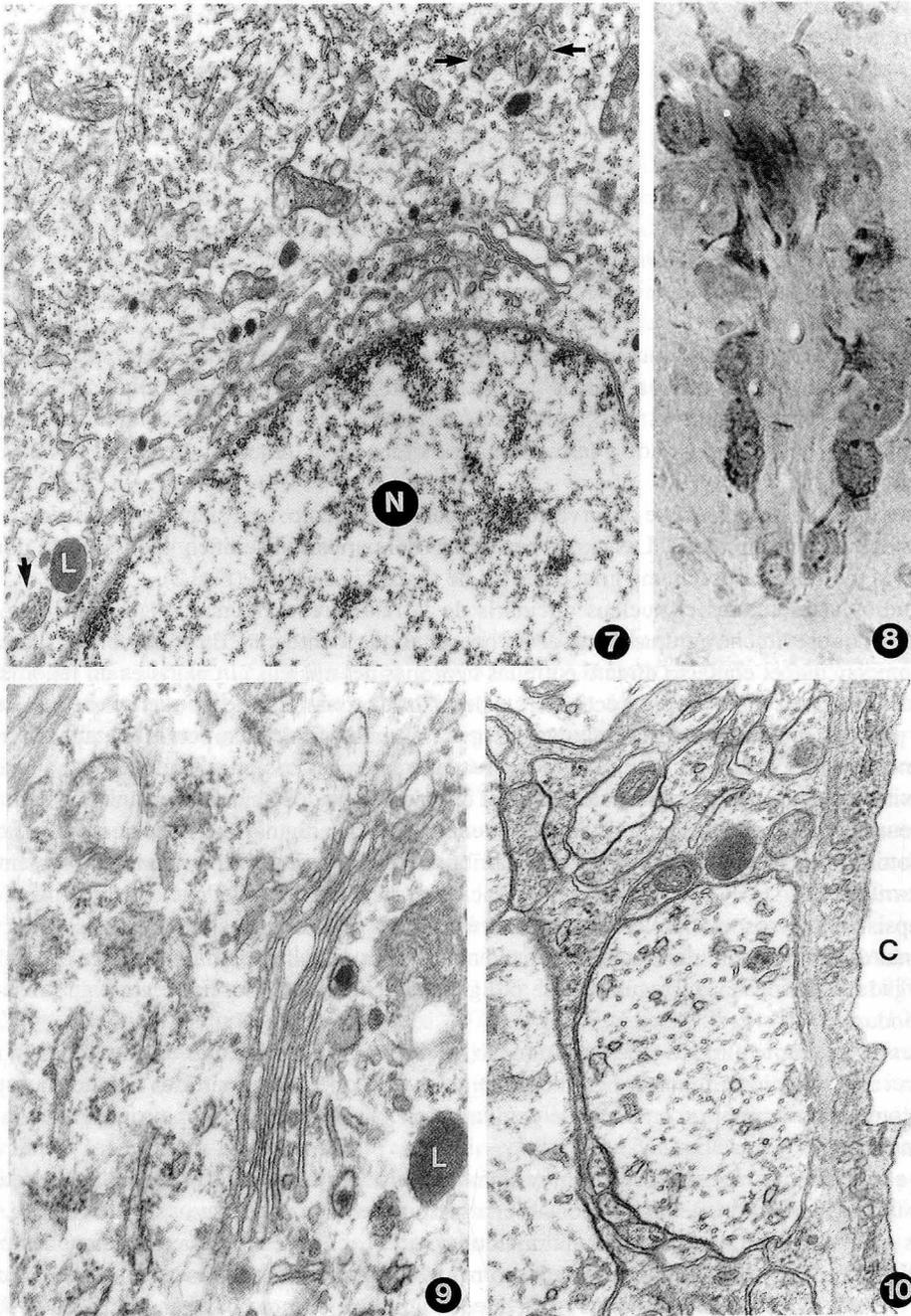
El estudio del *nucleus circularis* de la rata con microscopía de luz se ha realizado sobre cortes coronales o verticofrontales del hipotálamo, ya que este tipo de corte proporciona los puntos de referencia necesarios para la



- FIGURA 1.** Corte coronal de hipotálamo de rata. Obsérvese la luz del tercer ventrículo (V) y el quiasma óptico (señalado por asteriscos). SO= núcleo supraóptico. PV= núcleo paraventricular. Las flechas señalan los dos nucleus circularis. Tinción de Kluver-Barrera. Obj. 4X.
- FIGURA 2.** Nucleus circularis de hipotálamo de rata. C= capilar. Tinción de Kluver-Barrera. Obj. 25X.
- FIGURA 3.** Nucleus circularis de hipotálamo de rata. Corte semifino de control teñido con azul de toluidina. Obj. 25X.



- FIGURA 4.** Territorio del nucleus circularis de rata. Obsérvese el estrecho agrupamiento de las neuronas y la regularidad de los núcleos celulares. (2.350X).
- FIGURA 5.** Detalle a mayores aumentos (7.450X) de la figura 4. Se observan varios fragmentos de somas neuronales muy próximos entre sí; uno de ellos se sitúa en la inmediata vecindad de un capilar (C). Destaca el gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi. El núcleo celular (N) muestra escasa heterocromatina y un gran nucléolo (n) en posición excéntrica.
- FIGURA 6.** Detalle a mayores aumentos (21.500X) del territorio señalado con un asterisco en la figura 5. Se observa la existencia de una comunicación entre neuronas adyacentes (flecha).



- FIGURA 7.** Fragmento de una neurona del nucleus circularis. Obsérvese el aparato de Golgi y varios gránulos elementales de neurosecreción, así como un lisosoma (L). Las flechas señalan cuerpos multivesiculares. N=núcleo celular. (21.900X).
- FIGURA 8.** Neuronas del nucleus circularis inmunorreactivas para la vasopresina. Obj. 25X.
- FIGURA 9.** Detalle del área golgiana de una neurona del nucleus circularis. En sus proximidades hay cisternas de retículo endoplásmico rugoso de contenido moderadamente osmiófilo. L= lisosoma. (45.500X).
- FIGURA 10.** Territorio del nucleus circularis correspondiente a un espacio perivascular. Entre las fibras nerviosas hay laminillas gliales. La célula endotelial muestra una intensa actividad de micropinocitosis. C= capilar. (45.500X).

identificación de las estructuras objeto de estudio. De entre estos puntos de referencia los fundamentales, en nuestro caso, son la luz y paredes del tercer ventrículo, el quiasma óptico, así como las agrupaciones neuronales que constituyen los núcleos paraventricular y supraóptico, como se puede apreciar en la figura 1.

El nucleus circularis se localiza a medio camino entre los núcleos supraóptico y paraventricular o entre el supraóptico y la luz ventricular. Aparece como una formación que destaca entre el resto del tejido hipotalámico, tanto en las preparaciones teñidas con el método de Kluver-Barrera (Figs. 1 y 2), como en las que se ha utilizado la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa para poner de manifiesto la presencia de vasopresina (Fig. 8). En estas últimas preparaciones se comprueba que las células de este núcleo reaccionan de manera similar a las del núcleo supraóptico y cómo el material de reacción se localiza en casi todas las neuronas del nucleus circularis. Alrededor del núcleo hemos podido observar algunos trayectos arrosariados reactivos para la vasopresina. También se han teñido algunas prolongaciones neuronales.

Las neuronas que constituyen el nucleus circularis se encuentran estrechamente agrupadas, diferenciándose además por su gran tamaño de las que lo rodean (Figs. 1 y 3). Su forma es redondeada o elíptica (Figs. 2 y 3). Cuando las neuronas se hallan centradas por un vaso, se habla de forma anular (Fig. 3). En cualquier caso, el territorio del nucleus circularis está muy vascularizado y las neuronas se sitúan en la inmediata vecindad de los vasos, como se observa en las figuras 2 y 3.

En los cortes de 7 μm de espesor se observa con claridad un nucléolo, casi siempre excéntrico, en buena parte de las neuronas del nucleus circularis. Las partes periféricas del pericarion se tiñen intensamente por el violeta de cresilo, lo que nos indica que poseen una gran cantidad de sustancia de Nissl (Fig. 2).

En los estudios estructurales el nucleus circularis de la rata ofrece algunos rasgos morfológicos típicos y llamativos; entre ellos el estrecho agrupamiento de las neuronas que lo integran. En efecto, en las figuras 4 y 5 puede apreciarse claramente que el contacto directo entre las neuronas del nucleus circularis es un fenómeno usual. Las mismas imágenes muestran cómo, en otras ocasiones, a pesar de la proximidad de los cuerpos neuronales, el contacto no se establece por interponerse entre las células una delgada laminilla glial. Junto con la yuxtaposición de los somas neuronales hemos de mencionar otra observación efectuada en algunas ocasiones y que se ilustra en las figuras 5 y 6, en las que existe una aparente comunicación entre el citoplasma de dos neuronas vecinas.

Entre las neuronas del nucleus circularis también se encuentran con regularidad buen número de fibras nerviosas amielínicas, botones nerviosos (Figs. 5 y 6) y alguna fibra mielínica; estas últimas son relativamente abundantes alrededor del territorio (Fig. 4). Según nuestras observaciones, en el territorio del nucleus circularis del hipotálamo de rata las sinapsis, tanto axosomáticas como axodendríticas, son más bien escasas.

Las neuronas del nucleus circularis son de gran tamaño (27 μm de diámetro mayor la de la figura 5) y presentan una forma alargada, redondeada o irregularmente poligonal, de contorno liso. En general son más claras que el neuropilo circundante (Fig. 4).

El núcleo es casi siempre elíptico y de buen tamaño (el de la figura 5 mide más de 12 μm de diámetro mayor). Su nucleoplasma es claro, y los grumos de heterocromatina; muy pequeños y repartidos por toda la superficie (Figs. 4 y 5). En ocasiones encontramos un nucléolo de gran tamaño (más de 3 μm de diámetro mayor el de la figura 5) y situación excéntrica.

El retículo endoplásmico rugoso (RER) es muy abundante en estas neuronas. En general se caracteriza por estar distribuido por todo el pericarion, dentro del cual es el organito que ocupa una mayor superficie (Fig. 5). Consta de cisternas cortas que, casi siempre, forman un entramado irregular, si bien en ocasiones se disponen paralelas entre sí (Figs. 5 y 6). En su interior se advierte la existencia de un material pulverulento de escasa densidad electrónica (Figs. 6, 7 y 9). Las cisternas son estrechas en su mayoría, aunque tampoco es raro observar células cuyo RER ofrece un aspecto dilatado o vesicular (Figs. 5 y 7). Los polirribosomas libres son también muy abundantes en la vecindad de las cisternas del RER (Figs. 7 y 9).

El aparato de Golgi también muestra un gran desarrollo. Se dispone típicamente alrededor del núcleo y en sus proximidades, rodeándolo casi completamente (Fig. 5). Los dictiosomas (unos diez en la figura 5) se hallan integrados por sacos que, con frecuencia, presentan dilataciones (Figs. 7 y 9) y pequeñas vesículas. En su vecindad parecen concentrarse la mayor parte de las vesículas granulares observadas por nosotros (Figs. 5 y 7). Estos últimos organitos no son muy abundantes y su diámetro se halla comprendido entre 90 y 130 nm, estando constituidos por una parte central muy densa a los electrones y un halo claro periférico de unos 20 nm de anchura que la separa de la membrana vesicular.

En todas las neuronas son abundantes los cuerpos densos de tipo lisosomal cuya forma suele ser redondeada o elíptica y cuyo diámetro se sitúa, casi siempre, entre 200 y 400 nm (Fig. 5). Además de por su tamaño se diferencian de las vesículas granulares por la menor densidad electrónica de aquellos y la distribución uniforme de su contenido que, a grandes aumentos, muestra un aspecto pulverulento o finamente granular (Fig. 9). También hemos observado con alguna frecuencia la existencia de cuerpos multivesiculares en las neuronas del nucleus circularis (Fig. 7).

Las mitocondrias, moderadamente abundantes, son redondeadas o alargadas en los cortes (Figs. 5 y 7) y raramente su longitud sobrepasa las 1.5 μ m. Las crestas, longitudinales o transversales (Fig. 7), en muchos casos no se distinguen con claridad; la matriz es débilmente osmiófila.

Aunque las neuronas del nucleus circularis se hallan muchas veces separadas por laminillas gliales, nosotros no hemos encontrado células de naturaleza glial entre las neuronas de este núcleo.

Los capilares del nucleus circularis son de endotelio continuo; a su alrededor existe una membrana basal cuyo espesor oscila entre 45 y 65 nm. Llama la atención la intensa actividad de micropinocitosis que se evidencia en la membrana de las células endoteliales (Fig. 10). En ocasiones, en la inmediata vecindad de los capilares se observan prolongaciones nerviosas (Fig. 10), pero nunca hemos visto cuerpos de Herring terminales.

Discusión

La presencia del nucleus circularis en los cortes seriados de hipotálamos de rata, así como su situación, son hechos constantes en todos los animales de nuestra casuística. Llama también la atención cómo destaca del resto del tejido hipotalámico que lo rodea, tanto por el tamaño e intensidad de tinción de sus neuronas como por lo densamente agrupadas que están. En ocasiones pueden observarse dos masas celulares, raras veces tres, que corresponden al nucleus circularis. Este es un hecho relativamente frecuente, aunque de acuerdo con nuestras observaciones no permite llegar a las conclusiones de Bandaranayake (1971), que lo describe con el término núcleo supraóptico accesorio, para quien estaría integrado por dos grupos celulares bien definidos: uno alrededor de vasos sanguíneos y otro alrededor de axones. Aunque en ocasiones la descripción de Bandaranayake es cierta, esto, sin duda, no es lo más frecuente. En el neuropilo vecino al nucleus circularis abundan las fibras mielínicas, pero no hasta el extremo de encapsular al núcleo, como ha sido sugerido por algún autor (Hatton, 1976).

La asociación de las neuronas del nucleus circularis con capilares es también un hecho constante, que ha sido señalado con anterioridad por diferentes autores (Peterson, 1966; Bandaranayake, 1971; Hatton, 1976; Tweedle y Hatton, 1976; Choy y Watkins, 1977; Reaves y Hayward, 1978, 1979). Este hecho llevó a Peterson (1966) a resaltar su aspecto glandular. Por otra parte, Reaves y Hayward (1978) llegaron a sugerir para el nucleus circularis una función endocrina eferente, debido a la íntima relación de los axones intranucleares con los vasos sanguíneos. Nuestras observaciones nos han permitido comprobar la proximidad de fibras a los capilares del territorio del nucleus circularis. Ahora bien, los capilares son siempre de endotelio continuo y están rodeados por una membrana basal, hecho que en principio está en contra de una hipotética liberación hormonal a este nivel. Además, está perfectamente demostrado que las neuronas del nucleus circularis proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis (Sherlock y col., 1975; Fisher y col., 1979) y que contienen las dos hormonas neurohipofisarias, oxitocina y vasopresina, así como sus neurofisinas asociadas. Esto último ha sido comprobado tanto por métodos inmunohistoquímicos (Hatton, 1976; Choy y Watkins, 1977; Antunes y Zimmerman, 1978; Reaves, 1978; Armstrong y col., 1980; Rhodes y col., 1981; Caverson y col., 1987) como por hibridación in situ (véase Burbach y col., 1987). Ambos hechos, es decir, que las neuronas del nucleus circularis proyecten al lóbulo posterior de la hipófisis y que contengan las dos hormonas neurohipofisarias —por supuesto en neuronas diferentes— permiten suponer que citológicamente deben ser similares a las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular. Como es sabido, estas últimas liberan las hormonas neurohipofisarias en sus terminales axónicos o cuerpos de Herring terminales, caracterizados por poseer junto a los gránulos elementales de neurosecreción un acúmulo de microvesículas (Heap y col., 1975; Morris, 1976). Nosotros no hemos encontrado nunca cuerpos de Herring terminales en el territorio del nucleus circularis. Este dato, junto a las características de los capilares, hacen a nuestro juicio muy improbable una liberación hormonal intrahipotalámica a nivel del nucleus circularis. No obstante, lo que verdaderamente nos ha sorprendido es la gran

actividad de micropinocitosis en las células endoteliales de los capilares de este territorio, observación no muy frecuente en otros núcleos magnocelulares y para la que no tenemos explicación.

Una segunda función atribuida al nucleus circularis es la de actuar como un osmorreceptor dentro del cerebro, en base a su organización citoarquitectónica y a la respuesta de sus células a la deshidratación y rehidratación (Hatton, 1976; Tweedle y Hatton, 1976, 1977). En concordancia con esa opinión está la demostración del incremento en las neuronas del nucleus circularis de la actividad citocromo-oxidasa en ratas que carecen genéticamente de vasopresina (Krukoff y col., 1983), incremento que puede corregirse con la administración exógena de esta sustancia (Krukoff y Calaresu, 1984). Asimismo se ha comprobado un incremento en la actividad hexoquinasa en el nucleus circularis en casos de deprivación acuosa y diabetes insípida (Krukoff y col., 1986; Krukoff y Vicent, 1989) y tras la denervación de los barorreceptores aórticos (Turton y col., 1986).

Por otra parte, una de las observaciones más llamativas sobre el nucleus circularis es la estrecha agrupación de las neuronas que lo integran. Este dato ha sido resaltado por diferentes autores. Según Tweedle y Hatton (1976), en las ratas normales hasta una tercera parte de las neuronas del nucleus circularis establecen contacto directo sómato-somático con alguna otra neurona vecina. Aunque nosotros no hemos cuantificado el fenómeno de la yuxtaposición directa de los somas neuronales, nuestras imágenes parecen indicativas de que la frecuencia de estos contactos directos de los plasmalemas neuronales pueden ser aún mayor que la señalada por los autores antes citados. Cuando los somas neuronales próximos no están en contacto directo es porque entre ellos se interponen finas laminillas de células gliales, que pueden retraerse en casos de incremento de la demanda hormonal, favoreciendo así la aposición directa entre las neuronas (Tweedle y Hatton, 1977). En ocasiones hemos encontrado aparentes comunicaciones intercitoplasmáticas entre dos somas neuronales próximos. Observaciones similares han sido descritas por Van den Pol (1980) en el núcleo supraquiasmático de la rata. Según este autor, el fenómeno podría explicarse por la existencia de alguna adhesión intercelular que provocaría la rotura de la membrana durante el procesamiento del tejido.

Hemos podido comprobar un gran desarrollo del RER en la neurona de nucleus circularis de rata. Las cisternas que lo integran aparecen dilatadas con cierta frecuencia, lo que contrasta con las afirmaciones de Tweedle y Hatton (1976) sobre la no existencia de neuronas con RER dilatado en el nucleus circularis de ratas normales.

En relación con las aferencias al nucleus circularis, es de señalar que algunos datos sugieren que dentro del hipotálamo anterior es en el nucleus circularis, así como en el núcleo supraóptico y, en menor medida, en el núcleo paraventricular, donde se encuentra el mayor nivel de lugares de unión para la alfa-bungarotoxina, lo que se ha puesto en relación con un posible control colinérgico, mediado a través de receptores nicotínicos, de la secreción de vasopresina y oxitocina por el nucleus circularis (Meeker y col., 1986; Michels y col., 1986). Este hallazgo, fundamentado exclusivamente en estudios realizados con el microscopio de luz, parece estar en contradicción con nuestras observaciones sobre la escasez de sinapsis en el territorio del nucleus circularis. Ahora bien, en este sentido hay que tener en cuenta que el número de receptores no tiene por qué ser directamente proporcional a la inervación. Además, es evidente que la cuantificación de receptores nicotínicos, realizada por los autores antes citados en cortes de diez micras, difícilmente puede contrastarse con la información sobre la mayor o menor abundancia de sinapsis obtenida a partir de imágenes ultraestructurales.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Sánchez Franco, del Hospital Ramón y Cajal (Madrid), por haber proporcionado el antisuero antivasopresina, así como a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín, por su asistencia técnica.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 288/84).

BIBLIOGRAFIA

- ANTUNES, J.L. y E.A. ZIMMERMAN (1978): The hypothalamic magnocellular system of the rhesus monkey: an immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* **181**: 539-566.
- ARMSTRONG, W.E.; WARACH, S.; HATTON, G.I. y McNEILL, T.H. (1980): Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience*, **5**: 1931-1958.
- BANDARANAYAKE, R.C. (1971): Morphology of the accessory neurosecretory nuclei and of the retrochiasmatic part of the supraoptic nucleus of the rat. *Acta Anat.*, **80**: 14-22.
- BODIAN, D. y MAREN, T.H. (1951): The effect of neuro- and adenohipophysectomy on retrograde degeneration in hypothalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **94**: 485-504.
- BURBACH, J.P.; VOORHUIS, T.A.; VAN-TOL, H.H. y IVELL, R. (1978): In situ hybridization of oxytocin messenger RNA: macroscopic distribution and quantitation in rat hypothalamic cell groups. *Biochem. Res. Commun.* **145**: 10-14.
- BURLET, A.; CHATEAU, M. y DUHEILL, H. (1974): Immunohistochemistry of vasopressin: study of the hypothalamo-neurohypophysial system of normal, dehydrated and hypophysectomised rats. En: *Neurosecretion-The final neuroendocrine pathway* (F. Knowles y L. Vollrath, eds.), pp. 24-30. Springer-Verlag, Nueva York.
- CAVERSON, M. M.; CIRIELLO, J.; CALARESU, F.R. y KRUKOFF, T.L. (1987): Distribution and morphology of vasopressin-, neurophysin II-, and oxytocin-immunoreactive cell bodies in the forebrain of the cat. *J. Comp. Neurol.* **259**: 211-236.
- CHOY, V.J. y WATKINS, W.B. (1977): Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II Distribution of neurophysin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat. *Cell Tissue Res.*, **180**: 467-490.
- FISHER, A.W.F.; PRICE, P.G.; BURFORD, G.D. y LEDERIS, K. (1979): A 3-dimensional reconstruction of the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. The neurons projecting to the neurointermediate lobe and those containing vasopressin and somatostatin. *Cell Tis. Res.*, **204**: 343-354.
- FORD, D.H. y KANTOUNIS, S. (1957): The localization of neurosecretory structures and pathways in the male albino rabbit. *J. Comp. Neurol.*, **108**: 91-108.
- HATTON, G.I. (1976): Nucleus circularis: is it an osmoreceptor in the brain? *Brain Res. Bull.*, **1**: 123-131.
- HEAP, P.F.; JONES, S.W.; MORRIS, J.F. y PICKERING, B.T. (1975): Movement of neurosecretory product through the anatomical compartments of the neural lobe of the pituitary gland. *Cell Tissue Res.*, **156**: 483-497.
- JU, G.S.; LIU, S. y TAO, J. (1986): Projections from the hypothalamus and its adjacent areas to the posterior pituitary in the rat. *Neuroscience* **19**: 803-828.
- KRUKOFF, T.L.; CIRIELLO, J. y CALARESU, F.R. (1983): Metabolic alterations in the hypothalamus of the Brattleboro rat demonstrated with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* **280**: 160-164.
- KRUKOFF, T.L. y CALARESU, F.R. (1984): Exogenous vasopressin reverses hyperactivity in the hypothalamus of Brattleboro rats. *Am. J. Physiol.* **247**: R 932-935.
- KRUKOFF, T.L.; TURTON, W.E. y CALARESU, F.R. (1986): Increased hexokinase activity in forebrain of water-deprived and diabetes insipidus rats. *Am. J. Physiol.* **251**: R 268-273.
- KRUKOFF, T.L. y VICENT, D.H. (1989): Regional alterations in hexokinase activity within rat brain during dehydration and rehydration. *Am. J. Physiol.* **256**: 1050-1055.
- MEEKER, R.B.; MICHELS, K.M.; LIBBER, M.T. y HAYWARD, J.N. (1986): Characteristic and distribution of high- and low-affinity alpha bungarotoxin binding sites in the hypothalamus. *J. Neurosci.* **6**: 1866-1875.
- MICHELS, K.M.; MEEKER, R.B. y HAYWARD, J.N. (1986): Differential distribution of muscarinic cholinergic and putative nicotinic cholinergic receptors within the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Neuroendocrinology* **44**: 498-507.
- MORRIS, J.F. (1976): Distribution of neurosecretory granules among the anatomical compartments of the neurosecretory-processes of the pituitary gland: a quantitative ultrastructural approach to hormone storage in the neural lobe. *J. Endocrinol.*, **68**: 225-234.
- PASTOR, F.E. (1983): Estudio ultraestructural del sistema hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis durante el desarrollo postnatal. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; ALVAREZ-MORUJO SUAREZ, A. y AMAT, P. (1986a): Etude immunocytochimique et ultrastructurale du "nucleus circularis" de l'hypothalamus chez le rat. *Bull. Ass. Anat.* **70**: 61.
- PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; ALVAREZ-MORUJO SUAREZ, A. y AMAT, P. (1986b): El "nucleus circularis" del hipotálamo de rata: estudio inmunocitoquímico y ultraestructural. Libro de resúmenes de XII Congreso de la Sociedad Anatómica Española, pág. 112. Sevilla.
- PETERSON, R.P. (1966): Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, **128**: 181-190.
- REAVES, T.A. y HAYWARD, J.N. (1978): Immunocytochemical study of vasopressinergic and oxytocinergic neurons in cat hypothalamic supraoptic accessory nuclei. *Fed. Proc.*, **37**: 518.
- REAVES, T.A. y HAYWARD, J.N. (1979): Immunocytochemical identification of vasopressinergic and oxytocinergic neurons in the hypothalamus of the cat. *Cell. Tiss. Res.*, **196**: 117-122.

- REYNOLDS, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**: 208-213.
- RHODES, C.H.; MORRELL, J.I. y PFAFF, D.W. (1981): Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J. Comp. Neurol.*, **198**: 45-64.
- SHERLOCK, D.A.; FIELD, P.M. y RAISMAN, G. (1975): Retrograde transport of horseradish peroxidase in the magnocellular neurosecretory system of the rat. *Brain Res.*, **88**: 403-414.
- TURTON, W.E.; CIRIELLO, J. y CALERESU, F.R. (1986): Changes in forebrain hexokinase activity after aortic baroreceptor denervation. *Am. J. Physiol.* **251**: 274-281.
- TWEEDLE, C.D. y HATTON, G.I. (1976): Ultrastructural comparisons of neurons of supraoptic and circularis nuclei in normal and dehydrated rats. *Brain Res. Bull.*, **1**: 103-121.
- TWEEDLE, C.D. y HATTON, G.I. (1977): Ultrastructural changes in the rat hypothalamic neurosecretory cells and their associated glia during minimal dehydration and rehydration. *Cell Tiss. Res.*, **181**: 59-72.
- VAN DEN POL, A.N. (1980): The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.* **191**: 661-702.

Correspondencia: F. E. Pastor
Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca. España

EFFECTOS EXPERIMENTALES DEL CAMPO MAGNETICO PULSANTE DE 52 GAUSS SOBRE EL DESARROLLO DE LA RATA ALBINA

EXPERIMENTAL EFFECTS OF PULSED MAGNETIC FIELD OF 52 GAUSS INTO EMBRYOLOGICAL DEVELOPMENT OF WISTAR RAT

M.A. PEREZ-FERRIOLS, M.J. BROSETA, L. APARICIO

Departamento de Anatomía. Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Universidad de Valencia

RESUMEN

Se han estudiado los efectos experimentales de un campo magnético pulsante sobre el desarrollo embrionario de la rata. Ratas hembra presuntamente embarazadas han sido expuestas a un campo magnético pulsante de 52 gauss y entre 50 c/seg, y 10 Kc/seg, de frecuencia. Los productos de la concepción han sido estudiados a los 5, 12, 16 y 20 días de desarrollo intrauterino y a los 5, 12, 16 y 20 días de vida postnatal. No se han observado malformaciones macroscópicas externas ni en el grupo experimental ni en el control. El número de especímenes por rata ha sido similar en ambos grupos. Se ha observado una tendencia al incremento en los valores de la talla y el peso en el grupo experimental postnatal.

PALABRAS CLAVE: Campo magnético pulsante, teratógeno, peso, talla.

SUMMARY

Experimental effects of pulsed magnetic fields on embryological development of rats, were studied. Presumed embarrassed rats were exposed to pulsant magnetic field of 52 gauss and between 50 c/sec. and 10 Kc/sec. of frequency. The 8, 10, 16 and 20 intrauterine development days and 5, 12, 16 and 20 postnatal days were studied. Macroscopic external malformations neither in experimental group nor in control group, we did not observe. The number of specimens by rat was similar in both groups. A tendency to increase height and weight values in experimental postnatal group, we have observed.

KEY WORDS: Pulsed magnetic fields, theratogenic, weight, height.

Introducción

La acción de los campos magnéticos sobre el desarrollo embrionario ha sido estudiada en una amplia variedad de animales, utilizando para ello diferentes combinaciones de los parámetros básicos que definen un campo magnético. Como consecuencia, se han obtenido resultados controvertidos, cuando no contradictorios.

Así Ramírez (1983) observa una reducción de la puesta de huevos en las moscas drosophilas, expuestas a un campo magnético pulsante de muy baja frecuencia. Formicki (1982) expone huevos de salmón Trutta y salmón Gairdneri a campos magnéticos débiles de distintas intensidades y observa prolongaciones del periodo embrionario

con un aumento del tamaño y peso de los embriones incubados. Sin embargo, Neurath (1968) observa cómo un campo permanente de alta frecuencia impide el desarrollo normal de la rana *Pipiens*.

Si tomamos las experiencias realizadas en una sola especie, el índice de coincidencias aumenta. Zecca (1984) sobre ratones, y Microbbie (1985), en ratas, no observan efectos adversos del campo magnético pulsante aplicado durante el periodo embrionario de estas dos especies. Sin embargo, Bussi (1985), que prolonga los periodos de aplicación de un campo magnético pulsante durante la gestación de la rata, ya observa un aumento de la pérdida de embriones.

Será conveniente, pues, a la hora de comparar resultados, hacerlo entre aquellos trabajos cuya metodología más se asemeje a la que nosotros hemos empleado, tanto referida al campo magnético como a la especie estudiada.

Material y Métodos

Se han estudiado un total de 60 ratas de ambos sexos de la cepa Wistar, de edades comprendidas entre los 5 y 20 días de vida postnatal, que, durante su desarrollo intrauterino y hasta el momento del sacrificio, han seguido varios destinos:

– Grupo E (experimental), compuesto como los dos restantes de 20 ratas recién nacidas que han sido sometidas a la acción del campo magnético pulsante de 52 Gauss de intensidad y entre 50 c/seg, y 10 Kc/seg, de frecuencia, durante 30 minutos, 5 días a la semana.

– Grupo S (simulado), que ha seguido las mismas vicisitudes que el anterior, con la salvedad de que el generador de campos magnéticos (un "Biotelsa 40") permanece desconectado de la red eléctrica.

– Grupo T (testigo), cuyos componentes permanecen en el animalario hasta el momento de recogida de las piezas.

Se han registrado el número de ratas nacidas, las características macroscópicas externas al nacimiento y al día del sacrificio, el peso y la talla (cráneo-cola) alcanzados. Posteriormente se han realizado estudios microscópicos, que serán el motivo de otros trabajos. Para el estudio estadístico hemos utilizado el test "t" de Student.

Resultados

El resultado del apareamiento de 24 ratas hembra con sus respectivos machos se recoge en la tabla I. El número total de individuos nacidos ha sido de 72. La distribución por grupos se recoge en la tabla II.

No se han observado malformaciones macroscópicas externas en ninguno de los individuos nacidos del grupo experimental con respecto al simulado y control.

En cuanto al peso de los individuos nacidos, se observa que, a partir de los 12 días, los grupos experimental y simulado alcanzan valores semejantes y muy superiores, con diferencias estadísticamente significativas, a los del testigo. A los 20 días, el grupo experimental alcanza valores netamente superiores a los del testigo y también a los del simulado (gráfica 1).

Con respecto a las tallas, ocurre algo semejante. Frente a la curva quebrada, con una meseta entre los días 12 y 16, que presenta el grupo testigo, tanto el grupo experimental como el simulado presentan, entre los días 5 y 12, una curva casi exponencial, que se va suavizando a partir del día 12 (gráfica 2).

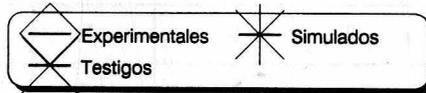
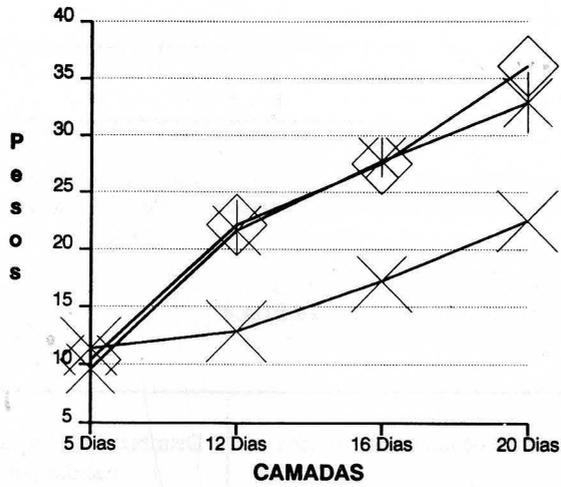
Discusión

Nuestros resultados coinciden, en cuanto a número y características macroscópicas de las camadas, con todos los autores consultados que han utilizado un campo magnético pulsante y el ratón o la rata como animal de

GRAFICA 1
GRUPO POSTNATAL

PESOS DE LAS CAMADAS

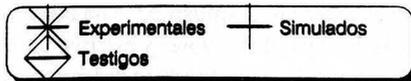
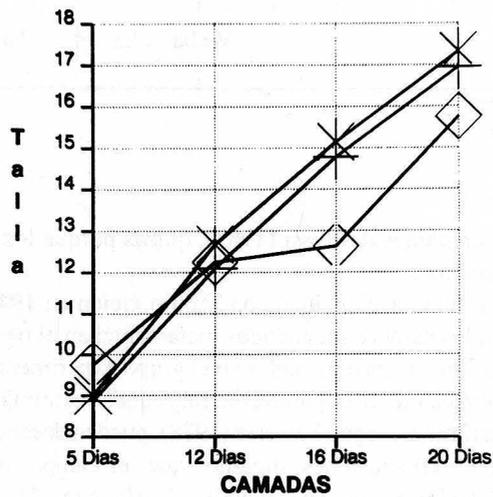
Medidas en gramos



GRAFICA 2
GRUPO POSTNATAL

TALLAS DE LAS CAMADAS

Medidas en Cms.



GRUPO POSTNATAL

TABLA 3

Nº ratas apareadas			Embarazo positivo		
E	T	S	E	T	S
8	8	8	3	3	4

TABLA 4

Nº total de individuos nacidos			Distribución del nº de individuos nacidos por rata		
E	T	S	E	T	S
22	22	28	6	7	8
			8	8	7
			8	7	7
					6
			-	-	-
			Media	7,3	7,3

experimentación. Únicamente discrepamos de Bussi (1985), quizás porque los periodos de aplicación del campo magnético son superiores a los nuestros.

En cuanto al peso, nuestros resultados coinciden con Tromp, quien en 1947 ya observó que, tras un periodo indiferente o incluso de regresión, los campos magnéticos incrementaban el peso y desarrollo de los ratones.

La aparición de curvas de crecimiento casi paralelas en el grupo experimental y simulado podría deberse, bien a la existencia de un magnetismo remanente en el aparato, bien al pequeño estímulo diario que supone la manipulación para el simulacro. Los pequeños estímulos, según Farreras (1978), pueden desencadenar pequeñas puntas secretoras de hormona del crecimiento. Como conclusiones, digamos que: el campo magnético pulsante aplicado no ha producido en el grupo experimental, alteraciones en la viabilidad de las camadas, tanto en lo que se refiere al número como a las características macroscópicas externas. Asimismo, se ha observado en los individuos nacidos del grupo experimental y simulado unos valores de peso y talla mayores y estadísticamente significativos con respecto al grupo testigo. A los 20 días de vida postnatal, el peso de los individuos del grupo experimental es mayor y estadísticamente significativo con respecto al del grupo simulado.

BIBLIOGRAFIA

- BUSSI, R.; FERRINI, S.; TOFANJ, S.; AGNESOD, G.; OSSOLA, P. (1985): Effeti sulla gravidanza osservati in ratti esposti a bassi livelli di campi electromagnetici a 27'12 Mhz., Riv. Tossicol. Sper. Clin., **15**: 55-62.
- FARRERAS ROZMAN (1978): Medicina Interna. Tomo 2. 1ª ed., Marín. Barcelona.
- FORMICKI, K.; WINNICKI, A. (1982): Preliminary studies on the effect of magnetic field on embryonic development of salmo trutta and salmo gairdneri. Przegł. Zool., **26**: 417-424.
- MICROBBIE, D. and FOSTER, M.A. (1985): Pulsed magnetic field exposure during pregnancy and implications for RNM fetal imaging: A study with mice. Magn. Reson. Imaging, **3**: 231-239.
- NEURATH, P.W. (1968): High gradient magnetic fields inhibit embryonic development of frogs. Nature **219**: 1358-1359.
- RAMIREZ, E.; MONTEAGUDO, J.L.; GARCIA-GARCIA, M. (1983): Oviposition and development of Drosophila modified by magnetic fields. Bioelectromagnetics **4**: 315-326.
- TROMP, S.W. (1949): Phychial Phisics. Elsevier, Bruselas: 266-285.
- ZECCA, L.; DAL CONTE, G.; BONINI, L.; BAREGGI, S.R. (1984): Estudios toxicológicos y teratológicos después de exponer a ratas a un campo magnético pulsante. Abstract. 1st International Meeting on biological effects and therapeutic application of elf electromagetic fields. p. 26: Fondazione Giorgio Gini. Venezia. Italy.

Correspondencia: M^a. José Broseta
Gran Vía Germanías, 18, 13^a
46006 Valencia. España

ESTUDIO MORFOMETRICO DEL TECTUM OPTICO EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES. APORTACION A SU ANALISIS EVOLUTIVO

MORPHOMETRIC STUDY OF THE OPTIC TECTUM IN SEVERAL ANIMAL SPECIES. A CONTRIBUTION TO THEIR EVOLUTIVE ANALYSIS

P. RECREO, P. CONTAMINA, M.J. BARRAL, M.C. PEREZ CASTEJON, F. GARCIA-ALVAREZ, A. VERA-GIL.

Departamento Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Hemos estudiado, mediante tratamiento de la imagen histológica por ordenador, la superficie areal del tecto óptico en el "lacerta lepida", "gallus gallus" y de los colículos en el "erinaceus europeus", considerándola parámetro comparativo.

Nuestros resultados apuntan a un mantenimiento de la entidad areal, pese al cambio proporcional con respecto al desarrollo encefálico.

PALABRAS CLAVE: Tecto óptico, colículos, filogenia, análisis morfométrico.

SUMMARY

Using computer aided handling of histological image, we have studied the areal surface of the optic tectum in the "lacerta lepida", "gallus gallus" and the colliculi in the "erinaceus europeus", considering it as a comparative value. Our results pointing to a maintenance of the areal entity despite the change in proportion, referred to the brain development.

KEY WORDS: Optic tectum, colliculi, philogeny, morphometric analysis.

Introducción

El tectum óptico en la mayor parte de los reptiles comprende capas alternadas de cuerpos celulares y fibras, que pueden ser agrupadas en zona periventricular, central y superficial. La zona periventricular contiene el 80% de los cuerpos celulares tectales y se compone de neuronas periventriculares piriformes cuya dendrita apical se extiende hacia la zona superficial donde sinaptan con aferencias de fibras ópticas. Es posible que estas dendritas reciban las aferencias visuales y telencefálicas en su mitad distal, y auditivas, táctiles y telencefálicas en su mitad proximal.

El tectum óptico en aves es una región laminada bien definida que forma la porción externa del lóbulo óptico. La región interna del lóbulo óptico que está debajo del tectum, incluye el pretectum, el complejo espiriforme, el núcleo del istmo y la formación reticular mesencefálica. Está formado por capas celulares y plexiformes que reciben distintas clasificaciones: numérica de 1-15 de Cajal desde la capa más externa o el sistema Cowan et al. (1961), que divide el tectum en cinco capas: I-V. Estas cinco capas desde la superficie a la profundidad son las siguientes: estratum

óptico, estrato gris y fibroso superficial, estrato gris central, estrato blanco central y estrato gris periventricular. Las neuronas son de tipo radial, horizontal y multipolar (en cuanto a la orientación de sus dendritas). Las horizontales se encuentran primariamente en las capas superficiales. Las radiales se encuentran algo más profundas que las horizontales. Las multipolares se localizan en las regiones más profundas del tectum y tienen dendritas que generalmente terminan de forma radial en las capas receptoras retinianas del tectum.

El gran tamaño y la complejidad del tectum óptico de las aves oculta un gran número de similitudes estructurales con el colículo superior del mamífero. Las dos estructuras tienen una apariencia laminada y tipos neuronales similares.

El colículo superior de los mamíferos que es considerado homólogo al tectum óptico en otros vertebrados, posee numerosos problemas cuando se pretende hacer una comparación detallada. En mamíferos, el techo del cerebro medio es dividido en una serie de capas numeradas de I-VII desde la superficie pial a la zona gris periacueductal. Tradicionalmente las capas I-VII forman el colículo superior, y la zona gris periacueductal es considerada una zona neuronal subtectal. Esta última probablemente resulte de la diferenciación *in situ* de células y comprende de este modo los neuroblastos que no han migrado más superficialmente.

Las capas IV-VII del colículo contienen la mayor parte de las células que dan origen a las fibras descendentes tecto-bulbares (Harting et al., 1973; Kawamura and Hashikawa, 1978; Holcombe and Hall, 1981; Weber et al, 1979). Ninguna de las capas grises periacueductales, ni las capas IV-VII contienen células piriformes con dendritas apicales (Cajal, 1911; Tokunaga and Otani, 1976).

La casi idéntica topografía y terminación de las fibras tectobulbares en reptiles y mamíferos sugiere que posiblemente las células piriformes en mamíferos primitivos migraran dorsalmente en el techo del cerebro medio modificando su patrón dendrítico, pero reteniendo sus conexiones con la formación reticular troncoencefálica. De este modo, muchas de las células que forman las láminas tectales 3 y 5 en reptiles pudieran ser consideradas homólogas a células coliculares de las capas IV a la VII en mamíferos.

La zona central tectal en reptiles contiene células bipolares fusiformes y neuronas ganglionares. Ambas poblaciones probablemente reciben aferencias directas de retina. Las células fusiformes probablemente reciban muchos tipos adicionales de inputs no visuales. Las neuronas bipolares fusiformes se observan en capas medias del tectum en la mayoría de los vertebrados (Leghissa, 1962) incluyendo mamíferos (Cajal, 1911; Tokunaga and Otani, 1976).

En reptiles, los axones de muchas de las células bipolares fusiformes entran en la lámina 6 o láminas más superficiales (9-14) y de este modo pueden contribuir a formar fibras ascendentes y descendentes. En pájaros, las células fusiformes bipolares (O'Flaherty, 1970) se localizan en la mitad de la lámina tectal (9-14), y células de esta lámina contribuyen a formar las aferencias ascendentes y descendentes (Reiner and Karten, 1982). En mamíferos, las células de las capas II y III dan origen a las aferencias tectales ascendentes así como a las proyecciones descendentes al núcleo parabisgeminal (Kawamura, 1980), homólogo mamífero el núcleo del istmo del reptil.

Las células bipolares fusiformes de la zona central tectal en reptiles son homólogas a las células fusiformes de las láminas 9-13 en pájaros y a células de las capas II-IV en mamíferos. Algunas células fusiformes, particularmente las de las capas II y III, se desarrollan independientemente o son homólogas a las células fusiformes de la zona superficial tectal de reptiles vivientes.

En la mayor parte de los tetrápodos, el tectum contiene células ganglionares en capas intermedias (Cajal, 1911; O'Flaherty, 1970; Quiroga, 1978); los axones de estas células parecen formar parte de las aferencias tectales descendentes, y las células probablemente homólogas entre todos los tetrápodos dan similitudes en su posición y morfología.

La zona superficial tectal en la mayor parte de los reptiles comprende láminas alternativas de fibras ópticas aferentes y sus campos terminales. Las láminas terminales contienen arborizaciones dendríticas de células fusiformes, ganglionares y periventriculares de láminas tectales profundas tanto como cuerpos celulares y dendritas de neuronas localizadas dentro de las láminas tectales superficiales. Clases de células extremadamente heterogéneas (de piramidales a horizontales) constituyen las láminas tectales superficiales. En reptiles y la mayor parte de otros vertebrados no mamíferos (excepto peces elasmobranquios), las fibras ópticas entran en el tectum como una serie de láminas, y sus axones cursan ventralmente para formar su arborización terminal. Sin embargo, en peces elasmobranquios y mamíferos, las fibras ópticas entran en el tectum más profundamente y rodean dorsalmente para formar sus arborizaciones terminales.

Las proyecciones córtico-tectales son extensas tanto en pájaros como en mamíferos. En mamíferos, las fibras corticófulgas terminando en las tres capas superficiales coliculares son derivadas del córtex frontal y córtex estriado y extraestriado. En pájaros, las fibras telencéfalo-tectales derivan del hiperestriado accesorio (de Wulst) y arquiestriado intermedio.

Es prácticamente imposible establecer homologías individuales entre las fibras ópticas y las radiaciones del tectum de diferentes vertebrados. Sin embargo, aunque se conocen muchas células, laminaciones, aferencias y eferencias, hacen falta más datos para comprender la función tectal y la evolución del tectum óptico en los vertebrados.

Los estudios realizados en distintas especies animales nos muestran las semejanzas y diferencias cualitativas en cuanto a la distribución laminar y tipos celulares. Existen trabajos de estudios cuantitativos realizados en otras especies (Platel, R. et al., 1977; Bogerts, K.B., 1977; Albers, F.J., 1988); sin embargo, al no estar descritas diferencias cuantitativas de la estructura en las especies referidas, nuestro trabajo nos ha llevado a plantear la introducción de un parámetro comparativo que nos permita medir la variación cuantitativa de estructura debida tanto al número de somas neuronales como al neuropilo. Cualquiera de los dos elementos es significativo de función total y parcial del órgano en relación con la visión y audición.

Material y Métodos

Hemos utilizado secciones seriadas de cerebro de lagarto (*Lacerta lépida*), gallina (*Gallus gallus*) y erizo (*Erinaceus europeus*) que siguieron el procesamiento histológico de rutina, tiñéndose con métodos de Klüver-Barrera y tricrómico de Martins y fueron analizados mediante equipo de morfometría diseñado en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Zaragoza, compuesto de señal de vídeo-cámara aplicada directamente a microscopio y analizada mediante equipo de Video Image Interfase HBI-G900 P acoplado a un ordenador SONY MSX HBG-900 P que trabaja con Software específico producido por el Departamento.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos correspondientes al área plana total del tectum óptico de lagarto fueron $\Sigma S = 123 \text{ mm}^2$, siendo significativamente similar en simetría axial. El área del tectum derecho fue de $61,2 \text{ mm}^2$, y la del tectum izquierdo, de $61,7 \text{ mm}^2$ (Fig. 1).

El pollo presentaba un área plana total de $\Sigma S = 570 \text{ mm}^2$, siendo de 282 mm^2 para el tectum derecho y de 288 mm^2 para el tectum izquierdo. Los volúmenes fueron de 73 mm^3 para el tectum derecho y de 72 mm^3 para el tectum izquierdo (Figs. 2 y 3).

El erizo presentaba un área plana total $\Sigma S_{cs} = 105 \text{ mm}^2$ para el colículo superior (Fig. 4) y $\Sigma S_{ci} = 100 \text{ mm}^2$ para el colículo inferior (Fig. 5). Como dato orientativo, esta área plana total se corresponde con unos volúmenes $V_{cs} = 117 \text{ mm}^3$ y $V_{ci} = 110 \text{ mm}^3$ para los colículos superior e inferior respectivamente.

La duplicación sensiblemente igual en erizo de estructuras según simetría sagital y horizontal supone que la suma total de estructuras sería de 205 mm^2 y 227 mm^2 . La masa comparativa en superficie es de 205 mm^2 para el erizo a comparar con 570 mm^2 del pollo y 123 mm^2 del lagarto.

Aunque proporcionalmente con respecto al tamaño del cerebro puede observarse una disminución de los colículos en erizo, esta es sólo relativa. Esto se puede comprobar al haber utilizado especies de tamaños parecidos, cuyo tamaño encefálico es comparable, y donde se sigue viendo el mayor tamaño en mamíferos, seguido de aves y reptiles, pues las medidas absolutas indican que su importancia se mantiene. Existe un gradiente de crecimiento, lo que debería ser analizado en otros trabajos de estructuras que se consideran cambiantes.

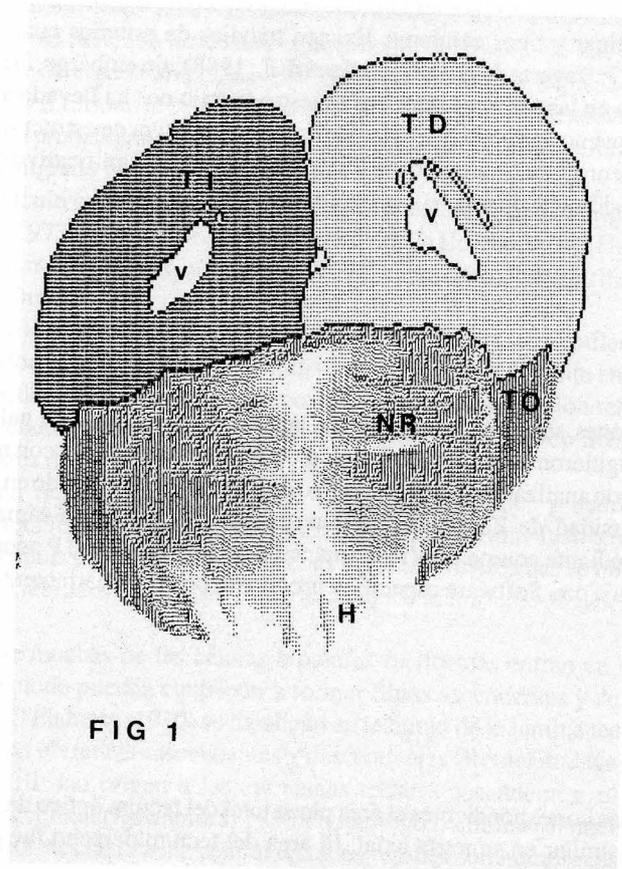
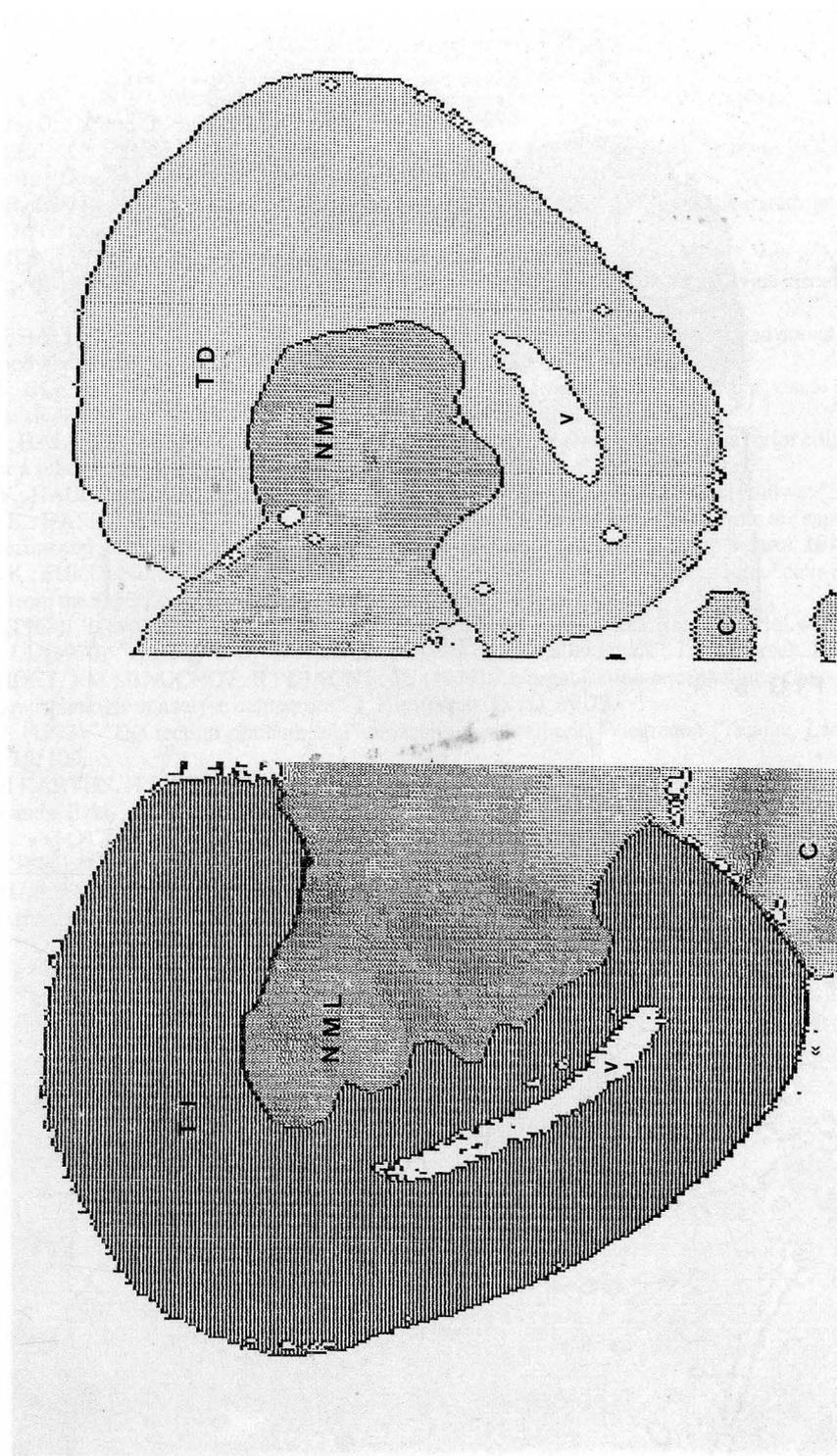


FIGURA 1. Sección transversal a través del tectum óptico de *Lacerta lepida*. 6x. TI, tectum izquierdo. TD, tectum derecho. TO, tracto óptico. V, ventrículo. NR, núcleo redondo. H, hipotálamo.



- FIGURA 2.** Sección transversal a través del tectum óptico izquierdo de Gallus gallus, 6x. TI, tectum izquierdo. NML, núcleo mesencefálico lateral. C, cerebelo. V, ventrículo.
- FIGURA 3.** Sección transversal a través del tectum óptico derecho de Gallus gallus. 6xTD, tectum derecho. NML, núcleo mesencefálico lateral. C, cerebelo. V, ventrículo.

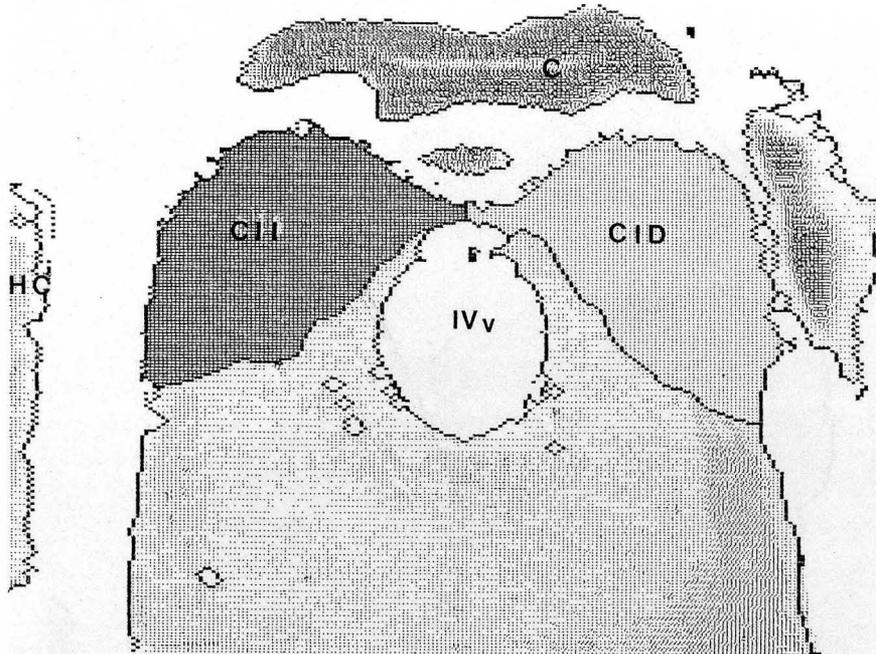


FIG 5

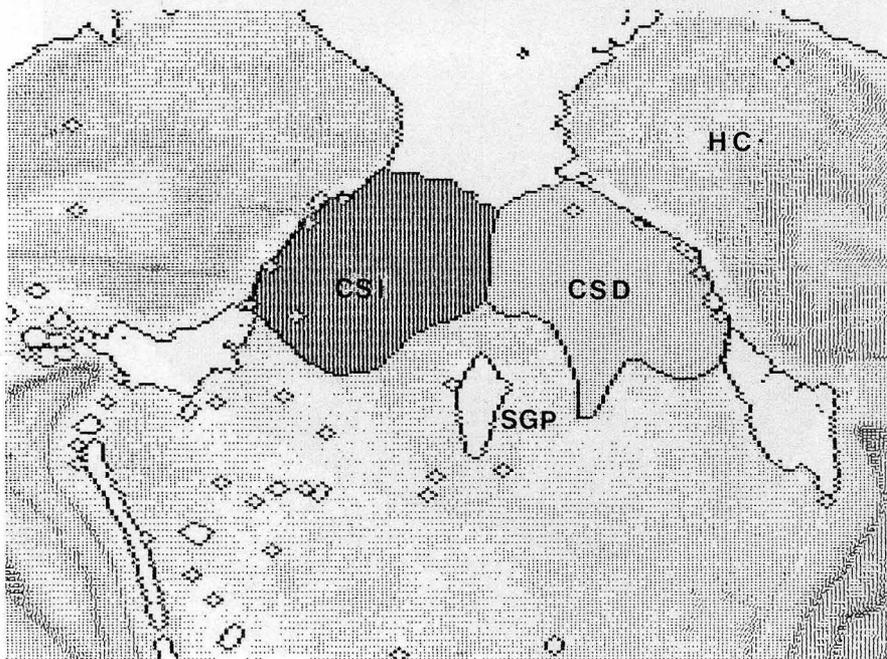


FIGURA 4. Sección transversal a través de colículos superiores de *Erinaceus europaeus*. 6x. CSI, colículo superior izquierdo. CSD, colículo superior derecho. SGP, sustancia gris periacueductal. HC, hemisferio cerebral.

FIGURA 5. Sección transversal a través de colículos inferiores de *Erinaceus europaeus*. 6x. CII, colículo inferior izquierdo. CID, colículo inferior derecho. IV v, cuarto ventrículo. HC, hemisferio cerebral. C, cerebelo.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERS, F.J.; MEEK, J.; NIEUWENHUYIS, R. (1988): "Morphometric Parameters of the Superior Colliculus of Albino and Pigmented Rats". *J. Comp. Neurol.* **274** (3): 357-370.
- ARIENS KAPPERS, C.U.; HUBER, G.C. and CROSBY, E.C. (1936): "The comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, including Man". Reprinted 1960, Hafner, New York.
- BOGERTS, K. B. (1977): "Quantitativ-morphometrische Untersuchungen am Corpus geniculatum laterale und Colliculus superior der Ratte nach vollstaendigem Lichtentzug". *J. Hirnforsch.* **18** (4): 303-19.
- CAJAL, S. RAMON y (1911): "Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés", Vol. 2, Maloine, Paris.
- COWAN, W. M.; ABAMSON, L. and POWELL, T.P.S. (1961): "An experimental study of the avian visual system". *J. Anat.* **95**: 545.
- HARTING, J.K.; HALL, W.C.; DIAMOND, I.T. (1973a): "Cortical projections of the pulvinar and dorsal nucleus of the lateral geniculate body in the tree shrew, *Tupaia glis*". *J. comp. neurol.* **150**: 362.
- HARTING, J.K.; GLENDENNING, K.K.; DIAMOND, I.T. (1973b): "Evolution of the primate visual system: Anterograde degeneration studies of the tectopulvinar system. *Am. J. Phys. Anthropol.* **38**: 383.
- HARTING, J.K.; HALL, W.C.; DIAMOND, I.T. (1973 c): "Anterograde degeneration of the superior colliculus in *Tupaia glis*: evidence for a subdivision between superficial and deep layers. *J. comp. neurol.* **148**: 361.
- HOLCOMBE, V.; HALL, W.C. (1981): "Course and laminar origin of the tectoparabigeminal pathway". *Brain Res.* **211**: 405.
- KAWAMURA, K.; HASHIKAWA, T. (1978): "Cell bodies of origin of reticular projections from the superior colliculus in the cat: An experimental study whith the use of horseradish peroxidase as a tracer". *J. comp. neurol.* **181**: 1.
- KAWAMURA, K.; FUKUSHIMA, N.; HATTORI, S.; KUDO, M. (1980): "Laminar segregation of cells or origin of ascending projections from the superficial layers of the superior colliculus". *Brain. Res.* **184**: 486.
- LEGHISSA, S. (1962): "L'evoluzione del tetto ottico nei bassi vertebrati". *Arch. Ital. Anat. Embriol.* **67**: 344.
- O'FLAHERTY, J.J. (1970): "A Golgi analysis of the optic tectum of the mallard duck". *J. Hirnforsch.* **12**: 389.
- PLATEL, R.; RIDET, J.M.; BAUCHOT, R.; DIAGNE, M. (1977): "L'organisation encephalique chez *Amia*, *Lepisosteus* et *Polypterus*: morphologie et analyse comparées". *J. Hirnforsch.* **18** (1): 69-73.
- QUIROGA, J.C. (1978): "The tectum opticum of *Pantodactylus schreiberii*, Wiegmann (Teiidae, Lacertilia, Reptilia)". *J. Hirnforsch.* **19**: 109.
- REINER, A. and KARTEN, H.J. (1982): "Laminar distribution of the cells of origin of descending tectofugal pathways in the pigeon (*Columba livia*)". *J. Comp. Neurol.* **204**:165
- TOKUNAGA, A. and OTANI, K. (1976): "Dendritic patterns of neurons in the rat superior colliculus". *Exp. Neurol.* **52**:189.
- VANEGAS, H. (1984): "Comparative Neurology of the Optic Tectum". Plenum Press, New York.
- WEBER, J.T.; MARTIN, G.F.; BEHAN, M.; HUERTA, M.F.; HARTING, J.K. (1979): "The precise origin of the tectospinal pathways in tree common laboratory animals: A study using the horseradish peroxidase method". *Neurosci. Lett.* **11**:121.

Correspondencia: Dr. A. Vera
Dpto. Ciencias Morfológicas
Universidad de Zaragoza
50009 Zaragoza. España

EVOLUCION POSTNATAL PRECOZ DE LA HIPOFISIS DE LA RATA. ESTUDIO DEL ARBOL VASCULAR

EARLY POST-NATAL DEVELOPMENT OF THE HYPOPHYSIS OF THE RAT. STUDY OF THE VASCULAR SYSTEM

M. RUBIO¹, E. CARBAJO², S. CARBAJO², J.C. CARVAJAL¹, R. VAZQUEZ²

Unidad Docente Anatomía Humana I.

¹C.U. de Medicina de Avila. ²Facultad de Medicina de Salamanca.

Departamento de Anatomía e Histología

Universidad de Salamanca

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es analizar la distribución del sistema vascular en los primeros días de la vida postnatal de la rata, para lo cual se han utilizado crías de rata con edades de cuatro a nueve días. Como método para la visualización de este sistema hemos revelado la actividad peroxidásica de los elementos formes de la sangre. En ambas edades, y en los dos sexos, existe una correspondencia entre la evolución del árbol vascular y la distribución intrahipofisaria de las células gonodotropas.

PALABRAS CLAVE: Hipófisis, vascularización, células gonodotropas, desarrollo, rata.

SUMMARY

The aim of the present work was to analyse the distribution of vascular system on the first days after birth in the rat. To do so young rats of 4 and 9 days of age were used. To visualize the vascular system, the peroxidase activity of the blood cells of the animals was determined. At both ages and in both sexes a correspondence was found to exist between the development of the vascular system and the intrahypophyseal distribution of the gonadotrophic cells.

KEY WORDS: Hypophysis, vascularization, gonadotrophic cells, development, rat.

Introducción

El sistema vascular portal hipofisario, descrito por Popa y Fielding (1930), presenta un flujo sanguíneo dirigido desde la Eminencia Media de la Hipófisis (Wislocki y King, 1936), por lo cual su importancia es fundamental en el control de la función endocrina de la Pars Distalis de la Adenohipófisis (PD) (Harris, 1937). Este flujo puede presentar diferencias regionales (Green y Harris, 1947), habiéndose estudiado la posible topografía de las áreas hipofisarias sometidas al influjo de los vasos por Adams y col. (1964).



Los estudios de Purves y Griesbach (1951) y Carbajo (1987) relacionan la distribución intrahipofisaria de las células gonodotropas, en ratas adultas, con la distribución del sistema vascular. Por otra parte, las diferencias regionales en la concentración de iones K^+ en la PD, tras la estimulación del tallo hipofisario, es un hecho que también sugiere la intervención de la distribución de los vasos en el control de la actividad funcional de la PD (Baertschi, 1980).

Son evidentes las diferencias en la distribución de las células gonadotropas entre los animales adultos y en el periodo postnatal (Rubio y col., 1987 y Alberca, 1988). Es posible que sea la distribución del sistema vascular uno de los condicionantes de estas diferencias, por lo que podemos suponer que su evolución debería seguir un curso paralelo al que hemos descrito para las células. En este trabajo se pretende analizar el desarrollo del árbol vascular en periodo postnatal temprano (4 y 9 días), tiempos similares a los empleados en la realización de un trabajo previo acerca de la distribución de las células LH.

Material y métodos

En la realización del estudio experimental se han empleado dieciséis ratas blancas, cepa Sprague-Dawley, ocho de cuatro días de edad (4 machos y 4 hembras), pertenecientes a la misma camada, y otras ocho ratas, con una edad de nueve días, con las mismas características, pero de una camada diferente. Las crías permanecieron estabuladas junto a sus madres, en las condiciones standard del animalario, fotoperiodo de luz diurna y oscuridad nocturna (07 a 18 horas) y libre acceso de las madres a agua y comida, hasta el momento del sacrificio.

Para el estudio del árbol vascular, tras el sacrificio, en atmósfera de éter, los animales fueron decapitados. Se reseco la calota craneana y se extrajo la hipófisis junto con los elementos óseos adyacentes, fijándose el conjunto por inmersión (paraformaldehído 1%-glutaraldehído 0,6% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4), durante 16 horas a 4° C. Al término de este periodo de fijación, las hipófisis se disecaron bajo microscopio quirúrgico, y se incluyeron en bloques de gelatina, que fueron cortados mediante un vibratomo (Oxford) en secciones sagitales de 80 μ m de espesor.

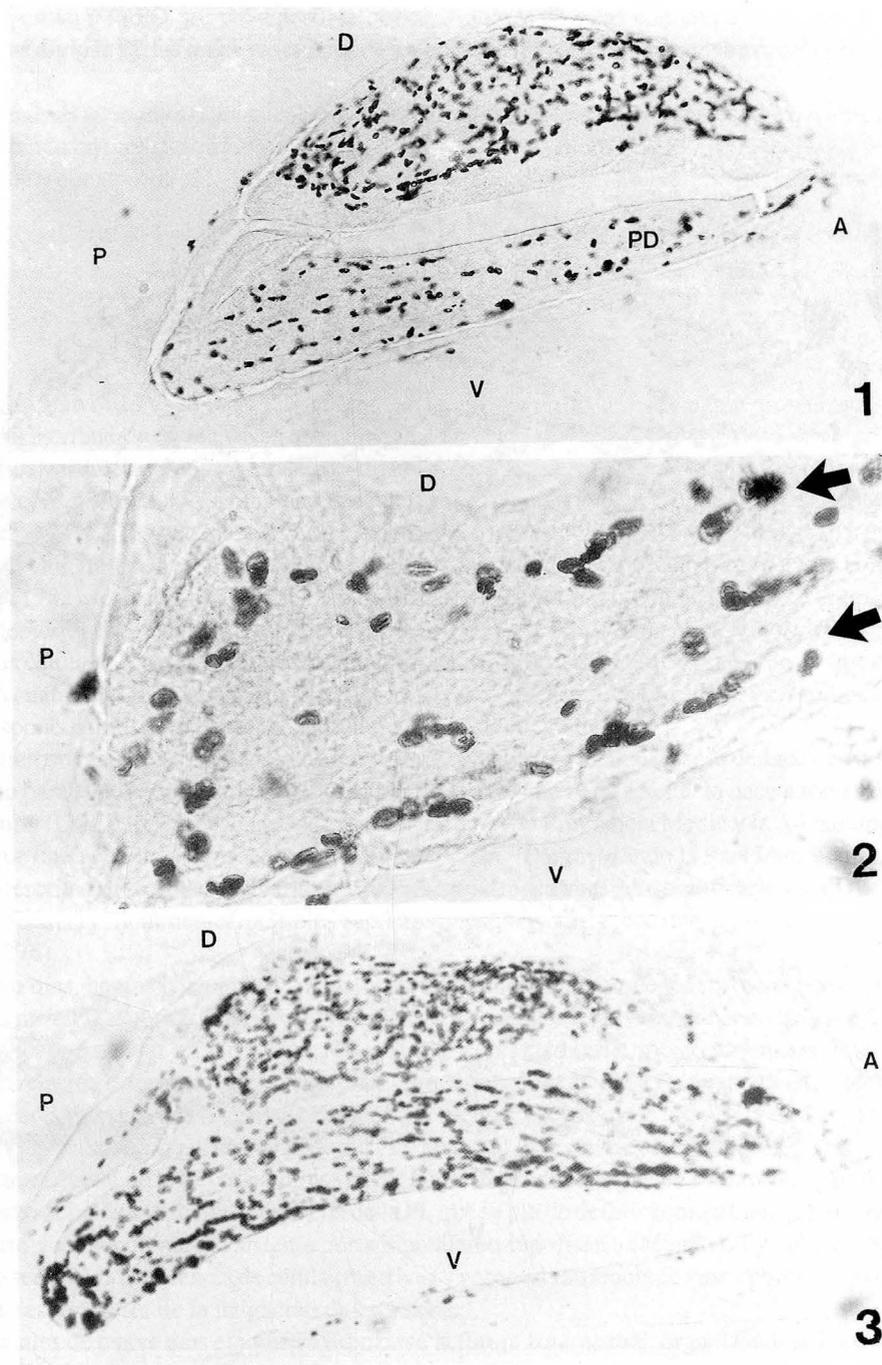
El trazado del árbol vascular se llevó a cabo aprovechando la gran actividad peroxidásica de los hematíes (Mesulam, 1982), al ser ésta revelada mediante la utilización del medio de Grahan y Karnovsky. Para ello, los cortes obtenidos se recogieron de forma seriada en pocillos que contenían tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, tras lo cual se sometieron a un periodo de preincubación (20 minutos) en una solución de 25 mg de 3,3' -diaminobencidina en tampón Tris 0,1 M, pH 7,4 en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron (20 minutos) en una solución similar a la anterior, a la que se añadió H_2O_2 (1 μ l/ml de medio), tras lo cual se deshidrataron y montaron en portaobjetos siguiendo los procedimientos habituales.

Para el estudio y obtención de fotografía se empleó un microscopio Leitz Dialux 20 EB.

Resultados

El revelado de la actividad peroxidásica endógena de los elementos formes de la sangre, ha permitido visualizar, en animales de cuatro días tanto machos como hembras, el trayecto de finos capilares surcando la PD sagitalmente (Fig. 1). Se observa una hilera vascular, en la que ocasionalmente aparecen grandes pelotones de elementos formes, que contornea a la glándula por su superficie ventral (Fig. 2). Dorsalmente, los trayectos vasculares se alejan bastante del propio límite de la PD (Figs. 1 y 2). No se han encontrado trayectos vasculares atravesando la PI.

En los animales de nueve días el desarrollo del árbol vascular es considerablemente mayor que en los de cuatro días, ya que es mayor el número de elementos teñidos y, además, por la presencia de vasos que, aunque son finos, tienen un calibre mayor que a los cuatro días (Fig. 3). Existe una línea vascular que recorre el borde dorsal de la PD que, en algunos puntos, parece estar comunicando con la red vascular del LN (Fig. 4), y parece alimentarse a partir



- FIGURA 1.** Imagen correspondiente a un macho de cuatro días. El árbol vascular de la PD se organiza formando finos trayectos que se disponen sagitalmente. (PD = Pars distalis; A = anterior; V = ventral; P = posterior; D = dorsal). x 291.
- FIGURA 2.** Micrografía correspondiente a la zona posterior de la PD de una hembra de cuatro días; se observa la constitución en esta zona de dos líneas vasculares (flechas) que recorren sagitalmente a la glándula, situándose una en el límite ventral y la otra en las proximidades del dorsal. (V = ventral; P = posterior; D = dorsal). x 943.
- FIGURA 3.** En los machos de nueve días los trayectos vasculares se orientan de la misma forma que a los cuatro días observándose un mayor número de perfiles y un posible aumento de su calibre. (A = anterior; V = ventral; P = posterior; D = dorsal). x 291.

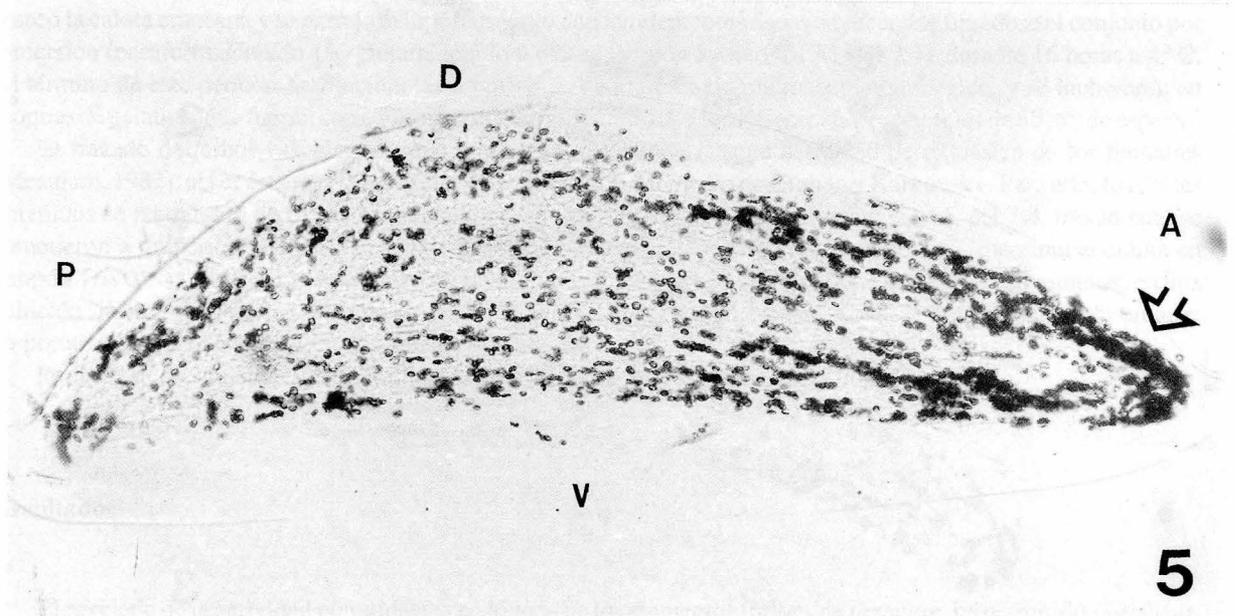
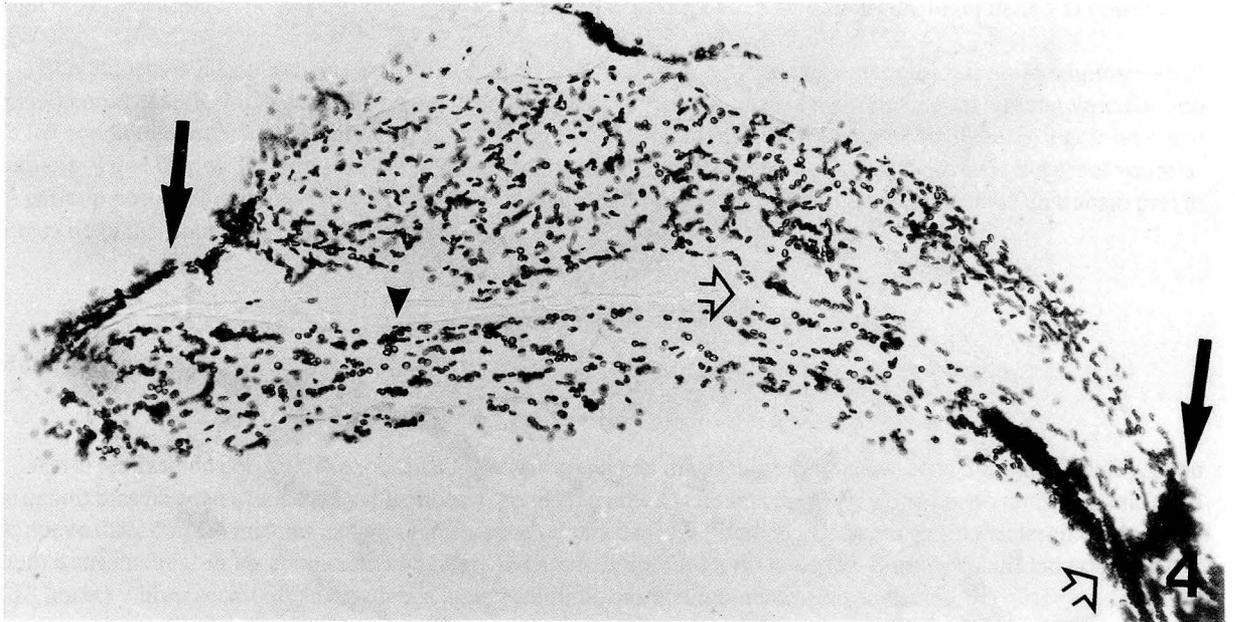


FIGURA 4. A los nueve días, como muestra esta imagen correspondiente a una hembra, se hace patente una línea vascular que recorre el límite dorsal de la PD (cabeza de flecha), relacionada con la red vascular del LN a través de la Pars Intermedia (flecha hueca) y en los polos anterior y posterior de la glándula (flechas curvas). x 236.

FIGURA 5. En esta sección de la PD de una hembra de nueve días, más laterilizada respecto de las presentadas previamente, se aprecia cómo los trayectos vasculares, partiendo de una condensación anterior recorren los límites ventral y dorsal de la PD (flecha hueca). (A = anterior; V = ventral; P = posterior; D = dorsal). X 263.

de vasos que abordan a la PD por su superficie dorsal. Además de estas comunicaciones entre LN y PD que se establecen atravesando la PI, las redes vasculares de ambos lóbulos son comunicantes a nivel del polo posterior (Fig. 4).

En porciones más laterales parece que los vasos se distribuyen partiendo de una condensación en el polo anterior de la PD, y siguiendo un trayecto en forma de V, con concavidad posterior (Fig. 5), de manera que parece contornear los bordes ventral y dorsal de la glándula. En la zona central, los trayectos no presentan una orientación homogénea.

Discusión

A diferencia de lo observado en la rata adulta, en la que puede describirse una regionalización de la hipófisis en función de la distribución de los vasos que la irrigan, en la PD de ratas neonatas, tanto de cuatro como de nueve días, los trayectos vasculares se disponen sagitalmente. Esta distribución puede estar condicionando la disposición que, a modo de cordones sagitales, adoptan las células reactivas al suero anti-LH (Alberca, 1988).

Durante la vida fetal, las células reactivas al suero anti-LH se encuentran concentradas en la región ventral de la PD. La explicación de este hecho no es clara, pues las opiniones de los diferentes autores son contradictorias; así, para Watanabe (1982), el desarrollo prenatal de las células gonodotropas comienza en la zona dorsal de la hipófisis, seguramente debido a la influencia del diencéfalo ventral. Para otros (Schechter y col., 1985), el inductor del desarrollo de las células LH sería el propio mesénquima ventral. Sea cual sea el mecanismo, lo que sí es cierto es que en las ratas con cuatro días de edad (Carbajo y col., observaciones aún no publicadas), y en ambos sexos, las células reactivas se disponen preferentemente en la región ventral de la glándula.

De los numerosos estudios realizados sobre el aporte sanguíneo a la hipófisis, se deduce que no existe un aporte vascular directo para la porción glandular hipofisaria. La sangre que llega a la PD lo hace a través de la red vascular del Lóbulo Neural (LN), a través de los vasos porta largos (entre la Eminencia Media y la Adenohipófisis), los vasos porta cortos (que unen el tallo y el proceso infundibular con la PD atravesando la Pars Intermedia), un tercer grupo de vasos porta descrito por Koritke y Dubernoy (1960) (dispuestos entre el tallo hipofisario y la PD pero contorneando la caverna hipofisaria) y, finalmente, múltiples capilares que unen toda la red neurohipofisaria con el lóbulo anterior (Page y col., 1976).

A los cuatro días, hemos encontrado, al analizar el sistema vascular, que los trayectos vasculares se organizan fundamentalmente en la zona ventral, y contornean a la PD, estando relativamente poco irrigada la zona adyacente a la caverna hipofisaria. Esto refuerza nuestra hipótesis, al plantear este trabajo, de maduración de la población gonodotropa en relación directa con la evolución del sistema vascular. El que a los cuatro días no hayamos encontrado trayectos vasculares atravesando la PI, que se muestra avascular, coincide con las observaciones de Murakami y col. (1985), quienes aprecian solamente un total desarrollo de la red vascular de este lóbulo tras la pubertad. La carencia de vasos en la zona dorsal de la PD se podría explicar por la dependencia que, en cuanto a irrigación se refiere, tiene esta zona respecto del plexo vascular superficial de la PI, que se puede definir como un auténtico sistema portal intraadenohipofisario, independiente del sistema porta hipotálamo-hipofisario (Murakami y col., 1985). Por otra parte, también podría ser debida la ausencia de células reactivas y vasos a la ausencia de vasos porta cortos que, según Baker (1974), son los responsables de la irrigación de esta zona.

En los animales de nueve días empieza a esbozarse la futura zona sexual, organizándose las células reactivas al suero anti-LH como una banda celular dorsal, más precoz en las hembras que en los machos (Carbajo y col., trabajo experimental aún no publicado). Simultáneamente, se puede apreciar una evolución del árbol vascular, cuyos trayectos se pueden observar ya en la zona dorsal de la PD. Ocasionalmente se ven en el plano de corte algunos trayectos vasculares adyacentes al borde ventral PI, que podrían corresponder a secciones de vasos porta cortos, o a los vasos que, procedentes del tallo hipofisario, contornean a la PI antes de incorporarse a la red dorsal de la PD, descritos por Koritke y Duvernoy (1960). También empiezan a esbozarse las arcadas vasculares de la PI. Estos datos coinciden con los aportados por Glydon (1957), quien refiere que el desarrollo del sistema portal comienza una semana después del nacimiento. Podemos afirmar que, a los nueve días de edad, los hallazgos en el estudio del sistema vascular se corresponden con la distribución y atributos morfométricos de las células reactivas al suero anti-LH.

Aún queda por explicar el retraso en la evolución de las células gonadotropas que sufren los machos respecto de las hembras (Alberca, 1988), pues tampoco a los nueve días hemos encontrado diferencias en la morfología del árbol vascular entre ambos sexos. Si bien la dinámica de la distribución celular no tiene una relación directa con la disposición del árbol vascular, es claro que sí depende de la información que, procedente de centros hipotalámicos, llega a través de los vasos.

En este sentido, está bien documentado que en la rata macho los niveles altos de testosterona en el periodo postnatal, representan un importante factor inhibitor de la actividad gonadotropa (Döhler y col., 1977). Dado que en los primeros días aún no está constituido el sistema portal, es posible que el influjo hipotalámico, tanto estimulante como inhibitor, acceda a la PD a través de un sistema accesorio por el que se pueda establecer una comunicación entre la Eminencia Media y la PD.

Krisch y Buchheim (1984), mediante un estudio con trazadores (HRP), comprobaron que, además del sistema de vasos porta cortos, hay otra posible vía de comunicación entre la Eminencia Media y la Hipófisis. Se trata del espacio submeníngeo, a través del cual el trazador difunde hasta las porciones ventral y medial de la PD. La existencia de este sistema, junto con las variaciones endocrinas a nivel hipotalámico, explicarían la evolución de la población gonadotropa en ambos sexos durante los primeros días de vida postnatal.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, J.H.; DANIEL, P.M. y RICHARD, M.M.L. (1964): Distribución of the hypophysial portal blood in the anterior lobe of the pituitary gland. *Endocrinology* **75**: 120-126.
- ALBERCA, V. (1988): Estudio de las células gonadotropas hipofisarias en el periodo postnatal de la rata. Diferencias en cuanto al sexo. Tesina de Licenciatura. Facultad de Medicina. Salamanca.
- BAERTSCHI, A.J. (1980): Portal vascular route from hypophysial stalk/neural lobe to adenohypophysis. *Am. J. Physiol* **239**: 463-469.
- BAKER, B.L. (1974): Functional cytology of the hypophysial pars distalis and pars intermedia. En: *Handbook of physiology* (Greep, R.O. Astwood, E.B. eds.). Section 7, vol. IV, American Physiological Society, Washington DC, pp. 45-80.
- CARBAJO, E. (1987): Estudio morfofuncional de las células gonadotropas hipofisarias tras la administración de la hormona LH-RH y un análogo de la misma. Tesis Doctoral de Medicina, Universidad de Salamanca.
- DÖHLER, K.D.; VON ZUR MÜHLEN, A. y DÖHLER, U. (1977): Pituitary luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and prolactin from birth to puberty in female and male rats. *Acta Endocrinol.* **85**: 718-728.
- GLYDON, R.J. (1957): The development of the blood supply of the pituitary in the albino rat, with special reference to portal vessels. *J. Anat.* **91**: 237-244.
- GREEN, J.D. y HARRIS, J.W. (1947): The neurovascular link between
- HARRIS, G.W. (1937): The induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophysial mechanism. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **122**: 374-394.
- KORITKE, J.,G. y DUVERNOY, H. (1960): Les connexions vasculaires du système porte hypophysaire. *Anat. Anz.* **107**: 786-806.
- KRISCH, B. y BUCHHEIM, W. (1984): Access and distribution of exogenous substances in the intercellular clefts of the rat adenohypophysis. *Cell Tiss. Res.* **236**: 439-452.
- MESULAN, M.M. (1982): Tracing neural connections with horseradish peroxidase. John Wiley and Sons, eds. Chichserter, pp. 102-104.
- MURAKAMI, T.; OHTSUKA, A.; TAGUCHI, T.; KIKUTA, A. y OHTANI, O. (1985): Blood vascular bed of the rat pituitary intermediate lobe, with special reference to its development and portal drainage into the anterior lobe. A scanning electron microscope study of vascular last. *Arch. Hist. Jap.* **48**: 69-87.
- PAGE, R.B.; MUNGER, B.L. y BERGLAND, R.M. (1976): In the rabbit, mouse, rat and dog a vascular cleft separates the reticular neurohypophysial capillary bed within the infundibular stem and process from the adjacent, linear, adenohypophysial capillary bed. Short portal vessels bridge this cleft. *Am. J. Anat.* **146**: 273-302.
- POPA, G.T. y FIELDING, U. (1930): A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region, *J. Anat.* **65**: 88-91.
- PURVES, H.D. y GRIEESBACH, W.E. (1951): The site of thyrotrophin and gonadotrophin production in the rat pituitary studied by McMANUS-HOTCHIKSS staining for glycoprotein, *Endocrinology* **49**: 244-264.
- RUBIO, M.; CARVAJAL, J.C.; CARBAJO, S.; RODRÍGUEZ, J y CARBAJO, E. (1987): Morphometric identification of the sexual zone in the hypophysis of male rats. *Trabajos del Instituto Cajal LXXXVI.* **57**.
- SCHECHTER, J.; GASH, D. y AHMAD, N. (1985): Mesenchymal influences on the development of the adenohypophysis in the rat. *Cell Tiss. Res.* **241**: 67-76.

- WATANABE, Y.G. (1982): An organ culture study on the site of determination of ACTH and LH cells in the rat adenohypophysis. Cell Tis. Res. 267-275.
- WISLOCKI, G.B. y KING, L.S. (1936): The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes, with a study of the hypophyseal vascular supply. Am. J. Ana. 58: 421-472.

Correspondencia: M. Rubio.
Unidad Docente Anatomía Humana I
Colegio Universitario de Medicina de Avila
C/ Santo Tomás, s/n. Avila. España

ESTUDIO DEL PATRON Y MORFOLOGIA FIBRILAR DEL MUSCULO RECTO FEMORAL DE LA RATA WISTAR POR DIVERSAS TECNICAS HISTOQUIMICAS*

STUDY OF THE PATTERN AND FIBRILLAR MORPHOLOGY OF WISTAR RATS FEMORALIS RECTUS MUSCLE BY DIFFERENT HISTOCHEMICAL TECHNIQUES

A. TORRES, M.P. DIAZ-HERRERA, J. L. NIETO, R. SARRAT, A. CRESPO

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se ensayan diferentes técnicas histoquímicas: miosín ATP-asa, NADH-TR y fosforilasa en el músculo recto femoral de la rata Wistar, comprobando que la miosín ATP-asa a pH 4,3 es la que mejor identifica los diferentes tipos de fibras. Se observa una distribución dentro del músculo de forma compartimental en tres regiones distintas, orientadas en sentido anteroposterior. En la región superficial predominan las fibras tipo IIB, disminuyendo progresivamente según se avanza a la región más profunda, donde encontramos un número mayor de fibras tipo IIA. Las fibras tipo I son escasas, encontrándose el mayor número de ellas en la región profunda del músculo.

PALABRAS CLAVE: Músculo. Rata. Histoquímica.

SUMMARY

Different histochemical techniques like miosin ATP-ase, NADH-TR, phosphorylase were assay in the Wistar rats Femoralis Rectus muscle. It was proved that the miosin ATP-ase at pH 4,3 is the best for the identification of the different muscular fiber types. It was observed a distribution inside the muscle in a compartmental form in three different regions, oriented in antero-posterior direction. In the superficial region, fiber type IIB predominate, decreasing progressively as it approach to the deeper region, where we find a larger number of fibers type IIA. Fibers type I are scanty and the larger number of them are found in the deeper region of the muscle.

KEY WORDS: Muscle. Rat. Histochemistry.

*Trabajo subvencionado por la Diputación General de Aragón.

Introducción

Es de conocimiento general que el músculo esquelético de los vertebrados posee una población heterogénea de fibras con diferentes propiedades, tanto funcionales como estructurales.

Estudios electrofisiológicos e histoquímicos (Burke y col., 1971, 1973, 1974, 1980; Buchtha y Smalbruch, 1980) han puesto de manifiesto las características propias de cada tipo de fibra en relación a su metabolismo energético y velocidad de contracción.

Sin embargo, la gran variedad de tipos fibrilares reconocibles por los diferentes métodos histoquímicos, basados en los diferentes grados de actividad enzimática de las fibras, ha llevado a una cierta confusión terminológica. No obstante, existe una gran unanimidad a partir del sistema propuesto por Dubowitz y Brooke (1973) para clasificar los dos tipos de fibras principales en el hombre y la rata, basado inicialmente sobre la actividad de un enzima oxidativo así como la NADH-TR o la succino-deshidrogenasa o en la reacción standard de la ATP-asa a pH 9,4; poseyendo ésta última la ventaja de ser modificada mediante preincubación a varios pH (4,3 - 4,6) y demostrar los subtipos de las fibras tipo II según indicaron Brooke y Kaiser (1970).

Algunos autores (Gollinick y col., 1972; Kugelberg, 1973; Nemeth y Pette, 1981 a, b) han denunciado las dificultades que presentan las técnicas oxidativas (similares a la propuesta por Peter y col., 1972) en la clasificación de las fibras, debido al traslado del potencial oxidativo que existe entre diferentes tipos de ellas.

A pesar de estas dificultades, Armstrong y Phelps (1984) mantienen la validez de esta técnica en el estudio de varios músculos de la rata, incluso reconociendo que se deben tomar decisiones arbitrarias para catalogar algunas fibras en un tipo u otro. Si bien, sostienen que la identificación de las fibras según las técnicas de la NADH-TR y miosín ATP-asa a pH 9,4, debe ser apoyada mediante correlaciones funcionales, tales como los modelos del flujo sanguíneo empleados por ellos.

Advertidos de estas dificultades, así como de ciertas variaciones presentes a nivel metabólico en las fibras musculares de diferentes especies de vertebrados, pretendemos, con este estudio, conocer la validez de distintas técnicas histoquímicas en la identificación de la población fibrilar del músculo de la rata. Por otro lado, obtener, mediante aquella o aquellas técnicas histoquímicas que consideremos más idóneas, el patrón y morfología fibrilar del músculo recto femoral de la rata Wistar, sobre el que poder experimentar, más adelante, los efectos que sobre dicho músculo produce el ejercicio físico.

Material y métodos

Hemos utilizado 10 ratas machos cepa Wistar, de 4 meses de edad. Una vez anestesiados en campana de éter y previa disección del recto femoral, se tomaron muestras de la porción media del músculo con el animal vivo. Las piezas que contenían la totalidad de la sección transversa del músculo, fueron congeladas introduciéndolas en isopentano congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente, en un criostato a -20°C se obtuvieron cortes seriados de 8 a 10 micras de grosor. Sobre estos cortes se ensayaron técnicas histoquímicas de miosín trifosfatasa miofibrilar (m-ATP-asa) a pH 9,4 (Dubowitz y Brooke, 1973) y con preincubación a pH 4,3 (Brooke y Kaiser, 1970); igualmente se usaron técnicas para demostrar la actividad de un enzima oxidativa como la nicotinamida adenina dinucleótido-tetrazolium reductasa (NADH-TR) (Novikoff y col., 1961) y de otra glucolítica, la fosforilasa (Método del dextrano de Meyer).

Para conocer la composición en cuanto a los distintos tipos de fibras sobre cortes transversales completos con la reacción ATP-asa a pH 4,3, que fue la técnica histoquímica que permitía distinguir con mayor objetividad los diferentes tipos de fibras, se separó el músculo en tres regiones en el sentido anteroposterior, que a simple vista parecía tener poblaciones distintas de fibras: región superficial, media y profunda.

De cada una de estas regiones, en cada corte se tomaron microfotografías, procurando que los campos fueran lo más posiblemente aproximativos en cada uno de los músculos examinados. Sobre ellos se contabilizó un número de 200 fibras por cada región muscular, (un número similar a los propuestos por Curless y Nelson, 1976; Adams y col., 1968; Loble y col., 1977; Braund y col., 1982; Armstrong y Phelps 1984), calculando posteriormente la proporción relativa de cada tipo de fibra en cada una de las tres regiones musculares.

Resultados

Con la técnica histoquímica de la miosín ATP-asa con preincubación a pH 4,3, se observan con gran objetividad los tres tipos principales de fibras en el músculo de la rata: fibras tipo I de reacción oscura y tamaño pequeño, fibras tipo IIA de reacción clara y tamaño similar al de las anteriores y fibras tipo IIB de reacción intermedia entre las dos anteriores pero de un tamaño dos o tres veces mayor que ellas (Fig. 1).

La técnica de miosín ATP-asa a pH 9,4 solamente permite distinguir dos tipos de fibras: las lentas tipo I con una reacción clara, dado su menor contenido de adenosín trifosfatasa, y las fibras rápidas IIA y IIB con una reacción oscura (Fig. 2)

Un número escaso de fibras que permanecieron estables en ambas preincubaciones ácida y alcalina, se consideraron fibras tipo IIC y que por su insignificancia desestimamos; sin embargo, este dato estaría de acuerdo con la edad adulta de los animales.

La técnica oxidativa de la NADH-TR muestra fibras grandes con baja actividad, clasificadas como tipo IIB por la reacción de ATP-asa a pH 4,3 y otras de menor tamaño con alta actividad. Estas últimas corresponden a aquellas fibras catalogadas por la ATP-asa ácida como fibras tipo I y IIA; sin embargo, con esta técnica presentan ambas una intensidad de reacción muy similar, dificultando su objetivación en un tipo u otro. Algunas de las fibras tipo IIB también poseen un potencial oxidativo alto (Fig. 3).

Con la técnica glucolítica de la fosforilasa se observa que las fibras tipo IIB poseen alta actividad; las fibras tipo IIA, intermedia, y las fibras tipo I, escasa (Fig. 4).

En la tabla 1 se expresan las proporciones relativas de los tipos de fibras hallados en las tres regiones que diferenciábamos en el músculo recto femoral de la rata Wistar. Dichos valores nos muestran cómo la región superficial del músculo contiene en su mayor parte fibras tipo IIB y un menor número de fibras tipo IIA. Estas últimas aumentan progresivamente en número a medida que nos acercamos a la región media, apareciendo en esta región alguna fibra aislada de tipo I.

Inversamente, la región profunda posee un predominio de fibras tipo IIA sobre las IIB, junto a un número de fibras tipo I que supera en esta región al de las dos anteriores.

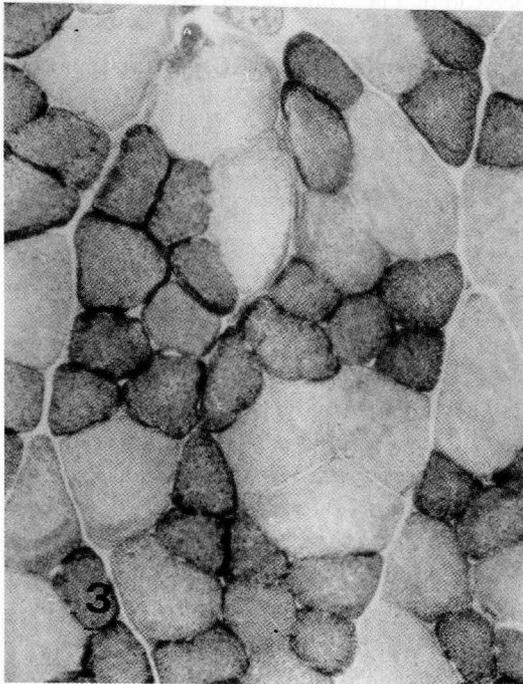
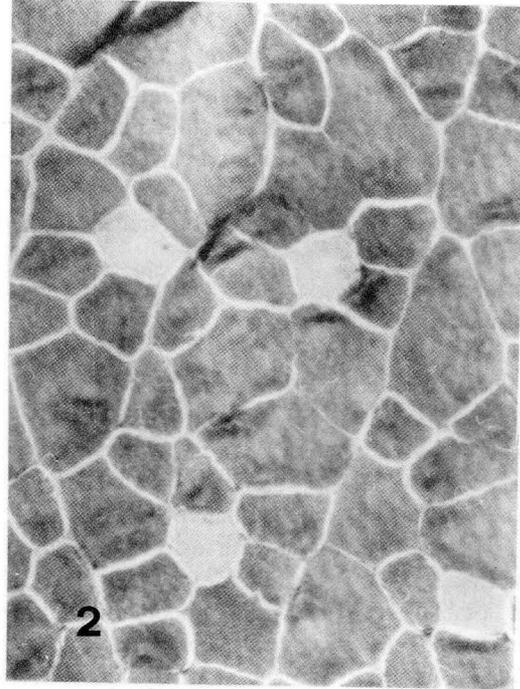
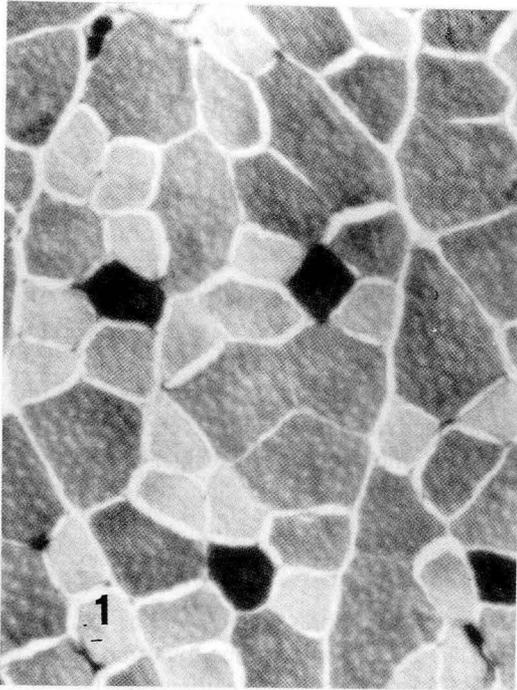
TABLA 1. Porcentaje de la composición del tipo de fibra en el músculo recto femoral de la rata Wistar. Los valores presentados son medias \pm 2 Errores Standar, siendo n = 10 ratas.

TIPOS DE FIBRAS	REGION SUPERFICIAL	REGION MEDIA	REGION PROFUNDA
I	--	2,6 \pm 0,31	9,0 \pm 0,55
II A	12,5 \pm 0,94	31,1 \pm 1,05	51,2 \pm 1,38
II B	87,4 \pm 0,89	66,2 \pm 0,95	36,5 \pm 0,82

Discusión

Al inicio de este trabajo comentábamos la utilización, paralela a las técnicas de miosín ATP-asa, de otras que intentaban identificar los tipos fibrilares según sus potenciales metabólicos. Sin embargo, Gollnick y col. (1972) y Kugelberg (1973) comprobaron que por estos últimos procedimientos de tinción existía una continuidad de intensidades de reacción para la capacidad oxidativa dentro de la clasificación de cada fibra principal.

Nemeth y Pette (1981 a, b) vuelven a reafirmar que la clasificación histoquímica usada por PETER y col. (1972) que diferencia las fibras de contracción rápida en dos grupos, basada sobre diferencias metabólicas: en fibras de contracción rápida glucolíticas (FG) y fibras de contracción rápida oxidativas glucolíticas (FOG), es un sistema de clasificación incompatible con un sistema basado sobre el análisis histoquímico de miosín ATP-asa con varias preincubaciones ácidas. Según ellos existe claramente una gran cantidad de traslado en el potencial oxidativo de fibras clasificadas como tipo IIA y IIB. Un hecho semejante es comentado por Dlizy col. (1988) al emplear la NADH-TR en la identificación fibrilar del músculo de perros de distintas razas.



Al observar nuestros resultados coincidimos con los autores anteriores en cuanto a la dificultad que implica esta técnica oxidativa en la identificación de los tipos de fibras; sin embargo, en el músculo de la rata es sobre todo entre las fibras tipo I y IIA donde encontramos dicho inconveniente. Así, al igual que han comentado López-Rivero y col. (1989) al examinar el músculo de caballos, nosotros, en los cortes del músculo de la rata teñidos para la actividad NADH-TR, sólo hemos podido objetivar las fibras FG (o IIB), teniendo presente que algunas de ellas tienen una actividad oxidativa tan alta como los otros dos tipos SO y FOG (I y IIA respectivamente), aunque siguen conservando su gran tamaño.

Además de la naturaleza subjetiva de las decisiones que se deben tomar para catalogar una fibra en un tipo o en otro, lo cual disminuye la realidad de la técnica, según Holloszy y BOoth (1976) y Salting y Gollnick (1983) se suma el problema que representa la labilidad de los enzimas mitocondriales: cambios en la utilización del músculo por el envejecimiento, desuso o desentrenamiento, modifican significativamente la actividad de los enzimas mitocondriales en los músculos.

No obstante, Snow-Guy (1980) propusieron una ecuación que utiliza el porcentaje de fibras tipo SO equivalente a los hallados con anterioridad con fibras tipo I con la ATP-asa ácida y de esa forma hallar los porcentajes de las fibras FOG (IIA).

Las razones anteriores y los resultados que hemos obtenido nos hacen pensar como Howald (1982) y Gollnick y col. (1982) que la técnicas histoquímicas que distinguen entre los diferentes isoenzimas miosín ATP-asa pueden proporcionar unos medios más objetivos de identificación de los diferentes tipos de fibras musculares. Incluso tener presente que los modelos de intensidad de la reacción ATP-asa para las fibras son discretos y están menos influenciados por el comportamiento contraáctil que lo están los enzimas metabólicos.

En relación con el segundo objetivo de este trabajo, referente a la composición fibrilar del músculo recto femoral de la rata Wistar, como se aprecia en la tabla 1, existe un gradiente de distribución para los tres tipos de fibras a lo largo del eje anteroposterior. Lo que implica que este músculo no se puede considerar como una unidad funcional homogénea.

Las fibras tipo I de contracción lenta encargadas de la actividad tónica son en general escasas en todo el músculo, como reflejan sus porcentajes de 2,6 y 9% en la región media y profunda respectivamente. Esto indica que el músculo desarrolla una actividad tónica bastante pobre.

Las fibras tipo IIB, que son rápidas pero susceptibles a la fatiga, estarían comprometidas en una actividad fásica potente pero momentánea. La región superficial, con un alto porcentaje de estas fibras del 87,4%, estaría, por consiguiente, relacionada con un tipo de contracción predominantemente fásica. La región media del músculo seguiría manteniendo esta misma propiedad al contar con un porcentaje de fibras tipo IIB del 66,2% frente a otro más bajo de fibras tipo IIA de un 31,1%.

Finalmente, la región más profunda, con un porcentaje alto del 51,2% de fibras tipo IIA (frente a un 39,8 % de fibras IIB y un 9% de fibras tipo I) también rápidas pero resistentes a la fatiga y, por lo tanto, adecuadas a una actividad fásica sostenida, deberá desarrollar un tipo de contracción rápida y duradera. Esta región que posee el mayor porcentaje de fibras tipo I, será, a su vez, la que ejerza una mayor actividad tónica de las tres.

Aun cuando estos patrones de distribución del tipo de fibra suceden en los músculos de la mayoría de los mamíferos, como se ha demostrado en numerosos estudios, Armstrong (1980) comenta que la estratificación en la rata es más rigurosa.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, R.D., COERS, C. and WALTON, J.N., 1968: Report of a subcommittee on the quantitation of muscle biopsy finding. *J. Neurol. Sci.* **6**: 79-188.
- ARMSTRONG, R.B., 1980: Properties and distributions of the fiber types in the locomotory muscles of mammals. In: *Comparative Physiology: Primitive Mammals*. K. Schmidt- Neilsen and C. R. Taylor, eds., Cambridge University Press, Cambridge, 243-254.
- ARMSTRONG, R.B., and PHELPS, O., 1984: Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *The Am. J. Anat.* **171**: 259-272.
- BRAUND, K.G., Mc GUIRE, J.A. and LINCOLN, C.E., 1982 : Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: A cytochemical, histochemical and morphometric study. *Vet. Pathol.* **19**: 577-595.

- BROOKE, M.H., and KAISER, K.K., (1970b)": Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: The nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem, Cytochem.* **18**: 670-672.
- BUCHTAL, F. and SCHMALBRUCH, H., 1980: Motor unit of mammalian muscle. *Physiol. Rev.* **60**: 90 - 142.
- BURKE, R.E., 1980: Motor unit types: functional specializations in motor control. *Trends Neuro. Sci.* **3**: 255-258.
- BURKE, R.E., LEVINE, D.M., ZAJAC, F.E., TSAIRIS, P. and ENGEL, N.K., 1971: Mammalian motor units: Physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Sci.* **174**: 704-709.
- BURKE, E. LEVINE, D. and TAISIRIS, P., 1973: Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat-gastrocnemius. *J. Physiol., London*, **234**: 723-748.
- CURLESS, R.G. and NELSON, M.B., 1976: Developmental patterns of rat muscle histochemistry. *J. Embryol. Esp. Morphol.*, **36**: 355-363.
- DIZ, A., LOPEZ RIVERO, J.L., MIRO, F., MORALES, J.L. y MARTINEZ-GALISTEO, (1988): Diferencias morfológicas en músculos de perros de cuatro perros de diferentes actitudes dinámicas. *An. Anat.* **34**: 49-64.
- DUBOWITZ, V. and BROOKE, M.H., 1973: Muscle biopsy: a modern approach. WB Sanders, London, 50-51.
- GOLLNICK, P.D., ARMSTRONG, R.B., SAUBERT, C.W., IV, et al., 1972: Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* **33**: 312-319.
- GOLLNICK, P.D., 1982: Relationship of strength and endurance with skeletal muscle structure and metabolic potential. *Int. J. Sports, Med.* **3**: 26-32.
- HOLLOSZY, J.O., and BOOTH, F.W., 1976: Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **38**: 273-291
- HOWALD, D., 1982: Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle. *Int. J. Sports. Med.* **3**: 1-12.
- KUGELBERT, E., 1973: Histochemical composition, contraction speed and fatigability of rat soleus motor units. *J. Neurol. Sci.* **20**: 177-198.
- LOBLEY, G.E., WILSON, A.B., and BRUCE, A.S., 1977: An estimation of the fibre type composition on eleven skeletal muscle from New Zeland white rabbits between weaning and early maturity. *J. Anat.* **123**: 501-503.
- LOPEZ RIVERO, J.L., AGUERA, E., VIVO, J., MORALES-LOPEZ, J.L. y MARTINEZ-GALISTEO, A. 1989: Población y tamaño fibrilar en el músculo glúteo de caballos pura sangre ingles. *An. Anat.* **35**: 19-27.
- NEMETH, P. and PETTE, D. (1981a): The limited correlation of the myosin-based and the metabolic-based classifications of skeletal muscle fibres. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 89-90.
- NEMETH, P. and PETTE, D. (1981b): Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATP-ase in three hindlimb muscles of rat. *J. Physiol. (Lond.)*, **300**: 73-80.
- NOVIKOFF, A. B., SHIN, W. and DRUCKER, J., 1961: Mitochondrial localization of oxidation enzymes: staining results with two tetrazolium salts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 47-61.
- PETER, J.B., BARNAARD, R. J., EDGERTON, V. R. et al., 1972: Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, **14**: 2627-2633.
- SALTIN, B. and GOLLNICK, P.D., 1983: Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. In: *Handbook of Physiology. Skeletal Muscle.* L.D. Peachy, ed. Am. Physiol. Soc., Bethesda, M.D. Sect. 10, Chap. **19**: 555-631.
- SNOW, D. H. and GUY, P.S., 1980: Muscle fibre type composition of a number of limb muscles in different types of horse. *Res. Vet. Sci.* **28**: 137-144.

Correspondencia: Dra. Ana Torres
Dpto. Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza
C/ D. Miral, s/n. 50009 Zaragoza. España

INFLUENCIA DE LOS CAMPOS MAGNETICOS PULSANTES SOBRE EL TESTICULO DE LA RATA ALBINA. (I) UN ANALISIS DE LOS DIAMETROS TUBULARES

PULSANT MAGNETIC FIELD INFLUENCE ON THE TESTICLE OF THE WISTER RAT. (I) ONE ANALYSIS OF THE TUBULAR DIAMETERS

M.P. VIÑALS, M.J. BROSETA, L. APARICIO, V. SMITH-FERRES

Departamento de Anatomía. Ciencias morfológicas.
Universidad de Valencia

RESUMEN

Se han estudiado los efectos experimentales de un campo magnético pulsante sobre los testículos. Ratas macho son expuestas a un campo magnético pulsante de 52 Gauss durante una hora diaria y son sacrificadas 24 horas después de la última dosis. A los 1, 3, 5, 7, 15 y 21 días.

Realizamos valoración de los diámetros de los tubos seminíferos, encontrando disminución estadísticamente significativa en los grupos experimentales de los 7, 15 y 21 días.

PALABRAS CLAVE: Testículo, tubo seminífero, campos magnéticos pulsantes.

SUMMARY

The effects of a pulsant magnetic field on the testicles have been studied. Adult male Wistar are exposed to a 52 Gauss pulsant magnetic field for one hour daily and are sacrificed twenty four hours after the last dose on 1st, 3rd, 5th, 7th, 15th and 21st.

Tabulars diameters value have been done. Statisticly significant disimintion in experimental groups of 7th, 15th and 21st days are observed.

KEY WORDS: Testicle, tubular diameters, pulsant magnetic field.

Introducción

El progresivo empleo de los campos magnéticos ha dado lugar a numerosas investigaciones. Estas nos han demostrado que los campos magnéticos poseen un alto poder de penetración, y que su efecto fisiológico se manifiesta en todo el organismo, independientemente de la zona del cuerpo en que se apliquen.

El presente trabajo plantea el estudio de los efectos morfológicos de los campos magnéticos en el testículo de la rata albina adulta, siguiendo una línea de investigación ya iniciada por la Escuela valenciana, pero relativamente reciente, que estudia las acciones que diversos agentes físicos tienen sobre determinados órganos y tejidos de los animales de experimentación.

Antecedentes históricos y bibliográficos

Los primeros fenómenos magnéticos conocidos estaban relacionados con los llamados imanes naturales. Desde épocas muy antiguas que se remontan a la antigüedad griega, es conocido el hecho de que algunas sustancias, como la magnetita, tienen la propiedad de atraer el hierro no imantado; esta propiedad se manifiesta muy acusadamente en ciertas regiones del imán llamadas "polos".

Los chinos en el año 121 de nuestra era ya conocían el hecho de que una barra de hierro colocada cerca de un imán natural adquiría y conservaba las propiedades de éste, y que si se suspendía libremente, era capaz de orientarse en la dirección N-S terrestre.

Con objeto de estudiar estos fenómenos, que no pueden ser considerados como consecuencia de acciones gravitatorias o electrostáticas, se constituyó una parte de la Física que se denominó "Magnetismo"; suponiendo, en principio, que no tenía relación alguna con los fenómenos eléctricos.

Más tarde, importantes físicos como Oersted (1819), Faraday (1830), Maxwell (1873), Lenz (1834) y Lorentz (1875) sentaron las bases físicas del "Electromagnetismo" moderno.

El nexo de unión de estos conocimientos físicos con la Medicina se produjo muy lentamente, y hasta 1950 existe un periodo de estancamiento; pero a partir de esta fecha los estudios se disparan, y comienzan a aplicarse los campos magnéticos en terapéutica, primero en traumatología y luego en las diversas ramas de la Medicina.

Existen importantes trabajos sobre los efectos biológicos de los campos magnéticos en diversos tejidos, pero nos interesa reseñar aquí los efectos testiculares y sobre la reproducción y el desarrollo embrionario.

H.B. Brewer (1979) observó que la acción de un campo magnético en un acuario producía en la primera generación una reducción del periodo de incubación, en la segunda una reducción en la tasa de desovación y del periodo de gestación y en la tercera la reproducción era inhibida completamente.

V.V. Grigor'ev (1981) demuestra que la aplicación local de un campo magnético sobre testículos de conejo produce alteraciones estructurales y desórdenes en la permeabilidad de la red sanguínea testicular, cambios estructurales y desarrollo de procesos autoinmunes humorales (anticuerpos) y celulares (linfocitos sensibilizados).

A.D. Strzhizhovskii y V.M. Mastryukova (1983) comprobaron un descenso de todos los tipos de células del espectro espermatogénico y un exceso de espermatozoos en los ratones expuestos a un campo magnético constante.

R. Ricco (1984) observó una disminución de los diámetros tubulares de los conejos sometidos a campos magnéticos de baja y de alta frecuencia, así como una detención madurativa en la fase de espermatoцитos.

G.V. Galaktinov, V.M. Mastryukova y A. D. Strzhizhovskii (1985) estudiaron la magnetosensibilidad de tejidos de mamíferos y demostraron que el epitelio espermatogénico es uno de los más sensibles, pues su exposición a campos magnéticos constantes produce una destrucción de los elementos celulares.

H.R. Withers, Kathryn A. Mason y C.A. Davis (1985) observaron que en los ratones tratados con campos magnéticos constantes, los números promedios de cabezas de espermia derivadas, desde células en la última espermátide y stem cell fueron ligeramente deprimidos; y aquellos desde espermátides tempranos, espermatoцитos y espermatoгонias fueron ligeramente elevados.

Bases físicas

Los fenómenos magnéticos están originados por cargas eléctricas en movimiento, pues toda carga, además de crear un campo eléctrico, cuando se desplaza, origina en el espacio que le rodea un campo magnético,

Cuando una corriente eléctrica atraviesa un hilo conductor, genera un campo magnético coaxial a dicho hilo.

Si con este hilo conductor se realiza una espiral en hélice, se obtiene un solenoide, y el campo del solenoide es la suma vectorial de los campos establecidos por cada una de las espiras que componen el solenoide.

El campo magnético generado varía en función del tipo de corriente que atraviesa el solenoide. Si la corriente es continua, el campo magnético será continuo; pero si la corriente es variable, también lo será el campo magnético.

En nuestro caso, como pretendemos crear un campo magnético pulsante, utilizamos una corriente alterna. Y para ello empleamos el generador y aplicador de campos magnéticos para medicina BIOTESLA-40 de ELECTRONICA-MILKA, cuya frecuencia de trabajo es de 50 a 10.500 Hz, y en el que nosotros seleccionamos la intensidad de 52 gauss.

Material y métodos

La investigación ha sido realizada sobre ratas albinas machos adultos, cuyos pesos oscilaban entre 200 y 333 gramos, y que han sido divididas en 7 grupos: uno control y 6 experimentales.

Los grupos experimentales se someten a campos magnéticos durante una hora diaria a lo largo de 1, 3, 5, 7, 15 y 21 días respectivamente, por medio del aparato mencionado en el apartado anterior. Los animales son sacrificados al cabo de 24 horas de la última dosis de magnetoterapia, y, tras su necropsia, se procede a la obtención de piezas, que en este caso son los testículos.

Las piezas extraídas para el examen con microscopio óptico han sido fijadas con formol e incluidas en parafina, lo que ha permitido obtener cortes de 10 micras de espesor; dichos cortes han sido coloreados sucesivamente con los siguientes métodos de tinción: hematoxilina-eosina, policromo de Cabanes, tricómico de Masson, P S y azul de Prusia.

Los testículos destinados al estudio mediante microscopía electrónica se fijan con glutaraldehído y se incluyen en Durcopán; así, obtenemos unos cortes de 600 a 900 angströms de grosor, que se contrastan con el método de Reynolds. Pero, de las piezas incluidas de este modo, también se obtienen cortes de una micra de espesor, que se tiñen con azul de Toluidina y que constituyen un excelente material para microscopía óptica.

Resultados

Hemos efectuado la valoración de los diámetros tubulares porque son uno de los indicadores más sensibles de la existencia de lesiones en las células espermatogénicas.

Los resultados obtenidos después de la medición de los túbulos seminíferos de las ratas debemos someterlos a tratamiento estadístico para poder interpretarlos.

Mediante el programa "StatWorks" calculamos la media y la desviación standard de cada grupo de observaciones. A partir de ellas obtenemos la "t" de Student, lo que nos permite comprobar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados extraídos de cada uno de los grupos experimentales y del grupo control.

Cada valor de "t" hay que interpretarlo para $n-1$ grados de libertad y, cuando la significación es menor de 0,05, se considera que hay una diferencia estadísticamente significativa.

Los diámetros tubulares de las ratas sometidas a la acción de los campos magnéticos son menores que los de las que no han recibido este tratamiento.

Pero esta disminución sólo es estadísticamente significativa en los grupos experimentales que han estado expuestos a los campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia durante 7, 15 y 21 días.

Esto lo vemos en la siguiente gráfica, que representa las variaciones de los diámetros tubulares a lo largo de los días. En ella aparece una curva descendente, expresión de la disminución de dichos diámetros, más marcada cuanto mayor es el número de días en que los animales han sido tratados.

Discusión

Nuestras experiencias confirman que los resultados de la acción de los campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia sobre la rata albina macho de la cepa "Wistar" son la existencia de alteraciones morfológicas a nivel de los túbulos seminíferos.

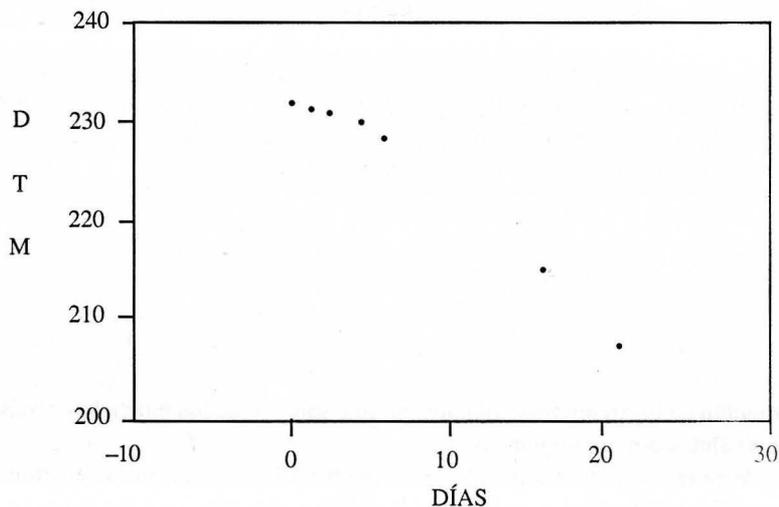
Además, por medio del estudio que hemos realizado, podemos mostrar la significación de los datos obtenidos.

Coincidiendo con los estudios efectuados por Ricco en 1984, con conejos macho, nosotros también encontramos una disminución de los diámetros tubulares de las ratas albinas macho, sometidas a la acción de campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia en comparación con las que no estuvieron expuestas.

La disminución de los diámetros tubulares es más significativa cuanto mayor es la dosis de magnetoterapia recibida. Como conclusión observamos que se produce una disminución de los diámetros tubulares de las ratas tratadas con campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia, al compararlas con las no tratadas. Esta disminución es estadísticamente significativa.

La significación es más notable cuanto mayor es la dosis de magnetoterapia recibida.

StatWorks™ Data D. T. M. 29-dic-1988 15:14



BIBLIOGRAFIA

- BREWER, H.B. (1979): Some preliminary studies of the effects of a static magnetic field on the life cycle of the "Lebistes reticulatus". *Biophys. J.* **28**: 305-314.
- CATALA, J. (1979): Física. Madrid, Fundación García Muñoz, Sección Saber. 432-445.
- GRIGOREV, V.V. (1981): Effect of magnetic fields on the spermatogenic function. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* **80**: 69-75.
- GALAKTINOV, G.V.; MASTRYUKOVA, V.N.; STRZHIZHOVSKII, A.D. (1985): Sensitivity of mammalian tissues to prolonged effects of constant magnetic fields strenght. *Kosm. Bios. Aviakosm. Med.* **19**: 78-81.
- RICCO, R. (1984): Effetti patologici della esposizione a campi magnetici: aspetti morfologici del danno a livello testicolare. *Pathologica* **76**: 605-613.
- STRZHIZHOVSKII, A.D.; MASTRYUKOVA, V.N. (1983): The influence of constant magnetic fields of high intensity on the spermatogenesis of mammals. *Izv. Akad. Nauk. Sssr. Ser. Biol.* **0**: 473-475.
- WITHERS, H.R.; MASON, K.A.; DAVIS, K.A. (1985): M. R. Effect on murine spermatogenesis. *Radiology*, **156**: 741-742.

Correspondencia: M.^a José Broseta Prades
 Gran Vía Germanías, nº 18-13^a
 46006 Valencia. España

Index

ALVAREZ-MORUJO, A.J.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; AMAT, P.: Ependymary surface of the rat fourth ventricle studied with the scanning electron microscope	3
AMAT, P.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; AMAT-PERAL, G.: Open or communicating synapses. Ultrastructural study in the arcuate nucleus of normal rats	15
BLANCO, E.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; SANCHEZ, F.; JUANES, J.A.; VAZQUEZ, R.: Topographical distribution of oxytocinergic neurons during late pregnancy and lactation in the rat brain	27
CARMONA, A.; CATALINA, C.J.; JIMENEZ-CASTELLANOS, J.: Dopamine-containing innervation of the striatum and Parkinson disease. Current data including our own personal experience	35
MONTERDE, J.G.; MIRO, F.; AGÜERA, E.; AGÜERA, S.: Exocranial references of the projection of the base of the cranium in five sheep breeds	41
MONTERO, M.; SANCHEZ, F.; JUANES, J.A.; BLANCO, E.; GONZALEZ, R.; VAZQUEZ, R.; CARRETERO, J.: Morphometric study of the ACTH-immunoreactive adenohypophysary cells	47
NIETO, J.L.; ALVAREZ, J.L.: Skull and jaws anthropometric study of a spanish population	55
PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; HERNANDEZ, M.T.; TORANZO, D.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ-BARRAGAN, L.; AMAT, P.: The nucleus circularis of the hypothalamus of the rat	67
PEREZ-FERRIOLS, M.A.; BROSETA, M.J.; APARICIO, L.: Experimental effects of pulsed magnetic field of 52 gauss into embryological development of wistar rat	77
RECREO, P.; CONTAMINA, P.; BARRAL, M.J.; PEREZ CASTEJON, M.C.; GARCIA-ALVAREZ, F.; VERA-GIL, A.: Morphometric study of the optic tectum in several animal species. A contribution to their evolutive analysis	83
RUBIO, M.; CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; CARVAJAL, J.C.; VAZQUEZ, R.: Early post-natal development of the hypophysis of the rat. Study of the vascular system	91
TORRES, A.; DIAZ-HERRERA, M.P.; NIETO, J.L.; SARRAT, R.; CRESPO, A.: Study of the pattern and fibrillar morphology of wistar rats femoralis rectus muscle by different histochemical techniques	99
VIÑALS, M.P.; BROSETA, M.J.; APARICIO, L.; SMITH-FERRES, V.: Pulsant magnetic field influence on the testicle of the wister rat. (I) one analysis of the tubular diameters	105

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

ALVAREZ-MORUJO, A.J.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; AMAT, P.: Superficie endimaria del cuarto ventrículo de rata visto con el microscopio electrónico de barrido	3
AMAT, P.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; AMAT-PERAL, G.: Sinapsis abiertas o comunicantes. Estudio ultraestructural en el núcleo arcuato de ratas normales	15
BLANCO, E.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; SANCHEZ, F.; JUANES, J.A.; VAZQUEZ, R.: Distribución topográfica de las neuronas oxitocinérgicas durante la gestación tardía y lactación en el cerebro de la rata	27
CARMONA, A.; CATALINA, C.J.; JIMENEZ-CASTELLANOS, J.: Inervación dopaminérgica del estriado y enfermedad de Parkinson's: Datos actuales aportando nuestra experiencia personal	35
MONTERDE, J.G.; MIRO, F.; AGÜERA, E.; AGÜERA, S.: Referencias exocraneanas de proyección basiencefálica en cinco razas de oveja	41
MONTERO, M.; SANCHEZ, F.; JUANES, J.A.; BLANCO, E.; GONZALEZ, R.; VAZQUEZ, R.; CARRETERO, J.: Estudio morfométrico de las células adenohipofisarias inmunoreactivas A h-ACTH de ratas sometidas a estrés	47
NIETO, J.L.; ALVAREZ, J.L.: Estudio biométrico del cráneo y de la mandíbula en una población española..	55
PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; HERNANDEZ, M.T.; TORANZO, D.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ-BARRAGAN, L.; AMAT, P.: El nucleus circularis del hipotálamo de rata..	67
PEREZ-FERRIOLS, M.A.; BROSETA, M.J.; APARICIO, L.: Efectos experimentales del campo magnético pulsante de 52 gauss sobre el desarrollo de la rata albina	77
RECRO, P.; CONTAMINA, P.; BARRAL, M.J.; PEREZ CASTEJON, M.C.; GARCIA-ALVAREZ, F.; VERA-GIL, A.: Estudio morfométrico del tectum óptico en distintas especies animales. Aportación a su análisis evolutivo	83
RUBIO, M.; CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; CARVAJAL, J.C.; VAZQUEZ, R.: Evolución postnatal precoz de la hipófisis de la rata. Estudio del árbol vascular	91
TORRES, A.; DIAZ-HERRERA, M.P.; NIETO, J.L.; SARRAT, R.; CRESPO, A.: Estudio del patrón y morfología fibrilar del músculo recto femoral de la rata wistar por diversas técnicas histoquímicas	99
VIÑALS, M.P.; BROSETA, M.J.; APARICIO, L.; SMITH-FERRES, V.: Influencia de los campos magnéticos pulsantes sobre el testículo de la rata albina. (I) un análisis de los diámetros tubulares	105