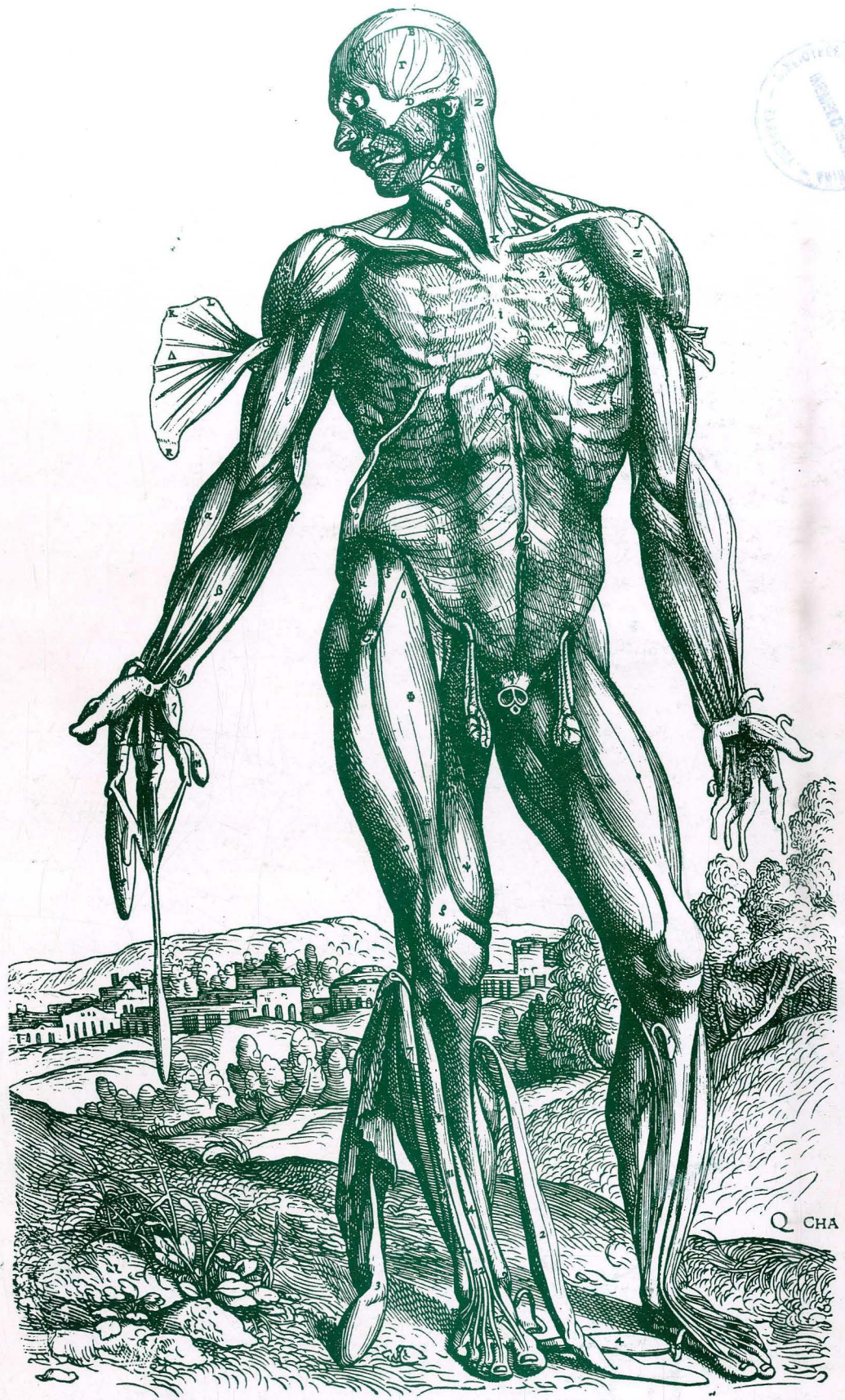


ANNALES DE ANATOMIA



ANALES DE ANATOMIA

Fundador:
J. ESCOLAR

Director:
R. SARRAT

Secretario de Redacción:
J.L. NIETO AMADA

Consejo de Redacción:

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

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

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

Composición 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

Diciembre 1990

Núm. 94

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CELULAS DE LA GLIA DE LOS NERVIOS DE LANCISI EN EL *BOS TAURUS* RAZA DE LIDIA

ULTRAESTRUCTURAL STUDY OF THE GLIAL CELLS OF THE LANCISI'S NERVES IN THE FIGHTING BULL

J. ARROYO-GUIJARRO, A. PRATS-GALINO, J. SAN-MOLINA y D. RUANO-GIL

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

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la ultraestructura de la neurología de los nervios de Lancisi en el toro de lidia. La presencia de astrocitos fibrosos con detalles morfológicos no diferenciables, el predominio de una sola variedad de oligodendrocitos en estos fascículos, y su relativa riqueza en células microgliales, se compara con las características que las células de la glía presentan en otras regiones del sistema nervioso central.

PALABRAS CLAVE: Nervios de Lancisi. Toro de lidia. Neuroglía. Ultraestructura.

SUMMARY

In the present paper the ultrastructure of neuroglia of the Lancisi's nerves in the fighting bull is described. Presence of fibrous astrocytes with common morphological details, predominance of a single type of oligodendrocytes in these fascicles and their relative richness in microglial cells are compared with the characteristics that glial cells present in other regions of the central nervous system.

KEY WORDS: Lancisi's nerves. Fighting bull. Neuroglia. Ultrastructure.

Introducción

Las estrías longitudinales mediales, antiguos nervios de Lancisi, constituyen, con las estrías longitudinales laterales, una porción del hipocampo supracomisural localizada en la profundidad de la cisura interhemisférica.

Los estudios efectuados acerca de estos tractos nerviosos, después de las descripciones histológicas realizadas con el método de Golgi por Ramón y Cajal en los roedores (1893; 1909-1911), se han referido fundamentalmente a sus conexiones y distribución (B.G. Gragg y L.H. Hamlyn, 1959; G. Raisman y cols., 1965). Estas investigaciones no han demostrado la llegada de las estrías de Lancisi al hipocampo, lo cual ha sido atribuido al escaso número de fibras nerviosas que contienen y a su poca importancia como vía aferente al hipocampo en las especies examinadas.

Por el contrario, nuestros estudios mediante el método de Klüver y Barrera han puesto en evidencia el importante desarrollo que los nervios de Lancisi presentan en el toro de lidia a lo largo de todo su trayecto supracallosa, así como su amplia terminación en el hipocampo (J. Arroyo-Guijarro y cols., 1988).

El presente trabajo tiene por finalidad completar tales investigaciones con un análisis ultraestructural de las células gliales características de esta región.

Material y Métodos

Han sido utilizados 5 encéfalos de *Bos taurus* de raza de lidia. Una vez extraído el encéfalo, fueron seleccionadas varias muestras que incluían una porción del cuerpo callosos con las estrías de Lancisi. Estas piezas se fijaron por inmersión en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2%, en tampón fosfato 0,1 M (pH=7,2), con la finalidad de obtener su endurecimiento inmediato. Transcurridos 30 minutos, se procedió a la disección de las estrías de Lancisi, aplicándose a las muestras los procedimientos habituales de postfijación en osmio, inclusión en Araldita, ultramicrotomía y contrastado para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Philips 300.

Asimismo, algunas muestras fueron tratadas sucesivamente mediante deshidratación progresiva en etanol, acetato de amilo, punto crítico, y montaje con plata coloidal y metalización con oro, siendo observadas con un microscopio de barrido Hitachi 1.200, con la finalidad de observar la disposición de la piamadre a nivel de los nervios de Lancisi.

Resultados

La piamadre observada con microscopio de barrido, aparece adaptada íntimamente a la superficie de los nervios de Lancisi, con la particularidad de que no emite prolongaciones septales hacia su interior. Dicha superficie es lisa y está compuesta por una capa delgada de tejido celular laxo, sobre la que se disponen células piales dispersas de morfología muy variada. Sin embargo, no se han observado células con microvillis, propias de la piamadre en otras regiones del sistema nervioso central (M.W. Cloyd y F.N. Low, 1974).

Por otra parte, mediante microscopía electrónica de transmisión, han sido analizadas las principales características ultraestructurales de los diferentes tipos de células gliales.

En cuanto a los astrocitos fibrosos (Fig. 1a), presentan habitualmente un núcleo de baja electrodensidad y aspecto granular, que contiene cromatina escasa, dispersa y uniformemente distribuida. En su centro destaca un nucléolo evidente. El citoplasma, también de baja electrodensidad, se caracteriza por presentar cisternas de retículo endoplasmático cortas y con trayecto irregular, recubierto de abundantes ribosomas (Fig. 1b). Estas células poseen, además, cuerpos densos y granulos de glucógeno dispersos en el citoplasma. Sus prolongaciones citoplasmáticas son numerosas y contienen abundantes filamentos.

En los nervios de Lancisi también se han identificado diferentes variedades morfológicas de oligodendrocitos (Fig. 2). La más frecuente presenta forma redonda u ovalada, tamaño pequeño y electrodensidad media. Su núcleo, de contorno regular y posición excéntrica, ocupa la mayor parte de la célula y contiene grandes acúmulos de cromatina adheridos a la envoltura nuclear, así como aislados en su porción central. El citoplasma es de mayor densidad que el nucleoplasma debido, en parte, a su gran contenido en mitocondrias y en ribosomas libres, en forma de rosetas, o asociados a las membranas del retículo endoplasmático.

Las prolongaciones citoplasmáticas de los oligodendrocitos suelen disponerse en grupos, que poseen un trayecto paralelo al curso de los axones. Muestran un diámetro uniforme y la presencia de microtúbulos en los mismos constituye una característica diferencial con los astrocitos fibrosos.

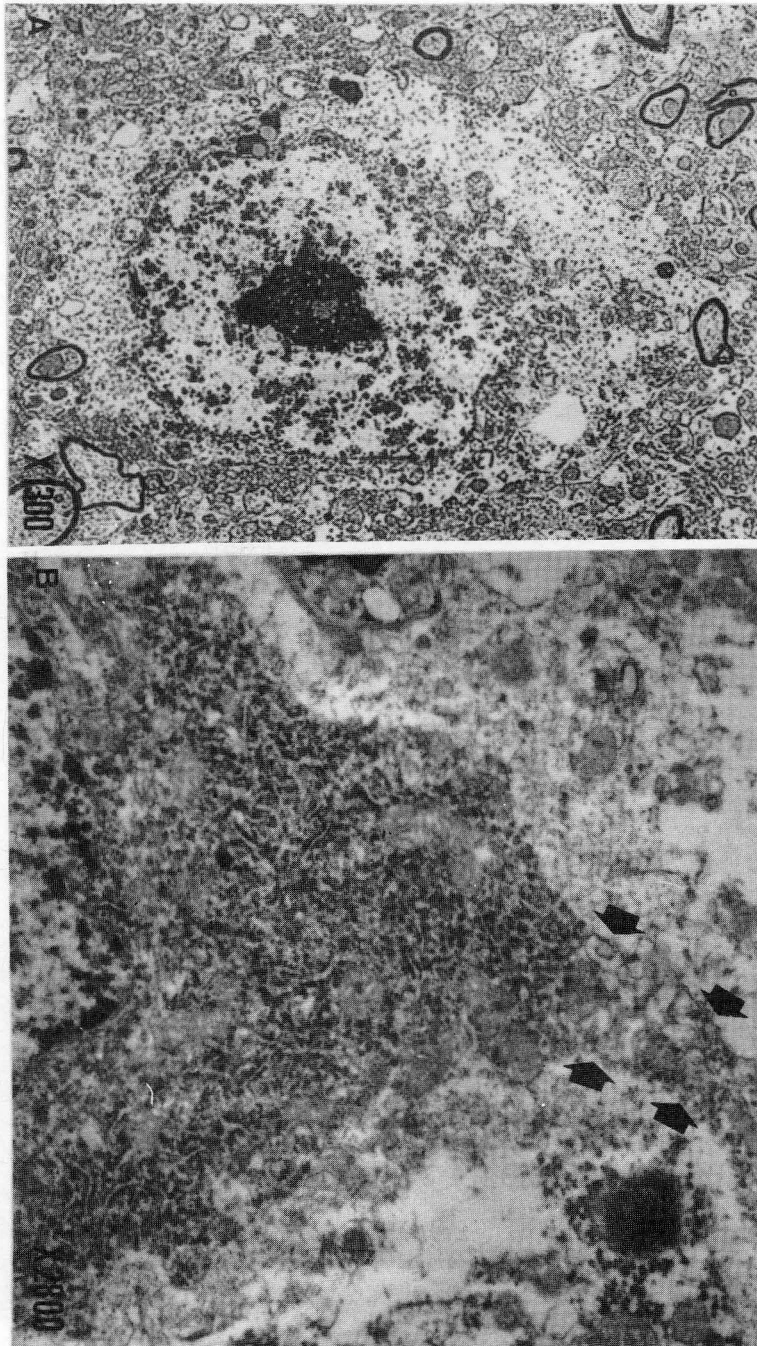


FIGURA 1. Astrocito fibroso. A: Núcleo con cromatina dispersa y núcleo evidente. El citoplasma es transparente, con orgánulos dispersos (x 1.300). B: prolongación astrocitaria emergiendo del protoplasma (x 2.800).

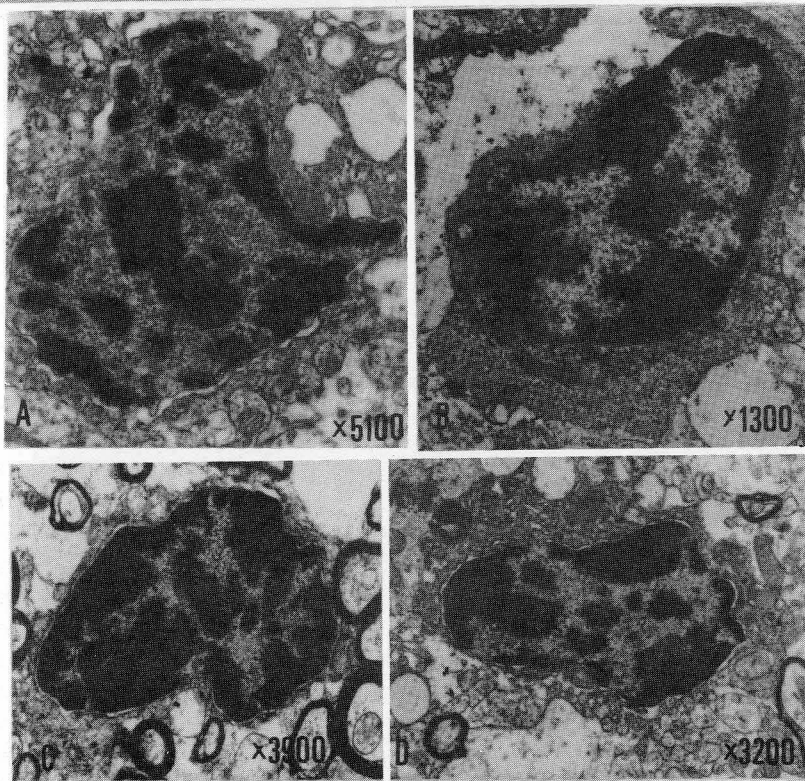
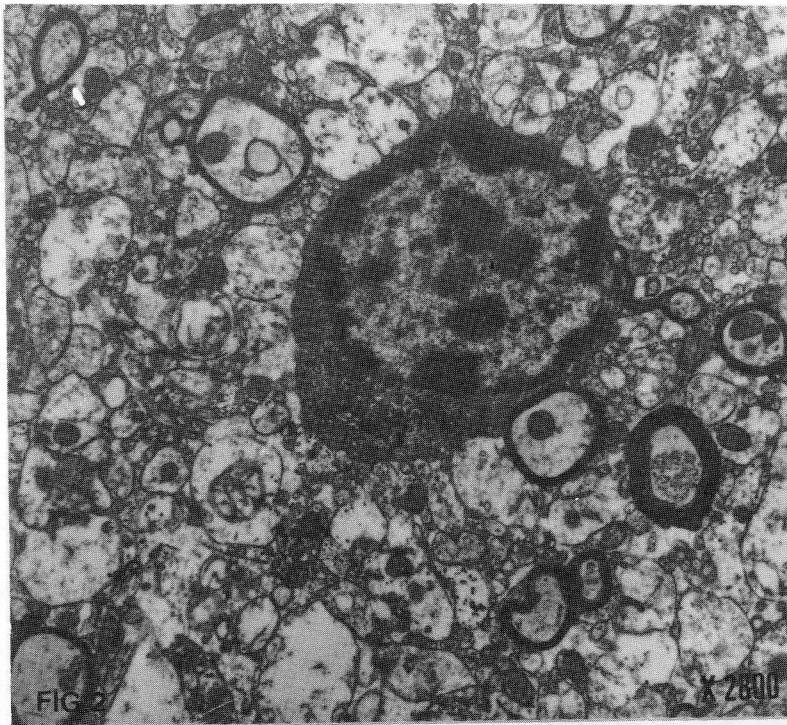


FIGURA 2. Oligodendrocito típico de electrodensidad media. Núcleo redondo con grandes masas de cromatina. El citoplasma presenta abundantes cisternas de retículo endoplasmático con ribosomas y Aparato de Golgi (x 2.800).

FIGURA 3. Grupo de oligodendrocitos con núcleo irregular y evidentes masas de cromatina. Su citoplasma es denso y escaso. A: x 5.100. B: x 1.300. C: x 3.900. D: x 3.200.

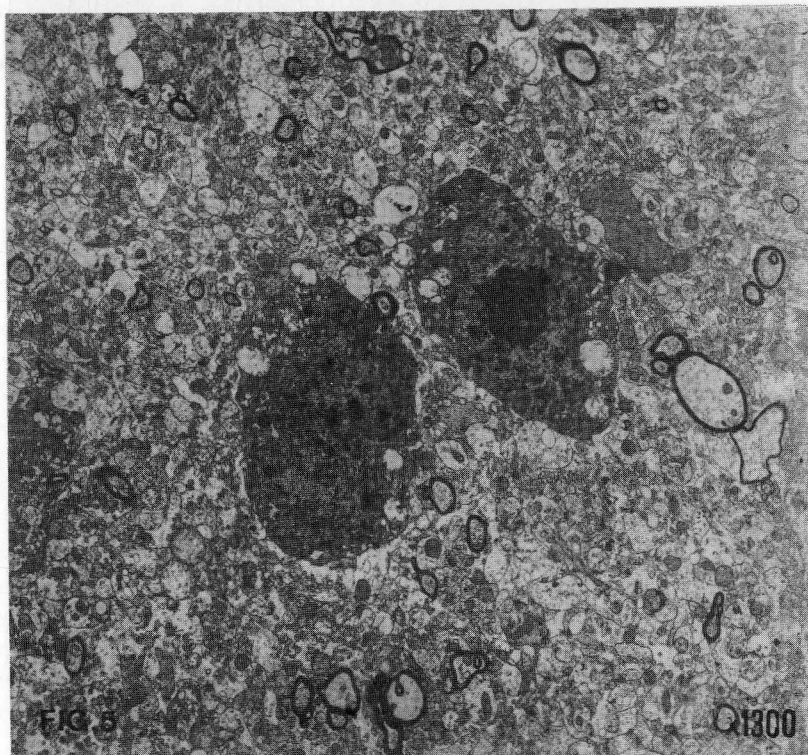
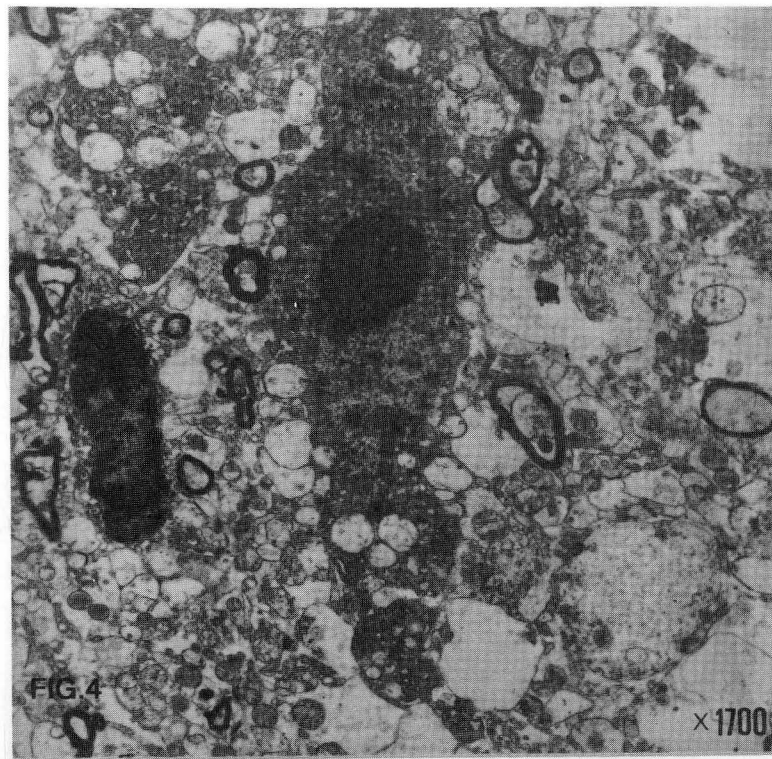


FIGURA 4. Microglía de forma alargada, núcleo con cromatina dispersa y nucléolo evidente. El citoplasma es menos denso que el núcleo y de aspecto multivesicular. (x 1.700).

FIGURA 5. Dos células microgliales ovoideas y multivesiculares. (x 1.300).

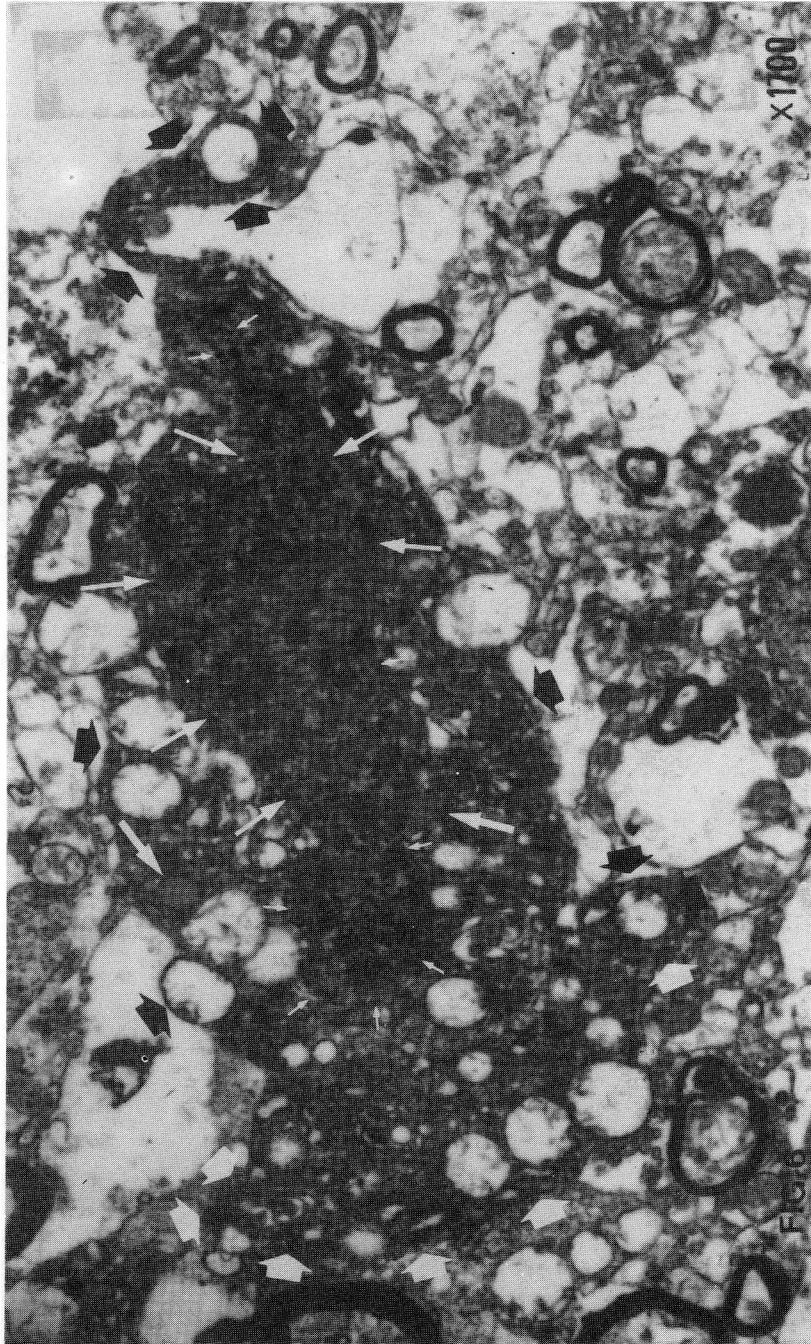


FIGURA 6. Microglía de núcleo ovoide e irregular y citoplasma de aspecto multivesicular, cuyos límites son difíciles de precisar (flechas blancas cortas). Las prolongaciones citoplasmáticas se señalan con flechas cortas y gruesas. En el citoplasma se aprecian numerosas vesículas claras y algunos lisosomas (flechas blancas largas) (x 1.700).

Con menor frecuencia se observan otras variedades morfológicas de oligodendrocitos (Fig. 3) caracterizadas por presentar un núcleo de forma irregular, pero con el mismo patrón de distribución de su cromatina que el descrito previamente.

La microglía, muy abundante en esta región, es alargada y ovoidea (Figs. 4, 5 y 6). El núcleo, electrodenso, ocupa una posición excéntrica, y su contorno, al igual que el perímetro celular, es irregular. En el nucleoplasma destaca la presencia de discretas masas de cromatina muy electrodensas y dispersas y un núcleo de gran tamaño, menor densidad y posición central.

El citoplasma de las células de la microglía es también oscuro y de aspecto multivesicular, lo cual está condicionado por la presencia de vesículas claras, redondeadas, que hacen relieve en el contorno celular, e incluso rechazan y deforman la envoltura nuclear. Estas vesículas contienen un material condensado en grumos irregulares o filiformes. Se observan, asimismo, cisternas de retículo endoplasmático cortas y aisladas en el citoplasma, con o sin ribosomas. Es también frecuente la presencia de cuerpos de inclusión, constituidos por un material electrodenso homogéneo y limitado por una membrana (Fig. 6).

Por último, las prolongaciones citoplasmáticas de la microglía son más irregulares y de mayor electrodensidad que en las otras células gliales (Fig. 6).

Discusión

El estudio de los astrocitos fibrosos de los nervios de Lancisi en el toro de lidia, mediante microscopía electrónica de transmisión, nos ha permitido obtener una serie de características morfológicas que coinciden, en gran parte, con las descripciones señaladas por diferentes autores (S.A. Luse, 1956; M.G. Farquhar y J.F. Hartman, 1957; R.L. Schultz y cols., 1957; S.L. Palay, 1958; E. De Robertis y H.M. Gerschenfeld, 1961; R.L. Schultz, 1964; S. Mori y C.P. Leblond, 1969, 1970; R. Griffin y cols., 1972).

A diferencia de las observaciones de Mori y Leblond (1970), que describen tres variedades de oligodendrocitos en el cuerpo caloso de la rata en base a su tamaño y electrodensidad, en nuestro material sólo se ha identificado un tipo celular de tamaño y electrodensidad medias. Sin embargo, hemos hallado diferentes variedades morfológicas de oligodendrocitos atendiendo a la morfología del núcleo, si bien todas estas células comparten el mismo patrón de distribución de la cromatina.

En relación con la microglía, las primeras observaciones acerca de su aspecto multivesicular fueron señaladas por primera vez por Río-Hortega (1920, 1921). Este autor ya destacó la presencia, en la microglía, de abundantes vesículas regularmente esféricas, que por su situación en el citoplasma pueden deformar el contorno nuclear o celular. El gran contenido de vesículas y cuerpos de inclusión en la célula microglial, comparada con los macrófagos de las meninges, es probablemente el resultado de su mayor capacidad fagocitaria (R.R. Sturrock, 1988).

Estas células han sido fácilmente reconocibles mediante microscopía electrónica por su alta electrodensidad núcleo-citoplasmática. Dicha característica, como ha sido señalado (M.G. Farquhar y J.F. Hartmann, 1957), dificulta la delimitación entre ambas estructuras.

Aunque no existen estudios cuantitativos sobre la distribución de la microglía en los nervios de Lancisi, nuestras observaciones demuestran su gran concentración en dicha región. Estos datos podrían relacionarse con la proximidad de las estrías de Lancisi al cuerpo caloso y al septo meníngeo medial, zonas que durante el periodo perinatal poseen un gran contenido en microglía ameboide, y por ello han sido consideradas como las principales fuentes de origen de células microgliales, desde las que emigrarían a otras regiones del sistema nervioso (J. Boya y cols., 1979; E.A. Lingm 1976; J. Boya y cols., 1987; F.L. Jordan y W.E. Thomas, 1988; V.H. Perry y S. Gordon, 1988).

BIBLIOGRAFIA

- ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINDO, A.; RUANO-GIL, D. y COSTA-LLOBET, C. (1988): Etude comparative des stries longitudinales médiales de l'hippocampe (anciennement «nerfs de Lancisi») chez le taureau de combat et le taureau domestique. *Bull. Assoc. Anat.* **72**: 15-19.
- BOYA, J.; CALVO, J. y PRADO, A. (1979): The origin of microglial cells. *J. Anat.* **129**: 177-186.
- BOYA, J.; CARBONELL, A.L.; CALVO, J. y BORREGON, A. (1987): Ultrastructural study on the origin of the rat microglia cells. *Acta Anat.* **130**: 329-335.
- CLODY, M.W. y LOW, F.N. (1974): Scanning electron microscopy of the subarachnoid space in the dog. I. Spinal cord levels. *J. Comp. Neurol.* **153**: 325-368.
- CRAGG, B.G. y HAMLIN, L.H. (1959): Histologic connections and electrical and automatic responses evoked by stimulation of the dorsal fornix in the rabbit. *Exp. Neurol.* **1**: 187-213.
- De ROBERTIS, E. y GERSCHENFELD, H.M. (1961): Submicroscopic morphology and function of glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* **3**: 1-65.
- FARQUHAR, M.G. y HARTMANN, J.F. (1957): Neuroglial structure and relationships as revealed by electron microscopy. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **16**: 18-39.
- GRIFFIN, R.; ILLIS, L.S. y MITCHELL, J. (1972): Identification of neuroglia by light and electron microscopy. *Acta Neuropath.* **22**: 7-12.
- JORDAN, F.L. y THOMAS, W.E. (1988): Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* **13**: 165-178.
- LING, E.A. (1976): Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. *J. Anat.* **121**: 29-45.
- LUSE, S.A. (1956): Electron microscopic observations of the central nervous system. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* **2**: 531-541.
- MORI, S. y LEBLOND, C.P. (1970): Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J. Comp. Neurol.* **139**: 1-30.
- PALAY, S.L. (1958): An electron microscopical study of neuroglia. In: *Biology of neuroglia*, 24-38. Ed. por W.F. Windle. C.C. Thomas. Springfield.
- PERRY, V.H. y GORDON, S. (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS* **11**: 273-277.
- RAISMAN, G.; COWAN, W.H. y POWELL T.P.S. (1965): The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain* **88**: 963-996.
- RAMON Y CAJAL, S. (1893): Estructura del asta de Ammon. *An Soc. Esp. Histo. Nat.* **22**: 53-114.
- RAMON Y CAJAL, S. (1909-1911). *Histologie dy système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine. Paris.
- RIO-HORTEGA, P. del (1920): La microglía y su transformación en células en bastoncito y en cuerpos granulo-adiposos. *Trab. del Lab. de Inv. Biol.* **18**: 37-83.
- RIO-HORTEGA, P. del (1921): Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglía. *Archivos de Neurobiología*. Número extraordinario 50 aniversario: 141-198, 1973. Comunicación presentada en la Real Sociedad Española de Historia Natural, sesión de 2 de febrero de 1921.
- SCHULTZ, R.L.; MAYNARD, E.A. y PEASE, D.C. (1957): Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum. *Am. J. Anat.* **100**: 369-408.
- SCHULTZ, R.L. (1964): Macroglial identification in electron micrographs. *J. Comp. Neurol.* **122**: 281-295.
- STURROCK, R.R. (1988): An electron microscopic study of macrophages in the meninges of the human embryonic nerve. *J. Anat.* **157**: 145-151.

Correspondencia: J. Arroyo Guijarro
 Dept. de Anatomía Humana. Facultad de Medicina.
 Avda. Diagonal, s/n. 08028 Barcelona. España

EFFECTOS DEL EJERCICIO FISICO MODERADO Y PROLONGADO SOBRE LAS GRANULACIONES DE LAS CELULAS MIOEPITELIOIDES

EFFECTS OF PROLONGED MODERATE PHYSICAL EXERCISE ON GRANULATIONS OF MIOEPITHELIOID CELLS

A. CABALLERO¹, J.F. ESCANERO², J.M. LOPEZ-NOVOA³ y S. RODRIGUEZ¹

¹Departamento de Anatomía humana. Colegio Universitario de Soria.
Facultad de Medicina. Valladolid.

²Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Zaragoza.

³Laboratorio de Fisiopatología Renal. Fundación Jimenez Diaz. Madrid.

RESUMEN

En este trabajo se estudia el efecto del ejercicio físico prolongado y moderado sobre la granulación de las células mioepitelioides del aparato yuxtaglomerular del riñón, mediante el cálculo del índice de granulación yuxtaglomerular (IGY). Se utilizan ratas wistar hembras adultas que se entrenan 135 días en los que corren una distancia de 169.961 m. A las 4 horas de la última sesión de ejercicio del programa de entrenamiento se observa un aumento significativo en las ratas entrenadas comparadas con las no entrenadas ($P < 0,05$) del IGY, de las concentraciones plasmáticas de potasio y sodio y, en cambio, no se encuentran diferencias para la osmolalidad.

PALABRAS CLAVE: Aparato yuxtaglomerular, Ejercicio, Sodio, Potasio, Osmolalidad.

SUMMARY

In this paper the effect of prolonged moderate physical exercise on the granulation of the mioepithelioid cells of the juxtaglomerular system, of the kidney, by the calculation of the juxtaglomerular granulation index (JGI). Wistar rats are used adult females who train for 135 days in which they run a distance of 169.961 m. 4 hours after the last exercise session of the training programme a significant increase can be noticed in the trained rats compared with the untrained ones ($P < 0,05$) of the JGI, of the plasmatic concentrations of potassium and sodium and, on the other hand, no differences have been noticed in the osmolality.

KEY WORDS: Juxtaglomerular System, Exercise, Sodium, Potassium, Osmolality

Introducción

Durante el ejercicio hay un aumento de la actividad simpatoadrenal que produce un descenso del flujo renal, inducido principalmente por un aumento de la actividad nerviosa simpática, que se acompaña de un descenso de la tasa de filtración glomerular y de la diuresis (Castenfors, 1977) y, probablemente, de aumento de la reabsorción de sodio (Young y Landsberg, 1979) por desviación de la sangre de las nefronas corticales a las yuxtamedulares, por efecto directo tabular y activación del sistema renina-angiotensina (SRA) (Convertino y cols., 1986). En 1985, Fagard

y cols. señalaron que los niveles alcanzados en sangre por los componentes del SRA después de una sesión de ejercicio eran menores en atletas de resistencia que en personas no entrenadas. Cuando se miden los niveles de este sistema en reposo se observa un descenso de éstos en los entrenados con respecto a los no entrenados. Hespel y cols. (1988) concluyen que los descensos en la actividad de la renina plasmática en reposo, en personas entrenadas con respecto a personas no entrenadas, sólo se da en aquellos sujetos que en el periodo de entrenamiento tienen una importante ganancia de capacidad de ejercicio.

Es bien conocido que la fuente más importante de síntesis y almacenamiento de renina son las células mioepitelioideas del aparato yuxtglomerular del riñón, descrito por Goormaghtigh en 1940. La característica más importante de estas células es la presencia en su citoplasma de granulaciones rodeadas de membrana. Está perfectamente descrito, por diferentes autores (Edelman y Hartroft, 1961; Desermeaus y cols., 1982), que el contenido de estos gránulos es la renina.

A pesar de la gran cantidad de trabajos bioquímicos y fisiológicos que tratan del efecto del ejercicio sobre el sistema renina-angiotensina y su control, no se han encontrado referencias sobre el sustrato morfológico de la síntesis, almacenamiento y liberación de la renina en estas circunstancias. En este trabajo se pretende determinar las variaciones morfológicas de las granulaciones de las células mioepitelioideas, calculando el índice de granulación yuxtglomerular (IGY) (Hartroft y Hartroft, 1953), del aparato yuxtglomerular de los riñones de ratas que realizan un entrenamiento prolongado de ejercicio moderado.

Material y Métodos

Material biológico: En este trabajo se han empleado 13 ratas hembras adultas distribuidas en dos grupos:

a) Un grupo estaba formado por 6 animales que realizaron, en una rueda de correr controlado diseñada por nosotros (Caballero y cols., 1990), 169 sesiones de ejercicio en 135 días, corriendo una distancia total de 169.961 m. En los 15 primeros días se realizaba una sesión diaria de ejercicio a una velocidad de 8,76 m/min. El tiempo de duración de las sesiones en este periodo aumentó desde 15 min a 25 min. Desde el día 16 al 38 la velocidad de carrera fue de 10,95 m/min y en 8 de estos días se realizó doble sesión de ejercicio. A partir del día 39 hasta el final, las sesiones de entrenamiento se realizaron a 13,14 m/min. Veintiocho de estos días tuvieron doble sesión de ejercicio. El tiempo de duración de las sesiones aumento progresivamente desde 25 a 145 min. Cuando en un día se realizaban dos sesiones de ejercicio la suma del tiempo de ambas correspondía al tiempo total de ejercicio que tenía que realizar ese día. El peso medio, \pm el error estándar de la media, de estos animales al comienzo del periodo de ejercicio era de $271,1 \pm 6,24$ g. Al final del periodo el peso medio era de $291,6 \pm 11,9$ g.

b) El otro grupo estaba formado por 7 ratas no entrenadas que fueron utilizadas como grupo control. El peso medio, \pm el error estándar de la media, era de $255,7 \pm 7,5$ g.

Métodos utilizados: Las ratas fueron sacrificadas entre las 16 y 18 horas (de 4 a 6 horas después de la última sesión de ejercicio). Previa anestesia en atmósfera de éter se extraía sangre por una punción cardiaca directa para determinar sodio y potasio por electrodo de ion selectivo mediante un autoanalizador (Astra 4, Beckman). Además se determinaba la osmolalidad plasmática midiendo el descenso del punto crioscópico en un osmómetro (Fiske Osmometer). Se extraían los riñones en los que se practicaba un corte un sentido longitudinal para posteriormente fijarlos en líquido de Smith y teñirlos con la tinción de Bowie modificada (Marquez-Gemar, 1980), con el objeto de teñir las granulaciones, acúmulos de renina, de las células mioepitelioideas de la arteriola aferente y eferente del glomérulo, para posteriormente calcular el IGY.

Métodos estadísticos: Se comprueba mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov que ambos grupos pertenecen a poblaciones cuyas distribución de valores es normal. Posteriormente se analizan sus valores mediante una comparación de medias independientes (Test de Student). Para analizar la presencia de una relación lineal entre las diferentes variables se ha utilizado el coeficiente de correlación.

Resultados

En los dos grupos de animales estudiados se calcula el IGY, se determinan las concentraciones plasmáticas de sodio y potasio y la osmolalidad (tabla 1).

Cuando se comparan los valores de las ratas entrenadas con los de las no entrenadas (t de Student) se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para el IGY (figuras 1 y 2), como se puede observar en los gráficos 1 y 2, y para las concentraciones de sodio y potasio. En cambio, la diferencia no es significativa para la osmolalidad.

Los valores del coeficiente de correlación señalan que no hay ningún tipo de relación lineal entre estas 4 variables.

PARAMETROS MEDIDOS	ENTRENADAS	NO ENTRENADAS	SIGNIFICACION ($P < 0,05$)
IGY	$52,2 \pm 1,2$	$43,6 \pm 3,4$	SI
Na	$145,1 \pm 0,4$	$141,2 \pm 1,1$	SI
K	$5,3 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$	SI
Osm	$300,0 \pm 0,8$	$302,5 \pm 2,7$	NO

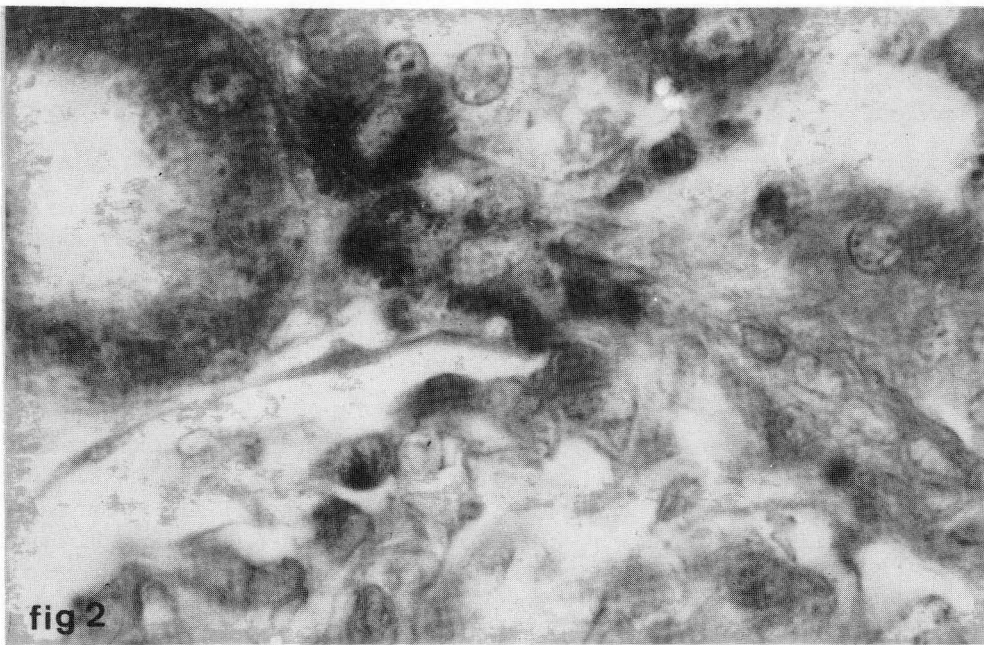
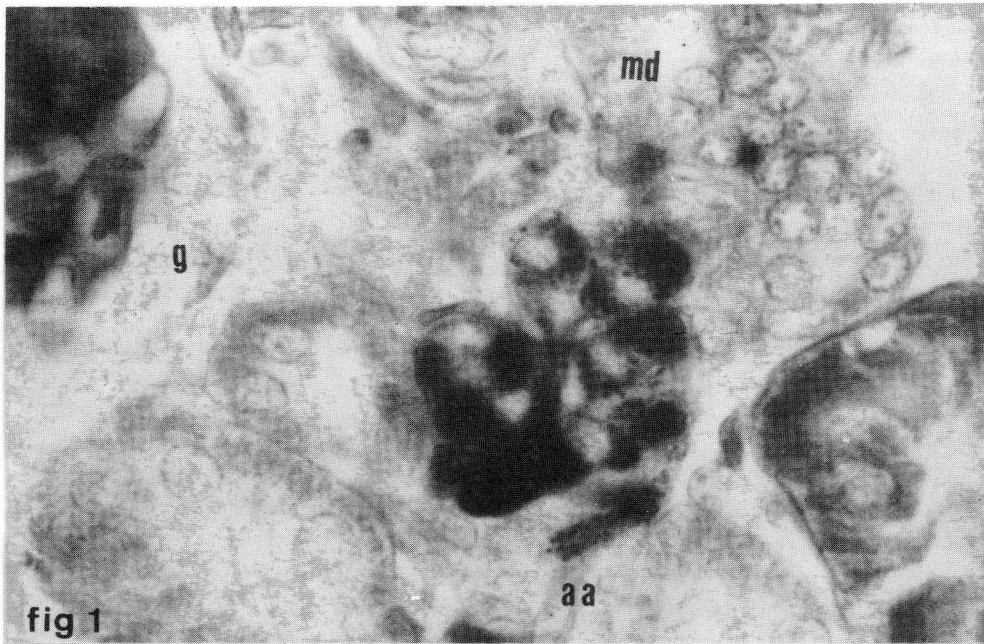
TABLA 1. En los dos grupos de ratas se indican las medias, \pm el error estándar de la media del IGY, de las concentraciones de Na y K en mEq/l y de la osmolalidad en mOsm/Kg.

Discusión

Los datos encontrados en este trabajo indican que existe un aumento de la granulación de las células mioepitelioides del aparato yuxtaglomerular del riñón con el entrenamiento moderado y prolongado. Esto no estaría en concordancia con las concentraciones basales de la renina plasmática, que como señalan, entre otros muchos autores Hespel y cols. (1988), están descendidos en las personas entrenadas respecto a las no entrenadas. En 1978, Winder y cols. señalaron que dicha disminución podría ser debido al descenso del tono simpático hallado en estas personas entrenadas. Salvando las diferencias de especie y si esto es así, por los datos de este trabajo tendríamos que decir que en nuestros animales esa bajada de tono simpático influye sobre la liberación de renina, pero no sobre la síntesis de la misma.

Los resultados sobre la concentración de potasio están en concordancia con los descritos por Wilkerson y cols. (1982) y Carlsson y cols. (1978). Estos autores señalan que el ejercicio produce un aumento de la potasemia, presumiblemente por la liberación del potasio muscular por acción de la contracción. Pero este aumento de potasio debería ir acompañado de un descenso del IGY como indican Rodríguez y cols. en 1976, cosa que no ocurre con el ejercicio.

Es un hecho perfectamente conocido que un aumento de la natremia produce un descenso del IGY (Rodríguez y cols., 1976; Rojo-Ortega, 1976). Estos datos bibliográficos no coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que las ratas entrenadas tenían un aumento significativo del sodio plasmático ($P < 0,05$) y un aumento significativo del IGY ($P < 0,05$). Por lo tanto, durante el ejercicio físico el sodio no actuaría sobre el almacenamiento de la renina.



- FIGURA 1.** Corresponde a un animal entrenado. Observamos en el margen izquierdo una porción del glomérulo (g). En la parte media vemos un grupo de 11 o 12 células epitelioides que corresponden al polo proximal de la arteriola aferente (aa) que se encuentra seccionada longitudinalmente. Se observa dentro de este grupo de células yuxttaglomerulares la diferente carga de las mismas en lo que a granos citoplasmáticos se refiere. La mácula densa (md) se localiza en la parte superior de la microfotografía. Negativo = 1250 aumentos. Tinción = Bowie modificada.
- FIGURA 2.** Corresponde a un animal no entrenado. Vemos en la parte inferior de la figura el glomérulo renal. En la parte media se observan varias células yuxttaglomerulares con diferentes grados de densidad de granulación citoplasmática. Negativo = 1250 aumentos. Tinción = Bowie modificada.

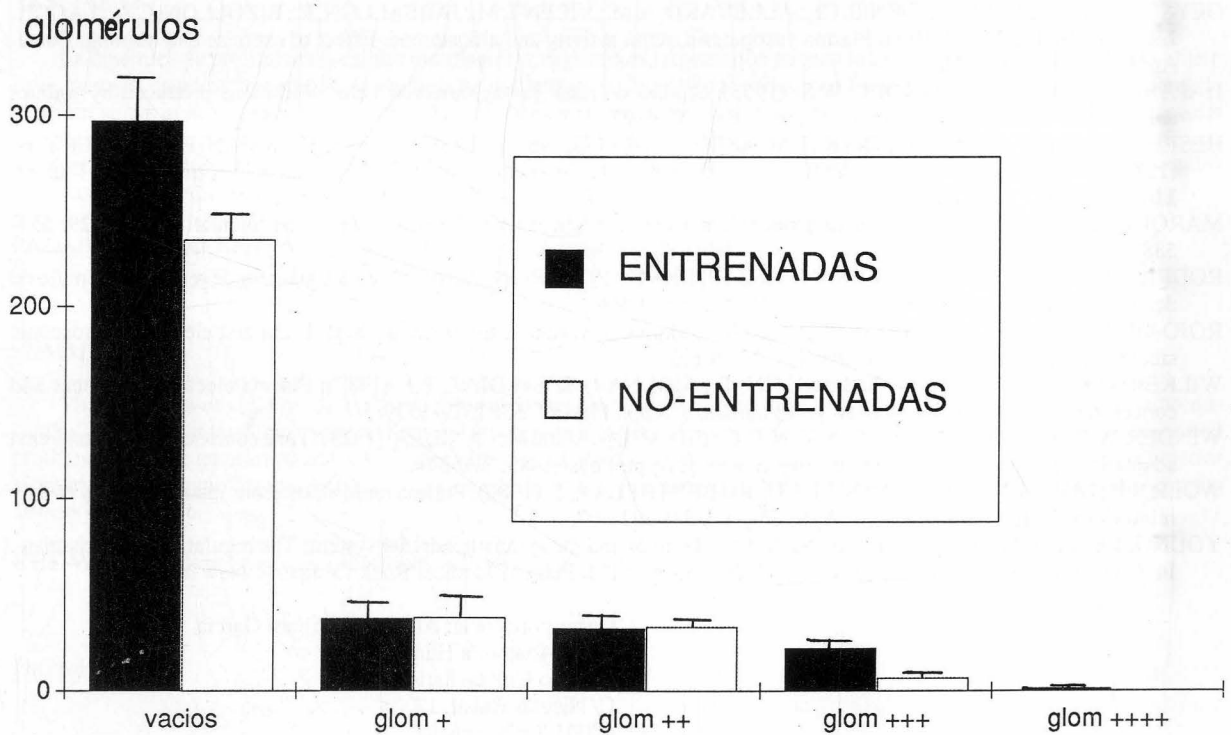
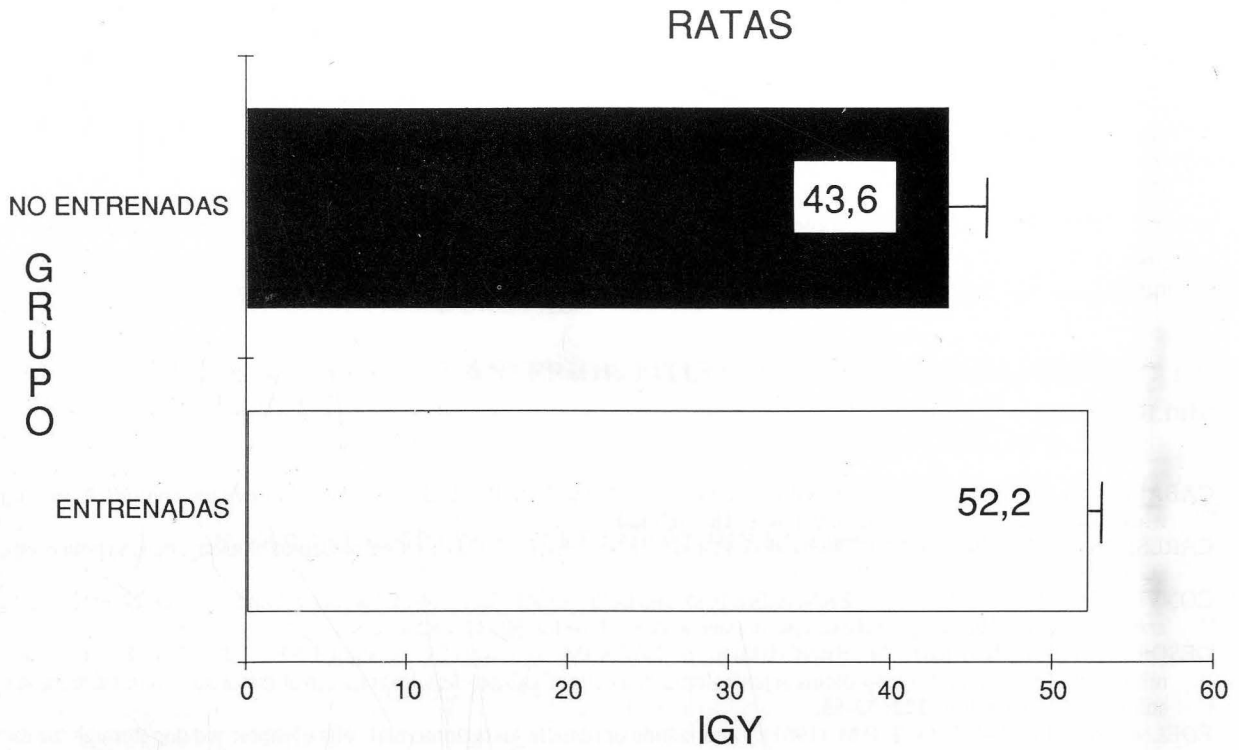


GRAFICO 1. Representación en histograma de frecuencias de las medias, \pm el error estándar de la media, de los IGY alcanzados por las ratas entrenadas y no entrenadas.

GRAFICO 2. Representación en histograma de frecuencias de las medias, \pm el error estándar de la media, de los diferentes grados de granulación en las ratas entrenadas y no entrenadas.

Geysant y cols. (1981) señalan que en humanos no hay diferencias significativas entre la osmolalidad antes y después de los periodos de entrenamiento. Los datos obtenidos de nuestras ratas son similares, ya que no hay diferencias significativas entre la osmolalidad de las ratas entrenadas y no entrenadas.

En conclusión, el ejercicio moderado y prolongado produce un aumento de la granulación de las células mioepitelioides del aparato yuxtaglomerular del riñón, como consecuencia de un aumento del almacenamiento de la renina. Además, aumenta la concentración de potasio y sodio plasmático que permanecen aumentados todavía a las 4 horas de la última sesión de ejercicio. En cambio, la osmolalidad ya está en los niveles basales.

BIBLIOGRAFIA

- CABALLERO, A.; ESCANERO, J.F.; LOPEZ-NOVOA, J.M. and RODRIGUEZ, S. (1990): A low-cost controlled running wheel for small size animals. *Med. Sci. Res.* **18**: 503-504.
- CARLSSON, E.; FELLENIUS, E.; LUNGBORG, P. and SVENSSON, L. (1978): β -adrenoreceptor blockers, plasma potassium, and exercise. *Lancet.* **2**: 424-425.
- CONVERTINO, V.A.; KEIL, L.C.; BERNAUER, E.M. and GEENLEAF, J.E. (1981): Plasma volume, osmolality, vasopressin and renin activity during graded exercise in man. *J. Appl. Physiol.* **50**: 123-128.
- DESORMEAUS, Y.; BALLAK, M.; BENCHIMOL, S.; LACASSE, J.; CANTIN, M. and GENEST, J. (1982): Synthesis and migration of proteins and glycoproteins in juxtaglomerular cells of sodium-deficient rats. An ultrastructural radioautographic study. *Cell. Tissue. Res.* **222**: 53-58.
- EDELMAN, R. and HARTROFT, P.M. (1961): Localization of renin in juxtaglomerular cells of rabbit and dog through the use of fluorescent-antibody technique. *Circulation Res.* **9**: 1069-1077.
- GASTENFORS, J. (1977): Renal function during prolonged exercise. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **301**: 151-159.
- GEYSSANT, A.; GEELEN, G.; DENIS, Ch.; ALLEVAR, A.M.; VICENT, M.; JARSALLON, E.; BIZOLLON, C.A.; LACOR, J.R. and CHARLB, Cl. (1981): Plasma vasopressin, renin activity and aldosterone: Effect of exercise and training. *Eur. J. Appl. Physiol.* **46**: 21-30.
- HARTROFT, P.M. and HARTROFT, W.S. (1953): Studies on renal juxtaglomerular cells. Variations produced by sodium chloride and desoxycorticosterone acetate. *J. Exp. Med.* **97**: 415-428.
- HESPEL, P.; LIJNEN, P.; VAN HOOF, R.; FAGARDF, R.; GOOSSENS, W.; LISSENS, W.; MOERMAN, E. and AMERY, A. (1988): Effects of physical endurance training on the plasma renin-angiotensinaldosterone system in normal man. *J. Endocr.* **116**: 443-449.
- MARQUEZ-GEMAR, J. (1980): El aparato yuxtaglomerular del riñón en animales con anemia experimental. *An. Anat.* **29**: 553-588.
- RODRIGUEZ, S.; ESCANERO, F.J. y SANCHEZ-RUBIO, F. (1976): Respuesta del sistema productor de renina al estímulo de determinados elementos inorgánicos. *An. Anat.* **25**: 579-548.
- ROJO-ORTEGA, J.M. (1976): The yuxtaglomerular complex in various experimental states. Light and electron microscopic studies. Tesis doctoral. McGill University, Montreal.
- WILKERSON, J.E.; HORVATH, S.M.; GUTIN, B.; MOLNAR, S. and DIAZ, F.J. (1982): Plasma electrolyte content and concentration during treadmill exercise in human. *J. Appl. Physiol.* **53**: 1529-1539.
- WINDER, W.W.; HAGBERG, J.M.; HICKSON, R.C.; EHSANI, A.A. and McLANE, J.A. (1978): Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *J. Appl. Physiol.* **45**: 370-374.
- WOLR, J.P.; NGUYEN, N.U.; DUMOULIN, G. and BERTHELAY, S. (1986): Plasma renin aldosterone changes during twenty minutes moderate exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **54**: 602-607.
- YOUNG, J.B. and LANDSBERG, L. (1979): Catecholamines and the sympathoadrenal system: The regulation of mechanism. In: *Contemporary Endocrinology*, Vol. 1. P: 245. Sidney, H.I. Plenum Medical Book Company. New York.

Correspondencia: Alberto Caballero García
Dpto. Anatomía Humana
Colegio Universitario de Soria
C/ Nicolás Rabal, 17
42003 Soria. España

PROLIFERACION CELULAR EN LA HIPOFISIS DE LA RATA: ESPECIAL CONSIDERACION A LAS CELULAS GONODOTROPAS

CELL PROLIFERATION IN THE ANTERIOR PITUITARY: ESPECIAL REFERENCE TO THE GONADOTROPHS

E. CARBAJO-PEREZ¹, S. CARBAJO¹, M. RUBIO² y R. VAZQUEZ¹

Departamento de Anatomía e Histología Humanas.

¹Facultad de Medicina.

²Colegio Universitario de Avila.

Universidad de Salamanca.

RESUMEN

La dinámica de proliferación celular hipofisaria y los distintos factores que pueden intervenir en su control, han sido objeto de numerosos estudios; sin embargo, aún quedan numerosas incógnitas por esclarecer. En el presente trabajo se ha pretendido hacer un sumario actualizado de los datos disponibles sobre proliferación celular en la hipófisis de la rata, haciendo especial hincapié en la proliferación de las células gonadotropas tras la castración. La existencia de una hipotética célula tronco hipofisaria y la participación hipotalámica en el control de la proliferación celular de la adenohipófisis, son los puntos más controvertidos y a ellos hemos dedicado de forma particular nuestra atención.

PALABRAS CLAVE: Hipófisis, células gonadotropas, proliferación, rata.

SUMMARY

The dynamics of cell proliferation and the various mechanisms involved in its control have been the subject of numerous studies. However, some important questions still remain unanswered. This report has been aimed as an up-to-date review on cell proliferation in the anterior pituitary with special reference to the gonadotrophs. Both the existence of a stem cell in the anterior pituitary and, the hypothalamic control of cell proliferation in this gland, have been discussed in detail as the most controversial aspects of the topic.

KEY WORDS: Hypophysis, gonadotrophs cell, proliferation, rat.

Introducción

La actividad proliferativa de la adenohipófisis de la rata adulta es escasa (Addison, 1917; Pomerat, 1941; Hunt, 1943; Stadtler y col., 1970; Inque y col., 1985 y Pérez y col. 1986). Siguiendo la clasificación de los tejidos propuesta por Messier y Leblond (1960), en función de su actividad proliferativa, la adenohipófisis, al igual que otras glándulas endocrinas, puede considerarse dentro del grupo de poblaciones celulares en expansión. En éstas, el número de células marcadas tras la inyección de timidina tritiada es bajo y persistente, oscilando entre un 0,4 y un 1 % del total de la población.

Antes de la introducción de las técnicas inmunocitoquímicas, se admitía que entre los distintos tipos celulares hipofisarios, las células cromóforas eran las que presentaban una mayor actividad mitótica, un 75 a 80 % de las mitosis de la glándula (Pomerta, 1941 y Stadtler y col., 1970). La gran proporción, que del total de la actividad mitótica se asignaba a las células cromóforas, era debida, sin lugar a dudas, a la difícil identificación de pequeñas cantidades de hormona, con lo que el número de células con actividad hormonal era infravalorado. En estudios más recientes, la identificación inmunocitoquímica de las células en proceso de división (Shirasawa y col., 1983). Los mismos autores reseñan las células productoras de GH y Prl son las que presentan un mayor número de mitosis (40 % y 38 % de la población celular hipofisaria, respectivamente), como cabría esperar de la gran proporción que estas células representan dentro de la adenohipófisis, según los datos de Dada y col. (1984). Un 3,8 % de las imágenes de mitosis corresponde a las células gonadotropas y el índice mitótico de las células ACTH y TSH es aún menor (Sakuma y col., 1984).

La ablación de los órganos diana de las hormonas hipofisarias, gónadas, tiroides o glándulas suprarrenales causa hipertrofia e hiperplasia de las células gonadotropas (Addison, 1917; Pomerat, 1941; Farquhar y Rinehart, 1954a e Inoue y Kurosumi, 1981), tireotropas (Farquhar y Rinehart, 1954b y Messier, 1969) y corticotropas respectivamente (Kurosumi y Kobayashi, 1966 y McNicol y col., 1988). El mecanismo (s) por el que un determinado tipo celular prolifera bajo estas circunstancias ha permanecido oscuro durante largo tiempo y aún existen incógnitas por resolver.

Para Inoue y Kurosumi (1981) hay tres posibles fuentes responsables del incremento de la población gonadotropa tras la castración: la división mitótica de células gonadotropas bien diferenciadas; la diferenciación de células inmaduras en células gonadotropas y, la conversión de otros tipos celulares en células gonadotropas. Por otra parte, Childs y col. (1982) han sugerido que el gran incremento de células LH y FSH que se produce en las primeras 24 horas tras la castración puede ser resultado de la transformación de células gonadotropas monohormonales en multihormonales. Estos autores han demostrado que en las primeras 24 horas tras la gonadectomía se produce un notable aumento del número de células gonadotropas que contienen tanto LH como FSH (desde un 70 % en el animal control hasta un 91 %) frente a las que contienen sólo una de las hormonas. De esta forma, un cambio funcional se traduciría en un claro aumento del número de células inmunoreactivas sin que exista de hecho modificación alguna en la densidad numérica de la población gonadotropa hipofisaria.

El incremento de la actividad proliferativa de las células gonadotropas tras la castración, se ha demostrado por el aumento en el número de éstas que incorporan timidina tritiada—células en fase de síntesis de DNA— (Stadtler y col., 1970 e Inoue y Kurosumi, 1981) y por el aumento de figuras de metafase tras el bloqueo del proceso mitótico con colchicina (Pomerat, 1941; Sakuma y col., 1984; Inoue y col., 1985 y Sakai y col., 1988).

La existencia de una estirpe de células tronco hipofisarias, aunque sugerida por varios investigadores, no ha podido ser ni demostrada ni descartada. Esta hipotética estirpe celular cobra especial importancia cuando se consideran situaciones que inducen hiperplasia hipofisaria, así como durante los periodos embrionario y postnatal.

Yoshimura y col., (1977) sugirieron que las células folículo estrelladas (FS) podrían ser identificadas como la célula tronco en la hipófisis de la rata, ya que tendrían capacidad tanto de proliferación como de diferenciación, manteniéndose un balance entre estas dos funciones. Leatherland y Renfree (1982) obtuvieron evidencia indirecta en apoyo de esta hipótesis trabajando en la hipófisis de marsupiales jóvenes. Shirasawa y col., (1984) han referido una particular relación entre las células FS y las gonadotropas tras la castración. Otros autores han señalado a las células FS como el posible origen de fibras musculares estriadas que aparecen tanto en homotransplantes hipofisarios (Inoue y col., 1987) como en cultivo monocapa de dispersados celulares hipofisarios (Watanabe, 1989); no obstante, Apira y col. (1988) invocan la existencia de una estirpe celular pluripotencial como el origen de estas fibras.

Estudios recientes desmienten el carácter indiferenciado de las células FS, para las que Amat y Boya (1973) habían sugerido una función similar a la de otras células glandulares. Se ha probado que las células FS producen proteína S-100 (Cocchia y Miani, 1980 y Shirasawa y col., 1983), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Ferrara y col., 1987) e interleukina-6 (Wankelecom y col., 1989), y está extensamente documentada su participación en el control de la secreción hipofisaria (Allaerts, 1989).

El papel de estirpe progenitora de las células FS, si cabe hablar de tal, podría estar prácticamente restringido al desarrollo postnatal. La actividad proliferativa de las células hipofisaria durante el periodo postnatal precoz es mantenida fundamentalmente por células *inmunonegativas* (Shirasawa y Yoshimura, 1982 y Carabajo-Perez y col., 1989). La contribución de estos elementos inmunonegativos a la actividad proliferativa global de la PD disminuye a lo largo del primer mes de vida, a la vez que aumenta la proliferación de las células inmunonegativas,

principalmente al suero anti-GH (Shirasawa y Yoshimura, 1982 y Carbajo-Pérez y col., 1989). Se ha discutido mucho sobre la identificación de estas células inmunonegativas, considerándose la posibilidad de que sean células FS (Carbajo-Pérez y col., 1989). Las primeras células FS reactivas al suero anti-S-100 aparecen en la PD de la rata hacia finales de la segunda semana postnatal, aumentando en número e intensidad de tinción de forma progresiva hasta la madurez (Shirasawa y col., 1983). Estos autores sugirieron que la actividad mitótica de las células FS disminuiría a medida que se diferenciaban en células productoras de proteína S-100. En un estudio reciente por Carbajo-Pérez y Watanabe (enviado a publicar), no se han podido encontrar células marcadas con bromodesoxiuridina (células en fase S) que simultáneamente reaccionen con suero anti S-100, confirmando de esta manera la hipótesis de Shirasawa y col. (1983) por la que la función de las células FS como células progenitoras sería muy limitada en el animal adulto.

La función de células progenitoras se ha atribuido también a otros tipos celulares. Así, Gon y col. (1988) han descrito la existencia de células G-C (granuladas y ciliadas), y sugieren para ellas una función de *células intermedias* durante el desarrollo ontogénico de la hipófisis de la rata. Recientemente Borrelli y col. (1989) refieren la existencia de una célula tronco mammosomatotropa que desarrolla su función esencialmente en los primeros días de vida, pero que también está presente en la hipófisis del animal adulto.

El incremento de la actividad proliferativa hipofisaria tras la castración parece ser un proceso autolimitado. Tras alcanzar el máximo a las dos semanas, desciende considerablemente a partir del primer mes y regresa a valores normales hacia el segundo mes tras la orquidectomía (Stadtler y col., 1970 e Inoue y col., 1980). Durante este periodo, no sólo aumenta el número de células en división, sino que también se acelera el ritmo de síntesis de DNA (acortamiento de la fase S aproximadamente a la mitad) y además es posible una disminución de la duración de la fase G2 (descanso premitótico) y de la duración del propio proceso de mitosis (Stadtler y col., 1970).

No hay acuerdo en cuanto a los tipos celulares implicados en el aumento de la actividad proliferativa hipofisaria tras la castración. Inoue y Kurosumi (1981), Romano y col. (1984) e Inoue y col. (1985) describieron que, como consecuencia de la gonadectomía, no sólo aumenta el número de mitosis en las células que no reaccionan frente al suero anti LH. Inoue y col. (1985) argüan que el incremento del porcentaje de gonadotropas de un 5,4 % a un 8,4 % de la población hipofisaria (de un 9 % a un 14 % par Childs y col. (1982) no justifica el incremento en el contenido hipofisario de DNA y el aumento de peso de la glándula tras la castración (no debe ser olvidada, al valorar el peso hipofisario, la importante hiperhemia postcastración, descrita ya por Addison en 1917. Otros autores no refieren cambios en el índice mitótico global de la PD tras la castración, aunque exista un aumento del número de mitosis en las células gonadotropas (Pomerat, 1941; Sakuma y col., 1984 y Sakai y col., 1988). En nuestra experiencia, el número de células marcadas con BrDU en la hipófisis del ratón dos semanas después de la castración (27,8 células/mm² es similar al de los ratones controles (28,6 células/mm²) (Carbajo-Pérez, observaciones no publicadas).

Las modificaciones de la actividad mitótica que siguen a la castración parecen afectar al balance entre las células gonadotropas y las células productoras de prolactina, si se tienen en cuenta los datos aportados por Sakuma y col. (1984) y Sakai y col. (1988) (Tabla 1).

Ninguno de estos autores describe modificaciones en el número total de mitosis ni en la proporción de figuras mitóticas en las células GH.

Los esteroides gonadales actúan básicamente activando la proliferación celular hipofisaria. Esta, varía durante el ciclo estrual con valores máximos en el día del estro (Hunt, 1943 y Hunt y Hunt, 1966) y la administración de estrógenos eleva el índice mitótico de la hipófisis (Hunt, 1947 y Pérez y col., 1986). Esta acción estimuladora parece tener lugar sobre las células de prolactina (Takahashi y col., 1984; Pérez y col., 1986 y Osamura 1988). Es por tanto de esperar que la castración, que sigue de una caída radical de los niveles de estrógenos, lleve consigo una disminución del número de mitosis de las células Prl. El índice mitótico global de la PD no se afecta por el gran incremento de la actividad mitótica que experimentan las células gonadotropas.

Los mecanismos a través de los que la castración estimula la actividad mitótica de las células gonadotropas no están plenamente esclarecidos. La disminución de los esteroides sexuales circulantes es, sin lugar a duda, el factor desencadenante. Esto se confirma al inhibirse el incremento de la actividad mitótica en las células gonadotropas inducida por la castración mediante la terapia sustitutiva con esteroides sexuales (Romano y col., 1984 e Inoue y col., 1986).

La intervención de algunas de las hormonas hipotalámicas en el control de la proliferación de las células hipofisarias ha sido ampliamente documentada. La actividad mitótica de la PD aumenta en la rata tras la administración de TRH, aumentando al mismo tiempo la proporción de mitosis correspondiente a las células basófilas (Kunertradeck y Pawlikowsky, 1975). El tratamiento prolongado con CRF (Gertz y col., 1987) induce un incremento

del número de células ACTH y aumento selectivo de la actividad mitótica de estas células (McNicol y col., 1988). Por otra parte, la administración de CRF potencia el efecto activador de la AVP sobre la proliferación celular en cultivos primarios hipofisarios (McNicol y col., 1989). El tratamiento prolongado con GRF aumenta el porcentaje de células somatotropas que captan timidina tritiada y la proporción de estas células en el conjunto de la población hipofisaria (Billestrup y col., 1986). Alteraciones en el sistema dopaminérgico pueden aumentar (mediante el bloqueo de los receptores de la dopamina con pimozide) o disminuir (mediante la administración de bromocriptina, agonista dopaminérgico) la actividad mitótica hipofisaria (Stepien y col., 1978). Sin embargo, la administración de LHRH se revelaba sin efecto en la actividad mitótica de las células gonadotropas (Inoue y col., 1986) o inducía una disminución de la captación de timidina tritiada por estas células tras ser añadida a cultivos hipofisarios (Stepien, 1981). La participación de la LHRH en el control de la actividad proliferativa de las células gonadotropas ha sido recientemente documentada por Sakai y col. (1988). Estos autores demostraron que la administración de suero anti LHRH a ratas castradas reducía a valores normales la actividad mitótica de las células gonadotropas. De esta forma quedaba establecido que la LHRH es un eslabón imprescindible para el desarrollo de la hiperplasia de las células gonadotropas tras la castración.

Con este trabajo hemos pretendido hacer una revisión del estado actual del conocimiento sobre la proliferación celular en la hipófisis de la rata. La respuesta a importantes cuestiones permanecen aún en el campo de lo especulativo. La identificación de una célula tronco hipofisaria es aún por muchos considerada como una quimera. Por otra parte, el estudio del control hipotalámico de la proliferación celular de la adenohipófisis presenta grandes atractivos, especialmente en relación con la génesis, desarrollo y posible control de tumores hipofisarios hormonodependientes. En los últimos años se han descrito nuevas técnicas para el estudio de la proliferación celular tanto *in vivo* como *in vitro* mediante métodos inmunocitoquímicos (Gratzner, 1982, Raza y col., 1984 y Wynford-Thomas y Williams, 1986). Estas técnicas, sencillas, rápidas y poco costosas han probado ser útiles para el estudio de la dinámica de proliferación celular en la hipófisis. Es de esperar que su perfeccionamiento contribuya a esclarecer alguna de las lagunas que aún existen en el control de la proliferación celular en la hipófisis.

TABLA 1

% Mitosis

	Control	Castrado	Control	Castrado
Gonadotropas	3,5 %	17,9 %	2,0 %	20,8 %
Células Prl.	38,6 %	16,7 %	35,3 %	13,7 %
	SAKUMA y col. (1984)		SAKAI y col. (1988)	

Proporción correspondiente a las células gonadotropas y productoras de prolactina del total de células en mitosis en ratas normales y castradas tras la administración de colchicina.

BIBLIOGRAFIA

- ADDISON, W.H.F. (1917): The cell-changes in the hypophysis of the albino rat after castration. *J. Comp. Neurol.* **28**: 441-463.
- ALLAERTS, W. (1988): Involvement of follicle-stellate cells in inhibitory interactions in rat anterior pituitary. A morpho-functional study *in vitro*. *Acta Biomédica Lovainesa*. Leuven University press.
- AMAT, P. y BOY, J. (1973): Ultrastructural observations on the genesis and extrusion of secretory granules in the adenohipophysis. *Acta. Anat. (Basel)*. **86**: 44-52.
- BILLESTRUP, N.; SWANSON, L.W. y VALE, W. (1986): Growth hormonereleasing factor stimulates proliferation of somatotrophs *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 6.854-6.857.
- BORREL, E.; HEYMAN, R.A.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P.E. y EVANS, R.M. (1989): Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature*. **395**: 583-541.
- CARBAJO-PEREZ, E.; MOTEGI, M. y WATANABE, Y.G. (1989): Cell proliferation in the pituitary gland of adult rat. *J. Neurocytology*. **9**: 275-281.

- COCCIA, D. y MIANI, N. (1980): Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J. Neurocytology*. **9**: 275-281.
- CHILDS, G.V.; ELLISON, D.G.; LIRENZEN, J.R.; COLLINS, T.J. y SCHWARTZ, N.B. (1982): Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. *Endocrinology*. **111**: 1.313-1.328.
- DADA, M.O.; CAMPBELL, G.T. y BLAKE, C.A. (1984): Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rat. *J. Endocrinol.* **101**: 87-94.
- FARQUHAR, M.G. y RINEHART, J.F. (1954a): Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology*. **54**: 516-541.
- FARQUHAR, M.G. y RINEHART, J.F. (1954b): Cytology alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: An electron microscopy study. *Endocrinology*. **55**: 857-875.
- FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G.; MITCHELL, R. y GOSSPODAROWICA, D. (1987): Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 381-288.
- GERTZ, B.J.; CONTRERAS, L.N.; McCOMB, J.; KOVACS, K.; TYRREL, J.B. y DALLMAN, M.F. (1987): Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. *Endocrinology*. **120**: 381-388.
- GON, G.; OHTAKE, R. e ISHIKAWA, H. (1988): Granular, ciliated cells in the anterior pituitaries of immature rats. *Cell Tissue Res.* **253**: 683-684.
- GRATZNER, H.G. (1982): Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. **218**: 474-475.
- HUNT, T.E. (1974): Mitotic activity in the anterior hypophysis of ovariectomized rats after injection of estrogens. *Anat. Rec.* **97**: 127-137.
- HUNT, T.E. y HUNT, E.A. (1966): A radiographic study of the proliferative activity of adrenocortical and hypophyseal cells of the rat at different periods of the estrous cycle. *Anat. Rec.* **156**: 361-368.
- IBRAHIM, S.M.; MOUSSA, S.M. y CHILDS, G.V. (1986): Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation and changes in gonadotropes with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology*. **119**: 629-637.
- INOUE, K. y KUROSUMI, K. (1981): Mode of proliferation of gonadotropic cells of the anterior pituitary after castration. Immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch. Histol. Jap.* **44**: 71-85.
- INOUE, K.; TANAKA, S. y KUROSUMI, K. (1985): Mitotic activity of gonadotropes in the anterior pituitary of the castrated male rat. *Cell Tissue Res.* **240**: 271-276.
- INOUE, K.; ISHIKAWA, K. y TANAKA, S. (1986): Proliferation of gonadotrophs in castrated male rat anterior pituitary of the castrate male rat anterior pituitary. En: *Pars distalis of the pituitary gland - Structure, Function and Regulation*. (Yoshimura, F. y Gorbman eds.). Elsevier Science Publishers, B.V. pp. < 125-131.
- INOUE, K.; TANIGUCHI, Y. y KUROSUMI, K. (1987): Differentiation of striated muscle fibers in pituitary gland grafts transplanted beneath the kidney capsule. *Arch. Histol. Japn.* **50**: 567-578.
- KUNERT-RADEK, J. y PAWLIKOSKI, M.H. (1975): The effect of thyrotropin releasing hormone on cell proliferation in the anterior pituitary gland of thyroidectomized rats. *Neuroendocrinology*. **17**: 92-95.
- KUROSUMI, 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.
- LEATHERLAND, J.F. y RENFREE, M.B. (1982): Ultrastructure of the nongranulated cells and morphology of the extracellular spaces in the pars distalis of adult and pouch-young tammar wallabies (*Macropus eugenii*). *Cell Tissue Res.* **227**: 439-450.
- MESSIER, B. (1969): Effect of exogenous thyroxine on ³H-Thymidine uptake in mouse pituitary gland. *Acta Endocrinol.* **61**: 133-136.
- MESSIER, B. y LEBLOND, C.P. (1960): Cell proliferation and migration as revealed by autoradiography after injection of Thymidine-³H into male rats and mice. *Am. J. Anat.* **106**: 247-285.
- McNICOL, A.M.; KUBBA, M.A.G. y McTEUGUE, (1988): The mitogenic effects of corticotrophin-releasing factor on the anterior pituitary gland of the rat. *J. Endocrinol.* **118**: 237-241.
- McNICOL, A.M.; MURRAY, J. y McMEEKIN, W. (1989): The effects of AVP and CRF-41 on DNA synthesis in rat pituitary cells in vitro. *J. Endocr. Invest.* **12**: (suppl. 2 to 5) p. 114.
- OSAMURA, R.Y. Immunohistochemical observations of prolactin (PRL) and proliferative activity of rat pituitary cell: effects of estrogen and bromocriptine. En: *Kioto Prolactin Conference Monograph* (Koshino K. Editor). Kyoto, Japan, 1988. Vol. 3. pp.: 121-127.
- PEREZ, R.L.; MACHIAVELLI, G.A.; ROMANO, M.I. y BURDMAN, J.A. (1986): Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats. *J. Endocrinol.* **108**: 399-403.
- POMERAT, G.R. (1941). Mitotic activity in the epuitary of the white rat following castration. *Am. J. Anat.* **69**: 89-121.
- RAZA, A.; PREISLER, H.D.; MAYERS, G.L. y BANKERT, R. (1984): Rapid enumeration of S-phase cells by means of monoclonal antibodies. *New Engl. J. Med.* **310**: 991.
- ROMANO, M.I.; MACHIAVELLI, G.A.; PEREZ, R.L.; CARRICATE, V. y BURDMAN, J.A. (1984): Correlation between LH secretion in castrate rats with cellular proliferation and synthesis of DNA in the anterior pituitary gland. *J. Endocr.* **102**: 13-18.
- SKAY, T.; INUE, K.; HASEGAWA, Y. y KUROSUMI, K. (1988). Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on the mitotic activity of gonadotropes in castrated male rats. *Endocrinology*. **122**: 2.803-2.808.

- SAKUMA, S.; SHIRASAWA, N. y YOSHIMURA, F. (1984): A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophyseal cells in immature and mature castrated rats. *J. Endocrinol.* **10**: 323-328.
- SHIRASAWA, N. y YOSHIMURA, F. (1982): Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohypophysial cells in different ages of rats. *Anta. Embriol.* **165**: 51-61.
- SHIRASAWA, N.; KIHARA, H.; YAMAGUCHI, S. y YOSHIMURA, F. (1983): Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res.* **231**: 235-249.
- SPIRA, O.; ATZMON, R.; RAHAMIM, E.; BAR-SHAVIT, R.; GROSS, J.; GORDON, A. y VLODAVSKY (1988). Striated muscle fibers differentiate in primaty cultures of adult anterior pituitary cells. *Endocrinology.* **122**: 3.002-3.004.
- STADLER, F.; STOCKER, E.; DHOM, G. y TIETZE, H.U. (1970): Autoradiographic studies on nuclear DNA synthesis in the adenohypophysis of castrated rats. *Acta Endocrinol.* **64**: 324-338.
- STEPIEN, H. (1981): LHRH inhibits ³H-Thymidine incorporation by pituitary cells cultured in vitro. *Endocrinology.* **109**: 1.784-1786.
- STEPIEN, H.; VOLANIUK, A. y PAWLIKOWSKI, M. (1978): Effects of pimozide and bromocriptine on anterior pituitary cell proliferation. *J. Neural. Transmission.* **42**: 232-244.
- TAKAHASHI, S.; OKAZAKI, K. y KAWASHIMA, S. (1984): Mitotic activity of prolactin cells in the epuitary glands of male and female rats of different ages. *Cell Tissue Res.* **235**: 497-502.
- WANKELEKOM, J.P.; CARMELIET, P.; VAN DAMME, J.; BILLIAU, A. y DENEUF, C. (1989): Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histotypic cell agregate culture system. *Neuroendocrinol.* **49**: 102-106.
- WATANABE, Y.G. (1989): Differentiation of striated muscle fibers in monolayer cultures of rat anterior pituitary. *Develop. Growth. and Difer.* **31**: 219-225.
- WINDFOERD-THOMAS, D. y WILLIAMS, E.D. (1986): Use of bromodeoxyuridine for cell kinetic studies in intact animals. *Cell Tissue Kinet.* **19**: 179-182.
- YOSHIMURA, F.; SOJI, T.; SATO, S. y TOKOYAMA, M. (1977): Developement and diferentiation of rat pituitary follicular cells under normal and some experimental conditions with special reference to an interpretation of renewal cell system. *Endocrinol. Japon.* **24**: 435-449.

Correspondencia: E. Carbajo Pérez
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina.
Campo Charro, s/n.
37007 Salamanca. España

EFFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA COMPOSICION FIBRILAR DEL MUSCULO VASTO LATERAL

EFFECTS OF TRAINING ON FIBRE COMPOSITION OF THE VASTUS LATERALIS MUSCLE

J.L. MORALES LOPEZ, E. AGÜERA, J.G. MONTERDE y J.L. LOPEZ RIVERO

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

RESUMEN

Se utilizan 72 ratas adultas de la cepa Wistar, que se distribuyen para su estudio en siete grupos. Cada grupo se somete a diferentes protocolos de ejercicios de velocidad y resistencia, permaneciendo el primer grupo como lote control. Las muestras, tomadas del Vasto lateral, son teñidas con la técnica histoquímica de m-ATPasa, que permite controlar la población fibrilar de las fibras tipo I, IIA y IIB, así como con la técnica oxidativa NADH-TR, para cuantificar las variaciones en los porcentajes de fibras FT. En la experiencia se observa que con los programas de entrenamiento aplicados no se produce variación estadística en el porcentaje de fibras tipo I del Vasto lateral. Sin embargo, las fibras tipo IIA tienden a aumentar significativamente, al contrario que las fibras IIB, que disminuyen. Las fibras FT disminuyen claramente en todos los casos. Esta disminución se produce con mayor celeridad con el que lo hace las fibras tipo IIB. Al considerar estas variaciones en relación a la duración del entrenamiento y a la distancia total recorrida, los individuos de los grupos que realizaron entrenamiento de velocidad ofrecieron una adaptación fibrilar más rápida, siendo progresivo este hecho en los grupos de resistencia.

PALABRAS CLAVE: Histoquímica, músculo, entrenamiento, rata.

SUMMARY

Seventy-two adult Wistar rats were divided into seven groups for experimentation. Each group underwent a different speed and endurance training programme, except the first group, which was used as a control. Samples of Vastus lateralis muscle were stained with m-ATPase to determine the proportion of type I, IIA and IIB fibres, and with NADH-TR in order to quantify variations in FT fibres percentages. The results showed that the training programmes implemented did not lead to statistical variations in the percentage of type I fibres in the Vastus lateralis. However, the proportion of IIA fibres rose significantly, whereas that of type IIB fibres fell. The clear decrease noted in FT fibres in all cases occurred more rapidly than the decrease in type IIB fibres. Analysis of these variations in terms of the duration of training and the total distance covered showed that fibre adaptation was faster in groups undergoing speed training, and progressive in groups undergoing speed training, and progressive in groups undergoing endurance training.

KEY WORDS: Histochemistry, muscle, training, rat.

Introducción

La gran plasticidad del músculo esquelético ha sido demostrada mediante procedimientos experimentales (inervación cruzada, hipogravidad, estimulación eléctrica, etc.). A pesar de ello, cambios extremos similares a éstos no han podido ser provocados por los métodos convencionales de entrenamiento (Bagby et al., 1972; Salmóns y Henriksson, 1981; Snow, 1983). No obstante, debe tenerse en cuenta que la magnitud de las adaptaciones del tejido muscular esquelético están relacionadas con el grado de estímulo aplicado por los ejercicios de entrenamiento.

En cualquier caso, las variaciones que se producen en el tejido muscular tras el entrenamiento dependen fundamentalmente de cada músculo, del tipo de entrenamiento al que es sometido (carrera, natación, sobrecarga estática, etc.) y de la intensidad y/o duración del mismo. Así, muchos investigadores han utilizado programas de entrenamiento de resistencia, con fuerte componente aeróbico (Jansson y Kaijser, 1977; Dudley et al., 1982; Green et al., 1984; Essén-Gustavsson y Lindholm, 1985), pero son escasos los que han considerado los efectos del entrenamiento de velocidad, con un mayor componente de trabajo anaeróbico (Saubert et al., 1973; Jansson et al., 1978; Dudley et al., 1982).

Las diferencias entre las modalidades de resistencia y velocidad se establecen en relación a los parámetros duración-intensidad del ejercicio programado (Herbison y Gordon, 1973; Jaweed et al., 1974). De esta forma, el ejercicio de resistencia sería aquel de baja intensidad y larga duración y el de velocidad el de alta intensidad y corta duración. El límite entre ambas modalidades de ejercicio de carrera sería celular, exigiendo, en el ejercicio de velocidad, el uso de rutas metabólicas anaeróbicas (Shepherd y Gollnick, 1976).

Así, en el presente estudio hemos determinado los efectos sobre la composición fibrilar utilizado de dos modalidades de entrenamiento -velocidad y resistencia-, aplicando diferente protocolos de ejercicio en cada uno de estos bloques. Hemos elegido el Vasto lateral del músculo Cuádriceps femoral, un músculo de eminente contracción rápida y de gran protagonismo en la protracción del miembro pelviano tras la consiguiente flexión de la rodilla.

Material y Métodos

En la experiencia se han utilizado 72 ratas adultas (de veinte semanas de edad en el momento del sacrificio) de la cepa Wistar de ambos sexos, de un peso corporal medio de 230 gr y 350 gr para hembras y machos, respectivamente. La alimentación (granulado comercial) y el agua fue suministrada ad libitum. Después de un periodo de aclimatación de una semana, los animales se distribuyeron en siete grupos. Cada grupo quedó constituido por doce animales -mitad hembras y mitad machos-, excepto los grupos VI y VII que estuvieron conformados por seis ratas cada uno.

Los animales del grupo I permanecieron en reposo durante toda la experiencia (lote control). Los restantes grupos se sometieron a diferentes programas de ejercicios de carrera utilizando un traedmill (Letica), aplicando una pendiente de 0° (grupos II y III: grupos de velocidad) o 5° (grupos IV, V y VI: entrenamiento de resistencia). Los animales del grupo II realizaron cinco carreras diarias de un minuto a intervalos de reposo de un minuto; la velocidad fue incrementada progresivamente desde 35 m/min la primera semana hasta 55 m/min la cuarta. Las ratas del grupo III fueron sometidas a cuatro carreras diarias de un minuto de duración a intervalos de reposo de un minuto, a una velocidad constante de 55 m/min la cuarta. Las ratas del grupo III fueron sometidas a cuatro carreras diarias de un minuto de duración a intervalos de reposo de un minuto, a una velocidad constante de 55 m/min durante las cuatro semanas que duró la experiencia. Los individuos del grupo de IV realizaron una carrera diaria de diez minutos durante un periodo de dos semanas. Los animales del grupo V realizaron inicialmente el mismo programa de ejercicio del grupo IV, continuando durante dos semanas más realizando una carrera diaria de veinte minutos. Las ratas del grupo VI realizaron igual protocolo que el grupo V, continuando durante otras dos semanas realizando una carrera diaria de treinta minutos de duración. En estos grupos la velocidad aplicada fue de 30 m/min. Finalmente, los animales del grupo VII (entrenamiento mixto) se sometieron al mismo protocolo del grupo V, continuando durante dos semanas realizando el programa del grupo III.

Finalizado el programa de entrenamiento para cada grupo se procedió al sacrificio de los animales, empleándose cloroformo administrado mediante sobredosificación inhalatoria. Las muestras –tomadas del Vasto lateral del músculo Cuádriceps femoral del miembro derecho a mitad del vientre muscular– se someten a congelación ultrarrápida mediante el método propuesto por Dubowitz y Brooke (1973), procediéndose a continuación a la obtención cortes seriados de 10 μ m de grosor en un criostato a -20°C. Estos cortes fueron teñidos por adenosín trifosfatasa miofibrilar (m-ATPasa) a pH 9.4 tras preincubación ácida a pH 4.4 (Brooke y Kaiser 1970), evaluando, así, la capacidad contráctil celular (Bárany, 1967). La capacidad oxidativa de las fibras fue valorada mediante la técnica nicotinamida adenina dinucleótido-tetrazolium reductasa (NADH-TR) (Novikoff et al., 1961).

Las fibras musculares fueron clasificadas en tipos I (de tonalidad oscura), IIA (claras) y IIB (intermedias) (figura 1a) según su actividad m-ATPasa (Brooke y Kaiser, 1970). En el corte teñido con NADH-TR (figura 1b) se cuantificaron a las fibras que mostraban «alta» o «baja» capacidad oxidativa (Davies y Gunn, 1972). Las fibras con baja capacidad oxidativa se corresponde con las fibras de contracción rápida y baja capacidad oxidativa (Snow y Guy, 1980), fibras llamadas FT por Lindholm y Piehl (1974). Una vez identificadas las tres porciones musculares que se consideran en el Vasto lateral (Armstrong y Phelps, 1984), se escogió para el estudio cuantitativo la porción mixta del mismo, calculando un mínimo de 500 fibras.

Los resultados cuantitativos se expresan como medias (\pm desviación típica, Sd). Las diferencias entre grupos confrontados fueron valoradas mediante las pruebas F de Snedecor y T de Tukey (SAS Institute Inc, 1982).

Resultados

Los análisis preliminares evidenciaron ausencia de diferencias estadísticas entre sexos en la composición fibrilar de este músculo, por lo que en los sucesivos análisis las hembras y los machos se han considerado conjuntamente.

Los datos obtenidos en cada grupo se muestran en la tabla 1. En la tabla se adjunta los resultados correspondientes al análisis de varianza realizado entre grupos para cada tipo fibrilar. Los porcentajes de fibras tipo I no han variado significativamente con los diferentes programas de entrenamiento. Sin embargo, las fibras IIA aumentan con significación estadística ($P < 0,5$) en su presencia prácticamente en todos los casos. Por el contrario, las fibras IIB disminuyen. En el Vasto lateral de los individuos del grupo VII -que realizó entrenamiento de tipo mixto- donde estas variaciones estadísticas se expresan más ampliamente. Las fibras FT disminuyen significativamente en todos los casos.

VARIABLE	A T P asa			NADH-TR
	GRUPOS	% Tipo I	% Tipo IIA	% Tipo IIB
Grupo I	2.7 \pm 1.3	23.7 \pm 1.3	73.4 \pm 2.1	37.8 \pm 2.4
Grupo II	2.8 \pm 1.3	26.2 \pm 2.1	71.0 \pm 2.5	29.3 \pm 1.3 ^A
Grupo III	3.5 \pm 1.7	27.6 \pm 1.3 ^A	68.9 \pm 1.4 ^A	27.4 \pm 1.2 ^{AB}
Grupo IV	3.2 \pm 1.2	26.2 \pm 2.4 ^A	70.2 \pm 2.5 ^A	32.6 \pm 1.5 ^{ABC}
Grupo V	3.1 \pm 1.3	27.5 \pm 1.8 ^A	69.4 \pm 1.9 ^A	29.9 \pm 1.8 ^{ACD}
Grupo VI	4.0 \pm 0.6	29.3 \pm 2.3 ^{AB}	66.7 \pm 2.6 ^{AB}	25.2 \pm 1.4 ^{ABCD}
Grupo VII	3.9 \pm 1.4	31.0 \pm 3.4 ^{ABCDE}	65.1 \pm 4.0 ^{ABCDE}	24.7 \pm 1.5 ^{ABCDE}

Los índices A, B, C, D y E indican diferencia significativa con los grupos I, II, III, IV y V, respectivamente

TABLA 1. Resultados del análisis de varianza desarrollado para estudiar las diferencias existentes entre grupos respecto a las variables que contemplan la población fibrilar (media \pm Ds).

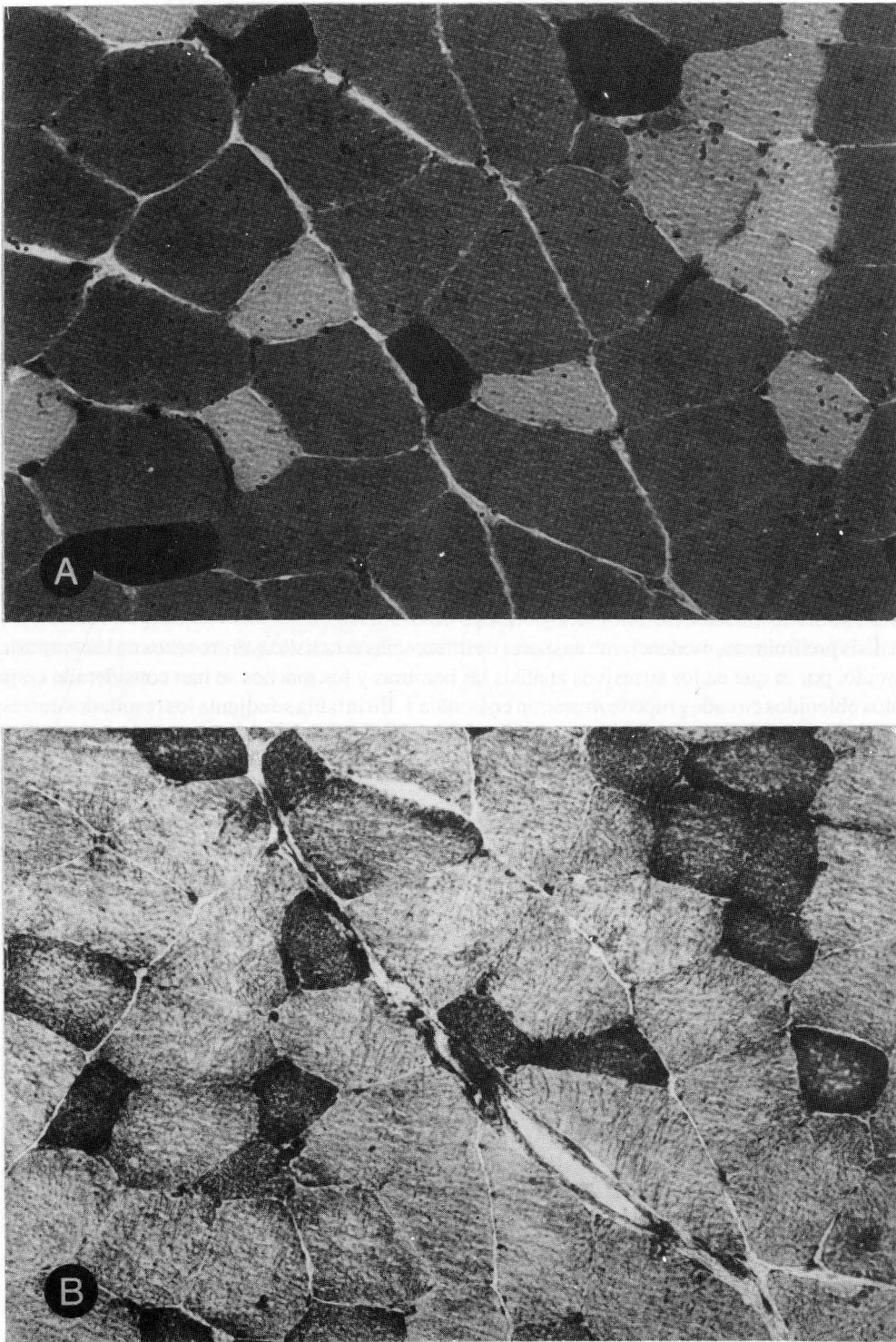


FIGURA 1. Microfotografías seriadas mostrando la identificación de los tipos de fibras musculares en el m. Vasto lateral. x200. A.- actividad miosin adenosin trifosfatasa (m-ATPasa tras preincubación ácida a pH 4.4). B.- NADH-TR.

Discusión

Como se observa en los datos del grupo control, el Vasto lateral se caracteriza por ser un músculo de eminente contracción rápida. La presencia de fibras tipo I (lentas) es muy escasa (2,7 %). Dentro de las fibras tipo II (rápidas), las fibras IIB son las más abundantes (73,4 %), frente a una presencia de fibras IIA del 23,7 %, lo que induciría a pensar que es un músculo de escasa fatigoresistencia (Snow, 1983; Stull, 1986). Sin embargo, la proporción encontrada de fibras con moderada (FTH) o alta (ST) capacidad oxidativa es del 62,2 %, es decir, que el 48,5 % de las fibras IIB ofrecieron evidente actividad oxidativa. Esto indicaría, por el contrario, que esta porción muscular posee cierto grado de fatigoresistencia (Baldwin et al., 1972; Nemeth y Pette, 1981).

En este estudio no se han encontrado diferencias con significación estadística en el porcentaje de fibras tipo I entre el grupo control y los grupos que realizaron ejercicios de entrenamiento, es decir, que en ningún caso la población fibrilar, en cuanto a la proporción de fibras lentas y rápidas (I/II), varía significativamente con los protocolos de ejercicios aplicados. Este hecho está de acuerdo con las experiencias de Bagby et al (1972) y Salmóns y Henriksson (1981), que tampoco encontraron modificación de la relación I/II como consecuencia del entrenamiento. Estos resultados reforzarían lo expresado por Komi et al. (1977) y Szentkty y Schlegel (1985), de que el equilibrio I/II de los músculos tiene un fuerte componente genético. Sin embargo, otros autores (Jaweed et al. 1977; Watt et al. 1982; Green et al. 1984) han reportado modificaciones de esta relación causada por el entrenamiento, lo cual podría implicar que los ejercicios programados empleados en este trabajo no han sido suficientemente altos como para provocar esta modificación.

En los programas de entrenamiento aplicados por nosotros hemos jugado con los factores intensidad y duración del ejercicio para establecer el protocolo de entrenamiento para cada grupo. Así, en los grupos de velocidad (grupos II y III) el factor intensidad de ejercicio ha tenido más importancia; además, la velocidad aplicada alcanzó hasta 55 m/min, lo que implica una Vo_2 superior al 100% del máximo poder aeróbico (ejercicio anaeróbico) (Shephard y Gillnick, 1976). Por el contrario, en los grupos de resistencia (grupos IV, V y VI), el factor duración en todos ellos fue de 30 m/min, lo que supone alrededor del 80% del Vo_{2max} , por ello los individuos realizaron un ejercicio de carácter aeróbico.

En todos los grupos ejercitados se ha producido una modificación de la relación de los subtipos fibrilares IIA y IIB. Esta variación en los porcentajes (aumento de la presencia de fibras IIA y disminución de las fibras tipo IIB) indican una conversión de las fibras tipo IIB en fibras tipo IIA. Este aumento de la relación IIA/IIB como consecuencia del entrenamiento es un hecho ampliamente aceptado (Baldwin et al., 1972; Jansson y Kaijser, 1977; Ingjer, 1979; Green et al., 1984). En nuestra experiencia se han evidenciado fibras tipo II de tonalidad de tinción variable e intermedia entre la de los tipos IIA y IIB. Esto indicaría que estas fibras (fibras tipo IIAB) se encuentran en diferentes estadios de conversión fibrilar y que la interconversión fibrilar se produce vía fibras IIAB (Jansson y Kaijser, 1977; Ingjer, 1979; Snow, 1983).

En los dos grupos de velocidad los individuos recorrieron una distancia total de 4.500 metros. El porcentaje de fibras IIA del grupo II aumentó un 2,5 %. Pero únicamente en el grupo III la elevación en la presencia de estas fibras (3,9 %) llega a poseer significación estadística respecto al lote control. En este sentido cabe indicar que mientras en el grupo que biomatemáticamente se establecen diferencias los individuos realizaron un entrenamiento específico de velocidad, a una velocidad constante de 55 m/min, en el otro –grupo II– alcanzaron esta velocidad de forma paulatina, comenzando los ejercicios a una velocidad de 35 m/min.

En los grupos de resistencia (grupos IV, V y VI) los individuos recorrieron 3.000, 9.000 y 18.000 metros, respectivamente. En todos ellos se produce aumento, significativo respecto al lote control, en el porcentaje de fibras IIA. Además, esta elevación de este tipo de fibras se realiza de forma secuencias con la progresión de los ejercicios (figura 2), estableciéndose una correlación lineal ($r = 0,997$) entre el porcentaje de fibras IIA y la distancia total recorrida o el tiempo total de ejercicio. El incremento de estas fibras desde el grupo I al IV se produce de forma brusca, lo que indicaría una adaptación inicial más acelerada.

Al comparar ambos bloques de entrenamiento –resistencia y velocidad–, observamos que no se produce diferencias estadísticas entre los grupos, a excepción de los grupos VI y II. Sin embargo, observamos que en relación a la distancia total recorrida (figura 2a), en el grupo III se produce una mayor adaptación fibrilar que si esa misma distancia hubiera sido recorrida con entrenamiento de resistencia. Esta mayor adaptabilidad con el protocolo de

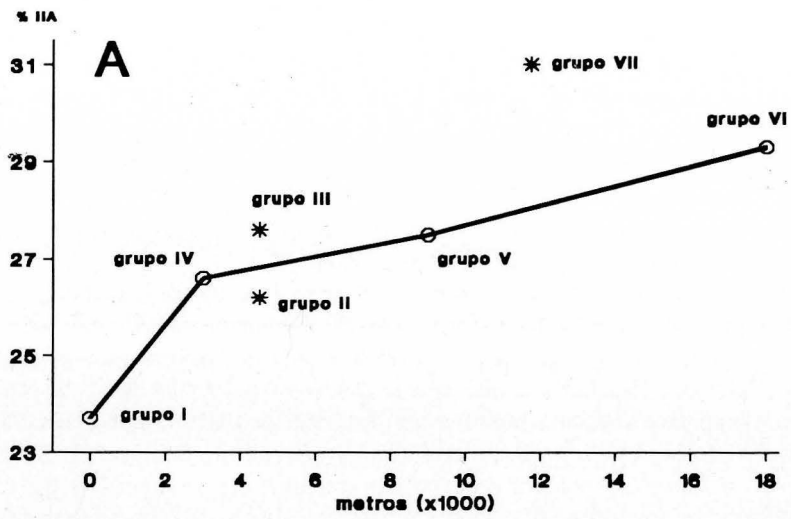


FIG. 2A

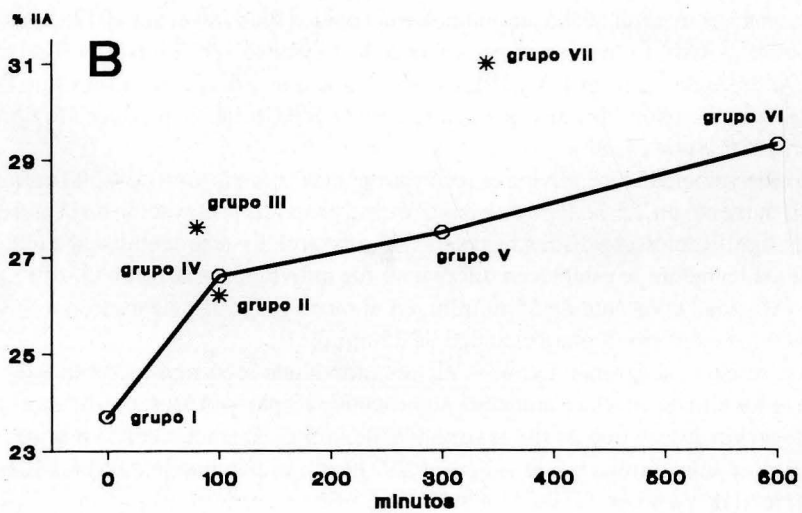


FIGURA 2. Variaciones en el porcentaje de fibras IIA en relación a la distancia (A) y al tiempo (B) total de carrera.

ejercicio del grupo III se acentúa si consideramos el aumento de las fibras tipo IIA en relación a la duración total de entrenamiento (figura 2b). Todo lo anteriormente indicado apunta hacia la consideración de que el Vasto lateral de la rata y con los protocolos aplicados, el entrenamiento de velocidad tiene mayor trascendencia en la adaptación fibrilar que los de resistencia. Este hecho se ve reforzado al considerar al grupo VII, que partiendo del mismo protocolo que el grupo VI, se distancia netamente de este último, más aún si se considera el aumento de fibras IIA en relación al tiempo total de ejercicio.

El otro aspecto de interés en la presente experiencia fue determinar la adaptación oxidativa de las fibras. Como se puede observar en la tabla 1, en todos los grupos ejercitados se produce un aumento significativo de en el porcentaje de fibras con alta o moderada capacidad oxidativa (ST=FTH). En efecto, independientemente de que las fibras adquieran un nuevo potencial contráctil, el entrenamiento lleva a una pérdida acusada de fibras de baja reacción oxidativa -fibras FT-, puesto que éstas adquirieron al menos una moderada capacidad oxidativa (FTH) (Baldwin et al., 1972; Dudley et al. 1982; Hoppeleer, 1987), pues resulta presumible una disminución acusada de la presencia de fibras FT, puesto que independientemente de la modalidad o tipo de entrenamiento, las fibras musculares adquieren una mayor capacidad oxidativa. Si relacionamos la pérdida de fibras IIB -de las cuales más del 50 % poseen inicialmente metabolismo fundamentalmente glucolítico- con la de las fibras FT, observamos que éstas últimas disminuyen con mayor celeridad con que lo hace las fibras IIB. Estos resultados indicarían, que la conversión de las fibras IIA en IIB se produce tras una previa adaptación enzimática de las fibras IIB en dirección a una mayor capacidad oxidativa, con el objeto de adecuar el nuevo potencial contráctil con la diferente exigencia metabólica que ello conlleva. Esto se ve reforzado por el hecho de que en todos los casos las fibras IIAB mostraban una alta reacción oxidativa. En relación a los dos bloques de entrenamiento, los resultados indican lo mismo que lo expuesto anteriormente en relación a las fibras IIA, es decir, que la intensidad del entrenamiento repercute más en la adaptación metabólica de las fibras que la duración del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- ARMSTRONG, R.B. and PHELPS, R.O. (1984): Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat.* **171**: 259-272.
- BAGBY, G.J.; SEMBROWICH, W.L. and GOLLNICK, P.D. (1972): Myosin ATPase and fiber composition from untrained and trained rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **233**: 1415-1417.
- BALDWIN, K.M.; KLINKERFUSS, G.H.; TERJUNG, R.L.; MOLE, P.A. and HOLLOSZY, I.O. (1972): Respiratory capacity of white, red and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am J Physiol.* **222**: 373-378.
- BÁRANY, M. (1967): ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol.* **50**: 197-218.
- BROOKE, M.H. and KAISER, K.K. (1970): Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch Neurol* **23**: 369-379.
- BURKE, R.E. (1986): Physiology of motor units. In: *Myology*. AG Engel & BQ Banker (eds). McGraw-Hill, Inc. New York. pp. 419-443.
- DAVIES, A.S. and GUNN, H.M. (1972): Histochemical fibre types in the mammalian diaphragm. *J Anat.* **112**: 41-60.
- DUBOWITZ, V. and BROOKE, M.H. (1973): Muscle biopsy: a modern approach. WB Saunders Co. Ltd. London.
- DUDLEY, G.A.; ABRAHAM, W.M. and TERJUNG, R.L. (1982): Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptation in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* **53**: 844-850.
- ESSÉN-GUSTAVSSON, B. and LINDHOLM, A. (1985): Muscle fiber characteristics of active and inactive Standardbred horses. *Equine Vet J.* **434**: 438.
- GREEN, H.J.; KLUG, G.A., REICHMANN, H.; SEEDORF, V.; WIEHRER, W. and PETTE, D. (1984): Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, paralbumin and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflugers Arch.* **400**: 432-438.
- HERBISON, G.J. and GORDON, E.E. (1973): Exercise of normal muscle: Biochemical effects. *Arch Phys Mrd Rehabil.* **54**: 409-416.
- HOPPELER, H. (1987): Training-induced changes in the structure of human skeletal muscle. *Rev Therapeutique.* **44**: 844-849.
- INGJER, F. (1979): Effects of endurance training on muscle fibre ATPase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. *J Physiol* **294**: 419-432.
- JANSSON, E. and KAIJSER, L. (1977): Muscle adaptation for extreme endurance training in man. *Acta Physiol Scand.* **100**: 315-324.
- JANSSON, E.; SJODIN, B. and TESCH, P. (1978): Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. A sign of fiber type transformation? *Acta Physiol Scand.* **104**: 235-237.

- JAWEED, M.M.; GORDON, E.E.; HERBISON, G. and KOWALSKI, K. (1974): Endurance and strengthening exercise adaptations. I. Protein changes in skeletal muscle. *Arch Phys Med Rehabil.* **55**: 513-517.
- JAWEED, M.M.; HERBISON, G.J. and DITUNNO, J.F. (1977): Myosin ATPase activity after strengthening exercise. *J Anat.* **124**: 371-381.
- KOMI, P.V.; VITASALO, J.; HASU, M.; THORSTENSSON, A. and SJODIN, B. (1977): Skeletal muscle fibres and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol Scand.* **100**: 385-392.
- LINDHOLM, A. and PIEHL, K. (1974): Fiber composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. *Acta Vet Scand.* **15**: 287-309.
- NEMETH, P.M. and PETTE, D. (1981): Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by ATPase in three hindlimb muscles of rat. *J Physiol.* **320**: 73-80.
- NOVIKOFF, A.B.; SHIN, W. and DRUCKER, J. (1961): Mitochondrial localization of oxidative enzymes. Staining results with two tetrazolium salt. *J Biophys Biochem Cytol.* **9**: 47-61.
- SALMONS, S. and HENRIKSSON, J. (1981). The adaptative response of skeletal muscle to increased use. *Muscle & Nerve.* **4**: 94105.
- SAS Institute Inc (1982): SAS User's Guide. SAS Institute Inc. Cary NC.
- SAUBERT, C.W.; ARMSTRONG, R.B.; SHEPHERD, R.E. and GOLLNICK, P.D. (1973): Anaerobic enzyme adaptations to sprint training in rats. *Pflugers Arch.* **341**: 305-312.
- SHEPHERD, R.E. and GOLLNICK, P.D. (1976): Oxygen uptake of rats at different work intensities. *Pflugers Arch.* **362**: 219-222.
- SNOW, D.H. (1983): Skeletal muscle adaptations: a review. In: *Equine Exercise Physiology*. DH Snow, SGB Persson & RJ Rose (eds). Granta Editions. Cambridge. pp. 160-183.
- SNOW, D.H.; 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.
- STULL, C. (1986): Muscles for motion. *Equine Practice.* **8**: 17-20.
- SZENTKUTI, V.L. and SCHLEGEL, O. (1985): Genetical and functional influences on fiber type composition and fiber diameter in M. Longissimus dorsi and M. Semitendinosus of pigs. Studies on exercised domestic pigs and wild pigs kept under restricted mobility. *DtSCH Tierarztl Wschr.* **92**: 93-97.
- WATT, P.W.; KELLY, F.J.; GODSPINK, D.F. and GOLDSPIK, G. (1982): Exercise-induced morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat. *J Appl Physiol.* **53**: 1144-1151.

Correspondencia: Dr. J.L. Morales López
Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas
Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria.
Avda. Medina Azahara, 9. 14005 Córdoba. España

CRECIMIENTO CEFALOFACIAL DURANTE LOS 4 PRIMEROS AÑOS DE LA VIDA. VARONES (I)

CEPHALOFACIAL GROWTH FROM BIRTH TO 4 YEARS AGE. MALES (I)

J.L. NIETO y N. TAJADA

Dto. Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Zaragoza

RESUMEN

Se presenta un modelo de crecimiento cefálico para hembras desde el nacimiento hasta los cuatro años de edad, que incluye la observación mediante metodología longitudinal (nacimiento a 2 años) y transversal (3 y 4 años) de 20 parámetros antropológicos (diámetros e índices), según la técnica antropométrica descrita por Olivier. La muestra se compone de 614 niños aragoneses nacidos a partir del 1-I-1987. Se han calculado percentiles y confeccionado gráficas para cada uno de los diámetros estudiados.

PALABRASCLAVE: Cefalometria. Crecimiento. Infantil.

SUMMARY

The authors present a model of cephalometric growth in females from birth to 4 years age. The study employed a longitudinal method (birth to 2 years age) and a cross-sectional one (3 and 4 years age). 20 cephalometric parameter are studied in 614 infants born in Aragón. Methodology used for sampling, recording data and data processing are showed.

KEY WORDS: Cephalometry. Growth. Infant.

Introducción

La abundante bibliografía antropométrica que existe escasamente se refiere al desarrollo cefálico y facial de las poblaciones infantiles durante los primeros años de la vida. A ello no son ajenas las graves dificultades de procedimiento debidas a la especial idiosincrasia de este grupo de edad.

No obstante durante la época postnatal y primeros años el tamaño cefálico experimenta los incrementos más notables de su vida extrauterina y los cambios más profundos en sus proporciones. Las tendencias seculares y condiciones del ambiente modifican así mismo el ritmo e intensidad de ese desarrollo. Una y otra circunstancia aconsejan la elaboración de patrones de crecimiento cefálico autóctonos, periódicamente actualizados, elaborados sobre muestras representativas de las poblaciones de referencia.

Material v métodos

El estudio parte de dos muestras diferentes.

La primera, utilizada para una observación longitudinal, se constituye de 214 niños aragoneses 106 varones y 108 hembras seguidos desde el nacimiento hasta los dos años de edad, con controles a los 0, 3, 6, 12, 18 y 24 meses.

La segunda, que ha servido para una observación transversal, se compone de 400 niños igualmente aragoneses, 100 varones y 100 hembras de 3 años \pm 6 meses, y 100 varones y 100 hembras de 4 años \pm 6 meses, elegidos con criterios de azar, en los que se ha realizado una medición única.

En cada niño y a las edades referidas se han medido según la técnica antropométrica de Olivier los siguientes parámetros: longitud, anchura y altura cefálicas, altura morfológica de la cara, anchura bicigomática, anchura frontal mínima, anchura bigoniaca, anchura, altura y prominencia nasal, longitud biorbitaria y anchura orbitaria. A partir de estas medidas absolutas se han obtenido los siguientes índices cefalométricos: cefálico, altura-longitud, altura-anchura, facial, céfalofacial, goniocigomático, frontoparietal y nasal.

Los datos recogidos se han procesado en la base de datos D' Base III Plus y tratados con el paquete estadístico SPSS.

En este trabajo se presentan los datos correspondientes a la muestra de varones.

Resultados v discusión

Valores del neurocráneo.- Los diámetros anteroposterior (glabro-iniaco) y transversal (biparietal), así como la altura cefálica o auricular crecen cuantiosamente durante los primeros 4 años de vida (58,6 mm., 41,8 mm. y 50,7 mm. respectivamente), siendo su crecimiento más intenso durante el primer año. La velocidad de crecimiento, muy alta durante los primeros meses, tiende a estabilizarse hacia el final del segundo año de vida.

La altura cefálica es el diámetro que proporcionalmente se incrementa más durante este periodo seguido de la longitud y anchura máximas, determinando estos diferentes ritmos de crecimiento los cambios de la morfología cefálica observados. La paulatina disminución del índice cefálico traduce el progresivo alargamiento de la cabeza a partir de la intensa braquicefalización presente al nacimiento (ind. cefálico 80,96%). Así mismo, la predominancia de cabezas bajas al nacimiento (ind. altura-longitud 58,23% e ind. altura-anchura 70,11%) evoluciona al predominio de cabezas altas a los 4 años (hipsicéfalas y acrocéfalas), más rotundo respecto a las longitud (ind. altura-longitud 67,56%) que a la anchura (ind. altura-anchura 86,30%).

Valores del esplanocráneo.- Los dos grandes diámetros faciales, altura morfológica de la cara y anchura bicigomática crecen desde el nacimiento hasta los 4 años con incrementos absolutos de 35,4 mm. y 29,9 mm. respectivamente. La cara del recién nacido, fundamentalmente ancha y baja, presenta una clara tendencia a alargarse durante este periodo, como traducen los progresivos incrementos del índice facial. Si bien hasta los 4 años predominan las caras euriprosopas o anchas, con valores del índice facial siempre inferiores a 84%, los sucesivos aumentos del mismo son expresión de la mayor intensidad de crecimiento de la altura sobre la anchura, que determina el progresivo alargamiento de la misma.

El crecimiento de la cara hasta los 4 años es proporcionalmente inferior al de los diámetros del neurocráneo, como demuestran las variaciones del índice céfalofacial.

La anchura frontal mínima crece de forma muy activa durante este periodo, con ganancias absolutas de 41,5 mm., crecimiento proporcionalmente más intenso que el de la cabeza y la cara, como reflejan las variaciones de los índices frontoparietal y frontocigomático. Estas secuencias de variación muestran en nuestra serie la estrechez relativa de la frente al nacimiento y el paulatino ensanchamiento de la misma.

El crecimiento de la mandíbula supera al de la anchura bicigomática durante este periodo. A partir de los 3 meses de vida hay ya una franca predominancia de mandíbulas anchas, que es mayoritaria a los 4 años.

VARONES

m m.

Edad (m)	Nº	Longitud Máxima	Anchura Máxima	Altura Auricular	Indice Cefálico	Indice Front-Par.	Indice Alt -Long	Indice Alt -Anch
0	106	116,7 ± 4,0	94,3 ± 3,5	67,7 ± 3,6	80,96 ± 3,1	54,49 ± 3,9	57,23 ± 3,2	70,11 ± 3,6
3	102	137,9 ± 4,2	108,3 ± 3,8	87,3 ± 4,1	78,69 ± 3,8	57,77 ± 7,1	63,28 ± 3,4	80,72 ± 4,0
6	98	150,6 ± 4,4	117,7 ± 3,9	95,8 ± 4,9	78,27 ± 3,7	58,12 ± 4,2	63,70 ± 3,8	81,19 ± 4,1
12	99	160,5 ± 5,1	123,8 ± 4,2	104,4 ± 4,9	77,09 ± 3,8	61,20 ± 3,4	65,10 ± 3,2	83,59 ± 4,3
18	97	167,9 ± 5,1	129,7 ± 4,2	108,0 ± 3,5	77,21 ± 3,7	62,12 ± 3,6	64,41 ± 2,5	83,41 ± 3,8
24	95	172,1 ± 6,2	132,7 ± 5,6	112,1 ± 6,7	77,34 ± 4,5	63,21 ± 3,8	65,28 ± 3,9	85,67 ± 5,7
36	100	173,9 ± 6,2	134,7 ± 5,4	115,8 ± 6,6	77,74 ± 4,4	65,52 ± 3,5	66,34 ± 3,9	85,95 ± 5,6
48	100	175,3 ± 6,1	136,1 ± 5,3	118,4 ± 6,3	78,54 ± 4,1	67,28 ± 3,4	67,56 ± 3,9	86,28 ± 5,3

VARONES

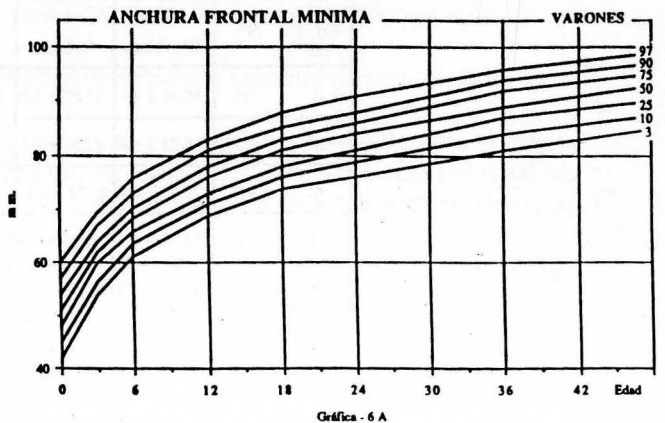
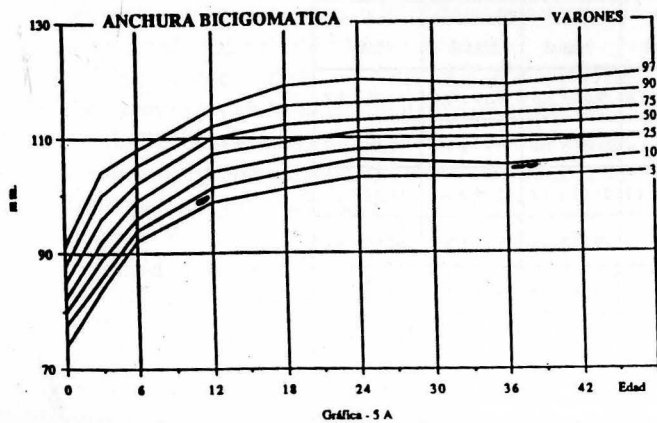
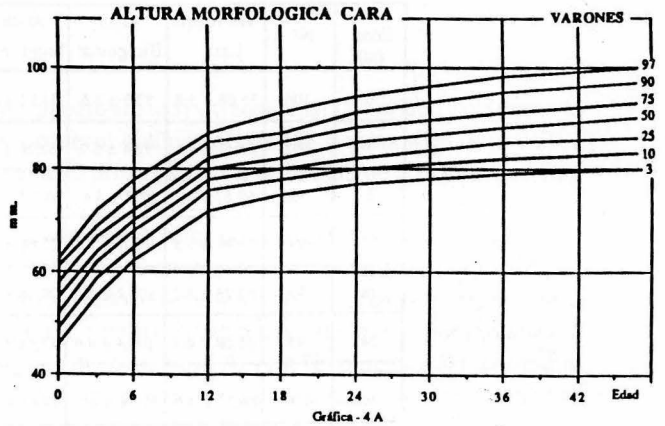
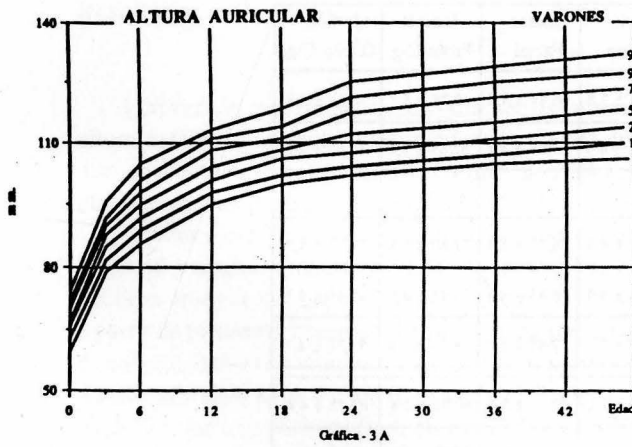
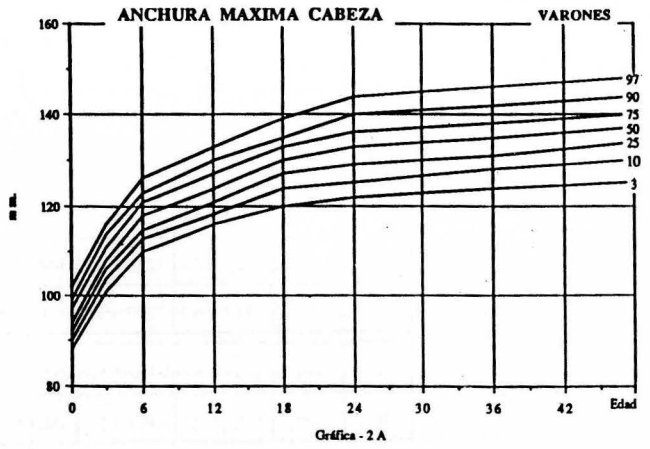
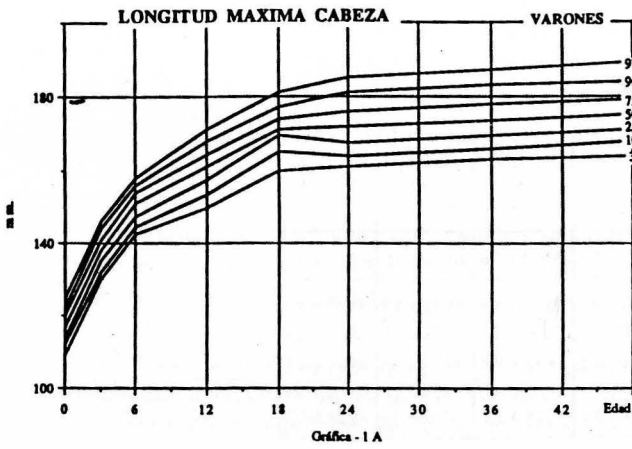
m m.

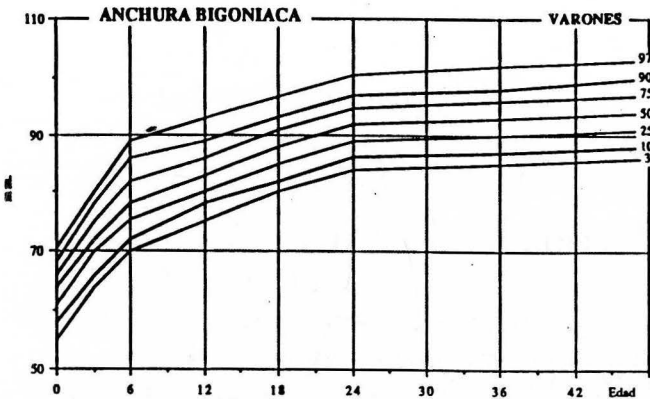
Edad (m)	Nº	Alt.Morf. Cara	Anch. Bicigomat.	Anch. Front- Min	Anch. Bigon.	Indice Facial	Indice Front-Cig.	Indice Gonio-Cigo
0	106	55,08 ± 3,8	82,3 ± 3,5	51,02 ± 4,6	63,19 ± 3,8	66,79 ± 4,4	62,38 ± 5,7	76,85 ± 3,9
3	102	64,41 ± 3,5	92,4 ± 5,2	62,26 ± 3,4	71,88 ± 4,3	69,88 ± 4,1	67,63 ± 3,4	77,65 ± 4,0
6	98	69,67 ± 3,1	98,2 ± 5,4	68,30 ± 3,1	78,3 ± 5,3	70,58 ± 4,1	69,47 ± 3,3	79,88 ± 4,3
12	99	79,96 ± 3,3	103,7 ± 5,6	75,68 ± 3,5	82,43 ± 4,5	76,71 ± 5,0	73,20 ± 3,7	79,71 ± 4,2
18	97	82,26 ± 3,2	106,9 ± 5,5	79,66 ± 3,1	85,91 ± 3,9	76,95 ± 4,4	74,41 ± 3,6	80,69 ± 4,1
24	95	85,08 ± 4,3	109,4 ± 4,6	83,56 ± 3,7	89,12 ± 5,1	77,85 ± 5,0	76,51 ± 3,4	81,70 ± 4,7
36	100	88,12 ± 4,6	110,9 ± 4,2	88,81 ± 3,7	91,20 ± 5,1	80,43 ± 5,4	80,02 ± 3,4	82,15 ± 4,4
48	100	90,43 ± 4,5	112,2 ± 4,3	92,54 ± 3,8	92,49 ± 4,8	80,85 ± 5,1	82,90 ± 3,7	83,12 ± 3,9

VARONES

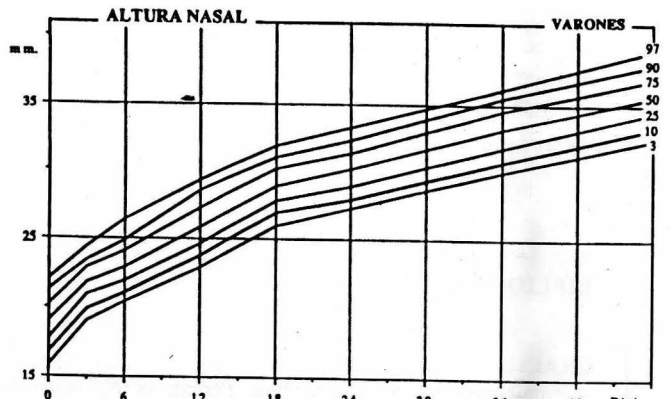
m m.

Edad (m)	Nº	Anch. Biorbitar.	Anch. Orbital.	Anch. Nasal	Alt. Nasal	Prominen. Nasal	Indice Nasal
0	106	65,04 ± 4,3	21,03 ± 1,1	21,87 ± 1,6	19,03 ± 1,6	8,10 ± 1,6	114,07 ± 1,8
3	102	69,02 ± 5,0	22,54 ± 1,2	22,48 ± 1,4	21,87 ± 1,4	9,87 ± 1,7	102,54 ± 1,7
6	98	73,08 ± 4,4	23,73 ± 1,4	23,13 ± 1,3	23,03 ± 1,4	11,18 ± 1,7	100,19 ± 1,7
12	99	77,16 ± 4,3	25,80 ± 1,5	23,92 ± 1,7	25,93 ± 1,6	12,44 ± 2,1	91,96 ± 1,6
18	97	80,21 ± 4,3	27,11 ± 1,6	24,79 ± 1,6	28,94 ± 1,5	13,03 ± 2,1	85,01 ± 1,6
24	95	83,31 ± 4,3	27,92 ± 1,5	25,62 ± 1,5	30,04 ± 1,6	13,38 ± 2,3	85,01 ± 1,6
36	100	85,21 ± 4,4	29,40 ± 1,6	25,79 ± 1,7	33,16 ± 1,7	14,03 ± 2,2	77,96 ± 3,9
48	100	86,72 ± 3,9	30,54 ± 1,7	26,84 ± 1,6	35,62 ± 1,7	15,11 ± 2,1	75,60 ± 3,6

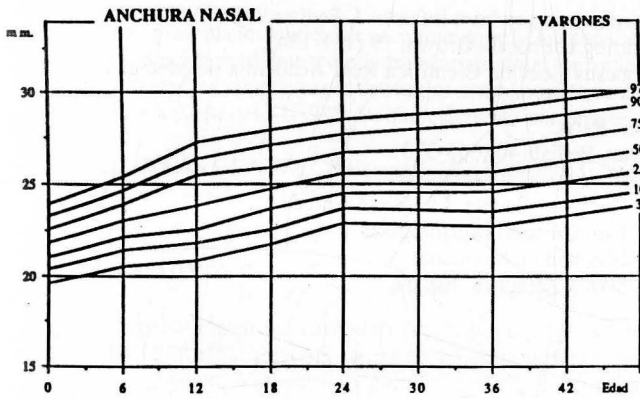




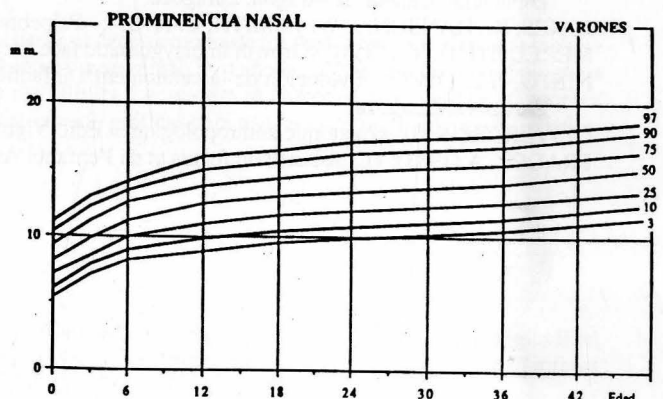
Gráfica - 7 A



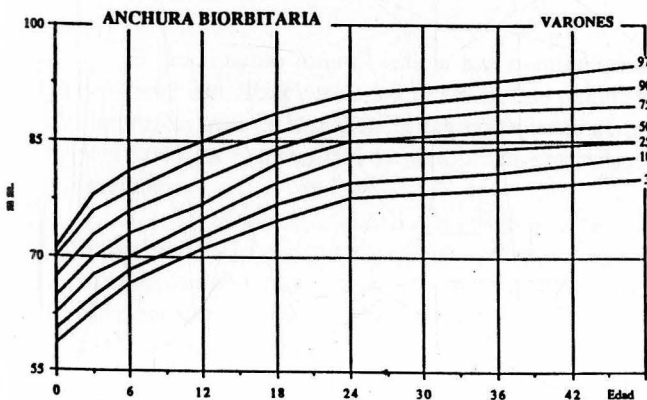
Gráfica - 9 A



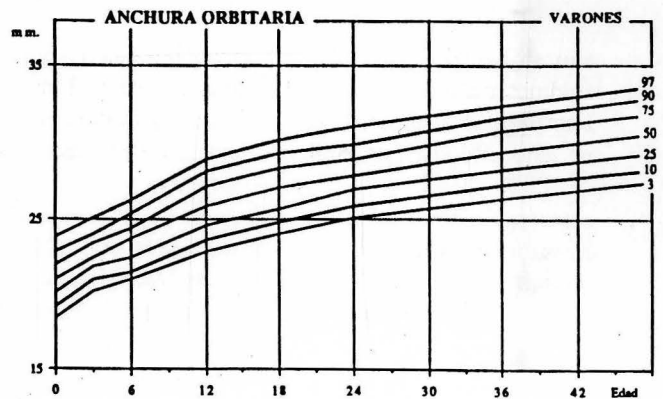
Gráfica - 8 A



Gráfica - 10 A



Gráfica - 11 A



Gráfica - 12 A

Valores nasales y orbitarios.- Los diámetros nasales crecen de forma regular hasta los 4 años, con mayor incremento proporcional de la altura sobre la anchura que determina el progresivo estrechamiento de la nariz durante este periodo, reflejado en las sucesivos descensos del índice nasal. Hasta los 12 meses todas las observaciones se incluyen en la categoría de nariz ancha (platinas)

Las longitudes orbitarias muestran un crecimiento constante, con incrementos más notorios durante el primer año. El crecimiento de ambos es paralelo al del diámetro bicigomático.

BIBLIOGRAFÍA

- BRACHET, G., LABBE, P., LEVILAIN, M. y LOUIS, T. (1981): «Etude anthropometrique du visage chez l'enfant de la naissance a 11 ans» Arch. Fran. Pediatr 38 (477-480)
- DIAMENT, A. (1976): «Cephalic measures in normal pre-school children 3 to 7 years old» Arq. Neuropsiquiatr. 34/4 (325-330).
- FALKNER, F. (1985): «Evaluación del crecimiento desde la edad fetal hasta los dos años» Nutrición Clínica en la Infancia. Raven Press. New York.
- GERVER, W. J. (1988): «Measurements of the body proportions in children. The Ooster Wolde Study» Drunkerij Groenevelt. Landgraaf.
- FERRANDEZ, A., BASTAROS, J. C., ARANA, T., ATARES, M., PUGA, B. y cols. (1988): «Estándares longitudinales normales de crecimiento, edad osea, y maduración intelectual de niños aragoneses controlados desde el nacimiento» Edit. Diputación General de Aragón. Zaragoza.
- JONES, K., HANSON, J. W. y SMITH, D. (1987): «Palpebral fissure size in newborn infants» J. Pediatr 9 (987-988).
- MEREDITH, H. V. (1954): «Growth in bizygomatic face breadth during childhood» Growth 19 (111-134).
- NIETO, J. L. (1988): «Evolución de la cefalometría infantil aragonesa» Lección Científica Real Academia de Medicina de Zaragoza. Zaragoza.
- OLIVER, G. (1965): «Anatomie anthropologique» Edit. Vigot Freres. Paris.
- PRADER, A. (1983): «Croissance du foetus et de l'enfant» Arch. Fran. Pediatr 40 (365-373).

Correspondencia: J.L. Nieto Amada
Dpto. Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina.
50009 Zaragoza. España

CRECIMIENTO CEFALOFACIAL DURANTE LOS 4 PRIMEROS AÑOS DE LA VIDA. HEMBRAS (II)

CEPHALOFACIAL GROWTH FROM BIRTH TO 4 YEARS AGE. FEMALES (II)

J.L. NIETO y N. TAJADA

Dto. Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Zaragoza

RESUMEN

Se presenta un modelo de crecimiento cefálico para hembras desde el nacimiento hasta los cuatro años de edad, que incluye la observación mediante metodología longitudinal (nacimiento a 2 años) y transversal (3 y 4 años) de 20 parámetros antropológicos (diámetros e índices), según la técnica antropométrica descrita por Olivier. La muestra se compone de 614 niños aragoneses nacidos a partir del I-I-1987. Se han calculado percentiles y confeccionado gráficas para cada uno de los diámetros estudiados.

PALABRAS CLAVE: Cefalometría. Crecimiento. Infantil.

SUMMARY

The authors present a model of cephalometric growth in females from birth to 4 years age. The study employed a longitudinal method (birth to 2 years age) and a cross-sectional one (3 and 4 years age). 20 cephalometric parameter are studied in 614 infants born in Aragón. Methodology used for sampling, recording data and data processing are showed.

KEY WORDS: Cephalometry. Growth. Infant.

Introducción

El crecimiento infantil refleja una continua modificación de sus modelos precisando la necesidad de una constante actualización de los mismos. Las circunstancias ambientales y tendencia secular determinan cambios temporales tanto en la secuencia o ritmo de crecimiento como en su intensidad en cada una de las edades. Ello bastaría para justificar la necesidad de patrones de crecimiento autóctonos sobre muestras obtenidas en las poblaciones de referencia.

Si a ello añadimos la escasez de referencias bibliográficas sobre el desarrollo cefálico y facial durante la primera época de la vida, época en la que por otra parte la cabeza experimenta el crecimiento más activo y los cambios de sus proporciones más profundos de la vida extrauterina, se comprenderá el interés que compromete al tipo de investigaciones como la que presentamos, en la que se aporta un modelo de crecimiento cefálico de niñas aragonesas desde el nacimiento hasta los 4 años.

Material y métodos

Para la presente observación se ha partido de dos muestras diferentes. La primera muestra, de tipo longitudinal ha estado formada por 214 niños nacidos en Aragón, 106 varones y 108 hembras, que han sido medidos a los 0, 3, 6, 12, 18 y 24 meses. La segunda muestra, que ha servido para una observación transversal, ha estado compuesta de 400 niños igualmente nacidos en Aragón, 100 varones y 100 hembras de 3 años \pm 6 meses, y 100 varones y 100 hembras de 4 años \pm 6 meses, elegidos con criterios de azar, en los que se ha realizado una medición única.

A las edades referidas se ha medido en cada niño, según la técnica antropométrica de Olivier, los siguientes parámetros: longitud, anchura y altura cefálicas, altura morfológica de la cara, anchura bicigomática, anchura frontal mínima, anchura bigoniaca, anchura, altura y prominencia nasal, longitud biorbitaria y anchura orbitaria. A partir de estas medidas absolutas se han obtenido los siguientes índices cefalométricos: cefálico, altura-longitud, altura-anchura, facial, céfalofacial, goniocigomático, frontoparietal y nasal.

Los datos recogidos se han procesado en la base de datos D' Base III Plus y tratados con el paquete estadístico SPSS.

Se presentan los datos correspondientes a la muestra de hembras

Resultados y discusión

Valores del neurocráneo.- los diámetros anteroposterior (glabelo-iniaco) y transversal (biparietal) así como la altura cefálica resultan inferiores a las de los varones (3,2 y 1-2 mm. respectivamente). Esta predominancia del tamaño masculino es ya evidente al nacimiento y se mantiene durante el periodo observado pero sin tendencia a incrementarse. Las velocidades de crecimiento en consecuencia son similares en ambos sexos.

La mayor braquicefalización de las hembras, ya presente al nacimiento con valores del índice cefálico a esa edad de 81,2%, se mantiene en todas las edades estudiadas. Los paulatinos descensos del índice cefálico, cuantitativamente similares en ambos sexos, traducen la mayor, aunque discreta, braquicefalización de las niñas.

A los 4 años los porcentajes de cabezas altas en general son algo inferiores a los de los varones.

Valores del esplanocráneo.- Los promedios femeninos de altura facial y anchura bicigomática son inferiores a los masculinos (0,5 - 1 mm.), diferencia presente en el momento del nacimiento, que se mantiene a lo largo de la observación, siendo en general los incrementos biométricos cuantitativamente similares para ambos sexos.

En nuestra serie no hemos hallado que la cara femenina sea más larga y estrecha que la masculina. Los valores y porcentajes hallados por nosotros no establecen diferencias significativas entre ambos sexos, y sí un tímido alargamiento de la cara varonil traducido en la discreta superioridad del índice facial masculino a cualquier edad, del orden del 0,5%, y en los porcentajes de caras medias (mesoprosopas) y largas (leptoprosopas) también discretamente superior en los niños a partir de los 12 meses de edad.

Los índices frontoparietal, frontocigomático y goniocigomático se comportan de forma similar en ambos sexos, aunque los valores absolutos de las niñas son menores a los de los varones.

No se han apreciado dimorfismos sexuales evidentes en el comportamiento de la anchura bigoniaca, que mantiene valores absolutos levemente superiores en los varones respecto a las niñas.

Valores nasales y orbitarios.- La nariz femenina, de dimensiones absolutas siempre inferiores a las masculinas, es el parámetro que acusa con más claridad el dimorfismo sexual de la cabeza. La predominancia masculina de los diámetros nasales, presente al nacimiento, tiende a incrementarse hasta los 4 años. El índice nasal muestra valores más altos a cada edad en varones, lo que traduce que la tendencia a la nariz estrecha o leptorrinia es más precoz en los varones que en las hembras.

HEMBRAS

m. m.

Edad (m)	Nº	Longitud Máxima	Anchura Máxima	Altura Auricular	Indice Cefálico	Indice Front-Par	Indice Alt -Long	Indice Alt -Anch
0	108	113,8 ± 4,2	92,2 ± 3,4	65,7 ± 3,8	81,22 ± 3,3	54,67 ± 4,4	57,79 ± 3,5	71,04 ± 3,7
3	106	134,8 ± 4,2	106,3 ± 3,9	85,4 ± 3,8	79,02 ± 3,8	58,02 ± 4,2	63,34 ± 3,2	80,23 ± 3,7
6	101	147,3 ± 4,3	115,8 ± 4,1	94,9 ± 4,3	78,86 ± 4,1	58,48 ± 4,0	64,53 ± 3,8	81,98 ± 3,9
12	101	157,3 ± 4,9	122,0 ± 4,1	102,2 ± 4,5	77,76 ± 3,8	61,47 ± 3,4	65,02 ± 3,1	83,88 ± 4,2
18	98	164,5 ± 4,9	127,9 ± 4,2	106,6 ± 3,6	77,65 ± 4,0	62,48 ± 3,7	64,74 ± 2,4	83,51 ± 3,9
24	98	169,2 ± 6,4	131,5 ± 5,4	111,0 ± 6,4	78,05 ± 4,4	63,43 ± 3,8	65,84 ± 4,0	84,92 ± 6,5
36	100	171,1 ± 6,1	132,8 ± 5,5	114,8 ± 6,7	77,65 ± 4,5	66,46 ± 3,7	67,05 ± 4,0	86,41 ± 5,8
48	100	173,2 ± 6,1	134,8 ± 5,3	118,4 ± 6,5	78,42 ± 4,2	67,50 ± 3,4	68,41 ± 4,1	87,08 ± 4,9

HEMBRAS

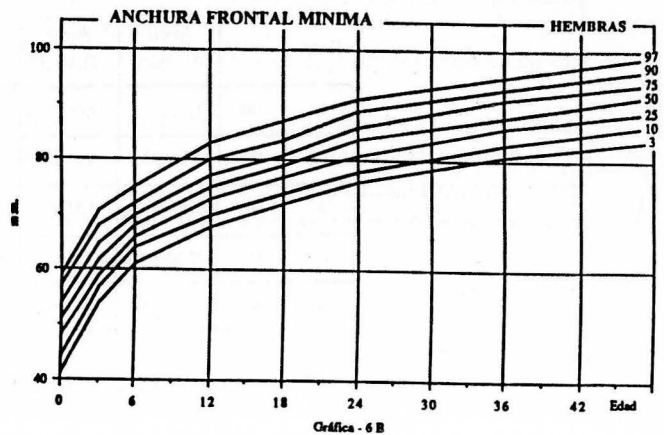
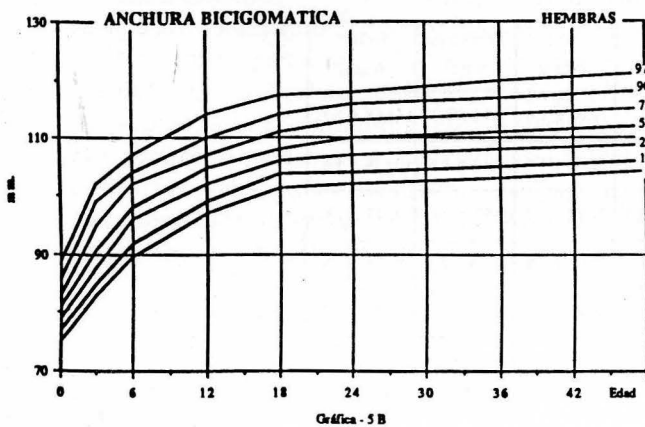
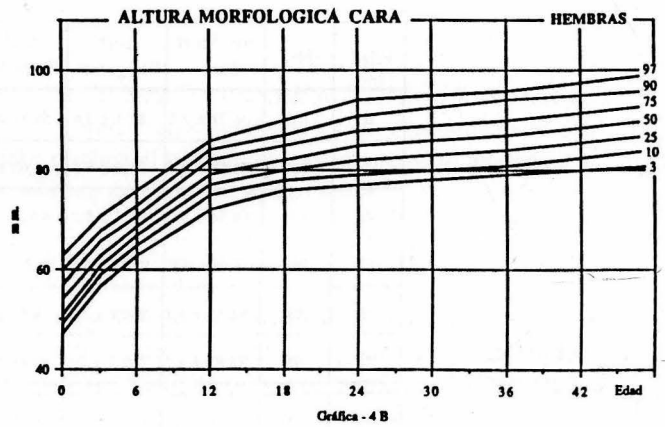
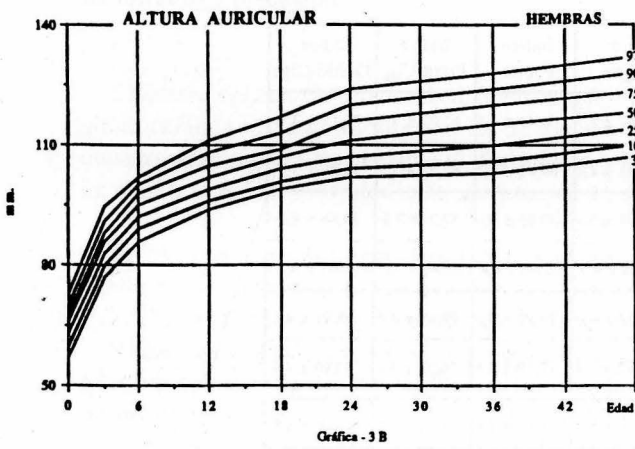
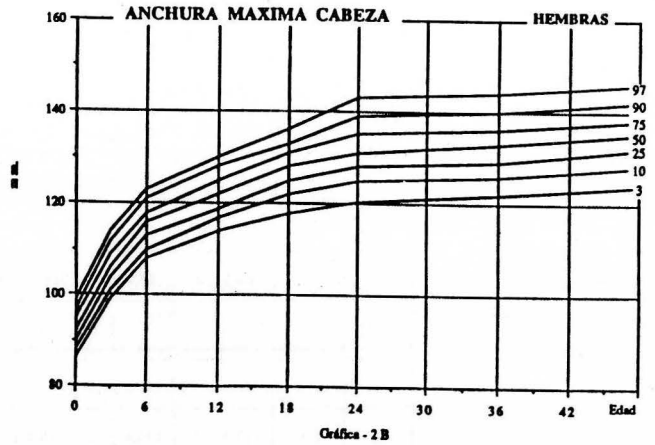
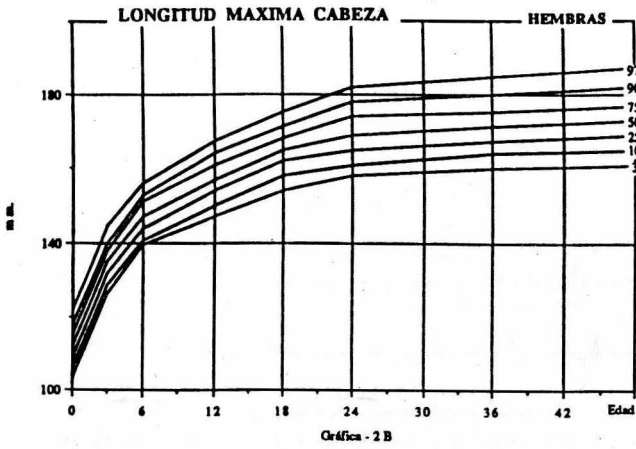
m. m.

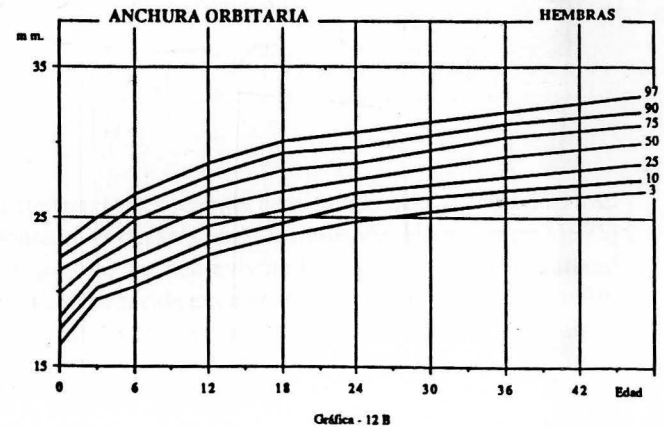
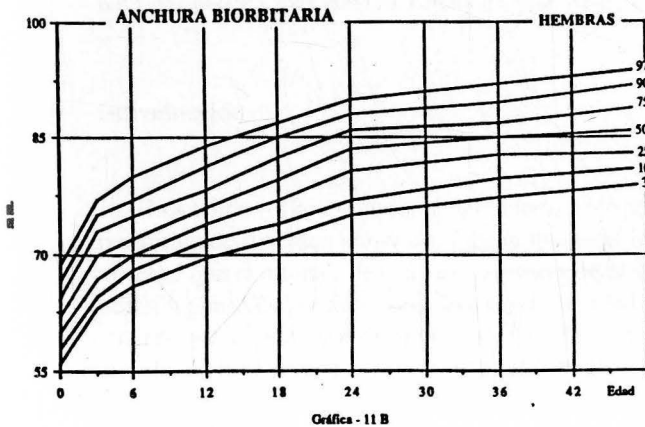
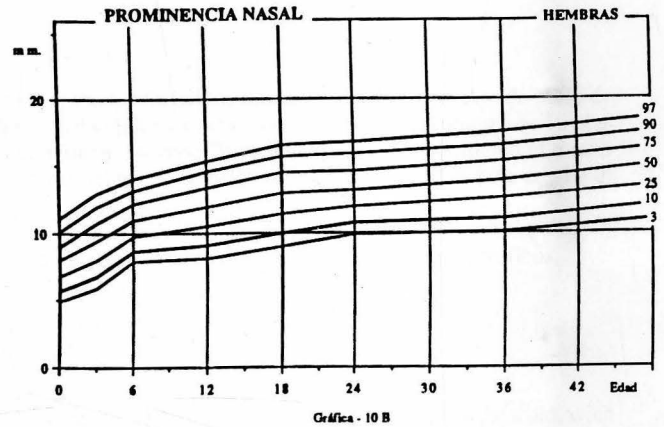
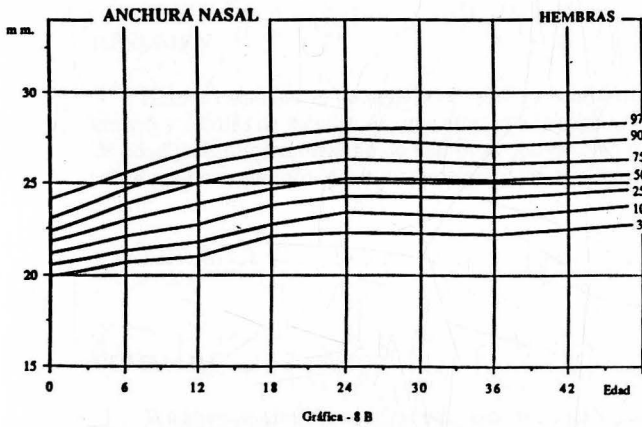
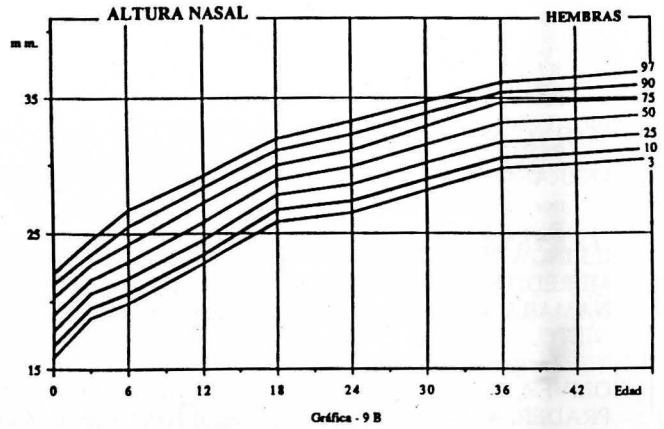
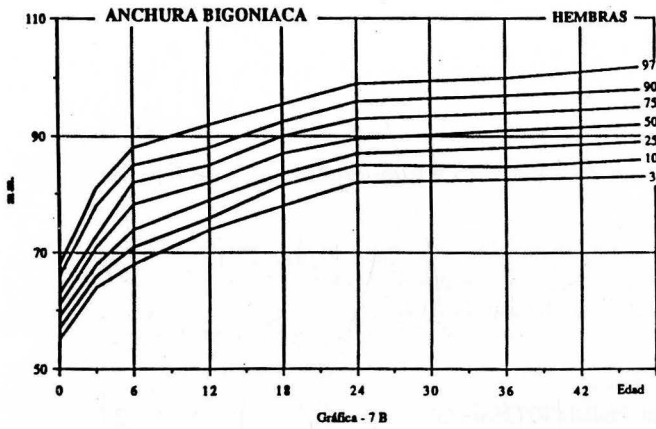
Edad (m)	Nº	Alt. Morf. Cara	Anch. Bicigomat.	Anch. Front-Min	Anch. Bigon.	Indice Facial	Indice Front-Cig.	Indice Gonio-Cigo
0	108	54,22 ± 4,0	81,4 ± 3,4	50,57 ± 4,7	62,17 ± 3,7	66,44 ± 4,5	62,03 ± 3,7	76,19 ± 3,9
3	106	63,53 ± 3,4	91,6 ± 5,0	61,68 ± 3,1	70,83 ± 4,1	69,42 ± 4,2	67,21 ± 3,2	77,51 ± 3,9
6	101	68,74 ± 3,2	97,7 ± 5,2	67,75 ± 2,9	77,79 ± 5,1	70,25 ± 3,9	69,21 ± 3,3	79,66 ± 4,5
12	101	79,06 ± 3,4	102,6 ± 5,5	75,08 ± 3,5	81,65 ± 4,5	76,92 ± 4,6	72,94 ± 3,5	79,41 ± 4,4
18	98	81,55 ± 3,1	106,9 ± 5,6	78,86 ± 3,4	85,22 ± 4,0	76,29 ± 4,1	73,65 ± 3,7	79,71 ± 4,1
24	98	84,82 ± 4,2	109,7 ± 4,5	83,48 ± 3,8	89,02 ± 5,4	77,10 ± 4,6	76,02 ± 3,4	80,96 ± 4,9
36	100	87,21 ± 4,4	110,8 ± 4,4	88,34 ± 3,6	90,71 ± 5,0	79,19 ± 4,9	79,86 ± 3,5	81,80 ± 4,5
48	100	89,98 ± 4,4	111,3 ± 4,2	91,52 ± 3,6	92,01 ± 4,8	80,86 ± 4,9	81,98 ± 3,4	83,18 ± 4,3

HEMBRAS

m. m.

Edad (m)	Nº	Anch. Biorbitar.	Anch. Orbital.	Anch. Nasal	Alt. Nasal	Prominen. Nasal	Indice Nasal
0	108	61,93 ± 4,3	19,86 ± 2,2	21,80 ± 1,7	19,02 ± 1,6	7,95 ± 1,7	114,98 ± 1,7
3	106	69,11 ± 5,3	22,12 ± 1,3	22,41 ± 1,5	21,60 ± 1,5	9,42 ± 1,9	103,29 ± 1,5
6	101	72,53 ± 4,9	23,57 ± 1,7	22,99 ± 1,4	22,94 ± 1,7	10,99 ± 1,7	100,19 ± 1,6
12	101	75,04 ± 5,6	25,71 ± 1,6	23,92 ± 1,7	25,91 ± 1,8	11,96 ± 2,1	91,96 ± 1,6
18	98	79,18 ± 4,3	26,87 ± 1,7	24,82 ± 1,6	28,95 ± 1,5	12,95 ± 1,2	85,65 ± 1,6
24	98	82,13 ± 4,2	27,64 ± 1,5	25,33 ± 1,8	29,85 ± 1,8	13,14 ± 2,3	84,76 ± 1,7
36	100	83,60 ± 4,5	29,11 ± 1,6	25,20 ± 1,7	33,09 ± 1,7	13,88 ± 2,2	76,08 ± 3,4
48	100	86,18 ± 4,0	30,11 ± 1,6	25,52 ± 1,6	33,62 ± 1,7	14,92 ± 2,2	75,94 ± 3,3





BIBLIOGRAFIA

- DIAMENT, A. (1976): «Cephalic measures in normal pre-school children 3 to 7 years old» *Arq. Neuropsiquiatr.* 34/4 (325-330).
- FALKNER, F. (1985): «Evaluación del crecimiento desde la edad fetal hasta los dos años» *Nutrición Clínica en la Infancia.* Raven Press. New York.
- FIGALOVA, P. (1975): «Growth standars for the evaluation of morphological anomalies of the neurocranium in children» *Cesk. Pediatr.* 30/6 (296-301)
- FERRANDEZ, A., BASTAROS, J. C., ARANA, T., ATARES, M., PUGA, B. y cols. (1988): «Estándares longitudinales normales de crecimiento, edad ósea, y maduración intelectual de niños aragoneses controlados desde el nacimiento» Edit. Diputación General de Aragón. Zaragoza.
- ILLINGWORTH, R. (1965): «Head circumference in infants related to body weight» *Arch. Dis. Child* 40 (672-676).
- MEREDITH, H. V. (1954): «Growth in bizygomatic face breadth during childhood» *Growth* 19 (111-134).
- NAMARA, J. (1984): «A method of cephalometric evaluation» *Am. J. Orthodont.* 86/6 (449-469)
- NIETO, J. L. (1988): «Evolución de la cefalometría infantil aragonesa» *Lección Científica Real Academia de Medicina de Zaragoza.* Zaragoza.
- OLIVER, G. (1965): «Anatomie anthropologique» Edit. Vigot Freres. Pan's.
- PRADER, A. (1983): «Croissance du foetus et de l'enfant» *Arch. Fran. Pediatr* 40 (365-373)
- SAUSSE, F. (1978): «La croissance des enfants parisiens de la naissance a six ans» *Antropologie* 82/2 (229-246).

Correspondencia: J.L. Nieto Amada
Dto. Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
50009 Zaragoza. España

CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA CAPACIDAD TROFICA DE EXTRACTOS QUE AFECTAN A LAS NEURONAS DE LOS GANGLIOS CILIARES

CHANGES DURING THE EMBRYONARY DEVELOPMENT IN THE EXTRACT TROPHY CAPACITY THAT AFFECT THE CILIARY GANGLIA NEURONS

F. PADILLA, M. BUSTOS y F. PUERTA

Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Veterinaria.
Universidad de Córdoba.

RESUMEN

Hemos estudiado el contenido en factores neurotróficos de los extractos de tejidos intraoculares de embriones de pollo de entre 5 y 18 días de incubación, que afectan a la supervivencia neuronal con los extractos procedentes de embriones de 16 días de edad y el número máximo de neuronas que emitían neuritas con los de 14 días. Con los extractos en solución en el medio nutritivo, conseguimos la mayor supervivencia con los extractos procedentes de embriones de entre 12 y 18 días de edad y el máximo número de neuronas que emitían neuritas con los extractos de 14 días.

PALABRAS CLAVE: Embrión de pollo, ganglio ciliar, cultivo de neuronas, extracto de tejidos, factores neurotróficos.

SUMMARY

We have studied the neurotrophic factors contained in the chick embryo's eye tissue extract between 5 and 18 days old, which affect survival and neurite outgrowth for the neurons of the chick embryo ciliary ganglia from 8 days old.

Using the extract for the pretreatment of the polyornithine substratum, we obtained the best neuronal survival when the extract of 16 days old was employed, and the best neurite outgrowth using extract with 14 days old. With the extract in solutions, we obtained the best neuronal survival when employed the extract between 12 and 18 days old, and the best neurite outgrowth when the extract by 14 days old was employed.

KEY WORDS: Chick embryo. Ciliary ganglia. Neurons culture. Tissue extract. Neurotrophic.

Introducción

Los tejidos (dianas) que son inervados *in vivo* por las neuronas pertenecientes a los ganglios del sistema nervioso periférico de diversos animales, juegan un papel importante en el desarrollo de los mismos. Hamburger (1975) observó que el número de neuronas motoras de embriones de pollo que sobrevivían al proceso de muerte neuronal normal, guardaba proporcionalidad con la cantidad de tejido a inervar existente; posteriormente Landmesser (1979) sugiere que las neuronas durante ciertos períodos son dependientes de los tejidos que inervan, compitiendo por algún aspecto de los mismos (sinapsis o factores tróficos) que se encuentran en una cantidad limitada.

Las neuronas de los ganglios ciliares (GC) de embriones de pollo pueden sobrevivir *in vitro* y emitir neuritas con una combinación de suero y extracto de embrión de pollo (Varon y col. 1979). Sin embargo, los diferentes tejidos que constituyen los embriones de pollo presentan diferente actividad neurotrófica; para las neuronas de los GC la mayor actividad trófica se encuentra en los extractos de tejidos oculares, y dentro de estos en la fracción compuesta por la coroides, iris, cuerpo ciliar y epitelio pigmentado (Adler y col. 1979).

Los factores neurotróficos que se han conseguido aislar y en algunos casos purificar son proteínas. De todos ellos el factor de crecimiento nervioso (NGF), ha sido el más estudiado y es necesario para la supervivencia y emisión de axones por las neuronas de los ganglios simpáticos y sensoriales del embrión de pollo tanto *in vivo* como *in vitro* (Burnham y col. 1987).

La sensibilidad de las neuronas a los factores tróficos varía con la edad (Manthorpe y col. 1981 y Skaper y col. 1986) así mismo la capacidad trófica de los extractos también varía con la edad (Henderson y col. 1984 y Lindsay y col. 1979), esta capacidad ha sido determinada generalmente en solución en el medio nutritivo, aunque existen evidencias (Alcaín y Padilla 1987) de la existencia de moléculas tróficas que actúan ligadas al sustrato de poliornitina.

El objetivo del presente trabajo es el de estudiar los efectos de los extractos de tejidos oculares procedentes de embriones de pollo de entre 5 y 18 días de incubación (utilizados en solución o preacondicionamiento el sustrato de cultivo) sobre la supervivencia y emisión de neuritas por las neuronas de los GC.

Material y Métodos

Los extractos se prepararon a partir de tejidos procedentes de embriones de pollo de 5, 7, 8, 10, 14, 16 y 18 días. Cuando preparábamos extractos de 5 días primeramente procedíamos a la enucleación de los ojos, desechando los restos de tejidos adheridos a la capa externa de la esclerótica así como el cristalino y el humor vítreo; los demás tejidos fueron utilizados para la obtención de los extractos. Con el resto de las edades utilizadas se procedió después de la enucleación de los ojos a la extracción de la coroides, iris, cuerpo ciliar y epitelio pigmentado que fueron utilizados en la elaboración de los extractos.

Los tejidos obtenidos fueron lavados en solución salina de Hank's libre de Ca^{++} y Mg^{++} (SSH), posteriormente se homogeneizaron en F_{12} (sobre hielo picado); la cantidad de medio utilizada fue dependiente de la edad de los embriones y estaba comprendida entre 1 ml por cada ojo (para los extractos de 16 y 18 días) y 1 ml por cada 8 ojos (para los extractos de 5 días). Los homogenizados fueron centrifugados a 200G durante 30 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante era almacenado a $-20^{\circ}C$, posteriormente los extractos eran nuevamente centrifugados a 39.000G durante 60 minutos y a $4^{\circ}C$; el extracto obtenido se esterilizaba mediante filtración a través de un filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. Del extracto obtenido se tomaba una alícuota para determinar su concentración de proteínas.

Determinación de proteínas

La concentración de proteína de los extractos se determinó según el método de Lowry y col. (1951).

Cultivos celulares

Se utilizaron placas de cultivo de tejidos de 35 mm de diámetro revestidas de poliornitina a la concentración de 0.1 mg/ml como describe Padilla y col. (1989), el medio de cultivo utilizado fue F_{12} suplementado con un 10% de suero de caballo ($F_{12}S_{10}$). Los extractos de tejidos intraoculares se utilizaron para preacondicionar las placas de cultivo o en solución en el medio nutritivo (en 2 ml de $F_{12}S_{10}$) y a cinco concentraciones de proteína diferentes (400, 200, 100, 50 y 10 μg /placa). El preacondicionamiento de las placas con los extractos disueltos en 1 ml de F_{12} se realizó durante 18 horas a $4^{\circ}C$, antes de su utilización se lavaron dos veces con SSH.

Las células utilizadas en los cultivos procedían de GC de embriones de pollo de 8 días de incubación, la técnica utilizada para su extracción fue la descrita por Bustos y col. (1979), sembrándose 5.000 neuronas en cada placa de cultivo. El número de neuronas supervivientes así como las que habían emitido neuritas se determinó después de 24 horas de cultivo continuo.

Resultados

Cuando cultivamos células procedentes de GC en el medio de cultivo sin extractos no observamos neuronas supervivientes después de 24 horas de cultivo.

Placas preacondionadas con extractos de tejidos oculares

Bajo estas condiciones de cultivo primeramente procedimos a la determinación de la cantidad de proteína presente en los extractos que habían sido utilizados para preacondicionar las placas de cultivo, estas determinaciones nos permitían evaluar de una forma indirecta la cantidad de proteína que permanecía adherida al sustrato. Las determinaciones realizadas muestran la no influencia de las edades embrionarias en la cantidad de proteína que se retira de las placas, encontrando, previa exclusión de los datos procedentes de las placas tratadas con 10 µg de proteína, un valor de la media aritmética de 66 µg/placa para la proteína que permanece unida al sustrato.

Cuando utilizamos los extractos para preacondicionar las placas de cultivo los resultados respecto a supervivencia neuronal y emisión de neuritas por las neuronas son menos satisfactorios que cuando los extractos fueron utilizados en solución en dicho medio.

Los resultados más bajos respecto a la supervivencia neuronal se obtienen cuando empleamos extractos procedentes de embriones de pollo de 5 o 7 días de edad (Figura 1), en estos cultivos las neuronas presentaban un mal aspecto, caracterizado por la existencia de neuronas con los somas poco refringentes y abundantes formas redondeadas de soma oscuro; con los anteriores extractos así como con los procedentes de embriones de 8 días también obtenemos los más desfavorables resultados de todos los extractos estudiados, bajo estas condiciones, respecto a la emisión de neuritas.

Aunque con la utilización de extractos procedentes de embriones de 8 días el desarrollo neurítico era escaso, sí se incrementaba notablemente la supervivencia neuronal respecto a la obtenida con la utilización de las anteriores edades, presentando las neuronas en los cultivos un buen aspecto.

Con la utilización de extractos procedentes de embriones de 10 días de edad obtenemos unos buenos niveles de supervivencia neuronal (Figura 1), verificándose la presencia de neuronas con emisión de neuritas en todas las placas observadas; aunque no se cuantificó la longitud de dichas neuritas, sí se observó que en las placas tratadas con las mayores concentraciones de proteína las neuronas presentaban un mayor desarrollo neurítico; este comportamiento se mantiene con las demás edades estudiadas excepto con los extractos procedentes de embriones de 18 días.

De todos los extractos estudiados el mayor desarrollo neurítico se conseguía cuando se empleaban extractos de 12 y 14 días, evidenciándose en las placas tratadas con las mayores concentraciones de proteína la presencia de neuronas con largas neuritas ramificadas. Los valores máximos respecto a la supervivencia neuronal se obtiene con la utilización de extractos de 16 días (Figura 1), observándose en estas placas pocas neuronas que emitían cortas neuritas.

Con los extractos de 18 días la supervivencia neuronal era baja, las neuronas presentaban un mal aspecto y un escaso desarrollo neurítico.

Extractos de tejidos oculares en solución en el medio de cultivo

Cuando los extractos de tejidos oculares procedentes de embriones de 5 días de incubación fueron utilizados en solución en el medio de cultivo, se observó un buen aspecto de las neuronas, presentando los somas muy refringentes.

La supervivencia neuronal obtenida fue alta (Figura 2), pero fueron pocas las neuronas que emitieron neuritas, siendo estas generalmente cortas; similar comportamiento observamos cuando empleamos extractos de 7 y 8 días.

Los extractos de 10 días permiten una alta supervivencia neuronal, pero no un importante desarrollo neurítico, ya que los valores obtenidos son los más bajos de todas las edades estudiadas bajo estas condiciones.

Con los extractos de 12 días se observa, en relación con las anteriores edades estudiadas, un importante incremento en el número de neuronas que emiten neuritas, observándose así mismo un incremento aparente en la longitud de las mismas. El incremento de la longitud de las neuritas así como su mayor grado de ramificación era más evidente en las placas que contenían las mayores concentraciones de proteína utilizadas.

La supervivencia neuronal se mantiene en similares niveles en las demás edades estudiadas (Figura 2), siendo los valores más altos los obtenidos con los extractos de 14 y 18 días; aunque con estas edades se obtienen los mayores niveles de supervivencia neuronal, no ocurre lo mismo con la emisión de neuritas, ya que el mayor número de neuronas con estas prolongaciones se obtiene con los extractos de 14 días.

Estudio estadístico

Los datos correspondientes a la supervivencia neuronal fueron sometidos a un análisis de varianza, en dicho estudio la aplicación de la prueba de Tukey muestra que cuando los extractos fueron utilizados para precondicionar las placas de cultivo existen diferencias significativas, al nivel del 95%, entre todas las edades estudiadas excepto entre 5↔7 y 8↔10 días. Cuando los extractos fueron utilizados en solución sólo existen diferencias significativas entre 10↔14 y 14↔16 días.

Discusión

En todos los recuentos celulares realizados excepto en dos series experimentales, correspondientes a la utilización en solución de extractos de 14 y 18 días, los resultados fueron inferiores a 5.000 neuronas/placa. En las placas con unos valores de recuento superiores a 5.000 neuronas/placa se observó una cierta tendencia de las células a la agregación en el centro de las placas de cultivo, esta distribución no uniforme pudo ser la causa del resultado obtenido.

Alder y col. (1980, 1981), Collins (1978) y Collins y col. (1980) encuentran que los factores neurotróficos que se unen al sustrato de poliornitina son factores promotores de neuritas que no tienen efecto sobre la supervivencia neuronal. Nosotros después de haber utilizado tejidos oculares procedentes de embriones de pollo de diferentes edades embrionarias para precondicionar las placas de cultivo, encontramos que existe(n) agente(s) neurotrófico(s) que se unen al sustrato de poliornitina y que actúan sobre la supervivencia y emisión de neuritas por las neuronas de los GC. Estas observaciones coinciden con unas anteriores realizadas por nosotros (Alcain y Padilla, 1987), trabajando con extractos oculares procedentes de embriones de 18 días.

Existe la posibilidad de que parte de la proteína que se une al sustrato pierda su unión con el mismo, pase a solución y pueda ser arrastrada en los lavados de las placas con la solución salina. Para estudiar esta posibilidad se procedió a determinar la posible existencia de proteína en la solución salina empleada en los lavados de las placas, obteniéndose en todo momento resultados negativos.

La actividad de este(os) agente(s) neurotróficos que se unen al sustrato y actúan sobre las neuronas de los GC. Uno de ellos soporta la supervivencia neuronal y su máxima actividad se encuentra en los extractos de 16 días, el otro sería un factor promotor de neuritas, encontrándose su máxima actividad en los extractos de 14 días. Estos resultados difieren de las observaciones de Davis y col. (1985a, b) y Hammarback y col. (1985), ya que estos autores encuentran que los factores con actividad neurotrófica que se unen al sustrato no tienen efecto sobre la supervivencia neuronal y específicamente intervienen en la emisión, crecimiento y guía quimiotáctica de las neuritas.

El único factor presente en los extractos de coroides, iris, cuerpo ciliar y epitelio pigmentado de embrión de pollo que ha sido aislado y purificado (Barbin y col. 1984) y que actúa sobre la supervivencia de las neuronas de los GC,

PLACAS PREACONDICIONADAS CON EXTRACTOS

DIAS INCUBACION		CONCENTRACION DE PROTEINA				
		400 µg	200 µg	100 µg	50 µg	10µg
5 días	N ⁺	0	0	0	0	0
	N.T.	420±68	336±157	218±85	84±59	21±36
7 días	N ⁺	249±126	84±84	42±42	0	0
	N.T.	1.470±210	672±168	252±84	168±84	0
8 días	N ⁺	84±84	0	0	0	0
	N.T.	4.116±168	3.234±42	2.940±84	2.520±84	2.310±42
10 días	N ⁺	882±42	693±209	672±230	714±499	567±529
	N.T.	3.318±42	3.423±124	2.814±268	2.730±400	2.142±462
12 días	N ⁺	1.134±84	798±126	567±217	273±36	105±109
	N.T.	3.150±42	2.814±378	1.974±378	1.659±382	1.029±138
14 días	N ⁺	1.470±771	714±42	882±317	525±388	147±124
	N.T.	3.44±285	3.192±84	2.457±255	1.827±438	1.113±396
16 días	N ⁺	564±332	506±331	384±205	201±100	183±114
	N.T.	4.759±216	4.569±300	3.882±186	3.389±483	2.681±540
18 días	N ⁺	147±91	126±73	105±69	42±42	0
	N.T.	2.079±124	1.617±124	1.197±240	1.071±240	630±173

FIGURA 1. Valores de las medias y desviaciones típicas que representan la supervivencia neuronal (N.T.) y emisión de neuritas (N⁺), cuando los extractos de tejidos intraoculares preacondicionaban las placas.

DIAS INCUBACION		PLACAS CON EXTRACTOS DE TEJIDOS DE SOLUCION				
		CONCENTRACION DE PROTEINA				
		400 µg	200 µg	100 µg	50 µg	10µg
5 días	N*	294±294	210±73	315±36	168±103	93±96
	N.T.	4.305±509	4.158±422	3.708±424	3.108±597	2.016±867
7 días	N*	378±42	462±42	634±206	336±30	294±42
	N.T.	3.738±630	3.738-630	3.364-416	3.108±168	1.512±24
8 días	N*	273±36	231±124	189±138	21±36	63±70
	N.T.	4.116±486	3.759±568	3.549±391	2.982±269	2.457±293
10 días	N*	0	42±42	63±70	42±73	0
	N.T.	3.528±84	3.696±695	3.171±404	2.814±173	2.268±84
12 días	N*	2.052±126	1.554±282	693±150	546±42	105±70
	N.T.	4.562±404	4.221±175	3.696±389	2.898±126	2.079±305
14 días	N*	2.394±282	1.932±464	1.204±345	1.029±387	252±119
	N.T.	4.809±516	4.053±686	3.780±544	3.570±255	2.709±731
16 días	N*	1.544±444	1.634±773	1.001±714	608±449	438±278
	N.T.	3.491±674	3.945±859	3.188±680	2.719±877	2.343±528
18 días	N*	1.911±353	777±138	588±272	105±138	105±70
	N.T.	4.914±173	3.969±417	3.717±261	3.213±426	2.205±225

FIGURA 2. Valores de las medias y desviaciones típicas que representan la supervivencia neuronal (N.T.) y emisión de neuritas (N*), cuando los extractos de tejidos intraoculares se empleaban en solución el medio nutritivo.

es el factor neurotrófico ciliar; este factor actúa en solución (Alder y col. 1982, Manthorpe y col. 1980, 1981) no existiendo evidencias de que actúe unido a un sustrato de poliornitina, por lo que cuando utilizamos los extractos para precondicionar las placas de cultivo no podemos presuponer su acción, aunque puede darse la circunstancia de que este factor (o parte de él) se encuentre asociado a otras moléculas que sí se unan al sustrato de poliornitina.

Cuando utilizamos los extractos de tejidos en solución en el medio nutritivo, encontramos los mayores valores de neuronas con neuritas con la utilización de extractos de entre 12 y 18 días, el factor responsable de esta acción aunque fuera utilizando en solución podría unirse al sustrato de cultivo, lo que sería coincidente con las observaciones de Adler y col. (1980, 1981), Collins (1978), Collins y col. (1980, 1982), Davis y col. (1985a), Hammarback y col. (1985) y Henderson y col. (1984).

Landa y col. (1980) encuentran que el contenido en factores neurotróficos presentes en los tejidos oculares de embriones de pollo, que actúan en solución sobre las neuronas de los GC no es constante, presentando un incremento entre los días 7º y 13º (periodo estudiado), encontrando un marcado incremento de actividad entre los días 11º y 13º. Nuestros datos no son totalmente coincidentes con los de estos autores, ya que no observamos grandes cambios en la supervivencia neuronal obtenida por el empleo de extractos procedentes de diferentes edades embrionarias (la prueba de Tukey sólo presenta diferencias en tres de las edades estudiadas). Las diferencias pueden encontrarse, entre otras causas por la utilización de diferentes sustratos, ya que Landa et al. realizan sus cultivos sobre colágeno y nosotros sobre poliornitina.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER, R.; LANDA, K.B.; MANTHORPE, M. and VARON, S. (1979): Cholinergic neuronotrophic factors: Intraocular distribution of triohic activity for ciliary neurons. *Science*. **204**: 1.434-1.436.
- ADLER, R. and VARON, S. (1980): Cholinergic neuronotrophic factors: V. Segregations of survival and neurite-promoting activities in heart conditioned media. *Brain Res.* **188**: 437-448.
- ADLER, R.; MANTHORPE, M.; SKAPER, S.D. and VARON, S. (1981): Polyornithineattached neurite-promoting factors (PNPFs). Culture sources and responsive neurons. *Brain Res.* **206**: 129-144.
- ADLER, R. and VARON, S. (1982): Neuronal survival in intact ciliary ganglia *in vivo* and *in vitro*: Ciliary neurotrophic factor as a target surrogate. *Develop. Biol.* **92**: 470-475.
- ALCAIN, F.J. and PADILLA, F. (1987): A crude eye tissue extract factor bound to the culture substratum maintains the survival of parasympathetic neurons. *Acta Microsc.* **10**: 197-201.
- BARBIN, G.; MANTHORPE, M. and VARON, S. (1984): Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J. Neurochem.* **43**: 1.468-1.478.
- BURNHAM, P.; RAIBORN, C. and VARON, S. (1972): Replacement of nerve-growth factor by ganglionic non-neuronal cells for the survival *in vitro* of dissociated ganglionic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**: 3.556-3.560.
- BUSTOS, M.; ALCAIN, F.J. NIÑO, F. y JORDANO, D. (1979): Influencia de distintos medios cardio-condicionados sobre cultivos celulares de ganglio ciliar de embrión de pollo. *Arch. Zootec.* **28**: 271-284.
- COLLINS, F. (1978): Induction of neurite outgrowth by a conditioned-medium factor bound to the culture substratum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 5.210-5.213.
- DAVIS, G.E.; MANTHORPE, M.; ENGVAL, E. and VARON, S. (1985a): Isolation and characterizations of rat schwannoma neurite-promoting factors: evidence that the factor contains laminin. *J. Neurosci.* **5**: 2.662-2.671.
- DAVIS, G.E.; MANTHORPE, M. and VARON, S. (1985b): Parameters of neuritic growth from ciliary ganglion neurons *in vitro*: influence of laminin, schwannoma polyornithine-binding neurite promoting factors and ciliary neuronotrophic factor. *Develop. Brain Res.* **17**: 75-84.
- HAMBURGUER, V. (1975): Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* **160**: 535-546.
- HAMMARBAK, J.A.; PALM, S.L.; FURCHT, L.T. and LETOURNEAU, P.C. (1985): Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-absorbed laminin. *J. Neurosci. Res.* **13**: 213-220.
- HENDERSON, C.E.; HUCHET, M. and CHANGEUX, J.P. (1984): Neurite-promoting activities for embryonic spinal neurons and their developmental changes in the chick. *Develop. Biol.* **104**: 336-347.
- LANDA, K.B.; ADLER, R.; MANTHORPE, M. and VARON, S. (1980): Cholinergic neuronotrophic factors: III. Developmental increase of trophic activity for chick embryo ciliary ganglion neurons in their intraocular target tissues. *Develop. Biol.* **74**: 401-408.
- LANDMESSER, L.T. (1979): The cholinergic synapse. *Progress in brain research*. Vol. **49**: Elsevier Scientific Publishing Company.
- LINDSAY, R.M. and TARBIT, J. (1979): Developmentally regulated induction of neurite outgrowth from immature chick sensory neurons (DRG) by homogenates of avian or mammalian heart, liver and brain. *Neurosci. Letters.* **12**: 195-200.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MANTHORPE, M.; SKAPER, S.; ADLER, R.; LANDA, K. and VARON, S. (1980): Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues. *J. Neurochem.* **34**: 65-75.
- MANTHORPE, M.; ADLER, R. and VARON, S. (1981): Cholinergic neuronotrophic factors. VI. Age-dependent requirements by chick embryo ciliary ganglionic neurons. *Develop. Biol.* **85**: 156-11163.
- PADILLA, F.; PUERTA, F. y BUSTOS, M. (1989). Diferencias en el desarrollo de los ganglios ciliares *in vitro* dependientes del substrato y la edad. II. Poliornitina. Pendiente de publicación. *An. Anat.*
- SKAPER, S.D. and VARON, S. (1986): Age-dependent control of dorsal root ganglion neuron survival by macromolecular and low-molecular-weight trophic agents and substratum-bound laminins. *Develop. Brain. Res.* **24**: 39-46.
- VARON, S.; MANTHORPE, M. and ADLER, R. (1979): Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res.* **173**: 29-45.

Correspondencia: F. Padilla
Dto. Ciencias Morfológicas. Facultad de Veterinaria.
Avd. Medina Azahara, s/n.
14005 Córdoba. España

CAMBIOS DEBIDOS A LA EDAD EN EL DESARROLLO NEURITICO DE LAS NEURONAS DE LOS GANGLIOS CILIARES

CHANGES IN THE NEURITIC DEVELOP FROM THE CILIARY GANGLION NEURONS DUE TO THE AGE

F. PADILLA, F. PUERTA y M. BUSTOS

Departamento de Ciencias Morfológicas.
Facultad de Veterinaria.
Universidad de Córdoba.

RESUMEN

Hemos estudiado el desarrollo neurítico *in vitro*, producido por las neuronas de ganglios ciliares procedentes de embriones de pollo de 8, 10, 12 y 14 días, cultivadas sobre poliornitina previamente acondicionada con extractos de tejidos oculares procedentes de embriones de 18 días. El mayor desarrollo neurítico se obtiene en los cultivos de neuronas de un único patrón de ramificación. Los resultados obtenidos no muestran la existencia de un determinado patrón de ramificación, bajo nuestras condiciones de cultivo.

PALABRAS CLAVE: Embrión de pollo. Ganglio ciliar. Extracto de tejidos. Factores neurotróficos.

SUMMARY

We have studied *in vitro* the neuritic development produced by the ciliary ganglia neurons of chick embryo from 8, 10 and 14 days old, cultivated on polyornithine precoating with ocular tissues of chick embryo from 18 days old. The greater neuritic development was obtained in the neurons culture from 8 days old and the lower with the 14 days old neurons.

The existence of an only neuritic model is also discussed. Under our culture conditions, result do not confirm this hypothesis.

KEY WORDS: Chick embryo. Ciliary gangli. Tissue extract. Neurotrophic factors.

Introducción

El estudio del desarrollo del sistema nervioso siempre nos plantea cuestiones interesantes. Comenzamos con la diferenciación de las neuronas, posteriormente se produce la migración de las mismas y lo que Bunge y col. (6) consideran como primer aspecto del desarrollo neuronal, es decir, la asunción de una determinada posición.

El establecimiento de la posición implica dos cuestiones. La primera se refiere al sitio donde tiene el soma una neurona, y la segunda es el destino de sus fibras eferentes; el destino de estas fibras y los procesos de elongación que conlleva están influenciados por agentes químicos, de los que el mejor conocido es el factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF) descrito por Levi-Montalcini y Hamburger (13).

El potencial para la emisión de fibras eferentes (formación de los conos de crecimiento y posterior elingación de éstos) se distribuye por toda la superficie neuronal, pero se encuentra reprimido en amplias zonas por los microtúbulos neuronales. Las ramificaciones de las fibras eferentes (neuritas) se produce en bifurcaciones de los conos de crecimiento [Bray (4) y Bray y col. (5)], caracterizándose algunas zonas del sistema nervioso por el aspecto (patrón) de estas ramificaciones. Katz (11) propone que los patrones de ramificación de las neuronas son el producto de interacciones entre las tendencia intrínsecas naturales de estas células y las influencias extrínsecas.

Mediante las técnicas de cultivos *in vitro* podemos someter a las neuronas a ambientes homogéneos, lo que conlleva el control de parte de las influencias extrínsecas, permitiendo a las neuronas la expresión de sus tendencias intrínsecas.

Las neuronas de los ganglios ciliares (GC) pueden sobrevivir *in vitro* cuando el medio de cultivo es suplementado con suero y extractos de embrión de pollo [Varon y col. (15)], pero no todos los tejidos del embrión presentan la misma actividad neurotrófica; para estas neuronas la mayor actividad se encuentra en los extractos de tejidos oculares [Alder y col. (1)].

En un trabajo procedente [Alcaín y Padilla (3)] encontramos que el tratamiento del sustrato de poliornitina con extractos de tejidos oculares procedentes de embriones de pollo de 18 días de incubación permite la supervivencia y emisión de neuritas de las neuronas de los GC. El objetivo de este trabajo es el de la cuantificación del desarrollo neurítico de las neuronas de estos ganglios, inducido por los factores presentes en los extractos.

Material y Métodos

Obtención de los extractos de tejidos oculares

Los extractos fueron preparados con tejidos oculares procedentes de embriones de pollo de 18 días de incubación. Para su obtención primeramente procedíamos a la extracción de los ojos, colocándolos en solución salina de Hanks libre de Ca^{++} y Mg^{++} (SSH), posteriormente se eliminaban los restos de tejidos adheridos a la esclerótica, se extraían el cristalino y el humor vítreo, lavándose el resto de las estructuras con SSH y homogenizándolas en un volumen equivalente de SSH. El homogenado fue centrifugado a 1.500 G durante 30 minutos, se decantaba el sobrenadante y se almacenaba a $-20^{\circ}C$.

Cultivos celulares

Se emplearon placas para cultivos de tejidos de 35 mm de diámetro revestidas de poliornitina a la concentración de 0,1 mg/ml como describe Padilla y col. (14). El medio de cultivo empleado fue F¹² suplementado con un 10% de suero de caballo.

Las placas de cultivo fueron preacondicionadas colocando 1 ml de extracto de tejidos oculares diluido al 50%. Estas placas se mantenían 12 horas a $4^{\circ}C$, dos horas antes de realizar el cultivo se colocaban en una estufa a $37^{\circ}C$ y antes de emplearlas se lavaban dos veces con SSH.

Las células empleadas procedían de GC de embriones de pollo de 8, 10, 12 y 14 días de incubación, la técnica empleada para su extracción fue la descrita por Bustos y col. (7), sembrándose 2.000 neuronas en cada placa de cultivo.

Observaciones

Para realizar las observaciones y mediciones del crecimiento neurítico las neuronas fueron fijadas en formol neutro de Cajal. Las mediciones se realizaron a las 24, 48 y 72 horas de cultivo en un microscopio equipado con óptica de contraste de fases y provisto de un cámara de TV unida a un equipo de análisis de imágenes.

Considerábamos que una neurona había emitido neuritas cuando la longitud de éstas era al menos igual al diámetro del soma neuronal.

Resultados

De los resultados obtenidos primeramente se deduce que las neuronas de los GC varían su comportamiento dependiendo de la edad, respecto a los factores tróficos contenidos en los extractos.

En la figura 1 se muestran los datos (en %) de las neuronas que emitían neuritas en las placas estudiadas; con dichos datos podemos realizar tres bloques, el primero constituido por los datos procedentes de los cultivos realizados con neuronas de 8 días ($\cong 90\%$ de neuronas con emisión de neuritas), un segundo bloque constituido por los resultados procedentes del estudio con neuronas de 10 días ($\cong 50\%$ de neuronas con neuritas) y un tercer grupo constituido por las otras dos edades estudiadas.

La figura 2 muestra el resultado del estudio sobre el número de neuritas que presentaban las neuronas en cultivo, de estos datos no se puede deducir una clara relación entre el número de estas prolongaciones y la edad de las neuronas que las producen.

En el estudio sobre el desarrollo neurítico alcanzado por las neuronas en los cultivos se tomaron dos series de datos de cada neurona, uno fue la longitud total de las neuritas emitidas y el otro la longitud de la neurita principal (consideramos como neurita principal a la de mayor longitud, sin tener en cuenta sus posibles ramificaciones).

En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos respecto a la longitud de las neuritas (longitud total de neuritas y longitud de la neurita principal), en las neuronas estudiadas. El mejor desarrollo neurítico se consigue cuando se emplean neuronas de 8 días de edad y el menor se obtiene con las neuronas de 14 días de edad.

Las dos series de datos fueron sometidos a un análisis de varianza. La prueba de Tukey muestra que respecto a las edades estudiadas existen diferencias significativas entre todas ellas excepto entre 12 - 14 días; respecto a los días de cultivo la misma dócima muestra la existencia de diferencias significativas entre el primer día de cultivo y el tercero y entre el segundo y el tercero.

Posteriormente y empleando el mismo tipo de análisis rastreamos las posibles diferencias en el desarrollo neurítico entre los días de cultivo dentro de cada edad embrionaria estudiada, los resultados de la prueba de Tukey se muestran en la figura 5.

EMISION DE NEURITAS POR LAS NEURONAS			
	<i>Días de cultivo</i>		
	1	2	3
Neuronas de 8 días	90,5	90	86,7
Neuronas de 10 días	47	50,3	49,5
Neuronas de 12 días	19,5	26	31,5
Neuronas de 14 días	17	25,5	22,5

FIGURA 1. Valor de las medias (en %) de las neuronas que emitían neuritas en las placas estudiadas

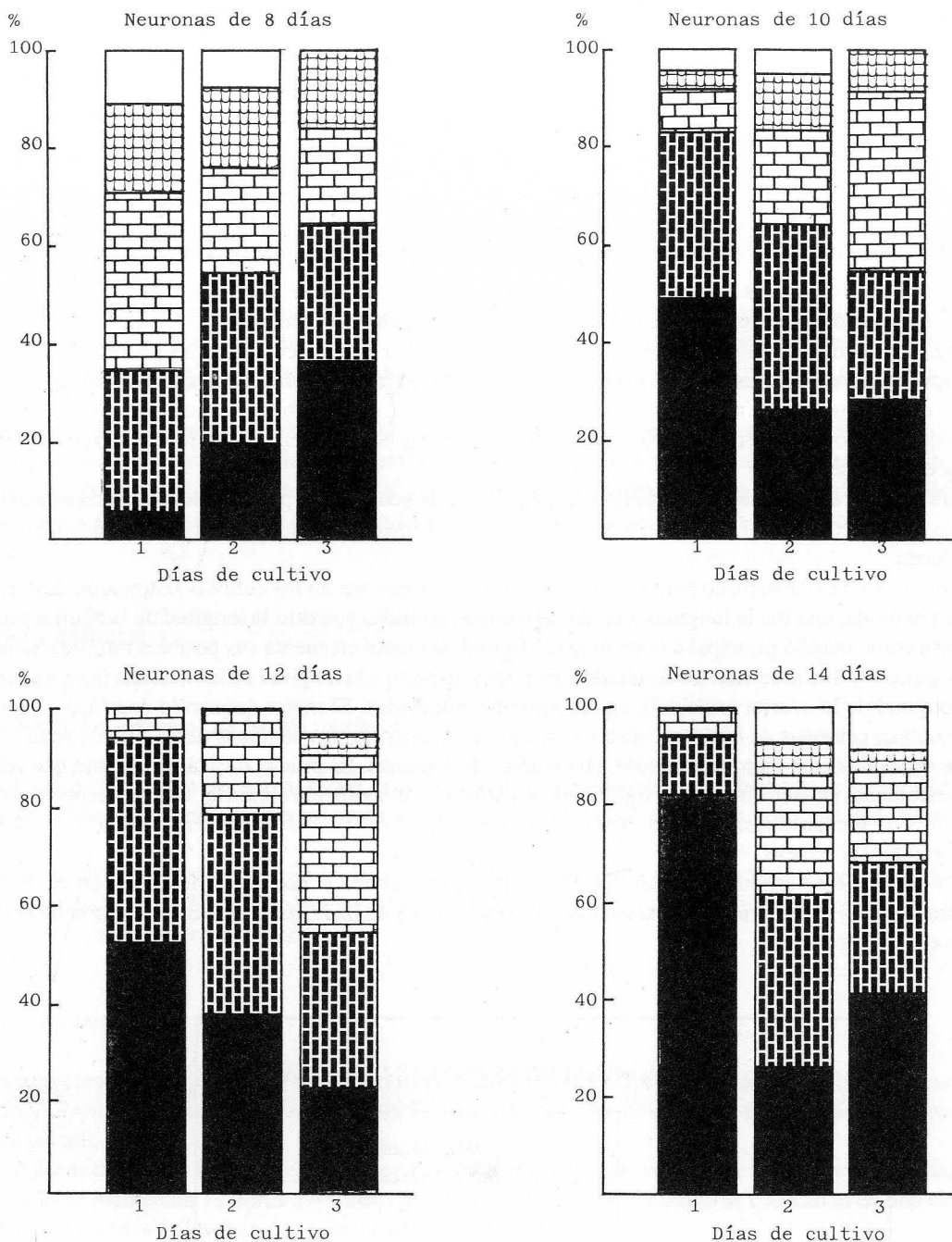


FIGURA 2. Número de neuritas que posean las neuronas en los cultivos

- 1. neurita.
- 2. neuritas.
- 3. neuritas.
- 4. neuritas.
- 5. neuritas.

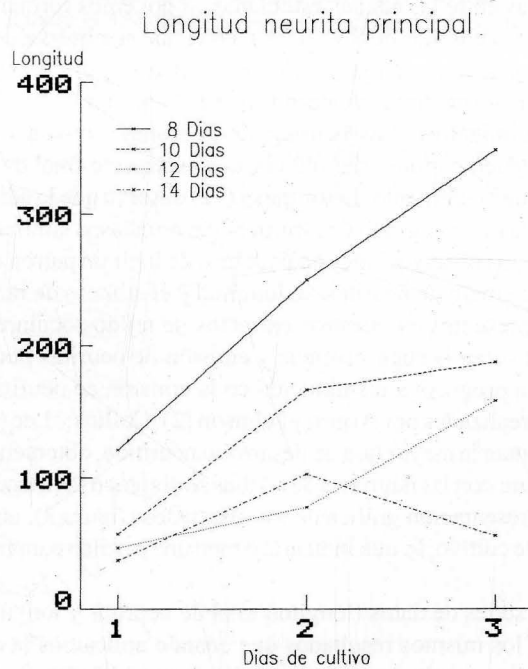
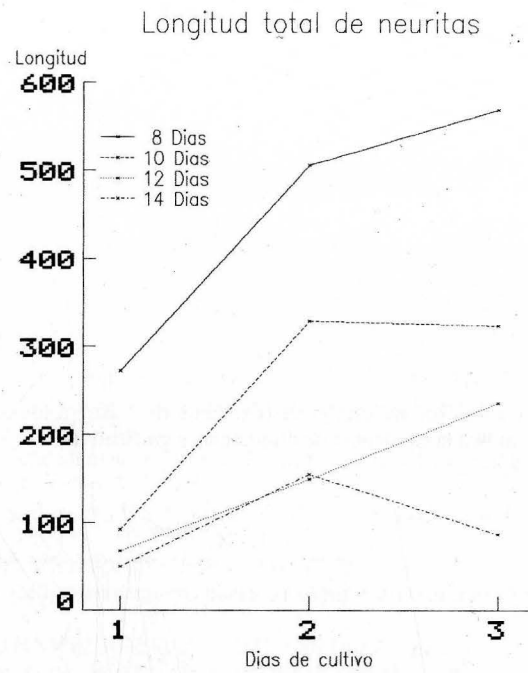


FIGURA 3. Representación gráfica de los valores de las medias (en μm), que corresponden a la longitud total de las neuritas de las neuronas de las edades estudiadas, en los días de cultivo.

FIGURA 4. Representación gráfica de los valores de las medias (en μm), que corresponden a la longitud de la neurita principal de las neuronas de las edades estudiadas, en los días de cultivo.

LONGITUD TOTAL NEURITAS				
	8 días	10 días	12 días	14 días
Día 1↔día 2º	***	***		***
Día 1↔día 3º	***	***	***	
Día 2º↔día 3º				***

LONGITUD NEURITA PRINCIPAL				
	8 días	10 días	12 días	14 días
Día 1↔día 2º	***	***		***
Día 1↔día 3º	***	***	***	
Día 2º↔día 3º				

FIGURA 5. Resultados obtenidos tras la aplicación de la d6cimo de Tukey a los d6as de cultivo dentro de cada edad embrionaria, (***) indica la existencia de diferencias significativas

Discusi6n

Aunque del estudio sobre el n6mero de neuritas que presentaban las neuronas en los cultivo (figura 2), no podemos deducir relaciones claras entre las edades estudiadas, s6 podemos formar dos grupos de comportamiento semejante. Uno constituido por las neuronas de 8 y 10 d6as, en el que se observa una «aparente» disminuci6n en el n6mero de neuritas que poseen las neuronas a lo largo de los tres d6as de cultivo y otro constituido por las neuronas de 12 y 14 d6as, en las que «parece» ocurrir un proceso inverso al anterior.

Bray (4) estudiando el crecimiento de las neuritas de neuronas simp6ticas, encuentra que los lugares de ramificaci6n de las neuritas no siguen patrones definidos y que es aspecto final de las neuritas es el resultado de la actividad aut6noma de los conos de crecimiento. Letoruneau (12) observa que la adhesi6n al substrato incide en gran manera en el tama6o de las neuritas y en el grado de ramificaci6n en 6stas; a similares conclusiones llega Katz (11). Nosotros como resultado de nuestras observaciones no podemos deducir un patr6n de ramificaci6n en las neuronas que hemos observado, ya que el n6mero de neuritas, su longitud y el n6mero de ramificaciones var6a ampliamente.

Los factores neurotr6ficos presentes en nuestros extractos de tejidos oculares y que se unen al substrato de poliornitina, presentan actividad sobre la supervivencia y emisi6n de neuritas por las neuronas de los GC. En las edades estudiadas se observa una progresiva disminuci6n en la emisi6n de neuritas en relaci6n con la edad; estas observaciones coinciden con las realizadas por Argiro y Johnson (2), Collins y Lee (8), Ebendal (9) y Hill y col. (10).

Las neuronas de 8 d6as presentan la mayor tasa de desarrollo neur6tico, obteni6ndose despu6s de 3 d6as de cultivo una longitud total media de 569 μm ; con las neuronas de 14 d6as se obtienen las menores tasas de desarrollo neur6tico, en este caso se observa en la representaci6n gr6fica de los resultados (figura 3), una disminuci6n en la longitud de las neuritas entre los d6as 2º y 3º de cultivo; lo que indicaría o bien una p6rdida o una retracci6n de las neuritas durante este tiempo de cultivo.

Quando sometemos las dos series de datos (longitud total de neuritas y longitud de la neurita principal) a un an6lisis de varianza, obtenemos los mismos resultados que cuando aplicamos la d6cimo de Tukey y a las edades estudiadas y a los d6as de cultivo; este resultado nos indica la inexistencia de diferencias, respecto a esta prueba, entre las dos series de datos y la posibilidad de emplear cualquiera de ellas para estudiar el desarrollo neur6tico.

Aunque no coinciden en su totalidad los resultados de la prueba de Tukey cuando se aplica a los d6as de cultivo dentro de cada edad estudiada (figuras 4 y 5), la 6nica diferencia se encuentra en la mayor de ellas y hay que tener en cuenta que en esta edad se produce el menor desarrollo neur6tico y que entre el 2º y 3º d6as (donde se encuentran las diferencias), se observa una disminuci6n en la longitud de las neuritas.

BIBLIOGRAFIA

1. ADLER, R.; LANDA, K.B.; MANTHORPE, M. and VARON, S. (1979): Cholinergic neuronotrophic factors: Intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science*. 204: 1.434-1.436.
2. ARGIRO, V. AND JOHNSON, M.I. (1982): Patterns and kinetic of neurite extension from sympathetic neurons in culture are age dependent. *The J. Neurosci.* 2: 503-512.
3. ALCAIN, F.J. and PADILLA, F. (1987): A crude eye tissue extract factor bound to the culture substratum maintains the survival of parasympatetic neurons. *Acta Microsc.* 10: 197-201.
4. BRAY, D. (1973): Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *The J. Cell Biol.* 56: 702-712.
5. BRAY, D.; THOMAS, C. and SHAW, G. (1978): Growth cone formation in cultures of sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5.266-5.229.
6. BUNGE, R.; JOHNSON, D. and ROSS, C.D. (1978): Nature and nurture in develop of the autonomic neurons. *Science.* 199: 1.409-1.416.
7. BUSTOS, M.; ALCAIN, F.J.; NIÑO, F. and JORDANO, D. (1979): Influence de distintos medios carido-condionados sobre cultivos celulares de ganglio cilira de embrión de pollo. *Arch. Zootec.* 28: 271-284.
8. COLLINS, F. and LEE, M.R. (1982): A reversible developmental change in the ability of ciliary ganglion neurons to extend neurites in culture. *J. Neurosci.* 2: 424-430.
9. EBENDAL, T. (1979): Stage-dependent stimulations of neurite outgrowth exerted by nerve growth factor and chick herat in cultured embryonic ganglia. *Develop. Biol.* 72: 276-290.
10. HILL, C.E.; HENDRY, I. A. and BONYHADY, R.E. (1981): Avian parasympathetic neurotrophic factors: age-related increases and lak of regional specificity. *Biol.* 85: 258-261.
11. KATZ, M.J. (1985): Axonal branch shapes. *Brain Res.* 361: 70-76.
12. LETOURNEAU, P.C. (1975): Cell-to-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongations. *Exp. Cell. Res.* 124: 127-138.
13. LEVI-MONTALCINI, R. and HAMBURGER, V. (1953): A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 123: 233-278.
14. PADILLA, F.; PUERTA, F. y BUSTOS, M. (1989): Diferencias en el desarrollo de los ganglios ciliares *in vitro* dependientes del substrato y de la edad. II. Poliornitina. Pendiente de publicación en *Anales de Anatomía*.
15. VARON, S.; MANTHORPE, M. and ADLER, R. (1979): Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monoleyer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Rs.* 173: 29-45.

Correspondencia: P. Padilla
Dpto. Ciencias Morfológicas. Facultad de Veterinaria.
Avda. Medina Azahara, s/n.
14005 Córdoba. España

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NUCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTALAMO DEL GATO. I. NEURONAS MAGNOCELULARES

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE HYPOTHALAMIC PARAVENTRICULAR NUCLEUS OF CAT. I. MAGNOCELLULAR NEURONS

F.E. PASTOR, J.L. BLAZQUEZ, D. TORANZO, B. PELAEZ, 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

Hemos estudiado la ultraestructura de las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo de gatos adultos de ambos sexos. Los somas presentan en el corte una forma oval o elíptica. El núcleo celular suele ser de gran tamaño y de contorno regular; la cromatina se halla dispersa y es habitual encontrar un nucléolo grande y alejado de la membrana nuclear. Llama la atención el hallazgo ocasional de vesículas membranosas intranucleares. En el pericarion se observa un notable desarrollo de los organitos relacionados con la síntesis, almacenamiento y transporte de sustancias de naturaleza proteica. Además de los típicos gránulos elementales de neurosecreción, en ocasiones se han observado gránulos de aspecto similar a los de las células beta del páncreas endocrino. Con frecuencia hemos encontrado prolongaciones repletas de filamentos y complejos membranosos en la inmediata vecindad de la membrana celular.

PALABRAS CLAVE: Neuronas magnocelulares, Núcleo paraventricular del hipotálamo, Ultraestructura, Gato.

SUMMARY

An ultrastructural study was carried out on the magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus of adult cats of both sexes. The perikarya showed an oval or elliptic shape. The cell nucleus was usually found to be large in size, with a regular contour. The chromatin was disperse and an usual finding was a large nucleolus distant from the nuclear membrane. Of interest was the occasional observation of membranous intranuclear vesicles. The cytoplasm exhibited a notheworthy development of organelles related to the synthesis, storage and transport of proteic substances. Apart from the typical neurosecretory granules, it was sometimes possible to observe granules with an aspect similar to those of the beta cells of the endocrine pancreas. Filamentous processes and laminary expansions of glial cells were commonly observed in the immediate vicinity of the cell membrane.

KEY WORDS: Magnocellular neurons, Hypothalamic paraventricular nucleus, Ultrastructure, Cat.

Introducción

El término núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) fue utilizado por vez primera por Malone en 1910 para denominar esta agrupación neuronal hipotalámica (véase Diepen, 1962). Cajal (1911) hace la primera descripción de las células que lo integran, empleando el nombre de «noyau sous-ventriculaire». Krieg (1932), que utiliza la denominación «núcleo filiforme», distingue la existencia en el núcleo de dos poblaciones neuronales -magno y parvocelulares- en atención a su tamaño.

El NPV es, junto con el núcleo supraóptico, el principal origen de las proyecciones al lóbulo posterior de la hipófisis (Bargmann, 1949). Sus neuronas sintetizan vasopresina y oxitocina, así como otras neurohormonas y neurotransmisores (véase Silverman y Zimmerman, 1983; Swanson y Sawchenko, 1983; Palkovits, 1986; Bondy y col., 1989; Calzá y col., 1990; Papadopoulos y col., 1990).

Teniendo en cuenta su citoarquitectura, su contenido hormonal y sus eferencias, algunas de ellas extrahipotálamicas, el NPV resulta ser una de las agrupaciones neuronales más complejas y heterogéneas del sistema nervioso central, habiendo sido dividido en diferentes subnúcleos tanto magno como parvocelulares (para referencias véase Swanson y Sawchenko, 1983).

Los estudios ultraestructurales sobre el NPV son escasos y prácticamente reducidos a la rata. En esta especie, los somas magnocelulares han sido descritos por Klein y col. (1968), Pilgrim (1969), Flament-Durand (1971), Kalimo (1971, 1975), Morris (1971), Yukitake y col. (1977), Gregory y col., (1980), Freund-Mercier y col. (1981) y Van Den Pol (1982). En esta misma especie la ultraestructura de las neuronas parvocelulares del NPV ha sido estudiada por Hervas y Lafarga (1979, 1980) y Lafarga y Palacios (1979).

En el presente trabajo se describen las características ultraestructurales de los somas magnocelulares del NPV del hipotálamo del gato, sobre el que abundan los trabajos de microscopía óptica (Bargmann, 1949; véase Diepen, 1962), pero que ha sido muy poco estudiado con el microscopio electrónico.

Material y métodos

Para nuestro estudio hemos utilizado seis gatos adultos (tres machos y tres hembras), con un peso comprendido entre 2.650 y 4.000 gramos. El sacrificio de los animales se realizó, previa anestesia con tiopental sódico (50 mg/Kg peso) por vía intraperitoneal, mediante perfusión a través del ventrículo izquierdo de una solución fijadora de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4 °C, precedida por un ligero lavado del árbol vascular con una solución de cloruro sódico 0.15 M. Tras la perfusión se obtuvo el bloque hipotálamo-hipofisario, que fue tallado en planos frontales. Las piezas de tejido en que se localiza el NPV permanecieron en la solución fijadora por un período de 12 horas. A continuación fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% en el tampón antes descrito, durante hora y media, a 4 °C. Posteriormente fueron deshidratadas con acetona, contrastadas en bloque con acetato de uranilo al 2% en acetona de 70° e incluidas en Durcupan (Fluka). Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800. Cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina para la localización del NPV. Los cortes ultrafinos se contrastaron siguiendo el método de Reynolds y se estudiaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-201.

Resultados

Hemos estudiado la porción anterior del territorio del NPV en cortes frontales del hipotálamo a nivel de la parte posterior del quiasma óptico, correspondientes, aproximadamente, al plano A-14 del atlas de Avendaño y Reinoso-Suárez (1975). A este nivel, el epitelio endimario del tercer ventrículo es monoestratificado, cilíndrico y ciliado.

El NPV se halla a menos de 1 mm de distancia del epéndimo, y a algo más de 1 mm de la parte superior del quiasma óptico; su territorio está muy capilarizado y en él existen nidos de neuronas y amplios neuropilos.

Los somas de las neuronas magnocelulares presentan en el corte forma oval (fig. 1) o elíptica, aunque tendiendo a ser circulares porque hay muy poca diferencia de longitud entre los ejes longitudinal y transverso. El primero mide en estas neuronas alrededor de 25 μm .

El núcleo celular es igualmente grande (el eje mayor puede alcanzar entre 11 y 13 μm) y se sitúa excéntricamente en el soma (figs. 1 y 5). En el corte es elíptico, con escasa diferencia entre los dos ejes. La cromatina esta dispersa y pueden verse algunos grumos de heterocromatina con poca tendencia a colocarse junto a la membrana nuclear. Alguna escotadura, no muy profunda, rompe la periferia del núcleo penetrando hacia el interior (fig. 1). Un nucléolo de tamaño grande puede distinguirse en el interior del núcleo, alejado siempre de la membrana nuclear (fig. 1). No son infrecuentes las inclusiones membranosas de forma vesicular (fig. 3, flecha) que se encuentran en el interior del núcleo y que no corresponden a invaginaciones de la membrana nuclear.

En el pericarion destaca, como nota característica, la casi constante existencia de apilamientos de retículo endoplásmico rugoso (RER) situados en varios territorios del soma (figs. 1 y 5). Estos apilamientos estan constituidos por cisternas de RER muy aplanadas, largas y dispuestas paralelamente, entre las cuales hay numerosos polirribosomas (fig. 9). Estos últimos también existen en abundancia por otros territorios del pericarion (figs. 7 y 10). En el interior de las cisternas se observa, a grandes aumentos, un contenido de aspecto floculento y densidad electrónica escasa (fig. 9).

El aparato de Golgi suele estar muy desarrollado y distribuido en varios campos por amplios territorios del soma, entre los apilamientos del RER y el núcleo celular (fig. 1). Está constituido por sáculos aplanados y cisternas (figs. 4 y 6) y en sus proximidades se observan gránulos elementales de neurosecreción en formación. Son gránulos grandes y redondos de un diámetro de unos 220 nm, con un centro denso y homogéneo y un halo claro entre éste y la membrana limitante del gránulo, que en algún punto puede tener una prolongación como si fuera la continuación de un sáculo golgiano (fig. 7). Por regla general este tipo de gránulos neurosecretorios suele estar siempre junto al Golgi. Ahora bien, también en el area golgiana hay otros gránulos con aspecto de vesículas redondas u ovales, grandes (280-300 nm, e incluso más), de contenido menos denso y heterogéneo, constituido por un acúmulo de microvesículas de menor tamaño que las de tipo sináptico, o bien con un contenido pulverulento y tan escaso que, en ocasiones, aparecen «vacías». Este tipo de gránulos se encuentra no sólo en el area golgiana (fig. 4), sino también en amplios territorios del pericarion, en las espinas somáticas (fig. 10) o formando filas entre las pilas de RER y el plasmalema (fig. 9).

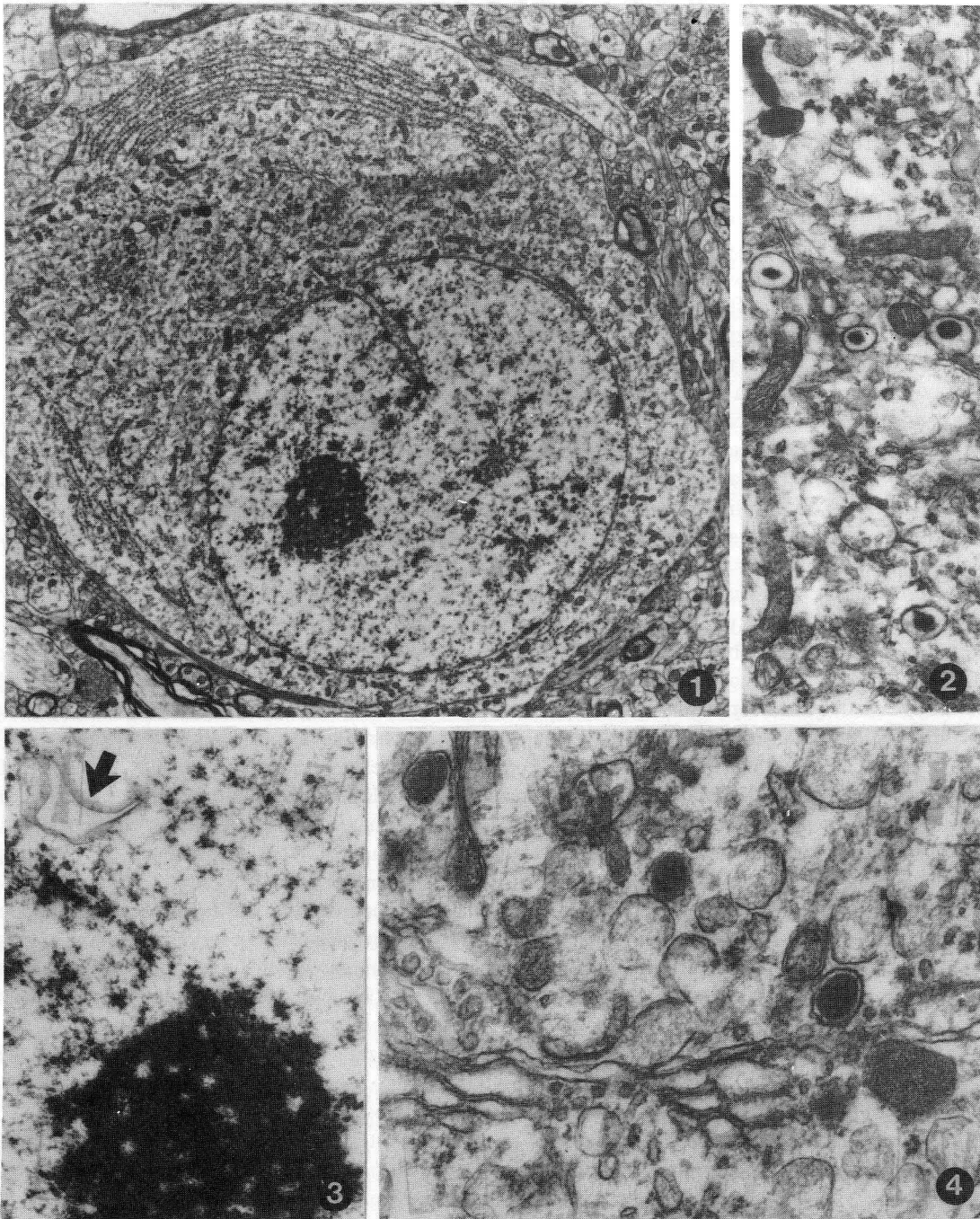
Excepcionalmente, otro tipo de gránulos se observan en algunas neuronas del NPV (fig. 2). Estos gránulos son similares a los de las células beta del páncreas endocrino. Están constituidos por un centro muy denso, homogéneo y redondo, de unos 150 nm, o menos, que se sitúa excéntricamente en una vesícula mayor (240 nm de diámetro), existiendo un gran espacio claro entre la membrana y el centro denso (fig. 2). Estos gránulos se encuentran también en el área golgiana.

Las mitocondrias, no muy numerosas, son largas, pudiendo alcanzar hasta 2 μm de longitud (fig. 8), de crestas transversas y matriz densa. En el citoplasma pueden encontrarse otros organitos tales como cuerpos multivesiculares (figs. 2 y 10), cuerpos densos lisosomiales (figs. 1 y 5) y neurotúbulos, aunque no son muy abundantes.

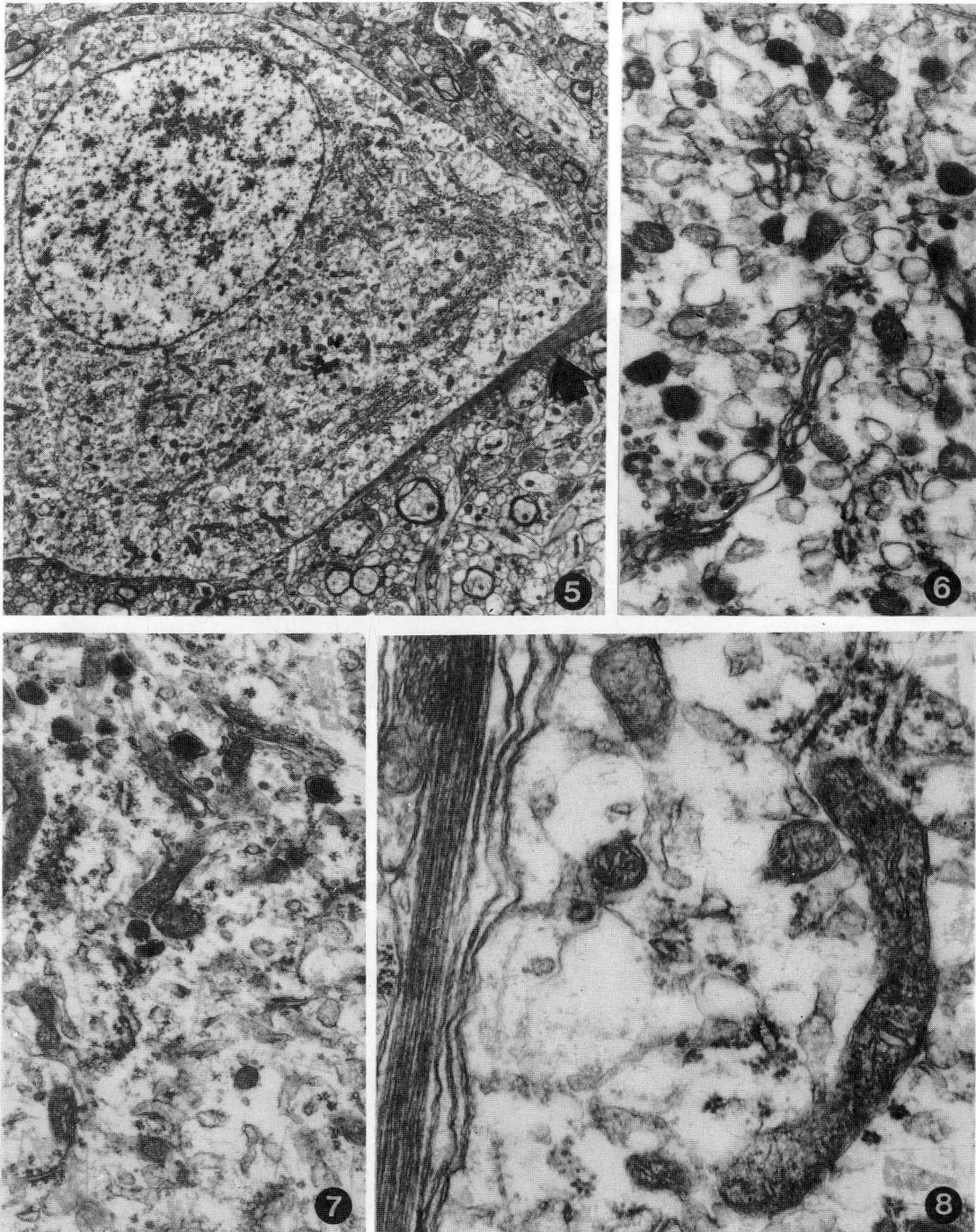
Junto a la membrana plasmática pueden verse prolongaciones citoplasmáticas repletas de filamentos que, en ocasiones, parece que intentan delimitar el perfil somático (fig. 5, flecha); también hallamos expansiones laminares de células gliales, paralelas entre sí, que separan el soma neuronal del neuropilo vecino (fig. 8).

Discusión

Las neuronas magnocelulares del NPV del gato muestran características ultraestructurales similares a las descritas en la rata (Klein y col., 1968; Pilgrim, 1969; Flament-Durand, 1971; Kalimo, 1971, 1975; Morris, 1971; Yukiwake y col., 1977; Gregory y col., 1980; Freund-Mercier y col., 1981; Van Den Pol, 1982). Su citoplasma posee los organitos típicos de las neuronas neurosecretoras, en especial los relacionados con la síntesis proteica (RER y ribosomas) y con el empaquetamiento del material neurosecretor (aparato de Golgi), así como gránulos elementales



- FIGURA 1.** Neurona del NPV de gata adulta. Obsérvese su contorno oval, el núcleo grande, escotado y excéntrico, y un nucléolo prominente alejado de la membrana nuclear, así como los apilamientos de RER, los campos de Golgi y algunos cuerpos densos lisosomiales. 5.915x.
- FIGURA 2.** Detalle del area golgiana de una neurona del NPV correspondiente a un gato macho adulto. Se aprecian algunas mitocondrias de matriz densa, un cuerpo multivesicular y varios gránulos con centro muy denso y un amplio espacio claro que lo separa de la membrana. 21.900x.
- FIGURA 3.** Gato macho adulto. Detalle del núcleo de una neurona del NPV. La flecha señala una inclusión membranosa intranuclear en forma de vesícula. 45.500x.
- FIGURA 4.** Detalle del area golgiana de la neurona de la figura 1. Obsérvese las cisternas del Golgi rodeadas por gránulos de secreción de contenido heterogéneo y algunos gránulos elementales de neurosecreción. 45.500x.



- FIGURA 5.** Neuropilo y neurona del NPV de gata adulta. En el soma neuronal además del núcleo ovalado y excéntrico se observan varios grupos de cisternas de RER, el campo de Golgi y algunos cuerpos densos lisosomiales. La flecha señala una prolongación repleta de filamentos en la inmediata vecindad del soma. 4.875x.
- FIGURA 6.** Detalle del área golgiana de la neurona de la figura anterior. alrededor de las cisternas del Golgi existen muchos gránulos de secreción de contenido heterogéneo. 21.900x.
- FIGURA 7.** Detalle del citoplasma de una neurona del NPV perteneciente a una gata adulta donde pueden observarse varios gránulos elementales de neurosecreción junto a los sacos del Golgi. Los polirribosomas son abundantes. 21.900x.
- FIGURA 8.** Detalle del área golgiana de una neurona del NPV de gato macho adulto. Se aprecian varias mitocondrias de matriz densa, una de las cuales ha sido seccionada longitudinalmente. Por fuera del plasmalema aparece un sistema de membranas paralelas y muy próximas entre sí. 45.500x.

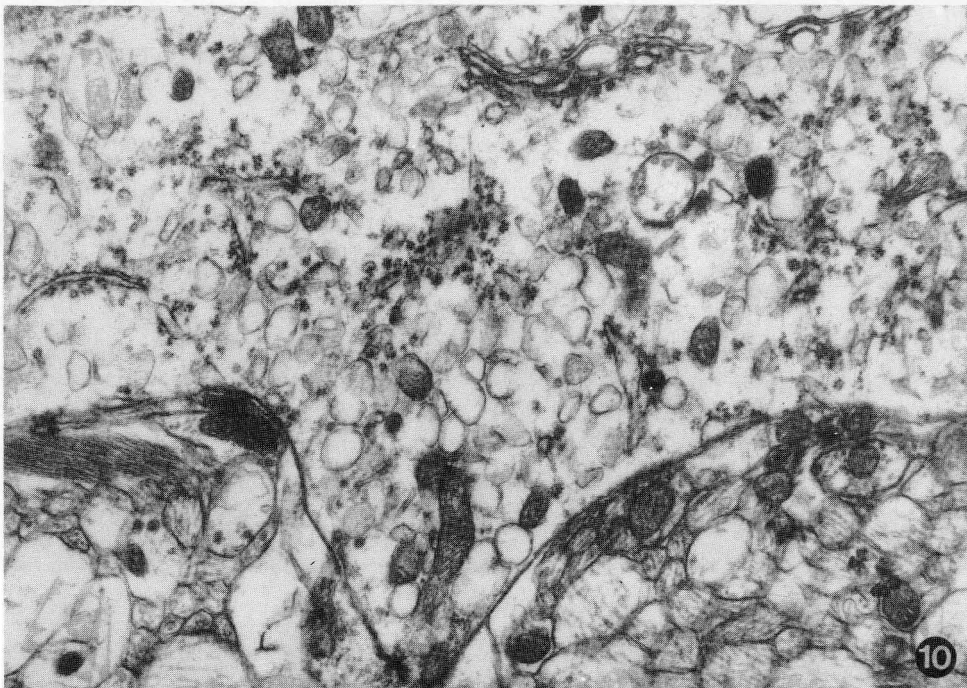
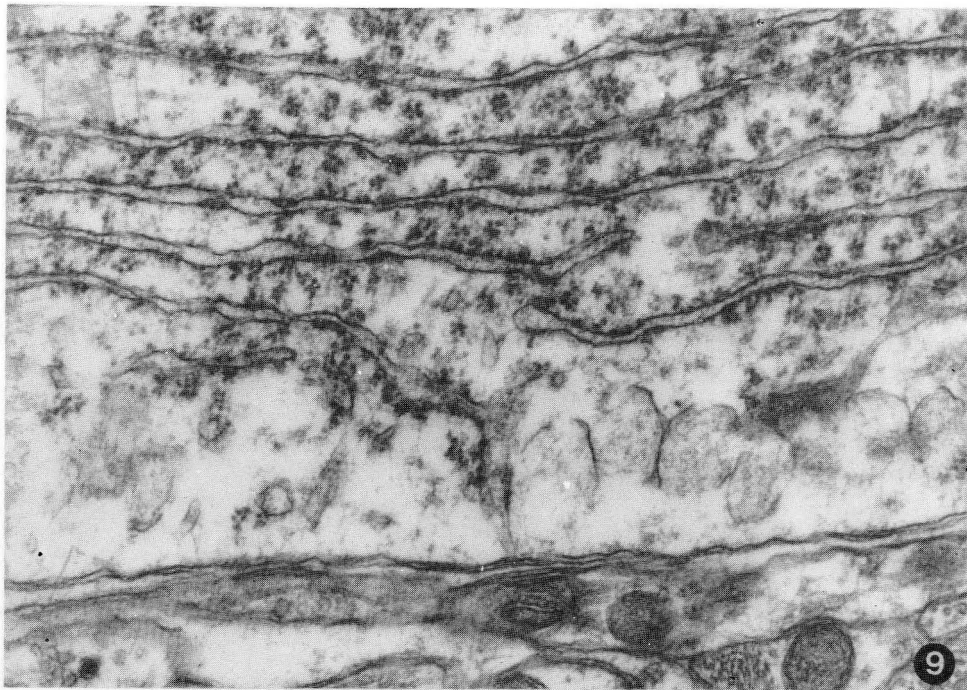


FIGURA 9. Detalle del territorio citoplásmico ocupado por apilamientos de RER correspondiente a la neurona de la figura 1. Se aprecia el contenido floculento de las cisternas aplanadas y algunos gránulos de neurosecreción. 45.500x.

FIGURA 10. Detalle del citoplasma de una neurona del NPV de gata adulta donde se observa una espina somática. También se aprecia un gran número de gránulos de neurosecreción y algunas cisternas de RER así como polirribosomas y un cuerpo multivesicular. 21.900x.

de neurosecreción, que son los organitos que contienen las neurohormonas y sus proteínas transportadoras (véase Livingston, 1971). En los somas magnocelulares se observan fundamentalmente dos tipos de gránulos. Por una parte, los gránulos de contenido denso y homogéneo, que está separado de la membrana limitante por un halo claro periférico; estos gránulos se suelen encontrar casi siempre en la vecindad de las cisternas del aparato de Golgi. Por otro lado, existen también otros gránulos, de mayor tamaño que los anteriores, con un contenido a base de microvesículas o de aspecto pulverulento, de baja densidad electrónica -a veces aparecen casi «vacíos»- y que carecen de halo periférico. La membrana limitante es discontinua en muchas ocasiones y el contenido parece ponerse en contacto con el citoplasma. Este diferente aspecto de los gránulos neurosecretorios se ha tratado de explicar suponiendo que en los de menor densidad electrónica se habría almacenado menor cantidad de material neurosecretor (Tweedle y Hatton, 1976) o que habrían perdido contenido por liberación hacia el citoplasma (Kalimo, 1971; Krisch, 1979). Ambas hipótesis son poco convincentes. Más probable es que el diferente aspecto de los gránulos guarde relación con la progresiva escisión del precursor hormonal almacenado en ellos. En este sentido se ha sugerido que el incremento en el tamaño y la disminución de la densidad electrónica estarían en relación con la maduración del contenido de los gránulos (Morris y Cannata, 1972, 1973; Cannata y Morris, 1973).

Un hallazgo casual en algunos somas neuronales del NPV es la presencia de gránulos que por su aspecto recuerdan a los de las células beta del páncreas endocrino. No descartamos que pueda tratarse de un artefacto. Caso de que no sea así, su presencia sugiere que podrían contener productos distintos de los péptidos neurohipofisarios. En este sentido es de resaltar que se ha descrito la coexistencia de hormonas neurohipofisarias y otras sustancias en neuronas del sistema neurohipofisario (véase Watkins, 1980; Vanderhaeghen y col., 1981; Martin y Voigt, 1981; Lundberg y Hokfelt, 1983; Jirikowski y col., 1986; Bondy y col., 1989; Papadopoulos y col., 1990).

Otro dato observado de forma ocasional en nuestro material, integrado por animales normales, es la presencia de vesículas membranosas intranucleares en las neuronas del NPV. Estructuras similares han sido descritas por Gregory y col. (1980) en neuronas del NPV de ratas deshidratadas y posteriormente rehidratadas, sugiriendo estos autores que las referidas estructuras podrían producirse durante la fijación y que su tendencia a aparecer sería función de la actividad celular. Nosotros las hemos observado en neuronas del área preóptica medial y del NPV de ratas sometidas a pinealectomía (Toranzo, 1986; Toranzo y col., 1988). También han sido descritas en neuronas de otras estructuras del sistema nervioso: nucleus cuneatus de rata durante el desarrollo (David y Nathaniel, 1978), complejo olivar inferior de gato y ardilla de tierra (Bozhilova y Ovtcharoff, 1985), corteza cerebral del pollo durante el desarrollo (Calvet y col., 1987). Se ha sugerido que la aparición de estas inclusiones puede deberse a invaginaciones de la hoja interna de la membrana nuclear y que podrían estar relacionadas con un mecanismo de transporte entre el citoplasma y el núcleo (véase David y Nathaniel, 1978; Calvet y col., 1987).

Con bastante frecuencia hemos sorprendido prolongaciones repletas de filamentos y expansiones laminares de células gliales adosadas a los somas magnocelulares. Estas últimas estructuras muy probablemente correspondan a prolongaciones de astrocitos (Fernández y col., 1984). Se ha sugerido que en circunstancias en que la función del sistema hipotálamo-neurohipofisario se halla incrementada, tales como la deshidratación, las prolongaciones de las células gliales podrían sufrir un proceso de retracción, favoreciendo de esta forma el establecimiento de contactos directos somatosomáticos (Tweedle y Hatton, 1976, 1977). Para tales contactos intersomáticos, esto es, aposición de somas neuronales sin interposición de prolongaciones de células gliales, se ha invocado un papel en la interacción neuronal, en relación con la coordinación y sincronización funcional (Lafarga y col., 1975; Van Den Pol, 1980).

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento 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

- AVENDAÑO, C. y F. REINOSO-SUAREZ (1975).- Atlas estereotámico de la amígdala, el hipotálamo y la región preóptica del gato. Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid.
- BARGMANN, W. (1949).- Über die neurosekretorische Vernüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z. Zellforsch.*, **34**: 610-634.
- BOZHILOVA, A. y W. OVTSCHAROFF (1985).- Nuclear inclusions in inferior olivary nucleus neurons of the cat and the ground squirrel (*Citellus citellus*, L.). *Z. mikrosk.-anat. Forsch.*, **99**: 725-734.
- BONDY, C. A., M. H. WHITNALL, L. S. BRADY y H. GAINER (1989).- Coexisting peptides in hypothalamic neuroendocrine system: some functional implications. *Cell. Mol. Neurobiol.* **9**: 427-446.
- CAJAL, S.R. (1911).- *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol. 2. Maloine, París. (Reedición del C.S.I.C. Instituto Cajal, Madrid, 1955).
- CALZA, L., L. GIARDINO, A. VELARDO, N. BATTISTINI y P. MARRAMA (1990).- Influence of aging on the neurochemical organization of the rat paraventricular nucleus. *J. Chem. Neuroanat.*, **3**: 215-231.
- CALVET, S., J.M. DOMENECH, V. MARTIN y J.M. GARCIA (1987).- Nuclear inclusions in the neurons of the developing cerebral cortex of *Gallus gallus*. *J. Submicrosc. Cytol.*, **19**: 471-478.
- CANNATA, M.A. y J.F. MORRIS (1973).- Changes in the appearance of hypothalamo-neurohypophysial neurosecretory granules associated with their maturation. *J. Endocrinol.*, **57**: 531-538.
- DAVID, S. y E.J.H.NATHANIEL (1978).- Intracellular inclusions in the developing neurons of the rat cuneate nuclei. *Cell Tissue Res.*, **193**: 525-532.
- DIEPEN, R. (1962).- *Der Hypothalamus*. En: *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*. IV/7. Nervensystem. (von Möllendorff y Bargmann, eds.). Springer-Verlag, Berlín.
- FERNANDEZ, B., I. SUAREZ y G. GONZALEZ (1984).- Topographical distribution of the astrocytic lamellae in the hypothalamus. *Anat. Anz.*, **156**: 31-37.
- FLAMENT-DURAND, J. (1971).- Ultrastructural aspects of the paraventricular nuclei in the rat. *Z. Zellforsch.*, **116**: 61-69.
- FREUND-MERCIER, M.J., M.E. STOECKEL, F. MOOS, A. PORTE y Ph. RICHARD (1981).- Ultrastructural study of the electrophysiologically identified neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell. Tissue Res.*, **216**: 503-512.
- GREGORY, W.A., C.D. TWEEDLE y G.I. HATTON (1980).- Ultrastructure of neurons in the paraventricular nucleus of normal, dehydrated and rehydrated rats. *Brain Res. Bull.*, **5**: 301-306.
- HERVAS, J.P. y M. LAFARGA (1979).- Subsurface cisterns in paraventricular nuclei of the hypothalamus of the rat. *Cell Tissue Res.*, **199**: 271-279.
- HERVAS, J.P. y M. LAFARGA (1980).- Lamellar bodies in paraventricular nuclei of the hypothalamus of the rat. *J. Submicrosc. Cytol.*, **12**: 243-253.
- JIRIKOWSKI, G.F., H. BACK, W.G. FORSSMANN y W.E. STUMPF (1986).- Coexistence of atrial natriuretic factor (ANF) and oxytocin in neurons of the rat hypothalamus. *Neuropeptides*, **8**: 243-249.
- KALIMO, H. (1971).- Ultrastructural studies of the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. The paraventricular neurons of the non-treated rat. *Z. Zellforsch.*, **122**: 283-300.
- KALIMO, H. (1975).- Ultrastructural studies of the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. III. Paraventricular and supraoptic neurons during lactation and dehydration. *Cell. Tissue Res.*, **163**: 151-168.
- KLEIN, M.J., A. PORTE y F. STUTINSKY (1968).- Comparaison ultrastructurale des noyaux neurosécrétoires hypothalamiques chez le rat normal ou en état de surcharge. *C.R. Ass. Anat.*, **142**: 1066-1072.
- KRIEG, W.J.S. (1932).- The hypothalamus of the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, **55**: 10-44.
- KRISCH, B. (1979).- Indication of a granule-free form of vasopressin in immobilization-stressed rats. *Cell Tissue Res.*, **197**: 95-104.
- LAFARGA, M. y G. PALACIOS (1979).- Nuclear inclusions in paraventricular nucleus neurons of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **203**: 223-229.
- LAFARGA, M., G. PALACIOS y R. PEREZ (1975).- Morphological aspects of the functional synchronization of supraoptic nucleus neurons. *Experientia*, **31**: 348-349.
- LIVINGSTON, A. (1971).- Subcellular aspects of storage and release of neurohypophysial hormones. *J. Endocrinol.*, **49**: 357-372.
- LUNDBERG, J.M. y T. HOKFELT (1983).- Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends in Neuroscience*, **83**: 325-333.
- MARTIN, R. y K.H. VOIGT (1981).- Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature*, **289**: 502-504.
- MORRIS, J.F. (1971).- Electron microscopical study of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *J. Anat.*, **108**: 592-593.
- MORRIS, J.F. y M.A. CANNATA (1972).- A possible origin of pale neurosecretory granules in the neurohypophysis. *J. Anat.*, **111**: 345-347.
- MORRIS, J.F. y M.A. CANNATA (1973).- Ultrastructural preservation of the dense core of posterior pituitary neurosecretory granules and its implications for hormone release. *J. Endocrinol.*, **57**: 517-529.

- PALKOVITS, M. (1986).- Afferents onto neuroendocrine cells. En: Morphology of hypothalamus and its connections. (Ganten y Pfaff, eds.) pp. 197-222. Springer-Verlag, Berlin.
- PAPADOPOULOS, G. C., J. ANTONOLPOULOS, A. N. KARAMANLIDIS y H. MICHALOUDI (1990).- Coexistence of neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus of the sheep. *Neuropeptides* **15**: 227-233.
- PILGRIM, Ch. (1969).- Morphologische und funktionelle untersuchungen zur neurosekretbildung. Enzihistochemische, autoradiogrphische und elektronenmikroskopische beobachtungen an ratten unter osmotischer belastung. *Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch.*, **41**: 1-79.
- SILVERMAN, A.J. y E.A. ZIMMERMAN (1983).- Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.*, **6**: 357-380.
- SWANSON, L.W. y P.E. SAWCHENKO (1983).- Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.*, **6**: 269-324.
- TORANZO, D. (1986).- Influencia de la glandula pineal sobre el eje hipotálamo- hipófiso-gonadal. (Estudio morfológico). Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- TORANZO, D., F.E. PASTOR, J.L. BLAZQUEZ, A.J. ALVAREZ-MORUJO y P. AMAT (1988).- Estudio ultraestructural del área preóptica medial en ratas normales y pinealectomizadas. *Histología Médica*, **4**: 99-110.
- TWEEDLE, C.D. y G.I. HATTON (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 G.I. HATTON (1977).- Ultrastructural changes in the rat hypothalamic neurosecretory cells and their associated glia during minimal dehydration and rehydration. *Cell Tissue Res.*, **181**: 59-72.
- VAN DEN POL, A.N. (1980).- The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.*, **191**: 661-702.
- VAN DEN POL, A.N. (1982).- The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. *J. Comp. Neurol.*, **206**: 317-345.
- VANDERHAEGHEN, J.J., F. LOTSTRA, F. VANDESANDE y K. DIERICKX (1981).- Coexistence of cholecystokinin and oxytocin-neurophysin in some magnocellular hypothalamo-hypophyseal neurons. *Cell Tissue Res.*, **221**: 227-231.
- WATKINS, W.B. (1980).- Presence of adrenocorticotropin and B-endorphin immunoreactivities in the magnocellular neurosecretory system of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **207**: 65-80.
- YUKITAKE, Y., Y. TANIGUCHI y K. KUROSUMI (1977).- Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and the formation of Herring bodies in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell. Tissue Res.*, **177**: 1-8.

Correspondencia:

Prof. P. Amat

Departamento de Anatomía e Histología Humanas

Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

Avda. Campo Charro, s/n

37007 Salamanca. España

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NUCLEO PRAVENTRICULAR DEL HIPOTALAMO DEL GATO. II. CELULAS GLIALES Y NEUROPILO

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE HYPOTHALAMIC PRAVENTRICULAR NUCLEUS OF CAT. II. GLIAL CELLS AND NEUROPILO

F.E. PASTOR, J.L. BLAZQUEZ, D. TORANZO, B. PELAEZ, 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 ultraestructural del territorio del núcleo paraventricular del hipotálamo del gato prestando particular atención a las células gliales y al neuropilo. Las células gliales son en su mayoría astrocitos fibrosos con abundantes y largas prolongaciones filamentosas que recorren grandes tramos del territorio nuclear. En el neuropilo se observan diferentes tipos de sinapsis axo-somáticas y axo-dendríticas. También existen abundantes cuerpos de Herring la mayoría de los cuales muestran un contenido de gránulos elementales de neurosecreción y algunas mitocondrias. Es muy frecuente la asociación entre los cuerpos de Herring y prolongaciones gliales filamentosas. Hemos observado botones nerviosos terminales haciendo sinapsis con cuerpos de Herring.

PALABRAS CLAVE: Núcleo paraventricular, Astrocitos, Neuropilo, Ultraestructura, Gato.

SUMMARY

An ultrastructural study was made of the territory of the paraventricular nucleus of the cat hypothalamus, placing special emphasis on the glial cells and the neuropil. The glial cells are mostly fibrous astrocytes with numerous long filamentous processes covering large stretches of the nuclear territory. In the neuropil it is possible to observe different types of nerve endings and axo-somatic and axo-dendritic synapses. There are also numerous Herring bodies, most of which contain neurosecretory granules and some mitochondria. A common finding are associations among Herring bodies and the filamentous glial processes. Nerve endings are seen to synapse with Herring bodies.

PALABRAS CLAVE: Paraventricular nucleus, Astrocytes, Neuropil, Ultrastructure, Cat.

Introducción

El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) es probablemente la agrupación neuronal más compleja del sistema nervioso central si se atiende a sus características citoarquitectónicas, a la diversidad de neurohormonas y neurotransmisores localizados en sus neuronas y a los territorios hacia donde proyecta (véase para revisión Silverman y Zimmerman, 1983; Swanson y Sawchenko, 1983; Palkovits, 1986; Bondy y col., 1989; Papadopoulos y col., 1990). Funcional y anatómicamente, dentro del NPV se pueden distinguir tres sistemas neuronales distintos. Uno de ellos es el clásico sistema magnocelular que proyecta al lóbulo posterior de la hipófisis, que funcionalmente se encarga de la liberación de vasopresina y oxitocina. Un segundo sistema está constituido por las neuronas que proyectan a la zona externa de la eminencia media y que intervienen en la regulación de diversas funciones adenohipofisarias. Por último, el tercer sistema proyecta a las neuronas vegetativas preganglionares del tronco del encéfalo y de la médula espinal, interviniendo en la regulación de diferentes funciones viscerales.

A tal complejidad estructural y funcional contribuye también el gran número de aferencias que recibe el NPV desde distintos territorios del telencéfalo, del diencéfalo y del tronco del encéfalo (véase Sawchenko y Swanson, 1982, 1983; Palkovits, 1986; Tucker y col., 1987; Cunningham y Sawchenko, 1988; Weiss y Hatton, 1990), habiéndose descrito incluso proyecciones directas desde la retina hacia el NPV en el caso del hamster (Yuongstrom y col., 1987).

En un trabajo previo (Pastor y col., 1990) hemos descrito las características de los somas neuronales magnocelulares del NPV del hipotálamo de gato, especie sobre la que prácticamente no existen descripciones ultraestructurales de este núcleo. En el presente trabajo describimos la ultraestructura de las células gliales y del neuropilo del territorio del NPV de gato.

Material y métodos

Hemos utilizado seis gatos adultos, tres machos y tres hembras, de peso comprendido entre 2.650 y 4.000 gramos. Tras ser anestesiados con tiopental sódico (50 mg/Kg peso), los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo, primero con una solución heparinizada de cloruro sódico 0.15 M y posteriormente con glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4 °C. Tras la perfusión los hipotálamos fueron tallados en planos frontales de 0.5 mm de espesor, que permanecieron en el mismo fijador durante 12 horas. Posteriormente, la piezas fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% en el tampón antes descrito, deshidratadas con acetona de gradación creciente e incluidas en Durcupan (Fluka). Tras localizar el NPV en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, se obtuvieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800, que fueron estudiados con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-201. Para contrastar el material se utilizó acetato de uranilo al 2% en la acetona de 70° y el método de Reynolds en los cortes ultrafinos.

Resultados

A nivel del territorio del NPV estudiado por nosotros, y que corresponde a su porción anterior (Pastor y col., 1990), en las amplias zonas del territorio del NPV que quedan comprendidas entre los somas neuronales destaca la presencia de fibras nerviosas y cuerpos de Herring, así como la de astrocitos fibrosos y sus prolongaciones (fig. 1).

Los astrocitos de esta región presentan su típica morfología estrellada (figs. 1 y 3). El núcleo de estas células es muy variable, tanto en lo que concierne a su forma como a su tamaño. El contorno puede ser regular o presentar invaginaciones profundas; su diámetro mayor se halla comprendido habitualmente entre 4 y 8 μm . De forma constante se aprecia un ribete continuo de heterocromatina junto a la hoja interna de la membrana nuclear. Por el nucleoplasma también se observan pequeños grumos de heterocromatina, pero el nucléolo no suele ser visible.

El citoplasma perinuclear de los astrocitos es escaso; en él podemos encontrar algunas mitocondrias de crestas transversales y matriz densa (fig. 4). También cabe mencionar la presencia de cisternas estrechas y aisladas de retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas. Ocasionalmente, al comienzo de las prolongaciones pueden observarse neurotúbulos aislados (fig. 4). En el pericarion se encuentran haces de microfilamentos dispuestos según los diferentes planos del espacio, lo que hace que el corte pueda afectarlos en varios sentidos (fig. 9).

Las prolongaciones que se irradian desde el cuerpo celular se disponen como largos y estrechos brazos repletos de microfilamentos que recorren grandes tramos del NPV (figs. 1, 3 y 4), apareciendo en otros casos seccionadas transversalmente (fig. 8). En todos los casos, los haces de filamentos están dispuestos según el eje longitudinal de la prolongación. Cuando el corte ha sorprendido a una prolongación longitudinalmente, junto a los haces de microfilamentos se encuentran habitualmente mitocondrias estrechas y alargadas -que pueden alcanzar las 3 μm de longitud, como en la fig. 4- cuyo eje mayor se orienta en la misma dirección que el de la prolongación.

En los cortes los cuerpos de Herring tienen una forma ovalada o triangular de vértices romos (fig. 1); su eje mayor oscila entre 3.5 y 11 μm (fig. 1). Contienen fundamentalmente vesículas que aparecen casi vacías o con escaso contenido pulverulento y de poca densidad electrónica. Su membrana es lisa y, a veces, incompleta (figs. 2 y 6). Estas vesículas tienen un diámetro que puede superar los 300 nm. Además de la población vesicular, que puede identificarse con los gránulos de neurosecreción maduros (véase Pastor y col., 1990), los cuerpos de Herring contienen también mitocondrias y neurotúbulos (figs. 2 y 6).

Es de señalar la frecuente asociación de los cuerpos de Herring con las prolongaciones filamentosas de las células gliales. En la figura 1 se observan tres cuerpos de Herring dispuestos junto a una de estas prolongaciones. La referida asociación es íntima como se aprecia en la figura 2.

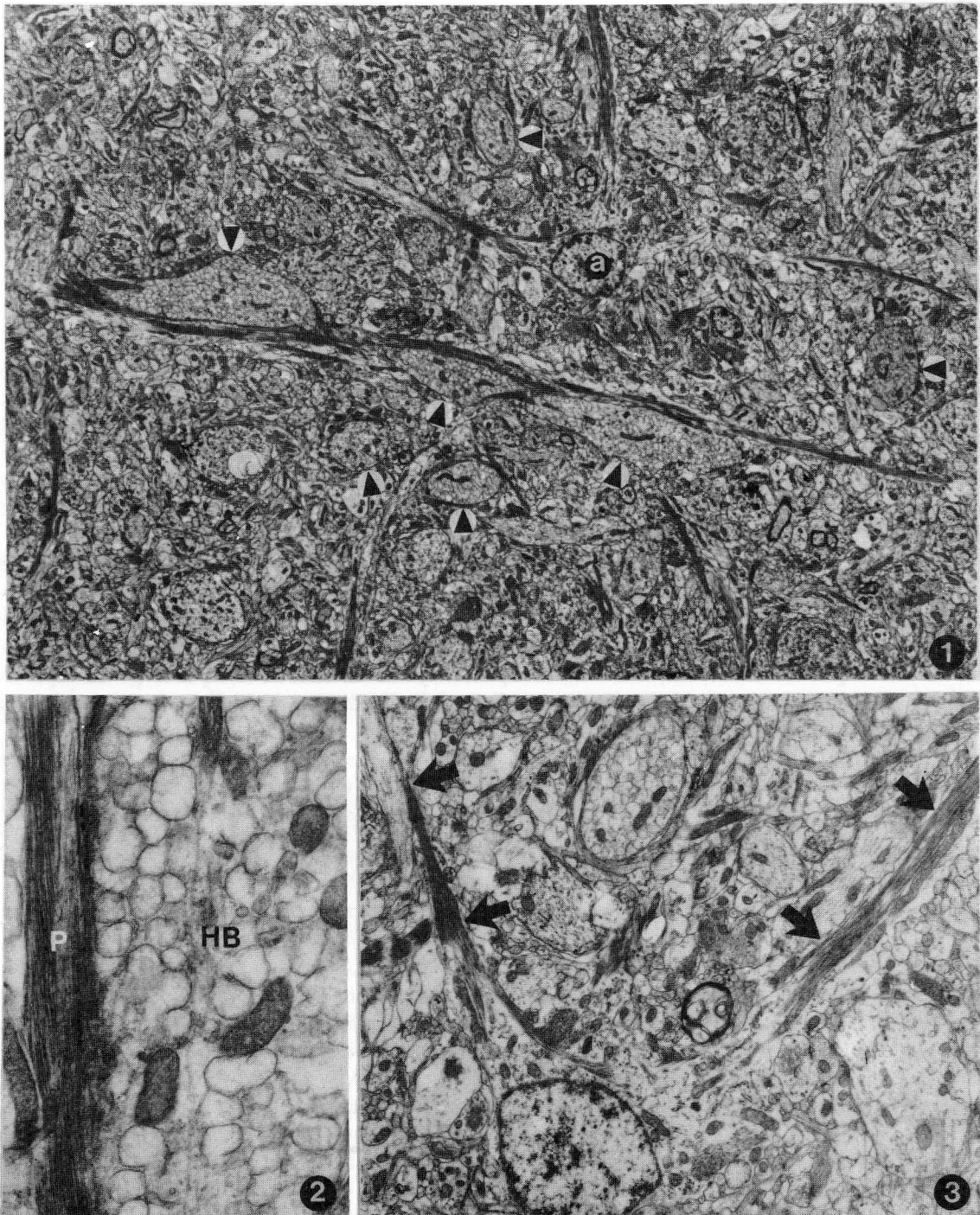
En el neuropilo pueden observarse algunas fibras mielínicas (figs. 1 y 5) y son muy numerosas las fibras amielínicas de calibre variable; pueden contener neurotúbulos, gránulos elementales de neurosecreción maduros y mitocondrias (fig. 5). Abundan los botones nerviosos terminales con multitud de vesículas de tipo sináptico reunidas en grandes acúmulos (fig. 5), observándose sinapsis axodendríticas y axosomáticas. También hay botones nerviosos terminales en los que, además de vesículas de tipo sináptico, hay otras de centro denso y homogéneo, separado de la membrana limitante por un halo claro periférico, de diámetro comprendido entre 90 y 110 nm (fig. 8), y por lo tanto de mayor tamaño que las de tipo sináptico.

Hemos observado la existencia de sinapsis entre botones nerviosos terminales y cuerpos de Herring; una de ellas aparece en las figuras 6 y 7, apreciándose los engrosamientos locales de las membranas sinápticas; en el botón nervioso terminal hay acúmulos de vesículas de tipo sináptico, vesículas de centro denso y una mitocondria.

Discusión

El examen con el microscopio electrónico del neuropilo del NPV muestra una gran complejidad estructural, lógica si se tiene en cuenta que éste territorio hipotalámico es un centro de integración de múltiples funciones neurovegetativas y neuroendocrinas (Swanson y Sawchenko, 1983; Liposits y col., 1986). Esta complejidad viene en parte determinada por la gran cantidad de aferencias que recibe el NPV desde diversos territorios del sistema nervioso central (Sawchenko y Swanson, 1982, 1983; Palkovits, 1986; Tucker y col., 1987; Cunnigham y Sawchenko, 1988; Weiss y Hatton, 1990), a lo que se suma una rica circuitería intranuclear debida tanto a la existencia de colaterales axónicas cortas de las fibras eferentes del núcleo como a los axones de neuronas intrínsecas (véase Van Den Pol, 1982; Kiss y col., 1983a; Liposits y col., 1985; Silverman y col., 1989). De la complejidad del patrón sináptico del NPV dan idea los datos obtenidos por Kiss y col. (1983b) que indican que, en la rata, con cada neurona magnocelular entran en contacto aproximadamente 2.800 terminales nerviosos. Nuestros datos ultraestructurales muestran que el neuropilo del NPV del gato presenta igualmente una gran complejidad, siendo muy llamativa la diversidad de botones nerviosos que se encuentran en el territorio y que establecen abundantes y diferentes sinapsis tanto con los somas como con las dendritas de las neuronas magnocelulares en el territorio estudiado por nosotros.

Como quiera que este territorio corresponde a la porción magnocelular anterior del NPV, además de los somas magnocelulares que anteriormente hemos descrito (Pastor y col., 1990), llama también la atención la existencia en el neuropilo de abundantes cuerpos de Herring, que como es sabido son dilataciones características de las fibras del



- FIGURA 1.** Territorio del NPV del hipotálamo de gato. Las flechas señalan varios cuerpos de Herring. a = astrocito. (3.290x)
- FIGURA 2.** Detalle a mayores aumentos (21.900x) de la fig. 1. Obsérvese un cuerpo de Herring (HB) junto a una prolongación glial filamentos (P).
- FIGURA 3.** Detalle del astrocito señalado con la letra «a» en la fig. 1. Obsérvese su forma estrellada. Las flechas señalan las prolongaciones. (7.450x)

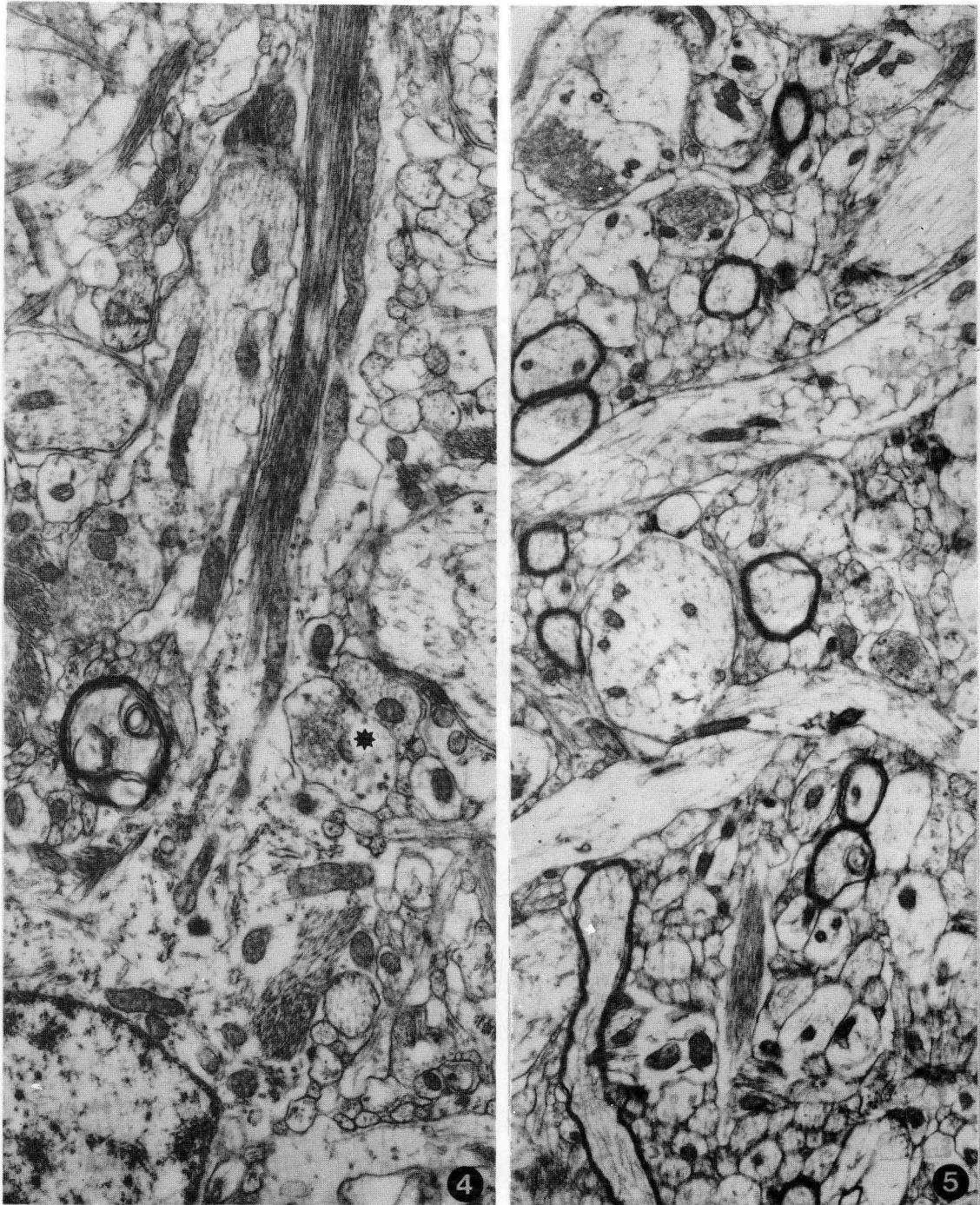
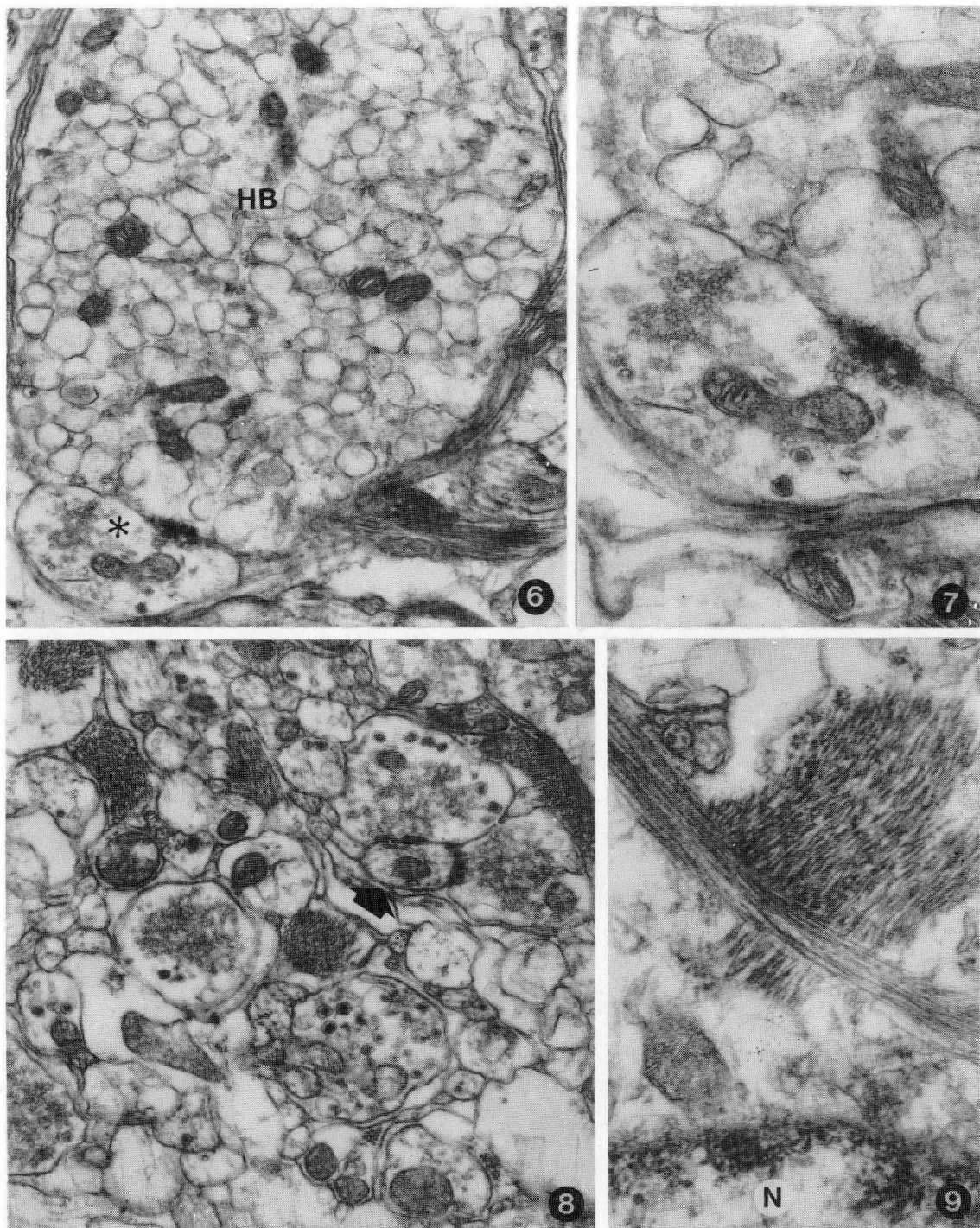


FIGURA 4. Fragmento del pericarion y prolongación del astrocito de la fig. 3. Obsérvese una sinapsis axodendrítica (*asterisco*). (16.000x)

FIGURA 5. Neuropilo del NPV de gato. Se observan abundantes fibras amielínicas y algunas mielínicas, así como prolongaciones gliales filamentosas. (11.200x)



FIGURAS 6 y 7. Sinapsis entre un botón nervioso (*asterisco*) y un cuerpo de Herring (HB); éste posee abundantes gránulos elementales de neurosecreción y algunas mitocondrias (21.900x y 45.500x, respectivamente)

FIGURA 8. Neuropilo del NPV de gato. Pueden apreciarse varios botones nerviosos y algunas prolongaciones gliales filamentosas. Sobre una dendrita (*flecha*) hacen sinapsis dos botones nerviosos. (21.900x)

FIGURA 9. Fragmento del pericarion de un astrocito del NPV de gato. N = núcleo celular. Se observan haces de filamentos cortados en diversas direcciones. (45.500x)

haz supraóptico-hipofisario a lo largo de su trayecto (véase Dellmann y Rodríguez, 1970). La mayoría de los cuerpos de Herring que hemos observado en el territorio del NPV del gato poseen abundantes gránulos elementales de neurosecreción y unas pocas mitocondrias. No se observan cuerpos de Herring terminales, caracterizados por poseer un acumulo de microvesículas (véase Amat y col., 1985).

Llama también poderosamente la atención la existencia, entre los elementos nerviosos del neuropilo del NPV, de abundantes astrocitos fibrosos que poseen múltiples y largas prolongaciones. Esta doble afirmación está basada en la gran frecuencia con que se sorprenden varias prolongaciones emergiendo del pericarion de las astrocitos en los cortes ultrafinos utilizados para microscopía electrónica, y en el hecho de que dichas prolongaciones pueden ser seguidas durante largos trayectos en el territorio objeto de estudio. Células similares en su aspecto, aunque en menor abundancia, existen en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo que puede ser observado en el mismo plano que el territorio del NPV estudiado por nosotros (Pastor y col., 1989).

Es de destacar la íntima relación existente entre los cuerpos de Herring y las prolongaciones filamentosas gliales. Tal asociación es característica del haz supraóptico-hipofisario (LuQui y Fox, 1976). En relación con este punto hay que tener en cuenta que en el núcleo supraóptico del gato las células gliales no son muy abundantes, si bien son numerosísimas las prolongaciones filamentosas gliales (Pastor, 1983). Estos datos, junto con el hecho de que en los territorios rostrales de la eminencia media del gato los elementos nerviosos de la zona externa están sustituidos por terminaciones gliales filamentosas (Pastor, 1983; Pastor y col., 1983) permite pensar en la posibilidad de que gran parte de las prolongaciones gliales que acompañan a las fibras del haz supraóptico-hipofisario se originen a partir de astrocitos localizados en el territorio del NPV. Una buena parte de estas fibras acabaría en los territorios rostrales de la eminencia media y las restantes continuarían junto a los axones de las neuronas magnocelulares en su discurrir hasta el lóbulo posterior de la hipófisis.

Otro dato digno de mención es la observación de sinapsis entre botones nerviosos y cuerpos de Herring en el neuropilo del NPV. Puesto que los cuerpos de Herring son dilataciones del haz supraóptico-hipofisario, esto es, de los axones de las neuronas magnocelulares, se deben encuadrar estas sinapsis dentro del tipo de las axo-axónicas. En relación con este punto es interesante señalar que, en el caso de la rata, Loesch (1985) no encontró evidencia de contactos sobre los axones de las neuronas oxitocinérgicas. Puesto que no hemos realizado un estudio inmunocitoquímico no podemos afirmar la naturaleza de los cuerpos de Herring sobre los que hemos visto establecer contacto sináptico a botones nerviosos terminales y, por tanto, no podemos sugerir que se trate de fibras vasopresinérgicas, como en principio podría suponerse en base a los referidos datos de Loesch (1985).

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento 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

- AMAT, P.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D. y MUÑOZ BARRAGAN, L. (1985): Estudio ultraestructural de las terminaciones nerviosas de los sistemas neurosecretores hipotalámicos. *Acta Microscópica* **8**: 367-378.
- BONDY, C.A., WHITNALL, M.H.; BRADY, L.S. y GAINER, H. (1989): Coexisting peptides in hypothalamic neuroendocrine system: some functional implications. *Cell. Mol. Neurobiol.* **9**: 427-446.
- CUNNINGHAM, E.T. y SAWCHENKO, P.E. (1988): Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **274**: 60-76.
- DELLMANN, H.D. y RODRIGUEZ, E. M. (1970): Herring bodies; an electron microscopic study of local degeneration and regeneration of neurosecretory axons. *Z. Zellforsch.* **111**: 293-315.
- KISS, J.Z., PALKOVITS, M.; ZABORSZKY, L.; TRIBOLLET, L.; SZABO, D. y MAKARA, G.B. (1983a): Quantitative histological studies on the hypothalamic paraventricular nucleus in rats. II. Number of local and certain afferent nerve terminals. *Brain Res.* **265**: 11-20

- KISS, J.Z.; PALKOVITS, M.; ZABORSZKY, L.; TRIBOLLET, L.; SZABO, D. y MAKARA, G.B. (1983b): Quantitative histological studies on the hypothalamic paraventricular nucleus in rats. I. Number of cells and synaptic boutons. *Brain Res.* **262**: 217-224.
- LIPOSITS, Z.S.; PAULL, W.K.; SETALO, G. y VIGH, S. (1985): Evidence for local corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. An electron microscopic immunohistochemical analysis. *Histochemistry* **83**: 5-16.
- LIPOSITS, Z.S.; PHELIX, C. y PAULL, W.K. (1986): Electron microscopic analysis of tyrosine hydroxylase, dopamine- β -hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyltransferase immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Histochemistry* **84**: 105-120.
- LOESCH, A. (1985): A light and electron microscopic study of oxytocin-containing neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **63**: 691-702.
- LuQUI, J.J.; y FOX, C.A. (1976): The supraoptic nucleus and the supraoptico-hypophysial tract in the monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.* **168**: 7-40.
- PALKOVITS, M. (1986): Afferents onto neuroendocrine cells. En: *Morphology of hypothalamus and its connections*. (Ganten y Pfaff, eds.) pp. 197-222. Springer-Verlag, Berlin.
- PAPADOPOULOS, G.C.; ANTONOLPOULOS, J.; KARAMANLIDIS, A.N. y MICHALOUDI, H. (1990): Coexistence of neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus of the sheep. *Neuropeptides* **15**: 227-233.
- 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.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y AMAT, P. (1983): Quelques aspects ultrastructuraux de l'eminence mediane chez le chat. Libro de resúmenes del 66ème Congrès de l'Association des Anatomistes, p. 40. Barcelona.
- PASTOR, F.E.; GOMEZ ESTEBAN, M.B.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y AMAT, P. (1989): Ultraestructura del núcleo supraquiasmático del hipotálamo de gato. Estudio preliminar. *An. Anat.* **35**: 49-59.
- PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ BARRAGAN, L. y AMAT, P. (1990): Estudio ultraestructural del núcleo paraventricular del hipotálamo de gato. I. Neuronas magnocelulares. *An. Anat.* **36**: 169-177.
- SAWCHENKO, P.E. y SWANSON, L.W. (1982): The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res. Rev.* **4**: 275-325.
- SAWCHENKO, P.E. y SWANSON, L.W. (1983): The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* **218**: 121-144.
- SILVERMAN, A.J. y ZIMMERMAN, E.A. (1983): Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.* **6**: 357-380.
- SILVERMAN, A.J.; HOU-YU, A. y CHEN, W.P. (1989): Corticotropin-releasing factor synapses within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroendocrinology* **49**: 291-299.
- SWANSON, L.W. y SAWCHENKO, P.E. (1983): Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* **6**: 269-324.
- TUCKER, D.C.; SAPER, C.B.; RUGGIERO, D.A. y REIS, D.J. (1987): Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **259**: 591-603.
- VAN DEN POL (1982): The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. *J. Comp. Neurol.* **206**: 317-345.
- WEISS, M.L. y HATTON, G.I. (1990): Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. I. Afferents from the subformal organ and the anteroventral third ventricle region. *Brain Res. Bull.* **24**: 231-238.
- YOUNGSTROM, T.G.; WEISS, M.L. y NUNEZ, A.A. (1987): A retinal projection to the paraventricular nuclei of the hypothalamus in the syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Brain Res. Bull.* **19**: 747-750.

Correspondencia: Prof. Dr. P. Amat
 Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
 Facultad de Medicina
 Universidad de Salamanca
 Avda. Campo Charro, s/n
 37007 Salamanca. España

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NUCLEO ARCUATO DEL HIPOTALAMO DE RATA TRÁS LA ADMINISTRACION DE GLUTAMATO MONOSODICO.

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE ARCUATE NUCLEUS OF THE RAT HYPOTHALAMUS AFTER MONOSODIUM GLUTAMATE ADMINISTRATION.

**F.E. PASTOR, B. PELAEZ, J.L. BLAZQUEZ, D. TORANZO, A. SANCHEZ, A.J. ALVAREZ-MORUJO
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

Hemos estudiado el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas tratadas subcutáneamente a los 4 días de edad con una única dosis (4 mg/g peso corporal) de glutamato monosódico (GMS) y sacrificadas 7, 30 y 120 días después. En los animales sacrificados a los 7 días no se observan lesiones ultraestructurales en el núcleo arcuato. Las neuronas muestran signos de hiperactividad, que consisten en incremento del retículo endoplásmico rugoso y del aparato de Golgi. A los 30 días de la administración del GMS se observan lesiones ultraestructurales consistentes en desestructuración de las dendritas en el neuropilo del núcleo arcuato; los somas neuronales y las terminaciones nerviosas no muestran alteraciones. Las lesiones son muy marcadas en el epéndimo y en el territorio periventricular, afectando preferentemente a las mitocondrias. A los 120 días no existen lesiones en el núcleo arcuato de la mayoría de los animales estudiados; algunas ratas muestran neuronas necrosadas y otras con alteraciones mitocondriales.

PALABRAS CLAVE: Núcleo arcuato, Glutamato monosódico, Ultraestructura, Rata.

SUMMARY

A study was made of the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats treated subcutaneously at 4 days of age with a single dose (4 mg/g body weight) of monosodium glutamate (MSG) and sacrificed 7, 30 and 120 days after. In the animals sacrificed at 7 days of age, no ultrastructural lesions were observed in the arcuate nucleus. The neurons showed signs of hyperactivity, consisting of an increase in rough endoplasmic reticulum and in the Golgi apparatus. At 30 days after MSG administration, ultrastructural lesions were observed in the form of a disorganization of the dendrites in the neuropil of the nucleus; the neuronal somata and nerve endings were unaltered. The lesions were very pronounced in the ependymus and the periventricular territory, mainly affecting the mitochondria. At 120 days after administration, there were no lesions in the arcuate nucleus in most of the animals studied; some rats had necrosed neurons and others displayed mitochondrial alterations.

KEY WORDS: Arcuate nucleus, Monosodium glutamate, Ultrastructure, Rat.

Introducción

El glutamato monosódico (GMS) administrado parenteralmente durante el período neonatal produce unos efectos neurotóxicos que son especialmente patentes en la retina y el hipotálamo (Olney, 1969, 1971). En esta última formación se ha descrito la degeneración irreversible de una gran parte de las neuronas del núcleo arcuato (Olney, 1969, 1971; Redding y col., 1971; Burde y col., 1971; Nemeroff y col., 1977a,b; Bakke y col., 1978; Clemens y col., 1978; Rodríguez-Sierra y col., 1980; Seress, 1982; Bloch y col., 1984a,b; Lorden y Caudle, 1986), permaneciendo indemnes los axones que pasan a través del mismo. Por esta razón ha sido ampliamente utilizado para estudiar el papel de las neuronas del núcleo arcuato en la esfera neuroendocrina.

Algunos autores han señalado que los somas dopaminérgicos son los más afectados (Holzwarth-McBride y col., 1976; Olney y col., 1976; Clemens y col., 1978; Nemeroff y col., 1977a,b; Conte-Delvox y col., 1981; Dawson, 1986), afirmación no compartida en otros estudios (Meister y col., 1989). En conjunto, las lesiones causadas por el GMS en el núcleo arcuato son responsables de una importante disfunción de la esfera endocrina, habitualmente descrita como «síndrome del glutamato monosódico», que incluye retraso en el crecimiento, hipogonadismo, hipotiroidismo y obesidad (Olney, 1969; Redding y col., 1971; Kizer y col., 1978; Pizzi y col., 1979; Rodríguez-Sierra y col., 1980; Seress, 1982; Clough y col., 1986).

El hecho de que los efectos del GMS se manifiesten a los pocos minutos de la administración de esta sustancia ha llevado a la mayor parte de los autores a limitar el estudio a un corto período de evolución. En el presente trabajo se analizan las lesiones inducidas por el GMS sobre el territorio del núcleo arcuato del hipotálamo de rata, tras un tiempo de evolución superior al generalmente recogido en la literatura.

Material y Métodos

Hemos utilizado para nuestro estudio 60 ratas albinas machos de la cepa Sprague-Dawley, que desde el nacimiento estuvieron sometidas a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas, disponiendo de comida y agua a voluntad. Treinta animales fueron inyectados a los 4 días de edad con una dosis de 4 mg/g peso corporal de L-glutamato monosódico (Sigma) en solución acuosa por vía subcutánea (grupo experimental). Quince animales fueron inyectados a los 4 días de edad con agua bidestilada (grupo control). Quince animales no sufrieron ningún tipo de experiencia (grupo normal). El sacrificio de los animales de cada grupo se realizó, por terceras partes, a los 11, a los 34 y a los 124 días de edad. Todos los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con una solución fijadora de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4 °C, precedida por un ligero lavado del árbol vascular con una solución de cloruro sódico 150 mM. Tras la perfusión se obtuvo el bloque hipotálamo-hipofisario, que fue tallado en planos frontales según la pauta de Pastor (1983). Las piezas de tejido en que se localiza el núcleo arcuato permanecieron en la solución fijadora por un período de 12 horas. A continuación fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% en el tampón antes descrito, durante hora y media, a 4 °C. Posteriormente fueron deshidratadas con acetona, contrastadas en bloque con acetato de uranilo al 2% en acetona de 70° e incluidas en Durcupan (Fluka). Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800. Cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina para la localización del territorio objeto de estudio. Los cortes ultrafinos se contrastaron siguiendo el método de Reynolds y se estudiaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-201.

Resultados

Describiremos sucesivamente las observaciones realizadas en animales sacrificados a los 11, a los 34 y a los 124 días de edad.

Animales sacrificados a los 11 días de edad

El estudio ultraestructural de las preparaciones del tuber posterior de ratas normales y controles de 11 días de edad permite apreciar, como era de esperar, la absoluta normalidad y ausencia de lesiones en los territorios estudiados (epéndimo, territorio periventricular y territorio del núcleo arcuato). En las neuronas del núcleo arcuato destaca la escasez de organitos celulares, especialmente retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi.

En los animales experimentales de esta edad se observa normalidad tanto en el epéndimo como en el territorio periventricular, no existiendo alteraciones ultraestructurales. Por el contrario, resalta el gran número de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo que muestran signos ultraestructurales de gran actividad de síntesis proteica. Estos datos contrastan con las observaciones realizadas en los animales normales y controles y consisten fundamentalmente en la existencia de gran cantidad de estrechas cisternas de RER, ordenadas paralelamente entre sí (Figura 1), y de un gran número de polirribosomas. En ocasiones las cisternas de RER forman círculos concéntricos, que son muy conspicuos incluso a pequeños aumentos (Figura 1). Estos rasgos coinciden con la presencia en el citoplasma de cuerpos filamentosos citoplasmáticos (CFC), cuyo diámetro oscila entre 1.5 y 2.7 μm (figs. 1, 2 y 4). Es frecuente la presencia en algunas neuronas de un conjunto ultraestructural constituido por un CFC, por estrechas cisternas de RER que se disponen alrededor de aquél y por polirribosomas que se sitúan entre las cisternas (Figura 4). Entre el CFC y la más interna de las cisternas de RER suele haber un halo claro en el que a veces hay vesículas lisas, unas electrotransparentes (Figura 4) y otras en las que aparecen estructuras diversas; estas últimas están limitadas por una unidad de membrana y poseen un contenido electrodenso amorfo.

A diferencia también de lo observado en los animales normales y controles de la misma edad, el aparato de Golgi de las neuronas del núcleo arcuato de los animales tratados con GMS de 11 días de edad suele estar muy desarrollado, disponiéndose alrededor del núcleo y en las prolongaciones citoplasmáticas del soma neuronal (Figura 3). En algunas ocasiones se observa la presencia de CFC muy próximos a sáculos golgianos dilatados. En el pericarion de estas neuronas hay también neurotúbulos y otros organitos, tales como lisosomas, pero en muy escasa cantidad y no en todas las neuronas.

El núcleo celular es relativamente grande; por regla general tiene forma regular, redondeada o elíptica, con alguna escotadura poco profunda (Figura 3). Tiene escasa heterocromatina que puede formar pequeños acúmulos, algunos de los cuales se adhieren a la capa interna de la membrana nuclear. El nucléolo puede ocupar una posición central o periférica, aunque esta última es más frecuente (figs. 1, 2 y 3). Se ven neuronas en cuyo núcleo hay dos nucléolos, ambos situados en la periferia (Figura 3). Suele haber estructuras paranucleolares grandes e, incluso, cuerpos accesorios de Cajal (Figura 2).

En el neuropilo del núcleo arcuato se ven fibras nerviosas amielínicas, algunas muy delgadas, que suelen agruparse formando haces (Figura 3); otras son anchas y presentan en su interior mitocondrias, cisternas lisas grandes, polirribosomas, etc, por lo que pueden identificarse como dendritas. También hay botones nerviosos terminales que hacen sinapsis sobre esas dendritas. No hemos observado alteraciones ultraestructurales de los elementos del neuropilo.

Animales sacrificados a los 34 días de edad

Al igual que ocurre en el grupo anterior, el epéndimo, el territorio periventricular y el núcleo arcuato de los animales normales y controles de 34 días de edad no muestran signos ultraestructurales de lesión.

Por el contrario, en los animales de esta edad tratados con GMS se observan profundas alteraciones que afectan a los tres territorios antes señalados. En el epéndimo llama la atención la falta de microvellosidades en el polo apical de los ependimocitos. En el citoplasma de estas células destaca sobre todo la alteración de las mitocondrias, que aparecen como grandes vacuolas electroclaras, con algunos restos de crestas, en su mayor parte retraídas hacia la periferia del organito. La hinchazón mitocondrial afecta no solamente a las situadas en el polo apical y alrededor del núcleo celular (Figura 5), sino también a las situadas en las prolongaciones basales de los tancitos (Figura 7).

En el territorio periventricular la alteración afecta tanto al neuropilo como a los somas neuronales. En esta zona son frecuentes las imágenes de muerte celular (Figura 7). A pequeños aumentos el territorio aparece plagado de vesículas electroclaras de distinto tamaño (Figura 7). Dichas vesículas corresponden a mitocondrias hinchadas y a

fibras nerviosas desestructuradas. La hinchazón de las mitocondrias, hasta convertirlas prácticamente en estructuras vesiculares claras, se observa tanto en el soma neuronal (Figura 6) como en las fibras nerviosas del neuropilo.

Los somas de la mayor parte de las neuronas del territorio periventricular presentan núcleos con membrana conservada y con heterocromatina dispersa, sin que se pueda considerar que están muy alterados (Figura 6). Por el contrario, el citoplasma del pericarion está muy afectado; además de la hinchazón de las mitocondrias, hay escasez de organitos y en algunas zonas total ausencia de los mismos (Figura 6). Ciertos organitos, como los CFC, están bien conservados en neuronas que presentan indudables signos de alteración ultraestructural.

La lesión de las fibras nerviosas se expresa fundamentalmente por la escasez de organitos, con desaparición casi total de los neurotúbulos y presencia de restos en forma de pequeñas vesículas membranosas (Figura 6). Tanto los botones nerviosos terminales que hacen sinapsis sobre fibras del neuropilo como los que la hacen sobre el pericarion no presentan signos de lesión; a veces, una envoltura glial los separa del neuropilo circundante (Figura 8).

En el núcleo arcuato los somas neuronales están poco afectados con buena conservación de las mitocondrias y de otros organitos (Figura 9), tales como el aparato de Golgi, RER, polirribosomas, cuerpos densos, microtúbulos y algunas vesículas granulares (diámetro 77,5 - 92,5 nm). En el neuropilo del núcleo arcuato las gruesas dendritas presentan alteraciones, expresadas por ausencia de organitos y muy especialmente de microtúbulos. Los botones nerviosos, al igual que en el territorio periventricular, no están alterados. A veces hay amplias comunicaciones entre el soma y el botón nervioso.

Animales sacrificados a los 124 días de edad

Ultraestructuralmente en los animales normales y controles de esta edad lo más característico es la ausencia de lesiones en todos los territorios estudiados.

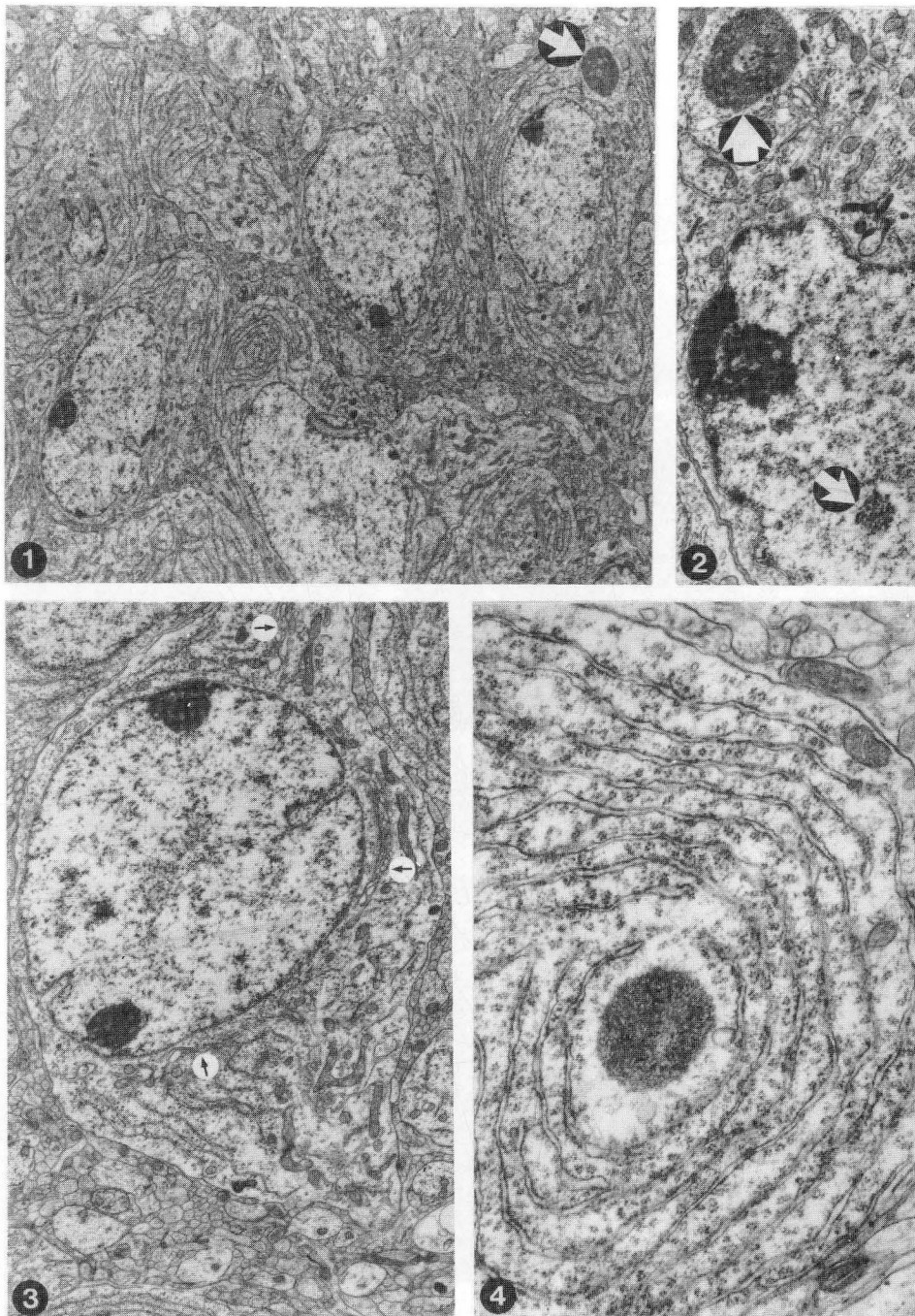
De las diez ratas tratadas con GMS y sacrificadas a esta edad que hemos estudiado con el microscopio electrónico, en dos de ellas se han detectado lesiones estructurales en el epéndimo y en el núcleo arcuato. En cambio, en los ocho animales restantes todos los territorios estudiados (epéndimo, territorio periventricular y núcleo arcuato) se han caracterizado por la ausencia de lesiones y por la presencia de neuronas que muestran signos de gran actividad de síntesis de proteínas.

En la figura 10, correspondiente a uno de los dos animales que presentan alteraciones, se ofrece la imagen del territorio del núcleo arcuato a la altura del ángulo lateral del receso infundibular del tercer ventrículo, pudiendo observarse neuronas oscuras y otras aparentemente normales. Estas ocupan la zona inferior de la figura mientras que las oscuras están en una zona superior. Las neuronas oscuras son células necrosadas; entre ellas aparecen otras que no muestran signos de muerte celular, aunque hay lesiones de algunos de sus organitos. Una vez más, los organitos que primero se afectan son la mitocondrias. Algunas de éstas están alteradas en su totalidad, apareciendo como vesículas electroclaras grandes y carentes de contenido (Figura 14); otras mitocondrias están parcialmente alteradas, produciéndose la hinchazón en uno de sus extremos y conservándose normal el resto (figs. 12 y 14). Las mitocondrias alteradas alternan con otras de aspecto normal en el mismo soma neuronal.

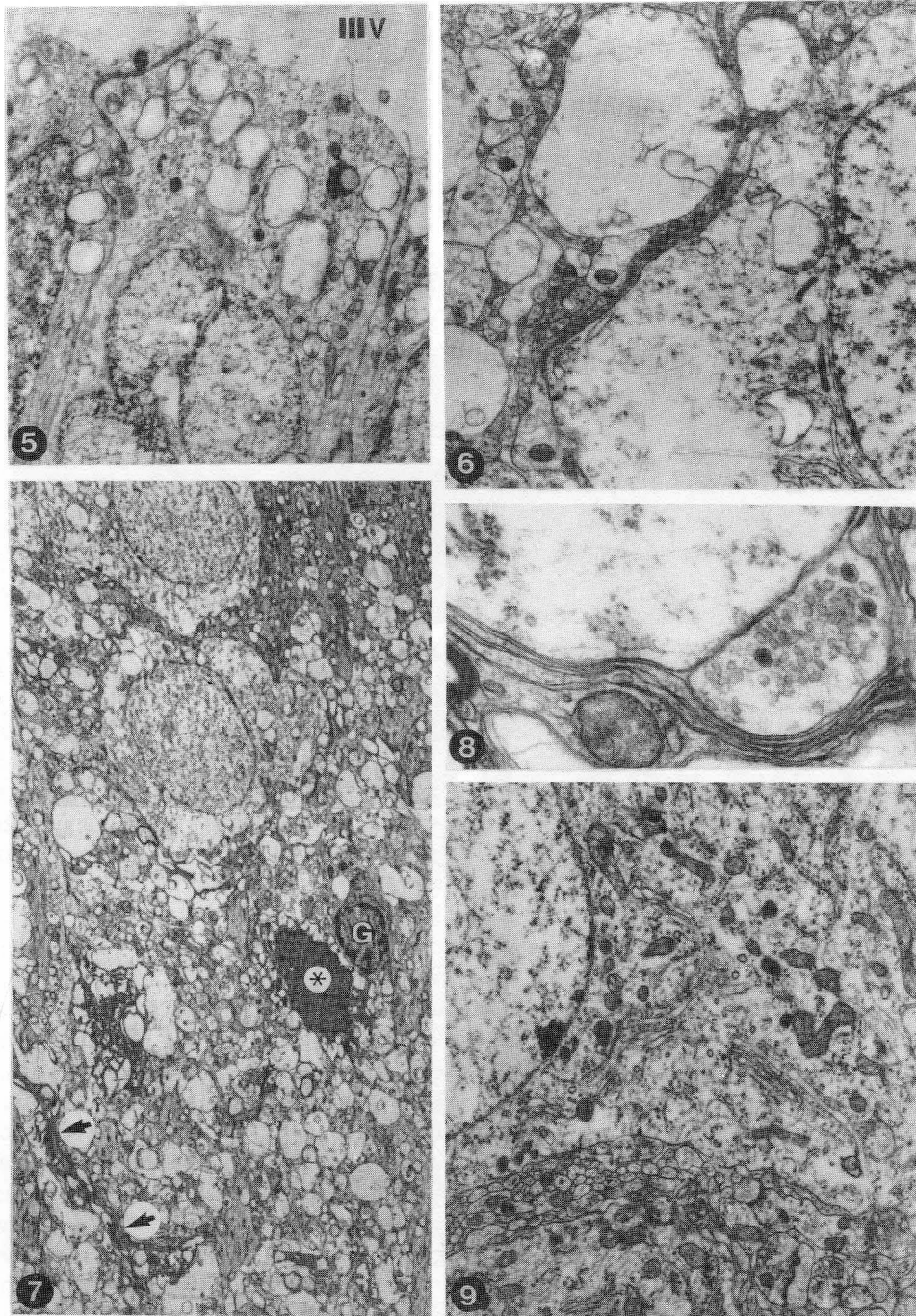
En el neuropilo del núcleo arcuato de los dos animales que presentan lesiones puede verse desestructuración de las fibras nerviosas de grueso calibre con ausencia de organitos. Se trata de dendritas sobre las que no es infrecuente observar botones nerviosos terminales que hacen sinapsis y no muestran signos de lesión (Figura 11). Las fibras amielínicas de menor calibre y algunas fibras mielínicas son normales.

Como anteriormente hemos dicho, en los restantes ocho animales tratados con GMS y sacrificados a los 124 días de edad, llama la atención la normalidad estructural de todos los territorios examinados, tanto de los somas neuronales como del neuropilo. Las neuronas suelen presentar núcleos irregulares y una gran densidad de organitos en el pericarion (Figura 13), destacando la presencia de abundantes cisternas de RER, de polirribosomas, de mitocondrias normales e incluso de algún cilio, cuyo tallo emerge de la superficie del soma sobre una pequeña zona en la que hay vesículas golgianas (Figura 13). También suele haber CFC. En algunos de estos animales hay una zona en el territorio del núcleo arcuato, distante aproximadamente unas 100 μm del epéndimo, en la que no existen somas neuronales. Dicha zona es intermedia entre otras dos, una interna y otra externa, en las que los somas neuronales son abundantes.

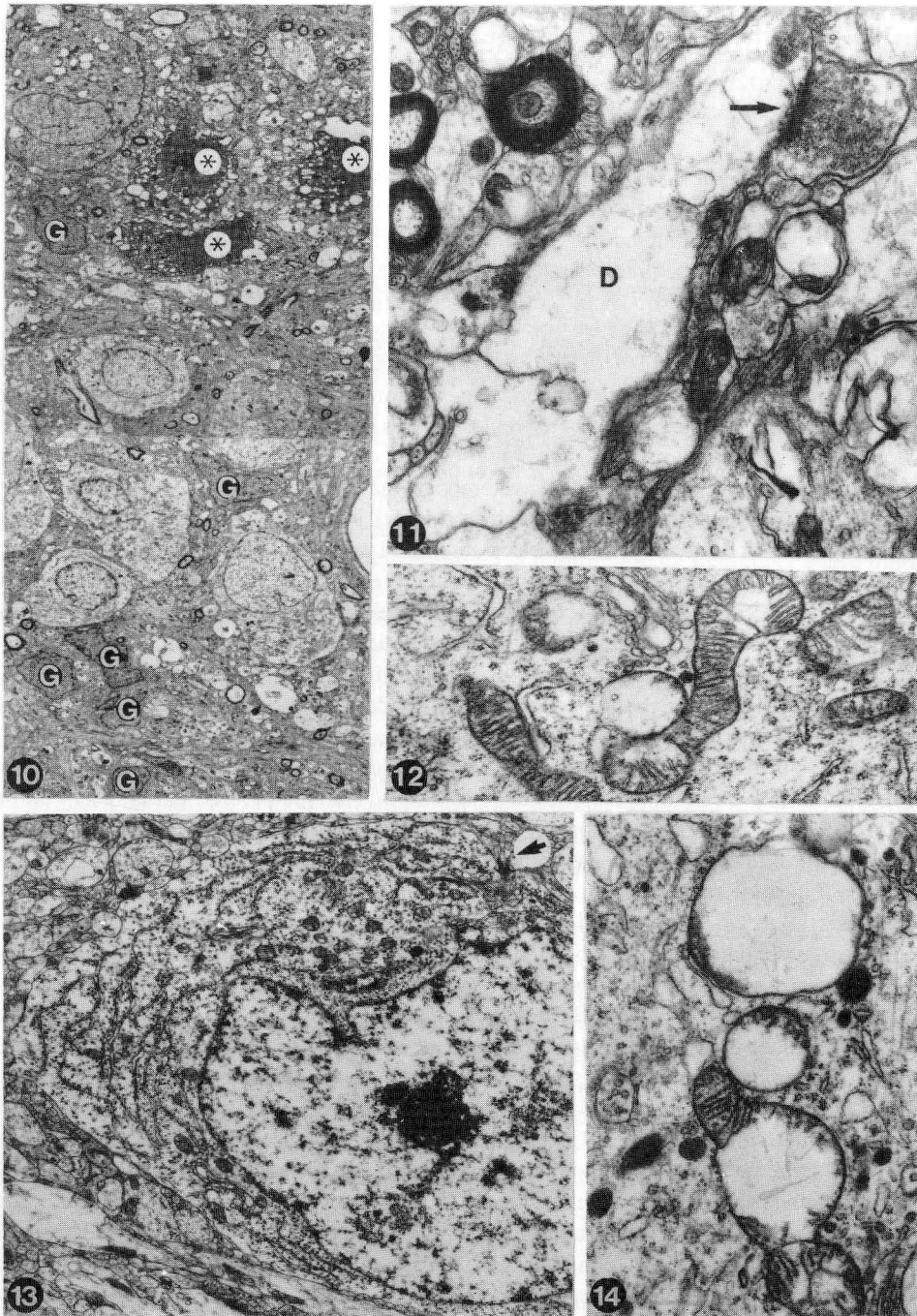
En todos los grupos de animales experimentales, independientemente de la edad del sacrificio, llama la atención la buena preservación de los células gliales, sobre todo en aquellos casos en que los elementos nerviosos están alterados (véanse figs. 7 y 10).



- FIGURA 1.** Rata tratada con GMS de 11 días de edad. Territorio del núcleo arcuato. La flecha señala un cuerpo filamentosos citoplasmático. (3.350x).
- FIGURA 2.** Rata tratada con GMS de 11 días de edad. Fragmento de una neurona del núcleo arcuato. La flecha grande señala un cuerpo filamentosos citoplasmático y la flecha pequeña un cuerpo accesorio de Cajal. (11.200x).
- FIGURA 3.** Rata tratada con GMS de 11 días de edad. Neurona del núcleo arcuato. Se observan dos nucléolos situados en la periferia del núcleo. Las flechas señalan varios campos golgianos. (7.450x).
- FIGURA 4.** Fragmento del pericarion de una neurona del núcleo arcuato de una rata, tratada con GMS, de 11 días de edad. Se observa un cuerpo filamentosos citoplasmático rodeado por cisternas de retículo endoplásmico rugoso. (21.900x).



- FIGURA 5.** Rata tratada con GMS de 34 días de edad. Fragmento del polo apical de ependimocitos. Obsérvese la alteración mitocondrial. III V = tercer ventrículo. (11.200x).
- FIGURA 6.** Rata tratada con GMS de 34 días de edad. Territorio periventricular a nivel del núcleo arcuato. Obsérvese signos de alteración ultraestructural en el pericarion y en las dendritas. (11.200x).
- FIGURA 7.** Rata tratada con GMS de 34 días de edad. Territorio periventricular a nivel del núcleo arcuato. Apréciase la gran espongiosis del tejido. Las flechas señalan la prolongación basal de un tanicito y el asterisco una neurona en necrosis. G= célula glial. (3.350x).
- FIGURA 8.** Rata tratada con GMS de 34 días de edad. Territorio periventricular a nivel del núcleo arcuato. Obsérvese un botón nervioso terminal que no muestra alteraciones. (45.500x).
- FIGURA 9.** Rata tratada con GMS de 34 días de edad. Se observa el fragmento de un soma neuronal del núcleo arcuato sin aparentes alteraciones. (11.200x).



- FIGURA 10.** Rata tratada con GMS de 124 días de edad. Territorio del núcleo arcuato a nivel del ángulo lateral del receso infundibular. Los asteriscos señalan neuronas necrosadas. G= célula glial. (2.350x).
- FIGURA 11.** Rata tratada con GMS de 124 días de edad. Neuropilo del núcleo arcuato. Se observa un botón nervioso terminal de apariencia normal (flecha) que hace sinapsis sobre una dendrita (D) desestructurada. (21.900x).
- FIGURA 12.** Mitocondrias del pericarion de una neurona del núcleo arcuato de una rata de 124 días tratada con GMS. (21.900x).
- FIGURA 13.** Neurona del núcleo arcuato de una rata tratada con GMS de 124 días de edad que muestra una apariencia normal. La flecha señala un cilio. (7.450x).
- FIGURA 14.** Mitocondrias alteradas del pericarion de una neurona del núcleo arcuato de una rata de 124 días de edad tratada con GMS. (21.900x).

Discusión

Hemos estudiado los efectos de la administración de glutamato monosódico (GMS) sobre el territorio posterior del tuber hipotalámico, prestando especial atención al núcleo arcuato. Concretamente, nuestras observaciones se han llevado a cabo en la porción de este núcleo que se localiza al mismo nivel que el núcleo ventromedial, pues según Seress (1982) es el territorio donde se manifiestan con mayor intensidad los efectos del GMS.

La dosis y pauta de administración que hemos utilizado está perfectamente demostrado que es capaz de provocar lesiones en el territorio del núcleo arcuato (Lamperti y Blaha, 1976; Cameron y col., 1978; Mestres y Rascher, 1983; Dawson, 1986). Sacrificando los animales a los 7, 30 y a los 120 días de la administración del GMS, hemos pretendido comprobar la repercusión durante un tiempo superior al generalmente utilizado por los diversos investigadores.

Pese a la abundante literatura que existe acerca de los efectos del GMS (véase Introducción), la extraordinaria diversidad de dosis y pautas de administración hace que sea muy difícil comparar los resultados obtenidos por los diferentes autores. El trabajo al que podemos hacer referencias más directas para comparar nuestros datos es el de Mestres y Rascher (1983), porque utilizan el mismo animal (la rata), la misma dosis y pauta de administración (4 mg/g en ratas neonatales de 4 días de edad) y, si bien estos autores se preocupan fundamentalmente del estudio de los axones intraventriculares, hacen una descripción minuciosa de la evolución de la lesión en animales sacrificados a los 15, 30, 60 y 90 minutos, 3, 6 y 12 horas y 1, 7 y 10 días después de la administración del GMS. Observan estos autores que los efectos lesivos de esta sustancia se instauran rápidamente, ya a los 15 minutos de la inyección, y consisten en hinchazones celulares y espongiosis que afectan fundamentalmente a los tancitos, estando más preservadas las neuronas y las células gliales, si bien los núcleos de algunas neuronas están alterados y se observan dilataciones del espacio perinuclear y de las vesículas del RER. La lesión evoluciona progresivamente, siendo muy marcadas la espongiosis y la hinchazón a los 60 minutos, y afectando a una gran parte de las neuronas a los 90 minutos, con fenómenos de picnosis y de desintegraciones del citoplasma. Aunque parezca paradójico y sorprendente las lesiones regresan, de forma tal que a las 12 horas de la administración del GMS la espongiosis ha desaparecido completamente y el epéndimo es prácticamente normal. En efecto, Mestres y Rascher condideran que a las 12 horas es cuando comienza la fase de recuperación, aunque continúa la degeneración de las células picnóticas. Un día después la espongiosis no es evidente, el epéndimo ya se ha recuperado y el área afectada contiene muy pocas células necróticas y los detritus celulares han sido o están siendo digeridos por macrófagos. Una semana después del tratamiento, el área parece normal con la excepción de una reducción marcada en el número de neuronas del NARC.

En nuestras ratas sacrificadas 7 días después de la administración de esta sustancia (animales de 11 días de edad), todos los territorios del tuber posterior son ultraestructuralmente normales, lo que coincide con los resultados de Mestres y Rascher. No hemos observado en este grupo de animales signos ultraestructurales de lesión en ninguno de los componentes del territorio del tuber posterior (células ependimarias, neuronas, neuropilo). Es más, las neuronas del núcleo arcuato muestran en este grupo de animales signos ultraestructurales de hiperactividad, sobre todo en lo referente al incremento de RER en comparación con las de los animales normales y controles.

La única explicación de este hecho que se nos ocurre es pensar que habiendo una lesión aguda e inmediata -al decir inmediata nos referimos a una repuesta a los pocos minutos-, denunciada no sólo por Mestres y Rascher sino por otros autores (véase también Lemkey-Johnston y col., 1976), y considerando que la recuperación puede iniciarse ya a las 12 horas, es de suponer que desde ese momento haya una reacción compensadora de las neuronas que sobreviven y que se tiene que expresar con signos ultraestructurales.

Sorprendentes pueden parecer nuestros resultados sobre el efecto del GMS en las ratas sacrificadas a los 34 días de edad, puesto que los datos ultraestructurales son indicativos de una clara lesión en el territorio posterior del tuber de estos animales. La sorpresa a la que aludimos radica en que, según los datos de Mestres y Rascher, la recuperación del efecto lesivo del GMS, dejando aparte la disminución de neuronas, comienza a las pocas horas de la administración. De hecho, anteriormente hemos apuntado que a los 7 días de la administración del GMS las neuronas del núcleo arcuato muestran signos de hiperactividad compensadora. Ultraestructuralmente los signos de lesión son muy evidentes en el grupo de animales experimentales sacrificados a los 30 días de la administración de GMS; estos signos se localizan preferentemente en el territorio periventricular del tuber posterior y en el neuropilo del núcleo arcuato. En la zona periventricular se afectan tanto las células ependimarias como las neuronas y los elementos del neuropilo. Los caracteres más sobresalientes de esas lesiones son la espongiosis y la hinchazón celular.

Por otra parte, las referidas lesiones afectan fundamentalmente a los organitos citoplasmáticos más que al núcleo celular. Las mitocondrias están hinchadas y en ellas prácticamente desaparecen las crestas que, cuando existen, están retraídas hacia la periferia. En las neuronas del territorio periventricular existe una desaparición de los organitos citoplasmáticos, además de la degeneración de las mitocondrias, pero los núcleos suelen mantener un aspecto relativamente normal. En el neuropilo resalta la desestructuración de las fibras nerviosas que deben corresponder a dendritas, pues hemos observado que los botones nerviosos sinápticos no muestran alteraciones ultraestructurales, hecho ya señalado por Burde y col. (1971), Olney (1971), Pérez y Olney (1972) y Simpson y col. (1977).

En el estudio de la ultraestructura siempre se ha de ser cauteloso con las lesiones mitocondriales puesto que estos organitos son muy lábiles a las variaciones del pH, de la presión osmótica, etc., y, por lo tanto, sus alteraciones pueden ser debidas a artefactos de la técnica. Nunca puede descartarse esta posibilidad, pero el hecho de coincidir en algunos casos mitocondrias normales con otras anormales da una cierta garantía a la interpretación de la alteración de las mitocondrias como efecto del GMS. En este sentido son muy significativas las imágenes de mitocondrias alteradas, coincidentes con otras que tienen una mitad normal y otra mitad alterada, y que a su vez alternan con otras normales.

En este sentido debemos referirnos a las observaciones de Van Houten y Brawer (1978) sobre la existencia de mitocondrias grandes, sin crestas, en algunas neuronas del núcleo ventromedial de ratas normales, que aparentemente podrían ser debidas a los artefactos de la técnica, lo que estos autores descartan alegando la coexistencia de mitocondrias normales en zonas próximas. Apoyándose en la monografía de Lehninger sobre mitocondrias, Van Houten y Brawer (1978) comparan las carentes de crestas de algunas neuronas del núcleo ventromedial con las imágenes ultraestructurales de la inactivación de estos organitos.

A pesar de la espectacularidad de las lesiones citoplasmáticas (alteraciones de las mitocondrias, disminución de organitos, edema, etc.) son pocas las células con picnosis nuclear. ¿Significa esto que se trata de lesiones potencialmente reversibles? Un dato a favor de una respuesta afirmativa serían nuestro hallazgos ultraestructurales sobre normalidad de los componentes del territorio del tuber posterior de la mayor parte de las ratas sacrificadas a los 120 días de la administración del GMS, que más adelante comentamos.

Si hacemos ahora una revisión cronológica de los fenómenos que acontecen tras la administración del GMS, tendríamos que referirnos en primer lugar al efecto lesivo inmediato (a los pocos minutos) provocado por esta sustancia y que se sigue de una fase pronta de recuperación que comienza pocas horas después de la administración. Estos datos son los usualmente recogidos en la literatura. Nosotros hemos comprobado que a los 7 días de la administración del GMS persiste la fase de recuperación, que suponemos puede representar un mecanismo compensador del déficit neuronal provocado tras la administración de la sustancia. A los 34 días de edad existe un segundo efecto lesivo que hay que interpretar como diferente del primero, ya que ambos están separados por la referida fase de recuperación. Nuestros datos permiten afirmar la indudable existencia de este efecto lesivo tardío.

Una cuestión llamativa acerca del efecto tardío del GMS es por qué dicho efecto se manifiesta preferentemente en las células endodimarias y en las neuronas y el neuropilo del territorio periventricular. La suposición más sugestiva es que el GMS haya alcanzado este territorio a través del líquido cefalorraquídeo. En relación con esto es de señalar que Lemkey-Johnston y col. (1976), estudiando las lesiones provocadas en ratones por el GMS administrado por vía gástrica, postularon que la vía de entrada de la sustancia tóxica podría ser el líquido cefalorraquídeo así como los capilares de endotelio fenestrado. Este tipo de capilares no existe en el territorio objeto de nuestro estudio, por lo que si admitimos como cierta la sugerencia de los citados autores, la mayor intensidad de las lesiones tendría que encontrarse en los territorios próximos al tercer ventrículo, postulado que coincide con nuestras observaciones.

Los animales de mayor tiempo de supervivencia de nuestra casuística son los sacrificados 120 días después de la administración de GMS. Los datos ultraestructurales no son coincidentes en todos los animales. En la mayor parte de ellos el territorio de la región posterior del tuber no muestra signos de lesión, pero en algunos animales aparecen tales signos. Las lesiones consisten en la presencia de neuronas degeneradas así como la existencia en algunas neuronas de alteraciones mitocondriales; en el neuropilo están alteradas exclusivamente las dendritas. Los datos referidos son difíciles de interpretar y únicamente podemos sugerir, aunque simplemente tenga el valor de una mera presunción, que las lesiones observadas en unos pocos animales de esta edad son residuales del efecto lesivo tardío observado a los 34 días de edad y que en los animales en que no se observan signos de lesión es que ya se han eliminado los elementos alterados. En algunos animales sacrificados a los 120 días de la administración de GMS hemos observado la existencia de una zona del territorio del núcleo arcuato en la que hay ausencia de somas neuronales. Creemos que ello representa la disminución del número de neuronas que ocurre tras la administración del GMS, disminución que ha sido ampliamente referida en la literatura.

Llama la atención la escasa afectación de las células gliales del territorio del núcleo arcuato tras el tratamiento con GMS. Una posible explicación puede radicar en el hecho de que el enzima glutamina-sintetasa, que cataliza el paso de ácido glutámico a glutamina, se localiza en las células gliales, preferentemente en los astrocitos (Martínez-Hernández y col., 1977; Norenberg, 1979).

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento 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

- BAKKE, J.L.; LAWRENCE, N.; BENNETT, J.; ROBINSON, S. y BOWERS, C. Y. (1978): Late effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinology*, **26**: 220-228.
- BLOCH, B.; LING, N.; BENOIT, R.; WEHRENBURG, W.B. y GUILLEMIN, R. (1984a): Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature*, **307**: 272-273.
- BLOCH, B.; GAILLARD, R.C.; BRAZEAU, P.; LIN, H.D. y LING, N. (1984b): Topographical and ontogenetic study of the neurons producing growth hormone-releasing factor in human hypothalamus. *Regulat. Pept.*, **8**: 21-31.
- BURDE, R.M.; SCHAINKER, B. y KAYES, J. (1971): Acute effect of oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice and rats. *Nature*, **233**: 58-60.
- CAMERON, D.P.; CUTBUSH, L. y OPAT, F. (1978): Effects of monosodium glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism and insulin secretion. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, **5**: 41-51.
- CLEMENS, J.A.; ROUSH, M.E.; FULLER, R.W. y SHAAR, C.J. (1978): Changes in luteinizing hormone and prolactin control mechanism produced by glutamate lesions of the arcuate nucleus. *Endocrinology*, **103**: 1304-1321.
- CLOUGH, R.W.; ARAVICH, P.F. y SLADEK, C.D. (1986): Monosodium glutamate neurotoxicity: a sex specific impairment of blood pressure but not vasopressin in developing rats. *Brain Res. Bull.*, **17**: 51-58.
- CONTE-DEVOLX, B.; GIRAUD, P.; CASTANAS, E.; BOUDOURESQUE, F.; ORLANDO, M.; GILLIOZ, P. y OLIVER, C. (1981): Effect of neonatal treatment with monosodium glutamate on the secretion of α -MSH, b-endorphin and ACTH in the rat. *Neuroendocrinology*, **33**: 207-211.
- DAWSON, R. (1986): Developmental and sex-specific effects of low dose neonatal monosodium glutamate administration of mediobasal hypothalamic chemistry. *Neuroendocrinology*, **42**: 158-166.
- HOLZWARTH-McBRIDE, M.A.; SLADEK, J.R. y KNIGGE, K.M. (1976b): Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. *Anat. Rec.*, **186**: 197-206.
- KIZER, J.S.; HUMM, S.; NICHOLSON, G.; GREELEY, G. y YOUNGBLOOD, W. (1978): The effects of castration, thyroidectomy and haloperidol upon the turnover rates of dopamine and norepinephrine and the kinetic properties of tyrosine hydroxylase in discrete hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Res.*, **146**: 95-107.
- LAMPERTI, A.A. y BLAHA, G. (1976): The effect of neonatally administered monosodium glutamate on the reproductive system of adult hamsters. *Biol. Reprod.*, **14**: 362-369.
- LEMKEY-JOHNSTON, N.; BUTLER, V. y REYNOLDS, W.A. (1976): Glial changes in the progress of a chemical lesion. An electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, **167**: 481-502.
- LORDEN, J.F. y CAUDLE, A. (1986): Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **8**: 509-519.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K.P. y NOREMBERG, M.D. (1977): Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, **195**: 1356-1358.
- MESTRES, P. y RASCHER, K. (1983): Effects of monosodium glutamate on the development of intraventricular axons in the rat hypothalamus. *Anat. Embryol.*, **168**: 433-444.
- MEISTER, B.; CECCATELLI, S.; HÖKFELT, T.; ANDEN, N.E.; ANDEN, M. y THEODORSSON, E. (1989): Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp. Brain. Res.*, **76**: 343-368.
- NEMEROFF, C.B.; GRANT, L.D.; BISSETTE, G.; ERVIN, G.N.; HARRELL, L.E. y PRANGE, A.J. (1977a): Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology*, **2**: 179-196.

- NEMEROFF, C.B.; KONKOL, R.J.; BISSETTE, G.; YOUNGBLOOD, W.; MARTIN, J.B.; BRAZEAU, P.; RONE, M.S.; PRANGE, A.J.; BREESE, G.R. y KIZER, J.S. (1977b): Analysis of the disruption in hypothalamic-pituitary regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG): evidence for the involvement of tuberoinfundibular cholinergic and dopaminergic systems in neuroendocrine regulation. *Endocrinology*, **101**: 613-622.
- NOREMBERG, M.D. (1979): The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 756-762.
- OLNEY, J.W. (1969): Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, **164**: 719-721.
- OLNEY, J.W. (1971): Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **30**: 75-90.
- OLNEY, J.W.; SCHANKER, B. y RHEE, V. (1976): Chemical lesioning of the hypothalamus as a means of studying neuroendocrine function. En: *Hormones, behavior, and psychopathology*, (Sachar, ed.). pp. 153-158. Raven Press, Nueva York.
- PASTOR, F.E. (1983): Estudio ultraestructural del sistema hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis durante el desarrollo posnatal. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- PEREZ, V.J. y OLNEY, J.W. (1972): Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate. *J. Neurochem.*, **19**: 1777-1782.
- PIZZI, W.J., BARNHART, J.E. y UNNERSTALL, J.R. (1979): Reproductive dysfunction in male rats following neonatal administration of monosodium L-glutamate. *Neurobehav. Toxicol.*, **1**: 1-4.
- REDDING, R.W.; SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A. y WAKABAYASHI, I. (1971): Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology*, **8**: 245-255.
- RODRIGUEZ-SIERRA, J.F.; SRIDARAN, R. y BLAKE, C.A. (1980): Monosodium glutamate disruption of behavioral and endocrine function in the female rat. *Neuroendocrinology*, **31**: 228-235.
- SERESS, L. (1982): Divergent effects of acute and chronic monosodium l-glutamate treatment on the anterior and posterior parts of the arcuate nucleus. *Neuroscience*, **7**: 2207-2216.
- SIMPSON, E.L.; GOLD, R.M.; STANDISH, L.J. y PELLET, P.L. (1977): Axon-sparing brain lesioning technique: the use of monosodium-L-glutamate and other amino acids. *Science*, **198**: 515-517.
- VAN HOUTEN, M. y BRAWER, J.R. (1978): Cytology of neurons of the hypothalamic ventromedial nucleus in the adult male rat. *J. Comp. Neurol.*, **178**: 89-116.

Correspondencia:
Prof. Dr. P. Amat
Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. España

PAPEL DEL NUCLEO PARAVENTRICULAR EN EL CONTROL HIPOTALAMICO DE LA SECRECION DE HORMONA CORTICOTROPA

ROLE OF THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS IN THE HYPOTHALAMIC CONTROL OF THE RELEASE OF CORTICOTROPIN HORMONE

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

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

RESUMEN

Se realiza una recopilación-análisis de la participación del núcleo paraventricular en el control hipotalámico de la secreción de hormona corticotropa hipofisaria. La recopilación se ha enfocado desde el punto de vista morfológico, con especial mención al uso de la técnica inmunocitoquímica a microscopía óptica. Se consideran en profundidad los péptidos implicados en este control tales como Vasopresina, Factor liberador de Corticotropina, Péptido Vasoactivo intestinal y Angiotensina II.

PALABRAS CLAVE: Núcleo Paraventricular. Hormona Corticotropa. Técnica Inmunocitoquímica. Adrenalectomía.

SUMMARY

A critical review-analysis of the role of the paraventricular nucleus in the hypothalamic control of the release of corticotropin hormone was made. The review was focused on morphological aspects especially on the use with the light microscopy of the immunocytochemical technique. We especially took into account the peptides which have been implied in such control like Vasopressin, Corticotropin Releasing Factor, Vasoactive Intestinal polypeptide and Angiotensin II.

KEY WORDS: Paraventricular Nucleus. Corticotropin Hormone. Immunocytochemical Technique. Adrenalectomy.

Introducción

El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) es un modelo ideal para estudiar mecanismos integrativos hipotalámicos; en la rata, este núcleo, ocupa no más de un tercio de milímetro cúbico de tejido a cada lado del tercer ventrículo.

Morfológicamente es un núcleo extraordinariamente complejo. Así, a las primeras descripciones sencillas realizadas a principio de siglo (Malona, 1910; Cajal, 1911; Fortuny, 1912), se fueron sumando otras ligeramente más complejas (Gurdjian, 1927; Grunthal, 1931; Krieg, 1932; Rose, 1935; Bodian, 1939), las cuales comenzaron ya a considerar distintas partes dentro del NPV, tanto de neuronas magnocelulares como parvicelulares. Posteriormente se unen a estas las realizadas por Hatton y col. (1976), Armstrong y col. (1980) y Koh y Ricardo (1980).

Probablemente el estudio más completo y exacto sea el realizado por Swanson y Kuypers en 1980, el cual nos servirá de base para este trabajo. Estos autores distinguieron dentro del NPV tres grandes grupos de neuronas magnocelulares (anterior, medial y posterior), inmersos en cinco grupos de neuronas parvicelulares (periventricular, anterior, medial, dorsal y lateral).

Esta clasificación, sin duda alguna la más utilizada hoy día, es compleja y con frecuencia los diversos autores tienden a introducir ligeras modificaciones. Nosotros, normalmente unificamos las subdivisiones magnocelulares anterior y medial en una única que por su relación con la comisura blanca anterior denominamos comisural (Sánchez y col. 1987; Sánchez y col. 1988 a y b; Sánchez y col. 1990 a y b). Otros autores denominan a esta unificación núcleo comisural anterior (Peterson, 1966) o núcleo paraventricular anterior (Hou-You y col. 1986).

Así pues, podemos considerar en el NPV la existencia de dos tipos neuronales claramente diferenciados. En primer lugar las neuronas neurosecretoras magnocelulares similares a las contenidas en el núcleo supraóptico (NSO) y en los núcleos accesorios (Swanson y Sawchenko, 1983; Zimmerman, 1983; Kiss, 1988), las cuales principalmente producen VP y OT envueltas en funciones antidiuréticas, de eyección de leche, así como en la eyaculación (Murphey y col. 1987).

En segundo lugar, una gran población celular compuesta por neuronas parvicelulares neurosecretoras, las cuales forman parte del sistema encargado del control de la liberación de hormonas hipofisarias tales como ACTH (Bloom y col. 1982; Bugnon y col. 1982; Merchentaler y col. 1982; Merchentaler y col. 1983; Swanson y col. 1983; Antoni, 1986) y TSH (Lechan y Jackson, 1982) entre otras.

Se considera una tercera población neuronal de «células autónomas», fundamentalmente parvicelulares, las cuales envían proyecciones al tronco del encéfalo y a la médula espinal (Armstrong y col. 1980; Swanson y Kuypers, 1980; Sawchenko y Swanson, 1982; Luiten y col. 1985; Schwanzel-Fukuda y col. 1984), involucrándose, entre otras, en funciones cardioregulatorias.

Otro aspecto morfológico a destacar es el de las conexiones que presenta este núcleo, tanto aferentes (desde diversas zonas del tronco del encéfalo, estructuras hipotalámicas y telencefálicas e incluso desde la retina) como eferentes (al lóbulo neural de la hipófisis, zona externa de la Eminencia Media, médula espinal y tronco del encéfalo (para mayor detalle ver Silverman y Zimmerman, 1983; Swanson y Sawchenko, 1983). Destacaremos por la importancia que tiene para esta recopilación aquellas que presentan algunas subdivisiones parvicelulares (anterior, medial y periventricular) con la zona externa de la Eminencia Media (Zeem) (Swanson y Kuypers, 1980; Wiegand y Price, 1980; Lechan y col. 1980; Lechan y col. 1982).

De los diversos sistemas neuroendocrinos en los cuales el NPV se encuentra envuelto, su participación en el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, junto con el núcleo ventromedial, es sin duda alguna uno de los más interesantes (Baertschi y Beny, 1982; Ixart y col. 1982; Makara y col. 1981; Baertschi y col. 1983; Makara y col. 1984; Filaterov y Filaterova, 1985). La secreción de glucocorticoides por la corteza suprarrenal está regulada por la hormona corticotropa (ACTH) liberada desde la adenohipófisis. A su vez, la ACTH se encuentra regulada por varios péptidos hipotalámicos, los cuales alcanzan la adenohipófisis a través de los vasos porta de la ZEEM.

En los últimos años ha existido un gran interés en el control de la secreción de ACTH, no sólo debido al valor terapéutico de los tratamientos con ACTH, sino también a los múltiples mecanismos que producen la liberación de ACTH y sus diversas acciones fisiológicas (Baertschi y Beny, 1982).

Por otra parte conocemos hoy día, gracias al auge de los estudios inmunocitoquímicos, que el NPV posee más de treinta sustancias transmisoras, enzimas y péptidos biológicos activos. De alguno de ellos (VP, OT) las funciones que desempeñan en el NPV son conocidas, si bien día a día se les implica en nuevas funciones; de otros, no es tan claro el papel que desempeñan en el NPV y son objeto de intenso estudio actualmente (ver Silverman y Zimmerman, 1983; Swanson y Sawchenko, 1983; Kiss, 1988).

La función de control de la secreción de ACTH se atribuye, fundamentalmente, a cuatro de los péptidos albergados en las neuronas del NPV, especialmente en sus componentes parvicelulares. De estos péptidos, dos actuarían como factores reguladores principales, la VP y el Factor regulador de Hormona Corticotropa (CRP) y los otros dos, como factores reguladores de menor importancia, el Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) y la Angiotensina II (AII). Describiremos a continuación, fundamentalmente desde un punto de vista morfológico, el papel que cada uno de estos péptidos juega dentro del NPV en el control de la secreción de ACTH, haciendo especial mención a los dos primeros. Sin embargo, consideraremos también otros péptidos contenidos en el NPV, tales como la OT y la somatostatina (SRIF), sobre los cuales, en los últimos años, se ha valorado su posible papel en el control de la secreción de ACTH.

Vasopresina

En condiciones fisiológicas la VP regula la secreción de ACTH, aunque en este caso es el CRF el péptido controlador por excelencia. Sin embargo, la VP potencia el efecto del CRF sobre la secreción de ACTH y, además, la inmunoneutralización del CRF no elimina la secreción de ACTH. Consecuentemente, la VP en sangre portal hipofisaria modula la liberación de ACTH desde las células corticotropas, tanto *in vitro* (Krieger y Zimmerman, 1977; Gillies y Lowry, 1982), actuando de dos maneras diferentes, bien potenciando el efecto del CRF bien favoreciendo la liberación de ACTH directamente.

Bajo condiciones no fisiológicas, como la insuficiencia suprarrenal o la adrenalectomía quirúrgica bilateral, la VP juega un potente papel estimulando la secreción de ACTH, e, incluso, Bugnon y col. (1983) han demostrado, mediante inmunocitoquímica de los terminales axónicos del NPV en la EM, que el aumento de inmunoreactividad es mayor a la VP que el CRF tras la adrenalectomía a bilateral.

Existe coincidencia general acerca de la aparición en el NPV de una gran población parvicelular, inmunorreactiva a VP, tras la adrenalectomía bilateral (Tramu y col. 1983; Kiss y col. 1984; Sawchenko y col. 1984 a; Piekut y Joseph, 1986; Sánchez y col. 1988 a; Sánchez y col. 1990 a).

Sin embargo, no existe un acuerdo exacto acerca de que subdivisiones parvicelulares del NPV son las implicadas. Así algunos autores las han situado en la «zona central» del NPV (Tramu y col. 1984; Piekut y Joseph, 1986; Sánchez y col. 1988 a; Sánchez y col. 1990 a). Por último nuestro grupo ha observado la aparición de una población parvicelular VP-inmunorreactiva no sólo en las subdivisiones previamente citadas, sino también en la subdivisión parvicelular periventricular (Sánchez y col. 1988 a; Sánchez y col. 1990 a) (figs. 1, 2, 3 y 4. Esquema 1) incluyendo un aumento marcado de axones inmunorreactivos a nivel del componente parvicelular (Sánchez y col. 1990 b) (fig. 5).

Por otra parte avalan estos trabajos el hecho que estas tres subdivisiones parvicelulares son las que presentan conexiones con la ZEEM (Lechan y col. 1980; Swanson y col. 1980; Wiegand y Price, 1980; Lechan y col. 1982) pudiendo así la VP de estas subdivisiones tanto ser liberada hacia los vasos porta hipofisarios, alcanzando por tanto la adenohipófisis.

Recientemente se ha demostrado que las poblaciones parvicelulares VP-inmunorreactivas (subdivisiones periventricular, anterior y medial), que aparecen tras la adrenalectomía bilateral, con administración previa de colchicina, presentan modificaciones morfométricas consistentes fundamentalmente en un aumento significativo del área celular, traduciendo así un estado claro de activación celular (Sánchez y col. 1990 a). Estos resultados morfométricos, pensamos, que tienen especial relevancia fisiológica ya que los cambios estadísticos observados afectan solamente a las subdivisiones citadas y no a las subdivisiones magnocelulares ni parvicelulares dorsal y lateral, subdivisiones que no presentan conexiones con la ZEEM.

Factor liberador de ACTH (CRF)

En un principio, estudios fisiológicos (Makara y col. 1981) y anatómicos (Swanson y col. 1980; Bloom y col. 1982), demostraron que las neuronas que liberan CRF a los vasos porta hipofisarios de la ZEEM se encuentran concentrados en una pequeña zona de la división parvicelular del NPV.

Posteriormente Sawchenko y col. (1984 a), después de adrenalectomía bilateral, demostraron un significativo aumento del número de neuronas CRF-reactivas, localizadas casi exclusivamente en la subdivisión medial parvicelular. Kiss y col. (1984) observaron que este aumento se localizaba, no sólo en la subdivisión parvicelular medial sino también en la parvicelular anterior.

Por último, Piekut y Joseph (1986) confirmaron que las neuronas CRF-inmunorreactivas del NPV se localizan preferentemente en la subdivisión parvicelular medial.

Co-expresión en el NPV de VP-CRF

Desde 1983 diversos estudios neuroanatómicos han demostrado una alta densidad de neuronas VP-reactivas en la zona del núcleo paraventricular ocupada por las neuronas reactivas a CRF (Tramu y col. 1983; Kiss y col. 1984; Sawchenko y col. 1984 a; Piekut y Joseph, 1985; Piekut y Joseph, 1986).

La exacta relación o interacción de los sistemas VP-CRF es uno de los aspectos que hoy en día está siendo ampliamente estudiado, habiéndose utilizado distintos protocolos para aclarar la colocalización de ambos sistemas neuropeptidérgicos.

Tramu y col. (1983) demostraron una importante síntesis de VP en las neuronas parvicelulares del NPV en un área («zona central»), que posee una importante densidad de neuronas productoras de CRF. Sugirieron co-existencia de ambos péptidos realizando doble técnica inmunocitoquímica en la misma sección. Este hecho fue confirmado por Kiss y col. (1984) y Sawchenko y col. (1984 a), utilizando protocolos similares en el mismo corte o bien en cortes sucesivos.

Sin embargo, Antoni y col. (1983 a) y Taniguchi (1984) no encontraron co-existencia para ambos péptidos. Piekut y Joseph (1985), utilizando un protocolo de doble tinción con glucosa-oxidasa anti glucosa-oxidasa, como sustituto de la peroxidasa-antiperoxidasa no encontraron evidencia de esta co-existencia, pero apuntaron que podría ser debido a que el primer complejo antígeno-anticuerpo pudiera enmascarar otros lugares antigénicos de la misma neurona. De hecho, realizando una modificación de dicho protocolo, los mismos autores, un año más tarde, demostraron una clara coexistencia CRF-VP en las neuronas parvicelulares del NPV después de adrenalectomía bilateral (Piekut y Joseph, 1986).

Whitnall (1988) distingue claramente dos subpoblaciones de neuronas reactivas a CRF en el NPV. Una de ellas, localizada casi exclusivamente en la región media del núcleo en sentido rostro caudal, expresa claramente CRF y VP co-existiendo en las mismas neuronas. La segunda subpoblación, situada en la parte más caudal del núcleo, contiene neuronas que solamente manifiestan CRF y no VP. Para este autor este hecho puede ser debido a una diferente innervación de estas subpoblaciones, que estarían independientemente reguladas y sugiere que deben realizarse estudios en orden a aclarar la posible existencia de diferentes tipos de terminales sinápticos para cada subpoblación.

Péptido vasoactivo intestinal

Son muy pocas las evidencias morfológicas que implican al VIP contenido en el NPV en el control hipotalámico de la secreción de ACTH.

Tan sólo Mezey y Kiss (1985), tras someter a adrenalectomía bilateral durante siete días a ratas Sprague Sawley y previo tratamiento con colchicina, observaron la aparición de una población neuronal VIP-inmunorreactiva en el NPV. Estas neuronas se situaban en la subdivisión parvicelular medial y, tras realizar doble tinción sugirieron que si bien se encuentran localizadas en una zona rica en neuronas inmunorreactivas a CRF, no existía co-existencia. Este dato se acompañó de la aparición de numerosas fibras VIP-inmunorreactivas en la ZEEM y apuntaron que el VIP puede, de alguna manera, contribuir a la regulación de la secreción de ACTH.

Esta hipótesis se apoyaría en estudios previos que demostraron un efecto regulador de los corticosteroides sobre la síntesis de VIP (Rotszen y col. 1980) y que el VIP estimulaba la liberación de ACTH de tumores hipofisarios humanos y de monos (Nicosia y col. 1982).

Nuestro grupo está realizando estudios, tras adrenalectomía con este péptido, el cual presenta una resistencia marcada a visualizarse con la técnica inmunocitoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa, en tejidos incluidos en parafina. En animales normales no hemos encontrado neuronas VIP-inmunorreactiva en situación periventricular, pero la norma es la ausencia de las mismas (resultados no publicados) (fig. 6).

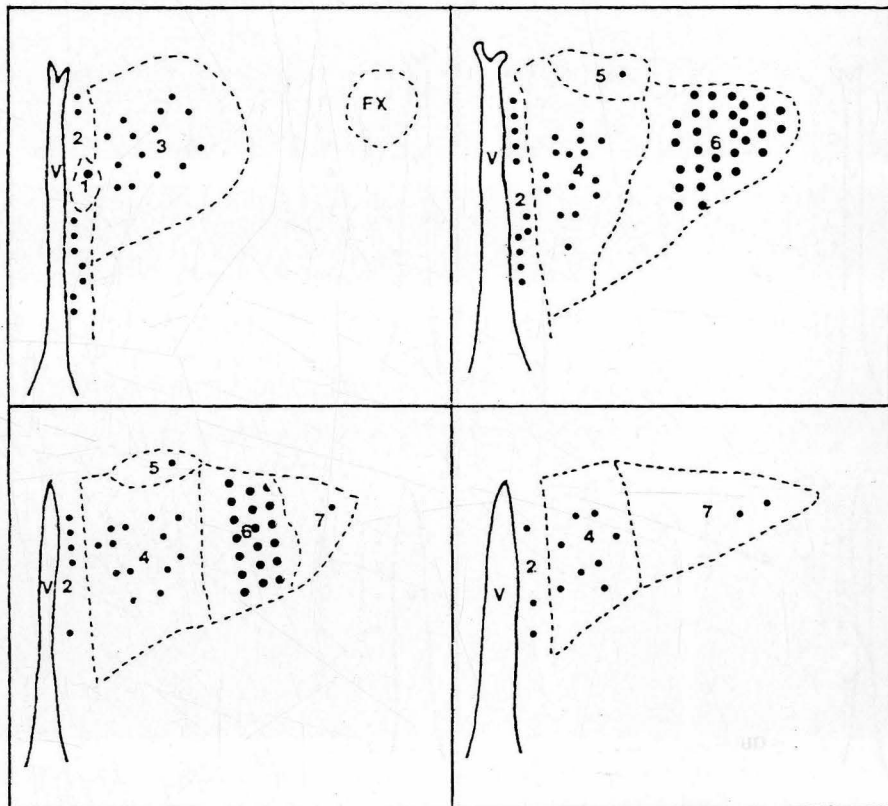
Angiotensina II

Son también pocas las evidencias que impliquen a la A II en el control de la secreción de ACTH. Tan sólo Spinedi y Negro-Vilar (1983) observaron, tras la adrenalectomía bilateral, un claro aumento de la inmunorreactividad a A II en la ZEEM. Sin embargo estos datos no se han corroborado con modificaciones en las neuronas A II inmunorreactivas del NPV.

Somatostatina

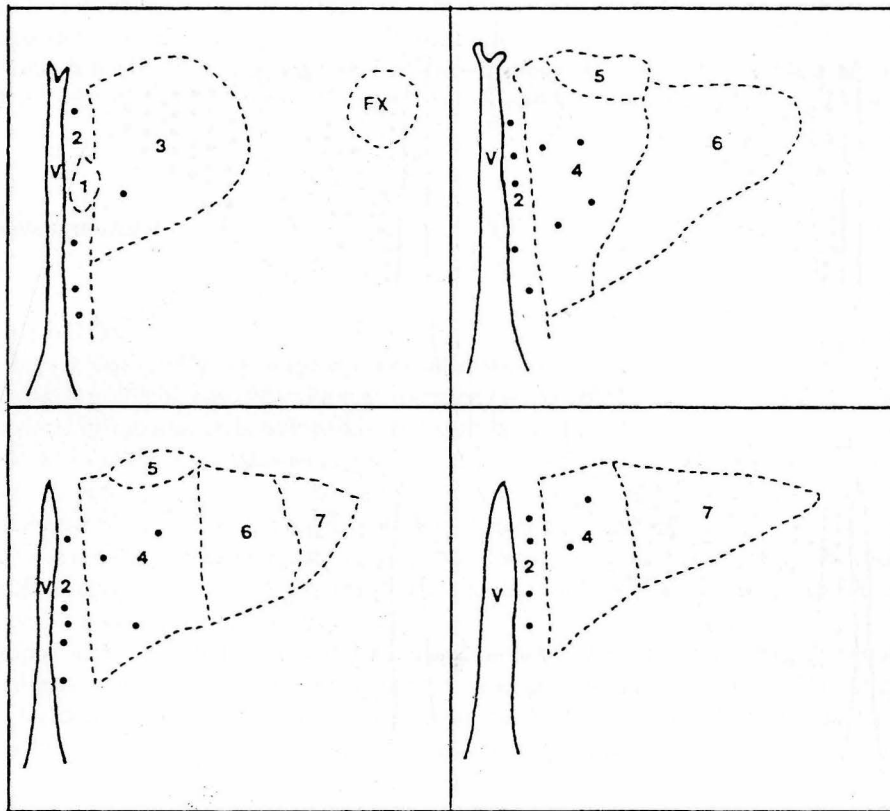
Recientemente nosotros (Hernández, 1988; Sánchez y col. 1989) hemos demostrado modificaciones de las neuronas SRIF-inmunorreactivas del NPV después de adrenalectomía bilateral y tratamiento con colchicina. En estas condiciones experimentales hemos objetivado un aumento del número de neuronas inmunorreactivas que afecta casi exclusivamente a la subdivisión parvicelular periventricular y en menor medida a la medial, si bien presentaron una débil intensidad de reacción (figs. 7 y 8) (Esquema 2).

Dado el predominante papel inhibitor que posee la somatostatina sobre la secreción de las hormonas adenohipofisarias, especialmente GH, estos hallazgos deben ser interpretados con cautela y tener en cuenta posibles interacciones de otras sustancias tales como los glucocorticoides. Pudiera existir un efecto inhibitor de estos glucocorticoides, el cual lógicamente desaparecería al realizar la adrenalectomía bilateral, por ello se deben realizar estudios posteriores para esclarecer este punto.



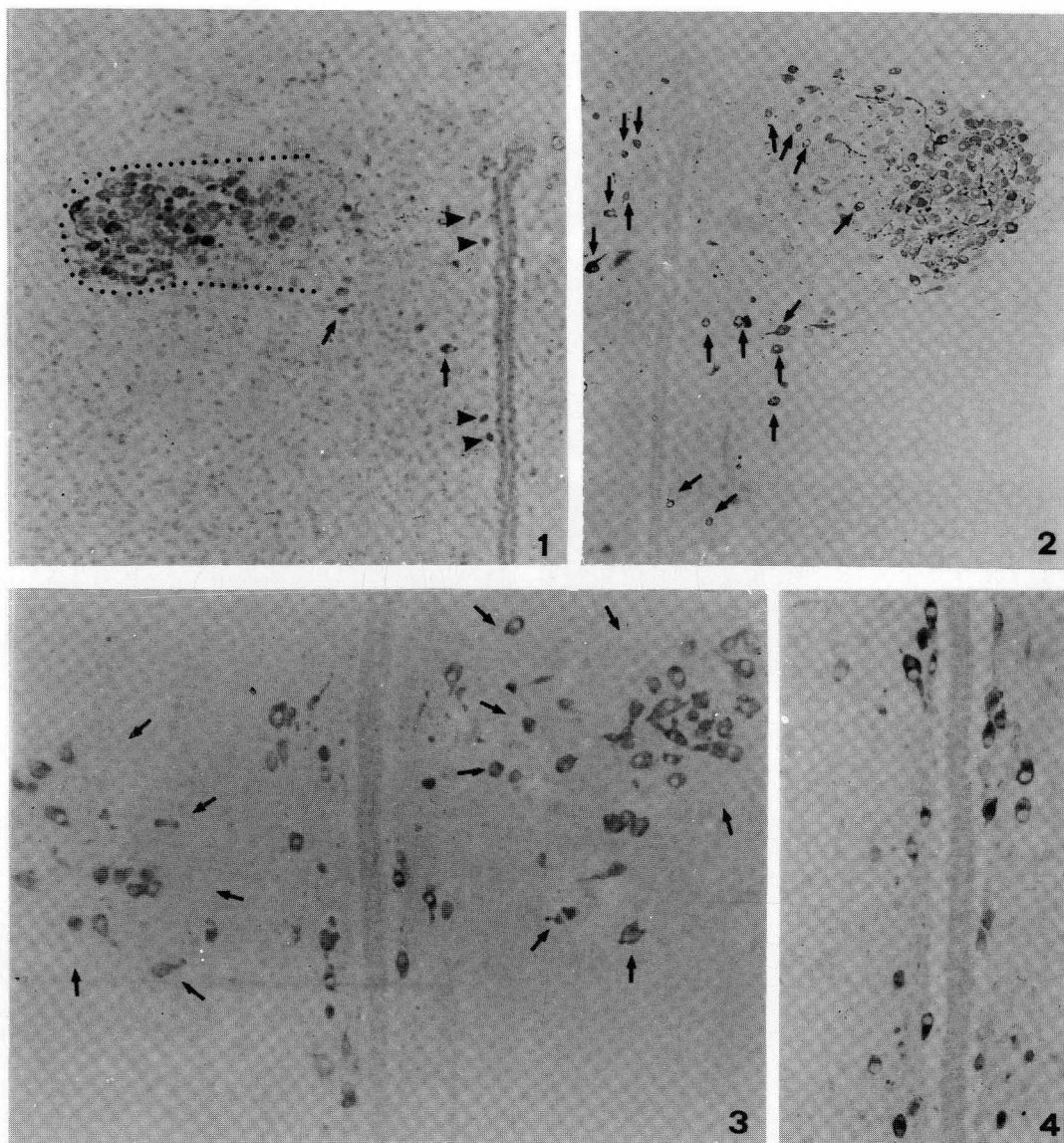
ESQUEMA 1. Distribución de las neuronas VP-inmunorreactivas en el núcleo paraventricular del hipotálamo después de adrenalectomía bilateral y administración de colchicina.

Los dibujos corresponden a secciones frontales centradas en el NPV en sentido antero-posterior (Desde A hacia H). FX: Fornix. V: Tercer ventrículo. 1: Subdivisión magnocelular comisural. 2: Subdivisión parvicelular. 3: Subdivisión parvicelular anterior. 4: Subdivisión parvicelular medial. 5: Subdivisión parvicelular dorsal. 6: Subdivisión magnocelular posterior. 7: Subdivisión parvicelular lateral.

**ESQUEMA 2.**

Distribución de las neuronas SRIF-inmunoactivas en el núcleo paraventricular del hipotálamo después de adrenalectomía bilateral y administración de colchicina.

Los dibujos corresponden a secciones frontales centradas en el NPV en sentido antero-posterior (Desde A hacia H). FX: Fornix. V: Tercer ventrículo. 1: Subdivisión magnocelular comisural. 2: Subdivisión parvicelular periventricular. 3: Subdivisión parvicelular anterior. 4: Subdivisión parvicelular medial. 5: Subdivisión parvicelular dorsal. 6: Subdivisión magnocelular posterior. 7: Subdivisión parvicelular lateral..



- FIGURA 1.** Animal tratado intracerebroventricularmente con colchicina ($90 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ de suero salino) 24 horas antes del sacrificio. Nótese la gran presencia de neuronas VP-reactivas en la subdivisión magnocelular posterior (entre puntos) y de alguna neurona VP-reactiva en las subdivisiones parvicelulares medial (una flecha) y periventricular (cabezas de flecha). 320 X
- FIGURA 2.** Animal adrenalectomizado bilateralmente y tratado con colchicina (misma dosis que animal de figura 1). Nótese el aumento de neuronas VP-reactivas en las subdivisiones parvicelulares medial y periventricular (flechas). 320 X
- FIGURAS 3 y 4.** Animal adrenalectomizado bilateralmente y tratado con colchicina (misma dosis que animal de figura 1). Visión correspondiente a las subdivisiones parvicelulares anterior (entre flechas. fig. 3) y periventricular (resto figs. 3 y 4). Neuronas VP-reactivas. 640 X

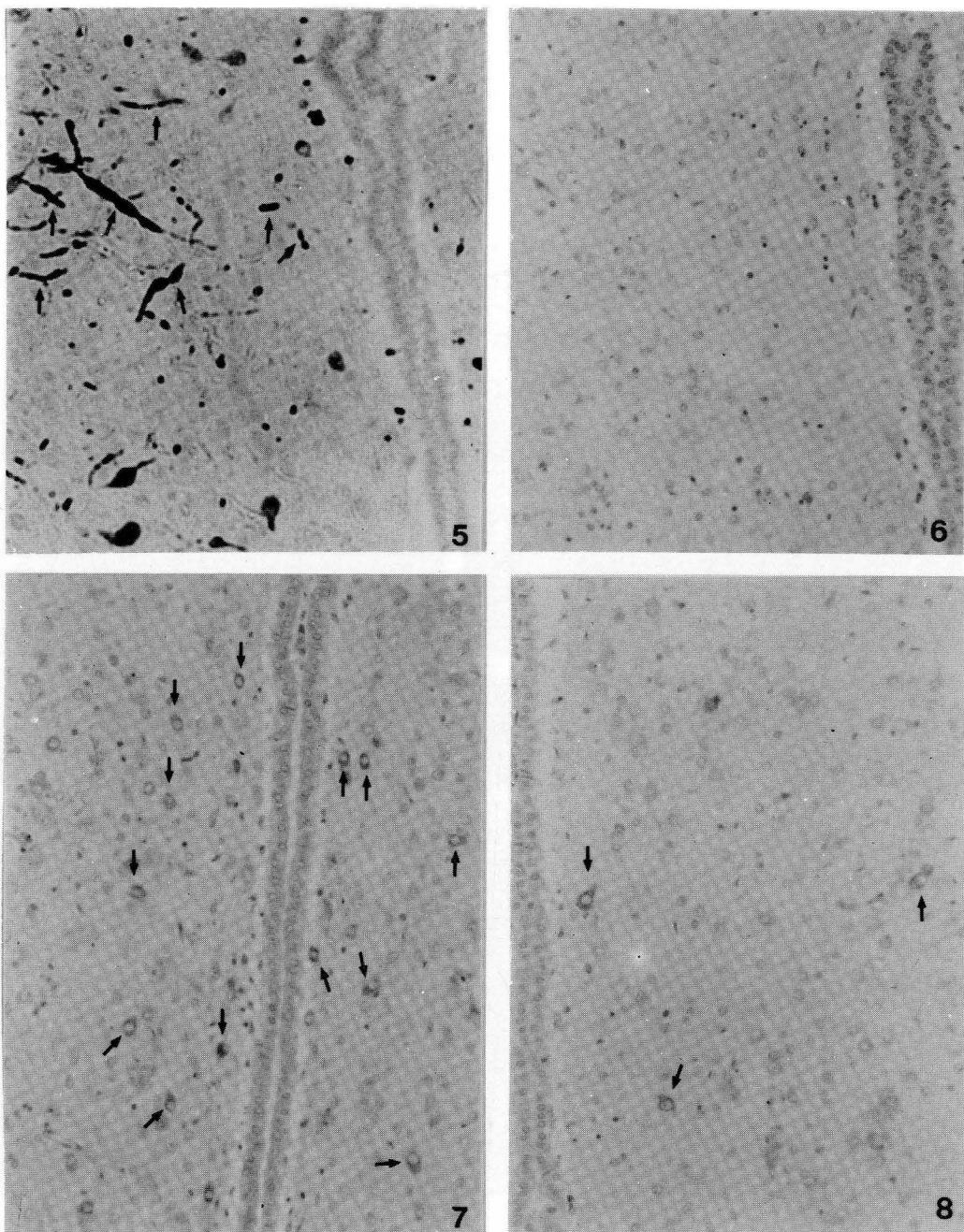


FIGURA 5. Animal adrenalectomizado bilateralmente y tratado con colchicina (misma dosis que animal de figura 1). Gran presencia de fibras VP-reactivas (flechas) en las subdivisiones parvicelulares medial y periventricular. 1.280 X

FIGURA 6. Animal adrenalectomizado bilateralmente y tratado con colchicina (misma dosis que animal de figura 1). Ausencia de neuronas VIP-inmunorreactivas. 1.280 X

FIGURAS 7 y 8. Animal adrenalectomizado bilateralmente y tratado con colchicina (misma dosis que animal de figura 1). Neuronas SRIF- inmunorreactivas débilmente teñidas (flechas) en las subdivisiones parvicelulares periventricular (figs. 7 y 8) y medial (fig. 8). 1.280 X

Oxitocina

No está claro el papel que la OT pueda jugar en el control hipotalámico de la secreción de ACTH.

Sawchenko y col. (1984a), tras adrenalectomía bilateral, observaron modificaciones en las neuronas parvicelulares productoras de VP y CRF pero no en las productoras de OT. Lewis y Sherman (1985), realizaron estudios en el hombre, observando que la administración de OT no alteraba los niveles de ACTH y cortisol. Incluso Chiodera y Legros (1981) y Legros y col. (1984) demostraron un efecto inhibitor de la OT sobre los niveles basales de ACTH y cortisol y Shu y col. (1986) demostraron, en la mujer, que la OT inhibía significativamente el efecto potenciador de la VP sobre la secreción estimulada de ACTH por CRF.

Sin embargo, Antonio y col. (1983 b), añadiendo OT sintética «in vitro», observaron que la OT potenciaba el CRF tanto en la rata Wistar como en la Brattleboro. Un año más tarde Gibbs y col. confirmaron este efecto y en 1986, Gibbs demostró un aumento de los niveles de OT en respuesta a dos tipos de estrés (exposición a eter y suspensión del animal por la cola).

En resumen, es claro que varios de los péptidos contenidos en el NPV juegan un papel primordial en el control hipotalámico de la secreción de ACTH, especialmente el CRF y la VP, si bien otros, como el VIP, la A II, la SRIF o la OT deben ser tenidos también en cuenta y por tanto deben de continuar siendo objeto de estudios que aclaren su intervención en el complejo mecanismo de la regulación hipotalámica de la secreción de ACTH.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por un proyecto DGICYT PB86-0213.

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los Dres. Sánchez-Franco y Cacicedo Egues (Servicio de Endocrinología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid) por cedernos gentilmente los sueros anti-VP, anti-VIP y anti-SRIF (1-14).

BIBLIOGRAFIA

- ANTONI, F.A. (1986): Hypotalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasin factor. *Endocr. Rev.* **7**: 351-378.
- ANTONI, F.A.; PALKOVITS, M.; MAKARA, G.B.; LINTON, E.A.; LOWRY, P.J. y KISS, T.Z. (1983 a). Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamo-infundibular tract. *Neuroendocrinology*. **36**: 415-423.
- ANTONI, F.A.; HOLMES, M.C. y JONES, M.T. (1983 b). Oxytocin as well as vasopressin potentiative ovine CRF in vitro. *Peptides*, vol. **4**: 411-415.
- 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**: 1.931-1.958.
- BAERTSCHI, A.J. y BENY, J.L. (1982): Hypothalamic paraventricular nucleus is a privileged site for brain-pituitary interaction in long-term tissue culture. *Nature (Lond.)*. **295**: 145-147.
- BAERTSCHI, A.J.; BENY, J.L. y MAKARA, G. (1983): Paraventricular nucleus region controls pituitary-adrenal function in Brattleboro rats. *Amer. J. Physiol.* **244**: 363-367.
- BLOOM, F.E.; BATTENBERG, E.L.F.; RIVIER, J. y BALE, W.W. (1982): Corticotropin releasing factor (CRF) immunoreactive neurons and fibers in the rat hypothalamus. *Regul. Pept.* **4**: 43-48.
- BODIAN, D. (1939): Studies on the diencephalon of the Virginia opossum. Part. I. The nuclear pattern in the adult. *J. Comp. Neurol.* **94**: 259-233.
- BUGNON, C.; FELLMAN, D.; GOUGUET, A. y CARDOT, J. (1982): Corticoliberin in the rat brain: Immunocytochemical identification and localization of a novel neuroglandular system. *Neurosci. Lett.* **30**: 25-30.
- BUGNON, C.; FELLMAN, D. y GOUGUET, A. (1983): Changes in corticoliberin and vasopressin-like immunoreactivities in the zona externa of the median eminence in adrenalectomized rats. Immunocytochemical study. *Neurosci. Lett.* **37**: 43-49.
- CAJAL, S. RAMON y. (1911): *Histologie du Système Nerveux de l'home et des vertébrés*. Vol. II. Paris: Maloine.
- CHIODERA, P. y LEGROS, J.J. (1981): L'injection intra-veineuse d'ocytocine entraîne une diminution de la concentration plasmatique de cortisol chez l'home normal. *C.R. Soc. Biol. (D). Paris.* **175**: 546.
- FILATEROV, A.A. y FILATEROVA, L.P. (1985): Role of the paraventricular and ventromedial hypothalamic nuclear areas in the regulation of the pituitary-adrenocortical system. *Brain Res.* **342**: 135-140.

- FORTUYN, Ae. B.D. (1912): Die ontogenie der kerne des zwischenhirns beim kanichen. *Arc. Anat. Physiol.* 302-352.
- GIBBS, D.M. Stress-Specific modulation of ACTH secretion by oxytocin. *Neuroendocrinology.* **52**: 456-458.
- GIBBS, D.M.; VALE, W.; RIVIER, J. y YEN, S.S.C. (1984): Oxytocin potentiates the ACTH-releasing activity of CRF (41) but not vasopressin. *Life Sci. Vol.* **34**: 2.245-2.249.
- GUILLES, G. y LOWRY, P.J. (1982): Corticotropin-releasing hormone and its vasopressin component. En: *Frontiers in Neuroendocrinology. Vol. 7*: GANONG, W.F. y MARTINI, L. eds. (Raven Press, New York) 45-75.
- GRUNTHAL, E. (1931): Der zellaufbau im hypothalamus des kanischens und des macacus rhesus nebst einigen allgemeinen bemerkungen über dieses organ. *J. Psychol. Neurol.* **42**: 425-464.
- GURDJIAN, E.S. (1927): The diencephalon of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **43**: 1-114.
- HATTON, G.I.; HUTTON, U.E.; HOBLITZELL, E.R. y ARMSTRONG, W.E. (1976): Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* **108**: 187-193.
- HERNANDEZ, M. (1988): Tesina de Licenciatura. Universidad de Salamanca.
- HOU-YOU, A.; LAMMEMA, T.; ZIMMERMAN, E.A. y SIVERMAN, A.J. (1986): Comparative distribution of vasopressin and oxytocin neurons in the rat brain using a double-label procedure. *Neuroendocrinology.* **44**: 235-246.
- HOLMES, M.C.; ANTONI, F.A.; CATT, K.J. y AGUILERA, G. (1986): Predominant release of vasopressin vs. corticotropin-releasing factor from the isolated median eminence after adrenalectomy. *Neuroendocrinology.* **43**: 245-251.
- IXART, G.; ALONSO, G.; SZAFARCZYK, A.; MALAVAL, F.; NOUGUIER-SOULE, J. y ASSEMNACHER, I. (1982): Adrenocorticotropin regulation after bilateral lesions of the paraventricular or supraoptic nuclei and in Brattleboro rats. *Neuroendocrinology.* **35**: 270-276.
- KISS, J.Z. (1988): Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res. Bull.* **20**: 699-708.
- KISS, J.Z.; MEZEY, E.; SKIRBOLL, L. (1984): Corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus become vasopressin positive after adrenalectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 1.854-1858.
- KOH, E.T. y RICARDO, J.A. (1980): Paraventricular nucleus of the hypothalamus: Evidence of ten functionally discrete subdivisions. *Soc. Neurosci. Abstr.* **6**: 521.
- KRIEG, W.J.S. (1932). The hypothalamus of the albino rats. *J. Comp. Neurol.* **55**: 18-89.
- KRIEGER, D.T. y ZIMMERMAN, E.A. (1977): The nature of CRF and its relationship to vasopressin. En: *Clinical Neuroendocrinology*, Martini, L. y Besser, G.M. eds. (Academic Press, New York). 364-392.
- LECHAN, R.M.; NESTLER, J.L.; JACOBSON, S. y REICHLIN, S. (1980): The hypothalamic tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase (HRP) microiontophoresis. *Brain Res.* **195**: 13-27.
- LECHAN, R.M. y JACKSON, I.M.D. (1982): The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. *Brain Res.* **245**: 1-15.
- LEGROS, J.J.; CHIONDERA, P.; GEENEN, V.; SMITZ, S. y VON FRENCKELL, R. (1984): Dose-response relationship between plasma oxytocin and cortisol and adrenocorticotropin concentrations during oxytocin infusion in normal men. *J. Clin. Met.* **58**: 105.
- LEWIS, D.A. y SHERMAN, B.M. (1985): Oxytocin does not influence adrenocorticotropin secretion in man. *J. Clin. Endocrin. Metab.* Vol. 60, nº 1: 53-56.
- LUITEN, P.G.M.; HORST, G.J.; KARST, H. y STEFFENS, A.B. (1985): The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in the medulla and spinal cord. *Brain Res.* **329**: 374-378.
- MALONE, E.F. (1910): Über die kerne der menschlichen diencephalon. *Abh. Preuss. Akad. Wiss.* **29**: 290-300.
- MAKARA, G.B.; STARK, E.; KARTESZI, M.; PALKOVITS, M. y RAPPAY, Gy. (1981): Effects of paraventricular lesions on stimulated ACTH release and CRF in stalk-median eminence of the rat. *Amer. J. Physiol.* **240**: 441-446.
- MAKARA, G.B.; ANTONI, F.A.; STARK, E. y KARTESZI, M. (1984): Hypothalamic organization of corticotropin releasing factor (CRF) producing structures. In: *Neuroendocrine Perspectives. Vol. 3*: Müller, E.E.; Mc. Leod, R.M., eds. pp. 71-119 (Elsevier, Amsterdam).
- MERCHENTALER, I.; VIGH, S.; PETRUSZ, P. y SCHALLY, A.V. (1982): Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Amer. J. Anat.* **165**: 385-396.
- MERCHENTALER, I.; VIGH, S.; PETRUSZ, P. y SCHALLY, A.V. (1983): The paraventriculo-infundibular corticotropin releasing factor (CRF) pathway as revealed by immunocytochemistry in long term hypophysectomized or adrenalectomized rats. *Regul. Pept.* **5**: 295-305.
- MEZEY, E. y KISS, J.Z. (1985): Vasoactive intestinal peptide-containing neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 245-247.
- MURPHY, M.R.; SECKL, J.R.; BURTON, S.; CHECKLEY, S.A. y LIGHTMAN, S.L. (1987): Changes in oxytocin and vasopressin secretion during sexual activity in men. *Endocrinol. Metab.* **65**: 738-741.
- NICOSIA, S.; SPADA, A. y GIANNATTASIO, G. (1982): En: *Vasoactive Intestinal Polypeptide*. Said, S.I. ed. (Raven Press, New York), 263-275.
- PETERSON, R.P. (1966): Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **128**: 181-190.
- PIEKUT, D.T. y JOSEPH, S.A. (1985): Relationship of CRF-immunostained cells and magnocellular neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Peptides.* **6**: 873-882.
- PIEKUT, D.T. y JOSEPH, S.A. (1986): Co-existence of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular paraventricular neurons of rat hypothalamus. *Peptides.* **7**: 891-898.
- ROTSZTEJN, W.H.; BENOIT, L.; BESSON, J.; BERAUD, J.; BLUET-PAJOT, M.T.; KORDON, C.; ROSSELIN, G. y DUVAL, J. (1980): *Neuroendocrinology*, **31**: 282-286.

- ROSE, M. (1935): Das zwischenhirn des kaninchens. Mem. Acad. Pol. Sci. Lett. Ser. B., 1-108.
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; CARBAJO, E.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VAZQUEZ, R. (1987): Análisis inmunocitoquímico de las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo durante el ciclo estrual de la rata. *Acta Microscópica*. Vol. **10**: nº 3: 379-385.
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RUBIO, M.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VAZQUEZ, R. (1988 a): Topographical distribution of vasopressin-producing neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus following adrenalectomy and treatment with colchicine. *Neuroendocrinology Letters*, Vol. **10**: nº 3: 165-174.
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; JUANES, J.A. y VAZQUEZ, R. (1988 b). Effect of a high dose of colchicine administered intracerebroventricularly to the corticotropic hypothalamic-hypophyseal axis of the rat. An immunocytochemical study. *Anales de Anatomía*. Vol. XXXIV, **90**: 91-99.
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A.; MONTERO, M. y VAZQUEZ, R. (1989): Estudio inmunocitoquímico de las neuronas inmunorreactivas a somatostatina (1-14) del núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas adrenalectomizadas. *Actas de la VIII reunión nacional del fondo de investigaciones sanitarias de la seguridad social*. pp. 102.
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; SANCHEZ-FRANCO, F.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A. y VAZQUEZ, R. (1990 a). Immunocytochemical-morphometric analysis of the vasopressin-reacting neurons of the paraventricular nucleus of the rat after adrenalectomy (en prensa).
- SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; SANCHEZ-FRANCO, F.; JUANES, J.A.; BLANCO, E. y VAZQUEZ, R. (1990 b): Immunocytochemical visualization of the vasopressin reactive fibres related to the rat paraventricular and supraoptic nuclei and the median eminence following adrenalectomy and treatment with colchicine. (En prensa).
- SAWCHENKO, P.E. y SWANSON, L.W. (1982): Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* **205**: 260-272.
- SAWCHENKO, P.E.; SAWNSON, L.W. y VALE, W.W. (1984 a): Co-expression of corticotropin-releasing factor: co-expressing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-vasopressin and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J. Neurosci.* Vol. 4, nº 4: 1.118-1.129.
- ACHWANZEL-FUKUDA, M.; MORREL, J.I. y PFAFF, D.W. (1984): Localization of forebrain neurons which project directly to the medulla and spinal cord of the rat by retrograde tracing with wheat germ agglutinin. *J. Comp. Neurol.* **226**: 1-20.
- SPINEDI, E. y NEGRO-VILLAR, A. (1983): Angiotensin II and ACTH release: Site of action and potency relative to corticotropin releasing factor and vasopressin. *Neuroendocrinology*, **37**: 446-453.
- SWANSON, L.W. y KUYPER, H.G.J.M. (1980): The paraventricular nucleus of the hypothalamus; Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vaal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J. Comp. Neurol.* **194**: 555-570.
- SWANSON, L.W. y SAWCHENKO, P.E. (1983): Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* **6**: 269-324.
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; WIEGAND, S.J. y PRICE, J.L. (1980): Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res.* **198**: 190-195.
- SHU, B.Y.; LIU, J.H.; RASMUSSEN, D.D.; GIBSEN, M.; STEINBERG, J. y YEN, S.S.C. (1986): Role of oxytocin in the modulation of ACTH release in women. *Neuroendocrinology*. **44**: 309-313.
- TANIGUCHI, Y. (1984): Immunohistochemical evidence against the coexistence of a corticotropin-releasing factor and oxytocin or vasopressin in the rat paraventricular nucleus. *Arch. Histochem. Jpn.* **47**: 475-483.
- TILDERS, F.J.H.; BERKENBOSH, F.; VERMES, I.; LINTON, E.A. y SMELIK, P.G. (1985): Role of epinephrine and vasopressin in the pituitary-adrenal response to stress. *Fed. Proc.* **44**: 155-160.
- TRAUM, G.; GROIX, C. y PILLEZ, A. (1983). Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce vasopressin-like material. Immunohistochemical demonstration in adrenalectomized guinea pigs and rats. *Neuroendocrinology*. **37**: 467-469.
- WHITNALL, M. (1988): Distributions of pro-vasopressin expressing and pro-vasopressin deficient CRH neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of colchicine-treated normal and adrenalectomized rats. *J. Comp. Neurol.* **275**: 13-28.
- WIEGAND, S.J. and PRICE, J.L. (1980): Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J. Comp. Neurol.* **192**: 1-19.
- ZIMMERMAN, E. (1983): Oxytocin, vasopressin, and neurophysins. En: Krieger, D.; Brownstein, M. y Martin, J. eds. *Brain Peptides*, New York. 597-611.

Correspondencia: F. Sánchez
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Avda. Campo Charro, s/n.
37007 Salamanca, España

ESTUDIO COMPARADO MORFOLOGICO Y MORFOMETRICO DE LAS ASTAS POSTERIORES DE LA MEDULA ESPINAL LUMBAR

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL STUDY OF THE DORSAL HORNS OF THE LUMBAR SPINAL CORD

S. RUIZ DE AGUIRRE, J. LOSADA y R. SARRIA

Departamento de Neurociencias. Sección de Anatomía
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
Leioa. Vizcaya.

RESUMEN

Hemos realizado un estudio morfológico y morfométrico en relación con la organización estructural de las astas posteriores de la médula espinal lumbar de rata, conejo, gato y humano adultos.

Este material ha sido examinado a microscopía óptica con técnicas de Kluver-Barrera y Golgi, habiéndose identificado la ordenación laminar de las astas posteriores en estos mamíferos, y los elementos celulares más representativos de cada lámina. El estudio morfométrico nos ha permitido conocer, el área total de la médula espinal, el área del asta dorsal, así como el espesor, la densidad y el tamaño celular de cada una de las Láminas del asta dorsal.

PALABRAS CLAVE: Astas posteriores. Médula espinal lumbar. Morfología comparada. Morfometría.

SUMMARY

We have carried out a morphological and morphometrical study about the structural organization of the dorsal horns of the lumbar spinal cord in adult rat, rabbit, cat and humans.

Using the Kluver-Barrera and Golgi techniques, the laminar organization of the dorsal horns and the most representative cellular elements of each Laminae have been studied with light microscopy. The morphometric study has allowed us to estimate the total area of the spinal cord, the area of the dorsal horn, as well as the thickness, the cellular density and size of each Laminae.

KEY WORDS: Dorsal horns. Lumbar spinal cord. Comparative morphology. Morphometry.

Introducción

El estudio de las astas posteriores de la médula espinal en las distintas especies de la escala filogenética, ha venido siempre determinado por un intento de ordenación en núcleos o columnas, como lo prueban entre otros los trabajos de Szentagothai y Alberts (1955), en relación al núcleo dorsal de Clarke.

Rexed en 1952, 1954 y 1964, estudia las médulas de gatos jóvenes y adultos a microscopio óptico con técnicas de Nissl, realizando una ordenación en láminas de la sustancia gris de la médula espinal. Estos criterios de ordenación laminar, han sido posteriormente aplicados a la médula espinal de los mamíferos superiores. Schoenen en 1973 y 1982, y Brichta en 1985, confirman la presencia de este patrón laminar tanto en tejido humano como en rata, respectivamente.

Es nuestro propósito, con el presente trabajo, realizar un estudio comparado de la ordenación laminar de las astas posteriores de la médula espinal en distintos mamíferos, así como conocer detalles morfológicos de los tipos celulares que componen cada lámina, de forma que, apoyados en el estudio morfométrico, podamos establecer una correlación estadística.

Material y Métodos

Hemos utilizado distintas especies de mamíferos representativos de la escala filogenética, con afinidad de edad y sexo, habiendo extraído para su estudio la médula espinal entre los segmentos T12 y S1.

Los animales elegidos han sido:

- Ratas blancas (Sprague Dawley), con un peso de 150-200 gr.
- Conejos albinos (New Zealand), con un peso de 500-700 gr.
- Gatos, con un peso de 450-600 gr.
- Humano (obtenido a partir de autopsias de personas fallecidas sin enfermedad neurológica).

Tras la anestesia, los animales fueron perfundidos por vía intracardíaca. De cada una de estas especies, se han estudiado 6 animales, los cuales se han dividido en dos grupos. La mitad de ellos se han procesado con técnicas convencionales de inclusión en parafina, y teñido según el método de Kluver-Barrera, y la otra mitad con técnicas de impregnación argéntica (Golgi rápido y Golgi Colonier).

El estudio morfométrico se ha realizado mediante un sistema óptico para análisis de imagen semiautomático, con un programa VIDS-III. Se calcularon las medidas de dispersión y se aplicó para el estudio estadístico el test t de Student.

Resultados

Rata

Las láminas de los segmentos lumbares de las astas posteriores de la rata, presentan una inclinación dorso lateral.

La lámina I es la capa más delgada dentro de la sustancia gris, y también la más dorsal. En esta lámina se encuentran células de soma fusiforme y 2 largas prolongaciones periféricas orientadas horizontalmente. El cambio en la orientación del neuropilo, ofrece el mejor criterio para delimitar la transición entre esta lámina y la siguiente.

La II, es paralela a la lámina I y está cubierta por ella dorsalmente, pero no en su parte media y lateral. Sus células son de morfología variable con una zona externa densamente poblada y una interna menos compacta.

El límite entre las láminas II y III viene definido por el gran número de axones mielínicos, que se ven en las secciones transversales de la médula espinal (Fig. 1a). Dispersas entre las fibras mielínicas transversales y longitudinales, hemos encontrado entre otros, células y neuronas de soma piriforme, mediano tamaño y con una larga prolongación apical que se proyecta hasta la lámina I y pequeñas dendritas basales. En el límite entre las láminas III y IV hemos observado grandes neuronas multipolares con una prolongación dendrítica hacia láminas profundas de la médula espinal.

La lámina IV es la más ancha de las descritas hasta ahora. Sus neuronas tienen un soma triangular con una prolongación apical y largas prolongaciones basales (Fig. 1 b). Nótese un contacto entre una dendrita y el soma de la célula.

En los niveles lumbares bajos, parece que la porción medial de esta lámina se continúa ventralmente cruzando la línea media, hasta unirse con la lámina IV contralateral en la región de la comisura gris dorsal. Sin embargo, en los niveles lumbares altos, el núcleo dorsal de Clarke parece extenderse tanto en sentido dorsal como para bloquear la continuación de la lámina a través de la línea media (Fig. 1c).

El tamaño de las células de la lámina V es parecido a las de la IV, excepto las que se encuentran en la zona lateral, que son más grandes. Esta lámina limita medialmente con el núcleo dorsal en los segmentos torácicos y lumbares altos de la médula (Fig. 1c).

La lámina VI, ventral al cuello del asta posterior y paralela a la lámina V, no ha podido ser totalmente delimitada en nuestro material.

Las láminas que mayor desarrollo alcanzan en la rata, corresponden a la IV con 165 micras y a la V con una media de 159 micras, no pudiendo afirmar, que sean significativamente distintas ni con una $p < 0,1$. La lámina I es la menos desarrollada con 9 micras (Tabla 1).

Conejo

Las láminas de las astas posteriores tienen al igual que en la rata, una inclinación dorsoventral.

La lámina I corresponde a la parte más dorsal de la sustancia gris de la médula espinal. La zona lateral se halla casi en contacto con la superficie de la médula. Su espesor es pequeño con un número de células escaso y de tamaño variable.

La lámina II contiene pequeñas células redondeadas, las cuales adoptan una disposición columnar en relación al asta posterior. Se halla cruzada por un gran número de fibras del cordón posterior en su porción medial.

La lámina III es la de mayor espesor del conejo. Sus células están menos agrupadas que en la lámina II, por encontrarse entre el retículo formado por las fibras longitudinales y transversales procedentes del cordón posterior. Estas fibras marcan el límite entre la lámina II y la III (Fig. 2a). Las células son de tamaño variable, destacando el gran desarrollo nuclear que poseen.

Las neuronas de la lámina IV tienen un gran calibre, con un soma de forma triangular y largas prolongaciones dendríticas, que se extienden hacia las láminas contiguas.

La lámina V ocupa la base de las astas posteriores, adoptando sus células un tamaño y forma variables. Predominan las de soma fusiforme, orientadas según un eje vertical y con largas prolongaciones en dirección apical y basal.

La lámina VI está situada en la base del asta posterior, debajo de la V. La zona medial de dicha lámina muestra células de tamaño intermedio, con un soma triangular o fusiforme perpendicular al eje mayor del asta.

Los resultados obtenidos con la medición de las láminas correspondientes al conejo (Tabla 1) muestran el mayor espesor alcanzado por la lámina III, con 173 micras, que es, con una $p < 0,05$ mayor que la lámina II, que mide 162 micras. La lámina II del conejo casi duplica en espesor a la lámina II de la rata (92 micras de media).

Gato

Las láminas de las astas dorsales son paralelas entre sí, y tienen una disposición horizontalizada, a diferencia de lo que ocurre en la rata y en el conejo.

La lámina I está rodeando al ápex e incluso se extiende lateralmente, cubriendo la zona dorsal y lateral del asta posterior, a diferencia de las especies descritas anteriormente. La densidad celular de esta lámina es escasa. Sus células adoptan una forma ligeramente ovalada, con citoplasma escaso y dispuesto transversalmente al asta posterior con un núcleo claro y grande y un nucleolo prominente. Los grumos de NISSL aparecen como una fina membrana rodeando al núcleo (Fig. 3a).

La lámina II se halla cubierta por la lámina I excepto en su zona medial. Está cruzada por un gran número de fibras que provienen del cordón posterior. Se divide en una zona dorsal o externa, y en otra ventral o interna, en la que hay menor densidad celular.

La lámina III forma una banda paralela a la I y a la II. Es considerablemente más ancha que las dos anteriores.

Limita con la sustancia blanca solo por la zona medial, ya que el resto está cubierto por la Lámina II. Sus células tienen escasas y cortas prolongaciones basales y largas prolongaciones apicales.

La lámina IV es la más ancha de las descritas. Medialmente limita con la sustancia blanca, pero lateralmente está cubierta por la I, II y III en su conjunto. La morfología del soma celular es a veces redondeado, triangular o estrellado, correspondiéndose con el tamaño de las células, siendo las más pequeñas redondeadas, las intermedias triangulares, y las más grandes estrelladas.

La lámina V se divide en dos zonas, ocupando la porción medial las dos terceras partes de la lámina, y la porción lateral la tercera parte (Fig. 3b). Las células de esta lámina tienen un tamaño y morfología variable. Las de la parte medial son de pequeño tamaño. La apariencia reticulada de la zona lateral de esta lámina, es el resultado del entrecruzamiento de los axones longitudinales mielínicos en dicha zona.

La lámina VI está situada en la base del asta posterior y solo se identifica a nivel de los segmentos cervical y lumbar. Al igual que la V se puede dividir en una zona medial, que representa la tercera parte de la lámina y en otra lateral que representa las dos terceras partes. Al igual que la lámina anterior, la zona medial tiene células más pequeñas y más compactas que la zona lateral.

Al estudiar las láminas del gato hemos podido comprobar que las láminas III, IV y V presentan un espesor similar, con una media de unas 162 micras (Tabla 1), no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre ambas.

Humano

En la especie humana el espesor de cada una de las láminas es superior a la del resto de los mamíferos, excepto la lámina V (Tabla 1). El estudio pormenorizado de los distintos tipos neuronales ha sido reflejado en los trabajos de Schoenen en 1982.

Midiendo la suma de los espesores de las láminas en cada especie animal y en tejido humano (Tabla 1), se comprueba que el asta posterior de la especie humana posee el mayor espesor con 974 micras, mientras que la rata posee un espesor medio de 567 micras.

En nuestro estudio morfométrico, al analizar el número de células por lámina y por corte se ha comprobado con una $p < 0,05$, que es la lámina II la que tiene mayor riqueza celular con respecto a las demás láminas, de forma que la rata posee una media de 256 células, el conejo de 362, el gato de 325 y la especie humana de 374 células (tabla 2).

Así mismo hemos analizado el tamaño celular en las distintas capas y en los diferentes animales y hemos podido observar que éste es muy variable incluso dentro de la misma lámina. En la lámina I de la rata, varía desde 47 micras al cuadrado hasta 100, mientras que en el hombre, va desde 59 hasta 110 micras al cuadrado.

La lámina II es la que menos variación presenta, a pesar de ser la más densamente poblada. En la rata varía de 25 a 50 micras al cuadrado, en el conejo de 44 a 75, en el gato de 23 a 87 y en el hombre de 28 a 47 micras al cuadrado.

El mayor tamaño celular, ha correspondido a la lámina IV en todos los mamíferos, excepto en el conejo, que presenta esta característica en la lámina III. Así en la lámina IV, se han visto células de hasta 393 micras al cuadrado en la rata y 252 en el hombre.

La lámina que más variación presenta en cuanto al tamaño, es la V, que contiene células, desde 47 a 220 micras al cuadrado en la rata, y desde 26 hasta 167 micras al cuadrado en el hombre.

Por último, la medición del perímetro de la médula lumbar, expresado en micras, de cada uno de los animales (Tabla 3), mostró, como se podía esperar, una progresión creciente en relación con el tamaño, edad y peso de los distintos animales.

Este mismo fenómeno, pudo ser comprobado al hacer la medición de las áreas, tanto de la médula como de las astas posteriores. Así podemos decir, que el área de las astas posteriores del humano es mayor que la del gato; la del gato es mayor que la del conejo, y la del conejo mayor que la de la rata, con una $p < 0,05$.

Por último establecimos una relación entre el área del asta posterior y la de la médula espinal en cada animal. El mayor desarrollo de esta relación corresponde al gato, con 0,106 micras al cuadrado, seguido de la especie humana, con 0,092 micras al cuadrado.

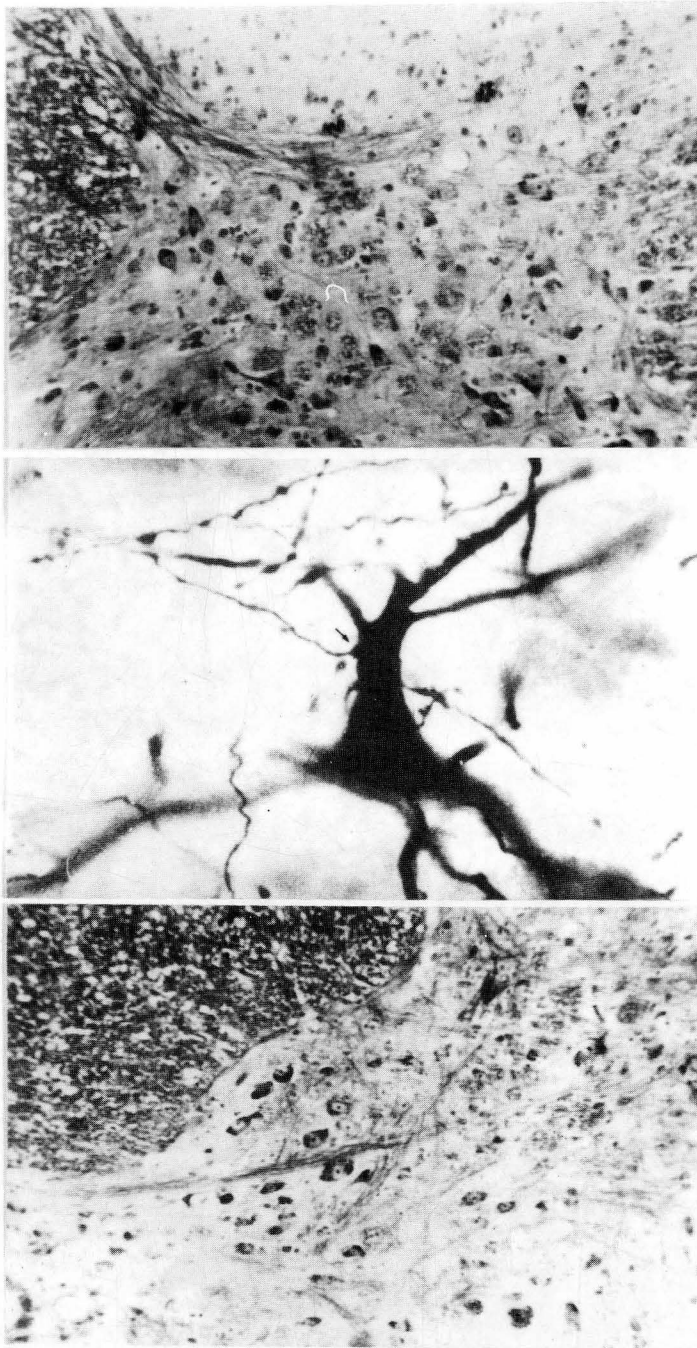


FIGURA 1a. Rata. Médula lumbar. Kluver-Barrera. Haces de fibras en la lámina III. 10 x.

FIGURA 1b. Rata. Médula lumbar. Golgi. Neurona en la lámina IV. Se aprecia un contacto entre un terminal y el soma de la neurona. 40 x.

FIGURA 1c. Rata. Médula lumbar. Kluver-Barrera. Núcleo de Clarke. 25 x.

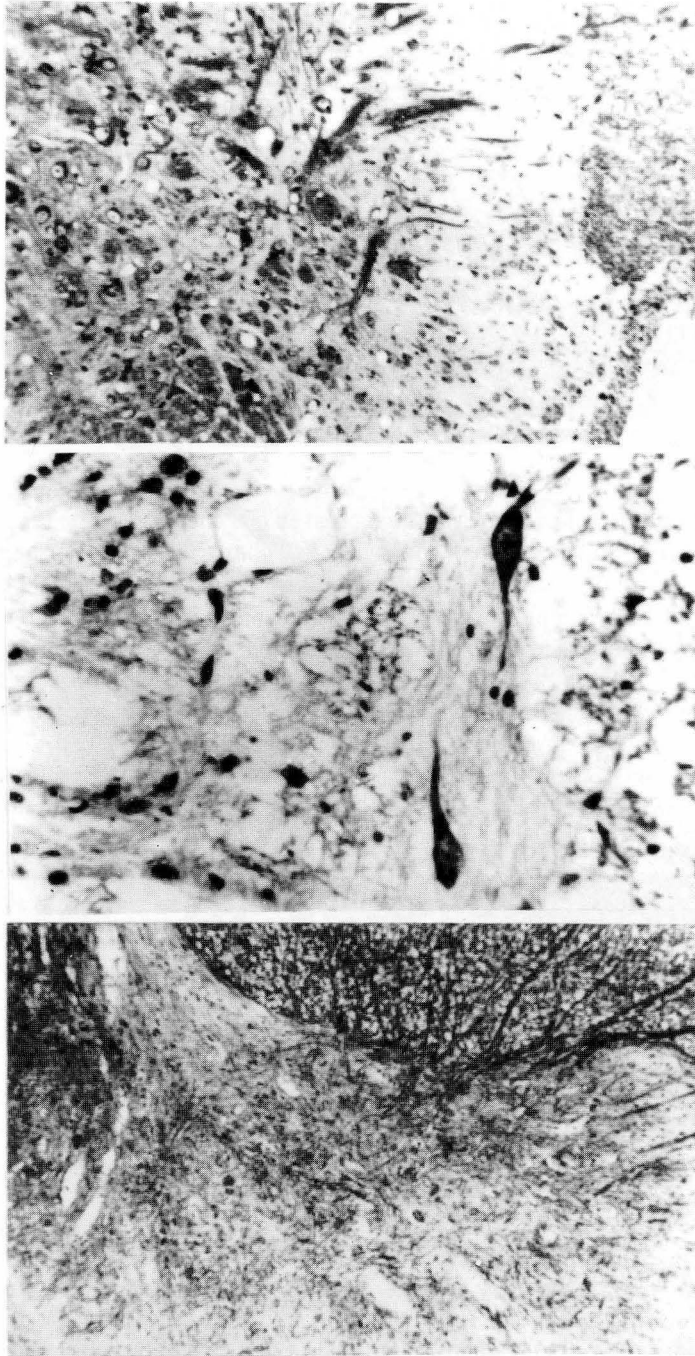


FIGURA 2a. Conejo. Médula lumbar. Kluver-Barrera. Panorámica de la médula espinal. 4,5 x.

FIGURA 3a. Gato. Médula lumbar. Kluver-Barrera. Neuronas horizontales de la lámina I. 25 x.

FIGURA 3b. Gato. Médula lumbar. Kluver-Barrera. Panorámica de la región medial de las astas posteriores. 10 x.

ESPESOR DE CADA LAMINA NUM (1-5)
Y TOTAL NUM (6)
(MICRAS)

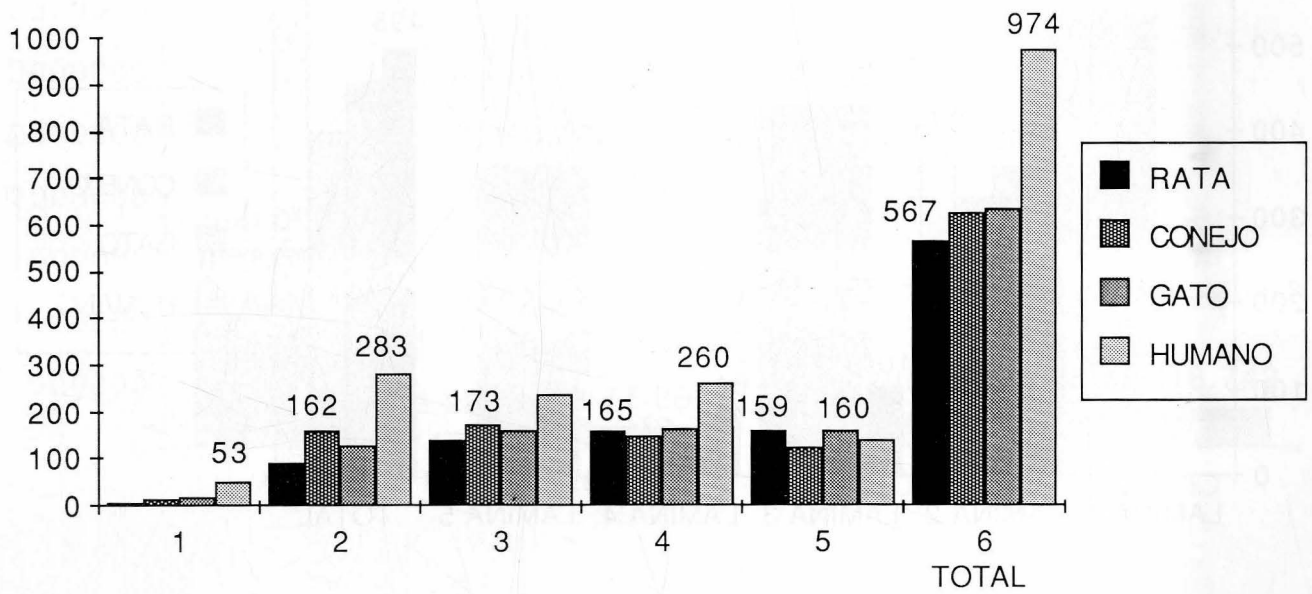


TABLA 1

NUMERO DE CELULAS POR LAMINA /CORTE

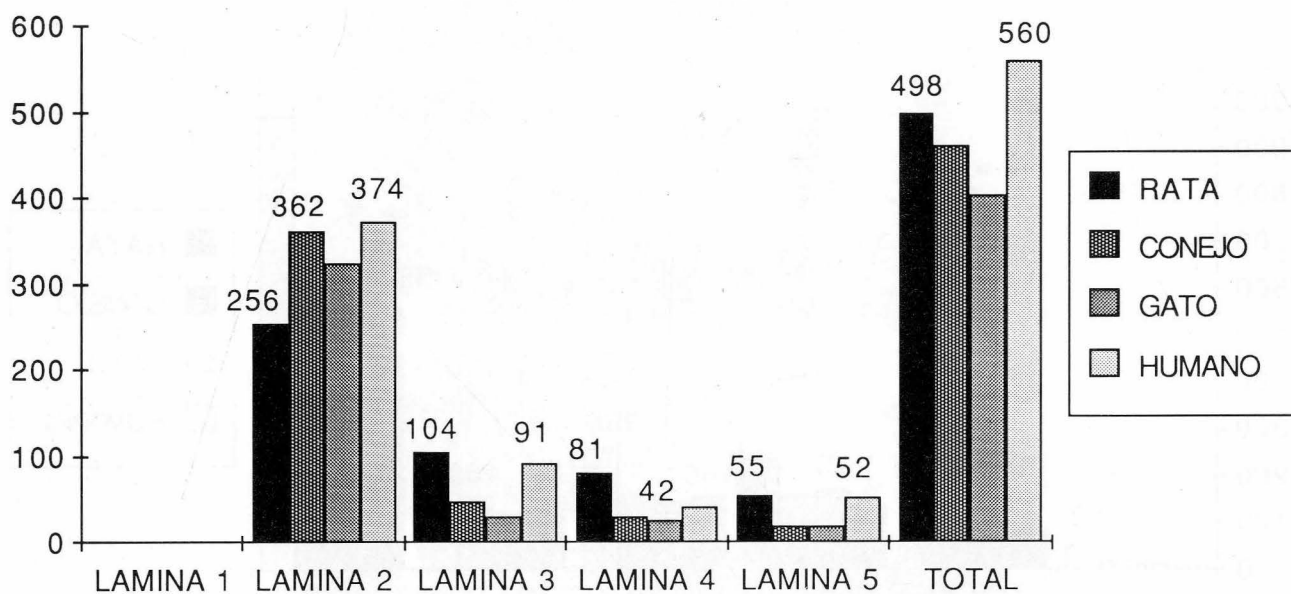


TABLA 2

AREA MEDULA Y AREA DEL ASTA POSTERIOR
(MICRAS)

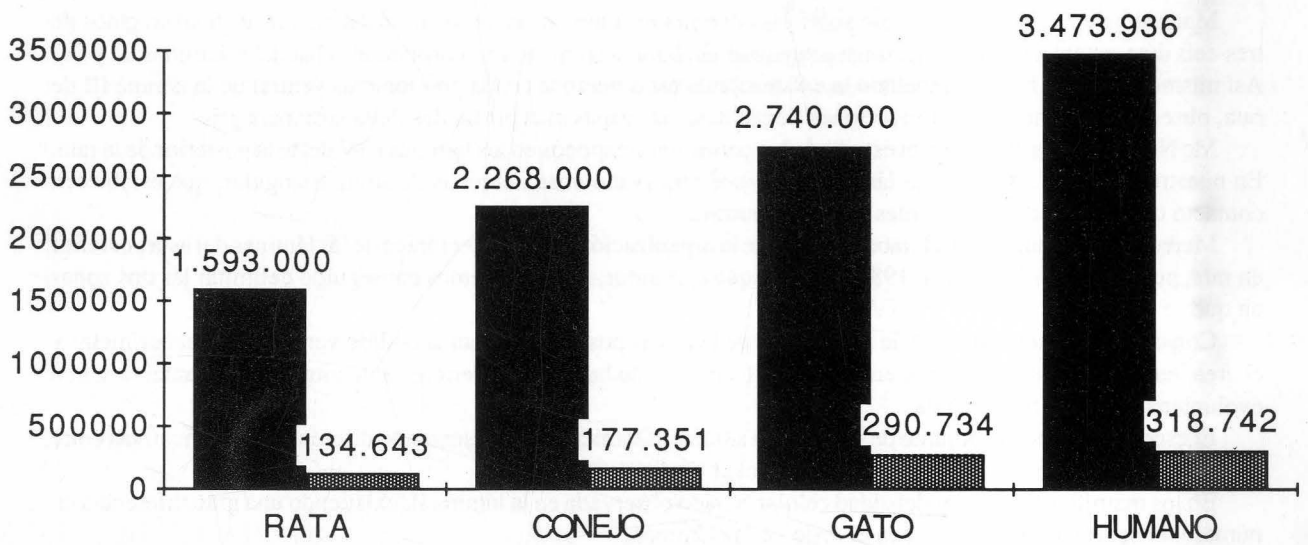


TABLA 3

Discusión

La descripción citoarquitectónica propuesta por Rexed en 1952 y 1954 ha sido seguida en el presente trabajo como una guía aceptada universalmente para el estudio de la médula espinal.

Ralston en 1965 y 1968, y Woolf y Fitzgerald en 1983 analizaron los detalles morfológicos de las láminas I y II de rata, delimitándolas por la diferente orientación de los somas y sus prolongaciones dendríticas.

Todd y Lewis en 1986 reconocen dos tipos neuronales principales en la lámina II de rata, que se distribuyen de forma uniforme a lo largo de toda la lámina. Este fenómeno ha sido analizado en nuestro material, habiendo observado una mayor densidad celular en la porción más dorsal de la lámina, mientras que existe una mayor dispersión en la región ventral. Este hecho lo hemos podido comprobar en todos los animales estudiados.

Los hallazgos microscópicos en relación con los tipos neuronales descritos por Rexed para las láminas del gato, así como los trabajos de Mannen y Sugiura en 1976 en relación con los tipos neuronales de la lámina III del gato, son superponibles a los hallados por nosotros en el presente trabajo.

Szentagothai en 1964 une las láminas II y III de rata para su estudio, ya que considera que ambas tienen una estructura similar e idénticas fibras nerviosas. Esta misma distribución de las fibras nerviosas nos ha servido en nuestro estudio para establecer el límite neto entre las láminas II y III.

Matsushita en 1969, en su estudio sobre las conexiones interneuronales de la sustancia gris espinal en gatos de tres-seis días, establece que las neuronas situadas en la lámina III mandan sus colaterales hacia las láminas III y IV. Así mismo, nosotros hemos apreciado la existencia de estas neuronas en la porción más ventral de la lámina III de rata, observando como sus prolongaciones llegan hasta las capas más profundas de la sustancia gris.

Mc Neill y Chung en 1989 han estudiado los contactos sinápticos en las láminas I-IV del asta posterior de la rata. En nuestro material, a nivel de la lámina IV hemos observado unas neuronas de soma triangular, que establecen contacto con terminales procedentes de otras neuronas.

Merece especial atención, el trabajo acerca de la organización citoarquitectónica de las láminas del asta posterior en rata, publicado por Brichta en 1985. Al igual que este autor, nosotros hemos conseguido delimitar las dos zonas en que se dividen las láminas V y IV.

Con el estudio morfométrico de las láminas de las astas posteriores, hemos podido verificar que el perímetro y el área, tanto de la médula espinal en su conjunto como el de las astas posteriores aumenta progresivamente según evoluciona la escala filogenética.

El espesor medio del conjunto de láminas ha sido de 700 micras, no presentando diferencias significativas entre sí, excepto la especie humana que posee un espesor medio de 974 micras.

En los mamíferos la mayor densidad celular ha sido observada en la lámina II, existiendo una gran diferencia en número de neuronas en relación con el resto de las láminas.

BIBLIOGRAFIA

- ARIENS KAPPERS, C.U.; CARL HUBER, G y CROSBY, E.C. (1967): The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man., **1**: 135-334. Hafner Co. New York .
- BRICHTA, A. M. (1985): Cythoarchitectural organization of the spinal cord. The rat nervous system. **2**: 293-301.
- CAJAL, S.R. (1899): Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados, **1**: 283-350, 473-507. Moya. Madrid
- KLUVER, H. y BARRERA, E. (1953): Method for combined staining of cells and fibers in the nervous system. *Journal neuropath. Exp. Neural.* **12**: 400-403
- KUHLENBECK, J. (1975): The Central Nervous System of Vertebrates. **4**: 95-176.
- LASSEK, A. M. (1936): Comparative volumetric study of the gray and white substance of the spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **62**: 361 -376
- MANNEN, H. y SUGIURA, Y. (1976): Reconstruction of neurons of dorsal horn proper using GOLGI-Stained serial sections. *J. Comp. Neurol.* **168**: 303-312
- MATSUSHITA, M. (1969): Some aspects of the interneuronal connections in cat's spinal gray matter. *J. Comp. Neurol.* **136**: 57-80
- MC CLUNG, J.R. y CASTRO, A.J. (1976): Neuronal organization in the spinal cord of the rat: An analysis of the nine laminar scheme of Rexed. *Anat Rec.* **184**: 474

- MC NEILL, D.L. y CHUNG, K. (1989): Number of synapses in laminae I-IV of the rat dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* **278**: 453-460
- MOLANDER, C. y XU, Q. (1984): The cythoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J. Comp. Neurol.* **280**: 133-141
- RALSTON, H.J. (1965): The organization of the substantia gelatinosa Rolandi in the cat lumbosacral cord. *Z. zellforsch.* **67**: 1-23
- RALSTON, H.J. (1968): The fine structure of neurons in the dorsal horn of the cat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **132**: 275-302
- REXED, B. (1952): The cythoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* **96**: 415-495
- REXED, B. (1954): A cythoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* **100**: 297-379
- SCHOENEN, J. (1982): The dendritic organization of the human spinal cord. The dorsal horn. *Neurosc.* **7**: 2057-2088
- STEINER, T.J. y TURNER, L. M. (1972): Cythoarchitecture of the rat spinal cord. *J. physiol.* **222**: 123-125
- SZENTAGATHAI, J. (1964): Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa Rolandi. *J. Comp. Neurol.* **122**: 219-239
- TODD, A.J. y LEWIS, S.G. (1986): The morphology of GOLGIstained neurons in Lámina II of the rat spinal cord. *J. Anat.* **149**: 113 - 119
- WOOLF, C. J. y FITZGERALD, M. (1983): The properties of neurons recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **221**: 313-328

Correspondencia: S. Ruiz de Aguirre
Departamento de Neurociencias
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea
48940 Leioa. Vizcaya. España

ANATOMIA COMPARADA DEL FORAMEN MAGNUM

COMPARATIVE ANATOMY OF THE FORAMEN MAGNUM

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

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio de anatomía comparada del foramen magnum en una serie de mamíferos (Orangutanes, chimpancés, monos inferiores (Ti-tí), tigres, toros de lidia, caballos, ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, castores y conejos), analizando las características más sobresalientes en cada especie, la relación con estructuras vecinas y la situación del foramen en el conjunto de la base del cráneo.

PALABRAS CLAVE: Foramen magnum. Anatomía comparada. Mamíferos.

SUMMARY

A study of comparative anatomy of the foramen magnum has been carried out, on a series of mammals (Orangoutangs, chimpancees, inferior monkeys (Ti-ti), tigers, fighting bulls, horses, sheep, goats, pigs, dogs, cats, beavers and rabbits), analyzing the most outstanding characteristics of each species, the relation with neighboring structures, and the situation of the foramen in the whole of the base of the cranium.

KEY WORDS: Foramen magnum. Comparative anatomy. Mammals.

Introducción

Al estudiar en un trabajo previo (VELILLAS et al. 1989) las variedades morfológicas del agujero occipital en el hombre, tuvimos ocasión de realizar un estudio comparativo con otras especies de mamíferos observando que, aunque aparecían variaciones individuales, cada eslabón de la escala filogenética poseía un foramen magnum (F.M.) de peculiar morfología. Ciertamente la forma del F.M. viene condicionada por los accidentes anatómicos que le rodean y por la tipología del cráneo en general, y es asimismo muy interesante su progresivo desplazamiento rostral en el conjunto de la organización de la base, a medida que ascendemos en la escala evolutiva.

Material y Métodos

El material del presente estudio lo componen los cráneos de varios museos anatómicos, especialmente el del Dpto. de Anatomía Comparada de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, pertenecientes a las siguientes especies: Orangután (6), chimpancés (11), mono ti-ti (3), tigres (4), toros de lidia (12), caballos (6), cerdos (6), gatos (10), perros (13), ovejas (12), cabras (10), cerdos (10), castores (3), conejos (10) y pollos (6). Los cráneos fueron fotografiados en la zona del F.M. y aledaños, y tomadas las oportunas medidas estandarizando la morfología más frecuente en cada especie y realizando un diseño sintetizador.

Resultados

En sentido topográfico, comprobamos en nuestro estudio el progresivo desplazamiento rostral del F.M. a medida que avanzamos en la escala filogenética, situándose en el hombre en una posición central en la base craneana.

El paso a los simios, supone un desplazamiento franco del agujero occipital en sentido caudal y su morfología en el Orangután (1) es ovalada con franco predominio del diámetro anteroposterior (29 mms.), sobre el transversos (20 mms.), con una gran regularidad en su contorno y con unos cóndilos bien desarrollados pero completamente extraluminares ya que no derforman para nada su silueta.

En el Chimpancé (2), se presenta como claramente visible un agujero occipital del todo redondeado, con un predominio incluso en ocasiones del diámetro transversos (20 mms.) sobre el longitudinal (18 mms.); los contornos de su luz son limpios y gráciles en lo que a su estructura se refiere; los cóndilos son de aspecto ovoideo y están situados muy próximos entre sí por su parte anterior. La lámina ósea occipital es muy fina y en ella se puede apreciar perfectamente su fisura de unión al hueso esfenoides. En el mono «Tití», (3) se aprecia un F.M. de predominio morfológico ovalado, con angulaciones laterales marcadas, que en ciertos casos le proporcionan forma de rombo; sus cóndilos son pequeños y totalmente extraluminares.

El Tigre (4), presenta un agujero occipital prácticamente cuadrilátero de 13 mms. de diámetro longitudinal por 20 mms. de transversos, con una enorme protusión de los cóndilos en su luz, y con la presencia patente de unos grandes tubérculos paracondíleos, para albergar la inserción de la potente musculatura nugal de este gran felino; el borde anterior es grueso y compacto, y la lámina basilar es también muy sólida, fusionándose completamente con la porción vecina del hueso esfenoides.

En el *Toro de Lidia* (5), se aprecia un agujero occipital completamente redondeado, con diámetros longitudinal y transversos de 27 y 31 mms. respectivamente; en el cual destaca la presencia de unos cóndilos ovalados de gran tamaño, de superficie sigmoidea, que enmarcan completamente la luz circunferencial del foramen magnum de esta especie animal, salvo en una pequeña porción de la parte posterior del mismo. En dicha zona, existe una cresta nugal media extraordinariamente vigorosa, determinada por razones muy similares a las aludidas anteriormente, que explican las importantes eminencias óseas existentes en la región occipital de los grandes felinos.

El Caballo (6), presenta un F.M. de situación muy dorsal en su conjunto y de aspecto morfológico cuadrangular, con diámetro longitudinal de 26 mms. y transversos de 31 mms. Se encuentra muy marginado lateralmente por unos cóndilos bastante vigorosos, pero que no obstante, dejan completamente libres los rebordes anterior y posterior del agujero en sí.

En el Perro (7), el F.M. ofrece una morfología irregularmente triangular de base anterior y vértice posterior, con diámetro longitudinal de 10 mms. y transversos de 15 mms. alojado en el seno de un conjunto craneal muy grácil con cóndilos bastante lateralizados, puesto que no protruyen en absoluto dentro de la luz foraminal. En esta especie animal sin embargo hay que destacar que todo varía en mayor o menor medida según las diversas razas de la misma.

El Cerdo (8), posee un agujero occipital de forma romboidea, con diámetro longitudinal de 20 mms. y transversos de 15 mms.; siendo completamente posterior en el cráneo basal, en cuanto a su situación se refiere, y con la existencia de un cóndilo a cada lado especialmente facetado, que en su conjunto marginan mucho el foramen lateralmente.

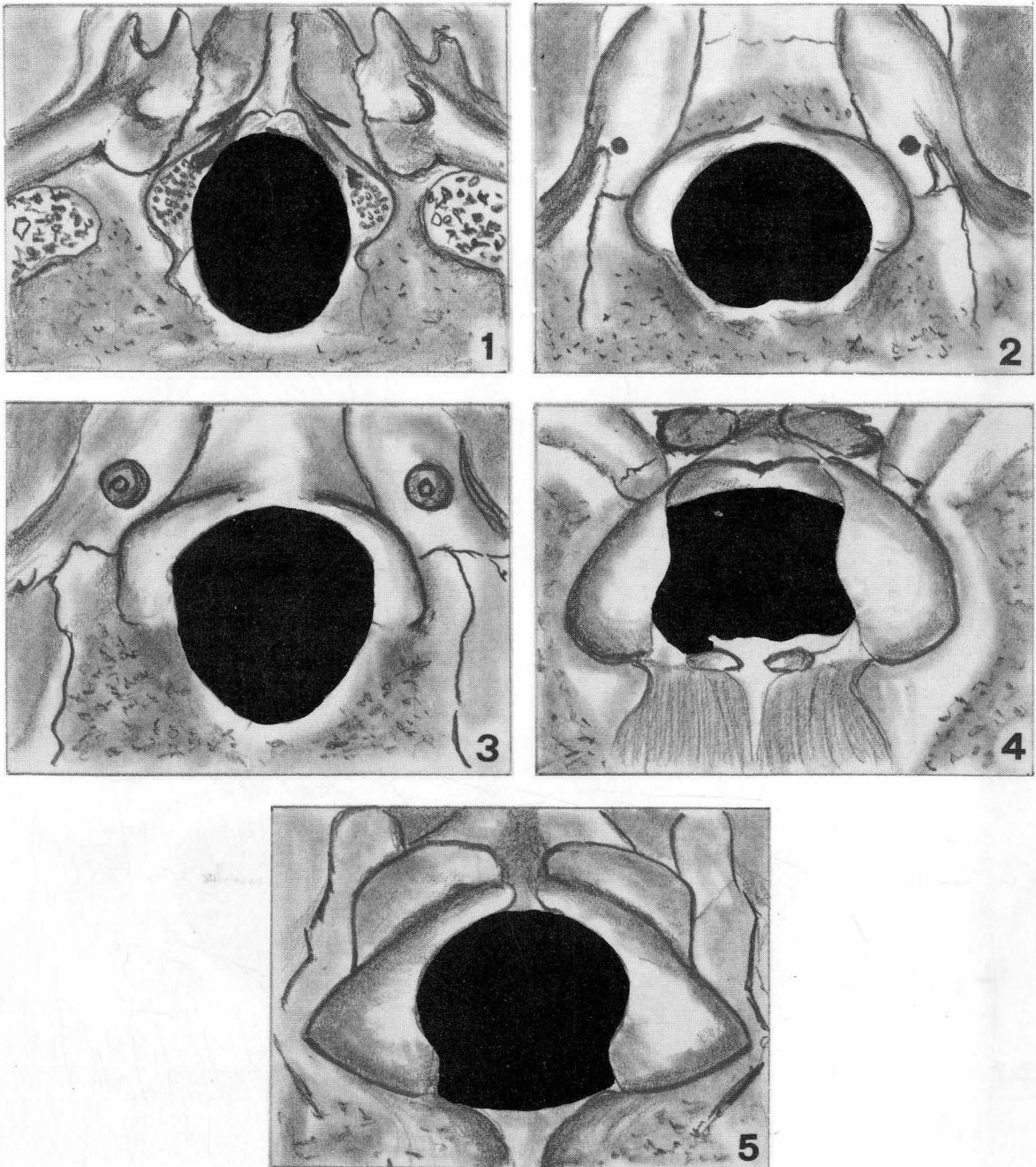


FIGURA 1. Representación esquemática del Foramen Magnum y estructuras adyacentes en las siguientes especies: 1) Orangután, 2) Chimpancé, 3) Mono Ti-Tí, 4) Tigre y 5) Toro de Lidia.

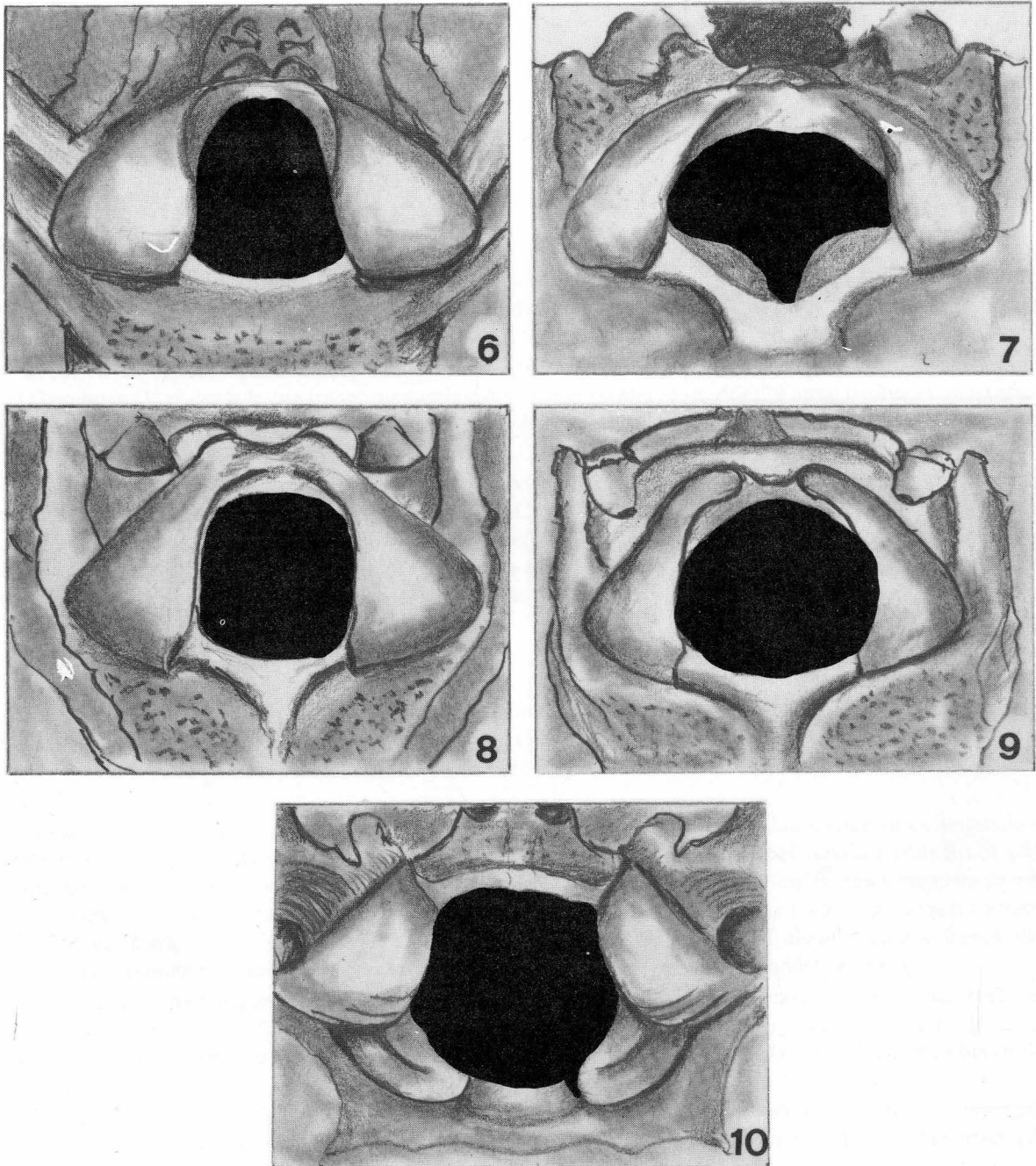


FIGURA 2. Representación esquemática del Foramen Magnum y estructuras adyacentes en las siguientes especies: 6) Caballo, 7) Perro, 8) Cerdo, 9) Oveja y 10) Cabra.

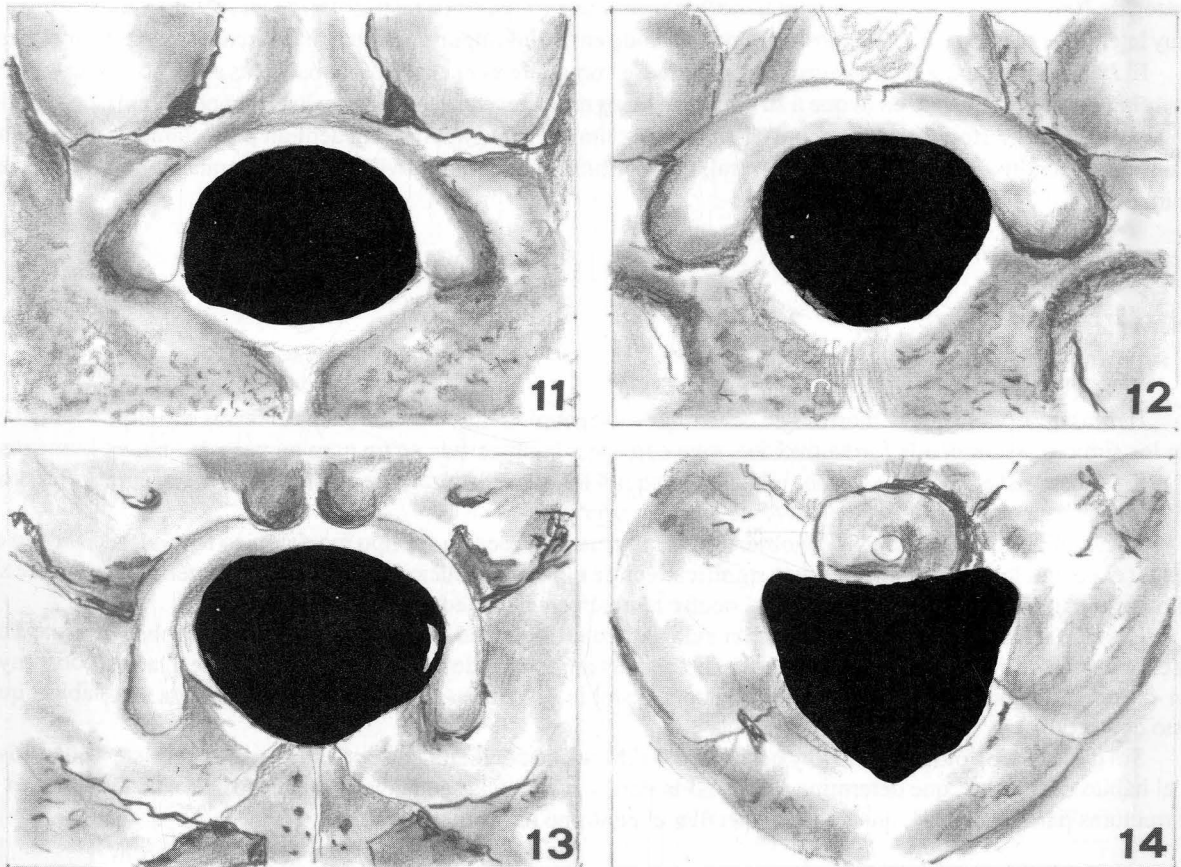


FIGURA 3. Representación esquemática del Foramen Magnum y estructuras adyacentes en las siguientes especies: 11) Gato, 12) Castor, 13) Conejo y 14) Pollo.

En la *Oveja* (9), se aprecia un agujero occipital de morfología cuadrilátera con 13 mms. de diámetro longitudinal por 18 mms. de transverso; siendo los bordes internos condíleos del todo rectilíneos. Su situación es completamente posterior y en conjunto, el tamaño de este foramen es considerable si se le compara al del resto del cráneo y al tamaño somático general.

La *Cabra* (10), deja ver al observador un F.M. muy parecido al anterior, pero algo más redondeado; sus diámetros miden 15 mms. el longitudinal y 18 mms. el transverso, siendo también de destacar, que el margen lateral demarcado por los cóndilos, no es tan rectilíneo como en el caso del animal anterior.

El *Gato* (11), muestra en la base de su cráneo un F.M. perfectamente redondeado, de 10 mms. de diámetro longitudinal por 11 mms. de diámetro transverso, con unos cóndilos occipitales muy amplios y gráciles, situados lateralmente y no protruyentes en absoluto dentro de la luz del mismo; puesto que son muy finos y están desplazados algo hacia fuera.

El *Castor* (12), muestra un F.M. triangular de 12 mms. de diámetro longitudinal por 18 mms. de diámetro transversal, con unos cóndilos muy ventralmente situados y unidos entre sí por su parte anterior. Hay que destacar en este animal que, desde aproximadamente la mitad del contorno del foramen, todo su reborde posterior está libre de todo tipo de estructuras anejas.

El *Conejo* (13), posee en la base de su cráneo un agujero occipital de morfología algo coincidente con la del castor, de 10mm. de diámetro longitudinal por 9 mm. de diámetro transverso: no obstante, sus cóndilos están situados muy lateralmente y son muy delgados, no contribuyendo en medida alguna a enmarcar la circunferencia del foramen.

El *Pollo* (14), tomado por nosotros en este estudio como referencia preliminar hacia las aves, posee un agujero occipital del todo retrasado en lo que a su situación topográfica respecta, de 6 mms. longitud por 7 mms. en sentido transverso, y de morfología plenamente triangular; los límites del agujero se encuentran perfectamente delineados y existe un cóndilo único en posición ventral, que permitiría una gran movilidad cervicocraneal a estas especies animales.

Discusión

Hemos observado que la morfología del foramen magnum es muy variada en las diversas especies estudiadas. En los simios, predomina la forma ovoidea, muy cercana a la observada en un gran número de cráneos humanos.

En los animales de gran tamaño, incluyendo aquí a los depredadores, predomina la forma cuadrangular, con intensa participación condílea y refuerzo del borde posterior.

En aquellos de menor tamaño, se observa una muy clara incidencia del tipo morfológico redondeado, siendo el gato y el conejo los dos exponentes más significativos de ello; circunstancia esta, que curiosamente y a pesar de su enorme separación de la escala filogénica, ocurre también en el cráneo del chimpancé.

Las aves señalan una marcada forma triangular de agujero occipital, con un cóndilo único centrobasal que explica la enorme versatilidad de movimientos que el cráneo del animal puede llegar a conseguir, y que a la vez, constituye un «salto» muy notable determinado sin duda por el cambio de «clase» animal y porqué no de vida y de hábitos que esto conlleva.

Sin duda la morfología, tamaño y posición del F.M. viene condicionada por el desarrollo del sistema nervioso y el hábito del animal, que determina asimismo la dotación muscular de la nuca y la disposición de los cóndilos y estructuras paraforminales, que ayudan a perfilar el contorno del agujero occipital.

BIBLIOGRAFIA

- DEAN, M.C. and WOOD, B.A. (1982): Basicranial anatomy of plio-pleistocen hominids from East and South Africa. *Am. J.Phys. Anthropol.* **59**: 32-39.
- JEASINGH, P.; DUA, S.; ARORA, A.K. and GUPTA, C.D. (1980): Study of epigenetic variants in the Northern Indian crania. *Anthropol. Anz.* **38**: 212-219.

- KEAN, M.R. and HOUGHTON, P. (1982): The polynesian head; growth and form. *J. Anat.* **135**: 423-435.
- LAWRENCE ANGEL, J. A new measure of growth efficiency; skull base height. *Am. J. Phys. Anthropol.* **58**: 297-305.
- MOSS, M.L.; MOSS-SALENTIEN, L.; VILMANN, H, and NEWELL-MORRIS, L. (1982): Neuroskeletal topology of the primate basicranium; its implications for the fetalization hypothesis. *Gegenbaurs morph.* **128**: 58-67.
- PILBEAN, D. (1984): Investigación y Ciencia: origen de los Hominóideos y Homínidos. *Scientific American*. **92**: U.S.A.
- SMITH-VIS, J.H. Growth control of the cranial base: a study with experimentally bipedal female rats. *Anat. Anz.* **154**: 97-110.
- SOLLOW, B. and SARNAS, K.V. (1982): A comparison of the adult Swedish and Danish craniofacial morphology. *Swed. Dent. J. Supplement.* **15**: 229-237.
- SOLOW, B.; BARRETT, M.J. and BROWNT, T. (1982): Craniocervical morphology and posture in Australian aboriginals. *Am. J. Phys. Anthropol.* **59**: 123-1128.
- VAN DRANGELERN W. and DULLEMEIJER, P. (1982): The feeding apparatus of caiman crocodilus; a functional and morphological study. *Anat. Anz.* **151**: 337-366.
- WRIGHT, J.A. (1979): A study of the radiographic anatomy of the foramen magnum in dogs. *J. Small Anim. Pract.* **20**: 501-508.

Correspondencia: R. Sarrat
Dto. Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina
50009 Zaragoza. España

Index

ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; SAN-MOLINA, J.; RUANO-GIL, D.: Ultrastructural study of the glial cells of the Lancisi's nerves in the fighting bull	113
CABALLERO, A.; ESCANERO, J.F.; LOPEZ-NOVOA, J.M.; RODRIGUEZ, S.: Effects of prolonged moderate physical exercise on granulations of mioepithelioid cells	121
CARBAJO-PEREZ, E.; CARBAJO, S.; RUBIO, M.; VAZQUEZ, R.: Cell proliferation in the anterior pituitary: Especial reference to the gonadotrophs	127
MORALES LOPEZ, J.L.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J.G.; LOPEZ RIVERO, J.L.: Effects of training on fibre composition of the vastus lateralis muscle	133
NIETO, J.L.; TAJADA, N.: Cephalofacial growth from birth to 4 years age. Males (I)	141
NIETO, J.L.; TAJADA, N.: Cephalofacial growth from birth to 4 years age. Females (II)	147
PADILLA, F.; BUSTOS, M.; PUERTA, F.: Changes during the embryonic development in the extract trophic capacity that affect the ciliary ganglion neurons	153
PADILLA, F.; PUERTA, F.; BUSTOS, M.: Changes in the neuritic development from the ciliary ganglion neurons due to the age	161
PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ BARRAGAN, L.; AMAT, P.: Ultrastructural study of the hypothalamic paraventricular nucleus of cat. I. Magnocellular neurons	169
PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ BARRAGAN, L.; AMAT, P.: Ultrastructural study of the hypothalamic paraventricular nucleus of cat. II. Glial cells and neuropil	179
PASTOR, F.E.; PELAEZ, B.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; AMAT, P.: Ultrastructural study of the arcuate nucleus of the rat hypothalamus after monosodium glutamate administration	187
SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A.; GONZALEZ, R.; VAZQUEZ, R.: Role of the paraventricular nucleus in the hypothalamic control of the release of corticotropin hormone	199
RUIZ DE AGUIRRE, S.; LOSADA, J.; SARRIA, R.: Comparative morphological morphometrical study of the dorsal horns of the lumbar spinal cord	211
VELILLAS, A.R.; TORRES, A.; SARRAT, R.: Comparative anatomy of the foramen magnum	223

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

ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; SAN-MOLINA, J.; RUANO-GIL, D.: Estudio ultraestructural de las células de la glia de los nervios de Lancisi en el bos taurus raza de lidia	113
CABALLERO, A.; ESCANERO, J.F.; LOPEZ-NOVOA, J.M.; RODRIGUEZ, S.: Efectos del ejercicio físico moderado y prolongado sobre las granulaciones de las células mioepitelioideas	121
CARBAJO-PEREZ, E.; CARBAJO, S.; RUBIO, M.; VAZQUEZ, R.: Proliferación celular en la hipófisis de la rata: especial consideración a las células gonadotropas	127
MORALES LOPEZ, J.L.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J.G.; LOPEZ RIVERO, J.L.: Efectos del entrenamiento sobre la composición fibrilar del músculo vasto lateral	133
NIETO, J.L.; TAJADA, N.: Crecimiento cefalofacial durante los 4 primeros años de la vida. Varones (I)	141
NIETO, J.L.; TAJADA, N.: Crecimiento cefalofacial durante los 4 primeros años de la vida. Hembras (II)	147
PADILLA, F.; BUSTOS, M.; PUERTA, F.: Cambios durante el desarrollo embrionario de la capacidad trófica de extractos que afectan a las neuronas de los ganglios ciliares	153
PADILLA, F.; PUERTA, F.; BUSTOS, M.: Cambios debidos a la edad en el desarrollo neurítico de las neuronas de los ganglios ciliares	161
PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ BARRAGAN, L.; AMAT, P.: Estudio ultraestructural del núcleo paraventricular del hipotálamo del gato. I. Neuronas magnocelulares	169
PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PELAEZ, B.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; MUÑOZ BARRAGAN, L.; AMAT, P.: Estudio ultraestructural del núcleo paraventricular del hipotálamo del gato. II. Células gliales y neuropilo	179
PASTOR, F.E.; PELAEZ, B.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SANCHEZ, A.; ALVAREZ-MORUJO, A.J.; AMAT, P.: Estudio ultraestructural del núcleo arcuato del hipotálamo de rata tras la administración de glutamato monosódico	187
SANCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A.; GONZALEZ, R.; VAZQUEZ, R.: Papel del núcleo paraventricular en el control hipotalámico de la secreción de hormona corticotropa	199
RUIZ DE AGUIRRE, S.; LOSADA, J.; SARRIA, R.: Estudio comparado morfológico y morfométrico de las astas posteriores de la médula espinal lumbar	211
VELILLAS, A.R.; TORRES, A.; SARRAT, R.: Anatomía comparada del foramen magnum	223