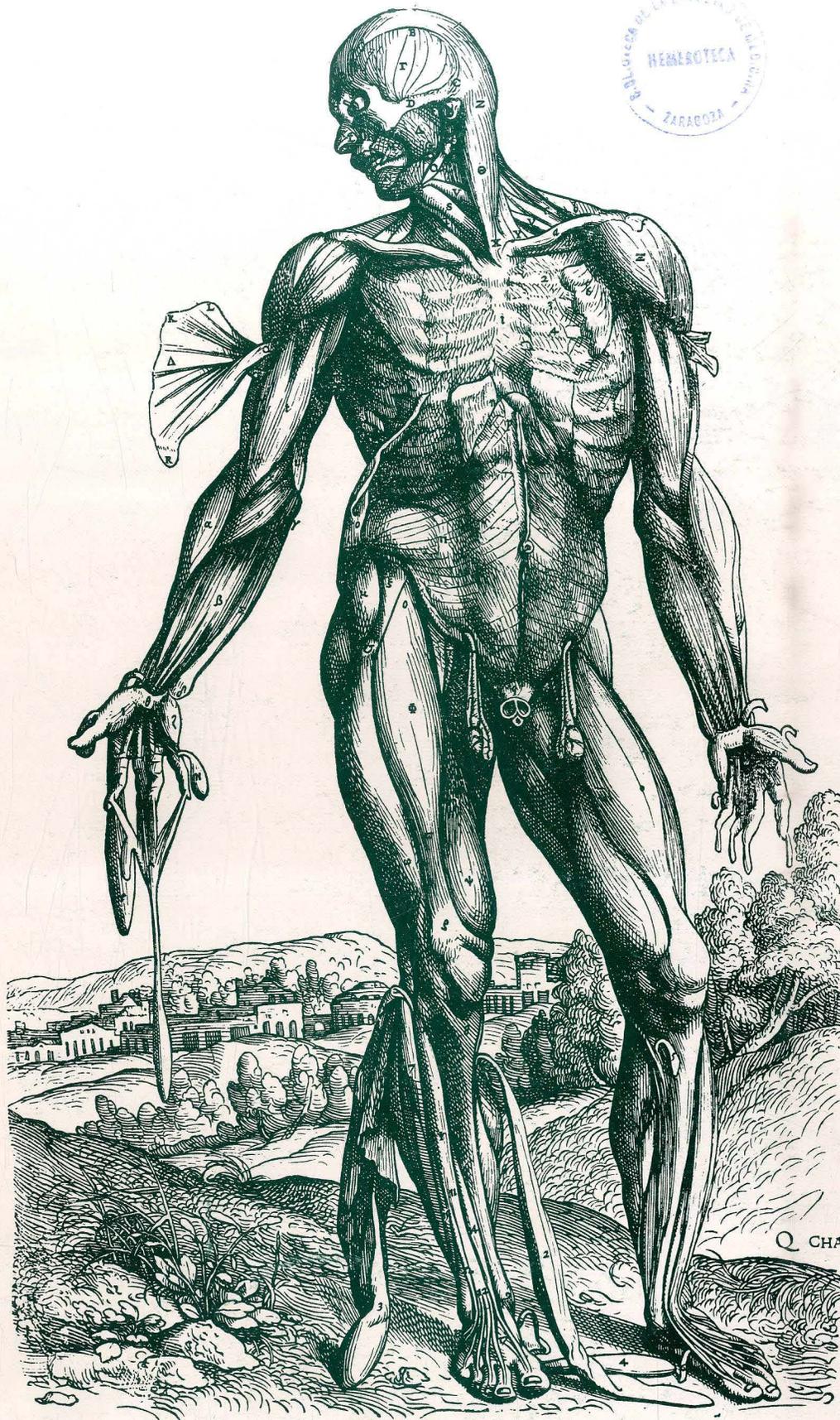


ANAIRES DE ANATOMIA



BIBLIOTECA DE LA ESCUELA DE LA PLAZA DE SAN FRANCISCO
Hemeroteca
ZARAGOZA

04 SET. 1991

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. Múrrillo (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: Calavia Fotocomposición

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 XXXVII

Junio 1991

Núm. 95

04 S.I. 1991



DUPLICACIÓN DE ARTERIAS RENALES

RENAL ARTERIES DUPLICATION

V. ALMENAR GARCÍA, A. MARTÍNEZ-ALMAGRO, M.A. PALOMINO CORTÉS

Unidad de Anatomía Clínica.
Departamento de Ciencias Morfológicas.
Facultad de Medicina.
Valencia.

RESUMEN

Se describe un caso de arteria renal doble, principal y accesoria, en ambos lados procedentes directamente de la aorta, tras el estudio mediante disección de 300 riñones. Se discute asimismo, la gran diferencia entre los hallazgos en la literatura revisada y los expuestos por nosotros.

PALABRAS CLAVE: Doble arteria renal. Arterias renales accesorias. Arterias renales supernumerarias. Variaciones en la vascularización renal.

SUMMARY

It's described one case about double renalis artery, main and accesory, in both sides and they arise from the aorta, after studing three hundred kidneys by means of dissection.

It's discussed too, the great difference between the finding at revised literature and the finding exposed by us.

KEY WORDS: Double renal arteries. Accesory renal arteries. Supernumerary renal arteries. Variations in renal vascularization

Introducción

El aparato renal comienza su desarrollo en la tercera semana de vida intrauterina, estadio 10 de O'Rahilly (10) pasando por las fases de pronefros, mesonefros y metanefros, que queda establecido como sistema renal definitivo hacia la 5.^a semana, involucionando los demás.

En un principio, este riñón embrionario se va a encontrar en una posición pélvica, pero se produce un ascenso renal debido, por una parte, a la disminución de la curvatura corporal y, por otra, al crecimiento a nivel lumbo-sacro, quedando el riñón en posición lumbar definitiva (5).

La vascularización renal procede, fundamentalmente de la aorta abdominal. Cada riñón recibe una arteria renal. La derecha nace del lado derecho de la aorta por debajo del origen de la mesentérica superior; la izquierda, lo hace generalmente un centímetro más arriba y del lado izquierdo de la aorta. Las dos arterias se amoldan a los cuerpos vertebrales y cruzan por delante del psoas antes de penetrar en el riñón. Suelen medir de 3 a 5 cm. de longitud, siendo menor la izquierda. El calibre de las mismas es variable: de 5 a 7 mm. (13), de 6.5 a 6.7 mm. (8), etc.

Recuérdese además, la presencia de un amplio círculo arterial perirrenal formado por las anastomosis de ramas procedentes de: mesentérica superior, mesentérica inferior, genital, capsular media, lumbares, diafragmática inferior, etc.

La presencia de arterias renales accesorias es un hecho suficientemente probado, pero los hallazgos según los autores consultados varían considerablemente. Para Testut, uno de cada cinco riñones normales posee arterias renales accesorias, Abrams afirma que uno de cada quince riñones presenta duplicación de arterias renales y que se da con igual frecuencia en ambos lados aunque no de forma simultánea. Para Gosling por último, un 20% de los individuos presentan arterias renales supernumerarias, aunque sin especificar si estaban o no ligadas a procesos patológicos.

Merklin y Michels, después de practicar unas 185 disecciones, obtienen un 30% de arterias renales con variaciones anatómicas no patológicas, coincidiendo con el porcentaje establecido por Williams, mientras que para Pansky, sólo el 3% de la población muestra variaciones en el número de arterias renales y en la posición de las mismas.

Por métodos angiográficos hemos revisado los siguientes datos: Edsman 21%, Olson encuentra 152 variaciones tras examinar 638 riñones, es decir, un 23.8%, mientras que Meschan describe un 25% de arterias renales múltiples.

Estas arterias renales accesorias tienen unos orígenes notablemente dispares: iliaca interna, iliaca externa, iliaca primitiva, gonadal, frénicas inferiores, etc., presentándose estos orígenes como estrechamente relacionados con riñones isquémicos (1).

Sin embargo, la mayor frecuencia la presentan las arterias renales accesorias que se desprenden directamente de la aorta. La existencia de esas ramas tiene, indudablemente, una explicación embrionaria.

Material y Métodos

Se han diseccionado 150 cadáveres en el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en el periodo comprendido entre los cursos académicos de 1976-77 a 1989-90. Estos cadáveres son los que utilizamos durante los dos primeros cursos de la licenciatura en medicina.

Tras el estudio del retroperitoneo, abordamos el pedículo renal individualizando cada uno de sus elementos constituyentes. Una vez estudiado minuciosamente el conjunto vascular renal, se procede a la apertura del riñón mediante incisión longitudinal que sigue el borde libre del mismo.

A lo largo de estos años, y preocupados por las diferencias establecidas entre los especialistas sobre el tema de duplicación en arterias renales, se han estudiado más de 300 riñones, encontrándonos sólo un caso de duplicación bilateral y que fue descubierto a lo largo del último curso académico.

Al plantearnos la existencia, por primera vez durante tan largo periodo de tiempo, de un caso de arterias renales dobles, se ha procedido a la limpieza y disección de la zona aorto-renal y a la medición de las diversas estructuras vasculares mediante un calibrador tipo pie de rey «metric» para medidas de precisión.

Antes de proceder a la extracción de la pieza en bloque, se fotografió la zona y las arterias con detalle. Luego se ha seccionado la aorta a nivel de su salida por el hiato diafragmático y a un centímetro por encima de la bifurcación en iliacas. Tras desprender mediante corte los distintos pedículos vasculares que se originan de la aorta, se ha llevado la pieza a nuestro laboratorio para un estudio más minucioso.

Resultados

Se descubrió en un varón de raza blanca, de 65 años de edad y con un peso aproximado de 65-70 kgr., una duplicación bilateral de arterias renales (Fig. 1), que presentaba las siguientes características.

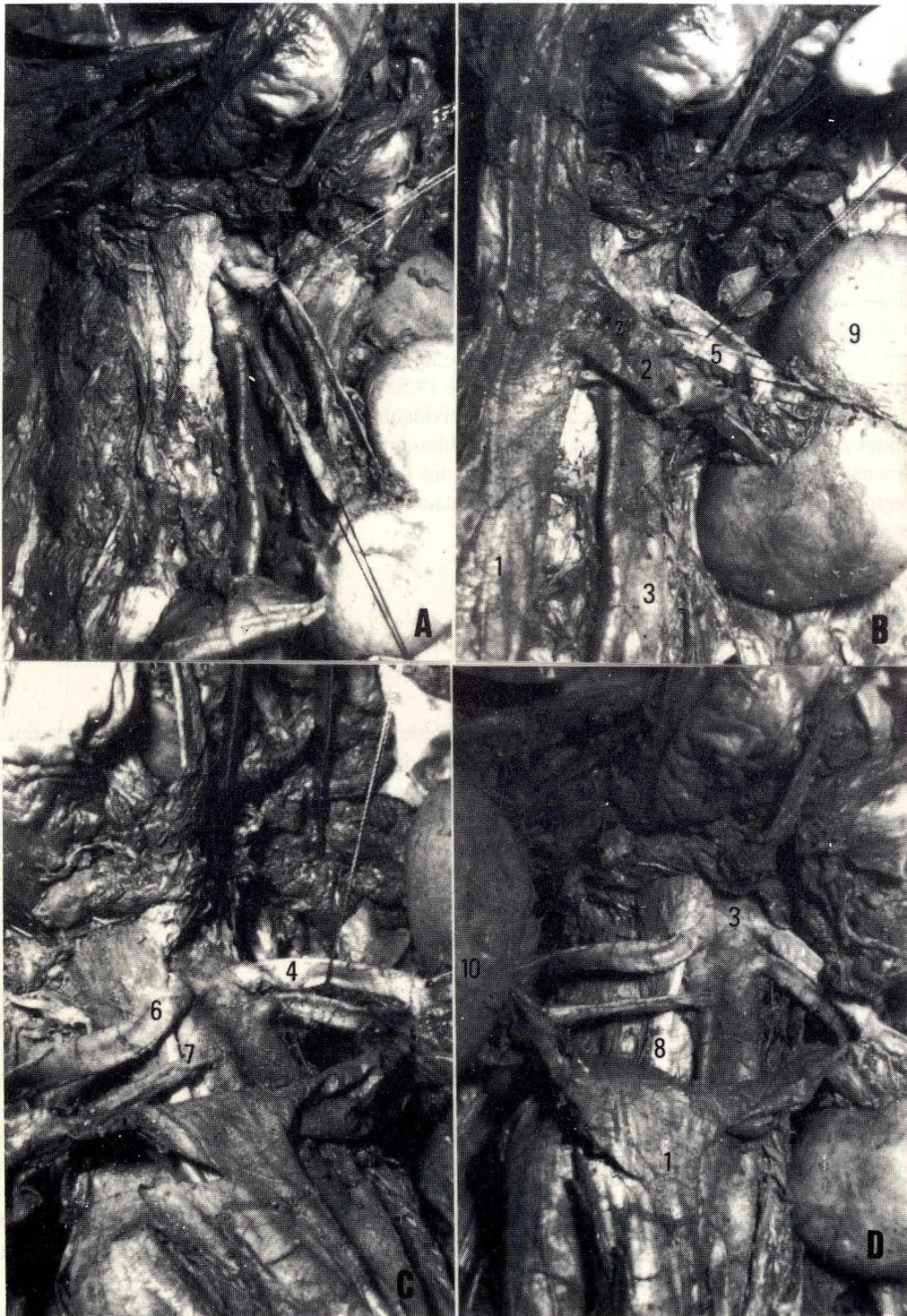


FIGURA 1.- A. Retroperitoneo y detalles de arterias renales izquierdas. B.- Pedículo vascular renal izquierdo. C.- Pedículo vascular renal derecho tras haber seccionado y replgado la vena cava inferior. D.- Visión de conjunto de las arterias renales derechas e izquierdas. 1. Cava inferior. 2. Vena renal izquierda. 3. Aorta. 4. Arteria renal superior izquierda. 5. Arteria renal inferior izquierda. 6. Arteria renal superior derecha. 7. Arteria renal superior derecha. 8. Psoas. 9. Riñón izquierdo. 10. Riñón derecho.

En el lado derecho hay una arteria renal principal cuyo diámetro es de 4.8 mm. y una arteria renal accesoria, situada por debajo de la anterior y a 10.2 mm. de distancia, siendo su diámetro de 2 mm.

En el lado izquierdo la disposición es similar, ya que hay una arteria renal principal, cuyo diámetro es de 5.3 mm. y una accesoria de 3.7 mm., situada también por debajo de la anterior y a 4.5 mm. de distancia.

Cabe destacar que el riñón izquierdo recibe una mayor vascularización directa de la aorta que el del lado derecho, que no se ha apreciado ningún otro vaso en ambos hilios aparte de los descritos, que ambos riñones no presentaban variaciones significativas de tamaño y que no eran asiento de patología alguna, dato que se confirmó tras la correspondiente prueba pericial anatomo-patológica.

En su trayecto hacia cada riñón, las arterias discurren paralelas y con una angulación, con respecto a la aorta, muy similar en ambos lados. Es de destacar que las dos arterias renales principales se dividen en cuatro ramas en el interior del riñón, mientras que las accesorias se bifurcan en dos.

El diámetro que presentaba la aorta a nivel del origen de las arterias renales ha sido de 40.2 mm.; la distancia entre arteria mesentérica superior y arteria renal derecha, de 19.5 mm., y la misma en el lado izquierdo, de 10.4 mm.

Con relación a los demás troncos vasculares, se individualizó el tronco celiaco comprobándose la ausencia de variaciones anatómicas, siendo asimismo normales ambas arterias mesentéricas.

Finalmente se examinó el ligamento arqueado medio del diafragma, apareciendo totalmente normal. La distancia entre el punto más alto del LAM y el origen de la arteria renal superior derecha ha sido de 26.4 mm. y la del lado izquierdo, de 12.5 mm.

Discusión

Nuestro porcentaje de hallazgos de arterias renales dobles que nacen directamente de la aorta durante estos últimos años, ha sido mucho más bajo que la media publicada por otros autores, ya que no llega ni al 1%. Cabe destacar que aunque nosotros no tengamos resultados altos, en el Servicio de Radiodiagnóstico de nuestro Hospital Clínico Universitario, los casos son algo más frecuentes.

Pero esa diferencia entre los hallazgos por método disectivo y angiográfico, tampoco se mantiene en los trabajos y autores consultados.

En este sentido, Lippert y Pabst encuentran un 22% de casos de arterias renales dobles, siendo el 10% de las características descritas por nosotros. Aunque los datos aportados por Fourman y Moffat difieren de los anteriores, están a mucha distancia todavía de los nuestros.

Posiblemente el factor más importante que hace que en la sala de disección se ven tan pocos casos y por el contrario, tantos en los servicios radiológicos, sea la búsqueda específica en estos últimos, sobre pacientes con patología renal.

Por otra parte, estamos viendo si la situación geográfica podría ser un factor determinante o al menos con alguna incidencia. A este respecto habrá de tenerse en cuenta, que los cadáveres cuyos riñones han sido estudiados, proceden en su mayor parte de la Comunidad valenciana, un pequeño porcentaje que situamos sobre el 6%, de Centroeuropa, mientras que el 8% restante es originario de otros lugares de la geografía peninsular española.

Destacar finalmente, que aunque la patología renal que se observa en los cadáveres estudiados es frecuente y diversa, ello no ha significado una variación del árbol arterial, ya que el caso que describimos ha aparecido, precisamente, en un espécimen con ambos riñones normales.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS, K.L. (1971): *Angiography*. 2. th.ed. Little Brown and Co. Boston.
EDSMAN, G. (1957): Angiography and suprarenal angiography. *Acta Radiol. Stockolm.* **155**: 1-18.

- FOURMAN, J. and MOFFAT, D.B. (1971): *The blood vessels of the kidney*. Blackwell. Oxford.
- GOLSLING, J.A. y DIXON, S.J. (1984): *Atlas fotográfico de anatomía funcional del tracto urinario*. Ed. Doyma. Barcelona.
- LANGMAN, J. (1982): *Embriología médica*. 4.^a ed. Panamericana. Buenos Aires.
- LIPPERT, H. and PABST, R. (1985): *Arterial variations in man*. J.F. Bergmann Verlag. München.
- MERKLIN, R.J. and MICHELS, N.A. (1958): The variant renal and suprarenal blood supply with data on the inferior phrenic, ureteral and gonadal arteries: a statistical analysis based, on 185 dissections and review of literature. *J.Int.Coll.Surg.*, **29**: 41-76.
- MESCHAN, I. (1975): *An Atlas of Anatomy basic to radiology*. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- OLSON, L. (1971): Variations in renal blood supply in H.L. Abrams. *Angiography*. 2th.ed. Little Brown Co. Boston.
- O'RAHILLY, R. (1985): *A color atlas of human embryology*. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- PANSKY, B. (1985): *Embriología médica*. Panamericana. Buenos Aires.
- PICK, J.W. and ANSON, B.J. (1940): Renal vascular pedicle. Anatomical study of 430 body-halves. *J.Urol.Baltimore* **44**: 411-434.
- TESTUT, L. y LATARJET, A. (1976): *Tratado de Anatomía Humana*. 8.^a ed. Salvat Editores, S.A. Barcelona.
- WILLIAMS, P.L. Y WARWICK, R. (1985): *Anatomía de Gray*. Salvat Editores, S.A. Barcelona.

Correspondencia: Dr. V.Almenar García
Unidad de Anatomía Clínica
Depto. Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina
Valencia. España.

MALFORMACIONES CONGÉNITAS MÚLTIPLES ASOCIADAS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS DE CUATRO CASOS

ASSOCIATED MULTIPLE CONGENITAL MALFORMATIONS IN DOMESTIC ANIMALS. CONTRIBUTION OF FOUR CASES

J. CAMON, D. SABATÉ, J. FRANCH, M.A. LOPEZ-BÉJAR, J. PASTOR, J. RUTLLANT, J. ORDEIG, E. DEGOLLADA Y J. VERDU

Unidad Docente de Anatomía y Embriología. Facultad de Veterinaria.
Universidad Autónoma de Barcelona

RESUMEN

La incidencia y el significado de la aparición de varias malformaciones congénitas asociadas en el mismo individuo han sido poco estudiados en medicina veterinaria. En este trabajo se describen las malformaciones presentes en cuatro animales pertenecientes a tres especies distintas y se discuten las posibles razones de la asociación de estas anomalías desde el punto de vista de la medicina comparada. Todos los animales presentaban dos o más malformaciones, constituyendo síndromes teratológicos no previamente descritos, al menos en estas especies, denominados «de modelo único» y hasta ahora no reconocidos. Un cerdo presentaba un conjunto de anomalías craneofaciales calificable como «síndrome del primer arco», junto con un meningocele occípito-parietal. Otro miembro de la especie porcina mostraba holoprosencefalia con ciclopía, varias anomalías en la extremidad anterior izquierda y un amplio onfalocele. Se describen también un gato dicefálico con rachisquisis y mielosquisis cervicales y un perro con espina bífida, cola retorcida y atresia anal.

PALABRAS CLAVE: Malformaciones congénitas múltiples asociadas. Síndromes de malformaciones de modelo único. Animales domésticos

SUMMARY

The incidence and significance of the appearance of various associated congenital malformations in a single individual have received poor attention in veterinary medicine. In this article, the malformations exhibited by four animals pertaining to three different animal species are described, and the possible reasons for the association of these anomalies are discussed from the viewpoint of the comparative medicine. All four animal showed two or three malformations constituting unrecognized teratological syndromes, so-called one-of-a-kind syndromes, which have not previously been described, at least in these particular animal species. A pig was affected by a series of craniofacial anomalies consisting in a «first arch syndrome» together with an occipito-parietal meningocele. Another member of the porcine species showed holoprosencephaly with cyclopia, various defects un the left front limb and an extensive onfalocele. A dicephalic cat with cervical rachischisis and myeloschisis, and a dog exhibiting spina bifida, curled tail and atresia ani are also described.

KEY WORDS: Associated multiple congenital malformations. One-of-a-kind syndromes of malformations. Domestic animals

Introducción

Algunas malformaciones congénitas pueden presentarse, tanto en el hombre como en los animales domésticos, bien aisladamente en un individuo o bien simultáneamente o de forma asociada en un mismo

individuo. En este contexto, se denominan síndromes a las agrupaciones de un cierto número de malformaciones características y anatómicamente definidas, que se presentan asociadas en un mismo individuo (Källén y Winberg, 1969). No obstante, la forma de presentación de las distintas malformaciones que constituyen un síndrome teratológico, referida a su número e intensidad, no es siempre constante; de tal manera que en unos individuos el síndrome aparece completo, pero en otros lo hace de forma incompleta. Esta variabilidad en la presentación de algunos síndromes teratológicos ha supuesto un importante obstáculo para su identificación clara y precisa. Un buen ejemplo de esa variabilidad y de la dificultad de identificación de estos síndromes, derivada también del hecho de que muchos de ellos además han sido interpretados por el estudio de un número limitado de casos observados personalmente por los distintos autores, lo constituyen las siete u ocho formas de alteración del desarrollo craneofacial, previamente descritas en la especie humana como entidades independientes y finalmente agrupadas por McKenzie (1958, 1966) como «síndrome del primer arco».

Por diversas razones, entre las que destacan las de carácter epidemiológico y etiológico, el estudio de los síndromes de malformaciones congénitas asociadas ha interesado desde hace tiempo en medicina humana (Leck et al., 1968; Källén y Winberg, 1969; Roberts y Powell, 1975; Leck, 1975; Cohen, 1976; Evans y Polani, 1980; Cohen y Lemire, 1982). Sin embargo, sus causas y sus implicaciones biológicas resultan en gran parte desconocidas y, a la vez, son materia de enconada controversia (Roberts y Powell, 1975; Leck, 1975; Kleinebrecht y Degenhardt, 1975; Evans y Polani, 1980).

En medicina veterinaria, el número de síndromes teratológicos bien definidos es relativamente escaso (Noden y De Lahunta, 1985; Szabo, 1989). Dada la variedad de especies animales domésticas y sus formas y características de vida, las tres causas principalmente productoras de malformaciones congénitas les afectan de forma muy diversa. Así, son los carnívoros (perro y gato) los más afectados por síndromes teratológicos de origen genético (Foley et al., 1979; Hámori, 1983), mientras que los trastornos ocasionados por sustancias teratogénicas naturales afectan principalmente a los herbívoros (Keeler et al., 1978; Keeler, 1988). Por último, se conocen en Veterinaria al menos doce virus distintos que producen malformaciones congénitas aisladamente o en varias de entre ocho especies animales de mamíferos (véase una revisión en Noden y De Lahunta, 1985). No obstante, y dada la diversidad de especies, los estudios realizados en los animales domésticos sobre las formas de asociación entre distintas malformaciones en un mismo individuo son muy pocos (Priester et al., 1970; Dennis, 1975a; Saperstein et al., 1975; Selby et al., 1971), probablemente porque siguen siendo ciertas las afirmaciones de Leopold et al. (1983), cuando señalan que en Veterinaria la información sobre malformaciones congénitas es todavía inadecuada por disponer de la descripción de aun demasiado pocos casos y por no haberse conseguido un interés suficiente por la integración de los procesos subyacentes de naturaleza embriológica, anatómica, patológica y genética en el estudio de las malformaciones congénitas.

En este trabajo se describen cuatro casos, pertenecientes a tres especies animales distintas, de individuos afectados por dos o más malformaciones congénitas que aparecieron de forma espontánea y concurrente en el mismo animal y se discuten las posibles razones de la presentación asociada de estas anomalías.

Material y Métodos

Dos hembras de la especie porcina, una que murió a las pocas horas de nacer (caso n.º 1) y otra que nació muerta (caso n.º 2), de raza híbrida por cruce industrial Landrace x Large White, procedentes de explotaciones comerciales distintas de la provincia de Barcelona y pertenecientes a camadas aparentemente normales y sin historia clínica previa, en ambas explotaciones, de presentación de malformaciones congénitas abundantes ni de carácter grave, fueron presentadas en fresco en nuestro laboratorio. Un gato dicéfalo (caso n.º 3), de raza mestiza y sexo masculino, nacido muerto por operación cesárea debida a un parto distócico que se había prolongado casi 24 horas, único miembro de la camada, se mantuvo congelado en un frigorífico y fue presentado al cabo de una semana. Un perro recién nacido (caso n.º 4), de raza Dobermann, miembro de una camada de animales normales, de sexo masculino, nacido de padres inscritos en el libro de registro de la raza que presentaban una historia clínica previa normal, fue llevado a consulta a una clínica veterinaria de la provincia de Barcelona por mostrar

síntomas de parálisis en las extremidades posteriores. Durante la exploración clínica se descubrió la presencia de una espina bífida lumbosacra con defecto de piel y exposición de la médula espinal, decidiendo el propietario la eutanasia del animal.

Los animales fueron inspeccionados y fotografiados a su recepción e inmediatamente después fueron fijados por inmersión el gato y el perro y por perfusión a través de los vasos del cordón umbilical las dos hembras porcinas, en todos los casos con una solución de formol al 10%, de alcohol de 96° al 5% y fenol al 2%, siendo sumergidos posteriormente en la misma solución. Una vez fijados, se realizaron radiografías de baja intensidad en los cuatro animales. Se practicó una disección completa del gato dicéfalo y en los otros animales se llevó a cabo una disección somera de las regiones anatómicas malformadas y una necropsia del reto del cadáver. Se tomaron fotografías seriadas y se realizaron dibujos esquemáticos de las disecciones realizadas.

Resultados

Caso n.º 1 (Figs. 1a, b). El animal nació vivo a término y poco antes de morir se mostraba en decúbito lateral, incapaz de incorporarse, con movimientos incoordinados de las extremidades, con tendencia a mantener la boca abierta y con dificultades para cerrarla haciendo la lengua ligera protrusión fuera de la cavidad oral. El animal acusaba sensibilidad táctil y dolorosa, pero no respondía a estímulos acústicos. Externamente, el animal presenta la rima oris considerablemente aumentada, de tal manera que las comisuras labiales, simétricamente dispuestas, llegan a quedar situadas a nivel del límite caudal de la orofaringe (macrostomía). Existe micrognatia mandibular con falta de articulación témporo-mandibular, de tal forma que la mandíbula resulta ampliamente móvil y fácilmente desplazable en todos los sentidos. Los pabellones auriculares están malformados, reducidos de tamaño y situados bastante más ventralmente de lo normal. Destaca en ambos lados la ausencia de membrana timpánica. No obstante, se observa la presencia de sendos conductos que comunican directamente el exterior con la faringe, tratándose probablemente de una comunicación directa de los conductos auditivos externos con las trompas faringotimpánicas anómalas. El orificio faríngeo de cada una de las dos trompas es amplio, irregular y anfractuoso, situado también anómalamente, lateralmente a ambos lados a nivel de la raíz de la lengua, por tanto, mucho más ventralmente de lo normal (Fig. 1b). En la cavidad oral existe una palatosquisis que afecta a los huesos palatinos y maxilares; sólo resta la porción incisiva del paladar con la papila incisiva. La mucosa del resto del techo de la cavidad oral presenta las crestas palatinas características. El paladar blando está ausente, pero existen tonsilas palatinas. La laringe aparece normal. Los párpados son de tamaño considerable, el inferior de cada lado ligeramente edematoso y se aprecia ligera microftalmia bilateral. Hasta aquí, el conjunto de anomalías craneofaciales observadas en este animal de la especie porcina es, probablemente, compatible con las correspondientes a las descritas en medicina humana bajo la denominación genérica de «síndrome del primer arco» (McKenzie, 1958, 1966) y, más en concreto, dentro de este amplio síndrome, con la entidad denominada síndrome de Treacher Collins (Collins, 1900) y sus posteriores redefiniciones (véase McKenzie, 1958).

Además de las anomalías mencionadas, este animal presentaba también en la región dorsal de la cabeza una craneosquisis a nivel occípito-interparietal, por la que hacía protusión y se continuaba con la piel una vesícula meníngea de aspecto piriforme, de 6 cm. de largo, de la que partía caudalmente un amplio divertículo de 39 cm. de largo. Ambas vesículas formaban un destacado meningocele, cuyas paredes presentaban un aspecto congestivo y cuyo contenido era ser-sanguinolento (Fig. 1a).

Caso n.º 2 (Figs. 2a, b). Este segundo animal de la especie porcina nació muerto y con aspecto fetal, a pesar de que sus compañeros de camada nacieron vivos y a término. Presenta a la vez tres tipos distintos de malformaciones congénitas. En la cabeza destaca la presencia de una ciclopia como forma más intensa de holoprosencefalia, que en este caso consiste en la existencia de una sola órbita central que aloja un único ojo de considerable tamaño y aspecto congestivo. Los párpados son inexistentes. La cavidad nasal no existe como tal, pero está representada por una probóscide de consistencia blanda, de 3,5 cm. de longitud y 1,2 cm. de anchura. En su extremo libre presenta un ensanchamiento equivalente al plano rostral (jeta) característico de los suidos, en cuyo centro existe un solo orificio nasal que da paso a un conducto ciego. Ventralmente al ojo, los dos procesos

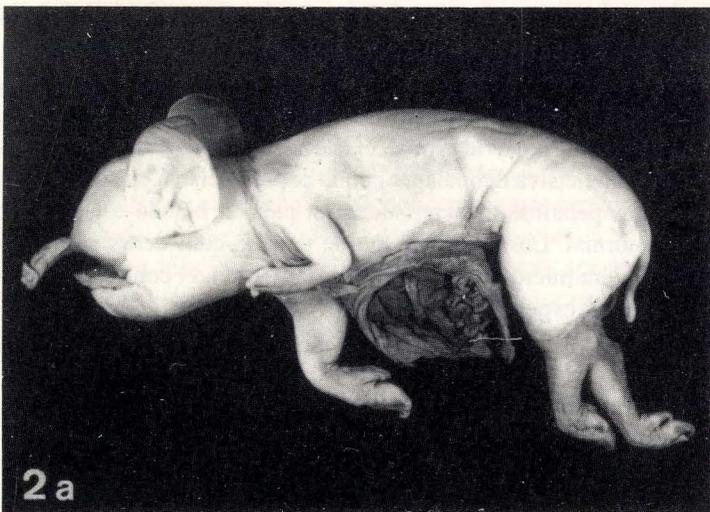
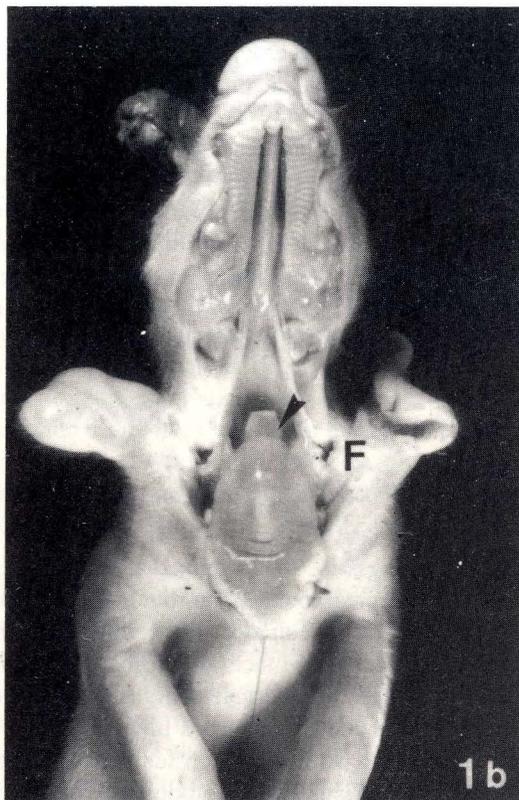


FIGURA 1A. Caso n.º 1. Cerdo recién nacido a término. Obsérvese la macrostomía, posición ventral del pabellón auricular y las vesículas que forman un amplio meningocele. Está presente el cordón umbilical.

FIGURA 1B. Caso n.º 1. Cavidades oral y faríngea. Palatosquisis. Epiglotis (flecha). Orificios anómalos de las trompas faringotimpánicas (F).

FIGURA 2A. Caso n.º 2. Cerdo nacido muerto prematuramente; obsérvese la inmadurez de las pezuñas. Holoprosencefalia con probóscide, ciclopía a hipoplasia maxilar. La extremidad anterior izquierda presenta falta de rotación, focomelia y artrogriposis carpiana. Onfalocelo con hernia hepática, gástrica, esplénica y yeyunal.

FIGURA 2B. Caso n.º 2. Vista anterior de la cabeza, que presenta una destacada probóscide frontal, ciclopía con congestión ocular, ausencia de párpados, hipoplasia de los procesos maxilares y ligera macroglosia.

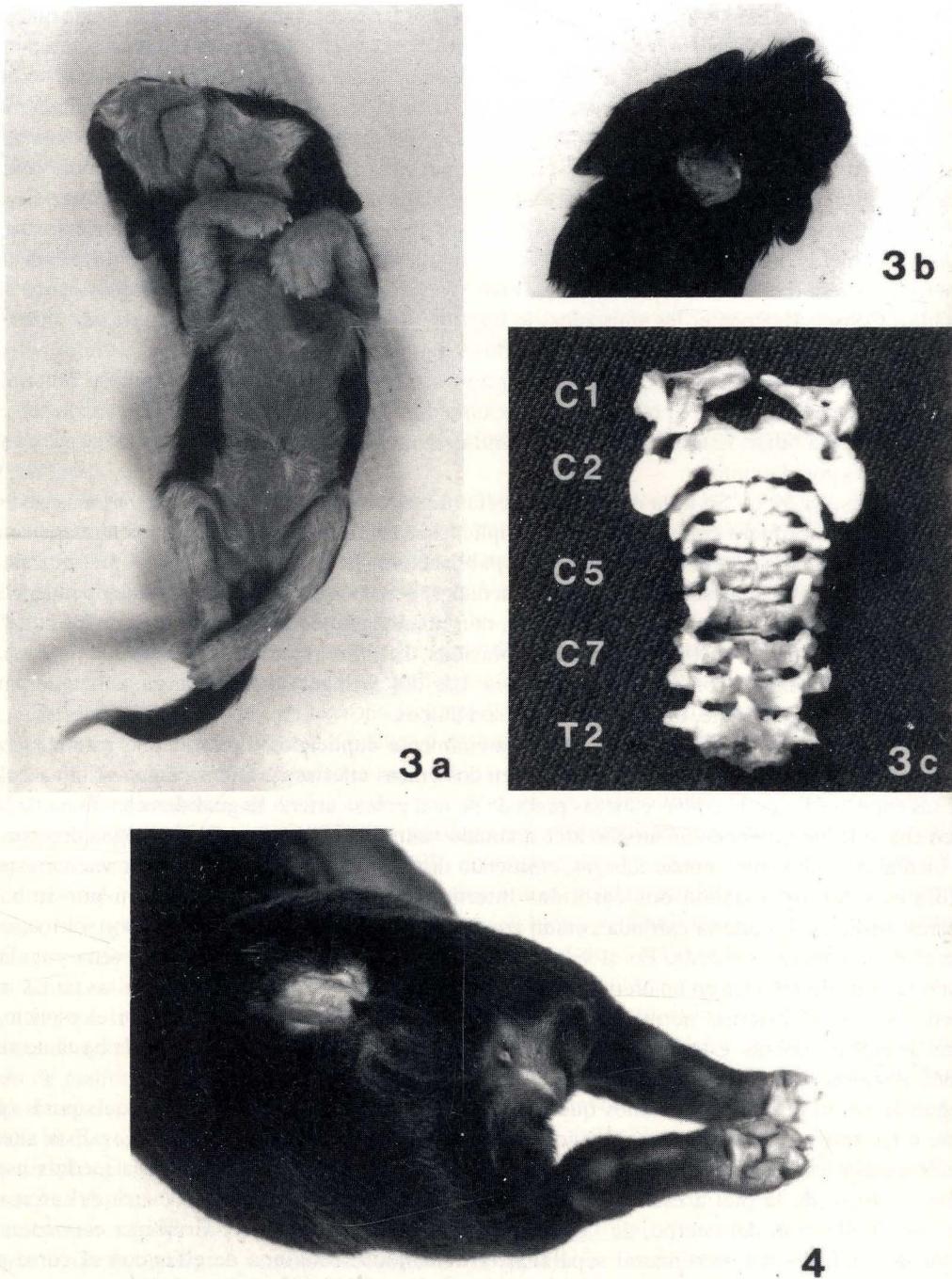


FIGURA 3A. Caso n.º 3. Gato dicéfalo en decúbito dorsal nacido por cesárea y estado de desarrollo a término.

FIGURA 3B. Caso n.º 3. Gato dicéfalo en decúbito ventral. Obsérvese la raquisquis cervical con exposición del tejido neural.

FIGURA 3C. Caso n.º 3. Vista dorsal de la vértebras C1 a T2. Obsérvese la separación de las mitades derecha e izquierda del arco neural del atlas, la duplicación de los cuerpos vertebrales en C2 a C5 y la falta de cierre de los arcos vertebrales en todas las vértebras cervicales. Las vértebras T1 y T2 son normales.

FIGURA 4. Caso n.º 4. Perro de 1 día. Espina bífida lumbosacra y cola retorcida asociadas con atresia anal. Un pliegue de piel se encuentra ocupando el lugar del orificio anal.

maxilares rudimentarios se hallan fusionados en la línea media. La mandíbula aparece bien desarrollada, al igual que la lengua. La rima oris resulta anómala por falta de correspondencia y superposición de sus componentes.

El segundo grupo de malformaciones afecta a la extremidad anterior izquierda. Externamente se observa un acortamiento de la extremidad, que ha experimentado además una falta de rotación normal (sirenomelia), apareciendo la región del autopodo en supinación. El carpo se encuentra en hiperflexión y escasamente móvil (artrogriposis); su cara dorsal está dirigida látero-caudalmente, en vez de cranealmente. Tanto en las radiografías, como durante la disección se comprueba además una hemimelia casi completa del radio, sólo representado por su epífisis proximal en contacto con el cúbito. La escápula y el húmero se encuentran profundamente modificados (focomelia). Ambos presentan una forma irregular, un tamaño muy reducido y están articulados entre sí; pero la extremidad distal del húmero está libre y dirigida cranealmente, por tanto no articulada con el cúbito y radio. Consecutivamente, los músculos de los tres segmentos proximales de la extremidad se hallan modificados, bien aparecen rudimentarios o mal situados y algunos faltan.

Finalmente, este mismo animal presenta un amplio onfalocele con salida de la cavidad abdominal de la mayor parte del intestino delgado, el estómago, bazo, omento mayor, así como los lóbulos mediales y cuafrado del hígado y la vesícula biliar. Estas vísceras se encuentran dentro del cordón umbilical, mucho más ancho de lo normal, y revestidas por el amnios.

Caso n.º 3 (Figs. 3a, b, c). Se trata de un gato dicéfalo, monosómico e iniodímico, que presenta dos grupos de malformaciones. El primero corresponde a una duplicación cefálica, cuyos detalles anatómicos serán objeto de un próximo artículo (Camón et al., enviado para publicación). Brevemente, el animal presenta dos cráneos fusionados a nivel de ambos huesos exoccipitales mediales, pero con dos forámenes magnos independientes y separados por una lámina ósea. Las estructuras óseas, musculares, glandulares y nerviosas de las caras mediales de ambas cabezas se muestran ligeramente hipoplásicas. En ambas cavidades orales existe una amplia palatosquisis. Las dos lenguas convergen en sus bases. Las dos faringes se fusionan caudalmente para formar una sola laringofaringe. La laringe, tráquea y esófago son únicos.

El hioides y algunos músculos hioideos están parcialmente duplicados. Los sistemas arterial y venoso se hallan considerablemente modificados. Aunque existen dos únicas arterias carótidas comunes, la vascularización arterial de las caras mediales de ambas cabezas procede de una gruesa arteria lingual derecha, rama de la carótida externa derecha, que, describiendo un amplio arco anómalo ventralmente a la base de la lengua derecha, se dirige al ángulo medial de unión entre ambas cabezas, emitiendo distintas ramas para vascularizar sus correspondientes caras mediales y terminar dando dos carótidas internas mediales que se introducen por ambas fisuras petrobasilares mediales. La arteria carótida común izquierda es de diámetro más reducido y solo vasculariza la mitad lateral de la cabeza izquierda. En el sistema venoso destaca la existencia de una vena yugular externa supernumeraria, que desemboca en un arco hioideo anómalo formado por la confluencia de las ramas iguales de las dos venas yugulares externas normales. Discurriendo longitudinal y ventralmente por el espacio entre las mandíbulas de ambas cabezas, esta yugular externa anómala recibe, configurando un patrón bastante simétrico a ambos lados, distintas ramas que drenan las caras mediales de ambas cabezas.

El segundo grupo de malformaciones que presenta este animal consiste en una raquisquisis que afecta gravemente a las seis primeras vértebras cervicales y algo menos a la séptima (Figs. 3b,c). Esta alteración va acompañada en este caso por una mielosquisis cervical con exposición al exterior de la médula espinal y el consiguiente defecto de la piel a ese nivel. Las vértebras, además de la falta de cierre del arco vertebral, presentan una duplicación del cuerpo, de la que quedan excluidas la sexta y la séptima cervicales. El atlas presenta las dos mitades del arco neural separadas, articulándose cada una de ellas con el correspondiente cóndilo occipital lateral de cada una de las cabezas.

Caso n.º 4 (Fig. 4). El perro objeto de estudio en este caso presenta un tamaño y estado de desarrollo normales y a término. Se observa una espina bífida que radiográficamente afecta a las tres últimas vértebras lumbares, de las siete existentes, y a la primera sacra. Hay además falta de la piel a ese nivel y exposición de la médula espinal. La cola del animal es corta y retorcida en forma de S, encontrándose las vértebras caudales incluidas dentro de un pliegue de piel, que comunica a toda la cola una anchura externa mayor de lo normal y forma en conjunto una masa prominente dorsal a la región perineal. Independientemente de estas alteraciones, este mismo animal presenta también una atresia anal, observándose en lugar del orificio anal un pequeño pliegue de piel que ocupa su lugar en la región perineal.

Discusión

La incidencia de malformaciones congénitas múltiples en distintas poblaciones humanas y animales parece ser bastante mayor de lo que habitualmente podría esperarse. En estudios realizados en medicina humana, las cifras oscilan entre un 16% (Leck et al., 1968) y un 7% a 4,8% (Roberts y Powell, 1975; Källén y Winberg, 1969, respectivamente) de los totales de individuos estudiados que presentaban malformaciones congénitas. En la literatura veterinaria sólo hemos podido encontrar cuatro trabajos que aportan cifras precisas sobre la incidencia de malformaciones múltiples. En un estudio basado colectivamente en cinco especies distintas, Priester et al. (1970) observan un 4,8% de casos con malformaciones múltiples dentro del conjunto de la población afectada por anomalías congénitas. En la especie porcina, la cifra asciende al 20,8% (Selby et al., 1971). En los óvidos, la incidencia es todavía mayor con cifras de 32,9% (Dennis, 1975a). Datos imprecisos, pero, no obstante, valiosos, sobre diversas asociaciones de malformaciones pueden encontrarse en las revisiones de Saperstein et al. (1976) sobre la especie felina, de Huston et al. (1977) en los équidos y de Leipold et al. (1983) en los bóvidos. Desafortunadamente, no hemos encontrado datos disponibles sobre este particular en el caso del perro.

Por otra parte a pesar de lo aparentemente elevado de las cifras que acabamos de citar, deberían, probablemente, considerarse como estimaciones con el carácter de mínimas. En efecto, en medicina humana se cree que entre el 30% y el 80% de todos los casos con malformaciones son abortados (Roberts y Lowe, 1975). Aunque cifras equivalentes a éstas son desconocidas en Veterinaria, debe considerarse evidentemente también la intervención del factor aborto como minimizador de las estimaciones posibles de malformaciones simples y múltiples en los animales. Pero, además se dan una serie de circunstancias que reducen todavía más, si cabe, ese carácter mínimo. Así, en los animales muchas malformaciones pasan inadvertidas, bien por su carácter discreto, bien porque su detección necesita una necropsia completa, que no es frecuentemente practicada, o bien porque muchos ganaderos y propietarios tienden a ocultar y destruir rápidamente los animales abortados o nacidos vivos o muertos con malformaciones por su carácter indeseable o por meras razones higiénico-sanitarias.

La presentación simultánea de varias malformaciones en un mismo individuo se ha intentado explicar de diversas maneras. Roberts y Powell (1975) han señalado tres posibilidades. La primera, que una malformación de una parte corporal pueda determinar el desarrollo defectuoso de otra (como ocurre en el síndrome de Pierre Robin). En segundo lugar, que las alteraciones cromosómicas puedan producir la aparición de conjuntos de malformaciones preferentemente a malformaciones aisladas y, finalmente, que determinados agentes teratogénicos actúen simultánea o sucesivamente durante el desarrollo sobre varios órganos o sistemas orgánicos. La intensidad y la intimidad, utilizando términos de los autores citados, con que aparecían asociadas las 17 malformaciones más frecuentemente observadas en la actualidad, de pruebas suficientemente convincentes de que los agentes teratogénicos físicos y químicos convencionales estén realmente implicados en la producción de malformaciones en la especie humana (salvo en un 5% de los casos), junto con la observación de la estrecha interrelación de las malformaciones más comunes, favorece la hipótesis de que existe «una única causa» para la mayoría de las malformaciones humanas y que, probablemente, sea de naturaleza «intrínseca», concluyendo que, en ausencia de razones que se opongan a ello, las mutagénesis intrínsecas (Burnet, 1974) constituirán una explicación satisfactoria.

Basándose en argumentos epidemiológicos y en estudios de malformaciones hereditarias, Leck (1975) cuestiona la hipótesis etiológica unicista de Roberts y Powell (1975) y se pronuncia por un modelo multifactorial y heterogéneo sobre la etiología de las malformaciones, incluidas las de presentación múltiple y aplica a estos procesos el concepto de “enfermedad cuantitativa” formulado por Pickering (1962).

Desde el punto de vista embriológico, este modelo etiológico parece más plausible que la idea de la causa única, puesto que muchos de los mecanismos del desarrollo que están relacionados con la presentación de malformaciones parecen contener componentes de carácter cuantitativo, que pueden estar implicados en los procesos teratológicos. En otros términos, algunas malformaciones pueden no siempre deberse a una causa específica, sino solamente a la interacción incorrecta y fortuita de factores cuantitativos que, en cambio, correctamente combinados contribuirían a producir un desarrollo normal (Leck, 1965).

Kleinebrecht y Degenhardt (1975) discrepan también de la teoría etiológica unicista y del carácter intrínseco

(genético) de la mayoría de las malformaciones humanas. Basándose en los resultados de un programa alemán de seguimiento de gestaciones y desarrollo infantil, concluyen que numerosas malformaciones pueden explicarse como resultado de la combinación de numerosos factores de importancia aparentemente secundaria y de naturaleza extrínseca e intrínseca. Cohen (1976) se pronuncia también por la heterogeneidad etiológica de las malformaciones múltiples, aunque reconoce que queda por determinar la causa de muchas de ellas, pero apunta varias posibilidades. Así, algunas malformaciones asociadas pueden constituir trastornos de origen monogénico con efectos pleiotrópicos (Neel, 1958).

Otras malformaciones múltiples pueden responder a un tipo de herencia poligénica. Según esto, un porcentaje de individuos de cada generación quedaría por debajo de la proporción obligatoria de loci heterocigóticos necesarios para asegurar un desarrollo normal, presentando, en consecuencia, malformaciones congénitas (Lerner, 1954). A causa de un fenómeno de interacción se cree que el umbral para la expresión simultánea de dos o más anomalías se reduce. Algunas malformaciones múltiples pueden constituir deleciones o duplicaciones citogenéticamente indetectables. Algunas otras pueden ser producidas por agentes teratogénicos ambientales y, finalmente, un pequeño porcentaje de malformaciones múltiples puede responder a asociaciones producidas al azar.

En Veterinaria tienen particular interés los posibles síndromes de malformaciones múltiples de carácter hereditario poligénico y los producidos por agentes teratogénicos. Con respecto a los prieros y teniendo en cuenta la presión de intensa selección genética a que se someten numerosas poblaciones animales en condiciones de explotación, hasta llegar en ocasiones a una estrecha consanguinidad, la aparición de una cierta proporción de malformaciones congénitas puede ser el precio que una determinada población tiene que pagar a cambio de otros caracteres genéticos deseables. En este caso, el fenómeno de interacción implicaría que algunos individuos con malformaciones múltiples podrían servir de vehículos a través de los cuales una población eliminaría con un criterio económico los fenotipos desviados resultantes de la segregación de un cierto número de sistemas genéticos.

Las malformaciones aisladas y síndromes producidos por agentes teratogénicos son bien conocidos en los animales herbívoros domésticos, particularmente rumiantes. Baste con hacer referencia a los producidos en los descendientes por el consumo de determinadas plantas por parte de las madres durante la gestación (Keeler, 1972, 1988; Keeler et al., 1978). Igualmente, son bien conocidos los síndromes producidos experimentalmente en animales de laboratorio (véase un amplia revisión en Szabo, 1989). No obstante, el interés notoriamente creciente por los efectos y la naturaleza de estos agentes, merece también algunas consideraciones embriológicas. Así, los agentes teratogénicos pueden ser simples o compuestos y pueden consistir en sustancias tóxicas, radiaciones o deficiencias nutricionales, que, a su vez, pueden resultar afectadas por determinados procesos metabólicos y pueden actuar sobre un complejo sistema de umbrales cambiantes (Evans y Polani, 1980). Cuando un agente teratogénico afecta a un determinado órgano o sistema orgánico durante el desarrollo, si la concentración está por debajo del umbral teratogénico, el órgano en cuestión se desarrollaría normalmente, pero si se encuentra a niveles equivalentes a los del umbral, algunos órganos resultarían alterados, mientras otros podrían quedar indemnes. Si la concentración supera ampliamente el umbral teratogénico, todos los órganos sensibles de un determinado estado o momento de desarrollo resultarían afectados. Es probable que los umbrales teratogénicos varíen entre embriones individuales y entre órganos e individuos en diferentes estados de maduración. Finalmente, si asumimos con Leck (1975), que los mecanismos que intervienen a nivel bioquímico en el desarrollo no tienen probablemente porqué ser totalmente diferentes para estructuras y órganos distintos y si los factores de esta naturaleza que intervienen en un determinado proceso del desarrollo lo hacen también en otro u otros, no resultaría entonces extraño encontrar individuos en los que aparezcan malformaciones en los diversos órganos afectados.

Las malformaciones congénitas asociadas que presentan los animales estudiados en este trabajo responden, en su mayoría, a síndromes teratológicos acertadamente calificados por Cohen (1976) como síndromes no reconocidos o "de modelo único" ("one-of-a-kind syndromes"). En efecto, ninguna de tales asociaciones la hemos encontrado descrita en la literatura veterinaria tal como se han presentado en nuestros casos y afectando a las especies concretas a que éstos pertenecen. No obstante, son factibles algunos comentarios. Así pues, con respecto al caso n.º 1, que presenta simultáneamente un síndrome del primer arco y un meningocele; esta última afección resulta claramente hereditaria en la especie porcina (Trautwein y Meyer, 1966; Stewart et al., 1972;

Hámori, 1983), de la que parece ser responsable un gen autosómico recesivo con penetrancia variable. El otro conjunto de anomalías craneofaciales que presentaba este animal y que hemos considerado equivalente a un síndrome del primer arco (McKenzie, 1958), no lo hemos encontrado descrito como tal en la especie porcina y únicamente Selby et al. (1971) hacen referencia en un estudio de poblaciones a cerdos que presentaban el síndrome de Pierre Robin. Sin embargo, otros casos similares al observado por nosotros han sido descritos, uno en la especie ovina (Gurtl, 1877) y dos más en los bóvidos (Joest, 1926; Lesbre, 1927), con la simple calificación de fisura bucal congénita o macrostomía para esta malformación. En la aparición de fisura bucal congénita en varios miembros de una familia de leones, Henschele (1959) sospechó que este proceso podría tener una transmisión hereditaria, pero sugirió también la intervención de otros distintos factores, tales como la edad de la madre, el número de miembros de la camada y las condiciones generales de vida. En la especie humana, McKenzie (1958, 1966) ha revisado el carácter hereditario y la etiología del síndrome del primer arco, señalando que un gen o grupo de genes constituirían el factor iniciador, responsable de la inhibición o incluso supresión del desarrollo de la arteria estapédica, fundamental para el desarrollo posterior de los derivados del primer arco visceral y parte de los del segundo. Por otra parte, la circulación sanguínea compensatoria, a base de anastomosis vasculares de territorios próximos, resultaría insuficiente, resultando una inhibición del desarrollo y crecimiento de las estructuras pertenecientes al área vascularizada por la arteria estapédica anómala y sus ramas. La penetrancia del gen o genes responsables dependería del estado nutricional y de la dieta consumida por la madre durante las primeras semanas de gestación. Finalmente, la expresividad y especificidad del gen dependerían de los detalles anatómicos concretos y del periodo de tiempo en que se produjera el desajuste en los diferentes vasos sanguíneos principales y colaterales implicados.

La ciclopía que presentaba el animal de la especie porcina del caso n.º 2, como forma más grave de holoprosencefalia, ha sido descrita en esta misma especie como resultado de la infección de la madre por *Erysipelothrix rhusiopathiae* (agente productor de la erisipela porcina o mal rojo) durante la gestación (Drommer, 1982). La aparición de ciclopía se ha descrito también en corderos nacidos de ovejas que habían consumido falso eléboro (*Veratrum californicum*) durante el día 14 de la gestación (Binns et al., 1965). En ese período el embrión ovino se encuentra en fase de formación de la placa neural. Sin embargo, el consumo de la citada planta el día 15 de gestación ya no determina la aparición de malformaciones craneofaciales. El animal de este mismo caso presentaba también malformaciones en la extremidad anterior izquierda, así como un amplio onfalocelo con salida de parte de las vísceras abdominales. Noden y De Lahunta (1985) describen un caso parcialmente similar en un gato que presentaba onfalocelo y ectromelia bilateral de las extremidades anteriores.

La dicefalia raramente va acompañada de craneorraquisquisis o raquisquisis con mielosquisis en los animales domésticos (caso n.º 3). Sólo hemos encontrado en la literatura un caso similar al aquí presentado, publicado por Drommer (1982), en un cordero, que, además de dicefalia, manifestaba una raquisquisis extendida prácticamente a lo largo de toda la columna vertebral con exposición al exterior de la médula espinal (mielosquisis). En la especie humana parece existir, en cambio, cierta asociación entre las duplicaciones cefálicas y la patogenia de malformaciones del tubo neural, particularmente anencefalia y mielosquisis (Spiers, 1974; James, 1976; Riccardi y Bergmann, 1977). Aunque no estrictamente constante, esta asociación resulta todavía más estrecha en la diprosopia humana (Riccardi y Bergmann, 1977). En los animales domésticos la diprosopia tampoco parece relacionada con malformaciones del tubo neural que no correspondan a la mera duplicación de estructuras (Camón et al., 1990). Otra diferencia relevante consiste en que casi la especie humana la dicefalia cursa prácticamente siempre con duplicación casi completa de toda la columna vertebral, mientras que en los animales la duplicación sólo afecta a los cuerpos de algunas vértebras cervicales.

La asociación entre espina bífida, alteraciones de la cola y atresia anal, tal y como la hemos descrito en el perro (caso n.º 4), sólo la hemos encontrado referida en los óvidos (Dennis y Leipold, 1972; Dennis, 1975b). Mientras en esta última especie la atresia anal parece ir frecuentemente acompañada de otras malformaciones (Dennis y Leipold, 1972), en los suidos, donde esta malformación es una de las más frecuentes, tiende a presentarse de forma aislada (Selby et al., 1971). Desconocemos los datos sobre este particular concernientes al perro, a pesar de ser una de las especies en que la atresia anal es de común presentación. En cualquier caso, las tres observaciones realizadas en este animal tienen, independientemente, un claro carácter hereditario (Hámori, 1983). Las alteraciones del desarrollo de la cola, resultando ésta retorcida, excesivamente corta o incluso faltando por completo, pueden estar asociadas con espina bífida lumbosacra en el perro (Curtis et al., 1964) y en

el gato (Leipold et al., 1974). En efecto, ambos tipos de malformaciones cuando aparecen asociadas pueden ser el resultado de un proceso de cruzamientos intensivos para obtener, por selección genética, animales con el carácter anuro o braquiuro, como ocurre especialmente en los gatos de la raza Manx. Durante el proceso de cruzamientos selectivos para obtener el carácter deseado, aunque constituya una anomalía esquelética, se manifiestan también diversas anomalías en el médula espinal. Muchos de los animales nacidos son incapaces de utilizar sus extremidades posteriores y otros pueden mantenerse en pie o caminar, pero carecen de control voluntario de la micción y de la defecación, constituyendo, en definitiva, un claro ejemplo de cómo la selección de un carácter puede provocar la aparición de otros que pueden terminar incapacitando al animal (Noden y De Launta, 1985).

A pesar de la naturaleza discordante, por su aparición en sistemas orgánicos a veces muy dispares, de varias de las malformaciones asociadas, observadas en los cuatro casos aquí descritos y en otros aportados por la literatura, un atento análisis, en otros estudios que resultan bastante necesarios, de las características morfológicas y embriológicas de las malformaciones múltiples asociadas y sus posibles interrelaciones, sin olvidar, naturalmente, otras cuestiones relevantes en este contexto, tendrían quizá resultados prometedores en cuanto al mayor conocimiento de la etiología, epidemiología, patogenia y prevención de estos procesos. Igualmente, posibles nuevas interdependencias entre distintos mecanismos y procesos del desarrollo embrionario y fetal podrían ser conocidos.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestra gratitud a los compañeros profesionales veterinarios y a los propietarios y ganaderos que nos facilitaron los cuatro animales objeto de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- BINNS, W.; SHUPE, J.L.; KEELER, R.F.; JAMES, L.F. (1965): Chronologic evaluation of teratogenicity in sheep fed *Veratrum californicum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **147**: 839-843.
- BURNET, F.M. (1974): Intrinsic mutagenesis: A genetic approach to ageing. Lancaster, Londres.
- CAMÓN, J.; RUBERTE, J.; ORDOÑEZ, G. (1990): Diaprosopia in a cat. *J. Vet. Med. Series A*, **37**: (en prensa).
- COHEN, M.M. (1976): Interrelationships between common congenital malformations. *Lancet* **1**: 147.
- COHEN, M.M.; LEMIRE, R.J. (1982): Syndromes with cephaloceles. *Teratology* **25**: 161-172.
- COLLINS, E.T. (1900): Case with symmetrical congenital notches in the outer part of each lower lid and defective development of the malar bones. *Trans. Ophthalm. Soc.* **20**: 190-198.
- CURTIS, R.L.; ENGLISH, D.; KIM, Y.J. (1964): Spine bifide in stub dog stocks selectively bred for short tails. *Anat. Rec.* **148**: 365.
- DENNIS, S.M. (1975a): Perinatal lamb mortality in Western Australia. VII. Congenital defects. *Aust. Vet. J.* **51**: 80-82.
- DENNIS, S.M. (1975b): Congenital defects of the nervous system of lambs. *Aust. Vet. J.* **51**: 147-149.
- DENNIS, S.M.; LEIPOLD, H.W. (1972): Atresia ani in sheep. *Vet. Rec.* **91**: 219-222.
- DROMMER, W. (1982): Missbildungen. En: "Lehrbuch der allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin". T. Kitt. L.C. Schulz (eds.). 386-406. Ferdinand Enke, Stuttgart.
- EVANS, P.R.; POLANI, N. (1980): Congenital malformations in a post-mortem series. *Teratology* **22**: 207-216.
- FOLEY, C.W.; LASLEY, J.F.; OSWEILER, G.D. (1979): Abnormalities of companion animals: Analysis of heritability. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- GURLT, E.F. (1877): Ueber thierische Missgeburten. Ein Beitrag zur pathologischen Anatomie und Entwicklungsgeschichte. August Hirschwald, Berlín.
- HÁMORI, D. (1973): Constitutional disorders and hereditary diseases in domestic animals. Elsevier, Amsterdam.
- HENSCHLE, W.P. (1959): Cleft palate in lions of one litter. A case report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **134**: 365-366.
- HUSTON, R.; SAPERSTEIN, G.; LEIPOLD, H.W. (1977): Congenital defects in foals. *J. Eq. Med. Surg.* **1**: 146-161.
- JAMES, W.H. (1976): Twinning and anencephaly. *Ann. Hum. Biol.* **3**: 401-409.
- JOEST, E. (1924): Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Band I, 2 Aufl. Schoetz, Berlín.
- KÁLLÉN, B.; WINBERG, J. (1969): Multiple malformations studied with a national register of malformations. *Pediatrics*. **44**: 410-417.
- KEELER, R. F. (1972): Effect of natural teratogens in poisonous plants on fetal development in domestic animals. En:

- "Drugs and fetal development". M. Klinberg, A. Abramovici, J. Chemke (ed.). 107-125. Plenum Press, New York.
- KEELER, R.F. (1988): Livestock models of human birth defects, reviewed in relation to poisonous plants, *J. Anim. Sci.* **66**: 2414-2427.
- KEELER, R.F.; VAN KAMPEN, K.R.; JAMES, L.F. (1978): Effects of poisonous plants on livestock. Academic Press, New York.
- KLEINEBRECHT, J.; DEGENHARDT, K.H. (1975): Causation of malformations. *Lancet* **3**: 1097-1098.
- LECK, I. (1965): Etiology of malformations. *New Engl. J. Med.* **273**: 864-866.
- LECK, I. (1975): Causation of malformations. *Lancet* **2**: 1097.
- LECK, I.; RECORD, R.G.; McKEOWN, T.; EDWARDS, J.H. (1968): Incidence of malformations in Birmingham, England, 1950-59. *Teratology* **1**: 263-280.
- LEIPOLD, H.W.; HUSTON, K.; BLAUCH, B.; GUFFY, M.M. (1974): Congenital defects of the caudal vertebra column and spinel cord in Manx cats. *J. Am. Vet. med. Assoc.* **164**: 520-523.
- LEIPOLD, H.W.; HUSTON, K.; DENNIS, S.M. (1983): Bovine congenital defects. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **27**: 197-271.
- LERNER, I.M. (1954): Genetic homeostasis. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- LESBRE, F.X. (1927): *Traité de tératologie de l'homme et des animaux domestiques*. Vigot. Frères, Paris.
- McKENZIE, J. (1958): The first arch syndrome. *Arch. Dis. Childh.* **33**: 477-486.
- McKENZIE, J. (1966): The first arch syndrome. *Develop. Med. Child Neurol.* **8**: 55-56.
- NEEL, J.V. (1958): A study of major congenital defects in Japanese infants. *Am. J. Hum. Genet.* **10**: 398-445.
- NODEN, D.M.; DE LAHUNTA, A. (1985): The embryology of domestic animals. *Developmental mechanisms and malformations*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- PICKERING, G. (1962): Nature of hypertension. *Lancet* **1**: 1298.
- PRIESTER, W.A.; GLASS, A.G.; WAGGONER, N.S. (1970): Congenital defects in domesticated animals: General considerations. *Am. J. Vet. Res.* **3**: 1871-1879.
- RICCARDI, W.M.; BERGMANN, C.A. (1977): Anencephaly with incomplete twinning (diprosopus). *Teratology* **16**: 137-140.
- ROBERTS, C.J.; LOWE, C.R. (1975): Where have all the conceptions gone? *Lancet* **1**: 498-499.
- ROBERTS, C.J.; POWELL, R.G. (1975): Interrelations of the common congenital malformations. Some aetiological implications. *Lancet* **2**: 848-850.
- SAPERSTEIN, G.; HARRIS, S.; LEIPOLD, H.W. (1976): Congenital defects in domestic cats. *Feline Pract.* **6**: 18-43.
- SAPERSTEIN, G.; LEIPOLD, H.W.; DENNIS, S.M. (1975): Congenital defects of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **167**: 314-322.
- SELBY, L.A.; HOPS, H.C.; EDMONDS, L.D. (1971): Comparative aspects of congenital malformations in man and swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **159**: 1485-1490.
- SPIERS, P.S.L. (1974): Neural tube defects and twinning. *Lancet* **1**: 1172.
- STEWART, R.W.; SELBY, L.A.; EDMONDS, L.D. (1972): A survey of cranium bifidum: An inherited defect in swine. *Vet. med. Small. Anim. Clin.* **67**: 677-679.
- SZABO, K.T. (1969): Congenital malformations in laboratory and farm animals. Academic Press, San Diego.
- TRAUTWEIN, G.; MEYER, H. (1966): Experimental studies on hereditary meningocele cerebri in pigs. *Pathol. Vet.* **3**: 529-555.

Correspondencia: Dr. Joaquín Camón Urgel
Unidad Docente de Anatomía y Embriología
Facultad de Veterinaria
Universidad Autónoma de Barcelona
08193 Bellaterra, Barcelona . España.

CÉLULAS PAS POSITIVAS Y CÉLULAS FOLICULO ESTRELLADAS, UNA ESTIRPE CELULAR COMÚN EN EL LÓBULO INTERMEDIO DE LA HIPOFISIS

PAS-POSITIVE AND FOLLICLE-STELLATE CELLS, A COMMON TYPE OF CELLS IN THE INTERMEDIATE LOBE OF THE PITUITARY GLAND

S. CARBAJO, E. CARBAJO-PÉREZ, J. RODRÍGUEZ, S. CASTRO Y J.C. CARVAJAL

Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Facultad de Medicina. Colegio Universitario de Medicina de Avila.
Universidad de Salamanca.

RESUMEN

En el Lóbulo Intermedio de la Hipófisis se ha considerado clásicamente la existencia de un solo tipo celular con capacidad secretora, las células productoras de POMC. Otros elementos descritos en esta glándula, las células PAS-positivas también presentan algunas características morfológicas de actividad secretora y, aunque su función es desconocida, existen múltiples hipótesis al respecto. En este trabajo intentamos relacionar en mamíferos la PAS positividad con el posible sistema regulador serotoninérgico del Lóbulo Intermedio.

ABSTRACT

It has classically been considered that only one type of secretory cells exist in the intermediate lobe of the pituitary gland, the POMC-producing cells. Furthermore, morphologic characteristics of secretory activity have also been found in PAS-positive cells of the intermediate lobe. However, the functional meaning of the latter is not clear. In the present report a relationship between PAS-positive cells and the serotonergic control of the rat intermediate lobe is hypothesized.

PALABRAS CLAVE Hipófisis. Lóbulo Intermedio. Células PAS positivas. Células foliculo estrelladas. Serotonina. Mamíferos.

Introducción

El Lóbulo Intermedio de la Hipófisis (LI) es un tejido glandular que alcanza un desarrollo considerable en la mayor parte de los mamíferos inferiores, apareciendo como una estructura pluriestratificada. Se describe en él la existencia de tres variedades celulares.

Una de ellas son las células glandulares típicas, a las que clásicamente se les dió el nombre de intermediocitos (Amat y col., 1976), células principales (Van Eys, 1980a), por su predominio en el citado lóbulo, o melanotropas por su función (Klein y col., 1970), ya que son las responsables de la síntesis de hormonas como la MSH, aunque también producen otros péptidos derivados de la POMC.

Otra estirpe celular del LI, también con capacidad secretoria, son las células PAS-positivas. Presentan signos de intensa actividad tales como el número de gránulos de secreción o el voluminoso aparato de Golgi, que muestra unas características de actividad inusual en el LI (Alluchon-Gerard, 1978). Van Eys (1980b) acepta la

posibilidad de que produzcan hormonas, pero considera como desconocidos los productos de síntesis. Podrían estar implicadas en mecanismos de regulación del calcio (Olivereau, 1969 y Olivereau y Olivereau 1979a y b), osmorregulación (Olivereau y col., 1980) o en la producción de sustancias de naturaleza glicoproteica (Olivereau y Chambole, 1979).

El tercer tipo celular clásico son las denominadas células intersticiales (Foster, 1971), estrelladas (Salazar, 1963 y Amat, 1976), foliculares (Farquhar, 1957) o folículo-estrelladas (Vila Porcile, 1972). Considerando el papel multifuncional que se les atribuye, estas células intervendrían en acciones tan variadas como de soporte, tróficas, de regulación de la microcirculación de las cavidades intersticiales (Vila Porcile, 1972), fagocitosis (Young Y COL., 1965), endocitosis (Forbes, 1972), reabsorción de la segregación de coloide (Bergland Y Rorack, 1969) y fagocitosis de células degeneradas (Farquhar, 1971 y Dingemans y Feltkamp 1972).

La existencia de reactividad positiva al PAS en las células folículo-estrelladas y la localización en las mismas de reactividad al suero anti-serotonina (Carvajal y col., 1991), así como la existencia de proteína S-100, proteína específica que no está presente en otros tipos celulares adenohipofisarios, nos ha llevado a intentar relacionarlas con las clásicamente descritas como PAS positivas.

Material y Método

Se han utilizado para este trabajo un total de 18 ratas de ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley, cuyo peso oscilaba entre los 250 y 300 g. Los animales, previamente al experimento, han permanecido estabulados a una temperatura de 20°C±2, humedad ambiental controlada y ritmo luz diurna (9 horas) oscuridad nocturna. Se les suministró una dieta equilibrada rata-ratón cría (Panlab) y dispusieron permanentemente de agua.

Previa anestesia, fueron perfundidos por vía intracardiaca con una solución de Bouin durante 20 minutos. Posteriormente se efectuó una craneotomía para extraer el bloque hipotálamo-hipofisario, al que se mantuvo inmerso durante tres días en la misma solución, a fin de completar el proceso de fijación. Las muestras así obtenidas fueron sumergidas en una solución saturada de carbonato de litio durante 4 horas; tras el lavado se deshidrataron e incluyeron en parafina siguiendo los procedimientos habituales. Posteriormente los bloques fueron cortados de forma seriada con un microtomo Leitz 1512, obteniendo secciones de 2 µm. de espesor con cuchilla de vidrio.

Immunocitoquímica

Se ha seguido el procedimiento de la peroxidasa anti-peroxidasa descrito por Sternberger y col. (1970). Las secciones seleccionadas, tras la desparafinización e hidratación, fueron incubadas en cámara de humedad durante 1 hora a 4°C, con suero anti-proteína específica S-100 (Dakopatts-Z311), a la dilución de 1:300. Con otro lote se utilizó un suero específico anti-serotonina (Chemicon-AB938), a la dilución de 1:1500, siendo el período de incubación de 12 horas a 4°C. Posteriormente las muestras de ambos grupos fueron incubadas durante 30 minutos con suero de cerdo anti-Ig de conejo (Dakopatts-Z196) a dilución 1:100 e igualmente y siguiendo la misma pauta se trató el material de ambos grupos con suero de conejo conjugado con peroxidasa, y el complejo soluble PAP (Dakopatts-Z113), revelando la reacción con el medio de Graham-Karnovsky (1966).

Histoquímica

Otro grupo fue teñido siguiendo el protocolo del PAS (McManus, 1946): tratamiento con ácido periódico 5 minutos, lavado repetido con agua destilada, incubación durante 15 minutos con reactivo de Schiff y lavado en agua corriente de 10 minutos de duración.

En todas las preparaciones se procedió a la deshidratación y montaje de las muestras, siguiendo los protocolos habituales, para su posterior estudio con un microscopio óptico Leitz Dialux-22. Las fotografías se ha realizado con película Kodak Panatomic.

Resultados

Tras el estudio del LI de las hipófisis de los animales pertenecientes a los tres grupos, no se han observado diferencias significativas que pudieran reflejar variaciones en la reactividad entre ambos sexos.

El marcaje con suero anti-serotonina ha mostrado en el LI trazos reactivos a este suero, que podrían identificarse como recorridos de fibras nerviosas de naturaleza serotoninérgica, si bien no son muy abundantes.

Así mismo, cabe destacar la existencia de material inmunorreactivo en el citoplasma de algunas células aparentemente de tipo glandular (fig. 1). Es destacable el gran polimorfismo celular, observándose elementos triangulares o piramidales, fusiformes y poligonales. En todos los casos su presencia ha sido constante. En algunas ocasiones, cuando se trata de células poligonales, se puede apreciar como de los vértices parten una o varias prolongaciones de diferente longitud y grosor, que se distribuyen por los espacios intercelulares del parénquima glandular. La intensidad de reacción tanto en las expansiones citoplasmáticas como en el material intracelular no es muy intensa.

Las imágenes del LI obtenidas tras la utilización del suero anti-proteína específica S-100 muestran al igual que en los animales del grupo anterior un gran poliformismo (figs. 2 y 3). Hay células con contornos irregulares e intensamente teñidas de las que, ocasionalmente, parten gruesos tractos reactivos, junto a otras mucho más numerosas, de forma poligonal y citoplasma debilmente teñido, en las que es raro encontrar prolongaciones citoplasmáticas.

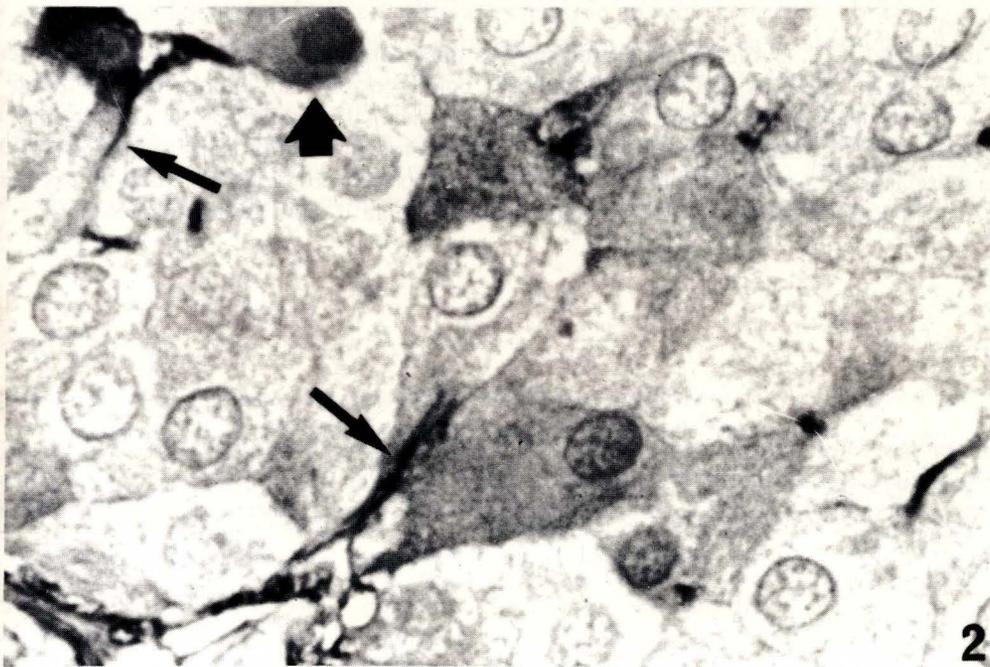
Con la tinción del PAS se diferencian claramente dos tipos celulares. Unas son redondeadas y carentes de prolongaciones (fig. 4). Las otras, son células poligonales, con largos procesos citoplasmáticos, que se ramifican a distancia y suelen disponerse en zonas con aspecto más o menos fibroso (fig. 5). La distribución en ambos casos es similar a la de las células reactivas a los sueros anti-serotonina y anti-proteína específica S-100.

La capa marginal del LI muestra reactividad al PAS, al suero anti-serotonina y al suero anti-proteína S-100, con una intensidad variable, siendo generalmente más marcada frente al suero anti-proteína S-100.

Discusión

La inervación serotoninérgica del LI podría estar restringida a determinadas especies de vertebrados inferiores (Thornton y Geschwind, 1975), anfibios (Kondo y col., 1983 y Ueda y col., 1984) o teleósteos (Groves y Batten, 1985 y Margolis-Kazan y col., 1985), donde intervendría como elemento esencial en la regulación de la actividad glandular.

En los mamíferos la serotonina parece estar localizada en los gránulos de las células gonadotropas (Payette y col., 1985), y su existencia a nivel de LI es discutida. En leporidos (Stoeckel y col., 1983 y Schimchowitsch, 1984), han detectado la existencia de tractos de fibras reactivas a un anticuerpo monoclonal anti-serotonina. Utilizando técnicas de autorradiografía ultraestructural (Calas, 1981) y de inmunocitoquímica (Friedman y col., 1983), se ha puesto en evidencia la existencia de sinapsis neuroglandulares serotoninérgicas y de un denso plexo nervioso de fibras inmunoreactivas al suero anti-serotonina en el LI de la rata. No obstante, estos hallazgos no son coincidentes con los resultados obtenidos por Kondo y col. (1983), quienes afirman no haber apreciado la existencia de inervación serotoninérgica en el LI de diferentes mamíferos como la rata, el hamster o el perro; o con los de Carvajal y col. (1991), que solamente encuentran algunas fibras reactivas dispersas en el LI.



- FIGURA 1.** Célula poligonal mostrando inmunorreactividad a un suero antiserotonina (flecha ancha). Se aprecia la existencia de prolongaciones citoplásmicas (flechas estrechas) con una longitud variable. X 6000.
- FIGURA 2.** Células reactivas a un suero anti-proteína específica S-100. Es de destacar el gran polimorfismo celular. Algunas células tienen el aspecto típico de las células glandulares (fig. 2, flecha ancha). Hay diferencias considerables en cuanto a la intensidad de la reactividad, tanto en los somas como en las prolongaciones (figs. 2 y 3, flechas estrechas). X 6000.

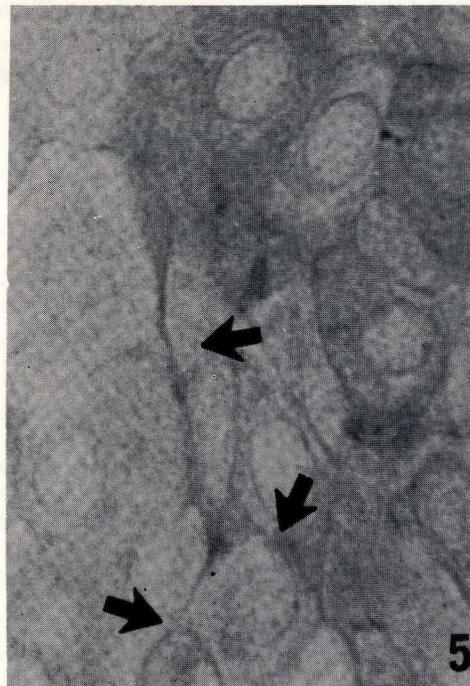
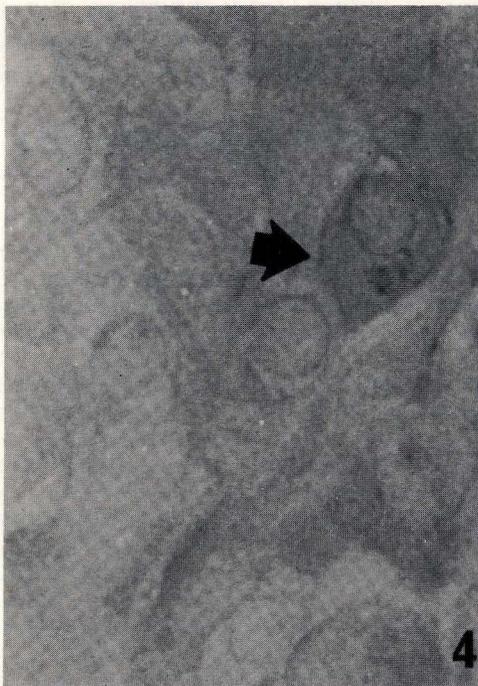
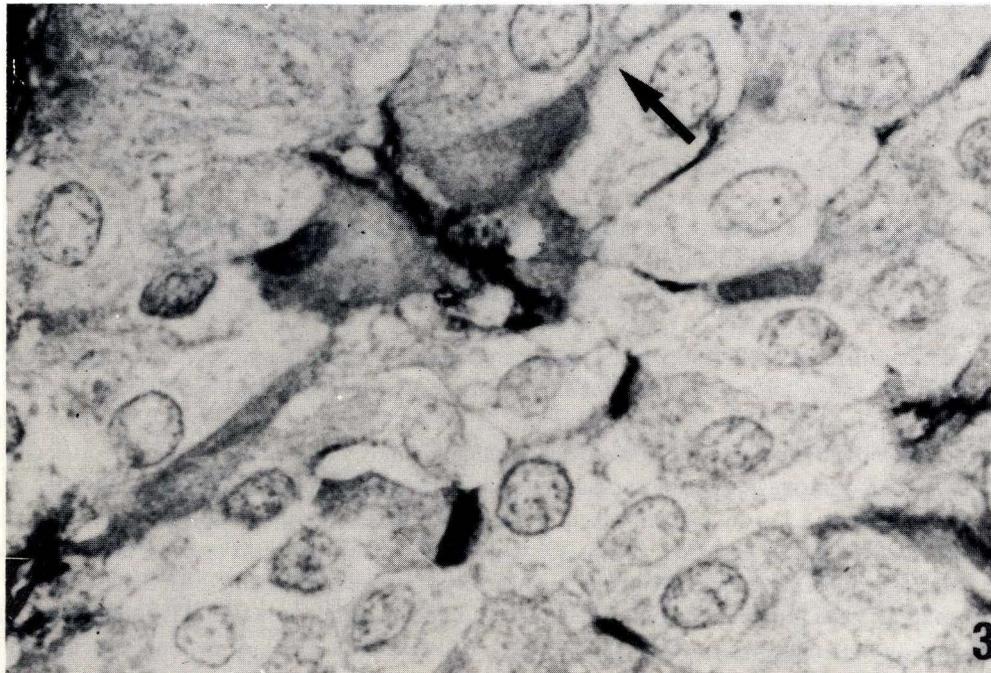


FIGURA 3. Células reactivas a un suero anti-proteína específica S-100. Es de destacar el gran polimorfismo celular. Algunas células tienen el aspecto típico de las células glandulares (fig. 2, flecha ancha). Hay diferencias considerables en cuanto a la intensidad de la reactividad, tanto en los somas como en las prolongaciones (figs. 2 y 3, flechas estrechas). X 6000.

FIGURA 4 Y 5. Células PAS-positivas en el LI. Algunas son redondeadas y aparentemente carecen de prolongaciones, por lo que muy bien pudiera tratarse de elementos de tipo glandular (fig. 4, flecha). Otras son poligonales y con prolongaciones citoñásmicas muy extensas (fig. 5, flechas), X 6000.

Tras descartar la posible existencia de reacciones cruzadas del suero anti-serotonina, nunca superiores al 1%, con fracciones protéicas intracelulares o con otras sustancias como la 5-metoxitriptamina, la norepinefrina o la epinefrina y, a la vista de las imágenes obtenidas, dada la concluyente positividad y especificidad de los sueros utilizados para la realización de este trabajo, cabe admitir que, la inmunoreactividad al suero anti-serotonina que aparece en somas celulares del LI, viene dada por la presencia en los mismos de productos de naturaleza serotoninérgica, aunque no haya razones suficientes para considerar la posibilidad de que estas células supongan una hipotética fuente endógena de serotonina.

Como alternativa, se podría admitir que la inmunoreactividad que aparece en los cuerpos celulares de aspecto no glandular del LI, sería el resultado de la captación por estas células, que actuarían como reservorio, de serotonina sintetizada en otros lugares del sistema nervioso, y liberada en los terminales de las fibras serotoninérgicas.

En nuestro trabajo hemos encontrado en una misma célula, mediante el estudio de cortes seriados, material reactivo tanto frente al suero anti-serotonina como al suero anti-proteína específica S-100, lo que determina su especificidad, tratándose por tanto de células foliculo estrelladas (ALLAERTS, 1989); si bien, frente a este último suero, hemos observado algunos elementos debilmente teñidos y que no aparecían en cortes adyacentes.

En las células PAS-positivas hemos observado que sus características morfológicas, cualidades tintoriales y distribución, son similares a las de las células serotonin-positivas. La presencia de serotonina en células PAS-positivas ha sido confirmada en peces por MARGOLIS-KAZAN y col. (1985). Por estos argumentos pensamos que se debe tratar de células pertenecientes a una misma estirpe, las células foliculo estrelladas.

Desde el punto de vista funcional, algunos hechos como la capacidad de las células foliculo-estrelladas para llevar a cabo procesos de endocitosis (FORBES, 1972 y ALLAERTS, 1989); el reciente descubrimiento de su efecto inhibitor sobre la estimulación e inhibición de hormonas hipofisarias, actuando como un sistema "buffer" fisiológico capaz de modular la respuesta de las células glandulares (ALLAERTS y col., 1990); y las aseveraciones acerca de la capacidad de síntesis de las células PAS-positivas, refuerzan nuestra hipótesis, lo cual casi nos permite afirmar que en el LI solamente existen dos variedades celulares, las células melanotropas y las células foliculo estrelladas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLAERTS, W. (1989): "Involvement of folliculo-stellate cells in inhibitory interactions in rat anterior pituitary: a morpho-functional study in vitro", pp: 62-76. Acta Biomédica Lovaniensia. Katholieke Universiteit te Leuven. Belgique.
- ALLAERTS, W.; CARMELIET, P. y DENEFF, C. (1990): "New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells". Molecular and Cellular Endocrinology **71**: 73-81.
- ALLUCHON-GERARD, M.J. (1978): "Ultrastructure of the dogfish adenohypophysis". Cell. Tiss. Res. **193**: 139-154.
- AMAT, P. (1976): "La pars tuberalis de la adenohipófisis del gato (estudio con el microscopio electrónico de su histología y citología)". An. Anat. **19**: 437-454.
- AMAT, P.; VÁZQUEZ, R. y LANCHO, J.L. (1976): "Estudio ultraestructural de la Pars Intermedia en algunos roedores (rata y cobaya)". An. Anat. **25**: 15-26.
- BERGLAND, R.M. y TORACK, R.M. (1969): "An ultrastructural study of follicular cells in the human anterior pituitary". Am. J. Pathol. **57**: 273-297.
- CALAS, A. (1981): "L'innervation monoaminérgique de l'hypophyse. Approche radioatographique chez le rat". Bull. Soc. Neuroendoc. Exp. **1**: 15.
- CARVAJAL, J.C.; CARBAJO, S.; CARBAJO-PÉREZ, E.; CASTRO, S. y RODRÍGUEZ, J. (1991): "Serotonin immunoreactivity in the intermediate lobe of the rat pituitary". Histology and Histopathology. (En prensa).
- DINGEMANS, K.P. y FELTKAMP, C.A. (1972): "Nongranulated cells in the mouse adenohypophysis". Z. Zelforsch. **124**: 387-405.
- FARQUHAR, M.G. (1957): "Corticotrophs of the rat adenohypophysis as revealed by electron microscopy". Anat. Rec. **127**: 291 (Abstract).
- FARQUHAR, M.G. (1971): "Processing of secretory products by cells of the anterior pituitary gland". Subcellular organization and function in endocrine tissues, 79-124. H. Heller y K. Lederis. Cambridge University Press. London.
- FORBES, M.S. (1972): "Fine structure of the stellate cell in the pars distalis of the lizard, *Anolis carolinensis*". J. Morphol. **136**: 227-246.
- FOSTER, C.L. (1971): "Relationship between ultrastructure and function in the adenohypophysis of the rabbit". Subcellular organization and function in endocrine tissues, 125-146. J. Heller y K. Lederis. Cambridge University Press. London.

- FRIEDEMANN, E.; KRIEGER, D.T.; MEZEY, E.; LÉRANTH, C.S.; BROWNSTEIN, M.J. y PALKOVITS, M. (1983): "Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section". *Endocrinology* **112** (6): 1943-1947.
- GRAHAM, R.C. y KARNOVSKY, M.J. (1966): "The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique". *J. Histochem. Cytochem.* **14**: 291-302.
- GROVES, D.J. y BATTEN, T.F.C. (1985): "Ultrastructural autoradiographic localization of serotonin in the pituitary of a teleost, fish, *Poecilia latipinna*". *Cell. Tiss. Res.* **240**: 489-492.
- KLEIN, M.J.; STOECKEL M.E.; PORTE, A. y STUTINSKY, F. (1970): "Arguments ultrastructuraux en faveur de l'existence de cellules corticotropes (ACTH) dans la pars intermedia et dans la pars tuberalis de l'hypophyse du rat". *C.R. Acad. Sc. (Paris)* **271**: 2159-2162.
- KONDO, Y.; NAGATSU, I.; YOSHIDA, M.; KARASAWA, N. y NAGATSU, T. (1983): "Existence of noradrenalin cells and serotonin cells in the pituitary gland of *Rana Catesbeiana*". *Cell. Tiss. Res.* **228**: 405-498.
- MARGOLIS-KAZAN, H.; HALPERN-SEBOLD, L.R. y SCHREIBMAN, M.P. (1985): "Immunocytochemical localization of serotonin in the brain and pituitary gland of the playfish, *Xiphophorus maculatus*". *Cell. Tiss. Res.* **240**: 311-314.
- McMANUS, J.F.A. (1946): "Histological demonstration of mucin after periodic acid". *Nature* **158**: 202.
- OLIVEREAU, M. y CHAMBOLE, P. (1979): "Serotonergic control of MSH secretion in the eel. Ultrastructural study after 5-hydroxytryptophan treatment". *J. Physiol. (Paris)* **75**: 109-112.
- OLIBEREAU, M y OLIVEREAU, J. (1979a): "Effect of estradiol-17b on the cytology on the liver, gonads and pituitary and plasma electrolytes in the female freshwater eel". *Cell. Tiss. Res.* **199**: 431-454.
- OLIVEREAU, M. (1969): "Complexe neuro-intermediaire et osmorégulation comparaison chez l'Anguille Européenne et chez l'Anguille Japonaise d'élevage au cours du transport en eau de mer". *Z. Zellforsch.* **99**: 389-410.
- OLIVEREAU, M. y OLIVEREAU, J. (1979b): "Estradiol-positive feedback on gonadotrophic A (GHT) cells in freshwater male silver eels". *Gen. Comp. Endocrinol.* **39**: 247-261.
- OLIVEREAU, M; AIMAR, C. y OLIVEREAU, J. (1980): "Responses of the teleost pituitary (goldfish, eel) to deionized water". *Cell. Tiss. Res.* **208**: 389-404.
- PAYETTE, R.F.; GERSHON, M.D. y NUÑEZ, E.A. (1985): "Serotonergic elements of the mammalian pituitary". *Endocrinology* **116**: 1933-1942.
- SALAZAR, H. (1963): "The pars distalis of the female rabbit hypophysis: an electron microscopic study". *Anat. Rec.* **147**: 469-497.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.(Jr); CUCULIS, J.J. y MEYER, H.G. (1970): "The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes". *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 315-333.
- SCHIMCHOWITSCH, S. (1984): "Caractérisation d'un nouveau modèle de régulation de la fonction mélanotrope: régulation peptidergique et absence de contrôle dopaminergique chez les léporides". Tesis Doctoral U.L.P. Strasbourg.
- STOECKEL, M.E.; SCHIMCHOWITSCH, S.; GARAUD, J.; SCHMITT, G.; VAUDRY, H. y PORTE, A. (1983): "Immunocytochemical evidence of intragranular acetylation of a-MHS in the melanotrophic cells of the rabbit". *Cell. Tiss. Res.* **230**: 511-515.
- THORNTON, V.F. y GESCHWIND, I.I. (1975): "Variations in plasma concentrations of —melanocyte-stimulating hormone during the oestrus cycle of the rat and after administration of ovarian steroids". *J. Endocrinol.* **88**: 385-395.
- UEDA, S.; NOJYO, Y. y SANO, Y. (1984): "Immunohistochemical demonstration of serotonin neuron system in the central nervous system of the bullfrog, *Rana Catesbeiana*". *Anat. Embryol.* **169**: 219-229.
- VAN EYS, G.J.J.M. (1980a): "Structural changes in the pars intermedia of the cichlid teleost *Sarotherodon Mossambicus* as a result of background adaptation and illumination. II. The PAS-positive cells Cell". *Cell. Tiss. Res.* **210**: 171-179.
- VILA-PORCILE, E. (1972): "Le réseau des cellules folliculo-stellaires et les follicules de l'adénohypophyse du rat (Pars distalis)". *Z. Zellforsch.* **129**: 328-369.
- YOUNG, B.A.; FOSTER, C.L. y CAMERON, E. (1965): "Some observations on the ultrastructure of the adenohypophysis of the rabbit". *J. Endocrin.* **31**: 279-287.

Correspondencia: S. Carbajo.
Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Facultad de Medicina.
Avda. del Campo Charro s/n
37007 - Salamanca. España.

ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA ADENOHIPÓFISIS DEL RATÓN MACHO ADULTO EN DIFERENTES PERIODOS DEL DÍA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE BROMODESOXIURIDINA

CELL PROLIFERATION IN THE ANTERIOR PITUITARY OF MALE MICE AT DIFFERENT PERIODS OF THE DAY AS REVEALED BY BROMODEOXYURIDINE

E. CARBAJO PÉREZ¹ y Y.G. WATANABE

Departamento de Biología.
Facultad de Ciencias, Universidad de Niigata, Niigata, Japón.

RESUMEN

Para estudiar las variaciones circadianas en la proporción de células adenohipofisarias que están en fase de síntesis de DNA se han estudiado tres grupos de ratones machos adultos. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina, a las 6:00, a las 13:00, o a las 21:00 horas respectivamente, y fueron sacrificados tres horas más tarde. La bromodesoxiuridina incorporada a los núcleos en fase de síntesis fue revelada mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo monoclonal anti bromodesoxiuridina. La mayor densidad numérica de células marcadas con bromodesoxiuridina se encontró al mediodía (13:00-16:00 h.) y la menor en el grupo estudiado durante la noche (21:00-24:00 h.). En número de núcleos marcados fue mayor en la regiones posteriores que en las regiones anteriores de la glándula en el grupo estudiado al mediodía; sin embargo, la distribución de éstos fue casi uniforme durante la noche.

PALABRAS CLAVE: Proliferación celular, Bromodesoxiuridina, Inmunocitoquímica, Variaciones circadianas, Hipófisis, Ratón adulto.

SUMMARY

To investigate daily variations of the rate of DNA replicating cells in the anterior pituitary, bromodeoxyuridine was given intraperitoneally to adult male mice. Three groups of animal were injected at 6:00, 13:00 or 21:00 h. respectively and killed three hours later. Bromodeoxyuridine incorporated into DNA was revealed immunohistochemically using a monoclonal antibody. The density of bromodeoxyuridine-labelled cells was highest in the afternoon (13.00-16.00 h.) and lowest at night (21.00-24.00 h.). The density of labelled nuclei was greater in the posterior than in the anterior portions of the pituitary in the afternoon although it was almost the same throughout the gland at night.

KEY WORDS: Cell proliferation, Bromodeoxyuridine, Immunocytochemistry, Daily Variations, anterior pituitary, mouse.

Introducción

Se ha demostrado variaciones circadianas en los ritmos de poliferación celular en distintos órganos endocrinos tales como la glándula suprarrenal (Halberg y col. 1959; Kirillov y Kurilenko, 1977; Uerberberg y

1. Visitante becado, miembro del Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. España.

col. 1982; McNicol y col. 1989a) y la hipófisis (Hunt, 1959; Nouët y Kujas, 1975). Los datos aportados sobre el ritmo de proliferación varían de una glándula a otra, incluso existen contradicciones sobre la actividad proliferativa de una misma glándula al contrastar los resultados de distintos autores. Hunt (1943), señaló que la actividad mitótica de la hipófisis de la rata era mínima en el periodo comprendido entre las 23:00 y las 8:00 horas, mientras que Nouët y Kujas (6) describieron un pico de máxima actividad mitótica a las 6:00 h. Esta diferencia podría ser aplicada, aunque sólo parcialmente, por el uso de diferentes técnicas.

Wyndford-Thomas y Williams (1966) han descrito recientemente el método para identificar las células en fase de síntesis de DNA tras ser éste marcado mediante la administración de Bromodesoxiuridina (BrDU) in vivo. Este procedimiento se ha aplicado con éxito para el estudio de la proliferación celular en la glándula adrenal de la rata por McNicol y col. (1987) y en la hipófisis del ratón (Carbajo-Pérez y col. 1989) y de la rata durante el periodo postnatal (Carbajo-Pérez y Watanabe, en prensa). También ha sido aplicado para el estudio in vitro de la proliferación celular en la hipófisis de la rata (McNicol y col. 1989b). En el momento actual los datos en relación con las variaciones circadianas de la actividad proliferativa de la hipófisis son escasos, por ello, en nuestro estudio se ha planteado su estudio en ratones machos adultos en diferentes periodos del día utilizando la técnica de la BrDU.

Material y Métodos

Animales

Se han utilizado ratones machos adultos de la cepa DDY que se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada ($21^{\circ} \text{C} \pm 2$), fotoperiodo de luz diurna y oscuridad nocturna y alimento y agua ad libitum. Todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 0,03 g. por kg. de peso de BrDU (Amersham, U.K.) y se sacrificaron por decapitación tres horas más tarde. Para prevenir la influencia de ritmos anuales, todos los animales fueron inyectados uno o dos días después del equinoccio de primavera (salida y puesta del sol a las 5.46 y a las 17.56 respectivamente, hora local). En función de la hora de inyección (6:00, a las 13:00 o 21:00 horas) los animales fueron divididos en tres grupos ($n=4$ en cada grupo).

Procesado de las muestras y técnica inmunocitoquímica

Tras el sacrificio se extrajo la hipófisis que fue fijada durante 12-24 horas en solución de Bouin. Tras ser deshidratadas las muestras se incluyeron en parafina según los procedimientos habituales. De cada hipófisis se obtuvieron secciones frontales de 3 mm., que fueron montadas a intervalos de 120 μm . conservando la seriación en sentido antero-posterior. Tras la desparafinización las secciones se lavaron en tampón fosfato salino (PES 0.2 M, pH 7,4) y se inició la reacción inmunocitoquímica para poner de manifiesto los núcleos marcados con BrDU siguiendo un protocolo similar al descrito para un experimento previo (Carbajo-Pérez y col. 1989). Las secciones fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-BrDU más DNasa (Amersham, UK) durante 60 min. y posteriormente con suero anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. La reacción fue visualizada con 3,3'-diaminobenzicina.

Estudio morfométrico

Los núcleos marcados con BrDU fueron contados directamente al microscopio a 400 X. De cada animal se recogieron los datos de todas las secciones en una serie (9 secciones por animal). La superficie de las secciones se midió con la ayuda de un analizador de imágenes (IBAS 2000, Zeiss), calculando la densidad numérica ($DN=$

proporción del número de células marcadas con BrDU por área total estudiada) expresada como número de células marcadas/mm². Para calcular el número total de células por unidad de superficie se tiñeron algunas secciones con hematoxilina, contando el número de núcleos contenidos en un área predefinido. Independientemente del grupo estudiado se obtuvo una proporción aproximada de 10.000 células/mm², lo cual permite el cálculo indirecto del número de células marcadas con BrDU/100 células.

Para determinar la existencia de variaciones en la DN entre distintas zonas de la pars distalis, se calculó la DN en tres regiones: anterior (Secciones a 120, 240 y 360 mm del polo anterior de la hipófisis), medio (480, 600 y 720 mm) y posterior (840, 960 y 1080 mm). Para la comparación de medidas se utilizó el test *t* de Student.

Resultados

Los núcleos marcados con BrDU se identificaron con facilidad incluso a pocos aumentos (Figs. 1 y 2) y, aunque distribuidos por toda la glándula, los núcleos marcados parecían ser más numerosos hacia las porciones dorsales del lóbulo anterior.

La densidad numérica (DN) en los grupos inyectados a las 6:00 y a las 13:00 fue significativamente mayor ($p > 0,05$) que en el grupo de animales estudiado durante la fase de oscuridad (Tabla 1). En el grupo inyectado a las 13:00 h. la DN fue mayor que en el de las 6:00 h. aunque esta diferencia no tuvo carácter estadísticamente significativo.

Hora de inyección	número de animales	área total estudiada (mm ²)	Núcleos n° total	marcados con BrDU núcleos/mm ²
6:00	4	31.3	810	27±4*
13:00	4	28.3	869	31±5*
21:00	4	26.2	493	19±3

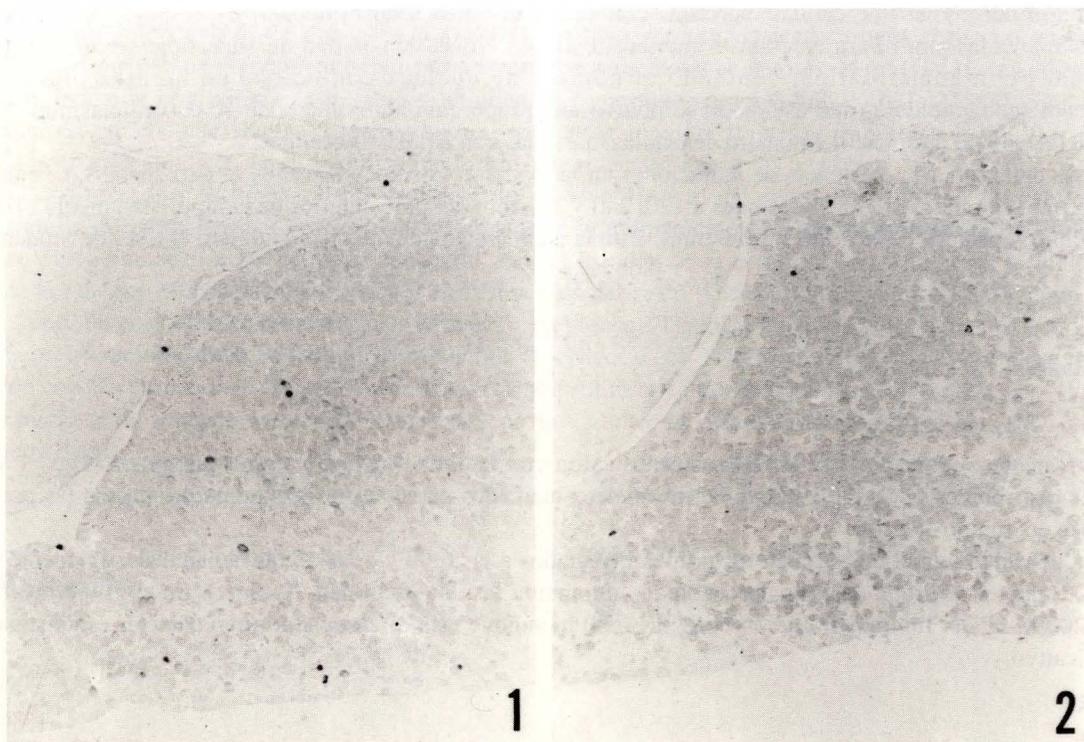
TABLA 1. Densidad numérica de núcleos marcados con BrDU (DN= núcleos/mm²) en el lóbulo anterior de la hipófisis de ratones machos adultos en tres periodos diferentes del día. Valores expresados como media ± error estandar de las medias.

Diferencia significativa con el valor correspondiente al del grupo inyectado a las 21:00 horas (test *t* de Student, $p < 0,01$).

No se han encontrado diferencias entre las DNs de las regiones anterior, media y posterior del lóbulo anterior de la hipófisis en los animales inyectados por la noche. En los otros dos grupos la DN fue mayor en la región posterior (Fig. 3).

Discusión

La técnica para la identificación de células en fase de síntesis de DNA tras la inyección in vivo de BrDU ha demostrado su utilidad para el estudio de la proliferación celular en la hipófisis (Carbajo y col. 1989, Carbajo y Watanabe, en prensa). Este método, por su relativa simplicidad, podría llegar a ser aplicado de forma rutinaria en el estudio de los complejos problemas que plantean la proliferación y la diferenciación celular en la hipófisis (Carbajo-Pérez y col. en prensa). La escasez de datos acerca de las variaciones circadianas del ritmo de



FIGURAS 1 y 2. Visión parcial de dos secciones frontales de la hipófisis de ratones machos adultos inyectados con BrDU tres horas antes del sacrificio. Los puntos negros corresponden a núcleos inmunoreactivos a la BrDU. Se hace evidente que en la Fig. 1, correspondiente a un animal inyectado a las 13:00 h. el número de núcleos marcados es mayor que en la Fig. 2, que corresponde a un animal inyectado a las 21:00 h. 140 X.

FIGURA 3. Densidad numérica de los núcleos marcados con BrDU en las regiones anterior (A), media (M) y posterior (P) del lóbulo anterior de ratones macho adultos en tres periodos diferentes del día (u 13:00-16:00; ñ 6:00-9:00; n 21:00-24:00). Se representan medias \pm ES. Los valores marcados con el mismo superíndice son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,01$, tes *t* de Student).

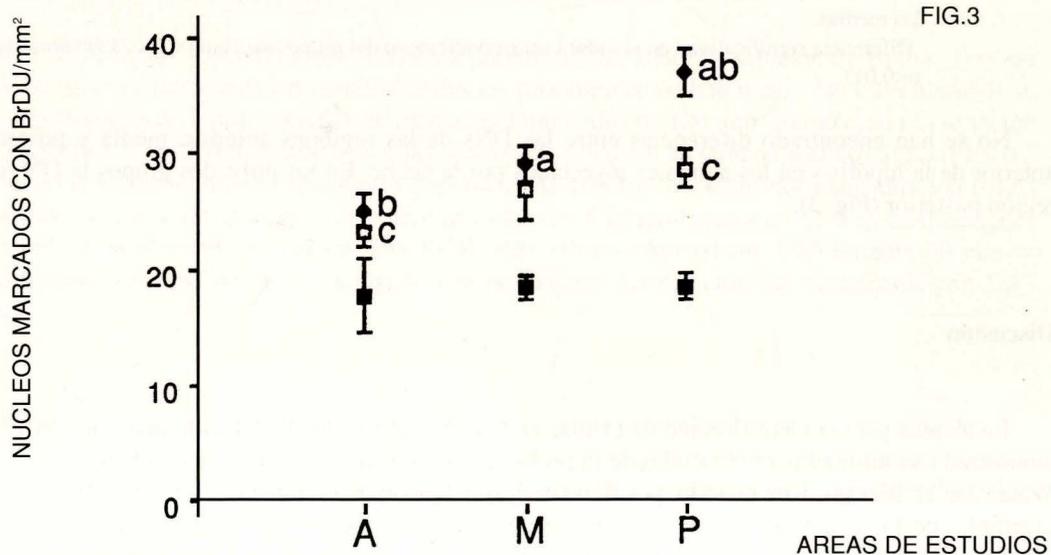


FIG.3

proliferación celular en la hipófisis nos indujo a plantear el estudio y cuantificación de las células marcadas tras la administración de BrDU en tres diferentes periodos del día.

Hemos encontrado que el índice de células en fase síntesis es mayor durante la fase de luz, con valores máximos alrededor del medio día, mientras que la proliferación celular disminuye por la noche. Comparar nuestros datos con los obtenidos por otros autores no es tarea fácil dado que no se cuenta con un patrón claro de correlación entre el ritmo de síntesis de DNA y el ritmo mitótico en diferentes tejidos, siendo este último el procedimiento empleado generalmente para cuantificar la actividad proliferativa. Barbason y col. (1987) han descrito en el hígado de la rata que las fases del ritmo de síntesis de DNA preceden en 9 horas a las de mitosis. Sin embargo, en la zona *fasciculata* de la corteza adrenal de la rata, Uerberberg y col. (1982) han descrito que los dos picos, el de síntesis y el de mitosis son casi simultáneos. Complicando más esta relación, Uerberberg y col. (1983) describieron que la actividad de síntesis de DNA y el ritmo mitótico varían independientemente el uno del otro en la zona *glomerulosa*, habiéndose obtenido resultados similares por Scheving y Pauli (1967) en el epitelio corneal.

En nuestro experimento no ha sido posible determinar la relación entre el ritmo de síntesis de DNA y el ritmo mitótico en la hipófisis, ya que aunque se intentó hacer una valoración de la actividad mitótica en secciones teñidas con hematoxilina férrica, la cuantificación precisa del número de mitosis no fue posible debido al número extraordinariamente pequeño de figuras de metafase y a la gran dificultad que entraña la correcta identificación de núcleos en profase. Considerando los datos aportados por otros investigadores en relación con el ritmo circadiano de la actividad mitótica hipofisaria, encontramos que Nouët y Kujas (1975) describieron un pico mitótico muy marcado a las 6:00 h. en ratas macho sacrificadas por perfusión con la solución de Bouin-Holland. En contraste, Hunt (1943) encontró el punto máximo de actividad mitótica a las 24:00 h. en ratas hembras que habían sido tratadas con colchicina 9 horas antes. Una comparación directa entre los datos de estos investigadores no es posible dado a las diferentes técnicas empleadas y, además, porque en el momento actual no se conoce hasta qué extremo el sexo puede afectar el ritmo circadiano de mitosis.

En nuestro estudio las mayores modificaciones en el número de células en fase de síntesis se han observado en la región posterior de la glándula. La mayor DN de los grupos de animales correspondientes a los intervalos 6:00-9:00 y 13:00-16:00 h. fue debido fundamentalmente a un mayor número de células marcadas con BrDU en las porciones posteriores de la glándula. Las diferencias entre el grupo estudiado en la fase de oscuridad (con la menor DN) y los otros dos grupos, han sido más llamativas en la porción posterior que en la anterior de la pars distalis. Al demostrarse que no existen diferencias significativas en la DN global de los animales inyectados a las 6:00 y a las 13:00 horas, pero que la DN obtenida en las porciones posteriores del lóbulo anterior en estos dos grupos es significativamente diferente, también hace pensar en una mayor contribución de las porciones posteriores del lóbulo anterior de la hipófisis en las variaciones circadianas de la proliferación celular en esta glándula.

La distribución de células en mitosis ha sido descrita como uniforme en el tejido hipofisario por Hunt (1947). Tampoco Shirasawa y Yoshimura (1982) ni Sakuma y col. (1984) encontraron diferencias regionales al estudiar la actividad mitótica en secciones coronales de la hipófisis de ratas macho. En estos experimentos, el sacrificio de los animales tuvo lugar a las 6:00 h., tres horas después de la inyección de colchicina, basándose en el gran pico de la actividad mitótica que debía tener lugar a las 6:00 h. según describieron Nouët y Kujas (1975). Sin embargo, de acuerdo con Hunt (1943) este periodo correspondería al de menor actividad mitótica durante el día. Como se ha mencionado antes, modificaciones del ritmo de la actividad de síntesis podrían preceder en varias horas a las modificaciones de la actividad mitótica. Si esta hipótesis fuera cierta, nuestros datos y los de Hunt (1943) estarían estrechamente relacionados. De forma consiguiente, la distribución uniforme de los núcleos con BrDU en el grupo de animales estudiados en el periodo de oscuridad, cuando la actividad de síntesis es mínima, se podría corresponder con la distribución homogénea de las figuras mitóticas descrita por Shirasawa y Yoshimura (1982) y Sakuma y col. (1984) en el tejido hipofisario.

BIBLIOGRAFÍA

BARBASON, H.; HERENS, CH.; MORTMONT, M.C. y BOUZAHZAN, B. (1987): Circadian synchronization of hepatocyte proliferation in young rats: the role played by adrenal hormones. *Cell Tissue Kinet.* **20**: 57-67.

- CARBAJO-PÉREZ, E. y WATANABE, Y.G. (en prensa): Cellular proliferation in the rat anterior pituitary during the postnatal period. (Cell Tissue Res.).
- CARBAJO-PÉREZ, E.; MOTEGI, M. y WATANABE, Y.G. (1989): Cell proliferation in the anterior pituitary of mice during growth. *Biomed. Res.* **10**: 275-281.
- CARBAJO-PÉREZ, E.; CARBAJO, S.; RUBIO, M. y VÁZQUEZ, R. (en prensa): Proliferación celular en la hipófisis de la rata: especial consideración a las células gonadótropas. (*An. Anat.*).
- HALBERG, F.; PETERSON, R.E. y SILBER, R.H. (1959): Phase relations of 24 hour peridocities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma, and total activity. *Endocrinology* **64**: 222-230.
- HUNT, T.E. (1943): Mitotic activity in the anterior hypophysis of female rats of different age groups and at different periods of the day. *Endocrinology* **32**: 334-339.
- HUNT, T.E. (1947): Mitotic activity in the anterior hypophysis of ovariectomized rats after injection of estrogens. *Anat. Rec.* **97**: 127-137.
- KIRILLOV, O.I. y KURILENKO, L.A. (1977): Adrenal cortex of mice: circadian cycle of mitotic activity and volume of cell nuclei. *Endokrinologie* **69**: 112-114.
- McNICOL, A.M. y DUFFY, A.E. (1987): A study of cell migration in the adrenal cortex of the rat using bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet.* **20**: 519-526.
- McNICOL, A.M.; PENMAN, I.D. y DUFFY, A.E. (1989a): Age-related variation in circadian rhythms of mitosis in the adrenal cortex of the male rat. *J. Endocrinol.* **120**: 207-310.
- McNICOL, A.M.; MURRAY, J. y McMEEKIN, W. (1989b): The effects of AVP and CRF-41 on DNA synthesis in rat pituitary cells in vitro. *J. Endocr. Inves.* **12**, suppl. 2 to no. 5, P 144.
- NOUËT, J.C. y KUJAS, M. (1975): Variations of mitotic activity in the adenohypophysis of male rats during a 24-hour cycle. *Cell Tissue Res.* **164**: 193-200.
- SAKUMA, S.; SHIRASAWA, N. y YOSHIMURA, F. (1984): A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophysial cells in immature and mature castrated rats. *J. Endocrinol.* **100**: 323-328.
- SCHEVING, G. y PAULI, J.E. (1967): Circadian phase relationships of thymidine-3H uptake, labelled nuclei, grain counts and cell division in rat corneal epithelium. *J. Cell Biol.* **32**: 677-683.
- SHIRASAWA, N. y YOSHIMURA, F. (1982): Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohypophysial cells in different ages of rats. *Anat. Embriol.* **165**: 51-61.
- UERBERBERG, H.; STOLZ, W. y TRIEB, G. (1982): Autoradiographic studies of the diurnal rhythm of the cell proliferation in the adrenal cortex of the rat. *Path. Res. Pract.* **173**: 183-190.
- WYDNFORD, D. y WILLIAMS, E.D. (1986): Use of Bromodeoxyuridine for cell kinetic studies in intact animals. *Cell. Tissue Kinet.* **19**: 179-182.

Correspondencia: Dr. E. Carbajo-Pérez
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Campo Charro s/nº
37007 Salamanca. España.

ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA DE LA ARTERIA VERTEBRAL HUMANA STRUCTURAL AND ULTRAESTRUCTURAL STUDY OF HUMAN VERTEBRAL ARTERY

M. CROVETTO, A. TORRES, A. MUNICIO, M. MUNICIO, R. SARRAT.

Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza.
Departamento Universidad del País Vasco.

RESUMEN

Reconocemos cuatro segmentos en la Arteria Vertebral, de acuerdo con criterios anatomorradiológicos y anatomoquirúrgicos: Segmento pretransversario, transversario, occipito-atloideo e intracraneal. En este trabajo nos ocupamos de estudiar la morfología microscópica y ultramicroscópica de los diferentes segmentos arteriales citados. De acuerdo con nuestros hallazgos el segmento pretransversario de la Arteria Vertebral corresponde a una arteria elástica, de forma progresiva la arteria se transforma en una arteria muscular. Dentro del segmento transversario hay diferencias morfológicas notables, dependiendo de su relación con el trayecto intravertebral o intervertebral de la arteria.

PALABRAS CLAVE: Arteria Vertebral, estructura y ultraestructura.

SUMMARY

We accept four segments in the vertebral artery, according with anatomochirurgical and anatomoradiological knowledge: pretransversary, transversary, suboccipital and intracranial segments. In this paper we study the structural and ultrastructural findings of these different arterial segments. According to our findings pretransversary segment is a typical elastic artery. Advancing upward the artery becomes a muscular artery. In the transversary segment there are structural and ultrastructural differences depending on its relation with intravertebral or intervertebral part of the artery.

KEY WORDS: Vertebral artery, structural morphology, ultrastructural morphology.

Introducción

La Arteria Vertebral (AV) de acuerdo con los trabajos de LANG (1965), BARGMANN (1968), PIFFER y ZORETTO (1980) entre otros, puede dividirse, de acuerdo con criterios anatomorradiológicos y anatomoquirúrgicos en 4 segmentos:

- 1- *Segmento Pretransversario* o V1, que comprende el fragmento arterial situado entre el origen subclavio de la arteria y su punto de penetración transversaria.
- 2- *Segmento transversario* o V2, que comprende la porción arterial que va desde su punto de penetración transversaria, en el agujero vertebral de la sexta vértebra, hasta el espacio intertransversario situado entre las vértebras cervicales segunda y tercera. El segmento V2 puede dividirse en dos: el tramo transversario que queda cubierto por el canal óseo de las apófisis transversas de las vértebras cervicales, denominado intraóseo, y el transversario extraóseo que queda entre los canales transversos de las vértebras.
- 3- *Segmento Occipito-Atloideo* o V3.
- 4- *Segmento Intracraneal* o V4, que se corresponde con el segmento arterial localizado en dicha región.

A la vista de los antecedentes reseñados y comprobada la existencia de lagunas y discordancias entre ellos, nos proponemos realizar un estudio de la Arteria Vertebral humana en sus distintos tramos.

Material y Métodos

Se han estudiado los siguientes especímenes:

7 pares de arterias de neonatos (menos de 48 horas de vida); 5 pares de arterias de niños fallecidos entre los 2 y los 8 años de edad; 25 pares de arterias de adultos fallecidos entre los 25 y los 80 años de edad.

Todas las arterias vertebrales, han sido procesadas para su estudio a microscopía de luz, y ocho vertebrales del grupo 3 lo han sido para su estudio ultraestructural.

El procesado del material ha sido realizado de forma rutinaria, utilizando las coloraciones de Orceina, Azan, Klüver-Barrera, Verhoef y Fucsina paraldehído de gabe en cuanto a las preparaciones destinadas al estudio estructural, y siguiendo los pasos estandarizados para el material con destino al microscopio electrónico de transmisión.

Resultados

Los hallazgos obtenidos en este estudio los vamos a dividir en 2 apartados fundamentales:

A) Resultados obtenidos con microscopía de luz y técnicas histológicas de rutina.

B) Aportaciones procedentes del estudio ultraestructural.

A) La *estructura* mural de la A.V. del neonato se caracteriza por su debilidad, faltando el tejido elástico en la Túnica Media (TM). Durante la infancia se desarrollan primero las láminas elásticas externas (LEE) e interna (LEI). Posteriormente con el paso al periodo escolar y juvenil aparecen las fibras elásticas, progresivamente más numerosas, en la TM.

En lo que a morfología de la AV adulta se refiere, vamos a comentar algunas diferencias estructurales observadas en sus distintos segmentos, a microscopía óptica.

- 1.- La AV tiene una estructura mural elástica en los primeros milímetros del segmento pretransversario V1, pero antes de que haya transcurrido un centímetro ya ha adquirido una estructura mural típicamente muscular. Destaca la nitidez de la MEI, una MEE más tenue y una vigorosa adventicia.
- 2.- El tramo V2 no presenta variaciones con respecto al anterior en lo que MEI, se refiere, pero destaca la drástica reducción de material elástico en la TM. Existe una diferencia entre la estructura adventicial de las porciones intraósea y extraósea del segmento arterial V2, consistente en un mayor vigor de esta membrana en el tramo extraóseo.
- 3.- El tramo V3 presenta una gruesa pared que vuelve en ocasiones a tener material elástico esporádicamente en su túnica media, a la vez que una considerable adventicia.
- 4.- La porción V4 Intracraneal, presenta un importante adelgazamiento de la TM, ausencia total de material elástico, la íntima algo engrosada y muy poca definición de las MEI y sobre todo MEE. Llama la atención, en contra de algunas descripciones, la abundante adventicia.

En el estudio que acabamos de realizar sobre la Arteria Vertebral, no hemos encontrado (y entendemos que es un dato negativo de interés) en ninguno de sus segmentos, dispositivos reguladores del flujo tipo 'PADS', como se han descrito en otras arterias de la economía.

B) En cuanto a los hallazgos habidos en el estudio ultraestructural queremos destacar aquellos más significativos, sistematizándolos y agrupándolos en sus diferentes segmentos arteriales:

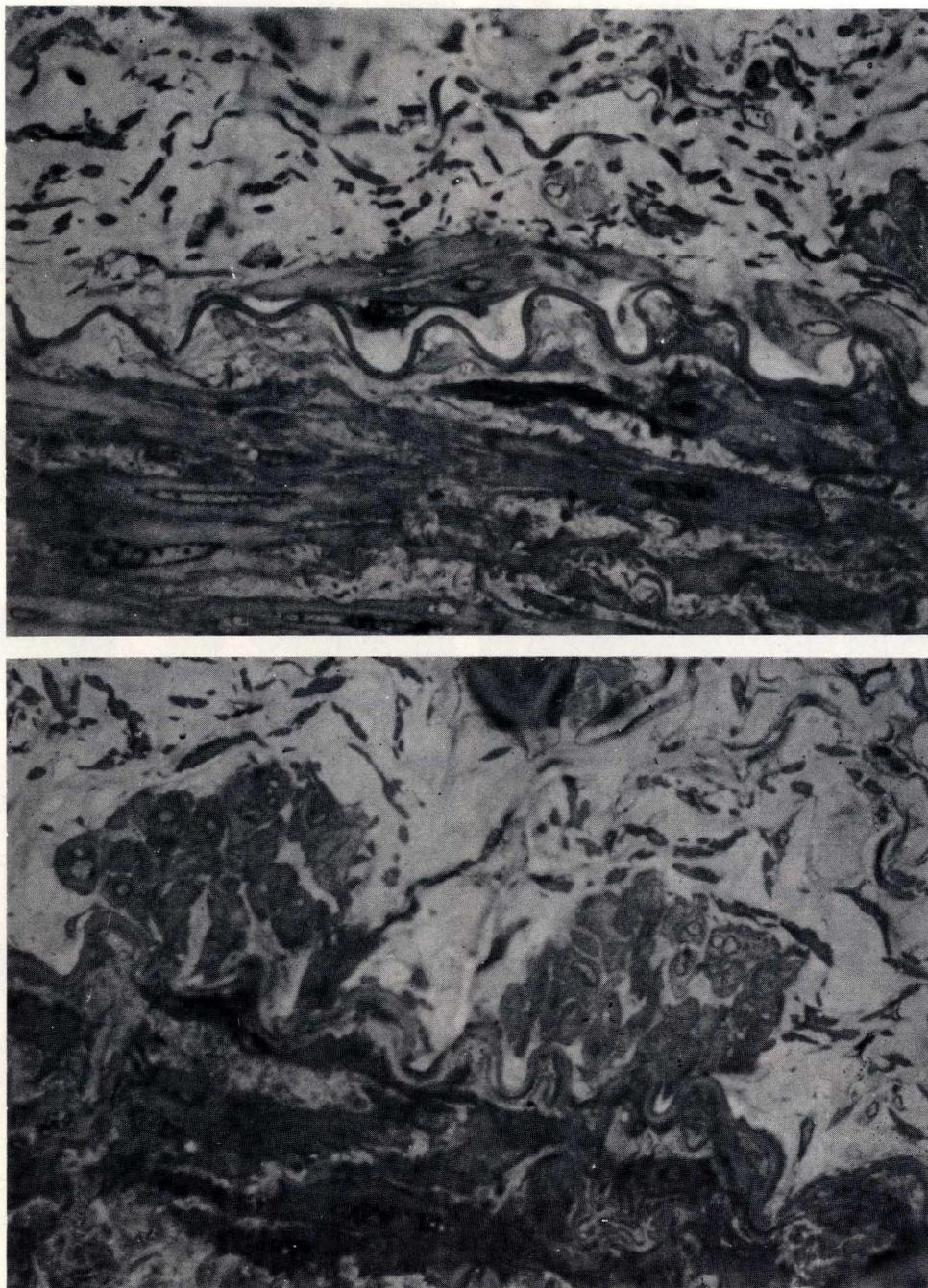


FIGURA 1. Adventicia de la arteria vertebral humana. Segmento V1. Nótese en a) fibras musculares lisas “ancladas” en la lámina elástica externa muy bien delimitada; y en b) haces de fibras musculares seccionados de través. Cortes semifinos. Azul de toluidina

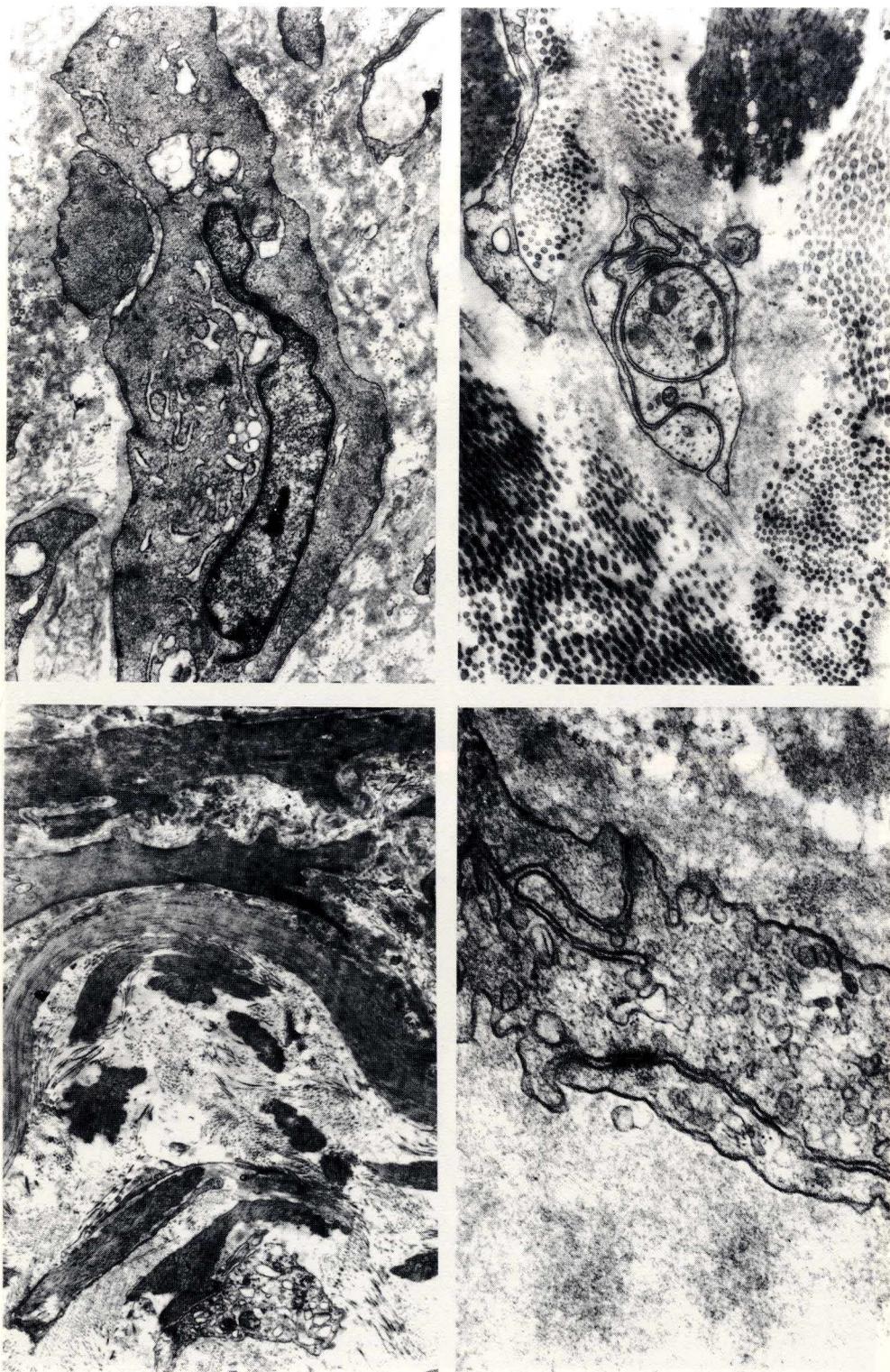


FIGURA 2. Arteria vertebral humana. a) Miofibroblasto del espacio subintimal.
b) Detalle de la lámina elástica externa a nivel del segmento V2 (extraóseo).
c) Adventicia del segmento V3. Nótese una fibra nerviosa amielínica.
d) Detalle de las uniones intercelulares a nivel de la íntima.

1.- En el *segmento Pretransversario* (V1) la íntima de la Vertebral está compuesta por un endotelio que descansa sobre un espacio subendotelial muy ancho y muy celular. Una neta MEI separa ésta capa de la TM. Las características del endotelio no difieren de las encontradas a otros niveles de las AV, y son las siguientes:

1 a.- Abundancia de vesículas micropinocíticas que se acumulan preferentemente en las proximidades de la luz y de la membrana basal.

1 c.- Abundancia de microfilamentos, cuerpos de Palade, mitocondrias, algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso y otros orgánulos citoplasmáticos.

La capa de células endoteliales descansa sobre una membrana basal continua, a través de la cual se une al espacio subendotelial.

Entre la lámina elástica interna y el endotelio íntimo pueden encontrarse tres tipos de células: musculares lisas, fibroblastos y miofibroblastos.

La membrana elástica externa es neta y continua y destaca su relación con fibras musculares, dispuestas en grupos, o aisladamente, por su cara adventicial.

2.- *Segmento V2 intraoseo o intratransversario*: La íntima de éstos segmentos presentan un adelgazamiento del espacio subendotelial, alcanzando a formarse 8 capas de células como media, compuestas por fibroblastos, miofibroblastos y fibras musculares. La MEI es continua, festoneada y vigorosa. En la capa media se observan abundantes fibras musculares, circularmente dispuestas, y manteniendo frecuentes contactos entre ellas. Destaca la disminución del material elástico en la media, aunque es la fibra conectiva más frecuentemente observada en esta región. La LEE es en los segmentos transversarios intraoseos más caudales continua y neta, siendo más delgada y discontinua en los homónimos más craneales.

La adventicia de todos estos segmentos V2 intraespinosos es delgada, predominando la colágena sobre los demás componentes conectivos.

Segmento V2 extraoseo o extratransversario: Las únicas diferencias respecto al segmento V2 intraoseo es que existe un engrosamiento del espacio subendotelial que alcanza las 12 hileras celulares como media, no variando sin embargo los tipos celulares constitutivos del referido espacio subendotelial. La LEE del segmento extraoseo es claramente más gruesa que su homónima intraosea.

3.- *Segmento Suboccipital*. La íntima está constituida por un endotelio que descansa sobre un espacio subendotelial constituido por unas 10 hileras de células.

Aunque la MEI mantiene todo su vigor y características de continuidad y grosor, la MEE es delgada y discontinua. La Adventicia es muy rica en colágeno y tiene un grosor similar al observado por la Adventicia del segmento arterial V2 extraoseo. Con frecuencia se ven fibras amielínicas rodeadas de material conectivo.

4.- *En el segmento intracraneal V4* destaca el grosor relativo de la íntima respecto de las otras tunicas arteriales, aunque su espacio subendotelial solo tenga 8 capas de células. Existe una nítida MEEI, pero falta la MEE y no pueden verse fibras elásticas en la TM; así mismo destaca la menor celularidad de la capa media, que comporta una relativa delgadez de dicha capa. La Adventicia es más gruesa que en todo el territorio Transversario y Suboccipital, alcanzando prácticamente el grosor del segmento pretransversario.

Pueden observarse algunos "vasa vasorum" en la Túnica Adventicia de cualquiera de los segmentos precedentemente descritos. Las fibras amielínicas, cualquiera que sea el segmento del vaso estudiado, sólo las hemos observado en la túnica adventicia, salvo en una ocasión en la que hemos tenido la oportunidad de encontrar una fibra amielínica en íntima relación con una célula muscular de la túnica media.

Discusión

Desde los trabajos de Argaud (1909), Dubreuil y Lacoste (1931) y Piffer y Zoretto (1980), se conoce a la Arteria Vertebral como un vaso típicamente muscular; otros autores como Lang (1965) o Bargmann (1968) encuadran a la arteria entre las elásticas. A éste respecto debemos indicar que después de observar los cambios estructurales que dicha arteria sufre a lo largo de su recorrido, entendemos que ambas tendencias son perfectamente compatibles. Los autores que aseveran la cualidad elástica de la arteria sólo pueden basarse en el estudio de los primeros milímetros del segmento pretransversario del vaso. A partir de ésta zona la arteria

adquiere un carácter típicamente muscular. Wilkinson (1972) indica que al penetrar la arteria en la duramadre disminuye el colágeno de su Adventicia. Piffer y Zoretto (1980) indican lo contrario. Después de nuestro estudio estamos de acuerdo con éstos últimos, ya que hemos podido constatar el paso de fuertes fascículos colágenos, que atan la Adventicia a la duramadre en su punto de penetración en esta.

Con respecto a los distintos segmentos en que hemos dividido a la arteria Vertebral, estamos en completo desacuerdo con Wilkinson (1972), quien afirma que esta arteria no sufre cambios estructurales a todo lo largo del recorrido que hace desde su origen hasta 1 cm. antes de perforar la duramadre. La arteria Vertebral varía progresiva y significativamente de uno a otro segmento y aún dentro del segmento V2 hemos observado notables diferencias en la estructura mural, dependiendo de la posición extra o intratransversaria. La "protección" del hueso vertebral es responsable de estas diferencias morfológicas, tanto en el nivel estructural como en el ultraestructural. Estas diferencias, especialmente significativas en lo que al grosor del espacio subendotelial y de la Adventicia se refieren, no habían sido previamente descritas.

BIBLIOGRAFÍA

- ARGENSON, C.; FRANCKE, J.P.; SYLLA, S.; DINTIMILLE, H.; PAPASIAN, S. y MARINO, V.: Les Arteres Vertebrales. *Anat. Clin.* **2**: 29-41 (1979).
- ARGAUD, D.: Recherches sur l'histopathologie des elements contractiles et conjonctifs des parois arterielles chez les molusques et les vertebres. *J. Anat. Phys. norm. et Pathol., Paris*, **45**: 95-96 (1909).
- DUBREUIL, G. y LACOSTE, A.: Histophysiologie des parois vasculaires arterielles et veineuses de l'homme. *Ann. Anat. Pathol., Paris*, **8**: 988-1041 (1931).
- PIFFER, C.R. y ZORETTO, N.L.: Microscopic anatomy of the Vertebral artery in the suboccipital and intracranial. *Anat. Anz. Jena*, **147**: 382-388 (1980).
- LANG, J.: Mikroskopische Anatomie der Arterien. *Angiol., Base* **2**: 225-284 (1965).
- BARGMANN, W.: Histología y Anatomía microscópicas humanas. Ed. Labor, Barcelona (3ª ed.): 259-303 (1968).
- WILKINSON, I.M.S.: The vertebral artery. The extracranial and intracranial structure. *Arch. Neurol.*, **27**: 392-396 (1972).

Correspondencia: M.A. Crovetto de la Torre
Maximo Aguirre 5-4B.
Las Arenas . Vizcaya . España.

TIPOS DE NEURONAS PIRAMIDALES EN LAS CAPAS II Y III DE LA CORTEZA CEREBRAL DEL CONEJO

TYPES OF PYRAMIDAL NEURONS IN LAYERS II AND III OF THE RABBIT CEREBRAL CORTEX

S.M. GOMEZ-URQUIJO, J.L. BUENO-LÓPEZ, C. REBLET, A. LOPEZ MEDINA,
M.J. MASEDA ARMESTO

Sección de Anatomía Departamento de Neurociencias.
Universidad del País Vasco.

RESUMEN

Hemos estudiado con técnicas de impregnación argéntica la morfología de las neuronas piramidales de las capas II y III. Hemos encontrado dos tipos distintos de células. Uno de ellos presentaba dendritas basales horizontales o descendentes, colaterales axónicas principalmente horizontales y soma de perfil triangular. El otro tipo de neurona piramidal es de soma redondeado, dendritas basales con mayor frecuencia ascendentes y colaterales axónicas verticalizadas u oblicuas ascendentes. Es plausible que existiendo tales diferencias en los campos dendríticos las aferencias a ambos tipos de neuronas sean distintas. Por otra parte la diferente colateralización axonal sugiere diferencias en los blancos sinápticos.

PALABRAS CLAVE: Morfología neuronal, Neocortex, Golgi.

SUMMARY

We have studied with the rapid Golgi method the morphology of the pyramidal neurons in layers II and III of the cerebral cortex. We have found two distinct types of pyramidal neurons. The first type displayed horizontal or descending basal dendrites, horizontal axon collaterals and triangular somatic shape. The second type presented rounded soma, radially arising from the somata basal dendrites and vertical or ascending axonal collaterals. Owing to the differences in the dendritic patterns it is conceivable that the input to both types of neurons are different. On the other hand, the distinct axonal collateralization suggest for both types different synaptic targets.

KEY WORDS: Neural morphology, Neocortex, Golgi.

Introducción

Desde las primeras observaciones microscópicas de la corteza cerebral se pudieron comprobar dos características peculiares como son su organización en capas y la presencia de unas células de sección triangular. Estas células pronto fueron denominadas neuronas piramidales o pirámides cerebrales y al ser observadas con métodos que demostraban toda la morfología neuronal, se comprobó que compartían otras características de importancia. Las principales son la presencia de abundantes espinas dendríticas, una prominente dendrita apical, varias dendritas basales que nacen de la zona opuesta y, principalmente, un axón de proyección que penetra en la sustancia blanca. También se pudo observar que su perfil no siempre era piramidal e incluso se consideraron

Tipos de neuronas piramidales de las capas II y III de la corteza cerebral del conejo.

FIGURA 1-(A). Representación de la distribución del árbol basal de ambos tipos celulares. En abscisas se colocan las distancias entre los puntos de intersección (en micras) y en ordenadas los valores medios de intersecciones. Se representan con círculos llenos las intersecciones de las dendritas basales de las neuronas triangulares y con círculos huecos las correspondientes a las neuronas redondeadas. La diferencia es especialmente marcada en las primeras 70 mm. (B): Esquema de las características más importantes de las neuronas piramidales triangulares: forma somática triangular, dendritas basales de división paulatina y confinadas al espacio sub-somático y colaterales axónicas horizontales. (C): Esquema de las características más importantes de las neuronas piramidales redondeadas incluyendo la forma somática, las dendritas basales ocupando niveles radiando desde el soma y dividiéndose en penachos, y las colaterales axónicas ascendentes.

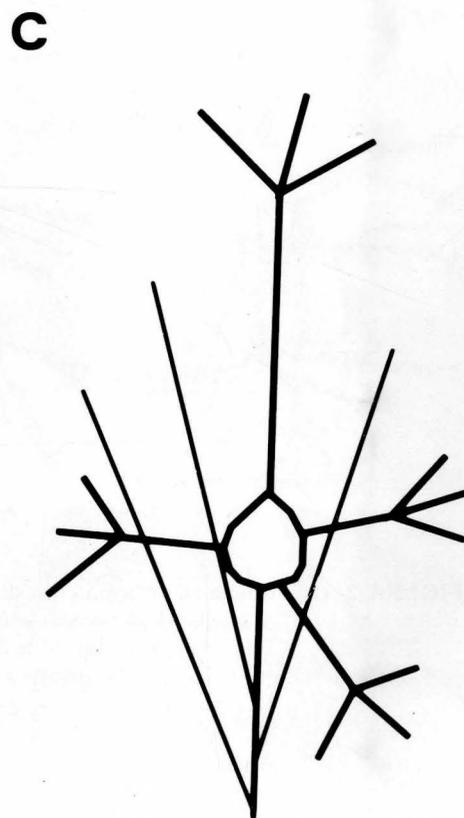
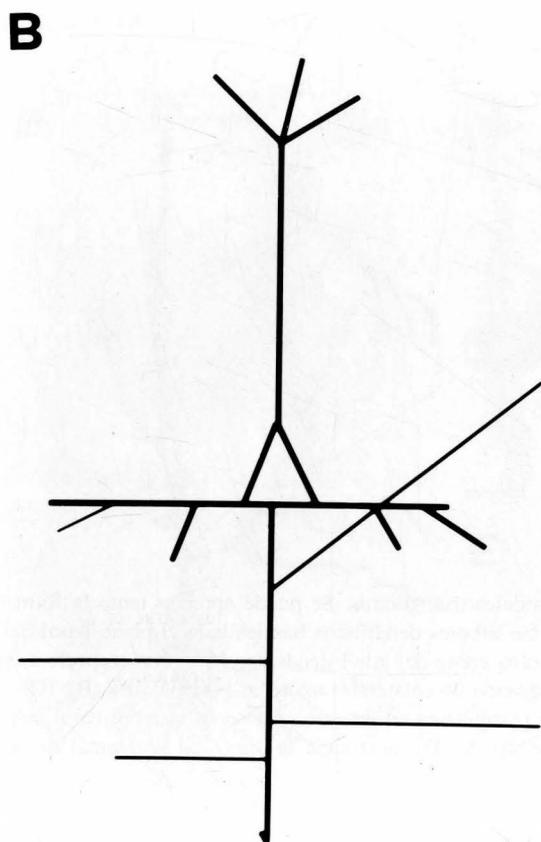
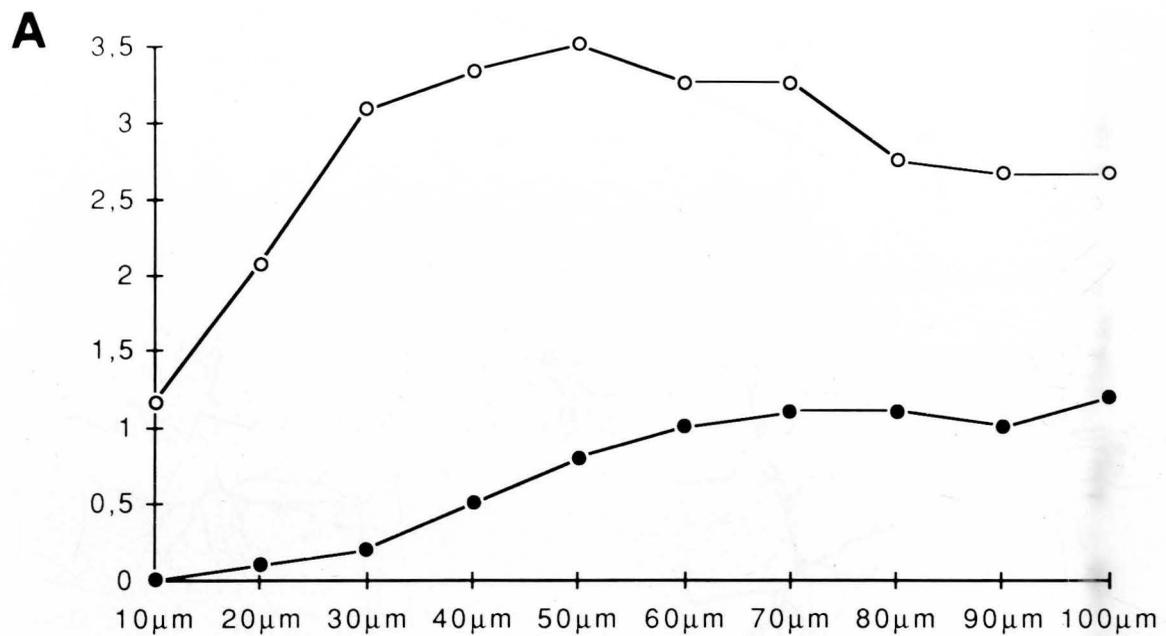




FIGURA 2- (A). Dibujo con cámara clara de cuatro células piramidales triangulares. Se puede apreciar tanto la forma triangular de sus somas como la distribución de sus árboles dendríticos basales bajo el plano basal del soma. Obsérvese en (3) la inclinación tanto del soma como del árbol dendrítico basal con respecto a la línea normal a la superficie pial. Se aprecia la aparición de colaterales axónicas horizontales. (B), (C) y (D): Microfotografías de dos células piramidales triangulares en las que se observa el árbol basal sub-somático y la forma triangular del soma. (E) Detalle de (D) mostrando la dirección horizontal de las dendritas basales.

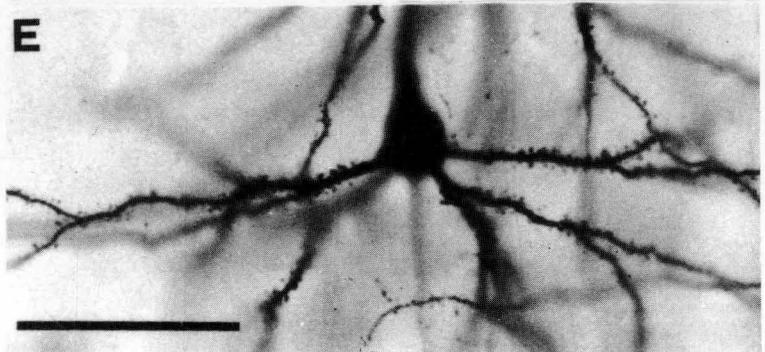
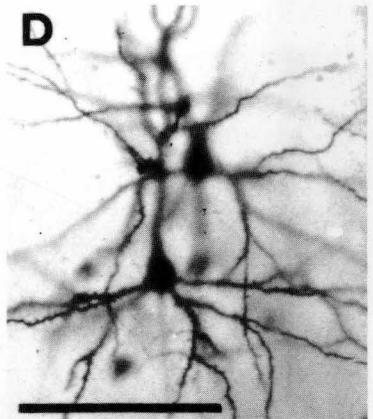
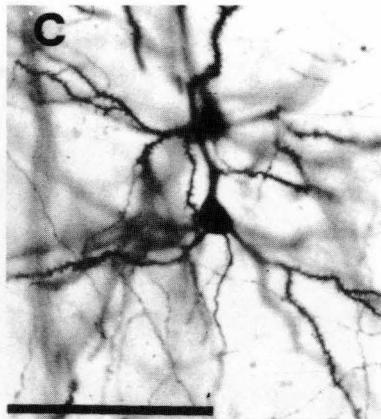
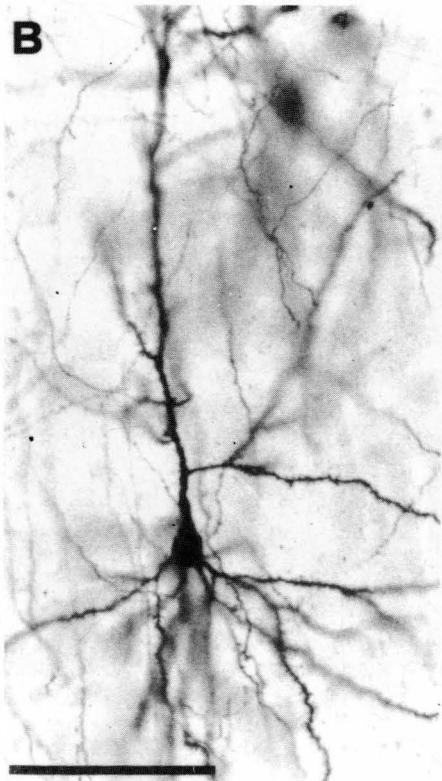




FIGURA 3-(A). Dibujo con cámara clara de cuatro células piramidales redondeadas con su característica forma somática, la división de las dendritas basales en penachos y las colaterales axónicas verticalizadas. Nótese especialmente la profusa colateralización vertical de la neurona (2). (B), (C) y (D): Microfotografías de células piramidales redondeadas en las que se aprecia la forma somática y la división de las dendritas basales en "Y" o "en penacho".

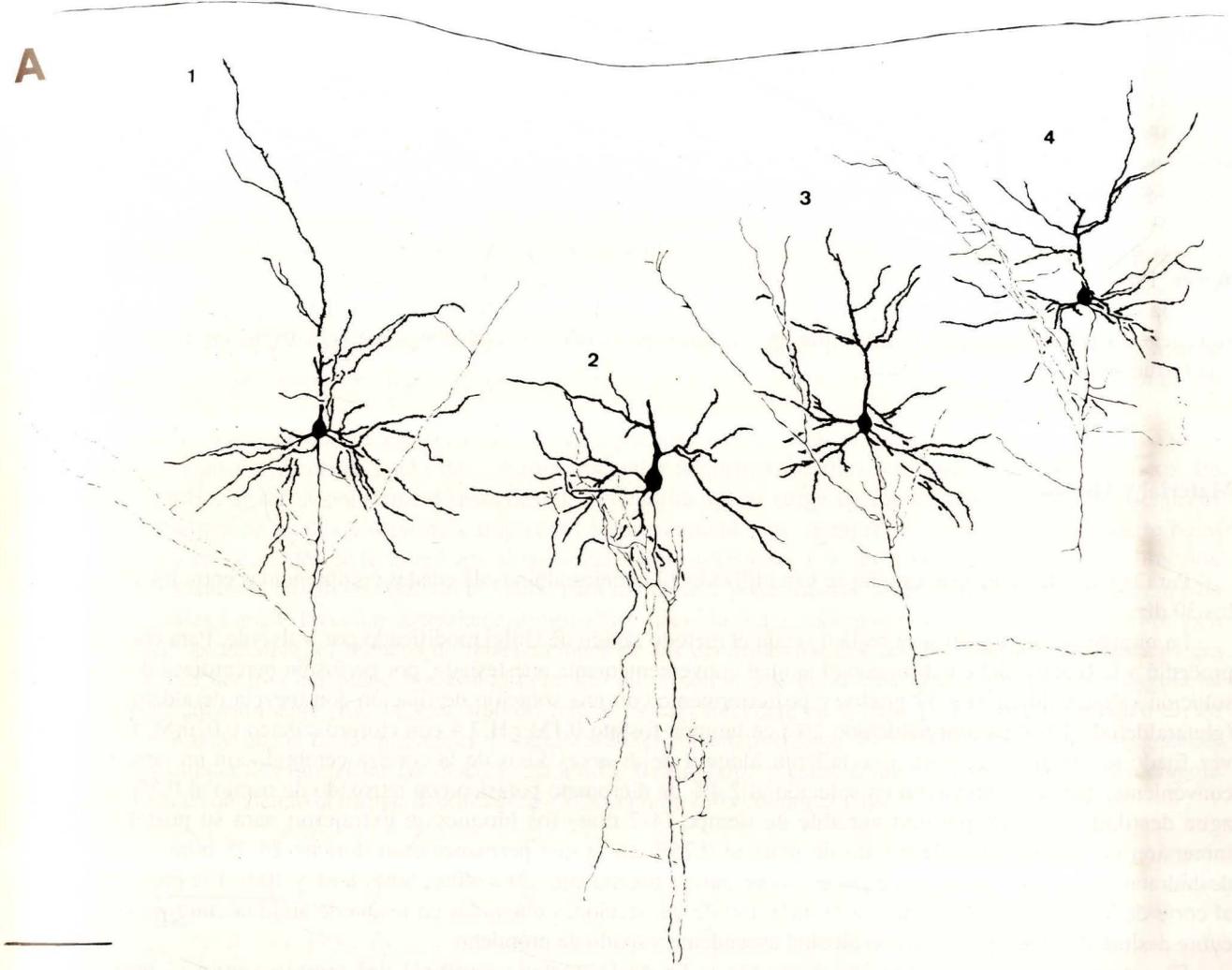
A

1

4

3

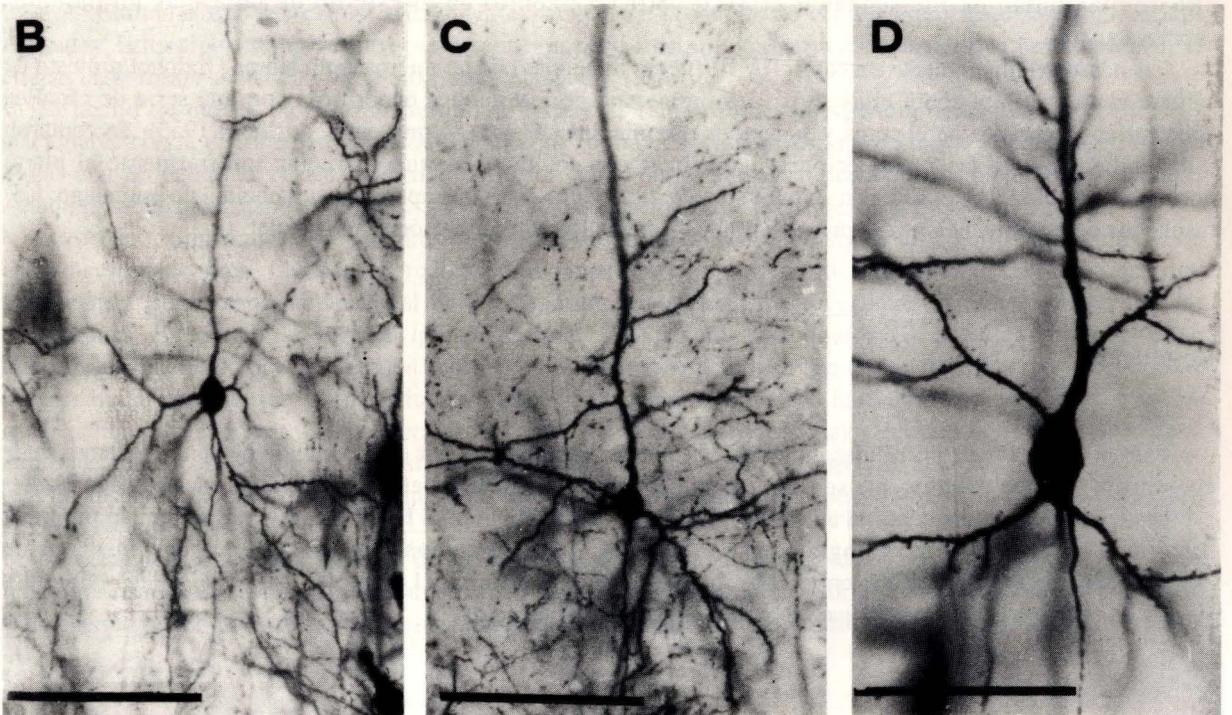
2



B

C

D



como células piramidales algunas neuronas cuya forma se alejaba de la pirámide ideal hasta llegar a presentar un perfil semilunar como son las pirámides modificadas descritas por Lorente de Nó (1922).

Estudios anteriores sobre morfología de las neuronas piramidales hacían hincapié principalmente en la distribución por tamaños (Peters y Kara, 1985). Sin embargo se ha comprobado que las diferencias en la morfología somática de las células piramidales y su patrón de distribución dendrítica en ocasiones está en relación con diferentes propiedades fisiológicas (Deschenes et al. 1979) y recientemente se han asociado distintas morfologías neuronales a distintos blancos sinápticos (Katz, 1987; Schofield et al., 1987; Games and Winer, 1988; Hallman et al., 1988; Hübener and Bolz, 1988). Estas diferencias no se refieren tanto al tamaño de la célula como a su forma. Por ello en este estudio hemos buscado diferentes formas celulares que puedan tener significación funcional dentro de las células piramidales, prestando especial atención a la distribución dendrítica y la forma somática.

Material y Métodos

Para la realización de este estudio se han utilizado 12 conejos albinos de edades comprendidas entre los 25 y los 30 días.

La impregnación argéntica se realizó según el método rápido de Golgi modificado por Valverde. Para ello se procedió a la fijación del cerebro, con el animal convenientemente anestesiado, por perfusión percardiaca de una solución salina fisiológica a 37 grados y posteriormente con una solución de fijación con mezcla de aldehídos (glutaraldehído 1% y paraformaldehído 1%) en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 con cloruro cálcico 0,02mM. Una vez fijado se extrajo el cerebro y se tallaron bloques de diversas áreas de la corteza cerebral, con un tamaño conveniente, que se mantuvieron en solución al 2,4% de dicromato potásico con tetróxido de osmio al 0,2% en agua destilada. Tras un periodo variable de tiempo (4-7 días) los bloques se extrajeron para su posterior inmersión en una solución de nitrato de plata al 0,75% en la que permanecieron durante 24-48 horas. Tras deshidratar los bloques en series de glicerinas de pureza ascendente (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) se procedió al corte de los bloques a 100 μ m y a la inclusión de las secciones obtenidas en resina de araldita entre porta y cubre deshidratándolos para ello con alcohol ascendente y óxido de propileno.

El estudio se realizó sobre las áreas Oc y Te de la corteza cerebral del conejo según el mapa citoarquitectónico de Fleischhauer et al. (1980) y se centró en el estudio de las capas piramidales supragranulares.

Las neuronas impregnadas en capas II y III fueron dibujadas con un microscopio Nikon Optiphot provisto de cámara clara a 40X y sobre ellas se realizó un conteo de inserciones dendríticas con una serie de círculos concéntricos centrados en el soma y separados por una distancia de 10 μ m entre sí (Sholl, 1953). Se contaron independientemente las intersecciones dendríticas con los círculos que aparecían inferiormente al plano horizontal que atraviesa el soma en su punto de mayor anchura y las que aparecían por encima de este plano. Los resultados de estas mediciones se promediaron para cada distancia, situación y tipo celular.

Resultados

Para la distinción de las células piramidales entre las impregnadas por el cromato de plata nos basamos en la coexistencia de dos criterios que son característicos y suficientemente definitorios: la presencia de abundantes espinas dendríticas y una dendrita apical dirigida hacia la superficie pial. Estos criterios nos delimitan un grupo de pirámides típicas de morfología somática variable, pero dejan aparte grupos de células clásicamente consideradas como piramidales; entre ellas las pirámides modificadas (Lorente de Nó, 1922) y las pirámides invertidas (Van der Loos, 1965), que no fueron objeto de este estudio.

Un primer tipo de pirámides que podemos describir son las pirámides clásicas cuyo soma presenta perfil de triángulo equilátero. En estas células las dendritas basales surgen de la arista laterobasal del soma con dirección horizontal; las ramificaciones secundarias toman dirección ascendente abarcando un campo aproximadamente semiesférico sin sobrepasar el nivel del plano basal somático. La mediación de las intersecciones dendríticas con los círculos daba una media muy baja en el espacio que se situaba entre los 0° y los 180° del eje horizontal mayor del soma (véase fig. 1). Estas células se presentan principalmente en la capa III. El tamaño celular puede ser muy variable pero en general aumenta con la profundidad a la que se encuentra situado el soma neuronal dentro de la capa. El axón puede surgir de una dendrita basal o de la superficie basal del soma y se dirige hacia la sustancia blanca. Las colaterales axónicas, cuyo número y emergencia dependen en gran medida de la altura a la que se encuentra la neurona, en general son horizontales y en la propia capa. Sólo en ocasiones aparece alguna rama recurrente oblicua hacia las capas superiores; estas ramas ascendentes suelen ser de las primeras en surgir del axón (fig. 2).

Otra forma de células piramidales, dentro de las pirámides típicas, son las pirámides redondeadas cuyo soma se aleja en mayor o menor grado de la forma triangular adoptando perfiles piriformes e incluso esféricos. En estas células, al ser el polo apical redondeado, la dendrita apical surge de forma más abrupta. Las dendritas basales surgen en una extensión más amplia del soma neuronal y no siempre se circunscriben a la parte basal surgiendo en ocasiones de la mitad apical del soma. Otra característica de las dendritas basales es su dirección aproximadamente radial, en relación al soma, para dividirse a pocas micras de éste en un penacho, algunas de cuyas ramas toman dirección ascendente dirigiéndose hacia la pía y sobrepasando el nivel somático. Por esta dirección ascendente, el número de intersecciones de las dendritas basales con los círculos concéntricos era mayor, por encima del plano horizontal centrado en el soma, que en el caso de las pirámides triangulares descritas anteriormente (fig. 1). Este tipo de células es más frecuente en la capa II. El tamaño somático es, en general, menor que el de las pirámides triangulares descritas anteriormente. El axón de estas células, en general, da más colaterales que el de las clásicas pirámides triangulares y estas colaterales son más frecuentemente ascendentes quedando el campo delimitado por ellas en una zona columnar (fig. 3).

Discusión

Los resultados que ofrecemos señalan la existencia de dos tipos de células entre las clásicas pirámides cerebrales. Estos tipos, diferenciados principalmente por su patrón de distribución dendrítica basal, también se reflejan en la forma somática y en la arborización axonal.

El hecho de que la morfología somática varíe con el patrón de emergencia dendrítica es fácilmente relacionable con la distribución del citoesqueleto que forma el anclaje de éstas y da forma al pericarion. Así las células con las dendritas basales naciendo de forma radial desde el cuerpo tienden a ser redondeadas mientras que aquellas que presentan las dendritas surgiendo desde los ángulos basales tienen formas más abruptas.

Otro dato importante es el hecho de que las colaterales axonales sigan un patrón semejante al de arborización dendrítica. Las células redondeadas tienen un campo dendrítico basal esférico o casi esférico consecuencia de la ramificación radial de sus dendritas, cuya extensión ascendente es mucho mayor que las triangulares. Estas células son las que presentan normalmente las colaterales axónicas recurrentes y verticalizadas de modo que los campos dendrítico y axonal se superponen. En las células triangulares de campo receptor basal semiesférico las dendritas primarias siguen largos trayectos horizontales siendo muy raras las ramificaciones ascendentes; las colaterales axónicas son asimismo horizontales evitando el campo dendrítico propio para enviar su señal a puntos distantes. Este hecho sugiere que ambos tipos de neuronas reciben diferentes tipos de aferencias por sus distintos campos receptores y que sus blancos sinápticos son distintos al presentar una diferente colaterización axonal.

La colaterización axonal intragrís de las células piramidales ha sido estudiada ya pero sin prestar especial atención a su relación con la forma somática o el patrón de arborización dendrítica (Schwark and Jones, 1989). Se ha encontrado en la corteza somatosensorial primaria que las colaterales intrínsecas de las células piramidales

supragranulares no abandonan el área en la que está la célula. Estas colaterales acaban mayoritariamente sinaptando sobre espinas dendríticas, presumiblemente de otras células piramidales (Kisvarday et al., 1986).

Con respecto a las capas infragranulares se han encontrado diferencias morfológicas que se asocian a distintas características funcionales. Deschenes et al. (1979) encontró que las células corticales de proyección a la médula espinal presentaban distinta morfología según su velocidad de conducción del impulso nervioso: las células de conducción rápida presentaban soma de mayor tamaño, su territorio dendrítico era más amplio con una dendrita basal larga característica y por último su penacho apical era poco ramificado y con escasas espinas; las células de conducción lenta presentaban un campo dendrítico basal más reducido en extensión y su penacho terminal era más ramificado y profusamente espinoso. Katz (1987) por su parte describe las diferencias entre las células de la capa VI cuyo blanco sináptico es el claustró y las que proyectan al núcleo geniculado. Estas últimas presentan un árbol dendrítico más reducido en extensión pero más denso y sin que su dendrita apical sobrepase la altura de la capa III, al contrario de las células que proyectan al claustró que invariablemente alcanzan la capa I con su penacho apical. Además se diferencian en las colaterales intragranulares de su axón que en el caso de las pirámides proyectantes a claustró son horizontales y en las proyectantes al núcleo geniculado lateral son ascendentes hasta la capa IV. La morfología de las células corticotectales de la capa V de la corteza se ha estudiado repetidamente y con distintos métodos (Schofield et al., 1987; Games and Winer, 1988; Hallman et al., 1988; Hübener and Bolz, 1988) y se han identificado como grandes pirámides de la parte más profunda de la capa V con una gruesa dendrita apical que llega a la capa I en forma de grueso penacho y un amplio y denso campo dendrítico basal. Las pirámides de conexión callosa dentro de la propia capa V son completamente distintas, de menor tamaño somático con un campo dendrítico basal reducido y con una dendrita apical ramificada que no sobrepasa la capa III (Games and Winer, 1988; Hallman et al., 1988; Hübener and Bolz, 1988).

En las capas supragranulares sin embargo no se han encontrado aún que distintos tipos morfológicos tengan distinta función y distintas proyecciones. En las capas II y III las células piramidales proyectan siempre a otras zonas corticales pero su forma de proyección puede ser muy variada. Así cada tipo celular podría especializarse en una forma de proyección específica; por ejemplo, proyecciones callosas, asociativas y dentro de estas últimas, proyecciones de áreas sensoriales primarias a secundarias o viceversa. Bühl y Singer (1989) han encontrado que células con distintos patrones dendríticos proyectan a través del cuerpo calloso, pero faltan datos sobre la participación de distintos tipos de pirámides de las capas supragranulares en otras formas de conectividad corticocortical.

Los datos con trazadores de conexiones y los obtenidos de la inyección intracelular de marcadores podrán explicar si las diferencias de morfología de las células piramidales de las capas II y III se corresponden realmente con diferencias fisiológicas o con distintos blancos sinápticos para cada tipo celular.

Agradecimientos

Agradecemos a Zacarías Alvarez la ayuda prestada con el material fotográfico. M.J. Maseda Armesto disfruta de una beca predoctoral del Gobierno Vasco. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación de la Universidad del País Vasco UPV 212.327-0020/89.

BIBLIOGRAFÍA

- BUHL, E.H. and SINGER, W. (1989): The callosal projection in cat visual cortex as revealed by a combination of retrograde tracing and intracellular injection. *Exp. Brain Res.* **75**: 470-476.
- DESCHENES, M.; LABELLE, A. and LANDRY, P. (1979): Morphological characterization of slow and fast pyramidal tract cells in the cat. *Brain Res.* **178**: 251-274.
- FLEISCHHAUER, K.; ZILLES, K. and SCHLEICHER, A. (1980): A revised cytoarchitectonic map of the neocortex of the rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). *Anat. Embriol.* **161**: 211-243.
- HÜBENER, M. and JURGEN, B. (1989): Morphology of identified projection neurons in layer 5 of rat visual cortex. *Neurosc. Lett.* **94**: 76-81.

- KATZ, L.C. (1987): Local circuitry of identified projection neurons in cat visual cortex brain slices. *J. Neurosc.* **7**: 1223-1249.
- KISVARDAY, Z.F.; MARTIN, K.A.C.; FREUND, T.F.; MAGLOCZKY, Z.S.; WHITTERIDGE, D. and SOMOGYI, P. (1986): Synaptic targets of HRP filled layer III pyramidal cell in the cat striate cortex. *Exp. Brain Res.* **64**: 541-552.
- LORENTE DE NÓ, R. (1922): La Corteza Cerebral del Ratón (Primera Contribución- La corteza acústica). Laboratorio de Investigaciones Biológicas. 41-103.
- PETERS, A. and KARA, D.A. (1985): The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cell. *J. Comp. Neurol.* **234**: 218+241.
- SCHOFIELD, B.R.; HALLMAN, L.E. and LIN, C.S. (1987): Morphology of corticotectal cells in the primary visual cortex of hooded rats. *J. Comp. Neurol.* **261**: 85-7.
- SCHWARK, H.D. and JONES, E.D. (1989): The distribution of intrinsic cortical axons in area 3b of cat primary somatosensory cortex. *Exp. Brain Res.* **78**: 501-513.
- SHOLL, D.A. (1953): Dendritic organization on the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* **87**: 387-407.
- VALVERDE, F. (1970): The Golgi method: a tool for comparative structural analyses. En: Nauta, W.J.H. and Ebesson, S.O.E. (eds.). *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, pp. 12-31. Springer-Verlag, Berlín.
- VAN DER LOOS, H. (1965): The 'improperly' oriented pyramidal cell in the cerebral cortex and its possible bearing on problems of neuronal growth and cell orientation. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **117**: 228-250.

Correspondencia: Sonia M. Gómez-Urquijo
Departamento de Neurociencias
Sección de Anatomía
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
48080 Bilbao. España.

APORTACIONES AL ESTUDIO DEL PROCESO DE OSIFICACIÓN POSTNATAL DEL ESQUELETO APENDICULAR DE LOS OVINOS. I.- PARTE: MIEMBRO TORÁCICO

CONTRIBUTION OF STUDY OF THE PROCESS OF POSTNATAL OSSIFICATION OF APPENDICULAR SKELETON OF THE SHEEP. I. PART: THORACIC LIMB

GUILLÉN, M.T.; REGODON, S.; FRANCO, A.J. y ROBINA, A.

Cátedra de Anatomía y Embriología.
Facultad de Veterinaria de Cáceres.
Universidad de Extremadura.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la osificación postnatal del esqueleto apendicular (miembro torácico) del ovino. Para ello, hemos utilizado 40 ovinos de ambos sexos y raza merina autóctona, distribuidos en cuatro lotes de 0, 45, 105 y 270 días de edad. Se ha efectuado un examen radiológico de sus miembros torácicos completos en diversas posiciones, analizando los núcleos de osificación visibles en las imágenes y considerando los momentos en que se producían la consolidación de las distintas metafisis.

Con todo ello se aprecia radiológicamente la evolución que experimentan los miembros torácicos del ovino en las distintas edades estudiadas. Se determina que las metafisis epifisarias experimentan una variación a líneas epifisarias siempre entre los 45 y los 105 días de edad.

PALABRAS CLAVE: Osificación, radiología, esqueleto apendicular y ovino.

SUMMARY

The present work studied the process of postnatal ossification of appendicular skeleton (thoracic limb) in the sheep. We have used 40 Merino breed lambs distributed in four groups of 0, 45, 105 and 270 days of age respectively. Immediately after we carried out a radiographic study on thoracic limb at different positions. From x-rays present ossification nuclei were analyzed taking into account the time of fusion of different metaphysis.

We have determined that epiphysis metaphysis change to epiphysis line between 45 to 105 days of age.

KEY WORDS: Ossification, radiology, appendicular skeleton and ovine.

Introducción

Las investigaciones radiológicas referentes a la osificación del esqueleto apendicular de los ovinos se iniciaron a finales del siglo pasado (Tschriwinsky, 1880; Lesbre, 1987). Las pautas señaladas por estos autores son tratadas con más profundidad por Tood/Tood (1936) y especialmente por Smith (1956 y 1968) y Barone (1976), quienes realizaron un ordenamiento completo de los tiempos de fusión (Tabla 1).

Rajtova en 1974, realizó un ensayo comparativo del desarrollo postnatal del esqueleto de los miembros en oveja y cabra, afirmando que en la cabra los huesos largos crecen de una manera más uniforme que en la oveja y los cartílagos de conjunción desaparecen más temprano. En general, los machos cabríos tienen unos huesos más largos y anchos y algunas epífisis se unen a las diáfisis más tarde que en las hembras caprinas. Chao-Chien

(1975) especifica que los huesos de los miembros de la cabra permanecen sin fusionarse hasta los 10 meses y medio de edad.

No obstante, resulta obligado hacer constar que quizás haya sido la especie canina la que ha suscitado mayor atención entre los diversos autores (SEOUDI, 1948; HARE, 1960; CHAPMAN, 1965 y GARCIA MONTERDE, 1982), quienes señalan que los núcleos de osificación en el mismo orden cronológico, pero las edades concretas en las que tienen lugar su primera expresión están sujetas a variaciones dependientes del factor racial, mientras que el sexo, parece no influir en el momento de aparición de los centros de osificación.

El interés de nuestro estudio radica en sumar algunas particularidades a los trabajos ya existentes y en confirmar fases concretas en el crecimiento del ovino.

CENTROS EPIFISIARIOS	LESBRE (1897)	TSCHIRWINSKY (1888)	TOOD&TOOD (1936)	BRUNI&ZIMMERL (1951)	SMITH (1956)	BARONE (1976)
ESCAPULA						
Tubérculo	5	-	8	5	5	5
HUMERO						
Proximal	42	16-21	36	4	17	24-36
Tub. mayor	-	-	-	-	28	-
Distal	3-4	3	8	3-4	4	3-4
Ep. lateral	-	-	-	-	4	-
Ep. medial	-	-	-	-	4	-
RADIO						
Proximal	3-4	3	6	3-4	4	-
Distal	42	16-21	33	42	21	-
CUBITO						
Proximal	36-42	-	-	42	21	-
Distal	42	-	33	36	26	-
METACARPO						
1 FALANGE	20-24	15-16	-	20-24	16	-
2 FALANGE	7-10	-	-	7-10	8	-
FEMUR						
Proximal	5-7	-	-	5-7	8	-
Proximal	36-42	16	33	36	17-18	-
Trocan.mayor	-	16	33	-	17-19	-
Trocan.menor	-	10	-	-	13	-
Distal	36-42	16-21	33	42	18-20	-
TIBIA						
Proximal	42	16-21	33	42	25	-
Tuberosidad	-	-	-	-	15	15-20
Distal	15-20	10	12	15-20	15	-
ROTULA						
PERONE	-	-	-	-	-	24
PERONE	36	-	-	42	15	-
METATARSO						
1 FALANGE	20-24	15-16	-	36	15	36
2 FALANGE	7-10	-	-	7-10	9	-
3 FALANGE	5-7	-	-	5-7	6	-
COXAL						
COXAL	5	-	-	5	-	5

TABLA 1. Tiempo de fusión (en meses) de los centros epifisiarios apendiculares del ovino según diversos investigadores.

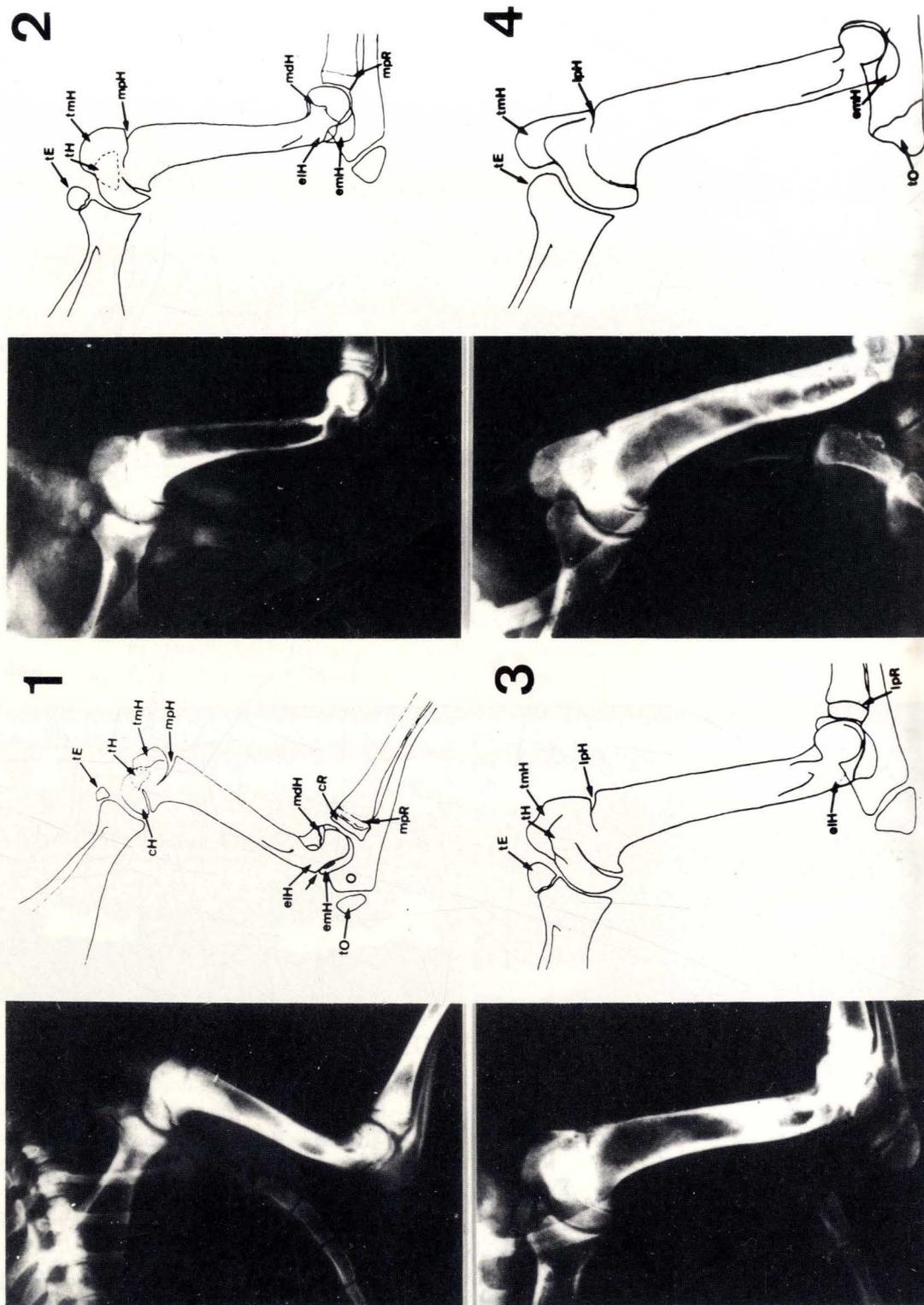


FIGURA 1. Imagen radiográfica lateral del hombro y codo y esquema explicativo correspondiente.
 1) nacimiento - 2) 45 días - 3) 105 días y 4) 270 días.

Material y Método

Se han utilizado 40 ovinos de raza merina autóctona distribuidos en cuatro lotes de 10 individuos cada uno (5 machos y 5 hembras), según edades (nacimiento, 45, 105 y 270 días de edad). A continuación, se efectuó un estudio radiológico de los miembros torácico y pelviano completos en las posiciones lateral y craneo-caudal (dorsopalmar o dorso-plantar, en mano y pie respectivamente).

Las radiografías fueron realizadas en un aparato Siemens-Monophos 150S del servicio de Radiología de la Facultad de veterinaria de Cáceres, con distintas programaciones (según área del miembro radiografiada y tamaño del individuo) que oscilaron entre 40-70 Kv y 16-36.5 mAs.

Resultados (Tabla 2)

Núcleos de osificación	Estructuras a las que se fusionan	Edad
M. TORACICO		
Tuberculosis escapula	+escapula	270
Epífisis proximal húmero	+diáfisis humeral	270
Tubérculo mayor humero	+diáfisis humeral	270
Epífisis distal húmero	+diáfisis humeral	105
Epicóndilo lat. húmero	+diáfisis humeral	105
Epicóndilo med. húmero	+diáfisis humeral	270
Epífisis proximal radio	+diáfisis radial	105
Epíf. proximal metacarpiana	+diáf. metacarpiana	Nacim.
Epíf. proximal flange prox.	+diáf. falangiana	170
Epíf. distal falange prox.	+diáf. falangiana	Nacim.
Epíf. proximal falange media	+diáf. falangiana	105
Epíf. distal falange media	+diáf. falangiana	Nacim.

TABLA 2. Tiempo de fusión referidos a los 0, 45, 105 ó 270 días de los niveles óseos analizados (miembro torácico)

HOMBRO Y CODO (Figs. 1)

Al nacimiento (Fig. 1. 1)

- Tubérculo de la escápula (tE) separado de su hueso.
- Núcleo de la cabeza humeral (cH) bastante desarrollado.
- Núcleo del tubérculo mayor (tmH) extenso.
- Tubérculo menor (tH) se proyecta muy circunscrito.
- Metáfisis proximal del húmero (mpH), evidente, amplia y sin discontinuidades.
- Epicóndilo lateral del húmero (elH) bien delimitado.
- Epicóndilo medial del húmero (emH), muy reducido (en fase más avanzada se desarrollará más ampliamente que en el lateral): nótese en la imagen la hendidura radiológica correspondiente al futuro tejido óseo del territorio, ahora en formación.
- El resto de la epífisis distal se muestra visiblemente marcada (tróclea humeral y cóndilo humeral).
- Metáfisis distal del húmero (mdH) notoria.
- En el cúbito, el núcleo de la tuberosidad del olecranon (O); se encuentra en fase de proliferación.

- La cabeza del radio, (cR) posee un núcleo amplio.
- La metáfisis proximal del radio (mpR) en este momento se aprecia netamente separada de su diafisis.

45 días (Fig. 1.2)

- Tubérculo de la escápula (tE) en fase activa de osificación (más amplio).
- Núcleos del tubérculo mayor (tmH) y menor (tH) más desarrollados.
- Metáfisis proximal y distal del húmero (mpH y mdH) con discontinuidades (se inicia la consolidación epifisiaria).
- Epicóndilo lateral (eH) casi consolidado.
- Epicóndilo medial (emH) con expansión.
- Metáfisis proximal del radio (mpR) en reducción (se acerca la fusión epifisio-diafisiaria). 105 días (Fig. 1.3)
- Tubérculo de escápula (tE) casi fusionado.
- Núcleo del tubérculo mayor (tmH) en fase avanzada de osificación.
- Núcleo del tubérculo menor (tH) claramente expresado (osificación secundaria a término).
- Aparece la línea ósea epifisiaria proximal del húmero (lpH) mientras la distal tiene mayor grado de osificación.
- Epicóndilo lateral (eH) consolidado.
- Surge la línea epifisiaria proximal del radio (1pR).

270 días (Fig. 1.4)

- Fusión total del tubérculo (tE) a la escápula.
- Núcleo del tubérculo mayor (tmH) fusionado.
- El cierre metafisiario proximal avanza (1pH). El distal sí ultimó su proceso.
- Epicóndilo medial (emH) cerrado.
- La tuberculosis del olécranon (tO) que se ha ido expansionando en las imágenes de los 45 y 105 días, se encuentra ya en fases finales de evolución: el cartílago (nivel radio-lúcido) se encuentra reducido y con aspecto aserrado. Resta por aparecer la línea radiopaca de fusión.

MANO (con extremo distal del antebrazo). (Figs. 2)

Al nacimiento (Fig. 2.1)

- La metáfisis distal del radio (mdR) es amplia, abierta y cartilaginosa.
- Tanto los huesos de la fila proximal del carpo (carpo-cubital-Cc, intermedio-I, carporradiar-Cr y Accesorio-Ac) como los de la distal (4º, 2º+3º y 1º) se proyectan redondeados; este hecho es más notorio para el h. accesorio (Ac).
- Las metáfisis distales del metacarpo III + IV (mdM) aparece bien reflejada, como corresponde a la plena funcionalidad en que está inmersa.
- La tróclea del metacarpiano III + IV es doble, pero todavía no existe como tal la cisura intertroclear (cit).
- Los surcos longitudinales dorsal (sld) y palmar (slp) que continúan la cisura por las caras de referencia, se encuentran bien delimitados, haciendo patente la unión de los cuerpos de los metacarpianos III y IV.
- Se detectan radiológicamente las metáfisis proximales o metáfisis funcionales de las falanges proximales y medias (mpFP, mpFM), mientras que las falanges distales muestran un núcleo de osificación cada una, en un estado cartilaginoso, pero sin características especiales.
- Los sesamoides experimentan una osificación tardía. Se observan los sesamoideos proximales (Sp), muy pequeños y radiolúcidos. Aún no aparecen los sesamoideos distales.

45 días (Fig. 2.2)

- La metáfisis distal del radio (mdR) está más cerrada que a los 0 días, pero sin desaparecer el tejido hialino.
- Los huesos de ambas filas del carpo son mayores y pierden su forma redondeada, para ir adoptando una morfología cuadrada, con bordes rectos y cortantes. El hueso accesorio (Ac) es extenso.
- Las metáfisis distales del metacarpiano III + IV (mdM) comienzan con una regresión de sus cartílagos.
- Aparece claramente la cisura intertroclear (cit).
- Las falanges proximales y medias presentan un incremento en sus longitudes y sus metáfisis proximales (mpFP, mpFM) están en fase de consolidación.
- Están más osificados los huesos sesamoideos proximales (Sp) y aparecen por primera vez los distales (Sd).

105 días (Fig. 2.3)

- La metáfisis distal del radio (mdR) se va cerrando, disminuyendo al tiempo el tejido cartilaginoso constituyente.
- Los huesos del carpo están bien conformados, aunque aún no existe la consolidación total (falta en los carpianos 2º + 3º y 4º). El hueso accesorio (Ac) se evidencia más desarrollado y unido a su correspondiente fila.
- Las metáfisis distales del metacarpo (mdM) al igual que sucedió en el radio, se hallan más cerradas.
- Falanges proximales y medias, con la cadencia de reducción metafisiaria descrita (mpFP, mpFM).
- Huesos sesamoideos más amplios que en la edad anterior.

270 días (Fig. 2.4)

- En este estadio, la metáfisis distal del radio se enuncia ya como línea epifisiaria distal del radio (1dR) al sufrir la regresión del cartílago, aunque todavía no se haya alcanzado la total fusión ósea.
- El cúbito y su epífisis distal (edC), presentes desde el nacimiento, no nos han aportado hasta ahora datos relevantes en las imágenes, bien por enmascararlo el radio o por la radiolucidez de sus tejidos jóvenes integrantes; sin embargo, en esta etapa procede reseñar la presencia de su metáfisis distal (mdC), sin cerrar (a diferencia de lo postulado en este sentido para el radio).
- En general, los huesos del carpo han experimentado una gran variación, pues en lugar de grandes espacios entre ellos, se aprecia una nítida coaptación.
- Las metáfisis distales del metacarpo III + IV varían a líneas epifisarias distales (1dM).
- Falanges proximales y medias consolidadas.
- Los huesos sesamoideos visibles y osificados.

Discusión

La edad de fusión de la epífisis proximal del húmero varía según los diversos investigadores: LESBRE (1887): 42 meses; TSCHIRWINSKY (1880): 16-21 meses; TOOD/TOOD (1936): 36 meses y SMITH (1956): 17 meses. Sin embargo, en nuestra experiencia, la consolidación se efectúa antes, a los 9 meses (270 días). El tubérculo mayor del húmero se fusiona para SMITH (1956) a los 28 meses y nosotros lo hallamos en fase consolidación a los 9 meses. También discrepamos de este último investigador con respecto a las fusiones de los epicóndilos lateral y medial del húmero, que mientras para él se realizan al mismo tiempo (4 meses), para nosotros se produce primero el lateral (105 días) y posteriormente el medial (270 días).

En sentido general, GARN et al. (1967) establecen un standard radiográfico para la osificación postnatal, señalando un hecho a nuestro entender importante y con el que coincidimos: "el análisis radiográfico no es "per se" suficiente como portador de datos que diferencien con claridad unas edades de otras a lo largo del crecimiento. A esta afirmación, añadimos que nos parece un método aceptable pero debe estar complementado con otros.

Como principal conclusión resaltamos que el análisis radiológico contribuye a la diferenciación de las etapas del crecimiento estudiadas. En el miembro torácico, las metáfisis epifisarias experimentan una variación a líneas epifisarias siempre entre los 45 y 105 días de edad.

BIBLIOGRAFÍA

- BARONE, R. (1976): Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome I. Osteologie.
- CHAO-CHIEN, H. (1975): Radiographic study of Taiwan goat. I. The extremities-radiographic fusion of ossification centres. J.Chinese Soc. Vet. Sci. **1**: 31-6.
- CHAPMAN, W.L. (1965): Appearance of ossification in centers and epiphyseal closures as determined by radiographic techniques. J. Am. Vet. Med. Ass., **147**: 138-41.
- GARCIA-MONTERDE, J.G. (1982): Estudio radiográfico sobre la cronología de osificación de esqueleto apendicular en el perro pastor Alemán. Tesis Doctoral Córdoba.
- GARN, S.M.; RHOMA, CH.G. and SILVERMAN, F.N. (1967): Radiographic standars for posnatal ossification and tooth calcification. Med. Radiog. Photog. **43** (2): 45-68.

- HARE, W.C.D. (1960): The age at which epiphyseal union take place in the limb bones of the dog. *Wien. Tierärztl Monatsschr.* 224-45.
- LESBRE, F.X. (1897): Contribution a l'étude de l'Ossification du squelette des mammifères domestiques. *Ann. Soc. Agric. Lyon. Series y*, (5): 1-106.
- RAJTOVA, V. (1974): Die posnate Entwicklung des extremitätenskeletts bei schaff und Ziege. *Anat. Histol. Embryol.* **3**: 29-39.
- SEOUDI, R. (1948): X-ray examination of epiphyseal union as an aid to the estimation of age in dogs. *Brit. Vet. J.*, **104**: 105-55.
- SMITH, R.N. (1956): Observations on the ossification of the appendicular skeleton of the sheep. Ph.D. Thesis. Bristol.
- SMITH, R.N. (1968): The developing skeleton. *J.m Vet. Radiology Society*. Vol. IX.
- TOOD and TOOD, R. (1936): Citado por SMITH en: "Fusion of epiphyses of the limb bones of the sheep". *Vet. Rec.* pg. 257.
- TSCHRIWINSKY, N. (1880): Citado por SMITH en: "Fusion of epiphyses of the limb bones of the sheep". *Vet. Rec.* pg. 257.

Correspondencia: M.T. Guillén
Cat. Anatomía y Embriología
Facultad de Veterinaria
Cáceres. España

CONTENIDO MINERAL ÓSEO EN MUJERES PREMENOPAÚSICAS Y SU RELACIÓN A VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

BONE MINERAL CONTENT IN PREMENOPAUSAL WOMEN AND ITS CORRELATION WITH ANTHROPOMETICAL VARIABLES

E.R. HERNANDEZ, M. REVILLA, H. RICO

Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía.
Departamento de Medicina de la Universidad de
Alcalá de Henares. Madrid.

RESUMEN

Aunque el contenido mineral óseo (CMO) del organismo humano se ha correlacionado con diversas variables antropométricas, no hay un consenso en cuál de ellas puede influir más el mismo. Por ello y en un amplio colectivo de mujeres premenopáusicas (n=105), por ser éstas más propensas a padecer osteoporosis, valoramos el CMO o masa ósea por absorción fotónica con fuente de rayos X de doble energía y lo correlacionamos con su masa muscular, el porcentaje de grasa, el peso, su masa corporal y la edad.

Sólo encontramos correlación significativa con el peso ($p<0.001$) y con la masa corporal ($p<0.001$), pero con ésta el valor de r es menor. Ello nos lleva a postular que el continuado esfuerzo mecánico que ocasiona el peso sobre el esqueleto es el principal condicionante de estímulo para el desarrollo de la masa ósea.

PALABRAS CLAVE: Variables antropométricas. Contenido Mineral Óseo. Mujeres Premenopáusicas.

SUMMARY

Several anthropometrical variables seen to correlate with bone mineral content (BMC), but it remains controversial which of them have the greatest influence over it. Therefore, the purpose of this study was to measure the BMC or bone mass by bone desitometry with dual energy X rays (DEXA) in a wide group (n=105) of premenopausal women, a status predisposed to suffer from osteoporosis, and correlate it with their lean body mass, fat percentage, weight, body mass and age.

We only found significant correlation with the weight ($p<0.001$) and body mass ($p<0.001$), being the r value lower in the latter. We can then postulate that the continued mechanic stress of the weight over skeleton is the main stimulus for bone mass development.

KEY WORDS: Anthropometrical variables. Bone Mineral Content. Premenopausal status.

Introducción

El contenido mineral de nuestro esqueleto, principalmente el calcio, es muy importante por estar implicado en múltiples y vitales funciones endocrino-metabólicas (19). El medir el contenido mineral óseo total (CMOT) da una idea muy precisa del contenido total del calcio ya que éste es un componente constante (37%) del contenido mineral (15); siendo a su vez el CMOT un dato fiable y estimativo de masa ósea (32).

Dependientes de las razas se han indicado cambios en la masa ósea (6), que ya Herodotus señaló observando los restos óseos de una batalla entre persas y egipcios (12). Aún así, para una misma raza, no hay un consenso en si la masa ósea, independientemente del condicionamiento genético, se relaciona con la masa muscular (MM), con el peso (P) o con la grasa (MG), habiendo referencias que indican una relación con la obesidad, con el P o con la MM (20,30,29).

Los valores de masa ósea adquieren especial importancia en la mujer, por ser esta más propensa a padecer de osteoporosis después de hacerse menopáusica (21). Por ello, en un amplio colectivo de mujeres premenopáusicas, valoramos el CMOT y lo correlacionamos con distintas variables antropométricas como las ya comentadas, es decir, con la masa muscular (MM), con el porcentaje de grasa (%MG), con la masa corporal (MC) y con el peso (P), que calculamos según la fórmula de Tomas y cols. (31).

Material y Métodos

Se estudian a 105 mujeres premenopáusicas con edades entre 20 y 49 años, que se seleccionaron con criterios de homogeneidad en razón a que no fumaran, ni ingerieran alcohol, que tuvieran 1 ó más hijos a los que dieran lactancia y realizaran el mismo tipo de vida (amas de casa) sin práctica adicional de deportes.

Por el estudio clínico y analítico se descartó cualquier enfermedad que pudiera influenciar en su metabolismo óseo. Los valores séricos de creatinina eran en todas inferiores a 1.2 mg/dl. Ninguna había estado inmovilizada más de 15 días en los dos últimos años y no tomaban ningún tipo de medicación (corticoides, hidantoínas, barbitúricos, vit. A ó D, tiazidas, etc.) que pudieran influir en el metabolismo cálcico.

A todas, en periodos alejados de la ingesta se les midió el CMOT, la MM, el %MG, la MC y el P, por absorción fotónica de doble energía de rayos X (DEXA) con aparato Norland XR-26 (Norland Co. Fort Atkinson. Wisconsin USA, Emsor S.A. Madrid). La medición se realizó en decúbito supino, en un tiempo medio de 21 minutos, con una tensión en el ánodo del tubo de 100KV cc y con una corriente de 1 mA cc; utilizando una resolución horizontal de 6,5 mm, una vertical de 13 mm y una velocidad de 80 mm/segundo. Este proceder tiene en nuestras manos un coeficiente de variación del 1.6%.

El estudio estadístico se hizo utilizando el test de correlación de Pearson entre el CMOT con la Edad, la MM, el %MG, la MC y el P, con un computador personal modelo Casio FX-820P (Casio Co.Japón), con programas biomédicos incorporados.

Resultados

En la tabla 1 se muestran los valores medios y desviación standard de la Edad, del CMOT, la MM, el %MG, la MC y del P, de las 105 mujeres estudiadas. Como puede verse la edad media era de 34.8 ± 8.3 años, con un rango de 20 a 49 años. El CMOT fue de 2.623 ± 484 gr., la MM de 29.8 ± 4.4 kg., el %MG de un $41.9 \pm 4.3\%$, la MC de 25.3 ± 1.7 , y el peso medio de 61.6 ± 6.5 kg.

En la tabla 2 se muestran los valores de r y p según el test de correlación de Pearson encontrado entre el análisis de los distintos parámetros. Como puede verse la más alta correlación se encuentra entre CMOT y peso ($r=0.648$; $p<0.01$), siendo también significativa la correlación entre CMOT y MC ($r=0.510$; $p<0.01$), no existiendo correlación significativa con la Edad, con la MM, ni con el %MG.

En la figura 1 se muestra la correlación entre CMOT y P y en la figura 2 la del CMOT y la Edad.

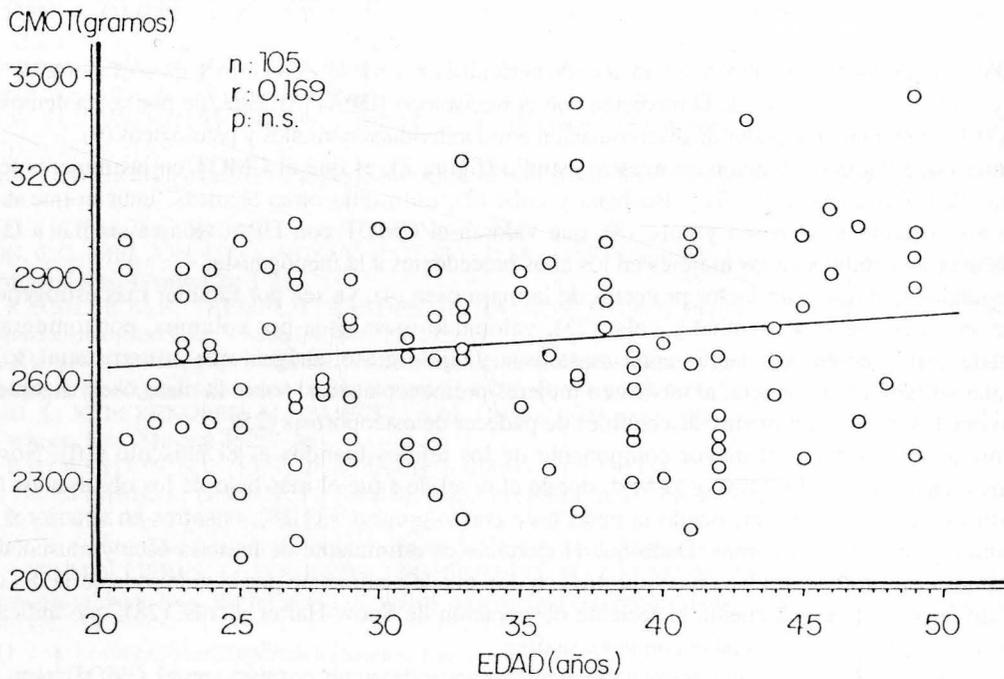
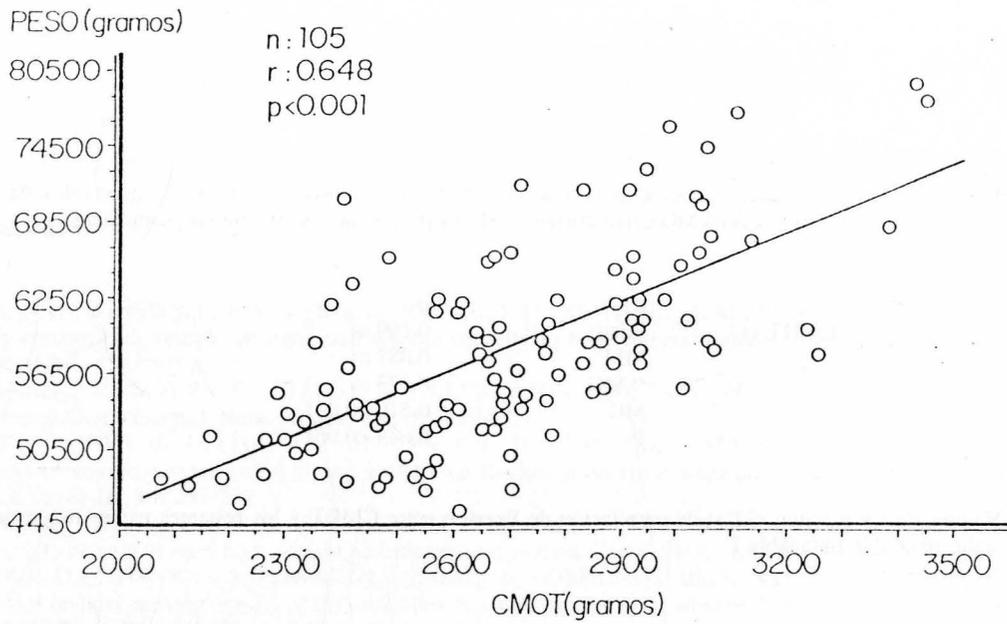


FIGURA 1. Diagrama de la correlación observada entre el Peso y el Contenido Mineral Óseo Total (CMOT) en 105 mujeres premenopáusicas consideradas normales.
FIGURA 2. Correlación observada entre el Contenido Mineral Óseo Total (CMOT) y la Edad en 105 mujeres premenopáusicas consideradas normales.

Edad	34.8±8.3 años
CMOT	2623±484 gr.
MM	29.8±4.4 kg.
%MG	41.9±4.3%
MC	25.3±1.7
P	61.6±6.5 kg.

TABLA 1. Valores medios y desviación standard de la edad, contenido mineral óseo total (CMOT), masa muscular (MM), porcentaje corporal de grasa (%MG), mas corporal (MC) y peso P, de las 105 mujeres estudiadas.

CMOT vs	r	p
	Edad	0.169 ns
	MM	0.087 ns
	%MG	0.173 ns
	MC	0.510 <0.001
	P	0.648 <0.001

TABLA 2. Valores de r y p según el test de correlación de Pearson entre CMOT y los restantes parámetros estudiados, siglas igual que en la tabla 1.

Discusión

La medición del CMOT con DEXA se considera una técnica muy fiable y con muy bajo coeficiente de variación (24,11,14) y sin los inconvenientes de la medición con doble isótopo (DPA) (3). Esta, de por sí, ha demostrado ser muy exacta (13) y tener un gran poder de discriminación entre individuos normales y patológicos (9).

Lo primero que llama la atención en nuestro estudio (figura 2), es que el CMOT en las mujeres fértiles no varía con la edad. Gilsanz y cols. (7) y Buchana y cols. (2), utilizando otras técnicas, indican que disminuye después de los 20 años. Gotfredsen y cols. (8), que valoran el CMOT con DPA, técnica similar a la nuestra, tampoco encuentran cambios en las mujeres en los años precedentes a la menopausia.

La obesidad se considera un factor protector de la masa ósea (4), ya sea por facilitar más estrógenos (20) o por inducir un mayor peso. Rosenthal y cols. (23), valorando masa ósea por columna, por tomografía axial computerizada, no observan correlación entre masa ósea y tejido graso, al igual que nosotros aquí, lo que nos lleva a señalar su falta de influencia, al menos en mujeres premenopáusicas, sobre la masa ósea; aunque se haya demostrado que los obesos son menos susceptibles de padecer de osteoporosis (25).

En el organismo humano el mayor componente de los tejidos blandos es el músculo (10). Nosotros no encontramos relación entre el CMOT y la MM, dónde el nivel de r fue el más bajo de los observados (tabla 2). Aunque varios autores han correlacionado la masa ósea con la muscular (1,18); nosotros en anteriores estudios (22) no pudimos correlacionar ambos. Dado que el ejercicio es estimulante de la masa ósea y muscular (17), el que no hayamos encontrado correlación en nuestro estudio, puede justificarse por la vida sedentaria del colectivo estudiado; sin dejar de tener en cuenta la reciente observación de Snow-Harter y cols. (28), que indican que la potencia muscular no es correlacionable con la masa ósea.

La masa corporal si presenta una correlación significativa y de signo positivo con el CMOT, pero más alto nivel de significación lo encontramos con el peso (figura 1); dado que para el cálculo de la MC una variable es el P y la otra la talla, el encontrar más significación con el P que con la MC, nos indica que la masa ósea o CMOT es más dependiente del P que de la talla o MC. De Simone y cols. (5); Wronski y cols. (33); Nelson y cols. (16) y Pocock y cols. (18), también observan una relación significativa entre masa ósea y P. Por otro lado, se sabe que la osteoporosis que se acompaña de una disminuida masa ósea incide preferentemente en mujeres de poco peso (25).

En definitiva, y en nuestro medio, por el estudio efectuado podemos señalar que el CMOT, dentro de las distintas variables antropométricas estudiadas se correlaciona muy significativamente con el P, y con la MC lo que nos lleva a indicar que el P tiene un efecto protector sobre el esqueleto, quizás facilitando a través de la vida, un pequeño pero continuado esfuerzo mecánico; ello justifica el que simples paseos de 30 minutos de duración, tres veces por semana, hayan demostrado que son capaces de enlentecer la pérdida de masa ósea postmenopáusica (26,27).

Este trabajo se ha realizado con la ayuda de la CICYT nº 0P89-0048.

BIBLIOGRAFÍA

- BEVIER, W.C.; WINSWELL, R.A.; PYKA, G.; KOZAK, K.C.; NEWHALL, K.M.; MARCUS, R. (1989): Relationship of body composition, muscle strength, and aerobic capacity to bone mineral density in older men and women. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 421-432.
- BUCHANAN, J.R.; MYERS, C.; LLOYD, T.; GREER, R.B. (1988): Early vertebral trabecular bone loss in normal premenopausal women. *J. Bone Mineral Res.* **3**: 583-587.
- DAWSON-HUGHES, B.; DEEHR, M.S.; BERGER, P.S.; DALLAL, G.E.; SADOWSKI, L.J. (1989): Correction of the effects of source, source strength and soft-tissue thickness on spine dual-photon absorptiometry measurements. *Calcif. Tissue Int.* **44**: 251-257.
- DAWSON-HUGUES, B.; DHIPP, C.; SADOWSKI, L.; DALLAL, G. (1987): Bone density of the radius, spine and hip in relation to percent of ideal body weight postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* **40**: 310-314.
- DESIMONE, D.P.; STEVENS, J.; EDWARDS, J.; SHARI, J.; GORDON, L.; BELL, N.H. (1989): Influence of body habitus and race on bone mineral density of the midradius, hip and spine in aging women. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 827-830.
- GARN, S.M.; RAO, E.M. y RHIL, L. (1964): Compact bone in chienes and japanese. *Science* **143**: 1429-1440.
- GILSANZ, V.; GIBBENS, D.T.; CARLSON, M.; BOECHAT, M.I.; CANN, C.E.; SCHULZ, E.E. (1988): Peak trabecular vertebral density: a comparison of adolescent and adult females. *Calcif. Tissue Int.* **43**: 260-262.
- GOTFREDSEN, A.; HADBERG, A.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. (1989): Total body bone mineral density. *J. Lab. Clin. Med.* **110**: 362-368.
- GOTFREDSEN, A.; PODENPHANT, J.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. (1989): Discriminative ability of total body bone-mineral measured by dual photon ansorptiometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **49**: 125-134.
- GRANT, J.F.; CUSTER, P.B.; THURLOW, J. (1981): Current thecniques of nutritional assesement. *Sur. Clin. North Am.* **61**: 437-463.
- HASSAGER, C.; CHRISTIANSEN, C. (1989): Influence of soft tissue body composition on bone mass and metabolism. *Bone* **10**: 415-419.
- HERODOTUS (1958): *The histories*. Heritage Press. New York.
- JOHNSTON, C.C.; MELTON, L.J.; LINDSAY, R.; EDDY, D.M. (1989): Clinical indications for bone mass measurement. *J. bone Mineral Res.* **4** (suppl 2): 1-28.
- MAZESS, R.; COLLICK, B.; TREMPER, J.; BARDEN, H.; HANSON, J. (1990): Performance evaluation of a dual-energy X-ray bone densitometer. *Calc. Tissue Int.* **44**: 228-232.
- MAZESS, R.B. y WAHNER, H.W. (1988): Nuclear medicine and densitometry, en: RIGGS BL. MELTON LJ. (Eds.) *Osteoporosis, etiology, diagnosis and management*. 251-296. Raven press. New York.
- NELSON, D.A.; KLEERKOPER, M.; PARFITT, A.M. (1988): Bone mass, skin color and body size among black and white women. *bone Mineral* **4**: 257-264.
- NELSON, B.E.; WESTLIN, N.E. (1971): Bone density in athletes. *Clin. Orthop.* **77**: 177-182.
- POCOCK, N.; EISMAN, J.; GWINN, T.; SAMBROOK, P.; KELLY, P.; FREUND, J.; YEATES, M. (1989): Muscle strength, physical fitness, and weight but no age predict femoral neck bone mass. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 441-448.
- RASMUSEN, K. (1986): The calcium messenger system. *N. Engl. J. Med.* **314**: 1094-1101.
- RIBOT, C.; TREMOLIERES, F.; POUILLES, J.M.; BONNEU, M.; GERMAIN, F.; LOUVET, J.P. (1987): Obesity and postmenopausal bone loos: the influence of obesity on vertebral density and bone turnover in postmenopausal women. *bone* **8**: 327-331.
- RICO, H. (1988): *El síndrome osteoporótico*. Sandoz. Barcelona.
- RICO, H.; YAGÜE, M.; HERNANDEZ, E.R.; GONZALEZ, M. (1987): El índice psoas/1-3 y la radiogrametría en el diagnóstico de la osteoporosis. *rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* **22**: 262-266.
- ROSENTHAL, D.I.; MAYO-SMITH, W.; HAYES, C.W.; KHURANA, J.S.; BILLER, E.M.K.; NEER, R.M.; KLIBANSKI, A. (1989): Age and bone mass in premenopausal women. *J. Bone Mineral Res* **4**: 533-538.
- SARTORIS, D.J.; RESNICK, D. (1989): Dual-energy radiographic absorptiometry for bone densitometry: current status and perspective. *AJR* **152**: 241-245.

- SAVILLE, P. (1973): The syndrome of spinal osteoporosis. *Clin.Endocrinol.Metab.* **2**: 177-186.
- SINAKI, M. (1988): Exercise and physical therapy. En: RIGGS, E.L.; MELTON, L.D. (Eds.): *Osteoporosis, etiology, diagnosis and management*. Raven Press. New York 457-480.
- SMITH, E.L.; REDDAN, W.; SMITH, P.E. (1981): Physical activity and calcium modalities for bone mineral increase in aged women. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **13**: 60-64.
- SNOW-HARTER, C.; BOUXSEIN, M.; LEWIS, B.; CHARETTE, S.; WEINSTEIN, P.; MARCIS, R. (1990): Muscle strenght as a predictor of bone mineral density in young women. *J.Bone Mineral Res.* **5**: 589-595.
- STEVENSON, J.C.; BANKS, L.M.; SPINKS, T.J.; FREMANTLE, C.H.; MACINTYRE, I.; HESP, R.; LANE, G.; ENDACOTT, J.A.; PADWICK, M.; WHITEHEAD, M.I. (1987): Regional and total skeletal measurements in the early postmenopause. *J.Clin. Invest.* **80**: 258-262.
- STEVENSON, J.C.; LEES, B.; DEVENPORT, M.; CUST, M.P.; GANGER, K.F. (1989): Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis? *Br.Med. J.* **298**: 924-928.
- TOMAS, A.E.; MCHAY, D.A.; CUTLIP, M.B. (1976): A monogram for assesseing body weight. *Am.J.Clin.Nutr.* **29**: 301-304. *Med. Sci.Sport. Exerc.* **13**: 60-64.
- WAHNER, H.W.; DUNN, W.L.y RIGGS, B.L. (1983): Non invasive bone mineral measurements. *Sem.Nucl.Med.* **13**: 282-289.
- WRONSKI, T.J.; SCHENCK, P.A.; CINTROM, M.; WALSH, C.C. (1987): Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcf. Tissue Int.* **40**: 155-159.

Correspondencia: Dra. E.R. Hernandez Díaz
Dpto. de Ciencias Morfológicas y Cirugía
Universidad de Alcalá de Henares
28871 Madrid. España



An. Anat. 37: 67-73 (1991)

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA PELVIS ÓSEA EMBRIONARIA Y FETAL

MORPHOLOGY STUDY OF PELVIS DURING EMBRYOGENIC AND FOETAL DEVELOPMENT

J.L. NIETO, A. GIMENO, L. CAMPO.

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

RESUMEN

Se realiza un estudio morfológico pelviano durante el desarrollo embrionario y fetal, mediante la reconstrucción tridimensional de Born. Se describe el cierre pelviano (embrión de 37 mm. cc.) y los distintos giros que realiza la pelvis a través de ejes laterolaterales (coronal) y verticales (sagital). El estudio abarca desde embriones de 16 mm.cc. hasta fetos de 95 mm.cc. de longitud craneo-caudal (cabeza-coxis).

PALABRAS CLAVE: pelvis, embriología, cierre pelviano.

SUMMARY

It is realized a study of the pelvis morphology during embryogenic or fetal development by d'Born tridimensional rebuild. It is describe the pelvic closure (embryone 37 mm.cc.) and the different turns in the laterolateral (coronal) and vertical arces (sagital). The study include embryos from 16 mm.cc. to 95 mm.cc. of craneo caudal longitude (Head-crape).

KEY WORDS: Pelvis, embryology, pelvic closure.

Introducción

La decidida intervención de la pelvis en la sustentación y deambulación corporal, unido a la exigencia de un modelado adecuado para la progresión fetal, justifica las graves alteraciones causadas en estos mecanismos por pequeños vicios de su conformación. Aunque las grandes deformidades pelvianas, relacionadas con determinadas afecciones como la coxalgia, el mal de Pott o la luxación congénita de cadera, resultan cada día más excepcionales como causa de patología pelviana, persisten todavía bastantes deformaciones moderadas, muchas de ellas de carácter congénito. Sin embargo, estas circunstancias apenas han motivado el interés por conocer los momentos críticos de la embriología pelviana.

En embriones de 4,5 mm.cc., todavía no se aprecian los blastemas primarios, aunque sí los esbozos de los miembros inferiores. En embriones de 12,5 mm.cc., en cambio, ya son visibles el blastema iliaco, los procesos isquiáticos y púbicos y la placa articular del sacro (BLECHSCHMIDT, 1954). La bibliografía consultada apenas aporta datos sobre la morfología pelviana en embriones y fetos mayores de 30 mm.cc., quizás por entender que el coxal ha alcanzado ya su forma definitiva.

Estos estudios generales sobre la génesis pelviana se han complementado con la investigación de algunas encrucijadas de la pelvis. Entre otras, la embriología de la sínfisis pubiana ha despertado la atención de diversos investigadores como SOURI, (1958), NIETO y TORRES (1988). Respecto al dimorfismo sexual de la pelvis embrionaria, LAVELY (1947), apenas encuentra diferencias sexuales en la pelvis, afectando estas, en todo caso, a la forma del estrecho superior y del arco pubiano.

Material y Método

Para este trabajo hemos utilizado 14 series de embriones y fetos humanos, entre 16 y 95 mm.cc., procedentes de la colección del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Zaragoza, cuyas características principales reseñamos en la tabla I. En cada caso, tras estudiar los esbozos cartilagosos de la pelvis y reconocer al microscopio la estructura de las principales vísceras de la zona, hemos procedido a realizar reconstrucciones tridimensionales, a 15 aumentos, de la región pelviana, utilizando planchas de cartón de 0,3 mm. de grosor, según la técnica de BORN. Además de estudiar la morfología pelviana y las relaciones viscerales de su cavidad, hemos realizado las mediciones necesarias para conocer los valores de los distintos diámetros pelvianos así como los índices de correlación entre la longitud fetal y dichos parámetros pelvianos.

TABLA 1 Resumen de las características de los embriones y fetos estudiados

Número Fetal	Longitud Fetal	Edad Gestac.	Sección Cortes	Grosor Cortes	Aumento Reconst.	Cortes Reconst.
1	16 mm.cc.	7 sem.	Transver.	10 μ	15	1 de 3
2	18 mm.cc.	7 sem.	Transver.	10 μ	15	1 de 3
3	23 mm.cc.	7,5 sem.	Transver.	20 μ	15	3 de 4
4	24 mm.cc.	7,5 sem.	Transver.	20 μ	15	3 de 4
5	26 mm.cc.	7,5 sem.	Transver.	26 μ	15	1 de 2
6	33 mm.cc.	9 sem.	Longitud.	20 μ	15	3 de 4
7	33 mm.cc.	9 sem.	Transver.	35 μ	15	4
8	37 mm.cc.	9,5 sem.	Transver.	37 μ	15	4 de 3
9	42 mm.cc.	10 sem.	Longitud.	20 μ	15	Todos
10	43 mm.cc.	10 sem.	Longitud.	20 μ	15	3 de 4
11	60 mm.cc.	3 meses	Transver.	35 μ	15	4 de 3
12	70 mm.cc.	3,5 meses	Transver.	60 μ	15	2 de 1
13	82 mm.cc.	3,5 meses	Transver.	67 μ	15	2 de 1
14	95 mm.cc.	4 meses	Transver.	60 μ	15	2 de 1

Resultados

Nuestros resultados expresan de manera manifiesta una serie de cambios progresivos que conducen a los esbozos pelvianos a establecer su morfología definitiva.

A) Fosas Ilicas. Bordes Coxales.

Las fosas iliacas empiezan a observarse en los embriones de 16 y 18 mm.cc., apareciendo luego bien definidas en toda la serie. En los embriones más pequeños (23-42 mm.cc.), su disposición es casi vertical. La

fosa externa es plana o ligeramente convexa, en tanto que la interna es cóncava en su parte dorsal. Alrededor de las doce semanas (feto de 60 mm.cc.), las fosas ilíacas ya se muestran perfectamente conformadas y con su disposición definitiva. La interna, cóncava hacia arriba y la externa hacia abajo.

La cresta ilíaca, al principio aplanada, (embriones de 16-24 mm.cc.), se transforma enseguida en convexa. Casi simultáneamente, una basculación de la pelvis, sobre un eje transversal, hace que la cresta ilíaca adopte además una inclinación anteroposterior.

Las espinas ilíacas anteriores y posteriores, ya esbozadas en los embriones más pequeños de la serie (16-24 mm.cc.), se hacen notoriamente manifiestas a partir del embrión de 33 mm.cc. A los tres meses, en el feto de 60 mm.cc. ya han alcanzado el desarrollo completo, con unas escotaduras innominadas muy bien definidas.

Las espinas ciáticas, esbozadas en los embriones de 23-26 mm.cc., aparecen ya perfectamente configuradas en el feto de 60 mm.cc., con una escotadura ciática muy desarrollada.

B) Sínfisis del pubis

La conformación de la sínfisis del pubis marca uno de los hechos fundamentales del desarrollo pelviano. En los embriones más tempranos de nuestra serie (23-26 mm.cc.), los esbozos de la sínfisis aparecen sin soldar, paralelos y notoriamente separados, disposición que recuerda, en algunos casos, al anillo pelviano de las aves.

En el curso del desarrollo ontogénico posterior, se produce una rotación hacia adentro de los esbozos sinfisarios de cada lado, que conduce a una aproximación progresiva de estas porciones, que terminarán por fusionarse en el feto de 37 mm.cc. Este giro pelviano, alrededor de un eje vertical que apenas afecta a las porciones ilíaca e isquiática del hueso, además del cierre del anillo, es responsable de una disminución de los teóricos diámetros antero posteriores de la pelvis (embriones entre 26 y 33 mm.cc.).

En las series embrionarias más jóvenes (23 a 33 mm.cc.), los esbozos pubianos rebasan la altura alcanzada por las fosas ilíacas y por la unión lumbosacra. En el feto de 37 mm.cc., la sínfisis se sitúa por debajo de las crestas ilíacas pero permanece todavía por encima de la articulación lumbosacra. Estas alturas se igualan en el feto de 42 mm.cc. En el de 70 mm.cc., el pubis ya se sitúa por debajo del futuro promontorio.

C) Tuberosidad isquiática

Es la región pelviana de desarrollo ontogénico más confuso. Aparece escasamente marcada en los embriones más jóvenes estudiados por nosotros (23-26 mm.cc.). Su evolución posterior varía bastante según los embriones estudiados, aunque en general presenta escaso desarrollo.

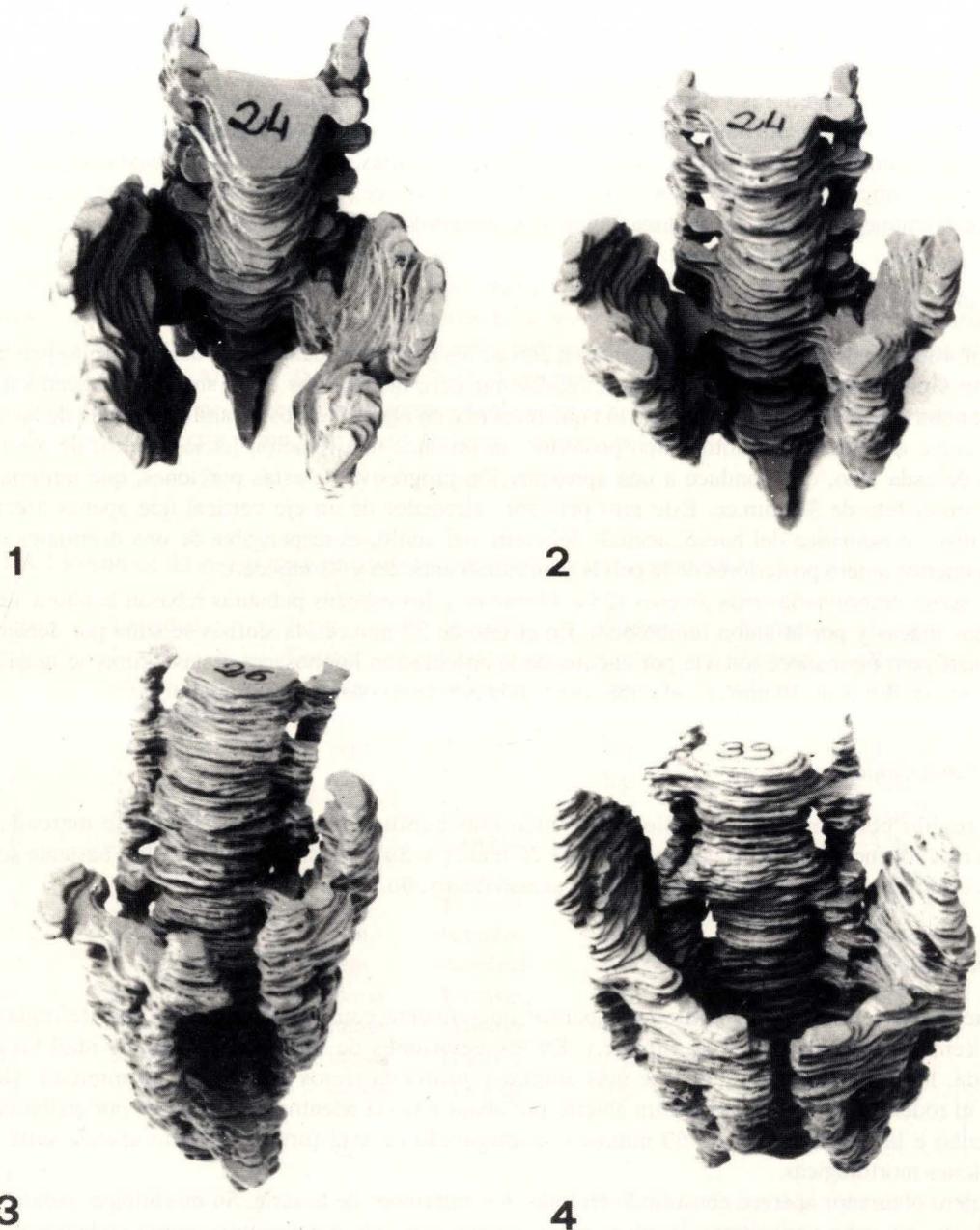
D) Cuidad cotiloidea. Agujero obturador

En nuestra serie, la cavidad cotiloidea aparece inicialmente como una depresión mal definida y poco profunda (embriones entre 23 y 26 mm.cc.). En los embriones de 33 mm.cc., esta cavidad ya aparece conformada, haciéndose paulatinamente más amplia y profunda (fetos entre 37 y 60 mm.cc.). Desde su aparición, el rodete glenoideo se encuentra abierto por abajo y hacia adentro, en tanto que por arriba forma un extenso techo a la cavidad (feto de 60 mm.cc.). Configurado de esta forma, el cotilo apenas sufre nuevas modificaciones morfológicas.

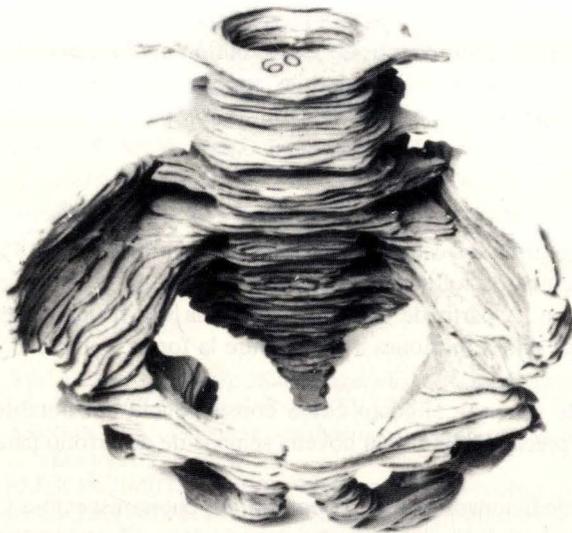
El agujero obturador aparece constituido en todos los embriones de la serie. Su morfología ovoide y de eje mayor oblicuo, no sufre variaciones decisivas en el tiempo estudiado por nosotros, como podemos ver en los fetos de 37 y 60 mm.cc. Su plano de orientación, como el de la cavidad cotiloidea, está condicionado por la evolución de ambos esbozos pubianos.

E) Región Sacrocoxígea

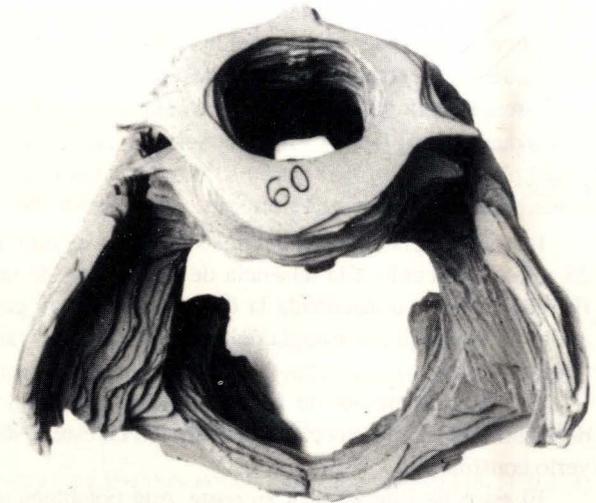
A consecuencia de la curvatura del dorso embrionario, la columna sacrocoxígea aparece fuertemente acostada en los embriones más pequeños de la serie (16,18 y 23 mm.cc.). En el embrión de 33 mm.cc. el sacro



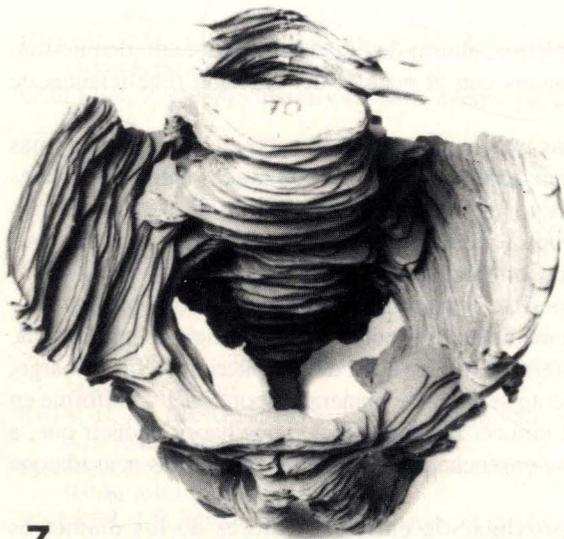
- FIGURA 1.** Embrión humano de 24 mm.cc. Visión anterosuperior de la pelvis ósea. Fosas ilíacas verticales. Escotaduras ciáticas delimitadas. Ramas isquiopúbicas paralelas y separadas.
- FIGURA 2.** Embrión humano 24 mm.cc. Esbozos pubianos muy separados. En columna lumbar los agujeros de conjunción aparecen conformados. Canal raquídeo abierto.
- FIGURA 3.** Embrión humano 26 mm.cc. Visión anterior de la pelvis. La cavidad cotiloidea, aunque esbozada, continúa sin delimitarse. El anillo pelviano no ha completado su cierre.
- FIGURA 4.** Embrión humano 33 mm.cc. Visión anterior de la pelvis. Cavidad cotiloidea conformada. Sínfisis púbica sin fusionarse.



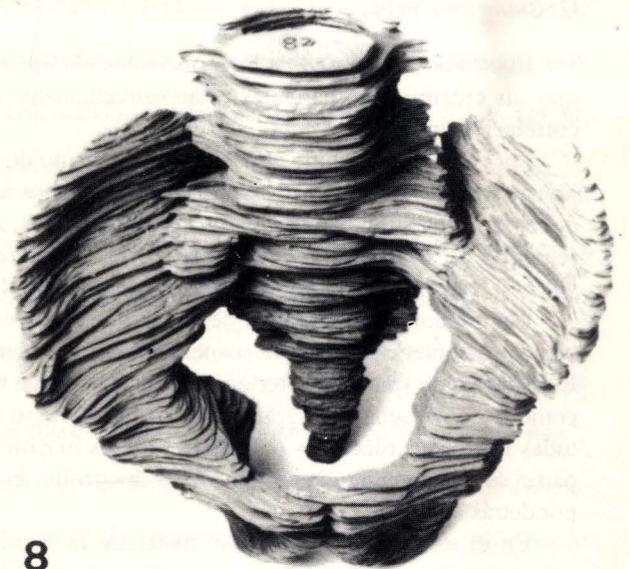
5



6



7



8

FIGURA 5. Feto humano 60 mm.cc. Visión anterior y superior de la pelvis. Fosas ilíacas han ampliado su superficie. El promontorio aparece esbozado.

FIGURA 6. Feto humano 60 mm.cc. Visión superior de la pelvis ósea. La morfología parece definitiva.

FIGURA 7. Feto humano 70 mm.cc. Visión anterior y superior de la pelvis. La sínfisis pubiana se sitúa por debajo del plano del promontorio. Tuberosidades isquiáticas visibles.

FIGURA 8. Feto humano 82 mm.cc. Vista anterosuperior. Aspecto robusto de la pieza. Espinas ciáticas muy voluminosas.

adopta una posición vertical, aunque el coxis sigue manteniendo su posición horizontal. Sólo a partir del feto de 60 mm.cc., la región sacrocoxígea comienza a adoptar su posición definitiva.

Al verticalizar el sacro su posición acostada, el anillo pelviano se eleva respecto a la región sacrocoxígea. A consecuencia de este enderezamiento, en el feto de 37 mm.cc., el plano del estrecho inferior de la pelvis se sitúa a nivel del tercer agujero sacro. Pocos días más tarde, sin embargo (feto de 42 mm.cc.), el anillo pelviano y la región sacrocoxígea presentan ya una topografía que puede considerarse como definitiva.

El canal sacro se encuentra ampliamente abierto por detrás (como vemos en este embrión de 24 mm.cc.) y no comienza a cerrarse hasta el feto de 37 mm.cc. La cresta sacra, lo mismo que las apófisis espinosas de las lumbares, sólo empiezan a manifestarse en nuestro feto de 60 mm.cc.

F) Estrechos pelvianos

La morfología de los estrechos superiores es muy irregular en los estadios más precoces (embriones de 18 a 23 mm.cc.), debido a la ausencia de la mayoría de sus puntos de referencia. Estos no adoptan su orientación fisiológica hasta transcurrida la décima semana de gestación. A partir de estas fechas, y una vez fusionado el anillo pelviano, la morfología del estrecho superior varía, de unos embriones a otros, entre la forma triangular y ovoidea.

El estrecho medio, de forma circular u ovoide, suele ser muy angosto como consecuencia del notable desarrollo de las espinas ciáticas. También en este caso, es preciso esperar a la novena semana de desarrollo para verlo constituido.

El estrecho inferior, por su parte, está notablemente condicionado por la topografía del pubis respecto a la región sacrocoxígea. Su plano de delimitación, muy acostado todavía en los embriones de 16 y 18 mm.cc., se hace vertical en el embrión de 33 mm.cc. y no acaba de adoptar su orientación fisiológica hasta los fetos de 37-42 mm.cc.

G) Biométrica pelviana

El estudio biométrico de los principales parámetros (diámetros, altura) de la pelvis embrionaria demuestran que sus crecimientos parciales están estrechamente relacionados con el general del embrión (coeficientes de correlación entre 0,77 y 0,99).

Por otro lado y debido al peculiar paralelismo de las ramas isquiopubianas, observado en los embriones más jóvenes de nuestra serie (16 a 23 mm.cc.), podemos afirmar que, en estos casos, las longitudes anteroposteriores del embrión rebasan con claridad a las transversales, sin embargo, al aproximarse entre sí los esbozos sinfisarios (embrión de 26 mm.cc.), la biometría de los diámetros anteroposteriores y transversos comienzan a acercarse sus valores, hasta igualarlos en los embriones entre 33 y 42 mm. de longitud craneocaudal.

Centrándonos en la gráfica de la pelvimetría externa, es posible comprobar como los diámetros bicrestileo y biespinoso anterior, crecen de manera notable y ascendente a medida que se incrementa la longitud embrionaria. El diámetro biespinoso posterior, al comienzo, sigue un crecimiento similar a los de los anteriores. Sin embargo, como se comprueba en la gráfica correspondiente, su crecimiento se frena de manera proporcional y uniforme en todas las reconstrucciones pelvianas de fetos mayores de 42 mm.cc. Estos resultados nos hacen deducir que, a partir de un momento determinado del desarrollo, la pelvis se ensancha por delante de forma más acusada que por detrás.

En el estrecho superior, se mantiene la paulatina aproximación entre los valores de los diámetros anteroposteriores y transversos. En este caso, parece prevalecer, aunque sea por muy poco, la supremacía del diámetro anteroposterior. En este estudio, esta peculiaridad se acentúa, como demuestra la gráfica correspondiente, en el embrión de 82 mm.cc. de angulación sinfisaria muy abierta, lo que proporciona al estrecho superior una forma más ovoide y cuadrangular.

Más complejo es el estudio biométrico de los diámetros pelvianos del estrecho medio. Una vez constituida la excavación (embrión de 33 mm.cc.), sus diámetros anteroposterior y transversos están muy próximos en sus valores como corresponde a la morfología circular u ovoide de este estrecho. Esta relación se rompe, en nuestro estudio, en el feto de 83 mm.cc., con una inversión de valores y un predominio de las longitudes transversas.

La morfología del estrecho inferior de la pelvis aparece profundamente condicionada por el grado de elevación del pubis y por la posición más o menos acostada y prominente del vértice del coxis, con predominio del anteroposterior en las series más jóvenes y mayor igualdad e incluso superioridad del transversal en algunos de los fetos de mayor longitud.

La altura pelviana, muestra un crecimiento progresivo y bastante uniforme. En cuanto a la cavidad cotiloidea muestra una evolución bastante proporcional a lo largo de las series estudiadas. Respecto al ángulo subpúbico, su angulación va disminuyendo a medida que avanza el desarrollo pelviano.

Por último, hemos de hacer constar que los índices de correlación y de regresión entre las variables estudiadas y la longitud fetal, así como la relación entre las distintas variables de cada estrecho, resultan altamente satisfactorias, con índices de correlación en el estrecho superior, mayores de 0,9 para la mayoría de parámetros comparados. En el estrecho medio esta dependencia estadística sigue siendo elevada (índice de correlación superior a 0,8). Sólo en el estrecho inferior, desciende algo, aunque conservando un satisfactorio índice de correlación (entre 0,7-0,9).

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, E. (1979): "Sacral agenesis with associated anomalies. (Caudal regression syndrome): Autopsy case report". *Clin. Orthop.* **145**: (168-171) EE.UU.
- ASIRON, P.J. (1972): "Contribución al estudio de la formación y evolución de la columna lumbar en el niño". Tesis Doctoral. Zaragoza.
- BLESCHCHMIDT, E. (1954): "Rekonstruktions verfahren mit vermen dung von kunststoffen". *Anat. Entwgesch* **118**: (170-174).
- BLESCHCHMIDT, E. (1954): "Die vorgeburtlichen wntwich lungsstadien menschen". Karger Basel, New York.
- COPANO, J.A. et col. (1988): "Contribución al estudio morfogenético y radiográfico de la cadera humana". *Actas. XIII C. S.A.E.* (129) Oviedo.
- DELMA, A. (1948): "Sur les connexions sacro-iliaques". *Ass. Anat.* **164**: citado por RIGAUD, A.
- DOSKOCIL, M. (1984): "Contributions to the study of human hip joint de development" *Acta. Univ. Carol.* **30/7-8**: (529-544). Czechoslovakia.
- GAMBLE, J.G.; SIMMONS, S.C.; FREEDMAN, M. (1986): "The symphysis pubis. Anatomic and pathologic considerations". *Clin. Orthop.* **203**: (261-272). EE.UU.
- GULUB, D.M.; BRONOVITSKAIA, G.M. (1981): "Development of the human hip joint and its inervation". *Arkh. Anat. Gistol.Embriol.* **80/5**: (47-56).
- GUILLEN, P. (1988): "Fases y estudios diferenciativos de la articulación coxo-femoral". *Actas. XIII C. S.A.E.* (29-30) Oviedo.
- LAVELY (1947): Citado por BOWES (1957) en "Recientes avances en obstetricia y ginecología". Edit. Toray. Barcelona.
- MEDEARIS, A.L.; SHIELDS, J.R. (1984): "Normal fetal and pelvic anatomy: a cross-section review". *Clin.Obstet.Gynecol.* **27/2**: (276-285).
- NIETO, J.L.; TORRES, A.M. (1988): "Cambios en la orientación del pubis durante el desarrollo de la pelvis humana". *Actas XIII C.S.A.E.* (104). Oviedo.
- NIETO, J.L.; GIMENO, A.; GASCON, A. (1986): "Evolución morfológica de la pelvis en embriones humanos de 23 a 99 mm.cc.". *Actas. XII C.S.A.E.* (18). Sevilla.
- PILLET, J. (1968): "Reconstruction du pelvis d'un embryon humain de 7,5 mm.". *C.R.Ass. Anat.* **139**: (1013-1033).
- PILLET, J. (1968): "Reconstruction des organes pelviens d'un embryon de 14 mm." (estade 19 de Streeter). *Faculté de Medecine, Angers.*
- RIGAUD, A.; LENG, J.; BONJEAN, P. (1968): "Reconstruction d'une articulation sacro-iliaque d'un foetus de 60 mm.". *Ass. Anat.* **139**: (1053-1055).
- SOURI, S.J. (1958): "The antenatal development of the human pelvis in relation to sex dimorphism". *Inst. of anat. (Madras. Indian Acad.* **48/6**: (284-296).
- WALKER, J.M. (1981): "Histological study of the fetal development of the human acetabulum and labrum significance in congenital hip disease". *Yale. J. Biol. Med.* **54/4**: (255-263).

Correspondencia: J.L. Nieto
Dpto. Ciencias Morfológicas
Universidad de Zaragoza
50008 Domingo Miral, s/n Zaragoza. España

EFFECTOS DEL GLUTAMATO MONOSODICO SOBRE LAS NEURONAS DEL NUCLEO ARCUATO DEL HIPOTALAMO DE RATA. ESTUDIO MORFOMETRICO ULTRAESTRUCTURAL

EFFECTS OF MONOSODIUM GLUTAMATE ON THE NEURONS OF THE ARCUATE NUCLEUS OF THE RAT HYPOTHALAMUS: A MORPHOMETRIC-ULTRASTRUCTURAL STUDY

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

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio morfométrico ultraestructural de las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de ratas tratadas a los 4 días de edad con una única dosis de 4 mg/g peso corporal de glutamato monosódico (GMS) en solución acuosa por vía subcutánea, que fueron sacrificadas 7, 30 y 120 días después, así como de ratas normales y controles (inyectadas con agua bidestilada) de las mismas edades. En relación con los animales normales y controles de las respectivas edades, las neuronas del núcleo arcuato de los animales sacrificados 7 días después de la administración de GMS muestran un incremento de las áreas celular, nuclear y citoplasmática. En las sacrificadas a los 30 días de la administración del GMS existe una disminución de estos parámetros. En los animales sacrificados 120 días después del tratamiento con GMS existe un incremento de las áreas celular y citoplasmática, sin modificaciones en el tamaño del núcleo celular. Se discuten estos hallazgos en relación con datos ultraestructurales previos..

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

SUMMARY

A morphometric-ultrastructural study was carried out on the neurons of the hypothalamic arcuate nucleus of rats treated at 4 days of age with a single subcutaneous dose of 4 mg/kg b.w. of monosodium glutamate (MSG) in aqueous solution that were sacrificed at 7, 30 and 120 days, and of normal and control (injected with bidistilled water) animals of the same age. With respect to the normal and control rats, the neurons of the arcuate nucleus of the animals sacrificed at 7 days after MSG administration showed an increase in the cellular, nuclear and cytoplasmic areas. In the animals sacrificed at 30 days following MSG administration a decrease in these parameters was observed. In the rats sacrificed at 120 days after MSG administration an increase was observed in the cellular and cytoplasmic areas, but no alterations in the size of the cellular nucleus. These findings are discussed in relation to previous ultrastructural data.

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

Introducción

El glutamato monosódico (GMS), ampliamente utilizado como aditivo en alimentación, es sabido que tiene efectos neurotóxicos, fundamentalmente sobre el núcleo arcuato del hipotálamo, cuando se administra en el período neonatal (para revisión véase Pastor y col., 1990).

Las lesiones causadas por el GMS en el núcleo arcuato provocan severos trastornos neuroendocrinos, que en conjunto constituyen el "síndrome del glutamato monosódico", caracterizado por disminución del 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).

En un trabajo previo (Pastor y col., 1990) hemos estudiado la ultraestructura del territorio del núcleo arcuato, así como del epéndimo del receso infundibular del tercer ventrículo, en ratas tratadas con GMS a los 4 días de edad y sacrificadas 7, 30 y 120 días después de la administración de esta sustancia. En el presente trabajo se describen las alteraciones morfométricas de las neuronas del núcleo arcuato de estos animales.

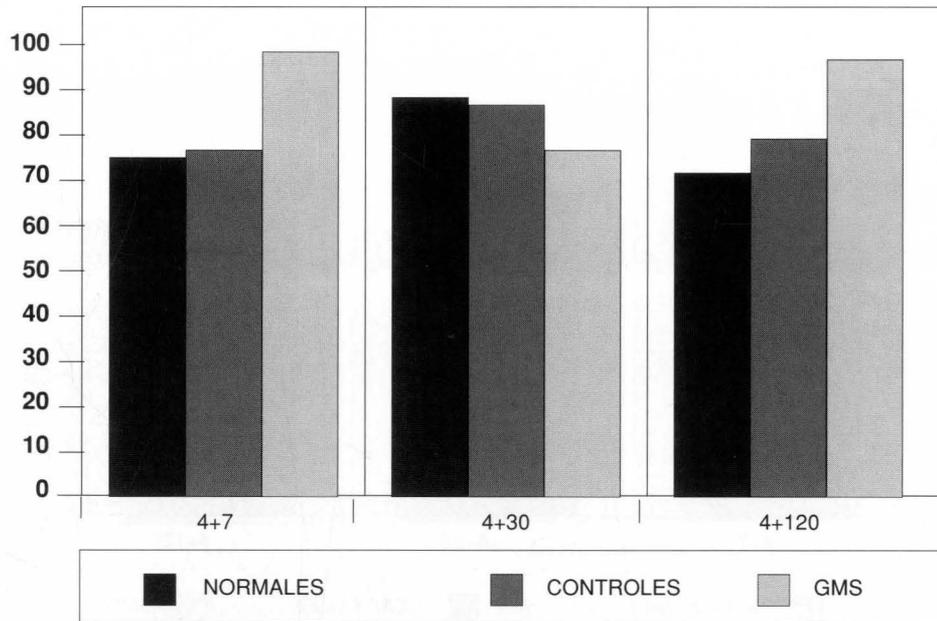
Material y Métodos

Hemos utilizado para nuestro estudio 60 ratas albinas machos de la cepa Sprague-Dawley, sometidas a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas, que han dispuesto de comida y agua a voluntad. A treinta animales se les administró a los 4 días de edad una dosis de L-glutamato monosódico (4 mg/g peso corporal; Sigma) en solución acuosa por vía subcutánea (grupo experimental - GMS). Quince animales fueron inyectados a los 4 días de edad con agua bidestilada (grupo control - BID). Quince animales no sufrieron ningún tipo de experiencia (grupo normal - NOR). El sacrificio de los animales de cada grupo se realizó, por terceras partes, a los 11 (grupos 4+7), a los 34 (grupos 4+30) y a los 124 (grupos 4+120) días de edad. El procesamiento de las piezas se describe en un trabajo previo (PASTOR y col., 1990).

Para realizar el análisis morfométrico se eligieron al azar dos animales de cada uno de los grupos (NOR 4+7, NOR 4+30, NOR 4+120, BID 4+7, BID 4+30, BID 4+120, GMS 4+7, GMS 4+30, GMS 4+120), procediéndose a obtener cortes ultrafinos del territorio del núcleo arcuato. De cada uno de los animales se escogieron aleatoriamente dos rejillas. Una vez la rejilla en el interior del microscopio electrónico (Philips EM-201), se seleccionó uno de los cortes montados en función de su aspecto y de la preservación del tejido. Tras localizar el territorio del núcleo arcuato se obtuvieron nueve micrografías (a 670 aumentos en el negativo de 35 mm), de forma totalmente aleatoria pero procurando no superponer las imágenes. Como quiera que de cada animal se utilizaron dos rejillas, en una de ellas se obtuvieron las imágenes de un núcleo arcuato y en la otra del núcleo contralateral. Puesto que de cada grupo se utilizaron dos animales, el resultado son 36 micrografías de cada grupo. La única finalidad de las mencionadas micrografías fue la de la realización de los estudios morfométricos. Se hicieron por separado las imágenes destinadas al estudio cuantitativo para tener la seguridad de que la elección de la muestra se realizaba de forma totalmente aleatoria y no venía determinada por ningún otro criterio. Tras positivar los negativos en papel fotográfico, con una magnificación 5x, se obtuvieron imágenes equivalentes cada una a 1545 μm^2 del territorio del núcleo arcuato. En las 36 imágenes de cada grupo se midieron todos los somas de las neuronas cuyo núcleo hubiese sido afectado por el corte. Mediante un analizador semiautomático de imágenes IBAS I KONTRON se determinó el área celular y el área nuclear de cada uno de los somas, obteniéndose el área citoplasmática por la diferencia entre los valores indicados. Para el cálculo de la significación estadística de las diferencias entre las medias aritméticas de las áreas celular, nuclear y citoplasmática se ha utilizado la "t" de Student.

Resultados

El análisis morfométrico ultraestructural de las neuronas del núcleo arcuato de las ratas sacrificadas a los 11 días de edad (grupos 4+7) demuestra la existencia de un incremento estadísticamente significativo del área celu-

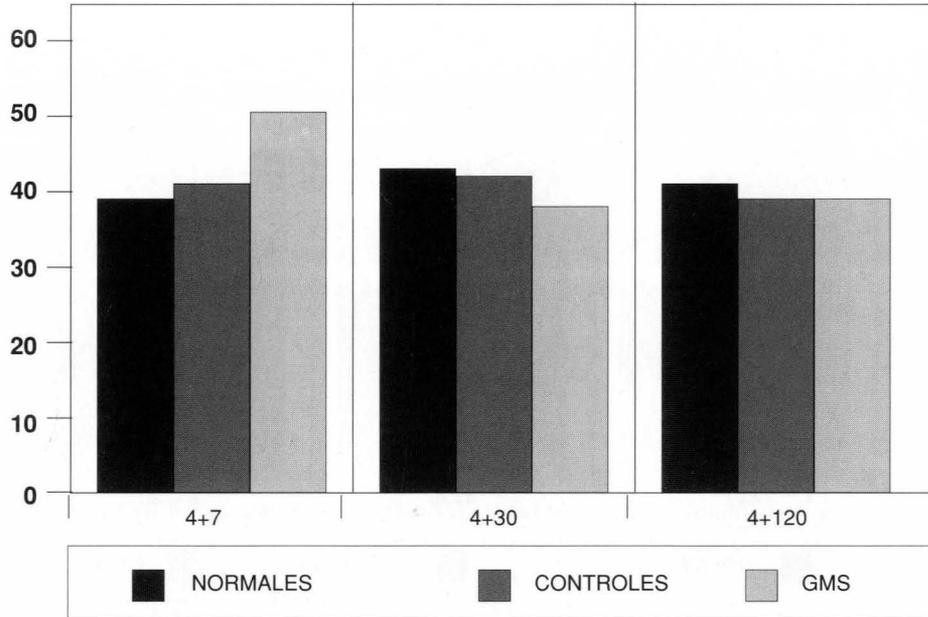
GRAFICO 1. Areas celulares de las neuronas del núcleo arcuato**TABLA 1. Areas celulares de las neuronas del núcleo arcuato**

Grupo	Area celular (μm^2) (Media \pm S.D.)	N. ^o neuronas medidas
NOR 4+7	74.19 \pm 20.10	104
BID 4+7	74.95 \pm 20.84	113
GMS 4+7	97.71 \pm 33.38	95
NOR 4+30	87.83 \pm 23.15	102
BID 4+30	86.56 \pm 28.38	113
GMS 4+30	76.56 \pm 17.38	93
NOR 4+120	77.35 \pm 21.27	101
BID 4+120	78.61 \pm 21.19	91
BMS 4+120	95.26 \pm 35.52	92

GMS 4+7 > NOR 4+7 ($p < 0.001$)
 GMS 4+7 > BID 4+7 ($p < 0.001$)
 BID 4+7 - NOR 4+7 (N.S.)

GMS 4+30 < NOR 4+30 ($p < 0.001$)
 GMS 4+30 < BID 4+30 ($p < 0.001$)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

GMS 4+120 > NOR 4+120 ($p < 0.001$)
 GMS 4+120 > BID 4+120 ($p < 0.001$)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

GRAFICO 2. Areas nucleares de las neuronas del núcleo arcuato**TABLA 2. Areas nucleares de las neuronas del núcleo arcuato**

Grupo	Area celular (μm^2) (Media \pm S.D.)	N. ^o neuronas medidas
NOR 4+7	30.03 \pm 12.35	104
BID 4+7	41.10 \pm 10.96	113
GMS 4+7	50.58 \pm 18.14	95
NOR 4+30	43.01 \pm 11.86	102
BID 4+30	42.09 \pm 12.39	113
GMS 4+30	37.48 \pm 10.84	93
NOR 4+120	40.80 \pm 11.51	101
BID 4+120	39.35 \pm 10.44	91
BMS 4+120	39.23 \pm 14.07	92

GMS 4+7 > NOR 4+7 ($p < 0.001$)
 GMS 4+7 > BID 4+7 ($p < 0.001$)
 BID 4+7 - NOR 4+7 (N.S.)

GMS 4+30 < NOR 4+30 ($p < 0.001$)
 GMS 4+30 < BID 4+30 ($p < 0.001$)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

GMS 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)
 GMS 4+120 - BID 4+120 (N.S.)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

GRAFICO 3. Areas citoplasmáticas de las neuronas del núcleo arcuato

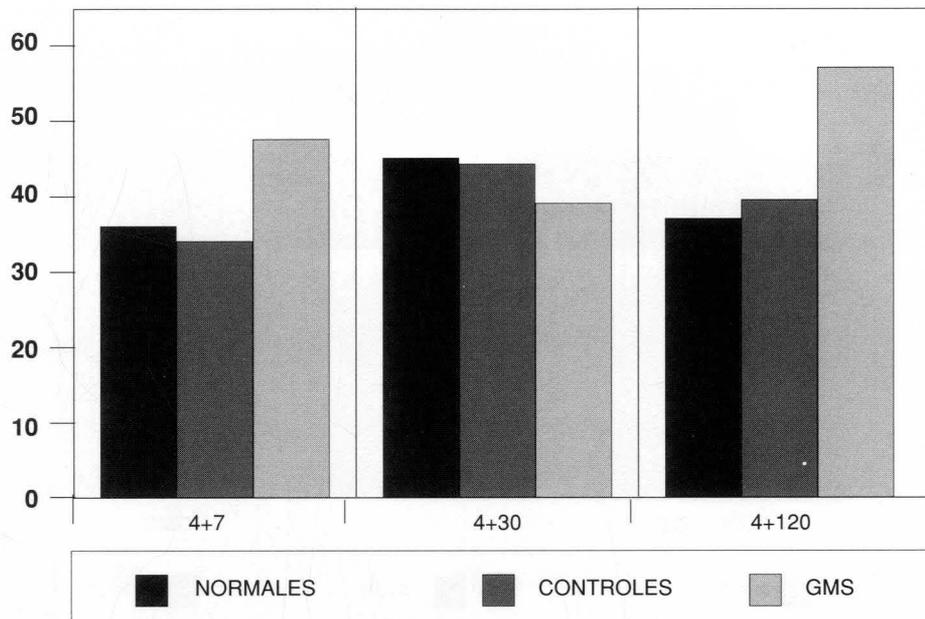


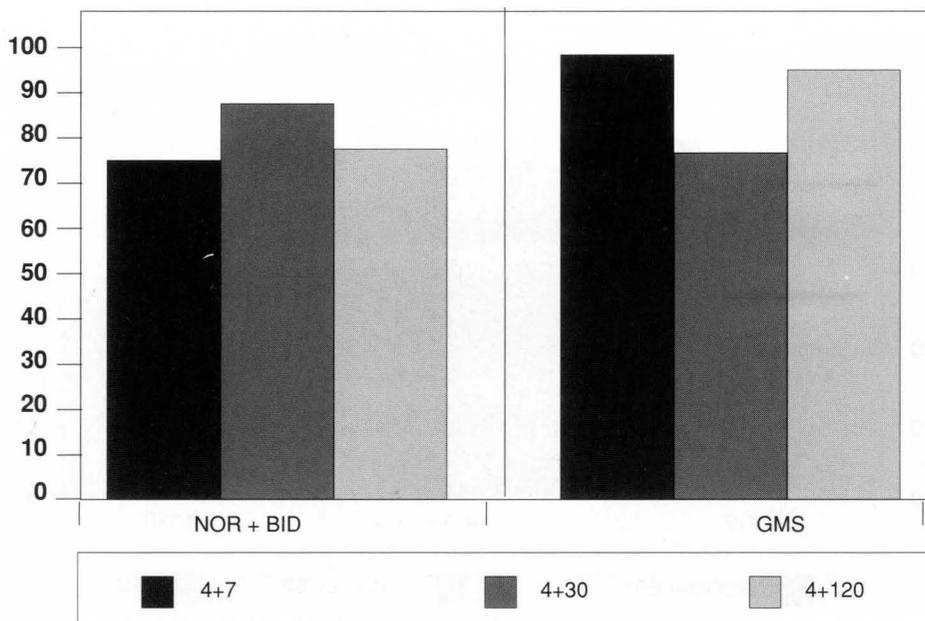
TABLA 3. Areas nucleares de las neuronas del núcleo arcuato

Grupo	Area celular (µm²) (Media ± S.D.)	N.º neuronas medidas
NOR 4+7	35.16 ± 14.78	104
BID 4+7	33.85 ± 15.37	113
GMS 4+7	47.13 ± 20.60	95
NOR 4±30	44.81 ± 14.96	102
BID 4+30	44.47 ± 12.36	113
GMS 4+30	39.08 ± 13.94	93
NOR 4+120	36.56 ± 14.79	101
BID 4+120	39.26 ± 14.98	91
BMS 4+120	56.03 ± 31.22	92

GMS 4+7 > NOR 4+7 (p < 0.001)
 GMS 4+7 > BID 4+7 (p < 0.001)
 BID 4+7 - NOR 4+7 (N.S.)

GMS 4+30 < NOR 4+30 (p < 0.005)
 GMS 4+30 < BID 4+30 (p < 0.005)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

GMS 4+120 - NOR 4+120 (p < 0.001)
 GMS 4+120 - BID 4+120 (p < 0.001)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

GRAFICO 4. Areas citoplasmáticas de las neuronas del núcleo arcuato**TABLA 4. Areas celulares de las neuronas del núcleo arcuato**

Grupo	Area celular (μm^2) (Media \pm S.D.)	N. ^o neuronas medidas
NOR + BID 4+7	74.58 \pm 20.45	217
GMS 4+7	97.71 \pm 33.38	95
NOR \pm BID 4+30	87.16 \pm 25.98	215
GMS 4+30	76.56 \pm 17.38	93
NOR + BID 4+120	77.95 \pm 21.19	192
GMS 4+120	95.26 \pm 35.52	92

NOR + BID 4+30 > NOR + BID 4+7 (P > 0.001)

NOR + BID 4+30 > NOR + BID 4+120 (P > 0.001)

NOR + BID 4+120 < NOR + BID 4+7 (P < 0.05)

GMS 4+30 < NOR + BID 4+7 (P < 0.001)

GMS 4+30 < GMS 4+120 (P < 0.001)

GMS 4+120 - GMS 4+7 (N.S)

GRAFICO 5. Areas celulares de las neuronas del núcleo arcuato

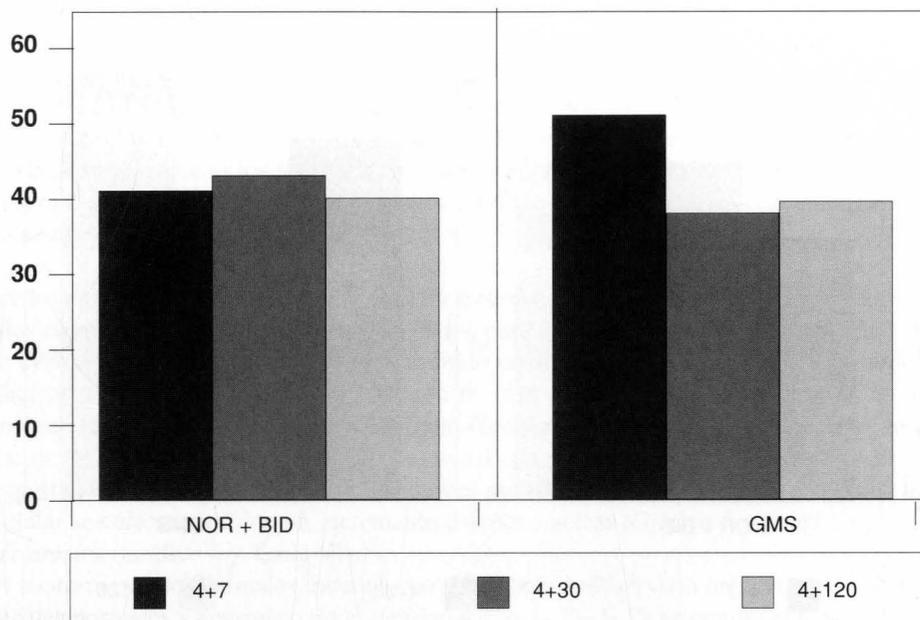
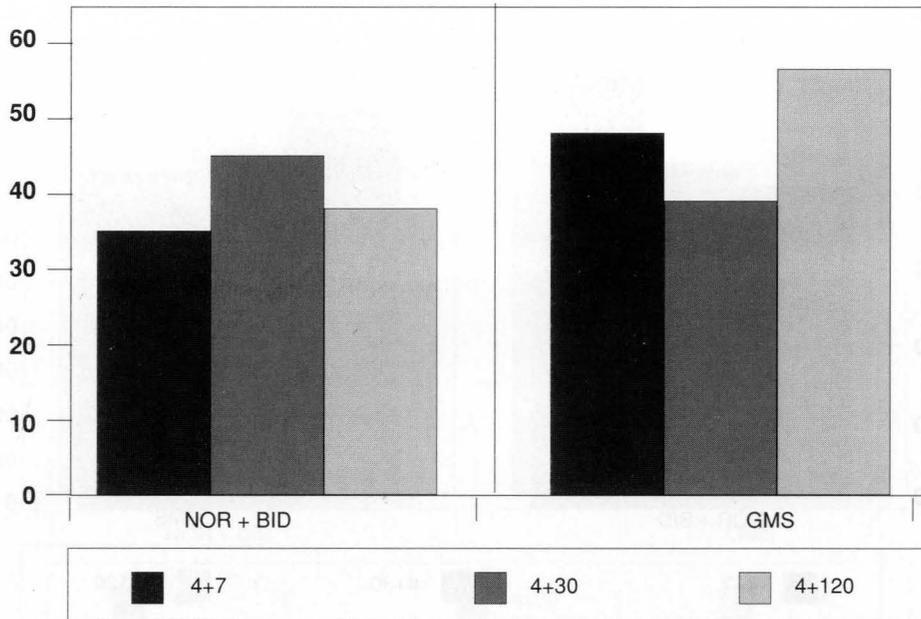


TABLA 5. Areas celulares de las neuronas del núcleo arcuato

Grupo	Area celular (µm²) (Media ± S.D.)	N.º neuronas medidas
NOR + BID 4+7	40.11 ± 11.66	217
GMS 4+7	50.58 ± 18.14	95
NOR ± BID 4+30	42.48 ± 14.39	215
GMS 4+30	37.48 ± 10.84	93
NOR + BID 4+120	40.11 ± 11.02	192
GMS 4+120	39.23 ± 14.07	92

NOR + BID 4+30 > NOR + BID 4+7 (P > 0.05)
 NOR + BID 4+30 > NOR + BID 4+120 (P > 0.05)
 NOR + BID 4+120 < NOR + BID 4+7 (N.S)

GMS 4+30 < NOR + BID 4+7 (P < 0.001)
 GMS 4+30 < GMS 4+120 (N.S)
 GMS 4+120 - GMS 4+7 (P < 0.001)

GRAFICO 6. Areas citoplasmáticas de las neuronas del núcleo arcuato**TABLA 6. Areas celulares de las neuronas del núcleo arcuato**

Grupo	Area celular (μm^2) (Media \pm S.D.)	N. ^o neuronas medidas
NOR + BID 4+7	34.48 \pm 15.06	217
GMS 4+7	47.13 \pm 20.60	95
NOR \pm BID 4+30	44.63 \pm 17.10	215
GMS 4+30	39.08 \pm 13.94	93
NOR + BID 4+120	37.84 \pm 14.90	192
GMS 4+120	56.03 \pm 31.22	92

NOR + BID 4+30 > NOR + BID 4+7 (P > 0.001)
 NOR + BID 4+30 > NOR + BID 4+120 (P > 0.001)
 NOR + BID 4+120 < NOR + BID 4+7 (P > 0.05)

GMS 4+30 < NOR + BID 4+7 (P > 0.005)
 GMS 4+30 < GMS 4+120 (P > 0.001)
 GMS 4+120 - GMS 4+7 (P > 0.05)

lar en los animales tratados con GMS, en relación con los normales y controles (Gráfico 1 y Tabla I). Dicho incremento afecta tanto al área nuclear (Gráfico 2 y Tabla II) como al área citoplasmática (Gráfico 3 y Tabla III).

Por el contrario, en los animales sacrificados a los 34 días de edad (grupos 4+30) las neuronas de las ratas tratadas con GMS muestran una disminución estadísticamente significativa del área celular (Gráfico 1 y Tabla I) cuando se comparan con las de los animales normales y controles de la misma edad. La referida disminución afecta tanto al área nuclear (Gráfico 2 y Tabla II) como al área citoplasmática (Gráfico 3 y Tabla III).

En los animales sacrificados a los 124 días de edad (grupos 4+120) hemos comprobado que el área celular de las neuronas del núcleo arcuato está incrementada, de forma estadísticamente significativa, en las ratas tratadas con GMS, en relación con los animales normales y controles (Gráfico 1 y Tabla I). Este incremento se produce exclusivamente en base al área citoplasmática (Gráfico 3 y Tabla III), no existiendo diferencias significativas en el área nuclear (Gráfico 2 y Tabla II).

Como quiera que no existen diferencias estadísticamente significativas de los distintos parámetros cuantificados entre los animales normales y controles de la misma edad (Tablas I, II y III), procedimos a agruparlos considerándolos como una única población (NOR+BIB), para la que determinamos las medidas de centralización y dispersión (Tablas IV, V y VI). Esto nos ha permitido comparar la evolución de los distintos parámetros (áreas celular, nuclear y citoplasmática) en relación con la edad del sacrificio, tanto para los animales tratados con GMS como para el conjunto de los normales y controles. En el Gráfico 4 y en la Tabla IV se comprueba que el área celular de los animales normales y controles sacrificados a los 34 días de edad es mayor, de forma estadísticamente significativa, que la de los mismos animales sacrificados a los 11 y a los 124 días. Este mayor tamaño del área celular se corresponde con un incremento del área nuclear (Gráfico 5 y Tabla V) y, preferentemente, del área citoplasmática (Gráfico 6 y Tabla VI).

Por el contrario, en los animales tratados con GMS hemos observado una evolución totalmente inversa a la de los animales normales y controles. En el Gráfico 4 y en la Tabla IV se comprueba que a los 34 días de edad el área celular de las neuronas del núcleo arcuato de los animales tratados con GMS es menor que la de los animales sacrificados a los 11 y a los 124 días de edad. Los animales tratados con GMS de 34 días de edad presentan en relación con los sacrificados a los 11 días una disminución tanto del área nuclear (Gráfico 5 y Tabla V) como del área citoplasmática (Gráfico 6 y Tabla VI). Por otra parte en los animales tratados con GMS el incremento del área celular que se produce a los 124 días de edad, en relación con los sacrificados a los 34 días, se debe exclusivamente a un aumento del área citoplasmática (Gráfico 6 y Tabla VI), sin que se modifique el área nuclear (Gráfico 5 y Tabla V).

Discusión

En un trabajo previo (Pastor y col., 1990) hemos descrito la ultraestructura del territorio del núcleo arcuato de ratas tratadas con GMS a los 4 días de edad y sacrificadas a los 7, 30 y 120 días del tratamiento. En el presente trabajo pretendemos correlacionar nuestros referidos hallazgos ultraestructurales con las modificaciones morfológicas de las áreas celular, nuclear y citoplasmática de las neuronas del núcleo arcuato. Las neuronas del núcleo arcuato de los animales sacrificados a los 7 días de la administración del GMS presentan ultraestructuralmente signos de hiperactividad, destacando el incremento del retículo endoplásmico rugoso en relación con los animales normales y controles de la misma edad (Pastor y col., 1990). Por otra parte, el estudio morfológico de estos grupos de animales indica que a los 11 días de edad las neuronas del núcleo arcuato de las ratas tratadas con GMS muestran un incremento de las áreas celular, nuclear y citoplasmática en relación con los animales normales y controles de la misma edad. Si tenemos en cuenta que tras la administración de GMS existe una lesión de las neuronas del núcleo arcuato que aparece pocos minutos después, iniciándose una recuperación a partir de las 12 horas (Lemkey-Johnston y col., 1976; Mestres y Rascher, 1983), es de suponer que tanto los signos ultraestructurales de hiperactividad (Pastor y col., 1990) como el incremento del tamaño de las neuronas que aparecen a los 7 días de la administración de la sustancia son indicativos de una reacción compensadora de las neuronas que sobreviven al efecto lesivo agudo del GMS.

En los animales tratados con GMS sacrificados a los 34 días de edad hemos observado una marcada disminución del tamaño neuronal en relación con las ratas normales y controles de la misma edad. Este dato coincide con el hecho de que a esta edad parece existir un segundo efecto lesivo del GMS (Pastor y col., 1990), que podría estar en relación con las observaciones de Marani y col. (1982). Según estos autores el GMS provocaría, además de un efecto lesivo inmediato, una aceleración de la emigración de los somas neuronales dopaminérgicos desde la eminencia media hacia el núcleo arcuato. En condiciones normales dicha emigración tiene lugar entre los días 22 y 55 después del nacimiento (Marani y col., 1981), y en los animales tratados con GMS se adelanta aproximadamente dos semanas. Además de la aceleración de la emigración de los somas dopaminérgicos, el tratamiento con GMS provocaría, según Marani y col. (1982), que dichas células se destruyesen al alcanzar el territorio del núcleo arcuato, lo que es considerado por los citados autores como un efecto secundario del GMS, distinto del efecto inmediato que tiene lugar a los pocos minutos de la administración de la sustancia neurotóxica. Marani y col. (1982) argumentan que, cuando tiene lugar el efecto neurotóxico inmediato del GMS administrado neonatalmente, los somas dopaminérgicos aún no han emigrado hacia el núcleo arcuato y, por lo tanto, la ausencia de estas células después del día 25 de edad representa un efecto lesivo posterior en el tiempo al agudo e inmediato. En este sentido pensamos que tanto la disminución del tamaño neuronal en el núcleo arcuato como nuestras anteriores observaciones sobre la existencia de signos ultraestructurales de lesión en este territorio a los 34 días de edad (Pastor y col., 1990), pueden explicarse por la posible destrucción de neuronas dopaminérgicas emigradas en esos momentos hacia el núcleo arcuato, de acuerdo con los resultados de Marani y col. (1982).

En los animales sacrificados 120 días después de la administración de GMS hemos comprobado la existencia de una hipertrofia de las neuronas del núcleo arcuato, en relación con los animales normales y controles de la misma edad, debida exclusivamente a un incremento del área citoplasmática, puesto que no existen modificaciones en el área nuclear. Además, a esta edad se comprueba también un incremento del tamaño celular en los animales tratados con GMS en relación con los también tratados sacrificados a los 34 días de edad. Esto puede interpretarse como consecuencia de una fase de recuperación que seguiría al efecto lesivo tardío del GMS. Estos datos coinciden con las observaciones ultraestructurales (Pastor y col., 1990) que indican que en la mayor parte de los animales tratados con GMS y sacrificados a los 124 días de edad no existen signos ultraestructurales de lesión.

En definitiva, tanto los datos ultraestructurales (Pastor y col., 1990) como los morfométricos presentados en este trabajo indican que tras la lesión aguda e inmediata que sufre el núcleo arcuato de los animales tratados neonatalmente con GMS, a la que sigue una fase de recuperación, ampliamente referida en la literatura (Lemkey-Johnston y col., 1976; Mestres y Rascher, 1983), tiene lugar un segundo efecto lesivo, que nosotros hemos comprobado en animales sacrificados al mes de la administración del GMS, y que probablemente esté relacionado con la destrucción de neuronas dopaminérgicas emigradas al núcleo arcuato desde la eminencia media (Marani y col., 1982). Este segundo efecto lesivo es seguido de una fase de recuperación, que hemos comprobado en la mayor parte de los animales sacrificados a los 120 días del tratamiento con GMS.

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

- CLOUGH, R. W., P. F. ARAVICH y C. D. SLADEK (1986).- Monosodium glutamate neurotoxicity: a sex specific impairment of blood pressure but not vasopressin in developing rats. *Brain Res. Bull.*, **17**: 51-58.
- KIZER, J. S., S. HUMM, G. NICHOLSON, G. GREELEY y W. YOUNGBLOOD (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.
- LEMKEY-JOHNSTON, N., V. BUTLER y W. A. REYNOLDS (1976).- Glial changes in the progress of a chemical lesion. An electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, **167**: 481-502.

- MARANI, E., W. J. RIETVELD, M. E. BOON y N. M. GERRITS (1981).- Fluorescence-displacement from the median eminence towards the arcuate nucleus at puberty. *Histochemistry*, **73**:165-169.
- MARANI, E., W. J. RIETVELD y M. E. BOON (1982).- Monosodium glutamate accelerates migration of hypothalamic perikarya at puberty. *Histochemistry*, **75**: 145-150.
- MESTRES, P. y K. RASCHER (1983).- Effects of monosodium glutamate on the development of intraventricular axons in the rat hypothalamus. *Anat. Embryol.*, **168**: 433-444.
- OLNEY, J. W. (1969).- Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, **164**: 719-721.
- PASTOR, F. E., B. PELAEZ, J. L. BLAZQUEZ, D. TORANZO, A. SANCHEZ, A. J. ALVAREZ-MORUJO y P. AMAT (1990).- Estudio ultraestructural del nucleo arcuato del hipotálamo de rata tras la administración de glutamato monosódico. *An. Anat.*, **36**: 187-197.
- PIZZI, W. J., J. E. BARNHART y J. R. UNNERSTALL (1979).- Reproductive dysfunction in male rats following neonatal administration of monosodium L-glutamate. *Neurobehav. Toxicol.*, **1**: 1-4.
- REDDING, R. W., A. V. SCHALLY, A. ARIMURA y I. WAKABAYASHI (1971).- Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology*, **8**: 245-255.
- RODRIGUEZ-SIERRA, J. F., R. SRIDARAN y C. A. BLAKE (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.

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

CUERPOS DE HERRING TERMINALES EN LA LUZ DEL TERCER VENTRICULO

TERMINAL HERRING BODIES IN THE LUMEN OF THE THIRD VENTRICLE

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

Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Departamento de Investigación y Microscopía Electrónica. (Director:
Prof. P. Amat). Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca.

RESUMEN

Se describe en el interior del tercer ventrículo de la rata la existencia de estructuras idénticas a los cuerpos de Herring del haz supraóptico-hipofisario. Estas estructuras contienen abundantes gránulos de neurosecreción con un diámetro comprendido entre 100 y 200 nm y algunas mitocondrias. Algunos de los cuerpos de Herring intraventriculares poseen un acúmulo de microvesículas claras de un diámetro de 30-50 nm, lo que permite identificarlos como terminales neurosecretorios. Se discuten estos hallazgos en relación con la presencia de hormonas neurohipofisarias en el líquido cefalorraquídeo.

PALABRAS CLAVE: Cuerpos de Herring terminales, Tercer ventrículo, Ultraestructura, Rata.

SUMMARY

A report is made of the existence in the third ventricle of the rat of structures identical to the Herring bodies of the hypothalamo-neurohypophysial tract. These structures contain numerous neurosecretory granules with a diameter ranging between 120 and 250 nm and also some mitochondria. Some of the intraventricular Herring bodies display a cluster of electron-lucent microvesicles with a diameter of 30-50 nm, thereby permitting their identification as neurosecretory endings. The findings are discussed in relation to the presence of neurohypophysial hormones in the cerebrospinal fluid.

KEY WORDS: Terminal Herring bodies, Third ventricle, Ultrastructure, Rat.

Introducción

Desde hace más de dos décadas se conoce la existencia de hormonas neurohipofisarias en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Heller y col., 1968; Vorherr y col., 1968; para revisión véanse Mens y col., 1982a; Robinson, 1983; Schwartz y Reppert, 1985; Jolkkonen y col., 1988), habiéndose demostrado modificaciones en los niveles de vasopresina en el LCR durante el envejecimiento, así como tras estímulos hormonales y osmóticos (para revisión véase Jolkkonen y col., 1988). Por otra parte, se sabe que la vasopresina existente en el LCR tiene un origen central y que no procede de filtración a nivel de los plexos coroideos (véanse Zaidi y Heller, 1974; Wang y col., 1982; Ang y Jenkins, 1982; Schwartz y Reppert, 1985), admitiéndose clásicamente que serían

fibras del haz supraóptico-hipofisario las que liberarían el material neurosecretor en el interior del tercer ventrículo (véanse Wittkowski, 1968; Mens y col., 1982a), si bien no existen pruebas concluyentes sobre esta cuestión.

Ahora bien, para la vasopresina se ha comprobado, además, que su concentración en el LCR muestra un ritmo circadiano, generado endógenamente y sincronizado al ciclo de iluminación, con valores altos durante la fase de luz y bajos durante la fase de oscuridad (Mens y col., 1982b; Schwartz y col., 1983; Robinson, 1983; Schwartz y Reppert, 1985; Jolkkonen y col., 1986, 1988), habiéndose implicado al núcleo supraquiasmático del hipotálamo en la generación de este último ritmo. Por tanto, y para el caso de la vasopresina, el origen podría ser doble: por una parte las neuronas magnocelulares del clásico sistema hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis y por otra el núcleo supraquiasmático. Incluso se admite que otros territorios cerebrales podrían contribuir a la liberación de vasopresina en el LCR.

En el presente trabajo se aportan evidencias ultraestructurales sobre la posible liberación de hormonas neurohipofisarias en el LCR por fibras del haz supraóptico-hipofisario.

Material y métodos

Las observaciones descritas en el presente trabajo se han realizado tras el estudio de cuarenta ratas machos albinas de la cepa Spraguey-Dawley, de entre uno y seis meses de edad, que han sido utilizadas como animales controles en diversos experimentos realizados en nuestro Departamento.

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 acetonas de gradación creciente e incluidas en Durcupan (Fluka). 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 y Discusión

En el interior de la luz del tercer ventrículo es frecuente la observación de elementos supraependimarios, esto es, formaciones que están situadas sobre el epitelio endimario. De ellas, unas estructuras son dependientes de las propias células endimarias, tales como yemas y bulbos citoplasmáticos propulsados desde el polo apical de los endimocitos, mientras que otros elementos son independientes del epéndimo, resaltando entre ellos las células supraependimarias y las fibras y botones nerviosos intraventriculares (Pastor y col., 1981).

Entre los elementos nerviosos intraventriculares con relativa frecuencia puede observarse la existencia de formaciones que por su ultraestructura podemos identificar como cuerpos de Herring (figs. 1 a 3), cuyo contenido está constituido, fundamentalmente, por gránulos elementales de neurosecreción (con un diámetro de nm) y algunas mitocondrias. Este es el contenido típico de los cuerpos de Herring tipo I de la clasificación de Dellman y Rodríguez (1970).

Sabido es que los cuerpos de Herring son dilataciones que presentan las fibras del haz supraóptico-hipofisario en su trayecto desde los núcleos magnocelulares del hipotálamo hasta el lóbulo posterior de la hipófisis. Dentro de estos cuerpos de Herring hay que distinguir los no terminales, esto es las dilataciones existentes a lo largo de las fibras del haz supraóptico-hipofisario, en las que no se produce liberación hormonal,

y los cuerpos de Herring terminales, situados al extremo de las citadas fibras neurosecretoras, junto a los capilares de endotelio fenestrado del lóbulo posterior de la hipófisis. En estos últimos es donde tiene lugar la liberación hormonal hacia el torrente circulatorio y se diferencian de los no terminales por poseer un acúmulo de microvesículas de 30 a 50 nm de diámetro y que con el microscopio electrónico parecen vacías de contenido (Heap y col., 1975; Morris, 1976). Estas microvesículas se admite que están relacionadas con el secuestro del Ca^{++} que penetra en el terminal neurosecretor con la llegada del impulso nervioso (véase Nordmann y Chevalier, 1980).

Los cuerpos de Herring observados por nosotros en la luz del tercer ventrículo son tanto del tipo no terminal (figs. 1, *cabeza de flecha*, y 3) como del tipo terminal (figs. 1, *flecha*, y 2), como lo demuestra en estos últimos la presencia del acúmulo de microvesículas claras. Bien es cierto que puede ocurrir que el corte ultrafino no haya afectado al acúmulo de microvesículas en un cuerpo de Herring que las posee, en cuyo caso al corte parecería corresponder a un cuerpo de Herring no terminal. Ahora bien, aquel cuerpo de Herring en el que se observe dicho acúmulo de microvesículas es indudablemente de tipo terminal. Como quiera que hemos observado cuerpos de Herring de este tipo (figs. 1 y 2), podemos afirmar categóricamente su existencia en el interior del ventrículo diencefálico. Por otra parte, es indudable que la liberación hormonal que tiene lugar a ese nivel ha de producirse forzosamente hacia el LCR que hay en la luz ventricular.

Varios estudios han demostrado la presencia en el interior del tercer ventrículo de fibras supuestamente pertenecientes al haz supraóptico-hipofisario (Wittkowski, 1968; Coates, 1981; Weindl y Sofroniew, 1982; Kozłowski, 1982; Pastor y col., 1982; Amat, 1989). No obstante, han sido pocos los autores que han afirmado categóricamente el carácter terminal de estas estructuras, fundándose en la presencia del acúmulo de microvesículas (Wittkowski, 1968; Pastor y col., 1982; Amat, 1989). Wittkowski (1968) describe la existencia de cuerpos de Herring terminales y mantiene la hipótesis de que pueden segregarse hacia el LCR del tercer ventrículo, denominando a este proceso "*neuroventriculocrinia*"; no obstante, este autor no apunta ningún significado funcional para este fenómeno. Martínez y de Weerd (1977), en un magnífico trabajo sobre la superficie ependimaria del receso infundibular de la rata, incluyen una imagen que corresponde a un cuerpo de Herring terminal, aunque estos autores no lo identifican como tal.

La importancia de la presencia de cuerpos de Herring en el interior de la luz del ventrículo diencefálico radica en que pueden ayudar a dilucidar, al menos en parte, el origen de las hormonas neurohipofisarias en el LCR. Aunque la presencia de péptidos neurohipofisarios y sus proteínas transportadoras es conocida desde hace años (véase Introducción), el origen de las mismas, esto es, el modo como alcanzan el LCR, no está perfectamente aclarado. El hecho de que la concentración de vasopresina muestre un ritmo circadiano en el LCR ha hecho que se proponga al núcleo supraquiasmático como responsable de la existencia de esta neurohormona en el LCR (véase Mens y col., 1982b; Schwartz y col., 1983; Robinson, 1983; Schwartz y Reppert, 1985). No obstante, en la actualidad se tiende a admitir que podrían ser varios núcleos hipotalámicos (e incluso territorios extrahipotalámicos) los que contribuirían a los niveles de hormonas neurohipofisarias en el LCR; dentro de ellos el núcleo supraquiasmático sería el responsable de las modificaciones circadianas rítmicas (Jolkkonen y col., 1988).

Nuestros hallazgos están de acuerdo con esta última hipótesis, porque los cuerpos de Herring terminales que hemos observado en el interior del tercer ventrículo creemos que pertenecen al haz supraóptico-hipofisario originado en los núcleos magnocelulares del hipotálamo. Ello es así por dos razones. En primer lugar porque su aspecto es en todo idéntico al de los cuerpos de Herring terminales que existen en el lóbulo posterior de la hipófisis; en segundo lugar, por el tamaño de los gránulos secretores que contienen, pues sabido es que la vasopresina sintetizada por neuronas del núcleo supraquiasmático está contenida en gránulos de menor tamaño que los del sistema hipotálamo-hipofisario (Van Leeuwen y col., 1978). También en apoyo de nuestra creencia podemos citar el trabajo de Kozłowski (1972), en el que demuestra que algunas de las fibras neurosecretoras en relación con el ventrículo contienen oxitocina, y sabido es que en el núcleo supraquiasmático no se sintetiza esta neurohormona (Bollo de Miguel, 1990).

En resumen, nuestros resultados demuestran la existencia de terminales neurosecretores en el interior del tercer ventrículo. Por sus características ultraestructurales los podemos considerar cuerpos de Herring terminales. Pensamos que estas estructuras intraventriculares explican, al menos en parte, la presencia de hormonas neurohipofisarias en el LCR.

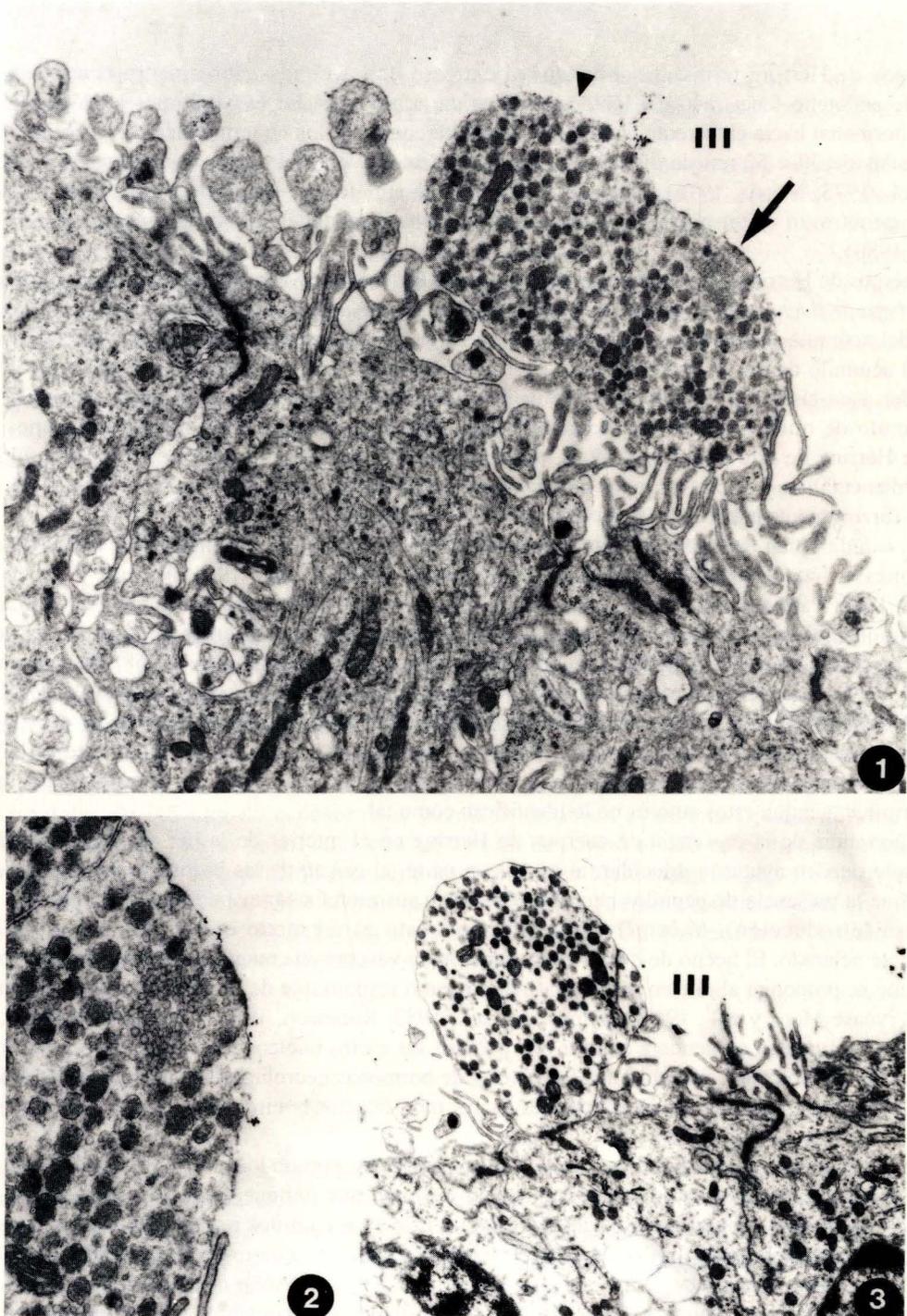


FIGURA 1. Epéndimo del tercer ventrículo de rata. Se observan los polos apicales de los endimocitos, de los que emergen microvellosidades y un cilio. En la luz del tercer ventrículo (III) destaca la presencia de dos cuerpos de Herring. Uno de ellos es de tipo no teminal (*cabeza de felcha*) y otro es de tipo terminal (*flecha*) (15.680x).

FIGURA 2. Detalle a mayores aumentos (30.660x) del cuerpo de Herring señalado con una flecha en la figura anterior. Obsérvese el acúmulo de microvesículas claras.

FIGURA 3. Epéndimo del tercer ventrículo de rata. Se observan polos apicales de endimocitos y en la luz del tercer

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. (1989).- El epéndimo de la región tuberoinfundibular del tercer ventrículo y sus relaciones con los mecanismos neuroendocrinos. *An. Anat.*, **35**: 21-30.
- ANG, V. T. Y. y J. S. JENKINS (1982).- Blood-cerebrospinal fluid barrier to arginine-vasopressin, desmopressin and desglycinamide arginine-vasopressin in the dog. *J. Endocrinol.*, **93**: 319-325.
- BOLLO de MIGUEL, E. (1990).- Estudio inmunohistoquímico del núcleo supraquiasmático del hipotálamo de gato. Tesina de Licenciatura. Universidad de Salamanca.
- COATES, P.W. (1981).- A comparison of intraventricular nerve fibers and supraependymal cell clusters in the third ventricle of monkeys and sheep. En: *Neurosecretion: molecules, cells, systems.* (Farner y Lederis, eds.). Pp.:438-440. Plenum Press, Nueva York.
- DELLMAN, H.D. y E.M. RODRIGUEZ (1970).-Herring bodies; an electron microscopic study of local degeneration and regeneration of neurosecretory axons. *Z. Zellforsch.*, **111**: 293-315.
- HEAP, P.F., C.W. JONES, J.F. MORRIS y B.T. PICKERING (1975).- Movement of neurosecretory product through the anatomical compartments of the neural lobe of the pituitary gland. *Cell Tissue Res.*, **156**: 483- 497.
- HELLER, H., S. H. HASAN y A. O. SAIFI (1969).- Antidiuretic activity in the cerebrospinal fluid. *J. Endocrinol.*, **41**: 273-280.
- JOLKKONEN, J., L. TUOMISTO, T. J. B. VAN WIMERSMA GREIDANUS, E. LAARA y P. J. RIEKKINEN (1986).- Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid in rats of different age and sex. *Neuroendocrinology*, **44**: 163-167.
- JOLKKONEN, J., L. TUOMISTO, T. J. B. VAN WIMERSMA GREIDANUS y P. J. RIEKKINEN (1988).- Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of rats with lesions of the paraventricular and supraquiasmatic nuclei. *Neurosci. Lett.*, **86**: 184-188.
- KOZLOWSKI, G.P. (1982).- Ventricular route hypothesis and peptide-containing structures of the cerebroventricular system. *Front. Horm. Res.*, **9**: 105-118.
- MARTINEZ MARTINEZ, P. y H. de WEERD (1977).- The fine structure of the ependymal surface of the recessus infundibularis in the rat. *Anat. Embryol.*, **151**: 241-265.
- MENS, W. B. J., A. F. VAN DAM, M. A. H. VAN EGMOND, E. A. D. BAKKER, J. J. LEGROS, T. B. VAN WIMERSMA GREIDANUS (1982a).- Neurohypophyseal hormones in cerebrospinal fluid. *Front. Horm. Res.*, **9**: 119-130.
- MENS, W. B. J., E. A. D. ANDRINGA-BAKKER y T. J. B. VAN WIMERSMA GREIDANUS (1982b).- Changes in cerebrospinal fluid levels of vasopressin and oxytocin of the rat during various light-dark regimes. *Neurosci. Lett.*, **34**: 51-56.
- MORRIS, J.F. (1976).- Distribution of neurosecretory granules among the anatomical compartments of the neurosecretory processes of the pituitary gland: a quantitative ultrastructural approach to hormone storage in the neural lobe. *J. Endocrinol.*, **68**: 225-234.
- NORDMANN, J.J. y J. CHEVALIER (1980).- The role of microvesicles in buffering (Ca^{2+}) in the neurohypophysis. *Nature*, **287**: 54-56.
- PASTOR, F.E., F.J. DOMINGUEZ y P. AMAT (1981).- Ultraestructura de los elementos intraventriculares diencefálicos. *Phronesis*, **2**: 99-106.
- PASTOR, F.E., D. TORANZO, L. MUÑOZ BARRAGAN y P. AMAT (1982).- Localization of the terminal Herring bodies in the hypothalamus-hypophysis. *Neurosci. Lett., suppl.*, **10**: S376.
- ROBINSON, I. C. A. F. (1983).- Neurohypophyseal peptides in cerebrospinal fluid. *Prog. Brain Res.*, **60**: 129-145.
- SCHWARTZ, W. J. y S. M. REPPERT (1985).- Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the supraquiasmatic nuclei. *J. Neurosci.*, **5**: 2771-2778.
- SCHWARTZ, W. J., R. J. COLEMAN y S. M. REPPERT (1983).- A daily vasopressin rhythm in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res.*, **263**: 105-112.
- VAN LEEUWEN, F.W., D.F. SWAAB y C. RAAJ (1978).- Immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin in the rat supraquiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.*, **193**: 1-10.
- VORHERR, H., M. W. B. BRADBURY, M. HOGHOUGHY y C. R. KLEEMAN (1968).- Antidiuretic hormones in cerebrospinal fluid during endogenous and exogenous changes in its blood level. *Endocrinology*, **83**: 246-250.
- WANG, B. C., L. SHARE, J. T. CROFTON y T. KIMURA (1982).- Effects of intravenous and intracerebroventricular infusion of hypertonic solutions on plasma and cerebrospinal fluid vasopressin concentrations. *Neuroendocrinology*, **34**: 215-221.

- WEINDL, A. y M. V. SOFRONIEW (1982).- Peptide neurohormones and circumventricular organs in the pigeon. *Front. Horm. Res.*, **9**: 88-104.
- WITTKOWSKI, W. (1968).- Elektronenmikroskopische Studien zur intraventriculären Neurosekretion in den Recessus infundibularis der Maus. *Z. Zellforsch.*, **92**: 207-216.
- ZAIDI, S. M. A. y H. HELLER (1974).- Can neurohypophysial hormones cross the blood-cerebrospinal fluid?. *J. Endocrinol.*, **60**: 195-196.

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

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION NEONATAL DE GLUTAMATO MONOSODICO SOBRE EL TESTICULO DE RATA

EFFECTS OF NEONATAL ADMINISTRATION OF MONOSODIUM GLUTAMATE ON THE RAT TESTIS

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

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio ultraestructural de testículos de ratas tratadas a los 4 días de edad con una única dosis de 4 mg/kg peso corporal de glutamato monosódico (GMS) en solución acuosa por vía subcutánea, que fueron sacrificadas 7, 30 y 120 días después, así como de ratas normales y controles (inyectadas con agua bidestilada) de las mismas edades. Asimismo se ha realizado un estudio morfométrico de la superficie de sección de los túbulos seminíferos en cortes histológicos. El estudio muestra que no existen alteraciones ultraestructurales entre los testículos de las ratas tratadas con GMS y los de los animales normales y controles. Independientemente de la edad, el GMS no determina cambios ultraestructurales ni en el tejido conjuntivo peritubular ni en las células de Sertoli, ni en las sexuales de los cordones seminíferos, ni tampoco en las de Leydig que existen en los espacios intersticiales. El análisis morfométrico muestra que la superficie de sección de los túbulos seminíferos de los animales tratados con GMS está disminuida, de forma estadísticamente significativa, en relación con la de los animales normales y controles, en las diferentes edades estudiadas, siendo dicha disminución porcentualmente mayor a los 11 y a los 34 días que a los 120 días.

PALABRAS CLAVE: Testículo, Glutamato monosódico, Morfometría, Ultraestructura, Rata.

SUMMARY

An ultrastructural study was made of the testes of rats treated at 4 days of life with a single subcutaneous dose of 4 mg/kg b.w. of monosodium glutamate (MSG) in aqueous solution that were sacrificed at 7, 30 and 120 days after the injection, and normal and control rats (injected with bidistilled water) of the same age. A morphometric study was also carried out on the cross-sectional surface of the seminiferous tubules in histological sections. The study shows that there are no ultrastructural alterations among the MSG-treated rats and the normal and control animals. Regardless of age, MSG does not lead to ultrastructural changes either in the peritubular connective tissue or in the Sertoli cells, or in the sex cells of the seminiferous tubules or in the Leydig cells present in the interstitial spaces. The morphometric analysis shows that the cross-sectional surface of the seminiferous tubules of the MSG-treated rats is decreased, with statistical significance, as compared with that of the normal and control animals, at the different ages studied; this decrease is percentually greater at 11 and 34 days than at 120.

KEY WORDS: Testis, Monosodium glutamate, Morphometry, Ultrastructure, Rat.

Introducción

La administración de glutamato monosódico durante el período neonatal tiene efectos neurotóxicos que dan lugar a severos trastornos neuroendocrinos (para revisión véanse Pastor y col., 1990, 1991).

Particular interés se ha prestado a las disfunciones de la esfera reproductiva determinadas por la administración de GMS a roedores, tales como retraso de la pubertad (Rodríguez-Sierra y col., 1980), ciclos vaginales irregulares (Redding y col., 1971; Rodríguez-Sierra y col., 1980), retraso de la apertura vaginal (Rodríguez-Sierra y col., 1980), disminución de los niveles séricos de estrógenos (Matsuzawa y col., 1979; Nemeroff y col., 1981) y de testosterona (Nemeroff y col., 1981; Badger y col., 1982), disminución de receptores estrogénicos hipotalámicos (Grant y col., 1978; Rodríguez-Sierra y col., 1982), alteraciones en los niveles plasmáticos de LH (Clemens y col., 1978; Sridaran y col., 1981) y de la liberación de LHRH (DePaolo y Negro-Vilar, 1982; Badger y col., 1982), niveles séricos de prolactina elevados (Clemens y col., 1978; Nemeroff y col., 1978), trastornos de la conducta sexual (Pizzi y col., 1977; Kruissink, 1980), disminución del peso de las gónadas, tanto del ovario como del testículo (Redding y col., 1971; Nemeroff y col., 1977a; Bakke y col., 1978; Clemens y col., 1978; Seress, 1982), etc.

El mecanismo por el cual se desarrollan los efectos del GMS sobre la esfera sexual dista de estar claro, ya que los resultados obtenidos por diferentes autores no son concordantes. Se ha supuesto generalmente que dichos efectos serían la consecuencia de la destrucción que ocurre en el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico y de las subsiguientes alteraciones hipofisarias, referidas al trastorno de la secreción de hormonas gonadotropas (para revisión véase Nemeroff y col., 1977a,b; Dada y Blake, 1984; Dawson, 1986). No obstante, como antes decíamos, el mecanismo no está claro en absoluto. De hecho Dada y Blake (1984) llegan a afirmar, tras un detenido estudio de los niveles de gonadotropinas, que los efectos gonadales del GMS podrían ser el resultado de niveles periódicamente bajos de gonadotropinas, de actividad reducida de estas hormonas, de déficit de receptores testiculares para las gonadotropinas, de un efecto tóxico directo del GMS sobre el testículo o de cualquier otro mecanismo.

En trabajos previos (Pastor y col., 1990, 1991) hemos estudiado los efectos sobre el núcleo arcuato del hipotálamo de la administración de una única dosis de GMS (4 mg/g peso corporal) a ratas machos de 4 días de edad, que fueron sacrificadas 7, 30 y 120 después. En el presente trabajo se describen las observaciones ultraestructurales y morfométricas de los testículos de estos animales.

Material y Métodos

Hemos utilizado para nuestro estudio 60 ratas albinas machos de la cepa Sprague-Dawley, sometidas a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas, que han dispuesto de comida y agua a voluntad. A treinta animales se les administró a los 4 días de edad una dosis de L-glutamato monosódico (4 mg/g peso corporal; Sigma) en solución acuosa por vía subcutánea (grupo experimental - GMS). Quince animales fueron inyectados a los 4 días de edad con agua bidestilada (grupo control - BID). Quince animales no sufrieron ningún tipo de experiencia (grupo normal -NOR). El sacrificio de los animales de cada grupo se realizó, por terceras partes, a los 11 (grupos 4+7), a los 34 (grupos 4+30) y a los 124 (grupos 4+120) días de edad, según la pauta descrita en un trabajo previo (Pastor y col., 1990). Finalizada la perfusión se obtuvieron los testículos de cada animal; uno de ellos se destinó al estudio ultraestructural y el otro, tras ser lavado durante 2 horas en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4, fue fijado en Bouin-Hollande-sublimado durante 48 horas, lavado con una solución acuosa saturada de carbonato de litio durante 12 horas, deshidratado e incluido en parafina según el proceder habitual en técnica histológica; cortes de 6 µm de espesor fueron teñidos con hematoxilina-eosina, realizándose en ellos la medición de las superficies de sección de los túbulos seminíferos mediante un analizador semiautomático de imágenes IBAS-I Kontron. De los diferentes grupos de animales (NOR 4+7, BID 4+7, GMS 4+7, NOR 4+30, BID 4+30, GMS 4+30, NOR 4+120, BID 4+120 y GMS 4+120) se obtuvieron las medidas de centralización y dispersión, contrastándose la significación estadística mediante el test Z.

Resultados

El exámen con el microscopio electrónico de los testículos de ratas tratadas con GMS demuestra que en éstos no existen alteraciones ultraestructurales de ninguno de los tipos celulares que los componen, en relación con las observaciones efectuadas en animales normales y controles. Esta ausencia de alteraciones se evidencia en todos los grupos de edad (11, 34 y 124 días) y contrasta con la existencia de modificaciones cuantitativas, referidas al calibre tubular, en los mismos testículos de los animales tratados con GMS en relación con los de las ratas normales y controles de la misma edad.

En los animales de 11 días los cordones seminíferos son macizos (fig. 1), constituidos en gran parte por células de Sertoli, y rodeados por una capa de fibroblastos (figs. 2,3,4). Abundan los islotes de células de Leydig, que con frecuencia presentan en sus citoplasmas muchas gotas de lípidos (fig. 3).

En todos los grupos de animales de 11 días se encuentra una gran actividad mitótica de células intersticiales, sin que podamos confirmar que se trate de células de Leydig (fig. 2; flecha). En la figura 3 se aprecia una de estas mitosis (señalada con una flecha) que podría corresponder a un pericito.

En los cordones seminíferos, como es lógico, la espermatogénesis está detenida, encontrándose espermatogonias pero no espermatocitos. En algunos casos las espermatogonias están en mitosis (fig. 4; asteriscos) y se hallan rodeadas por células de Sertoli de tal forma que el conjunto remeda un folículo ovárico.

A los 34 días de edad el calibre de los tubos seminíferos es mucho mayor que el de los animales de 11 días pero, al igual que en éstos, continúan siendo macizos. En algunos de los cordones seminíferos, sin embargo, empieza a esbozarse una luz (fig. 5). Asimismo se observa que se ha activado la espermatogénesis y se detectan no sólo espermatogonias, sino también espermatocitos y espermátides. Aún no se encuentran espermatozoides.

A esta edad ya no se ven figuras de mitosis en las células del intersticio testicular, por lo que sorprende la imagen de la figura 6 que corresponde a una mitosis de una típica célula de Leydig (señalada con un asterisco) en un animal tratado con GMS.

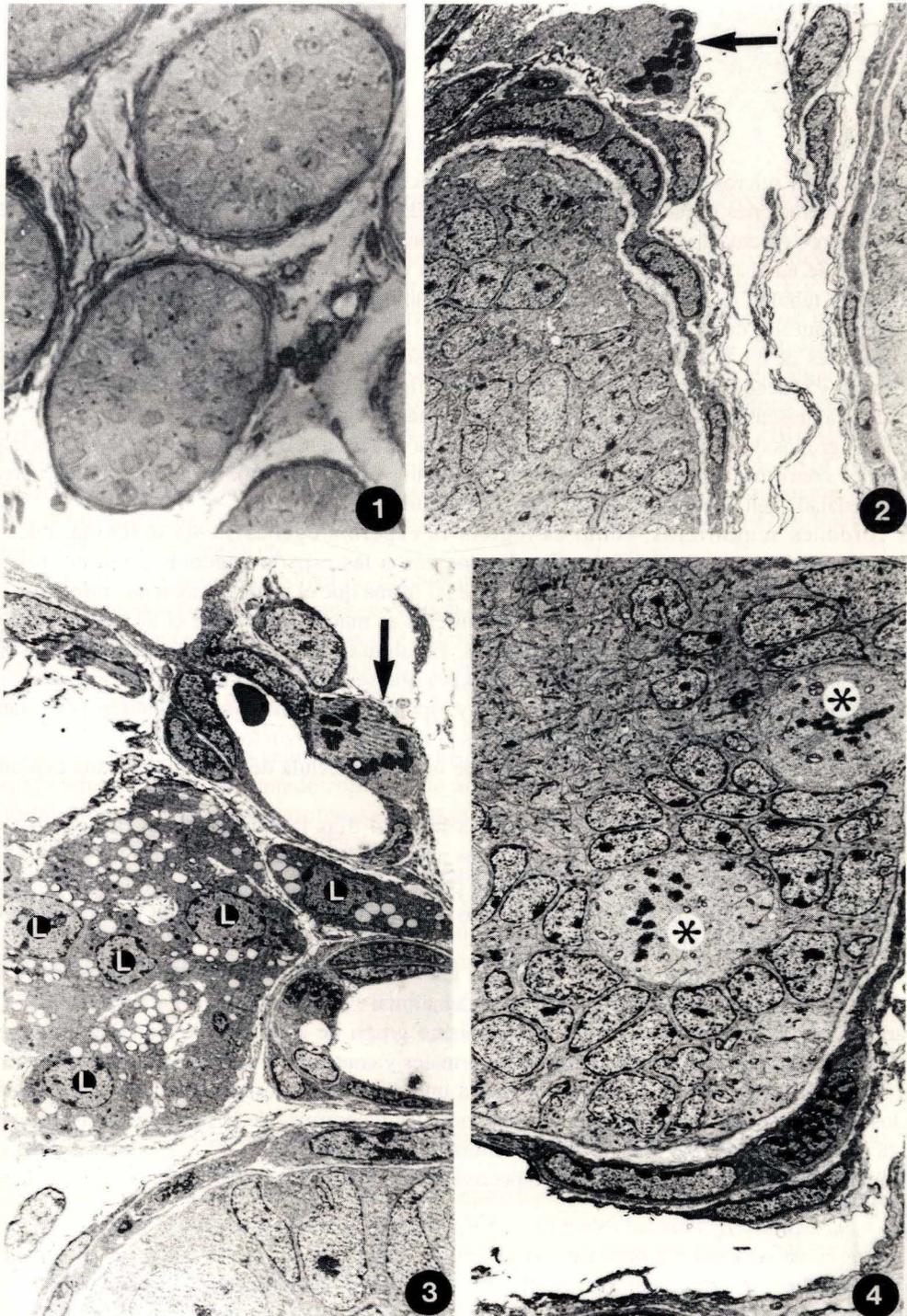
En los diferentes grupos de ratas sacrificadas a los 124 días tampoco se han detectado alteraciones sustanciales en la ultraestructura de los testículos de los animales tratados con GMS. En los túbulos seminíferos es patente la existencia de una luz; en sus paredes se observan las células sexuales en todos los estadios de la espermatogénesis (fig. 7). Nos ha llamado la atención la presencia de gran cantidad de lisosomas en algunas células de Sertoli de animales experimentales (fig. 8).

El estudio cuantitativo refleja, como es lógico, el gran incremento en la superficie de corte de los túbulos seminíferos que tiene lugar con el aumento en la edad del animal (véanse el gráfico 1 y la tabla I).

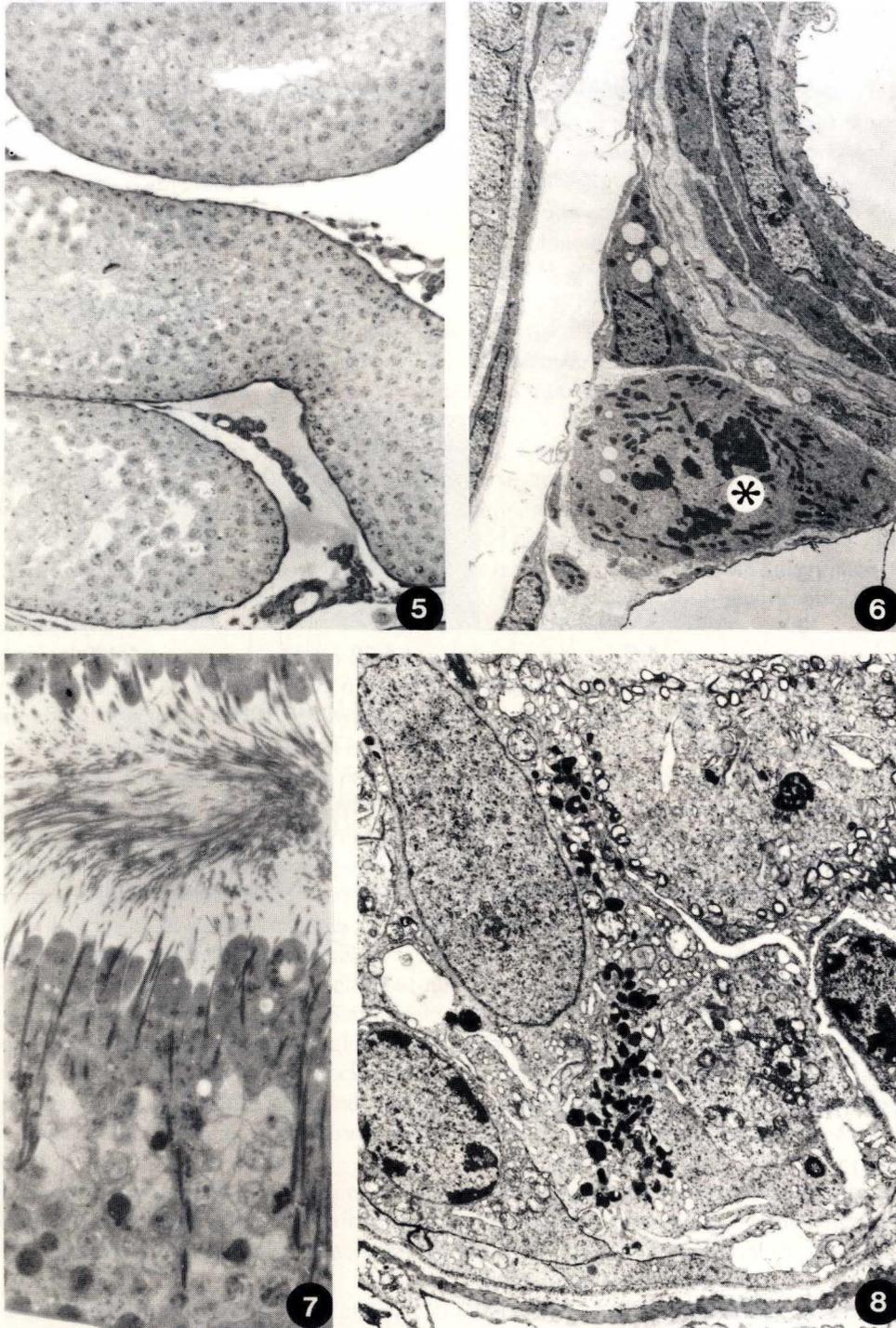
Comparando los datos obtenidos dentro de un mismo grupo de animales, se comprueba la existencia de diferencias, entre los animales experimentales y los normales y controles, respecto de la superficie de sección de los túbulos seminíferos. En todos los casos se observa una disminución estadísticamente significativa del área tubular de los animales tratados en relación con los normales y controles de la misma edad (véanse gráfico 1 y tabla I). Esta disminución es más notoria en los animales sacrificados a los 11 y 34 días de edad en los que, porcentualmente, es de un 20 %, y un 19 %, respectivamente, que en los sacrificados a los 124 días, en que la disminución es de un 5,5%.

Discusión

En la actualidad son bien conocidos los efectos neurotóxicos del GMS cuando se administra a roedores durante el período neonatal (véanse Pastor y col., 1990, 1991), que determinan una profunda alteración neuroendocrina, habitualmente descrita como "*síndrome del glutamato monosódico*", caracterizado por 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). Dentro de las alteraciones de la esfera sexual que determina el GMS (véase Introducción) en la literatura se ha prestado



- FIGURA1.** Microfotografía del testículo de una rata GMS 4+7. Corte semifino de control teñido con azul de toluidina. Se observan dos cordones seminíferos macizos. (Obj.: 25x)
- FIGURA2.** Testículo de una rata normal de 11 días de edad (NOR 4+7). La flecha señala una célula del intersticio en mitosis. (2350x).
- FIGURA3.** Testículo de una rata normal de 11 días de edad (NOR 4+7). Se observa un islote de células de Leydig (L) y una célula intersticial en mitosis (*flecha*), probablemente de tipo pericitario (2350x).
- FIGURA4.** Testículo de una rata GMS 4+7. Sección de un cordón seminífero rodeado por la túnica propia. Se observan dos espermatogonias en mitosis (*asterisco*) rodeadas por células de Sertoli. (2350x)



- FIGURA5.** Microfotografía del testículo de una rata GMS 4+30. Corte semifino de control teñido con azul de toluidina. En algunos cordones seminíferos comienza a aparecer una luz. Entre los cordones hay islotes de células intersticiales. (Obj.:10x)
- FIGURA6.** Intersticio del testículo de una rata GMS 4+30. Se observa una célula de Leydig en mitosis con mitocondrias de matriz muy oscura (*asterisco*). (3350x)
- FIGURA7.** Microfotografía del testículo de una rata GMS 4+120. Corte semifino de control teñido con azul de toluidina. En la luz se observan colas de espermatoцитos. (Obj.: 25x)
- FIGURA8.** Zona basal de un túbulo seminífero de una rata GMS 4+120. Obsérvese la gran cantidad de lisosomas existentes en el citoplasma de una célula de Sertoli. (4825x).

GRAFICO 1. Superficie seminiferos

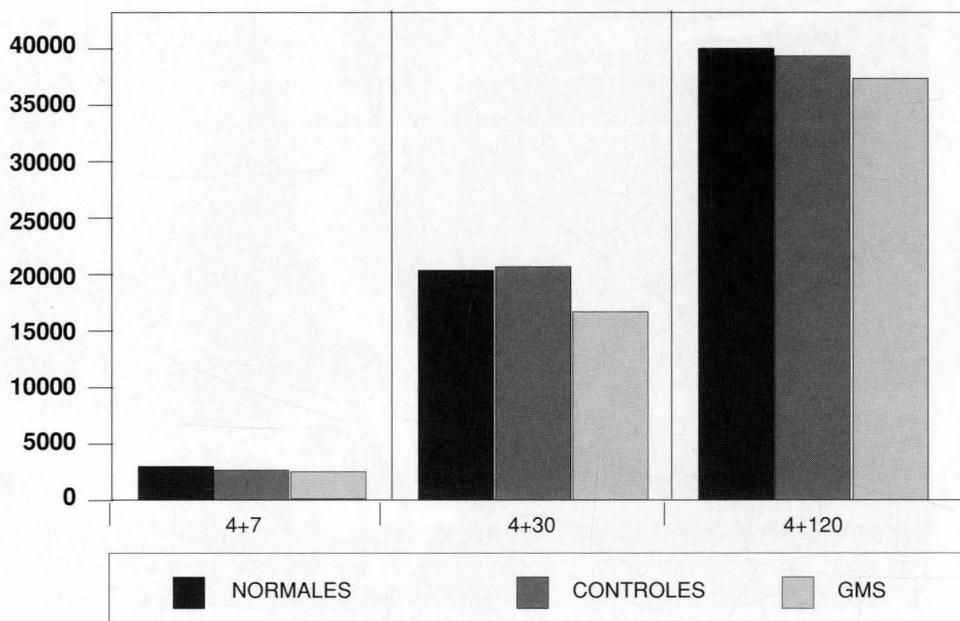


TABLA 1

Grupo	Area celular (µm ²) (Media ± S.D.)	N.º neuronas medidas
NOR 4+7	2889± 627	601
BID 4+7	2839 ± 476	400
GMS 4+7	2282 ± 539	600
NOR 4±30	20050 ± 2803	600
BID 4+30	20351 ± 3344	600
GMS 4+30	16353 ± 3246	600
NOR 4+120	39710 ± 8083	400
BID 4+120	38807 ± 8072	600
BMS 4+120	37102 ± 5906	600

GMS 4+7 > NOR 4+7 (< 0.001)
 GMS 4+7 > BID 4+7 (p < 0.001)
 BID 4+7 - NOR 4+7 (N.S.)

GMS 4+30 < NOR 4+30 (p < 0.001)
 GMS 4+30 < BID 4+30 (p < 0.001)
 BID 4+120 - NOR 4+30 (N.S.)

GMS 4+120 > NOR 4+120 (p < 0.001)
 GMS 4+120 > BID 4+120 (p < 0.001)
 BID 4+120 - NOR 4+120 (N.S.)

particular atención a los efectos de dicha sustancia sobre la función gonadal. Ya Olney (1969), trabajando con ratones, describió que la administración de GMS provocaba infertilidad en las hembras, mientras que los machos mostraban un índice de fertilidad normal y sus testículos eran indistinguibles de los de los animales no tratados. También en el ratón, Holzwarth-McBride y col. (1976) describieron disminución del peso de testículos y ovarios, que se acompañaba de una disminución de la fertilidad; ésta afectaba más a las hembras. En los machos el examen histológico de los testículos no mostraba alteraciones, mientras que éstas sí aparecían en los ovarios.

Diversos autores han descrito en las ratas tratadas con GMS la existencia de una disminución del peso de las gónadas, tanto del ovario como del testículo (Redding y col., 1971; Nemeroff y col., 1977a; Bakke y col., 1978; Clemens y col., 1978; Seress, 1982), pero con apariencia histológica normal, existiendo controversia en cuanto a los efectos sobre la fertilidad, pues Bakke y col. (1978) indican que el tratamiento conlleva una disminución de la fertilidad en los machos, mientras que no se afecta la de las hembras; por el contrario Seress (1982) describe infertilidad en las hembras, que por otra parte muestran una conducta sexual normal.

Nuestros resultados permiten afirmar que el GMS, a la dosis y pauta de administración utilizada por nosotros, no provoca lesión histológica alguna sobre el testículo. El único efecto observado ha sido una disminución del calibre tubular de los animales tratados, en relación con los normales y controles de la misma edad. Esta disminución del calibre tubular parece que tiende progresivamente a la recuperación, ya que es más intensa en los animales de menor tiempo de evolución tras la administración de GMS (disminución del 20% en las ratas GMS 4+7 y del 19% en los GMS 4+30) que en los sacrificados 120 días después de la inyección (disminución del 5.5%).

Estos datos nos obligan a pensar que, en caso de que la disminución del calibre tubular sea consecuencia de las lesiones producidas en el núcleo arcuato, dicho efecto ha de ser debido a la lesión inmediata desencadenada a los pocos minutos de la administración del neurotóxico (véase Pastor y col., 1990, 1991).

Al margen de los efectos del GMS sobre el testículo, las imágenes de éste, tanto en animales experimentales como en los normales, son muy llamativas y expresivas de una "cronología de maduración". En cualquiera de los grupos considerados, a los 11 días de edad la estirpe germinativa está representada solamente por espermatogonias, que en las paredes de los túbulos alternan con las células de Sertoli. A los 34 días, el túbulo seminífero presenta una espermatogénesis avanzada hasta el estadio de espermatide redonda. Por último, en las ratas de 124 días la espermatogénesis es completa, siendo abundantes las espermatides maduras en los túbulos seminíferos. Insistimos en que estas imágenes no guardan relación con la administración de GMS y que el efecto de esta sustancia sobre el testículo es recuperable, al menos a la dosis que hemos utilizado.

También es interesante relacionar la actividad mitótica de las células intersticiales durante el desarrollo normal (Roosen-Runge y Anderson, 1959; Baillie, 1961; Hitzeman, 1962; Gondos y col., 1977) y el aumento de esta actividad en condiciones experimentales, tales como la administración de hormona coriogonadotropa (Chemes y col., 1976; Christensen y Peacock, 1980) y la criptorquidia experimental (Kerr y col., 1979), con nuestros resultados. Nosotros hemos observado, aunque no cuantificado, un gran número de mitosis en células de la túnica propia y del intersticio, tanto en ratas experimentales GMS 4+7, como en las normales y controles de 11 días de edad.

Otro comentario marginal es el que sugiere la observación de una mitosis de una célula de Leydig en una rata sacrificada 30 días después de la administración de GMS, sin que haya la menor duda en cuanto a su identificación, pues en la imagen (fig. 6) se aprecian todas las características ultraestructurales de este tipo celular.

El hallazgo de esta mitosis puede relacionarse con la siguiente pregunta: ¿De dónde derivan las células de Leydig? Se sabe que hay dos períodos de desarrollo de estas células, el fetal y el puberal (véanse para revisión Kuopio y col., 1989a,b), y se admite que pueden originarse bien de unas células troncales o bien de células de Leydig maduras. No obstante, en las secciones de parafina de los testículos, observadas con el microscopio de luz, no es fácil la identificación de tales células de Leydig, incluso en aquellos modelos experimentales en que se ha inducido hiperplasia de estas células. Dicho con otras palabras, el microscopio de luz no ofrece garantías de identificación de una célula intersticial en mitosis para clasificarla como de Leydig. Por ello es muy importante la aportación de imágenes ultraestructurales de mitosis de este tipo celular. La microscopía electrónica permite identificarlas y, consecuentemente, afirmar su origen a partir no ya de células troncales, sino de las propias células de Leydig maduras. En este sentido tiene valor, al menos documental, nuestra imagen de una célula en

mitosis cuyas características ultraestructurales corresponden a una célula de Leydig madura, en el testículo de una rata GMS 4+30. Los primeros en mostrar una imagen ultraestructural de mitosis de una célula de Leydig fueron Kerr y col. (1979) en testículos criptorquídicos de ratas. Nuestra imagen adquiere valor, no sólo por su carácter demostrativo, sino porque permite negar la afirmación de Orth (1982) sobre la falta de evidencia de mitosis de células de Leydig en ratas jóvenes; asimismo, según Fouquet y Kann (1987), tampoco las hay en ratas sexualmente maduras.

Insistimos en que el valor de la imagen ultraestructural de una mitosis de célula de Leydig en el testículo de una rata GMS 4+30 es el documental, como lo es el de la mitosis de la célula de Leydig del testículo humano adulto descrita por Amat y col. (1986).

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., R. PANIAGUA, M. NISTAL y A. MARTIN (1986).- Mitosis in adult human Leydig cells. *Cell Tissue Res.*, **243**: 219-221.
- BADGER, T. M., W. J. MILLARD, J. B. MARTIN, P. M. ROSENBLUM y S. E. LEVENSON (1982).- Hypothalamic-pituitary function in adult rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Endocrinology*, **111**: 2031-2038.
- BAILLIE, A. H. (1961).- Observation on the growth and histochemistry of the Leydig tissue in the postnatal prepuberal mouse testis. *J. Anat.*, **95**: 357-370.
- BAKKE, J. L., N. LAWRENCE, J. BENNETT, S. ROBINSON y C. Y. BOWERS (1978).- Late effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinology*, **26**: 220-228.
- CHEMES, H. E., M. A. RIVAROLA y C. BERGADA (1976).- Effect of HCG on the interstitial cells and androgen production in the immature rat testis. *J. Reprod. Fert.*, **46**: 279-282.
- CHRISTENSEN, A. K. y K. PEACOCK (1980).- Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.*, **22**: 383-391.
- CLEMENS, J. A., M. E. ROUSH, R. W. FULLER y C. J. SHAAR (1978).- Changes in luteinizing hormone and prolactin control mechanism produced by glutamate lesions of the arcuate nucleus. *Endocrinology*, **103**: 1304-1321.
- DADA, M. O. y C. A. BLAKE (1984).- Administration of monosodium glutamate to neonatal male rats: alteration in the gonadotrophs and gonadotrophin secretion. *Neuroendocrinology*, **38**: 490-497.
- DAWSON, R. (1986).- Developmental and sex-specific effects of low dose neonatal monosodium glutamate administration of mediobasal hypothalamic chemistry. *Neuroendocrinology*, **42**: 158-166.
- DePAOLO, L. V. y A. NEGRO-VILAR (1982).- Neonatal monosodium glutamate treatment alters the response of median eminence luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals to potassium and prostaglandin E2. *Endocrinology*, **110**: 835-841.
- FOUQUET, J. P. y M. L. KANN (1987).- Mitotic activity in monkey rat Leydig cells. *Reprod. Nutr. Develop.*, **27**: 1053-1062.
- GONDOS, B., K. P. MORRISON y R. H. RENSTON (1977).- Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biol. Reprod.*, **17**: 745-748.
- GRANT, L. D., W. E. STUMPF, M. SAR, C. B. NEMEROFF y J. S. KIZER (1978).- Monosodium glutamate destruction of estrogen-feedback neurons in hypothalamic arcuate nucleus-median eminence. *Fed. Proc.*, **37**: 297.
- HITZEMAN, S. J. W. (1962).- Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. *Anat. Rec.*, **143**: 351-362.
- HOLZSWARTH-McBRIDE, M. A., E. M. HURST y K. M. KNIGGE (1976).- Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. I. Endocrine deficiency and ultrastructure of the median eminence. *Anat. Rec.*, **186**: 185-196.
- KERR, J. B., K. A. RICH y D. M. KRETSEY (1979).- Alterations of the fine structure and androgen secretion of the interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. *Biol. Reprod.*, **20**: 409-422.
- KRUISSINK, N. (1980).- Sexual behavior and estrus cycle in monosodium glutamate treated rats. *IRCS Med. Sci. Biochem.*, **8**: 380-381.

- KUOPIO, T., J. TAPANAINEN, L. J. PELLINIEMI y I. HUHTANIEMI (1989a).- Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development*, **107**: 213-220.
- KUOPIO, T., P. OD. SAVOURAS, L. J. PELLINIEMI y I. T. HUHTANIEMI (1989b).- Transplantation of newborn rat testis under the kidney capsule of adult host as a model to study the structure and function of Leydig cells. *J. Androl.*, **10**:335-345.
- MATSUZAWA, Y., S. YONETANI, Y. TAKASKI, S. IWATA y S. SEKINE (1979).- Studies on reproductive endocrine function in rats treated with monosodium L-glutamate early in life. *Toxicol. Lett.*, **4**: 359-371.
- NEMEROFF, C. B., L. D. GRANT, G. BISSETTE, G. N. ERVIN, L. E. HARRELL y A. J. PRANGE (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., R. J. KONKOL, G. BISSETTE, W. YOUNGBLOOD, J. B. MARTIN, P. BRAZEAU, M. S. RONE, A. J. PRANGE, G. R. BREESE y J. S. KIZER (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.
- NEMEROFF, C. B., M. A. LIPTON y K. S. KIZER (1978).- Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Develop. Neurosci.*, **1**: 102-109.
- NEMEROFF, C. B., C. A. LAMARTINIERE, G. A. MASON, R. E. SQUIBB, J. S. HONG y S. C. BONDY (1981).- Marked reduction in gonadal steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate: further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. *Neuroendocrinology*, **33**: 265-267.
- OLNEY, J. W. (1969).- Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, **164**: 719-721.
- ORTH, J. M. (1982).- Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.*, **203**: 485-492.
- PASTOR, F. E., B. PELAEZ, J. L. BLAZQUEZ, D. TORANZO, A. SANCHEZ, A. J. ALVAREZ-MORUJO y P. AMAT (1990).- Estudio ultraestructural del nucleo arcuato del hipotálamo de rata tras la administración de glutamato monosódico. *An. Anat.*, **36**: 187-197.
- PASTOR, F. E., B. PELAEZ, J. L. BLAZQUEZ, D. TORANZO, A. SANCHEZ, A. J. ALVAREZ-MORUJO y P. AMAT (1991).- Efectos del glutamato monosódico sobre las neuronas del nucleo arcuato del hipotálamo de rata. Estudio morfométrico ultraestructural. *An. Anat.* (en prensa).
- PIZZI, W. J., J. E. BARNHART y D. J. FANSLOW (1977).- Monosodium glutamate administration to the newborn reduces reproductive ability in female and male mice. *Science*, **196**: 452-454.
- REDDING, R. W., A. V. SCHALLY, A. ARIMURA y I. WAKABAYASHI (1971).- Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology*, **8**: 245-255.
- RODRIGUEZ-SIERRA, J. F., R. SRIDARAN y C. A. BLAKE (1980).- Monosodium glutamate disruption of behavioral and endocrine function in the female rat. *Neuroendocrinology*, **31**: 228-235.
- RODRIGUEZ-SIERRA, J. F., J. D. BLAUSTEIN, C. A. BLAKE, R. W. CLOUGH y K. A. ELIAS (1982).- A decrease of cytosol estrogen receptors in the hypothalamus as a result of treatment of neonatal rats with glutamate. *Exp. Brain Res.*, **48**: 272-278.
- ROOSEN-RUNGE, E. C. y D. ANDERSON (1959).- The development of the interstitial cells in the testis of the albino rats. *Acta Anat.*, **37**: 125-137.
- 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.
- SRIDARAN, R., J. F. RODRIGUEZ-SIERRA y C. A. BLAKE (1981).- Effects of hypothalamic arcuate nucleus lesions on pulsatile luteinizing hormone concentration in ovariectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **168**: 38-44.

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

CUERPOS LAMINARES ESPIRALES Y CASTRACION. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y CUANTITATIVO

MEMBRANOUS WHORLED BODIES AND CASTRATION. AN ULTRASTRUCTURAL AND QUANTITATIVE STUDY.

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

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio ultraestructural y cuantitativo sobre los cuerpos laminares espirales que se observan en neuronas del núcleo arcuato de ratas castradas. Se han utilizado animales machos y hembras castradas al mes de edad y sacrificadas uno y tres meses después de la intervención. Los cuerpos laminares espirales se observan excepcionalmente en animales normales y controles, siendo relativamente abundantes en los animales castrados. Estas estructuras están constituidas por láminas concéntricas de retículo endoplasmico liso. El estudio cuantitativo demuestra que en los machos el mayor incremento de cuerpos laminares espirales en las neuronas del núcleo arcuato tiene lugar al mes de la castración, mientras que en las hembras el mayor incremento de estas estructuras ocurre a los tres meses de la castración.

PALABRAS CLAVE: Cuerpos laminares espirales, núcleo arcuato, castración, ultraestructura, morfometría, rata.

SUMMARY

An ultrastructural and quantitative study was made of the membranous whorled bodies observed in the neurons of the arcuate nucleus of castrated rats. Male and female animals castrated at one month after birth and sacrificed at one and three months after surgery were used. Whorled bodies are exceptionally observed in normal and control animals and are relatively abundant in castrated rats. These structures are formed of concentric layers of smooth endoplasmic reticulum. The quantitative study showed that in the males, the greatest increase in whorled bodies in the neurons of the arcuate nucleus occurs at one month after castration while in the females the greatest increase occurs at three months after surgery.

KEY WORDS: Membranous whorled bodies, arcuate nucleus, castration, ultrastructure, morphometry, rat.

Introducción

Los cuerpos laminares espirales (CLE) son estructuras compuestas por estrechas cisternas de retículo endoplasmico liso, circulares y dispuestas concéntricamente entre sí. Fueron descritas por Brawer (1971) con el nombre de "whorled bodies" en el citoplasma de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de ratas machos castradas. Para este autor los CLE son la variación más característica en el citoplasma de las neuronas del núcleo arcuato como consecuencia de la castración.

Posteriormente King y col. (1974) describieron estas estructuras con el nombre de "ribbon-rolls" en neuronas del núcleo arcuato de ratas en fase de diestro y en ratas ovariectomizadas. Estos autores clasificaron los CLE en

tres tipos, atendiendo a la presencia o ausencia de ribosomas asociados a las membranas de estas estructuras, coincidiendo su CLE tipo III con el descrito por Brawer. Naftolin y col. (1985) coincidieron en su descripción con la realizada por Brawer, así como Leranthy y col. (1985), quienes confirmaron la relación entre los estrógenos y los CLE.

En el presente trabajo se describen distintos hallazgos ultraestructurales y cuantitativos sobre la presencia de CLE en el citoplasma de neuronas del núcleo arcuato de ratas castradas.

Material y Métodos

En nuestro estudio hemos empleado 80 ratas albinas Sprague-Dawley. Cuarenta animales (veinte machos -M- y veinte hembras -H-) fueron castrados quirúrgicamente al mes de edad (*animales castrados -C-*). La mitad de los animales de cada sexo se sacrificaron al mes de la castración (M C 1+1 y H C 1+1) y la otra mitad a los tres meses (M C 1+3 y H C 1+3). Veinte animales (diez machos y diez hembras) fueron sometidos a una intervención de castración simulada (*animales controles -CS-*), sacrificándose la mitad de los animales de cada sexo al mes de la intervención (M CS 1+1 y H CS 1+1) y la otra mitad a los tres meses (M CS 1+3 y H CS 1+3). Veinte animales (diez machos y diez hembras) no fueron sometidos a ningún tipo de experiencia (*animales normales -N-*), siendo sacrificada la mitad de los animales de cada sexo a los dos meses de edad (M N 1+1 y H N 1+1) y la otra mitad a los cuatro meses de edad (M N 1+3 y H N 1+3). Las castraciones, tanto en machos como en hembras, se han realizado bajo anestesia con eter etílico. En los animales machos se realiza mediante incisión de las bolsas escrotales y extirpación de los testículos, tras ligadura de los cordones espermáticos, con posterior sutura de la herida. En las hembras se realiza una incisión dorsomedial de la piel a la altura de la región lumbar, procediéndose a continuación a la apertura de la pared abdominal lateral. Tras localizar el ovario, se liga la porción distal de la trompa y se extirpa la gónada. Tras la extirpación de los ovarios, se procede a suturar las dos incisiones en la pared abdominal y, por último, la incisión cutánea. La castración simulada se realiza de forma idéntica a la anteriormente descrita pero no se ligan los conductos y no se extirpan las gónadas.

Bajo anestesia con pentotal sódico (30 mg/Kg peso), 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. 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 contrastadas en bloque con acetato de uranilo al 2% en acetona de 70°, deshidratadas con acetona e incluidas en Durcupan (Fluka). Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800, se contrastaron siguiendo el método de Reynolds y se estudiaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-201. Para realizar el análisis cuantitativo, se obtuvieron al azar 36 micrograffas, equivalentes cada una a 1545 μm^2 del territorio del núcleo arcuato, de cada grupo de animales; tras positivar los negativos en papel fotográfico se contaron todos los CLE presentes en las 36 imágenes de cada grupo de animales, valorándose la significación estadística con el test de comparación de proporciones con aproximación a la Normal.

Resultados

Los cuerpos laminares espirales (CLE) se observan de forma constante, en mayor o menor cantidad, en algunas neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de animales castrados, tanto machos como hembras, no encontrándose o haciéndolo de forma ocasional en ratas normales.

Por regla general los CLE se presentan en neuronas que poseen un gran desarrollo del retículo endoplásmico

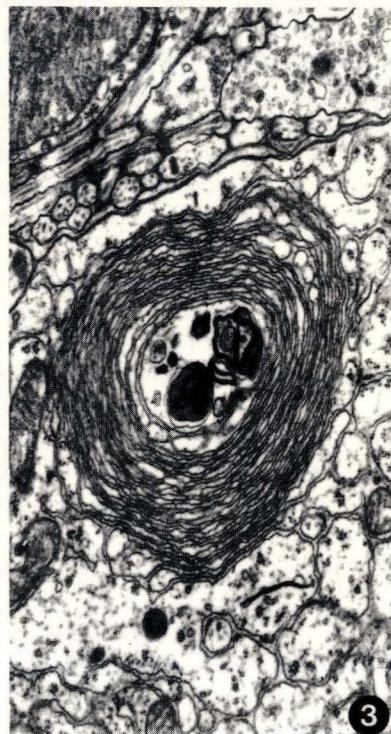
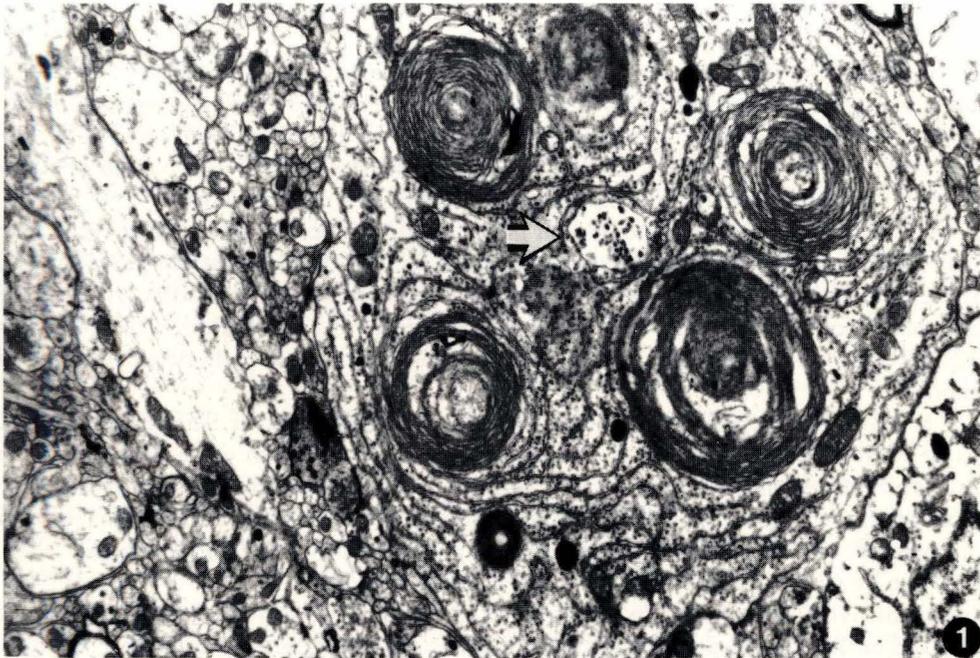


FIGURA 1. Fragmento del soma de una neurona del núcleo arcuato de una rata hembra castrada al mes de edad y sacrificada tres meses después de la castración. Se observan seis cuerpos laminares espirales. La flecha señala una estructura de eje mayor $1.3 \mu\text{m}$, limitada por una unidad de membrana, de fondo claro y con un escaso contenido a base de grumos densos. (10.430x).

FIGURA 2. Detalle de un soma neuronal de una neurona del núcleo arcuato. Se observan dos cuerpos laminares espirales. (30.735x).

FIGURA 3. Fragmento del soma de una neurona del núcleo arcuato. Se observa un cuerpo laminar espiral en cuya parte central existen formaciones de probable naturaleza lisosomal. (21.900x).

rugoso (RER) y abundantes polirribosomas dispuestos por el citoplasma entre las cisternas de RER (figs. 1 y 2). Se configuran como láminas circulares de retículo liso, concéntricas entre sí (fig. 1); en ocasiones no forman círculos completos, sino arcos muy cerrados con extremos dilatados en forma de cisternas (fig. 2). La lámina circular más periférica de los CLE suele continuarse con las cisternas del RER (fig. 1); no obstante, hay que insistir en que todas las láminas circulares componentes de los CLE son de retículo liso.

Los CLE muestran un centro de contenido variable; en algunos casos en el centro hay cisternas lisas aparentemente vacías o con muy escaso contenido, que seelen ser los extremos dilatados de las mismas cisternas circulares (fig. 2); en otros casos se pueden observar estructuras semejantes a lisosomas (fig. 3). En algunas neuronas puede haber dos (fig. 2) o más CLE, tal como se aprecia en la figura 1, en la que pueden observarse hasta seis CLE. En ocasiones, cuando los CLE son afectados por el corte en su periferia se presentan en forma de haces longitudinales.

A veces, en la proximidad de los CLE y como abrazándolos, existen cisternas estrechas de RER que alternan con espacios de hialoplasma donde hay polirribosomas (fig. 2). También en la proximidad suele haber mitocondrias y vesículas granulares (figs. 1 y 3). En una ocasión se ha sorprendido la existencia de una estructura, sensiblemente elíptica, de eje mayor 1.3 μm , limitada por una unidad de membrana, de fondo claro y con un escaso contenido a base de grumos densos, en la vecindad de varios CLE (fig. 1, flecha).

Es frecuente que los CLE estén próximos a sinapsis axosomáticas.

El estudio cuantitativo (Tabla I) pone de manifiesto la existencia de un incremento altamente significativo en el número de CLE en los animales castrados, tanto machos como hembras, en relación con los normales y controles del mismo sexo y edad. Si comparamos los machos castrados de dos y cuatro meses de edad, vemos como el incremento de CLE es mayor en los de menor edad, mientras que en las hembras sucede lo contrario, es decir, el aumento de CLE es mayor en las ratas de cuatro meses de edad que en las de dos meses. Por otra parte, el análisis morfométrico pone de relieve la extraordinaria escasez, e incluso inexistencia, de CLE en los animales normales y controles.

TABLA 1

Grupo (machos)	CLE	Grupo (hembras)	CLE
MNA+1	3	HN 1+1	0
MCS 1+1	2	HCS 1+1	1
MC 1+1	19*	HC 1+1	10+
MN 1+3	1	HN 1+3	1
MCS 1+3	2	HCS 1+3	0
MC 1+3	12+	HCA 1+3	31*

Los CLE están expresados por el número de estas estructuras en 36 micrográficas correspondientes cada una a 1545 μm^2 de tejido.

* + $p < 0.001$; + = $p < 0.005$; animales castrados con respecto a normales y sometidos a castración simulada el mismo sexo y edad (Test de comparación de proporciones con aproximación a la Normal)

Discusión

Desde su descripción por Brawer (1971) en neuronas del núcleo arcuato de ratas castradas, se ha considerado tradicionalmente la presencia de CLE en neuronas de este núcleo hipotalámico como un signo característico de la castración (King y col., 1974; Price y col., 1976; Domínguez, 1981; Walsh y col., 1982; Naftolin y col., 1985;

Leranth y col., 1985; Amat y col., 1987). No obstante, Fernández y col. (1986) describen estas estructuras en el núcleo supraóptico difuso del hamster normal, aunque sin realizar estudios cuantitativos.

Los CLE son una variedad de formaciones membranosas espirales, que King y col. (1974) clasificaron en tres tipos, relacionándolos con los tejidos en los que aparecen y con las funciones, a base de una extensa revisión bibliográfica del tema. El tipo I, denominado también parasomas, está constituido por membranas sin ribosomas y ha sido observado en células de las gónadas, tanto del ovario como del testículo, epéndimo y glándula pineal. El tipo II, que clásicamente se conoce con el nombre de "Nebenkern", ha sido hallado en páncreas, suprarrenal, melanomas, neuronas, espermatídes y en células de la bolsa de Rathke. Está constituido por membranas circulares dispuestas concéntricamente que contienen ribosomas en toda su superficie; son por lo tanto membranas de RER. El tipo III, al que los autores designan "ribbon-rolls" -y Brawer (1971) denomina "whorled bodies"-, son estructuras formadas, al igual que las anteriores, por láminas circulares concéntricas, en cuyas superficies más internas o en las más externas se adosan ribosomas. Además presentan material electrodenso entre las cisternas.

En relación con los resultados que aportamos, hemos de señalar que nuestro concepto de CLE, deducido de las imágenes ultraestructurales observadas, coincide con el de Naftolin y col. (1985), para quienes los "whorl bodies", como ellos los denominan, son: "organitos intraneuronales, compuestos por láminas concéntricas de retículo endoplásmico liso, que frecuentemente se continúan con elementos del retículo endoplásmico rugoso". Asimismo, nuestros CLE son idénticos al tipo III de la clasificación de King y col. (1974).

Nuestros datos cuantitativos confirman, en primer lugar, que los CLE son un signo característico de las neuronas del núcleo arcuato de las ratas castradas, pues no existen, o su presencia es excepcional, en los animales normales y controles. Considerados en conjunto los datos cuantitativos, se observa un incremento numérico de los CLE en cualquiera de los grupos castrados con respecto a los normales y controles del mismo sexo y edad. Comparando los resultados entre los grupos de ratas castradas se deduce que el incremento de CLE al mes de la castración es mayor en los machos que en las hembras, y que a los tres meses la relación se invierte, siendo mayor en las hembras que en los machos. Estos datos pueden ser relacionados con la existencia de un dimorfismo sexual en el núcleo arcuato del hipotálamo de la rata, puesto claramente de manifiesto por nosotros atendiendo a la diferente respuesta, tanto cuantitativa como cualitativa, de las neuronas de este núcleo tras la castración (Pastor y col., 1990).

Con respecto al posible significado de los CLE es de resaltar que siempre se ha considerado su relación con la esfera sexual. Así, para Brawer (1971) representarían la adaptación de la célula a la disminución de los esteroides sexuales circulantes tras la castración, mientras que para Domínguez (1981) podrían ser la expresión estructural de una acción de las hormonas gonadotropas, incrementadas en los animales castrados, sobre las neuronas del núcleo arcuato más directamente relacionadas con la función sexual.

En relación con la posible imbricación de los CLE con la disminución del nivel de hormonas sexuales, es de resaltar que varios autores han demostrado que tras la extirpación gonadal la terapia hormonal sustitutiva era capaz de impedir o disminuir la aparición de CLE en las neuronas del núcleo arcuato (Brawer, 1971; Leranth y col., 1985).

Por otra parte, ciertas experiencias distintas de la castración en las que se observa un incremento de CLE en las neuronas del núcleo arcuato, siempre pueden ser referidas a alteraciones en el nivel de hormonas sexuales, como ocurre tras los tratamientos con morfina (Ford y col., 1973, 1974; Price y col., 1976).

Por tanto, en principio parece clara una relación estrecha entre los CLE y el nivel de esteroides sexuales. No obstante, conviene ser cautos, porque Cramer y Ford (1977) han descrito un incremento de los CLE en las neuronas del núcleo arcuato de ratas neonatales tiroidectomizadas, afirmando que la respuesta de estas neuronas a la tiroidectomía es similar a la que sigue a la castración. En el caso de las ratas neonatales tiroidectomizadas, Cramer y Ford (1977) observaron ciertamente un aumento del número de los CLE, pero a ellos mismos les sorprendió no encontrar neuronas con dos o más CLE, a diferencia de lo que ocurre en la castración. Cramer y Ford, en el trabajo antes citado, no saben responder de una manera clara a si el escaso número de CLE por neurona, en su experimento de tiroidectomía, refleja una diferencia normal en la respuesta fisiológica o una neurona menos madura, y sugieren que las neuronas del núcleo arcuato pueden responder a la pérdida de un servomecanismo negativo de las hormonas de las glándulas diana (hormonas gonadales u hormonas tiroideas) de una manera semejante. Para ellos, el significado del CLE es desconocido, aunque basándose en su trabajo y en

los de Brawer (1971), King y col. (1974) y Ford y col. (1974), sugieren que dicho organito puede representar un signo de aumento de la actividad sintética de la célula.

Por tanto, el significado del CLE, o más bien, el de su aparición en neuronas del núcleo arcuato permanece aún sin obtener una respuesta concreta. Pero además, su importancia radica en el hecho de que pueda ser considerado como un marcador neuronal. En efecto, hasta el momento actual no ha sido posible identificar una población neuronal en respuesta a cambios ultraestructurales específicos tras alteraciones hormonales. De ahí que consideremos de gran importancia establecer cuál es el mecanismo que induce la aparición de esta estructura en neuronas del núcleo arcuato y si sólo lo hacen en una población neuronal específica, para lo que estamos desarrollando en la actualidad estudios inmunocitoquímicos con la finalidad de comprobar este último punto.

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a la Profesora P. Galindo por su inestimable ayuda en el estudio estadístico y 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., B. PELAEZ, D. TORANZO, J.L. BLAZQUEZ, A. ALVAREZ-MORUJO y F.E. PASTOR (1987).- Sur les inclusions cytoplasmiques dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus de rat. *Bull. Ass. Anat.*, **71** (215 bis): 23-24.
- BRAWER, J.R. (1971).- The role of the arcuate nucleus in the brain-pituitary-gonad axis. *J. Comp. Neurol.*, **143**: 411-446.
- CRAMER, E. B. y D.H. FORD (1977).- Ultrastructural changes in the hypothalamo-hypophyseal axis in rats thyroidectomized at birth. En: *Thyroid hormones and brain development*. (Grave, ed.) pp. 19-32. Raven Press, Nueva York.
- DOMINGUEZ, F.J. (1981).- Aportaciones al conocimiento del hipotálamo mediobasal. Estudio con el microscopio electrónico. Tesis Doctoral de Medicina. Universidad de Salamanca.
- FORD, D.H., K. VOELLER y B. CALLEGARI (1973).- Changes in neurons of the median eminence-arcuate region of rats induced by chronic morphine treatment: an electron microscopic study. *Anat. Rec.*, **175**: 321.
- FORD, D.H., K. VOELLER y B. CALLEGARI y E. GRESIK (1974).- Changes in neurons of the median eminence-arcuate region of rats induced by morphine treatment: an electron microscopic study. *Neurobiology*, **4**: 1-11.
- FERNANDEZ, B., I. SUAREZ, M.A. PEREZ-BATISTA, I. AZCOITIA y G. BODEGA (1986).- Annulate lamellae and whorl bodies in the diffuse supraoptic nucleus of the hamster. *Acta Anat.*, **126**: 230-236.
- KING, J.C., T.H. WILLIAMS y A.A. GERALL (1974).- Transformations of hypothalamic arcuate neurons. I. Changes associated with stages of the estrous cycle. *Cell Tissue Res.*, **153**: 497-515.
- LERANTH, C., H. SAKAMOTO, N.J. MACLUSKY, M. SHANABROUGH y F. NAFTOLIN (1985).- Estrogen responsive cells in the arcuate nucleus of the rat contain glutamic acid decarboxylase (GAD): an electron microscopic immunocytochemical study. *Brain Res.*, **331**: 379-381.
- NAFTOLIN, F., M. BRUHLMANN-PAPAZYAN, D. BAETENS y L.M. GARCIA SEGURA (1985).- Neurons with whorl bodies have increased numbers of synapses. *Brain Res.*, **329**: 289-293.
- PASTOR, F.E., B. PELAEZ, J.L. BLAZQUEZ, A. SANCHEZ, G. AMAT y M.T. HERNANDEZ HOLGADO (1990).- Dimorfismo sexual del núcleo arcuato del hipotálamo de rata. *An. Anat.* (en prensa).
- PRICE, M.T., J.W. OLNEY y T.J. CICERO (1976).- Proliferation of lamellar whorls in arcuate neurons of the hypothalamus of castrated and morphine treated male rats. *Cell. Tiss. Res.*, **182**: 537-540.
- WALSH, R.J., J.R. BRAWER y F.N. NAFTOLIN (1982).- Early postnatal development of the arcuate nucleus in normal and sexually reversed male and female rats. *J. Anat.*, **135**: 733-744.

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.

EFFECTOS TERATOLOGICOS DE LA CLORPROMAZINA. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL CHLORPROMAZINE TERATOLOGY EFFECTS. UTRAESTRUCTURAL STUDIES

**P.M. RAMOS CALVO, R. SARRAT TORREGUITART, J.R. BRAZAL RAPOSO, J. SANTAFE OROZ,
J. SEGARRA DOMENECH.**

Departamento de Anatomía Humana.
Facultad de Medicina. Zaragoza. Sección de Farmacología de la
Facultad de Farmacia. U.P.V./E.H.U. VITORIA-GASTEIZ

RESUMEN

Hemos tratado ratas preñadas con tres dosis teratológicas de Clorpromazina indistintamente durante 10 días seguidos y por vía I.P El estudio ultraestructural muestra que los fetos correspondientes a las ratas tratadas, presentan una Capa Germinal Externa cerebelosa (E.G.L.) con células dotadas de una cromatina celular muy densa o "no activa; hay también una menor celularidad y un menor índice mitótico. Estos resultados parecen ser el efecto de una acción directa de la Clorpromazina sobre la bioquímica celular, así como de la hiponutrición desarrollada por el fármaco en los animales tratados.

PALABRAS CLAVE: Rata. Teratología. Clorpromazina. Estudio ultraestructural.

SUMMARY

We have treated pregnant rats with three Chlorpromazine teratological doses during ten days (I.P.). The ultraestructural studies show that fetal E.G.L. has cellular chromatin condense, mitotic activity significantly reduced and less cellularity. These effects, apparently, are the result of the Chlorpromazine direct action and the hiponutrition on the treated animal.

KEY WORDS: Rat. Teratology. Chlorpromazine. Ultraestructural studies.

Introducción

Resulta evidente dentro del marco de los conocimientos médicos actuales que son muchos los factores y agentes, bien internos o externos al organismo, susceptible de producir, desarrollar e incluso iniciar modificaciones en el adecuado desarrollo embrionario y/o fetal de los diferentes órganos y aparatos que forman parte definitiva de nuestro sistema corporal. Esta es precisamente la razón por la que cada día adquieren mayor importancia los estudios teratológicos. Sin embargo estos agentes, su mecanismo de acción, e incluso sus efectos no son, en muchos casos, coincidentes en todos los estudios e investigaciones. Ante la gran controversia aparecida en la literatura científica actual sobre el posible papel teratológico de un fármaco tan utilizado como la Clorpromazina, hemos optado por esta problemática como trabajo de investigación, tomando como objeto material el desarrollo embrionario de la corteza del cerebelo.

Hasta la actualidad, numerosos son los estudios cuyos resultados se posicionan en un sentido u otro. Dentro de los que muestran posibles influencias de este fármaco sobre la gestación y en definitiva sobre el embrión y/o

feto, se encuentran los realizados por Padamanabhan y Singh (1978), quienes observan una importante disminución del peso cerebral y de la celularidad del cerebelo en los fetos cuyas madres fueron tratadas con Clorpromazina. Patel y cols. (1980), comprueban, en este mismo sentido, una significativa disminución de la actividad mitótica en el cerebelo globalmente, y en su corteza de forma especial, así como abundantes degeneraciones celulares. Otros, como Hannah y cols. (1982), observan una disminución importante de las células de Purkinge y de su árbol dendrítico, así como una importante condensación de la cromatina nuclear y picnosis celulares en diversas zonas del cerebelo correspondiente al embrión y/o feto. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores como (Patel y cols., 1973; Balazas y cols., 1977; Lewis y cols., 1977 a y b; Dailey, 1978; RAMOS y cols., 1984 a y b, 1985).

En fin, otros estudios, como es el caso del realizado por Leonard (1981), no aportan ningún efecto teratológico.

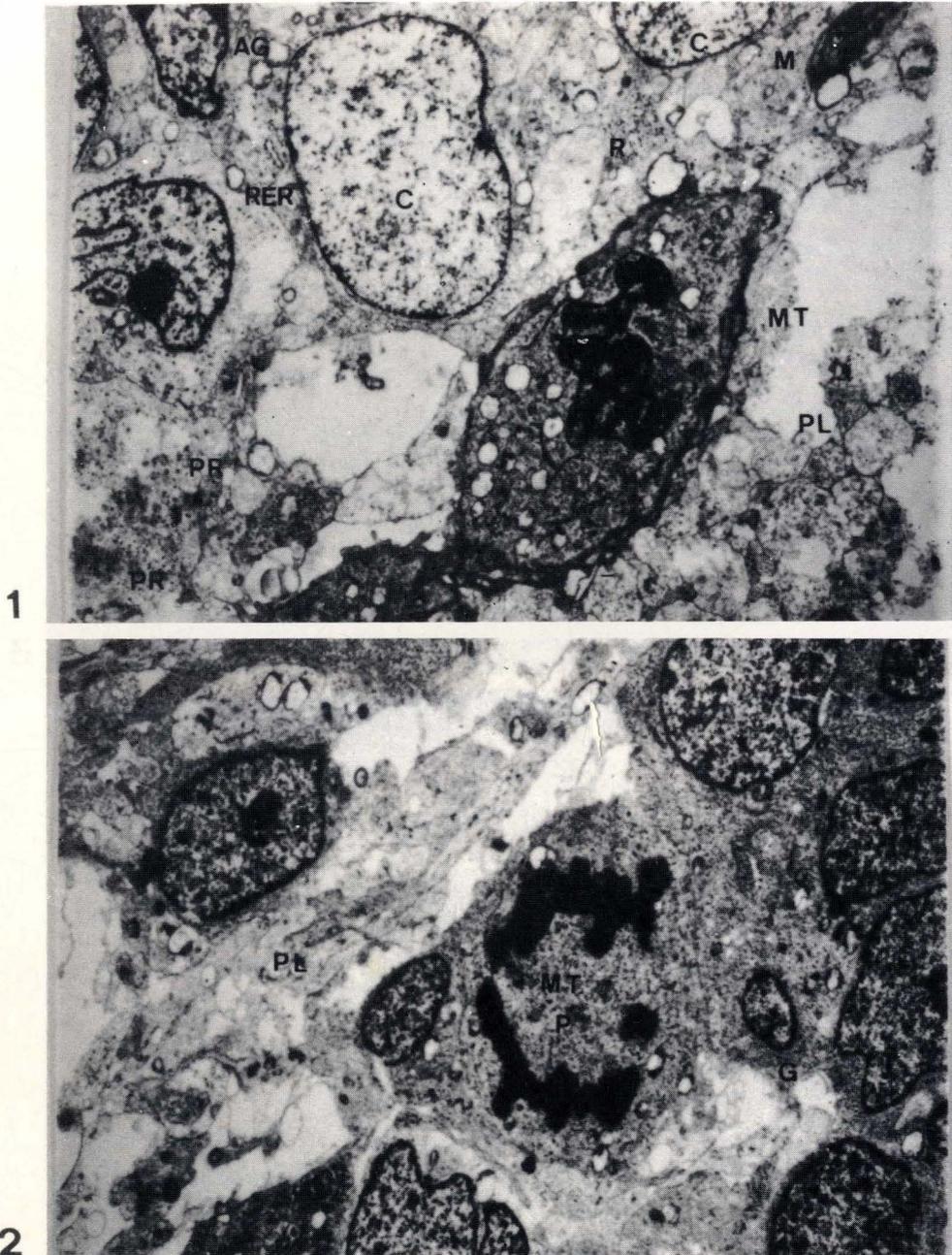
Por lo que hasta aquí hemos expuesto, consideramos que es objetivo fundamental del presente trabajo de investigación, clarificar la posible relación teratológica entre la Clorpromazina y el desarrollo de la corteza del cerebelo, centrándonos especialmente en los aspectos ultraestructurales.

Material y Métodos

Hemos empleado ratas wistar blancas, hembras y vírgenes de tres meses de edad, por su elevada fertilidad y número de crías. Han sido alojadas en un estabulario debidamente acondicionado y fueron distribuidas al azar en varios grupos de ratas preñadas, cuatro en total, de diez animales cada uno de ellos: Grupo Control y tres de Clorpromazina dosis alta, media y baja, respectivamente. Las dosis del fármaco han sido calculadas a partir del método descrito por Boyland y cols. (1968), teniendo en cuenta la Dosis Eficaz 50 y la Dosis Letal 50 de este fármaco y por vía intraperitoneal. Esto nos permite emplear dosis teratológicas y no tóxicas como sucede frecuentemente. Las dosis obtenidas son 8,5; 15,5 y 22,5 mg/Kg. Todas las ratas fueron tratadas con suero fisiológico (Grupo Control) o Clorpromazina, durante 10 días seguidos, desde el 7 al 16 de preñez, ambos incluidos, por ser este el periodo de máxima importancia en el desarrollo embrionario de la corteza del cerebelo. Durante el tratamiento se cuantifica la ingesta de agua, comida y ganancia de peso diaria de cada animal. El día 18 de preñez se extraen los fetos por laparotomía media y se procede al estudio con microscopía electrónica del esbozo cerebeloso. Las muestras se fijan en tres etapas: 1.- Prefijación en glutaraldehído al 2,5% amortiguado en buffer cacodilato a pH 7,2 0,1 M y 4 durante 12 h.; 2.- Fijación en Os 04 al 1% amortiguado a pH 7,2 con idéntico buffer y 2 h. a 4; 3.- Postfijación en solución acuosa de acetato de uranilo al 15 y 2 h. a temperatura ambiente. La inclusión se realizó en una mezcla de Epol-Araldita, y el contraste de los cortes, se efectuó con el citrato de Pb según Reynolds seguido de un tratamiento con nitrato de uranilo.

Resultados

El estudio de las muestras correspondientes al grupo Control presentan una capa germinal externa (EGL) con abundante celularidad, sobresaliendo el hecho de que estas células presentan ya una organización de organelas bastante característica en su citoplasma. Así, se demuestra la presencia de numerosos polirribosomas (PR), ribosomas libres (R), mitocondrias (M), retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi (AG). En consecuencia esto nos sugiere en principio, que existe una cierta diferenciación celular (Figura n.º 1). Al mismo tiempo pueden apreciarse distintos tipos celulares, que junto con lo anteriormente expuesto, y la localización profunda dentro de 1.ª Capa Germinal Externa de estas muestras, nos sugieren futuras células de Purkinge (P) (las más desarrolladas) y células gliales (G) (las más pequeñas) (Figura n.º 2). Es importante hacer notar que los elementos descritos presentan casi en su totalidad cromatina (C) en disposición muy laxa, lo cual es indicativo de una intensa actividad de síntesis por parte de estas células, imprescindible si tenemos en cuenta el elevado índice



- FIGURA 1.** Detalle de un neuroblasto en mitosis de la EGL (Capa Germinal Externa), región superficial. Apréciase la abundancia de organelas celulares y la disposición laxa de la cromatina nuclear. (A.G.: Aparato de Golgi; C: Cromatina; M: Mitocondrias; M.T.: Mitosis; P.R.: Polirribosoma; P.L.: Prolongaciones normales; R.: Ribosomas) (Grupo Control).
- FIGURA 2.** Imágen de la región profunda de la E.G.L., mostrando la mitosis de una futura célula de Purkinge (P; M.T.) (G: Guia; P.L.: Prolongaciones neuronales) (Grupo Control).

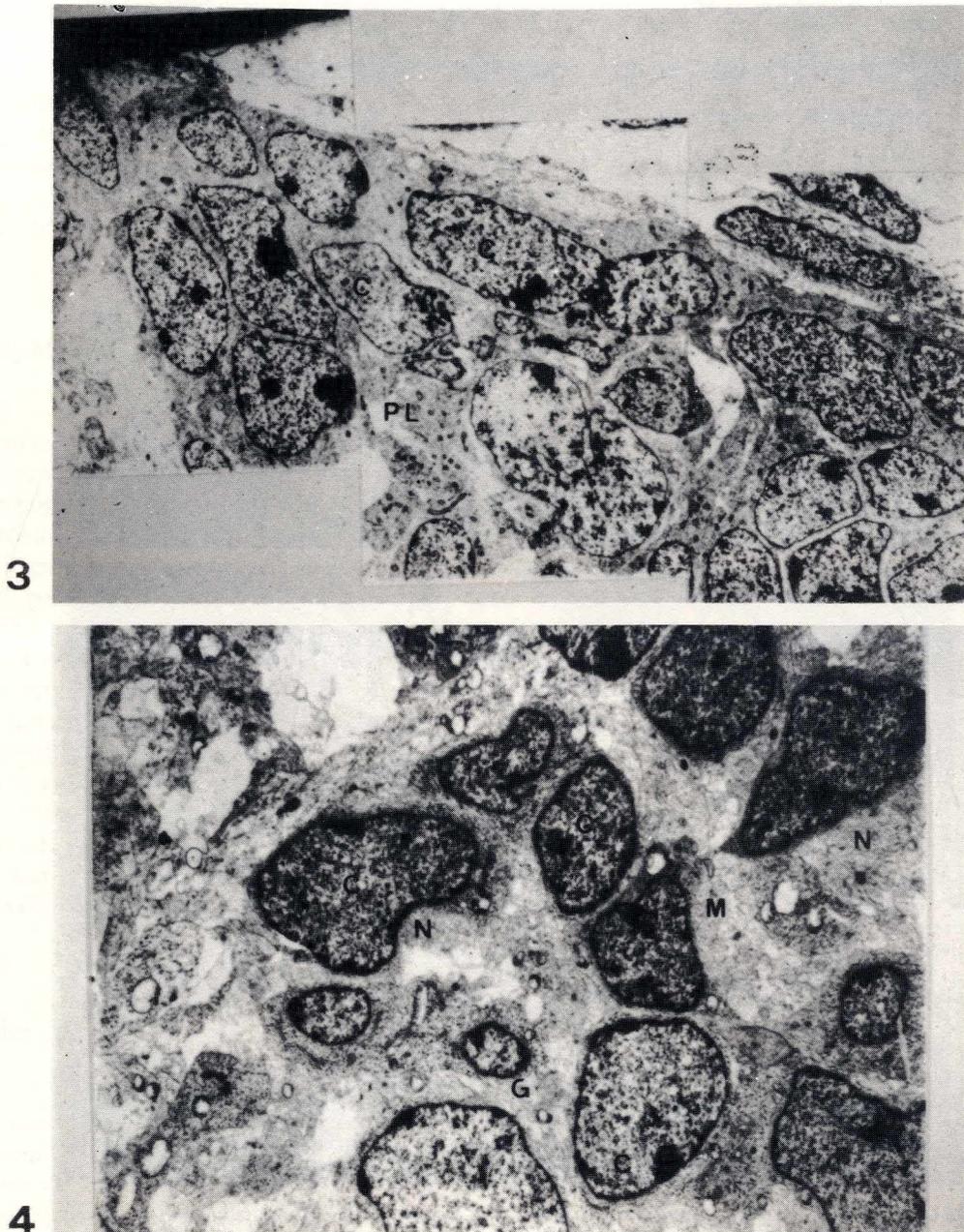
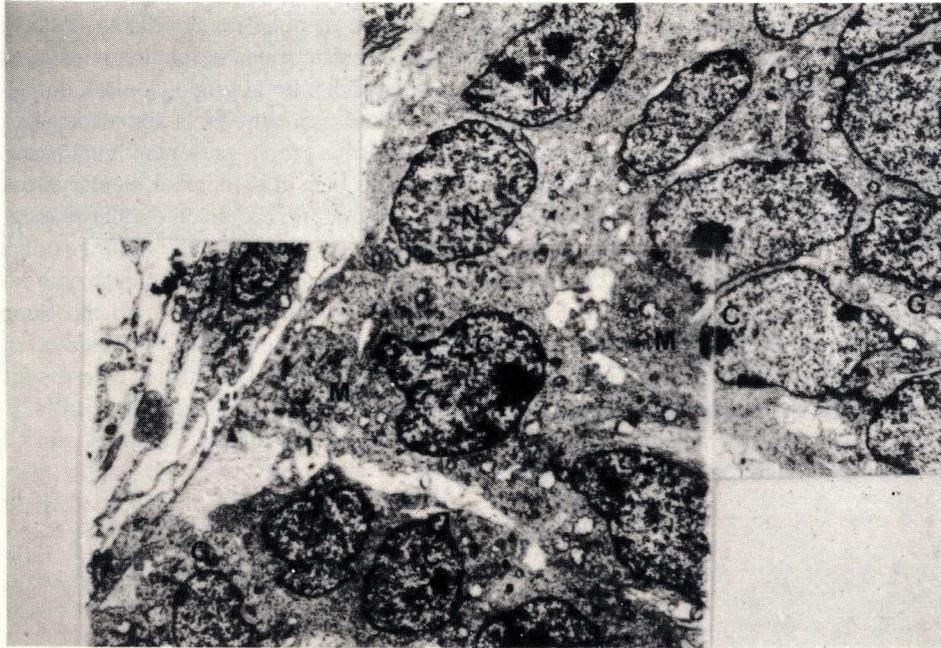
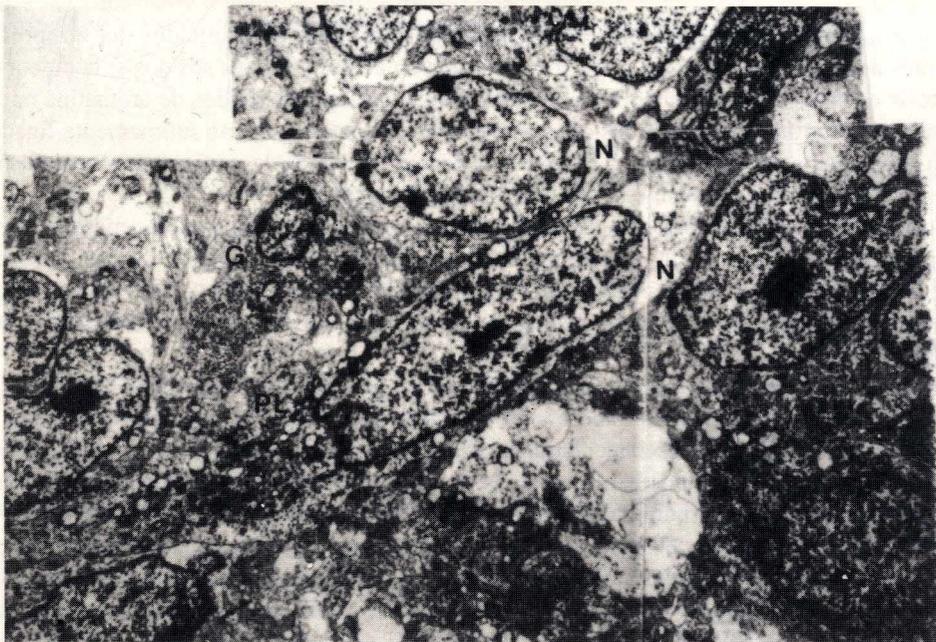


FIGURA 3. Detalle de la E.G.L. donde se aprecia una abundante celularidad y la disposición laxa característica de la cromatina (C) nuclear (P.L.: Prolongaciones neuronales) (Grupo Control).

FIGURA 4. Imágen de la E.G.L. donde se aprecian abundantes mitocondrias, disposición densa de la cromatina nuclear (C) y diversidad celular (N: neuroblastos; G: glia) (Grupo Clorpromazina 15,5 mg/Kg.).



5



6

FIGURA 5. Detalle de la E.G.L. donde se observa la disposición densa de la cromatina nuclear (C) (N: Neuroblasto; G: Glia; M: Mitocondrias) (Grupo Clorpromazina 8,5 mg/Kg.).

FIGURA 6. Imágen que muestra un neuroblasto (N) con una prolongación característica (P.L.), dotada de uss elementos más especiales. (G: Glia) (Grupo Clorpromazina 22,5 mg/kg.).

mitótico (MT) que muestran y la fase de diferenciación en la que se encuentran (Figuras n.º 1, 2 y 3). Entre estas células se pueden observar ya en este periodo, algunas prolongaciones (PL) nerviosas próximas a los somas neuronales, estableciéndose numerosos contactos entre estos elementos (Figuras n.º 1, 2 y 3). Consideramos de gran interés este aspecto, ya que los contactos ya desarrollados potencian la diferenciación celular, y a la inversa, son un indicativo de la misma.

En cuanto a los animales tratados con Clorpromazina, en todas las muestras estudiadas destacan dos hechos importantes. En primer lugar, que la mayor parte de las células muestran una cromatina nuclear en disposición ligeramente más condensada que en el caso de las células correspondientes al grupo Control, donde se encuentra en forma muy laxa (Figuras n.º 4 y 5). En segundo lugar es característica también la abundancia de mitocondrias en los citoplasmas de las células tratadas (Figuras n.º 4 y 5). Todos los grupos presentan igualmente y sobre todo en la parte interna de la Capa Germinal Externa, dos tipos celulares bien diferenciados, neuroblastos (N) y oligodendroblastos (G) (Figuras n.º 4 y 5). Los primeros presentan una gran organización citoplasmática, con diferenciación ya manifiesta de diversas organelas citoplasmáticas, así como de algunas prolongaciones dendríticas (Figura n.º 6). Estas prolongaciones poseen todos los elementos que las caracterizan en avanzado estado de desarrollo (polirribosomas, mitocondrias, neurotúbulos, neurofilamentos, vesículas, etc.), al mismo tiempo que se han establecido algunos contactos entre prolongaciones nerviosas y somas de neuroblastos (Figura n.º 6). Sin embargo, y en conjunto, tanto la celularidad como la presencia de prolongaciones y contactos en estos grupos, es ligeramente inferior a la del grupo Control, hechos que se apoyan en la menor frecuencia de mitosis. De forma global, estas observaciones son ligeramente más intensas en el caso de los animales tratados con Clorpromazina 22,5 mg/kg. y sobre todo en lo relativo a la actividad mitótica.

Discusión

Tres características destacan sobremanera a la hora de comparar los resultados del Grupo Control y los correspondientes a los animales tratados con Clorpromazina en cualesquiera de sus dosis: la menor celularidad e índice de mitosis en estos últimos, así como la generalizada presentación en ellos de cromatina nuclear densa, y no "activa" o laxa como la del Control. Estas tres características se encuentran íntimamente ligadas, ya que la condensación cromática es poco indicativa de división celular (y si todo lo contrario), al mismo tiempo que la menor frecuencia de mitosis trae consigo una celularidad menos marcada.

Buscando la razón última de estos hallazgos, pensamos que dos son los posibles mecanismos que aquí se unen para originarlos: o bien un efecto directo de la Clorpromazina sobre las células; o bien un factor indirecto que altera el desarrollo celular como puede ser la hiponutrición embrio-fetal, ya que como hemos observado durante la presente investigación, las ratas tratadas con el fármaco comen significativamente menos que las del Grupo Control.

Con relación al primero de los mecanismos citados, sabemos desde hace ya algunos años que la mitosis de las células embrionarias correspondientes sobre todo a órganos del S.N.C., se encuentra regida por los llamados neurotransmisores celulares, como las catecolaminas, serotonina y acetilcolina (Sereni y cols. 1966; Buznikov, 1967 Y 1973). La Clorpromazina posee mecanismos de acción antiserotomínérgicos y anticolinérgicos entre otros, por lo que en consecuencia, pudiera, a través de ellos, frenar o enlentecer el proceso de división celular. Nuestras experiencias con cultivos celulares tratados con Clorpromazina a dosis teratológicas, muestran resultados similares, lo que va en refuerzo de esta teoría (Ramos y cols., 1988). En cuanto al segundo mecanismo citado, la hiponutrición, puede actuar en dos vertientes. Por un lado, reduciendo el aporte de sustratos para la síntesis de los neurotransmisores celulares anteriormente citados (Dodge y cols., 1975; Patel, 1983 B). Por otra parte, restringiendo la bioquímica celular por déficit de sustratos (síntesis de lípidos, aminoácidos, glucogenolisis, etc) (Bassyy cols., 1970; Subba y cols., 1978; Patel, 1983 b). Investigaciones recientes llevadas a cabo por nuestro equipo y otros autores, demuestran claramente que un factor como la hiponutrición altera notablemente, no sólo el ritmo mitótico celular, sino el embrión en general, y en todas las vertientes (Winick, 1969; Patel, 1983; Ramos y cols., 1986; Ramos y cols., 1988).

Por lo expuesto hasta este punto, creemos que ambos mecanismos, acción directa de la Clorpromazina sobre la célula en diferenciación e hiponutrición, se mezclan para dar lugar a estos resultados.

Agradecimientos

Queremos agradecer la eficaz labor desarrollada por D. Javier Noceda, D. Javier Alonso y D^a Isabel Robres en la realización de la presente investigación.

BIBLIOGRAFIA

- BALAZS, R.; PATEL, A.J. and LEWIS, P.D.(1977): "Metabolic influences on cell proliferation in the brain". In. A.N. Davinson (Ed). *Biochemical Correlates of Brain Structure and Function*, Academic Press. New York, 43-83 .2).- BASS, N.H.; NETSHY, M.G. and YOUNG, E.(1970): "Effects of neonatal malnutrition on developing cerebrum". *ARCH. NEUROL.* **23**: 289-302.
- BOYLAND, E. and GOULDING, R. (1968): "Teratogenic effects of Drugs". *TOXICOLOGY BUTTERWORTH AND CO.* Londres. 932-105.
- BUZNIKOV, G.A. (1967): "The low molecular weight regulators in embryogenesis". Ed. Nauka, Moscow.
- BUZNIKOV, G.A. (1973): "S-Hydroxytryptamine, catecholamines, acetylcoline, and some related substances in early embryogenesis". In: "Comparative Pharmacology" Ed. Pergamon Press. London. Vol. II: 593-623.
- DAILEY, J.W. (1978): "Effects of maternal Chlorpromazine on offspring nervous system development" *NEUROPHARMACOLOGY.* **17**: 583-587.
- HANNAH, R.S.; ROTH, S.H.; and SPIRA, A.W. (1982): "The effects of Chlorpromazine and Phenobarbital on vasculogenesis in the cerebellar cortex". *ACTA NEUROPATHOL.* **57**: 306-308.
- LEONARD, B.E. (1981): "Effect of psychotropic drugs administered to pregnant rat on the behaviour of the offspring". *NEUROPHARMACOLOGY.* **20**: 1.237-1.242.
- LEWIS, P.D.; PATEL, A.J.; BENDEK, G. and BALAZS, R. (1977): "Do drugs acting on the nervous system affect cell proliferation in the developing brain?" *LANCET.* **i**: 399-401.
- LEWIS, P.D.; PATEL, A.J.; BENDEK, G. and BALAZS, R. (1977): "Effect of reserpine on cell proliferation in the developing rat brain: a qualitative histological study". *BRAIN RESEARCH.* **129**: 299-308.
- PADMANABHAN, R. and SINGH, S. (1978): "Chlorpromazine effect on the fetal brain in rats". *TERATOLOGY.* **18**, **1**: 167.
- PATEL, A.J.; BALAZS, R. and JOHNSON, A.L. (1973): "Effects of undernutrition on cells formation in the rat brain". *J. NEUROCHEM.* **20**: 1151-1165.
- PATEL, A.J.; VERTES, Z.S.; LEWIS, P.D. and LAI, M. (1980): "Effect of Chlorpromazine on cell proliferation in the developing rat brain. A combined biochemical and morphological study". *BRAIN RESEARCH.* **202**: 415-428.
- PATEL, A. (1983 A): "Undernutrition and brain development". *TREND. IN NEUROSCIENCES.* **6**: 151-154.
- PATEL, A. (1983 b): "Effects of Neurotropic Drugs on Brain Cell Replication in vivo and in vitro". *MONOGR. NEUR. SCI.* **9**: 99-110.
- RAMOS, P.; GUINDOS, G.; FDZ DE ARANGUIZ, A. y ALCARAZ, E. (1984 a): "La Clorpromazina y Gestación". *REV. ESP. OBST. Y GINEC.* **43**: 509-515.
- RAMOS, P.; BRAZAL, J.J.; ARRIETA, L.; BURGOS, J.A. y ALCARAZ, E. (1984 b): "Clorpromazina y corteza del crebelo". *MED. ESP.* **30**.
- RAMOS, P.M.; MÚGICA, M.; BRAZAL, J.J. y ALCARAZ, E. (1985): "Influencia de la Clorpromazina sobre la unidad fetoplacentaria". *PEDIATRIKA* **2**: 41-48.
- RAMOS, P.M.; ARRIETA, L.; FORCADA, J.; PINO, A. y GOIRIENA, J. (1986): "Influencia de la malnutrición sobre el desarrollo del S.N.C. fetal y/o neonatal". *PEDIATRIKA.* **74** (6): 28-36.
- RAMOS, P.M.; VIGIL, J. y SARRAT, R. (en prensa): "Estudio de los efectos de la Clorpromazina sobre el crecimiento celular 'in vitro'".
- RAMOS, P.M.; SANTAFE, J.; SEGARRA, J. y SARRAT, R. (en prensa): "Hiponutrición y desarrollo de la corteza del crebelo".
- SERENI, F.; PRINCIPI, N.; PERLETTI, L. and SERENI, L.P. (1966): "Drugs and neonate". *BIOL. NEONATE.* **10**: 254.
- SUBBA-RAO, K.; TIWARI, B.K. and SINGH, K.N. (1978): "Metabolic adaptation in nutritionally small-for-date rat brain: frow of the glucose carbons in vitro into glyco-and phospholipids". *INDIAN J. MED. RES.* **67**: 968-979.
- WINICK, M. (1969): "Malnutrition and brain development". *J. PEDRIAT.* **74**: 667-679.

Correspondencia: Dr. Pedro Manuel
Sección de Anatomía Humana
Facultad de Farmacia
Carretera de Lasarte, s/n
01007 - Vitoria-Gasteiz. España

EFFECTOS DEL ENTRENAMIENTO DE RESISTENCIA SOBRE EL PATRON HISTOENZIMATICO DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA RATA*

EFFECTS OF RESISTANCE TRAINING ON THE PATTERN HISTOENZIMATIC OF RAT SKELETAL MUSCLE

A. TORRES, A. CRESPO, J.L. NIETO.

Departamento de Ciencias Morfológicas.
Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se realiza un programa de entrenamiento de natación y otro de carrera de resistencia en dos grupos de ratas, con objeto de valorar los cambios que experimenta el músculo esquelético. Con técnicas histoenzimáticas, se observa un incremento del potencial oxidativo histoenzimático e hipertrofia de las fibras tipo IIB en ambos grupos de animales entrenados, sin hallar diferencias significativas en los porcentajes de los diferentes tipos de fibras respecto del grupo control.

PALABRAS CLAVE: Músculo, rata, ejercicio, histoquímica.

SUMMARY

It is realized a program of swimming training and another of resistance run in two rat groups with the object of value the changes in the skeletal muscle. Using histoenzimatic thechnics it is observed an increase in the oxidative potential and hypertrophy of the IIB fiber type in both groups of trained animals, and no significative diference were found in the percentage of the different fiber types respect to the control group.

KEY WORDS: Muscle, rat, exercise, histochemistry.

Introducción

En los últimos años un gran número de investigadores han centrado sus estudios en la comprensión de la transformación que sufre el músculo en respuesta al ejercicio físico. Todo ello motivado por la gran importancia que supone una buena dotación y capacidad de adaptación del tejido muscular en el desempeño de las actividades físicas, unido al auge experimentado en las últimas décadas por el deporte popular y de alta competición.

Numerosos estudios transversales, han demostrado que los atletas de resistencia poseen en sus músculos un porcentaje mayor de fibras lentas tipo I que los sujetos sedentarios y aquellos no entrenados en resistencia (Gollnick et al., 1972a; Havu et al., 1973; Costill et al., 1976; Burke et al., 1977; Howald, 1982). Por el contrario en los sprinters, saltadores y levantadores de peso, comprometidos en el desarrollo de trabajos de potencia, se ha encontrado un porcentaje más alto de fibras rápidas tipo II en sus músculos (Gollnick et al., 1972; Thortensen et al., 1977; Mero et al., 1981).

* Trabajo subvencionado por la Diputación General de Aragón.

Los resultados de estos estudios suscitaron la duda sobre si las diferencias en la composición de la población fibrilar entre atletas y personas sedentarias era consecuencia del entrenamiento físico o se debía a la dotación genética.

Se ha utilizado la estimulación artificial de unidades motoras para ver la influencia de los diferentes modelos de frecuencia eléctrica sobre las propiedades contráctiles, estructura molecular y función metabólica de las fibras musculares. Con la estimulación crónica del nervio se consigue una transformación completa de las fibras tipo II en tipo I (Pette et al., 1973; Jolesz y Sreter, 1981). Durante el proceso de transformación ocurre un aumento de la densidad capilar y de las actividades enzimáticas oxidativas en la primera semana (Brown et al., 1976; Pette et al., 1973), seguido de un cambio en las propiedades isométricas después de dos semanas (Salmons y Henrickson, 1981) y un descenso de los niveles de ATPasa después de tres semanas (Sreter et al., 1974).

La transformación de fibras tipo I en tipo II ha sido probada en escasas ocasiones y siempre previa denervación de las fibras lentas a la aplicación de los estímulos eléctricos.

Entre varios de los estudios longitudinales que no pudieron demostrar la conversión de fibras rápidas en lentas con diversos entrenamientos de resistencia se hallan los realizados por Bagby et al., (1972); Gollnick et al., (1973); Saltin et al., (1976); Bylund et al., (1977); Lavoie et al., (1980); Parsson et al., (1985); Hodgson et al., (1985).

En discrepancia con los resultados de los autores anteriores, Morgan et al., (1971); Syroby et al., (1972); Jawed et al., (1977); Muller, (1974) y Jansson et al., (1978) encontraron un aumento de las fibras lentas en detrimento de las rápidas tanto en el músculo de animales como de hombres, después del entrenamiento.

También Schantz et al., (1982) y Friden et al., (1983) observaron un incremento de fibras intermedias tipo IIC y una disminución de las fibras rápidas tras entrenamientos de resistencia.

Con el entrenamiento de ratas en carrera intensa a intervalos Luginbuhl, (1984) y Torres et al., (1990) observaron diferencias significativas en los porcentajes de distribución fibrilar respecto a los animales control. En un programa de entrenamiento similar realizado por Simoneau et al., (1985, 1986) con un grupo de sedentarios primero y después con gemelos monocigóticos, comprobaron un incremento de las fibras tipo I y una disminución de las fibras IIB.

Aumentos significativos del potencial metabólico oxidativo de las fibras musculares después del entrenamiento de resistencia han sido ampliamente confirmados. Sobre este aspecto, Soumient et al., (1977) comentaron la escasa importancia que tienen los factores hereditarios en la determinación de las actividades enzimáticas del músculo.

Siguiendo en la línea de algunos trabajos previos, en este pretendemos observar los cambios que experimenta un músculo de la rata (recto femoral) sometido a dos tipos diferentes de entrenamiento, ambos de resistencia.

Material y métodos

Para desarrollar este trabajo hemos empleado 30 ratas machos, cepa Wistar de cuatro meses de edad, formando tres grupos de diez animales cada uno.

El primer grupo realizó un programa de entrenamiento que consistió en nadar una hora diaria, seis días a la semana, durante un periodo de diez semanas.

El segundo grupo desarrolló un entrenamiento de carrera sobre tapiz rodante movido a motor a una velocidad de 22 metros por minuto, correspondiendo este trabajo a una absorción máxima de oxígeno del 65 al 75% aproximadamente según Bedford et al., (1979); Devine-Patch y Brooks, (1980); siendo las sesiones y el periodo de entrenamiento idénticos a los del primer grupo.

El tercer grupo permaneció sedentario en sus jaulas durante todo el tiempo que duraron los programas de entrenamiento.

Al concluir los entrenamientos los animales de los tres grupos fueron anestesiados en campana de éter y tras la disección del recto femoral del cuádriceps, se tomaron cortes transversales de pocos milímetros de grosor de la parte media del músculo. Estas muestras se introdujeron en isopentano congelado en nitrógeno líquido (-196°). De cada pieza se consiguieron cortes seriados de 10 micras de espesor con un criostato modelo SLEE HR, sobre

los que se utilizaron técnicas histoquímicas de miosin ATPasa a pH 9,4 (Dubowitz y Brooke, 1973) y con preincubación ácida a pH 4,3 (Brooke y Kaiser, 1970) y técnicas que nos demostraran la actividad de un enzima oxidativo como la NADH-TR (Novikoff et al., 19861) y de otro glucolítico, la fosforilasa (método del dextrano de Meyer).

Los porcentajes de los tres tipos de fibras I,IIA y IIB se extrajeron de cortes con la reacción ATPasa a pH 4,3; contabilizando un total de 200 fibras en cada una de las tres regiones en que dividimos el músculo en sentido antero-posterior: región superficial, media y profunda. A los porcentajes de los tres tipos de fibras hallados en cada región muscular de cada uno de los músculos de los animales se les aplicó la T de Student en un ordenador Macintosh mediante el programa Stat View.

Resultados

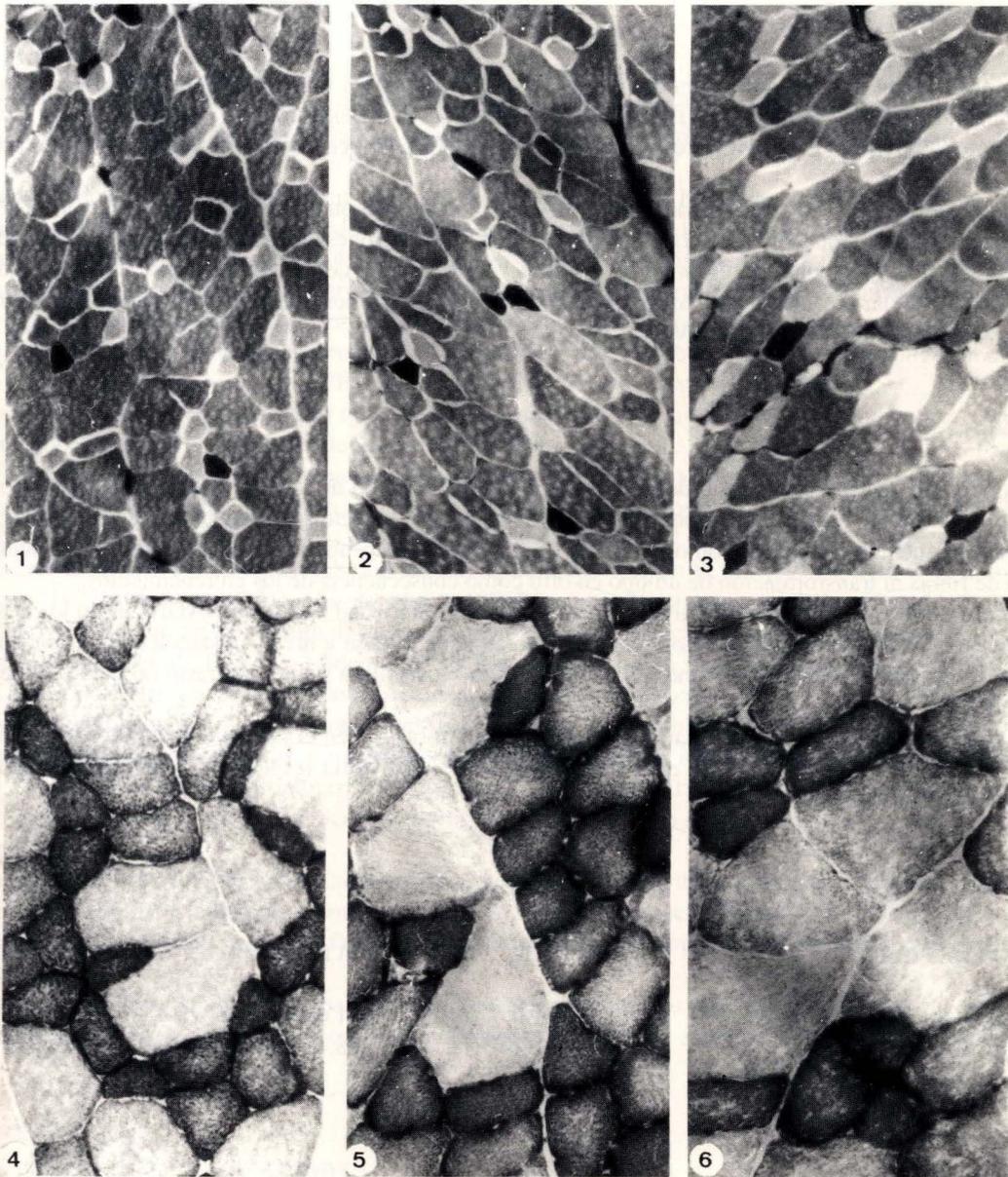
El patrón de distribución fibrilar de las tres regiones del músculo de los animales entrenados tanto en natación como carrera, no presentan ninguna diferencia significativa respecto al de los animales sedentarios, después de su procesamiento estadístico, como se refleja en la tabla 1. Esto nos indica que no ha habido aumento del número de fibras ni transformación de un tipo en otro como consecuencia de los entrenamientos.

Se puede observar de forma subjetiva un incremento de la actividad oxidativa NADH-TR en los tres tipos de fibras después de ambos entrenamientos, siendo especialmente intensa a nivel subsarcolémico en muchas de las fibras de los animales entrenados en natación. La actividad fosforilasa por el contrario no parece reflejar dicho incremento.

Un notable cambio morfológico han experimentado las fibras IIB en el músculo de ambos grupos de animales entrenados, ya que la mayoría de ellas poseen signos de hipertrofia respecto a las del grupo control como muestran sus áreas transversales.

TIPOS DE FIBRA	REGION SUPERFICIAL		
	CONTROL	NATACION	C. RESISTENCIA
Tipo I	-	-	-
Tipo IIA	12,5±0,94	11,6±0,62	11,6±0,60
Tipo IIB	87,4 ±0,89	88,4±0,63	88,4±0,61
TIPOS DE FIBRA	REGION MEDIA		
	CONTROL	NATACION	C. RESISTENCIA
Tipo I	2,6±0,31	3,0±0,32	3,1±0,46
Tipo IIA	31,1±1,05	31,9±0,64	29,7±1,12
Tipo IIB	66,2±0,95	65,0±0,62	67,4±1,11
TIPOS DE FIBRA	REGION PROFUNDA		
	CONTROL	NATACION	C. RESISTENCIA
Tipo I	9,0±0,55	10,0±0,65	8,3±0,79
Tipo IIA	51,2±1,38	53,4±1,33	53,6±1,27
Tipo IIB	39,8±0,99	36,5±0,82	38,0±0,70

TABLA 1. Porcentajes de los diferentes tipos de fibras en el músculo recto femoral de los animales sedentarios y entrenados en natación y carrera de resistencia. Los valores presentados son medias \pm 2 errores standar siendo n=10 ratas.



- FIGURA 1.** Sección transversa de la región media del recto femoral de rata sedentaria con ATPasa a ph 4,3. Observamos escasas fibras tipo I de reacción intensa y tamaño pequeño, fibras IIA de reacción clara y tamaño similar a las anteriores pero en número superior y fibras IIB de reacción intermedia con un area mayor que la de los dos tipos anteriores que constituyen la casi totalidad del patrón fibrilar
- FIGURAS 2 Y 3.** Ambas corresponden a secciones transversas de la región media del recto femoral; de rata entrenada en natación la primera y en carrera la segunda. Ambas presentan un patrón fibrilar similar al de la figura 1, reflejo del resultado obtenido en el tratamiento estadístico de los porcentajes de los tres tipos de fibras, expuesto en la tabla 1.
- FIGURA 4.** Región profunda del recto femoral de rata sedentaria en corte transverso que muestra la actividad oxidativa de la NADH-TR en las fibras. En esta región aparece en contraste con las regiones más superficiales del músculo un incremento del número de fibras tipo I y IIA con alta actividad oxidativa (dificultando su objetivación en un tipo u otro la similitud de intensidades entre ambas) frente al de fibras IIB, con una actividad también más baja.
- FIGURAS 5 Y 6.** Pertenecen a la región profunda del músculo estudiado de rata entrenada en natación y carrera respectivamente. En las dos se aprecia de forma cualitativa un incremento subjetivo de la actividad NADH-TR en los tres tipos de fibras respecto a las de la figura anterior y destaca especialmente la hipertrofia que han experimentado varias de las fibras IIB tras ambos entrenamientos.

Discusión

La demostración por Komi et al., (1977) de una distribución idéntica de los tipos de fibras en gemelos monocigóticos y dicigóticos por una parte, y de otra, el fracaso de numerosos estudios en revelar una interconversión fibrilar después de diferentes programas de entrenamiento, sostienen en opinión de Gollnick y Matoba (1984), que los porcentajes de los diferentes tipos de fibras en el músculo están determinados genéticamente.

Sin embargo los estudios de Jawet et al., (1977) y Muller, (1974) con ratas; Syroby et al., (1972) y Jansson et al., (1987) en humanos, demostraron una conversión de las fibras tipo II en tipo I después de entrenamiento de resistencia. Ya hemos comentado previamente como entrenamientos de carrera intensa a intervalos habían producido alteraciones del patrón fibrilar.

Además del modelo de estimulación nerviosa como factor que influye sobre el crecimiento muscular, en opinión de Goldberg (1980) también lo son las diferentes hormonas y factores nutricionales.

También las actividades habituales diarias tienen un papel importante en la expresión fenotípica durante la infancia, como se desprende de los resultados de Saltin et al., (1977) y Bell et al., (1980), donde estos últimos encontraron porcentajes mayores de fibras tipo I en el vasto lateral de niños y niñas de 5 y 6 años que los hallados por los primeros en jóvenes de 16 años. Howald (1982) cree, que puesto que los factores anteriores son semejantes en los gemelos monocigóticos, su modelo de distribución del tipo de fibra se debería al hecho de desenvolverse en las mismas condiciones ambientales, por lo que dicho modelo no estaría determinado solamente por los factores genéticos, idea también compartida por Larsson y Ansverd (1985). Simoneau et al., (1986) dedujeron después del entrenamiento de gemelos monocigóticos, que el papel de la herencia parecía estar ausente en los cambios de las proporciones del tipo de fibra que se dieron.

Nosotros no hemos hallado diferencias significativas en los porcentajes de los distintos tipos de fibras en el músculo de las ratas entrenadas en natación y carrera de resistencia respecto a los controles. A pesar de considerar el periodo de nuestros entrenamientos de una duración aceptable, si se tiene en cuenta el corto periodo de vida de la rata; coincidimos con Howald (1982), en que una posible explicación para estos resultados y a aquellos otros que no pudieron evidenciar algún tipo de cambio después del entrenamiento de resistencia, sería el periodo relativamente corto de los estudios junto a una intensidad de entrenamiento posiblemente más baja que la empleada por los atletas durante varios años de práctica. Para Salmons (1980) la intensidad y duración de los estímulos del entrenamiento sobre las fibras musculares en estos programas es más baja que la empleada en la estimulación eléctrica y por esta razón el umbral para las transformaciones moleculares se alcanza raramente, incluso después de varios años de entrenamiento.

Ciertas evidencias sugieren que las fibras intermedias o tipo IIC son un estado de transformación de las fibras tipo II en tipo I y viceversa (Pierobon-Bormioli et al., 1981; Schantz et al., 1982). Según esta sugerencia, la ausencia de una transformación de fibras en nuestros resultados, en contraste con otros; nos hace pensar como comentábamos más arriba que el periodo de entrenamiento ni siquiera fué suficiente para llegar a este estado intermedio, preámbulo de la transformación fibrilar. Sin embargo de acuerdo con Schantz et al., (1982) y Luginbuhl et al., (1984), también habría que tener en cuenta el grado de tensión que desarrollan las fibras y la intensidad del trabajo junto a la capacidad previa para realizarlo.

Las consideraciones anteriores podrían explicar también los resultados controvertidos hasta ahora sobre el incremento de los potenciales enzimáticos y el grado de hipertrofia que ocurren en las fibras tras programas de entrenamiento en resistencia.

Sin negar la importancia que sin duda tiene la herencia, admitimos que los factores ambientales ejercen una influencia no menos despreciable en las transformaciones que experimenta el músculo con la actividad física. No obstante para conocer los mecanismos que rigen dichas transformaciones hay que seguir investigando el grado de implicación que tienen diversos factores antes sugeridos, así como el papel de la herencia en la adaptación muscular a los diversos tipos de entrenamientos físicos.

BIBLIOGRAFIA

- BAGBY, G. J., SEMBROWICH, W. L., GOLLNICK, P. D., 1972 : Myosin ATPase and fiber composition from trained and untrained rat skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* **223**: 1415 - 1417.
- BEDFORD, T. G., TIPTON, C. M., WILSON, N. C., OPPLIGER, R. A., and GISOLFI, C. V., 1979 : Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **47**: 1278 - 1283.
- BELL, R. D., Mac DOUGALL, J. D., BILLETER, R., HOWAL, H., 1980 : Muscle fiber types and morphometric analysis of skeletal muscle in six-year-old children. *Med. Sci. Sports Exer.* **12**: 28 - 31.
- BROOKE, M. H., and KAISER, K. K., 1970 : "Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: The nature of their pH lability and sulfhydryl dependence." *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 670 - 672.
- BROWN, M. D., COTTER, M.A., HUDLICKA, D., VRBOVA, G., 1976 : The effects of different pattern of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pfluegers Arch.* **361**: 241 - 250.
- BURKE, R. E., CERNY, F., COSTILL, D., WILLIAM, F., 1977 : Characteristics of skeletal muscle in competitive cyclists. *Med. Sci. Sports* **9**: 109 - 112.
- BYLUND, A. C., BJURO, T., CEDERBLAD, G., HOLM, J., LUNDHOLM, K., SJOSTROM, M., AENGQUIST, K. A., and SCHERSTENT, T., 1977 : Physical training in man: skeletal muscle metabolism in relation to muscle morphology and running ability. *Eur. J. Appl. Physiol.* **36**: 151 - 169.
- COSTILL, D. L., DANIELS, J., EVANS, N., FINK, W., KRAHENBHUL, G., SALTIN, B., 1976 : Skeletal muscle enzymes and fibre composition in male and female athletes. *J. Appl. Physiol.* **40**: 149 - 154.
- DEVINE - PATCH, L., and BROOKS, G. A., 1980 : Effects of training on VO₂ max. and VO₂ during two running intensities in rats. *Pfluegers Arch.* **386**: 215 - 219.
- DUBOWITZ, V., and BROOKE, M. H., 1973 : Muscle biopsy: a modern approach. WB Sanders, London, 50 - 51.
- FRIDEN, J., SEGER, J., SJOESTROEM, M., EKBLUM, B., 1983 : Adaptive response in human skeletal muscle subjected to prolonged eccentric training. *Int. J. Sports Med.* **4** (3): 177 - 183.
- GOLDBERG, A. L., 1980 : The regulation of protein turnover by endocrine and nutritional factors, in Pette D. (Ed): *Plasticity of muscle*. Berlin- New York, Walter de Gruyter, p.p. 469-492..
- GOLLNICK, P. D., ARMSTRONG, R. B., SALTIN, B., SAUBERT IV, C. W., SEMBROWICH, W. L., SHEPHERD, R. E., 1973 : Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **34**: 107 - 111.
- GOLLNICK, P. D., ARMSTRONG, R. B., SAUBERT, C. W., IV, et al., 1972 : Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* **33**: 312 - 319.
- GOLLNICK, P. D., MATOBA, H., 1984 : The muscle fiber composition of skeletal muscle as a predictor of athletic success. An overview. *Am. J. Sports Med.* **12/3**: 212 - 217
- HAVU, M., RUSKO, H., KOMI, P. V., VOS, J., VIHKO, V., 1973 : Muscle fibre composition, work performance capacity and training in Finnish skiers. *Int. Res. Communications System.* **1**, 10.
- HODGSON, D. R., ROSE, R. J., Di MAURO, J., ALLEN, J. R., 1985 : Effects of a submaximal treadmill training programme on histochemical properties enzyme activities and glycogen., utilisation of skeletal muscle in the horse. *Equine Vet. J.* **17** (4): 300 - 5.
- HOWALD, D., 1982 : Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle. *Int. J. Sports. Med.* **3**, 1 - 12.
- JANSSON, E., SJODIN, B., TESCH, P., 1978 : Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. A sign of fibre type transformation? *Acta Physiol. Scand.* **104**: 235 - 237.
- JAWED, M. M., HERBISON, G. J., DITUNNO, J. F., 1977 : Myosin ATPase activity after strengthening exercise. *J. Anat.* **124**: 371 - 381.
- JOLESZ, F., SRETER, F. A., 1981 : Development, innervation, and activity-pattern induced changes in skeletal muscle. *Am. Rev. Physiol.* **43**: 531 - 552.
- KOMI, P. V., VIITASALO, J. H. T., HAVU, M., THORSTENSSON, A., SJODIN, B., KARLSSON, J., 1977 : Skeletal muscle fibres and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol. Scand.* **100**: 385 - 392.
- LARSSON, L., ANSVERD, T., 1985 : Effects of long-term physical training and detraining on enzyme histochemical and functional skeletal muscle characteristic in man. *Muscle nerve*, **8** (8): 714 - 722.
- LAVOIE, J. M., TAYLOR, A. W., and MONTPETIT, R.R., 1980 : Skeletal muscle fibre size adaptation to an eight-week swimming programme. *Eur. J. App. Physiol.* **44**: 161 - 165.
- LUGINBUHL, A. J., DUDLEY, G. A., and STARON, R. S., 1984 : Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry*, **81**: 55 - 58.
- MERO, A., LUHTANEN, P., VIITASALO, J. T., KOMI, P.V., 1981 : Relationships between the maximal running velocity, muscle fiber characteristics, force production and force relaxation of sprinters. *Scand. J. Sports Sci.* **3**: 16 - 22.
- MORGAN, T. E., COBB, L. A., SHORT, F. A., ROSS, R., and GUNN, D. R., 1971 : Effects of long-term exercise on human muscle mitochondria. In: *Muscle Metabolism During Exercise*, edited by B. Pernow and B. Saltin, New York: Plenum, **87 - 95**.
- MULLER, W., 1974 : Temporal progress of muscle adaptation to endurance training in hind limb muscles of young rats. A histochemical and morphometrical study. *Cell. Tissue. Res.* **156**: 61 - 88.

- NOVIKOFF, A. B., SHIN, W., and DRUCKER, J., 1961 : Mitochondrial localization of oxidation enzymes: staining results with two tetrazolium salts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 47 - 61.
- PARSSONS, D., MUSCH, T. I., MOORE, R. L., et al., 1985 : Dynamic exercise training in foxhounds. II Analysis of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **59/1**: 190 - 197.
- PETTE, D., SMITH, M. E., STAUDTE, H. W., VRBOVA, G., 1973 : Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscle. *Pfluegers Arch.* **338**: 257 - 272.
- PIEROBON BORMIOLI, S., SARTORE, S., LIBERA, L., VITADELLO, M., and SCHIAFFINO, S., 1981 : "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle." *J. Histochem.* **29**: 1179 - 1188.
- SALMONS, S., 1980: The response of skeletal muscle to different patterns of use- some new developments and concepts, in Pette D. (ed): *Plasticity of muscle*, Berlin- New York, Walter de Gruyter, pp. 387-399.
- SALMONS, S., HENRICKSSON, J., 1981 : The adaptative response of skeletal muscle to increased use. *Muscle Nerve*, **4**, 94 - 105
- SALTIN, B., HENRIKSSON, J., NYGAARD, E., ANDERSEN, P., JANSSON, E., 1977 : Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **301**: 3 - 29.
- SALTIN, B., NAZAR, K., COSTILL, D. L., STEIN, E., JANSSON, E., ESSEN, B., GOLLNICK, P. D., 1976 : The nature of the training response: Pheripheral and central adaptation to one-legged exercise. *Acta Physiol. Scand.* **96**: 289 - 305.
- SCHANTZ, P., BILLETER, R., HENRICKSSON, J., JANSSON, E., 1982 : Training-induced increase in myofibrillar ATPase intermediate fibers in
- SIMONEAU, J., A., LORTIE, G., BOULAY M. R., MARCOTTE, M., TRIBAULT, M. C., BOUCHARD, D. C., 1985 : Human skeletal muscle fiber type alteration with high-intensity intermittent training. *Eur. J. Appl. Physiol. (Berlin)*. Vol. **54/3**: 250 - 253.
- SIMONEAU, J., LORTIE, G., BOULAY, M. R., MARCOTTE, M., THIBAULT, M. C., BOUCHARD, C., 1986 : Inheritance of human skeletal muscle and anaerobic capacity adaptation to high-intensity intermittent training. *Int. J. Sports Med.* **7 (3)**: 167 - 71.
- SRETER, F. A., ROMANUL, F. C. A., SALMONS, S., GERGELY, J., 1974 : The effect of changed activity pattern on some biochemical characteristics of muscle. IN Milhorat A. T. (ed.): *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy*. Amsterdam, Excerpta Medica, (Int. Congr. Ser. 333), 338 - 343.
- SUOMINEN, H., HEIKKINEN, E., LIESEN, H., MICHEL, D. and HOLLMANN, W., 1977 : Effects of 8 weeks' endurance training on skeletal muscle metabolism in 56-70-year-old sedentary men. *Eur. J. Appl. Physiol.* **37**: 173 - 180.
- SYROVY, I., GUTMANN, E., MELICHNA, J., 1972 : Effect of exercise on skeletal muscle myosin ATPase activity. *Physiol. Bohemoslov.* **21**: 633 - 638.
- THORSTENSSON, A., LARSSON, L., TESCH, P., KARLSSON, J., 1977 : Muscle strength and fiber composition in athletes and sedentary men. *Med. Sci. Sports*, **9**: 26 - 30.
- TORRES, A., SARRAT, R., CRESPO, A. y NIETO, J.L., 1990: Entrenamiento físico y patrón histológico muscular. *Histol. Med. (Aceptado, pendiente de publicación)*.

Correspondencia: A. Torres.
 Dto. Ciencias Morfológicas.
 Universidad de Zaragoza
 D. Miral s/n. Zaragoza. España

RASTRO DEGENERATIVO FIBRILAR TRAS LA DIATERMOGOAGULACIÓN DE LA ENCRUCIJADA ESTRIODIAGONAL

CHANGES DEGENERATIVE FOLOWING LESIONS OF THE ENTOPEDUNCULARIS NUCLEUS

A. VICTORIA FUSTER, S. TORREGROSA RICO, E. SMITH FERRES

Departamento de Ciencias Morfológicas
de la Facultad de Medicina Valencia.

RESUMEN

La diatermocoagulación de la Encrucijada estriodiagonal izquierda nos permite observar mediante las técnicas de Fink y Heimer, fibras degeneradas en Insula, núcleo Prepiriforme, cinta diagonal de Broca, septum y asa lenticular, lámina reticular talámica, núcleo amigdalino, cortex cerebral, fascículo talámico y lámina affixa del tálamo.

PALABRAS CLAVES: Encrucijada estrio diagonal. Degeneración

SUMMARY

Changes degenerative observation in the limen insulae, n. prepiriformis, allocortex diagonal, septum, ansa lenticularis, s. reticularis talamus, n., amigdalinus, neocortex, fasiculus thalamicus and l. affixa talamus behind the entopeduncularis nucleus lesion from diathermic-coagulation,

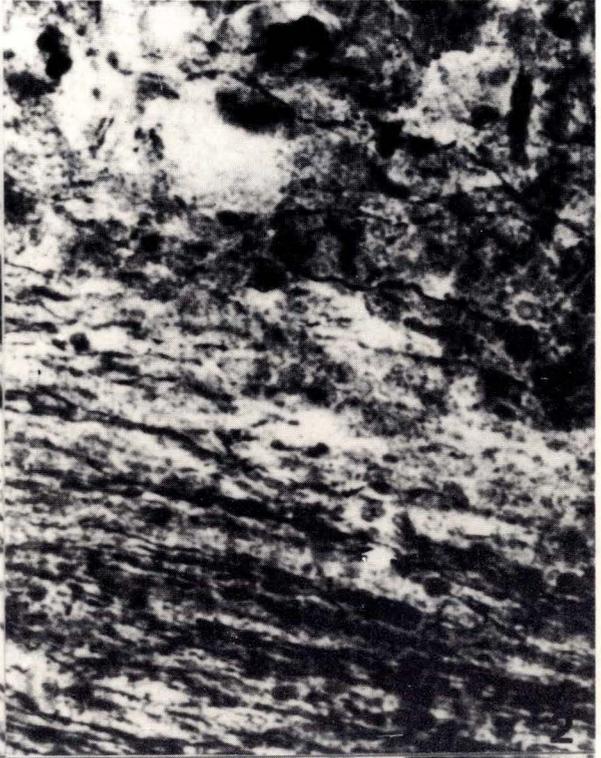
KEY WORDS: Degeneration. Entopeduncularis nucleus.

Introducción

Trabajo experimental consistente en la implantación a cronicidad de un electrodo en la Encrucijada Estriodiagonal izquierda, con el fin de seguir el rastro degenerativo fibrilar producido tras la diatermocoagulación de esta Encrucijada.

Material y Métodos

La experiencia la realizamos en 15 gastos domésticos (de 2,5 a 4,2 Kgr.). Tras anestesiarlos con Nembutal i.p. (30-40 mgr/K) y situarlos en un marco estereotáctico, procedemos a incidir piel, musculatura temporal, fas-



cia y periostio, y una vez en el plano óseo marcamos el punto de implantación del electrodo, concretamente a una "unidad relativa" desplazada al lado izquierdo de la octava división retronasiana, a 23 mm de profundidad. El electrodo implantado es de plata vírgen clorurada, mide 23 mm de longitud y 0,3 mm de diámetro y está aislado totalmente, salvo un milímetro en su extremo profundo o interior.

Al cabo de 30 días de la intervención quirúrgica, procedemos a la diatermocoagulación de esta zona, previa anestesia del animal. Utilizamos un aparato de electrocauterio, tipo Poluxgin, alimentado por una corriente de 150 V y 3 mA de intensidad. La esférula se consigue al conectar el aparato graduado al n.º 5 durante cuatro segundos.

A los once días de la diatermocoagulación, sacrificamos al animal, perfundiéndole un litro de suero fisiológico y posteriormente Formol al 10%. Tras disecar el cráneo, introduciremos la masa encefálica en formol al 10% durante cuatro a seis semanas. Posteriormente, lo teñiremos con la técnica de Fink y Heimer.

Resultados

Hemos observado fibras degeneradas en las ínsulas de Calleja, núcleo prepiriforme, cinta diagonal de Broca, séptum (fig. 1), lámina affixa del tálamo (fig. 2), asa lenticular), fascículo talámico (fig. 3), lámina reticular talámica (fig. 4), núcleo amigdalino y coterza cerebral del hemisferio izquierd

BIBLIOGRAFIA

- ADINOLFI, A.M. (1969): "Degenerative changes in the Entopeduncular Nucleus following lesions of the Caudate Nucleus. An electron microscopic study". *Experim. Neurol.* **25**: 246-254.
- CHUMAN, C. and NEAFSEY, E. (1983): "Propagation of local cortical epileptiform discharge to the Entopeduncular Nucleus: Effect of Caudate lesions". *Experim. Neurol.*, **79**: 152-159.
- DRUGA, R. (1984): "Reciprocal connections between the Claustrum and the Gyrus Sigmoideus posterior in the cat. An experimental study using the anterograde degeneration methods and the HRP retrograde axonal transport". *Anat. Anz.*, 109-18.
- ESCOLAR, J.; SMITH-AGREDA, V.; AMAT, P.; SMITH-AGREDA, J.M.; SARRAT, R.; RODRÍGUEZ, S. (1973): *Anatomía humana (funcional y aplicada)*. Vol. III. 3 ed. Barcelona. Ed. Espaxs. pp. 213-217.
- FINK, R.P. y HEIMER. (1976): "Two methods for selective impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system". *Brain Res.*, **4**: 369.
- GLESS, P. (1946): "Terminal degeneration with in the central nervous system as studied by a new silver method". *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **5**: 54.
- POWELL, E.W. (1963): "Septal afferents revealed by axonal degeneration in the rat". *Exp. Neurol.* **8**: 406-422.
- STEWART, O. (1976): "Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat". *J. Comp. Neurol.* **167**: 285-314.
- SWANSON, L.W. and COWAN, N.N. (1989): "The connections of the septal region in the rat". *J. Comp. Neurol.* **186**: 621-656.

Correspondencia: Dra. D.^ª Adelina Victoria Fuster
C/. San Agustín, 2.^º-A
46111 - Rocafort. Valencia . España

**ANATOMIA DE LOS CANALES DENTARIOS HUMANOS. UN ESTUDIO MORFOMETRICO.
ANATOMY OF THE HUMAN TEETH ROOT CANALS. A MORPHOMETRIC STUDY.**

A. VERA GIL, M.A. MARTINEZ, C; ARRANZ, P ; LORENTE.; J.M PAULES; M LAHOZ, .

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

RESUMEN

Hemos encontrado diferencias significativas en cuanto al número de conductos radiculares en determinados tipos de piezas dentarias, respecto a estudios realizados anteriormente mediante otros métodos. Además, la relación entre la edad de individuo y el tamaño de la cavidad pulpar de los dientes nos permite comprobar la disminución del tamaño de dicha cavidad a medida que la edad del individuo aumenta.

PALABRAS CLAVE: Conducto dentario humano. Morfometría.

SUMMARY

We have encountered significant differences in the number of root canals in different types of teeth, where as when other methods were used different results were found. Furthermore as the age of the individual increases the size of the root canal of the tooth decreases.

KEY WORDS: Root canals. Morphometric.

Introducción

El conocimiento de la anatomía del diente y de sus anexos resulta imprescindible para realizar cualquier tipo de maniobra relacionada con la odontología. Ya PREISWERK (1901) observó que la topografía de las cavidades pulpares no era tan sencilla como se pensaba, sino que entre los distintos conductos aparecían abundantes anastomosis, así como conductos secundarios. A partir de entonces se han realizado distintas clasificaciones atendiendo a la longitud del conducto, número de raíces y número de conductos por grupos de dientes (PUCCI y REIG, 1945), longitudes y anchuras (APRILE y FIGUN, 1960), anatomía interna del primer molar inferior (SKIDMORE y BJORNDEL, 1971), primero y segundo premolares (ZILLICH y DAWSON, 1973), número de conductos (HESSION, 1977). MAYO y cols (1986) presentan un método para valorar la morfología de los conductos radiculares utilizando el ordenador.

Material y Métodos

Para realizar el presente trabajo se han utilizado 111 piezas dentarias humanas, de la dentición permanente. Inmediatamente después de la extracción, cada diente es lavado con agua e introducido en un recipiente que con-

tiene agua oxigenada a una concentración del 3%, con el objeto de eliminar todos los restos de material orgánico tanto del interior como del exterior del diente, permaneciendo en estas condiciones durante un periodo mínimo de tres semanas.

A continuación se procede a someter a cada pieza a un proceso que nos permite visualizar su interior, es decir, la cámara pulpar y los conductos radiculares.

El siguiente paso es la inyección, a través del orificio apical, del medio de contraste elegido, que en este caso se trata de tinta china negra. Para poder visualizar perfectamente el interior del diente, es necesario descalcificarlo y hacerlo transparente, para lo cual en primer lugar se procede a sumergirlo en una solución del ácido nítrico a una concentración del 10%, que actúa como agente descalcificante.

Así permanecen los dientes durante 48 horas, siendo necesario renovar la solución de ácido nítrico cada 8 horas.

Pasado este tiempo, se comprueba mediante palpación que los dientes han perdido su consistencia dura tomando una consistencia blanda similar a la de un plástico, conservando su forma y proporciones originales, si bien la longitud disminuye en uno o dos milímetros debido a la descalcificación de las cúspides o los bordes incisales.

A continuación, se sumergen en alcohol de 96° durante 8 horas y después en alcohol absoluto durante 3 horas, con lo que quedan desecados y listos para ser introducidos en un recipiente que contiene salicilato de metilo, que es el medio en el que los dientes van a volverse transparentes al cabo de varias horas, siendo entonces posible observar el contraste que se había introducido.

Desde este momento, y para el resto de las observaciones a efectuar, es necesario conservar las piezas dentarias sumergidas en el salicilato de metilo, pues en cuanto se extraen de dicho líquido pierden rápidamente la transparencia, aunque vuelven a recuperarla inmediatamente tan pronto como son reintegradas a dicho medio.

Para los siguientes pasos es fundamental haber desecado muy bien las piezas introduciéndolas en alcohol antes de sumergirlas en salicilato de metilo, para eliminar restos de agua, pues el salicilato de metilo es una sustancia totalmente inmiscible con el agua.

Una vez que tenemos las piezas ya agrupadas, se procede a observarlas, siempre sumergidas en salicilato de metilo, a través de un sistema combinado de microscopio y cámara de vídeo que nos permite obtener una imagen ampliada.

En el vídeo digitalizador Sony HBI-G 900 P, ligado a un microcomputador Sony MSX-900 P, equipado con un software propio del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Zaragoza, digitaliza y analiza las imágenes adjudicando un color sólido al contraste introducido en los dientes y que había rellenado la cámara pulpar y los conductos. Calibrando con arreglo a los aumentos de la imagen, el equipo es capaz de medir superficies en milímetros cuadrados.

Resultados

En los incisivos centrales y laterales superiores encontramos siempre un solo conducto, sin que se observe la presencia de conductos laterales. Podemos apreciar las variaciones que sufre la cámara pulpar con el tiempo; en una persona joven sus incisivos centrales presentan una cámara amplia con dos astas pulpares bien marcadas, mientras que en personas avanzadas la cámara pulpar puede quedar intensamente retraída.

En los caninos superiores, aunque poseen también un único conducto es posible encontrar conductos secundarios. Llama la atención la elevada media de edad de extracción, la más alta de todos los dientes del maxilar superior, lo que da idea de la importancia de esta pieza, tanto funcional como estéticamente. Por otra parte, la morfología de su corona, con ausencia de fosas y surcos, la hace menos susceptible a la caries, y el hecho de poseer una raíz muy larga y potente hace que pueda resistir durante más tiempo una eventual enfermedad periodontal. Presenta además la máxima superficie de cavidad pulpar de entre todos los dientes del grupo anterior, puesto que es el más largo de todos ellos. También llama la atención el predominio del sexo femenino (66'6%) sobre el masculino en cuanto a procedencia de las piezas.

Los primeros premolares superiores presentan dos raíces que pueden ser convergentes, paralelas o completamente divergentes. Presentan numerosos accidentes de disposición y conductos laterales, apareciendo interconductos en tres de las piezas estudiadas. Se aprecian claramente los cambios evolutivos de la cámara pulpar y los conductos en relación a la edad, que nos confirma de nuevo la correlación inversa entre la edad y la superficie de la cavidad pulpar.

En los segundos premolares superiores encontramos casos con una sola raíz que podía presentar uno o dos conductos o dos raíces que podían estar separadas o fusionadas. La media de edad de extracción de este diente es inferior a la del primer premolar, a pesar de que en ningún caso procede de extracción por ortodoncia. La media de superficie en este caso es inferior a la del primer premolar, puesto que todos los casos fueron extraídos debido a caries, con la consiguiente reducción del tamaño de la cavidad pulpar.

En los primeros molares superiores la presencia de tres raíces es constante, si bien la dirección de las mismas es variable. Pudieron presentar tres o cuatro conductos principales con constante presencia de conductos secundarios. Todos estos primeros molares superiores fueron extraídos debido a la caries, igual que los primeros molares inferiores, muchos de ellos a pacientes muy jóvenes, lo que justifica el hecho de que sea el diente que presenta mayor media de superficie de la cavidad pulpar, y también que la media de extracción sea la más baja de todos los dientes del maxilar superior.

Los segundos molares superiores poseen al menos tres conductos pese a que en la mitad de los casos existe una fusión de dos raíces. Es casi constata la presencia de ramificaciones apicales. En cuanto a la superficie de la cavidad pulpar la media es inferior a la del primer molar. Por otra parte, la media de edad de extracción es superior en seis años a la del primer molar. Otro detalle que llama la atención es el hecho de que el 90% de los dientes de este grupo fueron extraídos a mujeres.

Los incisivos centrales inferiores presentan todos ellos un solo conducto, si bien puede encontrarse en algunos casos una tendencia a la bifurcación y una nueva fusión de los conductos resultantes. Únicamente el 1'8% de los tratamientos de endodoncia realizados, lo fueron en incisivos centrales inferiores. Sin embargo, junto con el incisivo lateral inferior, es el diente más frecuentemente afectado por la enfermedad periodontal.

Los incisivos laterales inferiores presentan características similares a las del central. Junto a él, es el diente de menor superficie, y junto con el canino inferior, es el diente que presenta la mayor media de edad de extracción. La incidencia de caries es baja, así como la frecuencia de tratamientos de endodoncia realizados en esta pieza (1'3%).

Los caninos inferiores presentan un sólo conducto, no encontrándose bifurcaciones ni conductos laterales. Todos los dientes del grupo anteroinferior (incisivos y caninos) presentan una media de edad de extracción superior notablemente a la de las piezas correspondientes del maxilar superior.

Los primeros premolares inferiores poseen una sola raíz, recta y cónica, que puede presentar dos conductos, comunicados por una compleja red de interconductos, o bien bifurcados y unidos de nuevo. Varias piezas de este grupo proceden de extracción por motivos de ortodoncia a pacientes jóvenes, de ahí, la amplitud del conducto y el tamaño de la cavidad pulpar.

Los segundos premolares inferiores presentan un único conducto principal aunque es frecuente la aparición de conductos laterales a nivel apical. En este grupo, ninguna pieza procedía de extracción por ortodoncia, y varias estaban afectadas por enfermedad periodontal, lo que se traduce en importantes diferencias en cuanto a longitud, superficie y media de edad respecto al primer premolar inferior.

Los primeros molares inferiores poseen dos raíces, mesial y distal. En cuanto al número de conductos, pueden aparecer cuatro (dos sobre la raíz mesial y dos sobre la distal), o tres (dos mesiales y uno distal). Destaca la baja media de edad de extracción, que implica que la ausencia de esta pieza sea muy frecuente en las personas de nuestra comunidad desde edades muy tempranas. Nueve de cada diez casos recogidos corresponden a personas del sexo femenino. Se comprueba una vez más, la relación inversa entre la edad y el tamaño de la cavidad pulpar.

Los segundos molares inferiores pueden presentar fusionadas parcial o totalmente ambas raíces. Pueden presentar asimismo tres o cuatro conductos. Las dimensiones de los conductos son similares a las del primer molar, en cambio la superficie media es mayor que la de aquel, pese a que la media de edad es también superior.

En la distribución por edades de los dientes utilizados en este estudio nos va a permitir obtener una serie de informaciones acerca de las costumbres odontológicas de la población de nuestro medio. En primer lugar, se observan dos picos en el diagrama: un primero que corresponde entre los 15 y 25 años, en el que ocurren dos cir-

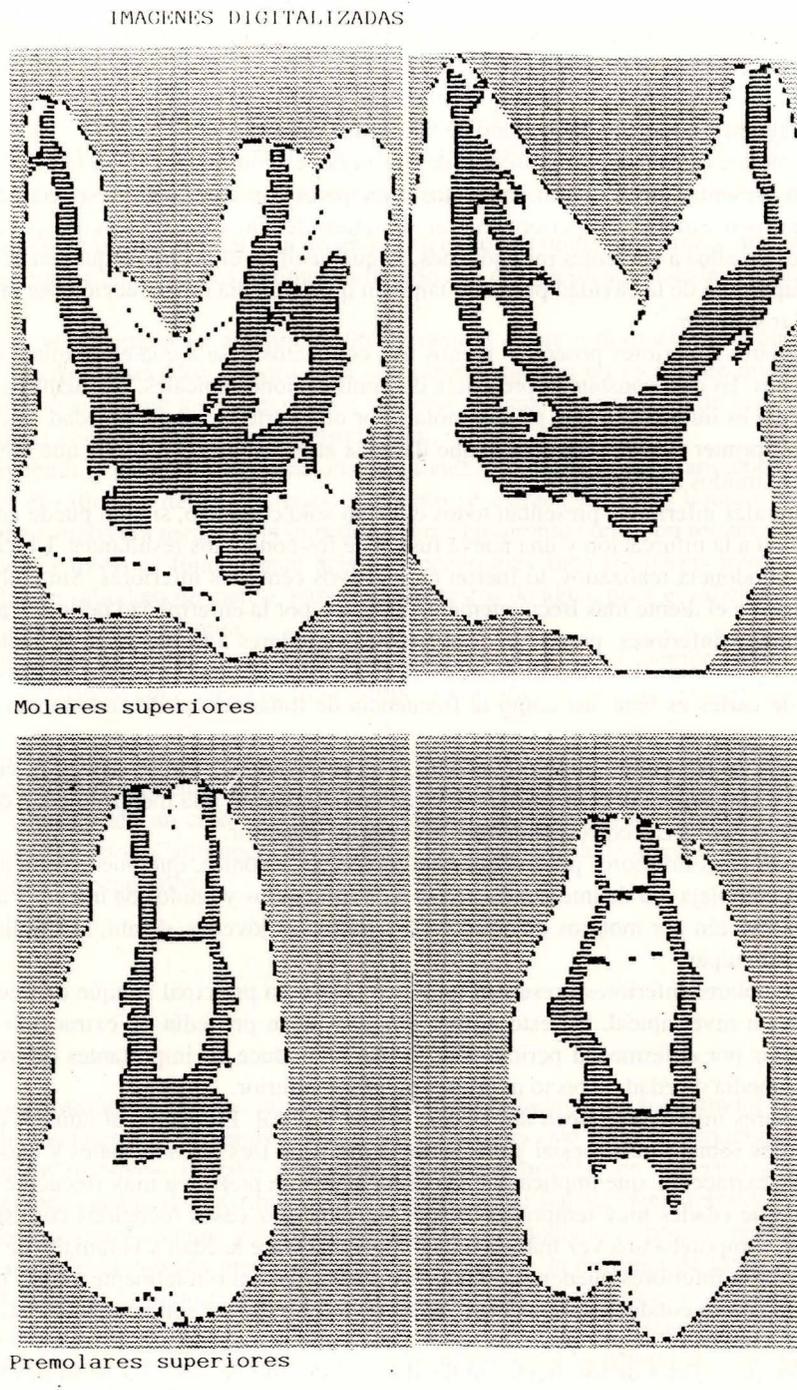


FIGURA 4. Imágenes Digitalizadas. Molares superiores. Premolares superiores.

cunstancias primordiales en cuanto a la pérdida de dientes: la más importante, la pérdida de los primeros molares de la dentición permanente debido a la caries, puesto que estos primeros molares, tanto superiores como inferiores, son afectados ya desde su erupción, a los 6 años de edad, en niños con abundante ingesta de productos cariogénicos y escaso hábito de higiene odontológica. Además, en este grupo de edad se incluyen las extracciones por motivos de ortodoncia.

En las siguientes etapas de la vida se observa una estabilidad en cuanto a la pérdida dentaria, hasta llegar al segundo pico que aparece entre los 50 y 60 años, y corresponde al deterioro progresivo que sufren los dientes a lo largo de la vida, y que lleva a su pérdida en dichas edades, bien por caries o bien por enfermedad periodontal.

En cuanto a la distribución por sexos, en el caso masculino no aparecen los dos picos tan destacados como en el caso femenino, aunque sí aparece un pico entre los 15 y 20 años, y otros dos picos a los 50 y 60 años. Sin embargo, entre los 20 y 50 años, a diferencia del sexo femenino aparece una escasa incidencia de la pérdida dental. En el caso femenino esta pérdida dentaria entre los 25 y 50 años se ve aumentada por ser la edad de fertilidad, y ser tanto embarazo como lactancia épocas de riesgo para la salud dental y gingival.

Resumen de valores medio por grupos de dientes

Dientes superiores

	Edad (años)	Area (mm ²)	Longitud conducto (mm.)	Longitud total (mm.)
Incisivo central	42,2	9,425	12,2	16,6
Incisivo lateral	48,4	10,486	13,9	18,5
Canino	56,9	16,417	16,1	20,4
Primer premolar	40,1	15,848	12,5	17,1
Segundo premolar	31,7	14,8	12,6	16,8
Primer molar	33,7	29,003	13,8	17,7
Segundo molar	36,7	24,577	14,1	17,7

Dientes inferiores

	Edad (años)	Area (mm. ²)	Longitud conducto (mm.)	Longitud total (mm.)
Incisivo central	60	8,081	13,3	15,8
Incisivo lateral	60,7	8,43	11,7	16,3
Canino	60,5	12,599	15,3	20,5
Primer premolar	28,7	16,433	13,6	17,8
Segundo premolar	52,5	11,548	11,5	15
Primer molar	23,8	18,975	13,8	17,3
Segundo molar	27,7	23,92	13,7	16,8

Discusión

En cuanto al método de trabajo, hemos elegido el método citado para descalcificar los dientes y poder visualizar el contraste tras hacer una serie de pruebas con otros medios de contraste.

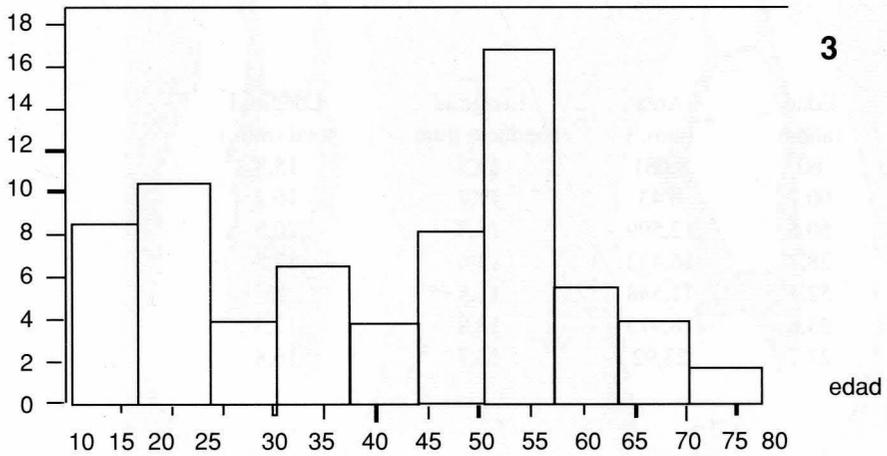
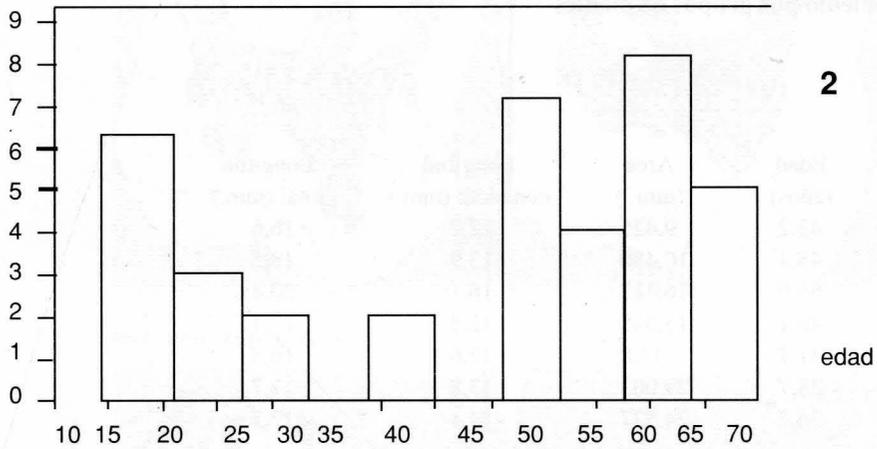
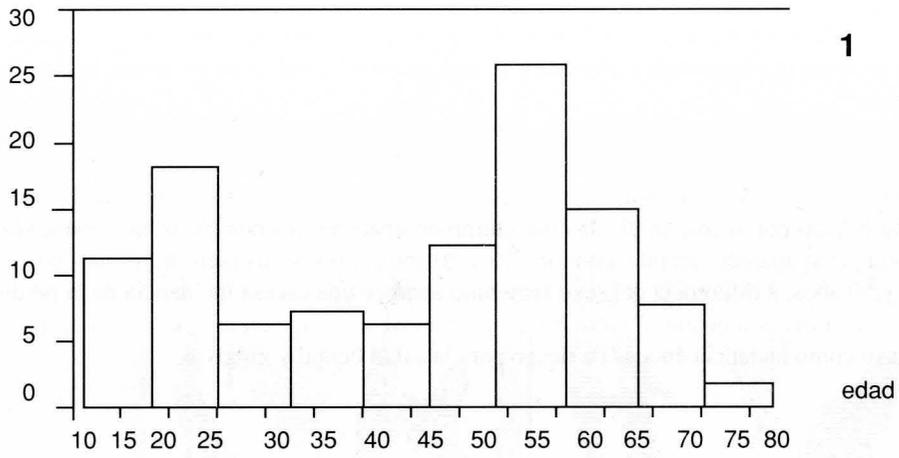


FIGURA 1. Distribución de los dientes empleados, por grupos de edades.

FIGURA 2. Distribución por edades, correspondiente al sexo masculino.

FIGURA 3. Distribución por edades, correspondiente al sexo femenino.

Después de la extracción, los dientes habían sido conservados en agua oxigenada durante varias semanas, en todo caso más de las tres semanas que cita Skidmore (1971) (a partir de los trabajos de Hibbard y Ireland (1957)) como período necesario para eliminar todos los restos orgánicos, sin que haya descalcificación de la dentina.

A continuación, se procedió a la inyección del contraste (tinta china negra) a través del ápice. Skidmore y Bjorndal (1971) inyectan resina autopolimerizable a través de la cámara pulpar. Vertucci (1978) prefiere como colorante la hematoxilina. Nosotros hemos encontrado mejores resultados con el citado método, por la fluidez del contraste que permite el relleno de los conductos secundarios y ofrece una buena imagen cuando se lleva al microscopio y después a la pantalla de video.

En cuanto a la descalcificación, comprobamos que la concentración de ácido nítrico al 10% durante 48 horas, renovándola cada 8 horas, era la forma más adecuada para dejar las piezas en buenas condiciones. Skidmore (1971) descalcifica los dientes en una solución de ácido nítrico al 35% durante 10 días. Vertucci (1974) sigue el método de Seelig (1973) y realiza la descalcificación en una solución de ácido clorhídrico al 5%.

Respecto al siguiente paso, coincidimos con Vertucci en deshidratar los dientes introduciéndolos en soluciones de alcohol etílico de 96° y 100° durante tres horas cada vez, puesto que el último agente, en el que los dientes se hacen transparentes, el salicilato de metilo, es inmiscible con el agua, y es necesario eliminar ésta totalmente para poder obtener buenas imágenes.

Respecto a las medidas de la longitud de cada diente, coinciden en general con las realizadas por Pucci y Reig (1945) y las de Aprile y Figul (1960), si bien hay que tener en cuenta la descalcificación de las cúspides.

En cuanto a la distribución de raíces y conductos en cada tipo de diente, se encuentran algunas diferencias y analogías en cuanto a porcentajes, con autores como Pucci y Reig (1945), Pineda y Kutler (1972), Green (1972), Hession (1977), Kerekes y Tronstad (1977), Zillich y Dawson (1973), etc.

BIBLIOGRAFIA

- APRILE, H. y FIGUN, M.D. (1975): Anatomía Odontológica. Ed. Ateneo, Buenos Aires.
- GREEN, E.N. (Nov. 1958): Microscopic investigation of root canal diameters. *J. of Am. Dent. Assoc.* **57**: 636-644.
- HESSION, R.W. (1977): Endodontic morphology. I. An alternative method of study. *Oral Surg.* **44** (3): 456-462.
- HESSION, R.W. (1977): Endodontic morphology. II. A radiographic analysis. *Oral Surg.* **44** (4): 610-620.
- HESSION, R.W. (1977): Endodontic morphology. III. Canal preparation. *Oral Surg.* **44** (5): 775-785.
- KEREKES, K; TRONSTAD, L. (1977): Morphometric observations on root canals of human anterior teeth. *J. of Endod.* **3**: (1): 24-29.
- MAYO, C.V.; MONTGOMERY, S.; DEL RIO, C. (1986): A computerized method for evaluating root canal morphology. *J. of Endod.* **12** (1): 2-7.
- PINEDA, F.; KUTTLER, Y. (1972): Mesiodistal and buccolingual roentgenographic investigation of 7.275 root canals. *Oral Surg.* **33**: 101-110.
- PUCCI, F.M.; REIG, R. (1945): Conductos radiculares. Montevideo.
- SEELIG, A.; GILLIS, R. (1973): Preparation of cleared specimens for pulp cavity studies. *J. of Am. Dent. Assoc.* **52**: (1154).
- SKIDMORE, A.E.; BJORNDAL, A.M. (1971): Root canal morphology of the human mandibular first molar. *Oral Surg.* **32**: (5): 778-784.
- VERTUCCI, R.F.; SEELIG, A.; GILLIS, R. (1974): Root canal morphology of the human maxillary second premolar. *Oral Surg.* **38** (3): 456-464.
- VERTUCCI, F. (1978): Root canal morphology of mandibular premolars. *J. of Am. Dent. Assoc.* **97** (1): 47-50.
- ZILlich, R.; DAWSON, J. (1973): Root canal morphology of mandibular first and second premolars. *Oral Surg.*, **36** (5): 738-744.

Correspondencia: Dr. D. Arturo Vera Gil.
Departamento de Ciencias Morfológicas.
Facultad de Medicina.
C/Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza. España



Index

ALMENAR GARCÍA V.; MARTÍNEZ-ALMAGRO A.; PALOMINO CORTÉS M.A.: Renal arteries duplication	3
CAMÓN J.; SABATÉ D.; FRANCH J.; LÓPEZ-BEJAR M.A.; PASTOR J.; RUTLLANT J.; ORDEIG J.; DEGOLLADA E.; VERDÚ J.: Associated multiple congenital malformations in domestic animals. Contribution of four cases	9
CARBAJO S.; CARBAJO-PÉREZ E.; RODRÍGUEZ J.; CASTRO S.; CARVAJAL J.C.: Pas-positive and follicle-stellate cells, a common type of cells in the intermediate lobe of the pituitary gland	21
CARBAJO PÉREZ E.; WATANABE Y.G.: Cells proliferation in the anterior pituitary of male mice at different periods of the day as revealed by bromodeoxyuridine	29
CROVETTO M.; TORRES A.; MUNICIO A.; MUNICIO M.; SARRAT R.: Structural and ultrastructural study of human vertebral artery	35
GÓMEZ-URQUIJO S.M.; BUENO-LÓPEZ J.L.; REBLET C.; LÓPEZ MEDINA A.; MASEDA ARMESTO M.J.: Types of pyramidal neurons in layers II and III of the rabbit cerebral cortex	41
GUILLÉN M.T.; REGODON S.; FRANCO A.J.; ROBINA A.: Contribution of study of the process of postnatal ossification of appendicular skeleton of the sheep. I part: thoracic limb	53
HERNÁNDEZ E.R.; REVILLA M.; RICO H.: Bone mineral content in premenopausal women and its correlation with anthropometrical variables	61
NIETO J.L.; GIMENO A.; CAMPO L.: Morphology study of pelvis during embryogenic and foetal development	67
PASTOR F.E.; PELÁEZ B.; BLÁZQUEZ J.L.; TORANZO D.; SÁNCHEZ A.; ÁLVAREZ-MORUJO A.J.; AMAT P.: Effects of monosodium glutamate on the neurons of the arcuate nucleus of the rat hypothalamus: a morphometric-ultrastructural study	75
PASTOR F.E.; BLÁZQUEZ J.L.; PELÁEZ B.; TORANZO D.; AMAT G.; SÁNCHEZ A.; ÁLBAREZ-MORUJO A.J., AMAT P.: Terminal Herring bodies in the lumen of the third ventricle	87
PELÁEZ B.; PASTOR F.E.; BLÁZQUEZ J.L.; TORANZO D.; SÁNCHEZ A.; ÁLVAREZ-MORUJO A.J.; AMAT P.: Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on the rat testis	93
PELÁEZ B.; PASTOR F.E.; BLÁZQUEZ J.L.; TORANZO D.; A. SÁNCHEZ, ÁLVAREZ-MORUJO A.J.; AMAT G.; MUÑOZ BARRAGÁN L.; AMAT P.: Membranous whorled bodies and castration. An ultrastructural and quantitative study	103
RAMOS CALVO P.M.; SARRAT TORREGUITAR T R.; BRAZAL RAPOSO J.R.; SANTAFÉ OROZ J.; SEGARRA DOMENECH J.: Chlorpromazine teratology effects. Ultrastructural studies	109
TORRES A.; CRESPO A.; NIETO J.L.: Effects of resistance training on the pattern histoenzimatic of rat skeletal muscle	117
VICTORIA FUSTER A.; TORREGROSA RICO S.; SMITH FERRES E.: Changes degenerative following lesions of the entopeduncularis nucleus	125
VERA GIL A. MARTÍNEZ M.A.; ARRANZ C.; LORENTE P.; PAULES J.M.; LAHOZ M.: Anatomy of the human teeth root canals. A morphometric study	129

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

ALMENAR GARCÍA V.; MARTÍNEZ-ALMAGRO A.; PALOMINO CORTÉS M.A.: Duplicación de arterias renales	3
CAMÓN J.; SABATÉ D.; FRANCH J.; LÓPEZ-BEJAR M.A.; PASTOR J.; RUTLLANT J.; ORDEIG J.; DEGOLLADA E.; VERDÚ J.: Malformaciones congénitas múltiples asociadas en los animales domésticos de cuatro casos	9
CARBAJO S.; CARBAJO-PÉREZ E.; RODRÍGUEZ J.; CASTRO S.; CARVAJAL J.C.: Células pas positivas y células foliculo estrelladas, una estirpe celular común en el lóbulo intermedio de la hipófisis	21
CARBAJO PÉREZ E.; WATANABE Y.G.: Estudio de la proliferación celular en la adenohipófisis del ratón macho adulto en diferentes periodos del día tras la administración de bromodesoxiuridina	29
CROVETTO M.; TORRES A.; MUNICIO A.; MUNICIO M.; SARRAT R.: Estructura y ultraestructura de la arteria vertebral humana	35
GÓMEZ-URQUIJO S.M.; BUENO-LÓPEZ J.L.; REBLET C.; LÓPEZ MEDINA A.; MASEDA ARMESTO M.J.: Tipos de neuronas piramidales en las capas II y III de la corteza cerebral del conejo .	41
GUILLÉN M.T.; REGODON S.; FRANCO A.J.; ROBINA A.: Aportaciones al estudio del proceso de osificación postnatal del esqueleto apendicular de los ovinos. I.- parte: miembro torácico	53
HERNÁNDEZ E.R.; REVILLA M.; RICO H.: Contenido mineral óseo en mujeres premenopáusicas y su relación a variables antropométricas	61
NIETO J.L.; GIMENO A.; CAMPO L.: Contribución al estudio morfológico de la pelvis ósea embrionaria y fetal	67
PASTOR F.E.; PELÁEZ B.; BLÁZQUEZ J.L.; TORANZO D.; SÁNCHEZ A.; ÁLVAREZ-MORUJO A.J.; AMAT P.: Efectos del glutamato monosódico sobre las neuronas del núcleo arcuato del hipotalamo de rata. Estudio morfométrico ultraestructural	75
PASTOR F.E.; BLÁZQUEZ J.L.; PELÁEZ B.; TORANZO D.; AMAT G.; SÁNCHEZ A.; ÁLBAREZ-MORUJO A.J., AMAT P.: Cuerpos de Herring terminales en la luz del tercer ventrículo	87
PELÁEZ B.; PASTOR F.E.; BLÁZQUEZ J.L.; TORANZO D.; SÁNCHEZ A.; ÁLVAREZ-MORUJO A.J.; AMAT P.: Efectos de la administración neonatal de glutamato monosódico sobre el testículo de rata	93
PELÁEZ B.; PASTOR F.E.; BLÁZQUEZ J.L.; TORANZO D.; A. SÁNCHEZ, ÁLVAREZ-MORUJO A.J.; AMAT G.; MUÑOZ BARRAGÁN L.; AMAT P.: Cuerpos laminares espirales y castración. Estudio ultraestructural y cuantitativo	103
RAMOS CALVO P.M.; SARRAT TORREGUITAR T R.; BRAZAL RAPOSO J.R.; SANTAFÉ OROZ J.; SEGARRA DOMENECH J.: Efectos teratológicos de la clorpromazina. Estudio ultraestructural .	109
TORRES A.; CRESPO A.; NIETO J.L.: Efectos del entrenamiento de resistencia sobre el patrón histoenzimático del músculo esquelético de la rata	117
VICTORIA FUSTER A.; TORREGROSA RICO S.; SMITH FERRES E.: Rastro degenerativo fibrilar tras la diatermogoagulación de la encrucijada estriodiagonal	125
MARTÍNEZ M.A.; ARRANZ C.; LORENTE P.; PAULES J.M.; LAHOZ M.; VERA GIL A.: Anatomía de los canales dentarios humanos. Un estudio morfométrico	129