

ANAIRES DE ANATOMIA



ANALES DE ANATOMIA

Volumen XXXVII

Diciembre 1991

Núm. 96

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. Ferrer Torres (Valencia)
R. Ferrer 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 (Homburg, R.F.A.)

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

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

Composición y maquetación de textos: Ester Valer, Antonio M. Montañés

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

TÉCNICA DE CREACIÓN DE MOLDES VASCULARES CON RESINAS DE POLIESTER NO SATURADAS Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN ARTERIAL DEL ESÓFAGO ABDOMINAL MURINO*

(THE USE OF UNSATURATED POLYESTER RESIN FOR VASCULAR CASTING AND ITS APPLICATION TO THE STUDY OF THE ABDOMINAL ESOPHAGUS)

**J. ARENA, F. BENEVENT, M. MONTESINOS, J.R. BALLESTEROS, A. VICTORIA,
V. SMITH-FERRES, F. GÓMEZ-FERRER y M. ADOBES-MARTÍN**

Servicio de Cirugía. Hospital Clínico Universitario.
Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina de Valencia

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la irrigación arterial intramural y extrínseca del esófago abdominal murino. Se basa en la construcción de moldes vasculares de resina de poliéster no saturada sobre 91 ratas de la cepa Wistar.

El esófago abdominal está irrigado constantemente por cuatro arterias principales (gástrica izquierda, hepática izquierda y esofágicas descendentes izquierda y derecha). Existen anastomosis constantes con la irrigación del esófago torácico y del estómago.

PALABRAS CLAVE: Arterias esofágicas murinas. Moldes vasculares de resina.

SUMMARY

The arteries for the abdominal esophagus are studied in 91 Wistar rats using vascular casts of polyester resin. The blood supply of such organ comes constantly from the left gastric, left hepatic, descending left and right esophageal arteries. Such vessels show constant anastomosis with the arteries for the thoracic esophagus and stomach.

KEY WORDS: Murine esophageal arteries. Vascular casts of resin.

* El presente trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (ref. SM88-0008).

Introducción

Es bien conocido que la irrigación arterial del esófago abdominal tiene su origen en la arteria coronaria estomáquica (1-2). Sin embargo hasta la fecha no se han realizado estudios de la distribución de las ramas arteriales peri ni intraesofágicas así como tampoco de sus anastomosis con otras ramas arteriales, en especial con aquellas que irrigan al esófago torácico y que han sido descritas previamente por nuestro grupo de trabajo (3). En cambio sí se conoce el patrón macrovascular de otros órganos de disección más sencilla y vascularización más rica como son el estómago y el riñón murinos (4-5). La técnica que se empleó para la realización de dichos estudios es la inyección intravascular de resina y el estudio de los moldes vasculares con microscopía electrónica y barrido (6-7).

El objetivo de presente trabajo consiste en la creación de un mapa de la vascularización extrínseca e intrínseca del esófago abdominal murino usando la técnica de construcción de moldes intravasculares con resinas de poliéster no saturadas.

Material y Método

A) Animales. Se han estudiado 91 ratas de la cepa Wistar de ambos sexos (26 machos y 65 hembras).

B) Materiales. Resina de poliéster para inyección de piezas pequeñas: crystic resin 191 E PA (Trylon CL201 PA, Northants, Wollanston, UK). Monómero C (Trylon Thinner). Catalizador líquido (Trylon Liquid Catalyst MEKP hardener). Acelerador E (Trylon Activator). Pastas de colores rojo y azul (Opaque Colour Paste Post Office Red and Mid Blue).

C) Métodos. Para la creación de moldes vasculares de resina se ha utilizado una modificación de la técnica de Tompsett (6) que ha sido descrita en detalle previamente (3).

Resultados

A.- Vascularización extrínseca

La vascularización del esófago abdominal tiene cuatro orígenes. En el lado derecho depende de la arteria coronaria estomáquica y de la cardiotuberositaria posterior, mientras que en el lado izquierdo depende de la arteria hepática izquierda y de la arteria cardiotuberositaria anterior que a su vez es rama de la arteria coronaria estomáquica.

A.1.- Arteria coronaria estomáquica

El esófago abdominal en su lado derecho está irrigado constantemente por la arteria coronaria estomáquica que nace a 8-9 mm del origen del tronco celiaco. La rama esofágica emerge a 3-7 mm del origen de la arteria coronaria estomáquica ascendiendo por la cara lateral derecha del esófago hasta anastomosarse con la arteria esofágica descendente derecha o posterior. La arteria coronaria estomáquica tiene un trayecto de convexidad superior que mide entre 7-9 mm hasta su bifurcación en la curvatura menor gástrica. La rama izquierda en su camino hacia la tuberosidad gástrica emite un pequeño número de ramas cortas ascendentes para la porción esofágica inferior que oscila entre uno y tres (fig. 1).

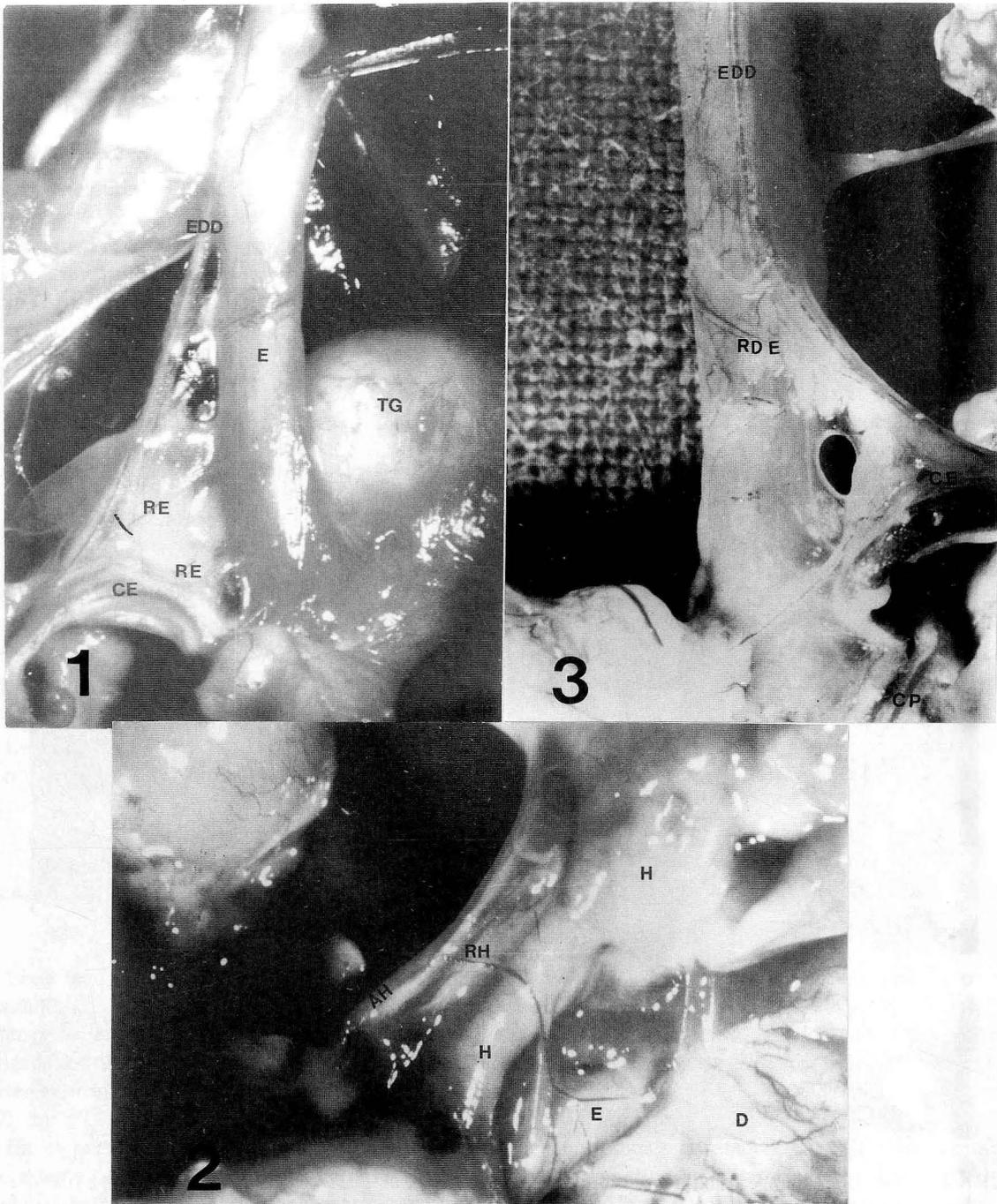
En un 25% de los animales de la primera serie (n=56), a pesar de la ligadura en bloque del hilio hepático se observó una rama arterial hepática izquierda que cruza por delante de la coronaria estomáquica y del cardias, y asciende por la cara lateral izquierda del esófago buscando la arteria esofágica descendente izquierda o anterior. En el 100% de los especímenes de la segunda serie (n=35), en los que no se ligó la arteria hepática principal pudo evidenciarse la presencia de esta rama esofágica de origen hepático (fig. 2).

A.2.- Arteria cardiotuberositaria anterior

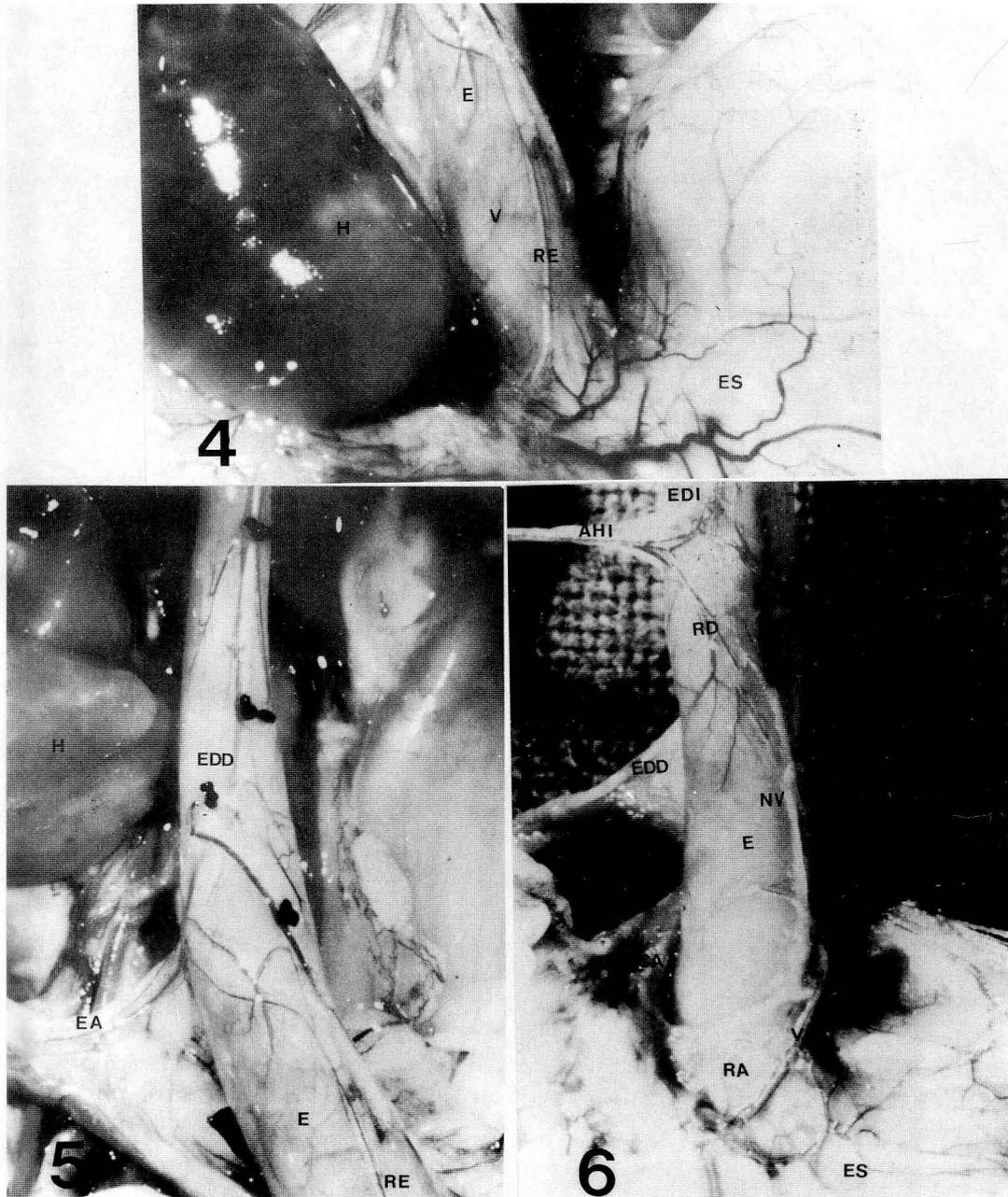
La arteria cardiotuberositaria anterior nace de la arteria coronaria estomáquica y su distribución se describirá posteriormente junto con el estudio de la vascularización intrínseca.

A.3.- Arteria cardiotuberositaria posterior

La arteria cardiotuberositaria posterior, rama de la arteria coronaria estomáquica, también contribuye a la vascularización del esófago abdominal, y será descrita en el siguiente apartado.



- FIGURA 1.** Vascularización arterial extrínseca del esófago torácico inferior y abdominal. Arteria esofágica descendente derecha o posterior (EDD). Arteria coronaria estomáquica (CE). Ramas esofágicas directas (RE). E: esófago. TG: tuberosidad gástrica.
- FIGURA 2.** Rama esofágica de la arteria hepática izquierda. Rama arterial procedente de la circulación hepática (RH) distal a la ligadura de la arteria hepática común. Esófago abdominal (E). Arteria descendente esofágica procedente de la bronquial izquierda. AH: arteria hepática izquierda. D: diafragma. H: hígado.
- FIGURA 3.** Anastomosis directa de la arteria esofágica descendente derecha o posterior (EDD) con la arteria coronaria estomáquica (CE). Origen de la arteria cardiotuberositaria posterior (CP). Ramas directas para el esófago (RED). H: hígado. AHI: rama esofágica de la arteria hepática izquierda.



- FIGURA 4.** Arteria cardiotuberositaria posterior (CP). Hígado (H). Rama Directa para el esófago abdominal que se acompaña de su correspondiente tronco vagal -RE-. ES: estómago. E: esófago. v: venas de drenaje.
- FIGURA 5.** Anastomosis entre las arterias esofágica ascendente (coronaria estomáquica), esofágica descendente y cardiotuberositaria posterior. Visión posterior. H: hígado. E: esófago. EA: arteria esofágica ascendente rama de la coronaria estomáquica. EDD: arteria esofágica descendente, rama de la arteria bronquial. RE: rama esofágica de la arteria cardiotuberositaria posterior.
- FIGURA 6.** Detalle de la arteria cardiotuberositaria anterior. Arteria esofágica descendente anterior o izquierda (EDI). Ramas gástricas del nervio vago (NV). Ramas esofágicas ascendentes (RA) de la arteria cardiotuberositaria anterior (CA). CE: coronaria estomáquica. EDD: esofágica descendente derecha. E: esófago. AHI: rama esofágica de la arteria hepática izquierda. V: rama ascendente de la cardiotuberositaria anterior y vena de drenaje. ES: estómago.

B.- Vascularización intrínseca

La vascularización intrínseca del esófago abdominal tiene dos orígenes fundamentales, según se trate de su vertiente derecha o posterior, o su vertiente izquierda o anterior.

La vascularización del lado derecho o posterior procede fundamentalmente de las arterias coronaria estomáquica y bronquial derecha (vía arteria esofágica descendente derecha). Este hecho ha podido constatarse en la totalidad de los especímenes. También existe una irrigación arterial adicional para el esófago derecho a partir de la arteria cardiotuberositaria posterior cuya presencia ha podido demostrarse en el 60% de los animales. La arteria coronaria estomáquica en la totalidad de los especímenes emite entre una y tres ramas directas para el esófago abdominal, incluyéndose en ellas la anastomosis directa con la esofágica descendente derecha o posterior (fig. 3).

La arteria cardiotuberositaria posterior (fig. 4) emite entre una y tres ramas esofágicas que se anastomosan a su vez de una manera plexiforme con la esofágica descendente posterior (50% de los especímenes) y con la coronaria estomáquica, siendo la anastomosis longitudinal con la esofágica descendente poco frecuente (20% de los especímenes) (figs. 4 y 5).

La vascularización del esófago abdominal en su lado izquierdo depende fundamentalmente de la arteria hepática izquierda (fig. 6) y de la arteria cardiotuberositaria anterior rama de la coronaria estomáquica. La arteria hepática izquierda emite entre una y tres ramas esofágicas incluida su anastomosis con la esofágica descendente izquierda o anterior (figs. 2, 3 y 6). Esta arteria se anastomosa constantemente con la arteria esofágica descendente izquierda o anterior y en el 75% de los especímenes con la arteria cardiotuberositaria anterior, siendo en estos casos la anastomosis de carácter plexiforme (fig. 6). En un 85% de los casos las ramas esofágicas de la arteria hepática izquierda se anastomosan con las de cara posterior contribuyendo a formar parte del plexo esofágico a ese nivel.

La arteria cardiotuberositaria anterior emite entre una y tres ramas para la porción inferior del esófago abdominal, que se anastomosan con la arteria hepática izquierda de manera plexiforme (Figura 6).

Discusión

El esófago abdominal murino está irrigado fundamentalmente por la rama esofágica ascendente de la coronaria estomáquica, unas pequeñas ramas nacidas del borde superior de las arterias cardiotuberositarias anterior y posterior así como por ramas de la arteria hepática izquierda. Esta descripción coincide parcialmente con las realizadas por Hebel y Stromberg así como por Greene, en tanto en cuanto la descripción de la rama esofágica de la arteria coronaria estomáquica y de la arteria hepática izquierda fué hecha con anterioridad por los citados autores (1-2).

En el presente trabajo se demuestra la existencia de anastomosis constantes entre la arteria esofágica descendente izquierda o anterior y las arterias hepática izquierda y cardiotuberositaria anterior. A su vez la arteria esofágica descendente posterior se anastomosa directamente con la arteria coronaria estomáquica y también aunque de manera plexiforme con la arteria cardiotuberositaria posterior. Dichas anastomosis, que constituyen el plexo esofágico abdominal no han sido descritas previamente por otros autores.

La existencia de una rama arterial procedente de la circulación hepática aparece en el 25% de los esófagos humanos y representa un vestigio de la primitiva circulación gastrohepática (8). A diferencia de lo que se ha descrito en el ser humano, en el caso del esófago abdominal murino no hemos encontrado ramas esofágicas directas de las arterias frénicas inferiores ni de la arteria esplénica (9-10).

BIBLIOGRAFÍA

- GREENE, ECh. (1963): Anatomy of the rat. Hafner Publishing Company. New York and London.
- HEBEL, R. y STROMBERG, MW. (1976): Circulatory systems. En: Anatomy of the laboratory rat. The Willian and Wilkins Company. Baltimore.
- BALLESTEROS SERRANO, J.R. (1990): Estudio de la vascularización arterial macroscópica y microscópica del esófago murino con moldes vasculares de resina. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- GANNON, B.J.; BROWNING, J. y O'BRIEN, P. (1982): The microvascular architecture of the glandular mucosa of rat stomach. *J. Anat.*, **135**: 667-683.
- MURAKAMI, A. (1971): Application of the Scanning Electron Microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch. Histol. Jap.*, **32**: 445-454.
- TOMPSETT, DH. (1980): Anatomical Techniques. 2nd Edition. E&S Livingstone. London and Edinburg.
- LAMETSCHWANDTNER, A.; LAMETSCHWANDTNER, U. y WEIGER, T. (1984): Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Scanning electron microscopy II*: 663-695.
- MICHELS, NA. (1955): Blood supply and anatomy of the upper abdominal organs. Pitman Medical Publishing Co Ltd. London.
- SWIGART, LL; SIEKERT, RG; HAMBLEY, WG. y ANSON, BJ. (1950): The esophageal arteries. An anatomic study of 150 specimens. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **90**: 234-243.
- SHAPIRO, AL. y ROBILLARD, GL. (1950): The esophageal arteries. Their configurational anatomy and variations in relation to surgery. *Ann. Surg.*, **131**: 171-185.

Correspondencia: Dr. J. Arena Ricart
Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina
Hernán Cortes 24, 6ª
46004 Valencia. España

ESTRUCTURA COMPARADA DE LA GLÁNDULA ADRENAL

COMPARATIVE STRUCTURE OF THE ADRENAL GLAND

M. BESCÓS, F. LOSTALE, A. WHYTE, A. TORRES, J. WHYTE y R. SARRAT

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Hemos realizado un estudio de Anatomía Comparada de las glándulas adrenales con el fin de aportar datos morfológicos sobre la estructura de la misma.

Tras una revisión bibliográfica de la estructura normal de las dos partes que componen la glándula, corteza y médula, hemos procesado y analizado glándulas adrenales de diversos mamíferos en condiciones normales.

Los mamíferos estudiados han sido: Rata, gato, cordero, cerdo, ternera, toro de lidia y humano.

En todos ellos se han analizado por separado: La cápsula, el tejido conectivo, cada una de las tres capas del córtex, el límite córtico-medular y la médula, así como la vascularización e innervación glandular.

PALABRAS CLAVE: Glándulas adrenales. Estructura. Mamíferos.

SUMMARY

This work is a study in Comparative Anatomy of the adrenal glands and its objective is to provide a series of morphological data about their structure.

After a bibliographical review about the normal structure of the two halves of the gland, the adrenal glands of various mammals in normal conditions have been processed and analysed.

The mammals upon which the study has been carried out are: rat, cat, lamb, pig, calf, fighting bull and human being.

A series of aspects have been analysed separately in all of them: the capsule, the connective tissue, all the three layers of cortex, the cortical-medullary limit, the medulla and also the glandular vascularization and innervation.

KEY WORDS: Adrenal Gland. Structure. Mammalian.

Introducción

En las glándulas adrenales se distinguen a simple vista dos partes: una externa de coloración amarillo vivo y consistencia compacta denominada corteza y otra interna de coloración blanco grisácea y consistencia más laxa denominada médula. Estas dos zonas poseen un esqueleto conectivo que externamente rodea a todo el órgano formando la cápsula.

La cápsula ha sido descrita por Trautmann (1942), Sisson y Grosman (1942), López Fernández (1974), Rossow (1978) y Geneser (1986) compuesta por fibras, elásticas y musculares lisas, y ocasionalmente pigmentos. Estos autores aseguran que la cápsula emite hacia el interior del órgano numerosas y delgadas prolongaciones, ricas en vasos y nervios, que llegan hasta la zona fronteriza con la médula adrenal. Junqueira (1974) niega que la cápsula emita septos hacia el interior del parénquima glandular.

Las variaciones de este tejido conectivo según la edad y la especie animal han sido analizadas por Stivie (1946), Rotter (1949) y Álvarez-Morujó (1971).

El córtex adrenal constituye el mayor volumen de la glándula y ha sido estudiada, estructural y funcionalmente, por Holmes (1984), Long (1967) y Eisenstein (1967) en la especie humana, Frazao (1952) en los bovidos, Fujioka (1956) en el cerdo, Grau (1967) en los óvidos y Nicander (1957) en la rata.

La distribución en tres capas concéntricas (glomerular, fascicular y reticular) es clara en todas las especies, pero el límite entre estas y la zona donde se produce la regeneración del órgano presenta grandes controversias entre los distintos autores. Tonutti (1953) nos describe los campos de transformación externo, situado entre las capas glomerular y fascicular, e interno, entre las capas fascicular y reticular, asegurando que es en estos campos donde se regenera la glándula. Ito y Takahasi (1964) describen una zona de transición externa y le dan significación regeneradora de las capas fascicular y reticular. Utilizando timidina tritiada Brenner (1963) y Pappiz (1972) describieron una migración centrípeta desde la zona externa del córtex en el gato y el ratón.

El límite córtico-medular suele ser nítido en todas las especies.

La médula adrenal está compuesta por paraneuronas. Ha sido estudiada en las distintas especies por muchos autores entre los que destacamos a Molbert (1960) y Malendowicz (1986) en la rata, Blaschko (1953) en los bóvidos y López-Fernández (1974) en los óvidos. Con métodos histoquímicos se distinguen dos tipos de células: claras o raiocromas y oscuras o hialocromas, productoras de noradrenalina y adrenalina respectivamente.

Material y Método

Para nuestro estudio hemos utilizado glándulas adrenales de rata (23), cordero (15), cerdo (15), ternera (15), toro de lidia (7) y humanas (9).

Las glándulas adrenales extraídas han sido lavadas con suero fisiológico para arrastrar los restos de sangre y detritus. A continuación realizábamos unos cortes en los polos para que penetrara mejor el fijador, este ha sido la solución de Bouin o formol diluido al 10%. Tras ser deshidratadas, en alcoholes a concentraciones progresivamente crecientes, las piezas fueron incluidas en parafina o paraplat y posteriormente cortadas en serie a 7 micras. Finalmente han sido teñidas por el método tricrómico de Martins modificado por Goldberg.

Resultados

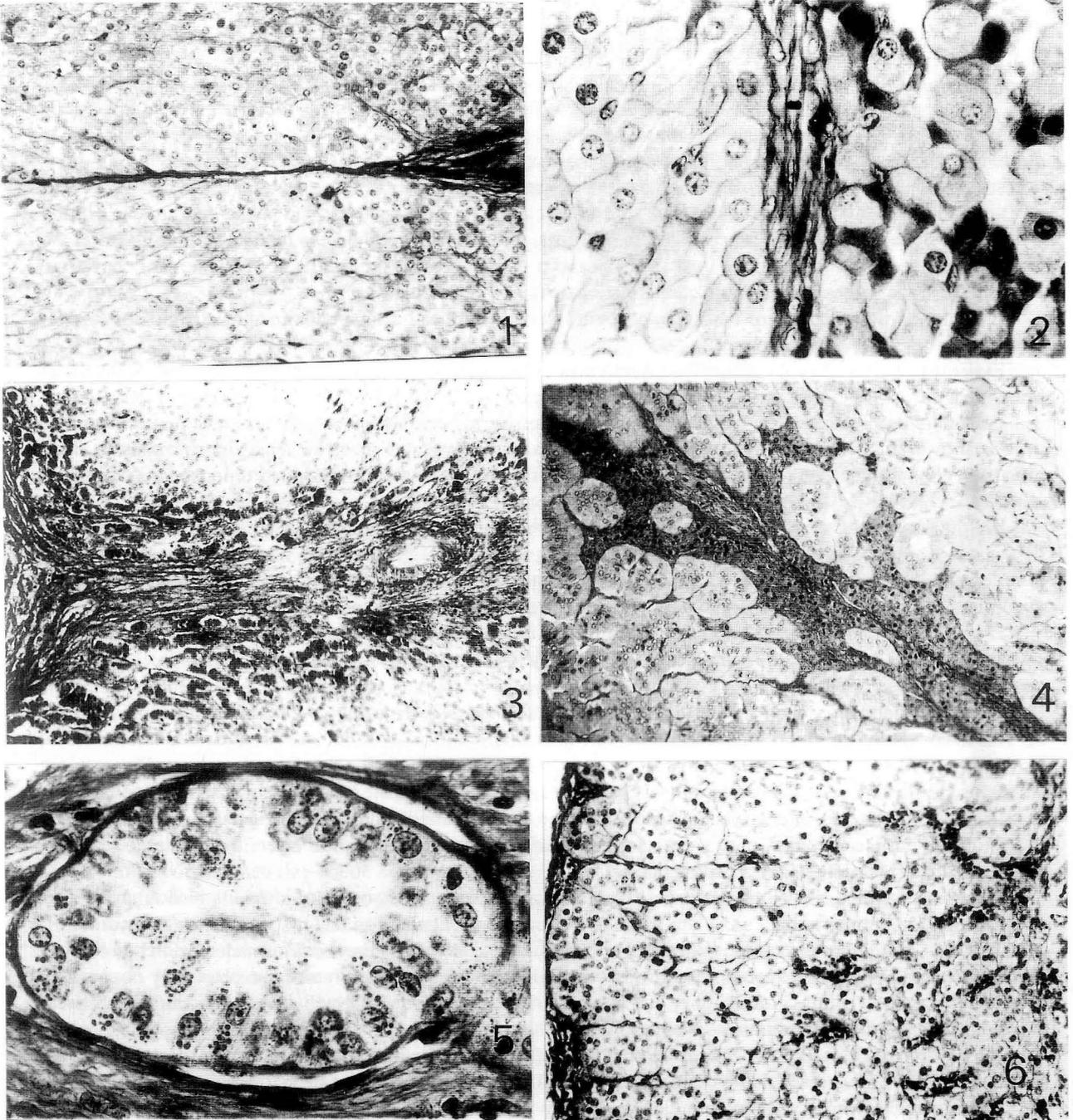
La glándula adrenal de la rata muestra una cápsula bien definida. En la zona periadrenal encontramos multitud de fascículos nerviosos así como ganglios vegetativos incluidos entre los tractos conjuntivos, dentro de estos ganglios las células presentan una gran uniformidad en cuanto a tamaño y forma.

En el córtex se observan sus tres capas bien delimitadas: Glomerular, fascicular y reticular.

Analizando cada una de las capas apreciamos cómo en la capa glomerular, hiper cromática, las células se agrupan en nichos con gran acúmulo de núcleos, debido al pequeño tamaño que tienen las células. Su capa fascicular presenta un aspecto esponjoso, con las células formando cordones perfectamente alineados y separados por capilares de aspecto sinusoidal que les sirven de eje. En la capa fascicular, en su parte más externa, hemos encontrado la mayor actividad mitótica de todo el córtex. En la capa reticular se observa cómo las células pierden la alineación entrecruzándose con el tejido conectivo y los vasos.

En esta especie observamos un límite córtico-medular claramente visible.

El cordero presenta una vigorosa cápsula de naturaleza conjuntiva constituida por numerosos haces de fibras de colágena que presentan una disposición paralela a la superficie capsular y con un trayecto ondulado. En la parte más superficial hemos podido constatar, en todos nuestros casos, una gran abundancia de filetes nerviosos. En la parte más interna se puede apreciar cómo delgados haces de colágena penetran hacia el interior de la capa glomerular delimitando los glomérulos.



- FIGURA 1.** Adrenal de cordero. Nótese la capa glomerular poco definida, sin tránsito marcado con la capa fascicular. El esqueleto conjuntivo muestra septum de los que se desprenden finos haces colágenos.
- FIGURA 2.** Adrenal de cordero. Detalle de la capa fascicular interna. Mostrando dos tipos de células distintas.
- FIGURA 3.** Adrenal de cerdo. Detalle de la zona superficial del córtex. Nótese las profundas invaginaciones capsulares, determinadas por los vasos, que se hunden en el espesor del córtex.
- FIGURA 4.** Adrenal de ternera. Nótese cómo la capa reticular se introduce en la medular formando auténticos radios de aspecto "dendrítico".
- FIGURA 5.** Adrenal de toro de lidia. Nótese la presencia de un glomérulo subcapsular con abundantes granulaciones de aspecto lipídico en su interior.
- FIGURA 6.** Adrenal humana. Nótese en la capa fascicular cómo las células se agrupan en cordones de varios elementos de espesor.

En el córtex, la capa glomerular está poco definida, sin que exista un tránsito marcado con la capa fascicular y las células se agrupan en cordones. En la parte externa de la capa fascicular hemos encontrado el más alto índice mitótico de todo el córtex. El esqueleto conjuntivo de esta capa muestra una disposición radiada que hace que los cordones celulares, a medida que profundizan, se inclinen divergentemente desde los septum conjuntivos, de los que se desprenden finos haces colágenos a modo de "vectores". En la capa fascicular interna hemos encontrado dos tipos celulares bien distintos: Uno, el clásico de células claras de aspecto redondeado o ligeramente facetado y otro, de células más cromófilas, con intensa basofilia, poligonales, con núcleos tendentes a la acidofilia y en menor porcentaje que las anteriores (figs. 1 y 2). La capa reticular presenta una población celular más heterogénea, con pérdida de la disposición radiada característica de la capa fascicular.

El límite córtico-medular es neto, con pequeñas invaginaciones hacia la capa medular dándole un aspecto festoneado.

El cerdo presenta una cápsula que con frecuencia se introduce en el espesor del córtex, formando profundas invaginaciones producidas por los vasos sanguíneos (fig.3).

La capa glomerular no está formada por los clásicos nichos celulares sino por cordones de gran densidad celular, muy cromófilos y delimitados por fuertes tractos conjuntivos que se anclan en la vigorosa cápsula. Tanto en la capa glomerular como en la cápsula es típico de esta especie observar la inclusión de tejido medular formando islotes en cuyas inmediaciones encontramos abundantes vasos sanguíneos.

El límite entre las capas glomerular y fascicular es neto y bien definido, sobre todo por el cambio de coloración de sus células. La capa fascicular se dispone en largos cordones perpendiculares a la superficie, entre los que circulan paralelamente los capilares, rodeados por una fina red de colágena. En la capa reticular las células pierden su alineación y encontramos una gran densidad celular con intensa coloración.

El límite córtico-medular es impreciso, difícilmente delimitable debido a las constantes imbricaciones que se producen entre el tejido reticular y la médula. De la médula salen expansiones que atraviesan todo el córtex para terminar subcapsularmente.

La ternera tiene una vigorosa cápsula donde se ven abundantes nervios y marcada vascularización.

En el córtex las células de la capa glomerular presentan un aspecto folicular, que recuerda a los folículos tiroideos, con la luz aparentemente vacía de contenido. En la capa fascicular las células se agrupan en cordones paralelos y en la capa reticular se pierde esta estructuración. En esta especie hemos encontrado a la capa reticular formando auténticos radios de aspecto "dendrítico" que se introducen en la médula (fig.4).

El límite córtico-medular, neto y preciso, presenta abundante participación de tejido conectivo que se va intercalando con las células de la capa reticular.

En el toro de lidia destaca la gran robustez de la cápsula conjuntiva que rodea a toda la glándula.

La capa glomerular adopta una clara tendencia a la forma folicular con una disposición en estratos, el más superficial lo encontramos incluido entre las fibras de colágena de la cápsula y está formado por nichos celulares de células claras, un segundo estrato con glomérulos típicos en los que encontramos unos con luz y otros sin ella y un tercer estrato de células glomerulares que se caracterizan por estar más pigmentadas. Analizando los folículos de la capa glomerular encontramos que sus células están cargadas de patentes y abundantes granulaciones de aspecto lipídico e incluso hemos encontrado una pequeña cantidad de material coloideo, de aspecto basófilo, en su interior (fig.5). Esta disposición de la capa glomerular es propia y singular de estos especímenes. Las capas fascicular y reticular no presentan variaciones respecto a la ternera.

El límite córtico-medular presenta grandes variaciones pero es constante la gran participación de tejido conectivo y vasos en esta zona.

La glándula adrenal humana tiene una cápsula conjuntiva fina y delicada que envía finos septos conjuntivos hacia el interior del parénquima adrenal al que sirven como vectores.

La capa glomerular está muy bien definida. Sus células son pequeñas y están agrupadas en pequeñas masas esferoidales separadas por finos tractos conjuntivos. La capa fascicular se compone de células ligeramente mayores que las anteriores, con citoplasmas espumosos, agrupadas en hileras o cordones de varios elementos de espesor. Estos cordones celulares delimitan a los sinusoides y se disponen de forma paralela o radiada, siguiendo los tractos conjuntivos que envía la cápsula hacia el interior de la glándula. La distribución casi paralela de los cordones celulares se pierde en la capa reticular y las hileras celulares se anastomosan en una complicada red entre cuyas mallas se encuentran los sinusoides y capilares sanguíneos.

Queremos hacer constar que el material humano del que hemos podido disponer para nuestro estudio procedía de necropsias y hemos hallado numerosas variaciones estructurales: Suprarrenales humanas en las que se conservan las tres capas del córtex bien definidas (fig.6), glándulas en las que la capa glomerular y la capa fascicular han degenerado y sólo se conserva bien estructurada la capa reticular y en otras ocasiones hemos podido observar una gran congestión en la capa reticular que nos impide la identificación de sus elementos celulares.

Discusión

En todas las especies estudiadas está presente la cápsula fibrosa rodeando a las glándulas adrenales. Esta cápsula es vigorosa en todas las especies estudiadas a excepción de la humana en la que es fina y delicada. De la cápsula se desprenden tractos conjuntivos que forman el esqueleto conectivo sobre el que asientan las células, hecho que niega Junqueira (1974).

Estamos de acuerdo con Álvarez (1971) en que existen variaciones en la cantidad y distribución del tejido conectivo según la especie estudiada. Nuestro estudio pone en evidencia este tejido conectivo, tanto en el córtex como en la médula, cuya distribución puede llegar a ser tan típica que nos permite establecer diferencias comparativas entre las adrenales de las distintas especies estudiadas. Así en la rata encontramos finos tractos conjuntivos entre las células mientras que en el cordero observamos unas gruesas trabéculas que parten de la cápsula y atraviesan todo el córtex hasta la médula y en el toro de lidia estas trabéculas están tan desarrolladas que engloban y aíslan células de la capa glomerular.

En el córtex la disposición de las células de la capa externa o glomerular es variable según la especie: nichos en la rata, cordones en el cordero y en el cerdo, siendo mucho más densos y cromófilos en este último, folículos en la ternera y el toro de lidia y masas esferoidales en el hombre.

La células de la capa fascicular se disponen formando cordones separados por los tabiques conjuntivos y los capilares, sólo en las glándulas humanas hemos apreciado un aumento en el espesor de estos cordones. En el cordero dentro de esta capa hemos observado dos tipos de células: uno el clásico de células claras y forma redondeada y otro de células muy cromófilas con intensa basofilia y núcleos tendentes a la acidofilia que pueden ser indicativos de su diferente composición citoplasmática.

El límite córtico-medular puede ser nítido y preciso, como ocurre en la rata, la ternera y el hombre, o difícilmente delimitable debido a las constantes invaginaciones entre la capa reticular del córtex y la médula, como ocurre en el cerdo.

En la médula las células son siempre de mayor tamaño que en el córtex y como las describió Al-Lami (1970) se disponen formando cordones o grupos redondeados que están delimitados por vasos sanguíneos, siendo frecuente la presencia de ganglios y fibras nerviosas.

La cantidad y distribución de las células ragiocromas e hialocromas es muy variable según la especie estudiada. En el cerdo las células hialocromas se presentan agrupadas en nichos alrededor de los vasos medulares, mientras que las células ragiocromas se disponen periféricamente respecto a las hialocromas. En la ternera las células hialocromas se encuentran aisladas entre los cordones de células ragiocromas, cuyo número es mucho mayor.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ-MORUJO, A. (1971): El esqueleto conectivo de las glándulas suprarrenales. *An. Anat.*, **20** (5): 205-220.
ARVY, L. (1961): Contribution à l'histochemie de la surrénale de *Bos Taurus* L. *Acta Histochem.*, **12**: 111-136.
CAVALLERO, E. y MAGRINI, U. (1964): Recenti acquisizioni sulla morfologia funzionale della cortecia surrenale. *Monit. Ostet. Gin. Endoc. Metab.*, **35**: 413-433.
CORTE REAL, E. y COIMBRA, A. (1955): Estroma conjuntivo e inervação do cortex suprarrenal. *Fol. Anat. Univ. Coimbragensis*, **30**: 1-11.

- CHESTER JONES, I. y cols. (1962): The adrenal cortex throughout the vertebrates. *Brit. Med. Bull.*, **18**: 110-114.
- EISENSTEIN, A.B. (1970): Estructura íntima de la corteza suprarrenal. Toray. Barcelona.
- FAWCETT, W. Don y cols. (1969): Adrenal cortex. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **25**: 347-359.
- FUJIOKA, T. (1956): Studies on the histology of the adrenal cortex in the pig. *Jap. J. Zootechn. Sci.*, **27**: 19-28.
- GRAU, H. y WALTER, P. (1967): Grundriss der Histologie und Vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. Paul Parey. Berlín.
- HOLMES, W.N. y CRONSHAW, J. (1984): Adrenal gland: Some evidence for the structural and functional zonation of the steroidogenic tissues. *J. Exp. Zool.*, **232** (3): 627-631.
- IDELMAN, S. (1970): Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex. *Int. Rev. Cytol.*, **27**: 181-281.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L. (1974): Estudio anatómico, estructural y biomatemático diferencial de las glándulas suprarrenales de los ovinos y caprinos. Tesis Doctoral. Madrid.
- MALENDOWICZ, L.K. y NUSSDORFER, G.G. (1984): Sex differences in adrenocortical structure and function. XV. Cellular composition and quantitative ultrastructural study of adrenal cortex of adult male and female hamster. *J. Submicrosc. Cytol.*, **16** (4): 715-720.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, I. (1974): Criterios de diferenciación histológica de la glándula tiroidea de algunas especies domésticas. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- NICANDER, L. (1952): Histological and histochemical studies on the adrenal cortex of the domestic and laboratory animals. *Acta Anat.*, **16**: 5-88.
- NUSSDORFER, G.G. (1970): The fine structure of the newborn rat adrenal cortex. I. Zona glomerulosa and Zona fasciculata. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **103**: 382-397.
- NUSSDORFER, G.G. y cols. (1978): Cytophysiology of the adrenal zona fasciculata. *Int. Rev. Cytol.*, **55**: 291-365.
- SILVERMAN, M.L. y LEE, A.K. (1989): Anatomy and pathology of the adrenal glands. *Urol. Clin. North. Am.*, **16** (3): 417-432.
- SMITH-AGREDA, V. y CABANES, J. (1971): Aportaciones al conocimiento de la porción interna de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal. *An. Anat.*, **20** (51): 569-578.
- SMOLLICH, A. (1958): Gestalt, Topographie, Masse und Gewichtsverhältnisse der Nebennieren des Rindes. *Anat. Anz.*, **105**: 205-221.
- STROGANOVA, M.A. (1965): The function, proliferation and differentiation of the adrenal cortical cells of animal and man. *Folia Histochem. Cytochem.*, **3**: 33-40.
- SYMINGTON, T. (1960): The morphology of the adrenal cortex. *Biochem. Soc. Symp.*, **18**: 40-49.
- SYMINGTON, T. (1962): Morphology and cytology of the human adrenal cortex. *Brit. Med. Bull.*, **18**: 117-121.
- TONUTTI, E. (1942): Die Umbauvorgänge in den Transformationsfeldern der Nebennierenrinde als Grundlage der Beurteilung der Nebennierenrindearbeit. *Zeit. Mikr. Anat. Forsch.*, **52**: 32-86.

Correspondencia: M. Bescós
Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza. España

ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS CELULARES DE LA MUCOSA GINGIVAL CON ENF. PERIODONTAL EXPERIMENTAL TRAS LA IRRADIACIÓN LÁSER I. R. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN LA RATA ALBINA (I)

ELECTRONIC MICROSCOPE STUDY OF THE MORPHOLOGICAL CELLULAR OF THE GINGIVAL MUCOSA ALTERATIONS WITH EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE AFTER LASER IR IRRADIATION. AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE ALBINO RAT (I)

**A. CAMPOS, A. VICTORIA, M. MONTESINOS, E. FERRES-TORRES, V. SMITH-AGREDA
y V. SMITH-FERRES**

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. Valencia

RESUMEN

Las alteraciones celulares presentes en la enfermedad periodontal experimental por inyección gingival de inmunocomplejos, las reagrupamos en : degeneración hidrópica de estructuras membranosas, dilatación del RER, dilatación anómala de la cisterna perinuclear, expresivas todas ellas de degeneración celular. Degeneración con áreas de citolisis, citosomas y productos de fagocitosis evidenciados por los fagolisosomas. El periodo de restitución hacia la curación del proceso, con sustitución y reorganización completa, está notablemente acortado –menos de la mitad– en los animales irradiados con Láser IR diariamente durante 2-3 semanas.

PALABRAS CLAVE: Láser IR. Enfermedad periodontal experimental. Antiinflamatoria.

SUMMARY

The cellular alterations present in the experimental periodontal disease an caused by a gingival injection inmunocomplexes we group them in: the hydropic degeneration of membranois structures, a dilation of RER an anomalus dilation the perinuclear cistern, all of them showing a cellular degeneration. The cellular degeneration with areas of cytolisis, cytosomes and products of the phagocytosis demostrated by the phagolisosomas. The period of restoration to the process of recovering with the substitution and complete reorganization, the period which is remarkably shortened by less than half in the animals which are irradiated with laser IR daily for 2-3 weeks.

KEY WORDS: Laser IR. Exp. Periodontal Illness. Antiinflammatory.

Introducción

La gran trascendencia de la enfermedad periodontal actualmente y el creciente interés despertado por la radiación Láser como agente terapéutico en el campo médico, nos indujo a comprobar su acción sobre dos cuadros inflamatorios, agudo y crónico, provocados en la mucosa gingival de la rata albina, cepa Wistar. Sometiendo dichos campos inflamatorios a sucesivas irradiaciones Láser IR, demostrando sus propiedades antiinflamatorias a nivel ultraestructural.

Los procesos inflamatorios son producidos por inyección de complejos inmunes formados por IgG humana y anti IgG humana procedente de conejo. Procedemos con dos técnicas, inyección única en la mucosa gingival vestibular provocando un proceso agudo similar al flemón paradental agudo e inyección repetitiva en mucosa palatina a nivel del primer molar desencadenando un infiltrado crónico que recuerda según Golub, Garant y Ramamurthy la enf. periodontal humana o periodontitis crónica destructiva, sirviéndonos como modelos experimentales para la posible aplicación del Láser IR en el campo clínico como antiinflamatorio.

Material y Método

Partimos de 32 ratas albinas de la cepa Wistar, repartidas en 8 series:

- 4 testigos.
- 4 simuladas.
- 4 experimentales de 4 días, representan el momento de eclosión del proceso agudo.
- 4 experimentales que representan el momento de eclosión del proceso agudo con atenuación de la sintomatología en el área vestibular y establecimiento del infiltrado celular crónico en m. palatina.
- 4 experimentales irradiadas de 8 días.
- 4 experimentales de 16 días.
- 4 experimentales irradiadas de 16 días, representa la curación del proceso debido a la acción antiinflamatoria de los Láser IR.
- 4 experimentales de 34 días, representa la curación del proceso por medios naturales.

Dentro de las series experimentales irradiadas disponemos de las series de 8 y 16 días y cuyas características resumimos:

Experimento de 8 días.	Experimento de 16 días.
Inyec. única vestibular-día 1.	Inyec. única vestibular-día 1.
Inyec. repetida palatina-1,3,5 y 7 días.	Inyec. única palatina.
Irradiación diaria.	Irrad. diaria durante 16 días a partir eclosión.
Sacrificio día 8.	Sacrificio día 16.
Serie exp. y exp. irrad.	Serie exp. y exp. irrad.

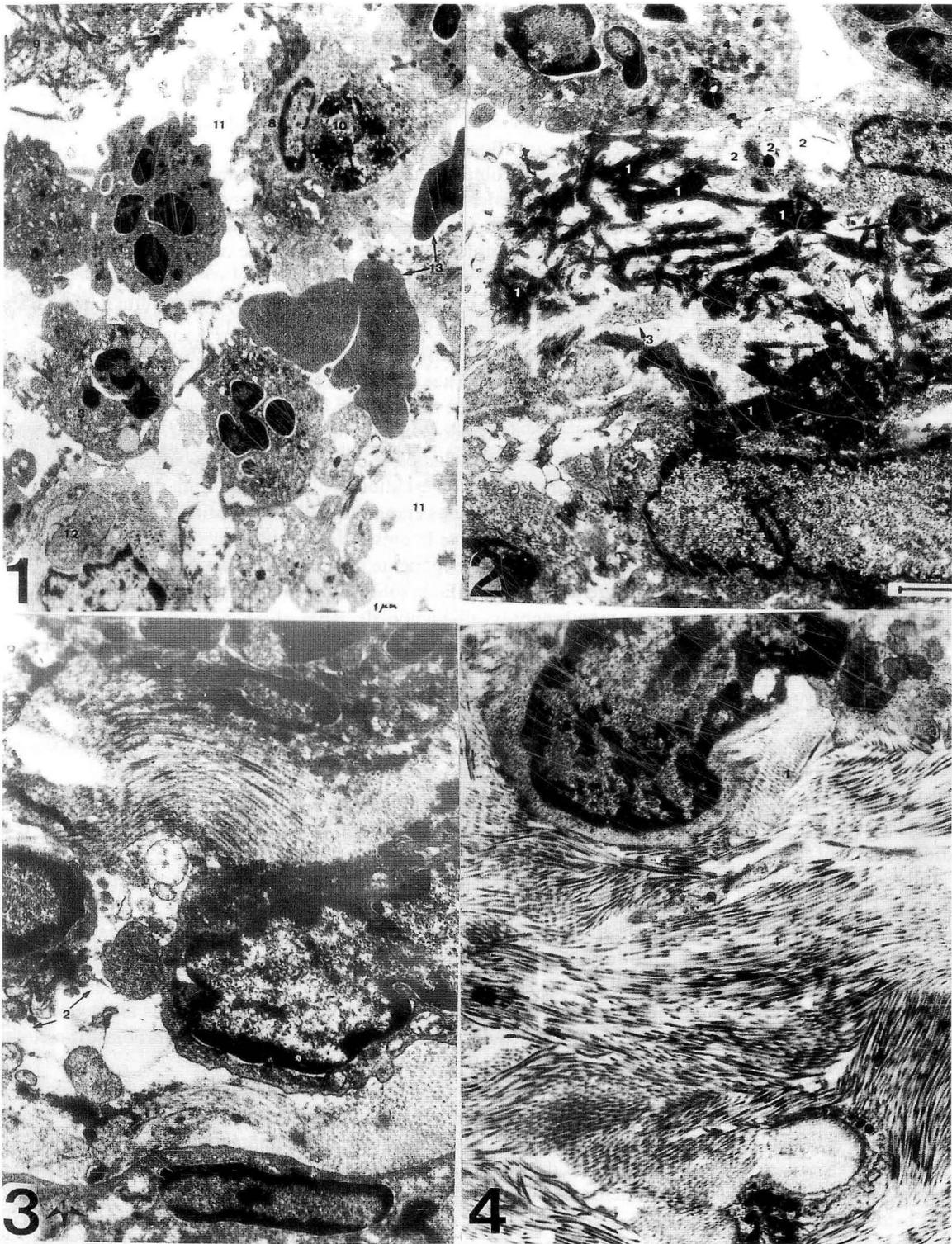
La irradiación de los animales se lleva a cabo diariamente con Láser IR 904 nm, 8-10W potencia pico, 4.000Hz de frecuencia y 5 min. tiempo de exposición, dosis total 0,6-1 J/cm².

En los días determinados se procede al sacrificio del animal y extracción de la pieza para su procesamiento a microscopia electrónica, contrastando los cortes para mayor nitidez de las estructuras con el método de Reynolds del citrato de plomo.

Resultados y Discusión

Vamos a detallar los resultados obtenidos en el estudio ultraestructural de los componentes celulares.

Comencemos por las alteraciones citoplásmicas, como las modificaciones de las organelas membranosas. Se observan cambios degenerativos tal como degeneración hidrópica de las mitocondrias, con extracción de la matriz, abombamiento, fragmentación y transformación en lamelas densas de las crestas mitocondriales. Más evidente en las series experimentales de 8 días, con inflamación subaguda en unos casos e infiltrado celular en otras. En la serie experimental de 4 días las hemos visto hacerse coalescentes hasta vacualizarse.



- FIGURA 1.** Exp. 4d. 2.000X. Proceso inf. agudo.
FIGURA 2. Exp. 4d. 4.500X. Vacuolas líticas.
FIGURA 3. Exp. 8d. 6.800X. Fagolisosoma diabético.
FIGURA 4. Exp. 8d. Irrd. Proceso inf. crónico. Cel. Cebada.

A nivel del retículo endoplásmico rugoso se aprecia dilatación con fusión intercisternal dando lugar a un sistema canalicular laberíntico, en algunas zonas muestra fragmentación de membranas limitantes para formar típicos citosomas. Encontrándose en las series experimentales de 4 y 8 días.

Con referencia al núcleo, en las serie experimental de 8 días, encontramos dilataciones anómalas de la cisterna perinuclear en leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

Se pueden destacar identaciones nucleares en fibroblastos con falsas imágenes de dinucleación, perteneciente a la serie experimental de 16 días, encontrando una serie de mitocondrias de apariencia normal. Existen también polirribosomas y un buen RER, situado este fibroblasto en la vecindad de una zona de fibrosis donde las fibras adoptan una distribución anárquica, apreciándose también fibras de colágena de aspecto normal y estriación transversal.

En la series experimentales de 4 días desaparece el nucléolo y núcleo disminuye de volumen hasta hacerse picnótico en ocasiones con gran condensación de la cromatina y degeneración celular.

En la superficie celular podemos ver desde ligeras modificaciones como disminución de los fenómenos de pinocitosis, observados sobre todo en la serie experimental sin irradiar de 16 días, hasta verdaderas soluciones de continuidad que conducen a la rotura total y desintegración de la célula.

Como suceso caraterístico de este experimento, realizado con la inyección intragingival de inmunocomplejos, queremos destacar la numerosa presencia de numerosos productos de fagocitosis, evidenciados por los fagolisosomas encontrados en los fagocitos mononucleares en varios estadios evolutivos. Se trata de inmunocomplejos fagocitados a los que se les ha unido un lisosoma en distintas etapas evolutivas, constituyendo el fagolisosoma, expresión de uno de los mecanismos de defensa celular ante la presencia de cuerpos extraños. Los encontramos preferentemente en la serie experimental de 8 días como exponente de un proceso inmunológico activo.

Resumiendo, se han visto cambios degenerativos, celulares sobre todo, en las series de 4 y 8 días tales como: degeneración hidrópica de estructuras membranosas, dilatación de RER, dilatación anómala de la cisterna perinuclear, degeneración celular con áreas de citolisis, citosomas y productos de la fagocitosis evidenciados por los fagolisosomas, siendo menos severos estos cambios degenerativos en la serie experimental de 8 días como exponente de su paso a la cronicidad. Vistos los resultados a microscopia electrónica bajo una concepción general podemos detallar cuáles han sido los cambios a nivel particular en cada estirpe celular considerada.

Así vemos neutrófilos y macrófagos con fagolisosomas de Ag-Ac. Estos fagolisosomas no aparecen en las series simuladas, inyectadas con solución salina.

Los monocitos se nos caracterizaron por la presencia de largos y sinuosos procesos celulares, filas paralelas de RER y gránulos liposomiales. A veces contenían fagolisosomas, marcándose así su diferenciación a macrófagos.

También hemos captado la presencia de Linfocitos-lake (linfocitos B) más grandes que los linfocitos con perfiles de RER, indicando su diferenciación a plasmoblastos.

Linfocitos con condensaciones periféricas de heterocromatina, ribosomas libres y pocas organelas. Células cebadas repletas de histamina a punto de degranulación. Células plasmáticas claramente diferenciadas. Fibroblastos con un buen ap. de Golgi y RER normal.

Presencia de colágeno intracelular, hallazgo poco frecuente, y en algunos casos ciertas alteraciones mitocondriales con pérdida de las crestas, se podría especular sobre la posibilidad de que los fibroblastos estuvieran algo hipertrofiados.

Un hallazgo relativamente frecuente ha sido la presencia de leucocitos eosinófilos con las típicas inclusiones cristalinas de peroxidasa β nucleoides que se observaron en las series de 8 días con proceso inflamatorio subagudo, leucocitos que acudieron al foco inflamatorio atraídos por el FQE (factor quimiotáctico de los eosinófilos).

Si comparamos las series experimentales de 4 días con las series experimentales de 8 días sin irradiación podemos observar una discreta disminución de la sintomatología como exponente de su paso a la cronicidad.

Si estudiamos las series de 16 días sin irradiación encontramos una mejoría notoria de las alteraciones citopáticas e incluso extracelulares, y finalmente si analizamos la serie experimental de 16 días irradiada observamos una "restitutio ad integrum" total con reorganización completa tanto del material intracelular como del extracelular, de donde podemos concluir que:

- La acción antiinflamatoria de la radiación Láser IR se deja notar con sólo 4 días de irradiación, sobre un campo inflamatorio agudo.

–La acción antiinflamatoria se hace más patente cuando irradiamos el proceso inflamatorio agudo durante 16 días llegándose prácticamente a la "restitutio ad integrum".

– Siendo consecuencia general que la radiación Láser IR aplicada en un proceso inflamatorio con un ritmo diario y durante un periodo de tiempo de 2–3 semanas es un potente y eficaz antiinflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, G.S. y STERN, J. B. (1966): The proliferation and migration of the attachment epithelium on the cemental surface of the rat incisor. *Periodontics.*, **4**: 15.
- COHEN. B., y CRAMER, I.R.M. (1981): Fundamentos científicos de odontología. Salvat.
- FREEDMAN, H.L.; LISTGARTEN, M.A. y TAICHMAN, N.S. (1968): Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. *J. Periodontal Res.*, **3**: 313.
- GARANT, P.R. (1975): An electron microscopic study of the periodontal tissues of germfree rats and rats monoinfected with *actinomyces naeslundii*. *J. Periodontal Res. (suppl)*, **15**: 1.
- GARANT, P.R. y CHO, M.I. (1979): Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. II ultrastructural feature of the inflamed subepithelial connective tissue. *J. Periodontal. Res.*, **14**: 310.
- GARANT, P.R. (1976): Collagen resorption by fibroblast. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. *J. Periodontal.*, **47**: 380.
- GOLUB, L.M.; GARANT, P.R. y RAMAMURTHY, N.S. (1977): Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan diabetic rat. *J. Periodontal Res.*, **12**: 402.
- GAVIN, J.B. (1970): Ultrastructural features of chronic marginal gingivitis. *J. Periodontal Res.*, **5**: 19.
- MULLER–GLAUSER, W. y SCHROEDER, H.E. (1982): The pocket epithelium: A light electromicroscopic study. *J. Periodontal*, **53**: 133.
- MAZZELLA, W.J. y BERNICK, S. H. (1968): The ultrastructure of normal and pathologic human gingival epithelium. *J. Periodontal*, **39**: 5.
- RIDER, M. (1980): Histological and ultrastructure characteristic of the periodontal syndrome in the rice rat. *J. Periodontal*, **15**: 585.
- TAKARADA, J.; CATTONI, M.; AKISADA, S. y ROSE, G. (1974): Ultrastructural studies of human gingiva. II the lower part of the pocket epithelium in chronic periodontitis. *J. Periodontal*, 155-169.

Correspondencia: A. Victoria Fuster
Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
San Agustín, 2 A
46.111 Valencia. España

ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EXTRACELULARES DE LA MUCOSA GINGIVAL DE LA RATA ALBINA CON ENFERMEDAD PERIODONTAL EXPERIMENTAL SOMETIDA A IRRADIACIÓN LÁSER IR COLAGENOLISIS (II)

ELECTRONIC MICROSCOPE STUDY OF EXTRACELLULAR MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE GINGIVAL MUCOSE OF ALBINO RAT WITH EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE, SUBJECTED TO A LASER IR IRRADIATION. COLLAGENOLISIS (II)

A. CAMPOS, A. VICTORIA, M. MONTESINOS, E. FERRES-TORRES y V. SMITH-AGREDA

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. Valencia. España

RESUMEN

La enfermedad periodontal experimental nos ha permitido observar a ME los cambios sufridos por el tejido conjuntivo en el desarrollo del proceso inflamatorio, desorganización, disociación y degeneración, fibrosis y disminución del diámetro de las fibras. Evidenciándose en los animales sometidos a tratamiento de irradiación Láser IR, una marcada acción anticolagenolítica, acortándose considerablemente el periodo de recuperación de la normalidad.

PALABRAS CLAVE: Láser IR. Colagenolisis. Anticolagenolítica.

SUMMARY

The experimental periodontal disease has permitted us to observe ME the changes suffered by conjunctive tissue in the development of the inflammatory process, the disorganization, the dissociation, and the degeneration fibrosis and the decrease in the diameter of the fibres. A remarkable anticollagenolítica is evident in the animals which have been submitted to a laser IR radiation treatment with a considerable shortening of the recovery period to normality.

KEY WORDS: Laser IR. Collagenolisis. Anticollagenolítica.

Introducción

La gran trascendencia de la enfermedad periodontal actualmente y el creciente interés despertado por la radiación láser como agente terapéutico en el campo médico, nos indujo a comprobar su acción sobre dos cuadros inflamatorios, agudo y crónico, provocados en la mucosa gingival de la rata albina, cepa Wistar. Sometiendo dichos campos inflamatorios a sucesivas irradiaciones Láser IR, demostrando sus propiedades antiinflamatorias a nivel ultraestructural.

Los procesos inflamatorios son producidos por inyección de complejos inmunes formados por IgG humana y antiIgG humana procedente de conejo. Procedemos con dos técnicas, inyección única en la mucosa gingival vestibular provocando un proceso agudo similar al flemón paradontal agudo e inyección repetitiva en mucosa palatina a nivel del primer molar, desencadenando un infiltrado crónico que recuerda, según Golub, Garant y Ramamurthy la enfermedad periodontal humana o periodontitis crónica destructiva, sirviéndonos como modelos experimentales para la posible aplicación del Láser IR en el campo clínico como antiinflamatorio.

Material y Método

Partimos de 32 ratas albinas de la cepa Wistar, repartidas en 8 series:

- 4 testigos.
- 4 simuladas.
- 4 experimentales de 4 días, representan el momento de eclosión del proceso agudo.
- 4 experimentales que representan el paso a la cronicidad del proceso agudo con atenuación de la sintomatología en el área vestibular y establecimiento del infiltrado celular crónico en m. palatina.
- 4 experimentales irradiadas de 8 días.
- 4 experimentales de 16 días.
- 4 experimentales irradiadas de 16 días, representa la curación del proceso debido a la acción antiinflamatoria de los Láser IR.
- 4 experimentales de 34 días, representa la curación espontánea del proceso por medios naturales.

Dentro de las series experimentales irradiadas disponemos de las series de 8 y 16 días, con las características generales de producción del proceso inflamatorio agudo o crónico y de irradiación descritos, sacrificándolos en la fecha determinada.

La irradiación se realiza con un aparato Cavity de IR de 904 nm, 8-10 W de potencia fija pico, 4.000 Hz de frecuencia y 5 min. de tiempo de exposición con una dosis total de 06-1J/cm².

Las piezas se fijan con glutaraldehído al 5 % para su posterior procesamiento para microscopía electrónica, contrastando los cortes para mayor nitidez de las estructuras con el método de Reynolds del citrato de plomo.

Resultados y Discusión

A nivel ultraestructural, además de las alteraciones celulares que ya han sido motivo de estudio, encontramos alteraciones del medio extracelular y del componente colágeno.

Las alteraciones más importantes en la biopatología ultraestructural del colágeno son:

- Desorganización, disociación y degeneración.
- Incremento patológico-fibrosis-.
- Disminución del diámetro individual de las fibras.

Debido a la acción degradativa enzimática de la colagenasa y mucopolisacaridasa o hialuronidasa proveniente de los polimorfonucleares, hemos encontrado una desorganización e incluso degeneración del colágeno en múltiples áreas. Hay edema con resolución intersticial de las fibras, que aparecen desflecadas y desnaturalizadas. Parece ser que el primer paso sería la degradación de la sustancia cementante, sustrato sobre el que asientan las fibrillas para constituirse en fibras. Dicha sustancia constituye cadenas laterales unidas a la proteína colágena y son las primeras en degradarse, apreciándose un incremento en el tamaño de los espacios interfibrilares con la consiguiente disociación de las fibras. La explicación de estos fenómenos se halla en la disgregación de los enlaces inter e intramoleculares, así como en la rotura en los enlaces electrostáticos con las cadenas laterales de mucopolisacaridos. Un paso más en este deterioro del colágeno sería la alteración de la arquitectura de las fibras

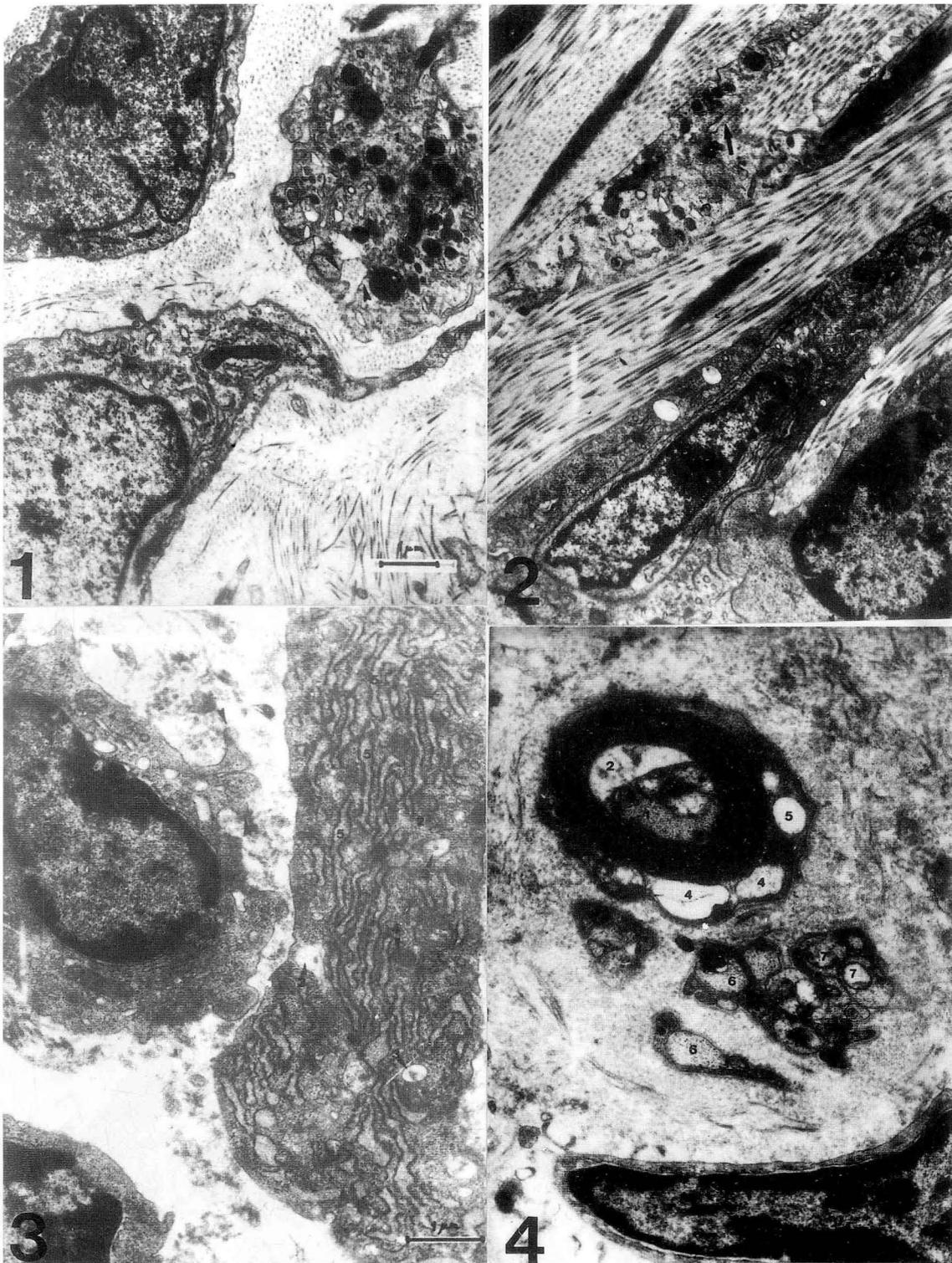
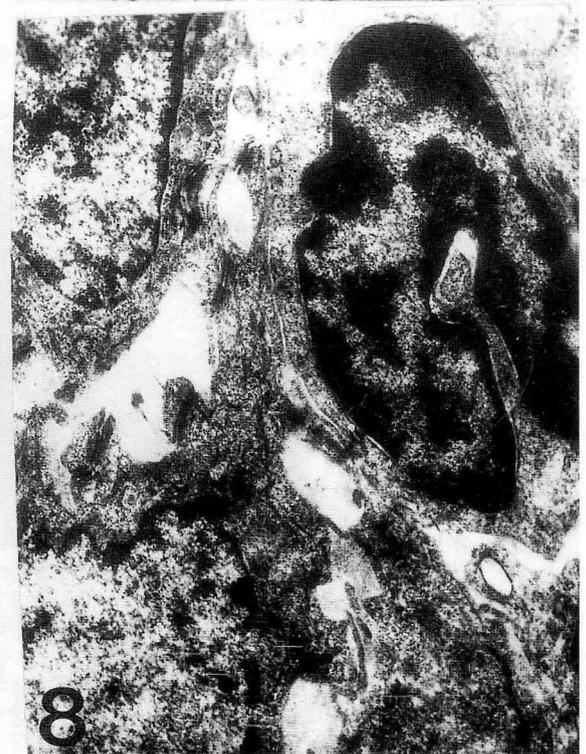
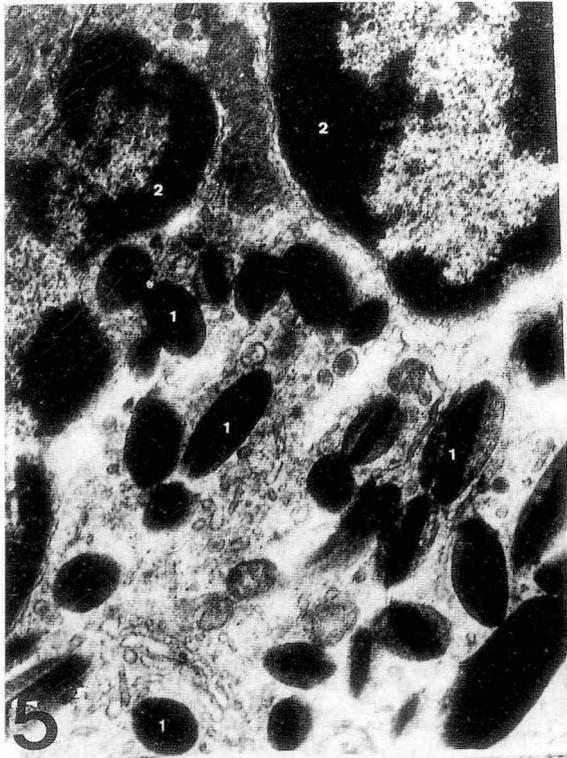


FIGURA 1. Exp. 4 días 4.500 X. Colágeno desorganizado.
FIGURA 2. Exp. 8 días 6.000 X. Proceso Inf. Crónico. Fibra de colágeno fagocitado.
FIGURA 3. Exp. 8 días 6.000 X. Irradiada Inf. Cel. Cr. Prolongación pseudopódica del monocito.
FIGURA 4. Exp. 8 días 4.600 X. Irradiada. Cschwann. Fagolisosomas.



- FIGURA 5.** Exp. 8 días 13.000 X Irradiada. Inclusiones cristalinas.
FIGURA 6. Exp. 16 días 5.000 X. Splitting de la vaina de mielina.
FIGURA 7. Exp. 16 días Irradiada. Fibroblasto, queratinocito.
FIGURA 8. Exp. 8 días. Exocitosis transepitelial.

manifestada por la pérdida de las típicas bandas cruzadas del colágeno insoluble, disminuye el grosor y la típica periodicidad axial.

Consecuencia de esta separación de las moléculas de la sustancia cementante se encuentra aflojamiento e intumescencia de las fibras maduras, siendo estos cambios propios de estadios más precoces.

Un hecho constante y de gran relevancia anatómo-patológica, presente en los dos modelos experimentales (PIA y ICC) es la reducción en la concentración del colágeno que detectamos tanto en microscopía óptica electrónica y a nivel funcional por el análisis cuantitativo de la excreción urinaria de hidroxiprolina. Además de la acción degradativa extracelular de la LPMN también intervendría la endocitosis o digestión intracelular de fibras maduras de colágeno intacto. A nivel ultraestructural hemos encontrado tres niveles gradativos de esta posible fagocitosis y digestión intracelular a cargo de los monocitos fibroblastos, observándose claramente una fibra madura, con su típica periodicidad axial de 640 Å totalmente intracelular.

Se han observado áreas de fibrosis próximo a focos de gran destrucción tisular, constituidos por paquetes de fibras orientadas anárquicamente, sin patrón de orientación alguna.

Es evidente una disminución del componente colágeno en zonas de gran infiltración inflamatoria y en relación con la intensidad de éste. Pérdida de colágeno debida a la degradación enzimática del colágeno extracelular por las enzimas liberadas por las células inflamatorias.

La presencia de fibras de colágeno fagocitadas, descritas anteriormente por el fibroblasto en ese proceso de digestión intracelular, también adscrito al macrófago y al osteoclasto, ha determinado que autores denominen al fibroblasto en estas ocasiones como fibroclasto.

Otro factor que también influiría en la disminución del colágeno sería la inhibición de la colagenogénesis de colágeno, por la interacción del linfocito sensibilizado con el fibroblasto. Influida por los cambios citopáticos del fibroblasto, consecuentes a la acción directa del linfocito sensibilizado y a la liberación de linfocinas.

Con relativa frecuencia hemos observado la presencia de gotas lipídicas que podría considerarse como un cambio citopático con posible interacción con la síntesis del colágeno.

Ampliamos este estudio ultraestructural a otras estructuras presentes en la zona y que presentan así mismo modificaciones, tal como a nivel del sistema nervioso periférico donde se observan lesiones degenerativas en axones y células de Schwann y rechazo del axón por la franja del citoplasma donde termina la vaina de mielina que se encuentra dilatada.

En las hojas de cebolla de la vaina de mielina, hemos visto lesiones de "splitting" o separación de las mismas.

Hemos encontrado fenómenos de trasépitelial, encontrando elementos inflamatorios como linfocitos en el estrato espinoso, explicables por el aumento de las defensas naturales y de la permeabilidad transepitelial. Se trata de elementos linfocitos pequeños con núcleo redondeado u oval, rodeado por un estrecho halo citoplásmico, en otras ocasiones el núcleo presenta numerosas indentaciones. Quizás se trate de linfocitos T sensibilizados que atraviesan la barrera epitelial para aumentar las defensas del organismo, acudiendo al lugar atraídos por sustancias quimiotácticas liberadas por los queratinocitos lesionados, estos linfocitos a su vez liberarían sustancias quimiotácticas que lesionarían a su vez a los queratinocitos, creándose un círculo vicioso.

Independientemente del modelo inflamatorio conseguido en ambos casos, existe una respuesta inflamatoria gingival con alteraciones cuantitativas y cualitativas del colágeno.

La acción antiinflamatoria del Láser IR se deja sentir con sólo 4 días de irradiación sobre un campo inflamatorio agudo, como se deduce del comportamiento de las series de 8 días irradiadas y sin irradiar.

Esta acción antiinflamatoria anticolagenolítica es más patente cuando irradiamos un proceso inflamatorio agudo durante 16 días consiguiendo la "restitutio ad integrum".

Y como consecuencia general la radiación Láser IR aplicada en un proceso inflamatorio con un ritmo diario y por un periodo de tiempo comprendido entre 2-3 semanas, es un potente y eficaz antiinflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, G.S. y STERN, J.B. (1966): The proliferation and migration of the attachment epithelium on the cemental surface of the rat incisor. *Periodontics*, **4**: 15.
- COHEN, B. y CRAMER, I.R.M. (1981): Fundamentos científicos de odontología. Salvat.
- FREEDMAN, H.L.; LISTGARTEN, M.A. y TAICHEMAN, N.S. (1968): Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. *J. Periodontal Res.*, **3**: 313.
- GARANT, P.R. (1975): An electron microscopic study of the periodontal tissues of germfree rats and rats monoinfected with *actinomyces naeslundii*. *J. Periodontal Res. (suppl)*, **15**: 1.
- GARANT, P.R. y CHO, M.I. (1979): Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. II ultrastructural feature of the inflamed subepithelial connective tissue. *J. Periodontal Res.*, **14**: 310.
- GARANT, P.R. (1976): Collagen resorption by fibroblast. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. *J. Periodontal Res.*, **47**: 380.
- GOLUB, L.M.; GARANT, P.R. y RAMAMURTHY, N.S. (1977): Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan diabetic rat. *J. Periodontal Res.*, **12**: 402.
- GAVIN, J.B. (1970): Ultrastructural features of chronic marginal gingivitis. *J. Periodontal Res.*, **5**: 19.
- MAZZELLA, W.J. y BERNICK, S. H. (1968): The ultrastructure of normal and pathologic human gingival epithelium. *J. Periodontal Res.*, **39**: 5.
- MULLER-GLAUSER, W. y SCHROEDER, H.E. (1982): The pocket epithelium: A light electromicroscopic study. *J. Periodontal Res.*, **53**: 133.
- RIDER, M. (1980): Histological and ultrastructure characteristic of the periodontal syndrome in the rice rat. *J. Periodontal Res.*, **15**: 585.
- TAKARADA, H.; CATTONI, M.; AKISADA, S. y ROSE, G. (1974): Ultrastructural studies of human gingiva. II the lower part of the pocket epithelium in chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 155-169.

Correspondencia: A. Victoria Fuster
C/ San Agustín, 2 A
46.111 Rocafort. Valencia. España

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

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. 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.

PALABRAS CLAVE: Hipófisis. Lóbulo intermedio. Células PAS positivas. Células folículo estrelladas. Serotonina. Mamíferos.

SUMMARY

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.

KEY WORDS: Hypophysis. Pars intermedia. Pas positive cells. Serotonin.

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 dio nombre de intermediocitos (Amat y col., 1976), células principales (Van Eys, 1980 a), 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 secretora, 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 (1980 b) 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 1979 a 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 foliculo-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 secreción de coloide (Bergland y Torack, 1969) y fagocitosis de células degeneradas (Farquhar, 1971 y Dingemans y Feltkamp 1972).

La existencia de reactividad positiva al PAS en las células foliculo-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 intracardíaca 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 μ m. de espesor con cuchilla de vidrio.

Inmunocitoquímica

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 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 han 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 cómo 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 polimorfismo (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 débilmente 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 teleosteos (Groves y Batten, 1985 y Margolis-Kazan y col., 1985), donde intervendrían como elemento especial 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 lepóridos (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.

Tras descartar la posible existencia de reacciones cruzadas del suero anti-serotonina, nunca superiores al 1%, con fracciones proteicas 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.

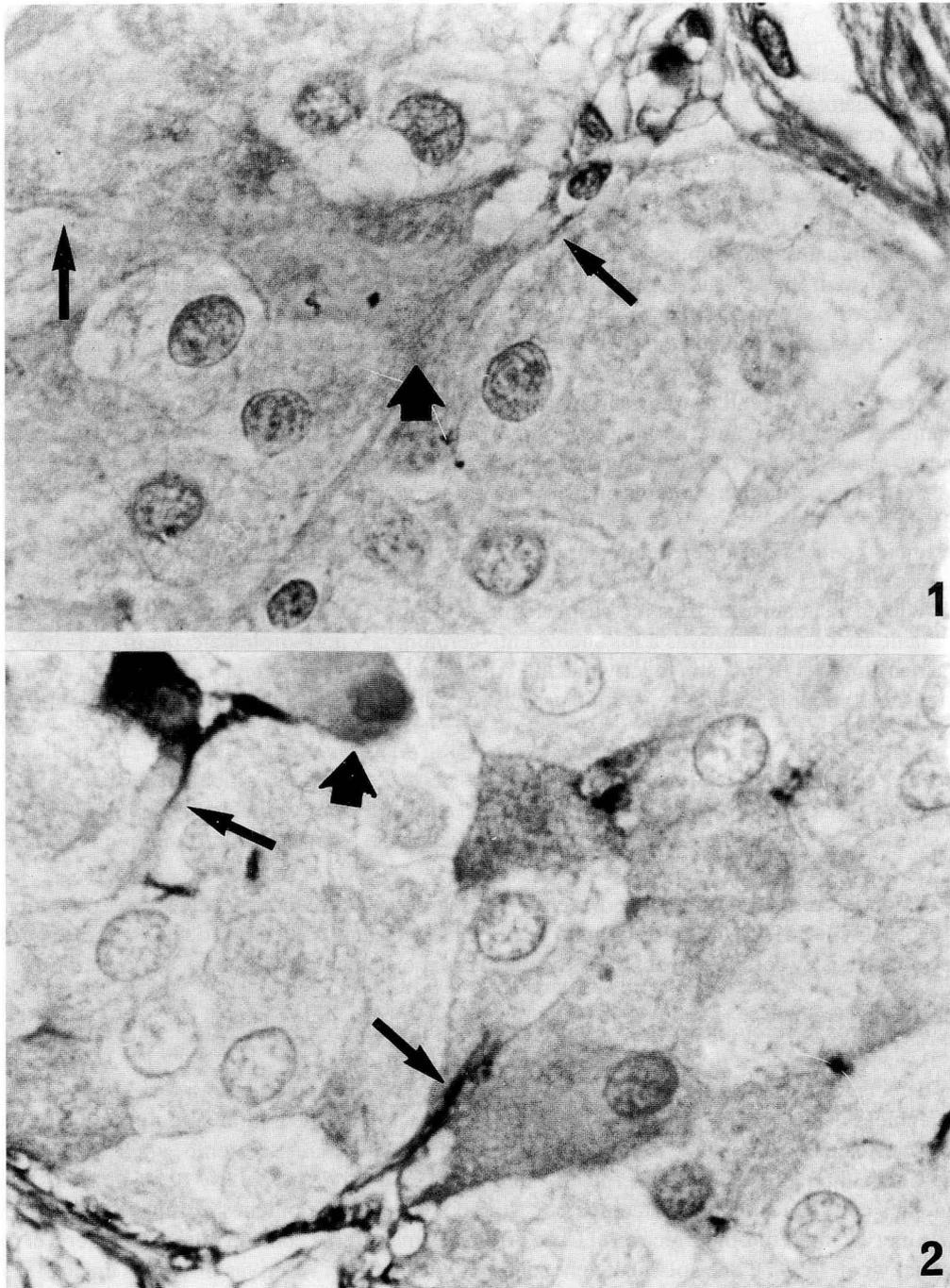
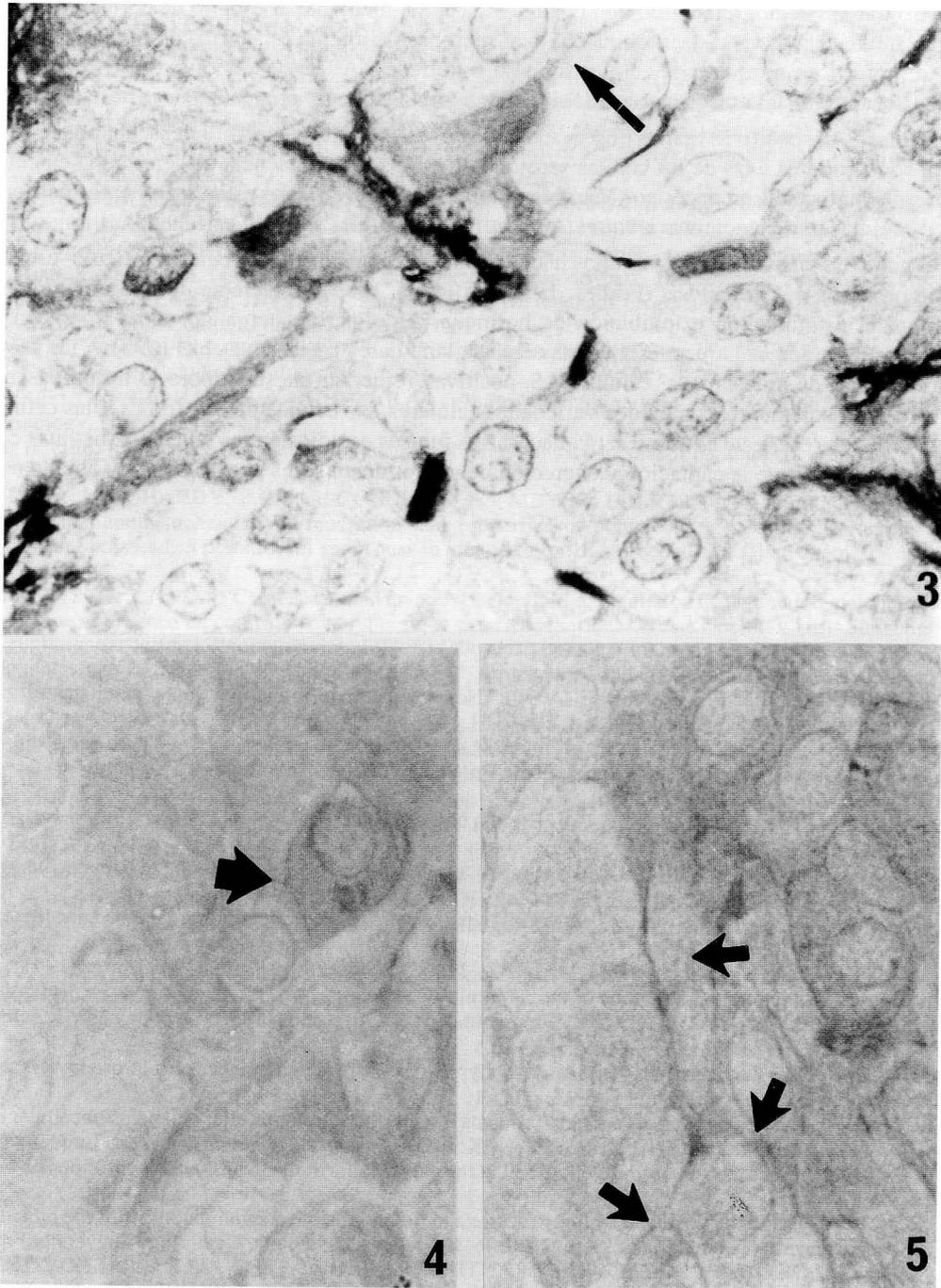


FIGURA 1. Célula poligonal mostrando inmunorreactividad a un suero antiserotonina (flecha ancha). Se aprecia la existencia de prolongaciones citoplásmicas (flechas estrechas) con una longitud variable. X 6.000.

FIGURAS 2 y 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 6.000.



FIGURAS 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 citoplásmicas muy extensas (fig. 5, flechas). X 6.000.

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 folículo estrelladas (Allaerts, 1989); si bien, frente a este último suero, hemos observado algunos elementos débilmente 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 folículo estrelladas.

Desde el punto de vista funcional, algunos hechos como la capacidad de las células folículo-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 folículo estrelladas. Para esclarecer este extremo serán necesarios futuros estudios en los que, bajo distintas condiciones experimentales, se confirme la captación y excreción de neurotransmisores por las células folículo estrelladas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLAERTS, W. (1989): "Involvement of folliculo-stellate cells in inhibitory interactions in rat anterior pituitary: a morpho-functional study in vitro". *Acta Biomedica Lovaniensia*. 62-76. Katholieke Universiteit te Leuven. Bélgica.
- 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 radioautographique chez le rat". *Bull. Soc. Neuroendoc. Exp.*, **1**: 15.
- CARVAJAL, J.C.; CARBAJO, S.; CARBAJO-PÉREZ, E.; CASTRO, S. y ROGRÍGUEZ, 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. Zellforsch.*, **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.
- FORTES, C. L. (1971): "Relationship between ultrastructure and function in the adenohypophysis of the rabbit". *Subcellular organization and function in endocrine tissues*, 125-146. H. Heller y K. Lederis. Cambridge University Press. London.
- FRIEDMAN, 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): 1.943-1.947.
- 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.*, **271**: 2.159-2.162. Paris.
- 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-SEBELD, L.R. y SCHREI MAN, M.P. (1985): "Immunocytochemical localization of serotonin in the brain and pituitary gland of the platyfish, *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.*, **75**: 109-112. Paris.
- OLIVEREAU, M. y OLIVEREAU, J. (1979a): "Effect of estradiol-17 β on the cytology of 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 osmorregulation comparison chez L'Anguille Europeéne 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 NÚÑEZ, E.A. (1985): "Serotonergic elements of the mammalian pituitary". *Endocrinology*, **116**: 1.933-1.942.
- 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): "Caracterisation d'un nouveau modèle de régulation de la fonction mélanotrope: régulation peptidergique et absence de contrôle dopaminergique chez les léporides". Tesis Doctoral. ULP Strasbourg.
- STOECKEL, M.E.; SCHIMCHOWITSCH, S.; GARAUD, J.; SCHMITT, G.; VAUDRY, H. y PORTE, A. (1983): "Immunocytochemical evidence of intragranular acetylation of β -MSH 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 β -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.
- VANEYS, G.J.J.M. (1980a): "Structural changes in the pars intermedia of the cichlid teleost *Sarotherodon* and illumination. I. The MSH producing cells". *Cell. Tiss. Res.*, **208**: 99-110.
- VANEYS, G.J.J.M. (1980b): "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. Endocrinol.*, **31**: 279-287.

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

TIPIFICACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE LOS ELEMENTOS GLIALES Y NEURONALES EN CULTIVOS DE CORTEZA FETAL DE RATA

IMMUNOCYTOCHEMICAL TYPIFICATION OF GLIAL AND NEURONAL ELEMENTS IN CULTURE OF RAT FETAL CORTEX

J. CARRETERO, F. SÁNCHEZ, J.A. JUANES, R. GONZÁLEZ, J.M. RIESCO,
E. BLANCO y R. VÁZQUEZ

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

RESUMEN

Empleando el método inmunocitoquímico de la PAP con suero específico contra proteína fibrilar ácida (GFAP), enolasa neuronal específica (NSE) y la subunidad de proteína de neurofilamento NF-70, se desarrolla un estudio de los elementos celulares obtenidos a partir de dispersiones celulares de cortezas cerebrales de ratas obtenidas en el día 17 del desarrollo fetal. Se valoran las características morfológicas de las células gliales y neuronales durante las dos primeras semanas de cultivo, así como la correlación GFAP, NSE y NF-70 a lo largo del desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Glía. GFAP. Enolasa neuronal específica. NF-70 proteína de neurofilamento. Corteza cerebral. Cultivos celulares.

SUMMARY

By means of the PAP immunocytochemical method with specific sera against glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuronal specific enolase (NSE) and neurofilament (NF-70) protein, a study of the cellular elements obtained from dispersed cells of cerebral cortex (taken from rats on day 17 of fetal life) was carried out. The morphological features of the both types of cells (glia and neurons) during the two first week of incubation of the culture as well as the correlation of GFAP, NSE and NF-70, was evaluated.

KEY WORDS: Glia. GFAP. Neuronal specific enolase. NF-70 neurofilament protein. Cerebral cortex. Cultures.

Introducción

Dentro del término general de filamentos intermedios, se diferencian cinco clases, siendo cada una de ellas específica de un tipo o línea celular (Liem y col., 1978; Lazarides, 1980; Anderton, 1981; Steiner y Parry, 1985; Traub, 1985). De ellas, los filamentos gliales, formados por una proteína de 54 KDa (GFAP), marcan específicamente células gliales y los neurofilamentos, las neuronas (Liem y col., 1982; Norton y Goldman, 1980; Schaalaepper, 1987; Robinson y Anderton, 1988). La enolasa neuronal específica (NSE), enzima intracitoplásmica glucolítica (Schmechel y col., 1978; Marangos y Schmechel, 1980), es otro marcador neuronal; sin embargo, su especificidad es menor que la de los neurofilamentos ya que puede marcar células de estirpe no neuronal (Kato y col., 1982; Vinos y col., 1984; Schmechel, 1985; Haimoto y col., 1985)

Estos marcadores permiten evidenciar la estirpe a la que pertenecen los elementos celulares presentes en cultivos del sistema nervioso. Por ello, con la finalidad de caracterizar morfológicamente los elementos celulares existentes en cultivos monocapa, a partir de corteza cerebral de fetos de ratas de 17-18 días de gestación, a lo largo de la evolución del cultivo, se empleó una batería Inmunocitoquímica que nos permitiera marcar proteína fibrilar glial ácida (GFAP), enolasa neuronal específica (NSE) y la subunidad de proteína de neurofilamento de 68 KDa (NF-70).

Material y Método

Técnica de cultivo

Se utilizaron ratas wistar que se cruzaron en el laboratorio detectándose la preñez por observación al microscopio del fluido vaginal con solución salina (NaCl, 0,15M). En el día 17-18 de la gestación se extrajeron los embriones, mediante proceder quirúrgico aséptico, que fueron colocados en placas de petri con PES (PO₄ O, 1M y NaCl, 0,15M). Tras extraer los fetos del saco embrionario, fueron decapitados, diseccionándose los hemisferios cerebrales en PBS; fueron liberados de las meninges y se lavaron tres veces con solución salina de Hank (HBSS) sin calcio ni magnesio, se suspendieron en el medio de dispersión y se dispersaron mecánicamente con pipetas Pasteur y jeringas con agujas de diámetro sucesivamente menor (20, 21 y 22 gauges). Las suspensiones celulares finales se resuspendieron en un volumen apropiado de medio de cultivo con una concentración final de 5-7 x 10⁶ células/placa, y se incubaron a 37° C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de incubación se renovó periódicamente (4 días) y el desarrollo morfológico de los cultivos se monitorizó mediante microscopía óptica de contraste de fases. El medio de cultivo empleado fue el MEM suplementado con glucosa (6 g/l), 80 mU/ml de insulina, 2% de glutamina y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina. Para el mantenimiento de los cultivos, el MEM se suplementó con 10% de suero fetal bovino y 10% de suero de caballo.

Inmunocitoquímica

El estudio se desarrolló a los 4, 7, 10 y 15 días de incubación, transcurridos los cuales y tras ser retirado el medio, los cultivos fueron lavados en PBS y posteriormente fijados en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1M, pH: 7,4), tras lavado en TBS (tampón Trissalino 0,05M, con un 8% de NaCl, adicionado con Triton X-100 al 0,2%), fueron procesados inmunocitoquímicamente mediante el método de la PAP (Sternberger y col., 1970), usando como sueros primarios, suero anti-GFAP (Dako), suero anti-NSE (Dako) y suero anti-subunidad NF-70. Este último fue obtenido por inmunización a conejos neozelandeses con la subunidad de 68 KDa de proteína de neurofilamento extraída a partir de cerebro de cerdo (siguiendo el método de Shelanski y col., 1973), aislada y cuantificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (según los métodos de Laemmli, 1970 y Lowry y col., 1951, respectivamente). Su especificidad se determinó tras transferencia a papel de nitrocelulosa (Towbin y col., 1979) evidenciando su capacidad de unión a la mencionada subunidad (Schlaepfe y col., 1981). Para inmunocitoquímica se emplearon diluciones de 1:500 para GFAP, 1:800 para NSE y 1:150 para NF-70 en TBS. El suero puente empleado fue suero de cerdo anti-inmunoglobulina de conejo (Dako), a dilución 1/100 en TBS y complejo soluble PAP (Dako), a dilución 1/100, también en TBS. El proceder de revelado fue el método de Graham-Karnovsky (1966), visualizándose la reacción en un microscopio Zeiss-Axiophot.

Resultados

Al evolucionar el cultivo durante la primera semana, se incrementan los elementos celulares, principalmente los de estirpe glial, apenas existentes en el momento del planting, apareciendo ya en el cuarto día de cultivo y presentando una morfología fusiforme y núcleo central. En el día 7 de cultivo, estas células recuerdan a los fibroblastos que aparecen en cultivos de otra naturaleza (fig. 1). Los elementos neuronales, al cuarto día de cultivo,

son células redondeadas e inmunorreactivas a NSE y NF-70 y no a GFAP (fig. 2). Al día séptimo de incubación estas células comienzan a emitir pequeñas prolongaciones citoplásmicas que buscan a otras células vecinas de estirpe neuronal.

La proliferación de células gliales se incrementa a lo largo de la segunda semana de evolución del cultivo, apreciándose, a los 10 días y aún más a los 14 días, tres tipos de distribución celular: el menos frecuente corresponde a células aisladas de características similares a las descritas a los 7 días de incubación, y los otros dos tipos, más frecuentes, se disponen formando grupos celulares. Uno de ellos está formado por pelotones celulares compactos y difíciles de definir, ya que en ellos se mezclan elementos gliales y neuronales de forma anárquica (fig. 3). El otro agrupamiento se hace en extensión, formándose conglomerados aplanados de células gliales, inmunorreactivas a GFAP, en los que el elemento celular predominante son células con un gran núcleo, que toma débilmente la hematoxilina ácida de Mayer, y un amplio citoplasma que lo contornea del que parten largos y anchos procesos que, a modo de puente, unen entre sí los conglomerados dando al cultivo un aspecto de malla (figs. 4 y 5). El soma y los procesos muestran clara inmunorreacción a GFAP, que es de aspecto fibrilar, siendo frecuente el observar imágenes de mitosis en esta estirpe celular.

A los 10 y 14 días de cultivo, asentando sobre los conglomerados celulares o bien situados en las oquedades de la malla glial se disponen los elementos neuronales (inmunorreactivos a NSE y S-70). En los pelotones celulares, las características morfológicas que definen a las células neuronales son imposibles de definir. No ocurre así en las neuronas que se sitúan en las oquedades o mallas de células gliales. Estas neuronas presentan ya características de neuronas maduras con somas pequeños en los que asienta el núcleo y prolongaciones finas (fig. 6) que, en muchos casos, se dirigen hacia otra neurona y llegan a contactar constituyendo cadenas neuronales de dos o más elementos (fig. 7), tanto el soma como las prolongaciones presentan inmunorreacción a NSE y NF-70 (figs. 6, 7 y 8).

Con arreglo a su morfología se distinguen dos tipos principales de neuronas: neuronas bipolares, de soma ovalado con dos prolongaciones en cada uno de sus extremos (flecha en fig. 8) y neuronas multipolares, con muchas prolongaciones dirigidas en todas las direcciones (cabeza de flecha en fig. 8). A veces, se observan neuronas de soma triangular que presentan dos prolongaciones más gruesas partiendo de los extremos y una prolongación, algo más fina, que parte del vértice del soma, siendo este tipo neuronal mucho menos frecuente. Todos ellos presentan somas de pequeño tamaño, con núcleos pequeños e hipercromáticos.

Discusión

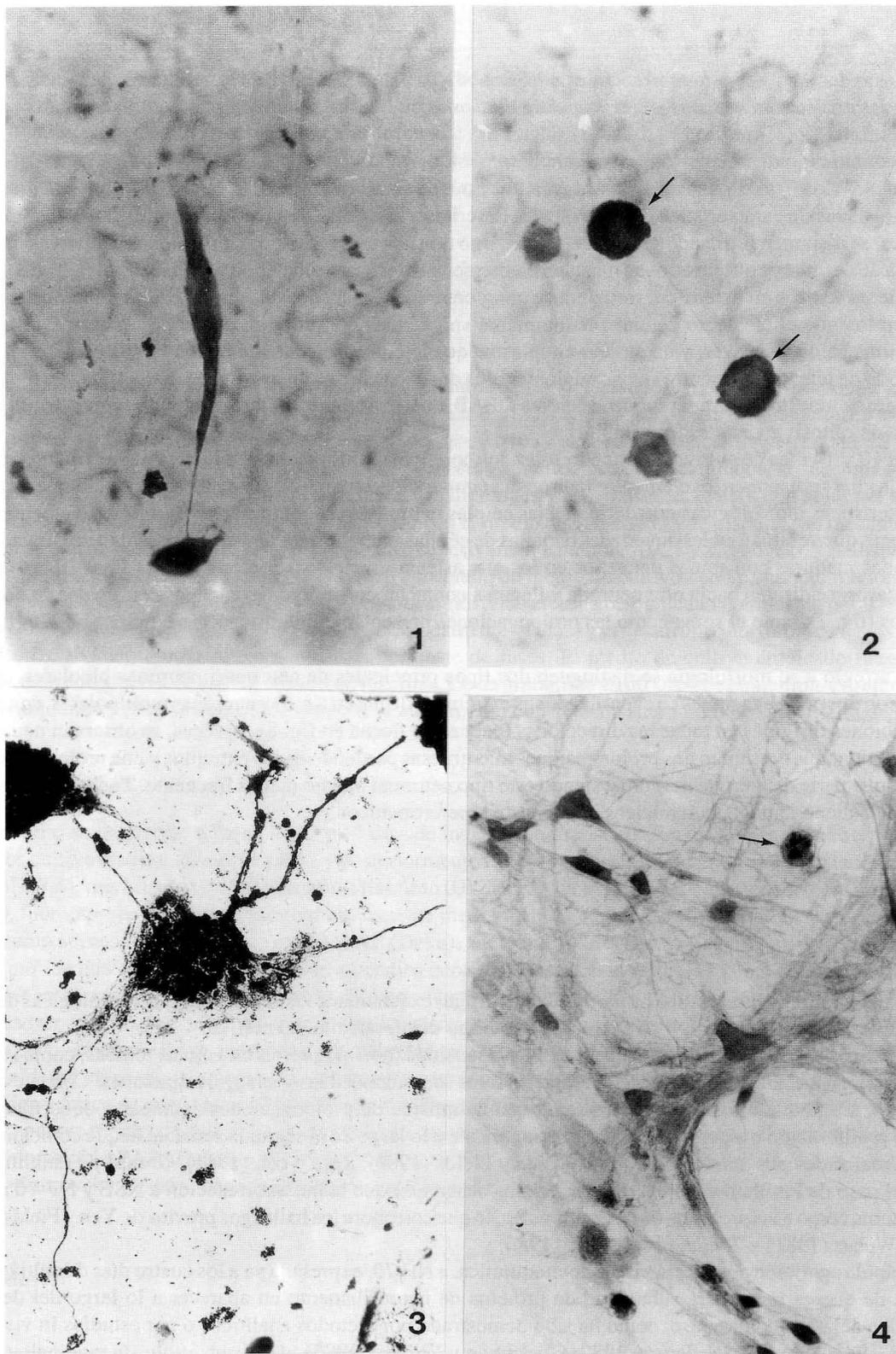
El estudio inmunocitoquímico ha permitido identificar exactamente las características morfológicas de ambos componentes: neuronal y glial, y su evolución a lo largo del desarrollo del cultivo.

Al cuarto día de incubación, hay una gran homogeneidad morfológica en las células teñidas, como resultado de la dispersión mecánica, las células inmunorreactivas son redondeadas y sin prolongaciones. Con la evolución del cultivo, surge una diferenciación neuronal con la emisión de prolongaciones axónicas y dendríticas y una marcada proliferación e hiperplasia glial, principalmente a lo largo de la segunda semana, lo que coincide con los estudios realizados por Sotelo y col. (1980), Yen y Fields (1981), Raju y col. (1981), Grould y Franklin (1987).

En el caso de los elementos neuronales, hemos observado que la inmunorreacción a NSE y NF-70 afectaba tanto al soma como a las prolongaciones neuronales, lo que corrobora los hallazgos previos de Yen y Fields (1981), Shaw y Weber (1981) y Trojanowski y col. (1985).

La rápida aparición de reacción inmunocitoquímica, a NF-70, expresada ya a los cuatro días de cultivo, apoya la teoría de que es la primera subunidad de proteína de neurofilamento en aparecer a lo largo del desarrollo ontogénico del sistema nervioso, como ha sido demostrado por métodos analíticos o por estudios in vivo (Shan y Weber, 1982; Calvest y Anderton, 1982; Glicksman y Willard, 1985).

A pesar de que los marcadores neuronales y gliales empleados permiten diferenciar claramente ambas estirpes celulares y resultan ser más específicos que los criterios morfológicos, nuestro estudio nos permite establecer algunos criterios que diferencian claramente elementos gliales de elementos neuronales. Las células gliales



- FIGURA 1.** Elementos fusiformes, reactivos a GFAP, observados en el día 7 de cultivo. x 100.
- FIGURA 2.** Elementos redondeados de estirpe neuronal, inmunorreactivos a NF-70 (flechas) obtenidos a partir de un cultivo en el cuarto día de incubación. x 100.
- FIGURA 3.** Pelotones celulares compactos, difíciles de definir, en el día 14 de cultivo (reacción para GFAP). x 10.
- FIGURAS 4 y 5.** Conglomerados celulares aplanados, de células inmunorreactivas a GFAP, obtenidos el día 14 de cultivo, que se disponen formando una malla fibrilar, obsérvense las figuras de mitosis (flecha). x 60.

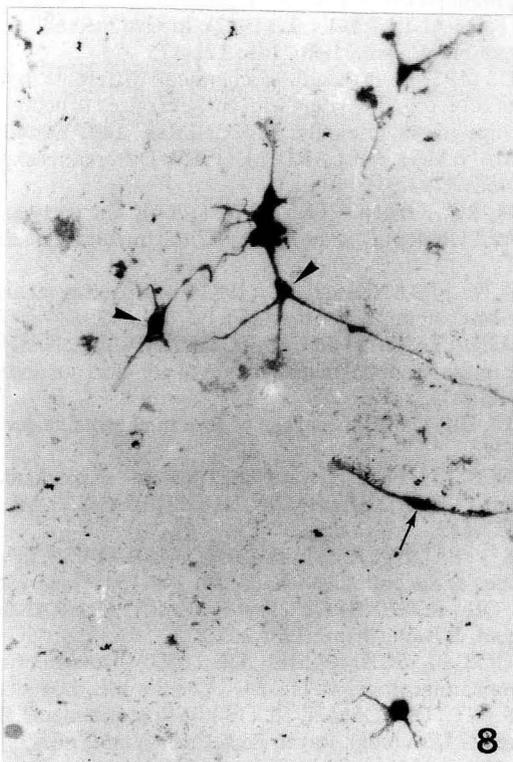
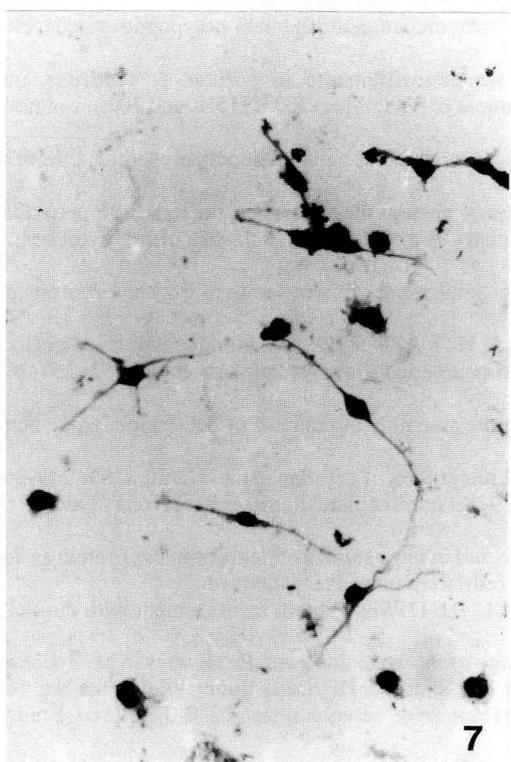
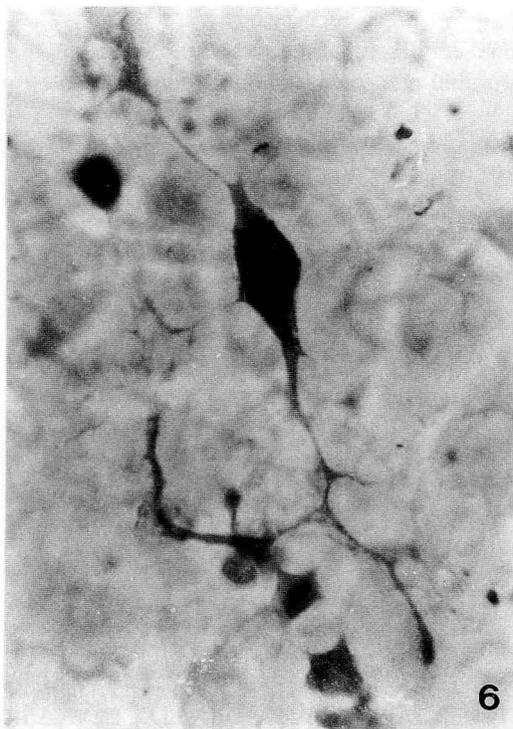
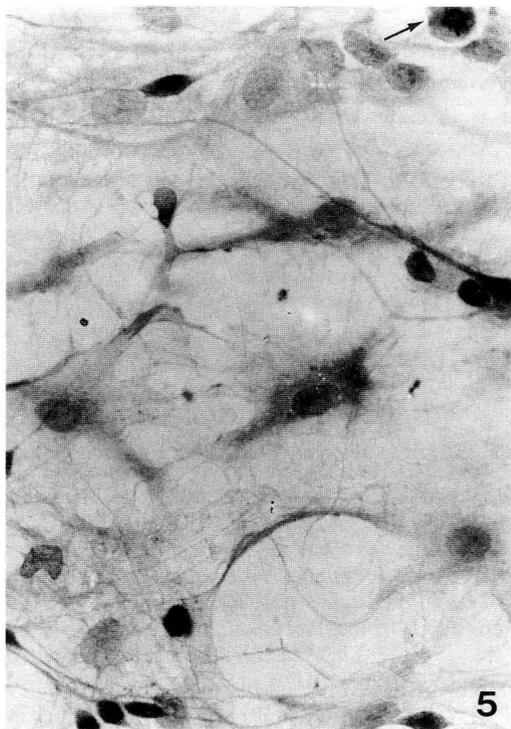


FIGURA 6.

Elementos celulares reactivos a NSE en el día 14 de cultivo. x 100.

FIGURA 7.

Elementos celulares inmunorreactivos a NF-70 en el día 14 de cultivo, formando cadenas neuronales. x 20.

FIGURA 8.

Patrones morfológicos típicos de los elementos reactivos a NF-70 en el día 14 de cultivo. Nótese la presencia de neuronas bipolares (flecha), junto a neuronas multipolares (cabezas de flecha). x 20.

presentan un amplio tamaño, con un gran núcleo que se tiñe débilmente con la hematoxilina; mientras que las de estirpe neuronal presentan un soma pequeño, con un núcleo pequeño, redondo e hiper cromático. Además, las prolongaciones gliales suelen ser amplias; mientras que las neuronales son, por lo general, finas. No obstante, a lo largo de la evolución del cultivo y, principalmente, en las primeras fases existen muchas formas intermedias con rasgos morfológicos similares entre las células de estirpe glial y las de estirpe neuronal, que aconsejan el estudio inmunocitoquímico.

Nuestros resultados parecen confirmar que las neuronas cultivadas son capaces de desarrollar un sustrato citoesquelético y enzimático normal que garantiza su organización y diferenciación.

Agradecimientos

Los autores del trabajo desean mostrar su agradecimiento al Dr. F. Sánchez-Franco (Servicio de Endocrinología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid) por la cesión del suero anti-NF-70.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERTON, B. (1981): Intermediate filaments: A family of homologous structures. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **2**: 141-148.
- BENNETT, GS.; TAPSCOTT, SJ.; DILULLO, C.; HOLTZER, H. (1984): Differential binding of antibodies against the neurofilament triplet proteins in different avian neurons. *Brain Res.*, **304**: 291-302.
- CALVEST, R.; ANDERTON, T. (1982): In vivo metabolism of mammalian neurofilament polypeptides in developing and adult rat brain. *FEBS Lett.*, **145**: 171-175.
- DAHL, D. (1983): Immunohistochemical differences between neurofilaments in perikarya, dendrites and axons. Immunofluorescence study with antisera raised to neurofilament polypeptides (200 K, 15 K and 70 k), isolated by anion exchange chromatography. *Exp. Cell Res.*, **149**: 397-406.
- GLICKSMAN, MA.; WILLARD, M. (1985): Differential expression of the three neurofilament polypeptides. *Ann. NY Acad. Sci.*, **455**: 479-491.
- GRAHAM, RC; KARNOVSKY, GW. (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.
- GROULD, DL.; FRANKLIN, CL. (1987): Morphological and physiological differentiation of Purkinje neurons in cultures of rat cerebellum. *J. Neurosci.*, **7**: 1,271-1,293.
- HAIMOTO, H.; TAKAHASHI, Y.; KOSHIKAWA, T.; NAGURA, H.; KATO, K. (1985): Immunohistochemical localization of γ -enolase in normal human tissues of non-nervous and non-neuroendocrine systems. *Lab. Invest.*, **52**: 257-261. KATO y col. (1982).
- LAEMMLI, UK. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**: 680-685.
- LAZARIDES, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, **283**: 249-256.
- LIEM, RKH.; YEN, S.; SALOMON, GD.; SHELANSKI, ML. (1978): Intermediate filaments in nervous tissues. *J. Cell Biol.*, **79**: 637-645.
- LIEM, RKH.; PACTER, JS.; HUCHISON, SB. (1982): In vivo and in vitro studies of neurofilament protein assembly. En: *Peptides of the biological fluids*, **30**: 149-154. Peeters, H. (ed). Pergamon Press, Oxford.
- LOWRY, OH.; ROSENBRONGH, NF.; FARS, AL.; RANDALL, RJ. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- MARANGOS, PJ.; SCHMECHEL, DE. (1980): The neurobiology of the brain enolases. En: *Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology*, **4**: 211-247. Youdim MB, Lovenberg W., Sharman DF, (eds). John Wiley-Sons Inc. New York.
- NORTON, WT.; GOLDMAN, JE. (1980): Neurofilaments. En: *Proteins of nervous system*, 301-329. 2^a ed. Bradshaw RA., Schneider DM. (eds). Raven Press. New York.
- RAJU, T.; BIGNAMI, A.; DAHL, D. (1981): In vivo and in vitro differentiation of neurons and astrocytes in the rat embryo: immunofluorescence study with neurofilament and glial filament antisera. *Dev. Biol.*, **85**: 344-357.
- ROBINSON, PA.; ANDERTON, BH. (1988): Neurofilament Probes. A review of neurofilament distribution and Biology. *Rev. Neurosci.*, **2**: 1-40.
- SCHALAEPPER, WW. (1987): Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **46**: 117-129

- SCHLAEPPER, WW.; LEE, V.; WU, H-L. (1981): Assessment of immunological properties of neurofilament triplet proteins. *Brain Res.*, **226**: 259-272.
- SCHMECHEL, D. (1985): γ -subunit of the glycolytic enzyme enolase : non-specific or neuron specific? *Lab. Invest.*, **52**: 239-249.
- SCHMECHEL, D.; MARANGOS, PJ.; ZIS, AP.; BRIGHT, MW.; GOODWIN, FK. (1978): Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science*, **199**: 313-315.
- SHAW, G.; WEBER, K. (1981): The distribution of neurofilament triplet proteins within individual neurones. *Exp. Cell Res.*, **136**: 119-125.
- SHAW, G.; WEBER, K. (1982): Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature*, **298**: 277-279.
- SHELANSKI, ML.; GASKIN, F.; CANTOR, CR. (1973): Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 765-768.
- SOTELO, J.; GIBBS, CJ.; GAJDUSEK, C.; TOH, BH.; WURTH, M. (1980): Method for preparing cultures of central neurons: cytochemical and immunochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 653-657.
- STEINER, PM.; PARRY, DAD. (1985): Intermediate filaments. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**: 41-54.
- STERNBERGER, LA.; HARDY, PH.; CUCULIS, JJ. y MEYER, HG. (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.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4.350-4.354.
- TRAUB, P. (1985): Intermediate filaments: A review. Springer Verlag. Berlin.
- TROJANOWSKI, JQ.; OBROCKO, MA.; LEE, VM-Y. (1985): Distribution of neurofilament subunits in neurons and neuronal processes: immunohistochemical studies of bovine cerebellum with subunit-specific monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**: 557-563.
- VINOES, SA.; BONNIN, JM.; ROBINSTEIN, LJ.; MARANGOS, PJ. (1984): Immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in neoplasms of the CNS and other tissues. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **108**: 536-540.
- YEN, SH.; FIELDS, T. (1981): Antibodies to neurofilament, glial filament and fibroblast intermediate filaments proteins bind to different cell types of the nervous system. *J. Cell Biol.*, **88**: 115-126.

Correspondencia: J. Carretero
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. España

APORTACIONES AL ESTUDIO DEL PROCESO DE OSIFICACIÓN POSTNATAL DEL ESQUELETO APENDICULAR EN EL OVINO. II.- PARTE: MIEMBRO PELVIANO

CONTRIBUTION OF STUDY OF THE PROCESS OF POSTNATAL OSSIFICATION OF APPENDICULAR SKELETON OF THE SHEEP. II.PART: PELVIC LIMB

M.T. GUILLÉN, S. REGODÓN, A.I. MAYORAL y A. ROBINA

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 pelviano) en el 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 pelvianos completos en diversas posiciones, analizando los núcleos de osificación visibles en las imágenes, 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 pelvianos del ovino en las distintas edades estudiadas. Se determina que las metafisis epifisarias pelvianas experimentan una variación a líneas epifisarias más tardía que en los miembros torácicos, entre los 45 y 270 días de edad.

PALABRAS CLAVES: Osificación, radiología, esqueleto, apendicular, ovino.

SUMMARY

The present work studied the process of postnatal ossification of appendicular skeleton (pelvic 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 pelvic 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 270 days of age.

KEY WORDS: ossification, radiology, skeleton, appendicular, 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, 1897). 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 realizan 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

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

CENTROS EPIFISIARIOS	LESBRE (1897)	TSCHIRWINSKY (1880)	TOOD&TOOD (1936)	BRUNI&ZIMMERL (1951)	SMITH (1956)	BARONE (1976)
ESCÁPULA						
Tubérculo	5	-	8	5	5	5
HÚMERO						
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	-
CÚBITO						
Proximal	36-42	-	-	42	21	-
Distal	42	-	33	36	26	-
METACARPO	20-24	15-16	-	20-24	16	-
1 FALANGE	7-10	-	-	7-10	10	-
2 FALANGE	5-7	-	-	5-7	8	-
FÉMUR						
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	-
RÓTULA	-	-	-	-	-	24
PERONÉ	36	-	-	42	15	-
METATARSO	20-24	15-16	-	36	15	36
1 FALANGE	7-10	-	-	7-10	9	-
2 FALANGE	5-7	-	-	5-7	6	-
COXAL	5	-	-	5	-	5

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 García Monterde, 1982), quienes señalan que los núcleos de osificación aparecen en el mismo orden cronológico, pero las edades concretas en las que tiene 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.

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 pelvianos completos en las posiciones lateral y cráneo-caudal (dorsopalmar o dorsoplantar, 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 45-70 Kv y 16-36,5 mAs.

Resultados

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

Núcleos de osificación	Estructuras a las que se fusionan	Edad
M. PELVIANO		
Cabeza femoral	+ diáf. femoral	270
Epif. proximal metatarsiana	+ diáf. metatarsiana	Nacim.

Rodilla (fig. 1)

Al nacimiento (fig. 1.1)

- La metáfisis distal del fémur (mdF) está formada por gran cantidad de tejido cartilaginoso en forma de "W", típica en esta zona del esqueleto apendicular del animal.

- La rótula (R) aparece pequeña, circunscrita y bastante radiolúcida.

No se aprecia la eminencia intercondilar (ei) de la tibia. Por el contrario, y dentro también de la epífisis proximal de la tibia, el núcleo accesorio de la tuberosidad tibial (tT) se encuentra poco manifiesto, separado de la diáfisis del hueso por un gran espesor de cartílago que nos da la imagen equívoca de hueso independiente y redondeado.

- Es ostensible la separación de la metáfisis proximal de la tibia (mpT), aunque se advierte más cerrada si la comparamos con la distal del fémur.

- La parte proximal del peroné contiene un núcleo de osificación (pP) en un inicio del desarrollo y con un alto grado de condricificación.

- En general, en este período, los huesos son redondeados, sin una morfología definida.

45 días (fig. 1.2)

- Núcleo de la epífisis distal del fémur es extenso, apareciendo ya la morfología de la fosa intercondilar (fi) (ver flecha).

- La metáfisis distal del fémur (mdF) se aprecia más cerrada, aun siguiendo con la morfología en "W" característica.

- La rótula (R), que se desarrolla como un hueso sesamoideo (un centro único), incrementa su superficie ósea y se hace más triangular.

- Presencia de una primitiva eminencia intermedia (ei), lo cual, y a diferencia de la edad anterior (ver imagen) determina la superposición de este nivel con el del área intercondilar del fémur adyacente; este hecho se hará mas patente a los 105 y 270 días respectivamente.

- El núcleo de la tuberosidad tibial (tT) es amplio y, en consecuencia, el tejido óseo está aumentado, y adopta una forma más o menos triangular para ir adaptándose a la diáfisis con la que más tarde deberá unirse.
- Metáfisis proximal de la tibia (mpT) se estrecha.
- Se manifiesta algo menor la parte proximal del peroné (pP) en su localización lateral.

105 días (fig. 1.3)

- La metáfisis distal varía a línea epifisaria distal del fémur (ldF) persistiendo su forma de "W".
- La rótula (R) ha ascendido un escalón más en su desarrollo, siendo más triangular, y adaptándose con su cara articular a los labios de la troclea femoral.
- Eminencia intermedia (ei), más desarrollada.
- El núcleo de la tuberosidad tibial (tT) sigue incrementándose, en busca de conformar la morfología prismática característica del hueso.
- Surge la línea proximal de la tibia (lpT) al sufrir su metáfisis la regresión correspondiente.
- Tal vez lo más notorio de esta imagen sea el gran desarrollo de la cabeza o parte proximal del peroné (pP), adosada al cóndilo lateral de la tibia.

270 días (fig. 1.4)

- Línea distal del fémur (ldF) consolidándose.
- La rótula (R) más amplia prosigue también en fase de consolidación.
- Podemos apreciar una zona de unión (señalado con una flecha) entre la tuberosidad tibial (tT) y la tibia.
- Como hecho más relevante, volvemos a referir el desarrollo que sigue prevaleciendo en la extremidad proximal del peroné (pP, comparar imágenes).

Pie (con extremo distal de la pierna) (fig.2)

Las analogías existentes de los elementos óseos entre la mano y el pie nos permiten excluir algunas consideraciones en nuestro estudio (ver Parte I.- miembro torácico, Guillén y col., 1991). Así, en este apartado sólo hemos analizado los extremos distales de la pierna y el tarso, sin incluir el metatarso y las falanges.

Al nacimiento (fig. 2.1)

- En la epífisis distal de la tibia se observa su metáfisis distal (mdT). Resulta algo dificultosa su interpretación, bajo el punto de vista radiológico, debido a que el cartílago que rellena la correspondiente metáfisis es un tanto anfractuoso y de ahí que se proyecte su radiolucidez en varios niveles.
- La epífisis distal del peroné + el maléolo lateral (dP+M) están separados totalmente de la extremidad distal de la tibia, apreciándose radiológicamente como un hueso redondeado e independiente.
- El núcleo primario del astrágalo (A) conforma la constitución típica de doble polea; sin embargo, no tiene aún su tamaño definitivo, existiendo abundante tejido cartilaginoso en sus articulaciones adyacentes.
- Se aprecia la tuberosidad del calcáneo (tC), separada del resto por una línea ancha de cartílago.
- Al igual que ocurría en los huesos del carpo, en el tarso, a esta edad, se evidencian morfologías redondeadas que irán perdiéndose con el tiempo. Esto es especialmente significativo en la segunda fila de huesos tarsianos (centrocuartal Cq, 2^o+3^o y 1^o).

45 días (fig. 2.2)

- La metáfisis distal de la tibia (mdT) se observa más cerrada.
- La epífisis distal del peroné + el maléolo lateral (dP+M) incrementa su superficie, apreciándose por ello más cercano del extremo distal de la tibia.
- El núcleo del astrágalo (A) está más desarrollado, adaptándose mejor a sus articulaciones adyacentes.
- La tuberosidad del calcáneo (tC) reduce su contenido en tejido cartilaginoso.
- En general, los huesos del tarso pierden su constitución redondeada para advertirse más rectangulares.

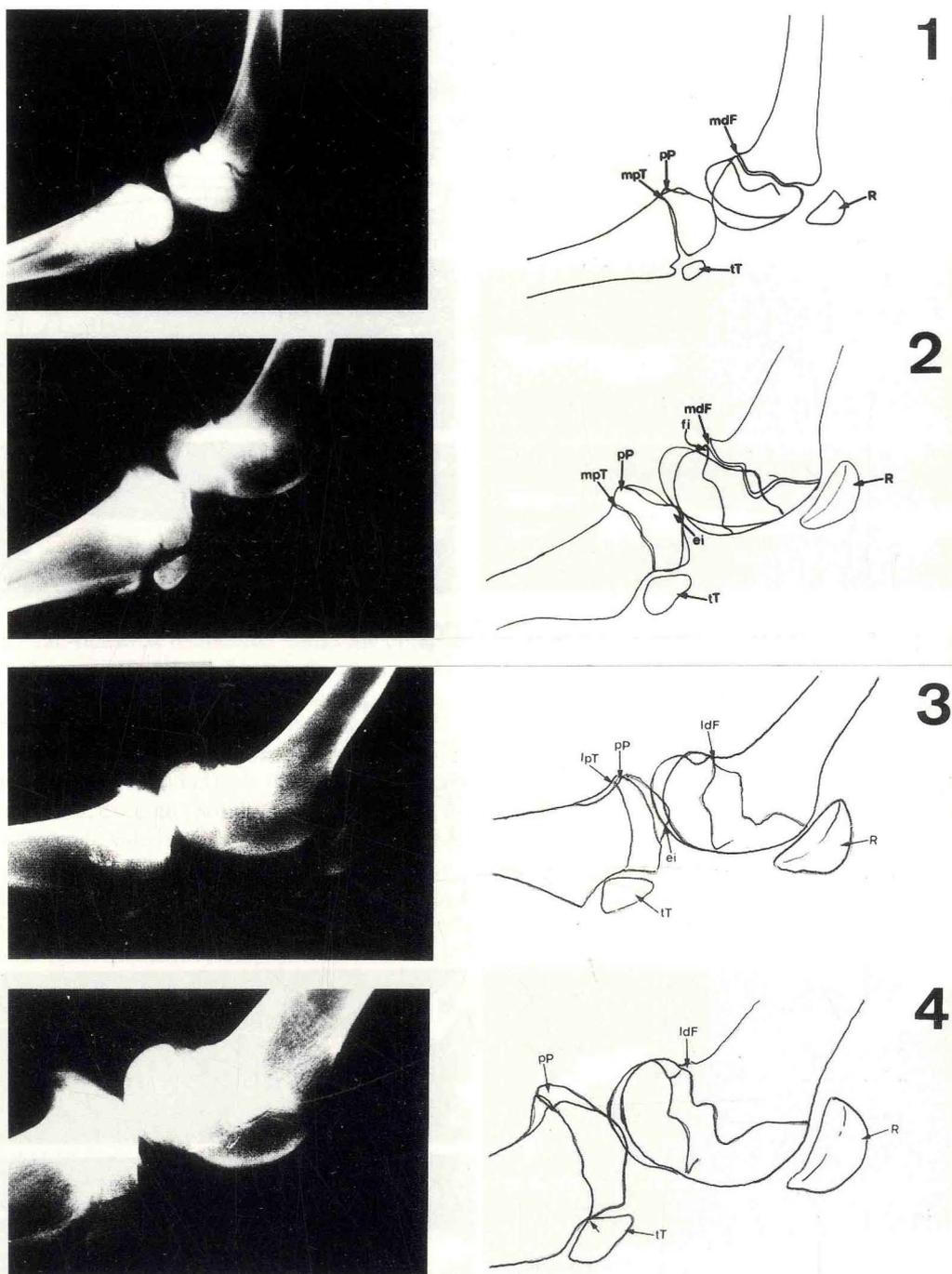


FIGURA 1. Imagen radiográfica lateral de la rodilla y esquema explicativo correspondiente. 1) nacimiento; 2) 45 días; 3) 105 días y 4) 270 días.

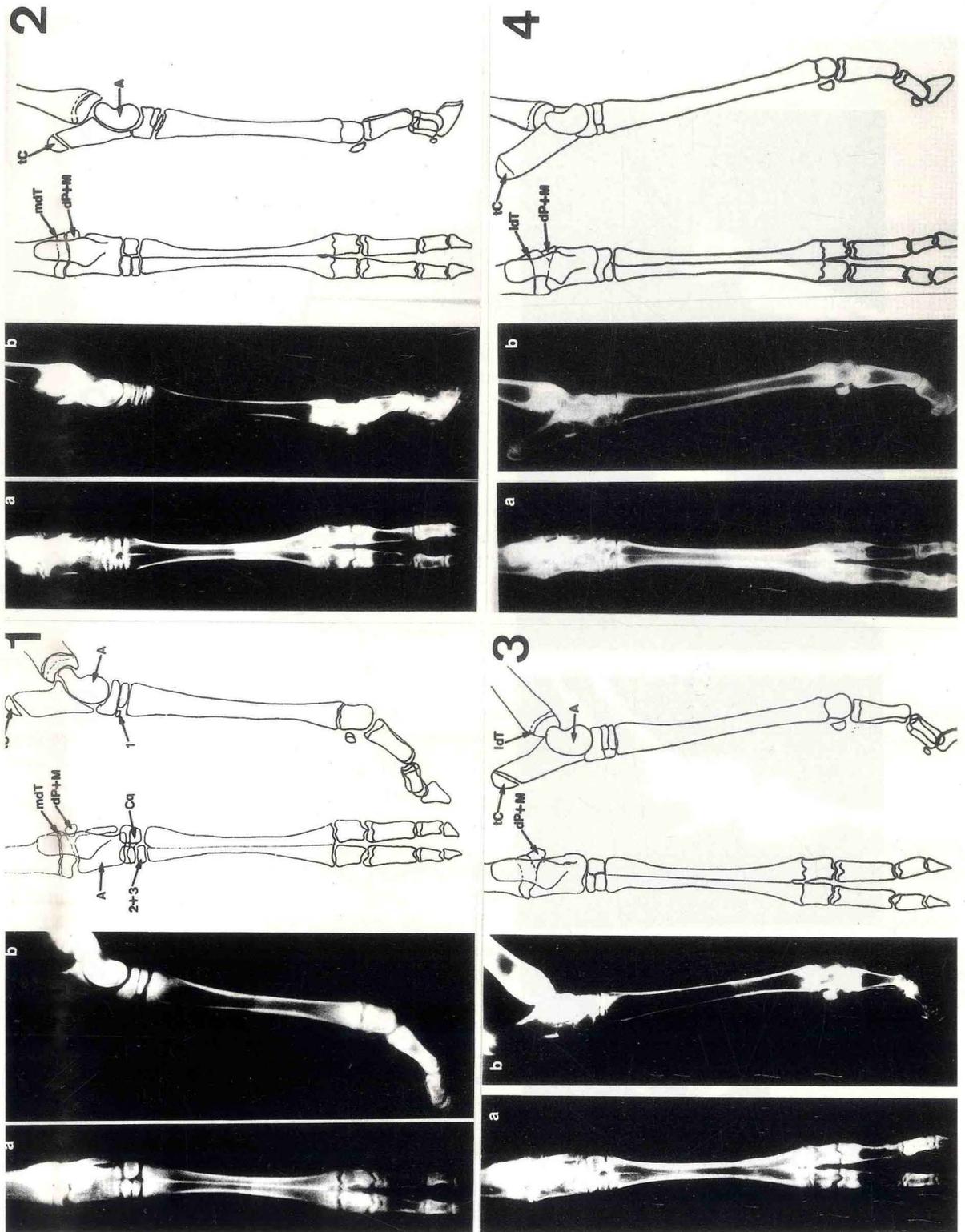


FIGURA 2. Imágenes radiográficas dorsoplantar (a) y lateral (b) del pie (con extremidad distal de la pierna) y esquemas explicativos correspondientes. 1) nacimiento; 2) 45 días; 3) 105 días y 4) 270 días.

105 días (Fig. 2.3)

- La metáfisis distal de la tibia (mdT)I se transforma ya en una línea epifisiaria distal (ldT), aunque mantiene las anfractuosidades a las que hacíamos referencia en la primera edad estudiada.
- La epífisis distal del peroné + el maléolo lateral (dP+M) se encuentra unida y separada por una simple línea radiolúcida.
- Mejor adaptación del astrágalo (A) a sus articulaciones adyacentes.
- Disminuye la banda de cartílago de la tuberosidad del calcáneo (tC).

270 días (fig. 2.4)

- La línea epifisiaria distal de la tibia (ldT) la dejamos en fase de consolidación.
- La epífisis distal del peroné + el maléolo lateral (dP+M) también se halla en fase de fusión definitiva, pero la alcanzará después que la inmediatamente anterior.
- La tuberosidad del calcáneo (tC) cerrándose.

A modo de resumen, obsérvense en la Tabla 1 los datos más relevantes del conjunto de los extraídos con el análisis radiográfico; lógicamente, nos referimos a los distintos tiempos de fusión de los niveles anatómicos implicados en el estudio desde el nacimiento a los 270 días, con independencia de aquellos otros (ya señalados) que van correspondiendo con las fluctuaciones de los huesos en fase de consolidación observables en las proyecciones radiográficas.

Discusión

En general, nuestros resultados, tanto los obtenidos en el miembro torácico (Guillén, 1989), como en el miembro pelviano y los señalados por diversos autores, coinciden. Sin embargo, existen algunas discrepancias, en áreas como la epífisis proximal del fémur que para Lesbre (1897), Tood/Tood (1936) o Bruni/Zimmerl (1945) se fusionan entre los 42 y 33 meses. Por el contrario, Smith (1956) señala que tiene lugar su fusión en casi la mitad de tiempo: 17-18 meses, y para nosotros se efectúa a los 9.

Referente a la tuberosidad de la tibia, la mayoría de los investigadores no se pronuncian al respecto, sin apenas darle importancia, excepto (Smith (1956) y Barone (1976), para quienes se fusionan a los 15-20 meses. Nuestro trabajo, comprende sólo hasta la edad de 9 meses, y así confirmamos que, a esta edad, no se encuentra fusionada la tuberosidad. En todo caso, observando su evolución, deducimos que es un buen indicador del crecimiento del animal, aunque no hayamos cuantificado los distintos gradientes de fusión.

Como área que se encuentra fusionada ya en la edad inmediatamente postnatal está la epífisis proximal del metatarso (al igual que el metacarpo), coincidiendo así con lo señalado por Barone (1976).

Como principal conclusión resaltamos que el análisis radiológico contribuye a la diferenciación de las etapas del crecimiento estudiadas. Al contrario que en el miembro torácico, en el pelviano las metáfisis epifisiarias experimentan una variación a líneas epifisiarias más tardía, entre los 45 y 270 días de edad.

BIBLIOGRAFÍA

- CHAPMAN, W.L. (1965): Appearance of ossification in centers and epiphyseal closures as determined by radiographic techniques. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **147**: 138-141.
- GARCÍA-MONTERDE, J.G. (1982): Estudio radiográfico sobre la cronología de osificación de esqueleto apendicular en el perro pastor alemán. Tesis Doctoral. Córdoba.
- GUILLÉN, M.T. (1989): El crecimiento en la canal ovina: estudio anatomodescriptivo y consideraciones aplicativas. Tesis Doctoral. UNEX. Cáceres.
- HARE, W.C.D. (1960): The age at which epiphyseal union take place in the limb bones of the dog. *Wien. Tierärztl Monatsschr*: 224-245.

- LESBRE, F.X. (1897): Contribution à l'étude de l'ossification du squelette des Mammifères Domestiques. Ann. Soc. Agric., 7, (5): 1-106. *Series*. Lyon.
- SMITH, R.N. (1956): Observations on the ossification of the appendicular skeleton of the sheep. Ph. D. Thesis. Bristol.
- TOOD and TOOD, R. (1936): Citado por SMITH (1956) en: Fusion of epiphyses of the limb bones of the sheep. Vet. Rec.: 257.
- TSCHRIWINSKY, N., (1880): Citado por SMITH, R.N. (1956) en Fusion of the epiphyses of the limb bones of the sheep. Vet. Rec.: 257.

Correspondencia: M.T. Guillén
Cátedra de Anatomía y Embriología
Facultad de Veterinaria
Cáceres. Universidad de Extremadura. España

ESTUDIO DE LA SUPERFICIE EPENDIMARIA DEL ÓRGANO SUBFORNICAL AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

STUDY OF THE EPENDYMARY SURFACE OF THE SUBFORNICAL ORGAN UNDER THE SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

J.A. JUANES, J.M. RIESCO, F. SÁNCHEZ, J. CARRETERO, E. BLANCO y R. VÁZQUEZ

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio, con el microscopio electrónico de barrido, de la superficie endimaria del órgano subfornical. Dentro de este órgano circunventricular observamos tres regiones claramente diferenciadas: ventral, con pocos cilios y de superficie plana; central, la más amplia y aciliada; y dorsal, constituida por células que le dan un aspecto en empedrado y es oligociliada.

En las dos primeras regiones hay más fibras que células supraependimarias; por el contrario, en la región dorsal hay muy pocas fibras y algunas células supraependimarias de aspecto polimorfo.

PALABRAS CLAVE: Órgano subfornical, superficie endimaria, microscopio electrónico de barrido.

SUMMARY

A scanning electron microscope study was made of the endymary surface of the subfornical organ. In this circumventricular organ three clearly differentiated areas were observed: the ventral region, with few cillia and flat surface; the central one, the largest and lacking in cilliae, and the dorsal region, formed of cells conferring it with a brick-like aspect, this area was oligocilliate.

In the first two regions there are more fibres than supraependymary cells; by contrast, in the dorsal region there are very few fibres and some supraependymary cells with a polymorphic aspect.

KEY WORDS: Subfornical organ, endymary surface, scannig electron microscope.

Introducción

En el cuadrante más rostral y dorsal del tercer ventrículo, a nivel de la línea media, cerca de los plexos coroideos y del ventrículo lateral, se encuentra una prominencia cónica llamada órgano subfornical (OSF).

Este órgano circunventricular (Hofer, 1958) presenta tres regiones: una anterior, ventral; una media o central, el cuerpo; y una tercera más posterior o dorsal (Mikami y Asari, 1978; Phillips y col., 1978; Takei y col., 1978).

Son muchos los autores que han estudiado la situación y la estructura de este órgano, al microscopio óptico y al microscopio electrónico de transmisión, en diferentes especies animales (Phillips y col., 1974; Mikami y Asari, 1978, Takei y col., 1978; Tsuneki y col., 1978), sin embargo, son escasos los trabajos que realizan un análisis de

las diferentes estructuras que se encuentran sobre la superficie luminal de la capa endimaria de este órgano con el microscopio electrónico de barrido (MEB), siendo éste el objeto de nuestro estudio.

Material y Método

Se ha estudiado la superficie endimaria del OSF en diez ratas blancas adultas, cepa Sprague-Dawley, que presentaban pesos comprendidos entre los 250 y los 300 g. Todos los animales se encontraron en condiciones normales de un laboratorio, con temperatura y humedad ambiental de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ y $48 \pm 5\%$ respectivamente, y con libre acceso a dieta equilibrada y agua.

Los animales fueron perfundidos, bajo anestesia con Ketamina (10 mg/Kg de peso), con una solución salina isotónica a 36°C , seguida de una solución fijadora tipo Karnovsky. Una vez fijado el animal, se decapitó y se abrió el cráneo, extrayendo el cerebro completo y practicándose en los cinco primeros animales un corte sagital, y sobre los otros cinco un corte frontal, que contenían en su interior el órgano a estudiar.

Después de una nueva fijación, por inmersión, en Karnovsky (3-6 horas), se lavó el material de 8 a 12 horas, con tampón fosfato (0,1 M y pH 7,4) y se continuó con la talla del tercer ventrículo en bloques cúbicos de tejido, no superiores a $1 \times 1 \times 0,5 \text{ cm}$. Posteriormente las piezas fueron fijadas en tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0,1 M, durante 90 minutos. Las muestras se deshidrataron en acetonas de porcentaje progresivo, comenzando por una solución del 30% hasta llegar al 100%. A continuación, se realizó el secado por el procedimiento del "punto crítico".

Finalmente, el material fue revestido de una capa de oro de 10 nanómetros en un metalizador ISI E-5000, permaneciendo en su interior durante 5 a 6 minutos y sometidos a una corriente de descarga cuya intensidad fue de 20 miliamperios.

El estudio de las piezas se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido Philips PSEM-500.

Resultados

El OSF se encuentra en la pared rostral del tercer ventrículo; ocupa el lugar situado entre los dos agujeros interventriculares, y está cubierto parcialmente por los plexos coroideos.

El estudio realizado con el MEB sobre el OSF de rata (fig. 1), revela la existencia de tres regiones:

- a) *Ventral*, estrecha y parcialmente ciliada (V).
- b) *Central*, la más ancha y generalmente aciliada (C).
- c) *Dorsal*, prominente, semiesférica y cubierta en gran parte por los plexos coroideos (D).

Los endimocitos de la región ventral (fig. 2) se caracterizan por presentar una superficie plana y poligonal, con gran número de microvellosidades distribuidas sobre la membrana apical, pero con una mayor concentración junto a los bordes intercelulares (fig. 2). Sobre la superficie endimaria se aprecian fibras y algunas masas celulares de aspecto macrofágico. Un gran número de endimocitos están oligociliados, y se diferencian netamente de la superficie endimaria no especializada que se encuentra fuertemente ciliada.

La zona central del órgano está formada por endimocitos de superficie poligonal aciliada, existiendo, de forma aislada, algún penacho ciliar (fig. 3).

Mientras que la transición entre la región central y la región ventral es paulatina, la existente entre la región central y la dorsal es brusca, debido a una protusión de esta última, dibujando un surco semilunar entre ambas.

Los endimocitos de la región dorsal son prominentes y globulosos, presentando el aspecto típico de empedrado. Presentan varias microvellosidades rizadas, más largas y con una distribución más homogénea que en el resto del OSF (fig. 4). La superficie endimaria es bien monociliada, oligociliada, o bien, lo más frecuente, aciliada.

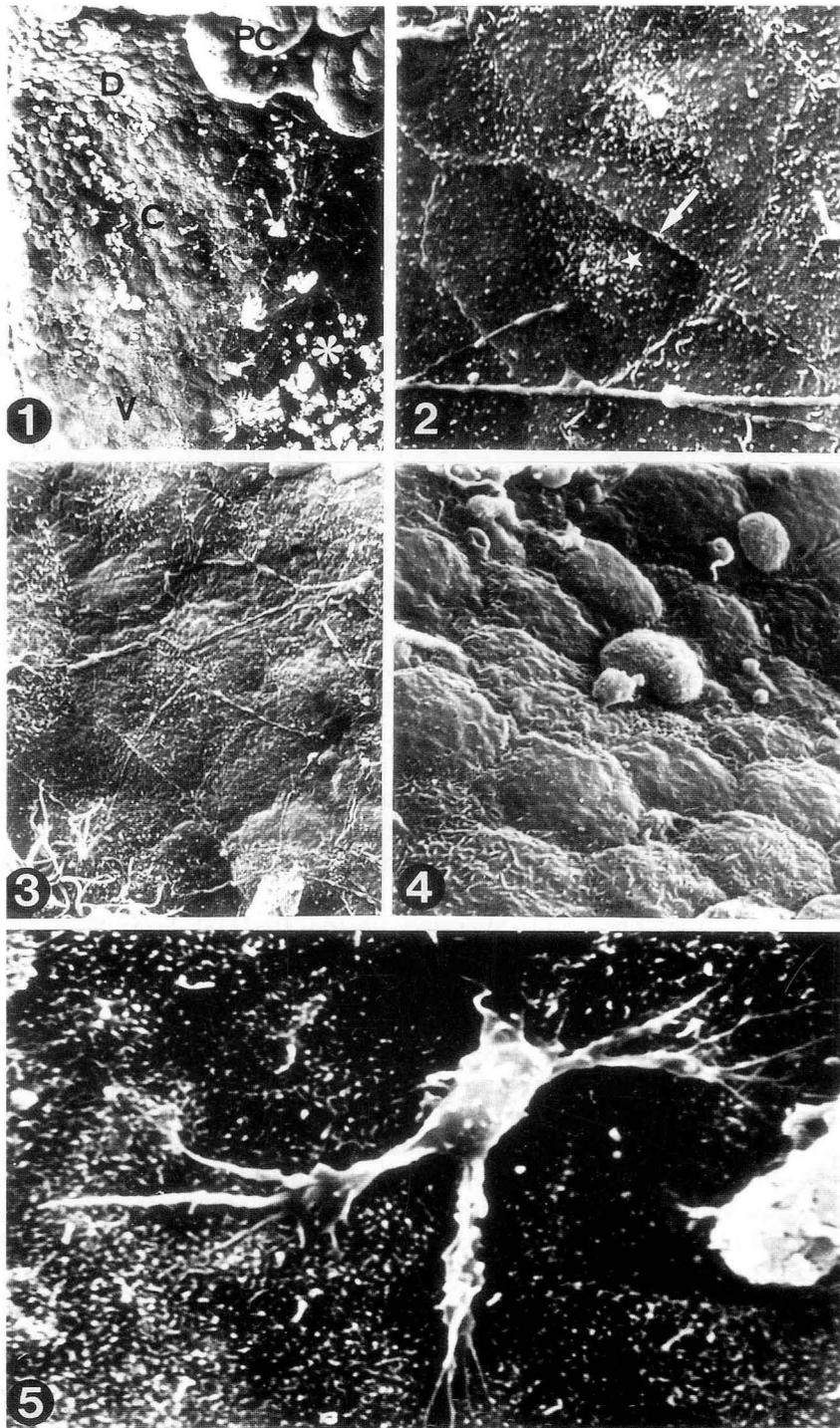


FIGURA 1. Corte sagital de la pared rostral del tercer ventrículo de rata. Panorámica del OSF. V: Región Ventral. C: Región Central. D: Región Dorsal. PC: Plexos Coroideos. * : superficie ependimaria no especializada fuertemente ciliada. Aumentos: 520 x.

FIGURA 2. Región Ventral del OSF. Ependimocitos de superficie plana y poligonal. Microvellosidades (estrella) sobre toda la membrana apical con una gran concentración cerca de los bordes intercelulares (flecha). Aumentos: 6750 x.

FIGURA 3. Región Central del OSF. Ependimocitos de superficie poligonal aciliada. Aumentos: 6750 x.

FIGURA 4. Región Dorsal. Ependimocitos con aspecto abultado y en forma de empedrado. Microvellosidades rizadas, con una distribución homogénea. Aumentos: 6750 x.

FIGURA 5. Célula supraependimaria de aspecto polimorfo con prolongaciones gruesas y cortas. Aumentos: 9750 x.

Sobre las tres regiones del órgano se pueden observar fibras arrosariadas y células supraependimarias con diferentes modelos de distribución.

Las fibras son más abundantes en las regiones ventral y central, mientras que en la dorsal, donde apenas existen fibras, se aprecia mayor número de células supraependimarias, de aspecto polimorfo, con prolongaciones cortas y gruesas (fig. 5) que no sobrepasan la superficie de cuatro o más endimocitos vecinos.

Discusión

Los trabajos realizados con el MEB sobre el OSF de diferentes especies admiten la existencia de tres regiones, iguales a las descritas por nosotros (Mikami y Asari, 1978; Phillips y col., 1978; Takei y col., 1978); sin embargo, existen diferencias morfológicas en los endimocitos de este órgano, en relación con las especies. Así, el OSF del conejo y de la codorniz japonesa poseen, en la región central, un sólo cilio (Leonhardt y Lindemann, 1973; Mikami y Asari, 1978; Takei y col., 1978); sin embargo, en la rata sólo hemos encontrado alguna célula monociliada, en la región dorsal. Phillips y col. (1977, 1978) han obtenido hallazgos similares a los descritos por nosotros.

La presencia de células supraependimarias en los OCV es un dato característico que ha sido bien analizado en otros órganos circunventriculares, como el órgano vasculoso de la lámina terminal (Risco y col., 1988; Juanes y col., 1989); el órgano subcomisural (Collins y Woollam, 1979), la eminencia media (Scott y cols., 1975), así como en áreas circundantes al tercer ventrículo (Walsh y cols., 1978); sin embargo, en el OSF no se suele hacer referencia a la existencia de estas células. En nuestro trabajo hemos observado la presencia de estas células, con morfología variada, así como fibras supraependimarias recorriendo la superficie de los endimocitos, con características similares a las descritas por otros autores (Dellmann y Linner, 1977; Mikami y Asari, 1978; Takei y col., 1978; Phillips y col., 1978).

Dellmann y Linner (1977) describen células supraependimarias en el OSF de la rata, pero estas células fueron localizadas en la región central del órgano; en nuestro trabajo la localización preferentemente fue en la región dorsal.

Las células supraependimarias han sido analizadas en diferentes regiones de la superficie ventricular (Scott y col., 1977; Pastor y col., 1982; Riesco y col., 1988; Juanes y col., 1989). A pesar de su polimorfismo (Riesco y col., 1988), se clasifican estas células en dos tipos: globulares, con superficie rizada o presencia de filopodia, consideradas por la mayoría de los autores como células de tipo macrófago; el segundo tipo celular corresponde a células ramificadas (bipolares o estrelladas) consideradas como células similoneuronales.

El OSF es escaso en células supraependimarias y no hay un tipo celular que predomine.

A través de los resultados expuestos podemos concluir que en el OSF existen tres regiones claramente diferenciables, así como la existencia de células supraependimarias polimorfas, y fibras de trayectos arrosariados que se extienden a largas distancias, en ocasiones, incluso sobrepasando el propio OSF.

BIBLIOGRAFÍA

- COLLINS, P. y WOOLLAM, D.H.M. (1979): The ventricular surface of the subcommissural organ: a scanning and transmission electron microscopic study. *J. Anat.*, **129**: 623-631.
- DELLMANN, H.D. y LINNER, J.G. (1977): Correlative light, scanning and transmission electron microscopy of the ventricular surface of the rat subfornical organ with special emphasis on supraependymal cells. *Anat. Rec.*, **187**: 565a.
- HOFER, H. (1958): Zur Morphologie der circumventricular Organe des Zwischenhirns der Säugetiere. *Verh. Deutsch. Zool. Ges. Zool. Anz. Suppl.*, **22**: 202-251.
- JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, E. y VÁZQUEZ, R. (1989): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de las células supraependimarias del órgano vasculoso de la lámina terminal (OVL) de gato y perro. *An. Anat. Vol. XXXV*. **92**: 45-50.

- LEONHARDT, H.; KRISCH, B. y HARTWING, H.G. (1983): Circumventricular organs as targets and release sites for peptide hormones and monoamines. En; Sano Y., Iyata Y., Zimmerman E.A. (eds). Structure and function of peptidergic and aminergic neurons. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, VNU Science Press BV. Utrecht.
- MIKAMI, S. y ASARI, M. (1978): Ultrastructure of the subfornical organ of the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Cell. Tiss. Res.*, **188**: 19-33.
- PASTOR, F.E.; MUÑOZ BARRAGÁN, L. y AMAT, P. (1982): Estudio con el microscopio electrónico de barrido del tercer ventrículo del gato. I) Células supraependimarias. *Morfología Normal y Patológica*. **6**: 73-86.
- PHILLIPS, M. I.; BALHORN, L.; LEAVITT, M. y HOFFMANN, W. (1974): Scanning electron microscope study of the rat subfornical organ. *Brain Res.*, **80**: 95-110.
- PHILLIPS, M. I.; DESHMUKH, P.P. y LARSEN, W. (1978): Morphological comparisons of the ventricular wall of subfornical organ and organum vasculosum of the lamina terminalis. *SEM*. **II**: 349-355.
- RIESCO, J.M.; JUANES, J.A.; CARRETERO, J. y VÁZQUEZ, R. (1988): Ultrastructure of the surface of the organum vasculosum laminae terminalis in different animal species. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **20**: 363-369.
- SCOTT, D.E.; KROSBISCH-DUDLEY, G.; PAULL, W. K.; KOZLOWSKI, G.P. y RIBAS, J. (1975): The primate median eminence. I. Correlative scanning-transmission electron microscopy. *Cell. Tiss. Res.*, **162**: 61-73.
- SCOTT, D.E.; KROSBISCH-DUDLEY, G.; PAULL, W. K. y KOZLOWSKI, G.P. (1977): The ventricular system in neuroendocrine mechanism. III. Supraependymal neuronal networks in the primate brain. *Cell. Tiss. Res.*, **179**: 235-254.
- TAKEI, Y.; TSUNEKI, K. y KOBAYASHI, H. (1978): Surface fine structure of the subfornical organ in drinking induced by angiotensin in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Cell Tiss Res.*, **191**: 389-404.
- TSUNEKI, K.; TAKEI, Y. y KOBAYASHI, H. (1978): Parenchymal fine structure of subfornical organ in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Cell. Tiss. Res.*, **191**: 405-419.
- WALSH, R.J.; BRAWER, J.R. y LIN, P.S. (1978): Supraependymal cell in the third ventricle of the neonatal rat. *Anat. Rec.*, **190**: 257.
- WEINDL, A. y JOYNT, R.J. (1972): Ultrastructure of the ventricular walls. Three-Dimensional study of regional specialization. *Arch. Neurol.*, **26**: 420-427.
- WEINDL, A. y SCHINKO, I. (1977): Scanning Electron Microscopy (SEM) of circumventricular organs (CVO). *SEM*. **II**: 559-556.

Correspondencia: Dr. Juan Antonio Juanes Mendez
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina.
Avda. Campo Charro s/n.
37007 Salamanca. España

ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA EVOLUCIÓN DEL GERMEN DENTARIO HUMANO EN DISTINTOS PERÍODOS DE DESARROLLO

A MORPHOMETRIC STUDY ABOUT THE HUMAN ODONTOGENESIS IN DIFFERENT PERIODS OF THE DEVELOPMENT

M. LAHOZ, P. LORENTE, J.M. PAULES, C. ARRANZ, M.T. PEG, J.M. COBO y A. VERA-GIL

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

RESUMEN

Se ha estudiado la evolución del germen dentario humano en distintos estadios, desde su inicio hasta la aparición de las capas de esmalte y dentina. Aplicando un método morfométrico se han establecido las relaciones porcentuales entre los distintos componentes en cada período evolutivo.

PALABRAS CLAVE: Odontogénesis humana. Morfometría.

SUMMARY

The development of the dental germ was studied from the initial stages until the appearance of the enamel and dentine. Using a morphometric method we have established the relationship between different compounds to the dental germ in the different stages.

KEY WORDS: Human odontogenesis. Morphometric.

Introducción

Es conocido desde hace tiempo que los gérmenes dentarios derivan de formaciones dependientes del ectodermo de la cavidad bucal y del mesodermo subyacente. Del engrosamiento del epitelio bucal primitivo en forma de herradura de cada maxilar, que constituye la lámina dentaria (base interna respecto a la lámina labiogingival) surgirán los componentes ectodérmicos del germen dentario (Gaunt y cols., 1971).

En el embrión humano de 20 mm, algunos puntos de la lámina dental se engruesan y forman los órganos del esmalte, 5 para cada hemimandíbula, y que crecen en torno al ectomesénquima que constituirá la papila dental. Al avanzar el desarrollo, estos órganos del esmalte se van introduciendo en el mesénquima (Matarasso y cols., 1986) (Nagahama 1984) (Ruch y cols., 1983). La papila dental aumenta de volumen y provoca la invaginación del órgano del esmalte, en el que se delimita un epitelio interno y otro externo, y cuyo límite o anillo cervical recubrirá a la papila dental como un casquete. Entre el epitelio interno y externo del órgano del esmalte se formará el retículo estrellado. Con el crecimiento, el anillo cervical rodea la mayor parte del contorno de la papila dental, con lo que el germen dentario tomará el aspecto de una campana. Más tarde, el epitelio interno del esmalte quedará como capa

de ameloblastos que originará el esmalte, mientras que la papila dental organizará una capa en contacto con los ameloblastos, que será la capa de odontoblastos formadores de dentina. Más tarde, durante el desarrollo de la corona, se irán diferenciando los distintos elementos de la raíz (Brown, 1983; Ruch y cols., 1983; Sasaki y cols., 1985; Slavikin y cols., 1988).

Material y Método

Para la realización del presente trabajo hemos utilizado embriones humanos de 28 mm, 32 mm, 33 mm, 50 mm, 78 mm, 130 mm, 140 mm y 145 mm, fijados con formol, incluidos en parafina y teñidos con Hematoxilina-Eosina, y Tricrómico de Martins.

Tras su revisión y selección realizamos el estudio morfométrico de los diferentes componentes del germen dentario, estableciendo relaciones porcentuales entre ellos. Para lo cual, los cortes fueron examinados en una lupa Wild-Heerbrugg, a la que se acopló una cámara de vídeo Philips 400, a través de la cual la imagen pasa a un equipo de morfometría compuesto de digitalizador y ordenador Sony MSX HBG-900P que trabaja con software específico desarrollado en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Zaragoza. De esta forma se consigue una fidelidad total de la imagen a tratar, al suprimir la manipulación de la imagen que supondrían otras técnicas. A continuación las imágenes fueron estudiadas mediante el tratamiento gráfico de dicho programa, delimitando cada uno de los elementos que pretendemos distinguir. A cada área se atribuye un color sólido diferente, de forma que el ordenador pueda realizar la cuantificación del área correspondiente.

Resultados

Mientras en el embrión humano de 28 mm, únicamente observamos la lámina dental, en el de 32 mm dicha lámina dental ya se observa continuándose con el órgano del esmalte. En el embrión humano de 50 mm (fig. 1 y 2), el 39,6 % del área total del germen dentario corresponde al órgano del esmalte, el 19,8% continua siendo lámina dental, el 9,2 % corresponde a un incipiente retículo estrellado, mientras que ya se diferencia claramente el epitelio interno del esmalte. Todo ello pone de manifiesto que la mayor parte del germen dentario en este estudio está compuesta por estructuras derivadas del ectodermo (71,9%), mientras que el mesodermo subyacente, formando la papila dental, representa el 28,1% restante.

En un estudio algo más avanzado (78 mm) (figs. 3 y 4) observamos que crece menos el órgano del esmalte, que pasa a representar el 33,3%, así como la lámina dental, que como gubernáculo dental pasa a ser únicamente el 10,1%, mientras el retículo estrellado aumenta a un 12,5% y la capa de ameloblastos, más nítida, supone ya un 4,3% del área total. Con todo ello vemos que los derivados ectodérmicos han descendido hasta un 60,2% mientras que la papila dental, es decir los derivados mesodérmicos han aumentado hasta un 39,7%.

En el feto humano de 130 mm (figs. 5, 6 y 7), se observa un aumento significativo del retículo estrellado (51,4%) sobre todo a costa del órgano del esmalte que desciende hasta el 13,1%, y del gubernáculo dental, que ya representa únicamente el 6,8%. También se encuentra mucho mejor delimitada la capa de ameloblastos, cuya área aumenta hasta el 4,8%. Así, los derivados ectodérmicos, cuya área relativa había descendido en el embrión humano de 78 mm, vuelve a aumentar hasta el 76,3%. Ello es en parte debido a que la papila dental se encuentra más adelgazada, ocupando un área menor (incluso en términos absolutos) que es el 20,7% y en ella se diferencia con una mayor claridad y precisión que no se hallaba en estadios anteriores, una capa de odontoblastos, que se adapta a la capa de ameloblastos, y que ocupa un área del 2,8%. Según estos datos, en este estadio de 130 mm, puede observarse que la relación entre la capa de ameloblastos y la de odontoblastos es del 63,1% de ameloblastos frente al 36,9% de odontoblastos, pero debido a que su área real es muy reducida, resultaban difíciles de delimitar en la visión panorámica en la que se relacionaban todos los componentes del germen dentario. Por ello, se substituyó la

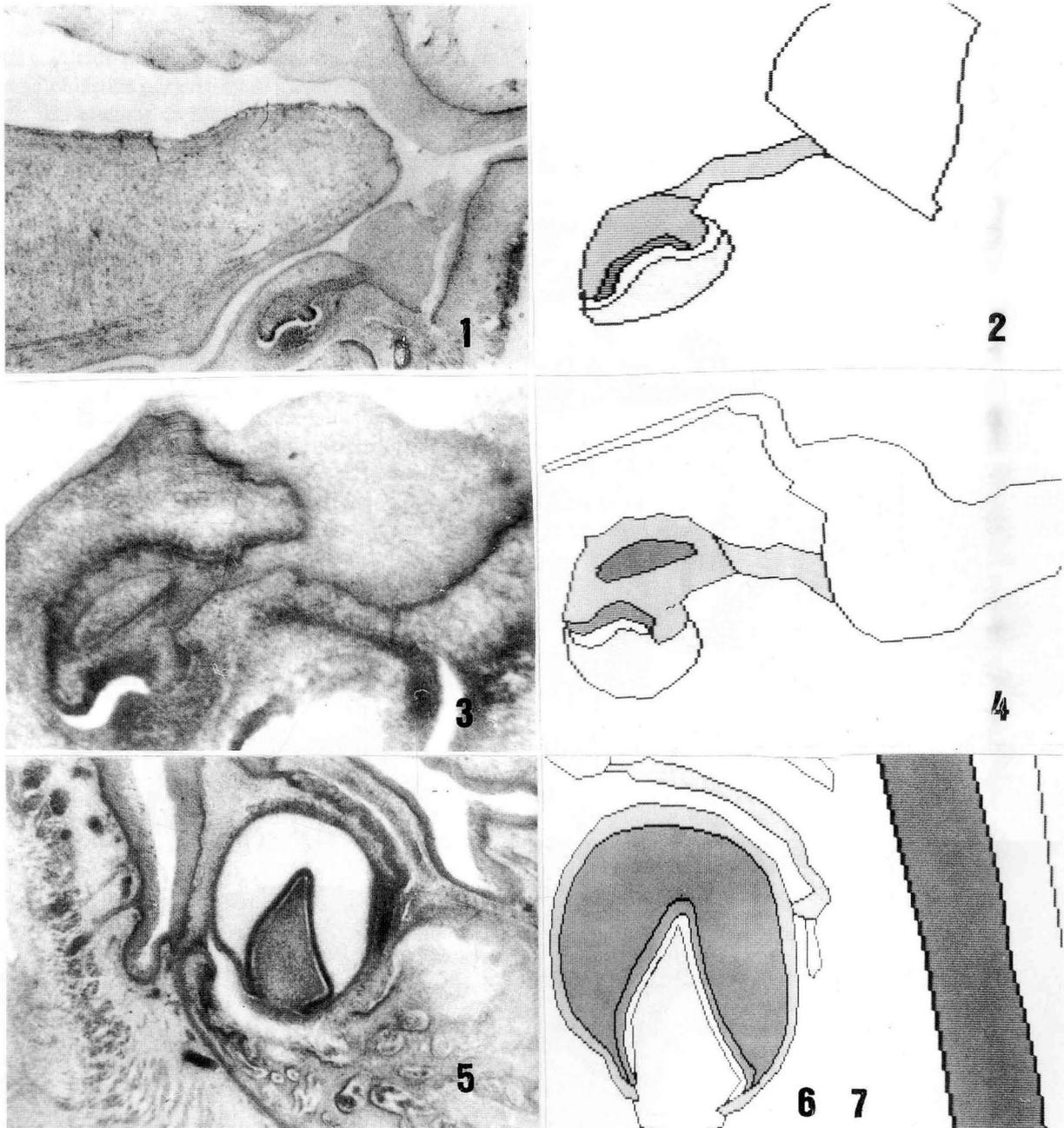


FIGURA 1. Embrión humano de 50 mm.

FIGURA 2. Embrión humano de 50 mm. Lámina dental: 19,8%. Órgano del esmalte: 39,6%. Retículo estrellado: 9,2%. Epitelio interno del esmalte: 3,3%. Papila dental: 28%.

FIGURA 3. Embrión humano de 78 mm.

FIGURA 4. Embrión humano de 78 mm. Lámina dental: 10,1%. Órgano del esmalte: 33,3%. Retículo estrellado: 12,5%. Epitelio interno del esmalte: 4,3%. Papila dental: 39,6%.

FIGURA 5. Feto humano de 130 mm.

FIGURA 6. Feto humano de 130 mm. Lámina dental: 6,8%. Órgano del esmalte: 13,1%. Retículo estrellado: 51,4%. Ameloblastos: 4,8%. Odontoblastos: 2,8%. Papila dental: 20,7%.

FIGURA 7. Feto humano de 130 mm. Relación entre la capa de ameloblastos y la de odontoblastos.

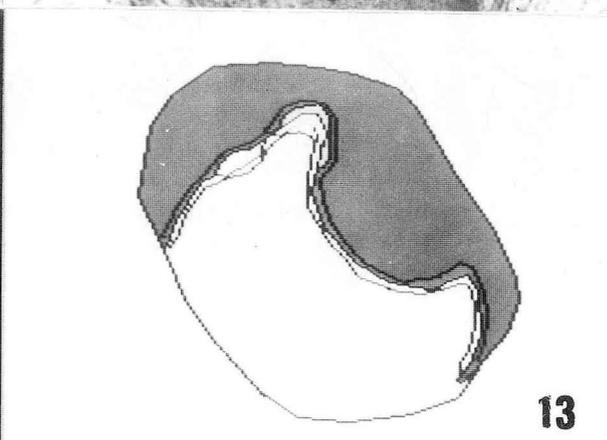
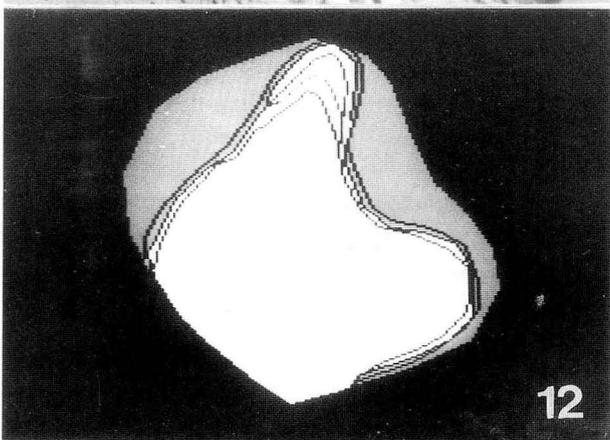
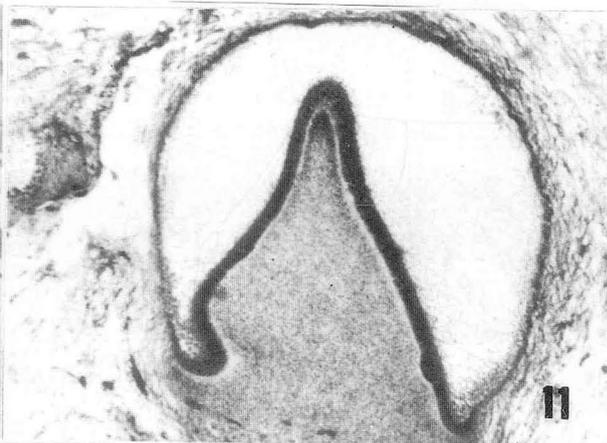
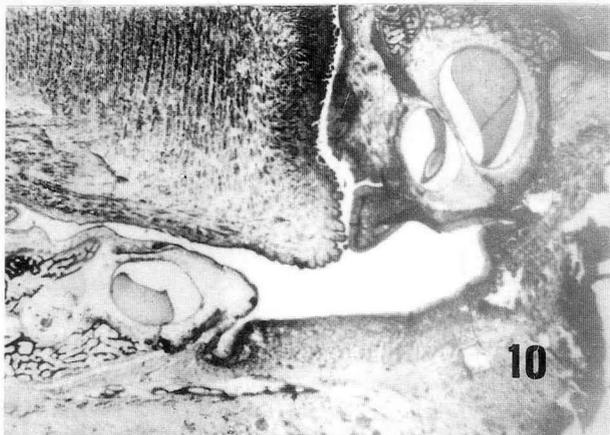
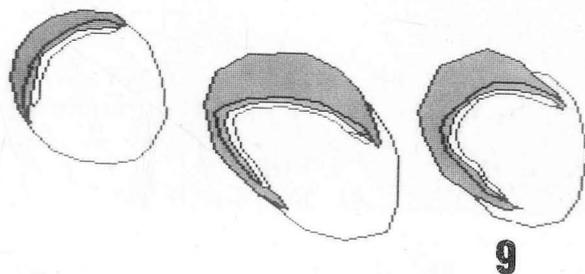


FIGURA 8. Feto humano de 140 mm.

FIGURA 9. Feto humano de 140 mm. Retículo estrellado: 25,5%. Ameloblastos: 4,6%. Odontoblastos 2,9%. Papila dental: 66,7%.

FIGURAS 10 y 11. Feto humano de 145 mm.

FIGURAS 12 y 13. Feto humano de 145 mm. Retículo estrellado: 40%. Ameloblastos 2,9%. Odontoblastos: 2%. Papila dental: 53,3%. Esmalte: 0,5% Dentina: 0,5%.

lupa Wild por un microscopio para observar a mayores aumentos una parte de esas capas adaptadas de ameloblastos y odontoblastos, y con el mismo método delimitar con mayor precisión la relación porcentual entre ambas capas. El resultado no se diferenció apenas del obtenido anteriormente, ya que la relación final fue de un 65,2% de capa ameloblástica por un 34,8% de odontoblastos.

En el embrión humano de 140 mm (figs. 8 y 9) y 145 mm (figs. 10, 11, 23 y 13), parecen reducirse los componentes ectodérmicos, no observándose ya el gubernáculo dental, y disminuyendo el retículo estrellado. Lo más llamativo, sin embargo, del estadio del 145 mm, es que ya aparecen en la corona un 0,5% de área total que corresponde al esmalte formado por los ameloblastos, y otro 0,5% de dentina formada por la capa de odontoblastos.

Discusión

En cuanto a la metodología empleada, al realizarse la introducción de las imágenes a través de una videocámara, se consigue una fidelidad total de la imagen a tratar. De acuerdo con Navarro (1987) y Paules (1988), el actual método obvia la manipulación del operador en la fase de dibujo a cámara clara y reduce el margen de error.

En cuanto a los resultados, parece evidente que en los primeros estadios de la odontogénesis existe un predominio manifiesto de los derivados ectodérmicos de la mucosa bucal, a los que más tarde se unirán los componentes mesodérmicos que tomarán mayor relieve en estadios posteriores, de 140 y 145 mm, para a partir de aquí regresar todos los anteriores componentes celulares para dejar paso a un crecimiento provocado por la aposición del esmalte y la dentina.

BIBLIOGRAFÍA

- BROWN, K.S. (1983): Evolution and development of the dentition. *Birth Defects*, **19** (1): 29-66.
- GAUNT, W.A.; OSBORN, J.W.; TEN CATE, A.R. (1971): *Advised dental histology*, second edition. Wright; Bristol.
- MATARASSO, S.; MARTUSCELLI, R.; AMATO, M.; SCOTTI, C. (1986): Le interazioni epitelio-mesenchimali nel corso dell'odontogénesi. *Minerva Stomatol.*, **35** (1-2): 1-6.
- NAGAHAMA, S. (1984): A histological study of the development of human dental laminae. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, **61** (1): 59-67.
- NAVARRO, M.J. (1987): Estudio morfométrico en algunos estadios del desarrollo cardíaco en embrión humano. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.
- PAULES, J.M. (1988): Estudio cuantitativo de los efectos de la obturación del conducto dentario con diferentes materiales endodónticos. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.
- RUCH, J.V.; LESOT, H.; KARCHER-DJURICIC, V.; MEYER, J.M.; MARK, M. (1983): Epithelial-mesenchymal interactions in tooth germs: mechanisms of differentiation. *J. Biol. Buccale*, **11** (3): 173-193.
- SASAKI, T.; SEGAWA, K.; TAKIGUCHI, R.; HIGASHI, S. (1985): Formation of tight and gap junctions in the inner enamel epithelium and preameloblasts in human fetal tooth germs. *Acta Anat. (Basel)*, **121** (4): 223-229.
- SLAVKIN, H.C.; SNEAD, M.L.; ZEICHNER-DAVID, M.; MACDOUGALL, M.; FINCHAM, A.; LAU, E.C.; LUO, W.; NAKAMURA, M.; OLIVER, P.; EVANS, J. (1988): Factors influencing the expression of dental extracellular matrix biomineralization. *Ciba Found Symp.*, **136**: 22-41.

Correspondencia: M. Lahoz Gimeno
Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza
C/ Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza. España

ORBITOMETRÍA EN CRANIUMS DEL YACIMIENTO DE "ADRO VELLO" (O GROVE-PONTEVEDRA)

ORBITMETRIC IN SKULLS OF THE "ADRO VELLO'S DEPOSIT" (THE GROVE-PONTEVEDRA- SPAIN)

M.C. MASA y M.L. NOGUEIRA

Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela

RESUMEN

Estudiamos 55 craniums, pertenecientes al yacimiento antropo-arqueológico de Adro Vello, O Grove (Pontevedra), de los cuales 35 los hemos clasificado como masculinos y los 20 restantes como femeninos.

En nuestro estudio realizamos medidas directas y medidas en proyección, las primeras exigieron del compás de corredera, de la cinta métrica milimetrada y del goniómetro adaptable así como, con el fin de utilizar este último, del cranióforo de Mollison y su correspondiente tabla-base niveladora.

En cuanto a las medidas en proyección, un conjunto de ellas fueron determinadas sobre los orbitogramas, mientras que otras exigieron la realización de dos secciones teóricas, vertical y transversal, trazadas gráficamente con el diágrafo de Martin.

Entre los resultados obtenidos destacaremos la tendencia a la Mesoconquia en la serie masculina, mientras que la serie femenina se presenta como Hipsiconquia.

PALABRAS CLAVE: Medidas directas; medidas en proyección; goniómetro; orbitogramas; diágrafo; Mesoconquia; Hipsiconquia.

SUMMARY

We have studied 55 skulls belonging to the anthropo-archaeological deposit of Adro Vello, O Grove (Pontevedra- North-West Spain). We have classified 35 of them as males and the rest, 20 as females.

In our study we have made both direct measures and projection ones. In order to make the former ones we needed a sliding compass with graduated millimetrical measuring tape, an adjustable goniometer, as well as Mollison's skull measurement and his corresponding table-basis balance.

In relation to projection measures, some of them were determined on orbitograms and others had to be done by means of two transversal, vertical theoretical sections which were drawn up graphically with Martin's diagraph.

Among our final results we would like to point out a tendency towards Mesoconquia in both series, although among female orbits the most predominant ones are the Hipsiconcas

KEY WORDS: Direct measures; projection measures; goniometer; orbitograms; Martin's diagraph; Mesoconquia; Hipsiconquia.

Introducción

El yacimiento se asienta en una duna de la playa de "O Carreiro" sita en la parroquia de San Vicente, municipio de O Grove, Pontevedra.

El lugar es conocido por los naturales de la zona con la denominación toponímica de "Adro Vello".

Sus coordenadas geográficas son: 5º 14' y 40" de longitud Oeste y 42º 28' y 40" de latitud Norte.

Se trata en realidad de un complejo arqueológico, pero por tratarse de un yacimiento todavía en fase de excavación, no se dispone de la memoria interpretativa definitiva.

El colectivo humano proveedor de la Necrópolis debió configurar en sus orígenes, la población de un hábitat castreño inmediato por el Oeste, conocido toponímicamente como "a punta do castrinho".

Cronológicamente, hay razones para suponerlo ya activo en la Edad de Bronce, desconociéndose en que momento se traslada de allí el colectivo humano que lo habitaba.

Material y Método

Para el estudio orbitométrico que nos ocupa, utilizamos 55 craniums, 35 de hombres y 20 de mujeres.

Realizamos medidas directas y medidas en proyección. Las primeras exigieron de el compás de corredera, de la cinta métrica milimetrada y del goniómetro adaptable, así como, con el fin de utilizar este último, del cranióforo de Mollison y su correspondiente tabla-base niveladora.

Por lo que se refiere a las medidas en proyección, un conjunto de ellas fueron determinadas sobre los orbitogramas (fig.nº 1) (realizados con el dioptrógrafo a escala 1:1 y con un grafito de 0,2 mm) mientras que otras exigieron la realización de dos secciones teóricas, vertical y transversal, trazadas gráficamente con el diágrafo de Martin.

Las medidas directas obtenidas son las siguientes:

- Diámetros tradicionales de la base; anchura máxima y altura.
- Agujeros etmoidales, anterior y posterior: estableciendo la distancia entre el punto más ventral de su extremo anterior y el maxilo-frontal correspondiente, medidas que posicionaron ambos agujeros respecto del citado punto craneométrico. También se midió su eje antero-posterior máximo.
- Amplitud de la hendidura esfenoidal, la mínima habitualmente radicada en 1/3 medio de la longitud de dicha hendidura.
- Altura y anchura máxima del saco lagrimal (cc).
- Anchura bióptica (c-c') entre el punto más ventral del borde anterior de un agujero óptico al otro.
- Ángulo de declinación de la altura base-orbitaria antes referida, respecto de la vertical teórica que pasa por su extremo superior (cc más goniómetro adaptable).

Medidas en proyección:

Sobre los orbitogramas se reflejan las siguientes medidas:

- Anchura interorbitaria interna (Nf-Mf).
- Amplitud máxima de las escotaduras/agujeros supraorbitarias.
- Anchura interorbitaria externa (Ec-Ec).
- Altura máxima, ortogonal al plano de Francfort, de la base de la órbita.
- Altura y anchura de los agujeros infraorbitarios.

Para la hendidura esfenoidal se ha estudiado:

- La distancia máxima de su extremo súpero-externo, al plano medio (AA'), lo mismo para el extremo ínfero-interno (B-B')
- Altura del extremo súpero-externo respecto al Francfort (H-H'), lo mismo para el extremo ínfero-interno (h-h'), y el ángulo de inclinación de la hendidura ($\alpha-\beta$).

Hemos calculado asimismo, el área de la hendidura esfenoidal y el área de la base orbitaria.

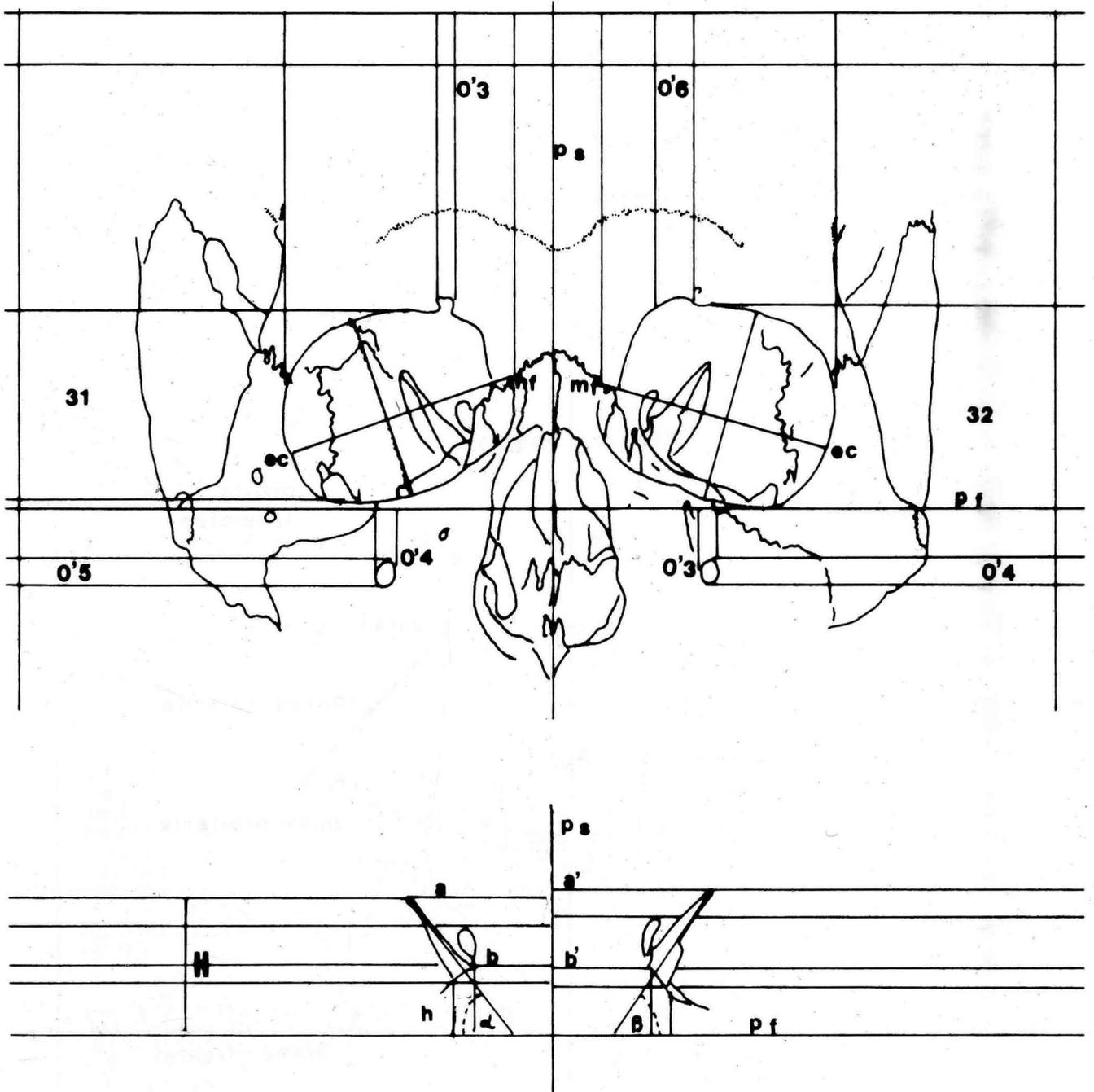


FIGURA 1. Orbitograma. Metodología utilizada para realizar las medidas en proyección. Esquema de la hendidura esfenoidal del mismo cranium. ec = Ectoconquio; mf = maxilofrontal; ps = plano sagital; pf = plano francfort; a-a' = Dist. máx. extremo supero-interno a ps.; b-b' = Dist. máx. extremo infero-interno a ps.; H = altura extremo súpero-externo a Pf.; h = altura extremo infero-interno a Pf.; α - β = ángulo inclinación de la hendidura con respecto al Pf.

Secciones orbitarias

La sección vertical se obtuvo proyectando las paredes superior e inferior de las órbitas, que fueron referidas por un trazo rectilíneo cuyos extremos corresponden ventralmente a los dos puntos límite de la altura baseorbitaria, dorsalmente por los puntos más alto y más bajo respectivamente, de los bordes craneal y caudal de los agujeros ópticos.

La sección transversal refleja un corte teórico que se compone en realidad de dos semicortes convergentes a nivel del plano medio (fig. 2).

Quedan así dibujadas en proyección las paredes externa e interna. Esta sección ha permitido obtener la dimensión rectilínea proyectiva de las paredes orbitarias así como mensurar gráficamente hasta 15 ángulos, los cuales tienen uno de sus lados, bien sobre el plano sagital, bien sobre el frontal o incluso sobre el eje que objetiva la anchura máxima base-orbitaria.

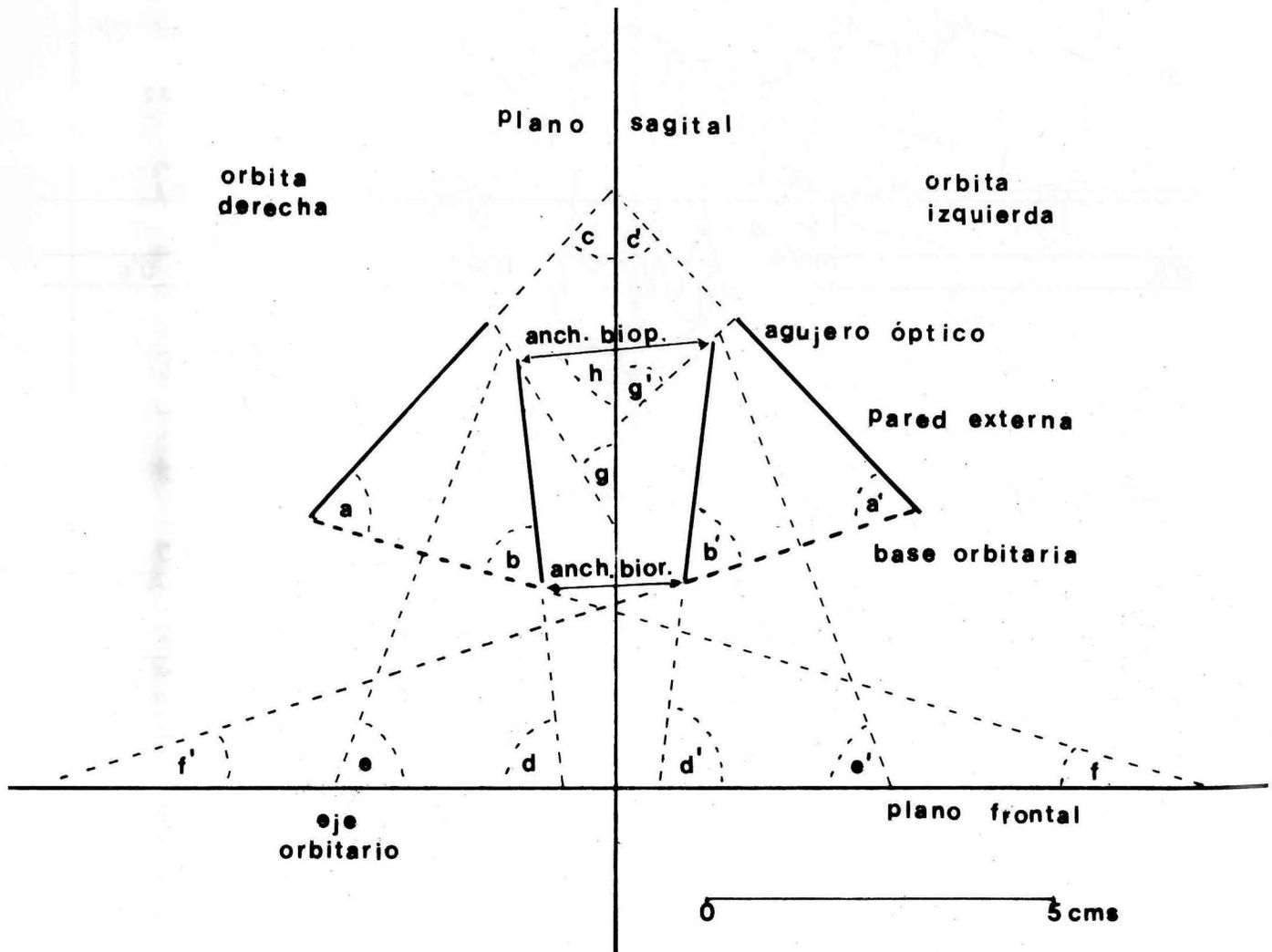


FIGURA 2. Sección transversal. Representación gráfica de las paredes externa e interna, rectilinizadas, que nos permiten mensurar gráficamente hasta 15 ángulos.

Resultados

Los resultados obtenidos quedan reflejados (en sus valores medios) en el cuadro adjunto. (Tabla 1).

	ÓRBITA DERECHA		ÓRBITA IZQUIERDA	
	HOMBRES X ± EX	MUJERES X ± EX	HOMBRES X ± EX	MUJERES X ± EX
ALTURA ORBITARIA	33,50 ± 0,51	33,80 ± 0,49	33,02 ± 0,65	33,65 ± 0,61
ANCHURA ORBITARIA	38,97 ± 0,54	38,69 ± 0,49	39,27 ± 0,38	38,50 ± 0,39
ÍNDICE ORBITARIO	85,65 ± 1,80	84,92 ± 1,49	84,04 ± 1,72	87,55 ± 1,90
LONG. PARED EXTERNA	46,07 ± 0,61	43,94 ± 1,37	45,89 ± 0,71	44,33 ± 1,10
LONG. PARED INTERNA	40,46 ± 0,85	38,90 ± 0,79	40,10 ± 0,85	38,77 ± 0,55
LONG. PARED SUPERIOR	46,96 ± 0,68	42,61 ± 0,59	45,56 ± 0,74	41,00 ± 0,82
LONG. PARED INFERIOR	44,42 ± 1,26	42,75 ± 0,64	44,64 ± 0,84	41,83 ± 1,20
ÁREA BASE-ORBITARIA	1.026,47 ± 22,19	1.006,23 ± 17,48	1.017,11 ± 21,73	986,30 ± 24,84
DIST. AL MF.	12,20 ± 0,58	19,10 ± 0,57	19,40 ± 0,61	18,10 ± 0,74
AGUJ. ETMOIDAL ANTR. EJE ANT-POSTR.	3,90 ± 0,27	4,10 ± 0,16	3,90 ± 0,20	4,00 ± 0,19
DIST. AL MF.	32,40 ± 1,20	31,00 ± 0,95	30,80 ± 0,84	31,40 ± 0,70
AGUJ. ETMOIDAL POSTER. EJE ANT-POSR.	2,00 ± 0,24	2,20 ± 0,30	2,30 ± 0,30	2,20 ± 0,25
ALTURA CANAL SACO LAGRIMAL EJE ANERO-POSTERIOR	20,00 ± 0,51	18,80 ± 0,48	19,80 ± 0,51	18,40 ± 0,62
	11,30 ± 1,87	7,10 ± 0,54	12,00 ± 3,27	8,10 ± 0,75
ALTURA AGUJERO INFRAORBITARIO	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,31 ± 0,01	0,28 ± 0,02
ANCHURA	0,33 ± 0,22	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,02
AMPLITUD ESCOTD. SUPRAORB.	0,49 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,35 ± 0,04
ÁNGULO INCLINACIÓN	8° 33' ± 1° 19'	5° 0' ± 0° 1'	6° 4' ± 1° 13'	5° 2' ± 1° 15'
ÁNGULO a	66° 0' ± 1° 0'	64° 22' ± 1° 6'	65° 12' ± 1° 10'	64° 22' ± 1° 18'
ÁNGULO b	66° 26' ± 1° 9'	67° 28' ± 1° 23'	67° 0,7' ± 1° 11'	68° 22' ± 1° 13'
ÁNGULO c	44° 18' ± 1° 13'	44° 6' ± 1° 18'	43° 0' ± 1° 9'	43° 11' ± 1° 37'
ÁNGULO d	90° 53' ± 1° 56'	87° 18' ± 2° 2'	85° 33' ± 1° 18'	87° 36' ± 2° 18'
ÁNGULO e	67° 25' ± 3° 37'	69° 6' ± 1° 23'	69° 0' ± 1° 10'	69° 0' ± 1° 23'
ÁNGULO f	19° 0' ± 1° 2'	18° 17' ± 1° 25'	18° 0,7' ± 4° 12'	17° 30' ± 4° 31'
ÁNGULO g	21° 11' ± 4° 25'	33° 36' ± 2° 25'	22° 0' ± 4° 12'	34° 3' ± 4° 31'
HENDIDURA ESFENOIDAL OBLICUIDAD	48° 10' ± 1° 18'	48° 1' ± 2° 3'	50° 43' ± 1° 38'	50° 1' ± 1° 3'
DIST. PUNTO SUPERO-EXT. P. SAGITAL	25,50 ± 0,45	24,69 ± 0,65	25,76 ± 0,46	25,76 ± 0,54
DIST. P. INFERO-INTERNO P. SAGITAL	17,97 ± 0,39	17,76 ± 0,68	18,95 ± 0,50	18,50 ± 0,71
ALT. SUPERO-EXTERNO AL FRANCFORT	26,12 ± 0,69	22,26 ± 0,76	25,69 ± 0,63	23,07 ± 0,67
ALT. INFERO-INTERNO AL FRANCFORT	12,47 ± 0,68	9,50 ± 0,75	11,88 ± 0,75	9,46 ± 0,37
ÁREA DE LA HENDIDURA	37,43 ± 3,18	33,38 ± 2,26	39,21 ± 2,64	35,65 ± 2,60
ANCHURA BIÓPTICA	29,77 ± 0,62	29,88 ± 0,54		
ANCH. INTERORBITARIA INTERNA	20,50 ± 0,55	20,78 ± 0,75		
ANCH. INTERORBITARIA EXTERNA	95,21 ± 0,95	93,87 ± 1,42		

TABLA 1



FIGURA 3. Cranium femenino (maturus). Canal infra-orbitario, vinculado, con el tercio medio de la hendidura esfenoideal.
FIGURA 4. Cranium masculino (senilis). Base orbitaria cuadrilátero-rectangular. Prácticamente horizontal.

Discusión

Podemos destacar la tendencia generalizada a la Hipsiconquia entre los ejemplares femeninos, mientras que los masculinos revelan Mesoconquia.

El índice orbitario masculino, $(84,04 \pm 1,72)$ está más cercano al obtenido por Hoyos en la Crania Hispánica, para la provincia de Pontevedra (82) que el femenino.

Vemos asimismo que prácticamente todos los parámetros en estudio alcanzan valores más elevados en los hombres que en las mujeres, y dentro de cada una de las series existe una ligera tendencia a valores algo más elevados en órbita derecha que en la izquierda. En las figuras nº 3 y 4 vemos la región orbitaria de un cranium femenino y masculino respectivamente.

Estamos preparando estudios similares en otros colectivos, para poder comparar estos resultados con los que se obtengan para otros lugares del territorio peninsular.

BIBLIOGRAFÍA

- ARANZADI, T.; HOYOS SAÍNZ, L. (1912): Unidades y constantes de la Crania Hispánica. Asociación española para el progreso de las ciencias. **V**: 29-60. Sección 4.ª. Madrid.
- CARRO OTERO, J. (1971): Los elementos bajo-romanos de San Vicente do Grove. Cuadernos de estudios gallegos. **XXVI (79)**: 129-153. Madrid.
- CARRO OTERO, J. (1983): El yacimiento Arqueológico de la playa Do Carreiro. Disque. Boletín informativo del Ilmo. Ayuntamiento do Grove. Año **I**: 6-8. Octubre.
- CARRO OTERO, J.; MILLÁN GONZÁLEZ, I. (1976): Ara con nuevo teónimo indígena en S. Vicente do Grove. El Museo de Pontevedra. **XXV**: 179-194.
- CARRO OTERO, J.; MASA VÁZQUEZ, M.ª.C.; VARELA OGANDO, M.ª. L. (1983): Molde de hachas, de la edad de Bronce, en S. Vicente do Grove (Pontevedra) Cuadernos de estudios gallegos. **XXXIV**: **99**: 33-51. Santiago.
- GARCÍA MARTÍNEZ, C.; VÁZQUEZ VARELA, J.M. (1968): La Necrópolis de Adro Vello (S. Vicente do Grove). Compostelanum. **13(4)**: 563-571. Santiago
- MASA VÁZQUEZ, M.ª.C. (1988): Estudio anatomo-antropológico de la órbita en habitantes antiguos del N.O. Peninsular. Tesis Doctoral. **II**: 492, 706-707. Santiago de Compostela.

Correspondencia: M.ª del Carmen Masa Vázquez
Algalia de Arriba nº 10-2º
15705 Santiago de Compostela. España

CUERPOS FILAMENTOSOS CITOPLASMÁTICOS EN EL NÚCLEO ARCUATO DEL HIPOTÁLAMO DE RATAS TRATADAS CON GLUTAMATO MONOSÓDICO. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y CUANTITATIVO

CYTOPLASMIC FILAMENTOUS BODIES IN THE HYPOTHALAMIC ARCUATE NUCLEUS OF MONOSODIUM GLUTAMATE TREATED RATS. AN ULTRASTRUCTURAL AND QUANTITATIVE STUDY

B. PELÁEZ, F.E. PASTOR, J. L. BLAZQUEZ, A. SÁNCHEZ, G. AMAT 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 filamentosos citoplasmáticos (CFC) presentes en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de ratas tratadas con glutamato monosódico (GMS). Se han utilizado animales machos a los cuales se les administro una dosis de 4 mg/g peso corporal de GMS a los cuatro días de edad, así como ratas controles (inyectadas con agua bidestilada) y normales; los animales fueron sacrificados a los 11, 34 y 124 días de edad. Los CFC aparecen como inclusiones citoplasmáticas redondas u ovales, carentes de membrana limitante y compuestas por un material filamentos-granular electrodensito que ultraestructuralmente recuerda a la cromatina perinucleolar. En los animales tratados con GMS el estudio cuantitativo del número de CFC demuestra la existencia de un incremento a los 11 días de edad, la no existencia de diferencias a los 34 días y una disminución a los 124 días de edad. Estos resultados se discuten en relación con hallazgos previos ultraestructurales y morfométricos en estos animales.

PALABRAS CLAVE: Cuerpos filamentosos citoplasmáticos, glutamato monosódico, núcleo arcuato, ultraestructura, rata.

SUMMARY

An ultrastructural and quantitative study was performed on the cytoplasmic filamentous bodies (CFBs) present on neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats treated with monosodium glutamate (MSG). Male rats receiving a dose of 4 mg/kg b.w. of MSG at four days of age, and control rats (injected with bidistilled water) and untreated animals were used. The animals were sacrificed at 11, 34 and 124 days of age. The CFBs were visualized as rounded or oval cytoplasmic inclusions that lacked limiting membrane and that were composed of an electron-dense filamentous-granular material that, ultrastructurally, resembled perinucleolar chromatin. In the animals treated with MSG, the quantitative study of CFBs revealed the existence of an increase at 11 days of life, the absence of differences at 34 days of age and a decrease at 124 days. The findings are discussed in relation to previous ultrastructural and morphometric data obtained in the same types of animal.

KEY WORDS: Cytoplasmic filamentous bodies, monosodium glutamate, arcuate nucleus, ultrastructure, rat.

Introducción

Es sabido que la administración de glutamato monosódico (GMS) durante el período neonatal tiene como consecuencia, entre otros efectos, una lesión de las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (para revisión véase Pastor y col., 1990, 1991), que puede traducirse en disfunción de la esfera reproductiva (véase Peláez y col., 1991). En el presente trabajo realizamos un estudio ultraestructural y cuantitativo sobre la presencia de unos organitos especiales, los cuerpos filamentosos citoplasmáticos (CFC), en las neuronas del núcleo arcuato de ratas tratadas neonatalmente con GMS.

Los cuerpos filamentosos citoplasmáticos son cuerpos presentes en el citoplasma de ciertas células y que tienen un gran parecido al nucléolo. Han sido descritos por varios autores recibiendo diferentes denominaciones que generalmente hacen referencia bien a su aspecto ultraestructural o bien a la indicada semejanza con el nucléolo. Dentro de los diferentes nombres con los que se conoce a este organito citoplasmático destacan los de nematosoma, cuerpo filamentosos citoplasmático, cuerpo parecido al nucléolo, etc.

La existencia de CFC en neuronas ha sido descrita en el núcleo arcuato (Adamo, 1972; King y col., 1974; Hindelang-Gertner y col., 1974; Ford y Milks, 1978; Walsh y Brawer, 1979; Walsh y col., 1982; Leranthy y col., 1985; Amat y col., 1987), en el núcleo ventromedial (Van Houten y Brawer, 1978), en el núcleo supraóptico (Tasso y Rua, 1978; Lafarga y col., 1980) y en el núcleo paraventricular de la rata (Tasso y Rua, 1978; Menéndez Peláez y Álvarez-Uría, 1987), en la sustancia negra de la rata y del ratón (Le Beux, 1972) y en el locus ceruleus del ratón (Kato y Shimizu, 1982). Se localizan en el citoplasma del pericarion y, en algunos casos, en las prolongaciones de las neuronas, relacionándose con otros organitos celulares como el retículo endoplásmico rugoso (RER) y ribosomas y con el aparato subsináptico (Le Beux, 1972; Hindelang-Gertner y col., 1974; Tasso y Rua, 1978; Ford y Milk, 1978; Kato y Shimizu, 1982).

Material y Método

Hemos utilizado para nuestro estudio 60 ratas albinas machos de la cepa Sprague-Dawley, sometidas desde el nacimiento a un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas y 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). La tercera parte de los animales de cada grupo se sacrificó a los 11 (grupos 4+7), a los 34 (grupos 4+30) y a los 124 días de edad (grupos 4+120). El procesamiento del tejido 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 distintos 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 del estudio cuantitativo. Tras positivar los negativos en papel fotográfico, con una magnificación 5x, se obtuvieron imágenes equivalentes cada una a 1.545 μm^2 del territorio del núcleo arcuato. Se contaron todos los CFC 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 y Discusión

Los cuerpos filamentosos citoplasmáticos (CFC) aparecen en las neuronas del núcleo arcuato de la rata como inclusiones citoplasmáticas redondas u ovals, con un diámetro mayor entre 1 y 2.5 μm , carentes de membrana limitante, compuestas de un material filamentoso-granular electrodenso que ultraestructuralmente recuerda a la cromatina perinucleolar. Pueden mostrar una textura homogénea (figs. 1 a 3) o heterogénea, con oquedades o lagunas en su interior, cuyo aspecto es similar al del hialoplasma (fig. 4). En ocasiones aparecen rodeados por cisternas circulares concéntricas de RER (fig. 1), pudiendo observarse la existencia de pequeñas vesículas membranosas entre el CFC y la cisterna de RER más próxima (fig. 3). Su existencia es independiente de la edad y de la situación experimental, puesto que pueden encontrarse tanto en los animales tratados con GMS, como en las ratas controles –inyectadas con agua bidestilada– y en las normales.

Aunque las referencias sobre los CFC en la literatura son abundantes, su exacta naturaleza y significado –incluso su denominación– son origen de gran confusión.

El organito que nosotros hemos denominado *cuerpo filamentoso citoplasmático* (CFC), siguiendo a Van Houten y Brawer (1978), es idéntico al *cuerpo filamentoso granular* de King y col. (1974). Otro término muy utilizado para designar estas estructuras es el de *cuerpo semejante al nucléolo* (Kessel, 1969; Kishi, 1972; Santolaya, 1973; Fuge, 1976; Takeuchi, 1980; Monaco y col., 1981; Takeuchi y Takeuchi, 1982; Katoh y Shimizu, 1982; Coimbra y Azevedo, 1984; Menéndez Peláez y Álvarez-Uría, 1987; López y col., 1990). En la literatura se encuentran asimismo denominaciones que aluden también al nucléolo, tales como *extrusiones nucleolares* (Ulrich, 1969) y *componente nucleolar secundario* (Jaworska y Lima De Faria, 1973a,b). No obstante, nosotros preferimos utilizar el término CFC para evitar –al igual que hicieron Van Houten y Brawer– una denominación que apunte al origen de este organito como procedente del núcleo celular, puesto que este extremo no está demostrado en absoluto, ya que no se ha podido establecer a ciencia cierta su exacta naturaleza y composición química (véase López y col., 1990). En efecto, aunque se considera que la composición del CFC consiste en ribonucleoproteínas (Santolaya, 1973; Hindelang-Gertner y col., 1974; Fuge, 1976; Takeuchi y Takeuchi, 1982), también hay datos que indican que su composición es exclusivamente proteica y que carecen de ácido ribonucleico detectable (Kishi, 1972). De hecho, se ha descrito que los CFC tienen diferentes propiedades tintoriales que los nucléolos (Santolaya, 1973; Menéndez Peláez y Álvarez-Uría, 1987).

Una serie de autores, tales como Le Beux (1972), Hindelang-Gertner y col. (1974), Halkka y Halkka (1975), Tasso y Rua (1978), Lafarga y col. (1980) y Leranthy y col. (1985), han utilizado, a nuestro juicio erróneamente, el término *nematosoma* para designar a formaciones ultraestructuralmente idénticas a los CFC. Grillo (1970) denominó nematosomas a unas estructuras constituidas por una red convoluta de cordones electrodensos que están incluidos en una matriz menos densa; los cordones tienen un diámetro entre 40–60 nm y, a su vez, están formados por paquetes de filamentos y partículas de un grosor entre 2,5–5 nm. Grillo los localizó en las neuronas de los ganglios simpáticos de rata pero no en las células gliales. Esta descripción es prácticamente idéntica a la que hacen Ockleford y col. (1987) de una inclusión citoplasmática localizada en células de placenta humana y de ratón, denominada también por ellos nematosoma. Estos autores lo definen textualmente de la siguiente forma: "El nematosoma es un organito citoplasmático esférico u ovoide, de aproximadamente una micra de diámetro transversal, que carece de membrana envolvente, y que consta de fibras aproximadamente de 40–60 nm de diámetro. A su vez cada fibra parece estar compuesta de filamentos menores entre 2,5–6 nm de diámetro, esta estructura parece estar incluida en una sustancia homogénea de menor densidad".

La confusión terminológica comienza con el propio Grillo (1970) al señalar la semejanza del nematosoma con el nucléolo –aunque precisa que los nematosomas son diferentes de las inclusiones granofilamentosas descritas por otros autores como estructuras semejantes al nucléolo– y es continuada por Le Beux (1972), quien estudia las inclusiones citoplasmáticas en las neuronas de la sustancia negra de la rata y del gato. El título del trabajo de este último autor es expresivo de la confusión que introduce en la terminología de los cuerpos de inclusión citoplasmáticos, algunos de los cuales son parecidos pero no idénticos. Le Beux (1972) titula así su trabajo: "Estudio ultraestructural de un cuerpo filamentoso citoplasmático, denominado nematosoma, en las neuronas de la sustancia negra de la rata y del gato". Es uno de los primeros que introduce el término de cuerpo filamentosos citoplasmático, pero como término inespecífico, como podría haber considerado, por ejemplo, el "Estudio

ultraestructural de un organito citoplasmático denominado aparato de Golgi"; en este caso "organito" es término genérico, y "aparato de Golgi" es el término específico. En el caso del título del trabajo de Le Beux, cuerpo filamentosos citoplasmático es término genérico y el específico es nematosoma. Le Beux distingue hasta tres tipos de nematosomas: 1) cuerpos filamentosos, redondos u ovals, densos –idénticos a los cuerpos filamentosos granulares de King y col. (1974) y a los CFC de Van Houten y Brawer (1978)–; 2) inclusiones reticulares con centros excavados o sin ellos; 3) agregados pequeños, poco definidos, de filamentos finos. Tal vez inducidos por el trabajo de Le Beux, una serie de autores han denominado nematosomas, siguiendo la nomenclatura de este autor (pero sin indicar si se trata del tipo 1, del 2 o del 3), a organitos citoplasmáticos de inclusión encontrados en las neuronas, que en realidad son CFC.

Aunque existen ciertas semejanzas entre el nematosoma de Grillo (1970) y de Ockleford y col. (1987) y el CFC, las diferencias ultraestructurales son muy manifiestas, como se comprueba con la simple observación de la iconografía de los trabajos de estos autores, por lo que pensamos que no se pueden utilizar ambos términos como sinónimos. Por otra parte, nada podemos aportar en relación con la hipótesis de Tasso y Rua (1978) sobre que ambos tipos de inclusiones pueden representar diferentes estadios de una misma estructura.

Nuestro estudio cuantitativo (Tabla 1) pone de manifiesto la existencia de modificaciones en el número de estas estructuras en los animales tratados con GMS, en relación con las ratas normales y controles de las mismas edades, mientras que no existen diferencias entre estos últimos. En los animales sacrificados a los 7 días de la administración de la sustancia neurotóxica hemos observado un marcado incremento del número de CFC (véase Tabla 1), lo que coincide con la existencia de signos de hiperactividad –referidos fundamentalmente al incremento del RER y del aparato de Golgi (Pastor y col., 1990)– y de hipertrofia neuronal (Pastor y col., 1991) en estos animales. Estos hallazgos ultraestructurales y morfométricos, previamente descritos por nuestro grupo, pueden ser interpretados como consecuencia de una hiperactividad compensadora a la lesión inmediata que tiene lugar en el núcleo arcuato a los pocos minutos de la administración de GMS (véase Pastor y col., 1990, 1991). En este sentido, el incremento en el número de CFC observado a los 7 días de la administración del GMS podría ser interpretado asimismo como un signo de hiperactividad. De hecho, varios autores han considerado a los CFC como signos de incremento de la actividad celular (véase Tasso y Rua, 1978 y Menéndez Peláez y Álvarez-Uría, 1987).

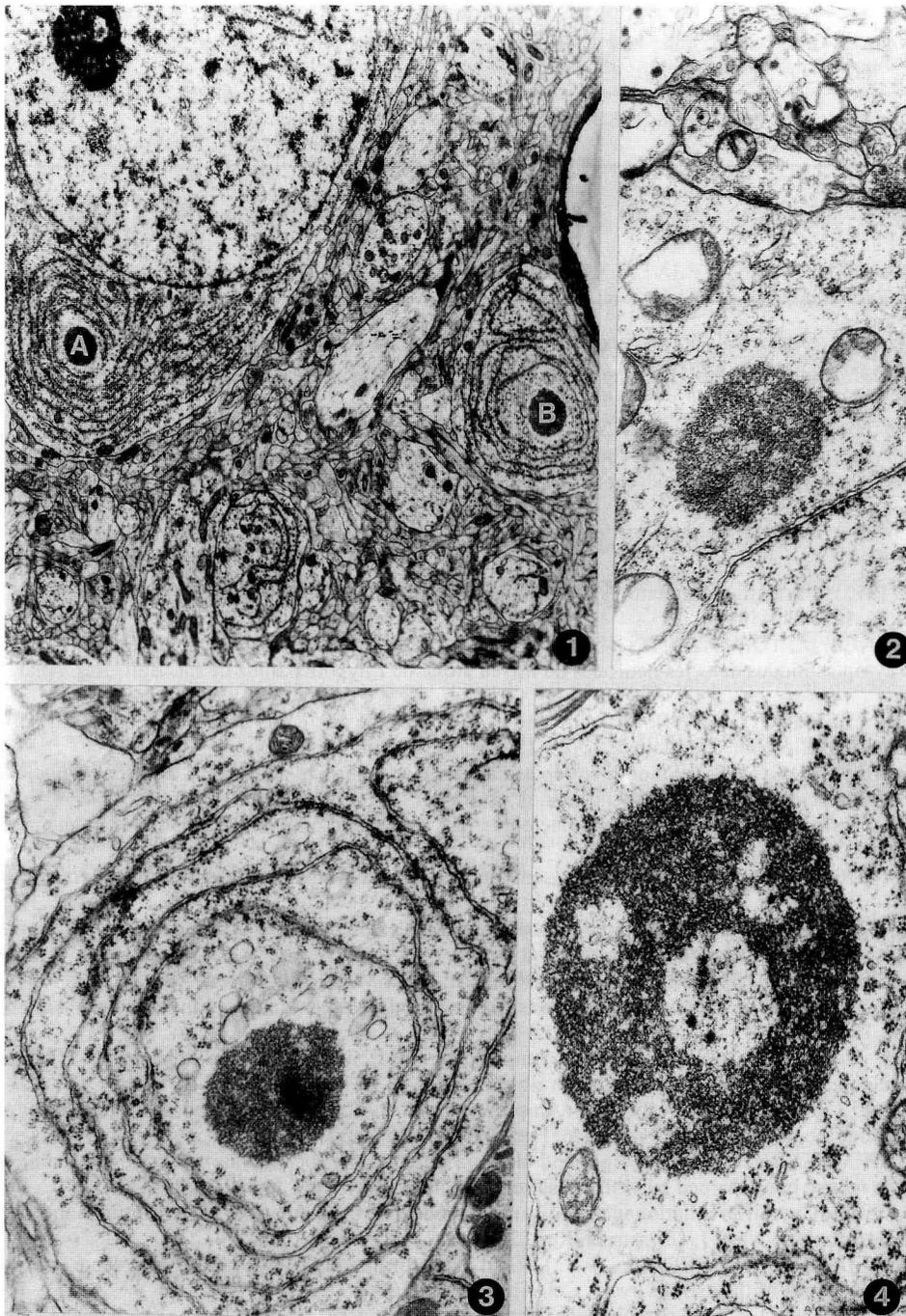
Por el contrario, en los animales sacrificados a los 30 días de la administración del GMS no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de CFC en relación con los animales normales y controles de la misma edad (Tabla 1). En estos animales existen signos ultraestructurales de lesión en el territorio del núcleo arcuato y en el epéndimo, así como una disminución del tamaño de las neuronas, datos identificados por nosotros como debidos a una lesión secundaria, tardía, distinta de la que tiene lugar escaso tiempo después de la administración del GMS (Pastor y col., 1990, 1991).

En los animales sacrificados a los 120 días de la administración del GMS existe una disminución estadísticamente significativa en el número de CFC en neuronas del núcleo arcuato, en comparación con los animales normales y controles de la misma edad (Tabla 1). Este dato puede parecer sorprendente si tendemos a relacionar el CFC con la hiperactividad neuronal, puesto que en la mayor parte de estos animales las neuronas del núcleo arcuato muestran signos ultraestructurales de hiperactividad (Pastor y col., 1990) y una hipertrofia neuronal debida exclusivamente al incremento del área citoplasmática (Pastor y col., 1991). No obstante, es de resaltar que en aproximadamente un 20% de estos animales las neuronas del núcleo arcuato siguen mostrando signos ultraestructurales de lesión, lo que tal vez podría explicar la comentada disminución en el número de CFC.

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).



- FIGURA 1.** Territorio del núcleo arcuato de una rata del grupo GMS 4+7. Se observan dos CFC; uno de ellos en el pericario de una neurona (A) y otro en un fragmento citoplasmático (B) (6.825x).
- FIGURA 2.** Fragmento del soma de una neurona del núcleo arcuato de una rata GMS 4+30. Se aprecia un CFC en la vecindad de mitocondrias desestructuradas. Llama la atención la buena preservación de los botones nerviosos terminales (21.900x).
- FIGURA 3.** Detalle a mayores aumentos (21.900x) del CFC marcado con la letra B en la figura 1. Las cisternas del RER se disponen concéntricamente alrededor del CFC; entre esta estructura y la más interna de las cisternas del retículo se observan varias vesículas
- FIGURA 4.** Detalle del pericario de una neurona del núcleo arcuato de una rata GMS 4+120. Se observa un CFC no homogéneo, en el que resaltan oquedades o lagunas de aspecto similar al del hialoplasma (30.375x).

TABLA 1

	NOR	BID	GMS
4+7	19	17	36 (*)
4+30	15	13	11 (N.S.)
4+120	15	14	7 (•)

Número de CFC en 36 micrografías correspondientes cada una a 1.545 μm^2 del territorio del núcleo arcuato del hipotálamo. * = $p < 0.001$; • = $p < 0.05$; animales tratados con GMS en relación a los normales y controles de la misma edad (Test de comparación de proporciones con aproximación a la normal).

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMO, N.J. (1972): Ultrastructural features of the lateral preoptic area, median eminence and arcuate nucleus of the rat. *Z. Zellforsch.*, **127**: 433-491.
- AMAT, P.; PELÁEZ, B.; TORANZO, D.; BLAZQUEZ, J.L.; ALVAREZ-MORUJO, A. y F.E. PASTOR (1987): Sur les inclusions cytoplasmiques dans les neurones du noyau arcué de l'hypothalamus de rat. *Bull. Ass. Anat.*, **71 (215 bis)**: 23-24.
- COIMBRA, A. y AZEVEDO, C. (1984): Structure and evolution of the nucleolus during oogenesis. En: *Ultrastructure of reproduction* (Van Blerkom y Motta, eds.), 127-139. Martinus Nijhoff, Boston.
- FORD, D.H. y MILKS, L.C. (1978): Smooth endoplasmic reticular whorls in neurons of the arcuate nucleus in male rats following adrenalectomy. *Psychoneuroendocrinol.*, **3**: 65-83.
- FUGE, H. (1976): Ultrastructure of cytoplasmic nucleolus-like bodies and nuclear RNP particles in late profase of tipulid spermatocytes. *Chromosoma*, **56**: 363-369.
- GRILLO, M.A. (1970): Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J. Cell. Biol.*, **45**: 100-117.
- HALKKA, L. y HALKKA, O. (1975): Accumulation of gene products in the oocytes of the dragonfly *Crocodulia aenea* L. I. The nematosomes. *J. Cell. Sci.*, **19**: 103-115.
- HINDELANG-GERTNER, C.; STOECKEL, M.E.; PORTE, A.; DELLMAN, H.D. y MADARASZ, B. (1974): Nematosomes or nucleolus-like bodies in hypothalamic neurons, the subfornical organ and adenohypophysial cells of the rat. *Cell Tissue Res.*, **155**: 211-219.
- JAWORSKA, H. y LIMA DE FARIA, A. (1973a): Amplification of ribosomal DNA in Achaeta. VI. Ultrastructure of two types of nucleolar components associated with ribosomal DNA. *Hereditas*, **74**: 169-186.
- JAWORSKA, H. y LIMA DE FARIA, A. (1973b): Amplification of ribosomal DNA in Achaeta. VII. Transfer of DNA-RNA assemblies from the nucleus to the cytoplasm. *Hereditas*, **74**: 187-204.
- KATOH, Y. y SHIMIZU, N. (1982): The light and electron microscopic localization of intracytoplasmic nucleolus-like bodies in the mouse brain stained by Holmes' silver method. *Arch. Histol. Jap.*, **45**: 325-333.
- KESSEL, R.G. (1969): Cytodifferentiation in the *Rana pipiens* oocytes. I. Association between mitochondria and nucleolus-like bodies in young oocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, **28**: 61-77.
- KING, J.C.; WILLIAMS, T.H. y GERALL, A.A. (1974): Transformations of hypothalamic arcuate neurons. I. Changes associated with stages of the estrous cycle. *Cell Tissue Res.*, **153**: 497-515.
- KISHI, K. (1972): Fine structural and cytochemical observations on cytoplasmic nucleolus-like bodies in nerve cells of rat medulla oblongata. *Z. Zellforsch.*, **132**: 523-532.
- LAFARGA, M.; HERVAS, J.P.; CRESPO, D. y VILLEGAS, J. (1980): Ciliated neurons in supraoptic nucleus of rat hypothalamus during neonatal period. *Anat. Embryol.*, **160**: 29-38.
- LE BEUX, Y.L. (1972): An ultrastructural study of a cytoplasmic filamentous body, termed nematosome, in the neurons of the rat and cat substantia nigra. *Z. Zellforsch.*, **133**: 289-325.
- LERANTH, C.; SAKAMOTO, H.; MACLUSKY, N.J.; SHANABROUGH, M. y NAFTOLIN, F. (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.
- LÓPEZ, J.M.; TOLIVIA, J.; DÍAZ, C. y ÁLVAREZ-URÍA, M. (1990): Ultrastructural study of lamellar and nucleolus-like bodies in the harderian gland during postnatal development of the hamster (*Mesocricetus auratus*). *Anat. Rec.*, **228**: 247-254.

- MENENDEZ PELÁEZ, A. y ÁLVAREZ-URÍA, M. (1987): Nucleous-like bodies in the posterior subnucleus of the rat paraventricular nucleus during postnatal development. An ultrastructural, cytochemical and morphometric study. *J. Submicrosc. Cytol.*, **19**: 101-105.
- MONACO, P.J.; RASCH, E.M. y BALSAMO, J.S. (1981): Nucleoprotein cytochemistry during oogenesis in a unisexual fish, *Poecilia formosa*. *Histochem. J.*, **13**: 747-761.
- NAFTOLIN, F.; BRUHLMANN-PAPAZYAN, M.; BAETENS, D. y GARCÍA SEGURA, L.M. (1985): Neurons with whorl bodies have increased numbers of synapses. *Brain Res.*, **329**: 289-293.
- OKLEFORD, C.D.; NEVARD, C.H.F.; INDANS, I. y JONES, C.P.J. (1987): Structure and function of the nematosome. *J. Cell Sci.*, **87**: 27-44.
- PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1990): Estudio ultraestructural del núcleo arcuato del hipotálamo de rata tras la administración del glutamato monosódico. *An. Anat.*, **36**: 187-197.
- PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1990): Efectos del glutamato monosódico sobre las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de rata. Estudio morfométrico ultraestructural. *An. Anat.* (en prensa).
- PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1991): Efectos de la administración neonatal de glutamato monosódico sobre el testículo de rata. *An. Anat.* (en prensa).
- SANTOLAYA, R. (1973): Nucleolus-like bodies in the neuronal cytoplasm of the mouse arcuate nucleus. *Z. Zellforsch.*, **146**: 319-328.
- TAKEUCHI, I.K. (1980): Nucleolus-like bodies in the embryonic ectodermal and mesodermal cells of postimplantation rat embryos. *J. Electron Microsc.*, **29**: 186-189.
- TAKEUCHI, I.K. y TAKEUCHI, Y.K. (1982): Ultrastructural and cytochemical studies on nucleolus-like bodies in early postimplantation rat embryos. *Cell Tissue Res.*, **226**: 257-266.
- TASSO, F. y RUA, S. (1978): Ultrastructural observations on the hypothalamo-posthypophysial complex of the Brattleboro rat. *Cell Tissue Res.*, **191**: 267-286.
- ULRICH, E. (1969): Étude des ultrastructures au cours de l'ovogenèse d'un poisson téléostéen le danio, *Brachydamio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Microscopie*, **8**: 447-478.
- VAN HOUTEN, M. y BRAWER, J.R. (1978): Cytology of neuron of the hypothalamic ventromedial nucleus in the adult male rat. *J. Comp. Neurol.*, **178**: 89-116.
- WALSH, R.J. y BRAWER, J.R. (1979): Cytology of the arcuate nucleus in newborn male and female and female rats. *J. Anat.*, **128**: 121-133.
- WALSH, R.J.; BRAWER, J.R. y NAFTOLIN, F.N. (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

APLICACIÓN DE UN MÉTODO ANATÓMICO DE INYECCIÓN-CORROSIÓN AL ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DE MOLDES VASCULARES RENALES CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

APPLICATION OF AN ANATOMICAL METHOD OF INJECTION-CORROSION TO THE THREE-DIMENSIONAL STUDY OF RENAL VASCULAR CASTS WITH THE SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

**J.M. RIESCO, F. GUTIÉRREZ, J.*. CASTRO, J.A. JUANES, M.A. VILA, E. BLANCO
y R. VÁZQUEZ**

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

RESUMEN

Se describe una técnica para la obtención y posterior estudio con el microscopio electrónico de barrido de moldes vasculares corrosivos a nivel renal, utilizando como medio de repleción la celoidina. Esta técnica se aplicó a riñones de ovejas y se comprobó que, además de simple, rápida y económica, no requería equipo o instrumental sofisticado.

La repleción de los vasos renales se controla a través de la viscosidad de la celoidina, cuya dilución se efectúa con disolventes epoxídicos habituales, y por la presión ejercida durante la inyección, que no conviene pasar de 300 mm Hg.

No se observaron retracciones macroscópicas ni reblandecimientos de los moldes vasculares renales, después de realizada la técnica o tras el almacenamiento de las muestras durante varios meses a temperatura ambiente.

La adición de colorantes a la celoidina permitió realizar estudios macroscópicos y submacroscópicos previos al estudio final con el microscopio electrónico de barrido.

PALABRAS CLAVE: Vascularización renal. Moldes corrosivos. Microscopio electrónico de barrido. Oveja. Celoidina.

SUMMARY

A technique is described for obtaining corrosive vascular casts from the kidney for later study under the scanning electron microscope, using celloidin as the filling medium. The technique was applied to sheep kidneys with the observation that as well as being simple, rapid and cheap, the procedure does not require sophisticated apparatus or tools.

Filling of the renal vessels is controlled by the viscosity of celloidin, whose dilution is made with the usual epoxide solvents and by the pressure exerted during injection, which should not be greater than 300 mm. of Hg.

No gross retractions or softening of the renal vascular casts were observed after the technique nor after storage of the samples for several months at room temperature.

The addition of dyes to the celloidin permitted macroscopic and submacroscopic studies prior to the final study with the scanning electron microscope.

KEY WORDS: Renal vasculature. Corrosion casting. Scanning electron microscope. Sheep. Celloidin.

Introducción

Los antiguos métodos de inyección-corrosión de órganos, tan empleados antaño en los estudios macro y submacroscópicos (Cole, 1921; Narat y col., 1935; Mezquita, 1957; Kus, 1969) presentaban graves inconvenientes cuando se intentaba obtener moldes corrosivos para ser estudiados con el microscopio electrónico de barrido (MEB), ya que éste precisa especímenes totalmente secos, sin reblandecimientos y que resistan la alta temperatura generada por el bombardeo de electrones en la cámara de vacío del microscopio. Además, la retracción del tejido tendrá que ser mínima tras la aplicación de la técnica. Y el medio de repleción deberá llegar hasta las estructuras tubulares de menor diámetro.

En las últimas décadas han surgido nuevas técnicas que intentan conseguir dichos objetivos. En su mayoría utilizan, como medios de repleción, derivados de gomas o látex, o bien, resinas epoxídicas que mejoraron los resultados obtenidos con las técnicas primitivas, pero resultan, por lo general, costosos y, a veces, difíciles de adquirir y manejar (para revisión ver Hode y Nowell, 1980; Murakami y col., 1983; Lametschwandtner y col. 1984; Schraufnagel, 1987).

En el presente trabajo, exponemos una técnica, rescatada de su utilización en estudios macroscópicos, que permite, además, analizar la morfología de moldes corrosivos vasculares con microscopía estereoscópica y, tridimensionalmente, con el MEB.

Material y Método

Material utilizado: Riñones de ovejas merinas extraídos inmediatamente después del sacrificio (n=10). Se extirpan en bloque, con los pedículos hiliares y los segmentos correspondientes de aorta y vena cava inferior.

Equipo de inyección: Consta de una jeringa de vidrio de 50 cc; una aguja, tipo arteriografía, de 1mm de diámetro; un manómetro; un tubo de vidrio bifurcado en Y, varias cánulas de polietileno y material de sutura (fig. 1).

La jeringa se conecta a la rama impar del tubo en Y mediante una cánula de polietileno. Las ramas pares del tubo de vidrio se unen mediante sendas cánulas, con el manómetro y con la aguja de perfusión.

Medio de repleción: Está constituido por celoidina, empleada al 2%. Para rebajar la viscosidad del medio se añaden los disolventes epoxídicos habituales, en una proporción variable, ente el 5 y el 10%.

Cuando, además del estudio microscópico, se pretende realizar también el análisis macroscópico, es conveniente utilizar colorantes que tiñan la celoidina. En nuestro caso hemos utilizado tinte universal Titán, rojo para inyecciones arteriales y azul para el moldeado venoso.

La composición final del medio de repleción coloreado fue, por cada 10 ml de medio: 7,5 ml de celoidina al 2%, 2 ml de colorante y 0,5 ml de disolvente epoxídico.

Descripción de la técnica: Extraído el bloque visceral, se lava en agua corriente y se disecan los pedículos hiliares conservándose la grasa perirrenal para evitar posteriores fugas del medio de moldeado.

Dependiendo del sistema que se desee replecionar (arterial, venoso o excretor), se introduce la aguja de arteriografía en la luz del conducto elegido. Con sutura de catgut se fija la pared del conducto en torno a la aguja.

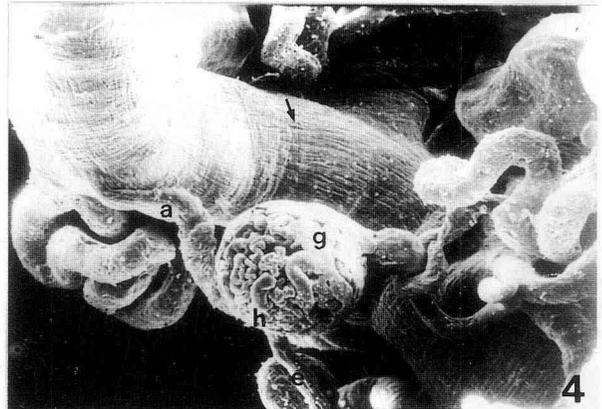
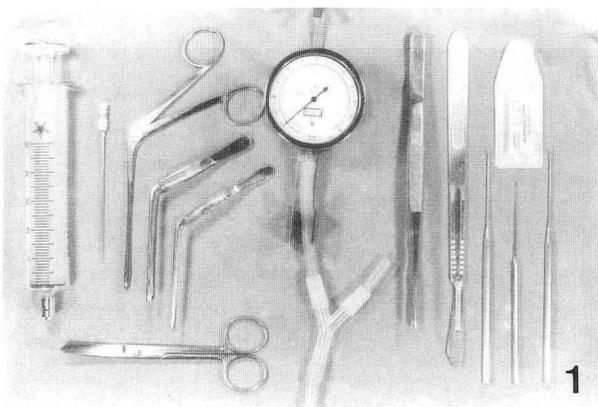
Se prepara el medio de moldeado, se vierte en la jeringa y se inicia la inyección bajo presión controlada.

El volumen total oscila entre 15 y 25 ml dependiendo de las dimensiones y peso de los riñones.

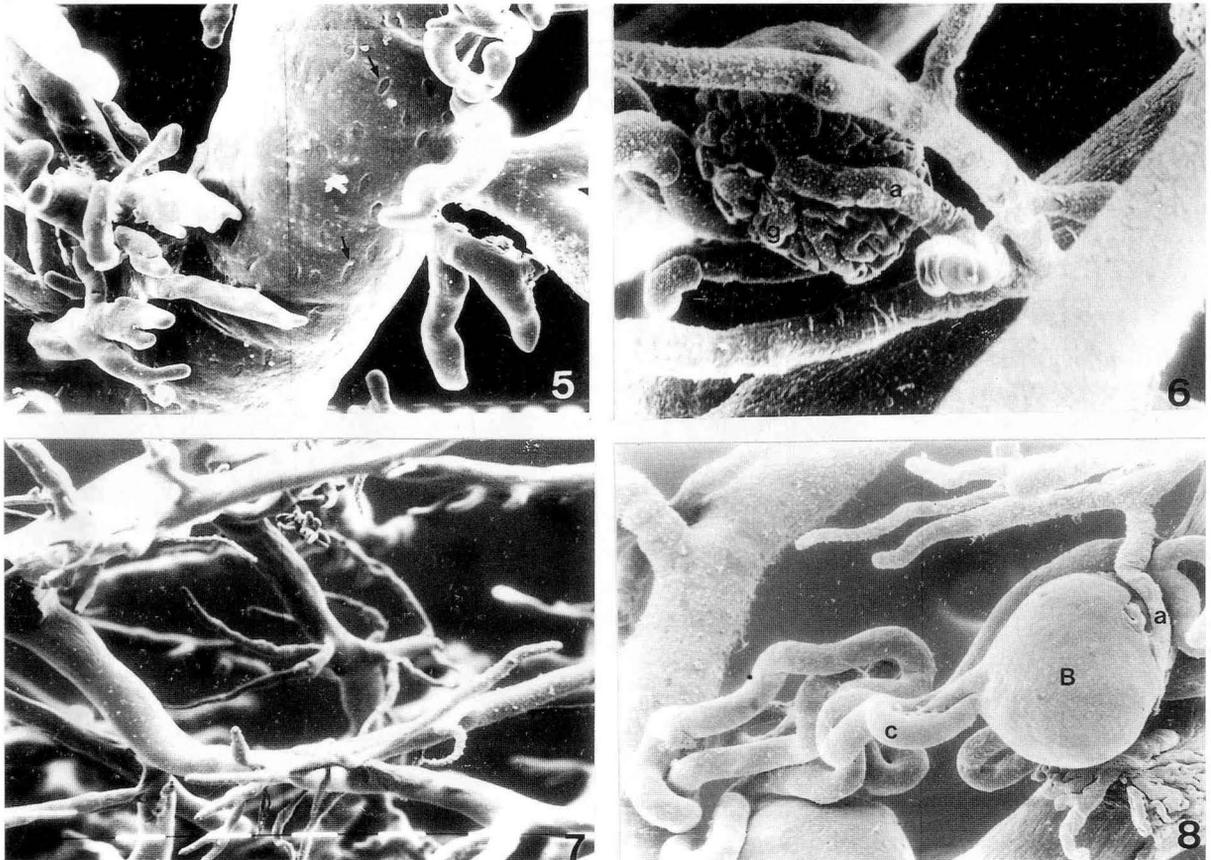
Cuando se precisan repleciones dobles, por distinta vía, se realizarán simultáneamente, utilizando doble material de perfusión.

Finalizada la inyección del medio, se retira la aguja, se liga el conducto y se coloca la muestra en un crisol de vidrio. Bajo campana de gases, se llena el crisol con CIH fumante hasta cubrir por completo al espécimen. La corrosión dura 5-7 días, al cabo de los cuales se procede al lavado con agua corriente, durante varias horas, para arrastrar los restos de tejido. Posteriormente, se coloca el molde sobre papel de filtro y se deja secar, a temperatura ambiente, durante 24-48 horas.

Cuando el molde está seco se procede al estudio macroscópico y microscópico estereoscópico.



- FIGURA 1.** Equipo e instrumental necesario para perfundir piezas y disecar los moldes corrosivos obtenidos. Jeringa de 50 cc; aguja tipo arteriografía; pinzas y tijeras; manómetro; tubo de vidrio en Y; cánula de polietileno; escalpelo; sondas y material de sutura.
- FIGURA 2.** Visión macroscópica, cara anterior, del molde corrosivo arterial de un riñón de oveja. Obsérvese a nivel del hilio, la arteria renal (r), dividiéndose en ramas segmentarias (s), y la vena renal (v). Las arterias interlobulares (flecha) están camufladas por los vasos interlobulillares corticales (i).
- FIGURA 3.** Micrografía obtenida con lupa binocular que muestra varios glomérulos (g) y arteriolas aferentes (flecha). Aumentos: 25 x.
- FIGURA 4.** Micrografía electrónica de barrido de una arteria interlobulillar emitiendo una arteriola aferente (a) que llega al polo vascular de un glomérulo (g) donde se resuelve en capilares. La arteriola eferente (e) abandona el glomérulo también por el hilio glomerular (h). La superficie de los vasos arteriales renales posee pliegues longitudinales (flecha) y depresiones ovaladas. Aumentos: 160 x.



- FIGURA 5.** Detalle al MEB de la pared de un vaso venoso renal. No posee pliegues longitudinales como las arterias, pero sí improntas ovaladas (flecha). Aumentos: 320 x.
- FIGURA 6.** La gran profundidad de campo que posee el MEB permite visualizar con nitidez estructuras situadas en distintos planos, proporcionando a la imagen un aspecto tridimensional. Obsérvese una arteriola aferente (a) llegando a un glomérulo subyacente (g). Aumentos: 240 x.
- FIGURA 7.** Micrografía de barrido, obtenida a pequeños aumentos, de una réplica vascular con abundantes vasos ciegos y arteriolas aglomerulares debidos a defectos de repleción. Aumentos: 80 x.
- FIGURA 8.** La extravasación del medio de moldeado desde el sistema vascular al excretor permite obtener réplicas de nefronas. Arteriola aferente (a). Cápsula de Bowman (B). Túbulo contorneado (c). Aumentos: 160 x.

Preparación de las muestras para el MEB: Las zonas del molde vascular que han de ser estudiadas con el MEB, deben disecarse mediante tijeras histológicas o tijeras de timpanectomía y pinzas. Las muestras obtenidas se montan sobre platinas porta-muestras para el MEB, con la ayuda de cinta adhesiva de doble capa y se les dota de conductividad introduciéndolas en un metalizador (ISIE-5000), donde son recubiertas con una capa de oro de unos 20-30 nm de espesor.

El estudio de las muestras se realizó en un MEB marca Philips SEM-500, aplicando voltajes de aceleración entre 6 y 12 kw. La aplicación de voltajes superiores, aunque consigue mayor profundidad de campo, resquebraja las muestras.

Resultados y Comentarios

La técnica que acabamos de describir fue utilizada en 10 riñones. Se obtuvieron excelentes resultados en 8 de ellos. Los moldes vasculares de estos riñones se estudiaron macroscópicamente (fig. 2), haciéndose un seguimiento minucioso de la distribución arterial y venosa, gracias al colorido del molde.

La microscopia estereoscópica permitió la descripción morfológica y el análisis cuantitativo de las estructuras de pequeño tamaño difíciles de analizar a ojo desnudo, tales como glomérulos y arteriolas aferentes y eferentes (fig. 3).

El análisis morfológico se completó al estudiar los moldes vasculares con el MEB, el cual permite diferenciar perfectamente, en imágenes monocromáticas, las paredes arteriales de las venosas debido a las distintas características ultraestructurales de superficie (figs. 4 y 5). Además, puede analizar en distintos planos visiones con aspecto tridimensional de la estructura glomerular (fig. 6).

En los dos riñones restantes se apreciaron defectos de repleción, sobre todo en las porciones distales de los vasos corticales, así como reblandecimientos de algunas ramas del modo vascular. Estos fallos suelen deberse a un endurecimiento prematuro del medio de moldeado, por exceso de viscosidad, lo que obliga a inyectar el medio con mayor presión. Como consecuencia, se producen roturas vasculares, fugas del medio de moldeado, entrada de aire y defectos de repleción, en especial, a nivel de las estructuras tubulares de menor calibre. Estos defectos de repleción se observan, en las imágenes de barrido, como estructuras vasculares ciegas y arteriolas aferentes aglomerulares (fig. 7).

También, presiones elevadas de inyección provocan fallos por exceso de repleción. La celoidina sobrepasa el sistema vascular y penetra en el sistema excretor, dibujando la morfología tridimensional de las nefronas (fig. 8).

La técnica de moldeado con celoidina, utilizada en primer lugar por Hyrtl (1860) para estudios macroscópicos, sufrió varias modificaciones ulteriores y aún sigue siendo válida para replecionar órganos (Álvarez Morujo, 1980; Álvarez-Morujó Suárez y Morujo 1982). En nuestro estudio, tras aplicar algunas variantes como colorantes, control de la viscosidad y de la presión de inyección del medio, creemos haber conseguido una técnica sencilla, barata y de fácil manipulación, que permite el estudio macroscópico y submacroscópico seguido del análisis ultraestructural de superficie con el MEB.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ MORUJO, M.G. (1980): Los linfáticos del globo ocular vistos con el microscopio electrónico de barrido. Kadmos. Salamanca.
- ÁLVAREZ MORUJO SUÁREZ, A.J. y A. ÁLVAREZ MORUJO (1982): Linfáticos del corazón vistos con el microscopio electrónico de barrido. Kadmos. Salamanca.
- COLE, F.J. (1921): The history of anatomical injections. In: Studies in the history and method of science. Vol. II. C. Singer, Oxford, Clarendon Press.
- HYRTL, J. (1860): Die Kirrosions anatomie und Ihre Ergebnisse. Braumüller, Viena.
- HODDE, K.C. y J.A. NOWELL (1980): SEM of Micro-corrosion casts. Scanning electron microsc., II: 88-106.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA Y SISTÉMICA DE MET-ENCEFALINA SOBRE LAS NEURONAS PRODUCTORAS DE VASOPRESINA DEL NÚCLEO SUPRAÓPTICO DEL HIPOTÁLAMO DE RATA. UN ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO-MORFOMÉTRICO

EFFECT OF CHRONIC AND SISTEMIC ADMINISTRATION OF MET-ENKEPHALIN ON THE VASOPRESSIN-PRODUCING NEURONS OF THE SUPRAOPTIC NUCLEUS OF THE RAT HYPOTHALAMUS. AN IMMUNOCYTOCHEMIC-MORPHOMETRIC STUDY

F. SÁNCHEZ, J. CARRETERO, J.M. RIESCO, J.A. JUANES, E. BLANCO, J. GIL y R. VÁZQUEZ

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

RESUMEN

Después de administrar crónica y sistémicamente met-enkefalina (met-enk), hemos realizado un estudio inmunocitoquímico-morfométrico de las neuronas inmunorreactivas a vasopresina del núcleo supraóptico del hipotálamo de rata (NSO). Tras el tratamiento pudimos observar un gran aumento del área citoplásmica y una disminución del área nuclear (probable efecto inhibitorio sobre la liberación de vasopresina) con respecto a los animales normales y controles, sin embargo este hecho sólo afectó a los animales hembras. Por tanto, es posible hipotetizar que las neuronas inmunorreactivas a vasopresina del núcleo supraóptico del hipotálamo responden de manera sexualmente específica a la administración crónica y sistémica de met-enk.

PALABRAS CLAVE: Núcleo supraóptico, met-enkefalina, inmunocitoquímica, morfometría, especificidad sexual.

SUMMARY

Following systemic and chronic administration of met-enkephalin, an immunocytochemical study of the neurons located in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, reactive to specific anti-vasopressin rabbit serum was made. After this treatment we observed a great increase of the cytoplasmic area and a decrease in the nuclear area (likely inhibitory affect on the vasopressin release) with respect to the normal and control animals, however this fact only could be seen in the female rats. Thus, it is possible to hypothesize that the vasopressin-immunoreactive neurons of the supraoptic nucleus have a sex-specific response to met-enk when the drug is administered chronic and systemically.

KEY WORDS: Supraoptic nucleus, met-enkephalin, immunocytochemistry, morphometry, sex-specificity.

Introducción

En la última década, han sido varios los trabajos que han centrado su atención sobre el efecto de los opiáceos sobre la liberación de vasopresina (VP) y oxitocina (OT) (ver Pittman y col., 1983; Wakerley y col., 1983).

Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado inmunocitoquímica y morfométricamente la existencia de un efecto inhibitorio de met-enkefalina, cuando se administra intracerebroventricularmente, y en una sola dosis, sobre la liberación de VP en las neuronas del NSO (Blanco y col., 1989); además este efecto es más patente en ratas hembras que en machos.

Por otra parte, en las neuronas magnocelulares VP-inmunoactivas del núcleo paraventricular del hipotálamo, hemos observado un efecto similar cuando la droga es administrada en este caso crónica y sistémicamente (Sánchez y col., 1990).

Basados en estas premisas, el objetivo del presente trabajo es analizar las posibles modificaciones existentes en las neuronas VP-inmunoactivas del NSO cuando se administra met-enkefalina crónica y sistémicamente.

Material y Método

Para la realización del trabajo se han utilizado 30 ratas de ambos sexos, cepa Sprague-Dawley, de 200-300 g, sometidas a las condiciones habituales de nuestro laboratorio (ritmo luz diurna-oscuridad nocturna, t° de $22 \pm 2^{\circ}$ C, humedad relativa del aire de $68 \pm 5\%$, dieta equilibrada y agua ad libitum).

Grupos de animales: A) Animales normales (10; 5 por sexo), los cuales no recibieron ningún tipo de tratamiento. B) Animales controles (10; 5 por sexo), los cuales recibieron una inyección intramuscular de suero salino (100 μ l) durante 14 días. C) Animales tratados con met-enkefalina (Sal acetato. Sigma. 20 μ g en 100 μ l de agua destilada) (10; 5 por sexo); los cuales recibieron una dosis intramuscular de la citada droga durante 14 días.

Proceso de las muestras: Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron los bloques hipotálamo-hipofisarios que fueron fijados por inmersión en Bouin-Hollande en sublimado de mercurio, para posteriormente ser incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes frontales de 5 micras en un microtomo LEITZ.

Inmunocitoquímica: Con el fin de inhibir la peroxidasa endógena, se sometió a las muestras a un baño de agua oxigenada (10 volúmenes) al 5% en metanol (Streefkerk, 1972). Posteriormente, se trataron con suero normal de cerdo (DAKO) durante 30 minutos, para inhibir las reacciones inespecíficas, siguiéndose a continuación el método descrito por Sternberger y col. (1970). Inmediatamente después se incubaron toda la noche con suero de conejo anti-vasopresina (VP) (gentilmente cedido por el Dr. Sánchez-Franco, Hospital Ramón y Cajal, Madrid) (Negro-Vilar y col., 1979; Sánchez-Franco y col., 1986). Como antisuero puente se utilizó suero de cerdo anti-Ig de conejo (DAKO) a dilución 1:100. Por último, se empleó complejo soluble PAP (DAKO) obtenido en conejo a dilución 1:100.

Morfométrica: Mediante un planímetro digital Apple conectado a un sistema de vídeo (RCA), se han medido 300 células inmunoactivas, elegidas al azar (nunca más de tres células/corte), por sexo y grupo. De cada una de las células se consideró el área celular (AC), área citoplásmica (ACit) y área nuclear (AN). Los resultados de los parámetros obtenidos se compararon estadísticamente con el test t-Student. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Resultados

Para la descripción de los resultados morfológicos hemos considerado, dentro del NSO, una subdivisión prequiasmática o principal y una retroquiasmática (Rhodes y col., 1981).

Hallazgos Morfológicos: En los animales normales y controles no se han observado diferencias en las características morfológicas entre ambos grupos (figs. 1, 2 y 3). Adicionalmente, en estos grupos no se observaron diferencias entre animales machos y hembras.

En ambas subdivisiones, la inmunoactividad ocupaba todo el citoplasma celular, siendo la intensidad de reacción homogénea aunque en la zona ventral de la subdivisión prequiasmática solían predominar neuronas con

mayor intensidad de reacción (fig. 1); sin embargo, considerada en su conjunto, la intensidad de reacción fue escasa.

En los animales tratados con met-enkefalina, el grupo de machos presentó las mismas características apuntadas para los animales normales y controles (fig. 4).

Sin embargo, la administración de met-enkefalina al grupo de ratas hembras provocó un aumento de la intensidad de reacción, acompañándose de un aumento del número de axones inmunorreactivos, tanto en el interior del núcleo como en las zonas circundantes (figs. 5 y 6).

Hallazgos morfométricos: Los valores observados en los tres parámetros considerados (AC, ACit y AN) en los animales normales, controles y machos tratados con met-enkefalina son similares, no presentando diferencias estadísticamente significativas (Tablas 1, 2 y 3).

En el grupo de ratas hembras tratadas con met-enkefalina, se objetivó un claro aumento del área citoplásmica ($p < 0,05$) y una marcada disminución del área nuclear ($p < 0,05$), cuando se comparan con el resto de los grupos incluidos los machos tratados (Tabla 3).

Discusión

Son varios los trabajos realizados en nuestro laboratorio que han apuntado, mediante inmunocitoquímica, un efecto inhibitorio de la met-enkefalina sobre la liberación de VP, tanto cuando se administra intracerebroventricularmente y en una sola dosis, valorando el efecto sobre el NSO (Blanco y col., 1989), como cuando se administra crónicamente y sistémicamente, valorando el efecto sobre el NPV (Sánchez y col., 1990).

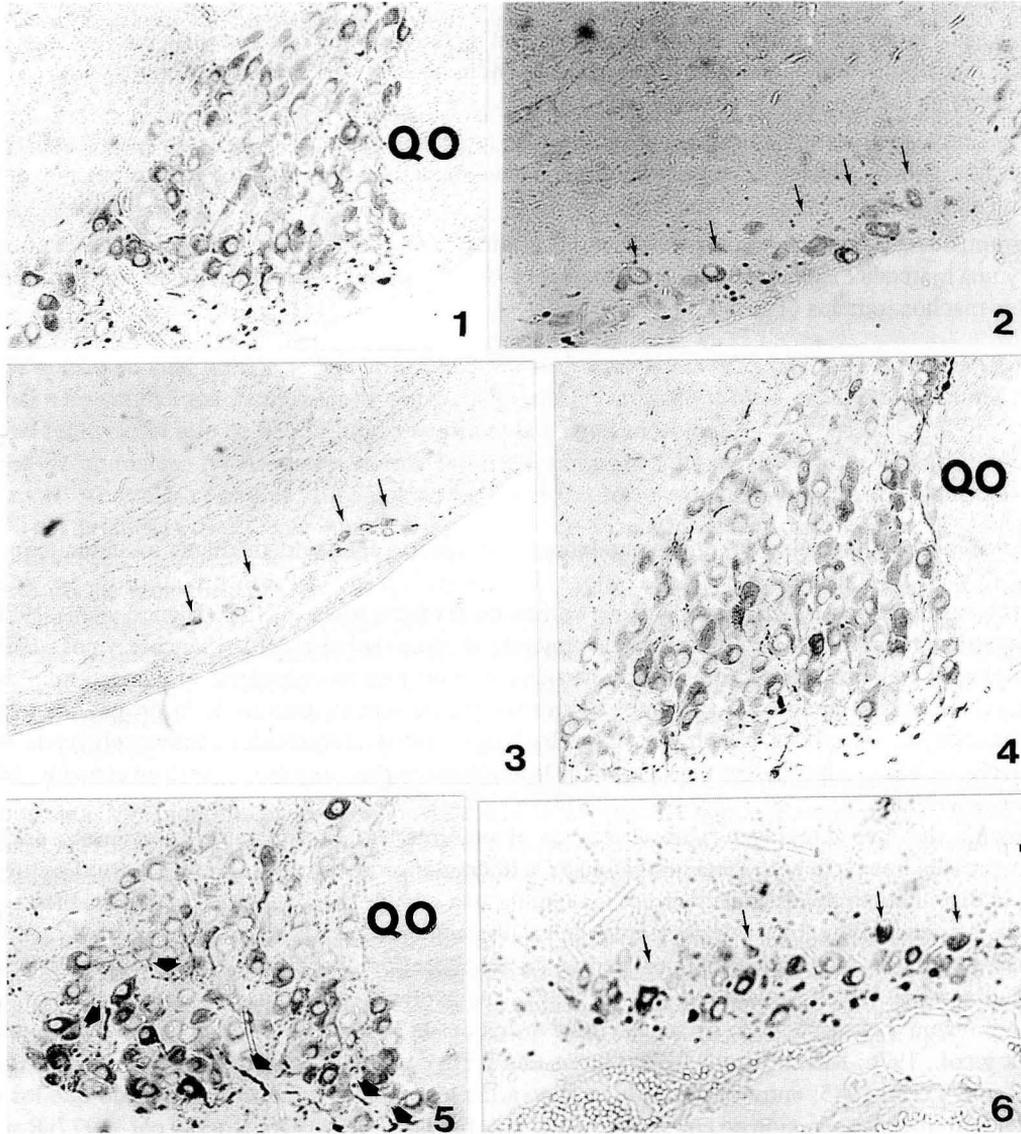
En los citados trabajos, los estudios morfométricos se centraron en considerar el número total de células inmunorreactivas, encontrándose un aumento del mismo, tras la administración de la droga, que afectaba de manera prácticamente selectiva a las hembras. Estos hallazgos fueron interpretados como un efecto de inhibición de la liberación de VP, produciéndose un acúmulo de la hormona en el soma y por lo tanto un aumento del número de neuronas reactivas.

El aumento del área citoplásmica observada en el presente estudio indicaría un acúmulo de VP en el citoplasma, probablemente debido a una inhibición de la liberación, concordando así con los estudios previos. Por otra parte, la disminución del área nuclear podría apuntar una posible inhibición de la síntesis, bien por acción directa de la met-enkefalina, bien por un acoplamiento liberación-síntesis.

Además, hoy día es bien conocida la existencia de receptores opiáceos en el NSO y el lóbulo neural de la hipófisis (Hillar y col., 1973; Simantov y Snyder, 1977) que explicarían la actuación de la droga.

El metabolismo y el mecanismo de acceso de la droga desde la sangre periférica es objeto de controversia (Hambrook y col., 1976; Kastin y col., 1976; Gorenstein y Snyder, 1980; Pardridge y Meitus, 1981; Schwartz, 1983; Zlokovic y col., 1985; entre otros), si bien son varios los trabajos que han demostrado que los opiáceos endógenos estimulan la secreción de ciertas hormonas hipofisarias (Lien, 1976; Bruni y col., 1977; Revier y col. 1977, entre otros).

Por último, el hecho de la afectación selectiva tras el tratamiento del grupo de animales hembras apuntaría a un efecto mediador por parte de los estrógenos, al igual que ya apuntamos en un trabajo previo (Sánchez y col., 1990). Pensamos que para apuntalar esta idea, nuevos montajes experimentales han de ser diseñados, especialmente centrados en estudios de grupos de animales machos previamente estrogenizados.



- FIGURAS 1 y 2.** Animales normales. Neuronas VP-reactivas en la subdivisión prequiasmática (1) y retroquiasmática (2). Nótense neuronas con distinta intensidad de reacción en la subdivisión prequiasmática y neuronas reactivas dispuestas a manera de hileras en la retroquiasmática (flechas). Q.O.: Quiasma óptico. 600 x.
- FIGURA 3.** Animales controles. Panorámica de la subdivisión retroquiasmática donde se observan neuronas VP-reactivas (flechas) con similares características a las observadas en la figura 2. 300 x.
- FIGURA 4.** Animales machos tratados. Subdivisión prequiasmática. Las neuronas presentan las mismas características que los animales normales y controles. Q.O.: Quiasma óptico. 600 x.
- FIGURAS 5 y 6.** Animales hembras tratadas. Subdivisión prequiasmática (5) y retroquiasmática (6). Nótense el aumento de la intensidad de reacción en ambas subdivisiones. Especialmente en la subdivisión prequiasmática pudo observarse la presencia de gran cantidad de axones inmunorreactivos (cabezas de flechas). Q. O.: Quiasma óptico. 600 x.

TABLAS DE 1 a 3: Valores de los parámetros área celular (AC), área citoplásmica (ACit) y área nuclear (AN), obtenidos en machos y hembras normales (Tabla 1), controles (Tabla 2) y tratados con met-enkefalina (Tabla 3). * $p < 0,5$ con respecto a los animales normales y controles.

PARÁMETRO	MACHOS	HEMBRAS
AC (μ^2)	277 . 41 \pm 64 . 10	273 . 40 \pm 55 . 70
ACit (μ^2)	224 . 84 \pm 60 . 07	221 . 28 \pm 51 . 69
AN (μ^2)	52 . 57 \pm 07 . 95	52 . 12 \pm 06 . 57

TABLA 1

PARÁMETRO	MACHOS	HEMBRAS
AC (μ^2)	275 . 42 \pm 63 . 20	276 . 94 \pm 63 . 80
ACit (μ^2)	224 . 61 \pm 59 . 73	222 . 36 \pm 58 . 45
AN (μ^2)	50 . 81 \pm 06 . 99	54 . 58 \pm 07 . 27

TABLA 2

PARÁMETRO	MACHOS	HEMBRAS
AC (μ^2)	269 . 98 \pm 56 . 80	285 . 97 \pm 61 . 11
ACit (μ^2)	221 . 10 \pm 53 . 64	252 . 33 \pm 59 . 57*
AN (μ^2)	48 . 88 \pm 08 . 23	33 . 64 \pm 05 . 15*

TABLA 3

Agradecimientos

Trabajo financiado por un proyecto FISS 85/113.

BIBLIOGRAFÍA

- BLANCO, E.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M. y VÁZQUEZ, R. (1989): Sex-specific effects of met-enkephalin treatment on vasopressin immunoreactivity in rat supraoptic nucleus. *Neuropeptides*, **13**: 115-120.
- BRUNI, J.F.; VAN VUGHT, D.; MARSHALL, S. y MEITES, J. (1977): Effects of naloxone, morphine and methionine-enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci.*, **21**: 461-466.
- GORENSTEIN, B.C. y SNYDER, S.H. (1980): Enkephalinases. *Proc. Rob. Lond.* **210**: 123.
- HAMBROOK, J.M.; MORGAN, B.A.; RANCE, M.J. y SMITH, C.F.C. (1976): Mode of deactivation of the enkephalins by rat plasma and rat brain homogenates. *Nature*, **262**: 782-783.
- HILLAR, J.M.; PEARSON, J. y SIMON, E.J. (1973): Distribution of stereospecific binding of the potent narcotic analgesic etorphine in human brain: predominance in the limbic system. *Pathol., Pharmacol.*, **6**: 1.052-1.062.
- KASTIN, A.J.; NISSEN, C.; SCHALLY, A.V. y COY, D.H. (1976): Blood-brain barrier, half-time disappearance and brain distribution for labelled enkephalin and a potent analog. *Brain Res. Bull.*, **1**: 583-589.
- LIEN, E.L.; FENICHEL, R. L.; GARSKY, V.; SARANTIKIS, D. y GRANT, N.H. (1976): Enkephalin stimulating prolactin release. *Life Sci.*, **19**: 837-840.
- NEGRO-VILAR, A.; SÁNCHEZ-FRANCO, F.; KWIATKOWSKI, M. y SAMSON, W.K. (1979): Failure to detect radioimmunoassayable arginine vasotocin in mammalian pineals. *Brain Res. Bull.*, **4**: 789-792.
- PARDRIDGE, W.M. y MEITUS, L.J. (1981): Enkephalin and blood-brain barrier: studies of binding and degradation in isolated brain microvessels. *Endocrinology*, **109**: 1.138-1.143.
- PITMAN, Q. J.; LAWRENCE, D. y LEDERIS, K. (1983): Presynaptic interactions in the neurohypophysis: endogenous modulators of release. *Prog. Brain Res.* **60**: 319-332.
- RHODES, C.H.; MORREL, J.I. y PFAFF, D.W. (1981): Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: Distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J. Comp. Neurol.*, **198**: 45-64.
- RIVIER, C.; VALE, W.; LING, N.; BROWN, M. y GUILLEMIN, R. (1977): Stimulation in vivo of the secretion of prolactin and growth hormone by β -endorphin. *Endocrinology*, **100**: 238-241.
- SÁNCHEZ, F.; GONZÁLEZ, R.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A. y VÁZQUEZ, R. (1990): Immunocytochemical analysis of the vasopressin-reacting neurons of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus following chronic administration of met-enkephalin. *Z. Mikrosk. Anatom. Forsch.*, (en prensa).
- SÁNCHEZ-FRANCO, F.; CACICEDO, L.; VASALLO, J. L.; BLÁZQUEZ, J.L. y MUÑOZ BARRAGÁN, L. (1986): Arginine-vasopressin immunoreactive material in the gastrointestinal tract. *Histochemistry*, **85**: 419-422.
- SCHWARTZ, J. Ch. (1983): Metabolism of enkephalin and the inactivating neuropeptidase concept. *TINS*, **6**: 45-48. (1983).
- SIMANTOV, R. y SNYDER, S.H.: Opiate receptor binding in the pituitary gland. *Brain Res.*, **124**: 178-184.
- STERNBERGER, L. A.; HARDY, P.H. Jr.; CUCULIS, J. J. y MEYER, H. G. (1980): The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- STREEFKERK, J. G. (1972): Inhibition of erythrocyte peroxidase activity by treatment with hydrogen peroxidase following methanol. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 829-831.
- WAKERLEY, J. B.; NOBLE, R. y CLARKE, G. (1983): In vitro studies of the control of phasic discharge in the neurosecretory cells of the supraoptic nucleus. *Prog. Brain Res.*, **60**: 53-59.
- ZLOKOVIC, B.; BEGLEY, D. y CHAIN-ELIASH, D. (1985): Blood-brain barrier permeability to leucine-enkephalin-d-alanine 2-d-leucine 5-enkephalin and their N-terminal aminoacid (tyrosine). *Brain Res.*, **336**: 125-132.

Correspondencia: Dr. Fernando Sánchez Hernández
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina. Campo Charro s/n
37007 Salamanca. España

ACELERACIÓN SECULAR DEL CRECIMIENTO. OBSERVACIÓN EN POBLACIÓN INFANTIL ARAGONESA. VARONES (I)

GROWTH SPUR IN SPANISH CHILDREN. MALES (I)

N. TAJADA, J.L. NIETO y A. LATRE

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

RESUMEN

Se presenta un modelo de crecimiento secular para niños varones de Aragón (España), que incluye los valores somatométricos y cefalométricos durante los años 1903 a 1990.

PALABRAS CLAVE: Crecimiento secular. Somatometría. Cefalometría.

SUMMARY

The authors present a model o growth-spur in spanish children. The study employed somathometrysts and cephalometrysts values during 1903 to 1990 years.

KEY WORDS: Growth spur. Somathometry. Cephalometry.

Introducción

Hasta el siglo XVIII no se iniciaron los primeros estudios de crecimiento con cierta garantía técnica y metodológica, y fue a partir del siglo XIX cuando comenzaron a observarse cambios que afectaban al tamaño o ritmo de crecimiento en función del tiempo transcurrido. A estos cambios, que han continuado durante el siglo XX, se les ha denominado cambios seculares del crecimiento. Ellos han sido descritos para las poblaciones más diversas del planeta (Meredith, 1963; Malina, 1981; Tojo, 1987), lo que ha motivado que los antropólogos los definan como una verdadera pandemia.

Los cambios seculares del crecimiento observados se caracterizan por el progresivo aumento del tamaño corporal y acortamiento del periodo de crecimiento, con adquisición de la plenitud corporal más temprano. Esta aceleración no se ha iniciado al mismo tiempo en todas las comunidades humanas, según refiere Cameron (1979), ni su ritmo ha sido uniforme para todas ellas. Tampoco la velocidad de cambio se ha mantenido constante en el tiempo, alternando periodos de diferente intensidad, incluso retrocesos. En algunos países existe cierta evidencia de que puede haber finalizado (Roche, 1979; Van Wieringen, 1979; Malina, 1981). Estos cambios, a pesar de las múltiples teorías elaboradas al respecto, no parecen estar genéticamente determinados, debiéndose fundamentalmente a influencias medioambientales. La mejora de la calidad de vida, en su más amplio sentido (alimentación, salud,

cultura, riqueza, paz, ocio, etc.) es el factor más íntimamente relacionado tanto con el comienzo como con la intensidad de los cambios seculares (Falkner, 1985).

Por todo ello, hemos considerado de interés el estudio de las variaciones diacrómicas del crecimiento en nuestra población infantil, ya que en gran medida ello es un indicador de su grado de bienestar y salud, y debido a que no hemos hallado ningún estudio previo de similares características en nuestra región.

Material y Método

Los datos actuales de antropometría infantil, observados entre 1987 y 1990 se obtienen de tres amplios estudios realizados en población infantil aragonesa.

El primero consiste en una observación de tipo longitudinal realizada entre 1987 y 1990 sobre una muestra de 106 varones desde el nacimiento hasta los 2 años de vida en la que se evaluaron 24 parámetros somatométricos.

La segunda muestra se compuso de 200 varones de 3 y 4 años de edad observados de forma transversal en los que asimismo se evaluaron 24 parámetros antropométricos.

El tercer grupo muestral se integró de 4.348 varones de 4 a 14 años de edad, representativos de todas las comarcas aragonesas, observados transversalmente entre 1987 y 1988, y en los que se evaluaron 24 parámetros somáticos y cefálicos según la técnica antropométrica descrita por Olivier, técnica también utilizada en las otras dos series referidas.

Para la elaboración del estudio de tendencia secular que se presenta, se han obtenido de las observaciones arriba referidas los valores correspondientes a peso, longitud/talla, perímetros torácico y cefálico y longitud y anchura máximas de la cabeza, para cada edad cronológica desde el nacimiento hasta los 14 años.

Los resultados obtenidos, que hemos considerado como antropometría actual, se han comparado con los previos de antropometría infantil y patrones de crecimiento para población infantil española y aragonesa aportados por Aranzadi (1903), Suárez y Teixeira (1952), García Almansa (1969), Palacios (1972) y los obrantes en el banco de datos del Seminario Universitario Antropológico de Zaragoza correspondientes a los años 1940, 1963 y 1980, referidos a niños de la misma edad y sexo, y que se han considerado como antecedentes.

A partir de los datos se han elaborado tablas comparativas por edad para cada uno de los parámetros, y establecido la velocidad de variación y las características de la misma para las variables más significativas.

Resultados

En las Tablas 1 a 7 se presentan los resultados del estudio comparativo para las distintas variables a cada edad en años, referido el peso en la Tabla 1, longitud/talla en la Tabla 2, peso y longitud/talla en la Tabla 3, perímetro torácico en la tabla 4 y parámetros cefálicos, longitud y anchura máximas de la cabeza y cerco cefálico, en las tablas 5, 6 y 7. Las fuentes se expresan al pie de las mismas.

Discusión

El análisis de las tablas elaboradas por nosotros es claramente demostrativo de la existencia de una aceleración secular positiva del crecimiento en la población infantil aragonesa masculina durante el periodo estudiado. Ello concuerda con los resultados de numerosos estudios seculares que han tenido lugar sobre todo en Europa y América del Norte (Eveleth y Tanner, 1976; Meredith, 1976; Roche, 1979; Tojo, 1987), de los que se puede concluir que desde

PESO
VARONES

	1903 (1)	1940 (2)	1954 (3)	1963 (2)	1968 (3)	1970 (4)	1972 (4)	1980 (2)	1987 (5)	kg 1990 (5)
EDAD años										
0						3,23				3,32
1						9,96				10,38
2						12,91				12,93
3						14,62				15,01
4		17,60				16,44	17,11	19,32	17,94	
5		18,62				18,23	18,50	21,99	20,28	
6		19,81	21,33	24,15	23,07		20,72	24,22	22,29	
7		21,62	23,58	24,49	25,20		22,83	25,48	24,96	
8	25,51	23,39	26,08	26,23	28,01		25,29	28,21	28,18	
9	23,12	25,63	28,58	29,37	31,42		27,80	30,29	31,16	
10	24,59	26,91	31,21	32,02	34,62		32,41	38,21	34,19	
11	27,11	30,85	34,22	35,32	36,80		32,78	38,82	38,86	
12	27,20	32,86	37,72	41,25	39,91		35,42	43,39	42,41	
13	30,82	37,68	42,13	42,53	44,24		39,10	50,07	47,87	
14	34,51	38,07	47,04	42,65	51,84		41,09		51,94	

TABLA 1

- (1) Según ARANZADI (1903): Antropometría. Soler. Barcelona.
 (2) Según datos del Seminario Universitario de Antropología. Universidad de Zaragoza.
 (3) GARCÍA ALMANSA, A. (1969): Patrones de crecimiento de los niños españoles. Rev. Clin. Esp., **113/1**: 45-48.
 (4) PALACIOS, J.M. (1970): El crecimiento de los niños españoles hasta los 5 años. Rev. Clin Esp., **118**: 419-424.
 (1972). Datos de talla y peso de 128.000 niños españoles. Rev. San. Hig. Pub., **46**: 1.107-1.124.
 (5) NIETO, J.L. (1987, 1990): Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina de Zaragoza.

LONGITUD / TALLA

VARONES

	1903	1940	1954	1963	1968	1970	1972	1980	1987	1990
	(1)	(2)	(3)	(2)	(3)	(4)	(4)	(2)	(5)	(5)
EDAD años										
0						501				503
1						739				764
2						872				889
3						948				979
4		990				1.015	1.013	1.071	1.079	
5		1.064				1.082	1.072	1.125	1.137	
6		1.109	1.150	1.217	1.202		1.132	1.184	1.190	
7		1.150	1.198	1.255	1.251		1.183	1.214	1.249	
8	1.180	1.211	1.248	1.301	1.307		1.244	1.273	1.306	
9	1.210	1.256	1.294	1.353	1.358		1.283	1.307	1.356	
10	1.239	1.304	1.342	1.406	1.403		1.327	1.408	1.390	
11	1.302	1.359	1.399	1.437	1.432		1.372	1.449	1.453	
12	1.316	1.403	1.443	1.475	1.479		1.418	1.489	1.506	
13	1.368	1.449	1.501	1.523	1.544		1.469	1.534	1.573	
14	1.404	1.456	1.559		1.619		1.528		1.620	

TABLA 2

- (1) Según ARANZADI (1903): Antropometría. Soler. Barcelona
- (2) Según datos del Seminario Universitario de Antropología. Universidad de Zaragoza.
- (3) GARCÍA ALMANSA, A. (1969): Patrones de crecimiento de los niños españoles. Rev. Clin. Esp., **113/1**: 45-48.
- (4) PALACIOS, J.M. (1970): El crecimiento de los niños españoles hasta los 5 años. Rev. Clin. Esp., **118**: 419-424.
(1972) Datos de talla y peso de 128.000 niños españoles. Rev. San. Hig. Pub., **46**:1.107-1.124.
- (5) NIETO, J.L. (1987, 1990): Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina de Zaragoza.

	PESO (kg)			LONGITUD / TALLA (mm)		
	1952 (1)	1987 (2)	1990 (2)	1952 (1)	1987 (2)	1990 (2)
Edad años	v	h	v	v	h	v
2	11,0		12,9	815		888
3	13,2		15,1	893		979
4	14,6	17,9		968	1.079	
5	16,7	20,3		1.032	1.137	
6	18,8	22,3		1.091	1.190	
7	21,5	24,9		1.114	1.249	
8	23,6	28,3		1.199	1.306	
9	25,8	31,2		1.247	1.356	
10	28,1	34,2		1.295	1.390	
11	30,4	38,9		1.342	1.453	
12	32,7	44,6		1.385	1.506	
13	35,7	47,9		1.432	1.573	
14	39,6	51,9		1.483	1.620	

TABLA 3

(1) Según SUÁREZ, M. y TEIXEIRA, J. (1952). VIII Congreso Nacional de Pediatría. Barcelona.

(2) NIETO, J.L. (1987,1990). Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina. Zaragoza.

Edad años	PERIMETRO TORÁCICO VARONES mm			
	1940 (1)	1963 (1)	1980 (1)	1987 (2)
6	542	579		613
7	563	603	595	629
8	595	622	625	657
9	596	642	639	683
10	612	658		702
11	617	676		734
12	672	723		787
13	665	745		812

TABLA 4

(1) Según datos procedentes del Seminario Universitario Antropológico. Zaragoza.

(2) NIETO, J.L. (1987). Cátedra de Anatomía de la Facultad de Medicina de Zaragoza.

LONGITUD MÁXIMA			mm
Edad años	1903 (1)	1987 (2)	1988 (2)
	v h	v	v
1	165		168
4	175	174	175
8	180	179	
11	185	183	

TABLA 5

ANCHURA MÁXIMA			mm
Edad años	1903 (1)	1987 (2)	1988 (2)
	v h	v	v
1	126		130
4	134	137	136
7	138	141	
9	142	144	

TABLA 6

PERÍMETRO CEFÁLICO			mm
Edad (a)	1913 (1)	1987 (2)	1988 (2)
	v h	v	v
1	471		486
8	516	533	

TABLA 7

- (1) Según ARANZADI, T. (1903): Antropometría. Soler. Barcelona.
 (2) NIETO, J.L. (1988): Cefalometría infantil: Estudio transversal en varones. An. Anat. **34**: 75-81.
 (1988). Cefalometría infantil: Estudio transversal en hembras. An. Anat., **35**:41-48.

1860 hasta 1960 la talla se incrementa 1,5 cm por década en niños, 2,5 cm por década en adolescentes y 1 cm por década en adultos, es decir, 2 ó 3 cm por cada generación, ocurriendo algo similar con el peso.

Durante la infancia, el aumento secular de talla y peso se pone ya de manifiesto en el recién nacido (Clarson, 1982). Lenz, en 1954, estima el aumento de longitud en el neonato de 1 ó 2 %. Nosotros hemos observado promedios de incremento de longitud al nacimiento similares o algo inferiores en varones durante los últimos 18 años. Biering (1985) observa que los niños recién nacidos islandeses han incrementado su peso al nacimiento 85 g durante los últimos 70 años. En nuestra serie los incrementos de peso al nacimiento estimados entre 1970 y 1990 han sido de 90 g.

Más difícil resulta la apreciación del fenómeno secular durante la época preescolar, entre el nacimiento y los 4 años, consecuencia de las escasísimas aportaciones bibliográficas previas existentes, que a menudo han sido realizadas según métodos distintos, lo que dificulta todavía más el estudio comparativo. No obstante, considerando las tablas-patrón de crecimiento infantil publicadas por Suárezx y Teixeira en 1952, la estatura y el peso de los varones aragoneses de esta edad se ha incrementado notablemente. Podemos decir que durante los últimos 38 años la talla de los varones ha aumentado en 67 mm, 81 mm y 105 mm a los 2, 3 y 4 años de vida respectivamente, lo que supone unas velocidades de incremento de 1,76 mm/año, 2,13 mm/año y 2,76 mm/año a esas edades, similares a las aportadas por otros autores para niños de la misma edad y época en poblaciones occidentales (De Toni, 1965; Eiben, 1979; Cameron, 1979, Tojo, 1987). Durante ese mismo periodo, los incrementos de peso, asimismo cuantiosos, fueron de 1,7 kg a los 2 años, 1,9 kg a los 3 años y 2,25 kg a los 4 años.

En lo que hace referencia a niños escolares, de edades superiores a 4 años, son de gran interés las tablas-patrón de normalidad para peso y estatura elaboradas en 1972 por Palacios y Vivanco a partir de una observación de crecimiento infantil realizada en 1963-1964 sobre una muestra de 128.317 escolares españoles, que aportan promedios antropométricos nacionales y desglosados por regiones para ambos sexos. Las comparaciones establecidas entre estos valores y los observados por nosotros muestran que durante los últimos 25 años los varones de 4 años han incrementado su talla en 38 mm respecto a la media nacional, incremento que es más cuantioso, de 68 mm respecto a la talla de niños del Pirineo de Huesca y Lérida. Este mismo estudio comparativo, referido a peso, señala incrementos ponderales en varones de 4 años de 320 g respecto a la media nacional, y más importantes, de 420 g, respecto a niños de las zonas del Pirineo referidas.

Lo mismo que en otras comunidades occidentales, el incremento de los parámetros corporales aumenta en Aragón desde la niñez hasta la adolescencia. En los varones la aceleración es máxima a los 12 - 13 años. A esta edad, durante los últimos 15 años, ha aumentado su estatura media en casi 6,1 mm/año y su peso en 355 g/año. El adelanto cronológico de la pubertad, y por tanto del considerable esfuerzo de crecimiento que conlleva, contribuye a que los incrementos sean máximos a esta edad, aminorándose en edades posteriores.

En efecto, a partir de entonces la magnitud del fenómeno pierde intensidad y al concluir la adolescencia el crecimiento diacrómico de los aragoneses durante el periodo referido es algo menor de 2 mm/año y de 41 g/año, según han demostrado los estudios de Nieto en 1984.

Nuestra observación pone asimismo de manifiesto las variaciones de la intensidad del crecimiento diacrómico durante los últimos 90 años. Tomando como punto de partida los datos de Aranzadi, en 1903 se observa que los incrementos ponderales y estaturales durante la primera mitad de este siglo son bastante más pequeños que los calculados para los últimos 25 años.

En España son muy escasas las investigaciones relacionadas con las posibles modificaciones seculares de los parámetros craneofaciales. La bibliografía mundial, además de parca, se muestra muy cauta en la interpretación de los resultados. Las mediciones cefalométricas realizadas por Knott y Meredith en 1963 en Iowa apenas se diferencian de las obtenidas por Boas 71 años antes en Massachusetts. Lo mismo sucede con las investigaciones de Hauvast en 1971 en niños holandeses. En general, las únicas diferencias y aun estas poco significativas, aparecen al comparar los valores del perímetro cefálico y los diámetros biparietales de la cabeza. Así lo confirman los datos comparativos aportados por nosotros en relación a los estudios de medidas cefálicas realizados por Aranzadi en 1903. Ello parece inscribirse en el proceso general de braquicefalización que afecta a todas las poblaciones humanas actuales, comprobado en población adulta aragonesa por los recientes estudios de Álvarez y Nieto en 1989 sobre craneometría aragonesa.

Como conclusiones, señalamos que se evidencia una clara tendencia secular positiva de crecimiento para varones aragoneses de edades comprendidas entre el nacimiento y los 14 años. Dicha tendencia se manifiesta en

las variaciones de peso, longitud/talla y perímetros cefálico y torácico fundamentalmente. La intensidad del fenómeno diacrómico es máxima durante los primeros años de la vida y durante el brote prepuberal. A los 4 años la velocidad de incremento de talla alcanza 2,7 mm/año durante los últimos 38 años, y a los 12-13 años de 6,1 mm/año durante los últimos 15 años. Esta aceleración secular del crecimiento infantil ha mostrado mayor intensidad en las zonas previamente deprimidas (zonas de montaña) que en las económica y culturalmente más favorecidas. También ha sido más activa durante los últimos 25 años que durante la época previa. La tendencia secular del crecimiento cefálico, si bien difícil de interpretar, parece inscribirse en el proceso general de braquicefalización que afecta a todas las poblaciones humanas actuales.

BIBLIOGRAFÍA

- ARANZADI, T. (1903): Antropometría. Manuales Gallach. Soler. Barcelona.
- BIERING, G. (1985): Birthweights in Iceland 70 years apart. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, **3/9**: 74-75.
- CAMERON, N. (1980): Conditional standars for growth in heigth for Britishchildren from 5 to 15,99 years of age. *Ann. Humm. Biol.*, **7/4**: 331-337.
- DE TONI, E. (1968): Accelerazione dell'acrescimento humano ed incremento seculare del soma. *Auxología. Minerva Medice. Torino.*
- EVELETH, P. y TANNER, J. M. (1979): World wide variation in human growth. Cambridge University Press. Cambridge.
- FALKNER, F. (1985): Some introductory concepts of human growth: An overview. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, **319**: 17-20.
- GARCÍA ALMANSA, A.; FERNÁNDEZ, M. D. y PALACIOS, J. M. (1969): Patrones de crecimiento de los niños españoles normales. *Rev. Clin. Esp.*, **113/1**: 45-48.
- LATRE, A (1987): Contribución a la cefalometría y somatometría infantil. Estudio transversal de la población aragonesa. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
- MEREDITH, H. V. (1971): Human head circumference from birth to early adulthood: Racial, regional and sex comparison. *Growth*, **35/3**: 233-251.
- MEREDITH, H. V. (1983): Compilation and comparison of overages for standing heigth and late chilhood ages on USA boys of several ethnic groups studied between 1875-1980. *Am. J. Phys. Athropol.*, **61/1**: 111-124.
- MURO, A; ACEÑA, A. y VIVANCO, F. (1954): Patrones de crecimiento de niños españoles normales. *Rev. Clin. Esp.*, **53**: 360-363.
- NIETO, J. L. (1983): Bioantropología de Aragón. *Rev. Aragón*: 316.
- NIETO, J. L. (1983): Aproximación al conocimiento bioantropológico de lapoblación aragonesa. Estado actual de los estudios sobre Aragón. Zaragoza: 55-63.
- OLIVER, G. (1965): Anatomie Anthropologiste. Vigot Freres. París.
- OLORIZ, F. (1894): La talla humana en España. Discurso en la Real Academia de Medicina de Madrid. Madrid.
- PALACIOS, J. M. y VIVANCO, F. (1965): Datos de talla y peso de 128.000 niños españoles. *Rev. Clin. Esp.*, **99**: 230-238.
- PALACIOS, J. M.; GARCIA, A. y VIVANCO, F. (1970): El crecimiento de los niños españoles desde el nacimiento hasta los 5 años. *Rev. Clin. Esp.*, **118/5**: 419-424.
- PRADER, A. (1983): Croissance du foetus et de l'enfant. *Arch. Fr. Pediatr.*, **40**: 365-373.
- ROCHE, A. F. (1979): Secular trend in human growth. Monograph serial 179. University Chicago Press. Chicago.
- SUÁREZ, M. y TEIXEIRA, J. (1952): Métodos de estudio de crecimiento. Ponencia al VIII Congreso Nacional de Pediatría. Barcelona.
- TANNER, J. M. (1952): The assessment of growth and development in children. *Arch. Disease Chil.*, **27**: 10-33.
- TAJADA, N. (1990): Parámetros cefálicos y somáticos infantiles en los cuatro primeros años de la vida. Estudio longitudinal y transversal en población aragonesa. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- TOJO, R.; IGLESIAS, C.; CASTRO, I.; ALONSO, B.; SEGADE, R. y NORES, A. (1987): Secular trend in Galicia 1900-1985: Evolución del crecimiento maduración y desarrollo humano. *Bol. Soc. Cast. Ast. Leon. de Pediatría.*, **XXVIII**: 289-300.

Correspondencia: N. Tajada
Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza
Domingo Miral, s/n
50009 Zaragoza. España

Index

ARENA, J.; BENEVENT, F.; MONTESINOS, M.; BALLESTEROS, J.R.; VICTORIA, A.; SMITH-FERRES, V.; GÓMEZ-FERRER, F.; ADOBES-MARTÍN, M.: (The use of unsaturated polyester resin for vascular cating and its application to the study of the abdominal esophagus)	139
BESCOS, M.; LOSTALE, F.; WHYTE, A.; TORRES, A.; WHYTE, J.; SARRAT, R.: Comparative structure of the adrenal gland	145
CAMPOS, A.; VICTORIA, A.; MONTESINOS, E.; FERRES-TORRES, E.; SMITH-AGREDA, V.; SMITH-FERRES, V.: Electronic microscope study of the morphological cellular of the gingival mucosa alterations with experimental periodontal disease after laser I.R. irradiation. An experimental study of the albino rat (I)	151
CAMPOS, A.; VICTORIA, A.; MONTESINOS, M.; FERRES-TORRES, E.; SMITH-AGREDA, V.: Electronic microscope study of extracellular morphological alterations in the gingival mucose of albino rat with experimental periodental disease, subjected to a laser I.R. irradiation. Collagenolisis (II)	157
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	163
CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; JUANES, J.A.; GONZÁLEZ, R.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Immunocytochemical typyfication of glial and neuronal elements in culture of rat fetal cortex	171
GUILLÉN, M.T.; REGODÓN, S.; MAYORAL, A.I.; ROBINA, A.: Contribution of study of the process of postnatal ossification of appendicular skeleton of the sheep II part: pelvic limb	179
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Study of the ependymary surface of the subfornical organ under the scanning electron microscope	187
LAHOZ, M.; LORENTE, P.; PAULES, J.M.; ARRANZ, C.; PEG, M.T.; COBO, J.M.; VERA-GIL, A.: A morphometric study about the human odontogenesis in different periods of the development	193
MASA, M.C.; NOGUEIRA, M.L.: Orbitmetric in skulls of the "Adro Vello's deposit" (The Grove-Pontevedra-Spain)	199
PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, G.; AMAT, P.: Cytoplasmic filamentous bodies in the hypothalamic arcuate nucleus of monosodium glutamate treated rats. An ultrastructural and quantitative study	207
RIESCO, J.M.; GUTIÉRREZ, F.; CASTRO, J.; JUANES, J.A.; VILA, M.A.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Application of an anatomical method of injection-corrosion to the three-dimensional study of renal vascular casts with the scanning electron microscope	215
SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; JUANES, J.A.; BLANCO, E.; GIL, J.; VÁZQUEZ, R.: Efecto of chronic and sistemic administration of met-enkephalin on the vasopressin-producing neurons of the supraoptic nucleus of the rat hipothalamus. An immunocytochemic-morphometric study	221
TAJADA, N.; NIETO, J.L.; LATRE, A.: Growth spur in spanish children. Males (I)	227

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

ARENA, J.; BENEVENT, F.; MONTESINOS, M.; BALLESTEROS, J.R.; VICTORIA, A.; SMITH-FERRES, V.; GÓMEZ-FERRER, F.; ADOBES-MARTÍN, M.: Técnica de creación de moldes vasculares con resinas de poliéster no saturadas y su aplicación al estudio de la vascularización arterial del esófago abdominal murino	139
BESCOS, M.; LOSTALE, F.; WHYTE, A.; TORRES, A.; WHYTE, J.; SARRAT, R.: Estructura comparada de la glándula adrenal	145
CAMPOS, A.; VICTORIA, A.; MONTESINOS, M.; FERRES-TORRES, E.; SMITH-AGREDA, V.; SMITH-FERRES, V.: Estudio a microscopia electrónica de las alteraciones morfológicas celulares de la mucosa gingival con enf. periodontal experimental tras la irradiación laser I.R. Estudio experimental en la rata albina (I)	151
CAMPOS, A.; VICTORIA, A.; MONTESINOS, M.; FERRES-TORRES, E.; SMITH-AGREDA, V.: Estudio a microscopia electrónica de las alteraciones morfológicas extracelulares de la mucosa gingival de la rata albina, con enfermedad periodontal experimental sometida a irradiación laser I.R. colagenolisis (II)	157
CARBAJO, S.; CARBAJO-PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ, J.; CASTRO, S.; CARVAJAL, J.C.: Células pas positivas y células folículo estrelladas, una estirpe celular común en el lóbulo intermedio de la hipófisis	163
CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; JUANES, J.A.; GONZÁLEZ, R.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Tipificación inmunocitoquímica de los elementos gliales y neuronales en cultivos de corteza fetal de rata	171
GUILLÉN, M.T.; REGODÓN, S.; MAYORAL, A.I.; ROBINA, A.: Aportaciones al estudio del proceso de osificación postnatal del esqueleto apendicular en el ovino II. Parte: Miembro pelviano	179
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Estudio de la superficie endodimaria del órgano subfornical al microscopio electrónico de barrido	187
LAHOZ, M.; LORENTE, P.; PAULES, J.M.; ARRANZ, C.; PEG, M.T.; COBO, J.M.; VERA-GIL, A.: Estudio morfométrico de la evolución del germen dentario humano en distintos periodos de desarrollo	193
MASA, M.C.; NOGUEIRA, M.L.: Orbitometría en craniums del yacimiento de "Adro Vello" (o Grove-Pontevedra)	199
PELAEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLAZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, G.; AMAT, P.: Cuerpos filamentosos citoplasmáticos en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas tratadas con glutamato monosódico. Estudio ultraestructural y cuantitativo	207
RIESCO, J.M.; GUTIÉRREZ, F.; CASTRO, J.; JUANES, J.A.; VILA, M.A.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Aplicación de un método anatómico de inyección-corrosión al estudio tridimensional de moldes vasculares renales con el microscopio electrónico de barrido	215
SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RIESCO, J.M.; JUANES, J.A.; BLANCO, E.; GIL, J.; VÁZQUEZ, R.: Efecto de la administración crónica y sistémica de met-enkefalina sobre las neuronas productoras de vasopresina del núcleo supraóptico del hipotálamo de rata. Un estudio inmunocitoquímico-morfométrico	221
TAJADA, N.; NIETO, J.L.; LATRE, A.: Aceleración secular del crecimiento. Observación en polación infantil aragonesa. Varones (I)	227