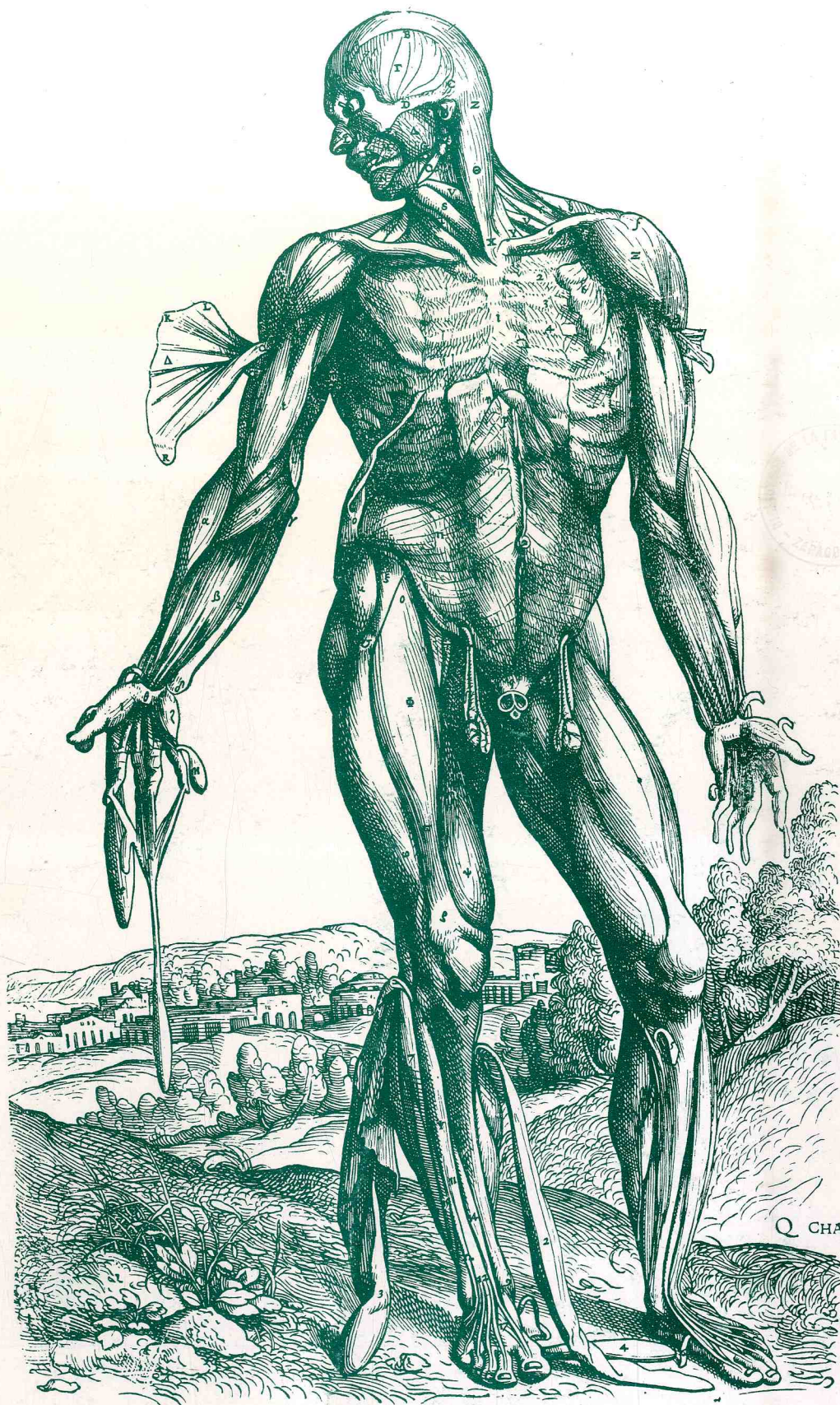


ANNALES DE ANATOMIA



65 JUN. 1992

ANALES DE ANATOMIA

Fundador:
J. ESCOLAR

Director:
R. SARRAT

Secretario de Redacción:
J.L. NIETO AMADA

Consejo de Redacción:

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

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

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

Composición y maquetación de textos: Secretariado de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

Edita y Distribuye: Secretariado de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

Con la colaboración financiera de:

Universidad de Barcelona (Central)

Universidad de Córdoba

Universidad de Oviedo

Universidad de Salamanca

Universidad de Zaragoza

Printed in Spain

ANALES DE ANATOMIA



Volumen XXXVIII

Enero 1992

Núm. 97

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL VELO MEDULAR ANTERIOR DEL CUARTO VENTRÍCULO EN EL *BOS TAURUS* RAZA DE LIDIA

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE ANTERIOR MEDULLARY VELUM OF THE FOURTH VENTRICLE IN THE FIGHTING BULL

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

Departamento de Anatomía Humana. Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

RESUMEN

El velo medular anterior, lámina delgada de sustancia blanca que forma parte del techo del IV ventrículo, ha sido analizada ultraestructuralmente en el *Bos taurus*, raza de lidia. Consta de numerosos fascículos de fibras mielinizadas, entre los que se observan perfiles de astrocitos, oligodendrocitos y fibras de Ranvier-Weigert. La superficie ventricular del velo medular anterior está constituida por una capa de células ependimarias, mientras que su superficie cerebelosa comprende una *glia limitans* recubierta por una membrana basal. La existencia de algunas neuronas en esta estructura ha sido puesta de manifiesto en secciones teñidas con hematoxilina-eosina, habiéndose observado, mediante microscopía electrónica, terminaciones nerviosas con vesículas claras y vesículas grandes con electrodensidad central.

PALABRAS CLAVE: Velo medular anterior. Ependimo. Toro de lidia. Ultraestructura.

SUMMARY

The anterior medullary velum, a thin lamina of white matter forming a portion of the roof of the IVth ventricle, has been analyzed ultrastructurally in the fighting bull (*Bos taurus*). It contained numerous fascicles of myelinated nerve fibres, between which profiles of astrocytes, oligodendrocytes and Ranvier-Weigert fibers were observed. The ventricular surface of the anterior medullary velum consisted of an ependymal cell layer, and its cerebellar surface was constituted by a *glia limitans* covered by a basal membrane. The existence of some neurons within this structure was evident in haematoxilin-eosin stained sections. Several nerve terminals containing clear as well as large dense-cored vesicles were also observed under electron microscopy.

KEY WORDS: Anterior medullary velum. Ependyma. Fighting bull. Ultrastructure.

Introducción

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios de morfología comparada de la porción posterior del IV ventrículo (H.C. Jones y cols., 1978; H.C. Jones, 1979; H.C. Jones y G.S. Dolman, 1979; G.S. Dolman y G. Brocklehurst, 1980; Y. Oda y I. Nakanishi, 1987; A.J. Álvarez-Morujó y cols., 1990). Por el contrario, sólo

recientemente se han efectuado análisis ultraestructurales detallados del velo medular anterior en algunos roedores (C.S. Raine y M. Dolich, 1986), siendo desconocida la estructura que esta lámina presenta en el *Bos taurus*, especie en la que está especialmente desarrollada.

La importancia que muestra el estudio del velo medular anterior viene determinada, asimismo, por el hecho de representar una región de asentamiento de ciertos tumores en el hombre (M. Hara y cols., 1981). Además, el conocimiento de su citoarquitectura puede ayudar a una mejor comprensión de los mecanismos de desmielinización paraventricular, debido a que dicha estructura, como han demostrado distintos autores (I. Sliney y cols., 1981; P. McConnel y cols., 1984), se encuentra particularmente implicada en ciertos procesos autoinmunes que se desarrollan durante la encefalitis alérgica experimental.

Material y Métodos

Han sido utilizados un total de 10 encéfalos de *Bos taurus* de raza de lidia.

El tronco del encéfalo ha sido separado del cerebelo mediante la sección de los pedúnculos cerebelosos, quedando unido el velo medular anterior a los tubérculos cuadrigéminos posteriores y pedúnculos cerebelosos superiores. Una vez obtenida la pieza, fue inmediatamente fijada por inmersión en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M. (pH = .2). Transcurridos 15 minutos, se procedió a la disección del velo medular anterior, postfijación con osmio, inclusión en Araldita, ultramicrotomía y contrastado, según técnicas convencionales, para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Philips 300.

Algunas muestras fueron procesadas para su tinción con hematoxilina-eosina, mientras que otras se trataron sucesivamente mediante deshidratación progresiva en etanol, acetato de amilo, punto crítico, montaje con plata coloidal y metalización con oro, siendo observadas en un microscopio de barrido Hitachi 1200, con la finalidad de analizar la superficie ventricular y la región subependimaria del velo medular anterior.

Resultados

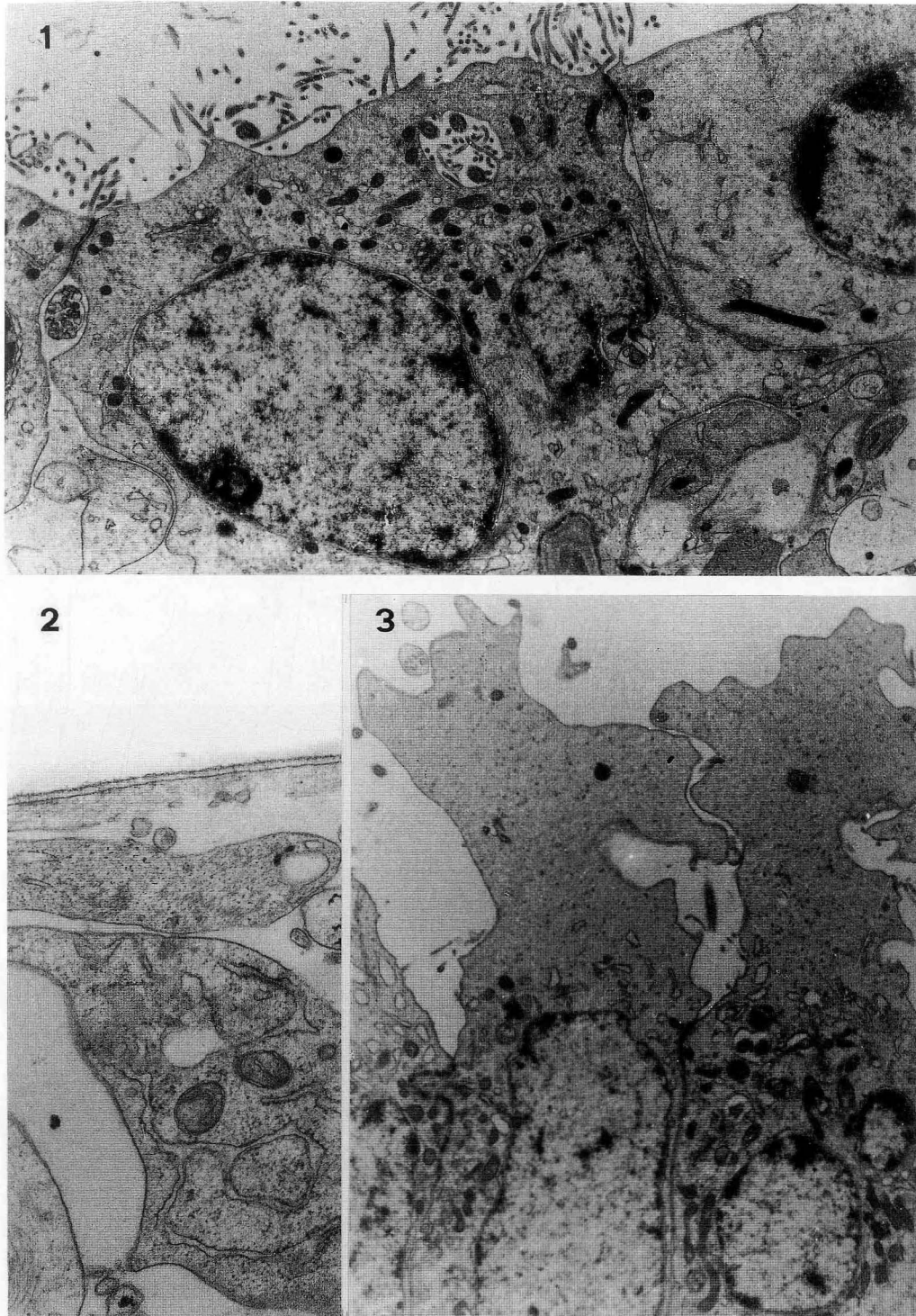
Desde el punto de vista macroscópico, el velo medular anterior es una fina lámina de sustancia blanca que forma el techo de la parte más anterior de IV ventrículo, unida a los tubérculos cuadrigéminos posteriores por su borde anterior, posteriormente a la línula cerebelosa y lateralmente a los pedúnculos cerebelosos superiores.

Dicha estructura presenta una superficie ventricular constituida por células endimarias, provistas de cilios y microvillis (fig. 1), y una superficie cerebelosa, limitada por una membrana basal, bajo la que se dispone una *glia limitans* (fig. 2).

El epéndimo está formado por una capa continua de células de tamaño y morfología poliédrica variable (figs. 1 y 3). Su núcleo puede ser rectangular, redondo o irregular, con acúmulos dispersos de cromatina. La envoltura nuclear presenta frecuentes invaginaciones.

En el citoplasma apical del endimocito se observa retículo endoplasmático rugoso, constituido por cisternas pequeñas y escasos ribosomas. Éstos pueden estar aislados o formando polisomas de 3 ó 4 unidades. El retículo endoplasmático liso está constituido por vesículas aisladas, estando, el aparato de Golgi, poco desarrollado. Por el contrario, existen numerosas mitocondrias, pudiéndose también encontrar algunos cuerpos de inclusión. En ocasiones se observan, en esta porción apical del citoplasma, imágenes semejantes a cisternas que contienen cilios y microvillis, posiblemente condicionadas por la irregularidad de la superficie celular (fig. 1).

Por lo general, la presencia de *zonulae adherentes* y *gap junctions* en las porciones de la membrana celular próximas a la luz ventricular refuerza la unión entre células adyacentes (figs. 1 y 3). En esta zona pueden emerger grandes protusiones celulares con límites irregulares, cuyo citoplasma, constituido fundamentalmente por un material amorfo, contiene ribosomas dispersos, algunas mitocondrias y vesículas (fig. 3).



- FIGURA 1.** Ultramicrofotografía de una célula ependimaria del velo medular anterior. Destaca la presencia de una gran concentración de orgánulos en su porción apical, así como de cilios y microvilllis en su superficie ventricular (x 2.000).
- FIGURA 2.** Estructura de la superficie cerebelosa del velo medular anterior. Bajo la membrana basal se dispone la *glia limitans* (x 5.500).
- FIGURA 3.** Protusiones superficiales de las células ependimarias del velo medular anterior hacia la luz ventricular. Se observan escasos ribosomas dispersos y algunas mitocondrias, inmersos en una matriz citoplasmática amorfa de electrodensidad media (x 1.600).

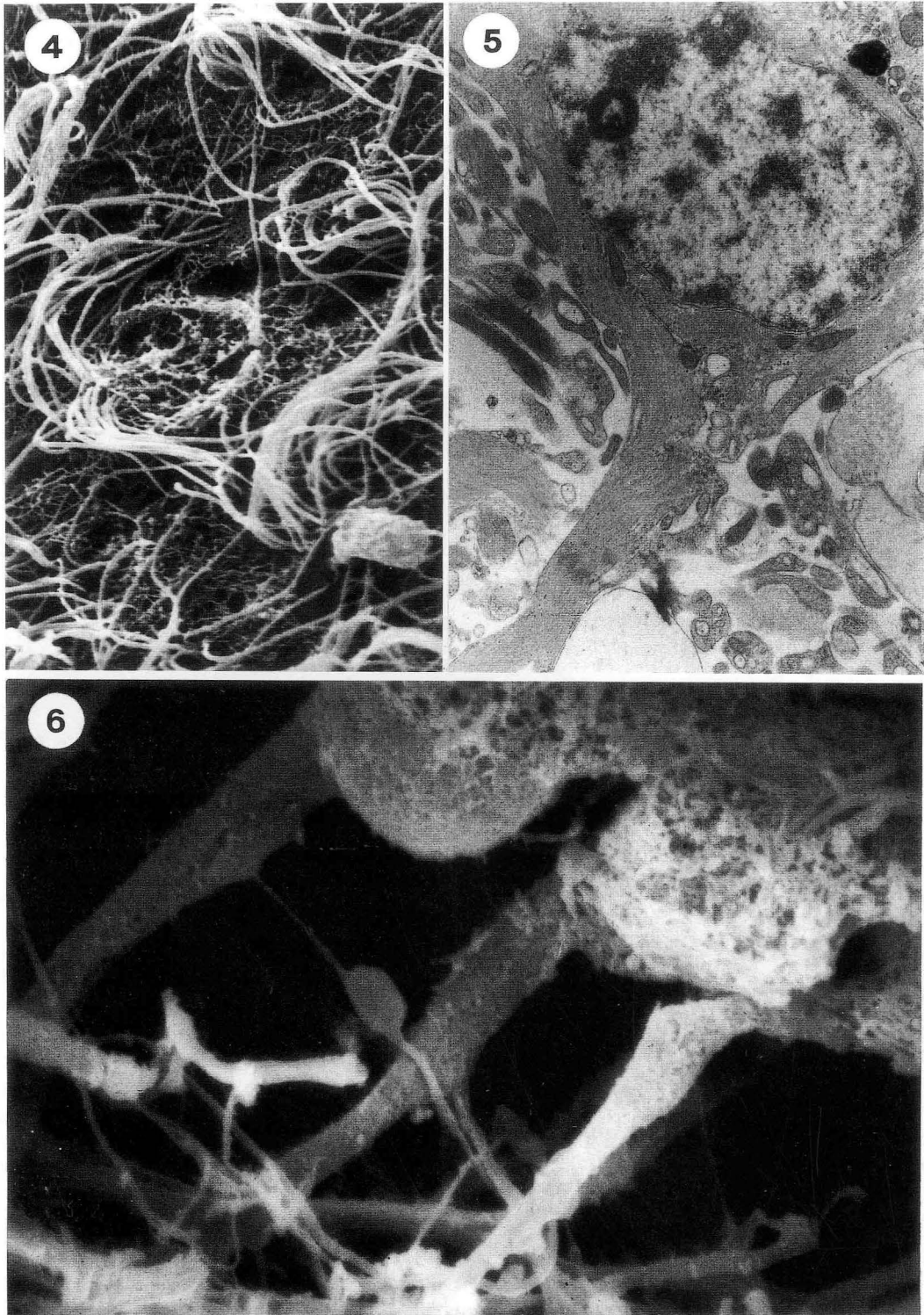
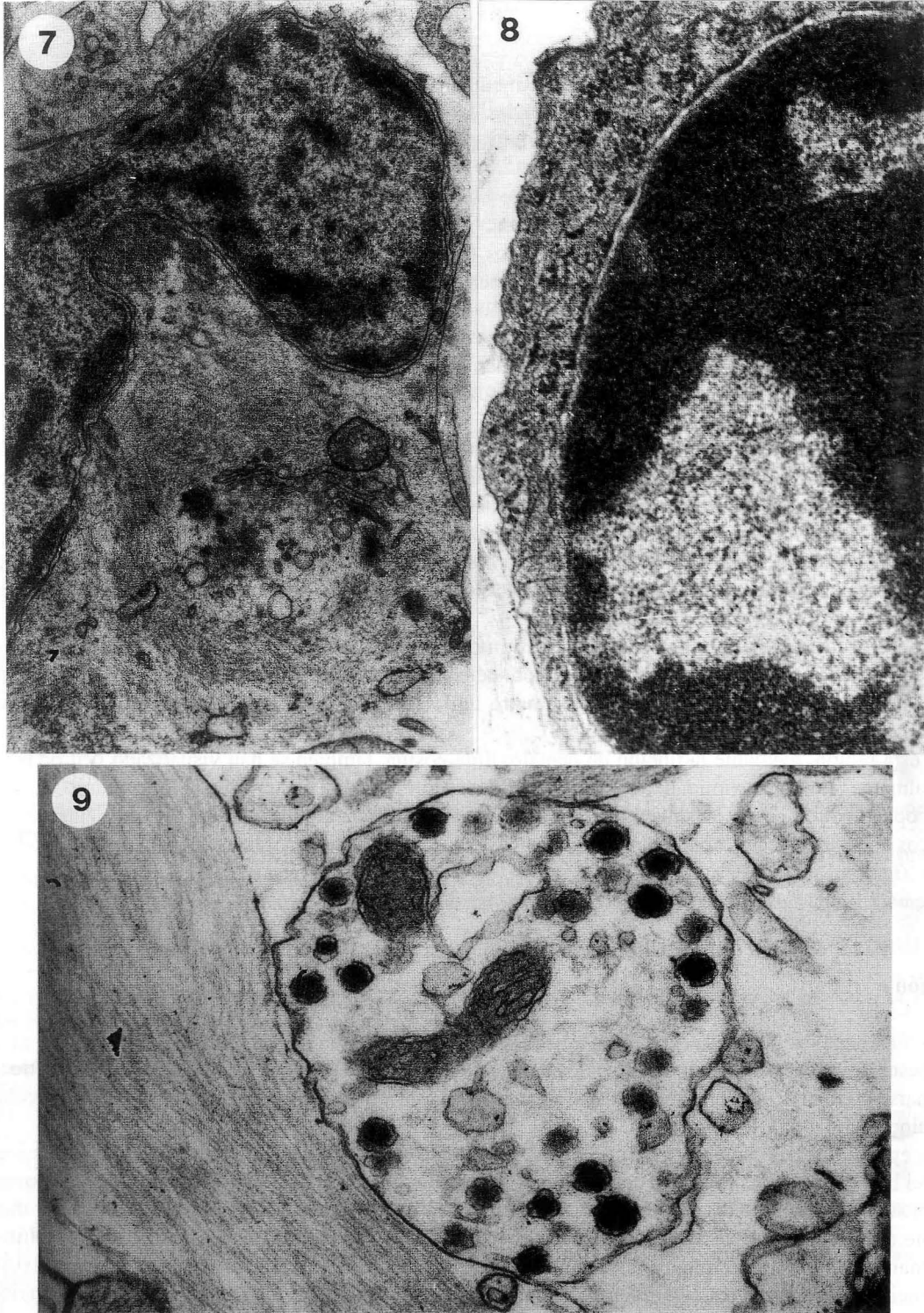


FIGURA 4. Detalle de la disposición de los penachos ciliares en la superficie endimaria del velo medular anterior, observada mediante microscopía electrónica de barrido (x 3.000).

FIGURA 5. Prolongación basal de una célula endimaria (tanacito), con abundantes neurofilamentos. En sus proximidades se aprecian perfiles correspondientes a astrocitos fibrosos (x 2.600)

FIGURA 6. Grupo de células endimarias, tipo tanacito, con prolongaciones basales dirigidas hacia el neuropilo. En contacto con éstas se observan prolongaciones de astrocitos fibrosos y una fibra de Ranvier-Weigert (x 5.000).



- FIGURA 7.** Ultraestructura de un astrocito fibroso, caracterizada por la presencia de un núcleo de morfología irregular, con grupos de cromatina de mediano tamaño, y abundantes neurofilamentos en su citoplasma (x 10.000).
- FIGURA 8.** Ultraestructura de un oligodendrocito, cuyo núcleo presenta grandes acúmulos de cromatina. Su citoplasma, electrodenso y limitado a un anillo periférico, contiene numerosos ribosomas, libres o asociados al retículo endoplasmático rugoso, y abundantes neurotúbulos (x 10.000).
- FIGURA 9.** Sección transversal de una fibra nerviosa amielínica con vesículas sinápticas grandes y región central electrodenso, cisternas de retículo endoplasmático liso y mitocondrias (x 10.000).

El examen de la superficie ventricular del velo medular anterior, mediante microscopía electrónica de barrido, revela la existencia de numerosos cilios, agrupados en forma de mechones (fig. 4). Con el microscopio de transmisión se aprecia su constitución por nueve grupos de dos túbulos periféricos dispuestos circularmente alrededor de un par central.

La porción basal de los endimocitos difiere considerablemente de una célula a otra. Algunas células endimarias poseen una base ovoidea o redonda, mientras que otras presentan delgadas prolongaciones citoplasmáticas, provistas de abundantes filamentos (fig. 5). Bajo microscopía electrónica de barrido, estas prolongaciones, cuyo calibre disminuye progresivamente, se caracterizan por un largo trayecto que se pierde en el espesor del neuropilo (fig. 6). En nuestro material no ha podido determinarse su posible transformación en pies vasculares.

El espacio comprendido entre el epéndimo y la membrana basal del velo medular anterior está constituido por fascículos de fibras mielinizadas y células gliales, fundamentalmente astrocitos (fig. 7), principal componente de la *glia limitans* (fig. 2), y oligodendrocitos (fig. 8).

Los astrocitos fibrosos de esta región presentan un núcleo de contorno irregular y posición excéntrica, con grandes acúmulos de cromatina asociados a la membrana nuclear interna. El citoplasma, de alta electrodensidad, contiene cisternas cortas de retículo endoplasmático, cuyas paredes están recubiertas por escasos ribosomas. La presencia de abundantes filamentos en el soma es prácticamente constante (fig. 7).

Las prolongaciones de los astrocitos fibrosos presentan perfiles muy variados, destacando también en ellos la presencia de neurofilamentos. De hecho, el aspecto electrodenso de las pequeñas fibras de Ranvier-Weigert está determinado por su alto contenido neurofibrilar.

Hemos identificado un tipo de oligodendrocito de morfología oval o redonda, tamaño pequeño y electrodensidad media (fig. 8). Sus prolongaciones citoplasmáticas suelen disponerse en grupos, que poseen un trayecto paralelo al curso de los axones. Éstas muestran un diámetro uniforme, y la presencia de microtúbulos constituye una característica diferencial.

En esta región, mediante la tinción de hematoxilina-eosina, también se han visualizado neuronas aisladas, principalmente en la proximidad de los tubérculos cuadrigéminos posteriores. Sin embargo, mediante el microscopio electrónico de transmisión sólo se han podido identificar algunas fibras nerviosas, aunque sin signos sinápticos en su membrana, conteniendo algunas vesículas claras y numerosas vesículas «dense-cored» de gran tamaño (fig. 9).

Discusión

A pesar de los escasos estudios realizados en relación con la ultraestructura del velo medular anterior, parece confirmarse la existencia de un patrón citoarquitectónico común en las especies analizadas (I. Sliney y cols., 1981; C.S. Raine y M. Dolich, 1986).

Los endimocitos constituyen el principal componente celular de la capa que tapiza la porción anterior del techo del IV ventrículo. Como se ha descrito en otras regiones del SNC, la mayoría de estas células poseen en su polo apical numerosos cilios, cuya organización en forma de mechones se pone especialmente de manifiesto mediante microscopía de barrido (D.E. Scott y cols., 1974; T. Yamadori y S. Yagihashi, 1975). Otras células endimarias, sin embargo, emiten grandes protusiones citoplasmáticas hacia la luz ventricular, caracterizadas por la presencia de estructuras vesiculares en las regiones próximas al núcleo celular, y por un contenido en ribosomas inferior al observado en las neuronas (H. Hydeny y E. Egyhaz, 1963). Estas protusiones se han descrito en la eminencia media de la rata (T. Matsui y H. Kobayashi, 1968), habiéndose asociado su función con procesos de absorción y secreción al III ventrículo.

Junto a los endimocitos, cuyas porciones basales poseen una forma variable entre aplanada y ovalada, destaca un tipo celular provisto de prolongaciones basales, simples o ramificadas, dirigidas hacia el neuropilo. Estas células han sido denominadas tanacitos (E. Horstmann, 1954), habiéndose analizado la estructura de sus prolongaciones mediante el método de Golgi y microscopía electrónica (M.W. Brightman y S.L. Palay, 1963; M.

Takeichi, 1966; O.E. Millhaouse, 1971, 1972; J.R. Brawer, 1972; P.M. Klara y K.R. Brizzee, 1977). Aunque la distribución de tanacitos se ha considerado generalmente limitada a la vecindad del III ventrículo, en el presente trabajo se confirma que, en ciertas especies, ésta es más generalizada.

Si bien no es posible descartar la existencia de otros componentes celulares en la capa endimaria del velo medular anterior, tal como ha sido descrito en otras regiones del sistema ventricular (A. Mito y A. Kiss, 1977; A. Kiss y A. Mitro, 1978; A. Mitro y M. Palkovits, 1981), su importancia cuantitativa, y por tanto funcional, debe ser mínima.

Coincidiendo con las descripciones de otros autores, el velo medular anterior contiene numerosas fibras nerviosas mielinizadas, oligodendrocitos, y una importante población de astrocitos fibrosos. Estos últimos han sido específicamente implicados en la formación, durante los procesos inflamatorios crónicos, de nidos y puentes heterotópicos astrogiales (C.S. Raine y M. Dolich, 1986). Por el contrario, no se ha podido poner en evidencia la existencia de microglía, tan características en otras estructuras centrales de sustancia blanca, como las estías de Lancisi (J. Arroyo y cols., 1990).

Asimismo, existen datos contradictorios en cuanto a la presencia de neuronas a nivel del velo medular anterior. Negada por algunos autores en la rata (I. Sliney y cols., 1981), otros estudios ultraestructurales recientes realizados en el cobaya (C.S. Raine y M. Dolich, 1986) la corroboran. En nuestro material, se ha podido constatar la presencia de algunas neuronas en la vecindad de los tubérculos cuadrigéminos inferiores, así como la existencia de fibras nerviosas amielínicas, probablemente terminaciones sinápticas, con numerosas vesículas «densecored», cuya posible naturaleza serotoninérgica está pendiente de confirmación.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ-MORUJO, A.J.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; BLÁZQUEZ, J.L. y AMAT, P. (1990): Superficie endimaria del cuarto ventrículo de rata visto con el microscopio electrónico de barrido. *An. Anat.* **36**: 3-14.
- ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; SAN-MOLINA, J. y RUANO-GIL, D. (1990): Estudio ultraestructural de las células de la glía de los nervios de Lancisi en el Bos taurus raza de lidia. *An. Anat.* **36**: 113-120.
- BRAWER, J.R. (1972): The fine structure of the ependymal tanocytes at the level of the arcuate nucleus. *J. Comp. Neurol.* **145**: 25-42.
- BRIGHTMAN, M.W. y PALAY, S.L. (1963): The fine structure of ependyma in the brain of the rat. *J. Cell. Biol.* **19**: 415-439.
- DOLMAN, G.S. y BROCKLEHURST, G. (1980): The roof of the hindbrain in *Rana pipiens* and *Rana temporaria*. *Brain Res.* **184**: 506-510.
- HARA, M.; KAWACHI, S. y HIRANO, A. (1981): Lipoma of the superior medullary velum with Schwann cells. Report of a case and review of the literature. *Acta Pathol. Jpn.* **31**: 825-833.
- HORSTMANN, E. (1954): Die Faserglia des Selachiergehirns. *Z. Zellforsch.* **39**: 588-617.
- HYDEN, H. y EGYHAZI, E. (1963): Glial RNA changes during a learning experiment in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 618-624.
- JONES, H.C. (1979): Fenestration of the epithelium lining the roof of the fourth cerebral ventricle in Amphibia. *Cell Tissue Res.* **198**: 129-136.
- JONES, H.C. y DOLMAN, G.S. (1979): The structure of the roof of the fourth ventricle in pigeon and chick brains by light and electron microscopy. *J. Anat.* **128**: 13-29.
- JONES, H.C.; DOLMAN, G.S. y BROCKLEHURST, G. (1978): The roof of the fourth ventricle in amphibian brains. *J. Zool., Lond.* **185**: 341-354.
- KISS, A. y MITRO, A. (1978): Ependyma and supraependymal structures in some areas of the fourth ventricle in the rat. *Acta Anat.* **100**: 521-531.
- KLARA, P.M. y BRIZEE, K.R. (1977): Tanycytic ependyma in the mammalian IV ventricle. *Anat. Rec.* **187**: 626.
- MATSUI, T. y KOBAYASHI, H. (1968): Surface protrusions from the ependymal cells of the median eminence. *Archs. Anat. Histol. Embryol.* **51**: 429-436.
- McCONNELL, P.; BERRY, M.; REES, E.L. y SIEVERS, J. (1984): The injury response of nerve fibres in the anterior medullary velum of the adult rat. *Brain Res.* **323**: 257-268.
- MILLHOUSE, O.E. (1971): A Golgi study of third ventricle tanocytes in the adult rodent brain. *Z. Zellforsch.* **121**: 1-13.
- MILLHOUSE, O.E. (1972): Light and electron microscopic studies of the ventricular wall. *Z. Zellforsch.* **127**: 149-174.

- MITRO, A. y KISS, A. (1977): Histological observations on the ependyma of the ventriculus mesencephali in the guinea pig. *Acta Anat.* **97**: 248-256.
- MITRO, A. y PALKOVITS, M. (1981): Morphology of the rat brain ventricles, ependyma, and periventricular structures. *Bibliotheca Anatomica*, núm. 21. S. Karger. Basel.
- ODA, Y. y NAKANISHI, I. (1987): Ultrastructure of the caudal portion of the fourth ventricular roof in the mouse. *J. Comp. Neurol.* **256**: 299-307.
- RAINE, C.S. y DOLICH, M. (1986): The anterior medullary velum and its involvement during autoimmune demyelination. *J. Neurocytol.* **15**: 261-272.
- SCOTT, D.E.; KOZLOWSKI, G.P. y SHERIDAN, M.N. (1974): Scanning electron microscopy in the ultrastructural analysis of the mammalian cerebral ventricular system. *Int. Rev. Cytol.* **37**: 349-388.
- SLINEY, I.; BERRY, M.; SIEVERS, J. y MANGOLD, U. (1981): CNS axons in the anterior medullary velum of the rat. *J. Anat.* **133**: 656.
- TAKEICHI, M. (1966): The fine structure of ependymal cells. Part 1. The fine structure of ependymal cells in the kitten. *Arch. Histol. Jap.* **26**: 483-505.
- YAMADORI, T. y YAGIHASHI, S. (1975): A scanning and transmission electron microscopic observation of the fourth ventricular floor in the mouse. *Arch. Histol. Jap.* **37**: 415-432.

Correspondencia: Dr. José Arroyo-Guijarro
Dpto. Anatomía Humana. Facultad de Medicina
Avda. Diagonal, s/n, Anexo Facultad de Farmacia
08028 Barcelona, España

OSMIOPHILIC LAMINAR BODIES IN THE PINEAL GLAND OF THE RAT

CUERPOS LAMINARES OSMIÓFILOS EN LA GLÁNDULA PINEAL DE RATA

J.L. BLÁZQUEZ, F.E. PASTOR, B. PELÁEZ, M.I. MOSQUEIRA, A. SÁNCHEZ,
A. ÁLVAREZ-MORUJO and L. MUÑOZ

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

SUMMARY

The presence of osmiophilic laminar bodies (OLB) in the pinealocytes of rats was studied from the 20th day of gestation until adult age. These laminar formations are mainly located in the cytoplasm of dark pinealocytes, although exceptionally they can be found in light pinealocytes. The OLB are a consistent finding in all the groups of animals studied although they are scanty in the younger rats and more abundant in the animals sacrificed at 60 and 120 days of age. At two months, they appear both in the gland fixed by immersion and in those perfused with the fixative. These organelles are formed by a variable number of osmiophilic laminae arranged concentrically and are either located within the mitochondria or are free in the cell cytoplasm. This kind of formation is also observed at the exact moment of their extrusion from the inside of the cell into the pericapillary space, and also isolated outside the pinealocytes in the perivascular spaces and the pineal canaliculi. All these data together suggest that the OLB are residual structures resulting from cellular metabolic processes and that they are expelled outside the cell by a process of exocytosis and are not artefactual structures.

KEY WORDS: Pinealocytes. Osmiophilic laminar bodies. Exocytosis. Ultrastructure. Rat.

RESUMEN

Se estudia la presencia de cuerpos laminares osmiófilos (OLB) en pinealocitos de ratas desde el día 20 de gestación hasta la edad adulta. Estas formaciones laminares se localizan principalmente en el citoplasma de los pinealocitos oscuros, aunque excepcionalmente pueden encontrarse en pinealocitos claros; no se observan en las células gliales. Los OLB son un hallazgo constante en todos los grupos de animales estudiados, aunque son escasos en las ratas más jóvenes y abundantes en los animales sacrificados a los 60 y 120 días de edad. En las ratas de dos meses de edad aparecen tanto en las pineales fijadas por inmersión como en las perfundidas. Estas formaciones están constituidas por un número variable de láminas osmiófilas dispuestas concéntricamente. Se localizan dentro de las mitocondrias o libres en el citoplasma en relación con los dictiosomas del aparato de Golgi. También hemos observado OLB extrusándose fuera de la célula, hacia los espacios pericapilares o canaliculares, así como libres en el interior de estos espacios. Todos estos datos permiten sugerir que los OLB son estructuras residuales de procesos metabólicos celulares, que son expulsadas fuera de la célula por un proceso de exocitosis y no son de origen artefactual. Se discute la posibilidad de que puedan constituir un mecanismo de eliminación de ciertos organitos, así como que puedan representar un marcador celular de una población de pinealocitos.

PALABRAS CLAVES: Pinealocitos. Cuerpos laminares osmiófilos. Exocitosis. Ultraestructura. Rata.

Introduction

Since the first work by Wolfe (1965) reporting the existence of membranous bodies located in rat pinealocytes—the vernate bodies many works have referred the presence of multilamellar concentric structures in the mammalian pineal gland. However, until now neither the exact nature nor the origin and meaning of these structures have been elucidated. Some of them would originate from the rough endoplasmic reticulum (Pévet and Saboureau, 1973; Pévet *et al.*, 1976; Pévet *et al.*, 1977; McNeill, 1978; González and Álvarez-Uría, 1984). Another type of lamellar formations, named by us osmiophilic laminar bodies (OLB), originate from mitochondria or Golgi complex (Miline *et al.*, 1968; Roux *et al.*, 1974; Blázquez *et al.*, 1988).

At our laboratory two types of pinealocytes have been differentiated according to their intracellular calcium content (Pizarro *et al.*, 1989a, b). Type I pinealocytes, corresponding to the light type (LP) of cell (Arstila *et al.*, 1967), have no free Ca^{++} in their cytoplasm, whereas the type II pinealocytes—the dark type (DP)—contain abundant intracytoplasmic Ca^{++} . Blázquez *et al.* (1988) have reported the presence of OLB in some DP, the so called *type C pinealocytes*.

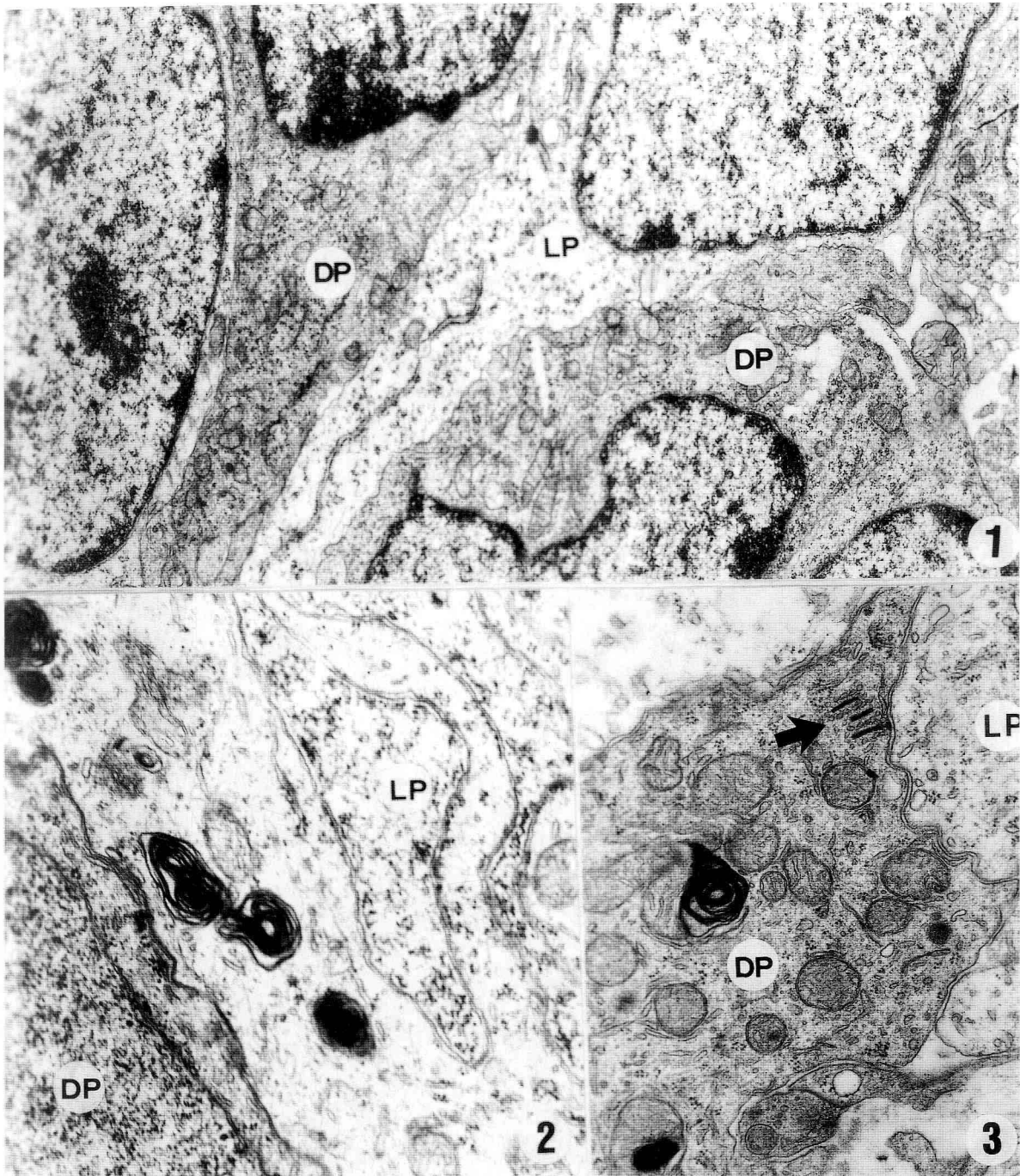
In the present work we studied the ultrastructure of the pineal gland of albino rats from day 20 of gestation up to adult age in order to describe data concerning the meaning of the OLB.

Materials and Methods

Albino male Sprague-Dawley rats subjected since birth to a 12/12 light/dark cycle were used. The animals had free access to standard rat chow and water. The animals were divided into the following groups (ten rats each): newborn rats and rats of 5, 10, 30, 60 and 120 days of postnatal age. Half of the animals in each group were sacrificed at midday and the other half at midnight. Four female rats were caged with males and conception confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears according to visualization with a phase contrast microscope. Twenty or 21 days after positive control, a total of twelve male fetuses were removed from their mothers under anaesthesia (30 mg sodium pentobarbital/kg, i.p.) and after opening a broad window in their skull—along the longitudinal sinus to the posterior confluence—a small amount of fixative fluid (5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C) was placed in situ. Following this, the pineal glands were dissected out and immediately immersed in fixative over a period of 2 hours. A similar procedure was used with the pineal glands from the other groups of animals. After fixation, the glands were post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer, dehydrated in graded acetones and embedded in Durcupan (Fluka). In 10 rats of another group of animals 60 days aged the fixative was perfused through the left ventricle. The later processing of the glands was identical to that described for the other animals. Ultrathin sections were obtained on LKB Ultratome III-8800 ultramicrotome, contrasted by the Reynolds method (1963) and studied with a Philips EM-201 electron microscope.

Results

The presence of light and dark pinealocytes was detected in the pineal glands of the animals from all groups studied. Indeed, as can be seen in fig. 1, since day 20 of gestation there were noticeable differences in the electron density of the cytoplasmic and nuclear matrices between both types of pinealocytes. Additionally, both in the light and dark pinealocytes—with the exception of those belonging to pineal glands from fetuses and new born rats—the characteristic organelles of these cells were observed: dense bodies, lipid droplets, subsurface cisterns and synaptic ribbons. The latter formations were present in the fetal pineal glands and in those of rats with an age of up to 10 days of postnatal development.



- FIGURE 1.** Electron micrograph of the pineal gland of a rat fetus of 21 days of age. Note two light pinealocytes (LP) and two dark ones (DP). Note also the absence of lipid droplets and dense bodies (11.200 x).
- FIGURE 2.** Electron micrograph of the pineal gland of an adult rat. One light and one dark pinealocyte can be observed. Note the presence of OLB in the cytoplasm of the light pinealocyte (30.375 x).
- FIGURE 3.** Electron micrograph of the pineal gland of an adult rat. Portions of light and dark pinealocytes can be observed. In the dark pinealocyte, OLBs can be observed, apparently located inside the mitochondria. Arrow shows a ribbon field (30.375 x).

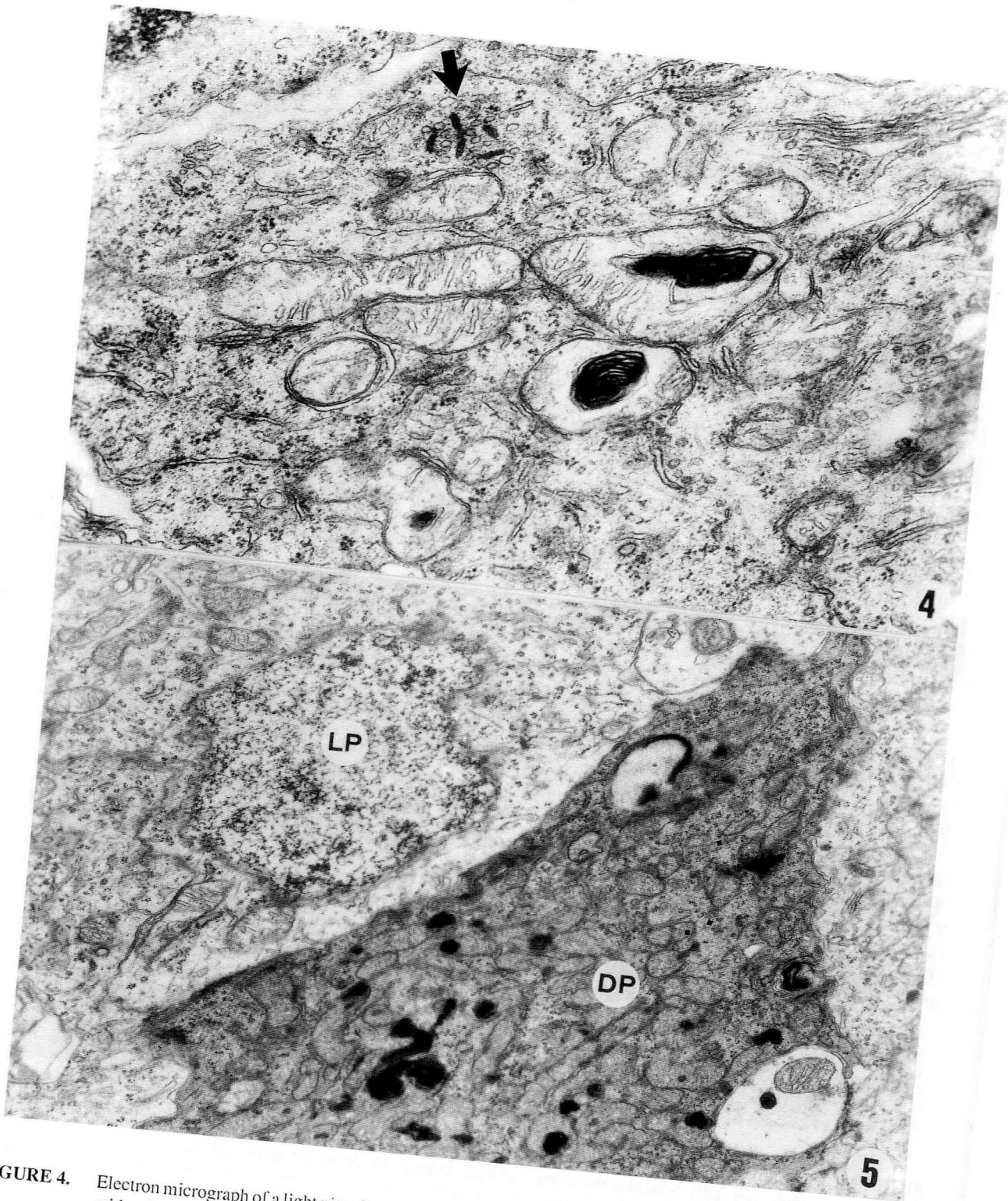
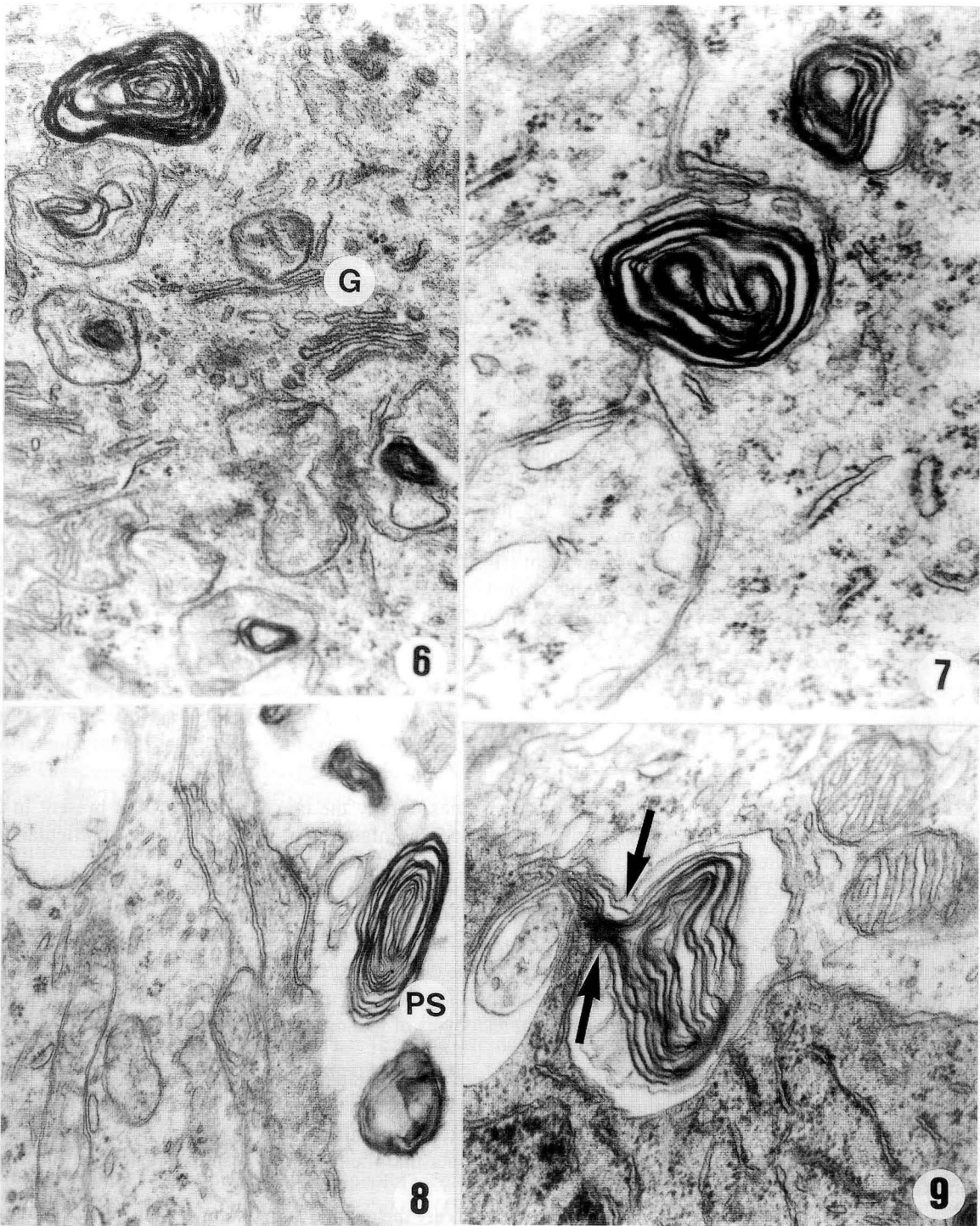


FIGURE 4. Electron micrograph of a light pinealocyte from an adult rat showing mitochondria with a normal aspect together with others with OLBs. Arrow shows a ribbon field (45.500 x).

FIGURE 5. Electron micrograph of the pineal gland of an adult rat showing a dark pinealocyte together with a portion of another light pinealocyte (left). The DP has numerous mitochondria containing lamellar formations (21.900 x).



- FIGURE 6.** Electron micrograph of a portion of a DP from an adult rat showing the presence of a lamellar formation apparently free in the cytoplasm and several mitochondria containing OLBs in their interior. All these structures are situated in the vicinity of the Golgi apparatus (G) (30.375 x).
- FIGURE 7.** Electron micrograph of portions of three light pinealocytes from a rat of 20 days of age. Note the confluence of the pinealocytes delimiting a canaliculus occupied by an OLB. In the pinealocyte to the left of the figure lamellar formations can be seen in the cellular cytoplasm (45.500 x).
- FIGURE 8.** Electron micrograph of the pineal gland of a rat of 20 days of age. Some OLBs can be observed in the pericapillary space (PS). Right: portions of light pinealocytes (30.375 x).
- FIGURE 9.** Electron micrograph of the pineal gland of an adult rat. Note the extrusion of an OLB into a canaliculus (45.500 x).

Regarding the OLB, it was seen that these structures, which were highly variable in size and shape, were present both in the light and dark types of cells of the animals sacrificed both at midday and at midnight (figs. 2 and 3). Also, these structures were equally prominent in the pinealocytes of glands fixed by immersion in fixative solution and those fixed by intracardiac perfusion of the fixative. However, the number of OLB is highly variable both within individual glands, according to the type of pinealocyte considered, and in the glands of animals of different ages. These structures were difficult to find in the LP while in all glandular sections some DP with OLB could always be seen. This observation became more pronounced as the age of the animals increased. Thus, OLB were present in isolated cases in some DP of fetuses of 20 or 21 days of gestation while they were abundant in the animals sacrificed between 60 and 120 days of postnatal age. Of note was the fact that OLB were not usually found in glial cells.

The OLB were formed of several layers arranged like an onion. The size of these structures varied considerably; their diameter ranging between 100 and 500 nm. The most simple ones were visualized inside mitochondria which had a destructured appearance (fig. 4); it was possible to observe DP in which many of the mitochondria had OLB (fig. 5). These intramitochondrial formations were usually related to the internal membrane and only when their development was advanced did the external membrane seem to be affected.

Structures similar to those reported inside the mitochondria were also commonly observed in the cell cytoplasm (fig. 6) and were related to the dyctosomes of the Golgi apparatus. OLB were also observed to protrude towards the interpinealocyte canaliculi or into them (fig. 7). It was in these canalicular spaces where the OLB appeared most frequently, although they were also noted in the pericapillary spaces (fig. 8) into which they were extruded from inside the pinealocytes, as may be seen in fig. 9.

Discussion

The discussion of the present findings follows two lines. Firstly the meaning of the OLB present in the pinealocytes is addressed. After this, the possibility that these OLB might serve as markers of some particular type of pinealocyte is considered.

The existence of OLB in the pinealocytes of different species has been reported (Miline *et al.*, 1968; Roux *et al.*, 1974; Blázquez *et al.*, 1988). Of interest is the presence of this kind of structure in pinealocytes of rats treated with lithium carbonate (Mosqueira *et al.*, 1981; Muñoz Barragán *et al.*, 1981).

In the present work we have been able to observe that the existence of OLB inside pinealocytes is constant as from day 20 of gestation until adult age both in the animals sacrificed at midday and in those killed at midnight. Additionally, these formations are observed in the pinealocytes of glands fixed both by perfusion and by direct immersion in fixative solution.

Regarding the intracellular location of OLBs, these were found isolated in the pinealocytes with a light matrix but, more commonly, in many of the pinealocytes with a dark matrix. In the latter, the frequency with which they are found is highly variable, ranging between isolated intramitochondrial formations and a massive representation that affects most of the mitochondria and other intracytoplasmic membranous systems, mainly in the Golgi apparatus.

The question that now arises is whether these formations are the result of a deficient system of fixation or are due to some internal metabolic process of the pinealocytes containing them; in other words, whether one is dealing with a technical artefact or a cellular structure with its own special identity.

Some authors (Ghadially, 1982) have attributed the appearance of intramitochondrial and/or extracellular lamellar structures to an artefact stemming from the fixation process. It is not possible to rule out this possibility definitively, but according to this interpretation, the structures studied should be found with the same frequency in the pinealocytes and glial cells. Additionally, neither does the constant appearance of these formations, even in perfused animals, seem concordant with an artefactual nature.

On the other hand, Krstic (1985) have interpreted the appearance of residual bodies with a myelin-like lamellar content, osmophilic particles and/or voluminous concentric whorls as autophagosomes, that are preferentially

located in areas close to the Golgi apparatus. According to this author, both lysosomes and lipid droplets and the laminar vesicles of the Golgi apparatus would have a role in the constitution of these formations. In our experience, the OLB are not related to dense lysosomal bodies or to lipid droplets. Rather, they are formed of concentric layers of osmiophilic membranes, located predominantly inside mitochondria and substituting the mitochondrial cristae.

Since OLB are also found inside the cytoplasm, extruding towards the outside of the cell and in the canalicular and pericapillary spaces, their existence seems to be related with an exocytosis mechanism that could be set in motion by the pinealocytes to get rid of aged mitochondria or other membranous debris. As is known, pinealocytes contain large numbers of mitochondria (Krakowski and Ceiciura, 1985a, b) whose renewal would demand the removal of aged or damaged elements. Among the removal mechanisms, the transformation of mitochondria into OLB could be included; these would then be expelled to the extracellular space. This latter interpretation is consistent with our observation on the mitochondrial alterations occurring in the pineal glands of rats treated with lithium salts. In fact, lithium carbonate—an agent that induces a marked decrease in adenylate cyclase activity (Forn and Valdecasas, 1971; Zatz, 1979; Muñoz Barragán *et al.*, 1981) and in the secretory activity of the pineal gland (Yocca *et al.*, 1983)—simultaneously induces a destructuring of the mitochondrial cristae, that are substituted by osmiophilic laminar formations in many of the dark pinealocytes. This is sometimes accompanied by the presence of osmiophilic residual bodies containing mitochondrial remains (Mosqueira *et al.*, 1981).

Furthermore, in the present work we observed that OLB are present in the pineal gland of all the animals studied, from the embryonic period to adult age. In our opinion, the presence of OLB should be interpreted as a constituent of a natural process whose existence might be modified by exogenous products such as, for example, lithium carbonate. As a result of this natural process the OLB are expelled from the pinealocytes, presumably to be digested by pineal macrophages.

The fact that these formations appear massively in some dark pinealocytes suggests a second orientation for discussion, designed to elucidate whether the OLB can be considered as markers of a given cell type within the secretory pinealocytes. The differentiation of two types of pinealocytes—light and dark cells—has been reported in different animal species (Wartemberg and Gusek, 1965; Arstila, 1967; Sheridan and Reiter, 1968; Pévet, 1979, 1981). These authors have focused their attention on whether both types of cell belong to the same cellular lineage (Karasek, 1987) or whether the differences in the density of the cytoplasmic matrix are determined by the fixatives used (Welsh and Reiter, 1978). We have earlier reported two types of secretory pinealocytes differentiated from interstitial cells both with respect to their organelles and the content and distribution of intracellular Ca^{++} (Pizarro *et al.*, 1989a, b). Type I secretory pinealocytes would correspond to the light cells in which intracellular Ca^{++} is scanty, while type II would correspond to the dark pinealocytes in which intracellular Ca^{++} is very abundant. Since both types of cell had organelles in common (dense bodies, lipid droplets, synaptic ribbons) we believe that all of them must belong to the same cellular lineage, although at the time of fixing each was captured in a different phase of its life cycle.

The exocytosis of membranous debris takes place in other cell types. Long *et al.* (1986) have described the possible elimination of membrane residues from the internal segments of retinal cones. In some species of lower vertebrates the existence has been proposed of cone-type and rod-type pinealocytes as a function of their immunoreactivity to specific antigens of retinal photoreceptors (Vigh *et al.*, 1985; Korf *et al.*, 1986; Morita *et al.*, 1989). Until now these data have only been confirmed in lower vertebrates, but not in the rat. Miline *et al.* (1968) speculate on the possibility of there being some relationship between the laminar bodies present in pinealocytes and other laminar formations situated in photoreceptor cells of the pineal gland of birds and fish.

In the pineal gland of the rat Blázquez *et al.* (1988) have described three different ultrastructural types of pinealocytes. Type C of these authors would be rich in OLB such that these structure would be specific to type C and hence would be true markers of a particular population of pinealocytes. The results offered in the present work do not completely confirm this interpretation but neither do they disprove the existence of two or more lineages of pinealocytes. In order to be able to affirm or negate that more than one cellular lineage are included under the common denomination of secretory pinealocyte, further and more precise data concerning their respective morphological organizations and biosynthetic and secretory activities would be required.

Acknowledgements

The authors wish to thank V. Alonso, S. García, M. Manteca and O. Martín for technical assistance. This work was supported by a grant of the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid (Grant number 288/84).

REFERENCES

- ARSTILA, A.U. (1967): Electron microscopic studies on the structure and histochemistry of the pineal gland of the rat. *Neuroendocrinology*, (Suppl. 2): 1-101.
- BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. and AMAT, P. (1988): Estudio ultraestructural sobre los diferentes tipos de pinealocitos de la rata. *An. Anat.*, **33**: 17-27.
- FORN, J. and VALDECASAS, F.G. (1971): Effects of lithium on brain adenylyl-cyclase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 2773-2779.
- GHADIALLY, F.N. (1982): Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 2nd ed. Butterworths, London.
- GONZÁLEZ, G. and ALVAREZ-URÍA, M. (1984): La glándula pineal de los mamíferos. Summa, Oviedo.
- KARASEK, M. (1987): Functional ultrastructure of the mammalian pinealocyte. In: *Advances in pineal research*, 2. (Reiter and Fraschini, eds.), pp. 19-33. John Libbey & Co, London.
- KORF, H.W.; OKSCHE, A.; EKSTRÖM, P.; VAN VEEN, T.; ZIGLER, J.S.; GERY, I.; STEIN, P. and KLEIN, D.C. (1986): S-antigen immunocytochemistry. In: *Pineal and retinal relationships*. (O'Brien and Klein, eds.), pp. 343-355. Academic Press, New York.
- KRAKOWSKI, G. and CIECIURA, L. (1985a): Stereologic studies on mitochondrial configuration in the rat pinealocytes. *J. Pineal Res.*, **2**: 305-314.
- KRAKOWSKI, G. and CIECIURA, L. (1985b): Ultrastructural studies on the pinealocyte mitochondria during the daytime and at night. *J. Pineal Res.*, **2**: 315-324.
- KRSTIC, R. (1985): Formation of autophagosomes in the pinealocytes of the rat and mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): A lysosome wrapping mechanism?. *Cell Tissue Res.*, **241**: 677-681.
- LONG, K.O.; FISHER, S.K.; FARISS, R.N. and ANDERSON, D.H. (1986): Disc shedding and autophagy in the cone-dominant ground squirrel retina. *Exp. Eye Res.*, **43**: 193-205.
- McNEILL, M.E. (1978): Membranous structures in pinealocytes of the infertile diabetic mutant mouse (C57 BL/KS-db/db). *J. Neural Transm.*, **42**: 207-221.
- MILINE, R.; KRSTIC, R. and DEVECERSKI, V. (1968): Sur le comportement de la glande pinéale dans les conditions de stress. *Acta Anat.*, **71**: 352-402.
- MORITA, Y.; SAMEJIMA, N. and TAMOTSU, S. (1989): Response patterns and neuronal networks of photosensory pineal organs. *Arch. Histol. Cytol.*, **52**: 469-475.
- MOSQUEIRA, M.I.; SUQUÍA, B.; HAMADA, M.S. and ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. (1981): Ultrastructural study of the pineal gland of albino rats treated with lithium carbonate. III World Congress of Biological Psychiatry, Stockholm. Abstracts book, F-323.
- MUÑOZ BARRAGÁN, L.; MOSQUEIRA, M.I.; PASTOR, F.E. and CUERVO, H. (1981): Ultracytochemical study of enzymatic activity of pineal gland of rats treated with lithium carbonate. III World Congress of Biological Psychiatry, Stockholm. Abstracts book, F-327.
- PEVET, P. (1979): Secretory processes in the mammalian pinealocyte under natural and experimental conditions. *Prog. Brain Res.*, **52**: 149-194.
- PEVET, P. (1981): Ultrastructure of the mammalian pinealocyte. In: *The pineal gland*. Vol. I. Anatomy and biochemistry. (Reiter, ed.), pp 121-154. CRC Press, Boca Ratón.
- PEVET, P. and SABOUREAU, M. (1973): L'épiphyse du hérison (*Erinaceus europaeus L.*) mâle. I. Les pinéalocytes et leur variations ultrastructurales considérées au cours du cycle sexuel. *Z. Zellforsch.*, **143**: 367-385.
- PEVET, P.; ARIENS-KAPPERS, J. and NEVO, E. (1976): The pineal gland of the male rat (*Spalax ehrenberi, Nehring*). I. The fine structure of pinealocytes. *Cell Tissue Res.*, **174**: 1-24.
- PEVET, P.; ARIENS-KAPPERS, J. and VOUTE, A.M. (1977): The pineal gland of nocturnal mammals. I. The pinealocytes of the bat (*Nyctalus noctula, Schreber*). *J. Neural Transm.*, **40**: 47-68.
- PIZARRO, M.D.L.; LÓPEZ GIL, J.A.; VASALLO, J.L. and MUÑOZ BARRAGÁN, L. (1989a): Distribution of calcium in the pineal gland of normal rats. *Adv. Pineal Res.*, **3**: 39-42.
- PIZARRO, M.D.L.; PASTOR, F.E.; LÓPEZ GIL, A. and MUÑOZ BARRAGÁN, L. (1989b): Ultrastructural study of the distribution of calcium in the pineal gland of the rat subjected to manipulation of the photoperiod. *Histochemistry*, **92**: 161-169.

- REYNOLD, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**: 208-213.
- ROUX, M.; RICHOUX, J.P. and DUSSART, G. (1974): Etude ultrastructurale de l'épiphyse du lérot (*Eliomys quercinus*, L.). *Bull. Ass. Anat.*, **58**: 1031-1042.
- SHERIDAN, M.N. and REITER, R.J. (1968): The fine structure of the hamster pineal gland. *Amer. J. Anat.*, **122**: 357-376.
- VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I.; AROS, B. and OKSCHE, A. (1985): Sensory cells of the «rod-» and «cone-type» in the pineal organ of *Rana esculenta*, as revealed by immunoreaction against opsin and by the presence of an oil (lipid) droplet. *Cell Tissue Res.*, **240**: 143-148.
- WARTEMBERG, H. and GUSEK, W. (1965): Licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Struktur der Epiphysis cerebri des Kaninchens. *Prog. Brain Res.*, **10**: 296-316.
- WELSH, M.G. and REITER, R.J. (1978): The pineal gland of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.*, **193**: 323-336.
- WOLFE, D.E. (1965): The epiphyseal cell: an electron microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. *Prog. Brain Res.*, **10**: 332-386.
- YOCCA, F.D.; LYNCH, V.P. and FRIEDMAN, E. (1983): Effect of chronic lithium treatment on rat pineal rhythms: N-Acetylserotonin and melatonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**: 733-737.
- ZATZ, M. (1979): Low concentrations of lithium inhibit the synthesis of cyclic AMP and cyclic GMP in the rat pineal gland. *J. Neurochem.*, **32**: 1315-1321.

Correspondencia: Dr. J.L. Blázquez Arroyo
Dpto. de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. España

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE GONADOTROPH CELLS OF PINEALECTOMIZED RATS

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS GONADOTROPAS DE RATAS PINEALECTOMIZADAS

J.L. BLÁZQUEZ, D. TORANZO, F.E. PASTOR, G. AMAT,
B. PELÁEZ, A. SÁNCHEZ and P. AMAT

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

SUMMARY

An ultrastructural study was conducted on the gonadotroph cells of the adenohypophysis of male Sprague-Dawley rats that had been pinealectomized at one month of age and sacrificed at one, two and three months later. In the animals sacrificed at one month following pinealectomy the gonadotroph cells displayed numerous dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum and a well developed Golgi apparatus. Two and three months after pinealectomy these ultrastructural signs of hyperactivity persisted and, also, signet ring cells could be seen; these were gonadotroph cells similar to those observed after castration. The findings are discussed with respect to the antagonistic function of the pineal gland.

KEY WORDS: Gonadotroph cells. Pinealectomy. Pineal Gland. Ultrastructure. Rat.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio ultraestructural de las células gonadotropas de la adenohipófisis de ratas machos Sprague-Dawley pinealectomizadas al mes de edad y sacrificadas uno, dos y tres meses después. En las ratas sacrificadas un mes después de la pinealectomía las células gonadotropas muestran abundantes cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso y un gran desarrollo del aparato de Golgi. Dos y tres meses después de la pinealectomía persisten estos signos ultraestructurales de hiperactividad y pueden verse, además, células en anillo de sello, que son gonadotropas similares a los observados tras la castración.

Con anterioridad Clementi y col. (J. Endocrinol., 44: 241-246, 1969) realizaron un estudio sobre la ultraestructura de las células gonadotropas en la rata pinealectomizada, en el que no observaron casi modificaciones, debido probablemente a que el tiempo de supervivencia tras la intervención, en sus experiencias, fue demasiado corto. Por lo demás nuestros datos concuerdan con los de otros investigadores quienes han comprobado un incremento en el contenido hipofisario de LH tras la pinealectomía. Las observaciones que presentamos están en contra de la opinión, hoy muy extendida, de que los efectos de la pinealectomía están muy atenuados en la rata.

PALABRAS CLAVE: Células gonadotropas. Pinealectomía. Pineal. Ultraestructura. Rata.

Introduction

The activity of the pineal gland has been related to modification in the function of different endocrine organs (Nir, 1978; Kappers, 1979). Among these organs, those most closely linked to pineal function are the ones forming the hypothalamic-pituitary-gonadal axis controlling reproduction (Reiter, 1980, 1991). Despite the many publications that have appeared in recent years attempting to clarify the relationship between the pineal gland and the gonadal function, there are still some points that are conflictive. In this sense, it still remains to fully elucidate to what extent pineal hormones affect the function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in species of animals that display non-seasonal reproductive behaviour, such as the albino rat, that are considered to be nonphotoperiodic. Working with this animal, certain authors have reported that pinealectomy leads to an increase in the hypophyseal content of LH similar to that observed after castration (see Mess *et al.*, 1979) while others have proposed that the rat reproductive system does not respond to manipulation of the pineal gland (Reiter *et al.*, 1980) or have stated that in the rat pinealectomy does not have important effects (Cardinali, 1985; Tamarkin *et al.*, 1985).

Neither is it clear at what level(s) of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis the pineal hormones act, although it is likely that the hypothalamus is involved (see Rivest *et al.*, 1987; Toranzo *et al.*, 1988). In recent years studies aimed at locating and characterizing melatonin receptors have been conducted in different animals species, but the results obtained are not conclusive. In the rat it seems clear that there are melatonin receptors in several regions of the central nervous system (Laudon *et al.*, 1988), including the suprachiasmatic nucleus and the area postrema (Williams, 1989), as well as in the median eminence (López González *et al.*, 1991) and in the pars tuberalis of the adenohypophysis (Williams, 1989).

Apart from melatonin, whose antigonadotropic action has been studied in depth, the pineal gland produces other substances, such as peptides, that have also been reported to have antigonadotropic activity. Among these, the best characterized is the tripeptide threonylseryllsine, which has been isolated from the pineal gland of cattle (see Ebels and Balemans, 1986). The administration of this substance to rats caused a significant decrease in serum LH levels (Benson, 1989).

The effect of pinealectomy on the gonadotroph cells of the adenohypophysis has been studied in the male rat by Clementi *et al.* (1969) who sacrificed the animals at 12 days after the operation. In order to note the repercussion of pinealectomy on this adenohypophyseal cell type over a longer period of time after surgery, in the present work we studied the ultrastructure of the gonadotroph cells in male rats subjected to pinealectomy at one month of age and sacrificed at one, two and three months thereafter.

Material and Methods

Albino male Sprague-Dawley rats were used as the experimental animals. All of them had been subjected to a 12/12 light/darkness cycle since birth in a room with constant temperature (18-20°C) and food and water *ad libitum*. In thirty animals the pineal gland was removed surgically under ether anaesthesia at 30 days of age. Pinealectomy was performed after opening a window in the skull and ligating the *sinus sagittalis superior*. Ten animals were sacrificed one month after the operation; a further ten at two months, and another ten at three months. Thirty rats of one month of age underwent a sham pinealectomy and were sacrificed according to the above schedule. Under intraperitoneally administered sodium thiopental anaesthesia (45 mg/kg b.w.) all the animals were perfused through the left ventricle with a fixative solution of 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C, following a wash of the vascular tree with a 150 mM sodium chloride solution. After perfusion, the hypophysis was removed, obtaining blocks of the adenohypophysis of approximately 1 mm³ that were kept in fixative solution over 12 h. The blocks were then post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer for 90 min at 4°C. They were then dehydrated in acetone and contrasted with 2% uranyl acetate and embedded in Durcupan (Fluka). Ultrathin sections were taken on an LKB Ultratome III 8800 ultramicrotome and studied with a Philips EM-201 electron microscope.

Results

In the different animals that had been subjected to the sham pinealectomy no ultrastructural modifications were observed in the gonadotroph cells, such that we shall focus on the alterations observed in this cell type in the pinealectomized animals.

In the animals sacrificed at one month after pinealectomy the most striking feature was the presence of numerous dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum (RER) occupying most of the cytoplasm of the gonadotroph cells (figs. 1 and 2). On section, these cisternae, which were rounded or elongated, displayed in their interior a material with a flocculated aspect, whose electron density varied discreetly among the neighbouring cells (fig. 1). As may be seen in figures 1 and 2, among the cisternae of RER there are mitochondria, usually small and with a dense matrix, together with the two populations of secretory granules typical of these cells: a population of large granules (ϕ 450-700 nm) and another larger population of small granules (ϕ 200-250 nm). These cells can therefore be identified as type I gonadotroph cells (Childs *et al.*, 1980; Kurosumi, 1986). The Golgi apparatus is well developed, its dictyosomes adopting a circular or bell-shaped arrangement (fig. 2). The nucleus of the gonadotroph cells of these animals does not usually show morphological alterations and is usually round. In some cases, it was possible to observe images of cytoplasmic invaginations inside the nucleus (fig. 1), demonstrating a certain irregularity of the nuclear contour.

In the rats sacrificed at 2 and 3 months after pinealectomy the most striking finding in the gonadotroph cells was the presence of cells similar to those observed after castration, i.e., *signet ring cells* (fig. 3). These are characterized by a large central vacuole originating from the fusion of RER cisternae. Otherwise, the ultrastructural characteristics are similar to those reported above: numerous granules, a well-developed Golgi apparatus and large numbers of dilated cisternae of RER.

Discussion

The ultrastructure of the gonadotroph cells of the rat adenohypophysis has been studied in considerable depth both with conventional methods and also using immunocytochemical techniques (for references, see Moriarty, 1975; Childs *et al.*, 1980; Childs, 1986; Kutosumi, 1986; Kurosumi and Inoue, 1986; Horvath and Kovacs, 1988; Sánchez *et al.*, 1991) such that this cellular type of the adenohypophysis is now fully identified.

The ultrastructural observations noted by us in the present work show that surgical pinealectomy leads to important alterations in the gonadotroph cells of the rat. In these adenohypophyseal cells ultrastructural signs of hyperactivity can already be seen at one month after the operation and include a strong development of the RER and Golgi apparatus and the existence of cytoplasmic invaginations inside the cell nucleus. These invaginations have been considered to be a sign of hyperactivity in adenohypophyseal cells (see Amat and Vázquez, 1970). The signs of hyperactivity in the gonadotroph cells become more pronounced at two months after pinealectomy.

Such findings corroborate the data reported by other authors carrying out hormonal determinations after pinealectomy in this species. Thus, Fraschini *et al.* (1968) have reported that pinealectomy leads to an increase in the hypophyseal content of LH similar to that seen after castration. However, using the same experimental design (sacrificing the animals at 12 days after the operation) Clementi *et al.* (1969) studied the ultrastructure of the gonadotroph cells and reported that «*The gonadotrophs looked normal, and only in some was it possible to observe a dilation of the cisternae of the endoplasmic reticulum*».

Unlike the above mentioned study, our ultrastructural investigation focused on animals sacrificed at one, two and three months after pinealectomy. Under these circumstances we observed clear signs of hyperactivity, including the presence of *signet ring cells* in animals sacrificed at two and three months after pinealectomy. As is known, these cells typically appear in the adenohypophysis of castrated animals, although their numbers are low at one month after the operation, later increasing to become quite numerous at three months (see Sánchez *et al.*, 1991). From our observations it may be inferred that something similar occurs in pinealectomized rats, which

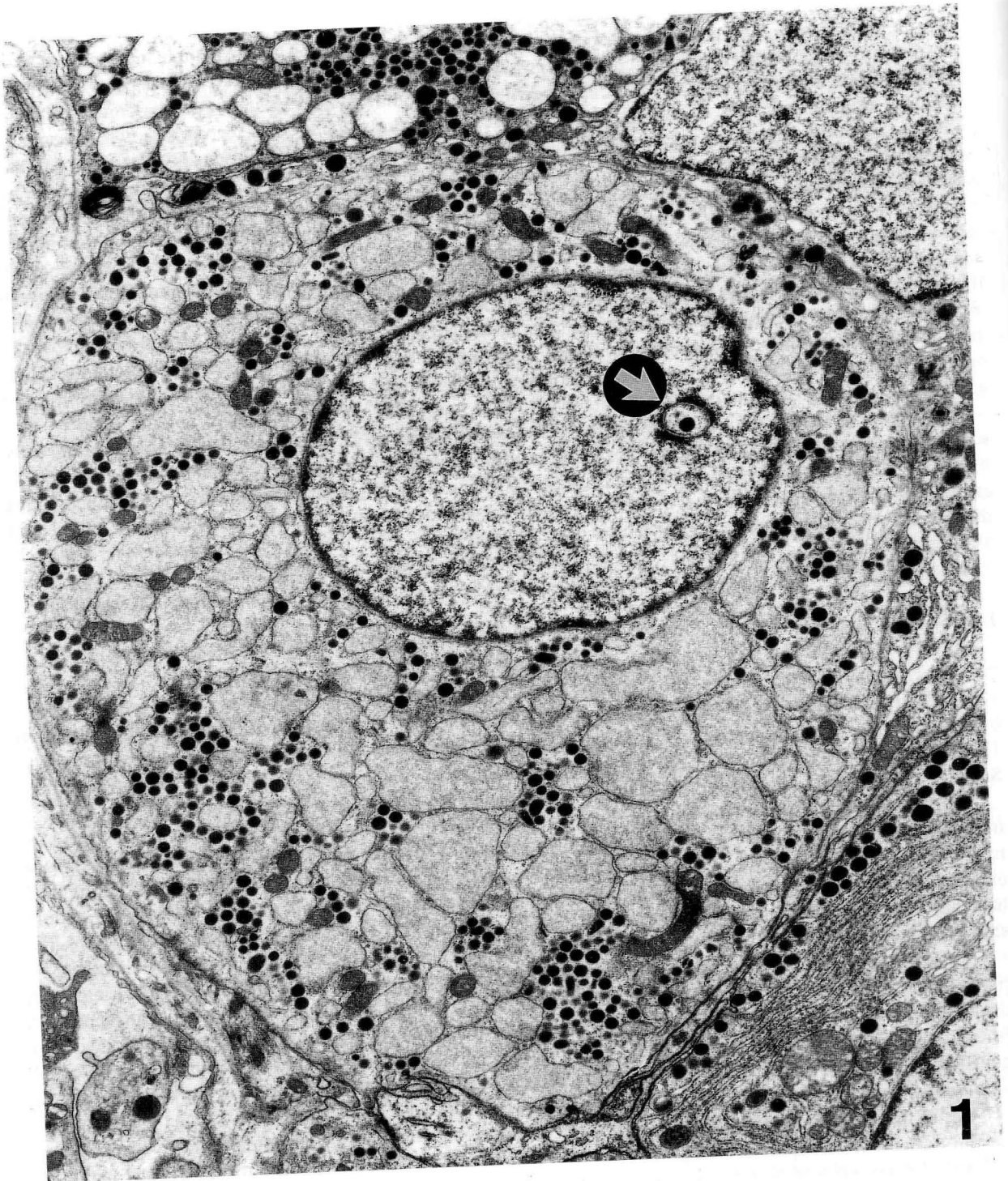


FIGURE 1. Adenohypophysis of a male rat pinealectomized at one month of age and sacrificed one month thereafter. Note a gonadotroph cell with numerous dilated cisternae of RER. Arrow shows a cytoplasmic invagination inside the cell nucleus (x 10.430).

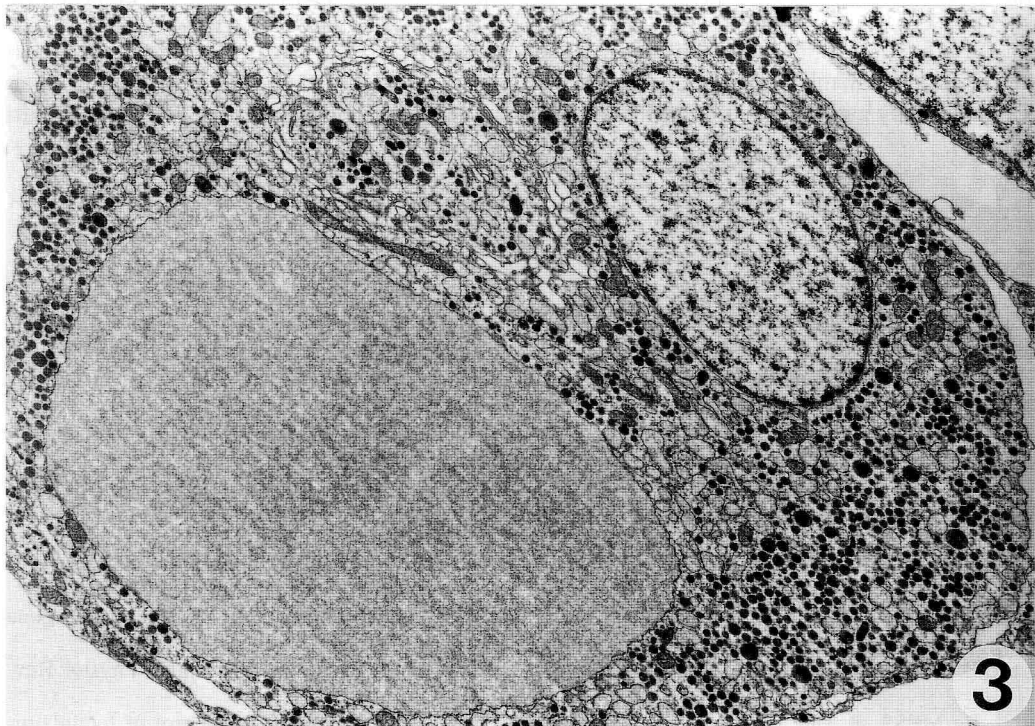
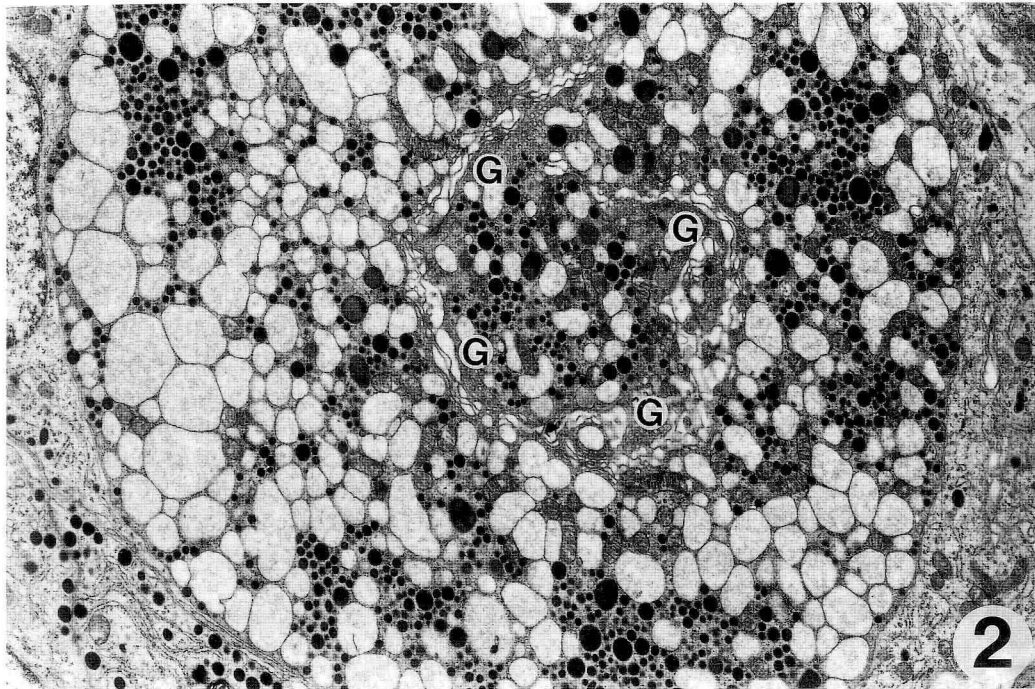


FIGURE 2. Adenohypophysis of a male rat pinealectomized at one month of age and sacrificed one month thereafter. Fragment of the cytoplasm of a gonadotroph adenocyte with numerous dilated cisternae of RER and a well developed Golgi apparatus (G) (x 7.450).

FIGURE 3. Adenohypophysis of a male rat pinealectomized at one month of age and sacrificed two months thereafter. Note a signet ring gonadotroph cell with a large central vacuole (x 7.450).

would account for the scarcity of modifications reported by Clementi *et al.* (1969). In any case, our findings do not agree with the widely held view that the effects of pinealectomy are very attenuated in the rat (Cardinali, 1985; Tamarkin *et al.*, 1985).

To date the work carried out does not allow us to draw any conclusions regarding the substance(s) responsible for the observed effect. Neither does the specialist literature offer conclusive data about this. Orts *et al.* (1974) have observed that the administration of pineal extracts free of melatonin significantly reduces serum LH levels in castrated male rats and Damian *et al.* (1979) have shown that a similar extract causes a decrease in serum LH and FSH levels induced by GnRH. In the same sense, Benson (1989) has stated that administration of threonyl-seryl-lysine to the rat produces a decrease in the weight of the uterus and a delay in vaginal opening as well as a significant fall in serum LH levels. Other authors have proposed that the action of the pineal gland on the gonadotroph cells takes place through melatonin since implantation of this substance in the median eminence or in the reticular substance of the brain stem reduces the increase in hypophyseal LH occurring after castration (see Mess *et al.*, 1979). In the light of the foregoing we believe that new experiments designed to elucidate which pineal substance(s) are responsible for the observed antigonadotropic activity are necessary.

It is well known that castration leads not only to qualitative changes in the morphology of the gonadotroph adenocytes but also a marked increase in the number of these cells; this increase is intensified between 30 and 90 days post-pinealectomy in the case of LH-immunoreactive cells (see Sánchez *et al.*, 1991). Currently there are no data regarding the possible modifications in the number of gonadotroph cells in pinealectomized animals such that immunohistochemical studies are under way at our laboratory to clarify this aspect.

Acknowledgements

The authors wish to thank V. Alonso, S. García, M. Manteca and O. Martín for their technical assistance. This work was supported by a grant from the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid (Grant number 288/84).

REFERENCES

- AMAT, P. and VÁZQUEZ, R. (1970): Inclusiones nucleares en células adenohipofisarias. *An. Anat.*, **19**: 15-25.
- BENSON, B. (1989): Bovine pineal tripeptide Threonylseryllysine retards puberty in female rats. *J. Pineal Res.*, **6**: 351-357.
- CARDINALI, D.P. (1985): Glándula pineal. In: *Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos.* (Schiaffini, Martini, Motta, Oriol Bosch and Tresguerres, eds.), pp. 309-330. Salvat, Barcelona.
- CHILDS, G. V. (1986): Functional ultrastructure of gonadotropes: a review. In: *Morphology of hypothalamus and its connections* (Ganten and Pfaff, eds.), pp. 49-97. Springer-Verlag, Berlin.
- CHILDS, G. V.; ELLISON, D.G. and GARNER, L.L. (1980): An immunocytochemist's view of gonadotropin storage in the adult male rat: Cytochemical and morphological heterogeneity in serially sectioned gonadotropes. *Amer. J. Anat.*, **158**: 397-409.
- CLEMENTI, F.; DE VIRGILIIS, G. and MESS, B. (1969): Influence of pineal gland principles on gonadotrophin-producing cells of the rat anterior pituitary gland: and electron microscopic study. *J. Endocrinol.*, **44**: 241-246.
- DAMIAN, E.; IANAS, O.; BADESCU, I. and OPRESCU, M. (1979): Inhibition of pituitary response to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by a melatonin-free pineal extract. *Prog. Brain Res.*, **52**: 383-385.
- EBELS, I. and BALEMANS, M.G.M. (1986): Physiological aspects of pineal functions in mammals. *Physiol. Rev.*, **66**: 581-604.
- FRASCHINI, F.; MESS, B. and MARTINI, L. (1968): Pineal gland, melatonin and the control of luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, **82**: 919-924.
- HORVATH, E. and KOVACS, K. (1988): Fine structural cytology of the adenohipofysis in rat and man. *J. Electron Microsc. Tech.*, **8**: 401-432.
- KAPPERS, J.A. (1979): Short history of pineal discovery and research. *Prog. Brain Res.*, **52**: 3-22.
- KUROSUMI, K. (1986): Cell classification of the rat anterior pituitary by means of immunoelectron microscopy. *J. Clin. Electron Micr.*, **19**: 299-319.

- KUROSUMI, K. and INOUE, K. (1986): Ultrastructure of anterior pituitary cells. In: Morphology of hypothalamus and its connections (Ganten y Pfaff, eds.), pp. 99-134. Springer-Verlag, Berlin.
- LAUDON, M.; NIR, I. and ZISAPPEL, N. (1988): Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology*, **48**: 577-583.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, M.A.; CALVO, J.R.; RUBIO, A.; GOBERNA, R. and GUERRERO, J.M. (1991): Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rat. *Life Sci.*, **48**: 1165-1171.
- MESS, B.; TRENTINI, G.P.; RUZSAS, C. and De GAETANI, C.F. (1979): Some endocrine effects of the pineal gland and melatonin with special reference to reproduction. *Prog. Brain Res.*, **52**: 329-340.
- MORIARTY, G.C. (1975): Electron microscopic immunocytochemical studies of rat pituitary gonadotrophs: a sex difference in morphology and cytochemistry of LH cells. *Endocrinology*, **97**: 1215-1225.
- NIR, I. (1978): Non-reproductive systems and the pineal gland. *J. Neural. Transm., Suppl.* **13**: 25-244.
- ORTS, R.J.; BENSON, B. and COOK, B.F. (1974): LH-inhibitory properties of aqueous extracts of rat pineal glands. *Life Sci.*, **14**: 1501-1510.
- REITER, R.J. (1980): The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.*, **1**: 109-131.
- REITER, R.J. (1991): Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.*, **12**: 151-180.
- RIVEST, R.W.; JACONI, M.E.E.; GRUAZ, N.; SIZONENKO, P.C. and AUBERT, M.L. (1987): Short-term and long-term effects of melatonin on Gn-RH-stimulated gonadotropin secretion in pituitaries of sexually maturing rats. *Neuroendocrinology*, **46**: 379-386.
- SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G. and AMAT, P. (1991): Células LH de la adenohipófisis de la rata macho castrada. Estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural. *An. Anat.* (en prensa).
- TAMARKIN, L.; BAIRD, C.J. and ALMEIDA, O.F.X. (1985): Melatonin. A coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*, **227**: 714-720.
- TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. and AMAT, P. (1988): Estudio ultraestructural del área preóptica medial en ratas normales y pinealectomizadas. *Histología médica*, **4**: 99-110.
- WILLIAMS, L.M. (1989): Melatonin-binding sites in the rat brain and pituitary mapped by in-vitro autoradiography. *J. Mol. Endocr.*, **3**: 71-75.

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



**EFFECT OF PINEALECTOMY ON THE MAGNOCELLULAR NEURONS OF THE HYPOTHALAMIC
PARAVENTRICULAR NUCLEUS OF THE MALE RAT**

**EFFECTOS DE LA PINEALECTOMÍA SOBRE LAS NEURONAS MAGNOCELULARES DEL NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO DE LA RATA MACHO**

**J. L. BLÁZQUEZ, F.E. PASTOR, D. TORANZO, G. AMAT,
B. PELÁEZ, A. SÁNCHEZ and P. AMAT**

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

SUMMARY

An ultrastructural study has been made of the magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus of male rats pinealectomized at one month of age and sacrificed at one, two and three months after surgery. The most striking cytoplasmic alterations observed are the strong development of the Golgi apparatus and the abundance of lysosomes together with a scarcity of rough endoplasmic reticulum and of neurosecretory granules. The cellular nuclei display abundant membranous inclusions. These findings are discussed in relation with a possible functional inhibition of the hypothalamo-neurohypophysial system evoked by pinealectomy.

KEY WORDS: Paraventricular nucleus. Pinealectomy, Ultrastructure. Rat.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio ultraestructural de las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas macho pinealectomizadas al mes de edad y sacrificadas uno, dos y tres meses después de la intervención. Las modificaciones citoplasmáticas más llamativas son el gran desarrollo del aparato de Golgi y la abundancia de lisosomas, así como la escasez de retículo endoplásmico rugoso y de gránulos de neurosecreción. En los núcleos celulares abundan las inclusiones membranosas. Se discuten estos hallazgos en relación con una posible inhibición funcional del sistema hipotálamo-neurohipofisario provocada por la pinealectomía.

PALABRAS CLAVE: Núcleo paraventricular. Pinealectomía. Ultraestructura. Rata.

Introduction

The relationship between the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and the pineal gland has been studied in several works. The interest in such a relationship derives from the fact that functionally the PVN lies between the suprachiasmatic nucleus and the intermediolateral cellular column of the spinal cord, forming part of the innervation pathway of the pineal organ (Swanson and Kuypers, 1980). Additionally, it has been reported that

the neurons of this organ project to the pineal gland, either through the habenular nuclei (Swanson and Sawchenko, 1983) or directly (Korf and Møller, 1984). This latter route, in the case of the rat, originates from the medial and periventricular parvocellular nuclei (Larsen *et al.*, 1991). The importance given to the axons that course to the pineal from the PVN derives from their possible peptidergic nature and in the possible modulatory role that they might play with respect to the biosynthesis of pineal secretory products, in particular melatonin (see Simonneaux *et al.*, 1990; Stehle *et al.*, 1991).

From the beginning of the sixties, the pineal gland has also been related to the function of the hypothalamic-neurohypophyseal system. In this sense, it has been suggested that the pineal could affect the body's water metabolism by modifying the formation of urine (Vollrath, 1981). Additionally, histological evidence points to a relationship between the pineal and the activity of the hypothalamic magnocellular neurons (Miline, 1960; Aron *et al.*, 1961), although the results are not conclusive, and indeed sometimes inconsistent (see Guzek, 1986). Among the few studies on the morphology of the supraoptic and paraventricular nuclei performed in pinealectomized animals, de Vries and Ariens-Kappers (1971) and de Vries (1972a) have observed a decrease in the neurosecretory activity of both nuclei; this effect is reversed following the implantation of pineal tissue in the hypothalamus (de Vries, 1972b). Later, other authors have reported that after pinealectomy a decrease in the activities of oxytocin and vasopressin occurs both in the hypothalamus and in the posterior lobe of the hypophysis. This is reflected in a decrease in the storage of substances in the hypothalamic-neurohypophyseal system (Guzek, 1986).

In the present work we studied the ultrastructure of the magnocellular neurons of the hypothalamic PVN of male rats that had been surgically pinealectomized at one month of age in order to check the existence of possible alterations and to determine the development of these in animals sacrificed at one, two and three months after surgery.

Materials and Methods

Sixty albino male Sprague-Dawley rats were used. All of them had been subjected to a 12/12 light/darkness cycle since birth in a room with constant temperature (18-20°C) and food and water *ad libitum*. In thirty animals the pineal gland was removed surgically under ether anaesthesia at 30 days of age. Pinealectomy was performed after opening a window in the skull and ligating the *sinus sagittalis superior*. Ten animals were sacrificed one month after the operation; a further ten at two months, and another ten at three months. Thirty rats of one month of age underwent a sham pinealectomy and were sacrificed according to the above schedule. Under intraperitoneally administered sodium thiopental anaesthesia (45 mg/kg b.w.) all the animals were perfused through the left ventricle with a fixative solution of 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C, following a wash of the vascular tree with a 150 mM sodium chloride solution. After perfusion, a sample including the paraventricular nucleus and surrounding tissue was obtained and kept in fixative solution over 12 h. The samples were then post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer for 90 min at 4°C. They were then dehydrated in acetone and contrasted with 2% uranyl acetate and embedded in Durcupan (Fluka). Ultrathin sections were taken on an LKB Ultratome III 8800 ultramicrotome and studied with a Philips EM-201 electron microscope.

Results

The present ultrastructural study was conducted on frontal sections that pass through the posterior magnocellular subnucleus of the PVN of the hypothalamus. In these sections the medial and periventricular parvocellular subnuclei are also present; however, this study is restricted to the magnocellular neurons. Here, our description will be limited to the modifications observed in pinealectomized rats as compared to control animals.

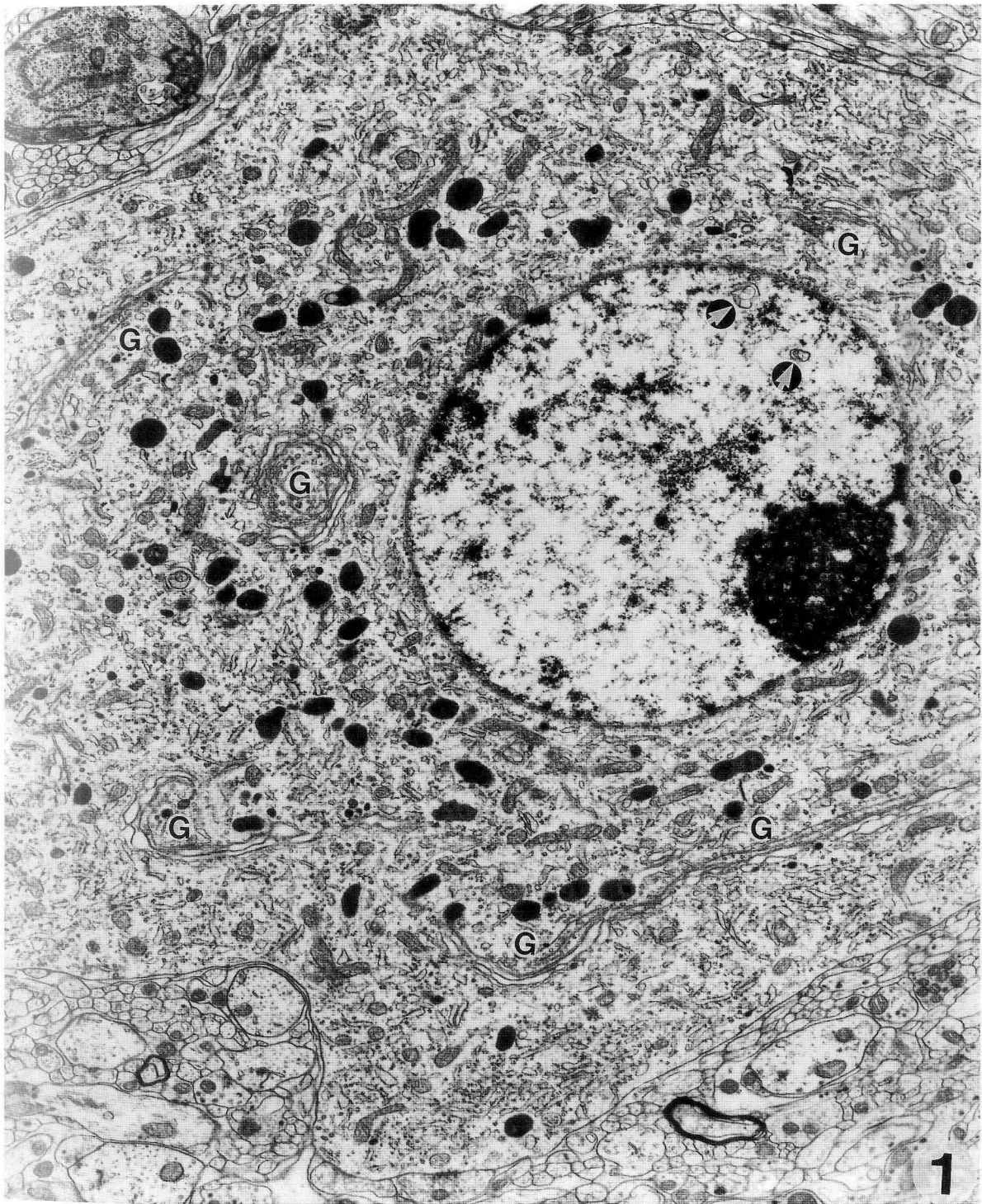


FIGURE 1. Magnocellular neuron of the paraventricular nucleus of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed one month later. Note the strong development of the Golgi apparatus (G) and the abundance of dense lysosomal bodies. *Arrows* show membranous intranuclear inclusions (x 10,430).

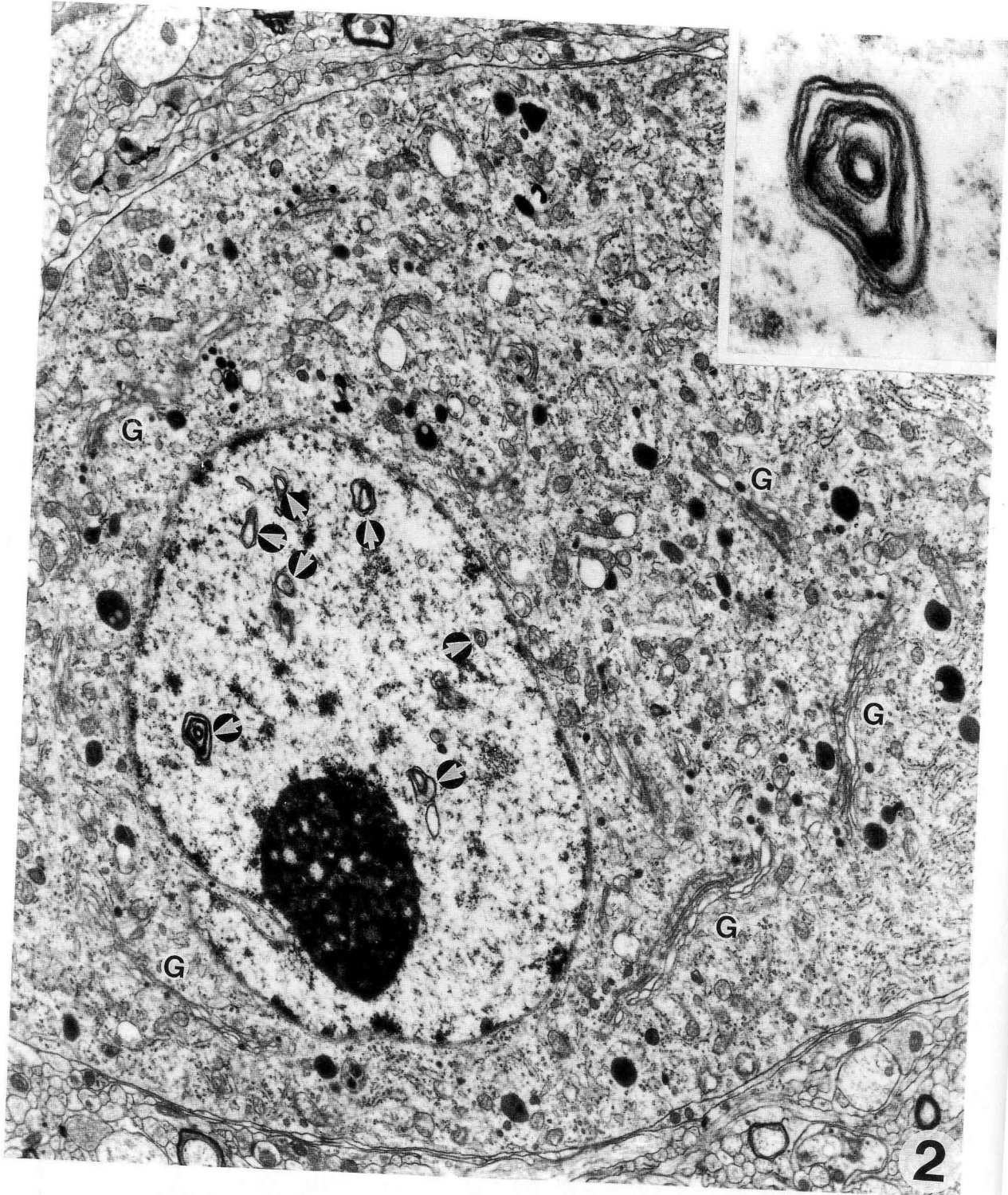


FIGURE 2. Magnocellular neuron of the paraventricular nucleus of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed three months later. Note the highly developed Golgi apparatus (G) and the large number of dense lysosomal bodies. *Arrows* show membranous intranuclear inclusions ($\times 10,430$). *Insert*: High power magnification of a membranous intranuclear inclusion ($\times 30,660$).

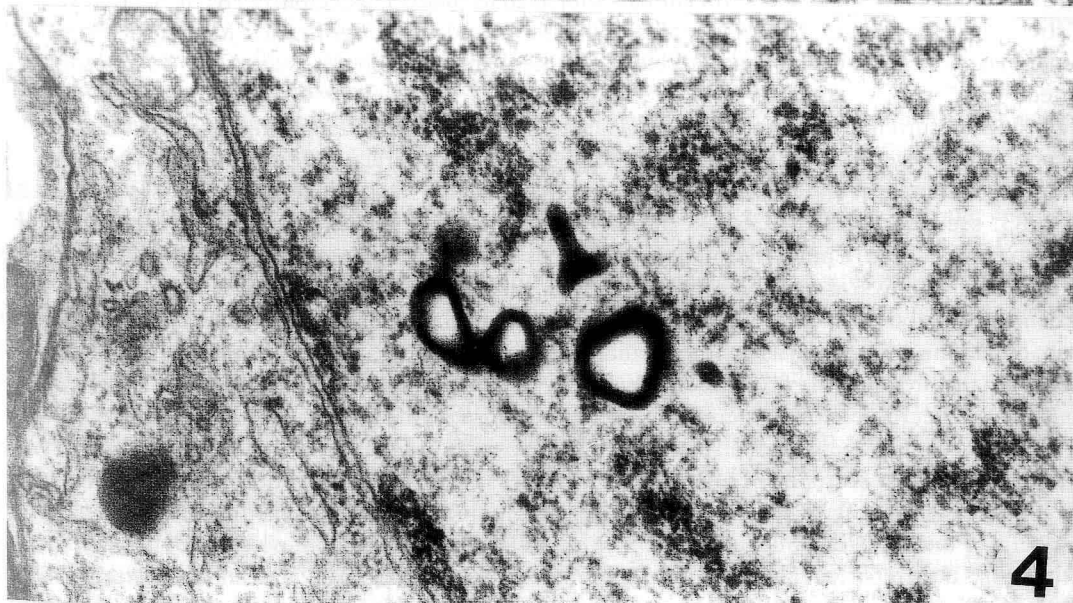
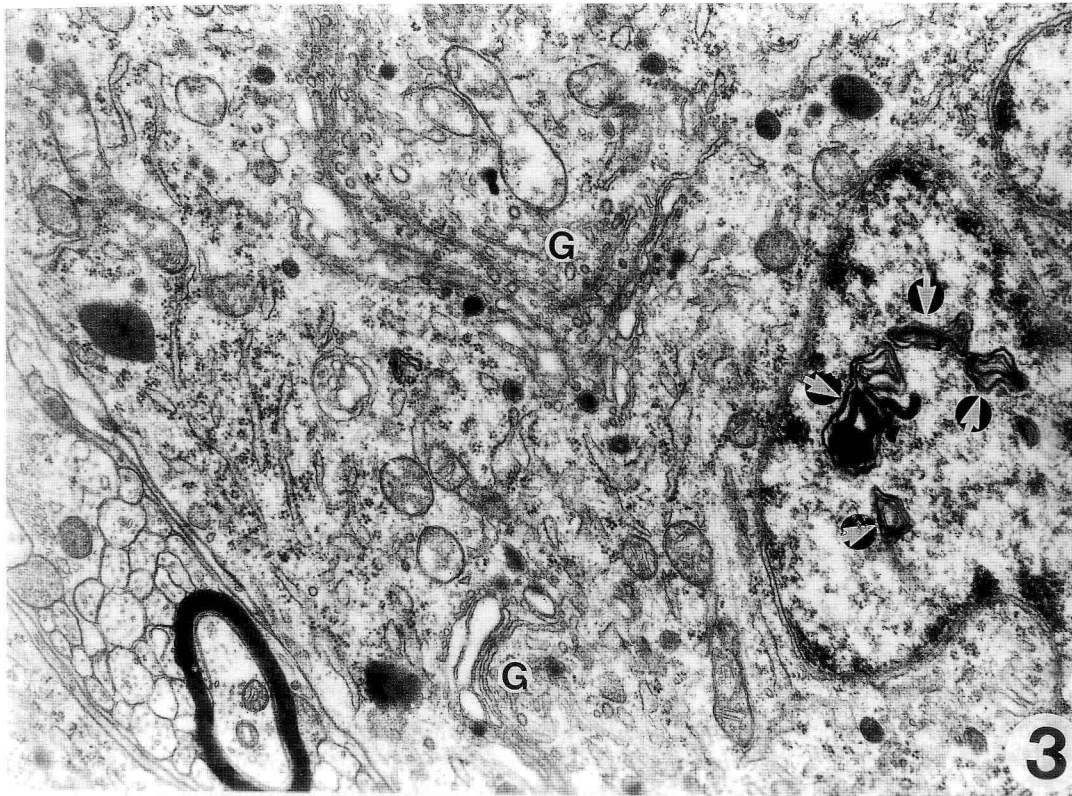


FIGURE 3. Magnocellular neuron of the paraventricular nucleus of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed three months later. Note prominent Golgi apparatus (G) with primary neurosecretory granules, immature in appearance, and the membranous intranuclear inclusions (*arrows*) (x 21,900).

FIGURE 4. Magnocellular neuron of the paraventricular nucleus of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed three months later. Note the membranous intranuclear inclusions (x 45,500).

In the rats sacrificed at one month following surgery the magnocellular neurons have a round nucleus with scarce heterochromatin in which the most striking feature is the almost constant presence of large nucleoli that are usually located peripherally to the nucleus (fig. 1). Irregularly shaped membranous intranuclear inclusions can be visualized (fig. 1, *arrows*). The perikaryon of these neurons shows a strongly developed Golgi apparatus; its numerous dyctiosomes are situated around the cell nucleus (fig. 1, G). Dense lysosomal bodies are also very abundant (diameter 400-600 nm). The rough endoplasmic reticulum is not very developed as compared with that of the control animals. Some small dense-core granules can be seen (diameter 100-150), almost always in the immediate neighbourhood of the Golgi complex (fig. 1).

In the animals sacrificed at two and three months after pinealectomy, these features persist (fig. 2). The strong development of the Golgi apparatus is very patent (figs. 2 and 3, G) and the scarcity of rough endoplasmic reticulum is conspicuous. Lysosomes continue to be abundant (fig. 2). Also, moderate numbers of small dense-core granules (diameter 100-150 nm) are seen, most of them located next to the Golgi cisternae (figs 2 and 3). In these groups of animals, especially at three months after pinealectomy, the modifications observed in the cellular nuclei are very striking. These are ovoid (fig. 2) or even irregular. In some cases their contours show very noticeable invaginations (fig. 3) which are usually related to the nucleolus (fig. 2). Inside the nuclei, a common finding is the presence of numerous membranous inclusions (fig. 2; *arrows*); some of these are formed of several layers of membranes arranged concentrically (fig. 3). In other cases, they adopt the form of empty vesicles with thick osmiophilic walls (fig. 4).

Discussion

Transmission electron microscopic study of the magnocellular neurons of the PVN of the hypothalamus of pinealectomized rats reveals the existence of certain alterations in some of the organelles of these cells as compared with the same elements studied in control animals subjected to sham pinealectomy. The most interesting findings are the strong development of the Golgi apparatus and the abundance of lysosomes, together with the scarcity of rough endoplasmic reticulum and neurosecretory granules. The question arises as to how such results should be interpreted.

According to currently available data, pinealectomy elicits a functional inhibition of the hypothalamic-neurohypophyseal system (de Vries and Ariens-Kappers, 1971; de Vries, 1972 a, b) together with a decrease in the storage of vasopressin and oxytocin both in the hypothalamus and in the neurohypophysis (Juszczak and Guzek, 1983; see also Guzek, 1986). Regarding the mechanisms responsible for this functional inhibition, according to Guzek (1986) a pineal hormone or hormones could directly or indirectly determine the synthesis and release of neurohypophyseal hormones. In the view of this author, the action would mainly take place on the hypothalamus, either on the magnocellular neurons or by altering the levels of some neurotransmitter (noradrenalin, serotonin, dopamine, glutamate) as an intermediate step. Nevertheless, we believe that in the light of other data documented in the literature the decrease in the activity of the neurons of the PVN can be interpreted in terms of a response of this neurosecretory system in an attempt to conserve the homeostasis of the internal milieu. In this regard, it should be remembered that different authors have observed that, among other alterations, pinealectomy causes an increase in the secretion of aldosterone (Kinson *et al.*, 1968), and corticosterone (Kinson *et al.*, 1968; Nir *et al.*, 1971; Ogle and Kitay, 1976), an increase in plasma renin activity (Karppanen *et al.*, 1975), and hypertrophy of the A cells of the suprarenal medulla (Kachi *et al.*, 1988). Furthermore, in pinealectomized animals arterial hypertension has been reported (Karppanen *et al.*, 1975; Holmes and Sudgen, 1976; Zanoboni *et al.*, 1978; Vaughan *et al.*, 1979), possibly as a result of the above hormonal alterations. Under these circumstances, it seems logical that the hypothalamo-neurohypophysial system would decrease the production and release of vasopressin and eliminate the excess of this hormone in an attempt to compensate the aforementioned disturbances. We feel that our results are consistent with this interpretation.

Thus, the abundance of lysosomes could be involved in the degradation of neurosecretory material. The magnocellular neurosecretory neurons have lytic mechanisms for eliminating the excess of hormonal products (see Rufener, 1974; Morris *et al.*, 1977; Morris and Nordmann, 1979; Holtzman, 1989). The degradation of a

neurosecretory product can occur through two mechanisms. One of them is by fusion of the secretory granules with primary lysosomes. This process is known as *crinophagy* (Smith and Farquhar, 1966) or *granulolysis* (Orci *et al.*, 1968). The other mechanism consists in the sequestering of a portion of cytoplasm by a membrane, involving diverse organelles, and is called *autophagy* (see Holtzman and Dominitz, 1968; Ericsson, 1969). In the neurons of the hypothalamo-neurohypophysial system the main mechanism is autophagy, which occurs essentially in the axons, while crinophagy is produced in the perikaryon and is of less importance (Boudier and Picard, 1976, 1978).

In turn, the strong development of the Golgi apparatus of the magnocellular neurons of the PVN of the pinealectomized rats in our series could be accounted for in terms of an increase in the production of lysosomes. In this sense, it should be mentioned that our results on the development of the Golgi apparatus are apparently not in agreement with those published by de Vries and Ariens-Kappers (1971) and by de Vries (1972 a,b). These authors reported that pinealectomy leads to a decrease in thiamine pyrophosphatase activity and deduced -in our own opinion, erroneously- that a decrease occurs in the Golgi apparatus whereas we have consistently observed a strong development of this organelle. Since the work of de Vries is based on histochemical observation of enzyme activity with the light microscope, we propose that the data obtained by us in this ultrastructural study offer a more precise and reliable reference of the development of the Golgi apparatus than histochemical demonstration of thiamine pyrophosphatase activity. It should also be pointed out that within the functional bipolarity of the Golgi complex proposed by Picard *et al.* (1972), thiamine pyrophosphatase activity would be located in the cisternae that originate the neurosecretory granules while lysosomes would be produced in the cisternae that have high acid phosphatase activity (see Morris *et al.*, 1977; Broadwell *et al.*, 1978; Castel and Dellmann, 1980). Accordingly, the decrease in thiamine pyrophosphatase activity would reflect a decrease in the production of neurosecretory material but not a reduced development of the Golgi complex, which would be hyperactive as regards the production of lysosomes, in accordance with our findings.

Additionally, the decrease in the synthesis of neurosecretory material is ultrastructurally paralleled by a poor development of the rough endoplasmic reticulum and a scarcity in neurosecretory granules. We have observed dense-core granules with a diameter of 100-150 nm in the perikaryon of magnocellular neurons of the PVN of pinealectomized rats. According to their aspect they can be identified as neurosecretory granules and it is likely that some indeed are, but we feel that many might correspond to newly produced primary lysosomes. In support of such a notion are the following: 1) the decrease in thiamine-pyrophosphatase activity in neurons of the PVN after pinealectomy (de Vries and Ariens-Kappers, 1971; de Vries, 1972 a, b), since this is one of the most accurate parameters of the index of secretory activity (Jongkind and Swaab, 1967); 2) most of the dense-core granules observed by us were located in the vicinity of the Golgi apparatus and were very scarce in the rest of the perikaryon; 3) the granules of this size and aspect could correspond both to secretory granules and primary lysosomes (Picard *et al.*, 1972), and 4) we did not observe pale neurosecretory granules in the perikaryon of the neurons of our pinealectomized animals.

In conclusion, we believe that our ultrastructural observations of the magnocellular neurons of the PVN of pinealectomized rats are consistent with the decrease in the functional activity of the hypothalamo-neurohypophysial system described by other authors.

Another important finding of this study is the observation of membranous inclusions inside the cellular nucleus of PVN cells. These formations have been described in neurons belonging to different territories of the nervous system (for references, see Blázquez *et al.*, 1992) and are common findings in the medial preoptic area of pinealectomized rats (Toranzo *et al.*, 1988). Their existence has been related to the transport of material from the cytoplasm to the nucleus and has been interpreted as a sign of increased cellular activity (Calvet i Marquez *et al.*, 1987). In the PVN of the rat, Gregory *et al.* (1980) observed that the number of membranous intranuclear inclusions decreases during dehydration and increases during rehydration. This latter experimental situation also leads to a decrease in neurosecretory activity -previously increased during dehydration- and the degradation of neurosecretory material synthesized in excess.

Acknowledgements

The authors wish to thank Valentin Alonso, Soledad García, María Manteca and Olvido Martín for their technical assistance. This work was supported by the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (project 288/84)

REFERENCES

- ARON, E.; COMBESCOT, C.; DEMARET, J.; GUYON, L. and MAUVERNAY, R.I. (1961): Modifications de la neurosécrétion observées dans l'encéphale du rat après injectoin d'un extrait épiphysaire. *C. R. Soc. Biol.* **155**: 593-595.
- BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A. and AMAT, P. (1992): Ultrastructural study of the gonadotroph cells of pinealectomized rats. *An. Anat.* (in press).
- BOUDIER, J.A. and PICARD, D. (1976): Granulolysis in neurosecretory neurons of the rat supraoptic-posthypophysal system. *Cell Tissue Res.*, **172**: 39-58.
- BOUDIER, J.A. and PICARD, D. (1978): Granulolysis, a possible intracellular regulatory mechanism of neurosecretion in the hypothalamo-posthypophysal system of the rat. In: *Neurosecretion and neuroendocrine activity. Evolution, structure and function.* (Bargmann, Oksche, Polenov and Scharrer, eds.) pp. 34. Springer-Verlag, Berlin.
- BROADWELL, R.D.; BRIGHTMAN, M.W. and OLIVER, C. (1978): Cytochemical study of the Golgi apparatus, GERL and lysosomes in neurosecretory neurons from normal and NaCl-treated mice. *J. Cell Biol.*, **79**: 101a.
- CALVET I MÁRQUEZ, S.; DOMENECH I MATEU, J.M.; MARTIN PÉREZ, V. y GARCÍA VERDUGO, J.M. (1987): Nuclear inclusions in the neurons of the developing cerebral cortex of Gallus gallus. *J. Submicrosc. Cytol.*, **19**: 471-478.
- CASTEL, M. and DELLMANN, H.D. (1980): Thiamine pyrophosphatase activity in the axonal smooth endoplasmic reticulum of neurosecretory neurons. *Cell. Tissue Res.*, **210**: 205-221.
- ERICSSON, J.L.E. (1969): Cellular autophagy. In: *Lysosomes in biology and pathology.* (Dingle and Fell, eds.) Vol. II, pp. 345-394. Nort Holland, Amsterdam.
- GREGORY, W.A.; TWEEDLE, C.D. and HATTON, G.I. (1980): Ultrastructure of neurons in the paraventricular nucleus of normal, dehydrated and rehydrated rats. *Brain Res. Bull.*, **5**: 301-306.
- GUZEK, J.W. (1986): The pineal-neurohypophysial interactions. En: *Advances in pineal research*, Vol. 1, pp. 139-147. (Reiter y Karasek, eds.). John Libbey & Co., Londres.
- HOLMES, S. W. and SUDGEN, D. (1976): The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **6**: 360P-361P.
- HOLTZMAN, E. (1989): *Lysosomes.* (Siekevitz, ed.) Plenum Press, New York.
- HOLTZMAN, E. and DOMINITZ, R. (1968): Cytochemical studies of lysosomes, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in secretion and protein uptake by adrenal medulla cells of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 320-336.
- JONGKIND, J.F. and SWAAB, D.F. (1967): The distribution of thiamine-diphosphate-phosphohydrolase in the neurosecretory nuclei of the rat following osmotic stress. *Histochemie*, **11**: 319-324.
- JUSZCZAK, M. and GUZEK, J.W. (1983): The content of vasopressin and oxytocin in the hypothalamus and neurohypophysis of pinealectomized male rats. *Acta Physiol. Pol.*, **34**: 41-46.
- KACHI, T.; BANERJI, T.K. and QUAY, W.B. (1988): Quantitative cytological analysis of functional changes in adrenomedullary chromaffin cells in normal, sham-operated, and pinealectomized rats in relation to time-of-day: II. Nuclear-cytoplasmic ratio, nuclear size, and pars granulosa of nucleolus. *J. Pin. Res.*, **5**: 141-159.
- KARPPANEN, H.; LAHOVAARA, S.; MANNISTO, P. and VAPAATALO, H. (1975): Plasma renin activity and in vitro synthesis of aldosterone by the adrenal glands of rats with spontaneous, renal, or pinealectomy-induced hypertension. *Acta Physiol. Scand.*, **94**: 184-188.
- KINSON, G.A.; SINGER, B. and GRANT, L. (1968): Adrenocortical hormone secretion at various time intervals after pinealectomy in the rat. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **10**: 447-449.
- KORF, H.W. and MØLLER, M. (1984): The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. *Pin. Res. Rev.*, **2**: 41-86.
- LARSEN, P.J., MØLLER, M. and MIKKELSEN, J.D. (1991): Efferent projections from the periventricular and medial parvicellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: A *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J. Comp. Neurol.*, **306**: 462-479.
- MILINE, R. (1960): Sur la réactivité stressogène du complexe hypothalamo-hypophysaire. *Symp. Biol. Hung.*, **1**: 105-130.
- MORRIS, J.F. and NORDMANN, J.J. (1979): Lysosomal control in neurosecretion: The roles of cellular compartmentation and granule age. *Bio. Cell.*, **36**: 193-200.
- MORRIS, J.F.; NORDMANN, J.J. and DYBALL, R.E.J. (1977): Structure-function correlation in mammalian neurosecretion. *Int. Rev. Exp. Path.*, **18**: 1-95.

- NIR, I.; SHCMIDT, W.; HIRSCHMANN, N. and SULMAN, F.G. (1971): The effect of pinealectomy on rat plasma corticosterone levels under various conditions of light. *Life Sciences.*, **10**: 317-324.
- OGLE, T.F. and KITAY, J.I. (1976): Effect of pinealectomy on adrenal function in vivo and in vitro in female rats. *Endocrinology*, **98**: 20-24.
- ORCI, L.; JUNOD, A.; PICTET, R.; RENOLD, A.W. and ORULLER, C. (1968): Granulolysis in A-cells of endocrine pancreas in spontaneous and experimental diabetes in animals. *J. Cell Biol.*, **38**: 462-466.
- PICARD, D.; MICHEL-BECHET, M.; ATHOUËL, A.M. and RUA, S. (1972): Granules neurosécrétoires, lysosomes et complexe GRL dans le noyau supra-optique du rat. Bipolarité des complexes golgiens. *Exp. Brain Res.*, **14**: 331-353.
- RUFENER, C. (1974): Autophagy of secretory granules in the rat neurohypophysis. *Neuroendocrinology*, **13**: 314-320.
- SIMONNEAUX, V.; OUICHOU, A.; BURBACH, J.P.H. and PEVET, P. (1990): Vasopressin and oxytocin modulation of melatonin secretion from rat pineal glands. *Peptides*, **11**: 1075-1079.
- STEHLE, J.; REUSS, S.; RIEMANN, R.; SEIDEL, A. and VOLLRATH, L. (1991): The role of arginine-vasopressin for pineal melatonin synthesis in the rat: involvement of vasopressinergic receptors. *Neurosci. Lett.*, **123**: 131-134.
- SWANSON, L.W. and KUYPERS, H.G.J.M. (1980): The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labelling methods. *J. Comp. Neurol.*, **194**: 555-570.
- SWANSON, L.W. and SAWCHENKO, P.E. (1980): Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, **31**: 410-417.
- TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. and AMAT, P. (1988): Estudio ultraestructural del área preóptica medial en ratas normales y pinealectomizadas. *Histología médica*, **4**: 99-110.
- VAUGHAN, G.M.; BECKER, R.A.; ALLEN, J.P. and VAUGHAN, M.K. (1979): Elevated blood pressure after pinealectomy in the rat. *J. Endocrinol. Invest.*, **2**: 281-284.
- VOLLRATH, L. (1981): The pineal organ. En: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des menschen*, Band VI/7. (Oksche y Vollrath, eds.). Springer, Berlín.
- VRIES, R.A.C. DE (1972a): Influence of pinealectomy on hypothalamic magnocellular neurosecretory activity in the female rat during normal light conditions, light-induced persistent oestrus, and after gonadectomy. *Neuroendocrinology*, **9**: 244-249.
- VRIES, R.A.C. DE (1972b): Abolition of the effect of pinealectomy on hypothalamic magnocellular neurosecretory activity in male rats by hypothalamic pineal implants. *Neuroendocrinology*, **9**: 358-364.
- VRIES, R.A.C. DE and ARIENS-KAPPERS, J. (1971): Influence of the pineal gland on the neurosecretory activity of the supraoptic hypothalamic nucleus in the male rat. *Neuroendocrinology*, **8**: 359-366.
- ZANOBONI, A.; FORNI, A.; ZANOBONI-MUCIACCIA, W. and ZANUSSI, C. (1978): Effect of pinealectomy on arterial blood pressure and food and water intake in the rat. *J. Endocrinol. Invest.*, **2**: 125-130.

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

RESPUESTA HIPOFISARIA A LA CASTRACIÓN: UNA REVISIÓN CRÍTICA

EFFECTS OF CASTRATION ON THE PITUITARY GLAND: A CRITICAL REVIEW

E. CARBAJO PÉREZ*, S. CARBAJO*, J.L. ALBERCA* y J.C. CARVAJAL**

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Universidad de Salamanca

* Facultad de Medicina

** Colegio Universitario de Ávila

RESUMEN

Los datos disponibles acerca de la secreción de gonadotropinas y los cambios morfológicos del lóbulo anterior de la hipófisis de ratas tras la castración, son numerosos. A pesar de ello, no es clara la relación entre la morfología y el estado funcional. El objetivo de este trabajo es correlacionar las aportaciones de diferentes investigadores en relación con la secreción de gonadotropinas, poniendo una especial atención en las modificaciones que sufre el procesamiento hipofisario de estas hormonas tras la gonadectomía.

PALABRAS CLAVE: Castración. Adenohipófisis. Rata.

SUMMARY

A great deal of experimental data are available both on the gonadotrophin secretion and morphological changes in the anterior pituitary of castrated rats. However, the relationship between morphology and function is still not clear. The clarification of this somewhat obscure relationship is the chief purpose of this report. A review of current morphological and functional data concerning gonadotrophin secretion in the castrated rat is made. Particular attention has been paid to those data suggesting a modification in the way gonadotrophins are processed in the pituitary of castrated animals.

KEY WORDS: Castration. Pituitary gland. Rat.

Con la gonadectomía el efecto feed-back de las secreciones gonadales sobre el eje hipotálamo hipofisario desaparece, alterándose la secreción de las gonadotropinas hipofisarias. Se produce un gran incremento de los niveles séricos de LH y FSH, así como modificaciones del contenido hipofisario de estas hormonas. Estos hechos están sobradamente probados pero, los mecanismos que condicionan las diferencias en la respuesta a la castración de los machos y las hembras; la diferente repercusión sobre la secreción de LH y FSH; el balance existente entre síntesis y liberación y sus causas íntimas; la función biológica y las causas que condicionan la modificación de la carga eléctrica y potencia biológica de las hormonas gonadotropas tras la castración, no se han esclarecido aún.

Desde el punto de vista del morfológico, la repercusión de la castración sobre la adenohipófisis es bien conocida; no obstante, la relación entre las alteraciones estructurales que sufren las células gonadotropas y la dinámica de la secreción hormonal tras la castración, sigue siendo una incógnita. Del mismo modo, existen también importantes lagunas en lo que a los mecanismos que controlan la hiperplasia de este tipo celular se refiere.

En esta revisión pretendemos hacer una síntesis de los conocimientos actuales sobre las alteraciones morfofuncionales hipofisarias que siguen a la castración. Los factores implicados en la evolución de la hiperplasia de las células gonadotropas tras la gonadectomía serán el objetivo de otro artículo. Antes de desarrollar estos temas consideramos oportuna una breve descripción de las alteraciones en la secreción de gonadotropinas como respuesta a la castración.

I. Repercusiones de la castración sobre los niveles séricos e hipofisarios de gonadotropinas

El efecto regulador de los esteroides gonadales, fundamentalmente estrógenos en la hembra y testosterona en el macho, puede ser ejercido tanto a nivel hipotalámico como hipofisario, con una acción dual, bien estimuladora, bien inhibidora de la secreción gonadotropa (ver Carabajo-Pérez, 1988 y Rubio y col., 1989). Aún no está claramente definido cuáles de estos efectos tienen lugar directamente a nivel hipofisario y cuales son mediados por modificaciones en la secreción de factores hipotalámicos. Hasta el momento sólo hay evidencia de la existencia de una hormona liberadora de gonadotropinas, la GnRH, cuya acción es indiscutible sobre la secreción de LH. La FSH escapa en cierto modo al control de la GnRH hipotalámica (Hasegawa y col., 1981 y De Paolo, 1985). Algunos autores han sugerido la existencia de una hormona liberadora específica para la FSH, la FSH-RH (De Paolo, 1985 y Culler y Negro Vilar, 1987). La acción de la inhibina, elemento primordial en la secreción de FSH, se puede localizar esencialmente a nivel hipofisario (Charlesworth y col., 1984), modulando algunas de las acciones de la GnRH (Wang y col., 1989).

Las modificaciones de los niveles séricos e hipofisarios de LH y del contenido hipotalámico de GnRH permitieron a Badger y col. (1978) sistematizar en dos fases la respuesta a la castración de la rata macho. Durante la primera, que comprende los siete primeros días tras la gonadectomía, hay un incremento llamativo de los niveles séricos de LH sin que se produzcan variaciones del contenido hipofisario de esta hormona ni de los niveles hipotalámicos de GnRH. Posteriormente Clayton y Catt (1981) y Abbot y col. (1985) han demostrado que el contenido hipofisario de LH disminuye durante este periodo (4 ó 5 primeros días tras la castración). Durante la segunda fase, hasta el final del primer mes, se triplican los niveles séricos de LH detectados durante la primera semana, que alcanzan niveles máximos a los 14 días. Los niveles hipofisarios de LH aumentan durante esta segunda fase, siendo a los dos meses de la castración, cuatro veces superiores a los de los animales controles (Abbot y col. 1985), apreciándose durante esta etapa una disminución de las tasas hipotalámicas de GnRH (Badger y col. 1978).

Un índice claro del aumento de la síntesis de gonadotropinas tras la castración es el incremento de los niveles del ácido ribonucleico mensajero que codifica por la LH y FSH (LH-ARNm y FSH-ARNm) según han descrito distintos autores (Abbot y col., 1985; Gharib y col., 1986; Papavalisiou y col., 1986; y Shupnick y col., 1988). Este aumento es máximo tres semanas después de la castración (Corbiani y col., 1984). Los niveles de α - y β -ARNm no se modifican paralelamente. Papavalisiou y col. (1986) y Gharib y col. (1986) observaron un mayor aumento de los niveles de LH ARNm- β en ratas castradas, incremento que corría paralelo al de los niveles séricos de LH en estos animales; lo cual indujo a que se considerara que el incremento de la síntesis de la subunidad β era el principal determinante del aumento de los niveles de LH tras la castración.

Se pensó en la posibilidad de que el incremento de los niveles de LH-ARNm tras la castración fuera debido a un aumento del número de células gonadotropas, pero este factor no era suficiente para justificar el gran incremento de los niveles de LH-ARNm en los animales castrados (Gharib y col. 1986). A la hora de justificar el incremento de los niveles de ARNm tras la castración se podían tener en cuenta dos posibilidades; éste podía ser debido a un aumento de la transcripción o bien ser consecuencia de una mayor estabilidad del ARNm. Shupnik y col. (1988) han demostrado recientemente que la castración induce un aumento de la transcripción tanto del ARNm de la subunidad común α , como el ARNm de las cadenas β de la LH y FSH. En estrecha relación con los datos referidos previamente, el experimento de Shupnick y col. (1988) revela que el incremento más notorio se produce en la transcripción del ARNm que codifica por la subunidad β .

Tras la castración el ritmo de secreción de FSH sigue un curso diferente; aumenta progresivamente tras las primeras 24 horas, estabilizándose a partir del día 30 y durante este periodo no se describen modificaciones simultáneas en el contenido hipofisario de FSH (Badger y col., 1978).

La evolución de la respuesta postcastración es también diferente en función del sexo (Clayton y Catt, 1981). En los machos, la reacción es rápida y presenta un aumento de los niveles séricos de LH dentro de las primeras 8-12 horas, aumento que se hace máximo hacia el final del primer día. Por el contrario, el aumento de las tasas de LH en las hembras es más lento, apareciendo 36-96 horas después de la ovariectomía y, en función del día del ciclo en que ésta se practique, sigue un curso diferente (Tapper y col., 1972). La evolución de los niveles hipofisarios de LH-ARNm también difiere en machos y hembras, correspondiéndose estrechamente con el contenido hipofisario de LH (Gharib y col., 1986 y Papavasiliou y col. 1986).

El paralelismo entre la concentración de receptores GnRH en la hipófisis y los niveles séricos de LH (rápido aumento en los machos, que al igual que el de los niveles séricos revierte con la administración de propionato de testosterona, y más lento en la hembra, que puede prevenirse con la administración de 17 β estradiol más progesterona; llevó a Clayton y Catt (1981) a sugerir que el incremento de los receptores hipofisarios para la GnRH es un factor importante en el desarrollo de la respuesta a la castración. Conn y col. (1987) han documentado ampliamente que el incremento del número de receptores para la LHRH es un buen índice de la actividad secretora de las hormonas gonadotropas, aumentando el número de aquéllos cuando ésta aumenta.

II. Repercusiones de la castración sobre la morfología de las células gonadotropas hipofisarias

El primer estudio sobre las repercusiones que la castración sobre la morfología hipofisaria se debe a Addison (1917), que dejó definidas las alteraciones morfológicas básicas consecuentes a la castración. Éstas pueden resumirse en: aumento del tamaño y número de las células basófilas hipofisarias y desarrollo progresivo en el tiempo de modificaciones en el *aspecto* de estas células, siendo lo más característico la presencia de vacuolas citoplásmicas. Esta descripción de Addison sigue vigente, pero es necesario señalar que el grupo de células basófilas hipofisarias incluye también a las células tireotropas, en las que no se observan alteraciones morfológicas tras la castración (Halimi, 1952, Farquhar y Rinehart, 1954b). Los estudios con el microscopio electrónico permitieron conocer las modificaciones ultraestructurales, confirmándose como característica primordial la vesiculación celular (Farquhar y Rinehart, 1954a). En general, las descripciones de Addison (1917) y Farquhar y Rinehart (1954a) reflejan las características morfológicas de las células gonadotropas hipofisarias tras la castración, encontrándose otras descripciones similares en los trabajos de Pomerat (1941), Barnes (1962), Kurosumi e Inoue (1980), Inoue y Kurosumi (1981) y Shiino (1982) entre otros.

La clasificación de las células gonadotropas ha estado sujeta a múltiples cambios y, por otra parte, no existe un criterio universal para la definición de los distintos tipos morfológicos, tintoriales o ultraestructurales. Esto ha dificultado en gran medida la comparación directa de las referencias de distintos autores, particularmente cuando se describen modificaciones de los tipos celulares básicos como respuesta a diferentes condiciones experimentales.

Kihara (1984) estudió las características morfológicas de las células gonadotropas en el animal castrado durante un periodo de 18 meses. En su trabajo se valora la respuesta a la castración durante uno de los periodos más largos que se pueden encontrar en la literatura científica. Este autor, por otra parte, basa el criterio clasificador en el aspecto citoplásmico, lo que simplifica la clasificación y facilita su reproducibilidad. En su trabajo Kihara (1984) describe cinco tipos celulares tras la castración. Los tipos III, III-IV y IV, están presentes en los animales normales, siendo el más numeroso el tipo intermedio III-IV, que constituye más del 60% de las células gonadotropas del macho. El tipo III podría corresponder a la clásica célula «FSH» de Kurosumi y Oota (1968), mientras que el tipo IV correspondería a la «célula LH» (ver relación entre las distintas clasificaciones en Rubio y col. 1988). A estos tres tipos (los dos clásicos y sus formas intermedias) se añaden otros dos, característicos del animal gonadectomizado, las *células de castración* y las *células inmaduras*. Las células de castración o en anillo de sello son el tipo celular patognomónico del animal castrado y como tal son descritas desde los primeros estudios tanto de microscopía óptica como de microscopía electrónica (Addison, 1917; Pomerat, 1941; Fernández-Morán y Luft, 1949 y Farquhar y Rinehart 1954a). Las células de castración se forman por la vesiculación progresiva de la célula, llegando a constituir una gran vacuola, rodeada en ocasiones tan sólo por una fina franja de material citoplásmico. El quinto tipo celular, las células inmaduras, se caracteriza por su pequeño tamaño, escaso contenido

granular y un desarrollo muy discreto de los perfiles de RER. Estas células inmaduras pueden corresponder a las gonadotropas tipo C, de Tixier-Vidal y col. (1975), también descritas por Inoue y Kurosumi (1981) como características del animal castrado y por Tougard y col. (1977) en el periodo fetal.

La proporción de los distintos subtipos celulares depende del tiempo transcurrido tras la castración. Garner y Blake (1981) y Kihara (1984) coinciden al señalar que en el animal gonadectomizado, atendiendo a las características citoplásmicas, el número de células homogéneas (tipo III, -III-IV), vesiculadas (IV) y de castración es muy similar. A partir del sexto mes, la proporción de células de castración disminuye, aumentando de forma paralela la proporción de células inmaduras, que llegan a representar el 52% de las células gonadotropas hipofisarias a los 18 meses de la castración (Kihara, 1984). Hoy se admite que las células de castración son consecuencia de la evolución de los modelos clásicos de célula, gonadotropas, aunque tras los primeros estudios de microscopía electrónica se pensó que de entre los dos tipos clásicos de células gonadotropas habría uno que daría origen fundamentalmente a las células de castración. Para Barnes (1962) estas células derivarían de las células β (tipo I de Moriarty, 1975), mientras que para Childs y col. (1982), su fuente esencial serían las células tipo II. Hoy se admite que los distintos subtipos ultraestructurales representan diferentes estados funcionales de las células gonadotropas, y que las células de castración son una forma añadida a los anteriores.

Si el origen de las células de castración parece estar bien definido, por el contrario, el papel funcional y la génesis de las células inmaduras no está plenamente esclarecido.

Uno de los datos que tradicionalmente se ha interpretado como índice de la actividad secretora ha sido la hipertrofia de los sistemas de membranas. En el caso particular de las células gonadotropas, existe una clara correlación entre el incremento de síntesis y liberación hormonal tras la castración (aumento de los niveles séricos e hipofisarios de LH) o tras la administración de LHRH (Rennels y col., 1971) y el grado de vesiculación citoplásmica y las modificaciones del contenido granular. Sin embargo, al desaparecer el efecto feedback negativo de las secreciones gonadales parece que no sólo se produce un incremento de la actividad de las organelas implicadas en el proceso secretor, sino que también pudiera existir una modificación de la función que las distintas organelas asumen en el proceso de secreción del animal normal.

Estudios con técnicas de autorradiografía e inmunocitoquímica sugieren la existencia de modificaciones en el almacenamiento y tránsito intracelular de las hormonas gonadotropas en el animal castrado. Pelletier (1974) estudió el proceso de síntesis y transporte de glicoproteínas en ratas normales y castradas, utilizando como trazador fucosa marcada con timidina tritiada. En su experimento encontró que la distribución de la fucosa marcada variaba en su localización sobre las organelas citoplásmicas entre los animales castrados y los controles. Mientras que en los animales normales no aparecía marcaje sobre el retículo endoplásmico (se localizaba principalmente en el aparato de Golgi y más tarde en los granos de secreción), en los animales castrados tras un periodo de 10 minutos las partículas marcadas se localizaban en proporción similar en el aparato de Golgi y en las cisternas del RER. Después de una hora, la mayoría de la fucosa incorporada (40%) se localizaba sobre las cisternas del RER. Estos datos indican que ante condiciones de intensa estimulación de las células secretoras, las glicoproteínas de nueva formación son retenidas en las cisternas del retículo endoplásmico o tienen un paso lento hacia otras organelas (Pelletier, 1974).

Estudios inmunocitoquímicos corroboran la posible modificación funcional del RER en el animal gonadectomizado. Tougard y col. (1973) describieron que sólo en algunas células intensamente vesiculadas de animales castrados se puede encontrar en el RER material reactivo al suero anti-LH Moriarty y Tobin (1976) describieron un fenómeno similar en las «células de tiroidectomía». Posteriormente, Tougard y col. (1980) con técnicas inmunocitoquímicas-postinclusión, demostraron la localización de producto de reacción frente al suero anti- α -LH β en el interior de vesículas de RER de ratas macho normales, no obstante, Childs y col. (1982) confirman que la intensidad de tinción frente a los sueros anti-LH β y anti-FSH β , es considerablemente mayor en el RER de las células de castración que en el RER de las células gonadotropas de los animales normales.

Si se admite una modificación en el curso normal del procesado intracelular de las hormonas gonadotropas en la hipófisis del animal castrado, es realmente tentador el intentar relacionar este hecho con las modificaciones cualitativas de las hormonas LH y FSH tras la gonadectomía. La castración lleva consigo una disminución del punto isoeléctrico (pI) tanto de la LH (Hattori y col. 1985) como de la FSH (Chappel y col. 1984). Este efecto revierte tras la administración de estrógenos, que inducen un aumento del punto isoeléctrico y de la actividad biológica de la hormona (Mukhopadhyay y col. 1979, Chappel y col. 1984).

Las modificaciones en el pI y potencia biológica de las hormonas glicoproteicas son consecuencia de modificaciones en la glicosilación, fundamentalmente en la incorporación de ácido siálico. El pI de la hormona disminuye a medida que se incorpora ácido siálico a la molécula (Miller y col., 1983; Chappel y col., 1984 y Hattori y col., 1985). Por el momento no se ha establecido si existe alguna relación entre los cambios que tienen lugar en la glicosilación de las hormonas gonadotropas y las modificaciones ultraestructurales postcastración.

Según Wakabayashi y col. (1986) en la ruta biosintética de la LH del animal normal, los primeros componentes que aparecen son aquellos de mayor pI, más alcalinos y más pobres en ácido siálico. Resulta pues sorprendente que en el animal castrado, en el que aumenta de forma considerable el turnover de esta hormona, exista un predominio de las formas más procesadas de la misma. Cabría pensar que las alteraciones cualitativas de la LH tras la castración podrían deberse a una modificación en el curso normal del procesado de la misma; sin embargo, no existe aún evidencia experimental que soporte esta hipótesis.

La castración no afecta de forma exclusiva a las hormonas gonadotropas. Ya en el primer trabajo de Addison (1917) se hacía referencia a la disminución a lo largo del tiempo de la intensidad de tinción y número de células acidófilas. Estas primeras observaciones han sido ratificadas al demostrarse la disminución de las tasas séricas e hipofisarias de PRL (Pérez y col., 1986) y las modificaciones en el número de las células productoras de Prl y GH (Ibrahim y col., 1986).

A la luz de los datos aquí recopilados es evidente que en el curso de los últimos años ha habido un gran avance en el conocimiento de las alteraciones hipofisarias que siguen a la castración pero que aún es necesario un esfuerzo multidisciplinar para llegar a concretar sus mecanismos íntimos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBOT, S.D.; DOCHERTY, D.; ROBERTS, J.L.; TEPPER, M.A. y CHIN, W.W. (1985): Castration increases luteinizing hormone subunit messenger RNA levels in male rat pituitaries. *J. Endocrinol.* **107**: R1.
- ADDISON, W.H.F. (1917): The cell changes in the hypophysis of the albino rat after castration. *J. Comp. Neurol.* **28**: 441-463.
- BADGER, T.M.; WILCON, C.E.; MEYER, E.R.; BELL, R.D. y CICERO, T.J. (1978): Simultaneous changes in tissue and serum levels of luteinizing hormone/follicle stimulating hormone releasing factor after castration in the male rat. *Endocrinology* **102**: 136-111.
- BARNES, B.G. (1962): Electron microscope studies on the secretory cytology of the mouse anterior pituitary. *Endocrinology* **71**: 618-628.
- CARBAJO PÉREZ, E. (1988): Some neural aspects of the control of the gonadotropin secretion. *J.P.B.T.* **28**:16-19.
- CLAYTON, R.N. y CATT, K.J. (1981): Regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology* **108**: 887-895.
- CONN, P.M.; McARDLE, C.A.; ANDREWS, W.V. y HUCKLE, W.R. (1987): The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action in the pituitary gonadotrope. *Biol. Reprod.* **36**: 17-35.
- CORBANI, M.; COUINS, R.; STARTZEC, A. y JUTSIZ, M. (1984): Effect of gonadectomy on pituitary levels of mRNA encoding gonadotropin subunits and secretion of luteinizing hormone. *Mol. Cell. Endocr.* **35**: 83-87.
- CULLER, M.D. y NEGRO-VILAR, A. (1987): Pulsatile follicle-stimulating hormone is independent of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. *Endocrinology* **120**: 2.011-2.021.
- CHAPPEL, S.C.; BETHEA, C.L. y SPIES, H.G. (1984): Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology* **115**: 452-461.
- CHARLESWORTH, M.C.; GRADY, R.R.; SHIN, L.; VALE, W.W.; RIVIER, C.; RIVIER, J. y SCHWARTZ, N.B. (1984): Differential suppression of FSH and LH secretion by follicular fluid in the presence or absence of GnRH. *Neuroendocr.* **38**: 199-205.
- CHILDS, G.V.; ELLISON, D.G.; LORENZEN, J.R.; COLLINS, T.J. y SCHWARTZ, N.B. (1982): Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. *Endocrinology* **111**: 1.318-1.328.
- DE PAOLO, L.V. (1985): Differential regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats disclosed by treatment with a LH-releasing hormone antagonist and phenobarbital. *Endocrinology* **117**: 1.826-1.833.
- FARQUHAR, M.G. y RINEHART, J.R. (1954a): Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology* **64**: 516-541.
- FARQUHAR, M.G. y RINEHART, J.F. (1954b). Cytologic alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: an electron microscope study. *Endocrinology* **55**: 857-876.

- FERNÁNDEZ MORÁN, H. y LUFT, R. (1949): Submicroscopic cytoplasmic granules in the anterior lobe cells of the rat hypophysis as revealed by electron microscopy. *Acta Endocrinol* **2**: 199-211.
- GHARIB, S.D.; BOWERS, S.M.; NEED, L.R. Y CHIN, W.W. (1986): Regulation of rat luteinizing hormone subunit messenger ribonucleic acids by gonadal steroid hormones. *J. Clin. Invest.* **77**: 528-589.
- GARNER, L.L. y BLAKE, C.A. (1981): Ultrastructural immunocytochemical study of the LH secreting cell of the anterior pituitary gland: changes occurring after ovariectomy. *Biol. Reprod.* **24**: 461-474.
- HALMI, N.S. (1952): Differentiation of two types of basophils in the adenohypophysis of the rat and the mouse. *Stain. Technol.* **27**: 61-64.
- HATTORI, M.A.; OZAWA, K. y WAKABAYASHI, K. (1985): Sialic acid moiety is responsible for the charge heterogeneity and the biological potency of rat lutropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**: 501-508.
- HASEGAWA, Y.; MIYAMOTO, K.; YAZAKI, C. e IGARASHI, M. (1981): Regulation of the second surge of follicle-stimulating hormone effects of antiluteinizing hormone-releasing hormone serum and pentobarbital. *Endocrinology* **109**: 130-135.
- IBRAHIM, S.N.; MOUSA, S.M. y CHILDS, G.V. (1986): Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology* **119**: 629-637.
- INOUE, K. y KUROSUMI, K. (1981): Mode of proliferation of gonadotropic cells of the anterior pituitary after castration. Immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch. Histol. Japn.* **44**: 71-85.
- KIHARA, H. (1984): Compensatory development of immature LH cells after long-term gonadectomy: an immunocytochemical, electron microscopic and cell count study. *Endocrinol. Japon.* **31**: 395-406.
- KUROSUMI, K. e INOUE, K. (1980): Surface pits of typical gonadotrophs and castration. Cells of the rat anterior pituitary suggestive of exocytosis and micropinocytosis. *Arch. Histol. Japn.* **43**: 373-382.
- KUROSUMI, K. y OOTA, Y. (1968): Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary gland of persistent estrous and diestrous rats. *Z. Zellforsch.* **85**: 34-46.
- MILLER, C.; ULLOA-AGUIRRE, A.; HYLAND, L. y CHAPPEL, S. (1983): Pituitary follicle stimulating hormone heterogeneity. Assesment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil. Steril.* **40**: 242-247.
- MORIARTY, G.C. (1975): Electron microscopic-immunocytochemical studies of rat pituitary gonadotropes. A sex difference in morphology and cytochemistry of LH cells. *Endocrinology* **97**: 1.215-1.225.
- MORIARTY, G.C. y TOBIN, R.B. (1976). An immunocytochemical study of TSH β storage in rat thyroidectomy cells with and without D or L thyroxine treatment. *J. Histochem. Cytochem.* **24**: 1.140-1.149.
- MUKOPADHYAY, A.K.; LEIDENBERGER, F.A. y LICHTENBERG, V. (1979): A comparison of bioactivity and immunoactivity of luteinizing hormone stored in and released in vitro from pituitary glands of rats under various gonadal states. *Endocrinology* **104**: 925-931.
- PAPAVASILIOU, S.S.; ZMEILI, S.; HERBON, L.; DUNCAN-WELDON, J.; MARSHALL, J.C. y LANDEFELD, T.D. (1986): an and luteinizing hormone β messenger ribonucleic acid (RNA) of male and female rats after castration: quantiation using an optimized RNA dot blot hybridization assay. *Endocrinology* **119**: 691-698.
- PELLETIER, G. (1974): Autoradiographic studies of synthesis and intracellular migration of glycoproteins in the rat anterior pituitary gland. *J. Cell. Biol.* **62**: 185-187.
- PÉREZ, R.L.; MACHIAVELI, G.A.; ROMANO, M.I. Y BURDMAN, J.A. (1986): Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin secreting cells in the anterior pituitary gland of adult rats. *J. Endocrinol.* **108**: 399-403.
- POMERAT, G.R. (1941): Mitotic activity in the pituitary of the white rat following castration. *Am. J. Anat.* **69**: 89-121.
- RENNELS, E.G.; BOGDANOVE, E.M.; ARIMURA, A.; SAITO, M. y SCHALLY, A.V. (1971): Ultrastructural observations of rat pituitary gonadotrophs following injection of purified porcine LH-RH. *Endocrinology* **88**: 1.318-1.326.
- RUBIO, M.; CARBAJO, E.; ALBERCA, V.; CARBAJO, S. y CARVAJAL, J.C. (1988): Bases morfológicas del sustrato gonadotropo hipofisario. Institución Gran Duque de Alba, Eds., Salamanca.
- RUBIO, M.; CARBAJO, E., VÁZQUEZ, R.; CARBAJO, S. y CARVAJAL, J. (1989): Regulación neuroendocrina de las gonadotropinas hipofisarias. Institución Gran Duque de Alba, Eds., Salamanca.
- SHIINO, M. (1982): Ultrastructural evidence of gonadotrophin release from castration cells following injection of LHRH in the rat. *Cells. Tiss. Res.* **222**: 213-222.
- SHUPNIK, M.A.; GHARIB, S.D. y CHIN, W.W. (1988): Estrogen supresses rat gonadotropin gene transcription in vivo. *Endocrinology* **122**: 1.842-1.846.
- TAPPER, C.M.; NAFTOLIN, F. y BROWN-GRANT, K. (1972): Influence of the reproductive state at the time of operation on the early response to the ovariectomy in the rat. *J. Endocrinol* **53**: 47-57.
- TIXIER-VIDAL, A.; TOUGARD, C.; KERDELHUE, B. y JUTSIZ, M. (1975): Light and electron microscopic studies on immunocytochemical localization of gonadotrophic hormones in the rat pituitary gland with antisera against ovine FSH, LH, LH α and LH β . *Ann. NY Acad. Sci.* **254**: 433-460.
- TOUGARD, C.; KERDELHUE, B.; TIXIER-VIDAL, A. y JUTSIZ, M. (1973): Light and electron microscope localization of binding sites of antibodies against ovine luteinizing hormone and its two subunits in rat adenohypophysis using peroxidase-labelled antibody technique. *J. Cell. Biol.* **58**: 503-
- TOUGARD, C.; PRICART, R. y TIXIER-VIDAL, A. (1977): Cytogenesis of immunoreactive gonadotropic cells in the fetal rat pituitary at light and electron microscope levels. *Dev. Biol.* **58**: 148-163.

- TOUGARD, C.; PRICART, R. y TIXIER-VIDAL, A. (1980): Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary. A light and electron microscope study using antisera against rat β subunits: a comparison between preembedding and postembedding methods. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 101-114.
- WAKABAYASHI, K.; HATTORI, M.; OZAWA, K. y SAKAMOTO, K. (1986): Biosynthesis and release of luteinizing hormone in relation to hormonal polymorfism. En: *Par distalis of the pituitary gland – Structure and regulation* (Yoshimura, Y. y Gorbman, A. editores). Elsevier Science Publishers B.V. pp. 363-369.
- WANG, Q.F.; FRANWORTH, P.G.; FINDLAY, J.K. y BURGER, H.G. (1989): Inhibitory effect of pure 31-kilodalton bovine inhibin on gonadotropin-releasing hormone. GnRH-induced up-regulation of GnRH binding sites in cultures rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **124**: 363-368.

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

ESTUDIO MORFOFUNCIONAL DE LA ACCIÓN DE DOSIS ALTAS Y REPETIDAS DE UN ANÁLOGO DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS SOBRE LA HIPÓFISIS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

MORPHOFUNCTIONAL STUDY OF THE ACTION OF HIGH AND REPEATED DOSIS OF AN LHRH ANALOGUE ON THE ANTERIOR PITUITARY OF OVARIECTOMIZED RATS

E. CARBAJO PÉREZ*, S. CARBAJO*, J.C. CARVAJAL y R. VÁZQUEZ****

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Universidad de Salamanca

*Facultad de Medicina de Salamanca

**Colegio Universitario de Medicina de Ávila

RESUMEN

Ratas adultas ovariectomizadas fueron tratadas con dosis altas del análogo de la LHRH Criptocur a días alternos durante 15 días. Tras el tratamiento los animales fueron sacrificados y se estudiaron los niveles séricos de LH así como las características tintoriales y morfométricas de las células reactivas al suero anti LH. En el estudio se han incluido animales controles intactos y castrados. Tras el tratamiento se redujeron los elevados niveles séricos de LH inducidos por la castración. En relación con los animales castrados controles el tratamiento indujo un aumento de la intensidad de tinción de las células LH y un aumento del área nuclear y proporción de células vacuoladas. Estos resultados parecen indicar que la pauta de tratamiento utilizada induce un aumento de la reserva secretora de LH en animales castrados, en contraste con el aumento de la sensibilidad para la secreción descrita previamente en nuestro laboratorio en animales intactos.

PALABRAS CLAVE: Castración. LHRH. Adenohipófisis. Células gonadotropas. Rata hembra.

SUMMARY

Mature female rats were ovariectomized and a month later treated with the LHRH analogue Criptocur (high dosis on alternate days for 15 days). LH serum levels as well as morphological and morphometrical features of cells reactive to anti-LH serum were studied. Normal and castrated females were used as controls. Treatment dumped the high levels of serum LH induced by castration and increased intensity of immunostaining, nuclear area and proportion of vacuolated LH cells as compared to untreated castrated animals. These results point out that treatment of castrated animals induced an increase of the secretory reserve as compared to the increase of the secretory sensibility induced by a similar treatment on intact animals as reported earlier in our laboratory.

KEY WORDS: Castration. LHRH. Anterior pituitary. Gonadotrophs. Female rats.

Introducción

La acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) sobre la secreción gonadotropa puede ser activadora o inhibidora dependiendo de la pauta de administración y la dosis (Redding y col. 1972; Schuiling y Gnode 1976; Crowley y col. 1981). La acción que la LHRH ejerce sobre la secreción de gonadotropinas no depende de forma exclusiva de la intensidad y ritmo del estímulo hipotalámico, o de la LHRH exógena administrada, sino que los esteroides gonadales desempeñan un papel muy importante en la modulación de las acciones del decapeptido hipotalámico (Giguere y col. 1981; Leblanc y col. 1983).

Los efectos de dosis agudas de LHRH sobre la liberación de LH han sido descritos tanto en animales intactos como en animales gonadectomizados, por diversos autores (Luborsky-Moore y col. 1975; Shiino, 1982; Watanabe, 1986). Del mismo modo, es bien conocido que la administración continua de esta hormona produce un bloqueo de la secreción gonadotropa (Koiter y col. 1982). En trabajos previos de nuestro laboratorio (Carbajo y col. 1987, 1988) se ha podido demostrar que la administración a días alternos de dosis altas de LHRH tienen un efecto estimulador de la secreción gonadotropa.

En este trabajo, pretendemos comprobar si en ausencia del eslabón de retrocontrol de las secreciones gonadales la acción de dosis altas y repetidas de LHRH puede ser comparada con la observada previamente en animales intactos o, en qué medida la castración modifica la respuesta hipofisaria a la administración exógena del decapeptido hipotalámico.

Material y Métodos

Se han utilizado 18 ratas hembras Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 300 g. Previo al experimento los animales estuvieron enjaulados bajo las condiciones estándar de nuestro animalario: ritmo de luz diurna y oscuridad nocturna, dieta equilibrada y agua de bebida *ad libitum*.

Al inicio del experimento se comprobó la fase del ciclo estrual mediante frotis vaginal, seleccionando únicamente animales en fase de proestro.

A los treinta días de la castración se inició el tratamiento de los animales con inyecciones repetidas del análogo de la LHRH Criptocur (seis animales). Éstos recibieron un total de ocho dosis de Criptocur (40 µg de Criptocur, diluidos en 400 µl de suero fisiológico) administradas a días alternos a primera hora de la mañana. Los animales controles (seis castrados y seis intactos) recibieron inyecciones de suero fisiológico con la misma pauta. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 17 y 18 horas del día en que recibieron la última dosis.

Procesado de las muestras

En el momento del sacrificio se recogió sangre de los vasos del tronco para la determinación mediante RIA de los niveles séricos de r-LH, usando sueros y patrones NIH (Bethesda, Maryland). El límite de detección del análisis fue de 0,12 ng/ml.

Inmediatamente al sacrificio se extrajo el bloque hipotálamo-hipófisis, que fue fijado por inmersión en solución de Bouin-Hollander durante 4 días. Al término de este periodo las muestras fueron procesadas para su inclusión en parafina y una vez obtenidos los bloques se hicieron cortes seriados, de un grosor de 5 µm, siguiendo un plano sagital.

Las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas y blanqueadas en una solución de metabisulfito sódico. Previo lavado en agua destilada se sometieron a un baño de agua oxigenada (10 vol.) al 5% en metanol a temperatura ambiente para inhibir la peroxidasa endógena. Las muestras fueron incubadas de forma secuencial con los siguientes anticuerpos: suero de conejo anti-LH (1:1200, 60 minutos, temperatura ambiente; DAKO) suero de cerdo anti inmunoglobulina de conejo (1:100, 60 minutos, temperatura ambiente; DAKO) y complejo soluble PAP

(1:100, 60 minutos, temperatura ambiente; DAKO). Como tampón de lavado se utilizó tampón fosfato salino, pH 7.4, 0.1 M. La reacción se reveló con el medio de Graham-Karnovsky (5-7 minutos). Tras una suave tinción de contraste con hematoxilina de Mayer las muestras fueron deshidratadas y montadas con DPX.

Para el estudio morfométrico se midieron las áreas celular y nuclear de al menos 50 células reactivas por grupo, utilizando para ello un planímetro digital Apple conectado a un microscopio Leitz Dialux 20 EB, mediante un sistema de vídeo. Los soportes lógicos del sistema han sido desarrollados en nuestro laboratorio. El estudio estadístico se realizó aplicando el test *t* de Student.

Resultados

En los animales castrados se ha encontrado una concentración sérica media de 9.6 ± 3.1 ng/ml de LH, superior a la de los animales controles en los que los niveles de LH en suero estuvieron por debajo del nivel de detección del análisis. En los animales tratados con Criptocur la concentración sérica media de LH fue de 5.8 ± 0.4 ng/ml, menor que en los castrados no tratados pero mayor que en los animales intactos.

Las células LH del grupo de los animales normales (figuras 1a-b) se caracterizan por su gran polimorfismo, predominando las células de forma redondeada u oval. El depósito del material de reacción es bastante uniforme en la masa citoplásmica de las células reactivas. La tinción es generalmente intensa (una cabeza de flecha) aunque pueden encontrarse células con una tinción más débil (dos cabezas de flecha). No es infrecuente encontrar imágenes negativas del aparato de Golgi (figura 1b).

En las células LH de los animales castrados control (figuras 2a-b) el depósito del material de reacción es, habitualmente, menos intenso que en los animales normales, presentando con frecuencia un aspecto granular. Es frecuente observar células en las que el depósito de material de reacción es muy escaso (tres cabezas de flecha). La presencia de células vacuoladas, que no se observan en los animales normales, es característica de este grupo. Estas vacuolizaciones pueden, en ocasiones, ocupar gran parte del citoplasma, desplazando hacia la periferia el núcleo y pequeños acúmulos de material teñido.

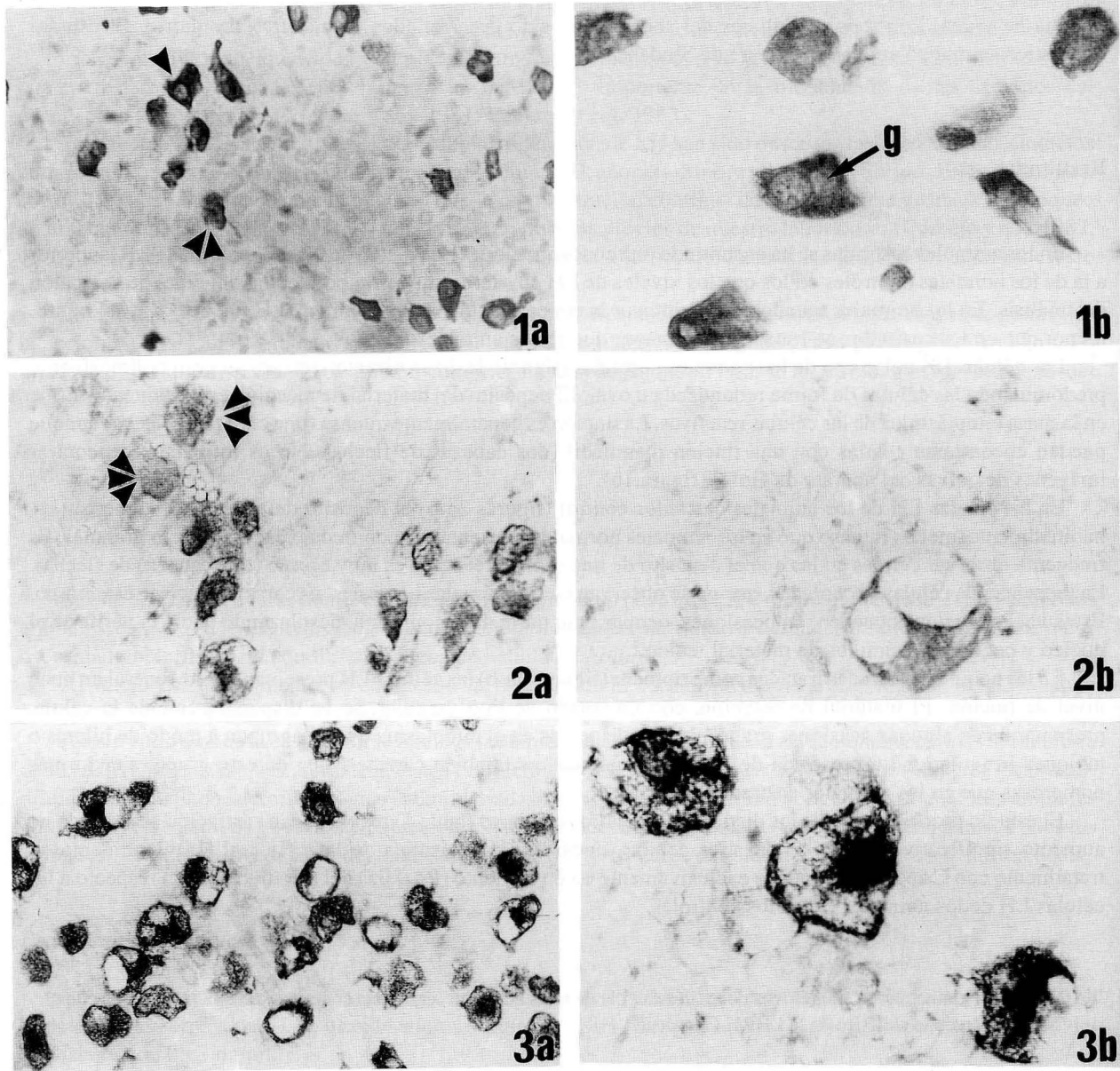
En las hembras castradas tratadas con Criptocur (figuras 3a-b) las células LH presentan por lo general un buen nivel de tinción. El material de reacción, con un patrón de tipo granular, se ve disperso por toda la célula, presentando en algunas ocasiones granos densos dispersos en el citoplasma que se agrupan a modo de hileras o tabiques irregulares. La presencia de células vacuoladas es también característica de este grupo, siendo más numerosas que en los animales castrados controles.

El estudio morfométrico de los distintos parámetros celulares (tabla 1) revela que la castración se sigue de un aumento significativo ($P < 0.01$) del área celular, nuclear y citoplásmica de las células LH, mientras que el tratamiento con Criptocur se traduce exclusivamente en un aumento ($P < 0.05$) del área nuclear con respecto a las células LH de los animales castrados controles.

TABLA 1. Parámetros morfométricos de las células LH de ratas normales, castradas controles y castradas tratadas con el análogo sintético de la LHRH Criptocur.

	CASTRADAS		
	NORMALES	CONTROLES	TRATADAS
AC	129.5 \pm 42.	198.9 \pm 84	208.2 \pm 60
ACT	105.7 \pm 39.	168.1 \pm 77	170.9 \pm 57
AN	23.7 \pm 7	30.8 \pm 10	37.3 \pm 10

AC = área celular; ACT = área citoplásmica; AN = área nuclear



FIGURAS 1 a 3. Células reactivas al suero anti-LH correspondientes a hembras normales (figs. 1a-b), hembras castradas (figs. 2a-b) y hembras castradas tratadas con Criptocur (figs. 3a-b). Nótese la diferente intensidad de inmunotinción en los distintos grupos. En los animales normales, predominan las formas intensamente teñidas, con una distribución homogénea del material de reacción. En los castrados, la intensidad de tinción es menor y la distribución del material teñido es irregular. En los animales castrados tratados con Criptocur, se observa una tinción intensa junto con un patrón granular del material inmunoteñido (figs. 1a, 2a, 3a 900 x; figs. 1b, 2b, 3b 2.200 x).

Discusión

El aumento de los niveles séricos de LH tras la castración (Gay y Sheth, 1972; Childs y col. 1982), así como la hipertrofia e hiperplasia de las células gonadotropas (Inoue y Kurosumi 1980, Kihara 1984; Ibrahim y col. 1986) son hechos ampliamente documentados. Tanto el aumento de los niveles séricos de LH como las características morfológicas y morfométricas de las células LH que encontramos en nuestro trabajo están en estrecha relación con lo descrito por los autores antes citados. Todas estas alteraciones del sustrato hipofisario que siguen a la castración están en gran medida bajo el control de la LHRH (Ellis y col., 1983; Grady y col. 1982) de tal modo que pueden ser bloqueadas y/o revertir mediante la administración de suero anti-LHRH (Sakai y col. 1988).

La acción de la LHRH sobre la secreción gonadotropa puede ser activadora o inhibidora dependiendo de la pauta de tratamiento. La administración aguda de dosis altas o la administración pulsátil durante un periodo limitado (Luborski Moore y col., 1975; Belchetz y col., 1978) tienen una acción activadora. Por el contrario, la administración continuada de LHRH o de análogos superagonistas de la misma (Schuiling y Gnode, 1976; Crowley y col., 1981) inducen un bloque de la secreción de LH. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Carbajo y col., 1987, 1988) se ha demostrado que la administración de dosis altas de LHRH en días alternos no induce un bloqueo sino un aumento de la liberación de LH en la rata hembra.

La acción de la LHRH está íntimamente ligada al estado previo de los esteroides sexuales (Leblanc y col., 1983), que intervienen en la modulación del número de receptores hipofisarios a la LHRH (Giguere y col., 1981) modulación que en parte depende de la propia acción de la LHRH (Pieper y col., 1982). Shiino (1982) ha observado que la administración aguda de LHRH en animales recientemente gonadectomizados, aumenta de forma considerable tanto la síntesis como la liberación de LH, resultados que concuerdan con los de Kurosumi e Inoue (1980) que estudian la respuesta hipofisaria a la administración de LHRH en animales castrados dos u ocho días antes del experimento. Sin embargo, cuando el tiempo transcurrido tras la castración aumenta, la sensibilidad de la respuesta hipofisaria a la LHRH disminuye (Shiino, 1982).

Al valorar la respuesta hipofisaria a la LHRH se puede adoptar el concepto introducido por Wang y col. (1976). Estos autores describen dos componentes en la respuesta secretora de las gonadotropas hipofisarias al estímulo con LHRH: *sensibilidad y reserva secretora*. De este modo, la disminución relativa de los niveles séricos de LH; el aumento de la inmunotinción, y el aumento del área nuclear y de la proporción de células vacuoladas, que se describen tras la administración de dosis altas y repetidas a días alternos de un análogo sintético de la LHRH, son compatibles con un claro aumento de la reserva secretora en estos animales. Los resultados obtenidos en hembras ovariectomizadas contrastan de forma clara con los efectos que una pauta de tratamiento similar induce en hembras intactas, en las que se describe un incremento notable de los niveles séricos de LH y FSH y una marcada disminución de la inmunotinción para ambas hormonas (Carbajo y col., 1987, 1988). Puede concluirse, por tanto, que la ausencia del eslabón de retrocontrol de las gónadas determina que el aumento de la sensibilidad para la secreción de LH, inducido por la administración a días alternos de dosis altas de LHRH en hembras intactas, revierta en un aumento de la reserva secretora en detrimento de la capacidad de liberación.

Agradecimiento

Al Dr. F. Sánchez Franco y a la Dra. L. Cacicedo del Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid por su colaboración en la determinación hormonal de LH (sueros y estándar HIH).

BIBLIOGRAFÍA

- BELCHETZ, P.E.; PLANT, T.M.; NAKAY, Y.; KEOGH, E.J. y KNOBIL, E. (1978): Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin releasing hormone. *Science* **202**: 630-632.
- CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; CARRETERO, J. y VÁZQUEZ, R. (1987): Análisis morfoplanimétrico de la acción de dosis altas y repetidas de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) sobre las células LH hipofisarias. *An. Anat.* **33**: 1-12.

- CARBAJO, E.; RUBIO, M.; CARBAJO, S.; SÁNCHEZ, F. y VÁZQUEZ, R. (1988): Morphological study of the rat pituitary follicle stimulating cells after alternate day treatment with luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). *Histol. Histopathol.* **3**:147-152.
- CROWLEY, W.F.; VALE, W.W.; RIVIERS, J. y McARTHUR, J.W. (1981): LHRH peptides as female and male contraceptives. PARFR Series on Fertility Regulation. Zatuchini, G.I.; Selton, J.D. y Sciarra, J.J. eds. Harper & Row. Philadelphia, pp. 321-333.
- CHILDS, G.V.; ELLISON, D.G.; LORENZEN, J.R.; COLLINS, T.J. y SCHWARTZ, N.B. (1982): Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. *Endocrinology* **111**: 1.318-1.328.
- ELLIS, G.B.; DESJARDINGS, C. y FRASER, H.M. (1983): Control of pulsatile LH release in rats. *Neuroendocrinology* **37**: 117-183.
- GAY, V.L. y SHETH, N. (1972): Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. *Endocrinology* **90**: 158-162.
- GIGUERE, F.; LEFEBURE, F.; y LABRIE, F. (1981): Androgen decreases LHRH binding sites in the rats pituitary cells in culture. *Endocrinology* **108**: 350-352.
- GRADY, R.R.; SHIN, L.; CHARLESWORTH, M.C. y SCWHARTZ, N.B. (1982): Characterization of the FSH-suppressing activity in follicular fluid. *Recent. Prog. Horm. Res.* **38**: 409-447.
- INOUE, K. y KUROSUMI, K. (1981): Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration. Immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch. Histol. Jpn.* **44**: 71-85.
- IBRAHIM, S.N.; MOUSSA, S.M. y CHILDS, G.V. (1986): Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology* **119**: 629-637.
- KIHARA, H. (1984): Compensatory development of Immature LH cells after longterm gonadectomy: An immunocytochemical, electron microscopic and cell count study. *Endocrinol. Jpn.* **31**: 395-406.
- KOITER, T.R.; POLS-VALKOHOF, N. y SCHUILING, G.A. (1982): Kinetics of LHRH-induced LH-release in vivo: influence of LHRH pretreatment. *Acta Endocr.* **99**: 195-199.
- KUROSUMI, K. e INOUE, K. (1980): Surface pits of typical gonadotrophs and castration. Cells of the rat anterior pituitary suggestive of exocytosis and micropinocytosis. *Arch. Histol. Jpn.* **43**: 373-382.
- LEBLANC, P.; PATTON, E.; L'HERITIER, A.; GOGAN, F.; SLAMA, A. y KORDON, C. (1983): Biphasic pattern of follicle stimulating and luteinizing hormone responses to gonadotropin releasing hormone in vitro. *Neuroendocrinology* **36**: 88-94.
- LUBORSKY-MOORE, J.L.; BOLIAKOFF, S.J. y WORTHINGTON, Jr. W.C. (1975): Ultrastructural observation of anterior pituitary gonadotrophs following hypophysial portal vessel infusion of luteinizing hormone-releasing hormone. *Am. J. Anat.* **144**: 549-556.
- PIEPER, D.R.; GALA, R.R.; REGIANI, S.R. y MARSHALL, J.C. (1982): Dependence of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor on GnRH secretion from the hypothalamus. *Endocrinology* **110**: 749-753.
- REDDING, T.W.; SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A. y MATSUO, H. (1972): Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in tissue cultures of rat pituitaries in response to natural and synthetic LH and FSH releasin hormone. *Endocrinology* **90**: 764-770.
- SCHUILING, G.A. y CNODE, H.P. (1976): Secretion of luteinizing hormone -releasing caused by continuous infusions of luteinizing-hormone in the long-term ovariectomized rat: effect of strogen pretreatment. *J. Endocrinol.* **71**: 1-11.
- SHIINO, M. (1982): Ultrastructural evidence of gonadotropin release from castration cells following injection of LHRH in the rat. *Cell Tissue Res.* **222**: 213-222.
- SAKAI, T.; INOUE, K.; HASEGAWA, Y. y KUROSUMI, K. (1988): Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on the mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* **122**: 2.803-2.808.
- WANG, C.F.; LASLEY, B.L. y YEN, S.S.C. (1976): The functional changes of the pituitary gonadotrophs during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **42**: 718-728.
- WATANABE, Y.G. (1986): Sex differences in pituitary LH storage and release in LHRH-stimulated pubertal rats. *Cell Tissue Res.* **243**: 509-515.

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

ALGUNAS MODIFICACIONES CÍCLICAS DEL ESTROMA EN LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA

SOME CYCLICAL CHANGES OF STROMA IN THE BREAST

E. GARCÍA-LÓPEZ, J.L. NIETO y A. TORRES

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. Zaragoza.

RESUMEN

Hemos realizado un estudio sobre los cambios histológicos observados en el estroma en una serie de 24 glándulas mamarias humanas, teniendo en cuenta los diversos momentos del ciclo ovárico así como las modificaciones aparecidas en la involución. Las técnicas realizadas han estado orientadas a la demostración los diversos tipos de tejido conjuntivo así como a la visualización general de la glándula.

PALABRAS CLAVE: Glándula mamaria humana. Tejido colágeno, elástico y reticular. Ciclo ovárico.

SUMMARY

We have studied Histological changes observed in the stroma in a serie of 24 breast, taking into account different stages of ovarian cyclal and changes appeared in the involution. The techniques have been oriented towards the connective tissue different types show and the general sight of the gland.

KEY WORDS: Breast. Collagen, elastic and reticular tissues. Ovarian cyclical.

Introducción

La voluminosa literatura referida al parénquima mamario, contrasta con la poca atención dedicada a su estroma, a pesar de constituir estos tejidos el componente más abundante de la lesión mamaria más común, el fibroadenoma de la glándula.

El tejido conjuntivo periductal difiere del ordinario de sostén, interlobular e intersegmental en muchos aspectos. Rodeando al conducto, se observa un manguito de estroma, especializado, más laxo, algo más celular y más vascular que el conjuntivo ordinario. Los linfáticos periductales corren por esta zona. El estroma, aún está más especializado en el lobulillo, con fibras de colágeno y abundante reticulina. Este estroma lobulillar, es más celular que el interlobulillar. Este estroma constituye el principal componente del lobulillo mamario, lo que le hace fácilmente distinguible del conjuntivo periductal. Hay que señalar que con el Azul de Alcian el lobulillo se delimita claramente del estroma interlobulillar, lo que sugiere el posible carácter mucoide del tejido lobular. (Ozzello, 1970)

En general, los conductos están revestidos por tejido elástico, en tanto que el lóbulo carece por completo de éste. Así sucede en la mama madura de la mujer joven. Esta cantidad de fibra elástica, aumenta en las mamas de las mujeres próximas a la menopausia. También hay evidencia del aumento del tejido elástico en los conductos de las mujeres que han parido, al menos en lo que concierne al conducto principal del pezón (Zanella, 1952).

El estroma designado como celular muestra una textura laxa con importantes espacios intersticiales. Las células presentan rasgos de fibroblastos pequeños. Los núcleos son alargados u ovales y normalmente no hiperromáticos. En estromas de este tipo, las fibras extracelulares no son reconocibles, pero los procesos o fibrillas celulares cortas se ven con facilidad, mostrando una orientación variable. Algunas células del plasma, como linfocitos y macrófagos mononucleares contribuyen a la celularidad de este estroma. El número medio de estas células es pequeño.

En contraste con el estroma de estos lóbulos, se observan otros donde el estroma está compuesto por gran cantidad de colágeno denso. Realmente, como señala Ihnen (1953) la cantidad de fibras colágenas es bastante variable y pueden encontrarse desde fibras dispersas en un medio más celular y laxo, hasta lóbulos en los que el estroma aparece completamente hialinizado. La estructura de estas fibras es variable, sin ninguna orientación predominante, aunque a menudo los túbulos aparecen rodeados por lazos de materia colágena. Hay que resaltar que en algunos lóbulos las bandas colágenas y el estroma celular estén entremezclados.

El estroma fibrilar presenta una estructura intermedia entre los dos tipos anteriores. En los lóbulos con este estroma lo más destacado son sus fibras y fibrillas. Éstas varían desde fibrillas finas y delgadas hasta otras más gruesas de tipo reticular. Una característica constante de estas fibras es su dificultad para teñirse de negro con la tinción reticular.

Normalmente, estas fibras adoptan una ordenación paralela, tendiendo a formar lazos alrededor de los túbulos. También se ha observado que este tipo de fibras puede verse mezclado con cantidades variables de colágeno. Hay que señalar, que la celularidad de estos lóbulos no es constante aunque tiende a ser mayor que en otros grupos. Las células en forma de huso son las más numerosas, aunque también pueden encontrarse células más gruesas como las descritas anteriormente.

Material y Métodos

Para este trabajo hemos utilizado 24 fragmentos de glándulas mamarias humanas normales, de edades comprendidas entre 19 y 76 años de edad procedentes de intervenciones de cirugía estética, de estas piezas 16 corresponden a mujeres en diversos días conocidos del ciclo ovárico, tanto en fase estrogénica, como luteínica. Otras 7 corresponden a mujeres menopáusicas. Las mujeres en edad fértil, las hemos clasificado, para su estudio siguiendo los criterios de Kaser en mama postmenstrual, preovulatoria y postovulatoria.

Preparación de los cortes histológicos. Recogido el material, éste fue inmediatamente troceado en fragmentos de un cm^3 y lavado con suero fisiológico. Los fragmentos seleccionados fueron inmediatamente fijados en formalina neutralizada al 10%. La selección de este fijador para el tejido mamario, aparece justificada en trabajos anteriores. Las piezas han permanecido en este líquido un mínimo de 72 horas y un máximo de 7 días. Una vez fijado el material adecuadamente, éste fue incluido en parafina sintética de la casa Merck de acuerdo con el procedimiento habitual en nuestro Departamento.

Concluido este proceso, los bloques fueron cortados con grosores variables entre 7 y 10μ . Para las coloraciones posteriores hemos procurado seleccionar cortes sucesivos, a fin de obtener imágenes morfológicas semejantes para cada una de las técnicas histológicas. Para este trabajo hemos utilizado las técnicas de Van Gieson y Martins para la visualización general del corte. Como técnicas específicas se usaron la Orceina para el tejido elástico y la Plata Amoniacal de Gomori para la reticulina. El examen de las preparaciones se ha realizado a 250, 400 y 1.000 aumentos, en este último caso mediante inmersión en aceite de cedro. Las zonas elegidas para el estudio fueron simultáneamente fotografiadas.

Resultados

Técnica de Van Gieson

Mama humana postmenstrual (1-7 días): Las células del parénquima mantienen la morfología típica cúbico cilíndrica. En un caso, las hemos encontrado turgentes, con apariencia vacuolada. En los restantes no presentan esta turgencia. Los núcleos ocupan diversas posiciones dentro de la célula, apareciendo con distinto grado de tinción. Los nucléolos no son constantes. Los citoplasmas aparecen bien teñidos, aunque con diferentes grados de color. Sólo en un caso hemos observado vacuolas. Periféricamente se observan células mioepiteliales, más aplanadas y con núcleos, más pequeñas y densas que las epiteliales. El citoplasma también es más claro en estas células mioepiteliales. También, en este caso, la apetencia tintorial es variable. Los lobulillos son de morfología ovalada, apareciendo muy separados unos de otros por tabiques conjuntivos. Su tamaño y el número de alvéolos por campo, son muy variables. En todos los casos la luz es evidente.

Los conductos aparecen rodeados de varias capas de tejido conjuntivo con la luz muy disminuida, incluso colapsada. Sus características citológicas no difieren de las de otros momentos del ciclo. Los lobulillos muestran colágeno laxo dispuesto circularmente alrededor de los alvéolos, formando un estuche a las células epiteliales. Las fibras de colágeno son gruesas y de aspecto mucoide. El tejido interlobulillar contiene fibras colágenas, lisas, paralelas al lobulillo y de aspecto laxo. Hay gran cantidad de tabiques conjuntivos entre un lobulillo y otro. También se comprueban adipocitos entre este tejido conjuntivo.

A partir de los cuarenta años se observan quistes, delimitados por células planas, de núcleos densos, sin nucléolos y citoplasma más claro. En algún caso encontramos restos de secreción en el interior de estos quistes.

Mama humana preovulatoria (8-13 días): El parénquima está formado por células epiteliales, cúbico cilíndricas, con núcleos en posición variable, bien teñidos, aunque con diferentes grados de intensidad. En algunos casos se observan nucléolos, mucho más densos que el núcleo. El citoplasma aparece casi siempre teñido, algo más claro que el núcleo, presentando también diferentes grados de tinción. No hemos encontrado vacuolas ni turgencia. Se observa una fila periférica de células mioepiteliales, inconstante e intermitente. Los núcleos son algo más oscuros que los epiteliales, más densos y de tamaño similar. En algunos casos muestran nucléolos visibles. El citoplasma, más claro que el de las epiteliales del parénquima, es de morfología ovalada y se coloca abrazando al alvéolo.

Los lobulillos son de morfología ovalada, limitados por un conjuntivo más o menos denso. En algunos casos, el lobulillo aparece retraído sobre sí mismo, dejando un espacio entre su periferia y el conjuntivo perilobulillar. Imágenes de este tipo, al lado de otras con el lobulillo no retraído pueden encontrarse en la misma glándula. El número de alvéolos por lobulillo es muy variable según los campos estudiados, calculando entre 20-50 alvéolos por lobulillo. Las luces, aunque disminuidas, existen y son desiguales. En mujeres de más de cuarenta años, hemos encontrado dilataciones quísticas, con células aplanadas, con núcleos densos y muy próximos a la luz.

Los conductos muestran dos filas celulares, en apariencia iguales y con luz evidente.

En el conjuntivo lobulillar, el Van Gieson no remarca las membranas basales. En el espesor del lobulillo, se encuentran fibras de colágeno grueso, teñidas de rojo, de aspecto mucoide y rodeando circularmente al alvéolo. El conjuntivo interlobulillar, muestra una gran cantidad de fibras colágenas, separando a los lobulillos con gran nitidez. Alrededor del lobulillo el colágeno es grueso y rizado, haciéndose más liso hacia el interior del lobulillo. Por sus polos, estos tabiques se bifurcan para alcanzar otros lobulillos, condensándose otras veces para formar tabiques frente a los acúmulos de adipocitos. Durante esta fase, no hemos evidenciado edema en el tejido conjuntivo de estas glándulas.

Mama humana postovulatoria (14-28 días): El parénquima muestra células cúbicas, en general más turgentes y vacuoladas que en otros momentos del ciclo. El núcleo se encuentra en posición variable, bien coloreado en marrón-negro, pero con diferentes grados. Los nucléolos aparecen de manera inconstante. El citoplasma, teñido en un color que varía del marrón al pardo, más claro que el núcleo, muestra diversos grados de coloración. Las células mioepiteliales, en segunda fila, son aplanadas y horizontales con respecto al alvéolo. Sus núcleos aparecen bien teñidos, en diferentes grados, no habiendo diferencias significativas con los de las células epiteliales. Los

citoplasmas parecen algo más claros que los de estas últimas células. Estos alvéolos forman lobulillos de morfología ovalada, viéndose en algunos cortes el inicio del conducto intralobulillar. El número de alvéolos por lobulillo, es muy variable, contándose entre 30 a 60 por lobulillo en el campo microscópico. La luz es evidente, con restos de secreción en algún caso. En mujeres de más de 40 años encontramos alvéolos con dilataciones quísticas, de epitelio aplanado y núcleos muy visibles.

Los conductos galactóforos, con dos filas celulares iguales y con luz evidente, generalmente ovalada.

Con esta tinción no se evidencian las membranas basales. Dentro del lobulillo, hay fibras de colágeno, teñidas de rojo más delgadas y densas que en otros momentos del ciclo, dando la impresión de estar desplazadas por unos alvéolos más turgentes. Estas imágenes no son constantes en todos los casos.

El tejido conjuntivo interlobulillar es ligeramente laxo, los tabiques interlobulillares no resultan contundentes ni densos pero sí gruesos. Las fibras colágenas son gruesas, algo rizadas y se bifurcan hacia la periferia del lobulillo para alcanzar otro alvéolo o bien se unen entre sí en caso de que no lo haya. Hacia el centro del lobulillo aparecen más lisas. Se comprueba la presencia de edema durante esta fase en el tejido conjuntivo interlobulillar.

Mama humana menopáusica: El epitelio parenquimatoso está formado por células cúbico-cilíndricas, con los núcleos en diferentes posiciones, teñidos más oscuros que el citoplasma. No hay vacuolas. En algunos casos se evidencian nucléolos. Las células mioepiteliales, de morfología alargada, forman una segunda fila, alrededor del alvéolo. Los núcleos aparecen algo más pequeños y densos que los de las células epiteliales, el citoplasma probablemente algo más claro. En las glándulas menopáusicas se encuentran con facilidad alvéolos con degeneración quística, con epitelio aplanado, núcleos bien teñidos y más cerca de la luz. En quistes pequeños todavía encontramos células mioepiteliales como las descritas anteriormente.

La morfología de los lobulillos es irregular, perdiendo en casi todos los casos su forma ovoidea y adquiriendo una apariencia desestructurada. Comparativamente son más pequeños que en la época fértil de la vida. El número de alvéolos también es menor, entre 10 y 20 por lobulillo, y a veces, incluso menos. La desestructuración alveolar se manifiesta, en unos casos, con acúmulos de células alveolares aplanadas y con pérdida de luz alveolar; en otros con la aparición de alvéolos excesivamente dilatados e incluso quísticos, con restos de secreción. Su disposición dentro del lobulillo se encuentra alterada, apareciendo zonas con alvéolos muy separados entre sí, al lado de otras, en que éstos aparecen formando acúmulos.

Los conductos en la mama menopáusica son de difícil hallazgo, habiendo desaparecido en su mayoría, tan sólo encontramos alguno de grueso calibre con una morfología alterada, luz triangular o romboidea y epitelio más delgado.

La técnica de Van Gieson no tiñe las membranas basales perialveolares. En el tejido conjuntivo intralobulillar aparecen las fibras de colágeno teñidas en rojo, que en estas glándulas menopáusicas, aparecen más densas y de grosor variable. Estas fibras rodean a los alvéolos, pero de una forma irregular y desestructurada sin formar círculos perfectos alrededor del alvéolo. Las fibras pierden su aspecto mucoide. En ocasiones no puede precisarse donde comienza o termina el tabique interlobulillar, dando la impresión de que las fibras del tabique invaden el lobulillo. El estroma interlobulillar, contiene fibras de tejido colágeno gruesas, teñidas en rojo. Los tabiques son, en muchos casos, gruesos y en otros más delgados, aunque las fibras colágenas mantienen siempre un aspecto bastante denso. Son fibras rizadas, que se aplanan en el centro del lobulillo y que continúan el mismo trayecto al terminar el lobulillo, sin abrazar a éste. En el tejido conjuntivo no aparece edema, pero sí parece existir en cambio, un aumento en el número de adipocitos.

Tricrómico de Martins

Mama humana postmenstrual (1-7 días) En esta fase, con el tricrómico de Martins, se observan células epiteliales con los citoplasmas teñidos en violeta y los núcleos rojo-violeta. En algunas células, se aprecian nucléolos muy evidentes destacando en negro. En algún caso las células aparecen turgentes. Podemos ver, así mismo, células mioepiteliales, formando una segunda fila, de forma discontinua. Son de morfología ovoidea y los citoplasmas de estas células aparecen más claros que los de las células epiteliales. Los núcleos aparecen más teñidos que los citoplasmas y su tamaño, es similar a los de las células epiteliales. En mujeres de más de 40 años,

aparecen dilataciones quísticas de los alvéolos, con secreción en su interior. La morfología de los lobulillos es ovalada, estando muy separados unos de otros por abundante tejido conjuntivo. El tamaño del lobulillo, es muy variable. Los ácinos muestran luces evidentes en la mayoría de los casos.

Las membranas basales aparecen teñidas de azul intenso, siguiendo las sinuosidades del epitelio. También se evidencia el colágeno intralobulillar, teñido de azul pálido y formando círculos alrededor de los alvéolos. Son fibras gruesas de aspecto más laxo que el conjuntivo interlobulillar. Encontramos una aparente disminución de volumen dentro de los lobulillos. El conjuntivo interlobulillar aparece como haces de fibras gruesas y rizadas de tejido colágeno, teñido de azul, más denso que el intralobulillar, formando tabiques que no rodean al lobulillo. Hemos encontrado células propias del tejido conjuntivo, sobre todo fibroblastos y fibrocitos, que destacan por su forma alargada y su núcleo bien teñido. Los conductos aparecen colapsados, rodeados de colágeno, pero dejando un espacio vacío entre el conducto y el tejido circundante.

Mama humana preovulatoria (8-13 días): Las células epiteliales parenquimatosas tienen núcleos en posición variable, bien teñidos en rojo-violeta. En algunos casos se evidencian nucléolos. No encontramos vacuolas. Las células mioepiteliales se hacen visibles, formando una segunda capa de células, discontinua, con su morfología ovalada, abrazando al alveolo. Con este método, aparecen más claras que las células epiteliales. En mujeres mayores de 40 años, encontramos de forma constante, dilataciones quísticas, con epitelio aplanado. La morfología de los lobulillos es ovalada, en algunos casos de forma inconstante, a veces retraído sobre sí mismo, dejando un espacio evidente entre el lobulillo propiamente dicho y el tejido conjuntivo perilobulillar. No es infrecuente que en la misma mama, aparezcan lobulillos retraídos y no retraídos. El número de alvéolos por lobulillo es muy variable oscilando entre 20 y 50. La luz alveolar, se encuentra disminuida.

Los conductos, con dos filas celulares y con luz evidente, aparecen más dilatados que en la fase anterior del ciclo, en la que los encontrábamos llamativamente colapsados.

Con esta tinción las membranas basales, aparecen teñidas en azul intenso, siguiendo las sinuosidades del epitelio. El tejido colágeno intralobulillar, muestra fibras gruesas, teñidas de azul pálido, rodeando al alvéolo. En el conjuntivo interlobulillar encontramos gran cantidad de tejido colágeno teñido de azul, formando los tabiques, con aspecto ligeramente laxo. Las fibras del tabique son gruesas y rizadas, algo más lisas hacia la mitad del lobulillo. En nuestras muestras no evidenciamos edema en esta fase. También numerosas células propias del tejido conjuntivo sobre todo fibroblastos y fibrocitos.

Mama humana postovulatoria (14-28 días): El parénquima muestra células cúbico-cilíndricas, en general más turgentes y vacuoladas que en otros momentos del ciclo. El núcleo teñido en rojo-violeta, se encuentra en posición variable, algo más oscuro que el citoplasma y con dos nucléolos en algunas células. Las células mioepiteliales, forman una segunda fila discontinua, de forma ovoidea y horizontales con respecto al alvéolo. Sus núcleos aparecen bien teñidos, en diferentes grados, no habiendo diferencias significativas con los de las células epiteliales. Los citoplasmas parecen algo más claros que los de estas últimas células. Los alvéolos forman lobulillos de morfología ovalada. El número de alvéolos por lobulillo, es muy variable, contándose entre 30 a 60 por lobulillo en los diferentes cortes estudiados. En mujeres de más de 40 años encontramos alvéolos con dilataciones quísticas, de epitelio aplanado. Los conductos galactóforos, con dos filas celulares iguales y con luz evidente, generalmente ovalada.

Con esta tinción se pueden apreciar las membranas basales teñidas de azul intenso. El tejido conjuntivo intralobulillar, presenta fibras de colágeno, teñidas de azul pálido, más delgadas y densas que en otros momentos del ciclo, dando la impresión de estar desplazadas por unos alvéolos más turgentes. Estas imágenes no aparecen en todos los casos. El tejido conjuntivo interlobulillar aparece ligeramente laxo. Los tabiques interlobulillares no resultan densos pero sí gruesos. Las fibras colágenas son gruesas, algo rizadas y bien se bifurcan hacia la periferia del lobulillo para alcanzar otro lobulillo o bien continúan su trayecto dejando a un lado el lobulillo del que han formado el tabique. Encontramos fibrocitos y fibroblastos, en cantidad discreta.

Mama humana menopáusica: El epitelio parenquimatoso está formado por células teñidas en violeta, con los núcleos en diferentes posiciones, teñidos en rojo-violeta. No hay vacuolas. En algún caso hemos visto nucléolos. Las células mioepiteliales, ovoideas o alargadas, forman una segunda fila celular discontinua alrededor del

alvéolo. Los núcleos aparecen algo más pequeños y densos que los de las células epiteliales, el citoplasma probablemente algo más claro. En las glándulas menopáusicas se encuentran gran cantidad de alvéolos con degeneración quística, con epitelio aplanado, núcleos bien teñidos y cercanos a la luz. En quistes pequeños todavía encontramos células mioepiteliales como las descritas anteriormente.

La morfología de los lobulillos es irregular, perdiendo en casi todos los casos la forma ovoidea característica y adquiriendo un aspecto desestructurado. Son más pequeños que en la época fértil de la vida, con un número de alvéolos entre 10 y 20 por lobulillo y a veces, incluso menos. Los alvéolos aparecen desestructurados, apareciendo en algunos casos como acúmulos de células epiteliales aplanadas y con pérdida de luz alveolar; en otros como dilataciones quísticas, con restos de secreción.

Los conductos en la mama menopáusica son de difícil hallazgo, habiendo desaparecido en su mayoría, encontramos sólo alguno de grueso calibre con una morfología alterada, luz triangular o romboidea y epitelio más delgado.

El tricrómico de Martins tiñe las membranas basales perialveolares en azul intenso. En el tejido conjuntivo intralobulillar aparecen las fibras de colágeno teñidas en azul pálido, estas fibras rodean a los alvéolos pero de forma anárquica y desestructurada, sin formar círculos perfectos alrededor del alvéolo. Las fibras han perdido su aspecto mucoide.

El estroma interlobulillar, contiene fibras de tejido colágeno gruesas, teñidas en azul de aspecto denso y rizado. Los tabiques son de grosor variable aunque las fibras colágenas mantienen siempre un aspecto bastante denso. En el tejido conjuntivo no aparece edema, pero sí parece existir en cambio, un aumento en el número de adipocitos. Encontramos escasos fibrocitos y fibroblastos.

Coloración con orceína

Glándula humana postmenstrual (1-7 días): Hay ausencia de fibras elásticas en las membranas basales y en el conjuntivo intra y perilobulillar. Tampoco se observan dilataciones quísticas. Por el contrario, los conductos gruesos se encuentran rodeados de una amplia zona de tejido conjuntivo, con fibras elásticas, finas, paralelas, dispuestas en varias capas alrededor del conducto. En estos casos, el conducto se encuentra retraído, con escasa luz y separado del conjuntivo periductal por un espacio ancho. Los conductos de calibre más pequeño, están rodeados de menor cantidad de fibras.

En el conjuntivo interlobulillar e interlobular, las fibras elásticas son finas y rizadas, e individualizadas, con una disposición diferente a las del colágeno, siendo en muchos casos perpendicular a la dirección de éstas.

Glándula humana preovulatoria (8-13 días): Ausencia de fibras elásticas alrededor del parénquima normal y quístico. En mujeres de 37 años, las fibras elásticas, muy finas y paralelas se observan en toda la trayectoria de los conductos. En cortes longitudinales muestran un aspecto rizado. En las glándulas de mujeres más jóvenes (19 años), hay una gran dificultad para encontrar fibras elásticas en todos los conductos estudiados, tanto en cortes longitudinales como transversales. También en esta fase, los conductos aparecen retraídos y separados por un espacio del tejido conjuntivo circundante.

En los tabiques glandulares las fibras elásticas son gruesas con una dirección semejante a la del colágeno, aunque algo más delgadas que éstas. Hay casos en que las fibras mantienen una disposición perpendicular a la del colágeno (mujeres de 37 años). En mujeres más jóvenes (19 años), las fibras elásticas son muy finas y muy escasas, lisas o ligeramente onduladas.

En las glándulas de edad más avanzada, es posible observar tejido elástico, grueso y rizado, formando parte de los tabiques que separan las grandes masas de adipocitos.

Glándula humana postovulatoria (14-28 días): Los resultados con la orceína vienen a confirmar lo expuesto para periodos precedentes. Se comprueba el incremento progresivo de tejido elástico con la edad de la glándula, que es independiente del momento cíclico estudiado. En mujeres próximas a la menopausia (44 años) el incremento de fibras elásticas periductales es muy importante, formando un rodete compacto, pegado al conducto y muy denso, de forma que resulta difícil de distinguir la dirección de las fibras. En los conductos más pequeños, la presencia

de tejido elástico es menor y proporcional al diámetro del conducto. Esta densidad de fibras elásticas en las mismas zonas glandulares de mujeres más jóvenes.

Al lado de estos caracteres generales, la glándula postovulatoria mantiene la ausencia de fibras elásticas en las membranas basales y en el conjuntivo intralobulillar. En algunos casos, éstas forman parte de los tabiques interlobulillares. En estos casos, su disposición, es rizada y paralela a los campos estudiados. Llama la atención que coincidiendo con la ingurgitación mamaria, las fibras elásticas estudiadas aparecen más lisas.

Glándula humana menopáusicas: En los siete casos estudiados hemos tenido gran dificultad para encontrar conductos galactóforos, sobre todo de pequeño calibre. Los estudiados, aparecen desestructurados, con epitelio más delgado y con la luz en ocasiones parcialmente ocluida y en otras de sección triangular o romboidea. Las fibras elásticas periductales no aparecen incrementadas respecto a los momentos premenopáusicos, disminuyendo incluso en las glándulas de edad más avanzada. La disposición de este tejido también es irregular y desestructurado. En los tabiques, las fibras elásticas son gruesas, rizadas, hallándose dispersas en el tejido conjuntivo de relleno. Es frecuente encontrar fibras de esta naturaleza en los tabiques que separan masas de tejido adiposo.

Plata amoniaca de Gomori

Glándula humana postmenstrual (1-7 días): Las características morfológicas de los lobulillos y de sus elementos componentes, guardan una estrecha relación con las descritas en las técnicas generales de Van Gieson y Martins. En este caso, predomina la coloración de fondo con el rojo neutro. Con ella, las células mioepiteliales aparecen más claras que las epiteliales. En estas preparaciones destacan las membranas basales, formadas por fibras argirófilas, teñidas de negro intenso, apareciendo alrededor de los alvéolos normales y quísticos y de los conductos galactóforos. En los conductos gruesos, las membranas aparecen fruncidas, en ocasiones con apariencias de roseta. En conductos más pequeños, adopta una forma dentada. En los alvéolos, delimita a las células epiteliales y mioepiteliales, también con morfología dentada. En los alvéolos quísticos la membrana basal, es prácticamente lisa.

El conjuntivo de los tabiques adquiere con el Gomori un color marrón grisáceo transparente, como corresponde a la estructura de colágeno, entre las que se observan algunas fibras argirófilas de reticulina. Hay que destacar la presencia de fibras argirófilas separando unos adipocitos de otros.

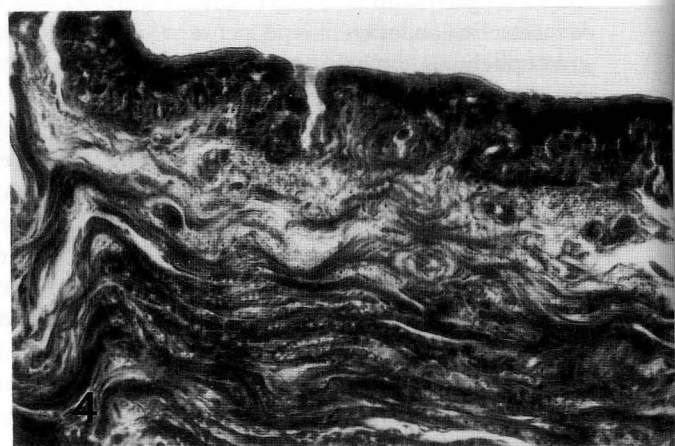
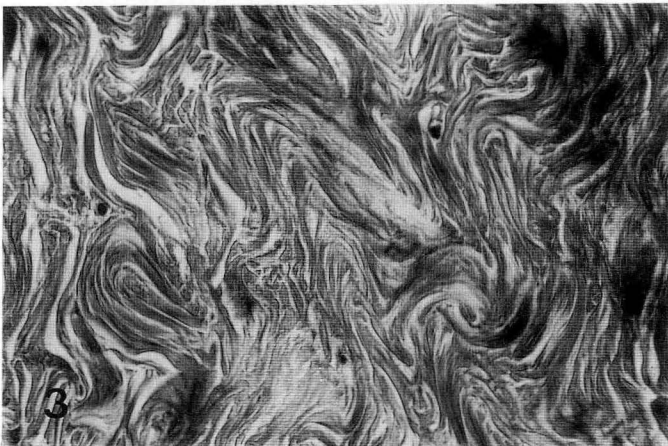
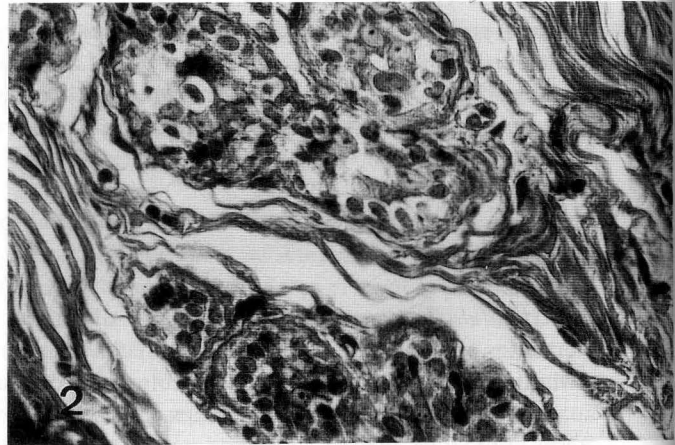
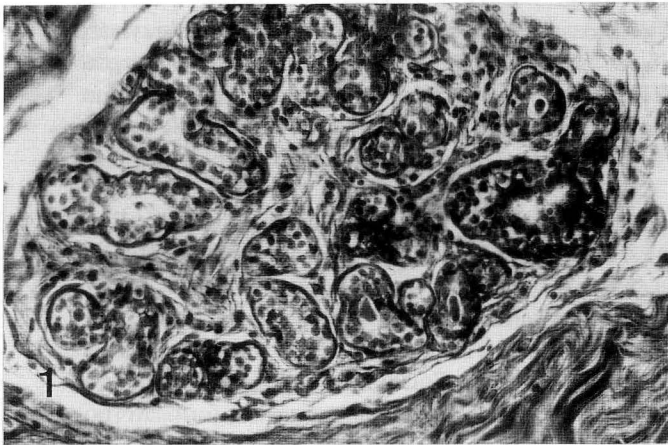
Glándula humana preovulatoria (8-13 días): Alvéolos con células mioepiteliales más claras. Las membranas basales aparecen dentadas hacia el interior, dando la impresión de comprimir a los alvéolos. La luz de éstos no aparece tan reducida como en la fase anterior. En las dilataciones quísticas la membrana se mantiene lisa.

El colágeno intralobulillar aparece con coloración marrón transparente, algo más pálido que el interlobulillar. En este último, se ven además algunas fibras argirófilas de reticulina, inmersas en la mayoría colágena del tabique. Separando unos adipocitos de otros, es posible ver fibras de reticulina formando las membranas basales.

Glándula humana postovulatoria (14-28 días): Los alvéolos mantienen los caracteres estructurales señalados en las fases anteriores. En este periodo, las luces alveolares son ovoideas y no parecen estar comprimidas. Las membranas basales mantienen un grosor parecido al del momento anterior del ciclo. Su morfología, ahora ondulada, es algo más suave que en las fases anteriores.

Los conjuntivos intralobulillar e interlobulillar, mantienen las características descritas hasta ahora. Las fibras de reticulina se continúan viendo fuera del conjuntivo lobulillar. También en los conglomerados de adipocitos.

Glándula humana postovulatoria: El parénquima ha desaparecido en gran medida de estas preparaciones. El que resta aparece desestructurado, con membranas basales que recuerdan por su grosor al de las mujeres más jóvenes. Los restos de conjuntivo intralobulillar, cuando aparece, mantiene el color marrón y la transparencia. La reticulina sigue siendo visible en los tabiques conjuntivos interlobulillares.



- FIGURA 1.** Glándula mamaria de 29 años de edad, en el 13^o día del ciclo. Tricrómico de Martins (x 400). Vemos un lobulillo en detalle. Encontramos cierta separación con el tabique.
- FIGURA 2.** Glándula mamaria de 23 años, en el 6^o día del ciclo. Tricrómico de Martins (1.000). Vemos una separación más amplia del tabique.
- FIGURA 3.** La misma preparación anterior (x 400). Detalle de la disposición del tejido conjuntivo dentro de la glándula.
- FIGURA 4.** Detalle de un conducto de grueso calibre. Tricrómico de Martins (x 1.000).

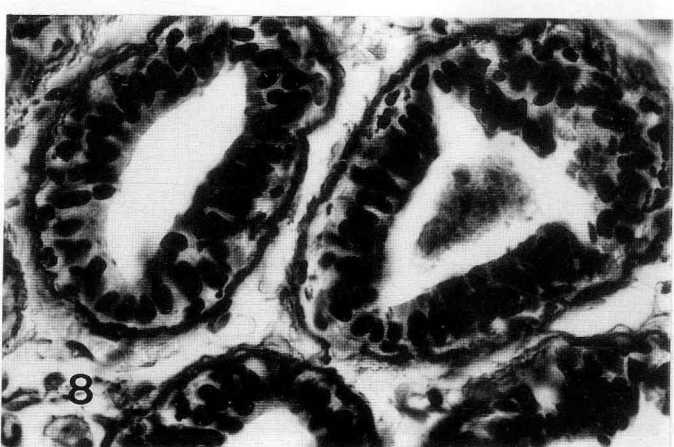
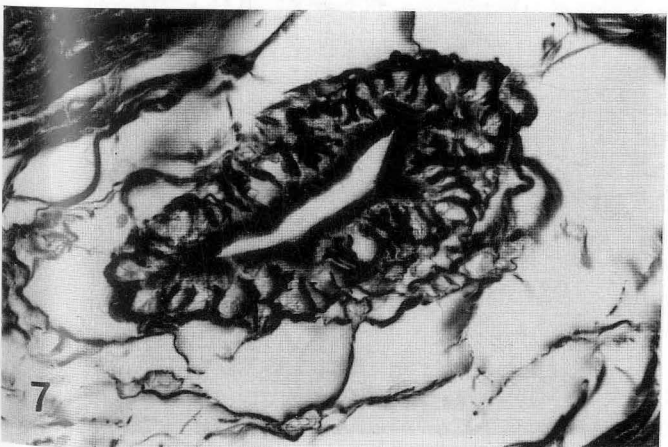
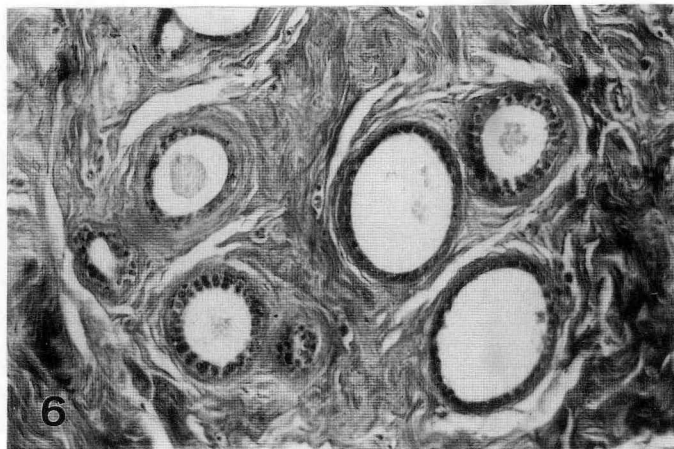
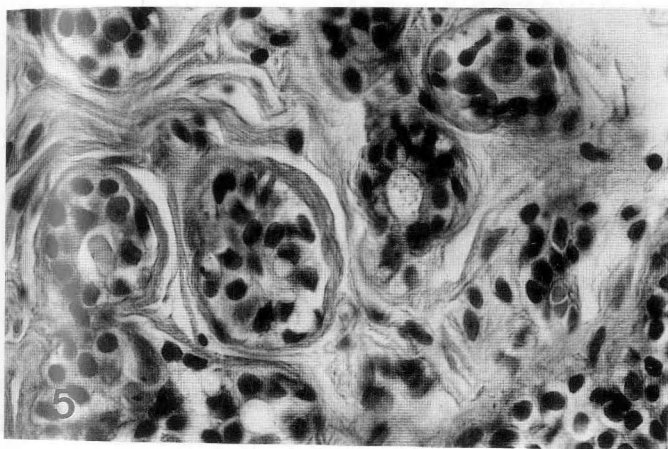


FIGURA 5. Glándula mamaria de 24 años en el 16º día del ciclo. Van Gieson (x 1.000). Vemos en detalle el tejido colágeno intralobulillar liso y bien estructurado, observamos el aspecto vacuolado de las células parenquimatosas y las luces abiertas de los ácinos.

FIGURA 6. Glándula mamaria de 40 años en el 2º día del ciclo. Van Gieson (x 400). Vemos dilataciones quísticas, frecuentes en esta edad.

FIGURA 7. Glándula mamaria 23 años, 6º día del ciclo. Método de Gomori (x 1.000). Se puede ver el colapso del conducto con la membrana basal fruncida.

FIGURA 8. Glándula mamaria de 23 años, 16º día del ciclo. Conductos dilatados con la membrana basal lisa.

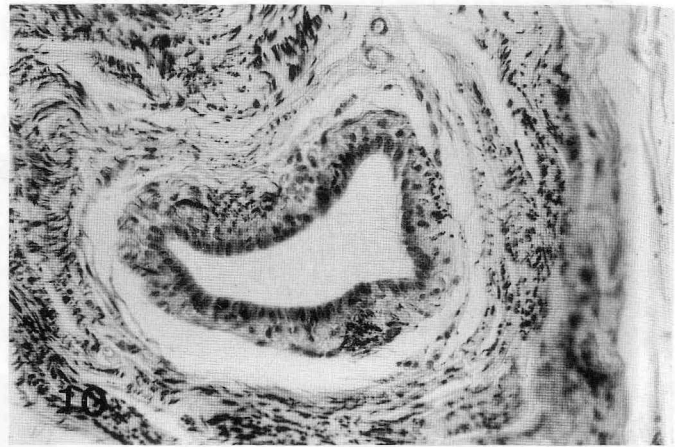
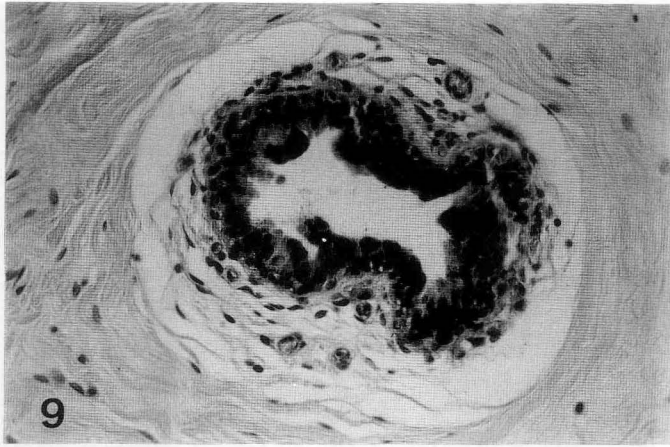


FIGURA 9. Glándula mamaria de 19 años, 9º día del ciclo. Coloración con orceína (x 400). Se observa la sección del conducto rodeado de fibras elásticas.

FIGURA 10. Glándula mamaria de 27 años, en el 9º día del ciclo. Coloración con orceína (x 400). Se observa la sección del conducto rodeado de fibras elásticas.

FIGURA 11. La misma preparación anterior (x 1.000). Vemos un aumento considerable de fibras elásticas periductales comparándolas con mujeres más jóvenes.

FIGURA 12. Glándula mamaria en una mujer menopáusica de 61 años. Método de la orceína (x 400). Vemos las fibras elásticas más gruesas, cortas y de aspecto desestructurado, en relación con las edades fértiles de la vida.

Discusión

Cada una de las unidades de la mama aparece envuelta por una membrana basal de reticulina, poco perceptible con el Van Gieson y francamente coloreada de azul con el tricrómico de Martins y selectivamente con el método de Gomori en negro intenso. Esta membrana también se colorea de rojo con la técnica histoquímica del azul Alcian-PAS, como ya señalaran Nieto (1977) y Nasarre (1986) en trabajos precedentes. Histológicamente, hemos comprobado que estas membranas basales contienen abundantes fibras de procolágeno o reticulina, delgadas y dispuestas circularmente abrazando al ácino, muy visibles en azul, con la coloración de Martins y en negro intenso con el método argéntico de Gomori, que abrazan de forma constante a estas unidades glandulares, mandando incluso, en ocasiones, prolongaciones hacia las células del parénquima. Esta circunstancia no la hemos visto reflejada en la bibliografía consultada. Las fibras elásticas demostradas por la Orceína son muy escasas, como ya señalaron Bennington (1979) e Ihnen (1953).

Cada uno de los lobulillos mamarios de morfología ovalada o poligonal está integrado por un número de alvéolos que varía según el momento cíclico, la edad y la zona de mama estudiada, oscilando entre 20 y 50 unidades por lobulillo ($\times 250$). Estos resultados, creemos que deben tomarse con mucha precaución, ya que la zona de glándula biopsiada los modifica en gran manera. En cualquier caso estas unidades aparecen inmersas en un estroma (conjuntivo intralobulillar) de fibras delgadas y predominantemente lisas de aspecto mucoide, con abundancia de fibras colágenas, puestas de manifiesto con el Martins y el Van Gieson y con escasa presencia de fibras de reticulina evidenciadas por el método argéntico de Gomori y ausencia de fibras elásticas, como pone de manifiesto la Orceína.

La importancia de este estroma intralobulillar está fuera de toda duda, ya que parece responder a la estimulación hormonal, desempeñando un papel funcional en las actividades cíclicas de la glándula. Por el contrario, el estroma interlobulillar, situado entre los diversos lobulillos, lo mismo que el interlobular, es un componente bastante inactivo de la mama, con rasgos morfológicos que tienden a permanecer constantes a todas las edades y tanto en condiciones normales como displásicas. Por su parte, la función de las membranas basales, también difiere de las del estroma, sirviendo predominantemente de apoyo al epitelio.

Los lóbulos aparecen delimitados por gruesos tabiques conjuntivos (conjuntivo interlobular), claramente diferenciados del estroma intra y perilobulillar y de cuyos extremos parten manojos de fibras más delgadas que ayudan a separar entre sí a los lobulillos (conjuntivo interlobulillar) y a delimitar los conglomerados de adipocitos. Con las técnicas de Van Gieson y Martins, hemos puesto de manifiesto abundantes fibras de colágeno, de aspecto laxo, gruesas y rizadas en el espesor del tabique y más delgadas y lisas en la periferia. La reticulina, tiene una presencia discontinua y escasa alrededor de los lobulillos. Las fibras elásticas, apenas son visibles en el estroma. En el espesor de los grandes tabiques, aparecen aisladas, gruesas y con la misma dirección que las del colágeno.

Los conductillos revestidos de epitelio cúbico, son los conductos más pequeños y vienen a concluir con los ductos subsegmentales. El tejido que los envuelve se continúa con el de los lobulillos por un lado y con el de los lóbulos por otro. Lo más característico, para nosotros es la fina envoltura elástica que poseen, todos los conductos de la glándula. Los conductos de mayor calibre (subsegmentales y segmentales), aparecen recubiertos por distinto tipo de epitelio, biestratificado en la posición proximal y pavimentoso, en la distal, próximo al seno lactífero, presenta una envoltura conjuntiva característica, con algunas peculiaridades que lo diferencian respecto al resto del estroma. Según nuestras observaciones, la estructura periductal es más laxa, algo más celular, más abundante que el tejido conjuntivo ordinario. Por otro lado hay que insistir en que mientras los conductos están revestidos de tejido elástico, los lóbulos están, en la práctica, desprovistos de éste.

Una de las características más notables de este trabajo es la posible demostración de un ciclo histológico en la glándula mamaria.

Ciclo ovárico: Como ya hemos señalado, diversos investigadores han tomado postura a favor (Rosenburg, 1922; Dabelow, 1941; Kaser, 1971; Fanger, 1974; Takahashi, 1981) o en contra (Bloom, 1973; Nasarre, 1986) de la aparición de modificaciones histológicas en la glándula mamaria coincidentes con momentos específicos del ciclo menstrual. Estos cambios, incluso, parecen afectar al conjuntivo de la glándula (Dieckmann, 1925; Moszkowicz, 1926; Ozzello, 1970).

Los resultados de nuestro trabajo recogen determinados cambios, quizás no muy aparentes, relacionados con el ciclo ovárico. Así, las células del parénquima postmenstrual (días 1-7) aparecen sin turgencia y sin vacuolas aparentes, imágenes microscópicas que apenas difieren de la glándula preovulatoria. En cambio, transcurrida la ovulación (días 14-28), las células parenquimatosas se hacen más turgentes y vacuoladas. La luz alveolar, es evidente en todos los momentos del ciclo. En los conductos, la luz es estrecha y en muchos casos colapsada en la fase postmenstrual y más dilatada en la preovulatoria. Respecto a las membranas basales de alvéolos y conductos, aparecen con aspecto dentado en la primera mitad del ciclo y más ondulado en la parte final del ciclo. No detectamos cambios de grosor.

En este trabajo, no hemos podido reconocer la proliferación progresiva de los epitelios de revestimiento de los brotes glandulares y conductos galactóforos, señalada por Kaser (1971), así como tampoco el regreso de estas modificaciones glandulares tras el inicio del periodo postmenstrual. En cambio, coincidimos con Kaser, en que las modificaciones que hemos reseñado, no son constantes y que incluso cuando se han observado, su variación ha sido muy notable de unas mujeres a otras.

Junto a estos cambios en el parénquima glandular, también hemos comprobado otros en el estroma conjuntivo. Así el mayor número de fibrocitos y fibroblastos coincide con la mama postmenstrual. Esta celularidad disminuye en la glándula preovulatoria y es muy discreto en la postovulatoria. El tejido conjuntivo intralobulillar disminuye de volumen durante la fase postmenstrual (días 1-7). En las fases preovulatoria y premenstrual hemos observado como los lobulillos se han retraído sobre sí mismos, dejando unos espacios evidentes entre los alvéolos y el conjuntivo perilobulillar, más acusado hacia la mitad del ciclo.

En la mama postovulatoria, el tejido conjuntivo aparece más grueso, dando la impresión de estar más edematizado que en momentos anteriores, presentando una textura más fina y más laxa, circunstancia ya recogida por Dieckmann y Geshickter, en trabajos ya citados. Por otra parte, en este momento del ciclo, las fibras elásticas estudiadas por nosotros son de apariencia más lisa contrastando con el aspecto rizado que ofrecen en la primera mitad del ciclo.

Los resultados que presentamos difieren de algunos aceptados hasta ahora. Así sucede con el establecimiento de máxima celularidad intersticial, postmenstrual para nosotros y premenstrual para otros. Tampoco aceptamos las modificaciones de grosor de las membranas basales señaladas por algunos en la fase premenstrual. En cambio, mostramos nuestro acuerdo en que las modificaciones cíclicas conjuntivas se acusan más en el conjuntivo intralobulillar que en el interlobular. Esta inactividad también es más acusada en los grandes conductos galactóforos que en los pequeños.

A vista de nuestros resultados, tampoco parece que el colágeno presente en los lóbulos de la mama sea sustituido por el tejido celular durante el ciclo menstrual posterior, ya que no hemos encontrado rasgos de necrosis. Mas estamos de acuerdo con Ozzello (1970) al considerar que el colágeno debe considerarse casi metabólicamente inerte.

Señalamos, por último, que Haangensen (1979) tampoco ha encontrado evidencias satisfactorias entre el fenómeno de ingurgitación mamaria premenstrual y los de proliferación epitelial, edema e infiltración leucocitaria, presumiendo que estos cambios deben relacionarse con una ingurgitación sanguínea o linfática y con aumento tensional del líquido extracelular de difícil demostración histológica e histoquímica.

BIBLIOGRAFÍA

- BENNINGTON, J.L. (1979): Problems in breast pathology. En Major Problems in Pathology. WB. Saunders Company Ltd. London, Philadelphia, Toronto.
- BLOOM, W y FAWCETT, D.W. (1973): Glándula mamaria. En Tratado de Histología, (870-880). Edit. Labor Barcelona.
- DABELOW, A. (1941): Der Entfaltungsmechanismus der Mamma. *Gegembaurs Morph. Jahrbuch* 85. Citado por Bargmann en *Histología y Anatomía Microscópica*. Edit. Labor. Barcelona.
- DIECKMANN, H. (1925): Über die Histologie der Brustdrüse bei gestortem und ungestortem Menstruationsablauf. *Virchows Arch. path. Anat.*, **256**: 321- 356.
- FANGER, H. y REE, H.J. (1974): Cycle changes of human mammary gland epithelium in relations to the menstrual cycle. An ultrastructural study. *Cancer* **34**: 574-585.

- GESHICKTER, C. (1943): Diseases of the breast: Diagnosis, pathology, treatment. Philadelphia, JB. Lippincott Company.
- HAANGENSEN, C. (1979): Enfermedades de la mama (1-70).
- IHNEN, M. y PÉREZ TAMAYO, R. (1953): Breast stroma. Morphological and histochemical study. A.M.A. Arch. Pat. **56**: 46.067.
- KASER, O.; FRIEDBER, V.; OBER, K.G.; THOMSEN, K. and ZANDER, J. (1971): Ginecología y Obstetricia. Ed. Salvat (151).
- MOSZKOWICZ, L.(1926): Uber den monatlichen Zyklus der Brustdruse. .Arch.Klin. Chir., **142**: 374-418.
- NASARRE, M.J. (1986): Aportación al estudio histoquímico y anatomocomparado del parénquima mamario. Tesis Doctoral. Univ. Zaragoza.
- NIETO, J.L.; PELLEJERO, S.; NASARRE, M^a.J. y JIMÉNEZ, L. (1977): Histoquímica de los carbohidratos en la glándula mamaria de la rata durante el ciclo normal, el embarazo y la lactancia. Ach. Fac. Med. Zaragoza. XXV. (19-26).
- OZZELLO, L. (1970): Epithelial stromal junction of normal an dysplastic mammary gland. Cancer (Philad.) **25/3**: 586-600.
- ROSEMBURG, A. (1922): Uber menstruelle durch das Corpus Lu-teum bedingte Mammaveranderungen. Frankfurt Ztschr Pat. **27**: 466. Citado por Inher y Pérez-Tamayo en «Breast Stroma».
- TAKAHASHI, N. (1982): Mama. En Atlas de Citología del cáncer 2^a edic. (243-266). Edit. Panamericana. Buenos Aires.
- ZANELLA E. (1952): Il materiale elastico della mammella della donna nelle varie eta della vita. Atti Soc. med.-chir. Padova. **29**: 20-29.

Correspondencia: Edelmira García López
Dpto. de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina de Zaragoza
C/ Domingo Miral, s/n
50009 Zaragoza. España.

TERMINALES MONOAMINÉRGICOS EN LAS LÁMINAS SUPERFICIALES DEL COLÍCULO SUPERIOR DE LA RATA

MONOAMINERGIC TERMINALS IN THE UPPER LAYERS OF THE RAT SUPERIOR COLLICULUS

L. HENNEQUET, J. GONDRA, J. NOCEDA, P. GRANDES y F. ORTEGA

Departamento de Neurociencias
Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea
Leioa, Vizcaya

RESUMEN

Tras administrar el marcador 5-hidroxidopamina (5 OHDA) en el ventrículo lateral de la rata, se han puesto en evidencia dos tipos de terminales sinápticos en las láminas superficiales del colículo superior.

PALABRAS CLAVE : Rata. Colículo Superior. 5 OHDA.

SUMMARY

Two different types of synaptic contacts have been found in the upper layers of the rat superior colliculus after the administration of 5-hydroxydopamine (5 OHDA) into the lateral ventricle.

KEY WORDS : Rat. Superior Colliculus. 5 OHDA.

Introducción

En el neuropilo de las láminas superficiales u ópticas del colículo superior existen diversos tipos de contactos sinápticos, de los cuales sólo son ampliamente conocidos los de origen retiniano y cortical (Mathers, 1977; Graham and Casagrande, 1980; Hollander and Schonitzer, 1983; Ortega y cols., 1987), caracterizados por la presencia de vesículas sinápticas redondas y contactos asimétricos.

Dos tipos sinápticos, con vesículas aplanadas y pleomórficas, fueron atribuidos a un origen intracolicular (Vrensen and De Groot, 1977). Sin embargo, esta clasificación debe ser revisada a la luz del conocimiento de la ultraestructura de los terminales intrínsecos (Sendino y cols. 1990), así como a la existencia de otros centros proyectantes a las láminas ópticas del colículo superior (Morrison and Foote, 1986; Parnavelas and Papadopoulos, 1989).

Con objeto de poner de manifiesto la presencia de terminales procedentes del locus coeruleus, de carácter noradrenérgico y con características morfológicas distintivas, hemos utilizado el marcador 5-hidroxi-dopamina (5 OHDA). Este falso neurotransmisor (Hwang *et al.* 1986), es selectivamente captado y concentrado en las vesículas sinápticas de terminales nerviosos catecolaminérgicos, donde tras fijación aldehídica forma un precipitado electrodenso.

De esta forma, los terminales catecolaminérgicos pueden ser identificados a nivel ultraestructural por la presencia de las vesículas de centro denso, lugar de almacenamiento de las catecolaminas (Coyle and Molliver, 1977), y por un precipitado electrodenso en su interior.

Material y Métodos

Para la realización del presente trabajo, han sido utilizadas 10 ratas adultas (Sprague-Dawley), de 150 g de peso.

Los animales fueron anestesiados con 0,75 cc de ketamina (50 mgr/100 ml) por vía intramuscular, y 0,5 cc de uretano al 20% en dilución acuosa, por vía intraperitoneal.

A continuación se hizo una perforación en la calota, calculada por estereotaxis (Pellegrino *et al.* 1979), en la zona correspondiente al ventrículo lateral, a -5,6 mm del punto bregma y lateral 1,5 mm al plano sagital. Se incidió la duramadre y se expuso la superficie cortical. Por medio de una sonda acoplada a una microjeringa Hamilton, se inyectaron 20 microlitros de 5 OHDA en el ventrículo lateral derecho. La utilización de la sonda permitió observar el líquido cefalorraquídeo que ascendía por ella, cuando ésta se encontraba en el interior del ventrículo.

Tras la inyección del marcador, el tiempo de supervivencia osciló entre 60 y 90 minutos. Los animales fueron perfundidos percardiacamente (previo lavado del aparato circulatorio con una solución de ClNa al 0,9% a 37° C) con una mezcla de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 1% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Se decapitó al animal, se extrajo el cerebro y se seleccionaron los colículos superiores, desechándose el resto.

El bloque elegido, a su vez dividido en cuatro piezas, fue lavado en tampón fosfato 0,15 M. Posteriormente los pequeños bloques fueron osmificados en una solución acuosa de OsO₄ al 2% durante dos horas. Transcurrido este tiempo, fueron sometidos a tres lavados con buffer fosfato 0,15 M.

La deshidratación posterior se realizó con acetonas en diluciones crecientes desde 40% hasta 70%, de donde pasaron a una solución de uranilo al 2% durante cuatro horas en oscuridad (0,5 g de uranilo y 50 cc de acetona al 70%). Posteriormente continuó la deshidratación hasta acetona al 100%, tras lo cual fueron incluidos en durcupan y polimerizados en estufa a 54° C durante dos días.

Las secciones ultrafinas se realizaron en un ultramicrotomo Reigert-Jung de la serie Ultracut, y recogidas en rejillas cubiertas con una película de formvar al 1%. Previamente a la realización del estudio a microscopía electrónica, las secciones fueron teñidas con citrato de plomo.

Resultados

El estudio de las secciones ultrafinas del colículo superior de los animales tratados con el marcador 5 OHDA, puso de manifiesto la presencia de un depósito electrodenso que abarcaba desde la superficie pial hasta estratos profundos del colículo superior. Este precipitado aparecía difusamente extendido en las porciones superficiales, ocupando perfiles de naturaleza dendrítica, axonal y glial.

A medida que se estudiaban partes más profundas del colículo superior, el precipitado disminuía, hasta que a nivel del estrato gris superficial, el depósito adquiría un carácter puntiforme y se localizaba en el interior de perfiles definidos. Con el fin de poder asegurar la naturaleza específica de la captación, fueron elegidos aquellos perfiles, con depósito electrodenso en su interior, que no estuvieran rodeados por otros también marcados.

El marcado electrodenso presentaba dos situaciones claramente definidas:

- a) Depósitos puntiformes sin límites claros con el citoplasma circundante, en perfiles que ocupaban espacios interneuronales y carecían de especializaciones sinápticas (figura 1), que correspondían a procesos gliales.
- b) Depósitos electrodensos en el interior de vesículas de probable carácter sináptico.

Los perfiles que contenían vesículas sinápticas con precipitado electrodenso presentaron características diferenciales, tanto por la morfología de las vesículas como por el contacto sináptico que establecían.

El primer tipo mostraba el depósito en el interior de vesículas de gran tamaño (60-120 nm de diámetro), compatibles con las denominadas granulares o de centro denso (densecored) junto con otras agranulares, de menor diámetro (30-60 nm). La presencia del precipitado en el interior de las vesículas sinápticas, enmascaraba la densidad central propia de las vesículas granulares. Estos perfiles establecían contactos de tipo asimétrico con otros dendríticos de pequeño y mediano calibre (figura 2). Nunca se observaron contactos de tipo axoaxónico o axosomático.

El segundo tipo, estaba constituido por perfiles sinápticos simétricos con vesículas pleomórficas (figura 3). Los escasos contactos sinápticos que se pudieron observar se establecían con dendritas de variados calibres. En ocasiones, estos perfiles se relacionaban con terminales axónicos de probable naturaleza retiniana, por sus contactos asimétricos, vesículas redondas y por la presencia de mitocondrias con crestas electrotranslúcidas (figura 4).

En ambos casos, el depósito estaba localizado fundamentalmente en el interior de las vesículas, aunque también podía afectar a la matriz axonal extraventricular.

En ninguno de los casos considerados como positivamente marcados se observaron depósitos electrodensos sobre mielina, mitocondrias, vasos sanguíneos u otros elementos no relacionados con estructuras de tipo sináptico.

Discusión

Tras la utilización de la 5 OHDA, aparecieron dos tipos de terminales sinápticos selectivamente marcados en el interior de las láminas superficiales del colículo superior.

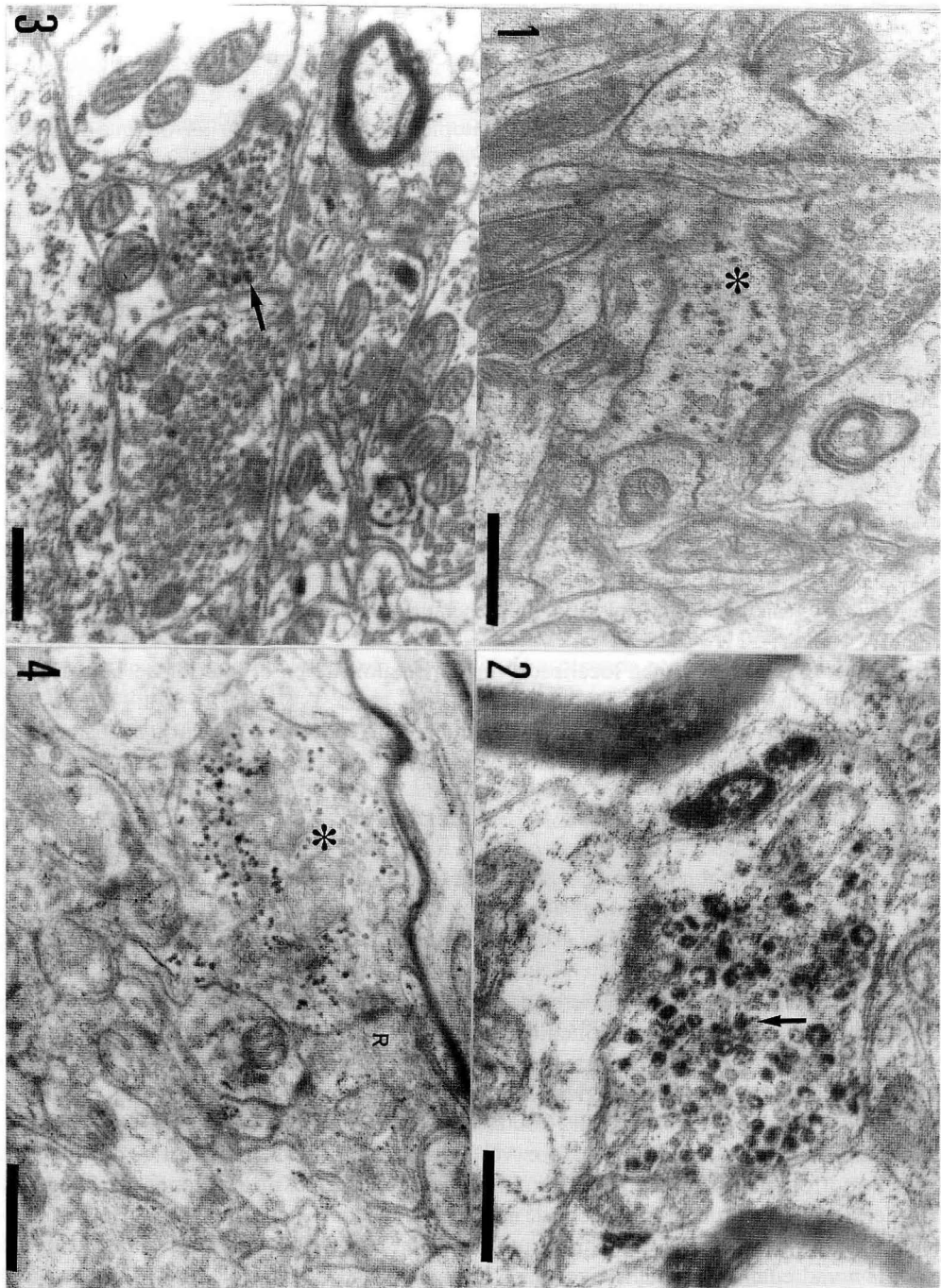
El primer tipo presentaba vesículas grandes con el centro electrodenso y ocupadas por el marcador, coincidiendo en sus características morfológicas con terminales de naturaleza noradrenérgica, conocidos como originados en el locus coeruleus (Morrison and Foote, 1986; Schwarzenbrunner *et al.* 1990).

El segundo tipo sináptico caracterizado por vesículas pleomórficas y contactos de tipo simétrico, es compatible con la morfología que presentan los terminales serotoninérgicos originados en el núcleo dorsal del rafe (Mize and Horner, 1989). Por otra parte, el hecho de aparecer ocupados por el marcador 5 OHDA puede explicarse por la particularidad que presenta la serotonina de utilizar un mecanismo de captación y almacenamiento similar al utilizado por la noradrenalina (Lichtensteiger *et al.* 1967; Fuxe and Ungerstedt, 1968; Koda and Bloom, 1977; Bradford, 1988). La naturaleza serotoninérgica de estos terminales queda respaldada por la presencia de perfiles morfológicamente compatibles con un origen retiniano, en la vecindad de algunos de estos terminales (Según *et al.* 1986).

De este modo la 5 OHDA aparece en nuestro material como un marcador monoaminérgico, al menos para la noradrenalina y la serotonina. Hasta el momento desconocemos su comportamiento con respecto a la dopamina.

Aunque hay referencias acerca de la posible existencia de vesículas de centro denso en el interior de terminales de naturaleza serotoninérgica (Bradford, 1988), este hallazgo no ha podido ser confirmado en nuestro estudio.

Las escasas vesículas de centro denso que pueden encontrarse en los terminales retinianos (Lund, 1969) no resultaron marcadas en nuestro material, indicando una limitación del método utilizado o una naturaleza distinta a la monoaminérgica, del neurotransmisor que contienen.



- FIGURA 1.** Electromicrografía mostrando un perfil glial (*) que contiene depósitos electrodensos en su interior. El precipitado se encuentra en el citoplasma, sin ningún tipo de revestimiento. Los perfiles circundantes se encuentran libres del marcado. (Barra: 0,5 μ m)
- FIGURA 2.** Perfil sináptico conteniendo vesículas de centro denso, así como otras agranulares, que establece un contacto asimétrico sobre un perfil dendrítico. El depósito electrodenso (flecha) se encuentra en el interior de las vesículas sinápticas y en el axoplasma. (Barra: 0,5 μ m)
- FIGURA 3.** Perfil sináptico mostrando vesículas pleomórficas con depósitos electrodensos (flecha) en su interior, junto con otras vesículas libres de marcado. (Barra: 0,5 μ m)
- FIGURA 4.** Electromicrografía de un terminal sináptico (*) con vesículas pleomórficas y depósito electrodenso en continuidad con otro terminal de características retinianas (R). (Barra: 0,5 μ m)

Debido al doble marcado que muestra la 5 OHDA, creemos conveniente la utilización de antidepresivos bloqueantes del mecanismo de recaptación de las monoaminas, del tipo de la imipramina (Mintz *et al.* 1989), o desipramina (Backstrom *et al.* 1989), con el fin de aumentar la especificidad del marcador. De este modo pretendemos confirmar nuestros datos sobre los distintos tipos de terminales, así como la naturaleza de su neurotransmisor.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a don Zacarías Álvarez Díaz su inestimable ayuda técnica en el procesado del material y en los soportes gráficos de este trabajo.

Estudio subvencionado por la DGICYT, PM 89/0066.

BIBLIOGRAFÍA

- BACKSTROM, I. T.; ROSS, S.B. and MARCUSSON, J.O. (1989): (3H)Desipramine binding to rat brain tissue: binding to both noradrenaline uptake sites and sites not related to noradrenaline neurons. *J. Neurochem.*, **52**: 1099-1106.
- BRADFORD, H. F. (1988): *Fundamentos de Neuroquímica*. 485 pp. Ed. Labor. Barcelona.
- COYLE, J. T. and MOLLIVER, M.E. (1977): Major innervation of newborn rat cortex by monoaminergic neurons. *Science*, **196**: 444-447.
- FUXE, K. and UNGERSTEDT, U. (1968): Histochemical studies on the distribution of catecholamines and 5-hydroxytryptamine after intraventricular injections. *Histochemie*, **13**: 16-28.
- GRAHAM, J. and CASAGRANDE, V.A. (1980): A light microscopic study of the superficial layers of the superior colliculus of the tree shrew (*Tupaia glis*). *J. Comp. Neurol.* **191**: 133-151.
- HOLLANDER, H. and SCHONITZER, K. (1983): Corticotectal terminals in the superior colliculus of the rabbit: a light- and electron microscopic analysis using horseradish peroxidase (HRP)-tetramethylbenzidine (TMB). *J. Comp. Neurol.* **209**: 81-87.
- HWANG, B.H.; WILLIAMS, T.H. and JEW, J. (1986): Plasticity of catecholaminergic terminals in rat paraventricular hypothalamic nucleus after 6-hydroxydopamine lesion: an emphasis on bouton sizes and synaptic frequency. *Brain Res.* **369**: 267-274.
- KODA, L. V. and BLOOM, F.E. (1977): A light and electron microscopic study of noradrenergic terminals in the rat dentate gyrus. *Brain Res.* **120**: 327-335.
- LICHTENSTEIGER, W; MUTZNER, U. and LANGEMANN, H. (1967): Uptake of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan by neurons of the central nervous system normally containing catecholamines. *J. Neurochem.* **14**: 489-497.
- LUND, R. D. (1969): Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* **135**: 179-208.
- MATHERS, L. H. jr. (1977): Retinal and visual cortical projections to the superior colliculus of the rabbit. *Exp. Neurol.* **57**: 698-712.
- MINTZ, I; GOTOW, T.; TRILLER, A. and KORN, H. (1989): Effect of serotonergic afferents on quantal release at central inhibitory synapses. *Science*. **245**: 190-192.
- MIZE, R. R. and HORNER, L.H. (1989): Origin, distribution and morphology of serotonergic afferents to the cat superior colliculus: a light and electron microscope immunocytochemistry study. *Exp. Brain Res.* **75**: 83-98.
- MORRISON, J. and FOOTE, S. (1986): Noradrenergic and serotonergic innervation of cortical, thalamic and tectal visual structures in old and new world monkeys. *J. Comp. Neurol.* **243**: 117-138.
- ORTEGA, F.; REBLET, C.; AROSTEGUI, J.A. y DOÑATE, F. (1987): Ultraestructura de las láminas superficiales del colículo superior. *Cuad. Invest. Biol.* **12**: 11-22.
- PARNAVELAS, J. and PAPADOPOULOS, G. (1989): The monoaminergic innervation of the cerebral cortex is not diffuse and non-specific. *Tins*. Vol. **12** nº 9, 315-319.
- PELLEGRINO, L. J.; PELLEGRINO, A.S. and CUSHMAN, A.J. (1979): *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. 122 pp. Plenum Press. New York.

- SCHWARZENBRUNNER, U.; SCHMIDLE, T.; OBENDORF, D.; SCHERMAN, D.; HOOK, V.; FISCHER-COLBRIE, R. and WINKLER, H. (1990): Sympathetic axons and nerve terminals: The protein composition of small and large dense-core and of a third type of vesicles. *Neuroscience*, Vol. **37** nº 3, 819-827.
- SEGU, L.; ABDELKEFI, J.; DUSTICIER, G. and LANOIR, J. (1986): High-affinity serotonin binding sites: Autoradiographic evidence for their location on retinal afferents in the rat superior colliculus. *Brain Res.* **384**: 205-217.
- SENDINO, J.; GONZALEZ, M. y ORTEGA, F. (1990): Organización intrínseca del colículo superior de la rata. *An. Anat.* **36**: 305-307.
- VRENSEN, G. and DE GROOT, D.. (1977): Quantitative aspects of the synaptic organization of the superior colliculus in control and dark-reared rabbits. *Brain Res.* **134**: 417-428.

Correspondencia: Prof. Dra. Leonor Hennequet
Dpto. Neurociencias
Fac. de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
48940 Leioa - Bizkaia. España

DISTRIBUCIÓN TOPOGRÁFICA DE LOS ELEMENTOS GFAP-INMUNORREACTIVOS EN EL ÓRGANO VASCULOSO DE LA LÁMINA TERMINAL DE RATA

TOPOGRAPHIC DISTRIBUTION OF THE GFAP-IMMUNOREACTIVE ELEMENTS IN THE ORGANUM VASCULOSUM OF THE LAMINA TERMINALIS IN THE RAT

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

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

RESUMEN

Empleando el método inmunocitoquímico de la peroxidasa-antiperoxidasa, se realizó un estudio morfológico y topográfico de la distribución de los elementos inmunorreactivos a la proteína glial fibrilar ácida, sobre cortes frontales seriados de cerebro de rata que contenían el órgano vasculoso de la lámina terminal.

En la zona externa del órgano, la inmunoreactividad se observó preferentemente alrededor de los vasos. En la zona interna se apreciaron tractos fibrosos inmunorreactivos. El límite entre ambas zonas, lo forma la presencia de tractos fibrilares reactivos a esta proteína.

Las células inmunorreactivas observadas presentaron un soma fuertemente teñido del cual partían prolongaciones cortas y sinuosas.

PALABRAS CLAVE: Órgano vasculoso de la lámina terminal. Proteína glial fibrilar ácida. Inmunocitoquímica. Rata.

SUMMARY

Using the peroxidase-antiperoxidase (PAP) immunocytochemical method, a morphological and topographic study was carried out on the distribution of the elements immunoreactive to glial fibrillary acidic protein in serial frontal sections of the rat brain containing the organum vasculosum of the lamina terminalis.

In the external zone of the organ, immunoreactivity was preferentially observed around blood vessels. In the internal zone, immunoreactive fibrous tracts were observed. The limit between both zones was seen to be formed by fibrillary tracts reactive to the protein.

The immunoreactive cells observed displayed an intensely stained cell body, out of which course short sinuous prolongations.

KEY WORDS: Organum vasculosum lamina terminalis. Glial fibrillary acidic protein. Immunocytochemistry. Rat.

Introducción

Con la denominación de órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT), término debido a Hofer (1958), se describe una particular formación situada en el límite anterior de la vesícula diencefálica, cuyas características citoestructurales le apartan del resto de las paredes ventriculares.

Campos Ortega y Ferres Torres (1965), en un estudio realizado en la rata albina, señalan la existencia de tres zonas en el OVLT. Una zona *externa*, con abundantes vasos y tejido conectivo; una *interna*, en contacto con la cavidad ventricular y otra *intermedia*, que constituye la membrana limitante glial.

El aislamiento y caracterización de proteínas específicas de los elementos gliales y la posterior obtención de anticuerpos, permitió la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas para el estudio de estas células.

La proteína glial fibrilar ácida (GFAP), aislada por Eng y col. (1971) en placas de esclerosis múltiple, constituye un marcador inmunocitoquímico para los astrocitos (Bignami y Dahl, 1977).

Aunque el OVLT ha sido estudiado a microscopía electrónica de transmisión (Rohlich y Wegner, 1969; Noach, 1972; Coates, 1978; del Brio y col., 1990) y a microscopía electrónica de barrido (Riesco y col., 1988a, 1988b; Juanes y col., 1989a), son muy pocos los trabajos que realizan un estudio de los elementos GFAP-inmunoactivos a nivel de este órgano circunventricular (Kalman y Hajos, 1989).

Por ello, nuestro propósito es valorar la distribución topográfica de las células GFAP-positivas en las diferentes zonas del OVLT.

Material y Métodos

Para el presente trabajo se utilizaron 10 ratas blancas (cinco machos y cinco hembras), cepa Sprague-Dawley, de pesos comprendidos entre los 200-250 g. Sacrificados los animales por decapitación, se extrajo el cerebro y se fijó en Bouin Hollande; posteriormente fueron deshidratados en etanol, incluidos en parafina y cortados frontalmente, de forma seriada, a 5 micras de grosor.

Para el estudio inmunocitoquímico se empleó el método enzimático de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), descrito por Sterberger y col. (1970), utilizando suero anti-GFAP (Dako, A-334) obtenido en conejo a dilución 1:500; suero anti-inmunoglobulina de conejo (Dako, Z-196), obtenido en cerdo, a dilución 1:100 y complejo soluble PAP, obtenido en conejo (Dako, Z-113) a dilución 1:100, después de inhibir la peroxidasa endógena con metanol agua oxigenada. Como tampón de lavado y de dilución se empleó el tampón TRIS 5×10^{-3} M, con un 8% de NaCl, pH: 7.5. La reacción se visualizó con 3-3' Diaminobenzidina, y se contrastó con hematoxilina ácida de Mayer, estudiándose el OVLT con arreglo a la sistematización de Campos Ortega y Ferres Torres (1965), con un microscopio Zeiss-Axiophot.

Resultados

En los animales estudiados no hemos encontrado diferencias morfológicas ni topográficas entre sexos, por lo que los resultados obtenidos los describiremos en su conjunto.

El OVLT está situado en la región anteroventral del tercer ventrículo, región AV3V de Carithers y Johnson (1984), Blackburn y col., (1987, 1990). Constituye un área, de difícil delimitación, próxima al quiasma óptico, en su porción inferior y a la comisura blanca anterior, en su porción superior (Esquema 1).

La inmunorreactividad a la GFAP, en la *zona externa* del órgano, se observó preferentemente a nivel de los vasos (figuras 1 y 2), apareciendo un anillo inmunorreactivo de fibras GFAP positivas, a modo de abrazadera, alrededor de ellos, contactando con la pared vascular, sin detectar los somas celulares (figura 2). También se

apreció, en esta región del OVLT, una banda de elementos GFAP-inmunorreactivos en las proximidades del límite pial inferior (figuras 1 y 3).

En áreas próximas a esta zona del órgano, se encuentra el quiasma óptico (figura 1); en él existen varias células reactivas, muy esparcidas, con un citoplasma intensamente marcado del que parten prolongaciones.

En la *zona intermedia* apareció una banda de células, dispuestas en cadena (membrana limitante glial) (figura 4), inmunonegativas a la GFAP, próximas a fibras débilmente inmunorreactivas a esta proteína (figura 4). Por otra parte, a este nivel del órgano, se observó una trama puntiforme inmunorreactiva, paralela a las células GFAP-negativas de la zona intermedia del OVLT (figura 4).

En esta zona intermedia del OVLT, los vasos poseen elementos GFAP-inmunorreactivos a su alrededor (figura 4) y el quiasma óptico sigue presentando células reactivas (figura 4).

La *zona interna* del OVLT, en contacto con la luz del tercer ventrículo (figura 5), está limitada lateralmente por elementos puntiformes inmunorreactivos a la GFAP (figura 5, con más detalle en la figura 6). En esta zona del OVLT se apreciaron, a grandes aumentos, haces difusos de glía débilmente reactiva a esta proteína (figura 7), y contactando con la luz ventricular, se observaron otras fibras, mucho más marcadas con la GFAP (figura 7). Sigue viéndose células inmunorreactivas en el quiasma óptico (figura 5).

Las células GFAP-inmunorreactivas observadas en las distintas zonas del OVLT analizadas, se caracterizaron por presentar un citoplasma irregular, muy reactivo, del que parten prolongaciones cortas y sinuosas, en número variable de unas células a otras. Estas células, por sus características morfológicas y tintoriales, semejan ser de tipo astrocitario (figura 8).

Discusión

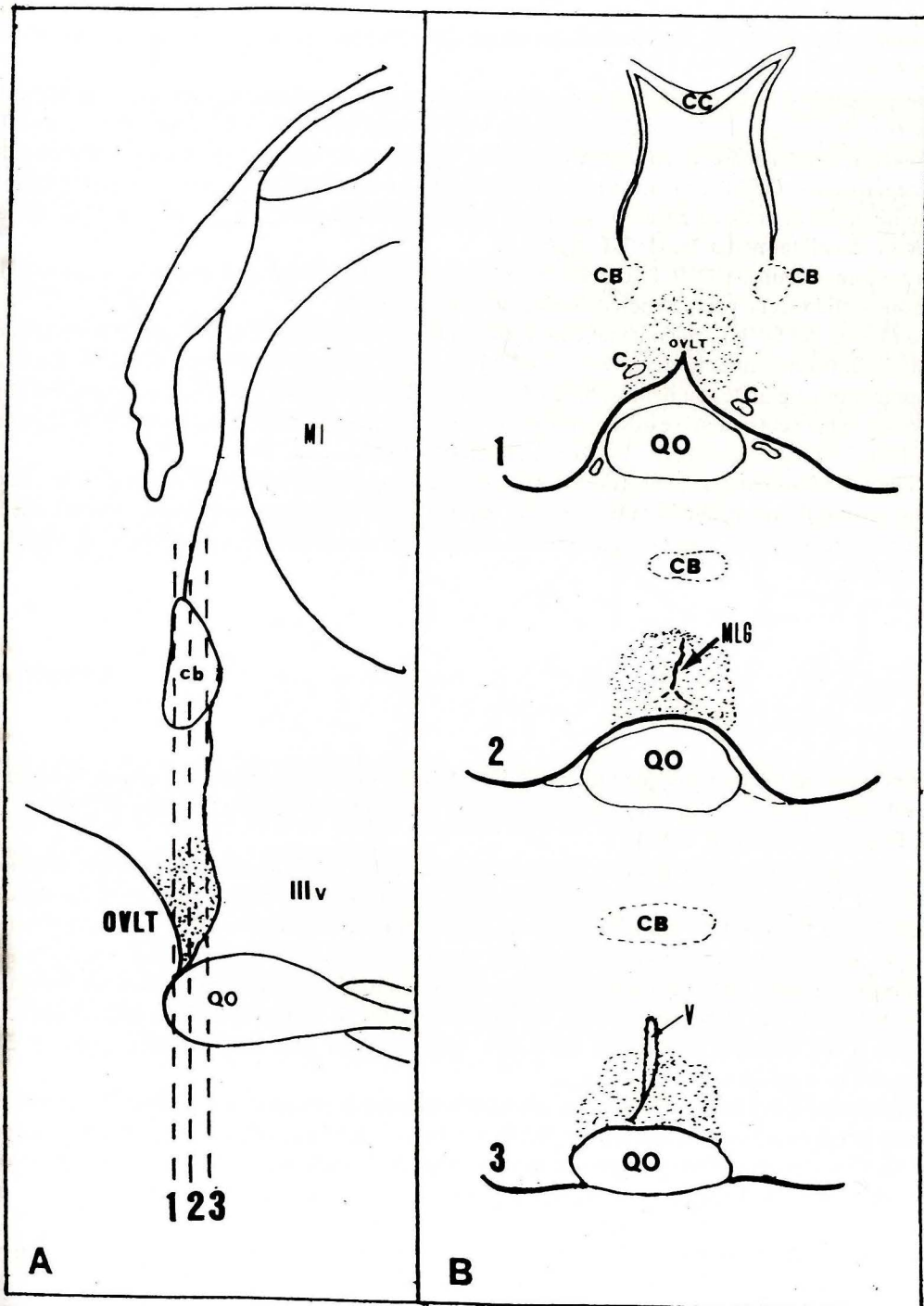
La mayor parte de los trabajos que utilizan la GFAP han sido para esclarecer el origen histogénico de los tumores cerebrales y para el estudio de la respuesta de los astrocitos a diferentes lesiones (Bignami y col., 1980; Eng, 1980; Bignami y Schoene, 1981).

Actualmente, no existen apenas trabajos que describan la distribución de los elementos GFAP-inmunorreactivos a nivel del OVLT. Cabe destacar la descripción hecha por Kalman y Hajos (1989) quienes encontraron la existencia de gran cantidad de fibras GFAP-inmunorreactivas, especialmente localizadas en la zona subependimaria; sin embargo, estos autores no detectaron el soma celular, cuestionándose el posible origen de estas fibras. Además, señalaron que este sistema de fibras inmunorreactivas era distinto al observado en el resto del Sistema Nervioso Central, especialmente por su menor tamaño. En nuestro estudio no hemos apreciado estas diferencias, siendo quizás debido a los distintos protocolos utilizados, quedando así una puerta abierta para su estudio con inmunocitoquímica a microscopía electrónica.

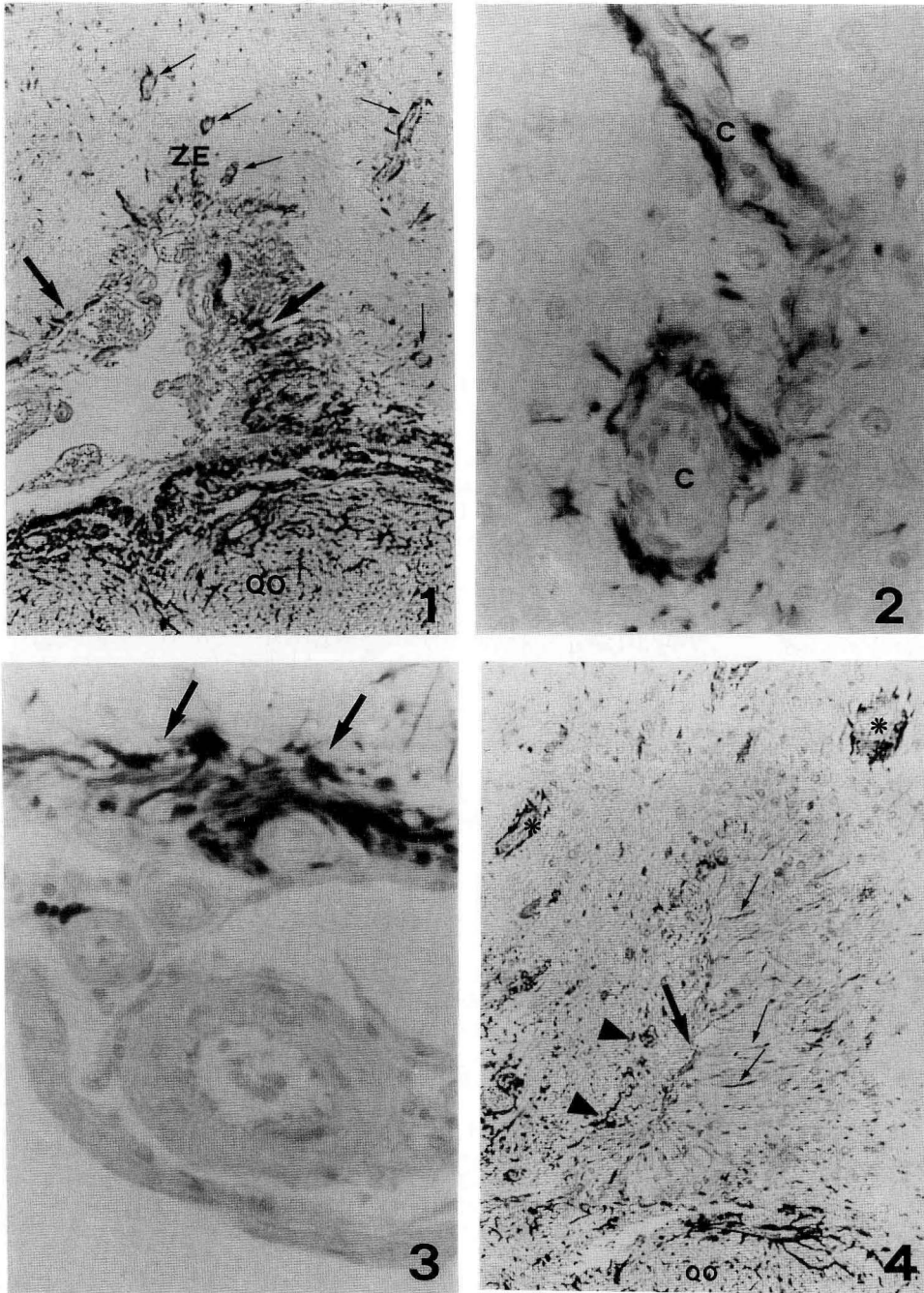
No se observaron diferencias entre ambos sexos; debido a que la mayoría de los trabajos utilizan únicamente un sexo como grupo experimental, no hemos podido establecer comparaciones en este sentido. Únicamente, los trabajos de Kalman y Hajos (1989) y Hajos y Kalman (1989), realizando un estudio de la distribución de la GFAP en el Sistema Nervioso Central de la rata albina, con grupos de animales de ambos sexos, sin encontrar diferencias entre éstos.

La mayoría de los elementos GFAP-inmunorreactivos observados por nosotros, dada sus características morfológicas, semejan astrocitos. La GFAP es una proteína integrante de los filamentos intermedios gliales, por ello, cabría pensar que tan sólo los astrocitos fibrosos serían GFAP positivos; sin embargo, estudios a microscopía electrónica (Schachner y col., 1977; Nowakowsky y Rakic, 1979), han demostrado que el inmunoprecipitado que origina la inmunoreactividad a la GFAP marca los dos tipos de astrocitos (fibrosos y protoplásmicos), ya que la GFAP también está presente, de forma soluble, en el citoplasma glial (Patel y col., 1985; Malloch y col., 1987).

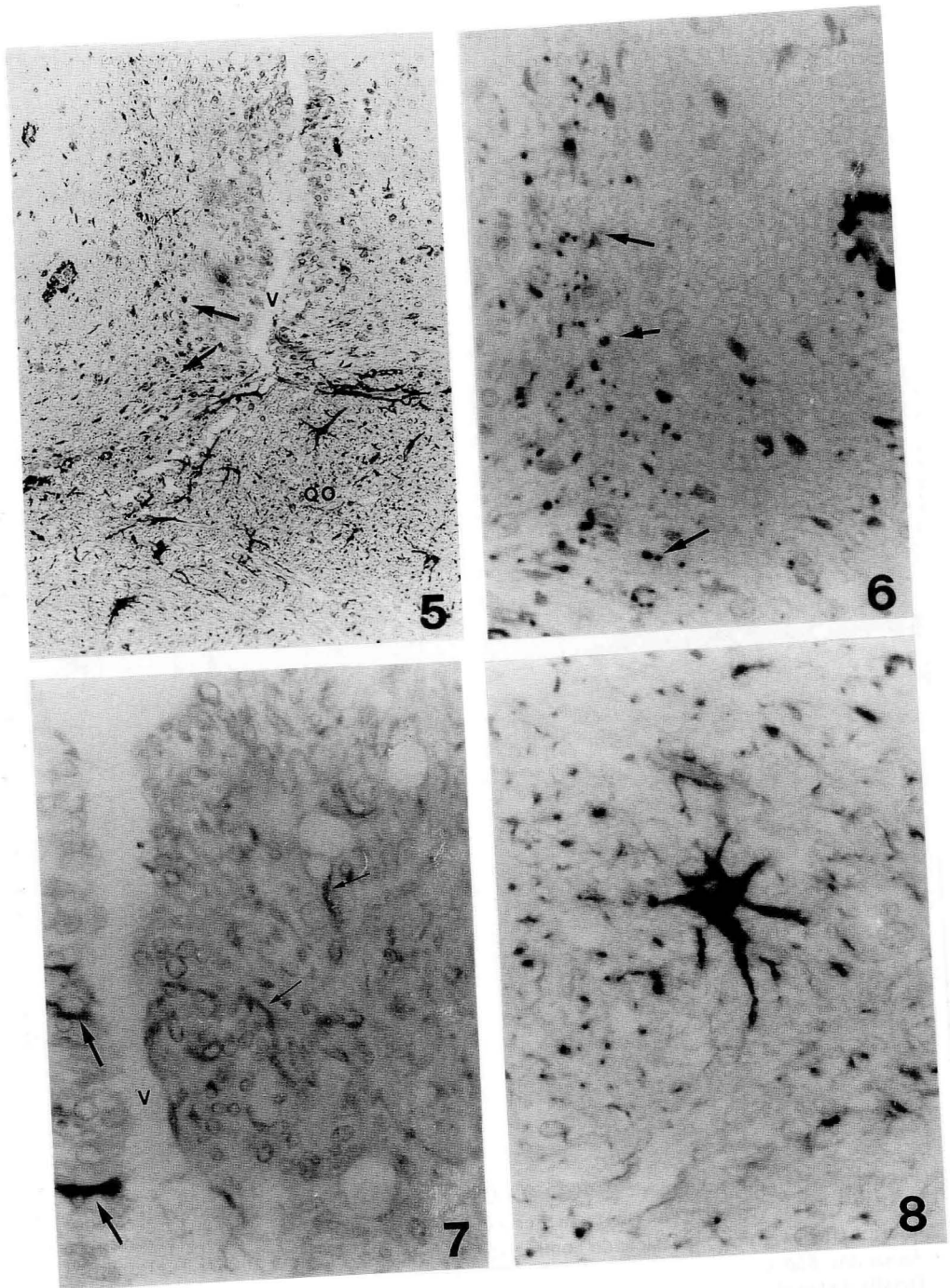
Nosotros no podemos matizar si estos astrocitos son de tipo protoplásmico o fibroso, pero sí coincidimos con el resto de los autores en señalar a la GFAP como un marcador altamente específico para los astrocitos en general (Bignami y Dahl, 1973, 1974; Dahl y Bignami, 1973; Juanes y col., 1989b; Juanes, 1990).



ESQUEMA 1. Representación gráfica del Órgano Vasculoso de la Lámina Terminal (OVLT) (zona punteada), situado en la región antero-ventral del tercer ventrículo (III v). **A.** Corte sagital del encéfalo de ratona. QO: Quiasma Óptico. cb: comisura blanca anterior. MI: Masa Intermedia. 1, 2 y 3: Líneas discontinuas verticales, que representan la sección que hemos practicado en el encéfalo (en sentido antero-posterior). **B.** Cortes frontales a nivel del OVLT (zonas punteadas), correspondientes a las zonas de sección. 1. Zona externa del órgano. 2. Zona intermedia, membrana limitante glial (MLG, flecha). 3. Zona interna del OVLT. cb: comisura blanca anterior. QO: Quiasma Óptico. V (flecha): Luz del tercer ventrículo. c: capilar. cc: cuerpo calloso.



- FIGURA 1.** Panorámica de la zona externa del OVLT (ZE). Obsérvese la existencia de elementos GFAP-inmunorreactivos alrededor de los vasos (flecha fina) y la presencia de una banda reactiva en las proximidades del límite pial inferior (flecha gruesa), destacando como área más reactiva, próxima al OVLT, el quiasma óptico (QO). Aumentos: 856 x.
- FIGURA 2.** Detalle de los elementos inmunorreactivos a GFAP a nivel perivascular, constituyendo un verdadero anillo inmunorreactivo que contacta con la pared vascular sin detectarse los somas celulares. c: capilar. Aumentos: 1.712 x.
- FIGURA 3.** Banda de elementos GFAP positivos en las proximidades del límite pial inferior (flecha). Aumentos: 1.712 x.
- FIGURA 4.** Zona intermedia del OVLT. Banda de células en cadena, inmunonegativas a la GFAP (flecha gruesa); se ven finas fibras, débilmente inmunorreactivas (flechas finas) y una trama puntiforme (cabeza de flecha) inmunorreactiva a la GFAP, dispuestas de forma paralela a las células en cadena. En los márgenes laterales de esta zona del OVLT, se aprecian vasos con elementos inmunorreactivos alrededor de los mismos (asterisco), así como una reacción en el quiasma óptico (QO). Aumentos: 856 x.



- FIGURA 5.** Zona interna del OVLT, en contacto con la luz del tercer ventrículo (V). En los márgenes laterales, se nota la presencia de elementos puntiformes inmunorreactivos a la GFAP (flecha); en el quiasma óptico aparecen células reactivas (QO). Aumentos: 428 x.
- FIGURA 6.** Detalle, a mayores aumentos, de los elementos puntiformes GFAP-inmunorreactivos (flechas) agrupados en hileras, y situados en la parte lateral de la zona interna del OVLT. Aumentos: 1.712 x.
- FIGURA 7.** Haces de glía inmunorreactiva a la GFAP, débilmente marcada (flecha fina) junto a otras fibras mucho más teñidas con esta proteína (flecha gruesa) que contactan con la luz del tercer ventrículo (V). Aumentos: 1.712 x.
- FIGURA 8.** Célula GFAP-inmunorreactiva con características astrocitarias. Aumentos: 2.696 x.

BIBLIOGRAFÍA

- BIGNAMI, A. y DAHL, D. (1973): Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.*, **49**: 393-402.
- BIGNAMI, A. y DAHL, D. (1974): Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study antibodies to glial fibrillary acidic protein. *J. Comp. Neurol.*, **153**: 27-38.
- BIGNAMI, A. y DAHL, D. (1977): Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 466-469.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. y RUEGER, D.C. (1980): Glial fibrillary acidic (GFA) protein in normal neural cells and in pathological conditions. In *Adv. Cell Neurobiol.*, **1**: 285-310.
- BIGNAMI, A. y SCHOENE, W.C. (1981): Glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. In «Diagnostic Immunohistochemistry» (R.A. DeLellis, ed.), pp. 213-225. Masson, New York.
- BLACKBURN, E.R.; LENG, G. y RUSSELL, J.A. (1987): Control of magnocellular oxytocin neurones by the region anterior and ventral to the third ventricle (AV3V region) in rats. *J. Endocr.*, **114**: 253-261.
- BLACKBURN, R.E.; DAY, N.C.; LENG, G. y HUGHES, J. (1990): The effect of anteroventral third ventricular lesions on the changes in cholecystokinin receptor density in the rat supraoptic nucleus following saline drinking. *J. Neuroendocrinology*. Vol. 2, nº 3: 323-328.
- CAMPOS ORTEGA, J.A. Y FERRES-TORRES, R. (1965): Sobre el sustrato del órgano vasculoso de la lámina terminal de rata albina. *An. Anat.*, **14**: 381-409.
- CARITHERS, J. y JOHNSON, A.K. (1984): Long term effects on the supraoptic nuclei and neural lobe produced by ablation of the tissue surrounding the preoptic recess (AV3V). *Brain Res.*, **305**: 123-140.
- COATES, F.W. (1978): Supraependymal cells and fiber processes in the fetal monkey third ventricle correlated scanning and transmission electron microscopy. *SEM/II. USA.*, pp. 143-150.
- DAHL, D. y BIGNAMI, A. (1973): Immunohistochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.*, **61**: 279-293.
- DEL BRIO, M.A.; RIERA, P.; GARCÍA, J.M. y ÁLVAREZ-URÍA, M. (1990): Ultrastructural study of the cellular components of the organum vasculosum lamina terminalis of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **22**: 303-309.
- ENG, L.F. (1980): The glial fibrillary acidic (GFA) protein. In «Proteins of the Nervous System» (R.A. Bradshaw and D.M. Schneider, eds.), pp. 85-117. Raven, New York.
- ENG, L.F.; VANDERHAEGEN, G.G.; BIGNAMI, A. y GERSTL, B. (1971): An acidic protein isolated from birous astrocytes. *Brain Res.*, **28**: 351-354.
- HAJOS, F. y KALMAN, M. (1989): Distribution of the glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. II.- Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Exp. Brain Res.*, **78**: 164-173.
- HOFER, H. (1958): Zur Morphologie der circumventrikularem organe des Zwischenhirnes der Säugetieren. *Verh. Deutsch. Zool. Ges. Zool. Anz. Suppl.* **22**: 202-251.
- JUANES, J.A. (1990): Estudio inmunocitoquímico de la glía en diversos órganos circumventriculares. Tesis Doctoral de Medicina. Universidad de Salamanca.
- JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E. y VÁZQUEZ, R. (1989a): Etude morphologique avec le microscope électronique à balayage chez deux organes circumventriculaires: l'organum vasculosum de la lamina terminalis et l'organe subfornical de rat sprague-Dawley. *Bulletin de l'Association des Anatomistes*. Vol. 72, nº 222, pp. 26.
- JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E. y VÁZQUEZ, R. (1989b): Estudio inmunocitoquímico de los elementos reactivos a la proteína glial fibrilar ácida en la eminencia media de la rata. *An. Anat.*, **35**: 51-55.
- KALMAN, M. y HAJOS, F. (1989): Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I.- Forebrain. *Exp. Brain Res.*, **78**: 147-163.
- MALLOGH, G.D.A.; CLARK, J.B. y BURNET, F.R. (1987): Glial fibrillary acidic protein in the cytoskeletal and soluble protein fractions of the developing rat brain. *J. Neurochem.*, **48**: 299-306.
- NOACH, W. (1972): Scanning and electron microscopical investigations of the surface of the lateral ventricles in the cat. *Brain Res.*, **46**: 121-129.
- NOWAKOSKY, R.S. y RAKIC, P. (1979): The mode of migration of neurons in the hippocampus: a Golgi and electron microscopic analysis in foetal rhesus monkey. *J. Neurocytol.*, **8**: 697-718.
- PATEL, A.J.; WEIR, M.D.; HUNT, A.; TAHOURDIN, C.S.M. y THOMAS, D.G.T. (1985): Distribution of glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein and correlation with glutamine decarboxylase in different regions of the rat central neurons system. *Brain Res.*, **331**: 1-10.
- RIESCO, J.M.; JUANES, J.A.; CARRETERO, J. y VÁZQUEZ, R. (1988a): Ultrastructure of the surface of the organum vasculosum laminae terminalis in different animals species. *J. Submicrosc. Cytol.*, **20**: 363-369.
- RIESCO, J.M.; JUANES, J.A.; CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F. y VÁZQUEZ, R. (1988b): Estudio comparativo del órgano vasculoso de la lámina terminal y del órgano subforniano con el microscopio electrónico de barrido. *Acta Microscop.* Vol. 10, nº 3: 409-416.

- ROHLICH, P. y WEGNER, T. (1969): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an organum vasculosum laminae terminalis der Ratte. *Z. Zellforsch.*, **102**: 483-506.
- SCHAECHNER, M.; HEDLEY-WHITE, E.T.; HSU, D.W.; SCHOONMAKER, G. y BIGNAMI, A. (1977): Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labelling *J. Cell. Biol.*, **75**: 67-73.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; 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.

Correspondencia: Dr. Juan A. Juanes Méndez
Dpto. de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. España

ASPECTO RADIOGRÁFICO DEL AGUJERO MENTONIANO

THE APPEARANCE OF MENTAL FORAMINA ON PANORAMIC RADIOGRAPHS

L.M. JUNQUERA, J.C. DE VICENTE, J. S. LÓPEZ ARRANZ, C. SALGADO

Departamento de Cirugía y especialidades médico-quirúrgicas. Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial
Hospital Ntra. Sra. de Covadonga. Oviedo

RESUMEN

El aspecto ortopantomográfico del agujero mentoniano, puede clasificarse en varios tipos: separado, continuo, difuso e indiferenciado. Sobre una muestra de 130 casos se realiza un estudio porcentual de los diferentes tipos, así como de su diámetro y situación en el plano vertical mandibular.

PALABRAS CLAVE: Agujero mentoniano. Ortopantomografía.

SUMMARY

The appearance of the mental foramen of panoramic radiographs can be classified as a separated, continuous, diffuse, or unidentified. In a sample of 130 patients, the authors draw a porcentaje study of the several types, also study the diameter and situation on the mandible vertical plane.

KEY WORDS: Mental Foramen. Panoramic radiographs.

Introducción

La ortopantomografía es una variedad de radiografía (1, 2 y 3) panorámica basada en la tomografía de superficies curvas.

En su denominación, se incluyen sus principales características:

- *Orto*: Hace referencia a su ortogonalidad y por lo tanto al hecho de disponer de tres ejes de giro.
- *Tomografía*: Se realiza un corte tomográfico mediante el movimiento rotacional de barrido del foco radiante en cada uno de los ejes sumado al movimiento también rotacional de la película.
- *Pan*: Prefijo indicativo de que el corte tomográfico abarca toda la mandíbula.

Ideada por Numatta (4) y Heckmann (5) en 1939, no tuvo su aplicación práctica hasta 1949, año en el que Paatero (6) profesor de radiología dental en la Universidad de Helsinki aplicó su primer método durante su estancia en la Escuela de Medicina Dental de Seattle (2). Este primer método de Paatero, rotógrafo, utilizaba un movimiento simultáneo de la película y del paciente, manteniendo fijo el foco. Sólo poseía un centro de rotación y actualmente no se usa. En 1957 Hudson y col. (7) idearon el «Panorex» que poseía dos centros de rotación, variaba la velocidad

de la película y mantenía fija la cabeza del paciente haciendo girar al foco y a la película. Por último Paatero (8) (1962) en su segundo método, concibe a la mandíbula como una curva compuesta por tres arcos de distinto centro: uno central y dos laterales. La mejora conceptual que este hecho supuso respecto a la idea de los «dos ejes» estriba en que al conseguir descomponer más apropiadamente la forma de la mandíbula, la exposición de la misma es más ortogonal, y por lo tanto se introducen menos distorsiones.

Desde entonces hasta hoy el uso de la ortopantomografía se ha ido generalizando y aplicando en todas las áreas de la moderna estomatología, existiendo en la literatura multitud de trabajos acerca de su correcto uso e interpretación (9, 10 y 11). No obstante las imágenes obtenidas mediante ortopantomografía resultan en determinadas regiones anatómicas difíciles de interpretar tendiéndose hoy a racionalizar su uso mediante la aplicación de criterios de selección lógicos (12).

El agujero mentoniano localizado en la cara externa del cuerpo mandibular, por encima de la línea oblicua externa representa la apertura cortical vestibular del corto canal mentoniano, rama externa terminal del conducto alvéolo dentario inferior (13, 14). En el adulto caucasiano (13, 15) se sitúa equidistante entre los bordes superior e inferior de la rama horizontal mandibular, en el 50% de los casos entre las raíces de los dos bicúspides, en el 25% de los casos a nivel de la raíz de segundo bicúspide, en el 20% a nivel de la raíz del primer bicúspide y en el 5% de las ocasiones por detrás de la raíz del segundo premolar. En contadas ocasiones el agujero mentoniano puede ser doble, situándose junto al foramen normal o en un punto más o menos próximo a la sínfisis. Bertelli (13) describe un caso de agujero mentoniano triple. La dirección del canal óseo mentoniano es medial-ventral-caudal (16) emergiendo por él los vasos y el nervio mentoniano que inerva la mucosa y piel de los labios, glándulas bucales y mucosa vestibular desde el primer molar inferior hasta la línea media, siendo el elemento nervioso más susceptible de lesión en la práctica dental (17, 18).

El poderoso avance de la implantología y de la cirugía ortognática, exigen de la ortopantomografía información precisa y fidedigna acerca de las características del agujero mentoniano, información que se evidencia como insuficiente al establecer comparaciones con otros medios radiográficos más sofisticados (19) (TAC mandibular) pero de mayor coste social y riesgo biológico. El propósito de este trabajo se centra en el conocimiento de la clasificación del aspecto que radiográficamente puede presentar el agujero mentoniano (1) así como en la correlación de sus características radiográficas con los datos anatómicos ya conocidos (2).

Material y Métodos

Nuestro estudio analizó 130 ortopantomografías recogidas en el Hospital Universitario Nuestra Señora de Covadonga y en el Servicio de Odontopediatría de la Escuela de Estomatología de Oviedo. Sesenta de ellas pertenecían a mujeres y sesenta y dos a varones. Entre 20 y 40 años había sesenta y tres radiografías, por debajo de 20 años veintiséis y por encima de 40 años treinta y tres. Ocho fueron desechadas para el estudio.

Para la realización de nuestro trabajo utilizamos un aparato de la casa Siemens «Ortopantomograph 10» y películas Agfa Curix RP2 (5x12 in), manteniendo constante en todos los casos el tiempo de exposición (15 s) y ajustando el kw según la talla del paciente. Las películas fueron procesadas automáticamente por un «Gevamatic 60» (Agfa-Gevaert) e interpretadas independientemente por dos miembros de nuestro servicio (una de ellas pertenecientes al staff médico) en las tres horas subsiguientes a su revelado.

El aspecto radiográfico del foramen mentoniano se clasificó en cuatro tipos: (figuras 1 y 4).

- a) *Tipo I*: Separado del conducto alveolodentario inferior (figura 1-1).
- b) *Tipo II*: Continuo respecto al conducto alveolodentario inferior (figuras 1, 2).
- c) *Tipo III*: No identificable radiográficamente (figuras 1, 3).
- d) *Tipo IV*: Difuso en cuanto a sus bordes (figuras 1, 4).

La posición vertical del foramen mentoniano se estimó trazando una recta que pasase por su centro y midiendo las distancias existentes entre el borde alveolar superior y el contorno superior del agujero mentoniano (a) y la existente entre su contorno inferior y el borde basal mandibular (b) figura 2.

La apariencia radiográfica de mayor prevalencia en nuestro estudio fue la del tipo separado con un 64% del total. Representó el aspecto radiográfico de mayor frecuencia de presentación en todos los grupos de edad, salvo en los menores de 20 años, en los que el tipo no identificado ocupaba esa primera posición.

El segundo aspecto radiográfico de mayor prevalencia de presentación fue el del tipo continuo con un 34% del total, siendo el segundo en frecuencia de presentación en los grupos de pacientes por encima de 20 años (Tabla I).

El diámetro medio del agujero mentoniano fue en nuestro estudio de 3.4 mm. El tipo difuso presentó en cualquier grupo de edad mayor longitud de diámetro que los restantes tipos (Tabla II). El mayor diámetro determinado en nuestra serie media 4,0 mm. y correspondió a una mujer de 33 años.

La posición vertical del agujero mentoniano establecida en mm mediante la relación a/b (figura 2) nos demuestra como salvo en el grupo de pacientes por encima de 40 años el foramen mentoniano se encuentra más próximo al reborde basilar mandibular; particularmente verídica es esta aseveración en el tipo separado con respecto a los otros tipos radiográficos (Tabla III).

TABLA I: Prevalencia de presentación de los diferentes tipos radiográficos del agujero mentoniano.

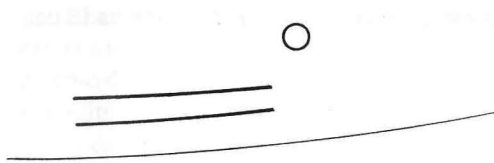
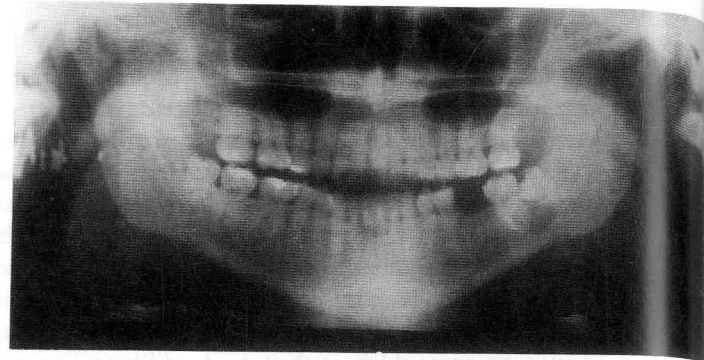
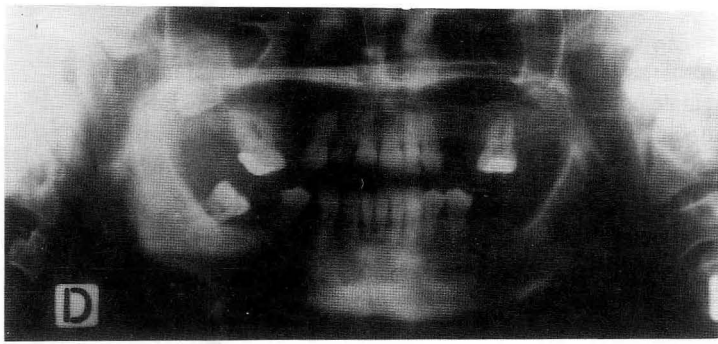
AGUJERO MENTONIANO	MENOS DE 20 AÑOS		ENTRE 20 Y 40 AÑOS		POR ENCIMA DE 40 AÑOS		TOTAL
	H	V	H	V	H	V	
TIPO SEPARADO	5	3	11	17	11	6	53 (64%)
TIPO CONTINUO	1	1	8	12	3	3	28 (34%)
TIPO NO IDENTIFICADO	6	5	6	2	3	1	23 (28%)
TIPO DIFUSO	2	3	2	5	2	4	18 (22%)
TOTAL	14	12	27	36	19	14	122

TABLA II: Diámetro medio del foramen mentoniano.

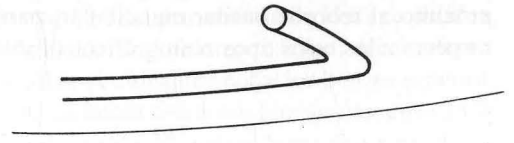
DIÁMETRO DE AGUJERO MENTONIANO	MENOS DE 20 AÑOS		ENTRE 20 Y 40 AÑOS		POR ENCIMA DE 40 AÑOS	
	H	V	H	V	H	V
TIPO SEPARADO	3,1 mm	3,3 mm	3,2 mm	3,5 mm	3 mm	3,1 mm
TIPO CONTINUO	3,2 mm	3,3 mm	3,6 mm	3,7 mm	2,9 mm	3,2 mm
TIPO DIFUSO	3,3 mm	3,6 mm	4,2 mm	3,9 mm	3,5 mm	3,8 mm
TIPO NO IDENTIFICADO	—	—	—	—	—	—

TABLA III: Posición media vertical del foramen mentoniano (mm).

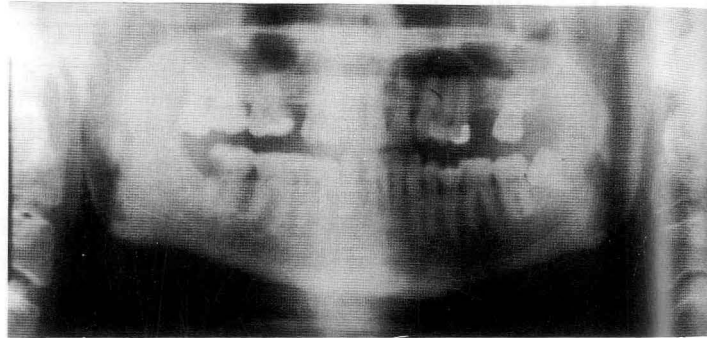
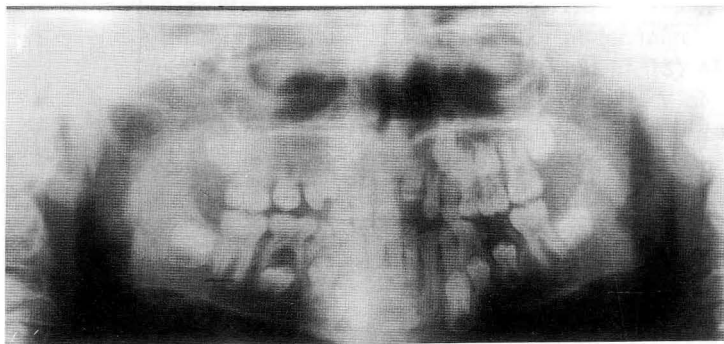
AGUJERO MENTONIANO	MENOS DE 20 AÑOS		ENTRE 20 Y 40 AÑOS		POR ENCIMA DE 40 AÑOS	
	H	V	H	V	H	V
TIPO SEPARADO	1,65 mm	1,63 mm	1,58 mm	1,51 mm	0,82 mm	0,78 mm
TIPO CONTINUO	1,26 mm	1,34 mm	1,42 mm	1,49 mm	0,79 mm	0,68 mm
TIPO DIFUSO	1,35 mm	1,42 mm	1,33 mm	1,50 mm	0,62 mm	0,98 mm
TIPO NO IDENTIFICADO	—	—	—	—	—	—



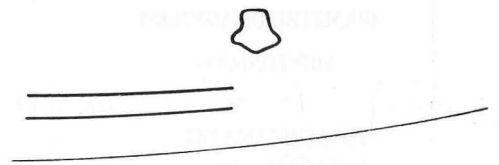
TIPO SEPARADO



TIPO CONTINUO



TIPO NO IDENTIFICADO



TIPO DIFUSO

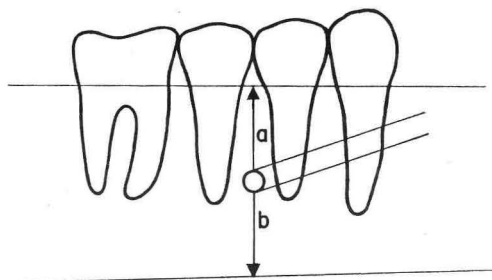


FIGURA 1. Clasificación del aspecto radiográfico del agujero mentoniano. Figura 1.1: Tipo separado. Figura 1.2: Tipo continuo. Figura 1.3: Tipo no identificado. Figura 1.4: Tipo difuso.
FIGURA 2. Determinación de la posición vertical del foramen mentoniano.

Discusión

En nuestro estudio el 64% de las radiografías presentaban un foramen mentoniano tipo separado, porcentaje similar al de otras series (21) en las que este tipo de aspecto radiográfico del agujero también era el de más frecuente visualización.

Fishell y Coll (22) señalan la no visibilidad radiográfica del agujero mentoniano en el 50% de sus placas retroalveolares. Esta circunstancia contrasta con el porcentaje encontrado por nosotros —tipo no identificado 28%— y se explica a nuestro entender por la diferente técnica radiográfica aplicada pues la ortopantomografía nos proporciona un campo radiológico más ancho, así como un mayor grado de angulación vertical y horizontal (23). En nuestro trabajo el tipo no identificado se presentó con singular frecuencia en los pacientes de menos de 20 años, circunstancia que explicamos por la superposición radiográfica que ocasionaban los gérmenes de los dientes permanentes. Otras causas de no identificación radiográfica del agujero mentoniano fueron la desmineralización mandibular, por la pérdida de contraste radiográfico que ello supone y la radiodensidad de la región premolar.

Aunque clásicamente se admite que el agujero mentoniano en los adultos se encuentra equidistante verticalmente de los rebordes mandibulares superior e inferior (13, 14), nuestra serie refleja su mayor proximidad hacia la basal mandibular. Este hecho puede explicarse no sólo por la angulación vertical que la ortopantomografía conlleva, sino que probablemente refleje que un cierto número de imágenes consideradas como agujero mentoniano correspondan en realidad a una sección del canal mentoniano que por su disposición medial-ventral-caudal se nos presenta más bajo en la película radiográfica. La mayor proximidad del agujero mentoniano al reborde alveolar superior en los pacientes mayores de 40 años es un hecho esperado si tenemos en cuenta la mayor incidencia de edentulismo posterior y la consecuente reabsorción centrífuga alveolar de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. CERNA, P. (1974): *Traité de radiodiagnostic*. V: 17-2. 7-12 Masson-Paris.
2. LAUDENBACH, P.; BONNEAU, E.; KORACH, G. (1977): *Radiographie panoramique dentaire et maxillo-faciales*. Masson-Paris.
3. STAFNE, E.; GIBILISCO, J. (1978): Diagnóstico radiológico en odontología, 391-394. Panamericana.
4. NUMATTA, H. (1933): Consideration on parabolic radiography in dental examination. *J. Shimazu Studies* **10**: 13.
5. HECKMANN, K. (1939): Die Röntgenperspektive und ihre unwandlung durch eine neue Aufnahmetechnik *Fortschr. Röntgenstr.* **60**: 144.
6. PAATERO, Y. (1949): A New tomographical method for radiographing curved outer surfaces. *Acta Radiol.* **32**: 177.
7. HUDSON, D.; KUMPULA, J.; DICKON, G. (1957): A Panoramic dental Xray machine. *U.S. armed forces med. J.* **8**: 46.
8. PAATERO, Y. (1962): On levels of radiation produced by the Orthopantomograph. *Spom. Hamma* **2**: 139-143.
9. JONES, J.; SEALS, R.; SCHELBE, E. (1985): Panoramic radiographic examination of edentulous patients. *J. of prosthetic d.V.* **53**: 535-539.
10. AMBROSIO, J.; SCHIFF, T.; DAVID, W.; LANGLAND, O. (1986): Diagnostic quality versus patient exposure with five panoramic screen film combinations. *Oral surg. Oral Med.* **61**: 409-11.
11. WARNICH, J. (1988): A clinical opinion survey of new fine detail panoramic radiographs. *Oral Surg. Oral Med.* **66**: 378-85.
12. WHITE, S.; FORSYTHE, A.; LIREKA, J. (1984): Patient-selection criteria for panoramic radiography. *Oral Surg. Oral Med.* **57**: 681-90.
13. TESTUT, L.; LATARJET, A. (1974): *Anatomía humana*. Tomo I: 247-251. Salvat.
14. SICHER, H.; DUBRUL, E. (1975): *Oral anatomy*. 6th ed. Louis: The CV Mosby Co: 424-430.
15. GREEN, R.: The position of the mental foramen: A comparison between the southern chinese and other ethnic.
16. EVERS, H.; HAEGERSTAM, G. (1983): *Manual de anestesia local en odontología*, 129-130. Salvat.
17. GIRARD, K. (1979): Considerations in the management of damage to the mandibular nerve. *J. am Dent Assoc* **98**: 65-71.
18. MOZSARY, P.; MIDDLETON, R.; SZABO, Z. (1982): Microsurgical treatment of traumatic neuroma of the inferior alveolar nerve *J. Oral Maxillofacial Surg* **40**: 446-448.
19. KLINGE, B.; PETERSSON, A.; MALY, P. (1989): Location of the mandibular canal: comparison of macroscopic findings, conventional radiography, and computed tomography. *Int. J. Maxillof.* **14**: 327-332.

20. SKOCZYLAS, L.; PREECE, J.; LANGLAIS, R.; McDAVID, W.; WAGGENER, R. (1989): Comparison of x-radiation doses between conventional Oral Surg Oral Med. **68**: 776-781.
21. YOSUE, T.; BROOKS, S. (1989): The appearance of metal foramina on panoramic radiographs I. Oral Surg. Oral Med. **68**: 360-364.
22. FISHEL, D.; BUCHNER, A.; HERSHKOWITH, A.; RAPPE, F. (1976): Roentgenologic study of the mental foramen. Oral Surg Oral Med. **41**: 681-686.
23. SHINOZIMA, M.; KOHIRAZAWA, H.; KUBOTA, K.; TOKUI, M. (1982): Tumorex (curved rotational tomography apparatus) in experimental and clinical practice. Oral Surg. Oral Surg. Oral Med. Januari 94-110.

Correspondencia: Dr. Luis Junquera Gutiérrez
Hospital N^o Señora de Covadonga
Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial
c/ Celestino Villamil, s/n
33005 Oviedo. España

EVOLUCIÓN Y MODIFICACIONES DE ANASTOMOSIS VASCULARES REALIZADAS POR INTUSUSCEPCIÓN

EVOLUTION AND MODIFICATION OF VASCULAR ANASTOMOSIS CARRIED OUT THROUGH THE TECHNIQUE OF INTUSSUSCEPTION

F. LOSTALÉ*, J. RODRÍGUEZ**, J. WHYTE*, A. WHYTE**, M. BESCÓS*
A. VILORIA**, S. PELLEJERO*, A. TORRES*, R. SARRAT*, R. SEVER**, J. ARIAS

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

** Unidad de Cirugía. Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza.

RESUMEN

Se ha analizado la evolución histológica de arterias renales, a las que se les practicó microanastomosis vascular mediante intususcepción y fijación de las arterias con un solo punto.

El material lo componen 15 ratas Wistar, machos, de pesos corporales comprendidos entre 250 y 300 gramos. Como medio de magnificación un microscopio quirúrgico Kop y como material de sutura nylon monofilamento 10/0. Para el estudio histológico hemos empleado la técnica de la Orceína.

En el curso operatorio sacrificamos dos animales por hemorragias y en el postoperatorio otro por presentar un aneurisma. Con los 12 que sobrevivieron se hicieron cuatro lotes de tres animales cada uno, posteriormente se sacrificaron los animales correspondientes a cada lote a los 15, 30, 90 y 360 días.

PALABRAS CLAVE: Estructura. Arteria renal. Microanastomosis. Rata.

SUMMARY

The purpose of this study is to analyze the histological evolution of the renal arteries in which a microanastomosis had been practised. The surgical technique used was the intussusception and fixation of the arteries by using only one stitch.

The material consist of 15 male Wistar Rats between 250 and 300 grams in weight; a surgical microscope Kop, used for magnifying, and 10/0 monofilament nylon for suture. The technique of Orcein was applied for the histological study.

Two rats were sacrificed during the operation due to haemorrhages and a third one after the operation because of aneurysm. The remaining 12 were divided into 4 groups of 3 animals. Each group of rats was later sacrificed in the space of 15, 30, 90 and 360 days.

KEY WORDS: Structure. Renal arterie. Microanastomosis. rat.

Introducción

La investigación en el trasplante de órganos exigé la puesta a punto de técnicas de anastomosis vascular de sencilla realización, y que cursen con un mínimo porcentaje de complicaciones (1).

Clásicamente las anastomosis en pequeños vasos se han realizado siguiendo técnicas de sutura manual continua o discontinua (2). No obstante y con el fin de simplificar estas técnicas se han descrito métodos de anastomosis vascular empleándose grapas (3), adhesivos (4), anillos (5), prótesis extravasculares (6) y el telescopaje vascular ideado por Lauritzen (7).

Nosotros venimos trabajando en anastomosis por intususcepción de diversos vasos arteriales (8).

En este trabajo se describe la evolución histológica de microanastomosis vasculares, realizados mediante intususcepción y fijación de las arterias con un solo punto, en las arterias renales.

Material y Métodos

Se han empleado 15 ratas Wistar, machos, de pesos corporales comprendidos entre 250 y 300 gramos. Como medio de magnificación un microscopio quirúrgico Kop y como material de sutura nylon monofilamento 10/0.

En estos animales se realizó autotransplante de riñón (9) siendo el riñón derecho anastomosado a los vasos renales izquierdos.

La anastomosis arterial se llevó a cabo mediante intususcepción de la arteria renal izquierda dentro de la derecha. Se anuda un punto sencillo en la superficie de sección de la arteria izquierda, a continuación se introduce el hilo de sutura por la luz de la arteria renal derecha y tras ser exteriorizado aproximadamente a 3 mm de su origen, se tracciona del hilo, lo que produce la introducción de la arteria renal izquierda en la derecha. La anastomosis queda concluida anudando el hilo sobre un borde de él mismo realizado mediante un pequeño punto en la arteria renal derecha.

Como complicaciones tuvimos que sacrificar dos animales por presentar hemorragias copiosas postdesclampaje y en un animal se detectó un aneurisma.

Con los 12 que sobrevivieron se hicieron cuatro lotes de tres animales cada uno, posteriormente se sacrificaron los animales correspondientes a cada lote a los 15, 30, 90 y 360 días.

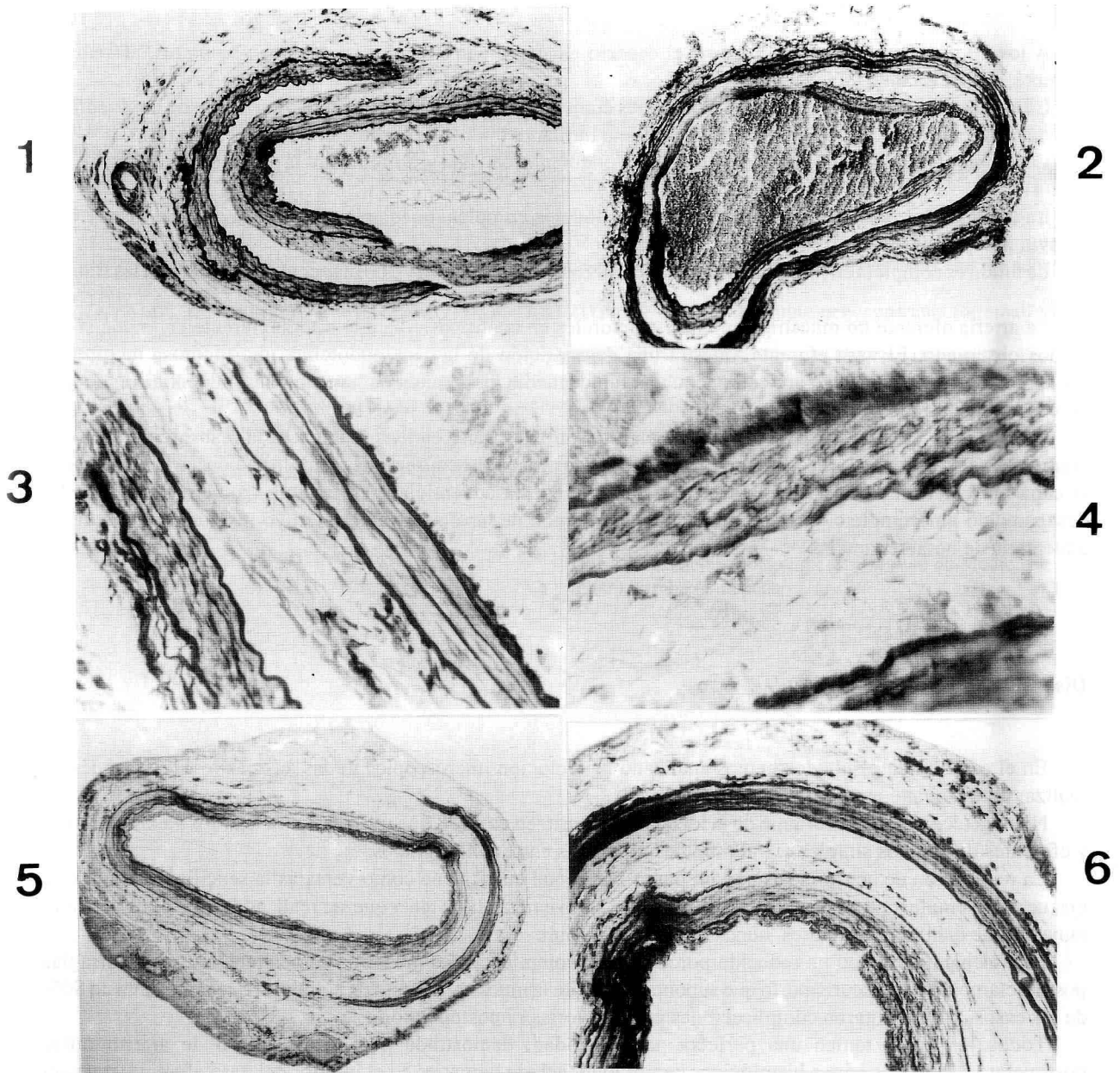
Las arterias renales, una vez sacrificado el animal, eran fijadas en formol al 10%, incluidas en Paraplas, cortadas en un microtomo Leitz a 7 micras y teñidas mediante la técnica de orceína para fibras de elastina.

Resultados

A los 15 días del postoperatorio observamos la existencia de dos segmentos vasculares aislados, unidos únicamente por escaso tejido conjuntivo.

El vaso aferente que ha sufrido la intususcepción conserva las características típicas de la arteria renal. Existe una perfecta delimitación del endotelio y la membrana elástica interna es compacta. En la túnica media la proporción entre las fibras musculares y el material elástico es bastante equilibrada, constituyendo las láminas elásticas auténticos compartimentos para los paquetes de fibras musculares. La adventicia está muy desarrollada, con predominio de fibras conjuntivas de colágeno. En el vaso eferente no hemos encontrado signos de alteración en el patrón estructural.

Muestra evidente de la permeabilidad del vaso aferente es la presencia de gran cantidad de hematíes en su interior (fig. 1).



- FIGURA 1.** Arteria renal a los 15 días de la intususcepción. Nótese la existencia de los dos segmentos vasculares, aferente y eferente, separados entre sí por un amplio espacio intervascular y unidos únicamente por escaso tejido conjuntivo. 10 x, Orceña.
- FIGURA 2.** Arteria renal a los 30 días de la intususcepción. Nótese la presencia del conjuntivo que cierra el espacio intervascular. 10 x, Orceña.
- FIGURA 3.** Arteria renal a los 30 días de la intususcepción. Detalle donde apreciamos la existencia de tabiques que parten desde la adventicia del vaso aferente y se dirigen a buscar la membrana limitante interna del vaso eferente. 40 x, Orceña.
- FIGURA 4.** Arteria renal a los 30 días de la intususcepción. Detalle del tejido conjuntivo que cierra el espacio intervascular. 40 x Orceña.
- FIGURA 5.** Arteria renal a los 360 días de la intususcepción. Nótese como el cierre del espacio intervascular es completo y el vaso eferente, en su porción media e izquierda, se está reabsorbiendo. 10 x Orceña.
- FIGURA 6.** Arteria renal a los 360 días de la intususcepción. Detalle de la estructuración de los segmentos aferente y eferente. 20 x Orceña.

A los 30 días hemos observado cómo el espacio existente entre los dos segmentos vasculares, aferente y eferente, se va cerrando (fig. 2).

Este cierre es debido al crecimiento de tabiques conjuntivos que a modo de puentes, parten desde la adventicia del vaso aferente y se dirigen a buscar la membrana limitante interna del vaso eferente (fig. 3).

Las fibras conjuntivas adoptan una disposición ondulante, con una gran abundancia de fibroblastos entre ellas (fig. 4)

La unión de los dos vasos en este tiempo no es todavía completa quedando zonas en la que los vasos están todavía independizados.

La unión es completa en los lotes de ratas en los que ha transcurrido 90 y 360 días como se observa en las figuras 5 y 6.

La arteria aferente no muestra cambios estructurales en contraposición a la arteria eferente en la que sí los hemos observado. El vaso eferente muestra una desaparición de la capa endotelial, una vigorosa membrana limitante interna, festoneada pero compacta, una túnica media disminuida de tamaño y una adventicia en la que no hemos encontrado cambios (fig. 6).

En la figura 5 observamos un hecho que para nosotros es trascendental, como es la reabsorción del vaso eferente. En la parte derecha de la imagen tenemos a los dos vasos que conservan la estructuración, en la parte media la capa muscular empieza a desaparecer mezclándose con la adventicia y en la parte izquierda esta capa ha desaparecido por completo, quedando únicamente la unión de las dos adventicias cuyo resultado es una única adventicia de notable tamaño.

Discusión

En el capítulo de resultados hemos analizado la evolución microscópica de las arterias renales después de realizar un trasplante renal ortotópico.

Nuestra técnica es una variante de la ideada por Lauritzen en 1978 que utilizaba para fijar los vasos aferentes y eferentes dos puntos simples extraluminales separados entre sí 180 grados.

La realización de anastomosis con un punto horizontal en U, tiene como ventajas la sencillez y rapidez de ejecución, al emplear un solo punto de sutura. Como inconveniente la de tener que ser realizada en vasos de pequeño tamaño y de diámetros similares, nunca mayores de 2 mm.

Esta técnica cursa con un reducido porcentaje de complicaciones, nosotros hemos tenido dos hemorragias postdesclampaje y un aneurisma, lo que supone un 20% de la muestra. El resto de animales, que representa un 80% de los casos, no presentaron complicaciones peroperatorias ni postoperatorias.

Todos los vasos tenían una perfecta permeabilidad, demostrada por la realización de arteriografías postoperatorias. En los cortes histológicos hemos evidenciado hematíes en el interior del vaso aferente, muestra inequívoca de la permeabilidad de dicho vaso.

No hemos encontrado ningún estudio estructural que analice los cambios que han sufrido los vasos anastomosados por intususcepción a tan largo tiempo.

Nosotros pensamos que en un primer tiempo la unión de los dos segmentos se realiza mediante puentes conjuntivos que partiendo de la adventicia de vaso aferente se dirigen a la capa íntima del eferente. Transcurrido el tiempo, el espacio existente entre ambos vasos se ocluye con una proliferación del tejido conjuntivo.

En un último estadio, el vaso eferente se reabsorbe y desaparece. Nosotros esta reabsorción, aunque no completa, la hemos observado en los cortes seriados de las arterias renales del lote de 360 días.

Pensamos que esta reabsorción del segmento eferente será completa cuando haya transcurrido más tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, G.; LORENTE, L.; ARIAS, J.; BRANDAN, D.; DURÁN, J. (1987): Técnicas microquirúrgica de anastomosis vasculares sin sutura en el transplante experimental de órganos. *AVEPA* **7(1)**: 12-16.
- FISCHER, B.; LEE, S. (1965): Microvascular surgical techniques in research, with special reference to renal transplatation in the rat. *Surgery*. **58 (5)**: 904-914.
- MCDONALD, J.C.; KUKUDA, A. (1966): Rabbit renal homograt. I. Technique for grafts to the neck. *Surgery*. **59 (6)**: 1.156-1.158.
- HAFNER, C.D.; FOGARTY, T.J.; CRANLEY, J.J. (1963): Nonsuture anastomosis of small arteries using a tissue adhesive. *Surg. Gynecol. Obstet.* April 417-419.
- NAKAYAMA, K.; TAMIYA, T.; YAMAMOTO, K.; AKIMOTA, S. (1962): A simple new apparatus for small vessel anastomosis. *Surgery*. **52 (6)**: 918-931.
- JIMÉNEZ, G.; RODRÍGUEZ, J.; LORENTE, L.; DE PEDRO, J.A.; ARIAS, J.; BRANDAN, D. (1988): Técnicas microquirúrgicas de transplante ortotópico renal en la rata. *Rev. Quir. Esp.* **15 (3)**: 148-152.
- LAURITZEN, C. (1978): A new and easier way to anastomose microvessels. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **12**: 291-294.
- RODRÍGUEZ, J.; ARIAS, J.; WHYTE, J.; LORENTE, L.; WHYTE, A.; LEUZA, A. (1991): Arterial microanastomosis technique by using only one stitch. *Surgery*. **76 (2)**: 112-114.
- VALDIVIA, J.G.; LÓPEZ, J.A.; TABERNER, J.; ROMERO, F. (1983): Transposición renal ortotópica contralateral en la rata». *Arch. Esp. Urol.* **36**: 9-15.

Correspondencia: Dr. F. Lostalé Latorre
Dpto. de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
50009 Zaragoza. España



VARIACIONES ANATÓMICAS DE LA VENA POPLÍTEA

ANATOMICAL VARIATIONS OF THE POPLITEAL VEIN

A. MARTÍNEZ-ALMAGRO, V. ALMENAR, R. PÉREZ

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Universidad de Valencia

RESUMEN

Se describe un caso de doble vena poplítea, principal y accesoria, en el que la vena accesoria se configura como un grueso vaso, satélite del nervio ciático poplíteo interno, y que tiene su origen en el músculo glúteo mayor y en un ramo anastomótico importante con la vena femoral profunda. No se ha evidenciado alteración patológica alguna a lo largo del recorrido vascular poplíteo-femoral.

PALABRAS CLAVE: Vena poplítea. Vena poplítea accesoria. Vena poplítea doble.

SUMMARY

A case of double popliteal vein, main and accessory, in which the accessory vein shapes as a thick vase, satellite of the internal popliteal sciatic nerve, having its origin in the high gluteus muscle and in an important anastomotic branch with the deep femoral vein, is described. No pathological alteration during the popliteo-femoral vascular way has been evident.

KEY WORDS: Popliteal vein. Accessory popliteal vein. Double popliteal vein.

Introducción

La vena poplítea es una vena profunda, satélite de la arteria del mismo nombre, que está situada por detrás y externa a ella y envuelta por la misma vaina muscular (11).

Tiene su origen a nivel del anillo del sóleo, en íntima relación con el borde inferior del músculo poplíteo (6, 10) y resulta de la fusión de los troncos venosos tibio-peroneos y las venas tibiales anteriores. Constituida como una gran vena, asciende buscando el anillo del músculo aductor mayor, para introducirse en el conducto de Hunter y pasar a ser femoral superficial (9, 11, 14).

Ocupando el hueco poplíteo junto con la arteria, los nervios ciático poplíteo interno y externo, los linfáticos y el paquete célula-adiposo, la vena poplítea recibe fundamentalmente la afluencia de las venas articulares, las venas de los gemelos y la voluminosa safena externa (2, 11).

Material y Métodos

Corresponde al material humano que se utiliza de manera habitual en la docencia práctica de la anatomía humana en el Departamento de Ciencias Morfológicas de nuestra Facultad de Medicina.

Se descubrió en un cadáver varón, de 58 años y 1,68 m. de estatura, sin patología de interés a excepción de un proceso degenerativo hepático.

Siguiendo el método disectivo habitual, se puso de manifiesto el hueco poplíteo y su contenido a lo largo del curso académico 1990-91, encontrándonos con la variación anatómica que se describe y que hemos estudiado y fotografiado convenientemente.

Resultados

Se ha descubierto una duplicación de la vena poplíteo izquierda (figuras 1 y 2), al disecar el hueco poplíteo de un cadáver que no presentaba patología en la extremidad inferior estudiada.

En la preparación anatómica, hemos podido observar la fusión de los afluentes venosos tibiales y peroneos para dar lugar a una única vena poplíteo.

Este grueso tronco poplíteo, sigue un trayecto ascendente y ligeramente oblicuo y hacia adentro, siendo cruzado en superficie por el nervio ciático poplíteo externo. Cuando dista 32 mm del cóndilo externo del fémur, se observa una bifurcación: un tronco grueso que se va haciendo cada vez más interno y otro, de menor entidad, que sigue un trayecto ascendente y se sitúa junto al nervio gran ciático en la mayor parte de su recorrido.

El tronco de mayor categoría, al que podríamos denominar vena poplíteo principal, ha seguido una dirección discretamente oblicua interna y se ha introducido por el anillo aductor de acceso al conducto de Hunter. El seguimiento de este vaso, nos ha llevado a reconocer su continuidad con una vena femoral superficial de configuración y trayecto normales.

En cuanto al otro vaso, al que podríamos asignar la denominación de vena poplíteo accesoria, sigue un trayecto ascendente, paralelo al nervio gran ciático y situado topográficamente entre el músculo gran aductor y el bíceps femoral.

A lo largo de su recorrido, la vena poplíteo accesoria recibe algunos vasos procedentes del músculo bíceps femoral y termina bifurcándose en el borde inferior del músculo glúteo mayor por medio de un vaso externo y otro interno.

La rama externa de la bifurcación descrita, se introduce en la masa muscular glútea y se resuelve en multitud de pequeñas anastomosis con los plexos venosos isquiático y circunflejo fundamentalmente.

Por lo que se refiere a la rama interna de la bifurcación, atraviesa la musculatura aductora y desemboca en la cara profunda de la vena femoral común.

De las dos ramas descritas, parece que la interna sea la continuidad de la vena poplíteo accesoria hacia la femoral, puesto que la externa, se abre en varias ramas de menor calibre que se pierden por el espesor de la masa muscular glútea así como por las escotaduras infrapiramidales y ciáticas inferiores.

Discusión

El hecho de una vena poplíteo única, es muy discutido por distintos investigadores, quienes sostienen que algunos individuos presentan, por fuera de la arteria, una segunda vena que, a modo de conducto anastomótico lateral, presenta un calibre considerablemente menor que la vena poplíteo principal. En uno de ellos, la duplicación se extendía sobre la femoral hasta el tercio superior del muslo (3, 5, 12).

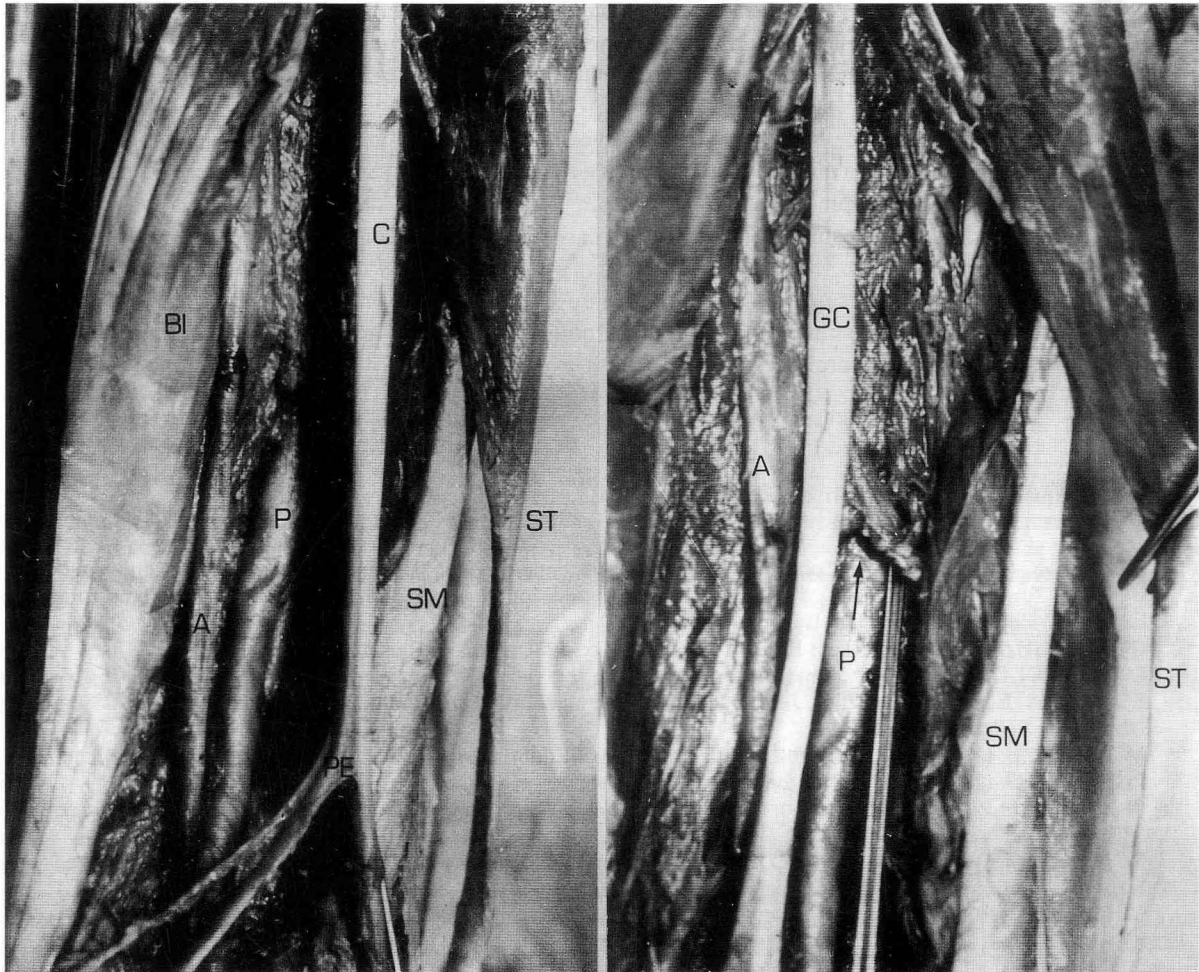


FIGURA 1. Hueco poplíteo: porción superior.

ST: Músculo semitendinoso. SM: Músculo semimembranoso. BI: Músculo bíceps femoral. C: Nervio gran ciático. PE: Nervio ciático poplíteo externo. P: Vena poplíteo principal. A: Vena poplíteo accesoria.

FIGURA 2. Hueco poplíteo: detalle.

ST: Músculo semitendinoso. SM: Músculo semimembranoso. GC: Nervio gran ciático. P: Vena poplíteo principal (obsérvese una sonda acanalada que acompaña al vaso y se introduce en el conducto de Hunter—flecha—). A: Vena poplíteo accesoria.

Otras veces, la vena poplítea, en lugar de seguir a la arteria a través del anillo del tercer aductor, se remonta a lo largo de la región posterior del muslo hasta una altura variable. Después, perfora aisladamente al grupo muscular aductor y vuelve a juntarse a la femoral en la ingle (10).

En ocasiones excepcionales, la duplicación de la vena poplítea forma a modo de un plexo alrededor de la arteria, con un tronco por delante y otro por detrás (1).

La variabilidad en la constitución de la vena poplítea que hemos podido constatar en la literatura consultada, estará en íntima relación con la fusión de sus troncos venosos constitutivos. Téngase presente, que la unión de tibial anterior y peronea, podría originar un tronco venoso poplíteo menor; mientras que la fusión de las tibiales posteriores daría origen a la vena poplítea principal, aunque esto no excluye cualquier otro tipo de posibilidad (4, 7).

Las diferentes variaciones de la vena poplítea, se unen generalmente a unos 5 cm por encima del nivel de la articulación de la rodilla, pero puede darse algún caso extraordinario en el que esto no ocurra hasta la mitad del muslo aproximadamente (13).

Nuestra experiencia, nos hace disentir de las observaciones de Picqué y Pigache (8), quienes llegaron a la conclusión de que la vena poplítea nunca era única. En su casuística, de 42 sujetos estudiados, en 39 describen una vena poplítea doble, e incluso triple en los tres restantes.

Por último, considerar que Testut (11), describe dos casos de vena poplítea siguiendo el trayecto de la arteria isquiática; mientras que nosotros, hemos presentado una vena poplítea de constitución, situación y trayecto normales, y una vena poplítea accesoria o anastomótica que, situándose en profundidad en la cara posterior del muslo, parece seguir un trayecto similar al de la arteria isquiática, aunque se resuelve en la masa muscular glútea por un lado y llega a la vena femoral por otro.

BIBLIOGRAFÍA

1. BERGMAN, R.A. *et al.* (1988): Compendium of human anatomic variation. Urban & Schwarzenberg. Baltimore, pp. 93.
2. BOUCHET, A. y CUILLERET, J. (1979): Anatomía descriptiva, topográfica y funcional: Miembros inferiores. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, pp. 159-160.
3. CUNNINGHAM, B. (1951): Text Book of Anatomy. Oxford University Press. London, pp. 368.
4. DAVIDSON, D.G. (1891): Abnormal arrangement of the veins about the popliteal space. *J. Anat. Physiol.* **25**: 154-163.
5. EDWARDS, E.A. and ROBUCK, J.D. (1947): Applied anatomy of the femoral vein and its tributaries. *Surg. Gyn. Obstet.* **85**: 547-557.
6. MOORE, K.L. (1986): Anatomía con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2ª ed., pp. 392.
7. PATURET, G. (1951): *Traité d'anatomie humaine II*. Masson et Cie. ed. Paris, pp. 193.
8. PICQUE, R. et PIGACHE, R. (1909): Contribution a l'étude des veines profondes du membre inférieur. *J. Anat.* **45**: 537-549.
9. ROUVIERE, H. y DELMAS, A. (1987): Anatomía Humana descriptiva, topográfica y funcional: Miembros y Sistema Nervioso Central. Masson, S.A. Barcelona, 9ª ed. pp. 461-462.
10. SNELL, R.S. (1984): Anatomía Clínica. Nueva Editorial Interamericana. México, pp. 519-522.
11. TESTUT, L. y LATARJET, A. (1973): Tratado de Anatomía Humana II. Salvat Editores, S.A. Barcelona, 9ª ed., pp. 494-496.
12. TESTUT, L. y JACOB, O. (1972): Tratado de Anatomía Topográfica con aplicaciones médico-quirúrgicas II. Salvat Editores, S.A. Barcelona, 8ª ed., pp. 981.
13. WILLIAMS, A.F. (1953): The formation of the popliteal vein. *Surg. Gyn. Obstet.* **97**: 769-772.
14. WILLIAMS, P.L. Y WARWICK, R. (1985): Gray. Anatomía I. Salvat Editores, S.A. Barcelona, pp. 836.

Correspondencia: Dr. A. Martínez-Almagro
Dpto. Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Valencia. España

SOBRE LAS YEMAS EPENDIMARIAS DEL TERCER VENTRÍCULO DEL ERIZO
(*Erinaceus europaeus*)

ON THE EPENDYMAL BLEBS OF THE THIRD VENTRICLE OF THE HEDGEHOG
(*Erinaceus europaeus*)

F.E. PASTOR, B. PELÁEZ, J. L. BLÁZQUEZ,
A. SÁNCHEZ, D. TORANZO, G. AMAT y P. AMAT

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo de erizos adultos de ambos sexos capturados y sacrificados en primavera. Al igual que en otras especies de mamíferos la pared lateral del ventrículo está cubierta por dos tipos de epitelio, ciliado y no ciliado, separados por una zona de transición. En la zona ciliada existen repliegues del epéndimo menos marcados que en otras especies animales. En la zona de transición y en las zonas no ciliadas son muy abundantes las yemas endimarias, que aparecen como protrusiones esféricas de 1 a 5 µm de diámetro. Se discute el posible papel de dichas yemas en relación con los procesos de secreción endimaria.

PALABRAS CLAVE: Yemas endimarias. Secreción endimaria. Tercer ventrículo. Microscopía electrónica de barrido. Erizo.

SUMMARY

A scanning electron microscopic study was made of the endymal lining of the third ventricle of adult hedgehogs of both sexes captured and sacrificed in spring. As in other mammalian species, the lateral wall of the ventricle is lined by two types of epithelium, ciliated and non-ciliated, that are separated by a transition zone. In the ciliated zone there are infoldings of the endyma that are less pronounced than in other animal species. In the transition zone and in the non-ciliated zones endymal blebs are very abundant; these appear as spherical protrusions measuring 1-5 µm in diameter. The possible role of these blebs with respect to the processes of endymal secretion is discussed.

KEY WORDS: Endymal blebs. Endymal secretion. Third ventricle. Scanning electron microscopy. Hedgehog.

Introducción

Desde que Löfgren (1959a,b; 1960; 1961) planteó la hipótesis de que los *tanicitos*, unas células endimarias especializadas del tercer ventrículo descritas por vez primera por Horstmann (1954), podrían intervenir en los mecanismos hipotalámicos de regulación de las funciones adenohipofisarias, han sido muy numerosos los estudios

realizados sobre el epitelio endimario de las paredes del ventrículo diencefálico. Así, en la actualidad está perfectamente demostrado que el epéndimo que reviste el sistema ventricular del neuroeje no es una simple barrera inerte entre el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el sistema nervioso, sino que ejerce importantes funciones (véanse Scott y col., 1974a, 1982; Peters y col., 1976; Rodríguez, 1976; Mestres, 1978; Amat y col., 1981, 1991a; Kozlowski, 1982; Amat, 1989; Amat Peral, 1991).

En la revisión que sobre la ultraestructura del sistema nervioso realizaron Peters y col. (1976), estos autores señalan como funciones del epéndimo las siguientes: movimiento del LCR, proliferación, soporte, función sensorial, transporte de sustancias y secreción. Dentro de esta última función es necesario distinguir entre la liberación de sustancias por elementos supraependimarios intraventriculares, tales como células neuroendocrinas y fibras nerviosas, entre ellas cuerpos de Herring (véanse Peters y col., 1976; Pastor y col., 1981, 1982, 1991a), y la propia secreción hacia la luz ventricular por parte del revestimiento endimario. El sustrato morfológico de esta secreción endimaria estaría constituido por yemas propulsadas del polo apical de los endimocitos, que se liberarían hacia la luz ventricular mediante un proceso de tipo apocrino (véase Pastor y col., 1981). Estas yemas endimarias han sido descritas en los ventrículos cerebrales de diversas especies animales, tanto con microscopía electrónica de transmisión como de barrido (Leveque y col., 1966; Knowles y Anand Kumar, 1969; Schechter y Weiner, 1972; Brawer y col., 1974; Scott y col., 1974a, 1976, 1982; Booz, 1975, 1979; Hannah y Geber, 1977; Hetzel, 1977; Scott y Paull, 1977; Stumpf y col., 1977; Flament-Durand y col., 1978; Coates y Davis, 1979; Rajtová, 1990; Álvarez-Morujó y col., 1990)

En el presente trabajo hemos realizado un estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del erizo (*Erinaceus europaeus*), un mamífero placentario muy primitivo (clase *Mammalia*, subclase *Theria*, infraclase *Eutheria*, orden *Insectivora*), prestando particular atención a las yemas endimarias, muy abundantes en esta especie animal.

Material y Métodos

Para nuestro estudio hemos utilizado siete erizos adultos, tres machos y cuatro hembras, capturados y sacrificados en primavera. Bajo anestesia con tiopental sódico (30 mg/kg peso) los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con una solución fijadora de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C. Tras permanecer 12 horas en el fijador, los bloques diencefálicos fueron tallados sagitalmente para exponer las paredes laterales del tercer ventrículo del cerebro. Las piezas resultantes se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón fosfato, se deshidrataron con acetonas, se desecaron mediante el punto crítico de CO₂, se metalizaron con oro y se observaron con un microscopio electrónico de barrido Philips PSEM 500.

Resultados

El estudio del tercer ventrículo del erizo con el microscopio electrónico de barrido muestra que su epéndimo es de dos tipos, ciliado y no ciliado. El epitelio no ciliado corresponde al revestimiento del receso infundibular y del receso mamilar, mientras que el resto del epéndimo se caracteriza por una gran abundancia de cilios. Dentro del territorio ciliado de la pared lateral del ventrículo llama la atención la existencia de rugosidades del epéndimo, correspondientes a áreas surcadas (fig. 1).

El epéndimo ciliado y el no ciliado están separados por una zona de transición (figs. 2 a 4), en la que alternan células endimarias ciliadas con otras carentes de cilios. Los cilios se observan aislados (fig. 2) o en forma de penachos (figs. 3 y 4).

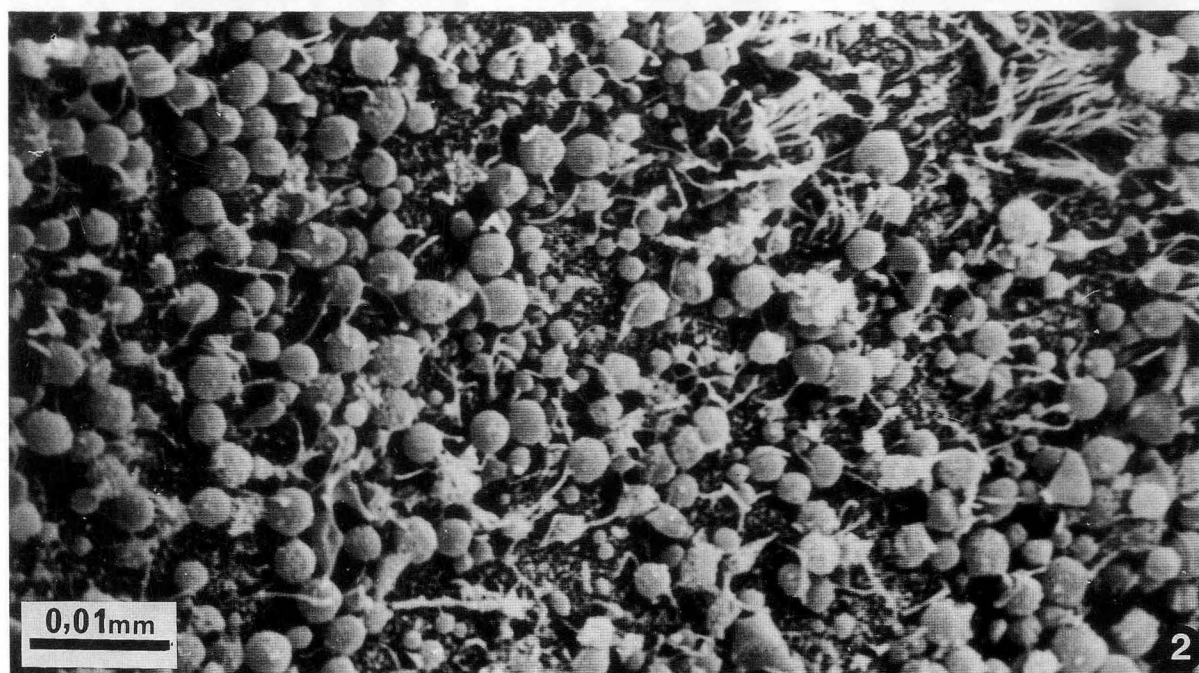
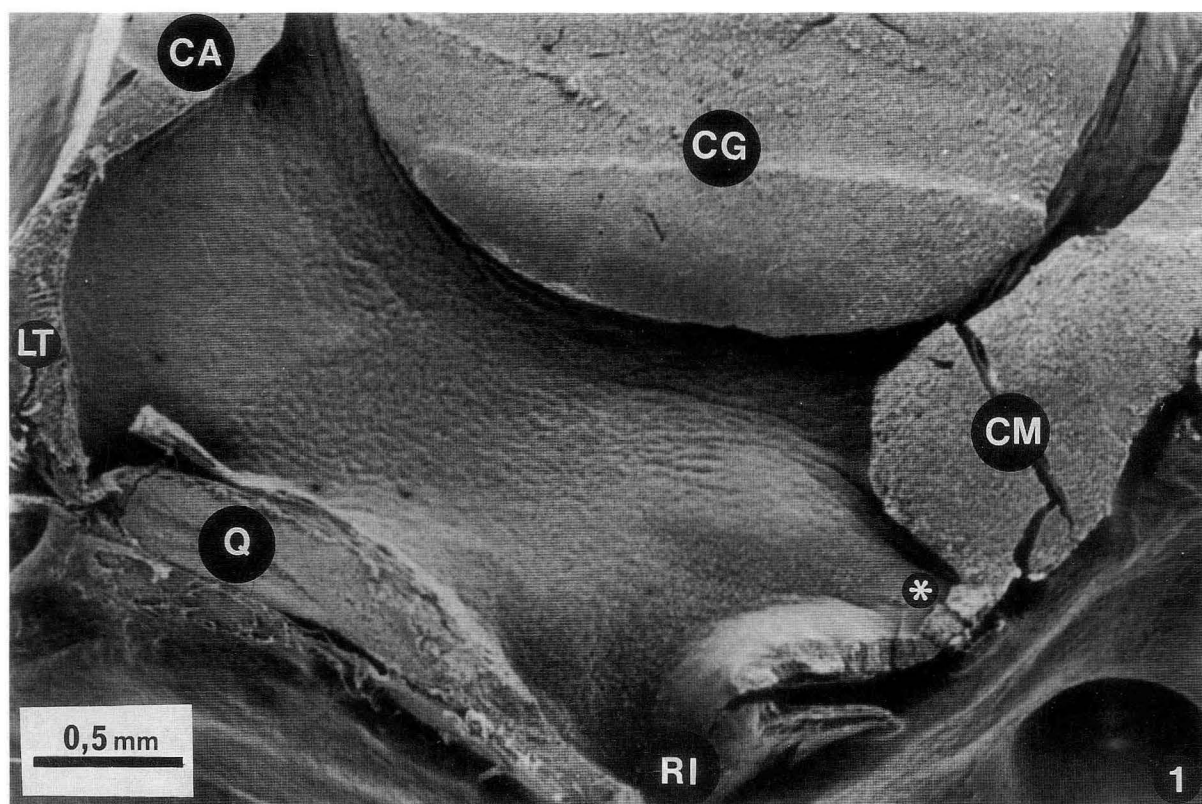


FIGURA 1. Pared lateral derecha de un erizo macho. CA=comisura blanca anterior. CG=comisura gris intertalámica. CM=cuerpo mamilar. LT=lámina terminal. Q=quiasma óptico. RI=receso infundibular. *=receso mamilar.

FIGURA 2. Detalle a mayores aumentos de la porción dorsal del receso infundibular de un erizo macho. Obsérvese la gran cantidad de yemas propulsadas de los polos apicales de los ependimocitos y algunos cilios aislados.

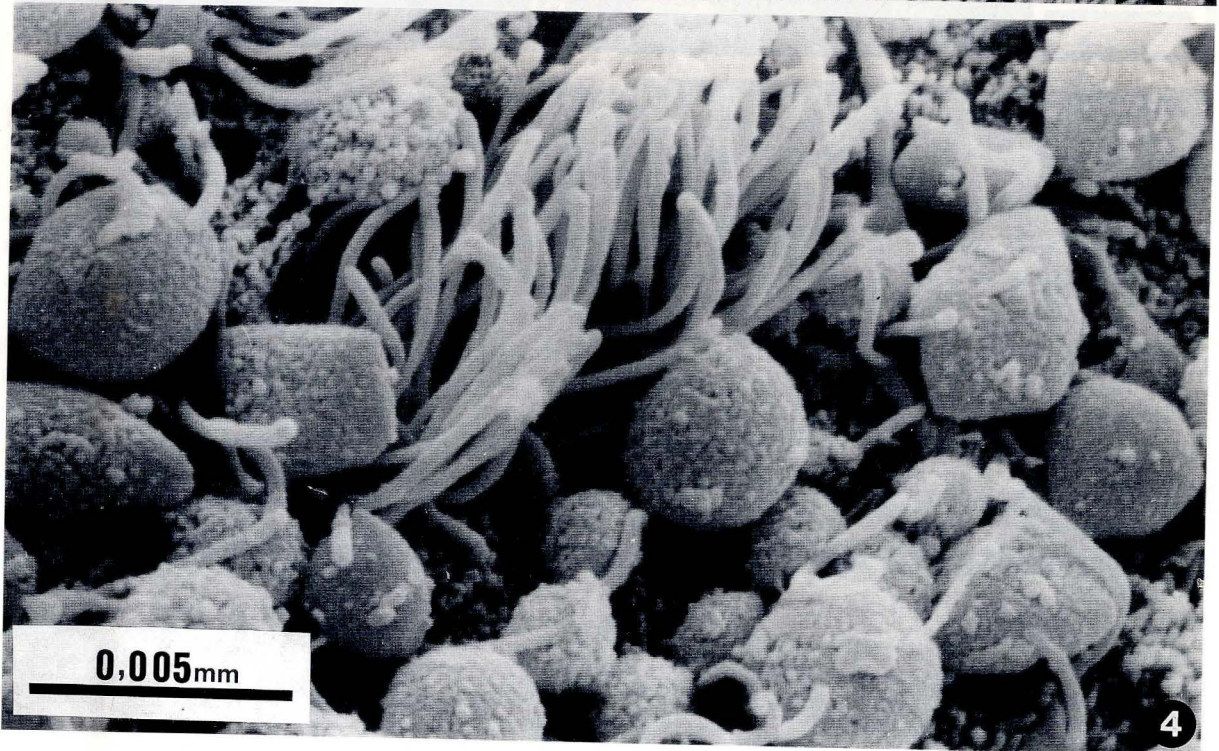


FIGURA 3. Pared lateral del receso mamilar de un erizo hembra. A nivel de la zona de transición se observan penachos aislados de cilios y yemas endimarias.

FIGURA 4. Zona de transición del receso infundibular de un erizo hembra. Alrededor de un penacho de cilios se observan varias yemas endimarias, algunas de las cuales muestran pequeñas esférulas sobre su superficie.

En la zona de transición, tanto a nivel de la porción dorsal del receso infundibular (fig. 2) como en el receso mamilar (fig. 3 y 4), son extraordinariamente abundantes unas yemas citoplasmáticas, esféricas, de 1 a 5 μm de diámetro, que desde los polos apicales de los endimocitos se propulsan hacia el interior del ventrículo. A grandes aumentos, se observa que la superficie de estas yemas intraventriculares es ligeramente rugosa (fig. 4); a veces sobre ellas hay abultamientos muy pequeños a modo de esférulas (fig. 4).

Discusión

El examen con los pequeños aumentos del microscopio electrónico de barrido permite observar superficies muy extensas; en el caso de las paredes laterales del tercer ventrículo del erizo, éstas pueden verse en su totalidad, mostrándonos así, como ha sido descrito más arriba, la existencia de territorios ciliados y no ciliados, al igual que ocurre con otras especies de mamíferos (véanse Scott y col., 1974a; Mitro y Palkovits, 1981; Amat y col., 1981). También se han visto las áreas surcadas, si bien en el erizo son menos patentes y sistematizables que en el gato (Pastor y col., 1991b). Este dato está de acuerdo con los de Friede (1961) quien, en su estudio comparado sobre las áreas surcadas de diferentes especies de mamíferos, observó que el desarrollo de las áreas surcadas estaba en relación directa con el tamaño del cerebro o de sus ventrículos.

A mayores aumentos, el microscopio electrónico de barrido muestra detalles más finos de la superficie endimaria del tercer ventrículo del erizo, tales como las yemas intraventriculares, que por el aspecto de su superficie recuerdan a las protrusiones endimarias del tercer ventrículo de fetos de hámster (Hannah y Geber, 1977).

En el territorio ciliado de las paredes del tercer ventrículo, no hemos observado yemas endimarias, lo cual no significa que no existan a este nivel, pues es tal la cantidad de cilios que éstos impiden ver el polo apical de los endimocitos. De hecho, en la literatura se han descrito bulbos endimarios similares a las yemas observadas por nosotros tanto en el endimo ciliado como en el no ciliado (véase Scott y col., 1982).

La existencia en distintas especies animales de yemas citoplasmáticas propulsadas desde el polo apical de células endimarias es un hecho bien documentado en la actualidad (véase apartado de Introducción), habiéndose relacionado generalmente estas formaciones con un proceso de secreción. Muchas de estas yemas contienen partículas similares a ribonucleoproteínas (Scott y col., 1974a; Booz, 1975; Kozlowski, 1982) y poseen un *retículo terminal* en su base de implantación en el citoplasma de la célula matriz (Booz, 1975, 1979; Hannah y Geber, 1977; Pastor y col., 1981). Este retículo terminal, que no se observa con el microscopio electrónico de barrido (en realidad, solamente es visible en los cortes ultrafinos examinados con el microscopio electrónico de transmisión), impediría la difusión de los organitos celulares hacia el interior de la yema con excepción del hialoplasma y de los ribosomas e incluso determinaría la formación y el estrangulamiento de la yema mediante su contracción (Freeman, 1972), lo que daría lugar a una secreción de tipo apocrino.

¿Qué significado puede tener la secreción de sustancias hacia el LCR de la luz ventricular? En relación con esta cuestión es necesario señalar que el LCR es un medio propicio para el mantenimiento de la actividad biológica de tales sustancias. En efecto, la TRH administrada intraventricularmente es capaz de estimular la liberación de TSH por la adenohipófisis (Oliver y col., 1975), e igualmente la neurotensina (Clineschmidt y McGuffin, 1977) y la vasopresina (Berntson y Berson, 1980) mantienen sus propiedades antinociceptivas en este medio.

Con respecto al destino de las sustancias liberadas hacia el LCR, se ha demostrado que pueden ser transportadas por los tunicitos de la eminencia media hacia los capilares del plexo porta hipofisario (Silverman y Knigge, 1972; Silverman y col., 1972; Scott y col., 1974b; Oliver y col., 1975), por lo que podrían actuar sobre la adenohipófisis, constituyendo así la vía alternativa propuesta por Löfgren (1959a,b, 1960, 1961) para explicar el control hipotalámico sobre las funciones adenohipofisarias. Por otra parte, la actuación de las sustancias segregadas hacia el LCR podría ejercerse sobre el tejido nervioso inmediatamente vecino a la luz ventricular. En este sentido hay que indicar que en el territorio del núcleo arcuato del hipotálamo no existe capa glial subependimaria (Christ, 1951; Nowakowsky, 1951), por lo que las neuronas de este núcleo están separadas del

LCR del tercer ventrículo sólo por la capa endimaria. Además, se ha señalado que el núcleo arcuato necesita del LCR para realizar su actividad (Krisch, 1986). Por tanto es lógico pensar que uno de los lugares de actuación de las sustancias contenidas en el LCR podría ser el núcleo arcuato del hipotálamo. Nuestro grupo ha descrito recientemente en la rata la existencia de una prolongación lateral del receso infundibular que extiende la luz ventricular inmediatamente por debajo del territorio del núcleo arcuato (Amat, 1989; Amat y col., 1991a,b; Amat Peral, 1991). Esta prolongación supone un incremento de la superficie de contacto del núcleo arcuato con la luz ventricular, lo que favorecería los procesos de transporte o difusión desde el LCR hacia ese territorio hipotalámico.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín por su asistencia técnica. Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 288/84).

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ-MORUJO SUÁREZ, A.J.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; BLÁZQUEZ, J.L. y AMAT, P. (1990): Superficie endimaria del cuarto ventrículo de rata visto con el microscopio electrónico de barrido. *An. Anat.*, **36**: 3-14.
- AMAT, P. (1989): El epéndimo de la región tuberoinfundibular del tercer ventrículo y sus relaciones con los mecanismos neuroendocrinos. *An. Anat.*, **35/92**: 21-30.
- AMAT, P.; MUÑOZ BARRAGÁN, L. y PASTOR, F.E. (1981): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato I. Características morfológicas del epitelio. *Morfol. Norm. Patol.*, **5**: 1-12.
- AMAT, G., PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A. y AMAT, P. (1991a): Ultrastructural evidence of the ventricular route of secretion and transport of substances in the mediobasal hypothalamus of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **Suppl. 4**: 26.
- AMAT, P., AMAT, G.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A. y PASTOR, F.E. (1991b): Étude au microscope électronique à transmission du prolongement latéral du recessus infundibulaire chez le rat. Livre des résumés du 73ème Congrès de l'Association des Anatomistes, p. 4. Bruselas.
- AMAT PERAL, G.M. (1991): Aportación al conocimiento morfofuncional de la región tuberoinfundibular. Tesina de Licenciatura. Pp. 1-117, 92 figs. Universidad de Salamanca.
- BERNTSON, G.G.; BERSON, B.S. (1980): Antinociceptive effects of intraventricular or systemic administration of vasopressin in the rat. *Life Sci.*, **26**: 455-459.
- BOOZ, K.H. (1975): Secretory phenomena at the ependyma of the IIIrd ventricle of the embryonic rat. *Anat. Embryol.*, **147**: 143-159.
- BOOZ, K.H. (1979): Sekretionserscheinungen am Ependym des Sulcus hypothalamicus Monroi del fetalen Ratte. Eine histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung. *Z. mikrosk. anat. Forsch.*, **93**: 1057-1074.
- BRAWER, J.R., LIN, P.S. y C. SONNENSCHNEIN (1974): Morphological plasticity in the wall of the third ventricle during the estrous cycle in the rat: a scanning electron microscopic study. *Anat. Rec.*, **179**: 481-490.
- CHRIST, J. (1951): Über den Nucleus infundibularis beim erwachsenem Menschen. *Acta Neuroveg. (Wien)*, **3**: 267-285.
- CLINESCHMIDT, B. V., McGUFFIN, J.C. (1977): Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur. J. Pharmacol.*, **46**: 395-396.
- COATES, P.W. y DAVIS, S.L (1979): The sheep third ventricle: correlated scanning and transmission electron microscopy, and plasma luteinizing hormone in wethers and testosterone propionate-treated wethers. *Scanning Electron Microsc./1979/III*, pp. 497-504.
- FLAMENT-DURAND, J., VIENNE, G. y DUSTIN, P. (1978): Scanning electron microscopic study of the hypothalamic region in man. *Scanning Electron Microsc./1978/II*, pp. 151-156.
- FREEMAN, (1972): Surface modifications of neural epithelial cells during formation of the neural tube in the rat embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **28**: 437-448.

- FRIEDE, R.L. (1961): Surface structures of the aqueduct and the ventricular walls: a morphologic, comparative and histochemical study. *J. Comp. Neurol.*, **116**: 229-247.
- HANNAH, R.S. y GEBER, W. (1977): Specialization of the ependyma in the third ventricle of the developing hamster. *Amer. J. Anat.*, **149**: 597-603.
- HETZEL, W. (1977): A scanning electron microscopic study of the cornu anterius and inferius of the lateral ventricle of the monkey's brain. *Scanning Electron Microsc./1977/II*, pp. 587-594.
- HORSTMANN, E. (1954): Die Faserglia des Selachiergehirns. *Z. Zellforsch.*, **39**: 588-617.
- KNOWLES, F.G.W. y ANAND KUMAR, T.C. (1969): Structural changes related to reproduction. I. The hypothalamus. II. The pars tuberalis. *Phil. Trans. R. Soc.*, **256**: 357-375.
- KOZLOWSKI, G.P. (1982): Ventricular route hypothesis and peptide-containing structures of the cerebroventricular system. *Front. Horm. Res.*, **9**: 105-118.
- KRISCH, B. (1986): Ultrastructure of regulation neuroendocrine neurons and functionally related structures. En: *Morphology of the hypothalamus and its connections* (Ganten y Pfaff, eds.), pp. 251-290. Springer-Verlag, Berlín.
- LEVEQUE, T.F. (1966): Morphologie fine d'une differentiation glandulaire du recessus infundibulaire chez le rat. *Z. Zellforsch.*, **69**: 381-394.
- LÖFGREN, F. (1959a): New aspects of the hypothalamic control of the adenohypophysis. *Acta Morphol. Neerl.-Scand.*, **2**: 220-229.
- LÖFGREN, F. (1959b): The infundibular recess, a component in the hypothalamo-adenohypophyseal system. *Acta Morphol. Neerl.-Scand.*, **3**: 55-78.
- LÖFGREN, F. (1960): On the transport mechanism between the hypothalamus and the pituitary. *Kungl. Fysiograf. Sällskapet. I. Lund. Fork.*, **30**: 115.
- LÖFGREN, F. (19561): The glial vascular apparatus in the floor of the indundibular cavity. *Lunds. Univ. Arrskr. N. F.*, **57**: 1-18.
- MESTRES, P. (1978): Old and new concepts about circumventricular organs: an overview. *Scanning Electron Microsc./1978/II*, pp. 137-142.
- MITRO, A. y PALKOVITS, M. (1981): Morphology of the rat brain ventricles, ependyma, and periventricular structures. *Bibliotheca Anatomica*, **21**: 1-110. Karger, Basilea.
- NOWAKOWSKI, H. (1951): Infundibulum und Tuber cinereum der Katze. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, **165**: 261 bis 339.
- OLIVER, C.; BEN-JONATHAN, N.; MICAL, R.S. y PORTER, J.C. (1975): Transport of thyrotropin releasing hormone from cerebrospinal fluid to hypophysial portal blood and the release of thyrotropin. *Endocrinology*, **97**: 1138-1143.
- PASTOR, F.E.; DOMÍNGUEZ, F.J. y AMAT, P. (1981): Ultraestructura de los elementos intraventriculares diencefálicos. *Phronesis*, **2**: 99-106.
- PASTOR, F.E.; MUÑOZ BARRAGÁN, L. y AMAT, P. (1982): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie ependimaria del tercer ventrículo del gato. II) Células supraependimarias. *Morfol. Norm. Patol., A, Histol.*, **6**: 73-87.
- PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; TORANZO, D.; AMAT, G.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1991a): Cuerpos de Herring terminales en la luz del tercer ventrículo. *An. Anat.*, **37**: 87-92.
- PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; TORANZO, D.; AMAT, G. y AMAT, P. (1991b): Areas surcadas del tercer ventrículo del gato. *An. Anat.* (en prensa)
- PETERS, A.; PALAY, S.L. y WEBSTER, H. De F. (1976): The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. W. B. Saunders Co., Filadelfia.
- RAJTOVA, V. (1990): Ependyma of the goat. I. The third cerebral ventricle: sanning electron microscopy study. *J. Hirnforsch.*, **31**: 415-421.
- RODRÍGUEZ, E.M. (1976): The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. *J. Endocrinol.*, **71**: 407-443.
- SCHECHTER, J. y WEINER, R. (1972): Ultrastructural changes in the ependimal lining of the median eminence following the intraventricular administration of catecholamine. *Anat. Rec.*, **172**: 643-650.
- SCOTT, D.E. y PAULL, W.K. (1977): Correlative scanning-transmission electron microscopy of the primate infundibular recess. *Microsc. Acta*, **80**: 57-60.
- SCOTT, D.E.; KOZLOWSKI, G.P. y SHERIDAN, M.N. (1974a): Scanning electron microscopy in the ultrastructural analysis of the mammalian cerebral ventricular system. *Int. Rev. Cytol.*, **37**: 349-388.
- SCOTT, D.E.; KROBISCH-DUDLEY, G. y KNIGGE, K.M. (1974b): The ventricular system in neuroendocrine mechanisms. II. In vivo monoamine transport of ependyma of the median eminence. *Cell Tissue Res.*, **154**: 1-16.
- SCOTT, D.E.; PAULL, W.K.; STEGER, R.W.; MESTRES, P.; MITCHELL, J.A. y HAFEZ, E.S.E. (1976): The primate hypothalamus: correlative scanning-transmission electron microscopy (SEM/TEM). *Scanning Electron Microsc./1976/II*, pp. 431-436.
- SCOTT, D.E., GASH, D.M.; SLADEK, J.R.; CLAYTON, C.; MITCHELL, J.A.; CALDERON, S. y PAULL, W.K. (1982): Organization of the mammalian cerebral ventricular system: ultrastructural correlates of CSF-neuropeptide secretion. *Front. Horm. Res.* **9**: 15-35.
- SILVERMAN, A.J. y KNIGGE, K.M. (1972): Transport capacity of median eminence. II. Thyroxine transport. *Neuroendocrinology*, **10**: 71-82.

- SILVERMAN, A.J.; KNIGGE, K.M. y PECK, W.A. (1972): Transport capacity of median eminence. I. Amino acid transport. *Neuroendocrinology*, **9**: 123-132.
- STUMPF, W.E.; HELLREICH, M.A.; AUMÜLLER, G.; LAMB, J.C. y SAR, M. (1977): The collicular recess organ: evidence for structural and secretory specialization of the ventricular lining in the collicular recess. *Cell Tissue Res.*, **184**: 29-44.

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

ÁREAS SURCADAS DEL TERCER VENTRÍCULO DEL GATO

SULCATED AREAS OF THE THIRD VENTRICLE OF THE CAT

F.E. PASTOR, B. PELÁEZ, J. L. BLÁZQUEZ, A. SÁNCHEZ, D. TORANZO,
G. AMAT y P. AMAT

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

RESUMEN

Se ha realizado un estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo de gatos impúberes y adultos de ambos sexos. En el territorio ciliado de la pared lateral del ventrículo llama la atención la existencia de tres zonas que muestran repliegues del epéndimo, las áreas surcadas, que nosotros hemos denominado áreas surcadas mamilar, talámica y supraóptica. El área surcada mamilar se sitúa por delante de los cuerpos mamilares; sus repliegues adoptan una disposición en forma de columnas salomónicas. El área surcada talámica se localiza inmediatamente debajo de la comisura gris intertalámica. El área surcada supraóptica se sitúa encima del quiasma óptico, en la vecindad del receso óptico. Se sugiere que las áreas surcadas podrían estar en relación con el encauzamiento del líquido cefalorraquídeo.

PALABRAS CLAVE: Áreas surcadas. Tercer ventrículo. Microscopía electrónica de barrido. Gato.

SUMMARY

A scanning electron microscopic study was made of the ependymal lining of the third ventricle of prepuberal and adult cats of both sexes. In the ciliated territory of the lateral ventricular wall a striking finding was the existence of three zones of folded ependyma, the sulcated areas, termed by us as the mamillary, thalamic and supraoptic areas. The mamillary area is situated in front of the mamillary bodies; its folds are arranged in the form of salomonic columns. The thalamic area is located immediately below the interthalamic grey commissure. The supraoptic area is located above the optic chiasma in the neighbourhood of the optic recess. It is suggested that the sulcated areas might be related to the channeling of cerebrospinal fluid.

KEY WORDS: Sulcated areas. Third ventricle. Scanning electron microscopy. Cat.

Introducción

El epitelio endimario que reviste las paredes del tercer ventrículo ha sido objeto de multitud de estudios durante las dos últimas décadas por gran número de investigadores. En nuestro Departamento el estudio de la superficie endimaria de este ventrículo, tanto con el microscopio electrónico de transmisión como con el de

barrido, se ha orientado a la posible existencia de una vía ventricular de secreción y transporte de sustancias biológicamente activas (véanse Pastor Jiménez, 1979; Amat y col., 1979, 1981, 1991a,b; Pastor y col. 1981, 1982, 1991; Amat, 1989; Amat Peral, 1991).

Desde el siglo pasado se conoce la existencia de irregularidades en la pared de los ventrículos cerebrales (Virchow, 1846; Retzius, 1986), debidas a repliegues del epitelio ependimario; las zonas que presentan estos repliegues se conocen como *áreas surcadas* (Friede, 1961). En el presente trabajo se realiza un estudio con el microscopio electrónico de barrido de las áreas surcadas del tercer ventrículo del gato, cuya existencia ha sido previamente reportada por nosotros (Amat y col., 1979, 1981; Pastor y Amat, 1981).

Material y Métodos

Para nuestro estudio hemos utilizado 8 gatos de ambos sexos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 y 90 días de edad y 2 gatos adultos (un macho y una hembra). Bajo anestesia con tiopental sódico (30 mg/kg peso) los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con una solución fijadora de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4 °C. Tras permanecer 12 horas en el fijador, los bloques diencefálicos fueron tallados sagitalmente para exponer las paredes laterales del tercer ventrículo del cerebro. Las piezas resultantes se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón fosfato, se deshidrataron con acetonas, se desecaron mediante el punto crítico de CO₂, se metalizaron con oro y se observaron con un microscopio electrónico de barrido Philips PSEM 500.

Resultados

El estudio con el microscopio electrónico de barrido de la pared lateral del tercer ventrículo del gato pone de manifiesto la existencia de zonas en las que el revestimiento ependimario muestra un aspecto irregular de apariencia «*arrugada*», que corresponden a las áreas surcadas. Estas áreas están constituidas por repliegues del epitelio ependimario, existen de forma constante en todos los animales estudiados, independientemente del sexo y de la edad, y se localizan en el territorio ciliado de la pared ventricular.

En la figura 1 se ve la pared lateral derecha del tercer ventrículo de un gato, resaltando a estos pequeños aumentos tres áreas surcadas (señaladas con las letras A, B y C). Una de estas áreas está situada inmediatamente delante de los cuerpos mamilares (señalada con la letra A); es el *área surcada mamilar*. A mayores aumentos (figura 2) se observa que los repliegues posteriores del epéndimo de esta zona adoptan una disposición que recuerda a las columnas salomónicas, orientándose verticalmente de modo que los surcos que quedan entre los pliegues apuntan, hacia abajo, en dirección al receso mamilar (figura 1, asterisco).

El *área surcada talámica* (figura 1, letra B y figura 3) se localiza inmediatamente debajo de la comisura gris intertalámica, muy desarrollada en esta especie. Los repliegues ependimarios adoptan dos disposiciones diferentes dentro de este territorio (figura 3); los situados en la parte superior del área se orientan en sentido anteroposterior, adaptándose a la convexidad inferior de la comisura gris; los de la parte inferior del área aparecen como cortas rugosidades muy próximas y unidas entre sí, que hacia adelante van difuminándose paulatinamente hasta desaparecer.

El *área surcada supraóptica* (figura 1, letra C y figura 4) se sitúa encima del quiasma óptico, en las inmediaciones del receso óptico; algunos de sus repliegues se orientan en sentido vertical y otros están muy anastomosados entre sí. El conjunto ofrece un aspecto similar al de las circunvoluciones cerebrales.

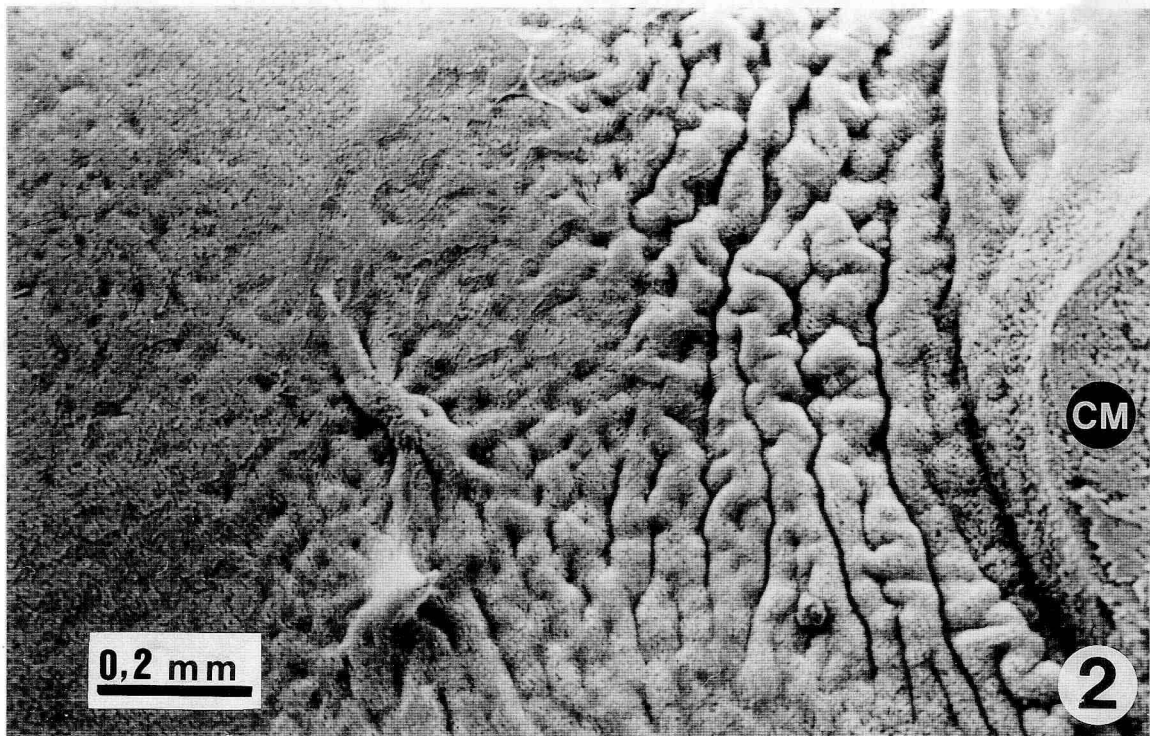
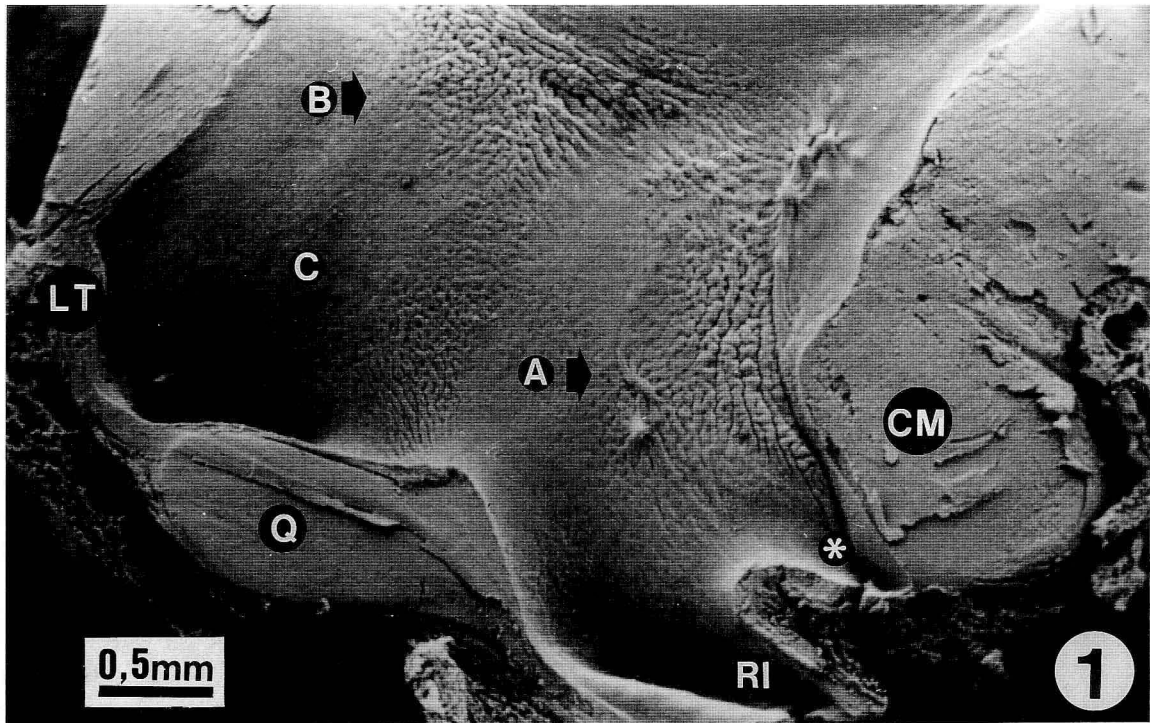


FIGURA 1. Pared lateral derecha del tercer ventrículo de un gato hembra de 30 días de edad. Se observan las áreas surcadas mamilar (A), talámica (B) y supraóptica (C). CM=cuerpo mamilar. Q=quiasma óptico. RI=receso infundibular. *=receso mamilar.

FIGURA 2. Detalle a mayores aumentos de la zona señalada con la letra A en la figura 1; corresponde al área surcada mamilar. CM=cuerpo mamilar.

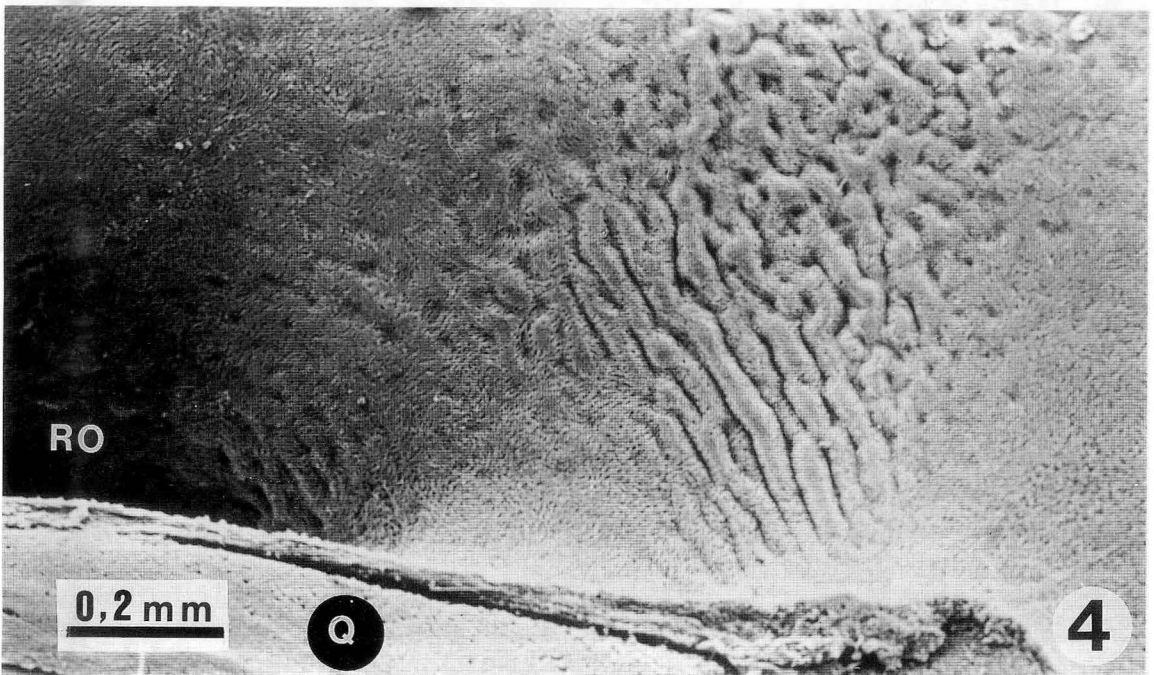
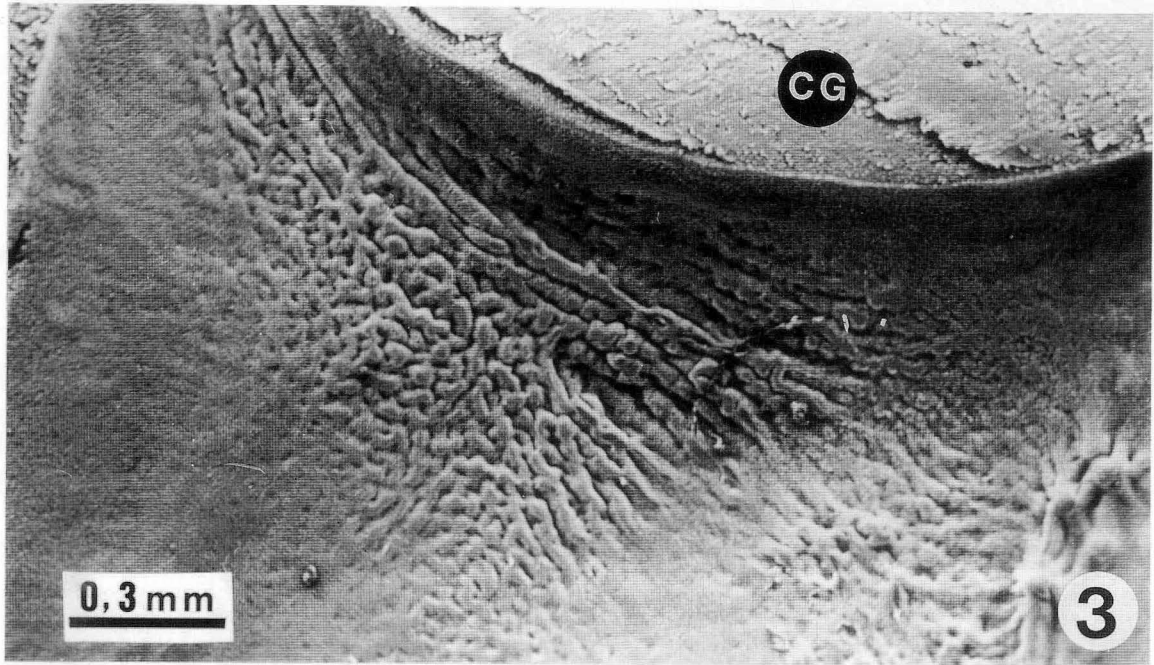


FIGURA 3. Detalle a mayores aumentos de la zona señalada con la letra B en la figura 1; corresponde al área surcada talámica. CG=comisura gris intertalámica.

FIGURA 4. Detalle a mayores aumentos de la zona señalada con la letra C en la figura 1; corresponde al área surcada supraóptica. Q=quiasma óptico. RO=receso óptico.

Discusión

En el caso del gato, y al igual que ocurre en otras especies animales, el revestimiento endimario del tercer ventrículo se caracteriza por presentar dos territorios muy definidos, uno densamente ciliado y otro carente de cilios. Este último comprende los recesos infundibular y mamilar y el suelo del receso óptico (véase Amat y col., 1979, 1981). Dentro del territorio ciliado resalta la constante existencia de tres zonas caracterizadas por su aspecto rugoso, determinado por repliegues del epéndimo, son las áreas surcadas talámica, mamilar y supraóptica.

La existencia de irregularidades del epéndimo había sido ya señalada por Virchow (1846) y por Retzius (1986), realizando Friede (1951, 1961) un amplio estudio sobre las áreas surcadas endimarias existentes en el tercer ventrículo, además de en otras zonas del sistema ventricular. Con el microscopio electrónico de barrido su presencia ha sido referida por varios autores (Coates, 1972, 1977; Flament-Durand y col., 1978; Scott y col., 1982). Las áreas surcadas del ventrículo diencefálico del gato, descritas en este trabajo y anteriormente reportadas por nosotros (Amat y col., 1979, 1981; Pastor y Amat, 1981), son muy similares a las del hombre (Friede, 1961). Con este último autor coincidimos en la constancia de su existencia y en la típica disposición y orientación de los repliegues en cada una de ellas.

¿Cuál puede ser el significado de estos repliegues del epéndimo? La respuesta a esta pregunta, si es que existe, es difícil. En este sentido es interesante llamar la atención sobre el hecho de que según Friede (1961) en los territorios donde existen se produce un incremento de la superficie endimaria de un 85% por término medio; además no se deben a un simple plegamiento mecánico del epitelio, sino a un crecimiento activo de éste y de la capa subependimaria. Está totalmente descartado, por otra parte, que se trate de artefactos o que se deban a circunstancias patológicas. Sí que parecen guardar relación, en cuanto a su desarrollo, con el tamaño ventricular (Friede 1961) y con la edad (Amat y col., 1981).

Para nosotros la constancia en la orientación de los repliegues podría sugerir una función de encauzamiento del LCR hacia zonas concretas de la luz ventricular, suposición que estaría apoyada por el hecho de que el epéndimo que los recubre es extraordinariamente rico en cilios y es sabido que éstos desempeñan con sus movimientos un papel fundamental en la circulación del LCR (Cathcart y Worthington, 1964; Scott y col., 1974, 1982; Milhorat, 1975; Yamadori, 1978; Yamadori y Nara, 1979).

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín por su asistencia técnica.

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

BIBLIOGRAFÍA

- AMAT, P. (1989): El epéndimo de la región tuberoinfundibular del tercer ventrículo y sus relaciones con los mecanismos neuroendocrinos. *An. Anat.*, **35/92**: 21-30.
- AMAT, P.; PASTOR, F.E. y MUÑOZ BARRAGÁN, L. (1979): Estudio con el microscopio electrónico de transmisión y con el microscopio electrónico de barrido del epéndimo basal del tercer ventrículo. *Actas del X Congreso de la Sociedad Anatómica Española*, pp. 23-28. Zaragoza.
- AMAT, P.; MUÑOZ BARRAGÁN, L. y PASTOR, F.E. (1981): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato I. Características morfológicas del epitelio. *Morfol. Norm. Patol., A, Histol.*, **5**: 1-12.

- AMAT, G.; PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A. y AMAT, P. (1991a): Ultrastructural evidence of the ventricular route of secretion and transport of substances in the mediobasal hypothalamus of the rat. *Eur. J. Neurosci., Suppl.* **4**: 26.
- AMAT, P.; AMAT, G.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A. y PASTOR, F.E. (1991b): Étude au microscope électronique à transmission du prolongement latéral du recessus infundibulaire chez le rat. Livre des résumés du 73^{ème} Congrès de l'Association des Anatomistes, p. 4. Bruselas.
- AMAT PERAL, G.M. (1991): Aportación al conocimiento morfofuncional de la región tuberoinfundibular. Tesina de Licenciatura. Pp. 1-117, 92 figs. Universidad de Salamanca.
- CATHCART III, R.S. y WORTHINGTON, W.C. (1964): Ciliary movement in the rat cerebral ventricles: clearing action and directions of currents. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **23**: 609-618.
- COATES, P.W. (1972): Scanning electron microscopic studies of third ventricle from infant monkey brains disclose supraependymal cells. *J. Cell Biol.*, **55**: 47a.
- COATES, P.W. (1977): The third ventricle of monkeys. Scanning electron microscopy of surface features in mature males and females. *Cell Tissue Res.*, **177**: 307-316.
- FLAMENT-DURAND, J.; VIENNE, G. y DUSTIN, P. (1978): Scanning electron microscopic study of the hypothalamic region in man. *Scanning Electron Microsc./1978/II*, pp. 151-156.
- FRIEDE, R.L. (1951): Über Furchenfelder in den Wandungen der Hirnventrikel. *Acta Neurovegetativa*, **2**: 84-97.
- FRIEDE, R.L. (1961): Surface structures of the aqueduct and the ventricular walls: a morphologic, comparative and histochemical study. *J. Comp. Neurol.*, **116**: 229-247.
- MILHORAT, T. H. (1975): Formation and flow of cerebrospinal fluid. En: *Brain-endocrine interaction. II. The ventricular system in neuroendocrine mechanisms* (Knigge, Scott, Kobayashi e Ishii, eds.), pp. 270-281. Karger, Basilea.
- PASTOR, F.E. y AMAT, P. (1981): Areas surcadas del tercer ventrículo del gato. Libro de resúmenes de la II Reunión de Neurobiólogos Españoles, p. 94. Salamanca.
- PASTOR, F.E.; DOMÍNGUEZ, F.J. y AMAT, P. (1981): Ultraestructura de los elementos intraventriculares diencefálicos. *Phronesis*, **2**: 99-106.
- PASTOR, F.E.; MUÑOZ BARRAGÁN, L. y AMAT, P. (1982): Estudio con el microscopio electrónico de barrido de la superficie endimaria del tercer ventrículo del gato. II) Células supraependimarias. *Morfol. Norm. Patol., A, Histol.*, **6**: 73-87.
- PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; TORANZO, D.; AMAT, G.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1991): Cuerpos de Herring terminales en la luz del tercer ventrículo. *An. Anat.*, **37**: 87-92.
- PASTOR JIMÉNEZ, F.E. (1979): Histología y ultraestructura del epitelio endimario del tercer ventrículo. Tesina de Licenciatura. Pp. 1-120, 118 figs. Universidad de Salamanca.
- RETZIUS, G. (1896): *Das Menschenhirn*. Königliche Buchdruckerei, Estocolmo.
- SCOTT, D.E.; KOZŁOWSKI, G.P. y SHERIDAN, M.N. (1974): Scanning electron microscopy in the ultrastructural analysis of the mammalian cerebral ventricular system. *Int. Rev. Cytol.*, **37**: 349-388.
- SCOTT, D.E.; GASH, D.M.; SLADEK, J.R.; CLAYTON, C.; MITCHELL, J.A.; CALDERON, S. y PAULL, W.K. (1982): Organization of the mammalian cerebral ventricular system: ultrastructural correlates of CSF-neuropeptide secretion. *Front. Horm. Res.* **9**: 15-35.
- VIRCHOW, R. (1846): Über das granuliert Aussehen der Wandungen der Hirnventrikel. *Allg. Zeitschr. Psychiatr.*, **3**: 242-250.
- YAMADORI, T. (1978): Scanning electron microscopic studies of the ciliary beat on the wall of the brain ventricles and spherical structures on the wall of the central canal. *Scanning Electron Microsc./1978/II*, pp. 823-830.
- YAMADORI, T. y NARA, K. (1979): The directions of ciliaria beat on the wall of the lateral ventricle and the currents of the cerebrospinal fluid in the brain ventricles. *Scanning Electron Microsc./1979/III*, pp. 335-340.

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

ESTUDIO MACRO Y MICROSCÓPICO DE MOLDES CORROSIVOS VASCULARES DE RIÑONES DE OVEJA

MACRO AND MICROSCOPIC STUDY OF CORROSIVE VASCULAR CASTS OF SHEEP KIDNEYS

**J.M. RIESCO, F. GUTIÉRREZ, J. CASTRO*, J.A. JUANES, F. SÁNCHEZ,
J. CARRETERO y R. VÁZQUEZ**

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina

* Colegio Universitario de Medicina de Ávila. Universidad de Salamanca

RESUMEN

El patrón de distribución arterial ha sido estudiado en moldes corrosivos vasculares de riñones ovinos, mediante análisis macroscópico y microscópico (lupa binocular y microscopio electrónico de barrido). Los moldes, inyectados con celoidina coloreada, mostraron seis segmentos vasculares renales. Todas las arterias intrarrenales eran terminales en toda su trayectoria. La microscopía estereoscópica mostró mayor densidad de glomérulos en la zona yuxtamedular que en la zona superficial de la corteza renal. La microscopía electrónica de barrido puso de manifiesto las características de superficie de las paredes arteriales, así como la composición lobular de los capilares glomerulares y las diferencias morfológicas entre arteriolas aferentes y eferentes.

PALABRAS CLAVE: Riñón. Moldes corrosivos vasculares. Morfología. Microscopía electrónica de barrido. Oveja.

SUMMARY

The pattern of arterial distribution was studied in corrosive vascular casts from sheep kidneys by a macro- and microscopic analysis (binocular light microscope and scanning electron microscope). The casts, injected with dyed celloidin, revealed 6 renal vascular segments. All the intrarenal arteries were seen to be terminal throughout their trajectory. Stereoscopic microscopy revealed a greater density of glomeruli in the juxtamedullary portion than in the surface zone of the renal cortex. The scanning electron microscope findings revealed the surface characteristics of the arterial walls together with the lobe-like composition of the glomerular capillaries and the morphological differences between the afferent and efferent arteries.

KEY WORDS: Kidney. Corrosive vascular casts. Morphology. Scanning electron microscopy. Sheep.

Introducción

La consecución de moldes vasculares renales permite analizar macroscópicamente la distribución del riego renal y las variantes anatómicas, con especial referencia a la microvascularización renal, cuando se emplean medios microscópicos.

Aunque la microvascularización renal fue estudiada en moldes corrosivos mediante microscopía de luz (Hall, 1955; Elías, 1957; Takahata y col., 1958), existían limitaciones técnicas, tales como baja resolución, retracciones de las muestras debidas al medio de moldeado e insuficiencia para dilucidar espacialmente las ramificaciones y conexiones de los vasos de pequeño calibre.

La introducción del microscopio electrónico de barrido (MEB) para el estudio de moldes vasculares, tras aplicar técnicas adecuadas de replección-corrosión, ofrece excelentes ventajas a la hora de analizar la morfología glomerular, al permitir utilizar grandes especímenes, conseguir alta resolución y obtener un aspecto tridimensional.

En la actualidad son múltiples los trabajos que analizan moldes vasculares renales al MEB, fundamentalmente, de anfibios y mamíferos (para una revisión detallada, ver Lametschvandtner y col., 1984), pero no hemos encontrado datos relacionados con la microcirculación renal ovina. Por eso, es nuestro propósito analizarla, empleando una técnica sencilla de moldeado que permite el estudio macro y microscópico de las muestras.

Material y Método

Se han utilizado un total de 16 riñones procedentes de ovejas merinas que fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio.

La técnica de repleción utilizada ha sido descrita previamente en esta revista (Riesco y col., 1990). El medio de repleción utilizado fue la celoidina al 2%, coloreada con tinte universal Titán y rebajada su viscosidad con disolvente convencional.

La corrosión del tejido no inyectado se realizó con CIH fumante (7-10 días) y posterior lavado en agua corriente para eliminar restos de tejido. El secado de los moldes se efectuó al aire, durante 24-48 horas a temperatura ambiente.

Tras el estudio macroscópico y submacroscópico (utilizando una lupa binocular WILD Neerbrugg), se procedió a la disección de las áreas de interés para su estudio con el MEB, utilizando pinzas y tijeras histológicas. La microdisección de los glomérulos se realizó con tijeras para timpanectomía.

Las muestras destinadas al estudio con el MEB se montaron sobre portamuestras y se dotaron de conductividad aplicándoles una capa de oro de 20-30 nm de espesor, mediante un metalizador ISI E-5000. Una vez metalizadas se estudiaron y fotografiaron en un microscopio de barrido Philips SEM-500. Los aumentos expresados en la leyenda de figuras corresponden a los aportados por el aparato sobre los negativos de 35 mm.

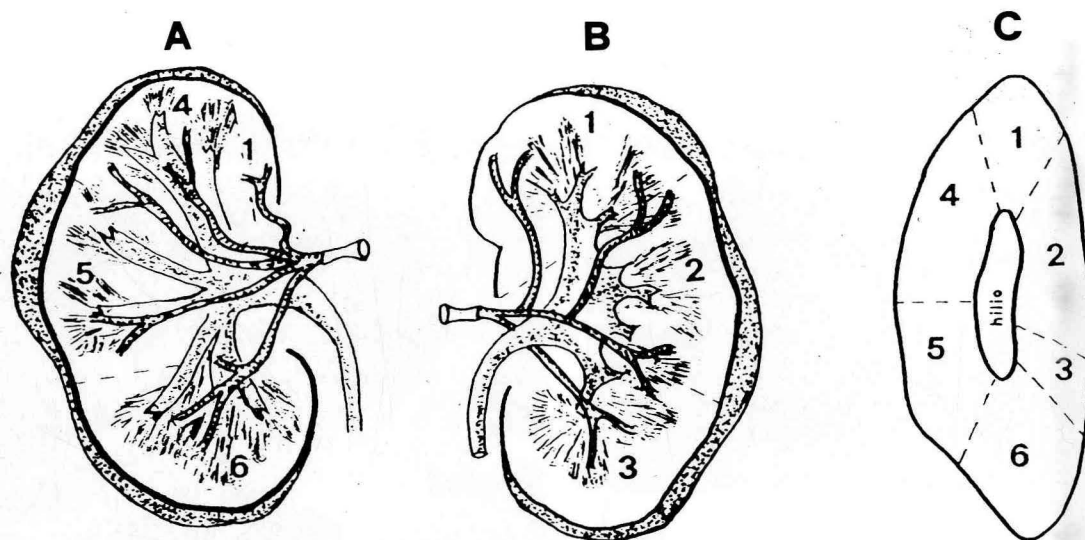
Resultados

Macroscópicamente, la arteria renal se divide, en el hilio del órgano, en una rama anterior y dos ramas posteriores que dan lugar a seis arterias segmentarias (tres proceden de la rama anterior, dos de la rama postero-superior y, la última, de la rama postero-inferior). Cada una irriga un territorio renal o segmento vascular (ver esquema 1).

De las arterias segmentarias se desprenden 9 a 11 arterias lobulares, situadas frente a las papilas renales (figura 1). Cada arteria lobular se divide en tres ramas interlobulares, paralelamente dispuestas en el espesor de las columnas de Bertin que terminan dicotomizándose en ramas opuestas que forman con la precedente un ángulo próximo a los 90°. Estas arterias, denominadas por su constitución arcuatas o arciformes, se hallan situadas en el límite córtico-medular del riñón.

De cada arteria arciforme se desprenden arborizaciones vasculares que discurren radialmente por la corteza renal; son las arterias interlobulillares, ramos terminales que nunca se anastomosan.

ESQUEMA 1. Segmentación arterial del riñón de oveja a partir de moldes corrosivos vasculares. A: visión renal anterior. B: visión posterior. C: visión medial. Segmentos: 1. Apical, 2. Posterior y medio, 3. Postero-inferior, 4. Antero-superior, 5. Anterior y medio, 6. Antero-inferior.



Con *microscopía estereoscópica* (figura 2), se aprecia la salida de finas ramas vasculares que parten de las arterias interlobulillares y finalizan en estructuras corpusculares rojizas; se trata de las arteriolas aferentes al glomérulo. En la zona yuxtamedular, algunas arteriolas aferentes nacen, directamente, de las arterias aciformes.

Con la lupa binocular es posible apreciar mayor densidad de glomérulos en la zona yuxtamedular (figura 3) que en la corteza superficial, donde se hallan más dispersos (figura 4).

Procedentes de los glomérulos yuxtamedulares (figura 3) se observan acúmulos vasculares paralelos que constituyen vasos rectos, los cuales, tras cruzar a los vasos arciformes, penetran en la región de las pirámides medulares renales.

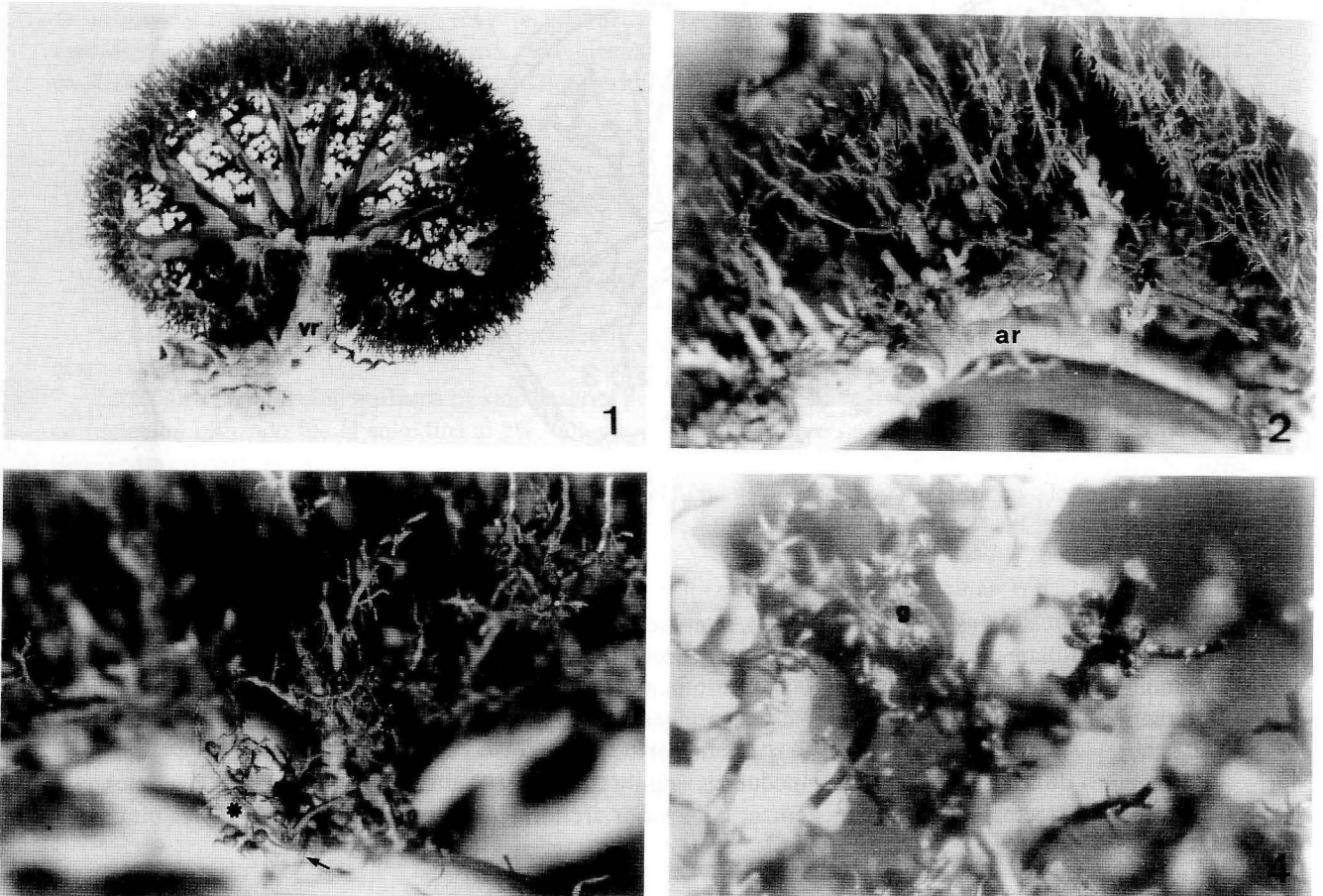
La *microscopía electrónica de barrido* pone de manifiesto un patrón estructural de superficie similar para todas las arterias intrarrenales, caracterizado por la presencia de pliegues longitudinales y gran número de indentaciones en el lugar que ocupan los núcleos de las células endoteliales (figura 5). Las arterias intrarrenales se diferencian entre sí por el distinto calibre y por la dirección que adoptan en los moldes vasculares.

Las arteriolas aferentes poseen, además, una serie de angostamientos transversales, de los cuales uno se sitúa siempre en la entrada del polo vascular del glomérulo, a manera de esfínter (figura 6).

Las arteriolas aferentes terminan dividiéndose en varias ramas que suministran la red capilar glomerular. Todos los capilares glomerulares, tributarios de una rama de división de la arteriola aferente, constituyen un lóbulos glomerular. Suelen existir entre dos y cuatro lóbulos en cada glomérulo.

Por el mismo hilio glomerular, pero con menor calibre y en dirección opuesta a la arteriola aferente, sale la arteriola eferente (figura 7). Ambas ramas son fácilmente distinguibles al MEB porque la superficie de la arteriola eferente es más lisa y no presenta indentaciones.

En la zona cortical superficial las arteriolas eferentes se abren en una red capilar de plexos peritubulares. En la zona yuxtamedular, las arteriolas eferentes se continúan con vasos rectos (figura 8), que descienden hacia la médula renal, formando paquetes de 10-15 canalículos rectilíneos.



- FIGURA 1.** Visión macroscópica de una réplica vascular de riñón de oveja obtenida mediante doble inyección-corrosión, por vía arterial y venosa. Se ha quitado la cortical de la cara posterior para observar el interior del molde. I: arterias interlobulares que surgen por división de las arterias lobulares (cabeza de flecha): a: arterias arciformes de las que parten las arterias interlobulillares (il). v: venas lobulares confluyendo para constituir la vena renal (vr).
- FIGURA 2.** Micrografía obtenida con lupa binocular. De una arteria arciforme (ar) salen, ortogonalmente, las arterias interlobulillares y de éstas, las arteriolas aferentes que finalizan en los corpúsculos glomerulares (flecha). Aumentos: 15 x.
- FIGURA 3.** Agrupaciones arracimadas de glomérulos (asterisco), en la región yuxtamedular de un molde vascular renal analizado con microscopía estereoscópica. Del racimo glomerular parten hilos vasculares (flecha) que corresponden a vasos rectos. Aumentos: 20 x.
- FIGURA 4.** Micrografía obtenida con lupa binocular que muestra menor densidad y mayor dispersión de los glomérulos (g) localizados en la región cortical de moldes vasculares renales de oveja. Aumentos: 30 x.

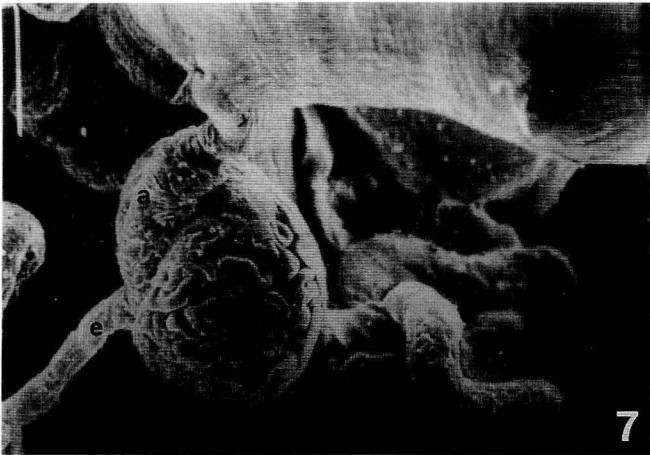
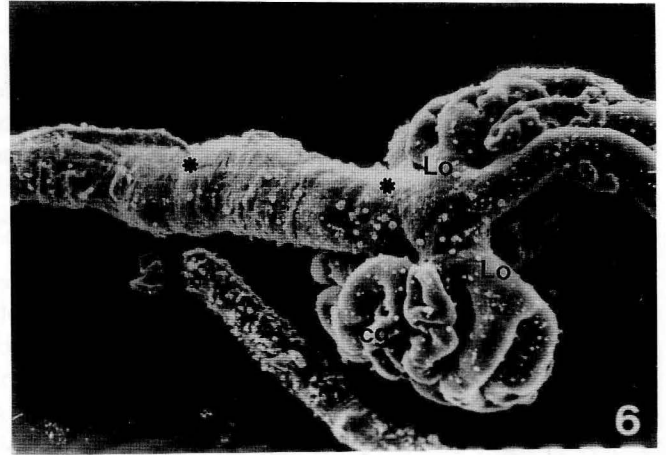
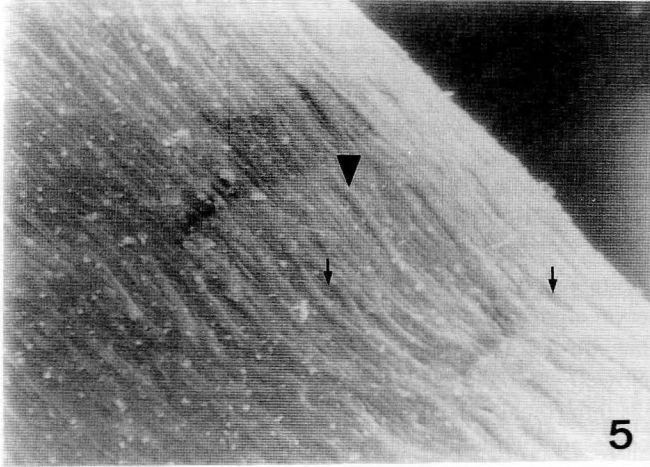


FIGURA 5. Micrografía electrónica de barrido en la que se observa la superficie de una arteria arciforme correspondiente a un molde vascular renal ovino. Obsérvese la presencia de múltiples pliegues longitudinales (cabeza de flecha) y numerosas depresiones ovaladas (flecha). Aumentos: 160 x.

FIGURA 6. Arteriola aferente con pliegues longitudinales y angostamientos transversales (asterisco), en especial, a nivel del hilio glomerular (h). Lo: lobulaciones de la arteriola aferente que dan origen a los capilares glomerulares (cg). Aumentos: 320 x.

FIGURA 7. Micrografía de barrido que muestra un glomérulo con las arteriolas aferente (a) y eferente (e) situadas en el polo vascular glomerular. La pared de la arteriola eferente es más estrecha y más lisa que la aferente. Aumentos: 240 x.

FIGURA 8. Arteriolas eferentes partiendo de glomérulos yuxtamedulares y su agrupación en vasos rectos (r) que descienden en haces rectilíneos. Aumentos: 80 x.

Discusión

El patrón de distribución vascular renal ha sido estudiado en diversas especies, mediante distintas técnicas (Graves, 1954; Anderson y Anderson, 1976; Bielke y col., 1976; Kessel y Kardon, 1979; Longia y col. 1982; Ajmani y Ajmani, 1983; Vodenichanov y col., 1987). En nuestro estudio macro y microscópico con lupa binocular hemos encontrado que el patrón vascular de distribución arterial en la oveja se asemeja al descrito en otras especies, pero con algunas diferencias. En efecto, seis son los segmentos vasculares que presenta el riñón ovino en lugar de los cinco descritos por Graves (1954) y Longia y col. (1982), en el humano. La diferencia estriba en que el segmento inferior del riñón humano incluye la totalidad del polo inferior renal, mientras que, en la oveja, esta área es tributaria de arterias segmentarias anteriores y posteriores, quedando dividida en dos segmentos: antero-inferior y postero-inferior, similar al patrón propuesto por Faller y Ungvary (1962).

Las arterias intrarrenales ovinas son terminales en todo su trayecto. Tampoco se han descrito anastomosis arteriales intrarrenales en otras especies, incluida la humana (Murakami, 1971, 1972; Anderson y Anderson, 1976; Kessel y Kardon, 1979; Williams y Warwick, 1985).

Con el MEB es fácil ver la distribución, con aspecto tridimensional, de las arterias más diminutas y conocer mejor la estructura glomerular. Sin embargo, hay que observar algunas precauciones cuando se analizan moldes corrosivos al MEB. Concretamente, es preciso rotar e inclinar con cierta frecuencia la muestra para no enmascarar falsas conexiones vasculares, como ya fue advertido por Nowell y col. (1972).

El detalle más importante de la superficie de las arterias intrarrenales, sea cual fuere su calibre y topografía, es la presencia de pliegues longitudinales e indentaciones correspondientes al lugar que ocupan los núcleos de las células endoteliales. Estas improntas son independientes del tipo de medio de moldeado utilizado y han sido descritas en moldes realizados con goma o con polímeros de resina y, por supuesto, en nuestro estudio, utilizando como medio de moldeado la celoidina. Murakami (1972) y Lee y Dempsey (1976) describen con gran detalle estas huellas presentes en las paredes arteriales. Por su parte, Miodonski y col. (1976) y Hodde y col. (1977), establecieron los patrones de diferenciación entre las improntas arteriales y las venosas. Estudios posteriores han confirmado tales descripciones (Lametschwandtner y col., 1978; Gnepp y Green, 1979; Nopanitaya y col., 1979; Kardon y Kessel, 1979).

Los angostamientos existentes en la pared de la arteriola aferente de la oveja, y especialmente el situado en la entrada del polo vascular del glomérulo, también ha sido observado en otras especies (Murakami, 1971, 1972; Nopanitaya, 1980), pero no en el perro o en la trucha (Anderson y Anderson, 1976).

Para Nopanitaya (1980), la constricción, a nivel hiliar, de la arteriola aferente, así como otras impresiones alineadas en forma de collar en la misma conexión arteriolo-glomerular, constituyen la base morfológica para diferenciar las arteriolas aferente y eferente. Además, la arteriola eferente posee menor calibre que la aferente.

El glomérulo del riñón ovino presenta 2 a 4 lobulaciones como consecuencia de la división de la arteriola aferente. Murakami (1972), fue el primero que describió en moldes renales de rata la existencia de lobulaciones glomerulares. Posteriormente, también han sido descritas en otros mamíferos (Casellas y Mimran, 1981), pero no en los anfibios (Ohtani y Naito, 1980; Naito, 1984).

Concluyendo, el patrón de distribución arterial del riñón de oveja, analizado mediante moldes corrosivos, es similar al de otros mamíferos, aunque posee ligeras diferencias con respecto al patrón humano. El empleo del MEB para el estudio de moldes corrosivos, analizados previamente a ojo desnudo y con lupa binocular, permite corroborar los hallazgos macro y submacroscópicos y describir, además, detalles de la microcirculación renal, fundamentalmente a nivel glomerular, debido al alto poder de resolución y a la gran profundidad de campo que posee este instrumento.

BIBLIOGRAFÍA

- AJMANI, M.L. y AJMANI, K. (1983): To study the intrarenal vascular segments of human kidney by corrosion cast technique. *Anat. Anz.* **154**: 293-303.

- ANDERSON, B.G. y ANDERSON, W.D. (1976): Renal vasculature of the trout demonstrate by scanning electron microscopy, compared with canine glomerular vessels. *Am. J. Anat.* **145**: 443-458.
- BIELKE, S.R.; NAGLE, R.B.; TRUMP, B.F. y BULGER, R.E. (1976): Scanning electron microscopy of renal vascular casts. *J. Microscopy*, **108**: 89-96.
- CASELLAS, D. y MIMRAN, A. (1981): Shunting in renal microvasculature of the rat. A scanning electron microscopy study of corrosion casts. *Anat. Rec.* **201**: 237-248.
- ELIAS, H. (1957): De structura glomeruli renalis. *Anat. Anz.* **104**: 26-36.
- FALLER, J. y UNGVARY, G. (1962): Die arterielle Segmentation der Niere. *Zentbl. Chir.* **87**: 972-984.
- GNEPP, D.R. y GREEN, F.H.Y. (1979): SEM of collecting lymphatic vessels and their comparison to arteries and veins. *Scanning electron microsc.*, **1979/III**: 756-762.
- GRAVES, F.T. (1954): The anatomy of the intrarenal arteries and its applications to segmental resection of the kidney. *Brit. J. Surg.* **42**: 132-139.
- HALL, B.V. (1955): Further studies of the normal structure of the renal glomerulus. *Proc. 6th Ann. Conf. Nephrotic Syndrome. New York, National Nephrosis Foundation* **1955**: 1-39.
- HODDE, K.C.; MIODONSKI, A.; BAKKER, C. y VELTMAN, W.A.M. (1977): SEM of microcorrosion casts with special attention on arteriovenous differences and application to the rat's cochlea. *Scanning electron microsc.* **1977/II**: 477-484.
- KARDON, R.H. y KESSEL, R.G. (1979): SEM studies on vascular casts of the rat ovary. *Scanning electron microsc.* **1979/III**: 743-750.
- KESSEL, R.G. y KARDON, R.H. (1979): Tissues and organs: A test atlas of scanning electron microscopy. W.H. Freeman and Company. San Francisco, **1979**: 219-245.
- LAMETSCHWANDTNER, A.; ALBRECHT, U. y ADAM, H. (1978): The vascularization of the kidneys in *bufo bufo* (L.), *Bombina variegata* (L.), *rana ridibunda* (L.) and *Xenopus laevis* (D.) (Amphibia, Anura) as revealed by scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Acta Zool.*, **59**: 11-23.
- LEE, M.M.L. y DEMPSEY, E.W. (1976): Microcirculation of the rat placenta. Scanning and transmission electron microscopic observations on fetal blood vessels. *Am. J. Obstet. Gynec.* **126**: 495-505.
- LONGIA, G.S.; KUMAR, V.; SAXENA, S.K. y GUPTA, C.D. (1982): Surface projection of arterial segments in the human kidney. *Acta Anat.* **113**: 145-150.
- MIODONSKI, A.; HODDE, K.C. y BAKKER, C. (1976): Rasterelektronen-mikroskopie von Plastik-Korrosions-Präparaten: morphologische Unterschiede zwischen Arterien und Venen. *BEDO* **9**: 435-442.
- MURAKAMI, T. (1971): Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch. Histol. Jap.* **32**: 445-454.
- MURAKAMI, T. (1972): Vascular arrangement of the rat renal glomerulus. A scanning electron microscope study of corrosion casts. *Arch. Histol. Jap.* **34**: 87-107.
- NAITO, I. (1984): The development of glomerular capillary tufts of the bullfrog kidney from a straight interstitial vessels to an anastomosed capillary network. A scanning electron microscopic study of vascular casts. *Arch. Histol. Jap.* **47**: 441-456.
- NOPANITAYA, W. (1980): SEM of glomerular microcirculation with special attention on afferent and efferent arterioles. *Scanning electron microsc.* **1980/III**: 395-397.
- NOPANITAYA, M.; AGHAJANIAN, J.G. y GRAY, L.D. (1979): An improved plastic mixture for corrosion casting of the gastrointestinal microvascular system. *Scanning electron microsc.* **1979/III**: 751-755.
- NOWELL, J.A.; PANGBORN, J. y TYLER, W.S. (1971): Stabilization and replication of soft tubular and alveolar systems. A scanning electron microscope study of the lung. *Scanning electron microsc.* **1972**: 305-312.
- OHTANI, O. y NAITO, I. (1980): Renal microcirculation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. A SEM study of vascular casts. *Arch. Hist. Jap.* **43**: 319-330.
- RIESCO, J.M.; GUTIÉRREZ, F.; CASTRO, J.; JUANES, J.A.; BLANCO, E. y VÁZQUEZ, R. (1990): Aplicación de un método anatómico de inyección-corrosión al estudio tridimensional de moldes vasculares renales con el microscopio electrónico de barrido. *An. Anat.*
- TAKAHATA, K.; KUDO, N.; SUGIMURA, M. y FURUHATA, K. (1958): Study on the vascular arrangement of the kidney gorilla. *Acta Anat. Nippon.* **33**: 256-262.
- VODENICHANOV, A.; DANCHEV, S. y VODENICHANOV, I. (1987): Arterial vessels of the kidney indomestic swine. *Vet. Med. Nauki.* **24**: 70-77.
- WILLIAMS, P.L. Y WARWICK, R. (1985): *Gray Anatomía. Tomo II.* Salvat edit. Barcelona.

Correspondencia: Dr. José M. Riesco Santos
 Dpto. Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina
 Avda. Campo Charro, s/n
 37007 Salamanca. España

APROXIMACIÓN A LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL ALCOHOL EN EL DESARROLLO PRE Y POSNATAL DE LA RATA. PRIMERA PARTE: RESULTADOS PRENATALES

INDUCIED EFFECTS BY ETHILIC ALCOHOL IN PRE AND POSTNATAL DEVELOPMENT OF THE MOUSE. PRENATAL DATA (I)

G. SANCHO*, J.M. MARÍN, P. RAMOS**, F. ARBUÉS* y J. GOROSTIAGA***

* Servicio de Ginecología

** Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia. Vitoria

RESUMEN

El SAF es un problema importante que está subestimado en nuestro medio, en parte, por presentar importantes lagunas en su conocimiento. Nosotros llevamos a cabo un estudio experimental en ratas Wistar. Se diseñaron tres grupos: alcohol, dieta libre y dieta apareada. El tiempo de exposición fue toda la gestación con una dosis moderada de alcohol (8 g/kg/dfa) administrada mediante intubación. Al 21 día de gestación se sacrificaban los animales y eran estudiados los fetos.

Los resultados mostraron una mayor ingesta alimenticia para el grupo dieta libre y una menor ganancia de peso para el grupo dieta apareada. El grupo alcohol presentó unos fetos con un descenso significativo en el peso y talla, así como un menor peso y una menor concentración de DNA para el cerebro y el riñón con respecto a los dos grupos control. La placenta no mostró diferencia en el peso, contenido de DNA y en su estructura a microscopía óptica.

Consideramos que el efecto negativo se debe al consumo de alcohol y se discuten los posibles mecanismos patogénicos.

PALABRAS CLAVE: Alcohol etílico. Desarrollo prenatal

SUMMARY

An important problem today is the FAS. We know this subject but there are problems for its study and the experimental model is good for explain unknown quantity. We carried out the study in Wistar rats. There were three groups: alcohol and both lib fed and pair-fed control groups. The time of exposition was during all gestation process. We choose a moderate dose of etanol 8 g/kg/day and all the animals were intubate in order to administer the solutions. We sacrificied and studies the foetus on 21 day of gestation.

The results showed that lib fed group had eaten more food than the others groups and pair-fed group had lower gain of weight with respect to two others groups. The foetus of alcohol group showed a descent in height and weight with respect to two control groups. The weight of both fetal brain and fetal kidney also were significative lower for the alcohol group. This group had a significative lower contein of DNA in brain and kidney with respect to two control groups. The placenta did not showed difference about weight, contein of DNA and the structure by optic microscopic.

We considered that the negative effect is alcohol ingest and we discussed the pathogenic mecanisms.

KEY WORDS: Ethilic alcohol. Prenatal development.

Introducción

El S.Alcohólico Fetal (SAF) y los efectos relacionados con el consumo de alcohol durante el embarazo están subestimados en nuestro medio. Hasta 1968, en que Lemoine, tras presentar un estudio de 127 niños de 69 familias alcohólicas crónicas, puso de manifiesto los efectos negativos del consumo de esta sustancia en el embarazo no se tomó conciencia de esta problemática. Sería posteriormente Jones (1973) quien acuñaría este cuadro malformativo con el S.Alcohólico Fetal (SAF), y, más tardíamente, el Grupo de Estudios Alcohol y Feto (1980) lo definiría con estas tres características: a) retraso en el desarrollo pre y/o postnatal; b) afectación del SNC y c) dismorfología facial típica.

Con el tiempo, y tras múltiples estudios epidemiológicos, se va conociendo la magnitud del problema y se ha estimado su incidencia. Para Olegard (1979) sería 1-3/1.000 nacidos vivos, siendo para Abel (1988), la más reciente estimación llevada a cabo, de 1,9/1.000 nacidos vivos. Con ser graves estas cifras, el problema aumenta cuando se consideran los efectos relacionados con el consumo de alcohol en el embarazo y que no completan el SAF. Para Brand (1982) esta patología sería 18 veces más frecuente que el SAF. Para Sokol (1981) causaría el 5% de todas las anomalías congénitas, y para Warren (1989) este problema ha desbancado al S. de Down y DTN en prevalencia, y es la primera causa de retraso mental.

Con ánimo de esclarecer los mecanismos etiopatogénicos implicados en la producción de estos cuadros evidenciados por los estudios epidemiológicos, se han llevado a cabo multitud de trabajos experimentales, con más profusión en rata y ratón, habiéndose reproducido estos hechos en estas especies, especialmente con dosis elevadas. No obstante, todavía quedan muchos interrogantes por resolver: si la relación dosis/efecto es lineal o existe un umbral de protección, qué momento de la gestación es más crítico, si la supresión durante la gestación remediaría el daño producido en etapas iniciales, la reversibilidad/irreversibilidad de las lesiones, si es efecto directo del alcohol o de los factores asociados.

Además de no estar totalmente resueltas estas cuestiones, existe discrepancia en relación con la cantidad de alcohol necesaria consumir para que se produzcan estos hechos. En la rata, los efectos son evidentes cuando los consumos son altos y hay unanimidad entre los autores, pero existe más discrepancias al valorar los consumos moderados (Abel, 1978; Bartley, 1983; Gallo, 1982; Gallo, 1986).

Material y Métodos

Nosotros hemos llevado a cabo un estudio experimental en ratas con el objetivo de comprobar los efectos de una dosis moderada de alcohol (8 g/kg/día), no toxicológica, sobre el comportamiento de la rata gestante, la posible afectación fetal y placentaria y valorar los posibles mecanismos de acción, tanto directos como indirectos. Además, hemos planificado el consumo durante toda la gestación, desde el momento periconcepcional, que es lo que normalmente sucede en la mujer habituada al consumo alcohol.

Como hemos indicado, el animal empleado ha sido la rata Wistar blanca, utilizando hembras vírgenes de la misma edad (tres meses), peso (250±10 g) y camada. Las condiciones de estabulación, mantenidas constantes, fueron las siguientes: temperatura 22° C, 60% de humedad y luz artificial durante 10 horas al día. La alimentación se llevó a cabo con dieta comercial para roedores que posee un valor calórico de 3,804 kcal/g. Las hembras fueron cubiertas por el macho durante la noche y la preñez fue determinada por frotis vaginales considerando como primer día de la misma cuando el frotis se hizo positivo.

Como se ha dicho, la rata estaba expuesta durante toda la gestación al posible teratógeno. La vía de administración seleccionada fue la intubación, pues nos permite dar a todas las camadas la misma cantidad de acuerdo al peso y nos posibilita alcanzar alcoholemias significativas > 150 mg%.

Los animales, según el diseño, se distribuyeron en tres grupos, el grupo expuesto al alcohol y dos grupos control. De estos controles, uno de ellos «ad libitum» para comparar los posibles efectos y el otro «dieta apareada» (pair-fed) para valorar los posibles efectos de la hiponutrición. Al grupo alcohol (compuesto de 12 ratas gestantes)

se le administraba la dosis de 8 g/kg/día disuelta en agua al 30% en dos mitades: a las 8.00 y 16.00. Al grupo «ad libitum» (compuesto de 12 ratas gestantes) se le intubaba a las mismas horas, administrándosele 5 cc de agua en cada ocasión. El grupo dieta apareada (pair-fed) (compuesto de 10 ratas gestantes) se le proporcionaba la misma comida que consumía el grupo alcohol y las calorías derivadas del etanol se aportaban en forma de glucosa.

Diariamente se cuantificaba la bebida, comida e incremento de peso. El día 21, un día antes de finalizar la gestación, eran sacrificados los animales y se procedía a una laparotomía para obtener el útero grávido. Se contabilizaban el número de fetos y reabsorciones, y, posteriormente, se seleccionaban cinco fetos de cada camada a los que se hacía un estudio macroscópico externo con lupa para descartar anomalías. Posteriormente, se pesaban, tallaban y se procedía a una disección para individualizar: cerebro, hígado, riñón y corazón. Se pesaban estos órganos y los de uno de ellos por camada se introducían en nitrógeno líquido para, posteriormente, llevar a cabo la cuantificación del DNA. Las placentas eran individualizadas, se pesaban, se sometían a estudio histológico tras teñirlas con hematosilina-eosina, tricrómico de Masson y PAS. Se analizaron los estratos fundamentales de la placenta de rata: la capa de reacción decidual, capa trofoespongial o de conjunción y la capa laberíntica o de vellosidades libres. También se separaba para estudio de DNA la placenta correspondiente al feto dedicado a este análisis.

Con los múltiples parámetros obtenidos, se llevó a cabo una base de datos y, posteriormente, se realizó el estudio estadístico consistente en análisis de varianza para la mayoría de los parámetros, a excepción de la ingesta de comida en gramos y calorías que se aplicó el test de la T-Student.

Resultados

Por lo que respecta a la rata gestante, destaca que las del grupo «ad libitum» comían más cantidad de comida a lo largo de toda la gestación que el grupo alcohol (y también que el grupo dieta apareada por diseño del estudio) con una significación de $p < 0.001$ (Tabla I). Cuando se valoró la ingesta calórica total no hubo diferencias. La ingesta de agua fue menor para el grupo alcohol con una significación de $p < 0.05$. La mayor ganancia de peso correspondió al grupo dieta libre, seguido del grupo alcohol y siendo llamativamente menor para el grupo dieta apareada. Éste mostró una significación de $p < 0.01$ con respecto al grupo de dieta libre y de $p < 0.05$ con respecto al grupo alcohol. Además, el 76,53% del incremento ponderal correspondía a la suma de los pesos de fetos y placentas para el grupo dieta apareada, mientras que este peso de los productos de la gestación representaba el 48,24% en el grupo dieta libre y 51,03% en el grupo alcohol (figura 1).

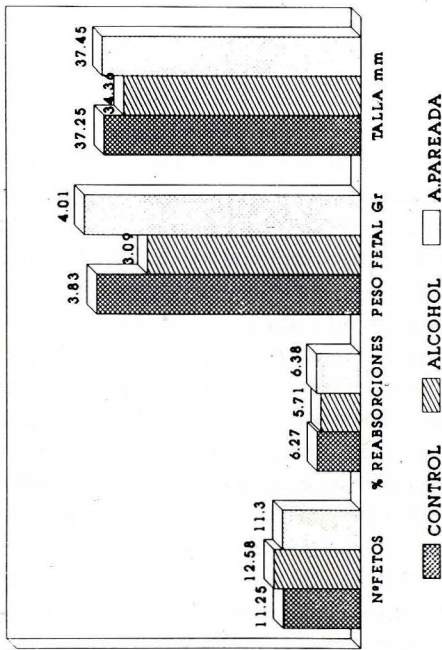
En relación con la fertilidad (número de fetos y porcentajes de reabsorciones) no hubo diferencias significativas entre los tres grupos. Al estudiar los fetos, se comprobó que el grupo alcohol tenía significativamente disminuidos con respecto a los grupos controles el peso y talla con una $p < 0.01$ (tabla I). Los órganos fetales, también, fueron más pequeños para el grupo alcohol. El cerebro mostró una significación de $p < 0.01$ con respecto al grupo dieta apareada y de $p < 0.05$ con respecto al grupo dieta libre. La significación para el caso del riñón fue de $p < 0.01$ con respecto a los dos grupos control. El peso del corazón no mostró diferencia significativa entre los tres grupos, y, finalmente, el peso hígado del grupo alcohol fue menor mostrando una significación de $p < 0.01$ con respecto a los dos grupos control (figuras 2 y 3).

A la observación de los fetos con lupa no se apreciaron malformaciones a nivel del paladar, columna, cola y órganos internos en ninguno de los tres grupos.

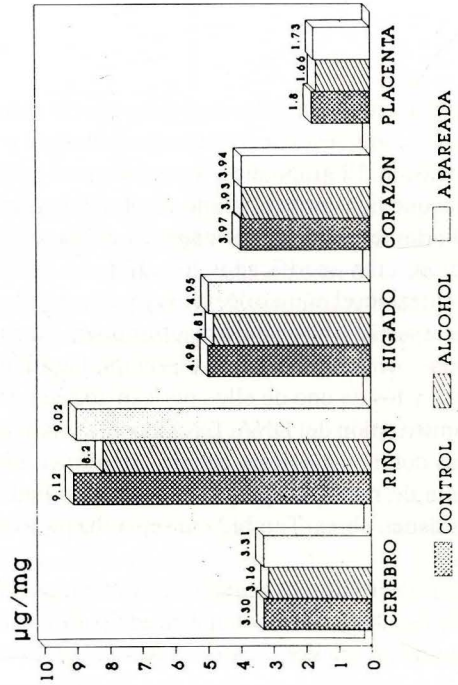
La cuantificación del DNA, para los distintos órganos, mostró diferencia significativa, siendo menor para el grupo alcohol, con respecto a los otros dos grupos, en el caso del cerebro ($p < 0.05$) y del riñón ($p < 0.01$) (figura 4).

En relación con el estudio placentario, no encontramos diferencia en cuanto al peso. Si existió cuando se relacionaba con el peso del feto, siendo mayor para el grupo alcohol con una $p < 0.01$ con respecto a los otros dos grupos. El estudio histológico a microscopía óptica no presentaba diferencias manifiestas entre los distintos grupos. El contenido de DNA placentario era similar en cada grupo (tabla I).

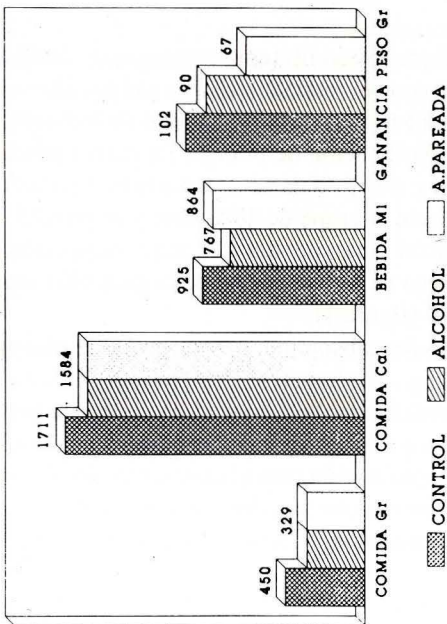
PARAMETROS FETALES



DNA FETAL



PARAMETROS MATERNOS



ORGANOS FETALES

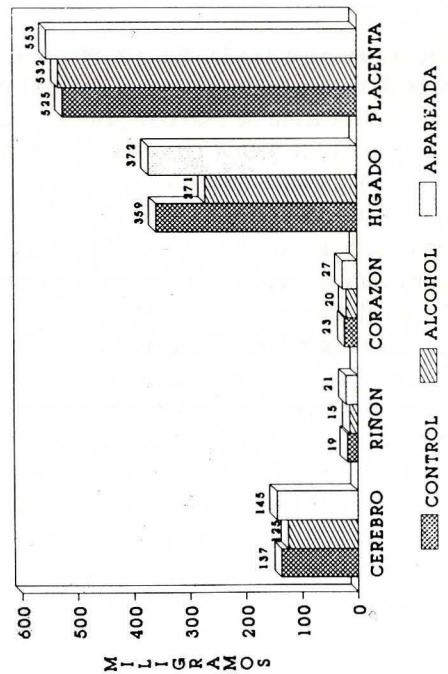


FIGURA 1. Estudio comparativo de los parámetros maternos estudiados: comida (en g y calorías), bebidas (ml) y ganancia de peso durante la preñez.
 FIGURA 2. Estudio comparativo de los parámetros fetales en los grupos estudiados: control, alcohol y dieta apareada.
 FIGURA 3. Estudio comparativo del peso de varios órganos fetales en los tres grupos de estudio.
 FIGURA 4. Valores medios de la concentración de DNA en diversos órganos fetales dentro de cada grupo de estudio.

TABLA I. Valores medios y estudio comparativo de los parámetros cuantificados en los diversos grupos de estudio.

PARÁMETROS	CONTROL		ALCOHOL		A. PAREADA		SIGNIFIC.
	\bar{X}	ESM	\bar{X}	ESM	\bar{X}	ESM	
COMIDA g	450,08	13.74	329.66	15.24	329.66	15.24	a,b
APORTE Cal	1.711.66	52.25	1.584	60.70	1584	60.70	N.S.
BEBIDA ml	925.25	47.06	767.75	31.75	864.4	27.03	a
INCR PESO g	102.16	6.19	90.5	5.22	67.8	4.75	b,c
Nº FETOS	11.25	0.78	12.58	0.54	11.3	0.73	N.S.
% REABSORC.	6.27	3.53	5.71	2.08	6.38	2.53	N.S.
TOT. GEST. g	49.32	3.76	45.36	2.07	52.10	4.94	N.S.
PESO FETO g	3.83	0.069	3.09	0.14	4.01	0.20	a,c
TALLA mm	37.25	0.27	34.36	0.42	37.45	0.72	a,c
PESO ORG. g							
CEREBRO	0.137	0.0017	0.120	0.0032	0.145	0.0045	a,c
RIÑÓN	0.018	0.0006	0.0146	0.00068	0.021	0.0012	a,c
CORAZÓN	0.023	0.0010	0.020	0.0010	0.026	0.0016	c
HÍGADO	0.359	0.0085	0.271	0.014	0.372	0.015	a,c
PLACENTA	0.525	0.0100	0.53	0.016	0.553	0.020	N.S.
DNA µg/mg							
CEREBRO	3.30	0.025	3.16	0.034	3.31	0.048	a,c
RIÑÓN	9.12	0.034	8.20	0.110	9.02	0.022	a,c
HÍGADO	4.98	0.047	4.81	0.052	4.95	0.060	a
CORAZÓN	3.97	0.047	3.93	0.065	3.94	0.057	N.S.
PLACENTA	1.80	0.046	1.66	0.045	1.73	0.049	N.S.

a: significación < 0.05 entre los grupos CONTROL y ALCOHOL

b: significación < 0.05 entre los grupos CONTROL y A. PAREADA

c: significación < 0.05 entre los grupos ALCOHOL y A. PAREADA

Discusión

Las modificaciones en la ingesta de comida en la rata del grupo alcohol es un hecho fácilmente explicable y que ha sido referido por otros autores (Weinberg, 1984). El alcohol tiene un alto valor calórico (7,1 kcal/g) pudiendo reemplazar y desplazar a otros alimentos de la dieta. Un alcohólico, por ejemplo, puede consumir un tercio o la mitad de sus requerimientos energéticos en forma de alcohol, y esto tiene un significativo descenso en la demanda de alimentos. Además de desplazar a otros alimentos ricos en nutrientes, el alcohol, tiene un efecto anorexígeno (Gottfried, 1978; Smith, 1979; Sorette, 1980).

En nuestro estudio, los datos referentes a la fertilidad (número de fetos y de reabsorciones) no indican compromiso por el hecho de consumir alcohol, ya que los resultados fueron parecidos para los tres grupos. Resultados similares encontró Gallo (1986). Hay varios autores que han descrito un aumento del número de reabsorciones (las cuales son comparables a los abortos en humanos) (Chernoff, 1977; Randall, 1981; Persaud, 1983; Sanchis, 1986). En nuestro caso, repetimos, no encontramos tal efecto negativo sobre la fertilidad a nivel experimental.

En nuestro estudio ha sido bien patente el retraso del crecimiento fetal, talla y peso, y de sus órganos vitales. Evidentemente, este efecto negativo sobre el desarrollo fetal debe achacarse al consumo de alcohol, ya que el grupo dieta apareada, con la misma ingesta alimentaria, no ha sufrido descenso en talla y peso fetales, así como tampoco a nivel de sus órganos. Obviamente, el único hecho diferenciador radica en el consumo materno de alcohol lo que conlleva la exposición al mismo por parte del feto.

Aunque el alcohol sea el responsable de estos efectos, bien de forma directa o indirecta, no está bien aclarado el modo de actuación. No obstante, se pueden sugerir varias hipótesis que, antes de excluirse, pueden ser complementarias. En primer lugar, debemos considerar los efectos directos del alcohol; en segundo lugar, los efectos de acetaldehído y, finalmente, los efectos que el alcohol indirectamente ejerce sobre la nutrición (malnutrición). En cuanto al primer apartado, Brown (1979), en estudios «in vitro» sobre ratas, observó un retraso en el crecimiento dosis dependiente, siendo un efecto directo del alcohol en ausencia de alteraciones nutritivas, metabólicas o fisiológicas maternas. Las deficiencias estructurales fueron atribuidas a una reducción en el número de células. Scott (1977) sugirió, como mecanismo de acción, una alteración en la proliferación celular. Chin (1979) comprobó que el alcohol ejerce un efecto directo sobre la estructura molecular de los fosfolípidos de la membrana celular, provocando un aumento de la permeabilidad. Esto podría alterar la proliferación, migración y fisiología celular. Por lo que hace referencia al segundo apartado, al acetaldehído, este metabolito del etanol juega un papel crítico en la teratogénesis. Es mil veces más embriotóxico que el etanol. Tanto los estudios «in vivo» como «in vitro» han evidenciado un retraso en el crecimiento (Dreosti, 1981; Campbell y Fantell, 1983) y un incremento de anomalías cardiovasculares y del SNC (O'Sea y Kaufman, 1981; Sreenathan, 1982; Webster, 1983).

La consideración de los efectos indirectos del alcohol resulta muy interesante. El alcohol puede originar hipo y/o malnutrición. La malnutrición puede tener origen en tres niveles distintos: a nivel de la ingesta (malnutrición primaria), a nivel de la digestión y absorción (malnutrición secundaria) y a nivel de la utilización de los nutrientes (malnutrición terciaria). Estos tres aspectos se han estudiado, tanto a nivel humano como experimental, cuando hay consumo moderado de alcohol. Ya hemos dicho que el alto valor energético del etanol puede desplazar fácilmente a otros nutrientes de la dieta. En nuestro caso, las ratas consumían el 22% de las calorías en forma de alcohol. Como las calorías del alcohol no van asociadas con vitaminas, minerales ni otros nutrientes esenciales, el aporte de estas calorías «vacías» puede producir deficiencias en la nutrición. Esta situación es especialmente crítica en el embarazo, situación en la que los requerimientos nutritivos están aumentados, precisando un 30% más de calorías y tres veces más de proteínas. Por otra parte, sabemos que el alcohol tiene un efecto deletéreo en casi todos los niveles del tracto digestivo, como, también, un efecto tóxico directo sobre muchos órganos, tales como el hígado y páncreas. Así, el consumo de alcohol puede alterar el metabolismo, transporte, utilización, activación y almacenamiento de casi todos los nutrientes esenciales.

Además, prenatalmente, se ha comprobado que una dosis aguda de alcohol provoca colapso de la circulación umbilical (Mukherjee, 1982) mientras que el consumo crónico disminuye el flujo sanguíneo hacia la placenta (Jones, 1981) y reduce el transporte placentario hacia el feto.

En relación con el metabolismo de las vitaminas y minerales, el alcohol puede interferirse con la utilización de la mayoría de estas sustancias. Las deficiencias más comúnmente referidas corresponden a los folatos, tiamina, vit. A y B (piridoxina) así como el zinc y magnesio. El déficit de varias de estas sustancias se ha asociado con malformaciones y retrasos del crecimiento, especialmente las deficiencias de folatos y de zinc (Weinberg, 1984; Mc Clain, 1983; Fischer, 1988; Zidenberg-Cherr, 1988).

Por lo que respecta al metabolismo de proteínas y aminoácidos, tanto en los animales como en los humanos, el consumo crónico del alcohol causa frecuentemente una reducción en el aporte proteico. Además, el alcohol induce el daño hepático pudiendo afectar al transporte, almacenamiento, metabolismo y utilización de los aminoácidos. Dosis agudas de etanol pueden alterar la absorción de éstos y suprimir la captación de varios de ellos por el hígado (Lieber, 1982). En relación con los aminoácidos, la anomalía más frecuentemente observada en el plasma es que, en el alcohólico, aumenta los niveles de aminoácidos aromáticos y disminuyen los de cadena ramificada (Weinberg, 1984).

Además, la malnutrición puede también aumentar los efectos negativos del etanol sobre la función intestinal. La ingesta de alcohol y la malnutrición pueden provocar la malabsorción de nutrientes esenciales. En resumen, el estado nutricional de la madre es claramente una variable crítica en términos de desarrollo fetal. Deficiencias nutricias, tales como las de folatos, zinc, vit. A y magnesio, tienen un efecto teratogénico por sí mismo o, al menos, tiene un efecto adverso sobre el desarrollo fetal. Más aún, pueden presentarse efectos sinérgicos entre alcohol y déficit de varios nutrientes. Debido a que el alcohol induce deficiencias nutritivas a través de varios mecanismos, o puede interactuar con el estado nutricional materno, es posible que tales interacciones o efectos indirectos estén implicados en aspectos del SFA.

Como hemos indicado, lo más significativo de los efectos del alcohol sobre el feto es el retraso del crecimiento. Éste puede ser consecuencia de una hipoplasia y/o hipotrofia celular a nivel de los distintos órganos. De ahí, nuestro interés en cuantificar el DNA como indicador indirecto de la densidad celular a nivel de los distintos órganos. En nuestro caso, apreciamos un descenso significativo para el riñón y el cerebro de los fetos expuestos intraútero al etanol. A este respecto, revisando los trabajos de la literatura que hacen referencia a consumos moderados como el nuestro, los resultados muestran cierta disparidad. Así ciertos autores (Riley, 1978; Gallo, 1982; Bartley, 1983) no encuentran diferencias. Pullen (1988) encontró un descenso del peso cerebral y hepático, como en nuestro caso, acompañado de una disminución en la cantidad de proteínas en dichos órganos, pero no vio diferencia cuando analizó el contenido de DNA. No obstante, nuestros resultados coinciden con los de varios autores que han descrito un menor contenido de DNA a nivel renal y cerebral (Gallo, 1986; Sancis, 1986). Gallo (1986) encontró descensos significativos a nivel del riñón, cerebro e hígado. En relación con este último órgano, consideró que el efecto era más una consecuencia de la dieta que del etanol. Este autor también coincide con nosotros al observar que el órgano más afectado era el riñón, con una significación altísima ($p < 0.001$). También para Henderson (1981) y Abel (1986) fue este el órgano más afectado. Estas diferencias podrían explicarse por las diferentes dosis, tiempo y vías de administración, ya que como ha puesto de manifiesto Rosett (1984) depende de la alcoholemia alcanzada y de los días de gestación que el feto se halla expuesto.

Todavía no se conocen los mecanismos reales por los que el alcohol produce estos efectos a nivel celular. Algunos autores han hecho hincapié en una menor síntesis o formación de DNA (Dreosti, 1981; Ciociola, 1988; Abel, 1986). Otros han comprobado una mayor destrucción, destacando como factor primordial la hipoxia tisular (Abel, 1986; Kolomeitseva, 1989; Ali, 1988). También estarían implicados mecanismos regeneradores. Se ha visto una menor capacidad regeneradora (Gerhart, 1988; Abel, 1986).

BIBLIOGRAFÍA

- ABEL, E.L.; DICTCHEFF, B.A. (1978): Effects of prenatal alcohol exposure on growth and development in rats. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **207**: 916-921.
- ABEL, E.L. (1986): Marihuana, tabaco, alcohol y reproducción. Edic. Díaz de Santos. Madrid.
- ABEL, E.L. (1988): Fetal alcohol syndrome in families. *Neurotox Teratol* **10**: 1-2.
- ALI, F. (1988): Mechanism of fetal alcohol effects: role of acetaldehyde. *Exp. Pathol.* **33**: 17-21.
- BARTLEY, H.L. (1983): The effects of alcohol-induced malnutrition in pregnancy on offspring brain and behavioral development. *Pharmacol Biochem Behav* **10**: 513-518.
- BRANDT, E.N. (1982): Alcohol consumption during pregnancy. Testimony before the Subcommittee on Alcoholism and Drug Abuse of the Committee on Labor and Human Resources, US Senate, Washington, DC, US Government Printing Office, December 21, pp. 9-23.
- BROWN, N.A.; GOULDING, E.H. (1979): Ethanol embryotoxicity: direct effects on mammalian embryos in vitro. *Science* **206**: 573-575.
- CAMPBELL, M.A.; FANTEL, A.G. (1983): Teratogenicity of acetaldehyde in vitro: relevance to the fetal alcohol syndrome. *Life Sci* **32**: 2.641-2.647.
- CIOCIOLA, A.A. (1988): Teratogenic and behavioral anomalies induced by acute exposure of mice to ethanol and their possible relation to fetal brain DNA synthesis. *Pharm Res.* **5**: 447-452.
- CHERNOFF, G.F. (1977): The fetal alcohol syndrome in mice: a animal model. *Teratology* **15**: 223-230.
- CHIN, J.H.; GOLDSTEIN, D.B. (1979): Fluidity and lipid composition of mouse biomembranes during adaptation to ethanol. *Alcoholism Clin. Exp. Res* **3**: 47-49.
- DREOSTI, I.E.; BALLARD (1981): The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA syntesis in growing cells and on fetal development in the rat. *Alcoholism Clin. Exp. Res* **5**: 357-362.
- FISHER, S.E. (1988): Neonatal and maternal hair zinc levels in a nonhuman primate model of the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism* **12**: 417-421.
- GERHART, M.J. (1988): Epidermal growth factor binding in the presencie of ethanol. *Adv. Alcohol Subst. Abuse* **7**: 209-211.
- GALLO, P.V.; WEINBERG, J. (1982): Neuromotor development and response inhibition following prenatal ethanol exposure. *Neurobehav Toxicol Teratol* **4**: 505-513.
- GALLO, P.V.; WEINGERG, J. (1986): Organ growth and Cellular Development in Ethanol Exposed Rats. *Alcohol Vol. 3*, pp. 261-267.

- GOTTRIED, E.B.; KORSTEN, M.A.; LIEBER, C.S. (1978): Alcohol induced gastric and duodenal lesions in man. *Am. J. Gastroenterol* **70**: 587-592.
- HENDERSON, G.I. (1981): Fetal alcohol syndrome: overview of pathogenesis. *Neurobehav Toxicol Teratol* **3**: 73.
- JONES, K.L.; SMITH, D.W.; ULLELAND, C.N.; STREISSGUTH, A.P. (1973): Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* **1**: 1.267-1.271.
- JONES, P.J.H.; LEICHTER, J. (1981): Placental blood flow in rats fed alcohol before and during gestation. *Life Sci* **29**: 1.153-1.159.
- KOLOMEISTSEVA, I.A. (1989): Effects of intrauterine alcohol intoxication on the function of the central nervous system in the progeny. *Akush Ginekol* **1**: 46-51.
- LEMOINE, P.; HAROUSSEAU, H.; BORTEYRU, J.P.; MENUET, J.C. (1968): Les enfants de parents alcooliques: anomalies observées. A propos de 127 cas. *Quest Med.* **21**: 476-482.
- LIEBER, C.S. (1982): The feeding of alcohol in liquid diets: Two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism Clin Exp Res.* **6**: 523-531.
- McCLAIN, C.J. (1983): Zinc deficiency in the alcoholic: A review. *Alcoholism Clin Exp. Res* **7**: 5-10.
- MUKHERJEE, A.B. (1982): Maternal ethanol exposure induces transient impairment of umbilical circulation and fetal hypoxia in monkeys. *Science* **218**: 700-702.
- OLEGARD, R.; SABEL, K.G.; ARONSSON, M.; SANDIN, B.; JOHANSSON, P.R.; CARLSSON, C.; HYLLERMAN, M.; IVERSEN, K.; HRBEK, A. (1979): Effects on the child of alcohol abuse during pregnancy: retrospective and prospective studies. *Aca Pediatr. Sacnd (Suppl.)* **275**: 112-121.
- O'SHEA, K.S.; KAUFMAN, M.H. (1981): Effect of acetaldehyde on the neuroepithelium of early mouse embryos. *J. Anat.* **128**: 65-76.
- PERSAUD, T.V.N. (1983): Prenatal loss in the rat following moderate consumption of alcohol incorporated in a liquid diet. *Ant. Anz. Jena* **153**: 169-174.
- RANDALL, C.L.; LOCHRY, E.A.; HUGHES, S.S.; SUTKER, P.B. (1981): Dose-response effect of prenatal alcohol exposure on fetal growth and development in mice. *Substance and alcohol actions misuse* **2**: 349-357.
- RILEY, E.P. (1979): Lack of response inhibition in rats prenatally exposed to alcohol. *Psychopharmacology* **62**: 47-52.
- ROSETT, H.L. (1984): Alcohol and the fetus. A clinical perspective. Oxford University Press, New York.
- SANCHIS, R.; SANCHO-TELLO, M.; GÜERRI, C. (1986): The effects of chronic alcohol consumption on pregnant rats and their offspring. *Alcohol & Alcoholism*, vol. 21 n° 3, pp. 295-305.
- SCOTT, W.J. (1977): Cell death and reduced proliferative rate. In JG and FC Fraser eds. *Handbook of Teratology* vol. II Plenum Press 81-98, New York.
- SMITH, J.C. (1979): Marginal nutritional states and conditioned deficiencies. In Niaaa Monograph **2**: Alcohol and nutrition, 23-46.
- SOKOL, R.J. (1981): Alcohol and abnormal outcomes of pregnancy. *Can Med. Assoc. J.* **125**: 143-148.
- SORRETTE, M.C.A.; MAGGIO, A.; STARPOLI; ABOISSEVAIN, M.; GREWOOD (1980): Maternal ethanol intake affects rat organ development despite adequate nutrition. *Neurobehav Toxicol Teratol* **2**: 181-188.
- SREENATHAN, R.N.; PADMANABHAN, R. (1982): Teratogenic effects of acetaldehyde in the rat. *Drug Alcohol Dependence* **9**: 339-350.
- WARREN, K.R. (1989): Alcohol-related birth defects: an update. *Public Health Rep* **103** (6): 638-642.
- WEBSTER, W.S. WALSH, D.A. (1983): Some teratogenic properties of ethanol acetaldehyde in C57 Bl/6J mice: implications for the study of the fetal alcohol syndrome. *Teratology* **27**: 231-233.
- WEINBERG, J.; GALLO, P.V. (1982): Prenatal ethanol exposure: Pituitary-adrenal activity in pregnant dams and offspring. *Neurobehav Toxicol Teratol* **4**: 515-520.
- WEINBERG, J. (1984): Nutritional Issues in perinatal alcohol exposure. *Neurobeh Toxicol and Teratology* **6**: 261-269.
- ZIDENBERG-CHERR, S. (1988): Influence of ethanol consumption on maternal-fetal transfer of zinc in pregnant rats on day 14 of pregnancy. *J. Nutr.* **118**: 865-870.

Correspondencia: Dr. G. Snacho Leza
Hospital Ortiz de Zárate
c/ José Achótegui, s/n
01009 Vitoria. España

ENVEJECIMIENTO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR. ESTUDIO EN RATAS NORMALES Y CASTRADAS

ARTICULAR CARTILAGE AGING. A STUDY IN NORMAL AND CASTRATED RATS

I. SMITH-FERNÁNDEZ, V. SMITH-FERNÁNDEZ e I. FERNÁNDEZ-ORTEGA

Departamento de Morfología Normal y Patológica. Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

RESUMEN

Estudiamos la superficie del cartílago hialino de la articulación coxofemoral con el microscopio fotónico y el electrónico de barrido (MEB), en ratas Wistar: machos y hembras, normales y castradas, de 6, 12 y 24 meses.

Se describen, con el SEM, áreas que guardan relación con el envejecimiento. Estas «áreas de envejecimiento» aparecen antes y son más abundantes en los animales castrados que en los normales.

PALABRAS CLAVE: Articulación coxofemoral. Cartílago articular. Envejecimiento. «Áreas de envejecimiento». Castración. Rata Wistar.

SUMMARY

We study the hyaline cartilage surface of the articulation coxae with the light microscope and the scanning electron microscope (SEM) in Wistar rats: male, female, normal and castrated, with 6, 12 and 24 months.

Areas in relation with the aging process are describe through SEM. These «aging areas» appear before and are more abundant in castrated animals than in the normal ones.

KEY WORDS: Articulation coxae. Articular cartilage. Aging. Aging areas. Wistar rat. Castration.

Introducción

Las estructuras del organismo manifiestan cambios relacionados con su desarrollo, maduración, momento funcional o involución. Cuanto mayor sea la edad, los procesos involutivos, propios de un envejecimiento normal, tienen más probabilidades de transformarse en patológicos. Los que afectan al aparato locomotor tienen una especial importancia por su repercusión en la calidad de vida y eficacia laboral.

Los avances en el conocimiento de la estructura del cartílago no han permitido todavía saber exactamente el mecanismo íntimo que motiva la aparición de una artrosis. Actualmente se acepta son múltiples los factores etiológicos causantes de las alteraciones del condrocito. Estas alteraciones perjudican la cinética y la calidad de los procesos de síntesis y degradación que localmente llevan a cabo estas células (1). La incidencia es algo mayor en las mujeres, pudiéndose detectar entre los quince y veinticuatro años ya en un 11% y alcanzar, en ambos sexos, a partir de los setenta y cinco el 96% (11).

De acuerdo con las observaciones anatomopatológicas (3), sería un hecho normal que se convertiría en patológico cuando al progresar apareciera el dolor y otras manifestaciones clínicas.

Creemos significativo que la artrosis de rodilla sintomática sea más frecuente en mujeres y a partir de los cuarenta y cinco años, así como en el 95% de ambos sexos en edades avanzadas.

El mantenimiento de un cartilago articular, en condiciones de normal funcionamiento, está basado en un correcto equilibrio entre el desgaste producido a causa del uso de la articulación y la regeneración que tiene lugar. Cuando este equilibrio se rompe, se inician las alteraciones anatomopatológicas (7). El cartilago articular diartrodial hialino se adapta con dificultad a una mayor exigencia funcional, ya que no cuenta con un potencial de reserva (12). Creemos de interés estudiar como repercute, en él, el envejecimiento y la castración. La bibliografía consultada aborda el problema desde diferentes campos, pero echamos a faltar determinados enfoques a los que quisiéramos aportar.

En este trabajo el estudio lo hacemos fundamentalmente con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), ya que permite detectar mínimos detalles morfológicos de una superficie que limita con una cavidad virtual convertida en real al seccionar la cápsula articular.

En un animal cuyo ciclo vital es corto, rata Wistar, podremos estudiar su proceso de involución secuencialmente y así tener un patrón del «proceso normal de envejecimiento». Su articulación coxofemoral tiene dimensiones muy adecuadas para estudiar en una preparación el acetábulo y en otra la cabeza femoral en el MEB, reservando la otra articulación para el estudio con el Microscopio Fotónico (MF).

Material y Método

Articulaciones coxofemorales de ratas Wistar (35 machos y 35 hembras). Catorce grupos de cinco animales cada uno. La diferencia entre los grupos las da: el sexo, ser normales o castradas, y, la edad de sacrificio. Todos los grupos fueron sometidos al mismo hábitat, dieta, temperatura y horas de luz:

Machos Normales		Machos castrados a los 3 meses	
Grupo I	de 1 mes	Grupo V	de 6 meses
Grupo II	de 6 meses	Grupo VI	de 1 año
Grupo III	de 1 año	Grupo VII	de 2 años
Grupo IV	de 2 años		
Hembras Normales		Hembras castradas a los 3 meses	
Grupo VIII	de 1 mes	Grupo XII	de 6 meses
Grupo IX	de 6 meses	Grupo XIII	de 1 año
Grupo X	de 1 año	Grupo XIV	de 2 años
Grupo XI	de 2 años		

Anestesia: Intraperitoneal, 2 cc de pentobarbital sódico 30 mg/kg. *Perfusión:* Intraoártica desde ventrículo, abertura aurícula izquierda, bomba peristáltica Watson-Marlow 101 U, 25 cc/minuto, lavado previo con 160 cc de suero salino. *Fijación:* 300 cc de glutaraldehído al 20%, tampón fosfato 0,1 M (Soluciones patrones: fosfato sódico dibásico 14,2 g/l y fosfato potásico monobásico 13,6 g/l, pH 7, 2-7, 4). Extracción de la articulación, eliminación de la cápsula, fractura de la pieza femoral inmediatamente por debajo de trocánteres y de la acetabular en su continuación con pubis, isquión e ileón. Las piezas destinadas al MEB se introducen en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M y las destinadas al MF en formol al 15% para continuar su procesamiento. *MEB:* 2 h fijador de la perfusión; lavado 45 minutos en agua destilada; deshidratación por gradientes de alcohol etílico y acetona. Deseccación: punto crítico del anhídrido carbónico en un CPD 020 Balzeis Unión. *Metalización:* oro en evaporador de vacío Jeol JFC 1100. *Visualización y fotografiado:* MEB. Jeol JSM-840. MF: Formol 15%, 48 horas.

Decalcificación: a. nítrico 5% hasta consistencia de plástico. *Lavado:* 12 hs. *Deshidratación:* Alcoholes. *Inclusión:* Parafina. Tallado del bloque. *Cortes:* 48 μm . *Tinciones:* Hematoxilina-eosina, tricrómico Masson-Goldner, Safranina.

Se extrajeron ovarios y testículos para su estudio.

Resultados

Sólo se detectan espermatogonias y espermatoцитos I y II en Grupo I y folículos primordiales, primarios y secundarios en Grupo VIII. Tubos seminíferos con representación de toda la serie germinal: en Grupos II, III, IV y toda la gama de actividad ovárica en Grupos IX, X, XI.

Estudio con el microscopio fotónico

Grupos I-VIII: La tinción con safranina distingue en la matriz zonas de color violeta y zonas de color rosado. La periferia del corte limitando con la luz articular y la primera capa de condrocitos está ocupando un delgado estrato acelular rosáceo que contrasta con el matiz violeta intenso de la matriz que rodea las lagunas primarias. Con el tricrómico se aprecia, de superficie a profundidad, una pérdida de la coloración azul-verdosa.

Grupos II-IX: El delgado estrato acelular que limita con la cavidad articular se encuentra subdividido en dos. El más superficial se colorea en azul-verdoso con el tricrómico y el más profundo en anaranjado por el tricrómico y en violeta-magenta por la safranina. La coloración de este estrato profundo es casi continua con islotes en que se encuentra engrosado y acelular (figura 1).

Grupos V-XII: Con la safranina se sigue viendo la capa superficial teñida de violeta, pero existen zonas donde esta coloración desaparece, ofreciendo un aspecto discontinuo (figura 2).

Grupos III-X: La zona de cartílago que limita con la luz articular está estrechada en relación con los animales de seis meses, y sigue presentando aspecto biestratificado y de coloración con el tricrómico o la safranina.

Grupos VI-XIII: La safranina no tiñe el estrato profundo de la capa superficial.

Grupos IV-XI: Los condrocitos más periféricos están separados de la luz articular por una amplia zona de matriz que en algunos niveles se lamina, desgarrar y fisuriza. La safranina en estas zonas da muy poca coloración, contrastando con las zonas aparentemente normales.

Grupos VII-XIV: Se distinguen en el cartílago dos zonas: la más superficial, en algunas áreas está laminada, resquebrajada y desprendida y en la más profunda, invadida por tejido óseo.

Estudio con el microscopio electrónico de barrido

Grupos I-II-VIII-IX: Tanto hembras como machos, presentan características que se repiten con ligeras diferencias en toda la superficie del cartílago. A 1300 X (figura 3) la superficie está surcada por filamentos ofreciendo un aspecto reticulado irregular. Los filamentos confluyen y divergen entre sí, estando formados o llevando adheridas pequeñas esférulas o gránulos semejando cadenas.

Grupos III-X: Al lado de imágenes superponible a lo descrito para los animales más jóvenes aparecen áreas ovaladas o circulares de diámetro algo superior a 10 μm , que hacen relieve sobre la superficie de aspecto normal



(figura 4). Algunas de estas áreas presentan sus contornos agrietados o fisurizados, y parecen estar deprimidas en relación con la superficie vecina. En otras la superficie del área está descamándose y tienen un diámetro algo superior a $15\mu\text{m}$ (figura 5). Otras, han completado la descamación demudando la superficie del área (figuras 6-7) ofreciendo el fondo un aspecto crivado. Estas áreas son más abundantes en acetábulo que en cabeza femoral y más en hembras que en machos.

Grupos IV-XI: Los filamentos del retículo se agrupan reforzando el contorno de las áreas indicadas para los animales de un año (figura 9) e invadiendo los filamentos la oquedad que ofrece la presencia de gránulos (figura 8). Tanto en machos como hembras estas áreas son muy abundantes. En algunas áreas los contornos de la misma se encuentran reforzados por marcadas excrescencias (figura 10). Algunas amplias áreas de la superficie están recorridas por largos filamentos lisos, sin el aspecto granulado descrito en los animales de uno y seis meses.

Grupos V-XII: Con aumentos panorámicos (20 X) las cabezas y acetábulos han perdido la esfericidad. A mayores aumentos son abundantes las áreas ovaladas de diámetro mayor a las $10\mu\text{m}$, y de aspecto variado, unas hacen ligera protrusión (figura 11), otras están descamadas en parte, y teniendo otras reforzados sus contornos o el área globalmente (figura 12).

Grupos VI-XIII: Las cabezas y acetábulos están más deformadas que en los castrados de seis meses. Con aumentos ligeros (150 X), aparecen zonas con el aspecto general, descrito en animales más jóvenes no castrados, filamentosos y reticulados pero con la presencia de áreas ovaladas, la mayor parte con diámetro ostensiblemente superior a las $10\mu\text{m}$. La superficie no es lisa sino ondulada.

Grupos VII-XIV: En aumentos panorámicos es ostensible la pérdida de esfericidad y lisura de superficie. A pequeños aumentos se aprecia la gran cantidad de áreas ovoideas, o la agrupación de ellas semejando granos de café (figura 14), así como el aspecto ondulado de la superficie. Los filamentos son cortos, no convergentes, encontrándose a veces en hileras concéntricas (figura 13). Las áreas rebasan casi siempre las $10\mu\text{m}$; con contornos remarcados y agrupados ofreciendo el aspecto descrito en apartados anteriores.

Discusión y consideraciones

Cualquier estructura de un organismo tiene tres fases morfofuncionales: de desarrollo, de plenitud funcional y de envejecimiento. El cartilago hialino articular no es una excepción. Su elevada especialización como capa deslizante en el aparato locomotor, garantiza una carga de tipo medio a lo largo de toda la vida. La adaptación a una mayor exigencia funcional es algo que le está negado (12). No parece, por tanto, desacertado, aceptar que el cartilago empieza un proceso de senescencia antes que otras estructuras. Este comienzo de envejecimiento se debe manifestar en cambios morfológicos de la imagen anatómica que consideramos expresión de plenitud funcional.

La pérdida de su organización considerada como normal la empezamos a detectar en animales relativamente jóvenes (un año). En nuestra especie, lesiones del cartilago imputables a la senescencia, las han encontrado muy frecuentemente, de aparición precoz (5, 7, 16). Estos autores no estudiaron las lesiones con el MEB.

En nuestros resultados, la relativamente pronta aparición de lo que hemos descrito como «áreas ovaladas» al MEB, aumentó su frecuencia y tamaño con la edad, adelantándose su aparición y número en los animales castrados, y existiendo diferencias con el sexo. Pensamos sean estas «áreas ovaladas» la expresión del fallo funcional del cartilago hialino y, por tanto «áreas de envejecimiento».

Estas áreas rompen la uniformidad de la superficie articular normal que, Richter y Stoff (4), describen (con el MEB y a una magnificación de 4.500 X), están cubiertas de pequeñas formaciones esféricas que pueden unirse entre sí formando cadenas. Este aspecto de la superficie, que consideramos normal por ser el único que hemos visto en los animales de uno y seis meses no castrados, tanto machos como hembras, coincide bastante con nuestra descripción. Creemos que las cadenas descritas por Richter forman filamentos de distinto calibre al confluír o

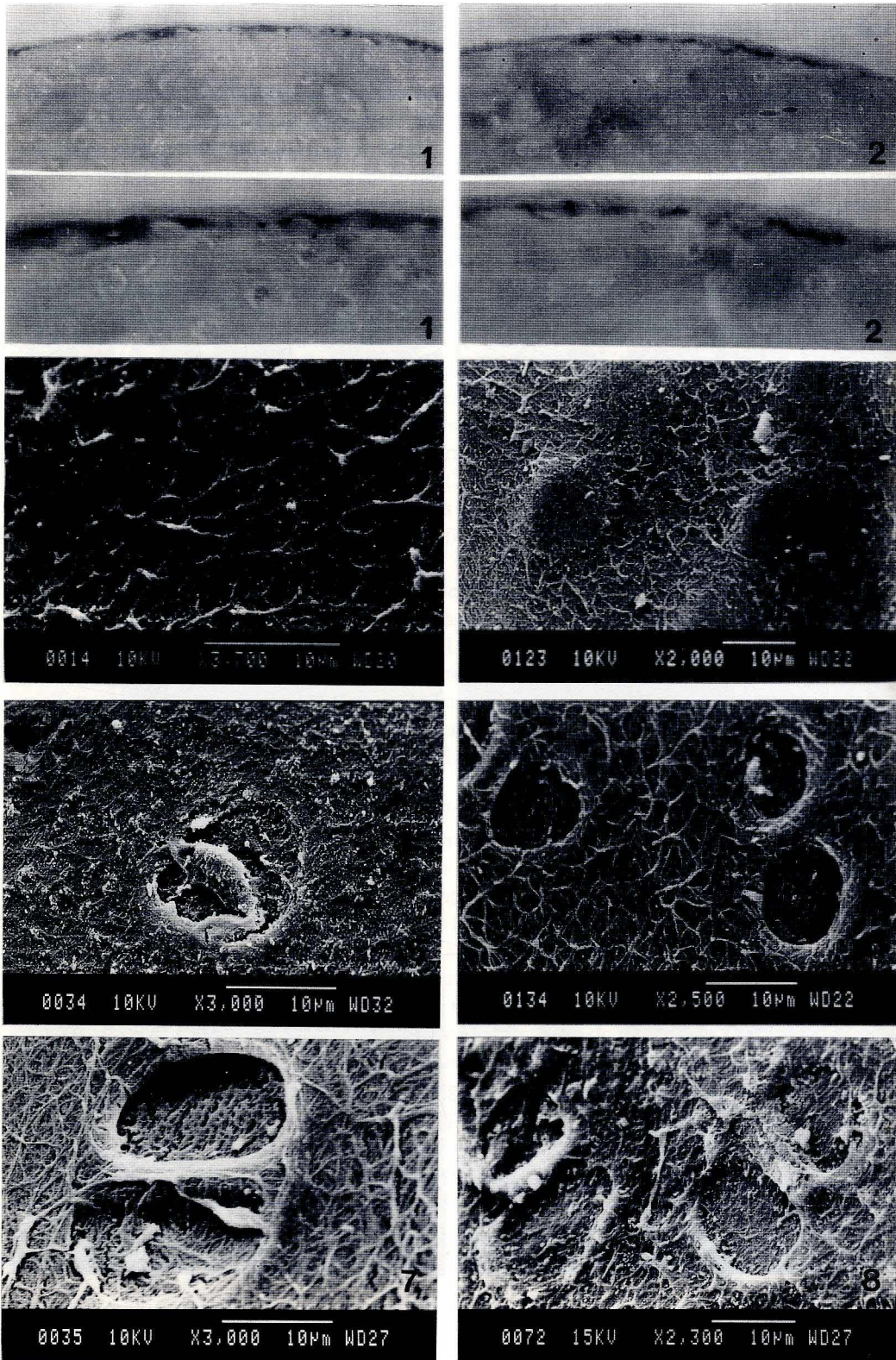


FIGURA 1. Ratas normales de seis meses. Safranina. MF.
FIGURA 2. Ratas castradas de seis meses. Safranina. MF.
FIGURA 3. Rata normal de seis meses. MEB.
FIGURAS 4, 5, 6 y 7. Ratas normal de un año. MEB.
FIGURA 8. Rata normal de dos años. MEB.

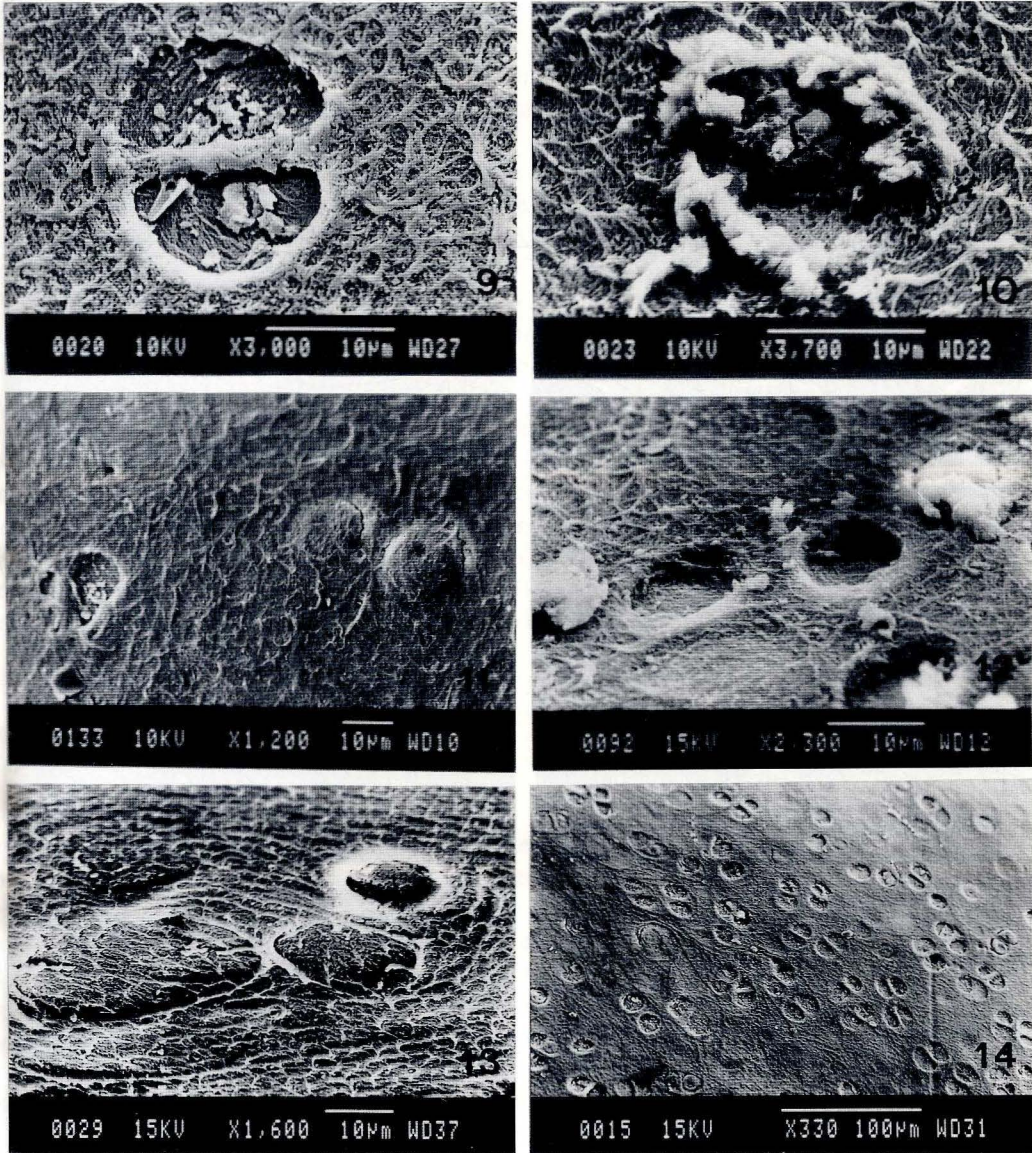


FIGURA 9. Rata normal de dos años. MEB.
FIGURA 10. Rata normal de dos años. MEB.
FIGURAS 11, 12. Rata castrada de seis meses. MEB.
FIGURAS 13, 14. Rata castrada de dos años. MEB.

diverger, dando un aspecto reticular entre cuyas mallas la superficie está cubierta de pequeñas formaciones esféricas. Estos filamentos podrían ser fibras de colágeno.

Las «áreas de envejecimiento» las interpretamos como pérdida de la eficacia en la capacidad funcional del condrocito, respecto al mantenimiento de los materiales intercelulares de acuerdo con las demandas, o pérdida de la capacidad de interacción matriz intercelular-células cartilagosas de cuyo mecanismo se ha ocupado Huang (8). En el esquema de Krstic (9), sobre la superficie del cartílago, aparecen unas áreas ovaladas que relaciona con los condrocitos. Su animal de trabajo sería un adulto en que empezaba a manifestarse el envejecimiento del cartílago.

Nos parece de interés la interpretación de Brandt (4), de la tinción rojo brillante, en nuestra iconografía rojo magenta, del método de la safranina como la expresión de un contenido normal de proteoglicanos, y, tinción menos intensa e irregular a causa de la pérdida de los mismos.

En nuestros animales más jóvenes en los que no apreciábamos «áreas de envejecimiento», la safranina tiñe amplias zonas de rojo magenta, y en los seis meses, tiñe la zona más profunda del estrato acelular, con condensaciones en forma de islotes que limita la luz articular con zonas donde existen condrocitos.

Este estrato acelular que forma el estrato más superficial, o Zona I, de los tratados de Histología, corresponde a la zona donde las fibras llevan dirección tangencial (2, 6, 10).

En las edades en que comenzamos a ver las «áreas de envejecimiento» (un año en animales normales y seis meses en castrados), la capa acelular teñida por la safranina es menos continua y sus islotes de condensación, menores.

Esta franja de tinción ha desaparecido en el resto de animales. Habiendo aumentado el número y diámetro de las «áreas de envejecimiento», sobre todo en los castrados de dos años. Parece pues existir relación entre zonas de pérdida de normalidad, al MEB, en la superficie del cartílago hialino, pérdida de la tinción de safranina en la capa profunda de la zona tangencial y la interpretación de Brandt (4) de pérdida de proteoglicanos.

En los animales de más edad (dos años), tanto normales como castrados, el espesor del cartílago se diferencia en dos zonas: la superficial, apenas teñida por la safranina donde la matriz se lamina, desgarras y fisuriza, y la profunda, teñida por la safranina, donde se plantearía la posibilidad de regeneración del cartílago al lado de una invasión por tejido óseo.

En los animales castrados de un año, la superficie del cartílago no se presenta plana, y en los castrados de dos, las cabezas femorales y cavidades acetabulares se han deformado perdiendo su esfericidad. La pérdida de distribución reticular en las zonas que mantienen aspecto normal, adoptando la distribución en hileras concéntricas recuerda las imágenes de cartílagos articulares condromalácicos (13).

Es palpable el influjo de la castración que adelanta la aparición de «áreas de envejecimiento» a los seis meses en animales castrados y aumenta considerablemente la frecuencia de estas áreas, así como la proximidad de las mismas, haciendo aparecer imágenes en «granos de café» difíciles de ver en los otros animales (figura 14).

Las «áreas de envejecimiento» no ofrecen todas el mismo aspecto como ya indicábamos en un trabajo previo (15). El proceso degenerativo debe durar un cierto tiempo y por tanto, lo que vemos es el mismo proceso pero en unos iniciándose y en otros consolidándose. Nos parece lógico agrupar las diferentes imágenes en un orden secuencial: al comienzo del proceso, el área se distingue de sus contornos por una mayor densidad (figura 4), después forma relieve (figura 11), quizás debido a un proceso de edematización seguido de una fisurización del área, pérdida del líquido edematizado y consecuentemente, hundimiento y descamación (figura 5).

Todo proceso degenerativo, involutivo o de envejecimiento trata de ser corregido. El éxito depende de la plasticidad de la estructura que analicemos. Este intento de regeneración tendría su expresión en los refuerzos de filamentos (figuras 7, 8 y 9), en los contornos de las «áreas de envejecimiento», y en las protrusiones (figuras 10 y 12) apreciadas en los castrados de un año o en los normales de dos años.

BIBLIOGRAFÍA

1. BARCELO, P. (Sr.) y BARCELO, P. (Jr.) (1982): La artrosis. Ancora, S.A. Ediciones Médica. Barcelona.
2. BARGMANN, W. (1962): Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. George Thieme Verlag, Stuttgart.
3. BENNET (1942): Cit. Capítulo 5 Reumatología. Medicina Interna P. Ferreras. Edit. Marín. Barcelona (1982).

4. BRANDT, K.D. (1985): Efectos del ácido acetilsalicílico y de los AINE sobre el cartílago articular. 66º Reunión Anual del American Collage of Physicians. Washington D.C. 28-31 marzo. 1985.
5. BYERST (1970): Cit. por Barcelo.
6. DÍAZ-FLORES, L. y SÁNCHEZ, G. (1980): Lecciones de Histología. Talleres Arte. Granada.
7. HARRISON, SCHAJOWICZ and TRUETA (1963): Ortoartritis of the hip; a study of the nature and evolution of the disease. *J.B. a J. Surg. (B)* **35B**: 598.
8. HUANG, G. (1977): Extracellular matrix-cells interactions and chondrogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **123**: 169.
9. KRSTIC, R.V. (1978): *Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere*. Springer-Verlag. Berlin.
10. KRSTIC, R.V. (1984): *General Hystology of the Mammals*. Springer-Verlag. Berlin.
11. LAWRENCE, J.S. (1947): *Rheumatism in populations*. Williams Heineman. Medical Books, Ltd. Londres, 1977.
12. MATHIES, H. y RICHTER, I.E. (1986): *La artrosis*. Medical Advise, S.A. Barcelona.
13. OSAMU, O.; JIRO, N.; TETSUGIRO, I., and cols. (1988): An Electron Microscopic Study of Early Pathology in Chondromalacia of the Patella. *J. Bone and Joint Surg.*, **70-A**: 833-899.
14. RICHTER, I.E. und STOFFT, E. (1977): Gelenkoberflächenveränderungen als Folge Gestörter Funktionen. Rasterelektronenmikroskopische Aspekt. *Verh. Anat. Ges.* **71**: 1.411-1.417.
15. SMITH, I.; VILLALOBOS, M.A.; FERNANDEZ-ORTEGA, I. y SMITH-AGREDA, J.M. (1989): Envejecimiento articular; Un estudio con microscopio electrónico de barrido. *Histología Médica*, **5**: 151-152.
16. VERHGUTH (1955): Cit. por Barcelo.

Correspondencia: Dra. I. Smith-Fernández
Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina
Campus Universitario de Teatinos
29080 Málaga. España

CRONOLOGÍA DE APARICIÓN DE LOS CENTROS DE OSIFICACIÓN DEL AUTÓPODO PELVIANO EN EL GATO SIAMÉS (*Felis catus L.*)

CHRONOLOGY OF APPEARANCE OF OSSIFICATION CENTERS OF THE FOOT IN THE SIAMES CAT (*Felis catus L.*)

J.M. VÁZQUEZ, M.I. VILLA, F. GIL, R. LATORRE, G. RAMÍREZ y F. MORENO

Departamento de Anatomía y Embriología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Murcia

RESUMEN

Se realiza un estudio mediante técnicas radiológicas de la cronología de osificación del autópodo pelviano en el gato siamés, desde el nacimiento hasta la 25ª semana de desarrollo postnatal. Para la experiencia hemos utilizado un total de 40 gatos (19 machos y 21 hembras), pertenecientes a 11 camadas, que fueron objeto de diferentes controles: patrón racial, sanitario, dietético, de crecimiento y radiactivo. Se determinó el momento de aparición y la evolución de los núcleos que integran el basípodo, metápodo y acrópodo del miembro pelviano. Asimismo, referimos los fenómenos de fusión que tienen lugar durante este periodo de tiempo y definimos la secuencia de osificación predominante en el tarso. Los aspectos de la osificación postnatal del autópodo pelviano en el gato siamés fueron comparados con los observados en el gato común por diferentes autores.

PALABRAS CLAVE: Osificación. Autópodo pelviano. Gato siamés. Radiología.

SUMMARY

Chronological ossification of the foot on the siames cat was studied by radiological techniques, from birth to the 25th postnatal week. In this experience we used 40 kittens (19 males and 21 females), belonging to 11 litters, monitored for: racial pattern, health, feeding, growth and radioactive dose. The moment of appearance and the evolution of ossification centers which are implicated in the foot were determined. Likewise, we reported the closure features at this period and defined the predominant ossification sequence in tarsus. The ossification aspects of the foot in the siames cat were compared with that of the common cat.

KEY WORDS: Ossification. Foot. Siames cat. Radiology.

Introducción

En Medicina Veterinaria, la mayoría de los trabajos sobre cronología de osificación radiográfica tienen al perro como sujeto de estudio, destacan en este sentido los de Pomriaskinsky-Kobozieff/Kobozieff (1954) y Bressou *et al.* (1957) sobre los autópodos torácico y pelviano del pastor alemán, respectivamente, Smith/Allock (1960) sobre

las fusiones metafisarias en la mano y pie del galgo, Chapman (1965) que analiza la cronología ósea del sabueso, García-Monterde *et al.* (1984) que estudian la aparición de los centros epifisarios y las fusiones metafisarias en el esqueleto apendicular del pastor alemán y Begon *et al.* (1985) que analizan el esqueleto apendicular del fox terrier.

Por el contrario, escaso es el número de trabajos realizados en el gato doméstico, *Felis catus L.*, sobre cronología del desarrollo osteogénico. Sólo los artículos publicados por Bressou *et al.* (1959a, 1959b), Smith (1968, 1969) y Boyd (1968, 1976) estudian radiográficamente la osteogénesis. De ellos, únicamente los de Bressou *et al.* (1959b) y Smith (1968, 1969) hacen referencia a la cronología osteogénica postnatal del autópodo pelviano. Por esta razón, decidimos tomar como especie de estudio el gato. La elección de la raza siamesa se hizo, fundamentalmente, por dos motivos:

1. La importancia creciente que ha ido adquiriendo el gato siamés durante los últimos años como animal de compañía.
2. La mayor incidencia en esta raza de procesos patológicos directamente relacionados con la osteogénesis postnatal o de patologías osteológico-nutricionales, Holzworth (1987).

Material y Métodos

Hemos utilizado 40 gatos (19 machos y 21 hembras) de raza siamesa en los que, desde el nacimiento hasta la 25ª semana de desarrollo postnatal, se estudió la aparición de los núcleos de osificación que integran el autópodo pelviano.

Los animales, pertenecientes a once camadas, fueron objeto de diferentes controles:

1. Control del patrón racial de los progenitores.
2. Control sanitario y de manejo.
3. Control dietético.
4. Control de crecimiento:
 - Análisis del incremento de peso semanal de cada individuo, rechazando aquellos cuya curva de crecimiento estuviera por debajo de los mínimos considerados normales por las Tablas de Incrementos del «Nutrient Requirements in Cats» (1986).
 - Análisis cada cinco semanas (tabla 1) de los valores hemáticos celulares (eritrocitos y leucocitos totales) y de las constantes hemáticas relacionadas con el metabolismo osteogénico (calcio, fósforo y fosfatasa alcalina presentes en el suero).

TABLA 1

	5ª semana	10ª semana	15ª semana	20ª semana	25ª semana
Eritrocitos totales 10 ⁶ /mm ³	6,02	7,24	10,51	9,50	9,18
Leucocitos totales 10 ⁶ /mm ³	8,40	8,96	10,62	11,54	11,73
Calcio sérico mg/dl	9,56	7,83	9,38	10,06	9,57
Fósforo sérico mg/dl	6,54	7,02	6,94	6,92	7,07
Fosfatasa alcalina sérica UI/l	23,60	26,05	24,20	18,10	18,70

5. Control radiactivo.
 - Cálculo de la dosis efectiva, al objeto de comprobar la no interferencia de la misma en el crecimiento normal del individuo.
 - División de los animales en grupos experimentales para así disminuir al máximo las dosis recibidas.
 - Comprobación de los resultados de los grupos experimentales con los obtenidos en los animales testigo.

Los gatos se distribuyen en los siguientes grupos de estudio:

Grupo A: Integrado por 17 animales radiografiados semanalmente entre el nacimiento y la 5ª semana.

Grupo B: Constituido por ocho animales realizados radiográficamente desde la 1ª a la 25ª semana. De la 1ª a la 12ª semana el control fue semanal y de la 12ª a la 25ª quincenal.

Grupo C: Integrado por seis animales que fueron analizados semanalmente entre la 1ª y la 12ª semana.

Grupo D: Formado por siete animales radiografiados semanalmente desde la 10ª a la 25ª semana.

Grupo E: Dos animales testigo controlados radiográficamente en la 25ª semana.

Los grupos C, D y E se consideraron a la vez como grupos experimentales y testigo.

El análisis radiográfico se efectuó de forma alternativa sobre ambos autópodos pelvianos con el fin de distribuir las dosis de radiación, haciendo coincidir el haz principal de rayos con la superficie objeto de estudio y colimando al máximo la región expuesta. Para facilitar la interpretación radiográfica en determinados animales menores de tres semanas, hemos utilizado placas y chasis de mamografías. Los controles radiográficos semanales se fueron variando de forma que en algunos animales el control coincidiera con el principio de la semana, y en otros con el final. Las sesiones radiográficas se realizaron sin anestesiarse los animales debido a la proximidad entre ellas. Se tomó esta decisión al observar que en los animales más jóvenes el periodo de recuperación resulta especialmente largo, dos o tres días según la edad y susceptibilidad del individuo, condicionando su crecimiento.

Los parámetros físicos radiográficos quedan reflejados en la tabla 2.

TABLA 2

0-2ª semana	2ª-5ª semana	5ª-15ª semana	15ª-25ª semana
Kv-mAs 36-3,84	Kv-mAs 37-5,12	Kv-mAs 37-5,12 37-7,68	Kv-mAs 37-7,68 38-11,52

Las posiciones radiográficas fueron dorsopalmar y mediolateral, y la relación de centros de osificación analizados la siguiente:

- Epífisis distales del tibia y peroné (Edt, Edp), aunque no pertenecen el autópedo pelviano las incluimos por razones topográficas.
- Astrágalo y cuerpo del calcáneo (As, Cc)
- Tuberosidad del calcáneo (Tc)
- Primer núcleo central del tarso (c1)
- Segundo núcleo central del tarso (c2)
- I, II, III y IV tarsianos (1t, 2t, 3t, 4t)
- Diáfisis metatarsianas y falangianas (Dmt, Df)
- Epífisis distales de los metatarsianos II-V (Edmt)
- Epífisis de las falanges de los dedos II-V (Efm)
- Sesamoideos de los dedos II-V (Ss)

De cada uno de estos núcleos estudiamos su primera aparición y el momento en que está presente en el total de animales.

Resultados

El autópedo pelviano presenta en el gato siamés una secuencia de osificación más constante que el torácico, tanto en el tiempo como en el orden de aparición de los núcleos, aunque no está exento de variaciones. Al nacimiento (figura 1A) son visibles radiográficamente los centros correspondientes al astrágalo y cuerpo del calcáneo, así como la diáfisis metatarsianas y falangianas.

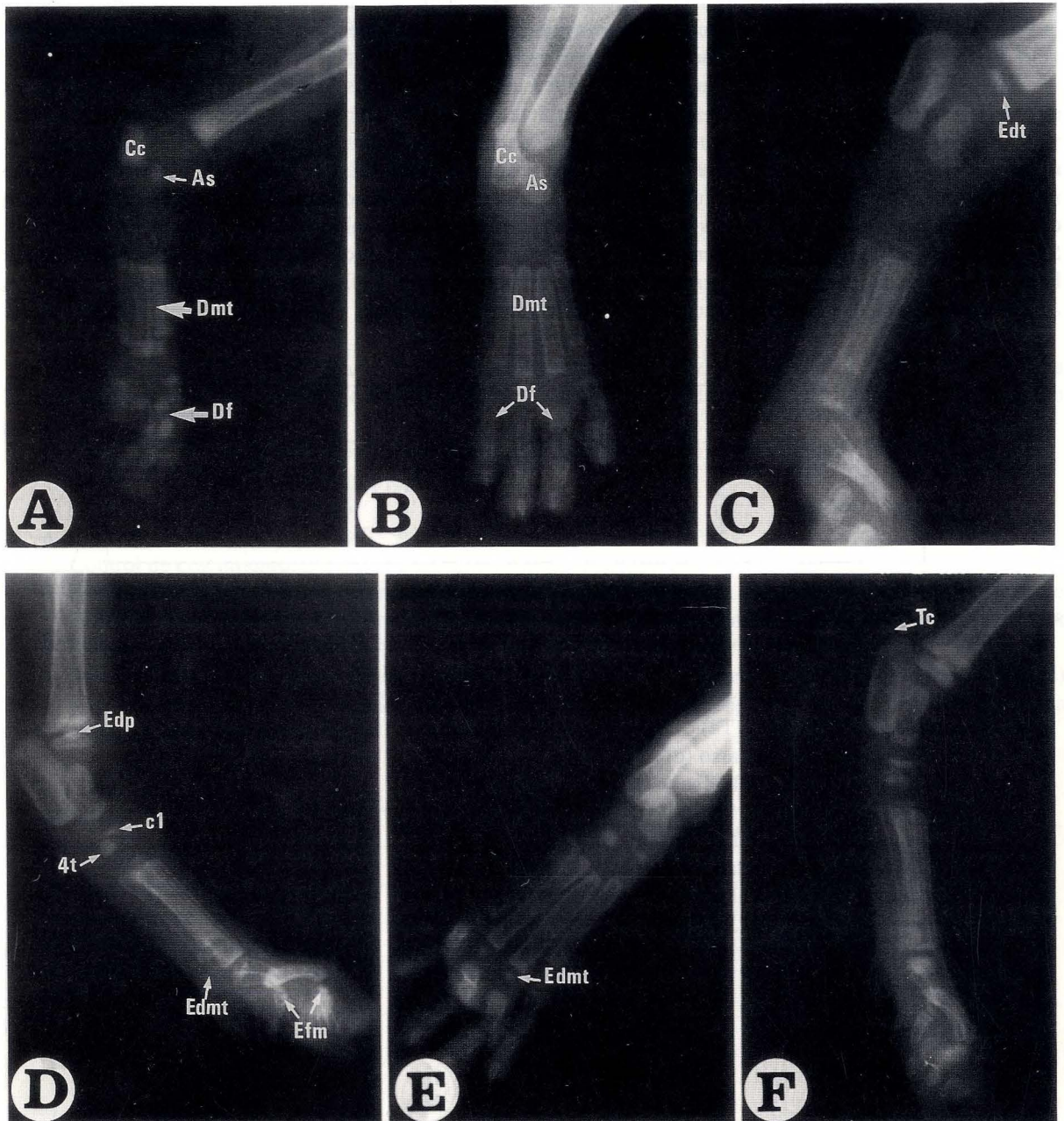


FIGURA 1. Imágenes radiográficas dorsopalmares y mediolaterales del autópodo pelviano del gato siamés. A: nacimiento; B: 1ª semana; C: 2ª semana; D y E: 3ª semana; F: 4ª semana (principio).

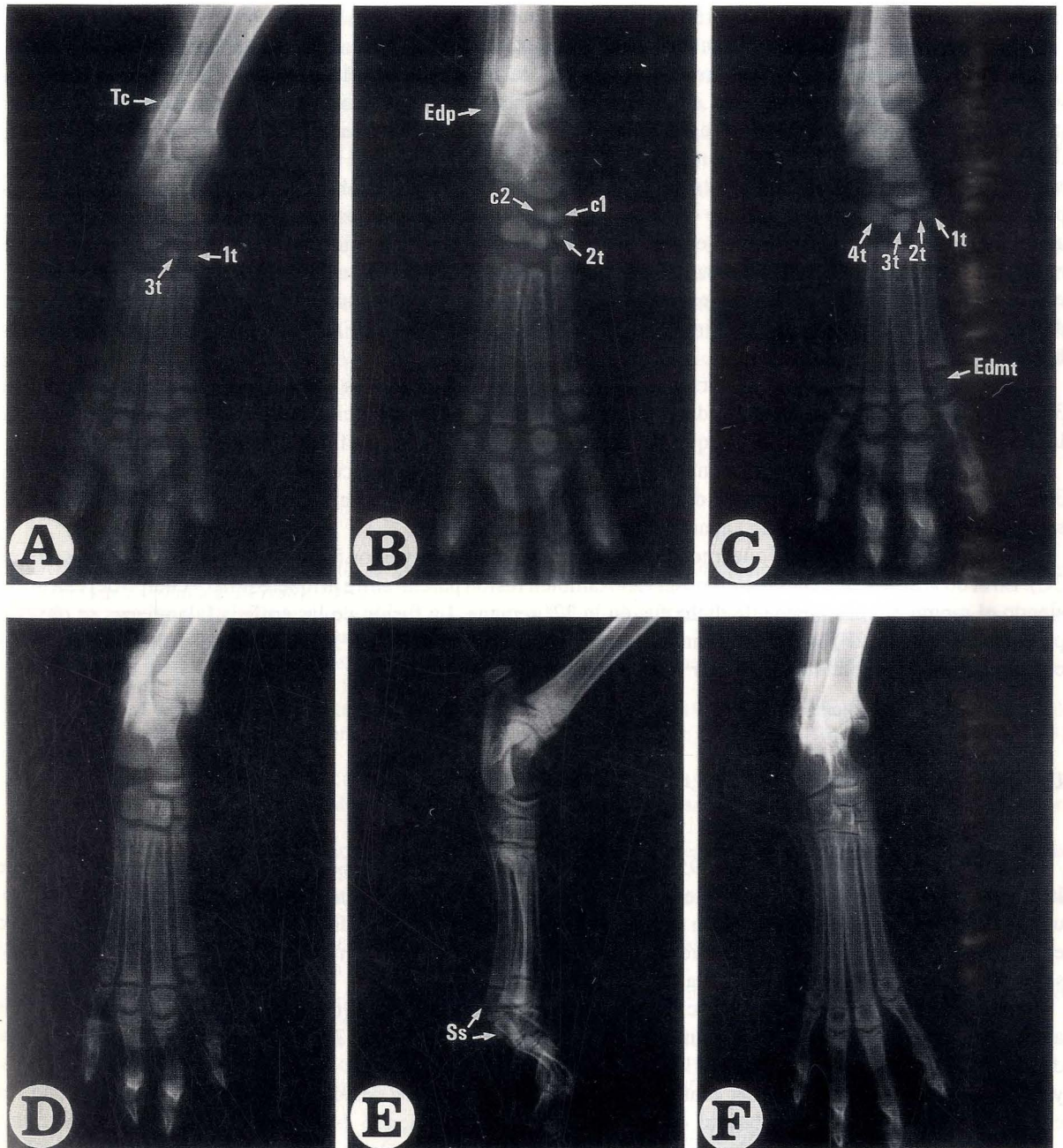


FIGURA 2. Imágenes radiográficas dorsopalmares y mediolaterales del autópodo pelviano del gato siamés. A; 4ª semana (finales); B; 5ª semana; C; 6ª semana; D; 8ª semana; E; 11ª semana; F; 25ª semana.

Durante la primera semana de desarrollo postnatal (figura 1B) no observamos nuevos centros de osificación. Es a finales de la 2ª semana (figura 1C) cuando se detecta, en todos los animales, el núcleo de la epífisis distal de la tibia, excepto en uno de los machos que se evidenció en la 3ª. A partir de la 6ª semana empieza a configurar el maleolo medial, proceso que culmina hacia la 17ª semana. No existe, por tanto, un núcleo de osificación independiente para el maleolo medial. La epífisis distal del peroné (figura 1D) aparece en la mayoría de los animales durante la 3ª semana y su presencia es constante a la 4ª.

En el tarso no son identificables nuevos centros de osificación hasta finales de la 3ª semana o principios de la 4ª. Los dos primeros núcleos en aparecer son el central del tarso y el IV tarsiano (figura 1D). Suelen evidenciarse los dos simultáneamente, aunque en algunos animales hemos observado una alternancia en su aparición con predominio del central, al que vemos desarrollarse por la fusión de dos núcleos. El segundo núcleo de osificación del central del tarso se identifica a partir de la 4ª semana. A finales de la 4ª semana (figura 2A) se observan dos nuevos centros de osificación, se trata del I y III tarsianos, situados distalmente a los núcleos del central. La presencia del III tarsiano es constante en todos los animales durante esta semana. El tarsiano I puede retrasar su aparición hasta la 5ª semana, incluso en uno de los animales no se evidenció hasta la 6ª. El núcleo de detección radiográfica más tardío es el II tarsiano, al que vemos aparecer en el transcurso de la 5ª semana (figura 2B). Sin embargo, en el 80% de los machos, no es identificable hasta la 6ª semana. El núcleo de osificación de la tuberosidad del calcáneo se detecta en algunos animales durante la 4ª semana (figura 1F) y su presencia es constante durante la 5ª.

Las epífisis distales de los metatarsianos III y IV pueden ser detectables a finales de la 2ª semana. Durante la 3ª (figura 1E) ya son identificables todas, con un ligero retraso en su evolución por parte de la del dedo V. Entre la 6ª y 8ª semana (figuras 2C, 2D) adquieren la configuración troclear y definen una línea epifisaria completa.

Las epífisis de las falanges proximales y medias (figuras 1D, 1E) aparecen el 30% de los gatos a finales de la 3ª semana y su presencia es constante durante la 4ª. Definen una línea epifisaria completa hacia la 8ª semana. Los sesamoides plantares (figura 2E) aparecen entre la 9ª y 11ª semana.

Los núcleos de osificación que integrarán el central del tarso los vemos fusionarse hacia la 6ª semana (figura 2C). En el 60% de los animales hemos observado también fusión parcial entre la tuberosidad y cuerpo del calcáneo, siendo el momento más precoz de dicha fusión la 22ª semana. La fusión de las epífisis falangianas se observa parcialmente (figura 2F) hacia las últimas semanas de la experiencia (22ª-25ª). Al concluir el estudio no habíamos observado fusión ni total ni parcial por parte de las trócleas metatarsianas.

Discusión

Coincidimos con Bressou *et al.* (1959) y Smith (1968) en que la epífisis distal de la tibia aparece a finales de la 2ª semana. Respecto a este centro de osificación es importante significar que no existe, como ocurre en el perro, un núcleo independiente de osificación para el maleolo medial. La epífisis distal del peroné constituye un centro epifisario muy constante. Todos los investigadores coinciden que aparece en la mayoría de los gatos durante la 3ª semana y su presencia es constante a la 4ª.

Referente a los núcleos de osificación que integran el tarso, Smith (1968) señala que los primeros núcleos aparecen, sin especificar cuales son, durante la 4ª semana y los últimos a la 7ª. Bressou *et al.* (1959) refieren una detección radiográfica más tardía para los primeros centros tarsianos, hacia la 5ª semana y, en concreto, son: IV y III tarsianos y primer núcleo del central del tarso. Los restantes los detectan a la 6ª semana: tuberosidad del calcáneo, segundo núcleo del central del tarso, II y I tarsianos, siendo éste el último en aparecer. Nuestras observaciones coinciden con las de Bressou *et al.* (1959) en el sentido de que los primeros centros identificables radiográficamente son el central y el IV tarsiano, pero en el gato siamés a finales de la 3ª semana. Existe también una precocidad en el resto de los núcleos que integran el tarso, ya que durante la 5ª están presentes todos, aunque el I y II tarsiano pueden retrasar su aparición en algunos animales hasta la 6ª semana.

El patrón de osificación más constante que hemos encontrado para el tarso en el gato siamés es el siguiente:
Al nacimiento: Cuerpo del calcáneo y astrágalo.

*Fin*es de la 3ª semana: Primer núcleo del central y IV tarsiano.

4ª semana: III y I tarsianos, segundo núcleo del central y tuberosidad del calcáneo.

5ª semana: Presencia del II tarsiano.

Los núcleos de osificación que conforman el central del tarso están fusionados en el gato siamés a la 6ª semana, para Bressou *et al.* (1959) la fusión no acontece hasta la 9ª semana. Smith (1968) no refiere en su trabajo de osteogénesis dicho proceso de fusión.

Respecto a las epífisis metatarsianas, diferimos de Bressou *et al.* (1959) en que estos autores señalan su aparición hacia la 3ª-4ª semana y de Smith (1968) que las detecta aún más tardíamente, a la 5ª semana. Asimismo, las epífisis falangianas tienen un momento de detección radiográfica más tardío para estos autores.

Se observa que los primeros centros tarsianos en aparecer corresponden al central y IV tarsiano, situados en la línea de apoyo del calcáneo y astrágalo, al objeto de integrar con prontitud un eje de transmisión de fuerzas en el autópodo pelviano. Dicho eje quedará completado con las epífisis distales metatarsianas de los dedos III y IV, con las epífisis falangianas y con las respectivas diáfisis.

Comparando los resultados obtenidos por Bressou *et al.* (1959) y por Smith (1968) en el gato común con los obtenidos por nosotros en el gato siamés, se observa una precocidad de osificación en el autópodo pelviano de este último. Además, podemos decir que los fenómenos de osificación en el autópodo pelviano, al igual que en todo el esqueleto apendicular del gato siamés, son muy uniformes. Cuando un animal retrasa o adelanta su osificación, nunca rompe la secuencia del proceso. Solamente pueden verse afectados aquellos núcleos cuyos momentos de aparición están muy próximos en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- BEGON, D.; MIALOT, J.P. et GUERIN, C. (1985): Aspects radiographiques du squelette appendiculaire chez le chien en croissance. *Point Vét.*, **17(88)**: 101-113.
- BOYD, J.S. (1968): Radiographic appearance of the centres of ossification of the limb bones in the feline foetus. *Br. Vet. J.*, **124**: 365-370.
- BOYD, J.S. (1976): Studies on the appearance of the centres of ossification of the axial skeleton in the feline foetus. *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Hist. Embryol.*, **5**: 193-205.
- BRESSOU, C.; POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF, N.A. et KOBOZIEFF, N. (1957): Etude radiologique de l'ossification du squelette du pied du chien aux divers stades de son évolution, de la naissance à l'âge adulte. *Rec. Méd. Vét. Alfort*, **133(8)**: 449-464.
- BRESSOU, C.; POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF, N.A. et KOBOZIEFF, N. (1959): Etude radiologique de l'ossification du squelette de la main du chat aux divers stades de son évolution, de la naissance à l'âge adulte. *Rec. Méd. Vét. Alfort*, **135(8)**: 547-563.
- CHAPMAN, W.L. (1965): Appearance of ossification centers and epiphyseal closures as determined by radiographic techniques. *J.A.V.M.A.*, **147(2)**: 138-141.
- GARCÍA MONTERDE, J.; AGÜERA, E. y SANDOVAL, J. (1984): La osificación de los miembros del perro: Atlas radiográfico. *Not. Neosán*, **212**: 5-61.
- HOLZWORTH, J. (1987): *Diseases of the cat*. Vol. 1. W.B. Saunders, Philadelphia.
- N.R.C. (1986): *Nutrient Requirements in Cats*. Academy Press, Washington.
- POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF, N.A. et KOBOZIEFF, N. (1954): Etude radiologique de l'aspect du squelette normal de la main du chien. *Rec. Méd. Vét. Alfort* **130(10)**: 617-646.
- SMITH, R.N. (1968): Appearance of ossification centers in the kitten. *J. Small Anim. Pract.*, **9**: 497-511.
- SMITH, R.N. (1969): Fusion of ossification centres in the cat. *J. Small Anim. Pract.* **10**: 523-530.
- SMITH, R.N. and ALLOCK, J. (1960): Epiphyseal union in the Greyhound. *Vet. Rec.*, **72**: 75-79.

Correspondencia: Dr. José M^º Vázquez Autón
Dpto. de Anatomía y Embriología. Facultad de Veterinaria
Universidad de Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia. España

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HUMAN MICROSCOPIC ANATOMY
(An Atlas for Students of Medicine and Biology)

R.V. Krstic

Springer-Verlag 1991

Acaba de aparecer la obra de Anatomía microscópica del Prof. R.V. Krstic que desarrolla sus actividades docentes e investigadoras en el Instituto de Histología y Embriología de la Universidad de Lausana.

La verdad es que esta publicación era esperada en el mundo de la morfología tras las magníficas obras del mismo autor de «Células» y «Tejidos» y de la documentada y utilísima «Enciclopedia ilustrada de la Histología humana».

Los «Órganos», como llamaríamos coloquialmente, sigue la misma tónica de las publicaciones precitas, pasando revista a todos los sistemas y aparatos del organismo humano, integrando en preciosas láminas el concepto de órgano desde su referencia macroscópica, hasta la imagen microscópica y ultraestructural. Siempre la idea de la «función», sencilla pero oportuna, aparece como eje de razonamiento sobre el que la forma en sus distintos niveles de organización va tomando vida lógica sin perder el sentido de la unidad del conjunto.

R.V. Krstic es una de las pocas personas del mundo de la Anatomía que jamás ha renegado de ningún peldaño de esta disciplina y que por ello, aun dedicándose preferentemente a la microscopía Electrónica, ama la Histología convencional, y disfruta en los cursos de anatomía macroscópica. Sólo ese equilibrio le ha permitido a nuestro entender, poder disponer de una «atalaya» privilegiada que ha dado a sus obras ese profundo sentido pedagógico e integrador.

Los que tenemos la suerte de conocerle personalmente, sabemos que todo lo anterior tiene perfecto encaje en su personalidad sencilla, clarividente, humilde y cordial.

Auguramos para ese nuevo «paso editorial» científico y docente, los mejores éxitos; y estamos seguros de que ayudará decisivamente a los estudiantes de todas las licenciaturas biológicas a comprender y entusiasmarse con la Anatomía microscópica.

Zaragoza. Primavera 1992
René Sarrat Torreguitart

ESCOLAR: RECONSTRUCCIONES HUMANAS POR PLANOS DE DISECCIÓNJ. M^a SMITH-AGREDA

Edit. Espaxs. S.A. 1991

La necesidad de aprovechar adecuadamente los escasos cuerpos humanos que llegan a los Departamentos de Anatomía, llevó al Prof. Escolar, hace ahora 30 años, a diseñar las primeras láminas de las *Reconstrucciones Humanas por Planos de Disección* las cuales, montadas por los propios estudiantes servían de síntesis y eficaz recordatorio de las enseñanzas recibidas junto al cadáver.

La reciente obra del Prof. J. M^a Smith Agreda da continuidad a estas láminas anatómicas de Escolar. Sus dibujos una vez recortados y adheridos sobre unas planchas bases, componen una hermosa y práctica sistematización, por planos, del cuerpo humano y de sus principales fases embrionarias, en los que J. M^a Smith, además de conservar el planteamiento de las *Reconstrucciones* originales, acierta a plasmar en nuevos dibujos las sugerencias de otros colaboradores y anatómicos lo que contribuye, sin duda a mejorar y actualizar esta nueva edición de las *Reconstrucciones* de Escolar.

Todas las obras anatómicas del Prof. Smith Agreda reflejan en algún momento su desbordada personalidad artística. Recuérdese su *Atlas de los Sistemas Neuromusculares*. Lo mismo sucede en estas *Reconstrucciones* en las que el dibujo minucioso de las estructuras anatómicas, las actitudes funcionales de los cuerpos desnudos o disecados y sobre todo las pinceladas urbanas de su Málaga adoptiva, que enriquecen los fondos de las planchas base, nos evocan, con plena modernidad y frescura a las representaciones anatómicas del Renacimiento. Un mérito más que añadir a esta didáctica obra tan prestigiada en la bibliografía médica española.

Zaragoza, marzo 1992
José L. Nieto Amada

Index

ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; RUANO-CIL, D.: Ultrastructural study of the anterior medullary velum of the fourth ventricle the fighting bull	3
BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; MOSQUEIRA, M.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ, A.; MUÑOZ, L.: Osmiophilic laminar bodies in the pineal gland of the rat	11
BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, P.: Ultrastructural study of the gonadotroph cells of pinealectomized rats	21
BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, P.: Effect of pinealectomy on the magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus of the male rat	29
CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; ALBERCA, J.L.; CARVAJAL, J.C.: Effects of castration on the pituitary gland: A critical review	39
CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; CARVAJAL, J.C.; VÁZQUEZ, R.: Morphofuntional study of the action of high and repeated dosis of an LHRH analogue on the anterior pituitary of ovariectomized rats	47
GARCÍA-LÓPEZ, E.; NIETO, J.L.; TORRES, A.: Some cyclical changes of stroma in the breast	53
HENNEQUET, L.; GONDRA, J.; NOCEDA, J.; GRANDES, P.; ORTEGA, F.: Monoaminergic terminals in the upper layers of the rat superior colliculus	67
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, VILLA, M.A.; VÁZQUEZ, R.: Topographic distribution of the GFAP-immunoreactive elements in the organum vasculosum of the lamina terminalis in the rat	73
JUNQUERA, L.M.; DE VICENTE, J.C.; LÓPEZ ARRANZ, J.S.; SALGADO, C.: The appearance of mental formaina on panoramic radiographs	81
LOSTALÉ, F.; RODRÍGUEZ, J.; WHITE, J.; WHYTE, A.; BESCÓS, M.; VILORIA, A.; PELLEJRO, S.; TORRES, A.; SARRAT, R.; SEVER, R.; ARIAS, J.: Evolution and modification of vascular anastomosis carried out through the technique of intussusception	87
MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; ALMENAR, V.; PÉREZ, R.: Anatomical variations of the popliteal vein	93
PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; TORANZO, D.; AMAT, G.; AMAT, P.: On the ependymal blebs of the third ventricle of the hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>)	97
PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; TORANZO, D.; AMAT, G.; AMAT, P.: Sulcated areas of the third ventricle of the cat	105
RIESCO, J.M.; GUTIÉRREZ, F.; CASTRO, J.; JUANES, J.A.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; VÁZQUEZ, R.: Macro and microscopic study of corrosive vascular casts of sheep kidneys	111
SANCHO, G.; MARÍN, J.M.; RAMOS, P.; ARBUÉS, F.; GOROSTIAGA, J.: Inducied effects by ethilic alcohol in pre and postnatal development of the mouse. Prenatal data (I)	119
SMITH-FERNÁNDEZ, I.; SMITH-FERNÁNDEZ, V.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.: Articular cartilage acing. A study in normal and castrated rats	127
VÁZQUEZ, J.M.; VILLA, M.I.; GIL, F.; LATORRE, R.; RAMÍREZ, G.; MORENO, F.: Chronology of appearance of ossification centers of the foot in the siames cat (<i>Felis catus L.</i>)	135

NORMAS DE PUBLICACION

La revista ANALES DE ANATOMIA es una publicación que edita trabajos originales de Ciencias Morfológicas. Éstos 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, 50.009 Zaragoza. La Revista admite manuscritos en español e inglés.

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 ese 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. Sólo se aceptarán fotografías en blanco y negro, exigiéndose la adecuada calidad y en número que no exceda de tres planchas de composición. Éstas estarán compuestas por láminas enteras de 23 x 15 cms, dejando el espacio necesario para incluir en las mismas las leyendas correspondientes.

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. (1987): 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, La redacción de la Revista podrá aconsejar en su caso la reducción del número de autores, cuando el contenido y la metodología del trabajo lo requiera.



Indice

ARROYO-GUIJARRO, J.; PRATS-GALINO, A.; RUANO-GIL, D.: Estudio ultraestructural del velo medular anterior del cuarto ventrículo en el <i>bos taurus</i> raza de lidia	3
BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; MOSQUEIRA, M.I.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ, A.; MUÑOZ, L.: Cuerpos laminares osmiófilos en la glándula pineal de rata	11
BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, P.: Estudio ultraestructural de las células gonadotropas de ratas pinealectomizadas	21
BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, P.: Efectos de la pinealectomía sobre las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo de la rata macho	29
CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; ALBERCA, J.L.; CARVAJAL, J.C.: Respuesta hipofisaria a la castración: una revisión crítica	39
CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; CARVAJAL, J.C.; VÁZQUEZ, R.: Estudio morfofuncional de la acción de dosis altas y repetidas de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas sobre la hipófisis de ratas ovariectomizadas	47
GARCÍA-LÓPEZ, E.; NIETO, J.L.; TORRES, A.: Algunas modificaciones cíclicas del estroma en la glándula mamaria humana	53
HENNEQUET, L.; GONDRA, J.; NOCEDA, J.; GRANDES, P.; ORTEGA, F.: Terminales monoaminérgicos en las láminas superficiales del colículo superior de la rata	67
JUANES, J.A.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; BLANCO, E.; VILLA, M.A.; VÁZQUEZ, R.: Distribución topográfica de los elementos GFAP-inmunorreactivos en el órgano vasculoso de la lámina terminal de rata	73
JUNQUERA, L.M.; DE VICENTE, J.C.; LÓPEZ ARRANZ, J.S.; SALGADO, C.: Aspecto radiográfico del agujero mentoniano	81
LOSTALÉ, F.; RODRÍGUEZ, J.; WHITE, J.; WHYTE, A.; BESCÓS, M.: Evolución y modificaciones de anastomosis vasculares realizadas por intususcepción	87
MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; ALMENAR, V.; PÉREZ, R.: Variaciones anatómicas de la vena poplítea	93
PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; TORANZO, D.; AMAT, G.; AMAT, P.: Sobre las yemas endimarias del tercer ventrículo del erizo (<i>Erinaceus europaeus</i>)	97
PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; TORANZO, D.; AMAT, G.; AMAT, P.: Áreas surcadas del tercer ventrículo del gato	105
RIESCO, J.M.; GUTIÉRREZ, F.; CASTRO, J.; JUANES, J.A.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; VÁZQUEZ, R.: Estudio macro y microscópico de moldes corrosivos vasculares de riñones de oveja	111
SANCHO, G.; MARÍN, J.M.; RAMOS, P.; ARBUÉS, F.; GOROSTIAGA, J.: Aproximación a los efectos inducidos por el alcohol en el desarrollo pre y posnatal de la rata. Primera parte: Resultados prenatales ...	119
SMITH-FERNÁNDEZ, I.; SMITH-FERNÁNDEZ, V.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.: Envejecimiento del cartílago articular. Estudio en ratas normales y castradas	127
VÁZQUEZ, J.M.; VILLA, M.I.; GIL, F.; LATORRE, R.; RAMÍREZ, G.; MORENO, F.: Cronología de aparición de los centros de osificación del autópodo pelviano en el gato siamés (<i>Felis catus</i> L.)	135