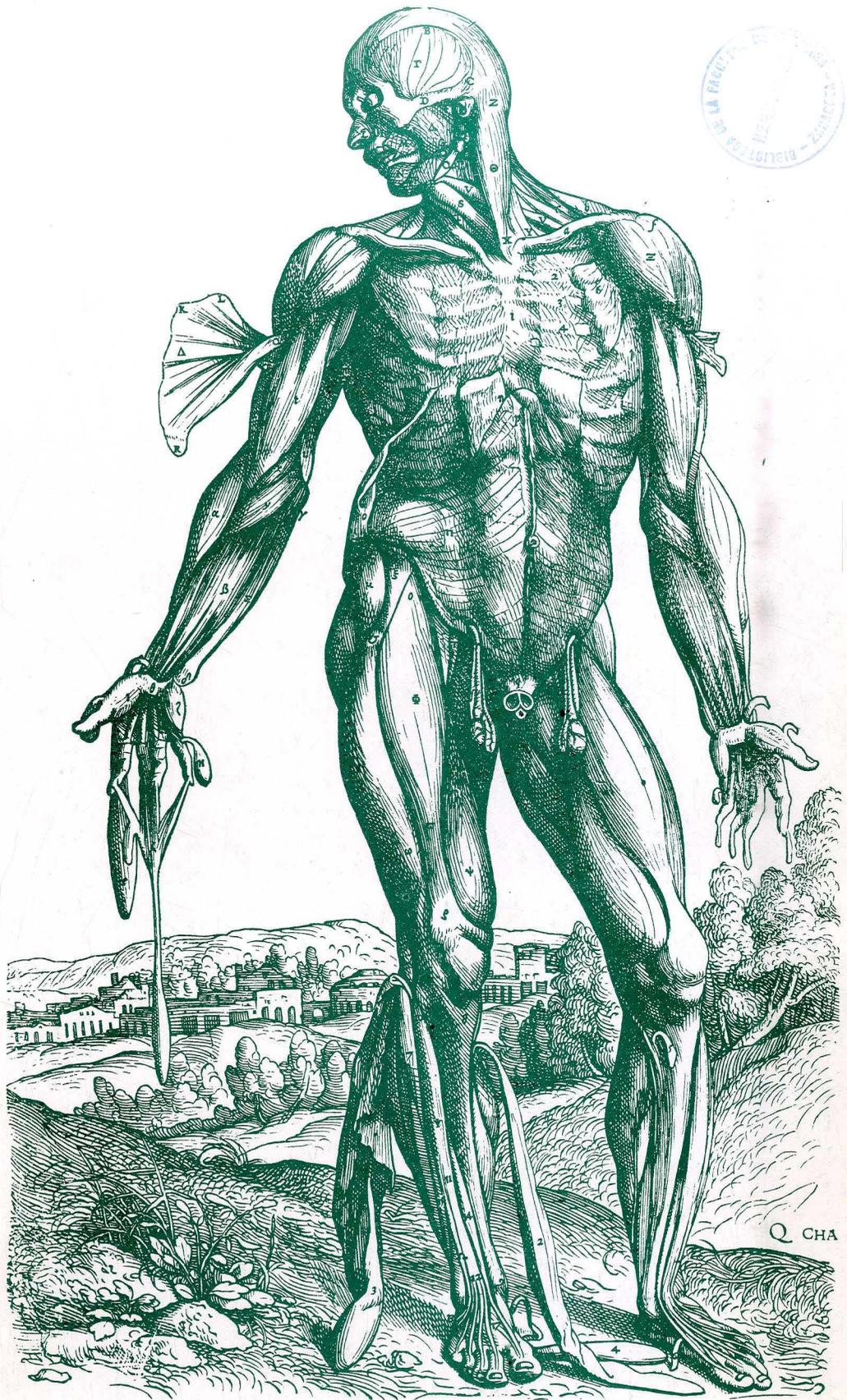


# ANAIRES DE ANATOMIA



# ANALES DE ANATOMIA

Fundador:  
J. ESCOLAR

Director:  
R. SARRAT

Secretario de Redacción:  
J.L. NIETO AMADA

Consejo de Redacción:

E. Agüera (Córdoba)  
P. Amat (Salamanca)  
J. Astruc (Richmond, U.S.A.)  
G. Bernal (Córdoba)  
A. Carrato (Madrid)  
F. Doñate (Bilbao)  
E. Ferres Torres (Valencia)  
R. Ferres Torres (La Laguna)  
L.M. Gonzalo Sanz (Pamplona)  
M. Guirao (Granada)  
J. Jiménez Castellanos (Sevilla)  
R. Krstić (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 ANATOMÍA**

**Volumen XXXIX**

**Junio 1993**

**Núm. 99**

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

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

Edita y Distribuye: Servicio de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

**VARIACIONES EN EL DESARROLLO CORPORAL EN RATAS ADULTAS DESPUÉS DE LA MANIPULACIÓN EXPERIMENTAL DE LA ESFERA GONADAL**

**VARIATIONS OF THE CORPORAL GROWTH FOLLOWING EXPERIMENTAL MANIPULATION OF THE GONADAL ENVIRONMENT IN ADULT RATS**

**J. CARRETERO, R. GONZÁLEZ, M. RUBIO, F. SÁNCHEZ, M. ANGOSO,  
J.M. RIESCO y R. VÁZQUEZ**

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

**RESUMEN**

Con la finalidad de valorar el efecto que los esteroides gonadales desempeñan en el desarrollo corporal, se estudia la variación porcentual del desarrollo ponderal en ratas adultas, de ambos sexos, castradas y tratadas o no con esteroides gonadales, comparando los resultados obtenidos con los de animales no tratados o bien con animales no castrados tratados con esteroides y, en el caso de los machos, se analizan las diferencias entre la orquidectomía y la criptorquidia. Nuestros resultados sugieren que la modificación de los patrones secretores de GH en estos animales se acompaña de significativas diferencias en el desarrollo ponderal, poniéndose de manifiesto un efecto inhibitor del estradiol y, al contrario, un efecto estimulador de la testosterona, principalmente en estados de hipertestosteronismo. Además, el déficit de esteroides gonadales se manifiesta, en ambos sexos, por un aumento en el desarrollo ponderal que es revertido a niveles inferiores a los del comienzo del experimento por el estradiol en la hembra; sin embargo, en el macho, la testosterona tan sólo frena el desarrollo ponderal acelerado por la castración. Estos resultados sugieren una distinta efectividad del patrón secretor de GH en la rata en relación con la actuación biológica de la hormona que es dependiente del ambiente esteroideo gonadal.

**PALABRAS CLAVE:** Desarrollo corporal. Castración. Testosterona. Estradiol.

**SUMMARY**

In order to valorate the role played by gonadal steroids in the modulation of corporal growth, the porcentual variations of the ponderal growth in adult rats of both sexes, after castration and/or gonadal steroids treatment were analyzed. The results were compared to those obtained in untreated rats and, in the males, to those obtained following chryptorchidia. An inhibitory effect on corporal growth was induced by estradiol; however, mainly in hypertestosteronic states, testosterone induced stimulatory effects. In both sexes, a significative increase of the corporal growth was observed following castration, this effect was reversed by estradiol in female, but only was delayed by testosterone in males. The results obtained in our study suggest a different efectivity of the rat GH secretory patterns in relation to the biological action of the hormone wich is gender-dependent.

**KEY WORDS:** Corporal growth. Castration. Testosterone. Estradiol.

## Introducción

Por lo general, en los vertebrados se observa, en la edad adulta, un mayor crecimiento corporal en machos que en hembras, aunque el crecimiento se más acentuado en las hembras durante la pubertad.

En la rata adulta se conoce la existencia de un diferente patrón de liberación de GH, en machos y en hembras, ya que la rata macho muestra unos picos secretores de mayor amplitud y a intervalos regulares (Hertz y cols., 1989) que los de la hembra y unos niveles interpico más bajos (Saunders y cols., 1976; Eden, 1979; Jansson y cols., 1985), lo que coincide con una secreción rítmica de Srif, que presenta grandes oscilaciones sincronizadas permitiendo así la aparición de oleadas en la secreción de GH (Tannenbaum y Martin, 1976; Wehrenberg, 1986; Akira y cols., 1988).

En la rata hembra, las variaciones en la secreción de GH son menos pronunciadas; mostrando así una menor amplitud en los picos secretores que los machos, unos niveles interpico más elevados (Tannenbaum y Ling, 1984; Plotsky y Vale, 1985) y más irregularidad entre los picos (Millard y cols., 1982; Hertz y cols., 1989).

Estos patrones de secreción parecen influir en la efectividad de la hormona del crecimiento sobre el crecimiento. Para comprobar si la manipulación experimental del sexo, mediante castración quirúrgica modifica los patrones de desarrollo corporal y si estas posibles modificaciones están en relación con la presencia o no de estradiol y testosterona, se analiza el desarrollo ponderal de ratas adultas de ambos sexos, castradas, con o sin tratamiento hormonal con esteroides gonadales y se compara con el de ratas control y con el de ratas sometidas a tratamiento con esteroides gonadales.

## Material y métodos

Para la realización de nuestro trabajo hemos utilizado un total de 100 ratas albinas adultas de la cepa Sprague Dawley (suministradas por Panlab, S.A.), enjauladas y sometidas desde su nacimiento a condiciones estándar de estabulario: separadas por sexos, superficie mínima de jaula por animal 250 cm<sup>2</sup>, temperatura ambiental de 20±2° C, humedad relativa del aire del 50±5%, luz desde las 8:00 a las 20:00 horas (hora solar), dieta balanceada rata-ratón mantenimiento (Panlab), agua *ad libitum*.

Los animales fueron divididos en diferentes lotes experimentales:

1. *Animales normales (no tratados)*, 20 animales, 10 por sexo, empleados como controles de los lotes experimentales, a los 30 días de su nacimiento fueron controlados durante 30 días.
2. *Animales ovariectomizados*, constituido por diez ratas hembras que a los 30 días de su nacimiento fueron anestesiadas con ketamina (Ketolar a dosis de 2 mg/kg de peso corporal), administrada intraperitonealmente, tras lo cual fueron sometidas mediante laparotomía media a la extirpación quirúrgica de ambos ovarios y fascia adiposa paraovárica.
3. *Animales ovariectomizados y tratados con estradiol*, este lote estuvo constituido por 10 animales hembras que, a los 15 días de la ovariectomía bilateral de forma similar a la descrita para el grupo anterior, fueron sometidos a tratamiento diario (11:00 am) con 125 µg de valerato de estradiol (por vía intramuscular) durante 15 días.
4. *Animales tratados con testosterona*, grupo formado por 10 animales hembras que, a partir de los 45 días de edad fueron sometidas a dosis diarias (11:00 am) de 50 µg de propionato de testosterona durante 15 días por vía intramuscular.
5. *Animales orquidectomizados*, constituido por 10 ratas machos que a los 30 días de su nacimiento y tras anestesia con ketamina intraperitoneal, fueron sometidas a la extirpación quirúrgica de ambos testículos mediante apertura de la bolsa escrotal.
6. *Animales orquidectomizados y tratados con testosterona*, lote formado por 10 animales machos que, a los 15 días de ser sometidos a castración de forma similar a la descrita para el grupo anterior, fueron tratados diariamente (11:00 am) durante 15 días con 50 µg de propionato de testosterona vía intramuscular.
7. *Animales criptorquídicos*, grupo formado por 10 animales machos que a los 30 días de su nacimiento fueron anestesiados con ketamina intramuscular tras lo cual se procedió a ascender ambos testículos y su cordón

espermático al interior de la cavidad abdominal, cerrando mediante sutura el conducto inguinal por descenso de los músculos oblicuos del abdomen y ligadura al ligamento inguinal, con el fin de evitar el descenso del testículo.

8. *Animales criptorquídicos y tratados con testosterona*, este grupo estuvo constituido por 10 ratas machos que, tras 15 días de ser sometidos a criptorquidia de forma idéntica a la descrita para el grupo anterior, fueron tratadas diariamente (11:00 am) con 50 µg de propionato de testosterona vía intramuscular durante 15 días.

9. *Animales tratados con estradiol*, lote formado por 10 animales machos que a partir de los 45 días de edad fueron tratados diariamente (11:00 am) con una dosis de 125 µg de valerato de estradiol vía intramuscular durante 15 días.

Durante el periodo de experimentación, 15 o 30 días, según el grupo experimental, se determinó semanalmente el desarrollo ponderal de los animales empleados, calculando el peso de los mismos en balanza electrónica.

Los valores obtenidos fueron procesados estadísticamente y las diferencias observadas en los valores medios se contrastaron mediante un análisis de la varianza, considerando estadísticamente significativas diferencias con un valor para  $p < 0,05$  en los tests del Fisher PLSD y F-Scheffe, conjuntamente.

## Resultados

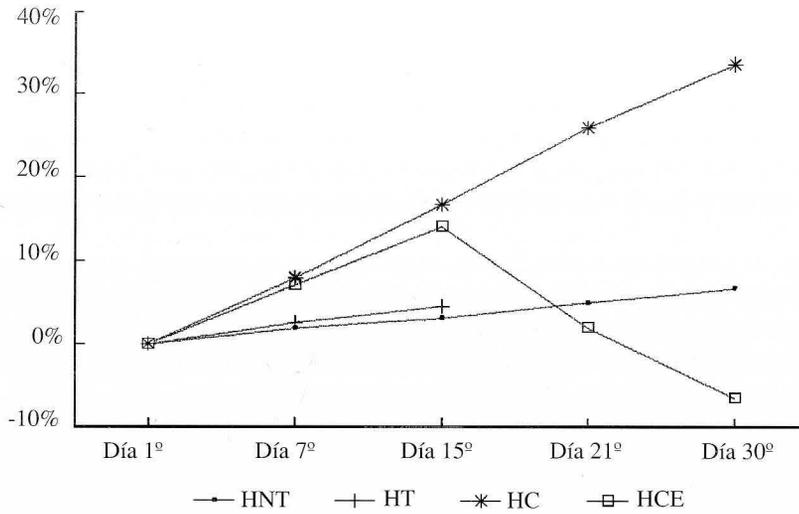
La tabla 1 muestra los valores medios expresados en el tanto por cien de las variaciones semanales observadas en el peso de los animales desde el primer día del experimento hasta los 15 o 30 días, dependiendo del grupo experimental.

El porcentaje de crecimiento en peso de los animales no tratados, que sirvieron de control para nuestro estudio, es significativamente mayor en machos que en hembras ( $p < 0,05$ ). Los machos ganaron en torno al 10% en peso al cabo de los 30 días de experimentación, mientras que en las hembras la variación fue de un 6,78%, estas diferencias fueron algo más llamativas en la mitad del periodo experimental, ya que a los 15 días los machos habían crecido un porcentaje el doble que el de las hembras, 7,78% contra 3,21%.

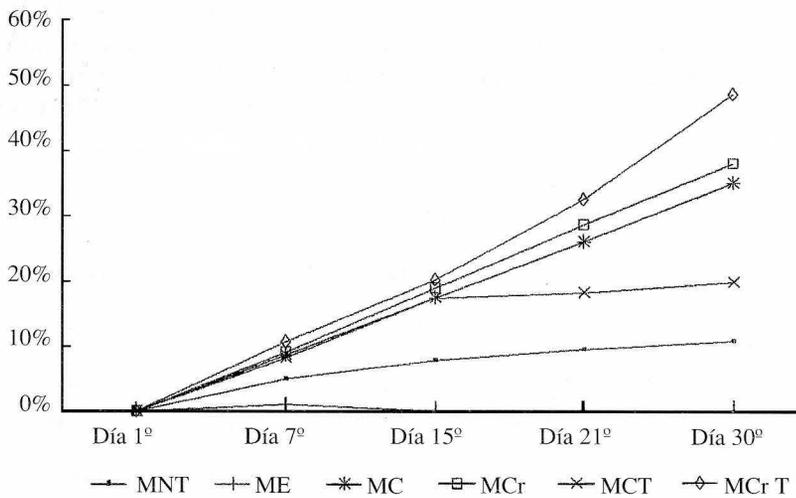
TABLA 1

	Día 1 <sup>o</sup>	Día 7 <sup>o</sup>	Día 15 <sup>o</sup>	Día 21 <sup>o</sup>	Día 30 <sup>o</sup>
HNT	0	2	3,21	5,15	6,78
HT	0	2,68	4,63	—	—
HC	0	8**	16,8**	26**	33,74**
HCE	0	7,19**	14,16**	2,12	-6,34**
MNT	0	5*	7,78*	9,43*	10,6*
ME	0	1,04♦	0♦	—	—
MC	0	8,6♦♦	17,37♦	25,84♦	34,74♦
MCr	0	9,1♦	18,87♦	28,41♦	37,74♦
MCT	0	8,25♦♦	17,39♦	18,06■	19,57■
MCrT	0	10,64♦	20,11♦	32,29♦	48,33■

TABLA 1. Desarrollo corporal expresado como el porcentaje de aumento en peso de los animales desde el primer día del experimento. (HNT: hembras no tratadas, HT: hembras testosterona, HC: hembras castradas, HCE: hembras castradas tratadas con estradiol, MNT: machos no tratados, ME: machos tratados con estradiol, MC: machos castrados, MCr: Machos criptorquídicos, MCT: machos castrados tratados con testosterona, MCrT: machos criptorquídicos tratados con testosterona). \*:  $p < 0,05$  en relación con HNT, \*\*:  $p < 0,01$  en relación con HNT, ♦:  $p < 0,01$  en relación con MNT, ♦♦:  $p < 0,01$  en relación con MNT, ■:  $p < 0,01$  en relación con MNT y MC, ■■:  $p < 0,01$  en relación con los demás grupos estudiados



GRÁFICA 1



GRÁFICA 2

**GRÁFICA 1.** Desarrollo ponderal en los distintos grupos de ratas hembras estudiadas. HNT: hembras no tratadas, HT: hembras tratadas con testosterona, HC: hembras castradas, HCE: hembras castradas tratadas con estradiol.

**GRÁFICA 2.** Desarrollo ponderal en los distintos grupos de ratas machos estudiados. MNT: machos no tratados, ME: machos tratados con estradiol, MC: machos castrados, MCr: machos criptorquídicos, MCT: machos castrados tratados con testosterona, MCrT: machos criptorquídicos tratados con testosterona.

En las hembras, el tratamiento con testosterona apenas modifica las variaciones porcentuales del peso del animal, el único efecto que podría llamar la atención sería un ligero aumento, no significativo, hacia el día 15<sup>o</sup>.

A diferencia de la testosterona, en la hembra, la castración induce una variación muy clara en el desarrollo ponderal ( $p < 0,01$  para todos los periodos de tiempo estudiado, en relación con las hembras no tratadas y las hembras tratadas con testosterona). Esta diferencia ya es apreciable en el día 7<sup>o</sup> de experimentación, de forma que el peso de estos animales crece porcentualmente el cuádruple que en una hembra no tratada, la diferencia se acentúa aún más con el paso del tiempo, es casi cinco veces mayor a los 15, 21 y 30 días.

El tratamiento sustitutivo con estradiol a los 15 días de efectuada la ovariectomía modifica la curva que acabamos de describir para la castración, de manera que durante los 15 primeros días, el efecto es similar; sin embargo, el estradiol frena esa curva de crecimiento de forma significativa ( $p < 0,01$ ) que a partir del día 15 apenas crece (sólo un 2,12%) e incluso a los 30 días el efecto del estradiol es tan notorio que los animales presentaron pesos por debajo de los pesos iniciales determinados el primer día del experimento con un crecimiento ponderal del -6,34% ( $p < 0,01$  con respecto a todos los grupos estudiados).

El tratamiento con estradiol a machos durante 15 días produce un aplanamiento significativo del desarrollo ponderal en relación con los machos no tratados ( $p < 0,01$ ). Este aplanamiento es tal que al cabo de 15 días de tratamiento, los pesos no variaron de los determinados en el primer día del experimento.

Esta curva es significativamente distinta de la observada en los machos castrados en los que se observó un efecto contrario; la castración provocó un aumento del desarrollo ponderal significativo ( $p < 0,05$ ) a los 7 días de la intervención que se fue haciendo cada vez más manifiesto con el paso del tiempo. Comparativamente con la hembra castrada, la curva de crecimiento porcentual en peso fue muy similar.

Lo mismo ocurre tras la criptorquidia, en la que se aprecia un aumento del porcentaje de crecimiento en peso desde la primera semana del experimento ( $p < 0,01$ ); si bien, aunque los valores fueron mayores que en los machos castrados en todos los periodos de tiempo analizados, las diferencias observadas con respecto a estos últimos no fueron significativas.

Sin embargo, el tratamiento con testosterona a partir del día 15 del experimento tuvo efectos diferentes sobre los machos castrados que sobre los machos criptorquídicos.

Así, los machos castrados sufrieron un frenazo brusco de su desarrollo ponderal, de manera que a partir del día 15<sup>o</sup> no modificaron significativamente su peso corporal ( $p < 0,01$  con respecto a los machos castrados). Mientras que los machos criptorquídicos, no sólo no frenaron su desarrollo ponderal sino que el porcentaje de crecimiento en peso aumentó aún más, siendo esta diferencia significativa al final del experimento ( $p < 0,01$ ).

## Discusión

Hasta el inicio de la pubertad, el crecimiento es mayor en ratas machos que en hembras, al igual que en la mayoría de los mamíferos, lo cual podría ser debido en parte a la actuación de los esteroides sexuales (Jansson y cols., 1984).

Para Wiedemann (1981) la castración aumenta el crecimiento somático en las hembras y lo disminuiría en los machos, lo que sugiere que los andrógenos son estimuladores del crecimiento, quizás estableciendo un patrón secretor de GH diferente (Millard y cols., 1986; Akira y cols., 1988); ya que el modelo secretor de GH en el macho estimula el crecimiento de forma más eficaz que el de la hembra (Jansson y cols., 1984).

Nuestros resultados demuestran que la consideración porcentual del desarrollo corporal tras la castración es mucho más fiable y que la castración aumenta significativamente, sobre todo después de 15 días, el desarrollo corporal en hembras y machos. Sin embargo, es cierto que este aumento es más notorio en la hembra.

La diferencia puede deberse al claro efecto inhibitorio de los estrógenos sobre el crecimiento corporal. Nuestros hallazgos en ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol, así como en los machos tratados con estradiol, sugieren este efecto, que podría deberse a la supresión del apetito por los estrógenos (Kennedy, 1969), puesto que existen evidencias de que el estradiol es capaz de aumentar la liberación de GH (Moll y cols., 1986; Simard y cols., 1988;

Breier y cols., 1988; Eriksson y cols., 1988; Carretero y cols., 1992). No obstante, este efecto también podría deberse al déficit de producción hepática de IGF-1 inducido por los estrógenos (Frohlander y VonSchoultz, 1988).

El efecto de la testosterona es claramente desmarcable frente al estradiol. Como sugieren los hallazgos tras el tratamiento con testosterona a machos criptorquídicos, la testosterona es un potente estimulador del desarrollo ponderal, tal y como fue sugerido por Marie y cols. (1988).

Sin embargo, su efecto es muy diferente si se administra a machos previamente castrados ya que, aunque el crecimiento es superior al de los machos no tratados, la testosterona inhibe claramente los efectos de la castración; además, en las hembras no parece afectar en forma significativa al desarrollo corporal.

El hipertestosteronismo de los dos primeros casos podría explicar estas diferencias, como ocurre en la pubertad masculina a partir de la cual existe una mayor respuesta de GH al GRF hipotalámico (Wehrenberg y cols., 1985; Sima y cols., 1989) que se iguala después de la castración (Wehrenberg y cols., 1985).

Los cambios observados sugieren un efecto positivo de la castración sobre el desarrollo corporal, más manifiesto en hembras que en machos, que parece ser dependiente, aunque en forma inversa, de los esteroides gonadales; siendo la testosterona, en estados de hipertestosteronismo, un potente estimulador del desarrollo corporal, principalmente en machos criptorquídicos.

En nuestros resultados, el destino patrón secretor de GH en la rata adulta, dependiendo del sexo (Tannenbaum, 1990) se pone de manifiesto en el desarrollo corporal, de forma que los machos no tratados evolucionan con un mayor peso que las hembras en todos los periodos de tiempo estudiados.

La castración modificó la curva de crecimiento en peso, de forma que, en ambos sexos, el peso de los animales fue mayor que en los no tratados, siendo el aumento porcentualmente menor en machos que hembras.

## Agradecimiento

Trabajo financiado por la DGICYT, PM 88-0159.

## BIBLIOGRAFÍA

- AKIRA, S.; WAKABAYASHI, I.; SUGIH, H.; MINAMI, S.; TAKAHASHI, F. y MOTOYAMA, A. (1988): Effect of testosterone on growth hormone secretion in female rats during a continuous infusion of growth hormone releasing factor. *Neuroendocrinology*, **47**: 116-124.
- BREIER, B.H.; GLUCKMAN, P.D. y BASS, J.J. (1988): Influence of nutritional status y oestradiol-17 beta on plasma growth hormone, insulin- like growth factors I and II the response to exogenous growth hormone in young steers. *J. Endocrinol.*, **118**: 243-250.
- CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; GONZÁLEZ, R.; MONTERO, M.; JUANES, J.A.; RIESCO, J.M. y VÁZQUEZ, R. (1992): Morphometric analysis of GH-immunoreactive cells after GH release induced by treatment with estrogen in adult male rats. *Acta Histochem.*, 92 (en prensa).
- EDEN, S. (1979): Age and sex related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **105**: 555-560.
- EDEN, S.; ALBERTSSON-WIKLAND, K. e ISAKSSON, O. (1978): Plasma levels of growth hormone in female rats of different ages. *Acta Endocrinol.*, **88**: 676.
- ERIKSSON, E.; MODIGH, K. y JANSSON, J.O. (1988): Effects of sex steroids on growth hormone responses to clonidine and GHRH in reserpine pretreated rats. *J. Neural Trans.*, **71**: 99-113.
- FROHLANDER, N. y VON-SCHOULTZ, B. (1988): Growth hormone and somatomedin-C during post-menopausal replacement therapy with oestrogen alone and in combination with an antioestrogen. *Maturitas*, **9**: 297-302.
- HERTZ, P.; SILVERMANN, M.; EVEN, L. y HOCHBERG, Z. (1989): Effects of sex steroids on the response of cultured rat pituitary cells to growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Endocrinology*, **125**: 581-585.
- JANSSON, J.O.; EKBERG, S.; ISAKSSON, O. y EDEN, S. (1984): Influence of gonadal steroids on age -and sex- related secretory patterns of growth hormone in the rat. *Endocrinology*, **114**: 1287-1294.

- JANSSON, J.O.; EDEN, S. e ISAKSSON, O. (1985): Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.*, **6**: 128-150.
- KENNEDY, G.C. (1969): Interactions between feeding behavior and hormones during growth. *Ann. New York Acad. Sci.*, **57**: 1049-1061.
- MARIE, P.J.; HOTT, M. y DURAND, D. (1988): Somatostatin infusion inhibits the stimulatory effect of testosterone on endosteal bone formation in the mouse. *Metabolism.*, **37**: 429-435.
- MILLARD, W.J.; MARTIN, J.B. Jr.; AUDET, J.; SAGAR, S.M. y MARTIN, J.B. (1982): Evidence that reduced growth hormone secretion observed in mosodium glutamate-tretated rat is the result of a deficiency in growth hormone releasing factor. *Endocrinology*, **110**: 540-550.
- MILLARD, R.P.; KLAFF, L.J.; BARRON, J.L.; LEVITT, N.S. y LING, N. (1983): Somatostatin-28 and somatostatin-14 suppression of arginine, insulin and TRH-stimulated GH and PRL secretion in man. *Clin. Endocrinol.*, **18**: 277-285.
- MOLL, G.W. Jr.; ROSENFELD, R.L. y FANG, V.S. (1986): Administration of low dose oestrogen rapidly and directly stimulates growth hormone production. *Am. J. Dis. Child*, **140**: 124-127.
- PLOTSKY, P.M. y VALE, W. (1985): Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science*, **230**: 461-463.
- SAUNDERS, A.; TERRY, L.C.; AUDET, J.; BRAZEAU, P. y MARTIN, J.B. (1976): Dynamic studies of growth hormone and prolactin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology.*, **21**: 193-203.
- SIMARD, J.; VINCENT, A.; DUCHESNE, R. y LABRIE, F. (1988): Full oestrogenic activity of C19-delta 5 adrenal steroids in rat pituitary lactotrophs and somatotrophs. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **55**: 233-242.
- TANNENBAUM, G.S. (1990): Interrelationship of somatostatin and growth hormone-releasing hormone in the genesis of the rhythmic secretion of growth hormone. *Acta Paediatr. Scand. (Supl.)*, **367**: 76-80.
- TANNENBAUM, G.S. y LING, N. (1984): The interrelationships of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*, **115**: 1952-1957.
- TANNENBAUM, G.S. y MARTIN, J.B. (1976): Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **98**: 562-570.
- WEHREMBERG, W.B. (1986): Continous infusion of growth hormone-releasing factor: Effects on pulsatile growth hormone secretion in normal rats. *Neuroendocrinology*, **42**: 143-147.
- WEHREMBERG, W.B.; BAIRD, A.; YING, S.Y. y LING, N. (1985): The effects of testosterone and estrogen on the pituitary growth hormone response to growth hormone-releasing factor. *Biol. Reprod.*, **32**: 369-375.
- WIEDEMANN, E. (1981): Adrenal and gonadal steroids. En: *Endocrine Control of Growth.* (Daughaday, W.H., ed.). Enselcier, New York, p.: 67.

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

## **ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO NUCLEAR EN ADN, LAS PROTEÍNAS NUCLEARES TOTALES Y LA EXPRESIÓN DE LOS NORs.**

### **COMPARATIVE STUDY OF DNA CONTENT, NUCLEAR PROTEINS AND EXPRESSION OF AgNORs.**

**J.C. CARVAJAL<sup>1</sup>, J. RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, A. ORFAO<sup>2</sup>, E. CARBAJO-PÉREZ<sup>3</sup> y S. CARBAJO<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Universidad de Salamanca. Colegio Universitario de Medicina. Avila.

<sup>2</sup>Servicio Central de Citometría. Universidad de Salamanca.

<sup>3</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.

<sup>4</sup>Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Universidad de Salamanca. Facultad de Medicina. Salamanca.

#### **RESUMEN**

En este trabajo se ha pretendido establecer la posible relación entre la cantidad de ADN nuclear de células no ciclantes y a término en cuanto a grado de diferenciación, como son los eritrocitos de trucha, pollo y rana, y la expresión de las NORs. Efectuados los correspondientes estudios cuantitativos, en el primero de los casos con citometría de flujo y en el segundo mediante el análisis de imagen, se ha podido determinar que no existe relación entre la cantidad total de ADN o de las proteínas nucleares totales y las proteínas argirófilas. Por ello, creemos que la capacidad transcripcional del ADNr no depende ni de la cantidad de material genético, ni de la arquitectura nuclear, ni tampoco de la dotación proteico-enzimática del núcleo; debiéndose las diferencias existentes entre las tres especies, en cuanto a la expresión de AgNORs, exclusivamente a la configuración genética que presentan cada una de ellas.

**PALABRAS CLAVE:** ADN. Proteínas nucleares. AgNORs. Citometría de Flujo. Citometría de Imagen. eritrocitos nucleados.

#### **ABSTRACT**

This study was carried out in attempt to gain insight into the relationship between DNA content, nuclear proteins and the expression of AgNORs. Trout, chicken and frog red blood cells were selected for our experimental model as they are differentiated, non cycling and nucleated cells. Both DNA and protein content in erythrocytes from the three species were studied by means of flow cytometry. AgNORs expression was evaluated in erythrocyte smears by using techniques of image cytometry. Our results showed that there is no relation between the expression of argyrophilic proteins and either DNA content or quantity of total nuclear proteins. It is concluded that the transcriptional activity of DNAr genes is not related either to the amount of DNA, the nuclear architecture or to the total protein content of the nucleus. Differences in AgNOR expression among the three species studied may be due exclusively to the genetic configuration on each of them.

**KEY WORDS:** DNA. Nuclear proteins. AgNORs. Flow cytometry. Image cytometry. Nucleated erythrocytes.

## Introducción

Las Regiones Organizadoras del Nucleolo u Organizadores Nucleolares (NORs) son estructuras con función poco conocida, cuyo estudio en los núcleos de células interfásicas está alcanzando un gran auge en relación con diversos estados patológicos (Crocker y Nar, 1987; Crocker y Skilbeck, 1987), dada la facilidad existente para la identificación de los mismos, en microscopía óptica, por técnicas de tinción argéntica (Ploton y cols., 1986). La argirofilia de los NORs es consecuente a la reactividad con los coloides de plata (AgNORs) de algunas de las proteínas (NORAPs) asociadas a estos genes (ADNr) que codifican por el ARNr.

Uno de los grandes interrogantes en torno a su naturaleza, es la posible interrelación entre los NORs y la cantidad de ADN nuclear, independientemente de la fase del ciclo celular. Como ya es sabido, a lo largo del ciclo celular, paralelamente al incremento del contenido nuclear en ADN, existe un aumento de proteínas y de ARN, ambos necesarios para el crecimiento celular (Darzinkiewich, 1990).

A fin de establecer la relación existente entre la cantidad de ADN y la expresión de los NORs, estudiada ésta por la reacción con coloides de plata, hemos planteado el estudio de los AgNORs en el núcleo de células a término, en cuanto a grado de diferenciación, y no ciclantes, como son los eritrocitos de pollo, trucha, y rana, algunos de ellos habitualmente utilizados como patrón de linealidad en citometría de flujo. En los tres tipos celulares se cuantificarán el contenido nuclear en ADN y proteínas por citometría de flujo y la expresión de los NORs por técnicas de citometría estática (imagen).

## Material y métodos

Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron muestras de sangre por punción intracardíaca, en 24 truchas (*Salmo irideus*), 16 pollos (*Iberline*) y 24 ranas (*Rana esculenta*). Tras la punción, las muestras de sangre de cada especie fueron recogidas y diluidas en solución de Alsever (4,2 g/l de cloruro sódico, 8 g/l de citrato sódico y 20,5 g/l de glucosa), manteniéndolas en nevera, a 4° C, hasta el procesado de las mismas.

### *Determinación del contenido nuclear en ADN*

La cuantificación del ADN nuclear se llevó a cabo sobre núcleos aislados, partiendo de una suspensión de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> células/ml. La preparación de la muestra y la tinción del ADN se realizó mediante la técnica descrita por Vindelov y cols. (1983). Una vez finalizada la preparación de la muestra, y antes de 1 hora desde la terminación del proceso, se efectuó la lectura con un citómetro de flujo FACScan (Becton / Dickinson, EE.UU). El estudio se realizó sobre un mínimo de 10.000 núcleos/test, a una velocidad entre 40 y 100 núcleos/segundo, y una lente focal elíptica con anchura de 120 µm. Para el análisis se utilizó el *software* CELLFIT (Becton / Dickinson, EE.UU), dotado con capacidad para discriminar dobletes.

Simultáneamente a la lectura del contenido nuclear en ADN (FL2A), se cuantificó la dispersión de la luz en ángulos próximos a los 0°, plano frontal (FSC-H), medida que aporta una aproximación al tamaño nuclear.

### *Cuantificación del contenido proteico del núcleo*

Se partió de suspensiones de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> células/ml de eritrocitos de pollo, trucha y rana, a las que se añadieron 1,5 ml de tampón citrato, centrifugando a continuación a 1.800 rpm. Cada botón celular se resuspendió en 200 µl de tampón citrato (Vindelov y cols., 1983). A esta suspensión se añadieron secuencialmente 1,8 ml/tubo de una solución de tripsina, a fin de digerir el citoplasma, que se dejó actuar durante 10 minutos, y 1,5 ml/tubo de una solución conteniendo un inhibidor de la tripsina, a fin de evitar la digestión nuclear, que actuó durante otros 10

minutos. Finalmente se añadieron 1,5 ml de una solución que contenía 3 µg/ml de isotiocianato de fluoresceína, tamponada a pH 8, prolongando la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad total.

La lectura se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACScan dotado de un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm y 15 miliwatios de potencia. Los fotomultiplicadores del citómetro se ajustaron automáticamente con bolas de calibración CALIBRATE™ y el software AUTOCOMP. Para la calibración de la señal de fluorescencia se empleó el sistema QuickCal (Flow Cytometry Standards Corporation, EE.UU.). La velocidad de adquisición se ajustó a 200-800 eventos/segundo, asegurándose que al menos el 75% de la población de bolas negativas eran visibles en el histograma de fluorescencia verde (FL1) mediante el *software* CONSORT 30 (Becton / Dickinson, EE.UU.). La intensidad de fluorescencia de las células se expresó en MESF (moléculas equivalentes de fluoresceína soluble).

### ***Tinción de los AgNORs***

Tras tres lavados en PBS, seguidos de centrifugación (400 rpm), se resuspendió el pellet en el mismo tampón, hasta conseguir una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml, procediéndose después a la extensión de 50 µl de la suspensión sobre portaobjetos de vidrio, a fin de realizar el estudio morfológico.

Tras el secado de las extensiones, se fijaron con una solución tamponada de paraformaldehído al 10% durante 30 minutos, siendo lavados posteriormente en agua destilada. Las muestras fueron incubadas durante 20 min, a 37° C con una solución coloidal de plata preparada según el procedimiento descrito por Ploton y cols. (1986). Fueron lavadas en agua y más adelante en una solución acuosa de tiosulfato sódico al 5% durante 5 minutos. Se contrastaron los núcleos con una solución acuosa de verde de metilo al 2% y, finalmente, tras un abundante lavado en agua corriente, fueron deshidratadas y montadas según los procedimientos habituales.

La cuantificación de los AgNORs por procedimientos de análisis de imagen se llevó a cabo según el procedimiento por Carbajo y cols. (1991-Mons), valorando el área nuclear, el área total de los AgNORs, el número medio de partículas por núcleo y tamaño medio de cada partícula, en 100 núcleos de cada una de las tres especies.

### ***Estudio estadístico***

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio morfométrico, se aplicó el test ANOVA con un grado de significación del 95%. La comparación entre pares de grupos se efectuó mediante la utilización del test de Fisher.

## **Resultados**

### ***Estudio del contenido nuclear en ADN y proteínas***

Ambos procedimientos cuantificadores han aportado resultados claros y satisfactorios, siendo posible la identificación de los núcleos de los eritrocitos de cada especie con cualquiera de los parámetros estudiados.

Los resultados se presentan como contenido relativo en ADN y proteínas (tabla 1) y como cociente de relación entre especies tanto del contenido en ADN como en proteínas (tabla 2), así como en los diagramas presentados en la figura 1 (a-f).

Se aprecia una clara relación entre el contenido nuclear en ADN de cada una de las tres especies y el tamaño nuclear (fig. 1, a-c), relación que puede hacerse extensiva al contenido proteico total del núcleo.

TABLA 1

ESPECIE	CANAL	ADN CV	PROTEÍNAS MESF MEDIO
Pollo	96,30	2,91	4,120
Trucha	217,00	3,07	9,255
Rana	572,20	2,19	24,358

Resumen de los datos obtenidos tras la cuantificación por técnicas de citometría de flujo del contenido nuclear en ADN (canal medio) y en proteínas (MESF =  $\exp [(canal+127,2031)/24,3855]$ ) de los eritrocitos de pollo, trucha y rana.

TABLA 2

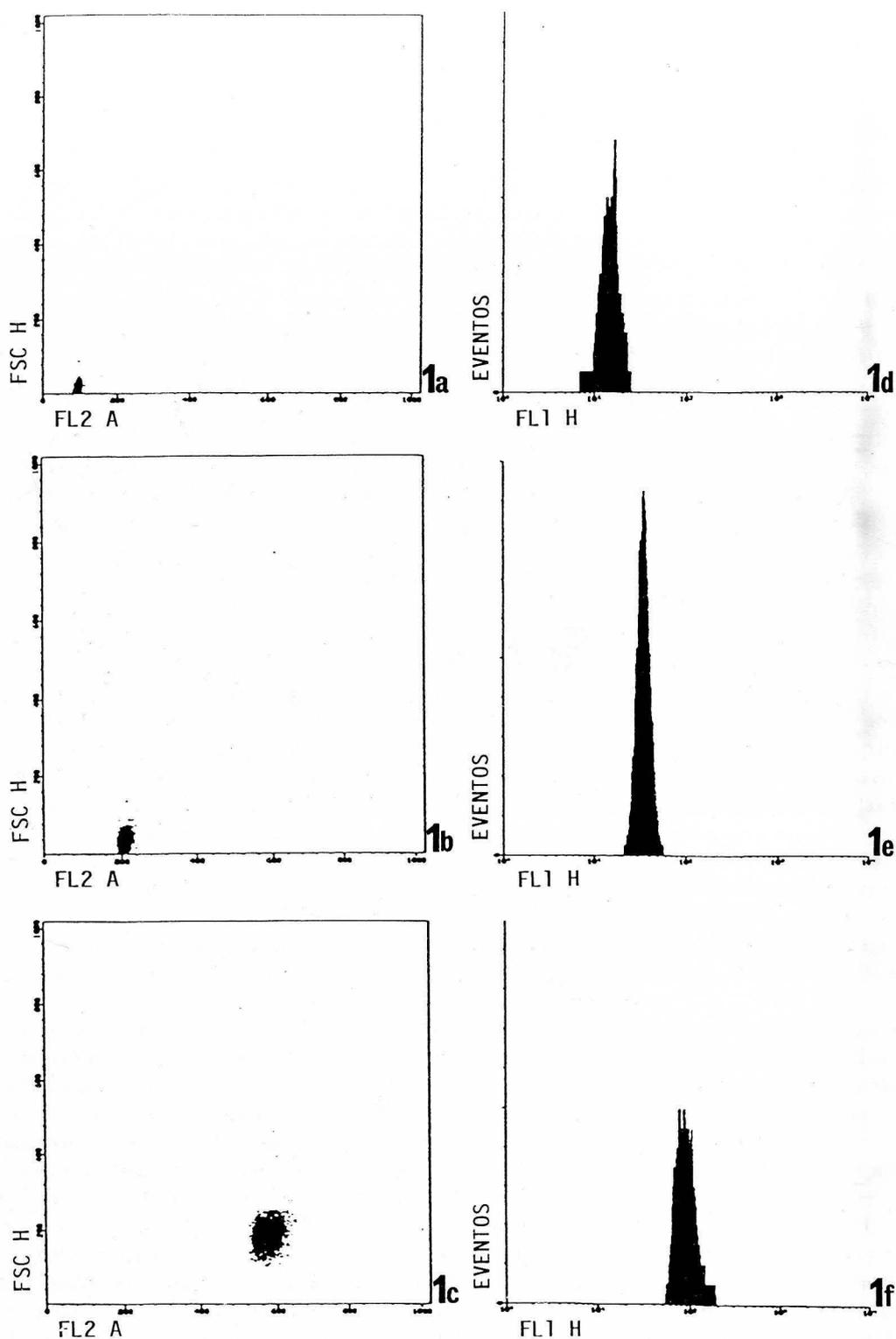
ESPECIE	COCIENTE ADN	PROTEÍNAS
Trucha/ Pollo	2,25 ± 0,01	2,23 ± 0,11
Rana/ Pollo	5,94 ± 0,04	5,90 ± 0,02
Rana/ Trucha	2,64 ± 0,03	2,65 ± 0,04

Relación existente entre los núcleos de los eritrocitos de pollo, trucha y rana en cuanto al contenido en ADN o proteínas nucleares totales expresada en forma de cociente entre especies.

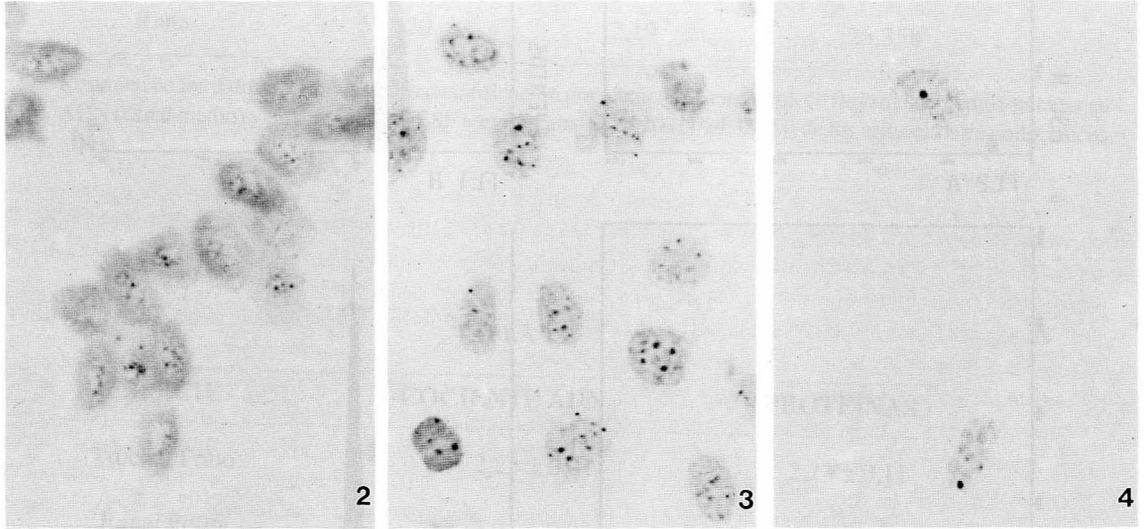
TABLA 3

PARÁMETRO	POLLO	TRUCHA	RANA	
Área Nuclear	12,69 ± 0,48	27,29 ± 0,55*	29,12 ± 0,62*	**
Área total de los AgNORs	0,88 ± 0,03	2,70 ± 0,10*	1,13 ± 0,06*	**
Número de AgNORs	3,16 ± 0,12	7,00 ± 0,18*	1,53 ± 0,08*	**
Tamaño medio de partícula	0,31 ± 0,01	0,41 ± 0,02*	0,83 ± 0,05*	**

Parámetros evaluados en el estudio morfométrico de los núcleos y AgNORs en los eritrocitos de pollo, trucha y rana, y sus valores respectivos (media + error estándar). \*Diferencia estadísticamente significativa con el valor del mismo parámetro en la primera columna (Test de Fisher  $p < cv$  0,05). \*\*Diferencia estadísticamente significativa con el valor del mismo parámetro en la segunda columna (Test de Fisher  $p < 0,05$ )



**FIGURA 1.** Diagramas biparamétricos que representan la relación entre el contenido nuclear en ADN (FL2-a) y la dispersión de la luz en el plano frontal, aproximación al tamaño nuclear (FSC-H), en los núcleos de eritrocitos de pollo (a), trucha (b) y rana (c); o el contenido proteico total del núcleo de las mismas células (FL1H), frente al número de eventos (d, e y f).



**FIGURAS 2, 3 y 4.** Imágenes resultantes de la tinción con coloides de plata de los NORs en núcleos de eritrocitos de pollo (Fig. 2), trucha (Fig. 3) y rana (Fig. 4). X 5625.

### *Cuantificación de los AgNORs*

El estudio de los AgNORs en los eritrocitos de pollo, trucha y rana no ofreció dificultades en cuanto a la tinción con el coloide de plata.

Los eritrocitos de pollo (fig. 2), por su pequeño tamaño, presentaron dificultades para la identificación y cuantificación de las partículas argirófilas, por ser estas de pequeño tamaño, por lo cual es posible que haya habido una infravaloración. En los citoplasmas se apreció la existencia de una reacción inespecífica y homogénea al coloide de plata.

En los eritrocitos de trucha (fig. 3) la reacción de los AgNORs fue nítida, observándose en todos los casos un mayor número de partículas que en los núcleos de las otras dos especies.

Los núcleos de los eritrocitos de rana (fig. 4) fueron los que mayor facilidad aportaron para el estudio de los AgNORs, tanto por el mayor tamaño nuclear como por la existencia, en la mayor parte de los casos, de una sola partícula argirófila.

La contratinción con verde de metilo se mostró como una técnica eficaz para el análisis morfométrico, dado que permitió la segmentación automática de los núcleos por umbralización de los niveles de gris, no apreciándose la existencia de artefactos que pudieran ser atribuibles a la tinción de proteínas nucleares.

Los datos obtenidos en el estudio morfométrico se presentan en la tabla 3.

### **Discusión**

Este estudio se ha basado en el análisis de muestras de eritrocitos de pollo, trucha y rana mediante dos técnicas citométricas ampliamente arraigadas, la citometría de flujo y la citometría de imagen, que han servido para obtener datos que permitan correlacionar cuatro atributos de estas células sanguíneas nucleadas: el contenido en ADN de sus núcleos; la cantidad total de proteínas contenidas en los mismos, cuantificando conjuntamente las proteínas histónicas y no histónicas; el tamaño nuclear obtenido por dos procedimientos, uno absoluto, estudiando citomorfométricamente las extensiones y otro relativo, en el que se utilizó la citometría de flujo cuando se analizó la luz dispersada en el plano frontal; finalmente, se estudiaron las NORs, demostradas por la reacción con coloides de plata de algunas de las proteínas no histonas, fundamentalmente la nucleolina (Daskal y cols., 1980; Lischwe y cols., 1979; Jordan, 1987), analizando su expresión mediante tres parámetros, el área total de las regiones argirófilas de cada núcleo, el tamaño medio de cada partícula argirófila y el número de partículas reactivas en cada núcleo.

La homogeneidad de las muestras obtenidas es adecuada, dados los bajos CV obtenidos en el análisis del contenido de ADN, lo cual asegura por una parte, la existencia de una mínima variabilidad genética entre los individuos de cada una de las especies y, por otra, la perfección en la obtención y tratamiento de las células hasta el momento de la cuantificación. Esta bondad en el muestreo y procesado ha sido también confirmada en el estudio citomorfométrico, en el que el error estándar para cada parámetro se mantiene en valores bajos.

Para todos estos parámetros, tanto cualitativos como cuantitativos, el análisis citométrico ha revelado la existencia de notorias diferencias entre las tres especies estudiadas. Estas diferencias, ya detectables en el análisis preliminar de los citogramas que plasman el estudio multiparamétrico llevado a cabo con el citómetro de flujo, en los que no es necesaria la aplicación de los test estadísticos por la gran magnitud de la muestra recogida y analizada, fueron confirmadas estadísticamente cuando se procedió a la cuantificación de las AgNORs. Revisando nuevamente los resultados, podemos concluir que, utilizando tan sólo dos parámetros, obtenidos a partir de la citometría de flujo, de la de imagen o de la combinación de ambas técnicas, es posible identificar cualquiera de las tres poblaciones celulares, sin necesidad de aplicar test de discriminación matemática de considerable precisión.

La relación entre las tres especies es similar, tanto cuando se valora el contenido nuclear en ADN, como cuando se utiliza el contenido proteico total del núcleo. Este hecho queda plasmado por la gran similitud en los cocientes de relación entre las tres especies para cada uno de los dos parámetros.

Esta diferencia entre especies afecta también, aunque en menor medida, al tamaño nuclear cuando se estudia mediante la dispersión frontal de la luz en citometría de flujo, pero no tan claramente en los estudios de imagen (aunque es significativa estadísticamente, no es muy notoria la diferencia de tamaño entre el núcleo de los hematíes de trucha y los de rana). Este hecho puede ser atribuible al aplanamiento del núcleo en el plano ecuatorial, existente, aunque en distinto grado, en los núcleos de las tres especies, lo cual permite considerables variaciones del tamaño nuclear sin que se modifique demasiado el área de proyección. Esta diferencia en la profundidad (el núcleo del eritrocito de rana es más próximo a la esfericidad) implica un mayor volumen nuclear, por lo cual existe una mayor dispersión de luz, hecho reflejado por el citómetro de flujo una vez amplificada la señal captada por el detector.

El estudio de los AgNORs con la técnica de marcado por coloides de plata, tal y como expusimos en la sección de resultados, ha sido satisfactorio, siendo excelentes el contraste y la conservación morfológica de las preparaciones. Estas dos características confirman que las tinciones argénticas son adecuadas para el estudio de las NORs en células interfásicas en extensiones, dispersados celulares o improntas. Estos procedimientos, a los que normalmente son reacios los investigadores ligados al campo de la patología, ya han sido aplicados con éxito para el estudio citológico y citométrico por Boldy y cols. (1989) y Carbajo y cols. (1991), ya que permiten conservar la integridad del núcleo celular, si bien los datos obtenidos no son nunca comparables con los obtenidos en secciones de tejido, en las que se ha observado que el número de partículas argirófilas por núcleo es casi tres veces menor (Boldy y cols., 1989).

La contratinción con verde de metilo aporta el contraste adecuado, tanto para el estudio directo al microscopio, como para el análisis de imagen. El resultado de esta tinción es muy homogéneo, dado que el colorante se une selectivamente al ADN, sin llegar a interaccionar con las histonas, facilitando la separación espectral de las partículas argirófilas (de color pardo-negro), pues enmascara el fondo de la reacción argirófila (de color pardo amarillento), optimizando las discriminaciones visual y automática.

Tanto en los estudios de las NORs por microscopía de luz transmitida convencional (hasta 1000 x), como cuando se aplica secuencialmente a la microscopía óptica el proceso digital de imágenes, en el que se incrementan destacablemente el tamaño y el contraste de la imagen, el pequeño tamaño de algunas de las partículas argirófilas, hace que éstas estén muy próximas al límite inferior de resolución del sistema, por lo cual es posible que en los núcleos de pollo, los de menor tamaño en nuestro estudio, haya tenido lugar una infravaloración de la reacción.

No existe correlación entre los resultados obtenidos por citometría de flujo (contenido en ADN y proteico) y los obtenidos por el análisis citomorfométrico para ninguno de los parámetros que definen a las NORs (área total de los AgNORs por núcleo, número de AgNORs por núcleo y tamaño medio de partícula), por lo que se puede concluir que no existe relación entre la cantidad de ADN o las proteínas nucleares totales y las proteínas argirófilas, al menos tratándose de diferentes especies, o, lo que es lo mismo, la capacidad transcripcional del ADN no depende ni de la cantidad de material genético, ni de la arquitectura nuclear (histonas), hecho ya sugerido por Howell (1977) y Schwarzacher y cols. (1978), ni de la dotación proteico-enzimática del núcleo (proteínas no histonas) una vez se ha alcanzado el límite del crecimiento o la diferenciación. Por tanto, la gran diferencia existente en la expresión de los AgNORs entre las tres especies estudiadas, es solamente atribuible a la configuración genética de cada una de ellas. Así, en la trucha hay de 54 a 64 cromosomas, entre 22 y 24 en anfibios y de 78 a 80 en aves (Schmid y cols., 1982). Nuestros datos sobre NORs no coinciden con los aportados por estos autores, que atribuyen tan sólo dos NORs a cada una de las tres especies. La diferencia puede deberse a la diversidad genética entre razas, pero es más factible que sea un defecto de cuantificación, consecuente al pequeño tamaño de las partículas, en coincidencia con lo descrito por Crocker (1990), de tal manera que puede haber sido imposible su identificación.

Las especiales características de los eritrocitos de rana: gran tamaño nuclear, homogeneidad textural del núcleo, área total de los AgNORs moderada que se concentra en la mayoría de los casos en una sola partícula y, la escasa variabilidad de estos parámetros; unidas al hecho de que se trata de células a término en cuanto a su grado de diferenciación, y no ciclantes; hace que pueda pensarse en ellas como elemento de correlación y referencia para estudios de muestras patológicas. Una valoración relativa de los AgNORs de este tipo ya ha sido sugerida, entre otros, por Adnet y cols. (1990) y Ruschoff y cols. (1990), quienes pensaron en linfocitos o en células normales del mismo tejido o individuo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADNET, J.J.; VISEAUX-COLETO, B.; BOGOMOLETZ, W.V.; BARHOUM, K.; CANELLAS, J.C. y PLOTON, D. (1990): «Interet de la quantification des proteíns Ag-NORs en pathologie tumorale». Colloque INSERM: Analyse d'Images Biologiques en Microscopie Optique et Electronique. Reims, France, 3-5 Avril 1990.
- BOLDY, D.A.R.; CROCKER, J. y AYRES, J.G. (1989): «Application of the AgNORs method to cell imprints of Iymphoid tissue». *J. Pathol.*, **157**: 75-79.
- CARBAJO, S.; ORFAO, A. y CARBAJO-PÉREZ, E. (1991): «Relationship between AgNORs and cell proliferation studied by flow and image cytometry». *Biol. Cell.*, **73**: 45.
- CROCKER, J. y NAR, P. (1987): «Nucleolar organizer regions in limphomas». *J. Pathol.*, **151**: 111-118.
- CROCKER, J. y SKILBECK, N. (1987): «Nucléolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study». *J. Clin. Pathol.*, **40**: 885-889.
- DARZYNKIEWICZ, Z. y TRAGANOS, F. (1990). «Multiparameter flow cytometry in studies of the cell cycle». En: *Flow cytometry and Sorting*. Second edition Wiley-Liss, Inc.
- DASKAL, Y.; SMETANA, K. y BUSCH, H. (1980): «Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver staining proteins. C<sub>23</sub> and B<sub>23</sub> are in the fibrillar component». *Exp. Cell. Res.*, **127**: 285-291.
- HOWELL, W.M. (1977): «Visualisation of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes». *Chromosoma*, **62**: 361-367.
- JORDAN, G. (1987): «At the heart of nucleolus». *Nature*, **329**: 489-490.
- LICHWE, M.A.; SMETANA, K.; OLSON, M.O. y BUSCH, H. (1979): «Proteins C<sub>23</sub> and B<sub>23</sub> and the major nucleolar silver staining proteins». *Life Sci.*, **23**: 701-708.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F. y ADNET, J.J. (1986): «Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level». *Histochem. J.*, **18**: 5-14.
- RUSCHOFF, J.; PLATE, K.H.; CONTRACTOR, H.; KERN, S.; ZIMMERMANN, R. y THOMAS, C. (1990): «Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization». *J. of Pathol.*, **161**: 113-118.
- SCHMID, M.; LOSER, C.; SCHMIDTKE, J. y EUGEL, W. (1982): «Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates». *Chromosoma*, **86**: 149-179.
- SCHWARZACHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V. y SCHNEDL, W. (1978): «The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions: electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis». *Cytogenet. Cell Genet.*, **20**: 24-39
- VINDELOV, L.L.; CHRISTENSEN, I.J. y NISSEN, N. (1983): «A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis». *Cytometry*, **3**: 323-325.

Correspondencia: Dr. J.C. Carvajal  
 Departamento de Anatomía e Histología  
 Facultad de Medicina  
 Avda. del Campo Charro s/n  
 37007 Salamanca. España

**ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO Y DEL CONTENIDO SECRETORIO LIPÍDICO DE LA GLÁNDULA SUPRARRENAL DE RATA ALBINA TRAS IRRADIACIÓN OVÁRICA CON LÁSER INFRARROJO DE 904 n.m.**

**HYSTOMORPHOLOGICAL STUDY AND STUDY OF THE LIPOID SECRETIONAL CONTENTS OF THE ADRENAL GLAND OF THE ALBINO RAT AFTER OVARIC IRRADIATION WITH INFRARED LASER BEAM (904 n.m.)**

**A. GORDILLO FERNÁNDEZ, R. PERALES MARÍN, E. SMITH-FERRES y V. SMITH-FERRES**

Departamento de Ciencias Morfológicas. V. Smith-Ágreda. Facultad de Medicina y Odontología.  
Universidad de Valencia

**RESUMEN**

Para estudiar el efecto del haz de láser infra-rojo (I.R.) (904 n.m.) sobre el substrato suprarrenal, tanto en su aspecto histomorfológico así como en relación con el contenido secretorio lipídico, tras irradiación de ambos ovarios, se realiza la experiencia con ratas prepúberas albinas de la cepa Wistar.

Se compara el efecto tras la irradiación a otros dos grupos no irradiados con y sin laparotomía inicial. Los posibles cambios se estudian los días 1º, 7º, 14º y 21º postcirugía.

En conjunto se aprecian cambios significativos en los animales estudiados pertenecientes al grupo irradiado.

**PALABRAS CLAVE:** Láser I.R.. Ovario. Suprarrenal. Cambios histomorfológicos. Cambios en el contenido lipídico. Rata albina.

**ABSTRACT**

In order to study the effect of the infra-red laser beam (904 n.m.), on the adrenal substratum, in both its morphological aspect and its lipoid secretional contents, after irradiation of both ovaries, an experiment is carried out with prepubescent albino rats of the wistar stock.

The effect after irradiation is compared with other non irradiated groups with and without initial laparotomy. The possible changes are studied on the 1st., 7th., 14th., and 21st. days after surgery.

On the whole, significant changes in the animals studied are noticed in those belonging to the irradiated group.

**KEY WORDS:** I.R. Laser beam. Ovary, adrenal. Hystomorphological changes. Changes in lipoid contents. Albino rat.

**Introducción**

El descubrimiento de la luz coherente de baja potencia y, posteriormente, la puesta en funcionamiento del primer láser hacen que se incremente la investigación para su utilización en medicina, pues para ello se necesita del laboratorio y de diferentes modelos experimentales a fin de obtener la mayor inocuidad posible de la técnica,

ya que es necesario tratar de establecer si su empleo sobre órganos normales o patológicos provocará o no la aparición de efectos secundarios indeseables de forma inmediata o diferida.

Por otra parte, también se justifica tratando de obtener la mayor cantidad de datos sobre sus posibilidades en función de las características físicas y del medio sobre el que se actúa (potencia, penetración, absorción, etc.) y los efectos tisulares o de otro tipo tanto directos como indirectos.

En nuestro Departamento, utilizando Soft-láser, autores como Smith Ágreda, Renovell, Montesinos, Perales y otros han demostrado la existencia de los efectos de este tipo de energía sobre la ciclosis celular en el sentido de estimulación, irradiando hipófisis y estableciendo sus consecuencias, bien a nivel de la glándula irradiada, bien a nivel de sus órganos diana (2, 3, 4, 8 y 9).

Nosotros, con el presente trabajo, pretendemos conocer los posibles cambios histomorfológicos y en el contenido secretorio lipídico que puedan aparecer en la glándula suprarrenal de ratas albinas tras irradiación ovárica con láser (I.R.).

## Material y métodos

Para comprobar los citados efectos, hemos elegido ratas albinas cepa Wistar ya que con ellas se han venido realizando casi la totalidad de los trabajos efectuados por los diversos autores, por tratarse de un animal de muy fácil manejo y poseer una excelente respuesta frente a los traumatismos quirúrgicos y ante la infección. Además las que hemos seleccionado son impúberes (para eliminar la influencia del ciclo genital), de entre 23 y 27 días de edad y con un peso, al comenzar el estudio, entre 50 y 60 g. La pubertad en las ratas se alcanza hacia los 70 días de vida (7).

La irradiación se ha efectuado con un láser semiconductor de As - Ga, que posee las siguientes características:

- Longitud de onda 904 n.m.
- Potencia pico 8 W.
- Potencia media 0,56 mW.
- Frecuencia de emisión 350 Hz.
- Duración del impulso 200 nseg.
- Profundidad de penetración 2-3 cm.  
(tejido cutáneo)

El tiempo de exposición ha sido de 14 minutos en cada ovario, lo que supone la administración de una energía de 0,4704 julios/ovario.

En nuestra experiencia hemos utilizado un total de 60 animales distribuidos en 3 grandes grupos (Tabla I):

Testigo: Llegan a la necropsia en condiciones normales.

Simulado: A los que sólo se les practica laparotomía.

Experimental: Se irradian ambos ovarios tras laparotomía.

**TABLA I**

### GRUPOS

		TESTIGO	SIMULADO	EXPERIMENTAL
S E R I E S	1 día	5	5	5
	7 días	5	5	5
	14 días	5	5	5
	21 días	5	5	5

Modelo experimental utilizado. Distribución. Testigo (control). Simulado (laparotomía).  
Experimental (laparotomía + irradiación).

Estos grupos los hemos subdividido en series de:

- 1 día: buscando posibles hallazgos de interés que puedan aparecer debidos al estrés quirúrgico.
- 7 días: tras los que el animal ha recuperado su vitalidad y ha comenzado a ganar peso.
- 14 y 21 días: series aleatorias, en las que observamos si persisten o no los efectos detectados.

Los animales han sido mantenidos en el estabulario que posee el Departamento, en el cual están sometidos a una misma dieta y en condiciones ambientales constantes de 28° C y ventilación asegurada por una instalación de aire acondicionado.

Por otra parte, para realizar este trabajo tras la necropsia del animal y extracción de las suprarrenales, hemos procedido al procesamiento de las mismas para el estudio a microscopía luz según técnica habitual empleando para la histomorfología las siguientes tinciones:

- Hematoxilina-Eosina.
- Tricrómico de Masson (variante de Goldner).
- Azán de Heindenhein.
- Azul de Toluidina.
- Tricrómico de Gallego-Dualde.

En cuanto a la detección del contenido lipídico, se ha utilizado para el corte a congelación las siguientes:

- Rojo Sudán.
- Rojo escarlata.
- Negro Sudán.

## Resultados

### *Histomorfología*

Hemos podido evidenciar en las preparaciones correspondientes al grupo experimental una densidad celular muy intensa, como puede observarse en los cortes que presentamos, correspondiendo ambos al grupo experimental, serie de 1 día el primero de ellos (figura 1) y a la de 21 días el segundo (figura 3), en el que además se aprecia en la capa fascicular, con la tinción de tricrómico de Masson/Goldner a 500X, un incremento de la oranjofilia citoplásmica (figura 1) en la mayor parte de las células.

También se demuestra una notable hipertrofia de la cortical suprarrenal (figura 3) conservando muy bien la arquitectura histológica de la glándula tal como se manifiesta en dicha preparación teñida con el método de Gallego-Dualde a 120X.

Para poder comparar, incluimos cortes pertenecientes al grupo testigo de las series de 1 día y 21 días respectivamente correspondientes a las tinciones descritas para el grupo experimental anteriormente citadas y a las mismas series de 1 y 21 días (figuras 2 y 4).

### *Detección cualitativa de lípidos*

En nuestros resultados observamos el evidente incremento del contenido secretorio de lípidos que puede observarse en la preparación teñida con negro Sudán a 500X y que corresponde a un corte de la capa fascicular del grupo experimental serie de 21 días (figura 5) en comparación con el contenido que presenta con la misma tinción y aumentos el grupo testigo serie de 14 días (figura 6).

Por otro lado también hemos apreciado, en los cortes preparados con rojo Sudán, en el grupo experimental serie de 1 día a 75X, una cortical densamente teñida con borramiento aparente de su arquitectura histológica debido al alto contenido secretorio, cuya condensación más intensa se aprecia bien en la glomerular (figura 7) y que posee un carácter más homogéneo y más denso en la fascicular que en dicha capa de los grupos testigo y simulado, mientras que en la panorámica correspondiente a la serie de 7 días de dicho grupo experimental (figura 8), se presenta un depleción del contenido lipídico en relación con la serie de 1 día.

FIGURA -1-

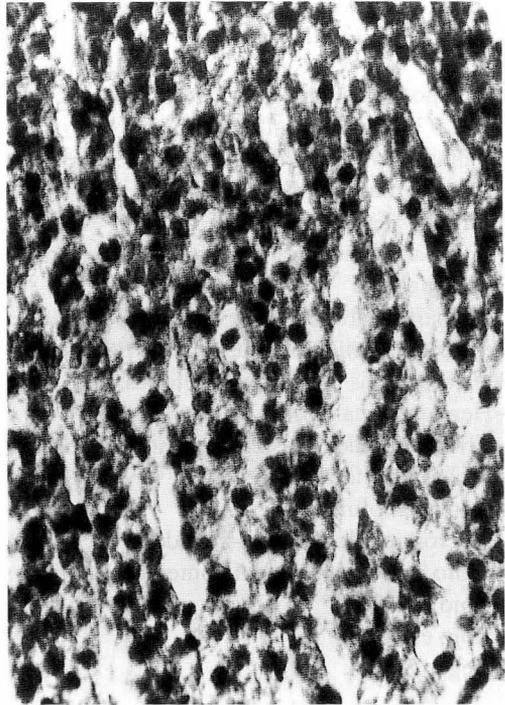


FIGURA -2-

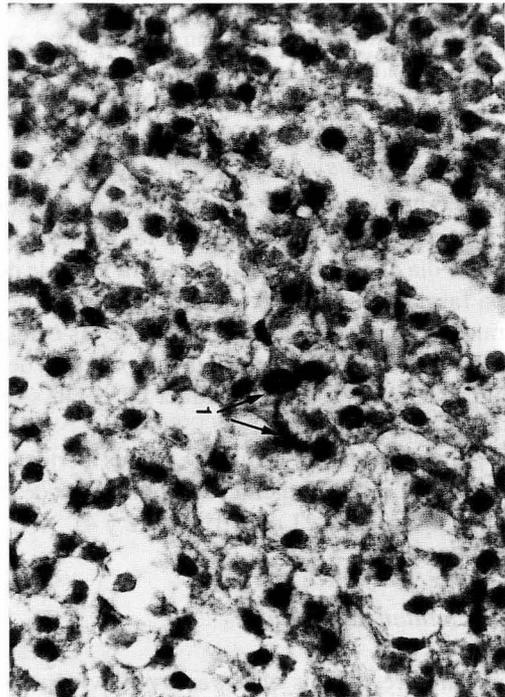


FIGURA -3-

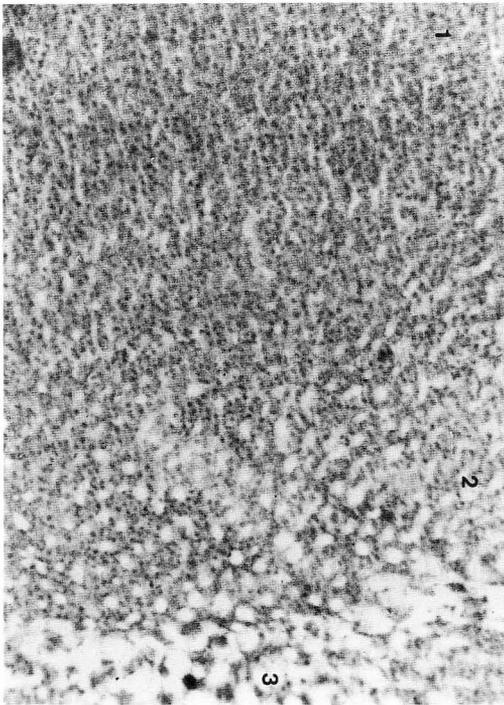
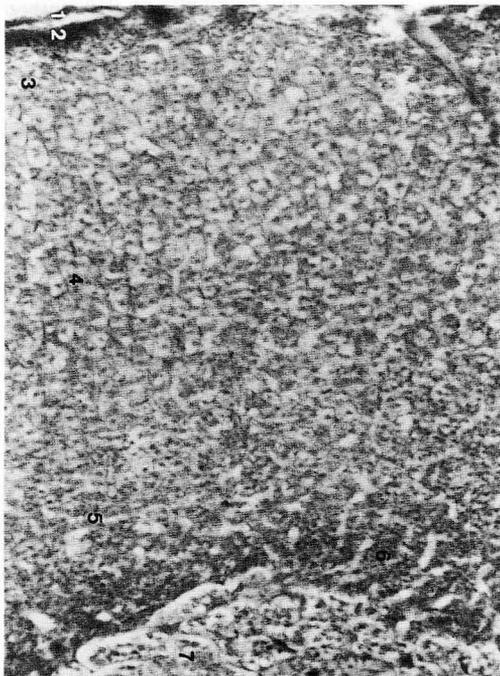


FIGURA -4-



- FIGURA 1.** Grupo experimental. Serie de 1 día. Fascicular. Tricrómico de Masson/Goldner. 500x. Densidad celular muy intensa e incremento de la oranjofilia citoplásmica en la mayor parte de las células.
- FIGURA 2.** Grupo testigo. Serie de 1 día. Fascicular. Tricrómico de Masson/Goldner. 500x. Menor densidad celular que en la preparación correspondiente al grupo experimental de la misma serie y tinción.
- FIGURA 3.** Grupo experimental. Serie de 21 días. Fascicular. Gallego-Dualde. 120x. Densidad celular muy intensa y notable hipertrofia de la cortical.
- FIGURA 4.** Grupo testigo. Serie de 21 días. Fascicular. Gallego-Dualde. 120x. Densidad celular menor que en la preparación correspondiente al grupo experimental de la misma serie y tinción.

FIGURA -7-

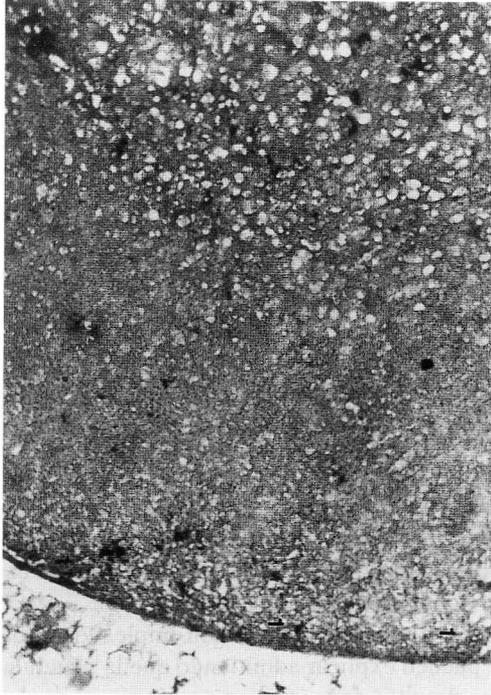


FIGURA -8-

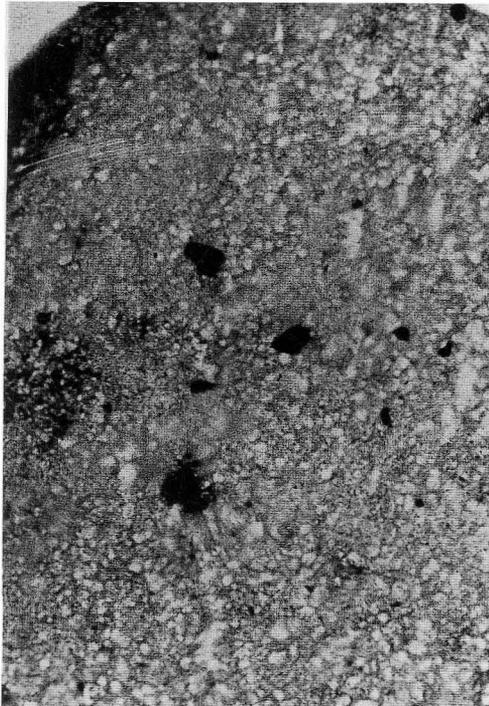


FIGURA -5-

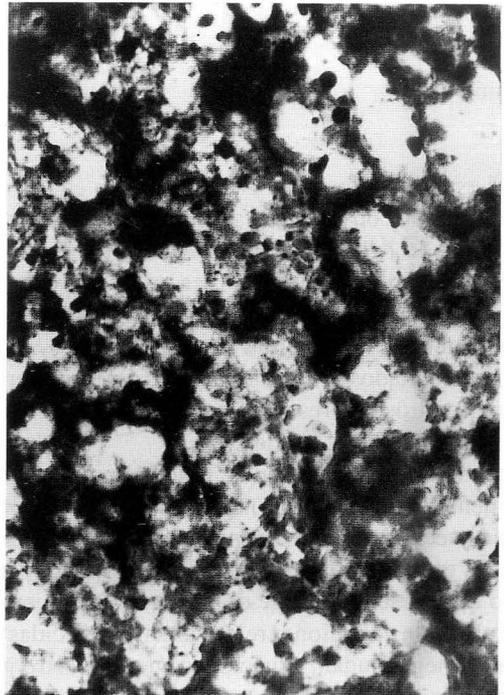
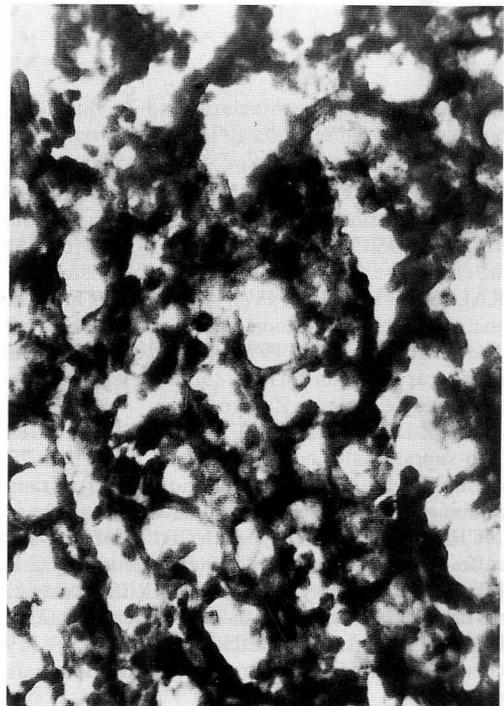


FIGURA -6-



- FIGURA 5.** Grupo experimental. Serie de 21 días. Fascicular. Negro Sudán. 500x. Evidente incremento del contenido secretorio de lípidos.
- FIGURA 6.** Grupo testigo. Serie de 14 días. Fascicular. Negro Sudán. 500x. Menor contenido secretorio lipídico que en la preparación correspondiente al grupo experimental de la misma serie y tinción.
- FIGURA 7.** Grupo experimental. Serie de 1 día. Panorámica. Rojo Sudán. 75x. Cortical densamente teñida con alto contenido secretorio lipídico. Glomerular con intensa condensación de lípidos. En la fascicular se aprecia el carácter más homogéneo y denso que en la de los grupos testigo y simulado.
- FIGURA 8.** Grupo experimental. Serie de 7 días. Panorámica. Rojo Sudán. 75X. Depleción del contenido lipídico en relación con la de la serie de 1 día del mismo grupo.

## Discusión

Del estudio de los resultados obtenidos en el grupo experimental se desprende la existencia de una intensa densidad celular con hipertrofia de la cortical, apreciable ya en la serie de 1 día y que se intensifica progresivamente en las series de 7, 14 y 21 días con buena preservación de la arquitectura histológica glandular, acompañada de importante oranjofilia citoplásmica en la mayor parte de las células tanto de la capa glomerular como de la fascicular, persistiendo en esta última la intensa densidad celular con alto contenido secretorio intracitoplásmico a la que hemos hecho referencia.

Estos resultados son similares a los obtenidos en experiencias respectivas por diversos autores (1, 5, 10). Por el contrario otros autores observan una disminución de la capa fascicular tras pinealectomía, así como aumento de las vacuolizaciones celulares (6).

Del estudio de detección de lípidos lo más significativo, en nuestra opinión, es la observación, en el grupo experimental (serie de 1 día), de la cortical densamente teñida con rojo Sudán en la que se evidencia un alto contenido secretorio, especialmente en la glomerular, y con un carácter más denso y homogéneo en la fascicular que en los grupos testigo y simulado de la misma serie de 1 día, lo cual contrasta con la depleción del contenido lipídico que presenta la serie de 7 días de este mismo grupo.

Se obtienen variaciones relativamente parecidas con los otros dos métodos de tinción empleados, es decir rojo escarlata y negro sudán, situaciones que, a nuestro juicio, se pueden explicar admitiendo que la glándula está en una situación funcional hiperactiva tras las primeras 24 horas después de la irradiación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. GARCÉS SAN RUPERTO, V. (1973): Aportaciones al conocimiento de las transformaciones experimentales del substrato endocrino suprarrenal, tras radiaciones ultravioletas hipofisarias. *An. Anat.* **22**: 247-266.
2. MONTESINOS CASTRO-GIRONA, M. *et al.* (1985): Respuesta del lóbulo anterior de la hipófisis a la estimulación con la luz coherente. Estudio ultraestructural. *Historia Médica*, Vol. **I/I**. Málaga.
3. PERALES MARÍN, R. (1987): Aportaciones al estudio de los cambios morfológicos y estructurales en el ovario de rata albina, tras la irradiación con luz coherente de baja potencia (904 n.m.). Tesis Doctoral. Valencia. Facultad de Medicina.
4. RENOVELL, A. y cols. (1978): Aportaciones al conocimiento de las transformaciones experimentales de la hipófisis y el ovario tras la acción del láser sobre la glándula hipofisaria. *Actas del X Congreso de la Sociedad Anatómica Española*. Ed. Heraldo de Aragón. Zaragoza.
5. SÁNCHEZ DEL CAMPO y F.J.; MARTÍNEZ SORIANO, F. (1978): Aportaciones al conocimiento de las relaciones epífiso-suprarrenales en la rata blanca. *Med. Esp.* **77**: 162-171.
6. SÁNCHEZ DEL CAMPO, F.J. *et al.* (1979): Transformaciones morfológicas de las glándulas suprarrenales tras la irradiación hipofisaria con luz coherente. *Morfolog. Normal y Patológica. Secc. Anat.* **3**: 757-768.
7. SÁNCHEZ GARRIDO, F.; SÁNCHEZ DEL CAMPO, F. y SÁNCHEZ DEL CURA, G. (1977): El ovario en los mamíferos: microscopía óptica y electrónica de barrido. Barcelona. Ed. Toray Masson, pp. 9-13.
8. SMITH ÁGREDA, V. y FERRES TORRES, E. (1982): Soft-Láser as an experimental stimulus in endocrinological study. Libro de Actas del I Congreso Internacional de Soft-Láser: pp. 3-4. Palma de Mallorca.
9. SMITH ÁGREDA, V. y FERRES TORRES, E. (1983): Los efectos del láser en el sistema neuroendocrino y en el desarrollo embriológico. Libro de Actas del Seminario sobre aplicaciones de los láseres terapéuticos. *Láser España -83*. Barcelona.
10. TKATCHEVA, G.A. (1986): Succinate-dehydrogenase and alkaline monophosphoesterase as indicators of secretory activity of adrenal cortex. *Arch. Anat. Histol. Embriol.* **54**: 57-61.

Correspondencia: Dr. Antonio Gordillo Fernández  
 Director Médico  
 Hospital «Dr. Moliner»  
 Servicio Valenciano de Salud  
 Porta-Coeli, s/n  
 46118 Serra. Valencia. España

## CONTENIDO MINERAL ÓSEO EN MUJERES PREMENOPÁUSICAS Y SU RELACIÓN A VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

## BONE MINERAL CONTENT IN PREMENOPAUSAL WOMEN AND ITS CORRELATION WITH ANTHROPOMETRICAL VARIABLES

E.R. HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, M. REVILLA<sup>2</sup> y H. RICO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía

<sup>2</sup> Departamento de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

### RESUMEN

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

Sólo encontramos correlación significativa con el peso ( $p<0,001$ ) y con la masa corporal ( $p<0,001$ ), pero con ésta el valor de r es menor. Ello nos lleva a postular que el continuado esfuerzo mecánico que ocasiona el peso sobre el esqueleto es el principal condicionante de estímulo para el desarrollo de la masa ósea.

**PALABRAS CLAVE:** Variables antropométricas. Contenido mineal óseo. Mujeres premenopáusicas.

### SUMMARY

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

We only found significant correlation with the weight ( $p<0,001$ ) and body mass ( $p<0,001$ ), being the r value lower in the latter. We can then postulate that the continued mechanic stress of the weight over skeleton is the main stimulus for bone mass development.

**KEY WORDS:** Anthropometrical variables. Bone mineral content. Premenopausal status.

### Introducción

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

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

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

## Material y métodos

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

Por el estudio clínico y analítico se descartó cualquier enfermedad que pudiera influenciar en su metabolismo óseo. Los valores séricos de creatinina eran en todas inferiores a 1,2 mg/dl. Ninguna había estado inmovilizada más de 15 días en los dos últimos años y no tomaban ningún tipo de medicación (corticoides, hidantoinas, barbitúricos, vitaminas A o D, tiazidas, etc.) que pudieran influir en el metabolismo cálcico.

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

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

## Resultados

En la tabla 1 se muestran los valores medios y la desviación estándar de la edad, del CMOT, la MM, el %MG, la MC, y del P, de las 105 mujeres estudiadas. Como puede verse la edad media era de  $34,8 \pm 8,3$  años, con un rango de 20 a 49 años. El CMOT fue de  $2.623 \pm 484$  g., la MM de  $29,8 \pm 4,4$  kg, el %MG de un  $41,9 \pm 4,3\%$ , la MC de  $25,3 \pm 1,7$ , y el peso medio de  $61,6 \pm 6,5$  kg.

En la tabla 2 se muestran los valores de r y p según el test de correlación de Pearson encontrado entre el análisis de los distintos parámetros. Como puede verse la más alta correlación se encuentra entre CMOT y peso ( $r=0,648$ ;  $p<0,001$ ), siendo también significativa la correlación entre CMOT y MC ( $r=0,510$ ;  $p<0,001$ ), no existiendo correlación significativa con la Edad, con la MM, ni con el %MG.

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

TABLA 1.

Edad	34,8 ± 8,3 años
CMOT	2.623,0 ± 484,0 g
MM	29,8 ± 4,4 kg
%MG	41,9 ± 4,3%
MC	25,3 ± 1,7
P	61,6 ± 6,5 kg

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

## Discusión

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

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

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

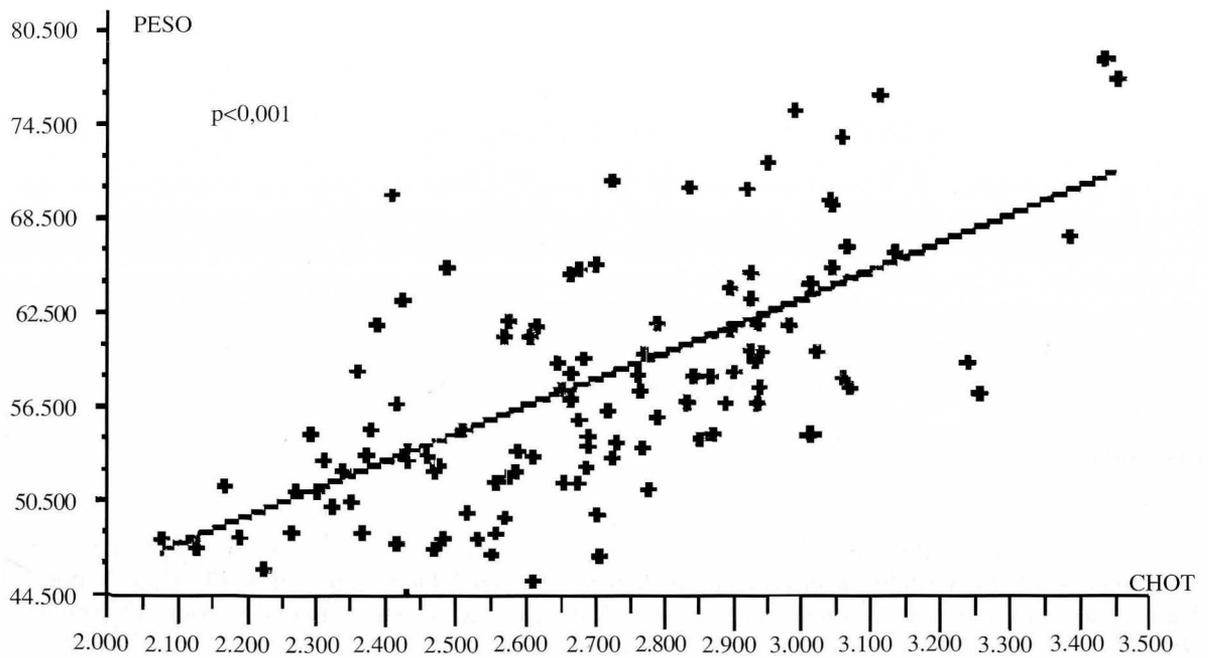
En el organismo humano el mayor componente de los tejidos blandos es el músculo (10). Nosotros no encontramos relación entre el CMOT y la MM, dónde el nivel de  $r$  fue el más bajo de los observados (tabla 2). Aunque varios autores han correlacionado la masa ósea con la muscular (1 y 18); nosotros en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

La masa corporal sí presenta una correlación significativa y de signo positivo con el CMOT, pero más alto nivel de significación lo encontramos con el peso (figura 1); dado que para el cálculo de la MC una variable es el P y

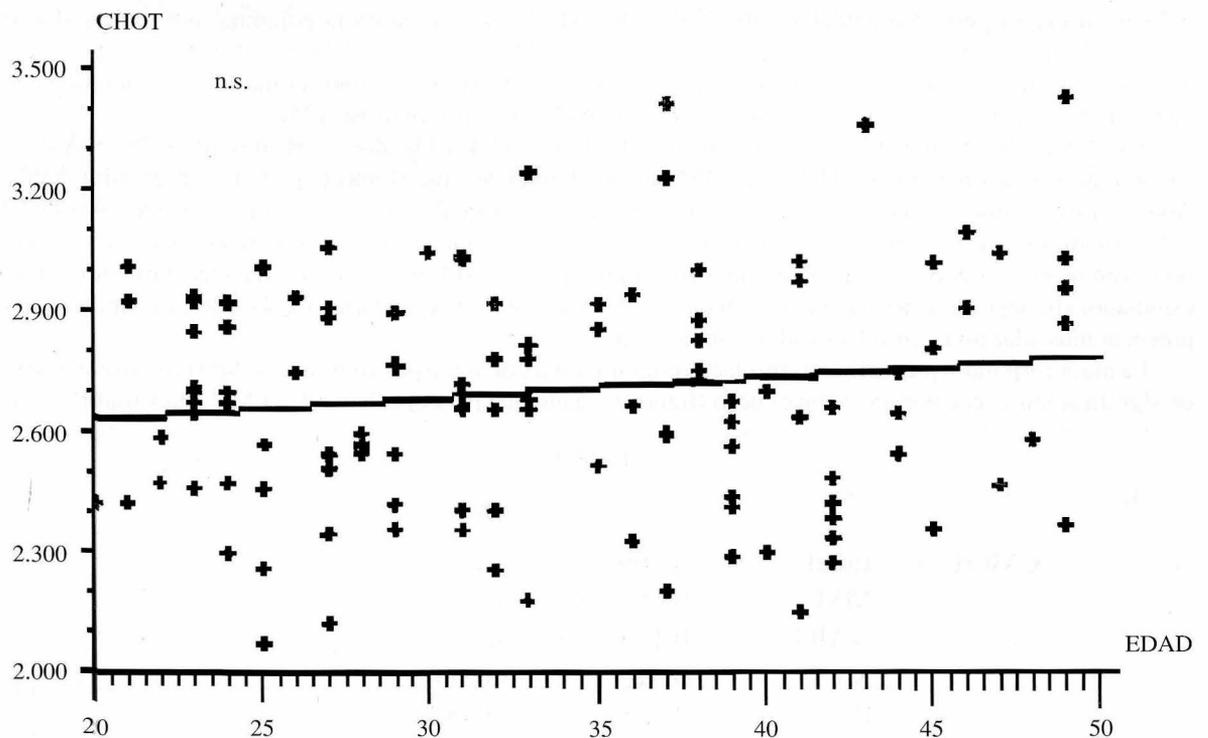
TABLA 2

	r	p
CMOT vs Edad	0,169	ns
MM	0,087	ns
%MG	0,173	ns
MC	0,510	<0,001
P	0,648	<0,001

Valores de  $r$  y  $p$  según el test de correlación de Pearson entre CMOT y los restantes parámetros estudiados. Siglas igual que en la tabla 1.



**FIGURA 1.** Correlación entre el CMOT (contenido mineral óseo total) y el P (peso), así como su nivel de significación ( $p < 0,001$ ), de las 105 mujeres estudiadas.



**FIGURA 2.** Correlación entre el CMOT (contenido mineral óseo total) y la edad y su nivel de significación.

la otra la talla, el encontrar más significación con el P que con la MC, nos indica que la masa ósea o CMOT es más dependiente del P que de la talla o MC. De Simone y cols. (5); Wronski y cols. (33); Nelson y cols. (16) y Pocock y cols. (18), también observan una relación significativa entre masa ósea y P. Por otro lado, se sabe que la osteoporosis que se acompaña de una disminuida masa ósea incide preferentemente en mujeres de poco peso (25).

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

### Agradecimiento

Este trabajo se ha realizado con la ayuda de la CICYT nº OP89-0048.

### BIBLIOGRAFÍA

1. BEVIER, W.C.; WISWELL, R.A.; PYKA, G.; KOZAK, K.C.; NEWHALL, K.M., y MARCUS, R. (1989): Relationship of body composition, muscle strength, and aerobic capacity to bone mineral density in older men and women. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 421-432.
2. BUCHANAN, J.R.; MYERS, C.; LLOYD, T., y GREER, R.B. (1988): Early vertebral trabecular bone loss in normal premenopausal women. *J. Bone Mineral Res.* **3**: 583-587.
3. DAWSON-HUGHES, B.; DEEHR, M.S.; BERGER, P.S.; DALLAL, G.E., y SADOWSKI, L.J. (1989): Correction of the effects of source, source strength, and soft-tissue thickness on spine dual-photon absorptiometry measurements. *Calcif. Tissue Int.* **44**: 251-257.
4. DAWSON-HUGHES, B.; DHIPP, C.; SADOWSKI, L., y DALLAL, G. (1987): Bone density of the radius, spine and hip in relation to percent of ideal body weight in postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* **40**: 310-314.
5. DESIMONE, D.P.; STEVENS, J.; EDWARDS, J.; SHARI, J.; GORDON, L., y BELL, N.H. (1989): Influence of body habitus and race on bone mineral density of the midradius, hip, and spine in aging women. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 827-830.
6. GARN, S.M.; RAO, E.M., y RIHL, L. (1964): Compact bone in chienes and japanese. *Science* **143**: 1.439-1.440.
7. GILSANZ, V.; GIBBENS, D.T.; CARLSON, M.; BOECHAT, M.I.; CANN, C.E., y SCHULZ, E.E. (1988): Peak trabecular vertebral density: a comparison of adolescent and adult females. *Calcif. Tissue Int.* **43**: 260-262.
8. GOTFREDSSEN, A.; HADBERG, A.; NILAS, L., y CHRISTIANSEN, C. (1987): Total body bone mineral density. *J. Lab. Clin. Med.* **110**: 362-368.
9. GOTFREDSSEN, A.; PODENPHANT, J.; NILAS, L., y CHRISTIANSEN, C. (1989): Discriminative ability of total body bone-mineral measured by dual photon absorptiometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **49**: 125-134.
10. GRANT, J.F.; CUSTER, P.B., y THURLOW, J. (1981): Current techniques of nutritional assessment. *Sur. Clin. North Am.* **61**: 437-463.
11. HASSAGER, C., y CHRISTIANSEN, C. (1989): Influence of soft tissue body composition on bone mass and metabolism. *Bone* **10**: 415-419.
12. HERODOTOS (1977-1981): Historia. Trad. y notas de Carlos Scharder. Editorial Gredos. Madrid.
13. JOHNSTON, C.C.; MELTON, L.J.; LINDSAY, R., y EDDY, D.M. (1989): Clinical indications for bone mass measurement. *J. Bone Mineral Res.* **4** (supl. 2): 1-28.
14. MAZESS, R.; COLLICK, B.; TREMPPE, J.; BARDEN, H., y HANSON, J. (1989): Performance evaluation of a dual-energy X-ray bone densitometer. *Calc. Tissue Int.* **44**: 228-232.
15. MAZESS, R.B., y WAHNER, H.W. (1988): Nuclear medicine and densitometry en: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. (eds.). Osteoporosis, etiology, diagnosis and management, 251-296. Raven Press. New York.
16. NELSON, D.A.; KLEEREKOPER, M., y PARFITT, A.M. (1988): Bone mass, skin color and body size among black and white women. *Bone Mineral* **4**: 257-264.

- 17 NILSSON, B.E., y WESTLIN, N.E. (1971): Bone density in athletes. *Clin. Orthop.* **77**: 177-182.
- 18 POCOCK, N.; EISMAN, J.; GWINN, T.; SAMBROOK, P.; KELLY, P.; FREUND, y J. YEATES, M. (1989): Muscle strength, physical fitness, and weight but no age predict femoral neck bone mass. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 441-448.
- 19 RASMUSSEN, H. (1986): The calcium messenger system. *N. Engl. J. Med.* **314**: 1.094-1.101.
- 20 RIBOT, C.; TREMOLLIÈRES, F.; POUILLES, J.M.; BONNEU, M.; GERMAIN, F., y LOUVET, J.P. (1987): Obesity and postmenopausal bone loss: the influence of obesity on vertebral density and bone turnover in postmenopausal women. *Bone* **8**: 327-331.
- 21 RICO, H. (1988): El síndrome osteoporótico. Sandoz. Barcelona.
- 22 RICO, H.; YAGÜE, M.; HERNÁNDEZ, E.R., y GONZÁLEZ, M. (1987): El índice psoas/1-3 y la radiogrametría en el diagnóstico de la osteoporosis. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* **2**: 262-266.
- 23 ROSENTHALL, D.I.; MAYO-SMITH, W.; HAYES, C.W.; KHURANA, J.S.; BILLER, B.M.K., y NEER, R.M.; KLIBANSKI, A. (1989): Age and bone mass in premenopausal women. *J. Bone Mineral Res.* **4**: 533-538.
- 24 SARTORIS, D.J., y RESNICK, D. (1989): Dual-energy radiographic absorptiometry for bone densitometry: current status and perspective. *AJR* **152**: 241-245.
- 25 SAVILLE, P. (1973): The syndrome of spinal osteoporosis. *Clin. Endocrinol. Metab.* **2**: 177-186.
- 26 SINAKI, M. (1988): Exercise and physical therapy. En: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. (Eds.). *Osteoporosis, etiology, diagnosis and management*. Raven Press. New York, 457-480.
- 27 SMITH, E.L.; REDDAN, W., y SMITH, P.E. (1981): Physical activity and calcium modalities for bone mineral increase in aged women. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **13**: 60-64.
- 28 SNOW-HARTER, C.; BOUXSEIN, M.; LEWIS, B.; CHARETTE, S.; WEINSTEIN, P., y MARCUS, R. (1990): Muscle strength as a predictor of bone mineral density in young women. *J. Bone Mineral Res.* **5**: 589-595.
- 29 STEVENSON, J.C.; BANKS, L.M.; SPINKS, T.J.; FREMANTLE, C.H.; MACINTYRE, I.; HESP, R.; LANE, G.; ENDACOTT, J.A.; PADWICK, M., y WHITEHEAD, M.I. (1987): Regional and total skeletal measurements in the early postmenopause. *J. Clin. Invest.* **80**: 258-262.
- 30 STEVENSON, J.C.; LEES, B.; DEVENPORT, M.; CUST, M.P., y GANGER, K.F. (1989): Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis? *Br. Med. J.* **298**: 924-928.
- 31 TOMAS, A.E.; MCKAY, D.A., y CUTLIP, M.B. (1976): A nomogram for assessing body weight. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**: 301-304. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **13**: 60-64.
- 32 WAHNER, H.W.; DUNN, W.L., y RIGGS, B.L. (1983): Non invasive bone mineral measurements. *Sem. Nucl. Med.* **13**: 282-289.
- 33 WRONSKI, T.J.; SCHENCK, P.A.; CINTROM, M., y WALSH, C.C. (1987): Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* **40**: 155-159.

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

## **ESTUDIO DE POSIBLES FENÓMENOS DE MIGRACIÓN CELULAR EN EL LÓBULO INTERMEDIO DE LA HIPÓFISIS DE LA RATA TRAS EL MARCAJE CON BROMODESOXIURIDINA**

### **STUDY OF PUTATIVE CELL MIGRATION IN THE INTERMEDIATE LOBE OF THE RAT HYPOPHYSIS AFTER BROMODEOXYURIDINE-LABELLING**

**J.L. HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, S. CARBAJO<sup>1</sup>, J.C. CARVAJAL<sup>1</sup> y E. CARBAJO-PÉREZ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Facultad de Medicina de Salamanca.

<sup>2</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo

#### **RESUMEN**

El presente estudio fue planteado en un intento por constatar la presencia de fenómenos de migración celular entre la capa marginal y el espesor de la porción glandular del lóbulo intermedio (LI) de la hipófisis de la rata durante el periodo postnatal. Para ello, las células en fase S del ciclo celular de tres grupos de ratas, fueron marcadas mediante la inyección intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU) el día 14<sup>º</sup> de vida postnatal, siendo sacrificadas 60 minutos, 7 o 14 días después de la inyección. El análisis inmunocitoquímico de las secciones hipofisarias tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU, puso de manifiesto que 7 y 14 días después de la inyección de BrdU existe una disminución remarcable tanto de la intensidad de tinción como del número de células reactivas, siendo frecuente el hallazgo de dobletes de células marcadas. Aunque existe una disminución global de las células reactivas localizadas en la capa marginal, cuando se compara con los animales de 14 días, no es infrecuente encontrar también en este estrato dobletes reactivos. Se concluye que, tras un pulso de BrdU, no es posible determinar de forma irrefutable la existencia de fenómenos de migración celular en el LI de la rata durante el periodo postnatal. El análisis de la cinética celular del LI sugiere que la aplicación de técnicas de infusión prolongada de BrdU, podrían ser una alternativa para este tipo de estudios.

**PALABRAS CLAVE:** Hipófisis. Lóbulo intermedio. Migración celular. Bromodesoxiuridina. Periodo postnatal. Rata.

#### **SUMMARY**

This study was aimed at checking whether or not cell migration exist from the marginal layer into deeper areas of the rat intermediate lobe during the postnatal period. Three groups of 14 day-old rats were given an intraperitoneal injection of BrdU and killed 60 minutes or 7 and 14 days later. Immunocytochemical analysis of sections treated with monoclonal antibody to BrdU showed that there was a decrease in the numbers of BrdU-labelled cells as well as as decrease of the intensity of immunostaining, both 7 and 14 days after the BrdU injection. Doublets of BrdU-labelled cells in the marginal layer did also decrease but, doublets of BrdU-labelled cells in this layer were not an infrequent finding. It is concluded that flush-labelling with BrdU does not provide unequivocal evidence of cell migration in the IL of the rat during the postnatal period. It is suggested that continuous infusion of BrdU might be a useful alternative for cell migration studies during development.

**KEY WORDS:** Pituitary gland. Intermediate lobe. Cell migration. Bromodeoxyuridine. Postnatal period. Rat.

## Introducción

Se admite, y es ya clásico, que el epitelio de la bolsa de Rathke es el germen y promotor de la porción glandular de la hipófisis (Schwind, 1928; Kerr, 1946). Trabajos recientes, en los que se valora la actividad proliferativa de este epitelio mediante el marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU) de las células en fase S del ciclo celular (Ikeda y cols. 1991), confirman la importancia de la actividad proliferativa de las células que limitan la bolsa de Rathke en el desarrollo del primordio hipofisario, al menos hasta el día 15º de la vida fetal.

En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio (Carbajo-Pérez y cols. 1991) se demostraba que, a lo largo del periodo postnatal, la actividad proliferativa de la capa marginal del lóbulo intermedio (LI) de la hipófisis de la rata, era proporcionalmente mayor que la actividad proliferativa de la porción glandular del mismo. Este hecho sugería con fuerza que la capa marginal podría desempeñar un papel de hoja germinativa del LI durante las primeras semanas de vida postnatal. La existencia de fenómenos de migración celular desde ésta hacia el espesor del LI, corroboraría, sin lugar a dudas, la hipótesis de que la capa marginal puede desempeñar las funciones de hoja germinativa del LI durante el primer mes de vida postnatal.

El marcaje con BrdU puede ser utilizado para valorar fenómenos de migración celular (DeFazio y cols. 1987; McNicol y Duffy, 1989). En el desarrollo del presente trabajo, se ha aplicado esta técnica para intentar determinar la existencia de fenómenos de migración celular desde la capa marginal hacia el espesor de la porción glandular del LI entre la segunda y cuarta semana de vida postnatal.

## Material y métodos

Se han utilizado crías de ratas blancas de la cepa Sprague-Dawley criadas en nuestro animalario bajo condiciones estándar: fotoperiodo de 12 horas de luz (8.00 a 20 horas) y 12 de oscuridad y teniendo las madres libre acceso a agua y dieta equilibrada (rata-ratón-cría, PANLAB). Para determinar la edad de los animales el día del nacimiento se consideró como día uno del periodo postnatal. Todas las crías utilizadas permanecieron con las madres hasta el día del sacrificio.

En el día 14º de vida postnatal, doce ratas recibieron una inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de peso corporal de BrdU (Sigma) disueltos en suero fisiológico. Se procedió al sacrificio de los animales 60 minutos, una semana y dos semanas después de la inyección.

Tras sacrificar a los animales por decapitación, se seccionó la calota craneana, retirando la masa encefálica. La base del cráneo fue sumergida en un pocillo con solución fijadora de Bouin procediéndose entonces a la disección de la hipófisis con la ayuda de una lente binocular. Las hipófisis se mantuvieron en la misma solución fijadora durante toda la noche y tras ser lavadas mediante varios pases en etanol al 70% en agua, fueron deshidratadas e incluidas en parafina.

De las muestras así procesadas se obtuvieron secciones coronales de 3µm de grosor, utilizando cuchillas de vidrio en un microtomo Ultratome Nova» (LKB), que fueron montadas en porta objetos de vidrio.

Para identificar la BrdU incorporada en los núcleos en fase S del ciclo celular en el momento del marcaje, se siguió el procedimiento descrito por Carbajo-Pérez y col (1989). Tras desparafinizar y rehidratar las muestras, éstas fueron lavadas en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) e incubadas durante 60 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU suplementado con DNasa (*Cell Proliferation Kit*, Amersahm, REINO UNIDO). Tras ser lavadas en PBS se procedió a incubar las muestras con inmunoglobulina de conejo anti-IgG de ratón conjugada con el complejo soluble PAP (Amersham). El revelado de la reacción se llevó a cabo con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, SIGMA), disolviendo para ello 12,5 mg de DAB en 50 ml de tampón tris (pH: 7,6), añadiendo 1µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% por ml de solución. Como complemento de la tinción específica, se sometió a las preparaciones a un suave teñido de contraste con hematoxilina de Mayer, tras el cual se procedió a la deshidratación y montaje de las muestras con DPX.

## Resultados

En las muestras obtenidas una hora después de la administración de BrdU se identificaron con facilidad los núcleos marcados, dado que presentaron un intenso depósito de material reactivo. Los núcleos marcados se localizaron tanto en la porción glandular como en la capa marginal del LI. Merece una especial referencia la porción posterior del LI, en la cual una gran proporción de los núcleos reactivos al suero anti-BrdU se localizó en la capa marginal (Fig. 1).

En los grupos de animales sacrificados 7 y 14 días después de la administración de BrdU la reactividad al suero anti-BrdU (Figs. 2, 3 y 4 y Fig. 5, respectivamente) fue muy similar, presentando ambos grupos clara que permitía distinguirlos del de los animales sacrificados en el día catorce. La disminución del número de núcleos marcados, comparado con el de los animales de catorce días; y la presencia de dobletes (reactividad en dos células adyacentes o muy próximas) fue la característica fundamental de estos grupos. Se apreció la presencia de dobletes tanto en la zona glandular (Fig. 3) como en la capa marginal (Fig. 4 y 5). Merece especial mención el hecho de que en los animales de 21 días (siete días después de la inyección de la dosis trazadora de BrdU), se encontraron células marcadas dispuestas a modo de hileras, extendiéndose entre la capa marginal, en contacto con la caverna hipofisaria, y el lóbulo neural (Fig. 6).

## Discusión

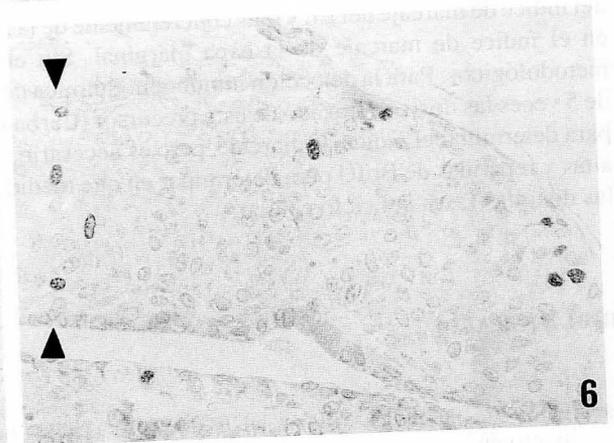
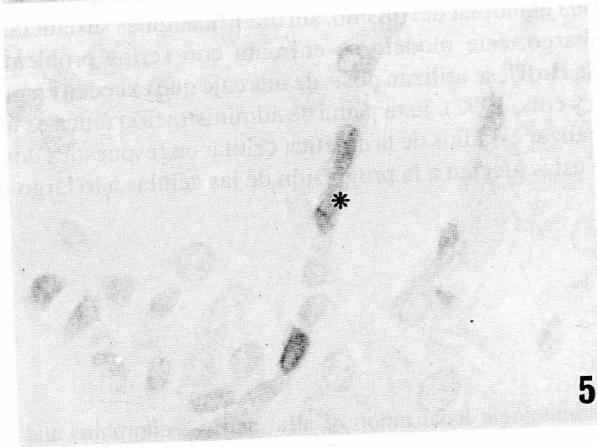
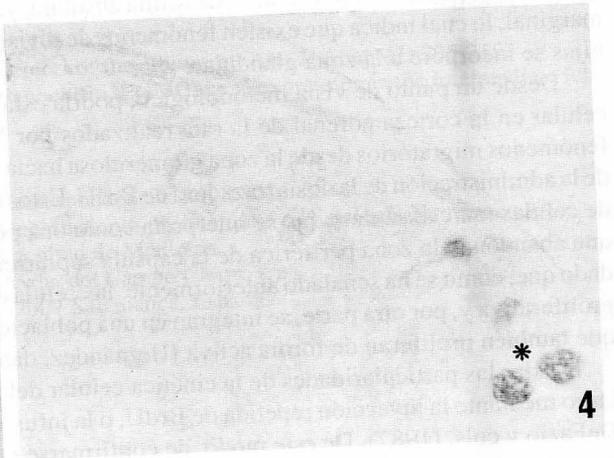
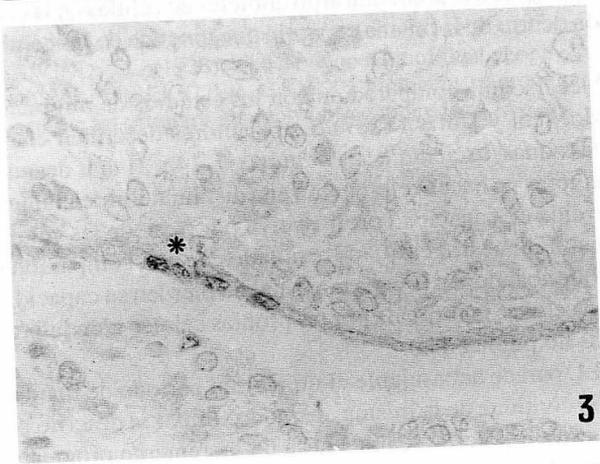
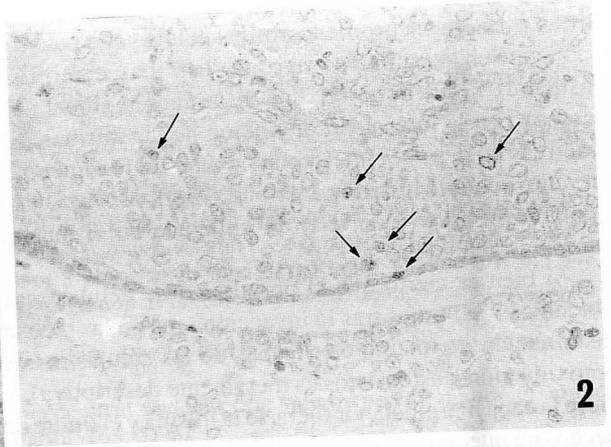
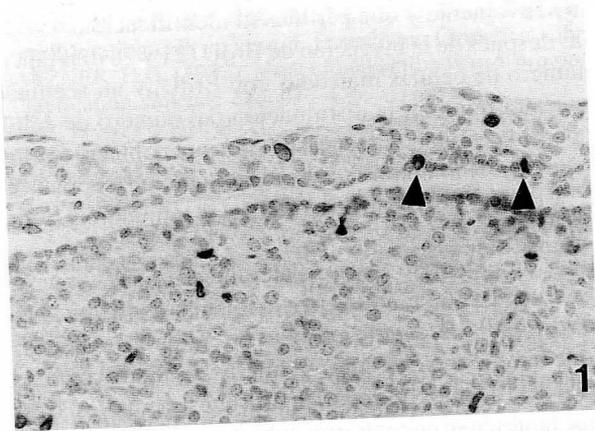
En contraste con la gran profusión de estudios sobre la diferenciación de los distintos tipos celulares hipofisarios (Chatelain y cols. 1979; Schwartzberg y Nakane, 1982; Begeot y cols. 1978; Tong y Pelletier, 1990), los estudios sobre la proliferación celular en la hipófisis a lo largo de su evolución pre- y postnatal son escasos. La gran dificultad que entraña la dosificación de las drogas antimitóticas en estudios en los que se incluyen animales en distintos estadios del desarrollo, ya señalada por Kerr (1946) y confirmada de forma irrefutable por Carbajo-Pérez y Watanabe (1990), es un factor que ha limitado durante décadas el estudio de la actividad proliferativa durante el desarrollo pre- y postnatal.

Con la descripción por Gratzner (1982) de una técnica para la detección de células en fase S del ciclo celular, basada en la utilización de anticuerpos monoclonales anti-BrdU, se ampliaban de forma considerable las posibilidades del investigador para el estudio de la proliferación celular. La técnica de marcaje con BrdU, simple y fiable, reproduce con fidelidad los datos aportados por las técnicas clásicas de autorradiografía para el cálculo de la fracción de crecimiento de un tejido (Langer y cols. 1985), obviando los problemas de éstas.

La evolución postnatal de la actividad proliferativa de la adenohipófisis ha interesado a distintos investigadores (Shirasawa y Yoshimura, 1982; Carbajo-Pérez y cols. 1989; Carbajo-Pérez y Watanabe, 1990), pero existe una gran laguna en la literatura científica en relación con la actividad proliferativa en el LI. Estudios recientes de nuestro grupo (Carbajo-Pérez y cols. 1991), orientados hacia el conocimiento del desarrollo postnatal del LI, han revelado que la actividad proliferativa de este lóbulo hipofisario, sigue un patrón similar al descrito previamente en la *pars distalis* por Carbajo-Pérez y cols. (1989) y Carbajo-Pérez y Watanabe (1990). En resumen, se aprecia un descenso progresivo de la actividad proliferativa desde el momento del nacimiento hasta el final del primer mes de vida postnatal. Una peculiaridad de la actividad proliferativa del LI, en contraste con el patrón de proliferación encontrado en la *pars distalis*, es la gran proporción de núcleos marcados (en ningún caso menor del 25,9%), que se localizan en la capa marginal. Esta característica, no observada en la *pars distalis* (Carbajo-Pérez y cols. 1989; Carbajo-Pérez y Watanabe, 1990), sugería que la capa marginal podría desempeñar, durante el periodo postnatal, el papel de hoja germinativa del LI (Carbajo-Pérez y cols. 1991).

Asumiendo esta hipótesis, es razonable pensar en la existencia de fenómenos migratorios, que desplazarían células originadas en la capa marginal hacia la zona glandular del LI. A fin de comprobar este hecho, se planteó el presente trabajo en el que, tras el marcaje con BrdU de las células en fase S del ciclo celular en el día 14º de vida

- FIGURA 1.** Imagen correspondiente a una sección hipofisaria de una rata de 14 días de edad que recibió una inyección de BrdU una hora antes del sacrificio. Las células en fase S del ciclo celular son claramente observables por el depósito de DAB tras la reacción con suero anti-BrdU. Es de resaltar el que una gran proporción del total de células marcadas se localiza en la capa marginal (cabezas de flecha). 200x.
- FIGURAS 2, 3, y 4.** Imágenes correspondientes a secciones hipofisarias de animales que recibieron una inyección de BrdU en el día 14º del periodo postnatal y fueron sacrificados una semana más tarde (día 21º). Es notoria la tenue reacción al suero anti-BrdU, que dificulta la identificación de las células reactivas (flechas en fig. 2), especialmente cuando se estudian con escasa magnificación. Nótese que la tinción de contraste con hematoxilina es más tenue en estas imágenes dado que de otra manera no hubiera sido posible la identificación de las células reactivas en una reproducción en blanco y negro. La presencia de dobletes (asterisco) fue un hallazgo frecuente tanto en la capa marginal (fig. 3) como en la porción glandular del LI (fig. 4). Fig. 2: 240x, Fig. 3: 360x. Fig. 4: 625x.
- FIGURA 5.** Imagen correspondiente a una sección hipofisaria de un animal que recibió una inyección de BrdU en el día 14º del periodo postnatal y fue sacrificado dos semanas más tarde (día 28º) en la que se observa un doblete de células marcadas (asterisco) en la capa marginal del LI. 625x.
- FIGURA 6.** Imagen correspondiente a un animal de 21 días en la que se observa una hilera de células marcadas (entre cabezas de flecha) que parecen unir la capa marginal y el límite dorsal del LI. 240x.



postnatal, se estudia la localización de las células marcadas 60 minutos, 7 y 14 días después de la exposición a la BrdU, trazador incorporado por las células que proliferan activamente y que permite su identificación.

Tanto en los animales sacrificados 7 días, como 14 días después de la inyección de BrdU (21 y 28 días de vida postnatal), se encontraron, una disminución global del número de células marcadas con BrdU, y un acentuado descenso en la intensidad de tinción de las mismas. En nuestra opinión, la disminución del número de células reactivas no debe ser interpretado como un fenómeno de pérdida celular, característico de una población celular en renovación (Messier y Leblond, 1960; *renewall cell system*), sino como la exageración de un fenómeno de dilución progresiva de la BrdU utilizada en el marcaje, a través del reparto del material inmunoreactivo en sucesivas generaciones.

Si bien es cierto que la proporción de células reactivas en el estrato marginal fue menor en las muestras obtenidas 7 y 14 días tras la inyección, que en las muestras obtenidas 60 minutos tras la misma (dado que la gran disminución de tinción en muchas de las células marcadas impidió la cuantificación certera de las mismas, la aproximación a estos datos es meramente descriptiva), y que también se encontraron hileras de células marcadas entre la capa marginal, por fuera de la misma y el límite dorsal del LI, datos que confirmaría nuestra hipótesis; estos hechos no pueden ser interpretados de forma absoluta, ya que también se encontraron dobletes de células en la capa marginal, lo cual indica que existen fenómenos de división dentro de la misma capa, sin que ninguna de las células hijas se incorpore a la zona glandular.

Desde un punto de vista metodológico, podría establecerse una comparación con los estudios de migración celular en la corteza adrenal de la rata realizados por McNicol y Duffy (1987). Estos autores describen claros fenómenos migratorios desde la zona glomerulosa hacia las zonas *fasciculata* y *reticularis*, 7, 14 y 21 días después de la administración de la dosis trazadora de BrdU. Estos autores no hacen referencia a una disminución del número de células marcadas, dato que se interpreta como una pérdida de capacidad proliferativa por parte de las células que abandonan la zona periférica de la cápsula suprarrenal. En nuestro caso, los resultados no son comparables, dado que, como se ha señalado anteriormente, las células que abandonan la capa marginal no pierden su capacidad proliferativa y, por otra parte, se integran en una población celular, la formada por las propias células glandulares, que también proliferan de forma activa (Hernández, datos no publicados).

Dadas las particularidades de la cinética celular del LI, parece aconsejable el utilizar un periodo de marcaje largo mediante la inyección repetida de BrdU, o la infusión continua de la misma, de modo similar al descrito por DeFazio y cols. (1987). De este modo, de confirmarse nuestra hipótesis, se apreciaría un incremento progresivo del índice de marcaje del LI, y mas concretamente de la zona glandular del mismo, sin modificaciones sustanciales en el índice de marcaje de la capa marginal. Sin embargo, este modelo se enfrenta con serios problemas metodológicos. Para la detección inmunocitoquímica de la BrdU, se utilizan dosis de marcaje que exceden en más de 5 veces las dosis de trazado de este precursor (Carbajo y cols. 1992). Esta pauta de administración única es útil para determinar el índice de marcaje, pero es necesario realizar estudios de la cinética celular en respuesta a dosis altas y repetidas de BrdU para determinar en que medida éstas afectan a la progresión de las células a lo largo de las distintas fases del ciclo celular.

## BIBLIOGRAFÍA

- BEGEOT, M.; DUBOIS, M.P., y DUBOIS, P.M. (1978): Immunologic localization of alfa- and  $\beta$ -endorphins and  $\beta$ -lipotropin in corticotropic cells of the normal and anencephalic fetal pituitaries. *Cell Tissue Res.* **143**: 413-422.
- CARBAJO, S.; GONZÁLEZ DEL POZO, F., y CARBAJO-PÉREZ, E. (1992): Quantitation of cellular proliferation on freshly dispersed cells from rat anterior pituitaries after in vivo and in vitro labelling with bromodeoxyuridine. *Histochem. J.* **24**: (en prensa).
- CARBAJO-PÉREZ, E., y WATANABE, Y.G. (1990): Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Res.* **261**: 333-338.
- CARBAJO-PÉREZ, E.; MOTEGI, M., y WATANABE, Y.G. (1989): Cell proliferation in the anterior pituitary of mice during growth. *Biomed. Res.* **10**: 275-281.
- CARBAJO-PÉREZ, E.; CARBAJO, S.; HERNÁNDEZ, J.L.; VICENTE-VILLARDÓN, J.L., y CARVAJAL, J.C. (1991): Cellular proliferation in the pars intermedia of the rat during growth. *J. Endocr. Invest.* **14** (Supl.): 84.

- CHATELAIN, A.; DUPOUY, J.P., y DUBOIS, M.P. (1979): Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, Prolactin) in fetal hypophysis of the rat: Influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res.* **196**: 409-427.
- DeFAZIO, A.; LEARY, J.A.; HEDLEY, D.W., y TATTERSALL, M.H.N. (1987): Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.* **35**: 571-577.
- GRATZNER, H.G. (1982): Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododesoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**: 474-475.
- IKEDA, H., y YOSHIMOTO, T. (1991): Developmental changes in proliferative activity of cells of the murine Rathke's pouch. *Cell Tissue Res.* **263**: 41-47.
- KERR, T. (1946): The development of the pituitary of the laboratory mouse. *Quart. J. Microsc. Sci.* **87**: 3-29.
- LANGER, E.M.; ROTTGERS, H.R.; SCHLIERMANN, M.G.; MEIER, E.M.; MILTENBURGER, H.G.; SCHUMANN, J., y GOHDE, W. (1985): Cycling S-phase cells in animal and spontaneous tumours. I. Comparison of the BrdUrd and <sup>3</sup>H-thymidine techniques and flow cytometry for the estimation of S-phase frequency. *Acta Radiol. Oncol.* **24**: 545-548.
- MESSIER, B., y LEBLOND, C.P. (1960): Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H<sup>3</sup> into male rats and mice. *Am. J. Anat.* **69**: 89-121.
- McNICOL, A.M., y DUFFY, A.E. (1987): A study of cell migration in the adrenal cortex of the rat using bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet.* **20**: 519-526.
- SHIRASAWA, N., y YOSHIMURA, F. (1982): Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohypophysial cells in different ages of rats. *Anat. Embriol.* **165**: 51-61.
- SCHWARTZBER, D., y NAKANE, P.K. (1982): Ontogenesis of adrenocorticotropin- related peptide determinants in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Endocrinology* **100**: 855-864.
- SCHWIND, J.L. (1928): The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am. J. Anat.* **41**: 295-319.
- TONG, Y., y PELLETIER, G. (1990): Ontogeny of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the intermediate lobe of the rat pituitary gland. *Neuropeptides* **16**: 173-179.

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

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS NEURONAS MARCADAS EN LA SUSTANCIA NEGRA TRAS LA INYECCIÓN DE FLUORO-GOLD EN EL ESTRIADO DE LA RATA**

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE LABELLED NEURONS IN THE SUBSTANTIA NIGRA FOLLOWING INJECTION OF FLUORO GOLD IN THE STRIATUM OF THE RAT**

**J.A. JUANES<sup>1</sup>, M. BENTIVOGLIO<sup>2</sup>, J.M. RIESCO<sup>1</sup>, G. BERTINI<sup>2</sup>, S. CHEN<sup>3</sup>, J. CARRETERO<sup>1</sup>,  
F. SÁNCHEZ<sup>1</sup>, E. BLANCO<sup>1</sup> y R. VÁZQUEZ<sup>1</sup>**

(1) Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. España.

(2) Istituto di Anatomia Umana ed Istologia. Facoltà di Medicina. Università di Verona. Italia.

(3) Department of Anatomy Human Medical. University of Changsha (R.P. China)

**RESUMEN**

Utilizando pruebas paramétricas y no paramétricas, se realiza un análisis estadístico exhaustivo del número de neuronas retrógradamente marcadas en la sustancia negra de ratas adultas, de ambos sexos, tras la administración de Fluoro Gold en el núcleo estriado.

El estudio cuantitativo reveló que la mayor proporción de neuronas FG positivas fue a nivel de la sustancia negra, *pars compacta*, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre animales machos y hembras. Además, se apreciaron algunas células marcadas en áreas adyacentes a la sustancia negra (lemnisco medial, zona incerta, área ventral tegmental).

Desde las regiones rostrales a las caudales de la sustancia negra, se observó un patrón de distribución similar, siendo más abundante el número de células marcadas en la transición rostro-caudal de la *pars compacta* de la sustancia negra.

**PALABRAS CLAVE:** Estriado. Fluoro-Gold. Transporte axonal retrógrado. Sustancia negra. Rata. Análisis estadístico.

**SUMMARY**

By using parametric and non parametric methods, a detailed statistical analysis of the number of retrograde labelled neurons in the substantia nigra of adult rats (both sexes) following the administration of fluoro gold in the striatum, was carried out.

The quantitative study showed that most of the fluoro gold positive neurons were located in the pars compact of the substantia nigra. No gender-related statistical differences were observed. Additionally, in the surroundings of the substantia nigra some labelled cells were detected (ventral tegmental area, zona incerta and medial lemniscus).

From the rostralmost regions to the caudal ones of the substantia nigra, a similar pattern of distribution was observed, with the characteristic that the number of labelled cells in the rostro-caudal transition of the pars compact of the substantia nigra was higher.

**KEY WORDS:** Striatum. Fluoro Gold. Retrograde axonal transport. Substantia nigra. Rat. Statistical analysis.

## Introducción

En estadística, las variables aleatorias siguen una distribución de probabilidad que sirve para obtener conclusiones. Por lo general, se asume que las variables cuantitativas siguen una distribución normal (gausiana), con una media y varianza dadas. Estas dos propiedades, que miden la tendencia central y la dispersión, son los parámetros que caracterizan la variable. Cuando la característica a estudio es de naturaleza binaria (animales machos y hembras), la distribución binomial con parámetros  $p$  (la propiedad de poseer la característica) y  $n$  (número de animales estudiados) permite estudiar la variable.

La mayoría de los problemas estadísticos pueden resolverse mediante métodos que precisan asumir que la variable sigue una distribución normal para que las conclusiones sobre los parámetros estudiados sean válidas. Sin embargo, existen situaciones en las que los datos indican que la presunción de normalidad es errónea; en estos casos se puede estudiar el motivo por el cual los datos no siguen una distribución normal y buscar una transformación matemática que intente corregir la desviación. Si no se encuentra una transformación adecuada deben emplearse métodos estadísticos no paramétricos o de distribución libre. Estas pruebas se basan en el análisis de la posición que ocupan las observaciones, una vez ordenadas.

Las proyecciones eferentes de la sustancia negra (SN) desde el estriado han sido estudiadas en diferentes especies animales, utilizando para ello distintos trazadores (Anden y cols., 1964; Ungerstedt, 1971; Moore y cols., 1971; Carpenter y Peter, 1972; Maler y cols., 1973; Kuypers y cols., 1974; Nauta y cols., 1974; Beckstead y cols., 1979; Van Kooy, 1979; Van Kooy y Wise, 1980), sin embargo, no existen estudios previos que analicen un exhaustivo análisis cuantitativo comparativo entre animales machos y hembras, en las diferentes zonas de la sustancia negra y en estructuras adyacentes a la misma, utilizando como trazador fluoro gold (FG), por lo que nuestro propósito es valorar el número de células FG positivas, en toda la extensión de la sustancia negra de ratas adultas, desde las porciones rostrales a las caudales, tras la administración de este trazador en el estriado, realizando una batería de pruebas estadísticas que nos proporcione nuevos datos en el conocimiento de esta vía extrapiramidal.

## Material y Métodos

Se utilizaron 20 ratas albinas (10 machos y 10 hembras), cepa Wistar, de pesos comprendidos entre los 250 y los 300 g, que fueron anestesiados profundamente, vía intraperitoneal, con pentobarbital sódico (30 mg/kg) y colocados en el aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) para la administración de Fluor Gold (FG, Fluorochrome Inc.), disuelto en agua destilada a una concentración de 2%, en el núcleo estriado, según las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1986), inyectando, mediante microjeringa Hamilton, 0.4  $\mu$ l de FG.

Tras un período de supervivencia de tres días, los animales fueron perfundidos, bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico, vía aorta ascendente, con 4% de paraformaldehído en tampón fosfato.

Extraído el cerebro del animal, se post fijó con 30% de sacarosa en PBS durante 12 horas. El corte del cerebro se llevó a cabo en un microtomo de congelación (Reichert Jung Mod. 1206), practicándose secciones frontales seriadas de 40  $\mu$ m de grosor, en sentido rostro-caudal, que fueron montadas sobre portas con gelatina y secadas al aire, cubriéndolas posteriormente con una gota de DPX.

Con el objeto de diferenciar claramente las zonas de la SN, y superponerlas a las secciones realizadas para fluorescencia, se recogieron dos secciones consecutivas, utilizando una serie para la tinción de Nissl, y la sección consecutiva para su visualización al microscopio fluorescente; de esta forma pudimos localizar con exactitud la distribución topográfica de las células marcadas con FG a nivel de la SN de la rata.

El estudio de las secciones se llevó a cabo en un microscopio Leitz Ploempack con 100 W de fuente de luz, utilizando el filtro A de 340-380 nm de excitación para su visualización.

El intenso llenado por gránulos fluorescentes del soma de las células, hace factible realizar un análisis cuantitativo de las neuronas marcadas por FG; para ello se visualizaron las secciones frontales seriadas que

contenían toda la sustancia negra desde las porciones rostrales a las caudales, con un intervalo de 240  $\mu\text{m}$ , obteniéndose los valores numéricos de las diferentes zonas de la sustancia negra y estructuras adyacentes.

Para el estudio cuantitativo de las células se utilizó un *ploter* X-Y conectado al microscopio, realizando la cuenta de las células mediante punteado automático con ordenador y obteniendo, posteriormente, los mapas de distribución correspondientes a las células marcadas, basados en el diseño gráfico obtenido con el computador.

Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas no paramétricas: prueba de Kolmogorov-Smirnov, para valorar la normalidad en la distribución de las variables utilizadas; la U de Mann-Whitney, para comparar variables cuantitativas (número de células) y cualitativas de dos categorías (animales machos y hembras); la prueba de Friedman, para comparar variables cuantitativas apareadas de más de dos categorías. Además, se utilizó alguna prueba paramétrica: la t de Student, para datos apareados en variables cuantitativas de distribución normal; la correlación de Pearson, para valorar la relación entre variables cuantitativas. Todos los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS/Pc + (*Statistical Package for Social Sciences*) para ordenadores personales compatibles, y el programa comercial CIA para valorar los intervalos de confianza. Todas las variables utilizadas así como los datos numéricos obtenidos se reflejan en la tabla 1.

## Resultados

No existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre animales machos y hembras, en todas las áreas consideradas, aplicando la U de Mann-Whitney, como queda reflejado en la tabla 3 y la gráfica 1, por lo que los resultados los describiremos en conjunto para ambos sexos.

Mediante la tinción de Nissl, la SN apareció como una lámina con forma de semiluna, ocupando toda la extensión del pedúnculo cerebral (Fig. 1), diferenciándose en ella dos zonas: una convexa, ventral, correspondiente a la *pars reticular* (SNr), y otra cóncava, dorsal, que corresponde a la *pars compacta* (SNc).

Tras el estudio de las secciones bajo la luz fluorescente, se observó que las células retrógradamente marcadas con FG se caracterizaron por presentar un soma ocupado por gránulos fuertemente fluorescentes, de color dorado, característico del trazador, con distintas prolongaciones sinuosas, más débilmente marcadas, partiendo del soma celular, correspondientes a las dendritas, así como otra prolongación más larga y gruesa que corresponde al axón de la neurona (Fig. 2).

La distribución topográfica de las neuronas marcadas con FG a nivel de la SN tuvo un predominio en la *pars compacta* en toda su extensión y en sentido rostro-caudal como se refleja en el esquema 1; además, se visualizaron algunas células marcadas con FG, de forma dispersa, en áreas adyacentes a la SN (área ventral tegmental, AVT; zona incerta, ZI y lemnisco medial, LM).

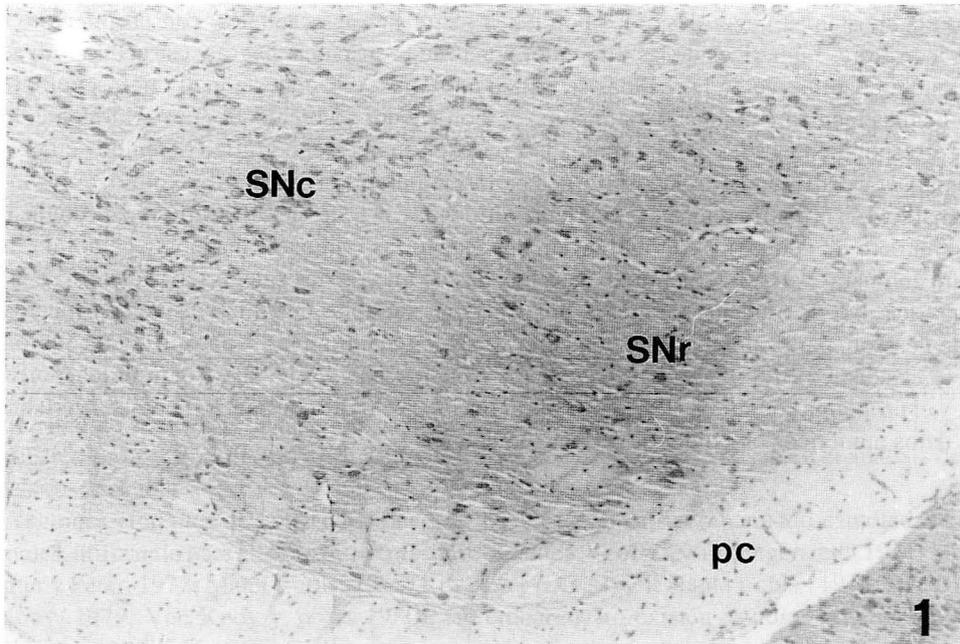
Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov verificamos que la distribución de las células en las regiones rostrales y caudales de la SNc es normal ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2). En otras zonas adyacentes a la SNc, como en el lemnisco medial, en los niveles rostrales, la distribución no siguió la ley normal ( $p = 0,04$ ), por ello, se utilizaron test no paramétricos para estos casos (Tabla 2).

Las medias aritméticas obtenidas para cada una de las áreas consideradas quedan recogidas en la tabla 4 y gráfica 1, destacando la zona de la SNc como el área en donde se localizó el mayor número de neuronas marcadas con FG.

Existieron diferencias estadísticamente significativas entre el número de células de las regiones rostrales respecto a las caudales en la SNc ( $p < 0,001$ ), siendo el número de células caudales mayor que las rostrales en la población entre 7,78 y 9,95 (Intervalo de Confianza, 95%) (Tabla 5 y Gráfica 2).

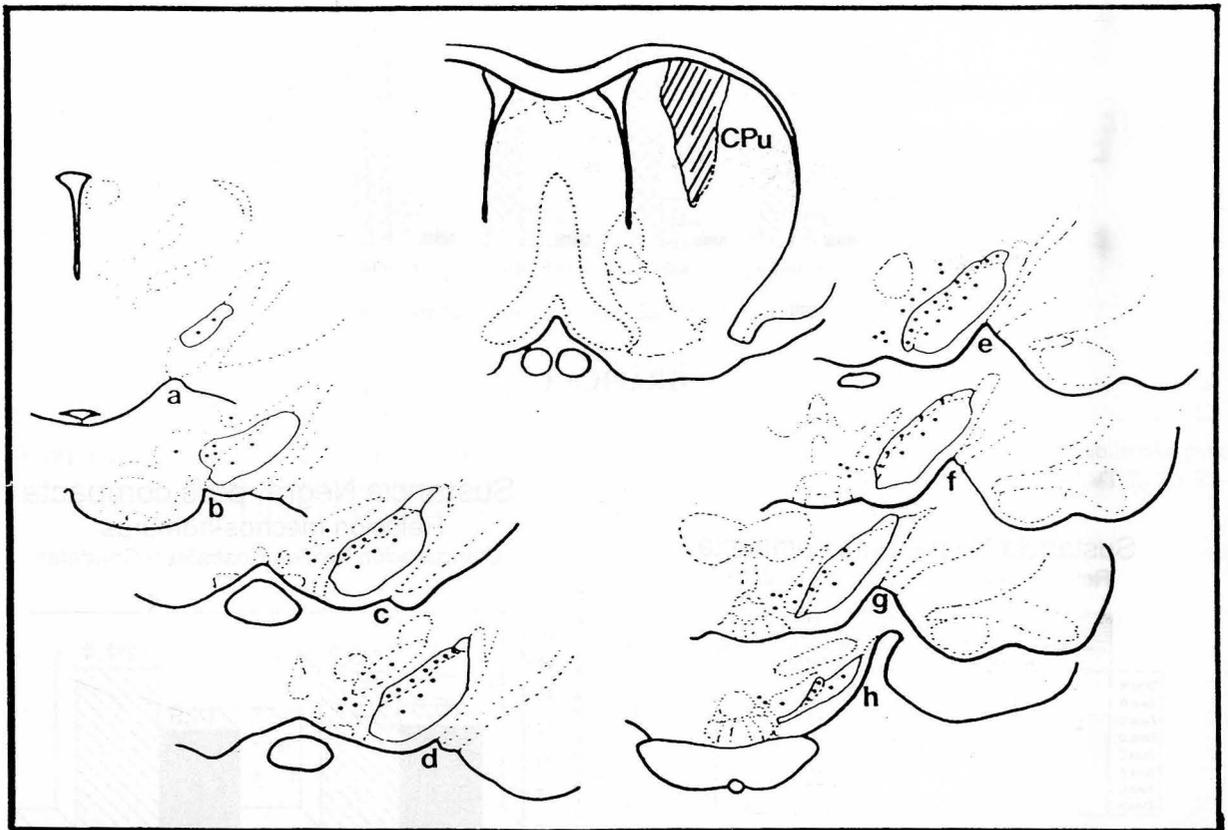
Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la SNc de los niveles rostrales y la SNc de los niveles caudales con el resto de las áreas rostrales consideradas, aplicando la prueba de Friedman (Tabla 6).

No existió correlación (Correlación de Pearson) entre el número de células en los dos niveles (rostrales y caudales), por lo que al parecer el número de células rostrales y caudales en cada animal se comporta de forma independiente; sin embargo, se observó correlación positiva ( $p < 0,01$ ) en la SNc a nivel rostral con la SNr a nivel rostral (0,64), AVT (0,64) y ZI (0,60); por su parte, se apreció igualmente correlación positiva ( $p < 0,01$ ) en la SNc en los niveles caudales con el lemnisco medial de los niveles caudales (0,55).

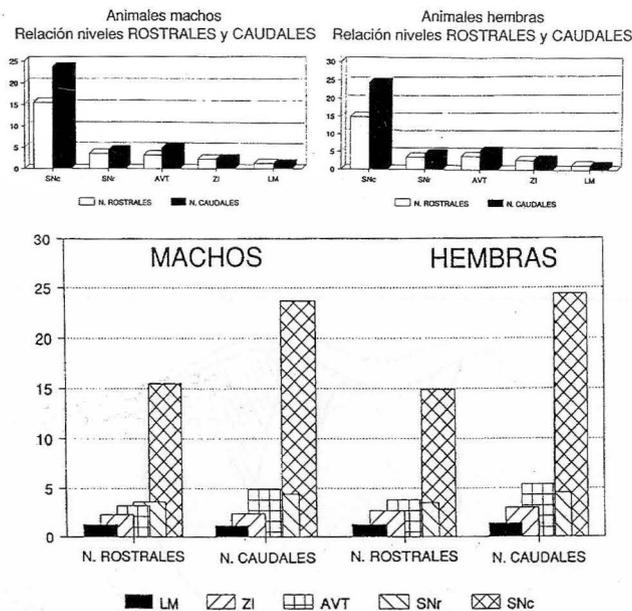


**FIGURA 1:** Panorámica de una sección frontal de la sustancia negra de la rata, mostrándose como una formación en forma de semiluna, en relación con el pedúnculo cerebral (pc). Nótese la existencia de dos zonas claramente diferenciables: *pars compacta* (SNc), con una alta densidad celular, y *pars reticularis* (SNr), con células de distribución más difusa. Tinción de Nissl. Aumentos: 550x

**FIGURA 2:** Célula retrógradamente marcada con FG a nivel de la SNc de la rata, donde se observa el gran llenado de gránulos fluorescentes del soma celular y sus prolongaciones. Aumentos: 550x

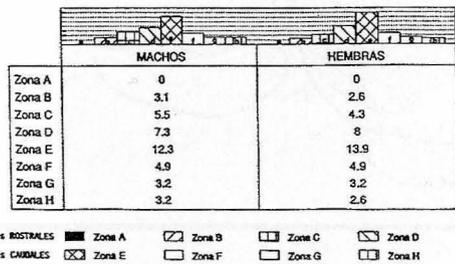
**ESQUEMA 1**

**ESQUEMA 1:** Representación esquemática de la distribución topográfica de las neuronas marcadas en la sustancia negra (a-h), tras la administración de FG en el núcleo caudado-putamen (CPu). Destaca la SNc como la zona en donde se localizó el mayor número de neuronas FG positivas, observándose algunas células aisladas en estructuras adyacentes a la SNc.



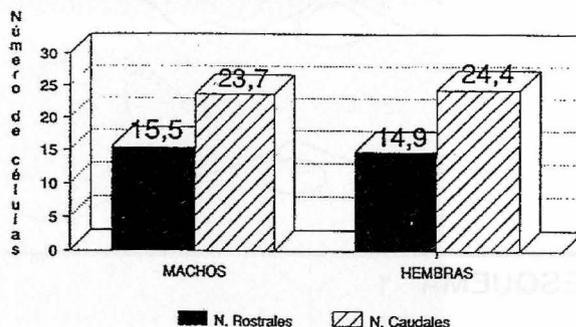
GRÁFICA 1

Sustancia Negra, pars compacta  
Relación Niveles Rostrales y Caudales



GRÁFICA 2

Sustancia Negra, pars compacta  
Relación machos-hembras.  
Comparación Niveles Rostrales y Caudales



GRÁFICA 3

- GRÁFICA 1:** Comparación entre animales machos y hembras del número de células FG positivas encontradas en los niveles rostrales y caudales para cada una de las áreas consideradas. Destaca la SNC como el área en donde fue observado la mayor proporción de células marcadas con FG.
- GRÁFICA 2:** Representación gráfica del número de células FG positivas a nivel de la SNC. Obsérvese el predominio de células marcadas en los niveles caudales de la SNC, no existiendo diferencias significativas entre animales machos y hembras.
- GRÁFICA 3:** Representación del número de células FG positivas a nivel de la SNC, dividiendo la misma en 8 zonas en sentido rostro-caudal. Nótese el elevado número de células en la zona E respecto al resto de las zonas consideradas, no existiendo diferencias significativas entre animales machos y hembras.

VARIABLES UTILIZADAS											
Sexo	Niveles ROSTRALES					Niveles CAUDALES					
V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	
1	12	3	0	0	0	22	5	7	4	2	
1	15	4	3	2	2	25	7	5	2	1	
1	13	2	3	1	0	21	4	2	1	0	
1	17	5	4	3	1	26	3	4	2	1	
1	15	4	4	2	2	23	2	4	1	0	
1	16	3	4	3	2	22	4	5	3	2	
1	18	5	5	4	2	24	4	6	3	1	
1	14	3	2	3	2	25	6	5	4	2	
1	17	4	3	2	0	26	4	5	3	2	
1	18	3	4	3	2	23	5	6	4	1	
2	11	2	1	1	0	25	5	8	3	2	
2	13	3	4	3	2	24	5	7	3	1	
2	14	3	3	2	1	22	4	4	2	1	
2	17	4	4	2	1	26	5	4	3	2	
2	14	4	5	3	2	24	3	5	3	1	
2	15	2	4	3	1	25	5	6	4	2	
2	17	5	6	5	2	22	3	6	2	0	

**TABLA 1:** Variables utilizadas para su posterior análisis con el programa SPSS/Pc + y número de células contabilizadas para cada una de las zonas estudiadas. V1: sexo (1-machos, 2-hembras); V2: SNc-R; V3: SNr-R; V4: AVT-R; V5: ZI-R; V6: LM-R; V7: SNc-C; V8: SNr-C; V9: AVT-C; V10: ZI-C; V11: LM-C.

ÍNDICE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV		
ÁREA	Niveles ROSTRALES	Niveles CAUDALES
SNc	0,700	0,645
SNr	0,227	0,551
AVT	0,186	0,493
ZI	0,262	0,339
LM	0,044*	0,086

**TABLA 2:** La distribución de las células marcadas con FG en las regiones rostrales y caudales, en ambos sexos, sigue la ley normal ( $p > 0,05$ ), excepto en el lemnisco medial, de los niveles rostrales, donde no se observó este patrón de distribución (\*).

U de MANN-WHITNEY		
ÁREA	Niveles ROSTRALES	Niveles CAUDALES
SNc	0,5157	0,4194
SNr	0,9051	0,7240
AVT	0,3176	0,2750
ZI	0,5733	0,6076
LM	0,8048	0,5645

**TABLA 3:** No existieron diferencias estadísticamente significativas entre animales machos y hembras ( $p > 0,05$ ) para todas las zonas analizadas.

MEDIAS ARITMÉTICAS		
ÁREA	Niveles ROSTRALES	Niveles CAUDALES
SNc	15,20 ± 2,07	20,05 ± 1,67
SNr	3,55 ± 0,94	4,45 ± 1,19
AVT	3,50 ± 1,36	5,30 ± 1,38
ZI	2,50 ± 1,10	2,85 ± 0,99
LM	1,30 ± 0,80	1,30 ± 0,73

**TABLA 4:** Representación de las medias aritméticas obtenidas para cada una de las áreas analizadas, considerando ambos sexos.

	SNc-ROSTRAL		SNc-CAUDAL	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Media	15,50	14,90	23,70	24,40
Desviación Estándar	2,06	2,13	1,76	1,57
Error Estándar	0,65	0,67	0,55	0,49

**TABLA 5:** Medias aritméticas obtenidas a nivel de la sustancia negra, *pars compacta*, en los diferentes niveles analizados (rostral y caudal) diferenciándose los valores entre animales machos y hembras.

PRUEBA DE FRIEDMAN						
	SNc-R	SNr-R	AVT-R	ZI-R	LM-R	
SNc-R	1,000	0,641*	0,637*	0,601*	0,374	
SNr-R	0,641*	1,000	0,544*	0,531*	0,396	
AVT-R	0,637*	0,554*	1,000	0,845**	0,580*	
ZI-R	0,601*	0,531*	0,845**	1,000	0,656**	
LM-R	0,274	0,396	0,580	0,656**	1,000	
SNc-C	0,271	0,282	-0,034	0,043	0,027	
SNr-C	-0,124	-0,325	-0,472	-0,261	0,016	
AVT-C	-0,188	-0,092	-0,252	0,034	0,104	
ZI-C	0,144	-0,188	-0,294	0,024	-0,006	
LM-C	0,140	-0,006	-0,476	-0,261	-0,251	
	SNc-C	SNr-C	AVT-C	ZI-C	LM-C	
SNc-R	0,271	-0,124	-0,188	0,144	-0,006	
SNr-R	0,282	-0,325	-0,092	-0,188	-0,251	
AVT-R	-0,034	-0,472	-0,252	-0,294	-0,476	
ZI-R	0,043	-0,261	0,034	0,024	-0,261	
LM-R	0,027	0,016	0,104	-0,006	-0,251	
SNc-C	1,000	0,385	0,244	0,387	0,546*	
SNr-C	0,385	1,000	0,361	0,597*	0,560*	
AVT-C	0,244	0,361	1,000	0,613*	0,426	
ZI-C	0,387	0,597*	0,613*	1,000	0,792**	
LM-C	0,546*	0,560*	0,426	0,792**	1,000	

**TABLA 6:** Correlación entre las diferentes zonas analizadas, indicando la correlación positiva (\* : 0,01) y muy positiva (\*\* : 0,001) entre algunas de las áreas consideradas.

El estudio cuantitativo de las diferentes secciones seriadas, reveló que la mayor proporción de neuronas FG positivas fue observado en el límite rostro-caudal de la SNc (Gráfica 3); siendo la zona D con  $7,65 \pm 1,35$  (DE) y la zona E con  $13,10 \pm 2,25$  (DE), las zonas de mayor número de neuronas marcadas; existiendo correlación ( $p < 0,001$ ) de 0,75 entre la zona D y E.

## Discusión

Son numerosos los estudios que han analizado la morfología de la SN, utilizando para ello diferentes técnicas y especies animales (Bak, 1967; Rinivik y Grafova, 1970; Hanaway y cols., 1970; Parizek y cols., 1971; Gulley y Wood, 1971; Agid y cols., 1973; Sotelo y cols., 1973; Schwyn y Fox, 1974; Butcher y Marchand, 1978; Butcher y Talbot, 1978; Domesick, 1979), sin embargo, ninguno de ellos realizan un análisis cuantitativo de las células FG positivas en toda la extensión de la SN, y sin hacer una distinción entre animales machos y hembras.

Para cualquier proceso estadístico que se realice, es fundamental una buena recogida de los datos para poder alcanzar un objetivo. Por otra parte, siempre debe preverse mecanismos para evaluar y asegurar la calidad de los datos recogidos, ya que sobre ellos se llevará a cabo el análisis.

En nuestro estudio utilizamos un método informatizado que nos permitió la fácil recogida de todos los datos analizados y su posterior codificación, empleando para ello programas comerciales altamente sofisticados.

Dentro de las pruebas no paramétricas o de distribución libre, el índice de Kolmogorov-Smirnov permite comparar, en un sentido global, la distribución de dos muestras independientes. Si sólo interesa la tendencia central, la prueba de la U de Mann-Whitney es la más indicada. Cuando las muestras son dependientes (datos apareados) se debe emplear la prueba de Wilcoxon. Para comparar más de dos medianas puede emplearse la prueba de Kruskal-Wallis o la de Friedman, en función del diseño de estudio. También existen métodos no paramétricos para realizar análisis multivariante, pero su empleo e interpretación son difíciles (Stell y Torrie, 1986; Campbell y Gardner, 1988; Sprent, 1989; Moreno y cols., 1991).

Los métodos no paramétricos podrían emplearse en la mayoría de las situaciones, incluso cuando las variables siguen una distribución normal. Estos métodos tienen una sensibilidad muy buena. Cuando las variables no siguen una distribución normal, las pruebas paramétricas pierden sensibilidad y es preferible emplear los métodos de distribución libre (Moreno y cols., 1991).

La prueba específica para determinar si una variable sigue una distribución normal es la prueba de Kolmogorov-Smirnov, sin embargo, esta prueba es poco sensible a las desviaciones de la normalidad cuando el tamaño de la muestra es pequeño.

En nuestro estudio, debido a que en alguna zona adyacente a la SNc, como el lemnisco medial, la distribución no siguió la ley normal, utilizamos test no paramétricos para estos casos, empleando pruebas paramétricas para el resto de los casos.

Aplicando la U de Mann-Whitney, no observamos diferencias significativas entre los diferentes sexos, en ninguno de los parámetros analizados (morfología, distribución topográfica y análisis cuantitativo de las células). Este dato no ha sido considerado por ninguno de los autores consultados por nosotros.

La observación, en nuestro estudio, de algunas neuronas marcadas con FG, a nivel del área ventral tegmental, podría explicarse porque la proyección de AVT al núcleo acumbens se extiende a lo largo del estriado ventral y de la mitad medial del caudado-putamen, como señalara González y cols., (1990), coincidiendo, de este modo, en parte con la proyección de la SNc.

Aunque FG permite gran variabilidad en los tiempos de supervivencia del animal, sin embargo, este período de tiempo influye de forma notable en el marcaje posterior de las células como ya señalara Schmued y Fallon (1986), y por consiguiente, será importante a tener en consideración a la hora de realizar un análisis cuantitativo de las células marcadas; así, tiempos de supervivencia cortos (1-2 días) muestra un acúmulo de vesículas en el citoplasma y axón; mientras que períodos de 4 días a 4 semanas, existe un acúmulo de vesículas en el soma, extendiéndose a las prolongaciones dendríticas.

En nuestro trabajo, con un tiempo de supervivencia de 3 días, conseguimos visualizar una alta concentración del trazador en el soma, dendritas y axón; tiempo idóneo para realizar la cuenta celular, por lo que para nosotros este período de supervivencia lo consideramos como óptimo para poder valorar toda la célula en su conjunto y realizar con facilidad un estudio cuantitativo de las células FG positivas. No obstante, en este sentido, no hay una concordancia absoluta, entre la mayoría de los autores, en describir cual es el tiempo de supervivencia idóneo, pudiendo indicar que sean otros factores los que influyan en la buena visualización del marcaje celular, sin que todavía se conozcan los mismos.

Si bien son escasos los trabajos que realizan un estudio de la distribución topográfica de las células marcadas con FG a nivel de la SN, tras la administración de este trazador en el núcleo caudado-putamen, sin embargo, sí existen estudios que analicen esta vía mediante la administración de otros trazadores (Kuypers y cols., 1974; Bentivoglio y cols., 1979; Beckstead y cols., 1979; Van Kooy, 1979), coincidiendo la organización de las proyecciones eferentes con los mismos lugares topográficos determinados por nosotros con FG, si bien, la mayor parte de los autores citados no realizan un estudio exhaustivo de las diferentes zonas de la SN, desde los niveles rostrales a los caudales tal y como nosotros hemos diseñado. Por otra parte, ninguno de los estudios previos realizan una valoración cuantitativa de las neuronas marcadas.

Constatamos que el mayor predominio de células FG positivas se localizó a nivel de la SNc en toda su extensión rostro-caudal. Este dato confirma los resultados obtenidos por otros autores, utilizando, para ello, diferentes trazadores.

Aunque se conoce bastante sobre esta vía, en la actualidad muchos estudios se siguen centrando en el análisis morfológico, neurológico y neurofarmacológico de esta vía extrapiramidal; por otra parte, el empleo de pruebas estadísticas incrementa el depósito de datos existentes en el conocimiento de esta vía.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGID, Y.; JAVOY, F.; GLOWINSKI, J.; DOUVENT, D. y SOTELO, C. (1973): Injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra of rat.- II. Diffusion and specificity. *Brain Res.*, **58**: 291-301.
- ANDEN, N.E.; CARLSON, A.; DAHLSTROM, A.; FUXE, K.; HILLARP, N.A. y LARSSON, K. (1964): Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life. Sci.*, **3**: 523-530.
- BAK, I.J. (1967): The ultrastructure of the substantia nigra and caudate nucleus of the cellular localization of catecholamines. *Expl. Brain. Res.* **3**: 40-57.
- BECKSTEAD, R.M.; DOMESICK, V.B. y NAUTA, W.J.H. (1979): Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain. Res.* **175**: 191-217.
- BENTIVOGLIO, M.; VAN DER KOOY, D. y KUYPERS, H.G. (1979): The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.*, **174**: 1-17.
- BUTCHER, L.L. y MARCHAND, R. (1978): Dopamine neurons in pars compacta of the substantia nigra contain acetylcholinesterase: histochemical correlations on the same brain section. *Eur. J. Pharmac.*, **52**: 415-417.
- BUTCHER, L.L. y TALBOT, K. (1978): Acetylcholinesterase in rat nigrostriatal neurons: experimental verification and evidence for cholinergic-dopaminergic interactions in the substantia nigra and caudate-putamen complex. En *Cholinergic-Monoaminergic Interactions in the Brain* (ed. Butcher, L.L.) pp. 25-95. Academic Press. New York.
- CAMPBELL, M. y GARDNER, M.J. (1988): Calculating confidence intervals for some non-parametric analyses. *Br. Med. J.*, **296**: 1454-1456.
- CARPENTER, M.B. y PETER, P. (1972): Nigrostriatal and nigrothalamic fibers in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.*, **144**: 93-116.
- DOMESICK, V.B. (1979): Cytology of dopamine and nondopamine cells of the substantia nigra in the rat: a light and electron microscopic study. *Anat. Rec.*, **193**: 525-526.
- GONZÁLEZ, A.; RÜSSCHEN, F.T. y LOHMAN, A.H. (1990): Afferent connections of the striatum and the nucleus accumbens in the lizard *Gekko gekko*. *Brain. Behav. Evol.*, **36**: 39-58.
- GULLEY, R.L. y WOOD, R.L. (1971): The fine structure of the neurons in the rat substantia nigra. *Tiss. Cell.*, **3**: 675-690.
- HANAWAY, J.; McCONNELL, J.A. y NETSKY, M.G. (1970): Cytoarchitecture of the substantia nigra in the rat. *Am. J. Anat.*, **129**: 417-438.
- KUYPERS, H.G.J.M.; KIEVIT, J. y GROEN-KLEVANT, A.C. (1974): Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in rat's forebrain. *Brain Res.*, **67**: 211-218.
- MALER, L.; FIBIGER, H. y McGEER, P.L. (1973): Demonstration of the nigrostriatal projection by silver staining after nigral injections of 6-hydroxydopamine. *Exp. Neurol.*, **40**: 505-515.

- MOORE, R.Y.; BHATNAGAR, R.K. y HELLER, A. (1971): Anatomical and chemical studies of a nigro neostriatal projection in the cat. *Brain Res.*, **30**: 119-135.
- MORENO, V.; VALLESCAR, R. y MARTIN, M. (1991): Las pruebas no paramétricas en el análisis estadístico de datos. *Atención primaria*. 8/1: 58-60.
- NAUTA, W.J.H., PRITZ, M.B. y LASEK, R.J. (1974): Afferents to the rat caudoputamen studied with horseradish peroxidase. An evaluation of a retrograde neuroanatomical research method. *Brain Res.*, **67**: 219-238.
- PARIZEK, J.; HASSLER, R. y BAK, I.J. (1971): Light- and electron microscopic autoradiography of substantia nigra of rat after intraventricular administration of tritium labelled norepinephrine, dopamine, serotonin and the precursors. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **115**: 137-148.
- PAXINOS, G. y WATSON, Ch. (1986): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Second Edition. Academic Press. Australia.
- RINVIK, E. y GROFOVA, I. (1970): Observations on the fine structure of the substantia nigra of the cat. *Expl. Brain Res.*, **11**: 229-248.
- SCHMUED, L.C. y FALLON, J.H. (1986): Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.*, **377**: 147-154.
- SCHWYN, R.C. y FOX, C.A. (1974): The primate substantia nigra: a Golgi and electron- microscopic study. *J. Hirnforsch.*, **15**: 95-126.
- SOTELO, C.; JAVOY, F.; AGID, Y. y GLOWINSKI, J. (1973): Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. - I. Morphological study. *Brain Res.*, **58**: 269-290.
- SPRENT, P. (1989): *Applied nonparametric statistical methods*. Londres, Chapman and Hall.
- STEEL, R.G.D. y TORRIE, J.H. (1986): *Estadística no paramétrica*. En: *Bioestadística. principios y procedimientos*. México, McGraw-Hill. pp: 520-539.
- UNGERSTEDT, U. (1971): Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiol. Scand.*, **82**: supl. 367,1-48.
- VAN der KOOY, D. (1979): The organization of the thalamic, nigral and raphe cells projecting to the medial vs lateral caudate-putamen in rat. A fluorescent retrograde double labeling study. *Brain Res.*, **169**: 381-387.
- VAN der KOOY, D. y WISE, R.A. (1980): Retrograde fluorescent tracing of substantia nigra combined with catecholamine histofluorescence. *Brain Res.*, **183**: 447-452.

Correspondencia: Dr. J.A. Juanes Méndez  
Departamento de Anatomía e Histología Humanas  
Facultad de Medicina.  
Avda. Campo Charro s/n  
37007 SALAMANCA (Spain).

## **ANATOMÍA DE LOS NERVIOS DENTARIOS SUPERIORES CON ESPECIAL REFERENCIA AL NERVIIO DENTARIO MEDIO**

### **UPPER DENTAL NERVES ANATOMY WITH AN SPECIAL ACCOUNT OF THE MEDIAL DENTAL NERVE**

**A. MARTÍNEZ-ALMAGRO, C. BALLESTER VALLÉS, I. BARJAU GUIÑÓN y C. PÉREZ IGLESIAS**

Unidad de Anatomía Clínica.

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

#### **RESUMEN**

Hemos estudiado diez preparaciones maxilares humanas con la finalidad de reconocer los canales labrados en el hueso maxilar por los nervios dentarios superiores. Tras la sección de las piezas mediante corte coronal practicado entre 2º y 3º molares, se han identificado los diferentes trayectos de cada uno de los nervios en el interior del antro maxilar.

Al observar la cavidad sinusal maxilar, hemos puesto de manifiesto crestas y tabiques óseos así como suelos dehiscentes con raíces dentarias asomando libremente al interior del seno. En cuanto a los surcos nerviosos, hemos podido reconocer con absoluta claridad los de los nervios dentarios anteriores, medios y posteriores; y en contra de la opinión general recogida en la literatura, los nervios dentarios medios han sido constantes en todas nuestras preparaciones, y en alguna de ellas, incluso dobles.

**PALABRAS CLAVE:** Nervios dentarios superiores. Antro maxilar. Trigémino. Inervación dentaria

#### **SUMMARY**

We evaluated 10 human maxillary preparations to study the canals carved in the maxillary bone by the upper dental nerves. We identified the various routes of each one of the nerves inside the maxillary cavity following the dissection of the pieces through a coronal cut between the second and the third molars.

When observing the maxillary sinusal cavity, osseous crests and walls as well as dehiscent surfaces with dental roots freely showing into the sinus were revealed. As to the nerve tracks, we could easily identify those of the anterior, medial and posterior dental nerves. We do not share the general opinion of the authors, those of the bibliography, as the medial dental nerves have remained unchanged in the whole preparations and, in some of them, even double.

**KEY WORDS:** Upper dental nerves. Maxillary antrum. Trigeminal nerve. Dental innervation.

#### **Introducción**

La sensibilidad de los dientes de la arcada superior, de sus alveolos y encías, de la mucosa del antro maxilar y del propio hueso maxilar, es recogida por filetes nerviosos que configuran los nervios dentarios superiores.

Sin embargo, la revisión bibliográfica efectuada sobre todos aquellos temas relacionados con dichos nervios, muestra la discordancia que existe en cuanto al origen, curso y distribución de los mismos, y en particular sobre la existencia o no del nervio dentario medio.

Por ello el interés de nuestro estudio y la importancia que tiene un exacto conocimiento topográfico del plexo dentario, para poder realizar una idónea anestesia de la arcada superior o para justificar cierto tipo de situaciones en patologías bucales, faciales o nasosantrales.

Centrándonos fundamentalmente en los filetes nerviosos que se originan en los dientes, describiremos los nervios dentarios superiores: anterior, medio y posterior.

El *nervio dentario superior anterior* recoge la sensibilidad de incisivos y caninos por medio de pequeños fascículos nerviosos que forman parte del plexo dentario superior. Estos ramos se reúnen en una rama ascendente que sigue un conducto especial excavado en el espesor del hueso maxilar y por delante del antro. A esta rama ascendente se le une otra que recoge la sensibilidad de la mucosa de la zona anteroinferior de la pared externa de las fosas nasales. El nervio dentario superior termina en el tercio anterior del tronco infraorbitario en el 60% de los casos, en el tercio medio en casi el 30% y en el tercio posterior el resto (2).

El *nervio dentario superior medio*, conocido también como rama dentaria superior menor de Beck y como nervio alveolar superior anterior menor, es muy inconstante y por lo tanto no se incluye habitualmente en las descripciones sistemáticas y topográficas del plexo dentario (10). Si está presente recogería la sensibilidad de los premolares (8).

Los *nervios dentarios superiores posteriores*, recogen la sensibilidad de los molares, periostio alveolar, la encía correspondiente y mucosa del antro maxilar. Los filetes nerviosos que los constituyen, en número de dos o tres, recorren el espesor de la tuberosidad maxilar y abandonan el hueso por los conductos y agujeros dentarios posteriores, incorporándose al tronco nervioso maxilar. En el interior del hueso, los ramos nerviosos anteriores, medios y posteriores, se anastomosan formando un verdadero plexo (8 y 9).

## Material y métodos

Nuestro estudio se ha realizado sobre 5 especímenes adultos de los utilizados habitualmente para la docencia de la anatomía humana en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia.

Hemos practicado un corte coronal que pasa por detrás de las apófisis pterigoides con la finalidad de trabajar con mayor precisión y comodidad el complejo facial. Después hemos seccionado, siguiendo también un plano vertical, a nivel de la fosa alveolar que separa el segundo y tercer molar.

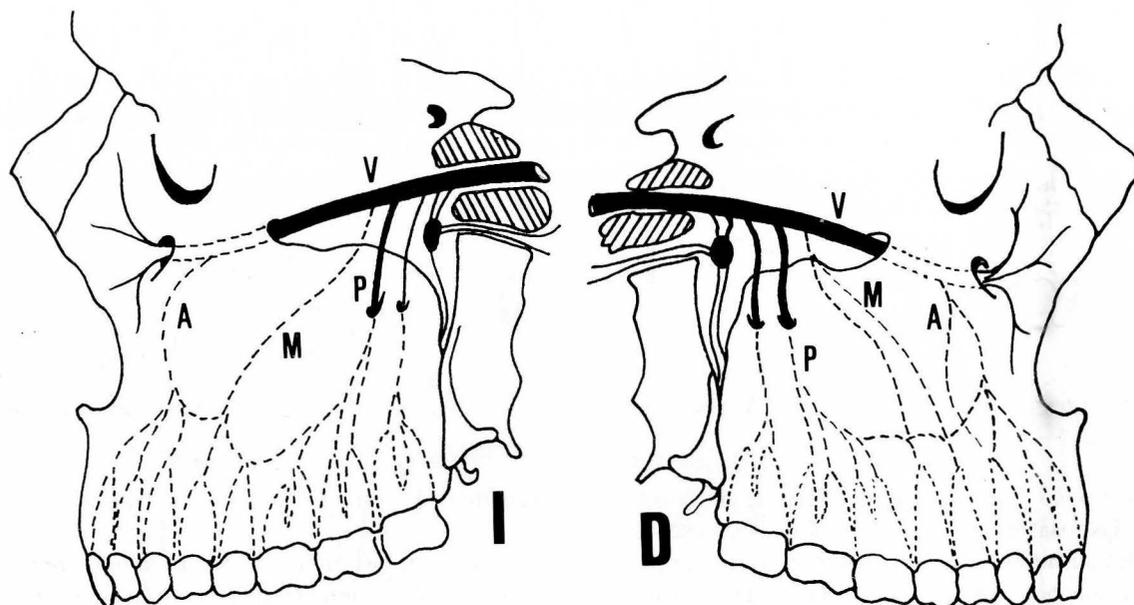
De esta forma, el antro maxilar ha quedado separado en dos porciones: anterior y posterior, que permiten el estudio minucioso, tanto de la configuración sinusal, como de los surcos y trayectos vasculares y nerviosos que han sido reflejados adecuadamente en esquemas.

El número total de piezas que hemos descrito ha sido de diez, habiéndose estudiado cada espécimen en el lado derecho e izquierdo.

## Resultados

*Caso nº1.* Fig.1: En el seno izquierdo, se aprecian dos surcos discretamente oblicuos y paralelos entre sí, distantes 15 mm, que arrancan del vértice anterior y discurren por la pared externa de la cavidad. El superior comunica ampliamente con el canal suborbitario que es dehisciente al interior del seno. El inferior termina en la región preorbitaria del nervio maxilar superior.

La morfología de este seno corresponde a una pirámide cuadrangular bastante regular que muestra un suelo situado por debajo del nivel de las fosas nasales y con una pequeña cresta ósea. Presenta una prolongación orbitaria con multitud de agujerillos y una especie de cámara neumática en contacto con la lámina ósea externa del maxilar. En la pared interna de esta cavidad antral hemos reconocido un total de 16 surcos vasculares.



**Fig. 1.** Caso nº1 I) Izquierdo; D) Derecho; A) Nervio dentario anterior; M) Nervio dentario medio; P) Nervio dentario posterior; V) Nervio maxilar.

En el lado derecho, se aprecian cuatro surcos en la pared anterior del antro. Los dos anteriores se unen antes de finalizar en el tercio anterior del canal suborbitario, mientras que los dos posteriores cruzan de delante hacia atrás, siguiendo un trayecto bastante paralelo hasta terminar mediante un solo canal en la región preorbitaria del nervio maxilar superior.

La cavidad sinusal descrita, presenta una considerable prolongación cigomática con multitud de foramina vasculares, tiene una morfología piramidal cuadrangular y su suelo está por debajo del nivel de las fosas nasales.

*Caso nº 2.* Fig.2: Los dos senos son bastante simétricos, con un nivel medio de suelo (al mismo nivel que el de las fosas nasales) y de morfología piramidal cuadrangular regular.

En la pieza izquierda, encontramos cuatro surcos: los dos anteriores ascienden siguiendo un trayecto muy rectilíneo y se unen antes de llegar al tercio anterior del conducto suborbitario; de los dos posteriores, uno asciende desde la zona del primer premolar y el otro desde la zona del segundo premolar, fundiéndose en un tronco único hacia la mitad de su recorrido, para terminar en el tercio posterior del conducto suborbitario.

Como dato anatómico de interés, señalar que este seno presenta un tabique total que independiza dos cavidades antrales de distinto tamaño, así como la presencia de cuatro crestas óseas a nivel del suelo de 3-4 mm de altura.

En la pared externa del seno derecho, aparecen tres surcos de situación oblicua y bastante paralelos entre ellos. El anterior comunica con el tercio anterior del conducto suborbitario, mientras que los dos posteriores tienen su origen y trayecto, uno en el primer premolar que termina en el tercio posterior del conducto infraorbitario, otro en el segundo premolar que finaliza en el tronco del nervio maxilar superior una vez que ya ha salido del conducto.

Este seno presenta un amplio receso orbitario con multitud de agujerillos en su fondo, un septo parcial en la pared superior y cinco crestas óseas en el suelo que dan lugar a seis nichos o celdillas. Entre el tercero y cuarto de estos nichos, se aprecian las raíces del primer molar improntando directa y libremente en el interior de la cavidad.

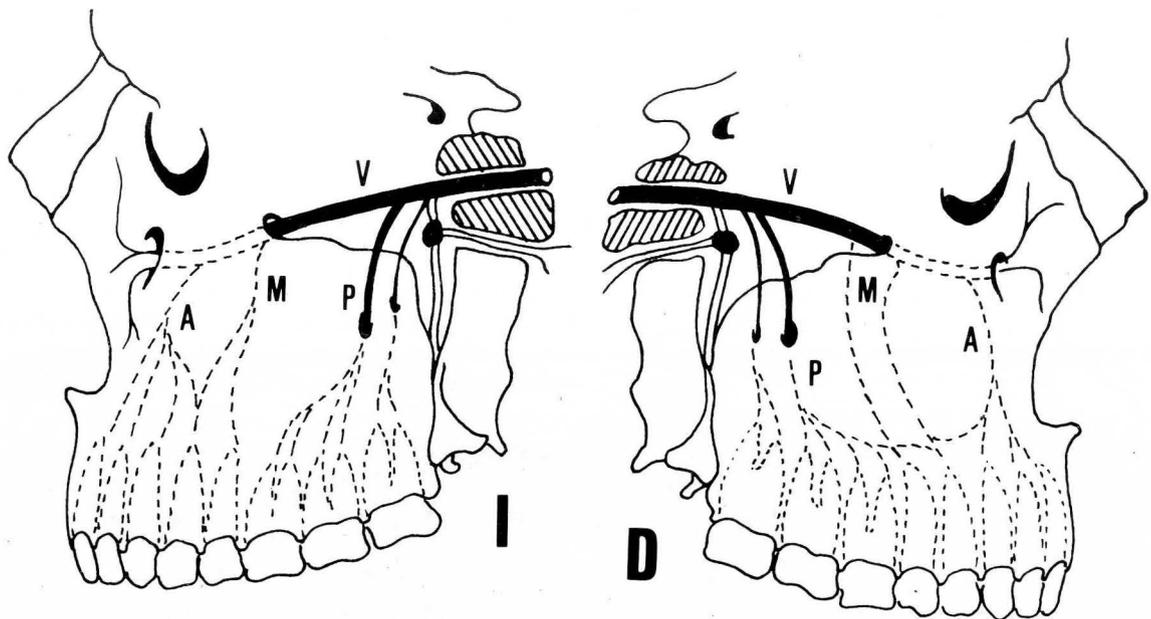


Fig. 2. Caso n°2 I) Izquierdo; D) Derecho; A) Nervio dentario anterior; M) Nervio dentario medio; P) Nervio dentario posterior; V) Nervio maxilar.

Caso n°3. Fig. 3: El antro del lado izquierdo es piramidal cuadrangular irregular, su suelo es bajo con relación al de las fosas nasales y muestra una cresta ósea de 5 mm.

En su interior observamos tres surcos, de posición horizontal, que se originan del vértice más anterior y discurren por la pared externa de la cavidad. El superior es el más anterior y comienza a nivel de incisivos y canino para bifurcarse en dos; uno finaliza en el tercio medio del conducto infraorbitario y el otro se une al surco que se encuentra por debajo y por detrás de él para acabar en el tercio posterior del citado conducto suborbitario, dehiscente hacia el interior de la cavidad. El surco mas inferior ya ha sido descrito parcialmente, sólo indicar que se origina en la zona de los premolares primero y segundo.

La morfología de la cavidad sinusal derecha es oval y su suelo esta situado a nivel medio, presentando una pequeña cresta ósea que mide 2 mm en su punto mas alto.

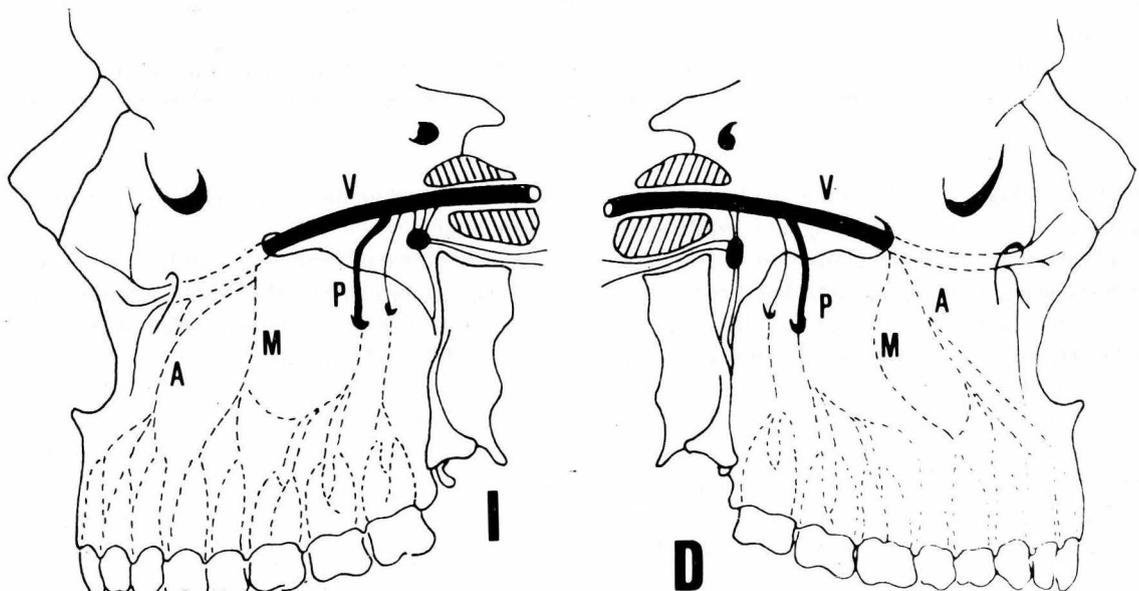
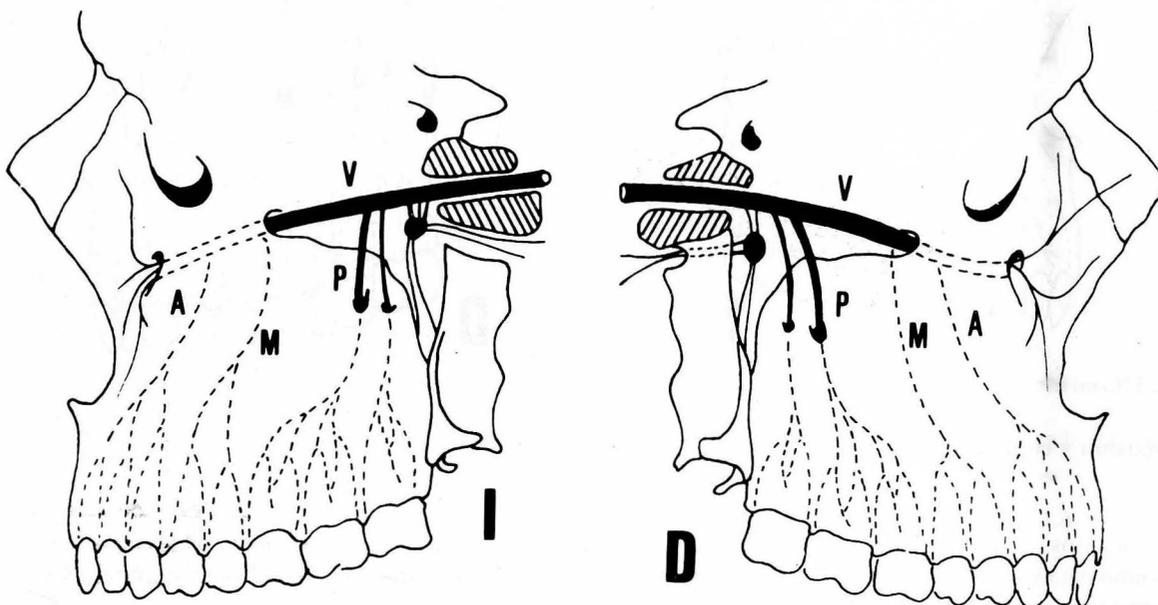


Fig. 3. Caso n°3 I) Izquierdo; D) Derecho; A) Nervio dentario anterior; M) Nervio dentario medio; P) Nervio dentario posterior; V) Nervio maxilar.

Al igual que en el lado izquierdo, aparecen tres surcos que se originan de la porción mas anterior y van discurriendo por la pared externa de la cavidad. Los dos superiores tienen su inicio en incisivos y caninos, distan unos 3mm y se unen antes de abocar en el tercio posterior del conducto infraorbitario. El surco inferior, cruza oblicuamente de delante hacia atrás para terminar en la porción mas posterior del conducto infraorbitario, que es dehiscente en el interior de la cavidad.

*Caso n°4.* Fig.4: El seno izquierdo presenta dos surcos que corren bastante paralelos en la pared antral externa: el superior o anterior se origina en los incisivos y canino, asciende ligeramente oblicuo y termina en el tercio anterior del conducto infraorbitario. El inferior arranca de ambos premolares y finaliza en el tercio posterior del conducto. Esta cavidad antral tiene una morfología piramidal cuadrangular regular, muestra una prolongación cigomática considerable con una pequeña cresta ósea, su suelo es bajo y presenta dos pequeñas crestas que se elevan 1 mm por encima del mismo.



**Fig. 4.** *Caso n° 4* I) Izquierdo; D) Derecho; A) Nervio dentario anterior; M) Nervio dentario medio; P) Nervio dentario posterior; V) Nervio maxilar.

En cuanto al lado derecho, el suelo antral es alto, su morfología es simétrica a la del lado izquierdo, incluso hay un receso cigomático de gran tamaño con abundantes foramina vasculares.

La pared externa de la cavidad derecha muestra dos canales especialmente marcados. El más superior se origina en los incisivos y canino, comunicando ampliamente con el conducto infraorbitario en su tercio medio. El inferior arranca de la zona del primer premolar fundamentalmente y finaliza en la región preorbitaria del tronco maxilar.

*Caso n° 5.* Fig.5: Ambos senos presentan su suelo por debajo del nivel de las fosas nasales y son bastante simétricos, con una morfología piramidal cuadrangular regular.

El izquierdo muestra dos surcos bien configurados que tienen el siguiente trayecto: el superior, se origina de la zona de canino e incisivos para comunicar ampliamente con el tercio medio del conducto infraorbitario; el inferior por su parte, arranca de la zona de los premolares y busca el conducto suborbitario justo en su tramo más posterior. En la cavidad izquierda observamos un receso cigomático y otro orbitario con abundantes foramina vasculares en ambos.

Por último, la preparación del lado derecho muestra tres canales: los dos superiores corresponden a filetes nerviosos que se originan en incisivos y canino y que se unen antes de abordar el tercio medio del conducto infraorbitario. El inferior, se extiende desde los premolares hasta el punto más posterior de dicho conducto. En el suelo sinusal se observa una amplia dehiscencia que deja ver con claridad las raíces del primer molar.

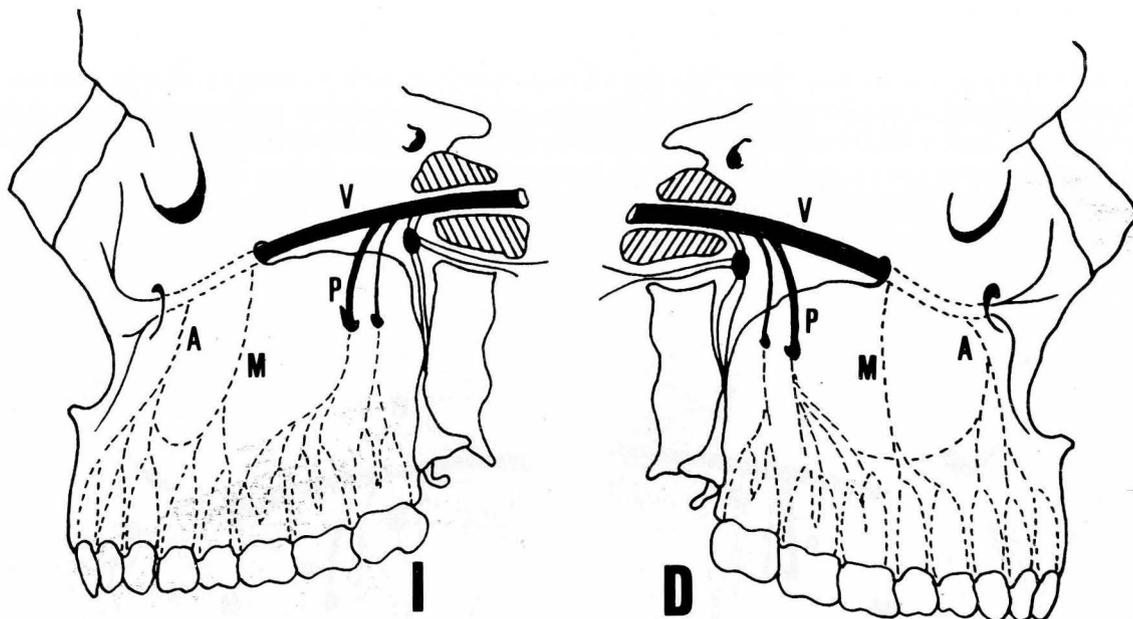


Fig. 5. Caso nº 5

### Discusión y conclusiones

En todos nuestros casos hemos descrito surcos neurovasculares que tienen su origen, en la zona de incisivos y canino para los más superiores o anteriores, y en la zona de los premolares para los canales inferiores. Nosotros interpretamos estos últimos como los lechos de los nervios dentarios medios.

No se han mencionado en ninguno de los casos los surcos dentarios posteriores, y la razón viene dada porque cuando hemos cortado las preparaciones, el bloque situado por detrás del plano de sección portaba la tuberosidad maxilar con los correspondientes conductos y orificios dentarios posteriores. De todas formas, siempre ha sido constante el hallazgo de uno o varios surcos anastomóticos entre los canales de más entidad sea cual fuere su situación antral.

La variabilidad del nervio dentario medio en cuanto a su número y trayectorias, ha sido motivo de serias revisiones y estudios que han pretendido una tipificación.

Fitzgerald, después de examinar el nervio alveolar medio y su canal en disecciones y maxilares secos, describe cinco posibles modelos: 1) Que termina en la región preorbitaria del nervio maxilar superior en un 11% de casos; 2) Que finaliza en el tercio posterior del tronco infraorbitario en un 14% de sus casos; 3) Al tercio medio va un 15%; 4) En el tercio anterior aboca un 25%; y 5) Las fibras del nervio dentario medio están unidas al nervio dentario anterior en un 17% de casos. En resumen, un 54% de los nervios medios de su muestra se incorporaban al tronco infraorbitario, en un 28% de casos había variaciones y en el 18% restante no lo identificó (1).

Un trabajo desarrollado sobre 50 piezas maxilares ha puesto de manifiesto: 15 casos (30%) según la descripción clásica, 17 casos (34%) en los que no se independizó con claridad el canal dentario medio y en 18 ocasiones (36%) no lo había (5).

Un estudio posterior refleja un 53,6% de ocasiones en las que el nervio dentario medio se incorpora al tercio posterior del conducto infraorbitario. En un 35,7% de casos, el canal dentario medio es doble y presenta gran variabilidad morfológica y de trayectoria, mientras que no se encontró en el 10,7% restante (3).

Trabajos más recientes llevados a cabo sobre huesos maxilares ponen de manifiesto que el nervio dentario medio es constante. Desemboca en el segmento preorbitario del tronco maxilar superior en un 36% de casos, y busca el conducto infraorbitario en el 64% restante (6). El canal para dicho nervio ha sido único en la mayoría de las ocasiones, algunas veces aparecía en forma de «Y» y otras doble.

Nuestros resultados muestran al nervio dentario medio como una estructura constante, único o doble, llegando al tronco maxilar en su tramo preorbitario o a lo largo del conducto infraorbitario y siempre originándose en la zona de los premolares por medio de dos o más filetes nerviosos.

Hemos de concluir señalando que nuestra casuística no nos permite tipificar modelos, que hemos de validar nuestros resultados con estudios sobre mayor número de preparaciones y que nuestro trabajo ha pretendido demostrar la existencia de un nervio prácticamente inaccesible a la anestesia (7).

La superficialidad de los canales neurovasculares, así como las dehiscencias óseas que hemos encontrado y que nos muestran las raíces de algunos molares improntando en plena cavidad antral, sugiere una estrecha relación entre patologías de origen sinusal y dentario, así como una afectación nerviosa de la segunda rama del trigémino.

## BIBLIOGRAFÍA

1. FITZGERALD, M.J.T. (1956): The occurrence of a middle superior alveolar nerve in man. *J. Anat.* **90**: 520-522.
2. FITZGERALD, M.J.T. y SCOTT, J.H. (1958): Observations on the anatomy of the superior dental nerves. *Br. Dent J.* **104**: 205-208.
3. GABALLAH, M.F. (1973): On the course of the posterior and the middle superior alveolar canals. *Acta Anat.* **86**: 151-156.
4. KEUSTERS, D. (1986): The nervus trigeminus. *Acta Otorhinol. Belgica*, **40**: 121-141.
5. LESTER, M.C.; DANIEL, y W.M. (1956): Variations in nerve distributions of the maxillary teeth. *J. Dent. Res.* **35**: 916-921.
6. PACINI, A., y GREMIGER, D. (1975): Alcune modalità nella distribuzione del nervo mascellare. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* **80**: 29-35.
7. DUBRUL, E. (1990): Anatomía oral. 8ª edición. Ediciones Doyma. Barcelona.
8. TESTUT, L.; LATARJET, L. (1976): Tratado de Anatomía Humana. 9ª edición. vol. III. Salvat Editores, S.A. Barcelona.
9. WILLIAMS, P.L., y WARWICK, R. (1986): Anatomía de Gray. 1ª edición. vol. II. Salvat Editores, S.A. Barcelona.
10. WOOD, J.F. (1939): The anterior superior alveolar nerves and vessels. *J. Anat.*, **73**: 583-591.

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

## **INJERTOS DE ESBOZO ÓTICO DE CODORNIZ EN LA REGIÓN CEFÁLICA DE EMBRIONES DE POLLO: DESARROLLO E INTERACCIONES CON EL SISTEMA NERVIOSO DEL HUÉSPED**

## **QUAIL OTIC ANLAGE GRAFTS PLACED IN THE CEPHALIC AREA OF CHICK EMBRYOS: DEVELOPMENT AND INTERACTIONS WITH HOST NERVOUS SYSTEM**

**C. MARTÍNEZ ÁLVAREZ, A.L. PEÑA MELIÁN, Y. NIETO JIMÉNEZ, F. VIEJO TIRADO, C. MERCADAL TALLADA y A.J. PUERTA FONOLLA**

Departamento de Ciencias Morfológicas. Cátedra I de Anatomía.  
Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

### **RESUMEN**

A través de la realización de injertos de placoda ótica de codorniz de 19 somitos situada rostralmente al esbozo ótico de embriones de pollo de estadio similar, se estudia el comportamiento del complejo ótico supernumerario implantado. Los resultados demuestran que, en el estadio considerado, el oído interno y ganglio acústico vestibular desarrollados son comparables morfológica y cronológicamente con los de embriones control de igual estadio. Se analiza la formación de proyecciones nerviosas a partir del injerto.

**PALABRAS CLAVE:** Injerto. Oído interno. Desarrollo. Ganglio acústico vestibular.

### **SUMMARY**

After grafting 19 somites quail otic placode slightly anterior to the otic anlage of a similar stage chick embryo, we have studied the behaviour of the implanted supernumerary otic complex. In the stage considered for this study results show that both developed inner ear and acoustic ganglion are morphologically and chronologically comparable to those of similar stage control embryos. The establishment of graft nervous projections are analysed.

**KEY WORDS:** Graft. Inner ear. Development. Acoustic ganglion.

### **Introducción**

La realización de trasplantes de tejidos neurales, tras una larga historia (revisión en Dunnet *et al.*, 1990), ha cobrado renovado interés recientemente ante la posibilidad de utilizarlos con fines terapéuticos. Así hoy se pueden restablecer experimentalmente mediante este tipo de técnica sistemas neurotransmisores perdidos (Dunnet, 1990), o tratar tejidos cerebrales dañados mediante inyecciones de tejidos sanos *in situ*, con resultados clínicos (Mickley, 1987) y electrofisiológicos (Palmer, 1991) comprobados. Para estos fines, en diversas zonas del sistema nervioso central, la utilización de tejidos embrionarios se ha revelado más eficaz que la de tejidos adultos (Hallas, 1989).

Aunque se han realizado muchos trasplantes de esbozos óticos durante este siglo (Orts Llorca *et al.*, 1965; Constantine-Paton, 1983), pocos se han llevado a cabo muy próximos al esbozo ótico del huésped (Detwiller, 1951) y en ningún caso se ha efectuado mediante esta técnica un trabajo enfocado a vislumbrar las posibilidades de reconstrucción de estructuras óticas sensoriales o nerviosas dañadas. Basándonos en esta idea hemos llevado a cabo un estudio preliminar aproximativo realizando trasplantes de placoda ótica de codorniz en la proximidad del esbozo ótico de pollo de edad similar, aprovechando el marcador nucleolar del modelo pollo-codorniz (Le Douarin, 1969), y el marcaje con el anticuerpo monoclonal HNK-1 (Peña *et al.*, 1991) para estudiar el patrón morfológico del desarrollo experimental de oído interno y del ganglio acústicovestibular derivados del esbozo ótico donante, así como el establecimiento de conexiones centrales y periféricas procedentes de los neuroblastos ganglionares desarrollados y las interacciones surgidas entre los tejidos injertados y los del huésped.

## Material y métodos

Se han utilizado para el experimento embriones de pollo de la especie *Gallus Gallus Domesticus* y embriones de codorniz de la especie *Coturnix Japonica*.

### *Técnica microquirúrgica*

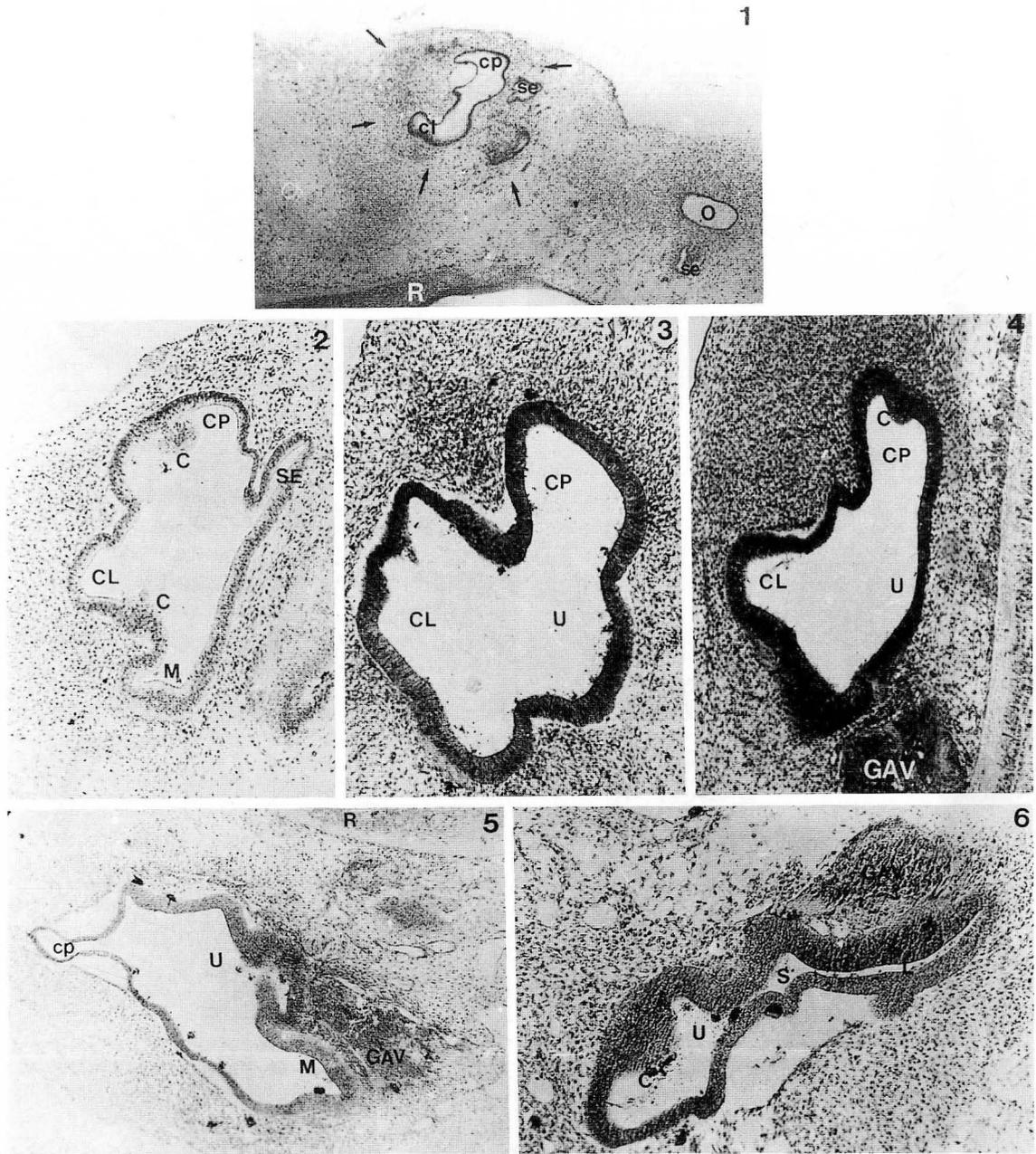
Los embriones fueron incubados entre 37,5 y 38 grados centígrados hasta que alcanzaron el estadio 13 HH (Hamburger y Hamilton, 1951) para los de pollo y 11 Z (Zacchei, 1961) para los de codorniz. La placoda ótica del embrión de codorniz, junto con el tejido mesenquimatoso subyacente, fue extraída mediante agujas de tungsteno afiladas, transportada en buffer fosfato salino (PBS) ( $\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$ ) y situada en una pequeña incisión previamente realizada ligeramente craneal a la placoda ótica derecha del embrión de pollo. A continuación, los receptores fueron reincubados a 37,5-38 grados centígrados, extraídos tras 3 ó 5 días de reincubación, fijados en líquido de Zencker o Bouin, incluidos en parafina y cortados transversalmente a 7 micrómetros de espesor. La serie de embriones extraídos después de tres días de reincubación (estadio 23 HH) y fijados en Bouin fueron marcados con el anticuerpo monoclonal HNK-1, mientras que los extraídos tras cinco días (estadio 28 HH) y fijados en líquido de Zenker fueron teñidos mediante la técnica de Feulgen-Rossembeck y hematoxilina de Mayer.

### *Inmunohistoquímica*

Tras ser desparafinados las cortes de la manera habitual, fueron incubados en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante dos horas con el sobrenadante del clon producto del anticuerpo HNK-1. Tras ser lavados en varios baños de PBS ( $\text{pH} = 7,4 \pm 2$ ), los cortes fueron sometidos al sistema Avidina-Biotina, siendo revelados a continuación con diaminobencidina (DAB, Serva) y finalmente montados en Eukyt.

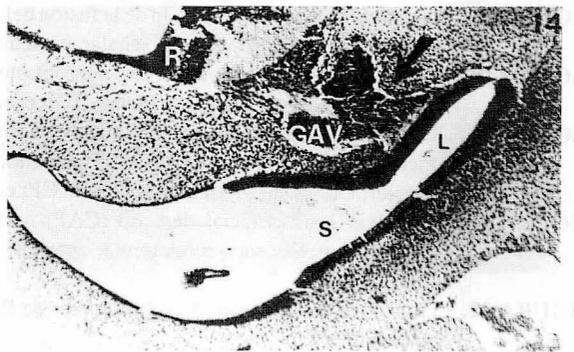
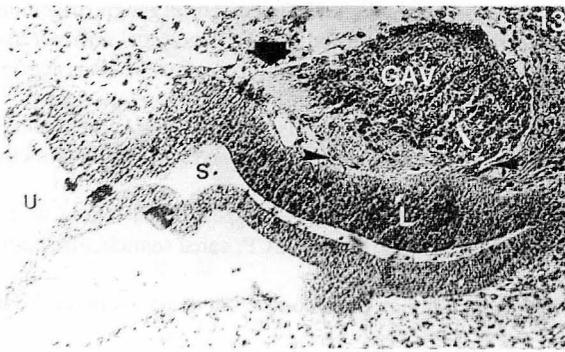
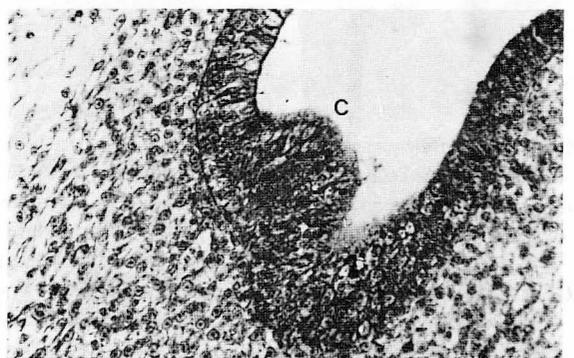
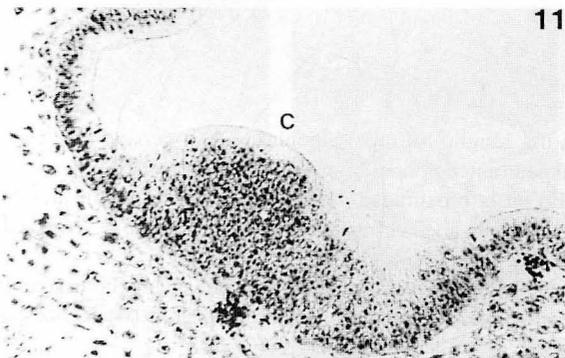
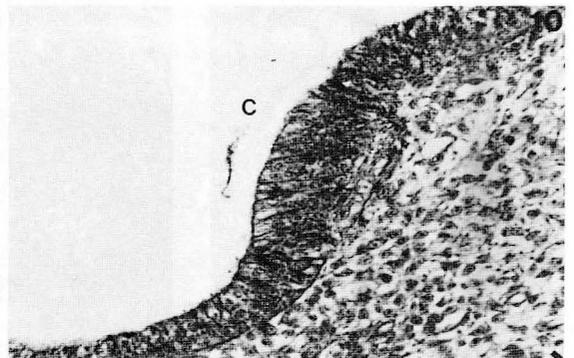
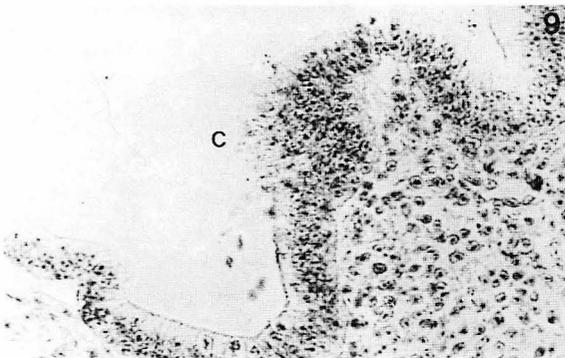
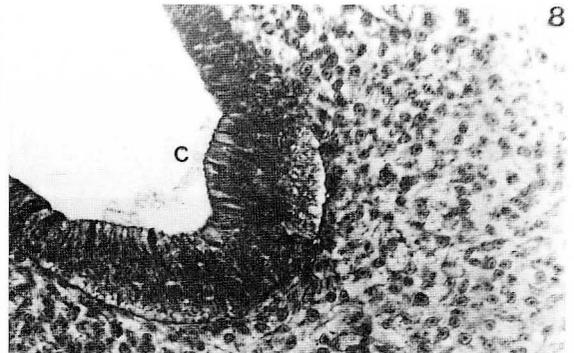
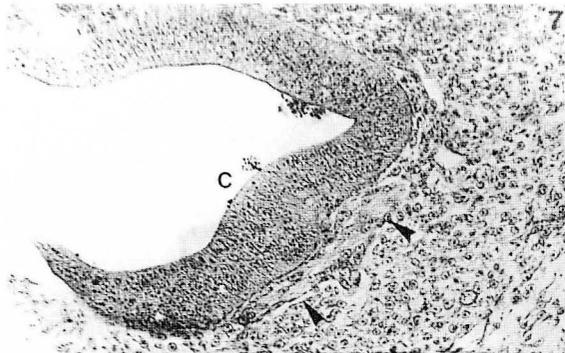
## Resultados

Los resultados muestran que el complejo acústico de codorniz del estadio 11 Z injertado se ha integrado perfectamente en la porción defálica de un huésped de edad similar (fig. 1), desarrollándose todos los casos los esbozos auditivo y ganglionar de codorniz en situación rostral al complejo acústico del receptor y lateral al rombencéfalo del mismo.

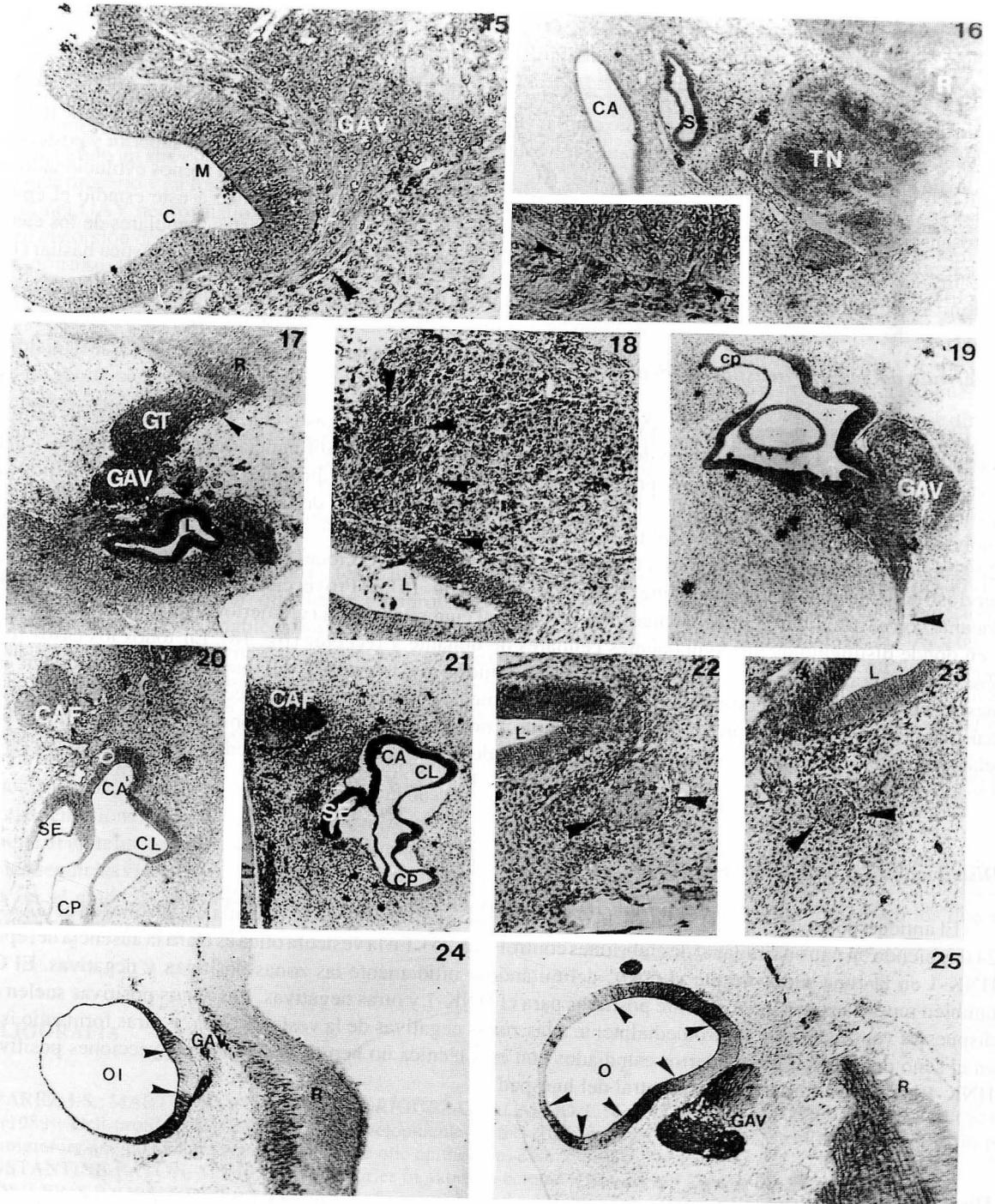


- FIGURA 1.** Localización del injerto (flechas) en situación rostral al esbozo acústico (0) de un embrión de pollo del estadio 28 HH. CL: canal semicircular lateral; CP: canal semicircular posterior; SE: saco endolinfático; R: rombencéfalo. (4x).
- FIGURA 2.** Injerto de 5 días de desarrollo. SE: saco endolinfático; C: cresta; M: mácula; CP: canal semicircular posterior; CL: canal semicircular lateral. (10x).
- FIGURA 3.** Esbozo acústico derecho de un embrión de pollo del estadio 28 HH, huésped de un injerto de placoda ótica de codorniz. CP: canal semicircular posterior; CL: canal semicircular lateral. U: utrículo. (10x).
- FIGURA 4.** Esbozo acústico derecho de un embrión de codorniz del estadio 20 de Zacchei. C: cresta; CP: canal semicircular posterior; CL: canal semicircular lateral; U: utrículo; GAV: ganglio acústicovestibular. (10x).
- FIGURA 5.** Porción vestibular de un injerto de 5 días de desarrollo. CP: canal semicircular posterior; U: utrículo; M: mácula del sáculo. GAV: ganglio acústicovestibular; R: rombencéfalo. (10x).
- FIGURA 6.** Porción lagenar de un injerto de 5 días postimplante. L: lagena; U: utrículo; S: sáculo; GAV: ganglio acústicovestibular. (10x).

- FIGURA 7.** Esbozo de la cresta ampular del canal semicircular anterior (C) de un injerto de 5 días postimplante. Bajo ella se aprecian fibras nerviosas (flechas) que se dirigen a su base y a una mácula próxima. (20x).
- FIGURA 8.** Esbozo de la cresta ampular del canal semicircular anterior (C) de un embrión de codorniz del estadio 20 de Zacchei. (20x).
- FIGURA 9.** Esbozo de la cresta ampular del canal semicircular lateral (C) de un injerto de 5 días postimplante. (20x).
- FIGURA 10.** Esbozo de la cresta ampular del canal semicircular lateral (C) de un embrión de codorniz del estadio 20 de Zacchei. (20x).
- FIGURA 11.** Esbozo de la cresta ampular del canal semicircular posterior (C) de un injerto de 5 días postimplante. (20x).
- FIGURA 12.** Esbozo de la cresta ampular del canal semicircular posterior (C) de un embrión de codorniz del estadio 20 de Zacchei. (20x).
- FIGURA 13.** Epitelio lagenar (L) de un injerto de 5 días postimplante a cuya base llegan fibras nerviosas (puntas de flecha) procedentes del ganglio acústicovestibular (GAV) desarrollado a partir del implante. Se aprecian fibras nerviosas dirigiéndose a la base de la mácula sacular (flecha gruesa). (20x).
- FIGURA 14.** Epitelio lagenar (L) del esbozo ótico de un embrión de codorniz del estadio 21 de Zacchei a cuya base llegan fibras nerviosas (flecha) procedentes del ganglio acústicovestibular (GAV). S: sáculo; R: rombencéfalo. (10x).



- FIGURA 15.** Fibras nerviosas (punta de flecha) procedentes del ganglio acústicovestibular (GAV) derivado del implante placodal tras 5 días de desarrollo dirigiéndose al neuropitelio ótico. M: mácula; C: cresta (20x).
- FIGURA 16.** Fragmento de tejido nervioso (TN) desarrollado en la proximidad del esbozo ótico del injerto tras 5 días postimplante. (10X). Recuadro: fibras nerviosas (flechas) unen el fragmento al rombocéfalo del huésped (R). (20x). SE: saco endolinfático; CA: canal semicircular anterior.
- FIGURA 17.** Fusión del ganglio acústicovestibular (GAV) de un injerto de 5 días postimplante con el ganglio trigémino del huésped (GT). Las puntas de flecha señalan las conexiones del complejo con el rombocéfalo (R) del huésped. L: lagena del injerto. (10x).
- FIGURA 18.** Complejo ganglionar resultado de la fusión del ganglio acústicovestibular del injerto con el ganglio trigémino del receptor. Las puntas de flecha señalan un acúmulo de neuroblastos de codorniz. L: lagena del injerto. (20x).
- FIGURA 19.** Injerto de 5 días postimplante. Los neuroblastos del ganglio acústicovestibular (GAV) envían fibras nerviosas a tejidos del receptor (punta de flecha). CP: canal semicircular posterior. (10x).
- FIGURA 20.** Complejo acústicofacial derecho (CAF) de un embrión de pollo huésped distorsionado por la presencia de un injerto de 5 días de desarrollo. SE: saco endolinfático del esbozo ótico del huésped; CA: canal semicircular anterior; CL: canal semicircular lateral; CP: canal semicircular posterior (10x).
- FIGURA 21.** Complejo acústicofacial derecho (CAF) normal de un embrión de pollo huésped de un injerto de 5 días postimplante. SE: saco semicircular anterior; CL: canal semicircular lateral; CP: canal semicircular posterior. (10x).
- FIGURA 22.** Tronco del nervio facial derecho (puntas de flecha) de un embrión de pollo receptor de un injerto de 5 días. L: laguna. (20x).
- FIGURA 23.** Tronco del nervio facial izquierdo (puntas de flecha) del embrión de la figura anterior. L: lagena. (20x).
- FIGURA 24.** Esbozo ótico (OI) de un injerto de 3 días postimplante marcado con HNK-1. La zona no marcada (puntas de flecha) está subyacente al ganglio acústicovestibular (GAV) neoformado. R: rombocéfalo. (10x).
- FIGURA 25.** Esbozo ótico (O) de un embrión de codorniz del estadio 17 de Zacchei marcado con el anticuerpo HNK-1. Las puntas de flecha indican los límites entre las zonas marcadas y no marcadas por el anticuerpo. GAV: ganglio acústicovestibular; R: rombocéfalo. (10x).



### ***Desarrollo del esbozo auditivo***

El grado de desarrollo del oído injertado es perfectamente comparable (fig. 2) al del oído del huésped (fig. 3) y al del oído de embriones control de estadio similar (E-20 Zacchei) (fig.) observándose la formación de todas las cavidades que muestra el laberinto membranoso en este estadio: los canales semicirculares superior y posterior en estadio de aproximación de sus paredes centrales (fig. 5) y el canal semicircular lateral menos evolucionado (fig. 2), las cavidades utricular y sacular, así como la lagena (fig. 6). Como corresponde a este estadio el epitelio neurosensorial aún está poco desarrollado, pero se aprecian los esbozos de las crestas ampulares de los canales semicirculares superior (Figs. 7 y 8), lateral (Figs. 9 y 10), posterior (Figs. 11 y 12) y papila acústica basilar (Figs. 13 y 14).

### ***Desarrollo del ganglio acústico-vestibular***

El ganglio acústico-vestibular (GAV) se ha desarrollado en todos los casos (fig. 15), mostrando sus células el marcador codorniz. En los casos bien desarrollados presenta claramente diferenciados los componentes acústico y vestibular, apreciándose en todas las proyecciones de los neuroblastos dirigidas a la base del epitelio, tanto vestibular (fig. 15) como coclear (fig. 13). En cuanto al establecimiento de las proyecciones centrales hacia el rombencéfalo del huésped, hemos podido distinguir tres patrones diferentes: 1) Ausencia de proyecciones visibles (20% de los casos) en presencia de un GAV bien formado; 2) Proyecciones a través de un fragmento de tejido nervioso donante incluido en el explante (20% de los casos) (fig. 16); 3) Proyecciones a través de la fusión del GAV donante con el ganglio trigémico del huésped, próximo al cual se desarrolla el injerto (50% de los casos) (fig. 17) y en donde distinguimos los componentes celulares de donante y receptor (fig. 18). En todos los casos se han observado fibras nerviosas que se dirigen hacia tejidos no nerviosos del huésped terminando en ellos inespecíficamente tras un corto recorrido (fig. 19). Sólomente en un caso hemos apreciado distorsión del complejo acústico del huésped por la proximidad del implante, consistente en fragmentación del esbozo ganglionar en su relación con el rombencéfalo (Figs. 21 y 21) y aporte de fibras nerviosas procedentes del complejo ganglionar donante para formar un tronco facial de mayor tamaño (Figs. 22 y 23).

### ***Distribución del anticuerpo monoclonal HNK-1***

El anticuerpo monoclonal HNK-1 se distribuye en los injertos tanto en la vesícula ótica como en el GAV (fig. 24) siguiendo un patrón similar al de embriones control (fig. 25). En la vesícula ótica es clara la ausencia del epítipo HNK-1 en la zona suprayacente al GAV, delimitándose nítidamente las zonas positivas y negativas. El GAV también muestra zonas intensamente positivas para el HNK-1 y otras negativas. Las zonas positivas suelen estar dispuestas ventrolateral y ventromedialmente a las zonas negativas de la vesícula ótica, y otras formando islotes en el seno del GAV. En los injertos estudiados con esta técnica no hemos observado proyecciones positivas al HNK-1 hacia el sistema nervioso central del huésped.

### **Discusión**

Nuestros resultados muestran que la placoda ótica de codorniz del estadio 11 Z se integra perfectamente en la región ligeramente rostral a la placoda ótica de embriones de pollo de edad similar sin distorsionar tejidos fundamentales del huésped, salvo en lo que se refiere a las interacciones ganglionares que luego serán comentadas. El grado de desarrollo morfológico alcanzado por los esbozos ótico y ganglionar es perfectamente comparable al de embriones de codorniz de los mismos estadios, demostrado además al comparar en ellos la distribución del epítipo HNK-1, tanto en vesícula ótica como en el GAV (Peña *et al.*, 1991).

La presencia del marcador nucleolar de codorniz en el GAV que crece inmediato al otocisto desarrollado, demuestra que sus células se han desarrollado a partir del implante. Hemos observado la formación de ganglios de aspecto, situación y dimensiones aparentemente similares a las de embriones control, lo que indica que el mecanismo de producción de células por parte de la placoda (Álvarez *et al.*, 1989) aparentemente se ha conservado, al igual que la capacidad de proliferación de sus componentes. En los especímenes más desarrollados, el ganglio se ha dividido en sus componentes acústico y vestibular, lo que no es apreciable en aquellos cuyo desarrollo ha sido más precario y en los que la proximidad del implante al ganglio trigémino del huésped ha permitido la fusión con él del GAV neoformado. Esta fusión, ya observada en anfibios por Constantine-Paton (1983), motiva una ligera distorsión del ganglio trigémino del huésped, pero siempre hemos apreciado la salida de sus tres ramas en dirección a sus tejidos diana. No hemos obtenido fusión del GAV donante con el del receptor, lo que, sin embargo, podría ser interesante para nuestros objetivos y nos obligará en futuros experimentos a aproximar más el implante a la placoda ótica del huésped. Sólo en un caso la proximidad del implante al complejo ótico motivó distorsión del complejo acústico-facial del mismo, conservándose las proyecciones al epitelio neurosensorial ótico y apreciándose un aporte suplementario de fibras nerviosas procedentes del complejo donante al tronco facial del huésped. Este hecho, unido a la aparición en todos los casos de fibras nerviosas que parten del GAV neoformado y se dirigen a tejidos mesenquimatosos del huésped, quizás pueda ser explicado mediante el hallazgo de Hemond y Morest (1991) de que células procedentes de la porción de placoda ótica que ellos definen como "crestas óticas" contribuyen a formar los ganglios VII, IX y X. De este modo, los tejidos diana periféricos del huésped quizás pudieran ejercer alguna atracción sobre las neuritas de las neuronas derivadas de estas zonas del esbozo ótico donante.

Las neuronas del GAV enviaron en todos los casos proyecciones al epitelio neurosensorial ótico en desarrollo, tanto vestibular como coclear, que fueron comprobadas con el HNK-1. En el 50% de los casos las proyecciones centrales pueden haberse establecido a través de la fusión con el ganglio trigémino del huésped y en el 20% a través de un fragmento de rombencéfalo injertado con el explante. No observamos conexiones centrales directas procedentes de los neuroblastos de GAV en ningún caso, lo que probablemente pueda ser debido a un retraso en su formación, implícito a la propia técnica del injerto, que será seguramente obviado aumentando la edad de supervivencia de los receptores.

En resumen, consideramos que la técnica, si bien requiere modificaciones ligeras, es alentadora al menos desde un punto de vista morfológico, pues consigue el desarrollo de un oído suplementario comparable estructuralmente con el de embriones control de edad similar, el desarrollo de proyecciones periféricas desde el complejo ganglionar donante al epitelio neurosensorial del oído implantado y a los tejidos mesenquimatosos del huésped, que incluso pueden seguir las vías periféricas habituales. Será imprescindible la realización ulterior de pruebas electrofisiológicas para ver el grado de funcionalidad del implante y ulteriormente efectuar injertos heterocrónicos en los que el receptor sea un animal adulto.

## BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, I.S.; MARTÍN-PARTIDO, G.; RODRÍGUEZ-GALLARDO, L.; GONZÁLEZ-RAMOS, C. y NAVASCUÉS, J. (1989): Cell proliferation during early development of the chick embryo otic anlage: quantitative comparison of migratory and non-migratory regions of the otic epithelium, **290**: 278-288.
- CONSTANTINE-PATON, M. (1983): Trajectories of axons in ectopic VIIth nerves. *Dev. Biol.*, **97**: 239-244.
- DETWILER, S.R. (1951): Further experimental observations on the differentiation of the otic vesicle in *Amblystoma*. *J. Exp. Zool.*, **116**: 415-430.
- DUNNET, S.B. (1990): Neural transplantation in animal models of dementia. *Eur. J. Neurosci.* **2**: 567-587.
- DUNNET, S.B. y RICHARDS, S.J. (1990): Neural transplantation: From molecular basis to clinical application: Progress in Brain Reserch. 82. Elsevier, Amsterdam.
- HALLAS, B.H.; LOWE, H.F.; JACOBSEN, G.; LATORRE, M.; LEE, S.P. y ZANAKIS, M.F. (1989): Developing retina and PNS segments for transplantation into the adult host eye: reconstruction of the mammalian visual system. 2. Results. *J. Neural Transplant.*, **1** (3-4): 87-93.
- HAMBURGER, V. y HAMILTON, H.L.A. (1951): Series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, **88**: 49-92.

- HEMOND, S.G. y MOREST, D.K. (1991): Ganglion formation from the otic placode and the otic crest in the chick embryo: mitosis, migration, and the basal lamina. *Anat. Embryol.*, **184**: 1-13.
- LE DOUARIN, N.M. (1969): Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix Coturnix Japonica*). Utilisation de ces particularités comme "marquage biologique" dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogénese. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **103**: 435-453.
- MICKLEY, G.A.; TEITELBAUM, H. y REIER, P.J. (1987): Fetal hypothalamic brain grafts reduce the obesity produce by ventromedial hypothalamic lesions. *Brain Res.*, **27.424** (2): 239-248.
- ORTS LLORCA, F. y MURILLO FERROL, N.L. (1965): Action of the rhombencephalon on the differentiation of the audirive placodes. Chronology of its influence. *Roux'Arch. Entwickl.-Mech.*, **156**: 363-367.
- PALMER, M.R.; HENSCHEN, A.; TROK, K.; HUDSON, J.L.; HOFFER, B.J. y OLSON, L. (1991): Functional inervation of spinal cord tissue by fetal neocrotical grafts in oculo: an electrophysiological study. *Exp. Brain Res.*, **87(1)**: 96-107.11.
- PENAMELIÁN, A.; NIETO JIMÉNEZ, Y.; VIEJO TIRADO, F.; MARTÍNEZ ALVAREZ, C.; PACHECO, W.; MERCADAL, C. y PUERTA-FONOLLA, J. (1991): Distribution de l'anticorp monoclonal HNK-1 dans le developpement de l'ebauche auditive chez les oiseaux. 73<sup>ème</sup> Congres de l'assotiation des Anatomistes. Bruxelles. II.
- ZACCHEI, A.M. (1961): Lo sviluppo embrionale delle quaglia giapponese (*Coturnix Japonica* T. e S.). *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, **66**: 36-62.

Correspondencia: Dra. Concepción Martínez Álvarez  
Dpto. Ciencias Morfológicas. Cátedra I de Anatomía  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
28040 Madrid. España

## **ALCOHOLISMO: ESTUDIO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DEL CEREBELO EN LA RATA BLANCA WISTAR ALCOHÓLICA**

### **A STUDY HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL ENZYMATIC OF CEREBELLUM IN THE ALCOHOLIC WISTAR WHITE RAT**

**M.J. MORA, A. SOLANO, I. SMITH-FERNÁNDEZ, I. FERNÁNDEZ-ORTEGA  
y J.M. SMITH-ÁGREDA**

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

#### **RESUMEN**

Las repercusiones que el consumo del etanol tiene sobre el organismo del individuo que lo realiza, donde afecta de modo especial al SNC, y dentro de éste al cerebelo, nos hace plantear el presente trabajo, centrándonos en el estudio de la corteza, núcleos y médula cerebelosa de la Rata Blanca Wistar sometida a diferentes modelos alcohólicos, en relación con animales testigos de las mismas edades.

**PALABRAS CLAVE:** Alcohólica. Rata. Cerebelo. Corteza cerebelosa. Núcleos cerebelosos. Médula cerebelosa. Klüver y Barrera. Loyez. Fosfatasa Alcalina y Acetilcolinesterasa.

#### **SUMMARY**

The repercussions that ethanol consumption has over the whole organism where affects in a special way the CNS and the cerebellum inside it, took us to undertake present work, focusing in the study of the cortex, nucleii and cerebellar medulla in the Wistar white rat under different alcoholic models, in relation with control animal of the same ages.

**KEY WORDS:** Alcoholic. Rat. Cerebellum. Cerebellar cortex. Cerebellar nucleii. Cerebellar medulla. Klüver and Barrera. Loyez. Phosphatase alkaline and Cholinesterase.

#### **Introducción**

Las drogas en general, y las consecuencias sociales que de su consumo se derivan, se han convertido en objeto de estudio científico y en motivo de acción de entidades públicas y privadas.

Si nos centramos en nuestro país, es evidente que la drogadicción más extendida es el alcoholismo, ya que España ocupa el segundo lugar en el mundo en el consumo de alcohol absoluto por habitante y año (1).

Según el Plan Nacional de Drogas, el número de alcohólicos oscila entre 1.200.000 y 2.300.000 personas (2 y 3). En Andalucía, el problema alcanza dimensiones alarmantes, ya que el consumo excesivo de alcohol (más de 100 cm<sup>3</sup> al día), afecta al 11,3% de los mayores de 16 años.

Un estudio realizado recientemente a nivel nacional, asegura que el 88,3% de los varones españoles y el 66,5% de las mujeres, consumen alguna cantidad de alcohol puro al día (entre bebedores ligeros, moderados, altos y excesivos) (4). Parece claro el considerar como persona de riesgo de presentar una complicación, a bebedores de más de 100 cm<sup>3</sup> al día (5). No hay, sin embargo, un acuerdo científico que señale una cantidad por debajo de la cual no existan efectos teratogénicos.

A pesar de que el National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism dice que el consumo de 89 mLs. de alcohol absoluto por día constituye un mayor riesgo para el feto (6), Newman en 1980, asegura que para que se produzcan trastornos en la descendencia es suficiente la cantidad de 28,5 mLs. (7).

En este sentido, la Medicina Preventiva aconseja que, «mientras no se haya definido el umbral de toxicidad del alcohol para el feto, el mejor consejo para las mujeres que planeen quedarse embarazadas, es que dejen completamente el alcohol» (8), y la Asociación Médica Americana recomienda que la mujer embarazada prescinda del alcohol durante la gestación (9).

La acción tóxica que el etanol y sus metabolitos (acetaldehído) ejercen sobre el Sistema Nervioso Central, altera de una manera selectiva la actividad de enzimas asociadas a la membrana neuronal, importantes para la transmisión de información (10), y parece ser que también el interior de la neurona (11). De forma especial produce atrofia y disminución del número de células de Purkinje en el cerebelo humano (12), y signos degenerativos en los granos en el de la rata adulta (13). Todo esto, unido al hecho de haber estudiado en trabajos previos el desarrollo de la corteza cerebelosa de la rata blanca Wistar en diferentes edades de su desarrollo postnatal, así como la actividad que presentan determinadas enzimas del grupo de las hidrolasas, y el grado de mielinización de la médula cerebelosa (14), nos hace plantear el presente trabajo.

Poderosas razones éticas, fundamentan la necesidad de recurrir a modelos experimentales. Por otra parte, la utilización de estos modelos bajo condiciones controladas, permite reproducir en éstos una gran cantidad de alteraciones que se presentan en el humano alcohólico.

En estos modelos, es posible asegurar una exposición ética suficientemente prolongada como para producir toxicidad, tolerancia y estado desnutricional, permitiendo conocer mejor los afectos tanto a nivel macro, como microscópico y bioquímico.

## Objetivo

Nos planteamos el estudio del influjo del etanol en la corteza, núcleos y médula cerebelosa, mediante técnicas histológicas e histoquímicas enzimáticas.

## Material y métodos

Realizamos la experiencia en la rata blanca Wistar. El modelo alcohólico elegido es el de adicionar etanol al agua de bebida, cuya eficacia ha sido ampliamente demostrada (15), en concentraciones crecientes, comenzando con un 5%, para ir subiendo cada semana un 5% hasta llegar al 20%. Consideramos animal alcohólico crónico, aquel que bebe agua alcohólica al 20% durante 2 meses como mínimo.

No contemplamos modelos de alimentación basados en dietas equilibradas en calorías, para extraer los resultados aislados del etanol como noxa, puesto que el fenómeno desnutricional suele estar imbricado al proceso de etilización, al igual que sucede en la patología humana.

Los animales se estudian a los 87 y 98 días de su desarrollo. Se emplean tres grupos de trabajo:

A) Animales hijos de madre y padre alcohólicos, con lactancia en su madre alcohólica, y que han bebido siempre agua alcohólica después de la lactancia (alcohólicos crónicos).

B) Animales nacidos de madre y padre no alcohólicos, que se han hecho alcohólicos al añadirle etanol al agua de bebida (nuevos alcohólicos).

C) Animales testigos (controles).

Técnicas histológicas: fijador, formol al 15%, inclusión en parafina, cortes en microtomo a 10  $\mu$ m. Técnicas histoquímicas: fijador, formol-sacarosa. cortes de 8  $\mu$ m en criostato a  $-25^{\circ}$  C.

Métodos: Klüver y Barrera, Luxol-fast-blue, Loyez, y la determinación de la actividad fosfatasa alcalina (Gomori) y la acetil-colinesterasa (Elbadami y Schenk).

## Resultados

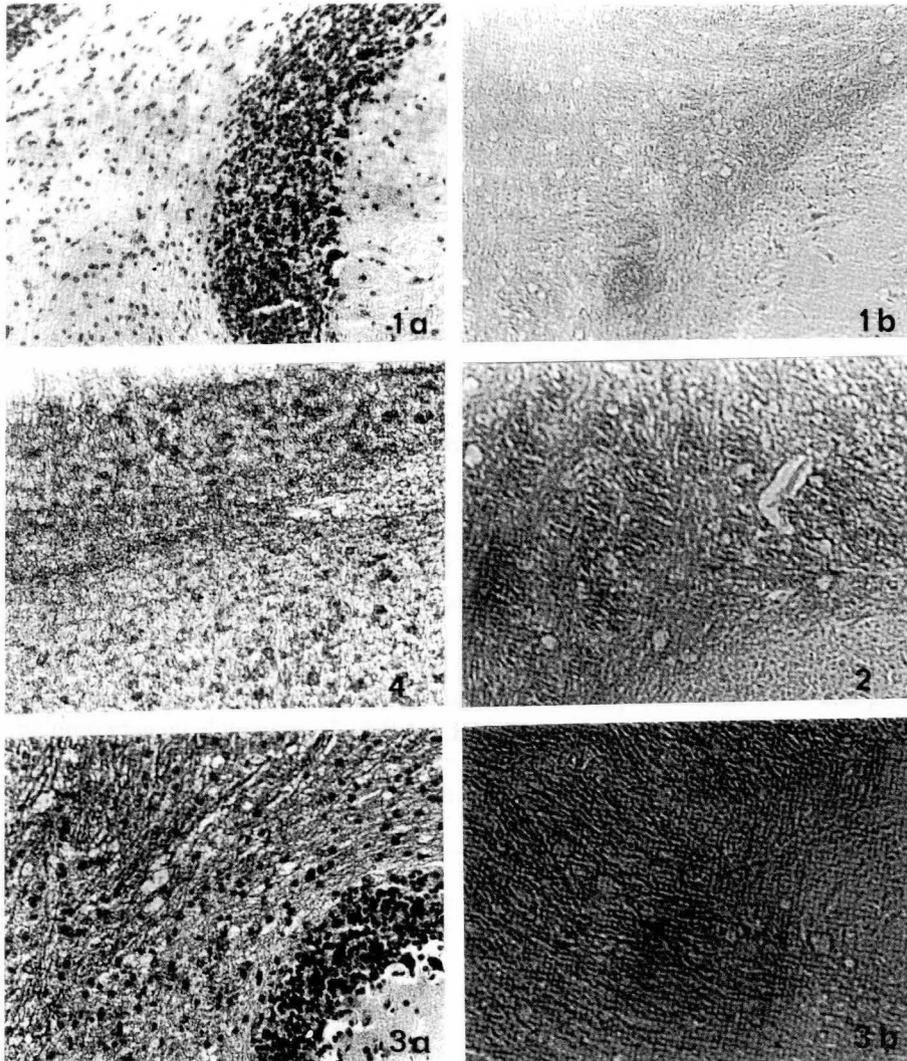
Se muestran en la tabla I.

El signo + significa que hay actividad o impregnación mediante la técnica indicada.

**TABLA 1**

TÉCNICAS	LOCALIZACIÓN	TE87	AC87	AN87	TE98	AC98	AN98
Luxol-Fast-Blue	MÉDULA CER.	+++	+	++	+++	+	++
	CELS. PURKINJE	+	+	+	+	+	+
	NÚCLEOS CER.	-	+	+	-	+	+
Klüver-Barrera	MÉDULA CER.	+++	+	++	+++	+	++
	CELS. PURKINJE	+	+	+	+	+	+
	NÚCLEOS CER.	-	+	+	-	+	+
Loyez	MÉDULA CER.	+++	+	++	+++	+	++
	CELS. PURKINJE	+++	+	++	+	+	+
	NÚCLEOS CER.	-	+	+	-	+	+
Fosfatasa alcalina	MÉDULA CER.	+	+	+	+	+	+
	CELS. PURKINJE	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEOS CER.	+	+	+	+	+	+
Acetil-colinesterasa	GLOMERULOS CER.	+++	+	+	+++	+	++
	GOLGI II	+	+	+	+	+	+
	MÉDULA CER.	++	+	+	++	+	++
	NÚCLEOS CER.	+	+	+	+	+	+

TE: Animales testigo; AC: Animales alcohólicos crónicos; AN: Animales alcohólicos nuevo; 87, 98: Edad (en días).



- FIGURA 1.** (a) AC. Klüver-Barrera. 87 D. y  
(b) AC. Luxol-Fast-Blue. 87 D.
- FIGURA 2.** AN. Luxol-Fast-Blue. 87 D.
- FIGURA 3.** (a) TE. Klüver-Barrera. 87 D. y  
(b) TE. Luxol-Fast-Blue. 87 D.
- FIGURA 4.** TE. Acetilcolinesterasa. 87 D.

## Discusión

Referente al modelo alcohólico, coincidimos con otros autores acerca de la validez del método de adición del etanol al agua de bebida en los modelos alcohólicos de animales de experimentación (16).

Los resultados histológicos e histoquímicos, evidencian cómo el alcoholismo afecta fundamentalmente a la mielinización, con una alteración en la médula cerebelosa en los animales alcohólicos crónicos muy evidente (Fig. 1), que se empieza a manifestar en el nuevo alcohólico (Fig. 2), y que no existe en los animales testigos (Fig. 3), pudiendo ser la base morfológica de los trastornos neurológicos presentados por los individuos alcohólicos.

En este aspecto coincidimos con Lancaster y cols. (17), que resaltan el deficitario desarrollo mielínico en animales en contacto con el alcohol durante el desarrollo postnatal.

En cuanto a las actividades enzimáticas, la fosfatasa alcalina apenas muestra variaciones en los animales estudiados, siendo la acetil-colinesterasa la que presenta diferencias, con una disminución en su actividad en los animales nuevos alcohólicos, y más acusada en los animales alcohólicos crónicos.

A este respecto, Rudeen y Guerri (18), examinando los trastornos ocasionados por el etanol en las enzimas cerebrales ligados a las membranas neuronales (ATPasa-Ca, ATPasa Na/K y acetil-colinesterasa) en determinadas áreas cerebrales que incluía el cerebelo, de ratas expuestas al etanol, demostraron una disminución en la actividad de dichas enzimas durante el periodo postnatal en todas ellas.

Referente a nuestro trabajo, hay que señalar que en todos los animales estudiados, la presencia de mayor número de glomérulos cerebelosos evidentes, coincide con mayor grado de mielinización (Fig. 4).

## BIBLIOGRAFÍA

1. RANKIN, J.L., y ASHLEY, M.J. (1986): Alcohol Related Health Problems and Their Prevention. En LAST, J.M. (dir). Macxy-Rosenau, Public Health and Preventive Medicine. Appleton Century-Trofts, Norwalk.
2. PREIXA, F. (dir.) (1985): Alcoholismo. Jano (nº monográfico). M, 5-41.
3. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD PÚBLICA (1984): Estudio de los hábitos de consumo de alcohol en la población adulta española. Madrid. Ministerio de Sanidad y Consumo.
4. NAVARRO, J.; LORENTE, S.; VARO, J. y RUIZ, M. (Ed.) (1985): El consumo de drogas en España. Madrid. Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. Cruz Roja Española.
5. CLARREN, S.K.; ALVORD, E.C.; SUMI, S.M.; STREISSGUTH, A.P., y SMITH, D.W. (1978): Brain malformation related to prenatal exposure to ethanol. *J. Pediatr.* **92**: 64-67.
6. NATIONAL INSTITUTE OF ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (1977): Critical Review of the Fetal Syndrome. Rockville, Maryland. Alcohol drug and Mental Health Administration.
7. NEWMAN, N.M. y CORREY, J.F. (1980): Effects of alcohol in pregnancy. *Med. J. Austr.* **2**: 5.
8. SALLERAS, L. y BACH, L. (1988): Alcohol y Salud. En: PIEDROLA, G. Medicina Preventiva y Salud Pública. 8ª ed. Barcelona. Salvat, S.A.
9. CHARNESS, M.F. y cols. (1989): Ethanol and the nervous system. *New Engl. J. Med.* **321**: 442-454.
10. TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P.L., y LILJEQUIST, S. (1987): Effects of ethanol on the activity of brain enzymes. En: Von Wartburg, J.P. Alcohol Metabolism and Alcoholism: the role of enzymes. *Enzyme*, **37**: 70-86.
11. DUNMIERE, C.R. y La VELLE, F.W. (1983): Effects of ethanol on Nucleolar Structure: A Cytological Indication of Change in RNA/Protein Synthesis. *The Anatomical Record*; **206**: 363-371.
12. TORVIX, A. y TORPS, S. (1984): The prevalence of alcoholic cerebellar atrophy. A morphometric and histological study of an autopsy material. *J. Neurol. Science*, **75**: 43-51.
13. PAULA-BARBOSA, M.M., y TAVARES, M.A. (1985): Long-term alcohol consumption induces microtubular changes in the adults rats cerebellar cortex. *Brain Res.*, **339**: 195-199.
14. MORA, M.J. (1985): Aportación al estudio del cerebelo en desarrollo. *An. Desarr.*, **29-65**: 57-75.
15. ERICKSSON, K.; SINCLAIR, J.D., y KIIJANMAA, K. (1980): Animal models in alcohol research. London. Academic Press.
16. LÓPEZ TEJERO, D.; FERRER, I.; LLOBERA, M., y HERRERA, A. (1986): Effects of prenatal ethanol exposure of physical growth, sensory reflex maturation and brain development in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **12**: 251-260.
17. LANCASTER, F.E.; PHILLIPS, S.M.; PATSALOS, P.N., y WIGGINS, R.C. (1984): Brain myelinization in the offspring of ethanol treated rats: in utero versus lactational exposure by crossfostering offspring of control, paired and

- athanol teated dams. Brain Res., **309**: 209-216.
18. RUDEEN, P.K., y GUERRI, C. (1985): The effects of alcohol exposure in utero on acetylcholinesterase, Na/K-ATPase and Ca-ATPase activities in six regions of rat brain. Alcohol, **20**: 417-425.

Correspondencia: Dra. M.J. Mora  
Dpto. de Morfología Normal y Patológica  
Facultad de Medicina  
Campus de Teatinos  
29080. Málaga. España

## **CONTRIBUCIÓN A LA MORFOLOGÍA Y BIOMETRÍA DE LA CINTURA ESCAPULAR Y DEL TÓRAX EMBRIONARIO Y FETAL**

### **MORPHOLOGY AND BIOMETRY STUDY OF THORAX AND STERNOCLAVICULAR JOINT DURING EMBRYOGENIC AND FOETAL DEVELOPMENT**

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

Dpto. de Ciencias Morfológicas. Universidad de Zaragoza.

#### **RESUMEN**

Se realiza un estudio morfológico torácico durante el desarrollo embrionario y fetal, mediante la reconstrucción tridimensional de Born. Se describe la evolución y la biometría de la cintura escapular y del tórax en conjunto. El estudio abarca desde embriones de 13 mm hasta fetos de 60 mm de longitud craneocaudal.

**PALABRAS CLAVE:** Tórax. Cintura escapular. Embriología. Biometría

#### **SUMMARY**

It is realized a study of the thorax and sternoclavicular joint morphology during embryogenic or foetal development by de Born tridimensional rebuild. It is describe the evolution and biometric of the sternoclavicular joint and the thorax. The study include embryos from 13 mm to 60 mm of craneo-caudal longitude.

**KEY WORDS:** Thorax. Sternoclavicular joint. Acromioclavicular joint. Embryology. Biometric.

#### **Introducción**

El embrión humano atraviesa uno de los momentos más críticos de su desarrollo, coincidiendo con la incurvación y cierre de las estructuras toracoabdominales. Defectos en este proceso, conllevan inevitablemente, a la aparición de graves malformaciones congénitas, muchas veces incompatibles con la vida. Sin embargo, estas circunstancias apenas han motivado la aparición de estudios relacionados con la conformación embriológica del tórax (Arey, 1965; Kilma, 1968; Allan, 1973; Gray y Skandalakis, 1975). El esfuerzo investigador, parece dirigido desde antiguo, a conocer la génesis y el desarrollo de las vísceras contenidas en el tronco, en especial del corazón y los pulmones (Popva-Latkina, 1961; Belenkaya, 1961; Amell-Sans, 1967), con manifiesto desinterés por el moldeado y biometría de sus paredes y por la topografía de su contenido (Belenkaya, 1961; Brizzi, 1967). Son estas circunstancias las que nos han llevado a profundizar nuestros conocimientos en este tema.

## Material y métodos

Este estudio comprende 7 series de embriones y fetos humanos, bien conservados, de longitud craneocaudal comprendida entre 13,5 mm y 60 mm, procedentes del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de Zaragoza. Las series han sido preparadas, seccionando los embriones transversalmente, con grosores entre 10 y 35 micras, tiñendo posteriormente con hematoxilina-eosina. Estas series presentan las características siguientes:

*Serie nº 1.*- Embrión humano de 13 mm cc., aproximadamente de seis semanas de edad y sexo todavía no identificado. La serie comprende 62 preparaciones con un total de 789 cortes horizontales seccionados a 10 micras de grosor.

*Serie nº 2.*- Embrión humano de 24 mm cc., aproximadamente de siete semanas y media de edad y sexo todavía sin identificar. Comprende un total de 128 preparaciones con un total de 1.169 cortes horizontales seccionados a 20 micras de grosor.

*Serie nº 3.*- Embrión humano de 26 mm cc., aproximadamente de siete semanas y media de edad, y sexo todavía sin identificar. Comprende un total de 245 preparaciones con un total de 1.730 cortes horizontales seccionados a 26 micras de grosor.

*Serie nº 4.*- Feto humano de 33 mm cc., aproximadamente de nueve semanas de edad, y sexo todavía sin identificar. Comprende un total de 192 preparaciones con un total de 985 cortes horizontales seccionados a 35 micras de grosor.

*Serie nº 5.*- Feto humano de 37 mm cc., aproximadamente de nueve semanas y media de edad, y sexo todavía sin poder ser identificado. Comprende un total de 112 preparaciones con un total de 856 cortes horizontales seccionados a 37 micras de grosor.

*Serie nº 6.*- Feto humano de 40 mm cc., aproximadamente de diez semanas de edad, y sexo todavía no identificado. Comprende un total de 213 preparaciones con un total de 882 cortes horizontales seccionados a 30 micras de grosor.

*Serie nº 7.*- Feto humano de 60 mm cc., aproximadamente de tres meses de edad, y perteneciente al sexo masculino. Comprende un total de 81 preparaciones con un total de 1.215 cortes horizontales seccionados a 35 micras de grosor.

En cada caso, tras reconocer los esbozos cartilagosos del tórax y de la cintura escapular y las principales vísceras de la zona, hemos procedido a realizar reconstrucciones tridimensionales, a 15 aumentos, de la región torácica, utilizando planchas de cartón de 0,3 mm de grosor, según la técnica de Born. Las reconstrucciones reproducen las estructuras cartilagosas y óseas del tórax. Así mismo se han hecho reconstrucciones parciales torácicas con su contenido visceral.

Reconstruidos los tórax embrionarios y fetales y estudiada su morfología, hemos realizado un estudio biométrico de los parámetros siguientes:

1.- *Perímetros torácicos.* A nivel *axilar* (punto subglenoideo) y *xifoideo* (extremo inferior del apéndice o de las bandas hemiesternales, no fusionadas). Cinta milimetrada.

2.- *Diámetros del tórax.* *Anteroposterior superior:* desde la horquilla esternal hasta el borde anterior a la 1ª vértebra dorsal. Calibre milimetrado.

*Transverso superior:* máxima separación entre las primeras costillas de ambos lados. Calibre milimetrado.

*Anteroposterior medio:* línea horizontal que une el apéndice xifoideo al cuerpo vertebral. Calibre milimetrado.

*Tranverso medio:* perpendicular al anterior. En nuestro caso el diámetro corresponde a un plano que corta entre el cuarto espacio intercostal (embrión de 24 mm cc.) y la sexta costilla (embrión de 60 mm cc.). Calibre milimetrado.

3.- *Diámetros vertebrales D1 y D5.* *Diámetro anteroposterior del cuerpo:* distancia comprendida entre el punto medio del borde anterior y el posterior del cuerpo vertebral. Calibre milimetrado.

*Diámetro transverso del cuerpo:* perpendicular al anterior. Corta el cuerpo vertebral en su porción media y va del borde derecho al izquierdo del mismo. Calibre milimetrado.

*Diámetro medio anteroposterior de la vértebra:* distancia comprendida entre borde anterior del cuerpo vertebral y el extremo posterior de la apófisis espinosa. En caso de ausencia, se toma como punto de referencia el punto medio de la tangente entre ambas láminas vertebrales. Calibre milimetrado.

4.- *Diámetros escapulares. Altura máxima:* corresponde a la distancia comprendida entre los ángulos superior e inferior de la escápula. Calibre milimetrado.

*Anchura máxima:* corresponde a una línea trazada perpendicularmente a las anteriores y situada a la altura de la cavidad glenoidea. Calibre milimetrado.

*Altura de la cavidad glenoidea:* corresponde a la línea que va desde la mitad del borde superior al inferior de la cavidad. Calibre milimetrado.

*Anchura de la cavidad glenoidea:* perpendicular a la anterior. Va desde la mitad del extremo anterior al posterior. Calibre milimetrado.

*Profundidad de la cavidad glenoidea:* distancia entre el plano glenoideo y en punto de mayor profundidad de la misma. Calibre milimetrado.

5.- *Longitud y anchura clavicular. Longitud:* distancia recta entre los extremos medial y el lateral del hueso. Calibre milimetrado.

*Anchura:* espesor anteroposterior medio en la porción media del hueso. Calibre milimetrado.

Obtenidos los datos biométricos reseñados, sus valores han sido adaptados al tamaño original del embrión, dividiendo para ello por 15, número de aumentos a los que han sido realizadas estas reconstrucciones.

## Resultados

A) *Esternón.* Las bandas esternales aparecen por primera vez hacia las siete semanas de gestación (embrión de 24 mm cc.) totalmente separadas. Su fusión, comienza por la porción superior, deteniéndose en el embrión de 26 mm cc. al alcanzar la articulación con la primera costilla. En la porción superior de este embrión se comprueban dos prominencias que corresponden a los huesos supraesternales. Su extremo inferior no presenta todavía apófisis xifoides. Conforme avanza la edad embrionaria (feto de 33 mm cc.), la fusión de las bandas progresa en sentido descendente, alcanzando en este caso el nivel que corresponde a la inserción del tercer cartílago costal. Aparecen dos apéndices que corresponden a la futura xifoides. Hacia las nueve semanas (feto de 37 mmcc.) las bandas esternales se han fusionado en su totalidad, e incluso aparece en el extremo inferior el apéndice xifoides claramente visible.

B) *Columna vertebral.* Es la primera estructura ósea que aparece en nuestras reconstrucciones. En el embrión de 13 mm cc., se ve únicamente el cuerpo vertebral, con el esbozo de alguna apófisis transversa en la zona dorsal. Las láminas vertebrales, poco marcadas, carecen de pedículos de unión al cuerpo vertebral, estando por tanto independientes. En el embrión de 24 mm cc., las vértebras poseen ya casi todas las estructuras; los agujeros de conjunción son amplios, de forma circular. Los arcos vertebrales, sin cerrar, muestran una amplia abertura posterior. Aproximadamente a las nueve semanas (feto de 33 mm cc.) esta abertura es menor, cerrándose por completo en el feto de 37 mm cc. aunque no aparezcan todavía las apófisis espinosas, visibles a partir del feto de 40 mm cc., durante la décima semana alguna de ellas con forma bilobulada. Estas apófisis ya están totalmente desarrolladas a los tres meses de gestación (feto de 60 mm cc.). Las apófisis transversas, dirigidas primero tangencialmente hacia afuera y adelante (embrión de 26 mm cc.), lo hacen luego hacia afuera y atrás (feto 37 mm cc.).

La biometría del crecimiento vertebral, demuestra desde el comienzo que la forma del cuerpo vertebral, es de forma oval, predominando el diámetro transversal sobre el anteroposterior (tabla 1). También se observa un aumento del diámetro anteroposterior medio de las vértebras con relación a los diámetros del cuerpo vertebral, a partir del feto de 37 mm cc., coincidiendo en la delimitación de las futuras apófisis espinosas.

C) *Costillas.* Los primeros esbozos costales los encontramos en el embrión de 13 mm cc., como pequeños apéndices costales que arrancan de algunas de las vértebras dorsales, sin que rebasen ninguno la porción dorsolateral de la futura región torácica. En este estadio, al igual que en el siguiente (embrión de 24 mm cc.) todavía no se

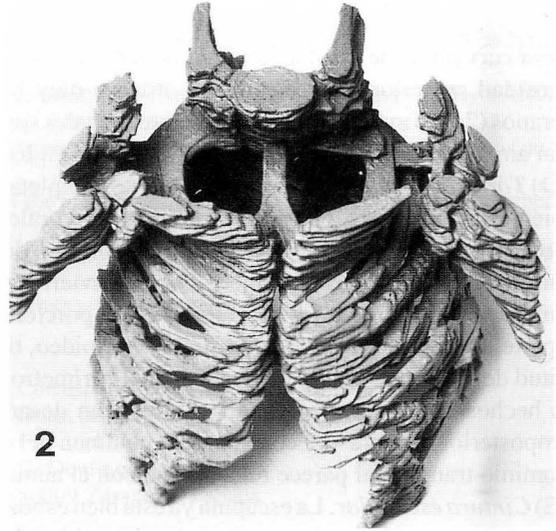
TABLA 1

BIOMETRÍA EMBRIONARIA Y FETAL (en mm)						
Embrión/Feto	24 mm	26 mm	33 mm	37 mm	40 mm	60 mm
<i>Medidas claviculares</i>						
Long. acromio-esternal	2,60	2,80	3,80	4,93	5,40	9,06
Anch. media	0,26	0,33	0,56	0,66	0,80	1,06
<i>Dimensiones escapula</i>						
Alt. máxima	3,20	4,20	4,60	5,90	6,40	11,30
Anch. máxima	2,33	2,33	2,86	3,93	4,30	8,46
Prof. cav. glenoidea	0,053	0,066	0,20	0,266	0,133	0,33
Alt. cav. glenoidea	1,00	1,13	1,40	1,86	2,00	2,60
Anch. cav. glenoidea	0,40	0,66	0,73	1,20	1,06	1,73
Ind. escapular	72,80	55,40	62,17	66,60	67,18	74,86
<i>Estrecho sup. tórax</i>						
Diám. mayor ant-post.	1,86	2,13	1,93	1,86	3,53	4,46
Diám. mayor transv.	2,20	2,40	3,60	4,53	3,73	8,46
Ind. superior torácico	118,27	112,60	186,52	243,50	105,60	189,68
<i>Amplitud torácica</i>						
Diám. mayor ant-post.	2,86	4,20	5,13	4,60	6,20	10,60
Diám. mayor transv.	4,20	3,73	7,33	6,53	7,33	13,20
Ind. medio torácico	146,85	88,80	142,88	141,95	118,22	124,52
<i>Perímetros torácicos</i>						
Perím. axilar	14,33	14,33	15,00	21,33	22,33	36,00
Perím. xifoideo	21,00	22,00	24,33	25,33	30,00	51,00
<i>Longitudes vertebrales</i>						
Diám. ant-post D1	0,66	0,73	0,53	0,93	1,06	1,60
Diám. transv. D1	1,13	1,13	0,86	1,60	1,86	3,20
Diám. medial ant-post. D1	1,86	1,93	1,80	2,73	3,13	5,66
Ind. vertebral D1	58,40	64,60	61,60	58,12	56,90	50,00
Diám. ant.-post. D5	0,66	0,80	0,60	0,86	1,13	1,53
Diám. transv. D5	1,00	1,20	1,00	1,60	1,80	3,20
Diám. medial ant.-post. D5	1,86	2,00	2,00	2,80	3,13	5,46
Ind. vertebral D5	66,00	66,66	60,00	53,75	62,70	47,81

- FIGURA 1.** Embrión 13 mm cc. El tórax apenas está esbozado. Muestra un cuerpo de 6 vértebras cervicales. Ángulo costal cerrado. Las vísceras torácicas todavía sin proteger por las costillas.
- FIGURA 2.** Embrión 24 mm cc. Fusión esternal incompleta. Costillas sin torsión. Espacios intercostales pequeños y paralelos.
- FIGURA 3.** Embrión 24 mm cc. Reconstrucción visceral. Se observa el gran volumen hepático.
- FIGURA 4.** Embrión 33 mm cc. El tórax todavía permanece parcialmente abierto. Costillas horizontales y con espacios intercostales amplios. Ausencia de curvas de arrollamiento y de torsión.
- FIGURA 5.** Embrión 40 mm cc. Las clavículas muy incurvadas contactan con el acromion. Las apófisis espinosas comienzan a diferenciarse.
- FIGURA 6.** Embrión 40 mm cc. Las costillas ya muestran las curvaturas de arrollamiento y torsión, con amplios espacios intercostales.



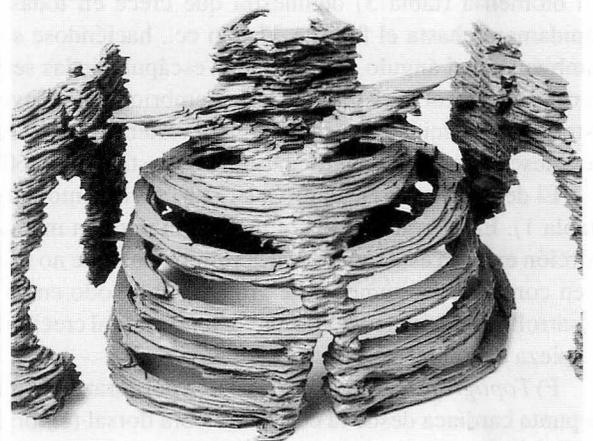
1



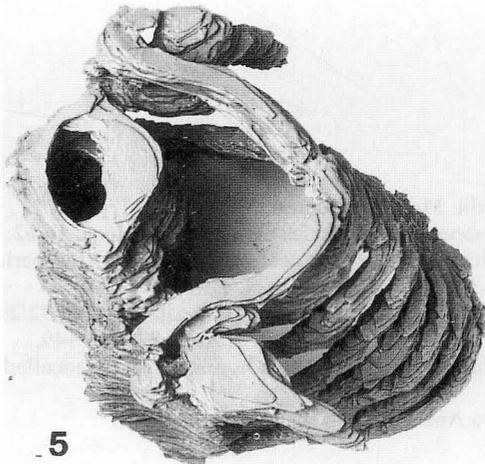
2



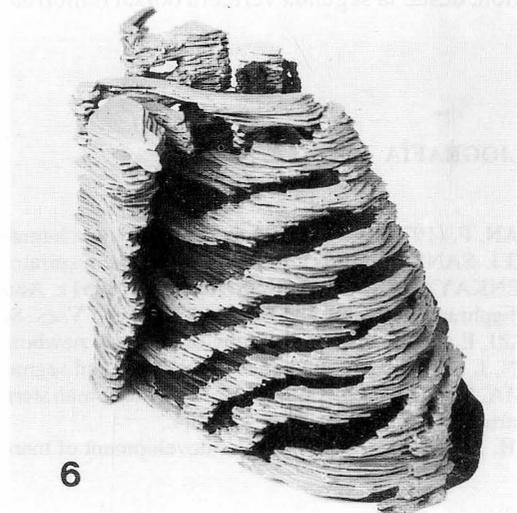
3



4



5



6

observa curvaturas de arrollamiento ni de torsión, características que no aparecen hasta el feto de 37 mm cc. La tuberosidad posterior de la costilla se observa muy bien en el embrión de 60 mm cc. En los embriones más tempranos (24-26 mm cc.), los espacios intercostales son estrechos. Más adelante (feto de 33 mm cc.) vemos como se han ampliado, adquiriendo su mayor amplitud en los fetos de 40 y 60 mm cc.

D) *Tórax en conjunto*. El arco costal no se completa hasta las siete semanas (embrión 24 mm cc.). A esta edad también están presentes todas las estructuras vertebrales a excepción de las apófisis espinosas. En las series más jóvenes (13, 24 y 26 mm cc.) existe claro predominio del diámetro anteroposterior sobre el transversal. Más tarde (embrión de 33 mm cc.) estas dimensiones se invierten y predominan claramente los diámetros transversos sobre los anteroposteriores, tanto si nos referimos a la porción superior del tórax, como a su porción media (tabla 1). Por otra parte, los perímetros torácicos, axilar y xifoideo, tienen un crecimiento paralelo hasta que el feto alcanza la longitud de 37 mm cc., momento en el que el perímetro xifoideo crece más rápido que el perímetro axilar. Todos estos hechos aparecen relacionados con el gran desarrollo de las vísceras toracoabdominales. El predominio anteroposterior depende del considerable volumen del corazón y del timo, y de la exigüidad de los pulmones. El predominio transversal parece relacionado con el aumento de las vísceras abdominales, en especial del hígado.

E) *Cintura escapular*. La escápula ya está bien esbozada en el embrión de 24 mm cc., pudiendo reconocer todos los accidentes incluidos el acromion, la coracoides, la espina y la cavidad glenoidea. Todos estos elementos adquieren ya una morfología similar al adulto en el feto de 37 mm cc. A esta edad la espina separa con claridad la fosa supraespinosa de la infraespinosa. La cavidad glenoidea está muy delimitada en el embrión de 26 mm cc. Su biometría (tabla 3) demuestra que crece en todas sus dimensiones (altura, anchura y profundidad) muy rápidamente hasta el feto de 37 mm cc., haciéndose su crecimiento más lento con posterioridad. Observamos también que el ángulo superior de la escápula de las series más jóvenes (24 y 26 mm cc.) corresponde a la sexta vértebra cervical mientras que en los embriones de mayor edad y en los fetos más pequeños (37, 40, y 60 mm cc.) este ángulo desciende hasta la primera vértebra dorsal. El ángulo inferior se sitúa en la 5ª costilla (embrión 24 mm cc.) descendiendo más tarde hasta la 6ª costilla (feto 60 mm cc.).

El desarrollo clavicular muestra un crecimiento muy regular y proporcionado entre su longitud y su anchura (tabla 1). En el embrión de 24 mm cc. la porción medial de la clavícula ya muestra su articulación esternal. Su porción externa está próxima al acromión, aunque no se aprecia articulación. En el feto de 37 mmcc., la clavícula, bien conformada, aumenta de grosor, sobre todo en su extremidad interna, a partir de esta edad vemos que el desarrollo clavicular muestra mayor tendencia al crecimiento longitudinal. En el embrión de 37 mm cc. la clavícula empieza a adoptar la forma de S itálica.

F) *Topografía visceral*. La posición del corazón es más elevada en los embriones más pequeños, descendiendo la punta cardíaca desde la cuarta vértebra dorsal (embrión de 24 mm cc.) a la quinta o sexta (feto de 60 mm cc.); de forma paralela lo hace el cayado aórtico, de la primera vértebra dorsal (embrión de 24 mm cc.) a la tercera (embrión de 60 mm cc.). En cuanto a los pulmones, en el embrión de 24 mm cc. los vértices pulmonares se sitúan a nivel de la tercera vértebra dorsal, correspondiendo a partir del feto de 33 mmcc. a la segunda vértebra dorsal, separados todavía de la parrilla costal. A su vez la bifurcación traqueal va descendiendo con la evolución del embrión, desde la segunda vértebra dorsal (embrión de 24 mm cc.) hasta la cuarta vértebra dorsal (feto de 60mm cc.).

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLAN, F. (1973): Lo esencial de la embriología humana. Edit. Manual Moderno. México.  
 AMELL-SANS, A. (1967): Embryology of the respiratory system. Enfermedades del tórax Barcelona, **16/62**: 265-283.  
 BELENKAYA, A. Y BALAKISHIEV, K. (1961): Anatomical and topographical relationships of the pericardium and diaphragm in foetus and newborn. Trudy vi Vses. Sezda Anat., Gistol. I Embriol. **1**: 1.165-1.171.  
 BRIZZI, E. (1965): The topography of fetal and newborn mediastinal organs. Arch. Ital. Anat. Embriol. **72/2**: 95-187.  
 CHEN, J. (1953): Experiments on the closure and segmentation of the sternal bands. J. Anat. **87**: 130-149.  
 KLIMA, M. (1968): Early development of the human sternum and the problem of homologization of the so-called suprasternal structures. Acta Anat. **69/4**: 473-484.  
 KOCH, A. (1960): Early clavicular development of man. Acta Anat. **12/3**: 177-212.

- MALM, E., y VERGA, A. (1955): Developpement de la cavite thoracique pendant la periode foetale. Et.-Neo-Nat. (Paris) **4/3**:165-172 Graphs 1 Tables 3 Illus. 1.
- MULLER, F., y ORAHILLY, R. (1986): Somitic-vertebral correlation and vertebral levels in the human embryo. Am. J. Anat. (USA) **177/1**:3-19.
- NIETO, J. L., GIMENO, A., y GASCON, A. (1986): Evolución morfológica de la pelvis en embriones humanos de 23 a 99 mm cc.. Actas XII C. S.A.E. (18) Sevilla.
- OLAH, A. y LUDWIG, K. (1971): The foetal development of the human sternoclavicular joint. Acat. Anat. (Aachen) **78/3**: 383-405.
- POPVA-LATKINA, N. (1961): On the development of the shape of the human thorax during the embryonic period. Doklady Biol. Sci. Sect. **135/1-6**: 886-889. Illus. 6.
- THOMPSON, R., SUMIDA, H., ABERCROMBIE, V. y col. (1985): Morphogenesis of human cardiac outflow. Anat. Rec. **213/4**:578-586.

Correspondencia: J.L. Nieto Amada  
Dpto. de Ciencias Morfológicas  
Facultad Medicina  
C/ Domingo Miral, s/n  
50009 Zaragoza. España

## **EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE ESTRÓGENOS SOBRE LAS CÉLULAS GONADOTROPAS DE LA ADENOHIPÓFISIS DE LA RATA MACHO**

## **EFFECTS OF NEONATAL ADMINISTRATION OF ESTROGENS ON GONADOTROPH CELLS OF THE ADENOHYPHYSIS OF THE MALE RAT**

**F.E. PASTOR, A. SÁNCHEZ, C. ZAMARRÓN, J.L. BLÁZQUEZ,  
B. PELÁEZ, 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 inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural de las células gonadotropas de la adenohipófisis de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley tratadas durante el primer mes de vida con 2 mg de valerianato de estradiol y sacrificadas a los 30, 75 y 150 días de edad. También se determinaron por radioinmunoanálisis los niveles séricos de LH y FSH. En todos los grupos de animales existe una marcada disminución del número de células LH inmunorreactivas. El tamaño de estas células está incrementado en las ratas sacrificadas a los 30 días de edad y disminuido a los 75 y 150 días. Las células gonadotropas de los animales sacrificados a los 30 y 75 días de edad tienen abundantes cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso. Los niveles séricos de LH están disminuidos en todos los grupos de animales. Los de FSH están disminuidos a los 30 y 75 días de edad.

**PALABRAS CLAVE:** Células gonadotropas. Adenohipófisis. Estrógenos. Rata.

### **SUMMARY**

An immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study was performed on the gonadotroph cells of the adenohypophyses of male Sprague-Dawley rats treated over the first month of life with estradiol valerate and sacrificed at 30, 75 and 150 days of life. The serum levels of LH and FSH were determined by radioimmunoanalysis. In all the groups of animals there was a marked decrease in the number of LH-immunoreactive cells. The size of these cells was increased in the rats sacrificed at 30 days and were decreased in those sacrificed at 75 and 150 days. The gonadotroph cells of the animals sacrificed at 30 and 75 days of age showed abundant dilated rough endoplasmic reticulum cisternae. Serum LH levels were decreased in all the groups of animals. Those of FSH were decreased at 30 and 75 days of age.

**KEY WORDS:** Gonadotroph cells. Adenohypophysis. Estrogens. Rat.

### **Introducción**

Además de las diferencias sexuales en cuanto a dotación cromosómica, gónadas, conductos genitales, genitales externos y esfera somática, hay dos funciones que están reguladas por el sistema nervioso central que muestran también diferencias entre sexos: la conducta sexual y ciertas funciones neuroendocrinas, principalmente el patrón de liberación de gonadotropinas, que es tónico en el macho y cíclico en la hembra.

Estas diferencias funcionales se explican por la existencia de un dimorfismo sexual en ciertas regiones del sistema nervioso central, involucradas en su regulación (véase Pastor y cols., 1990). El dimorfismo sexual se explica, en el caso de la rata y probablemente en otras especies, por la acción sobre el cerebro de los esteroides gonadales, que tiene lugar durante el período perinatal (véanse Arai y cols., 1986; Naftolin y cols., 1990), en el llamado «*período crítico de la diferenciación sexual del cerebro*». Concretamente, esta diferenciación se debe a la acción de la testosterona segregada por el testículo durante el período perinatal (Döhler y Wuttke, 1975; Weisz y Ward, 1980; MacLusky y Naftolin, 1981; Arnold y Gorski, 1984; Naftolin y cols., 1988), que actuando sobre la sinaptogénesis determina un patrón tónico de liberación de gonadotropinas característico del macho. En la hembra, al no existir andrógenos, al menos en la cantidad suficiente, no tiene lugar tal modificación sináptica y se produce una diferenciación en sentido femenino, caracterizada por un patrón cíclico de liberación de gonadotropinas. Ahora bien, la testosterona, que en el período perinatal alcanza una concentración en el hipotálamo del macho muy superior a la de la hembra (Rhoda y cols., 1983), es aromatizada a estradiol en el hipotálamo (Naftolin y cols., 1975; Naftolin y MacLusky, 1984), y es precisamente el estradiol hipotalámico, procedente de la aromatización de la testosterona el que determina las modificaciones sinápticas que dan lugar a un patrón de reproducción típico del macho (MacLusky y Naftolin, 1981; Arnold y Gorski, 1984; Naftolin y cols., 1988). La explicación de que los estrógenos ováricos en la hembra y los de origen placentario en el macho y en la hembra no tengan acción sobre el hipotálamo radica en el hecho de que son fijados por la alfa-fetoproteína, muy abundante durante el período neonatal, que no fija a los andrógenos (MacLusky y Naftolin, 1981; Arnold y Gorski, 1984).

El propósito del presente trabajo ha sido estudiar los efectos de la administración de dosis altas de estrógenos (valerianato de estradiol) durante el período neonatal sobre las células gonadotropas de la adenohipófisis de ratas machos.

## Material y técnicas

Como animal de experimentación se ha utilizado la rata albina macho de la cepa Sprague-Dawley. Treinta y seis animales fueron inyectados desde el segundo día de edad, por vía subcutánea, con una solución oleosa de valerianato de estradiol, utilizando como vehículo oleato de etilo. La administración se realizó cada 4 días, durante un mes; la dosis por inyección fue de 0.25 mg (en 0,1 mL) y la dosis total 2 mg. Doce de estos animales se sacrificaron a los treinta días de edad (grupo EST-30), otros doce a los setenta y cinco días (grupo EST-75) y los doce restantes a los ciento cincuenta días (grupo EST-150). Otros treinta y seis animales fueron inyectados, siguiendo las pautas anteriores, con ocho dosis de 0,1 mL de oleato de etilo, procediendo al sacrificio de igual manera. Doce animales se sacrificaron a los treinta días de edad (grupo COE-30), doce animales a los setenta y cinco días (grupo COE-75) y los otros doce a los ciento cincuenta días (grupo COE-150). Los animales fueron inyectados en todos los casos a la 10 horas y el sacrificio se realizó a las 17 horas.

Previamente al sacrificio las ratas fueron anestesiadas con tiopental sódico (30 mg/kg peso), procediéndose a extraer una muestra de sangre para la determinación por RIA de los niveles séricos de LH y FSH. A continuación los animales fueron sacrificados, destinándose la mitad de las ratas de cada grupo al estudio inmunohistoquímico y la otra mitad al estudio ultraestructural convencional.

*Estudio inmunohistoquímico.* Los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo del corazón con Bouin-Hollande sublimado. Finalizada la perfusión se extrajo la hipófisis, que fue dividida en dos mitades sagitales que permanecieron en el mismo fijador durante 24 horas. Posteriormente fueron lavadas, deshidratadas con alcohol e incluidas en parafina. Sobre cortes seriados de 10  $\mu$ m de espesor se realizó la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) según el proceder de Sternberger y cols. (1970), utilizando un antisuero específico contra LH de rata (UCB) y 3,3'-diaminobencidina como marcador. Los núcleos celulares fueron contrastados con hematoxilina.

*Estudio ultraestructural.* El sacrificio se realizó por decapitación, seguida de extracción rápida de la hipófisis, tallado e inmersión en glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4 °C, durante 24 horas. A

continuación se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en Durcupan (Fluka). Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800 y se estudiaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 201.

*Estudio morfométrico.* Se realizó sobre las preparaciones inmunohistoquímicas. Se seleccionaron de manera aleatoria 100 células inmunorreactivas para LH de cada grupo de animales, determinando con un analizador semiautomático de imágenes Ibas I Kontron las áreas celular y nuclear, obteniendo por la diferencia entre ambas el área citoplasmática, calculando posteriormente la relación núcleo/citoplasma. Para determinar el número de células inmunorreactivas por unidad de superficie (*densidad celular*) se contaron, en cada grupo de animales, las células LH presentes en 48 campos de 80500  $\mu\text{m}^2$  de tejido hipofisario; estos campos fueron elegidos al azar y no estaban superpuestos. Para analizar la significación estadística se utilizó la «t» de Student.

*Estudio radioinmunoanalítico.* Las muestras de suero fueron analizadas para LH y FSH usando un Kit específico NIAMDD para cada hormona. Los resultados (Tabla II) se expresan en términos de patrones NIAMDD rat-LH-RP-2 (valores normales de LH entre 0,3 y 1 ng/mL) y NIAMDD rat-FSH-RP-2 (valores normales de FSH entre 200 y 300 ng/mL).

## Resultados

En los animales sacrificados inmediatamente después de terminado el tratamiento estrogénico [grupo EST-30], llama la atención la manifiesta disminución del número de células inmunorreactivas para LH en la adenohipófisis, en relación con los animales controles [grupo COE-30] (véase Tabla I). El análisis morfométrico demuestra en los animales EST-30 una disminución muy marcada (70% en términos porcentuales) del número de células LH por unidad de superficie, así como un discreto incremento (16%) del área celular, con aumento del área citoplasmática, disminución del área nuclear y disminución de la relación núcleo/citoplasma. El estudio ultraestructural pone de manifiesto la existencia de dilataciones del retículo endoplásmico rugoso (RER) en algunas células gonadotropas.

En las ratas sacrificadas al mes y medio de concluir el tratamiento, los cortes de adenohipófisis teñidos para LH muestran una marcada disminución en el número de estas células en relación con los animales controles, como puede comprobarse en las figuras 1 (correspondiente al grupo COE-75) y 2 (perteneciente a un animal del grupo EST-75). El estudio morfométrico (Tabla I) demuestra una dramática disminución (86%) en la población de estas células, así como una disminución del área celular (20%), que se debe a una disminución tanto del área nuclear

TABLA I

Grupo	Densidad celular	Área celular	Área nuclear	Área citoplasmática	Relación núcleo/citoplasma
COE-30	73,56 ± 4,94	110,85 ± 14,03	30,52 ± 6,38	80,32 ± 15,74	0,40 ± 0,14
EST-30	22,00 ± 2,37 (*)	129,12 ± 20,86 (*)	27,94 ± 5,71 (*)	101,18 ± 21,73 (*)	0,29 ± 0,10 (*)
COE-75	54,69 ± 6,29	191,06 ± 33,03	34,16 ± 6,55	156,90 ± 33,95	0,23 ± 0,07
EST-75	7,50 ± 1,52 (*)	152,62 ± 37,62 (*)	29,42 ± 6,19 (*)	123,20 ± 36,32 (*)	0,20 ± 0,05 (*)
COE-150	41,06 ± 5,89	111,81 ± 16,32	19,99 ± 4,42	91,82 ± 16,66	0,23 ± 0,08
EST-150	15,44 ± 4,32 (*)	101,03 ± 14,72 (*)	29,17 ± 6,00 (*)	71,85 ± 15,86 (*)	0,44 ± 0,18 (*)

Todos los valores están expresados por media aritmética ± desviación típica.

Densidad celular = Número de células LH-inmunoreactivas/80.500  $\mu\text{m}^2$  de tejido adenohipofisario.

Las áreas celular, nuclear y citoplasmática están expresadas en  $\mu\text{m}^2$ .

Para evaluar la significación estadística se ha utilizado la «t» de Student (\* = p<0,001)

como de la citoplasmática, disminuyendo asimismo la relación núcleo/citoplasma. El examen ultraestructural pone de manifiesto que las células gonadotropas muestran un ergastoplasma muy profuso constituido por cisternas dilatadas (figs. 3 y 4); en estas imágenes resulta llamativa también la íntima asociación de adenocitos mamotropos y gonadotropos.

GRÁFICO 1. NIVELES SÉRICOS DE LH

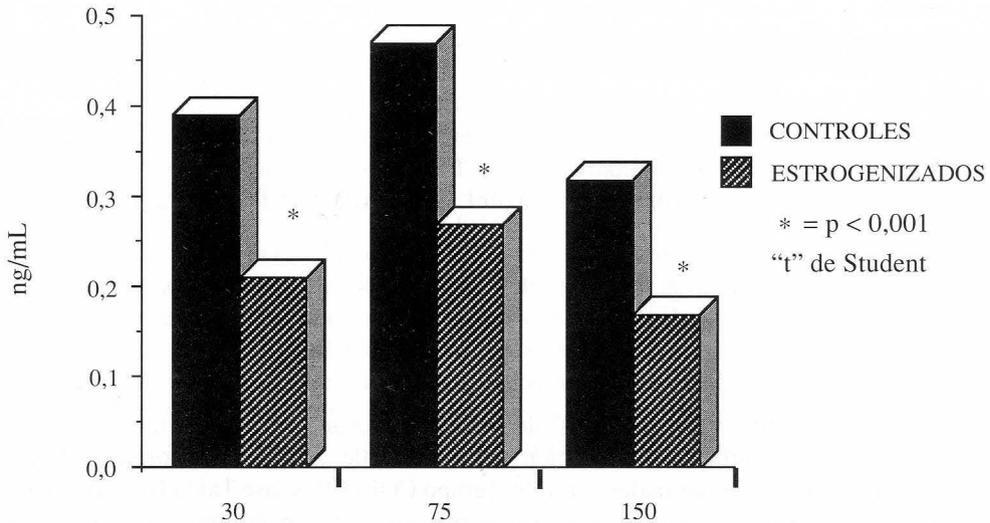


GRÁFICO 2. NIVELES SÉRICOS DE FSH

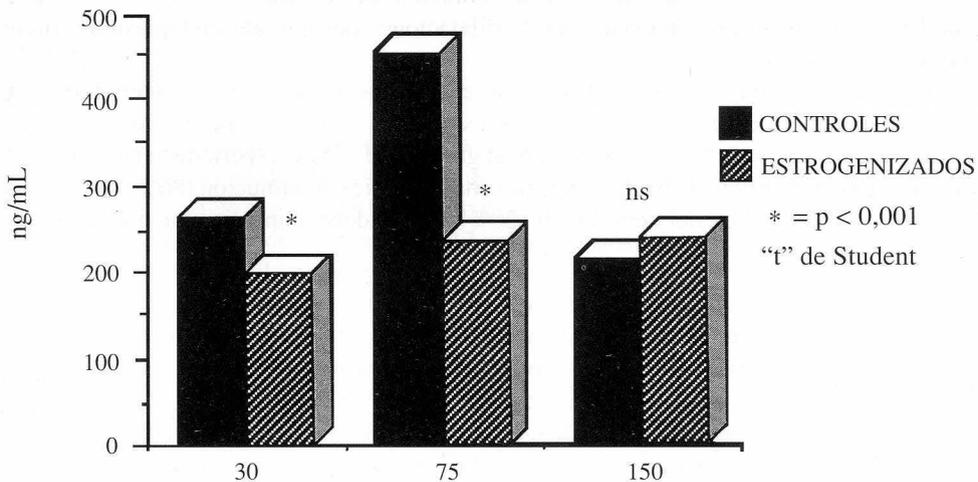
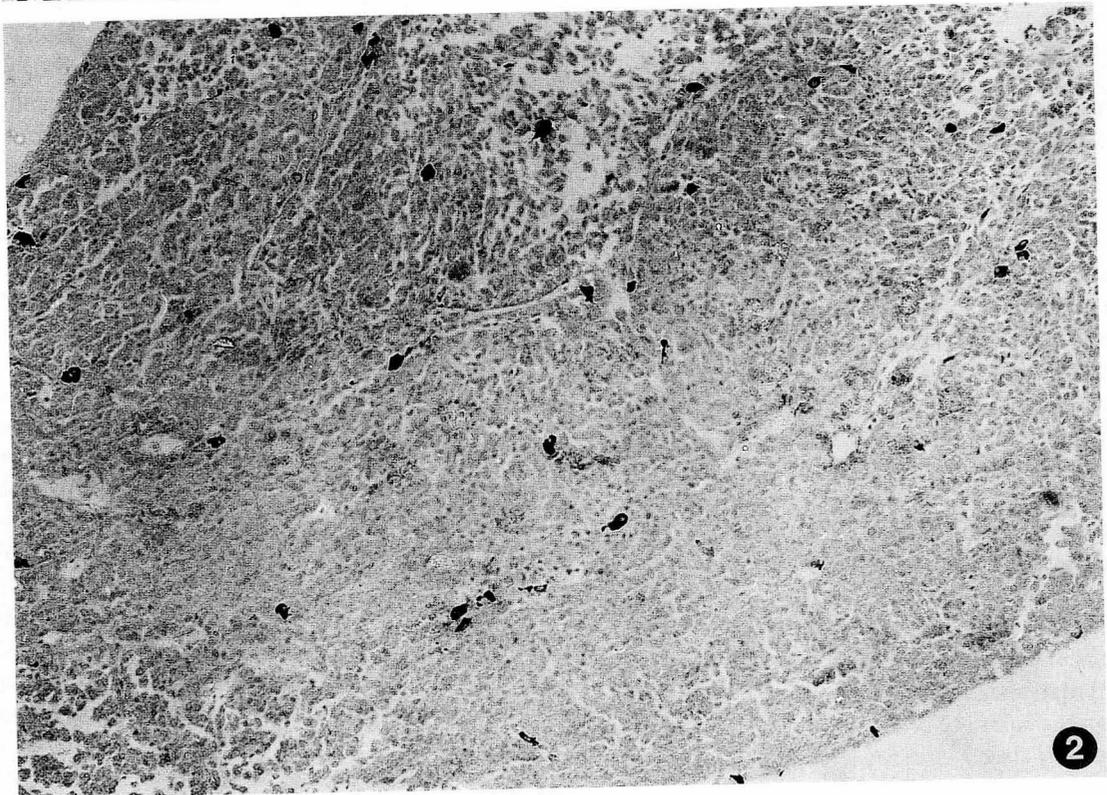
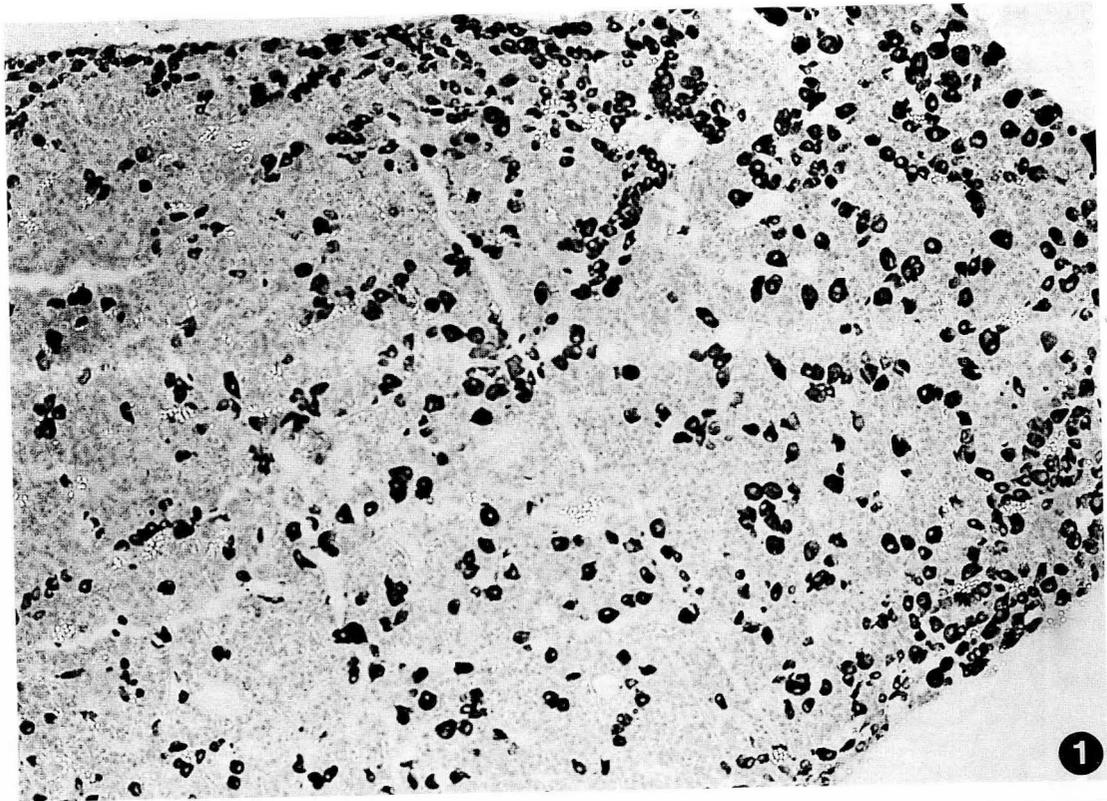


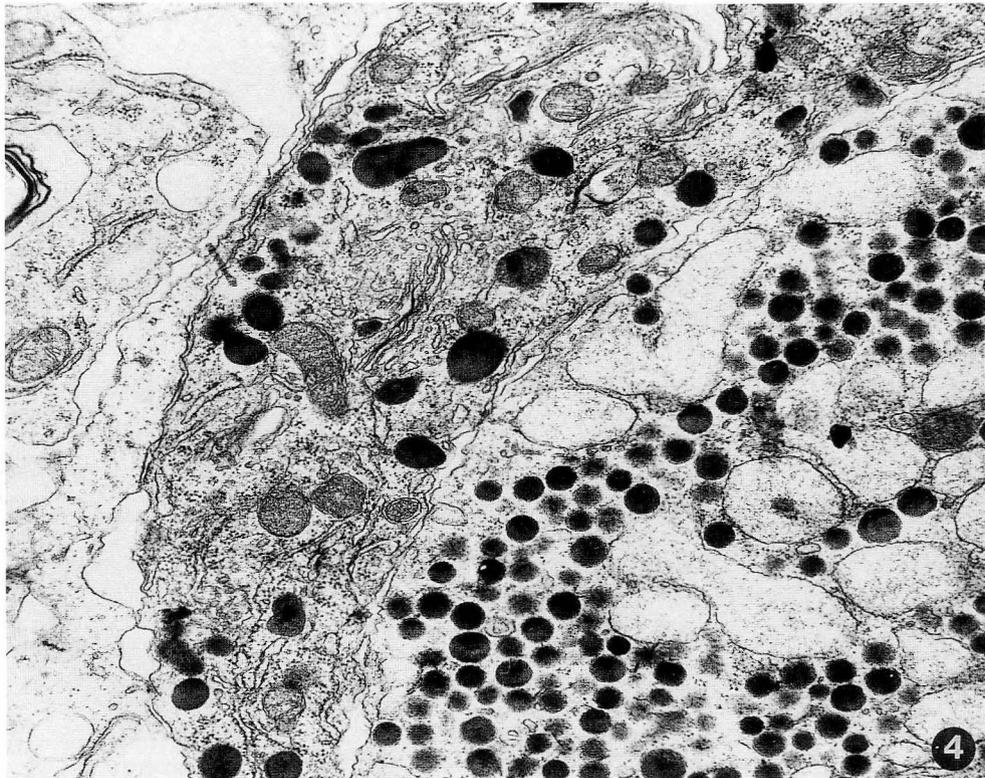
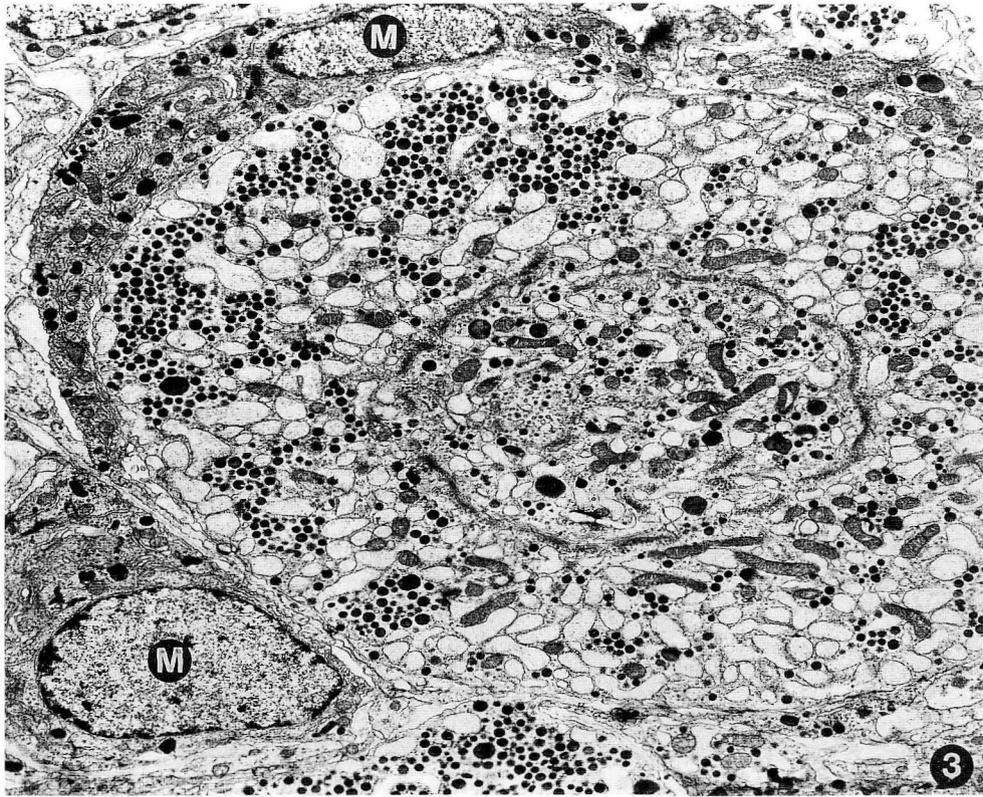
TABLA II

Grupo	Niveles séricos de LH (ng/mL)	Niveles séricos de FSH (ng/mL)	Mediciones realizadas
COE-30	0,39 ± 0,09	261 ± 10	12
EST-30	0,21 ± 0,05	198 ± 48	12
COE-75	0,47 ± 0,07	449 ± 75	12
EST-75	0,27 ± 0,10	232 ± 57	12
COE-150	0,32 ± 0,07	210 ± 57	12
EST-150	0,17 ± 0,02	236 ± 53	12



**FIGURA 1.** Rata macho inyectada con oleato de etilo durante el primer mes de vida y sacrificada a los 75 días de edad (COE-75). Tinción inmunohistoquímica para LH. Obj.: 10x.

**FIGURA 2.** Rata macho tratada con estrógenos durante el primer mes de vida y sacrificada a los 75 días de edad (EST-75). Tinción inmunohistoquímica para LH. Obsérvese la escasez de células inmunorreactivas. Obj.: 10x.



**FIGURA 3.** Micrografía electrónica de la adenohipófisis de una rata EST-75. Se observa un adenocito gonadotropo con un aparato de Golgi muy desarrollado y abundantes cisternas dilatadas de RER. En su inmediata vecindad se sitúan dos adenocitos mamotropos (M). 7450x.

**FIGURA 4.** Detalle a mayores aumentos (21900x) de la figura 3.

Al igual que ocurre en los grupos anteriores, en las ratas del grupo EST-150 la disminución de adenocitos inmunorreactivos para LH es patente, como se comprueba en el estudio morfométrico, que muestra una marcada disminución (62%) de la población de células LH y una discreta disminución (10%) del tamaño celular. Es un hecho curioso que las modificaciones de los tamaños nuclear y citoplasmático se realicen de forma opuesta, puesto que mientras el área nuclear experimenta un incremento, el área citoplasmática sufre una disminución; esto se traduce en un marcado incremento de la relación núcleo/citoplasma. El estudio ultraestructural pone de manifiesto la no existencia de modificaciones resaltables en las células gonadotropas. En este grupo de animales no se observan las dilataciones de RER que hemos podido apreciar en las células gonadotropas de los animales EST-30 y EST-75.

En los distintos grupos de animales experimentales de nuestra casuística existe una disminución del nivel sérico de LH (véanse gráfico 1 y la tabla II). No obstante, en las ratas estrogenizadas se observa un «pico» peripuberal de esta hormona, similar al de los animales controles aunque de menor intensidad. Los niveles de FSH están disminuidos estadísticamente en los animales sacrificados a los 30 y a los 75 días en relación con sus controles (gráfico 2 y tabla II), aunque sus valores se encuentran en los límites inferiores de normalidad. En las ratas sacrificadas 150 días después de terminar el tratamiento no existen diferencias significativas en los niveles séricos de FSH entre los animales estrogenizados [EST-150] y sus controles [COE-150].

## Discusión

Es sabido que los estrógenos ejercen un efecto inhibitor sobre las células gonadotropas de la adenohipófisis (Moore y Price, 1932). Con la utilización de técnicas inmunohistoquímicas se ha descrito una marcada regresión en el número de células gonadotropas (El Etreby y cols., 1977; El Etreby y Fath el Bab, 1978). Asimismo, los estrógenos disminuyen los niveles circulantes de LH y FSH (Verjans y cols., 1974; Grotjan y Steinberger, 1978), aunque curiosamente en cultivos adenohipofisarios estimulan la liberación de FSH en el caso de la rata (véase Miller y Wu, 1981).

Hasta el presente se desconoce el mecanismo exacto por el que los estrógenos inhiben la secreción de gonadotropinas. Uno de los posibles mecanismos podría ser la modificación de los niveles de dopamina. A su vez, la dopamina podría actuar a través de sus efectos sobre la liberación de LHRH (Weber y cols., 1983). No obstante, el papel de la dopamina sobre el control de la secreción de LH no está aclarado en absoluto (véanse McEwen y Parsons, 1982; Jones y Naftolin, 1990). De hecho se han descrito efectos facilitadores de la dopamina sobre la liberación de LH (Weiner y Ganong, 1978; Advis y cols., 1980; Negro-Vilar y cols., 1982), mientras que otros estudios han señalado efectos inhibidores (Gallo, 1978; Vijayan y McCann, 1978). También se ha sugerido que la hiperprolactinemia provocada por los estrógenos podría ser la causa de la disminución de los niveles de gonadotropinas, en especial de LH (Tresguerres y cols., 1981), aunque parecen existir datos que niegan esta posibilidad (véase Saade y cols., 1987).

Por otra parte, en la actualidad está demostrado que el estradiol hipotalámico, procedente de la aromatización de la testosterona, determina un patrón de secreción de gonadotropinas típico del macho (véase apartado de Introducción), interviniendo en la diferenciación sexual del hipotálamo.

En el presente estudio hemos utilizado dosis muy altas de estrógenos con la finalidad de bloquear la capacidad de fijación de la alfa-fetoproteína para que puedan alcanzar el sistema nervioso central. Nuestros resultados confirman la existencia de una marcada reducción en la población de adenocitos inmunorreactivos para LH en todos los grupos de animales tratados con estrógenos, lo que coincide con las observaciones de otros autores (El Etreby y cols., 1977; El Etreby y Fath el Bab, 1978). Pero por otra parte las modificaciones en los parámetros ultraestructuralmente en los animales del grupo EST-30.

En los animales sacrificados a los 75 días de edad, además de una dramática disminución de la población de células inmunorreactivas para LH, hemos comprobado una disminución tanto del área celular como de la citoplasmática de las mismas (véase Tabla I), si se comparan con los datos obtenidos en los animales controles. Ahora bien, si comparamos los parámetros área celular y área citoplasmática de los animales EST-75 con los de

los animales EST-30 observamos que están incrementados en aquéllos. ¿Qué significado pueden tener estas modificaciones? Creemos que para interpretarlas hay que tener en cuenta no sólo la comparación con los grupos controles sino también la evolución sufrida por las células LH en relación con la edad de sacrificio. En este sentido es interesante señalar que en los animales controles sacrificados a los 75 días de edad los parámetros relativos al tamaño celular y citoplasmático están muy incrementados con respecto a los de los animales controles sacrificados a los 30 y a los 150 días de edad. Este incremento es lógico si tenemos en cuenta que a los 75 días nos encontramos, en el caso de la rata, en pleno período peripuberal. El efecto inhibitorio de los estrógenos obviamente determina una disminución de los referidos parámetros en los animales sacrificados a los 75 días de edad, pero pese a ello estos parámetros son mayores que en los animales EST-30 y EST-150. Desde un punto de vista ultraestructural este hecho también se explica por el gran desarrollo del RER de las células gonadotropas de los animales EST-75, que tiene una apariencia similar al observado tras un corto período de evolución después de la castración (véase Sánchez y cols., 1991a).

Por otra parte, las modificaciones experimentadas por las células LH, en especial en lo referente a los parámetros área celular y área citoplasmática, permiten sugerir que si bien los estrógenos inhiben la liberación de gonadotropinas, no provocan una anulación de los mecanismos hipotalámicos desencadenantes de la pubertad. En efecto, tanto en los animales controles como en los tratados con estrógenos se observa un marcado incremento del tamaño celular y citoplasmático de las células LH durante el período peripuberal, esto es, en los animales de nuestra casuística sacrificados a los 75 días de edad. También está de acuerdo con esta interpretación el hecho de que los niveles séricos de LH de animales estrogenizados muestren un «pico» de esta hormona a los 75 días de edad (véanse gráfico 1 y tabla II), similar al observado en los animales controles, aunque de menor intensidad. Esto no ocurre con la FSH (véanse gráfico 2 y tabla II), que no muestra este «pico» a los 75 días en las ratas estrogenizadas, aunque sí aparece en las controles. El efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la FSH parece desaparecer antes que para la LH, pues en los animales sacrificados 120 días después de terminar el tratamiento los niveles de FSH son similares a los de las ratas controles, mientras que los de LH están disminuidos.

La íntima relación de vecindad entre adenocitos gonadotropos y mamotropos es muy evidente también en los animales estrogenizados, habiéndose supuesto que puede estar en relación con la existencia de interacciones paracrinas entre ambos tipos celulares (para referencias véase Sánchez y cols., 1991b).

### Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento al prof. Tresguerres (Universidad Complutense de Madrid) por la determinación de los niveles de LH y FSH, a la profesora P. Galindo por su inestimable ayuda en el estudio estadístico y a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín por su asistencia técnica.

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

### BIBLIOGRAFÍA

- ADVIS, J.; McCANN, S. y NEGRO-VILAR, A. (1980): Evidence that catecholaminergic and peptidergic (luteinizing hormone-releasing hormone) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, media basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. *Endocrinology*, **107**: 892-901.
- ARAI, Y.; MATSUMOTO, A. y NISHIZUKA, M. (1986): Synaptogenesis and neuronal plasticity to gonadal steroids: Implications for the development of sexual dimorphism in the neuroendocrine brain. En: *Morphology of hypothalamus and its connections*. (Ganten y Pfaff, eds.), pp. 291-307. Springer-Verlag, Berlin.
- ARNOLD, A.P. y GORSKI, R.A. (1984): Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **7**: 413-442.
- DÖHLER, K.D. y WUTTKE, W. (1975): Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. *Endocrinology*, **97**: 898-907.
- EL TREBY, M.F. y FHAT EL BAB, M.R. (1978): Effect of 17 $\beta$ -estradiol on cells stained for FSHb and/or LHb in the dog pituitary gland. *Cell Tissue Res.*, **193**: 211-218.

- EL ETREBY, M.F.; SCHILK, B.; SOULIOTI, G.; TÜSHAUS, U.; WIEMANN, H. y GÜNZEL, P. (1977): Effect of 17 $\beta$ -estradiol on cells of the pars distalis of the adenohypophysis in the beagle bich. An immunocytochemical and morphometric study. *Endokrinologie*, **69**: 202-216.
- GALLO, R. (1978): The effects of blockage of dopamine receptors in the inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rats. *Endocrinology*, **102**: 1026-1034.
- GROTJAN, H.E. y STEINBERGER, E. (1978): On the relative biological and immunoreactive potencies of LH in the E2 treated male rats. *Acta Endocrinol.*, **89**: 538-550.
- JONES, E.E. y NAFTOLIN, F. (1990): Estrogens effect on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Res.*, **510**: 84-91.
- MacLUSKY, N.J. y NAFTOLIN, F. (1981): Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, **211**: 1294-1303.
- McEWEN, B.S. y PARSONS, B. (1982): Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**: 555-598.
- MILLER, W.L. y WU, J. (1981): Estrogen regulation of follicle-stimulating hormone production in vitro: species variation. *Endocrinology*, **108**: 673-679.
- MOORE, C.R. y PRICE, D. (1932): Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex antagonism. *Amer. J. Anat.*, **50**: 13-72.
- NAFTOLIN, F. y MacLUSKY, N.J. (1984): Aromatization hypothesis revisited. En: *Sexual differentiation: basic and clinical aspects.* (Serio, Motta, Zanisi y Martini, eds.), pp 79-82. Raven Press, Nueva York.
- NAFTOLIN, F.; RYAN, K.; DAVIES, I.; FLORES, F.; PETRO, Z.; KUHN, M.; WHITE, R.; TAKAOKA, Y. y WOLIN, L. (1975): The formation of steroids by central neuroendocrine tissue. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **31**: 295-319.
- NAFTOLIN, F.; MacLUSKY, N.J.; LERANTH, C.; SAKAMOTO, H.S. y GARCÍA-SEGURA, L.M. (1988): The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. *J. Steroid Biochem.*, **30**: 195-207.
- NAFTOLIN, F.; GARCÍA-SEGURA, L.M.; KEEFE, D.; LERANTH, C.; MacLUSKY, N.J. y BRAWER, J.R. (1990): Estrogen effects on the synaptology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Biol. Rep.*, **42**: 21-28.
- NEGRO-VILAR, A.; ADVIS, J.; OJEDA, S. y McCANN, S. (1982): Pulsatile luteinizing hormone release pattern in ovariectomized rats: involvement of norepinephrine and dopamine in the release of LH-releasing hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology*, **111**: 932-938.
- PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, G.; HERNÁNDEZ HOLGADO, M.T.; TORANZO, D.; ÁLVAREZ MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1990): Dimorfismo sexual del núcleo arcuato del hipotálamo de rata. *An. Anat.*, **36 (núm. extr.)**: 241-244.
- RHODA, J.; CORBIER, P. y ROFFI, J. (1983): Hypothalamic testosterone increase in the male rat at birth. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **1**: 187-190.
- SAADE, G.; LONDON, D.R. y CLAYTON, R.N. (1987): Effect of estrogen treatment on gonadotroph function in adult male rats. *J. Endocrinol.*, **114**: 95-101.
- SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G. y AMAT, P. (1991a): Células LH de la adenohipófisis de la rata macho castrada. Estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural. *An. Anat.* (en prensa).
- SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G. y AMAT, P. (1991b): Sobre las relaciones morfofuncionales entre los adenocitos gonadotropos y mamotropos en la adenohipófisis de rata. *An. Anat.* (en prensa).
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J. y MEYER, H.G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry. 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.
- TRESGUERRES, J.A.F.; ESQUIFINO, A.I.; PÉREZ MÉNDEZ, L.F. y LÓPEZ-CALDERON, A. (1981): Possible role of prolactin in the inhibitory effects of estradiol on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the rat. *Endocrinology*, **108**: 83-87.
- VERJANS, H.L.; DE JONG, F.H.; COOKE, B.A.; VAN DER MOLEN, H.J. y EIK-NES, K.B. (1974): Effect of estradiol benzoate on pituitary and testis function in the normal adult male rat. *Acta Endocrinol.*, **77**: 636-642.
- VIJAYAN, E. y McCANN, S. (1978): The effect of systemic administration of dopamine and apomorphine on plasma luteinizing hormone and prolactin concentrations in conscious rats. *Neuroendocrinology*, **25**: 221-235.
- WEBER, R.F.A.; DEGREEF, W.J.; DE KONONG, J. y VREEBURG, J.T.M. (1983): LH-RH and dopamine levels in hypophysial stalk plasma and their relationship to plasma gonadotrophins and prolactin levels in male rats bearing a prolactin and adrenocorticotrophin secreting pituitary tumor. *Neuroendocrinology*, **36**: 205-210.
- WEINER, R.I. y GANONG, W.F. (1978): Role of the brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol. Rev.*, **58**: 905-976.
- WEISZ, J. y WARD, I.L. (1980): Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*, **106**: 306-316.

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

**ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DEL NERVIÓ ÓPTICO DE LA RATA.  
I: EN EL FETO «A TÉRMINO»**

**MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL STUDY IN THE RAT OPTIC NERVE.  
I: IN FETUSES AT THE END OF PRENATAL PERIOD**

**M.D. PINAZO-DURÁN, V. SMITH-FERRES y V. SMITH-ÁGREDA**

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

**RESUMEN**

El Nervio Óptico (NO) ha sido ampliamente utilizado para el estudio de su propio desarrollo, de los procesos patológicos que le implican directamente y de otros relacionados con el Sistema Nervioso Central (SNC). En la actualidad, la Neuromorfología del desarrollo es un campo sumamente atractivo para múltiples investigaciones. En este trabajo preliminar realizado en fetos de 21 días de gestación sobre el NO de la rata, hemos efectuado un estudio a microscopía óptica y electrónica, describiendo las células gliales y axones ópticos al final de la fase prenatal y también un análisis morfométrico y estereológico de nuestros resultados.

**PALABRAS CLAVE:** Glioblasto. Axones ópticos. Desarrollo. Malformación congénita. Hipoplasia del nervio óptico.

**SUMMARY**

The Optic Nerve (ON) has been used on the study of his development and diverse pathogenic processes, anyway in othereones closely conected with the Central Nervous System (CNS). Today considerable research is doing about the Neuromorphology of the development. In this preliminar work in the ON of the rat fetuses at the end of gestation (21st day) we have done a light and electron microscopy study in order to describe the glial cells and optic axons during prenatal period and too a morphometric and stereologic analisis of all our findings.

**KEY WORDS:** Glioblast. Optic axons. Development. Congenital malformation. Optic nerve hipoplasia.

**Introducción**

Es bien conocida la especial susceptibilidad del NO que excede a otras áreas del SNC en procesos patológicos diversos (encefalomielitis, esclerosis múltiple, tóxicos, etc.) (8). La porción yuxta-ocular del NO presenta algunos hechos anatómicos que pueden ser importantes en la presentación de estas enfermedades (9 y 13). Por esto, muchos autores lo utilizan para estudiar procesos que le conciernen directamente y otros relacionados con el SNC. (1, 3, 14, 15, 16, 18 y 19). Es importante conocer el desarrollo de los componentes del NO durante su evolución. Hemos basado nuestros estudios en los componentes fundamentales del NO: células macrogliales y axones ópticos. Asumiendo que el día 21 de gestación en la rata resume todos los acontecimientos de la evolución prenatal del NO, este trabajo se ha efectuado en fetos «a término».

El/los mecanismo/s por los que las células del SNC se reconocen e interaccionan entre sí durante su desarrollo adquieren especial importancia en la fase prenatal, pues de su integridad dependen los procesos de proliferación y diferenciación celular que ocurren tras el nacimiento. Las células neuroepiteliales del tubo neural dan lugar a: células endoteliales, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (todas constituyentes del SNC) no conociéndose aún los factores que determinan la diferenciación en una u otra estirpe (12 y 16). El NO no tiene cuerpos neuronales, tan sólo los axones de las células ganglionares constituidos en fibras del NO, elementos del tejido conectivo y de la neuroglia, además de pequeños vasos nutricios, nervios y los grandes vasos retinianos (7 y 13).

El NO de la rata adulta contiene 3 tipos de células macrogliales: Astrocitos tipo I, Astrocitos tipo II y Oligodendrocitos (17). Es posible que la alteración de los elementos de la neuroglia y de los axones ópticos durante el desarrollo prenatal del NO constituyan anomalías estructurales que puedan derivar en defectos congénitos como los observados, entre otros, en la hipoplasia del NO (10).

## Material y métodos

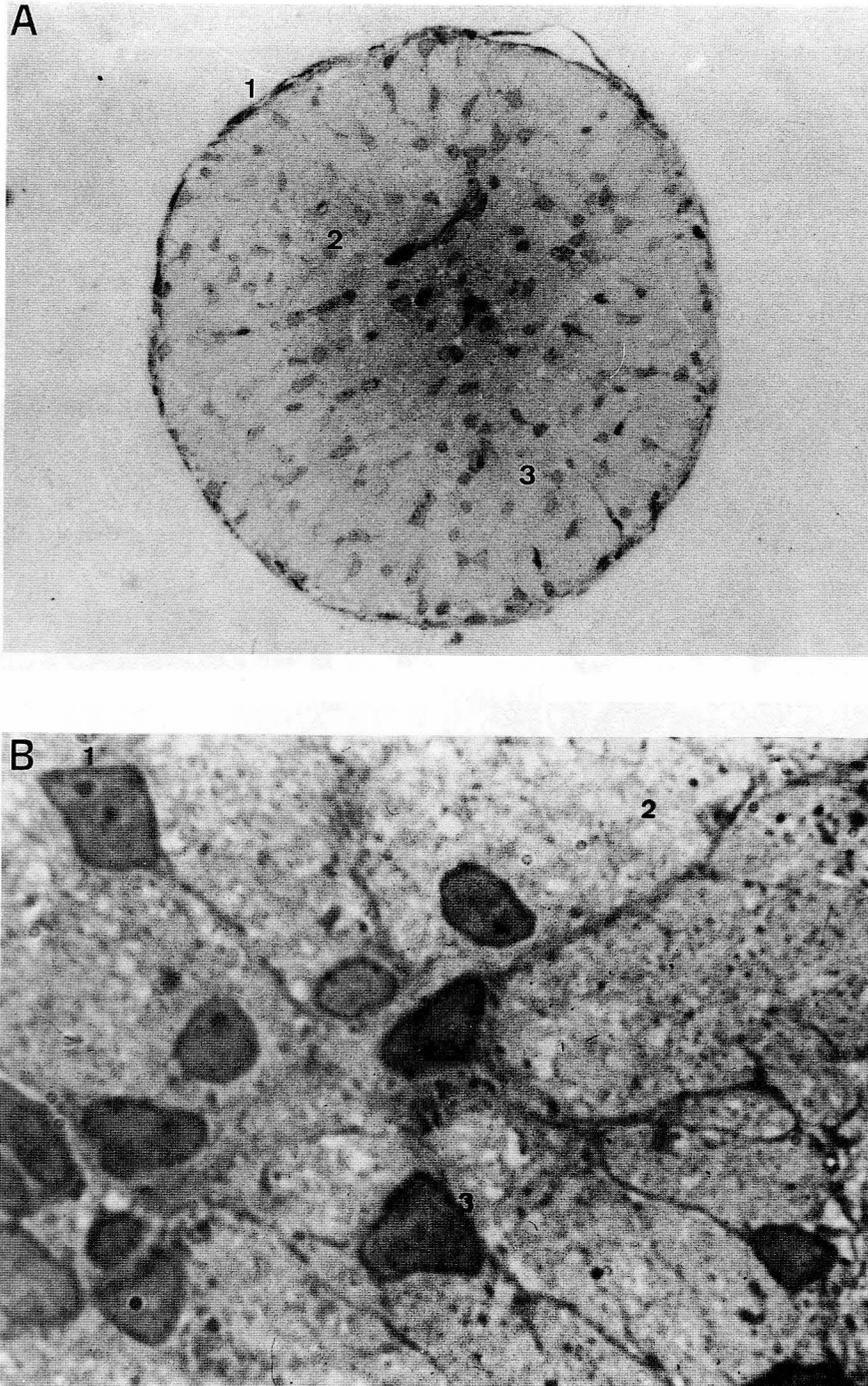
Hemos utilizado 4 ratas hembras vírgenes de la raza Wistar, con peso inicial de 175-200 g alimentadas mediante dieta Standard (pienso Sanders y agua *ad libitum*). Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (23°C), humedad (60%) y ciclos luz-obscuridad (12h.). Cada rata se cruzó con un macho de la misma especie hasta conseguir la gestación. Confirmado el embarazo se vigiló diariamente el estado nutricional de las gestantes. A los 21 días de la gestación se sacrificaron las ratas y se extrajeron los fetos que se pesaron y examinaron. Tras decapitarlos se incidió el cráneo por la línea media, extrayendo el cerebro que se pesó, procediendo a visualizar el quiasma óptico y los NO. Se extrajeron ambos globos oculares seccionando el NO de 1-3 mm por detrás del ojo en unos y a su salida del mismo en otros. Las piezas obtenidas se fijaron en solución de glutaraldehído 2% y formaldehído 3% en tampón cacodilato 0,1M. y pH 7,4. A los 30 minutos se extrajeron para cortar el globo ocular por el ecuador e introducirlos en la solución, nuevamente hasta completar 2h. Posteriormente se tiñeron en solución de tetraóxido de osmio 1%, deshidratando sucesivamente e incluyendo en Durcupan. Cada bloque convenientemente orientado se cortó en ultramicrotomo III LKB para obtener secciones transversales semifinas (1µm.) y ultrafinas (0,5 µm.) que teñidas respectivamente con azul de Toluidina y mediante el método de Reynolds, se observaron al microscopio óptico y electrónico, realizando microfotografías x 320 u x 1.250 y electronomicrografías x 7.300 u x 15.000, ampliando fotográficamente a niveles 3 y 7 para el estudio morfométrico según trabajos previos (6,20). Los resultados están expresados como: Media ± Desviación estándar y/o Media ± Error estándar.

## Resultados

1) *Datos del Modelo Experimental.* La ingesta calórico-proteica es constante durante la gestación (Tabla I). Los pesos corporales, cerebrales y oculares de los fetos se muestran en la Tabla II.

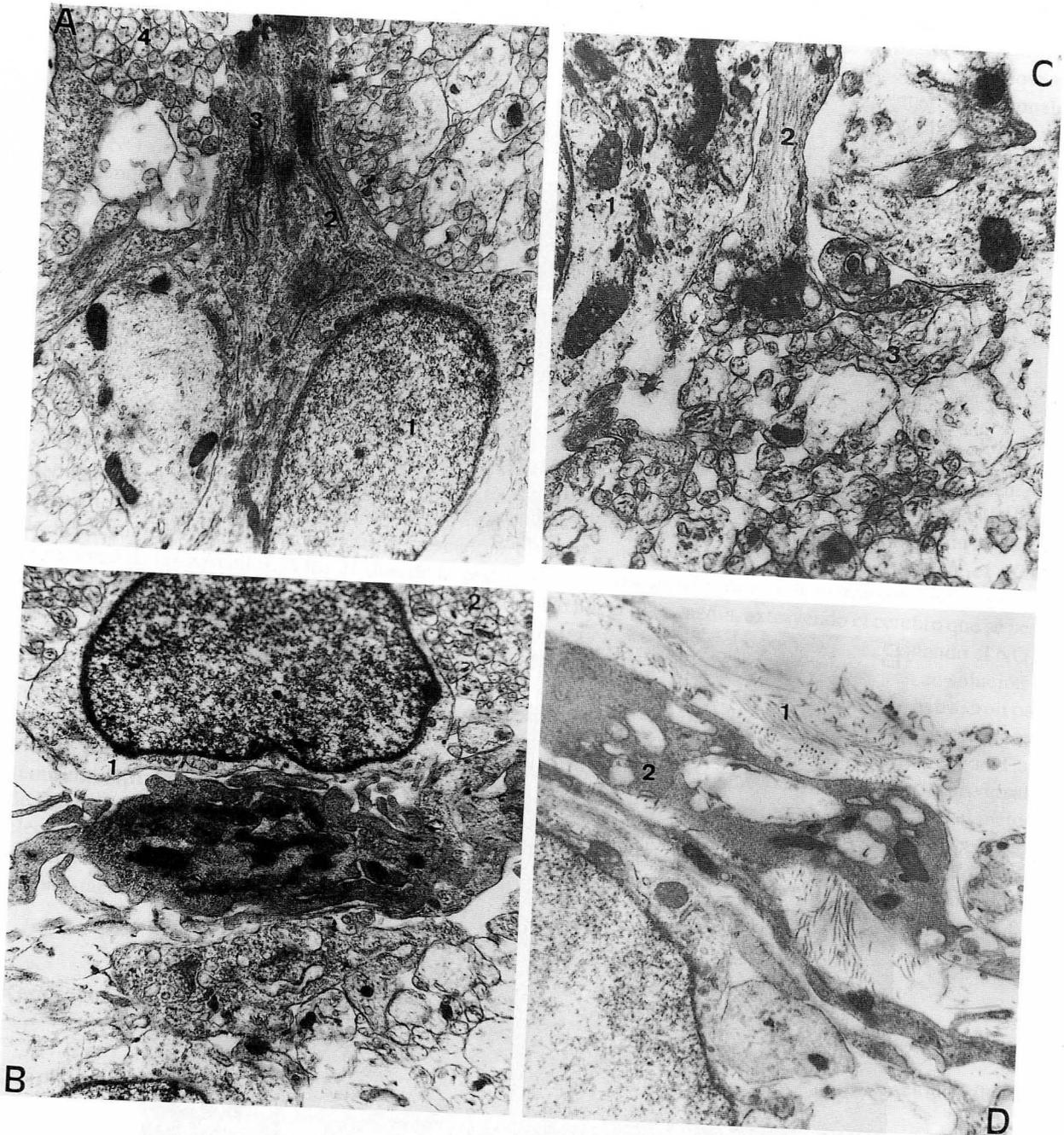
2) *Resultados Cualitativos.* El estudio morfológico de la sección transversal del NO en los fetos «a término» nos permite observar la forma redondeada del mismo y la apariencia delgada de las membranas exteriores. Contrastando con el abundante espacio extracelular destaca el relativamente escaso número de elementos neurogliales (Fig. 1-A). Los hemos identificado como *Glioblastos* y entre ellos predominan los *Astroblastos* de formas geométricas, también algunos *Oligodendroblastos* aislados, y *Células precursoras gliales* (Fig. 1-B). El núcleo de los astroblastos es oval y contiene cromatina condensada pero bastante escasa, visualizando igualmente la membrana nuclear y uno o dos nucleolos. En el citoplasma se observan orgánulos como RER, mitocondrias y elementos del citoesqueleto tales como Filamentos Intermedios (Fig. 2-A). Algunos de los astroblastos han sido identificados como del tipo I, que emiten los procesos celulares radiales hacia los vasos sanguíneos y la superficie

FIG . 1



**FIGURA 1.** Microfotografías de la sección transversal semifina del nervio óptico fetal a los 21 días de gestación. Tinción: azul de Toluidina.  
A) x 320. 1) Membranas exteriores del NO. 2) Glioblastos. 3) Espacio Extracelular.  
B) x 1.250. 1) Glioblasto en el que se evidencia el núcleo y nucleolo. 2) Espacio Extracelular. 3) Astroblasto.

FIG. 2



**FIGURA 2.** Electronmicrografías de la sección transversal ultrafina del nervio óptico fetal a los 21 días de gestación. Tinción: Método de Reynolds.

A) x 7.300. Astroblasto. 1) Núcleo y membrana nuclear. 2) Citoplasma y cisternas de REr. 3) Mitocondrias. 4) Axones ópticos.

B) x 7.300. Astroblasto tipo I. 1) Proceso celular hacia un vaso sanguíneo. 2) Axones ópticos.

C) x 7.300. Astroblasto. 1) Proceso celular. 2) Filamentos Intermedios. 3) Axones ópticos.

D) x 7.300. Membrana externa del NO. 1) Fibras de colágena. 2) Meningoblasto.

TABLA I

## INGESTA CALÓRICO-PROTEICA DURANTE LA GESTACIÓN

<i>Ingesta calórica</i>	<i>kcal./kg. peso</i>
1ª semana	250 ± 24
2ª semana	285 ± 13
3ª semana	254 ± 5
<i>Ingesta proteica</i>	<i>gr./kg. peso</i>
1ª semana	11,6 ± 1,3
2ª semana	12,4 ± 0,6
3ª semana	10,1 ± 0,51

n=4

Ingesta calórico-protéica diaria durante la gestación de la rata

TABLA II

Peso corporal	8,72 ± 1,65 g
Peso cerebral	0,36 ± 0,06 g
Peso ocular OD	18,1 ± 1,47 mg
Peso ocular OI	18,6 ± 1,51 mg

n=8

Estudio de los pesos corporal, cerebral y ocular en el feto de rata «a término»

TABLA III

## ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL NERVIO ÓPTICO

Feto de rata (21 días de gestación)

Diám. medio axones opt.	0,01 ± 0,002 $\mu\text{m}$
Áreas nucleares cel. gliales	3,69 ± 1,10 $\mu\text{m}^2$
Vol. nucleares cel. gliales	10,89 ± 2,30 $\mu\text{m}^2$
Área media secc. nerv. opt.	2.592 ± 339 $\mu\text{m}^2$
Diam. medio secc. nerv. opt.	56,6 ± 3,90 $\mu\text{m}$
Espesor membrana nerv. opt.	0,15 ± 0,01 $\mu\text{m}$
Nº cel. gliales/secc.	140,0 ± 12,2 $\mu\text{m}$
Densidad glial/secc.	0,051 cel/ $\mu\text{m}^2$
Nº axones/secc.	62.500 ± 3.250 cel/ $\mu\text{m}^2$

n=8

Estudio morfométrico y análisis estereológico de la sección transversal del nervio óptico de la rata, en el feto «a término»

del NO (Manto astrocitario de Graefex) (Fig. 2-B). Los procesos citoplasmáticos comienzan a extenderse de forma estelar y en ellos pueden verse RER, ribosomas, mitocondrias y Filamentos Intermedios (Fig. 2-C). Los oligodendroblastos son escasos y su núcleo es redondeado u oval, presentando un citoplasma claro. Los axones ópticos son muy numerosos, pequeños, redondeados y uniformes, encontrándose todos en fase amielínica. Poseen un axoplasma claro en el que se distinguen microtúbulos y mitocondrias y en algún caso cisternas de RER. Podemos diferenciarlos de las células y sus procesos por la ausencia en su axoplasma de ribosomas u otros gránulos. Ultraestructuralmente la membrana exterior del NO en el feto presenta 3 capas bien definidas: exterior o Duramadre, intermedia o Aracnoides e interna o Piamadre que contacta con la sustancia propia del NO. Contiene elementos celulares inmaduros que identificamos como meningoblastos y fibras elásticas y colágenas. (Fig. 2-D).

3) *Resultados cuantitativos*. El estudio morfométrico y análisis estereológico de la sección transversal del NO en el feto «a término» nos muestra en la Tabla III los diferentes parámetros estudiados y sus resultados respectivos.

## Discusión

Al asumir que el final de la gestación nos resume todos los acontecimientos que ocurren durante las fases embrionaria y fetal, nos encontramos también con que éste es un periodo de transición entre la etapa pre- y postnatal. Muchos de estos elementos pueden mostrar ciertas características comunes o límite entre ambas etapas. En nuestros hallazgos morfológicos en el NO de ratas fetales observamos que todos los elementos celulares son inmaduros, desde los meningoblastos de las membranas envolventes del NO a los glioblastos de la sustancia propia. Según varios autores (4 y 12) la gliogénesis comienza cuando se visualizan algunos astroblastos en los últimos días de la gestación. La evidencia de diferenciación astrobástica más precoz es la formación y extensión de sus procesos celulares (7). Nosotros los hemos constatado en el NO de la rata el día 21 prenatal correspondiendo la mayor densidad celular a los astroblastos, de acuerdo con otros autores (3, 4, 16). Los oligodendroblastos, por el contrario, son aún escasos en esta fase pues desarrollan un poco más tarde y muestran menor variedad morfológica que los astroblastos. Todas las descripciones coinciden con las de células inmaduras de citoplasmas claros (7, 11, 15 y 16). Los axones ópticos presentan una morfología característica. Son muy numerosos y están desprovistos de mielina (5 y 18). Estudios al respecto confirman la disminución en el número de oxones ópticos en el periodo comprendido entre el fin de la gestación y la primera semana de vida postnatal de la rata (1 y 5), que posiblemente es debido a los fenómenos de muerte y redistribución celular que acontecen durante el desarrollo del SNC (7 y 18). No obstante este proceso «normal» podría alterarse bajo ciertas condiciones, conduciendo a una pérdida exagerada de axones ópticos, incompatible con una buena función visual (1, 2 y 12) y aún más en el caso de anomalías genéticas, inflamaciones o exposición a tóxicos (9, 10 y 19) que podrían causar atrofia parcial o total del NO, hipoplasia del mismo, etc.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BALASZI, A.G.; ROOTMAN, J.; DRANCE, S.M.; SCHULZER, M. y DOUGLAS, G.R. (1984). The effect of age on the nerve fiber population of the human optic nerve. *Am. J. Ophthal.* **97**: 760-766.
2. BEDI, K.S. y WARREN, M.A. (1983): The effects of undernutrition during early life on the rat optic nerve fiber number and size. Frequency distribution. *J. Comp. Neurol.* **219**: 125-132.
3. BOSOW, H. (1980): The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals, a special glial for the ganglion cells axons. *Cell Tissue Res.* **206**: 367-378.
4. CIMA, CH. y GRANT, P. (1980): Ontogeny of the retina and optic nerve of *Xenopus Laevis*. IV: Ultrastructural evidence of early ganglion cell differentiation. *Dev. Bio.* **76**: 229-237.
5. CRESPO, D.; O'LEARY, D. y COWAN, M. (1985): Changes in the number of optic nerve fibers during late prenatal and postnatal development on albino rat. *Dev. Brain Res.* **19**: 129-134.
6. CRUZ-ORIVE, L.M. y WEIBEL, E.R. (1981): Sampling designs for stereology. *J. Microscopy.* **122**: 235-257.

7. DÍAZ-FLORES, L.; ORTIZ-URDIAIN, G. y SÁNCHEZ-SALGADO, G. (1974): Sistema Nervioso: Bases ultraestructurales en citología, histología y anatomía patológica. Santiago de Compostela.
8. GUY, J. y RAO, N.A. (1984): Acute and chronic experimental optic neuritis. Alteration in the blood optic nerve barrier. *Arch. Ophthalmol.* **102**: 450-308.
9. HAMARD, H.; CHEVALERAND, J. y RONDOT, P. (1986): Neuropathies optiques. *Rap. Ann. Soc. Fr. Ophtal.* **2**: 301-308.
10. MARGALITH, D.; JAN, E.E.; MC CORMICK, A.Q.; TZE, W.J. y LAPOINTE, J.(1984): Clinical spectrum of congenital optic nerve hypoplasia: review of 51 patients. *Dev. Med. Child Neurol.* **26**: 311-322.
11. MORI, S. y LEBLOND, C.P. (1980): Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. *J. Comp. Neurol.* **139**: 1-30.
12. NG, A.Y.G. y STONE, J. (1982): The optic nerve of the cat: Apperance and loss of axons during normal development. *Dev. Brain Res.* **5**: 263-271.
13. POLYAK, S. (1957): The vertebrate visual system. Heinrich Klüver Ed. The University of Chicago Press.
14. POSTON, M.R.; FREDIEU, J.; CARNEY, P.R. y SILVER, J. (1988): Roles of glia and neural crest cells in creating axons pathways and boundaries in the vertebrates central and peripheral nervous system. Parnavelas, Stirling and Stern Eds. Oxford University Press.
15. PRIVAT, A. y FULCRAND, J. (1977): Neuroglia from the subventricular precursor to the mature cell. *Cell Tissue and Organ Cul. in Neurobiol. Academic Pres. New York.*
16. RAFF, M.C. (1983): A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**: 390-396.
17. RAFF, M.C. (1989): Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science.* **243**: 1.451-1.455.
18. RAMÓN Y CAJAL, S. (1909): *Histologie du systeme nerveux de l'home et des vertebres.* Maloine. París.
19. SARAUX, H; LEMASSON, C.; OFFRET, H. y RENARD, G. (1985): *Anatomía e histología del ojo.* Ed. Masson. Barcelona.
20. WENDER, M. y GONCERZEWICZ, M. (1986): Morphometric studies of the developing optic nerve in Wistar rats. *Neuropatol. Pol.* **241**: 109-123.

Correspondencia: Dra. María Dolores Pinazo-Durán  
Oftalmólogo  
Av. Barón de Cárcer, 14  
46001 Valencia. España

## ESTUDIO DE LA MUERTE NEURONAL EN EL HIPOCAMPO Y DEL COMPORTAMIENTO EN RATAS GESTADAS EN MADRE NORMAL Y LACTADAS EN NODRIZA ALCOHÓLICA

## A STUDY OF NEURONAL DEATH IN THE HIPPOCAMPUS AND OF THE BEHAVIOUR IN RATS GESTATED BY NORMAL MOTHER AND LACTANT IN ALCOHOLIC NURSE

I. SMITH-FERNÁNDEZ, I. FERNÁNDEZ-ORTEGA, P. SALINAS y V. SMITH-FERNÁNDEZ

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

### RESUMEN

Se estudia en dos grupos de ratas Wistar lactantes, su comportamiento y las áreas hipocampales CA1, CA2, CA3, *Subiculum* y *Gyrus dentatus*.

El grupo I: son gestadas en madre normal, y lactadas de su madre normal.

El grupo II: son gestadas en madre normal pero lactadas en nodriza alcohólica crónica.

Se comparan los resultados obtenidos en su comportamiento, y en cada área hipocampal sobre curvas de recuentos neuronales, y de la superficie relativa (% de la superficie total del hipocampo en cada edad).

**PALABRAS CLAVE:** Alcoholismo postnatal. Alcoholismo crónico. Muerte neuronal. Comportamiento. *Hippocampus*. CA1, CA2, CA3, *Subiculum*. *Gyrus dentatus*. Lactancia. Lactancia alcohólica. Wistar. Rata. Desarrollo postnatal.

### SUMMARY

We have studied in two groups of Wistar white rats their behaviour and the hippocampal areas CA1, CA2, CA3, subiculum and dentatus gyrus.

Group I: are gestated in normal mother and lactated in their normal mother.

Group II: are gestated in normal mother but lactated in chronic alcoholic nurse.

Results about their behaviour are compared, and in each one of the hippocampal area on curves of neuron counts and of the relative surface (% of total hippocampus surface in each area for each age).

**KEY WORDS:** Postnatal alcoholism. Chronic alcoholism. Neuronal death. Behaviour. Hippocampus. CA1. CA2. CA3. Subiculum. Dentatus gyrus. Lactation. Alcoholic lactation. Postnatal development. Wistar rat.

### Introducción

Una de las drogas objeto de mayor reflexión y estudio ha sido el alcohol por la gran cantidad de trastornos que produce. Numerosos modelos alcohólicos animales han sido experimentados, si bien ninguno es perfecto (7 y 8).

El hipocampo ha sido intensamente estudiado con diferentes métodos (1, 2, 3, 4, 9 y 13) y mas recientemente por Swanson (16).

La muerte neuronal durante el desarrollo del S.N. es un hecho admitido (2 y 10). Ha sido estudiada en casi todos los niveles tanto en el S.N.C. como en el periférico. La teoría más aceptada para explicar esta muerte es la basada en la competición por alcanzar la diana en la que establecer sinapsis. En esta competencia degenerarían las que no lo consiguen (6).

Nuestro trabajo pretende aportar al estudio del desarrollo postnatal del hipocampo de la rata que habiendo tenido un desarrollo prenatal normal, al obligarla a lactar en nodriza alcohólica, el etanol influye en su desarrollo postnatal.

## Material y método

Dos grupos de ratas Wistar: I (gestación y lactancia normales), II (gestación normal y lactancia alcohólica).

Las nodrizas alcohólicas se consiguieron adicionando a hembras de 60 días etanol en el agua de bebida. Comenzamos con una concentración del 5%, incrementando otro 5% cada semana hasta estabilizarla al 20% v/v. Estas ratas no se aparean hasta transcurridos seis meses desde el comienzo de la alcoholización, se le retiran sus crías y ellas pasan a nodrizas de crías normales.

Sacrificio: A los 5, 8, 12, 14, 16 y 21 días postnatales. Cinco animales en cada edad. Perfusión intravascular de formol al 10% con bomba peristáltica Watson-Marlow. Inclusión de los encéfalos en parafina. Cortes seriados de 10 micrometros. Tinciones: Nissl (N), Klüver-Barrera (KB).

Recuentos de poblaciones celulares de las regiones hipocámpales CA1, CA2, CA3, Subículo y Giro Dentado comparándolos con la evolución relativa de su superficie.

Las superficies fueron medidas con un analizador de imagen Ibas Kontron 2000. Su valor para cada área es del tanto por cien de la suma de las superficies de todas las áreas del hipocampo.

Los recuentos celulares, realizados por el mismo observador, incluyen solamente las neuronas que tenían visibles núcleo, nucleolo y citoplasma.

Test de comportamiento: Estado de hendiduras palpebrales, pelaje, posibilidad de levantar el vientre en decúbito prono, propulsión de las extremidades, marcha, recuperación postural tras el decúbito supino, suspensión de miembros anteriores, respuesta a suspensión por el rabo, motilidad y respuesta a estímulos sensoriales.

Se efectuaron determinaciones de alcohol en sangre por GS-HS (Cromatografía de Gases / Espacio-Cabeza) utilizando un FID chromatograph Perkin-Elmer, Sigma 300.

Se siguió la curva ponderal y la del peso cerebral.

## Resultados

Las superficies relativas y los recuentos celulares para los grupos I y II se recogen en las tablas.

Los resultados comparativos entre superficies y recuentos de los dos grupos se indican en las gráficas.

El test de comportamiento registra los siguientes resultados:

Grupo I (normales): las hendiduras palpebrales empiezan a abrirlas el P.12 un 20% de los animales y el P.16 las tienen totalmente abiertas todos; la piel está cubierta de pelo en el 60% el P.12 y en el 100% el P.14; el vientre no arrastra en el 80% en el P.12 y en el 100% el P.14; la marcha se hace coordinada en el 30% en el P.12 y en el 100% el P.14; la propulsión es eficaz en el 50% en el P.8 y en todos en el P.12; la recuperación postural tras decúbito se hace sin dificultad en el P.5 en el 100%; se mantienen suspendidos de los miembros anteriores el 80% entre el P.5 y P.8 y el 100% el P.12; la respuesta a suspensión por el rabo es dificultosa en el recién nacido y para el 20% en el P.8; la motilidad y la respuesta a estímulos es hipocinética hasta el P.12 en un 20%. La muerte perinatal es de un 12%.

GRUPO I.

Superficies.

	5 DIAS	8 DIAS	12 D.	14 D.	16 D.	21 D.
CA1	KB19.83 15,955 N-12.08	KB13.86 13,37 N-12.88	KB18.64 15,28 N-11.92	KB17.61 14,635 N-11.66	KB17.84 14,195 N-10.55	KB21.14 17,045 N-12.95
CA2	KB8.06 5,12 N-2.18	KB-3 2,295 N-2.85	KB1.95 2,045 N-2.14	KB3.04 2,775 N-2.51	KB2.70 2,67 N-2.64	KB2.11 2,355 N-2.60
CA3	KB13.68 15,335 N-16.99	KB20.02 21,305 N-22.54	KB22.47 20,005 N-19.85	KB23.01 21,43 N-19.85	KB20.82 20,78 N-20.74	KB10.57 15,19 N-19.81
SUB.	KB42.12 38,875 N-35.63	KB45.73 42,975 N-49.64	KB33.87 41,755 N-49.64	KB34.16 43,425 N-52.69	KB33.60 43,34 N-53.09	KB37.88 46,665 N-55.45
G.D.	KB16.30 34.7 N-33.10	KB17.37 19,405 N-21.44	KB25.04 20,89 N-18.74	KB22.16 17,715 N-13.27	KB25.01 18,98 N-12.95	KB28.28 18,72 N-9.16

Recuentos.

	5 DIAS	8 DIAS	12 D.	14 D.	16 D.	21 D.
CA1	KB-316 M-438 N-560	KB-428 M-478 N-529	KB-308 M-342 N-376	KB-149 M-278 N-407	KB-358 M-412 N-466	KB-686 M-577 N-468
CA2	KB-80 M-77 N-74	KB-59 M-66 N-73	KB-72 M-83 N-94	KB-71 M-82,5 N-94	KB-68 M-103 N-138	KB-54 M-63 N-72
CA3	KB-306 M-311 N-316	KB-233 M-262 N-391	KB-235 M-321 N-408	KB-233 M305,5 N-367	KB-216 M328,5 N-441	KB-363 M368,5 N-374
SUB.	KB-384 M499,5 N-615	KB-338 M-406 N-474	KB-257 M402,5 N-548	KB-182 M401,5 N-621	KB-238 M-288 N-338	KB-344 M-379 N-414
G.D.	KB-390 M-457 N-524	KB-460 M459,5 N-459	KB-452 M499,5 N-547	KB-235 M-515 N-795	KB-738 M861,5 N-985	KB1392 1269,5 N-1147

GRUPO II.

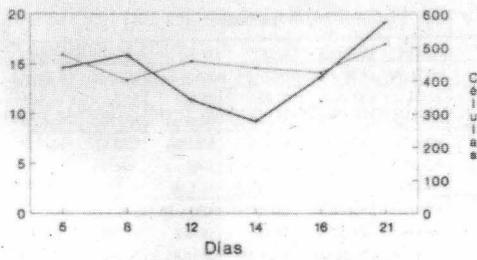
Superficies.

	5 DIAS	8 DIAS	12 D.	14 D.	16 D.	21 D.
CA1	KB16.80 14,25 N-11.70	KB14.88 13,045 N-11.21	KB19.81 17,015 N-14.22	KB16.66 14,815 N-12.97	KB11.80 12,31 N-12.82	KB17.64 15,145 N-12.65
CA2	KB9.27 5,985 N-2070	KB3.80 2,62 N-1.94	KB2.81 2,72 N-2.63	KB2.94 2,65 N-2.36	KB2.11 2,365 N-2.62	KB3.54 3,33 N-3.12
CA3	KB12.53 16,435 N-20.34	KB19.74 21,17 N-22.60	KB21.45 23,09 N-24.73	KB24.58 20,615 N-16.65	KB25.06 19,785 N-14.51	KB19.88 21,24 N-22.60
SUB.	KB52.04 48,42 N-44.80	KB33.73 38,87 N-44.02	KB29.57 34,21 N-38.85	KB31.46 39,895 N-48.33	KB34.77 23,795 N-12.82	KB37.63 25,14 N-12.65
G.D.	KB13.74 17,085 N-20.43	KB27.82 15,01 N-2.20	KB26.33 22,94 N-19.55	KB24.33 21,995 N-19.66	KB26.24 19,065 N-11.89	KB21.28 17,58 N-13.88

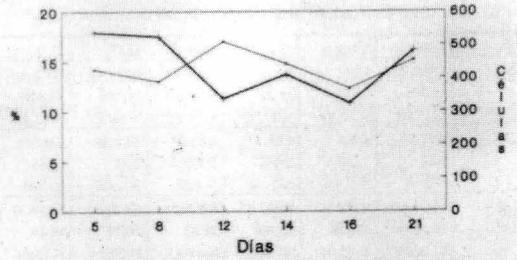
Recuentos.

	5 DIAS	8 DIAS	12 D.	14 D.	16 D.	21 D.
CA1	KB900 539.5 N-579	KB305 526 N-747	KB165 339.5 N-514	KB365 412 N-459	KB322 325 N-328	KB393 483 N-573
CA2	KB96 105 N-114	KB59 69 N-79	KB72 68.5 N-65	KB60 76.5 N-93	KB67 83.5 N-100	KB70 79 N-88
CA3	KB245 359 N-228	KB236 293.5 N-351	KB325 402 N-479	KB357 364.5 N-372	KB248 276.5 N-305	KB412 357 N-302
SUB.	KB496 550 N-604	KB264 442.5 N-621	KB229 361 N-493	KB266 381.5 N-497	KB320 368 N-416	KB504 564.5 N-625
G.D.	KB293 568 N-550	KB415 709.5 N-589	KB500 693.5 N-887	KB632 882 N-1132	KB577 843 N-1109	KB1033 1242 N-1451

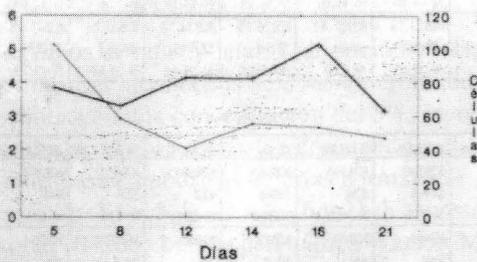
**Grupo I**  
Superficies y Recuentos CA1



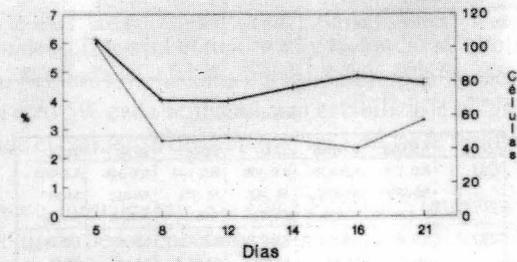
**Grupo II**  
Superficies y Recuentos CA1



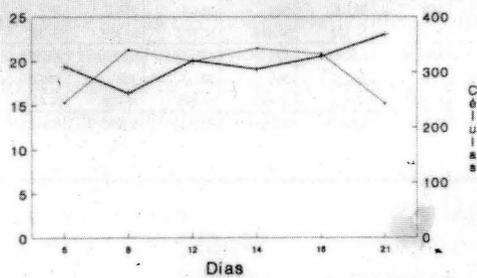
Superficies y Recuentos CA2



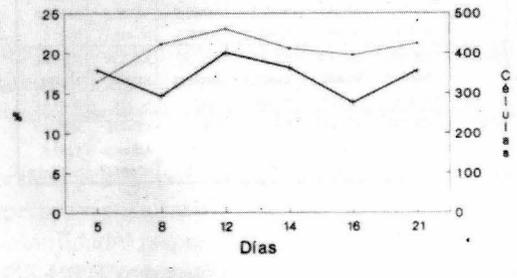
Superficies y Recuentos CA2



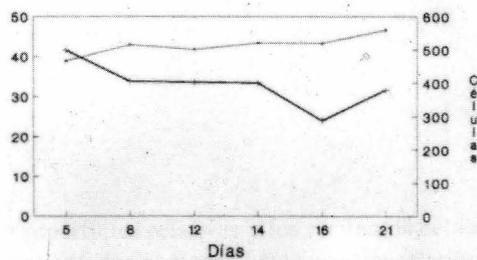
Superficies y Recuentos CA3



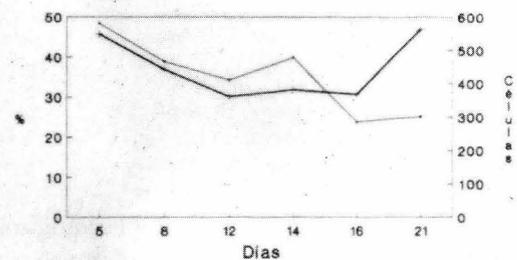
Superficies y Recuentos CA3



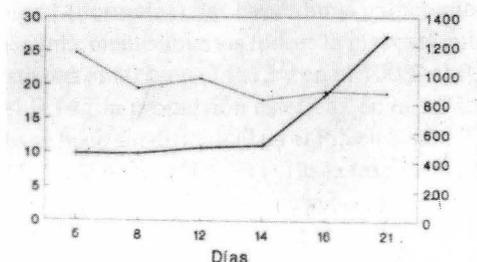
Superficies y Recuentos Subículo



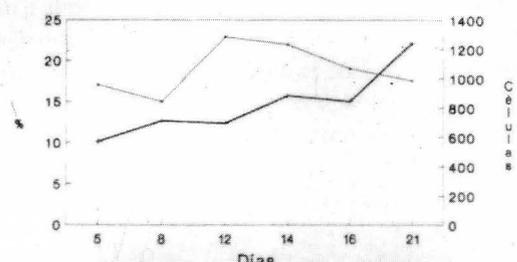
Superficies y Recuentos Subículo



Superficies y Recuentos Giro Dentado



Superficies y Recuentos Giro Dentado



— Superficies — Recuentos

— Superficie — Recuentos

La evolución ponderal es regular y ascendente, así como la del peso cerebral.

Grupo II (lactantes de nodriza alcohólicas): Las hendiduras palpebrales comienzan a abrirse el P.14 en un 20%, a los P.16 en el 60% y a los P.21 el 100%; la piel está cubierta de pelo en el 20% el P.12, en el 60% el P.16 y en el 100% el P.21; el levantamiento del vientre se mantiene el P.12 en el 43%, en P.14 y 16 en el 60% y el P.21 en el 100%; la marcha es coordinada el P.14 en el 20%, el P.16 en el 60% y el P.21 en el 80%; la propulsión es eficaz en P.12 en el 20%, el P.16 en el 40% y el P.21 en el 100%; la recuperación postural tras decúbito la hacen sin dificultad el P.5 el 80%, el P.12 el 45%, el P.14 el 100%, el P.16 solo el 80% y el P.21 el 100%; se mantienen suspendidos de los miembros anteriores el P.5 el 40%, el P.8 el 100%, el P.12 el 78%, el P.14 el 100%, el P.16 el 60% y el P.21 el 80%; la respuesta a suspensión por el rabo es dificultosa en el RN, para el 40% en el P.5, en el P.14 para el 21% en el P.8 y muy dificultosa en el 40% en el P.16 y el 20% en el P.21; la motilidad y la respuesta a estímulos es hipocinética en todas las edades para el 100% en el recién nacido, y para el 20% en el P.21 e hiperkinética en el P.5 para el 20%, en el P.8 y P.12 para el 23% y en el P.14 para el 40%.

La desnutrición es muy patente en todas las edades y la muerte perinatal es de un 42%. La curva de peso es ascendente pero siempre muy por debajo de los normales siendo en P.21 la mitad que la normal. El peso cerebral es también ascendente pero muy por debajo del normal.

En cuanto a alcoholemias los intervalos de confianza son para las madres del 34, 80%-96, 80%.

## Discusión y consideraciones

Del estudio del comportamiento podemos resaltar la gran afectación en todos los parámetros, de las ratas lactantes en nodriza alcohólica con respecto a las normales. Son muy significativos los parámetros en relación con la motilidad, la propulsión, la marcha y la respuesta a estímulos. Tanto el peso corporal como el cerebral es cercano a la mitad del de los normales. Estos resultados hacen retrasar la edad crítica del desarrollo que se encuentra entre el P.12 y P.16 (1 y 14).

En cuanto al estudio del hipocampo vemos lo siguiente:

En el grupo II, el mayor descenso de población se produce en CA2 y CA1. Encontramos una población estable a lo largo de todo el desarrollo postnatal en CA3 y Subículo y un ascenso continuo hasta doblar la población, en GD.

Observamos también un ascenso brusco con descenso posterior en el CA1 a los P.14 para el grupo II que no se acusa en grupo I. En CA3 ocurre este ascenso brusco el P.12 para el grupo II que no se acusa en grupo I.

Las superficies permanecen estables en CA1, CA3 y GD; sin embargo CA2 y Subículo presentan una disminución en los finales con respecto a los primeros para el grupo II, que solo es detectable para el CA2 en los del grupo I.

En el CA2 la pérdida mayor de superficie ocurre durante los primeros ocho días para permanecer estable, solo en el grupo II, durante todo el desarrollo.

En CA1, aunque la superficie al principio y al final permanece estable, a los P.12 detectamos un aumento de esta superficie ampliada en P.14 para los del grupo I. En GD y CA3, ocurre el mismo hecho en el P.12 detectándolo los del grupo I solo para CA3 en P.8. En Subículo ocurre un descenso paulatino a lo largo de todo el desarrollo y este descenso se aumenta en el intervalo de P.14 a P.16 y a partir de aquí permanece estable, lo que no se acusa en el grupo I.

En el CA2, comparando las gráficas de recuentos y superficies, encontramos como la gran pérdida celular ocurre, al igual que la gran pérdida de superficie en los primeros ocho días. Después las dos gráficas permanecen más o menos estable en el grupo II.

En GD, mientras la gráfica de población celular consigue un gran aumento, las de superficie permanecen estables en los dos grupos.

Para el grupo II en CA1 la inflexión en la gráfica de superficie en el P.12 y la inflexión en la curva de contajes ocurre en el P.14. En el CA3, aunque es más acusada la inflexión en la curva de recuento, la curva de superficies y recuentos coinciden en el día importante, P.12, del desarrollo. En Subículo, aunque la gráfica de superficie es

de descenso y la de contajes se mantiene, el momento importante de inflexión de las superficies ocurre en el intervalo de P.14 a P.16 y la inflexión en los contajes celulares del Subículo ocurre en P.12.

Esto puede ser comparado con los trabajos de Philips y Cragg (12) quienes estudiando el desarrollo postnatal del cerebro bajo la influencia del etanol, encuentran que una dosis única de alcohol en P3 produce alteraciones de las células del hipocampo. En un trabajo posterior (5) determinan un periodo crítico para el desarrollo del S.N.C., y que varía según las distintas zonas cerebrales. Si el alcohol incide durante este periodo disminuye el número de neuronas. Si afecta en fechas posteriores, no se pierden células en número superior al considerado «normal». Dicho de otra forma, si el alcohol incide por primera vez sobre un Sistema Nervioso producirá daño a las neuronas que estén inmaduras y no altera aquellas que ya hayan completado su desarrollo.

Según lo anterior, el grupo II recibe alcohol en este periodo crítico postnatal inmediato, (12) y puede ser la causa de la gran pérdida celular que ocurre en zonas como CA2 antes de P.8.

Comparando los dos grupos observamos que las características de las curvas son, con matices, superponibles. Si nos atenemos a la evolución de los recuentos y superficies podemos resaltar algunos hechos.

La subida brusca del recuento en GD en los dos grupos. En el I es a partir de P.14 y en el II de P.16. Se podría interpretar como un retraso para los animales de lactancia alcohólica en la última oleada celular de GD sobre lo propuesto por Bayer en normales (1).

Todas las áreas, menos CA2, en el P.21 terminan con un aumento. El decremento es menor en el grupo II, su curva salvo el marcado descenso en P.8 se mantiene a lo largo de la lactancia y termina con mayor número de células que en los animales normales. Esta área es la de menor oferta sináptica, solo el área septal y teniendo que compartirla con CA1 y CA3 (11).

Los descensos celulares que no afectan a la superficie no tienen las mismas características en un grupo o en otro. En CA1 se da para el grupo I en P.12 y P.14 y solo en P.12 para el grupo II. La superficie no desciende en CA3 en P16 para el grupo II y en Subículo para el grupo I. El aumento y mantenimiento de la superficie se debe al aumento del neuropilo y no se daría con la misma cronología para CA3 y Subículo en los dos grupos de animales.

La pérdida neuronal más intensa en CA2 antes del P.8 y el hecho de que solamente se afecte en este día esta área mientras las demás áreas permanecen estables, habla a favor de distintas cronologías del desarrollo. No obstante a pesar de la pérdida neuronal en P.8, posteriormente se mantiene el número siendo superior en el P.21 a los animales normales. Este hecho podría indicar que el etanol a lo largo de la lactancia sería más lesivo para las otras áreas restando competitividad en el establecimiento de sinápsis en el septum al CA2, área en la que sobrevivirían mayor número de neuronas (15).

Los resultados diferentes encontrados para el grupo II en hipocampo así como en las manifestaciones motoras de su comportamiento y en la pérdida de peso global y cerebral, es achacable a tres factores: La incidencia del etanol en el periodo crítico del desarrollo del S.N.C.; la desnutrición por posible reducción de cantidad y composición de la leche, consecuente a la alcoholización de las nodrizas (15); y, la falta de adaptación tanto de las crías a la nodriza, como de esta por ser alcohólica crónica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BAYER, S.A. (1980): Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* **190**: 87-114.
2. BEAULATON, J., y LOCKSHIN, R.A. (1982): The relation of programmed cell death to development and reproduction: Comparative studies and an attempt at classification. *Int. Rev. Cytol.* **79**: 215-235.
3. BERGER, T.W.; SWANSON, G.W.; MILNER, T.A.; LYNCH, G.S., y THOMPSON, R.F. (1980): Reciprocal anatomical connections between hippocampus and subiculum in the rabbit: evidence subicular innervation of regio superior. *Brain Res.* **183**: 265-276.
4. CADETE-LEITE, A.; TAVARES, M.A.; PACHECO, M.M.; VOLK, B., y PAULA BARBOSA, M.M. (1989): Hippocampal mossy fiber-CA3 synapsis after consumption and withdrawal. *Alcohol.* **6**: 303-310.
5. CRAGG, B.G.; PHILLIPS, S.C. (1984): Natural loss of cerebellar Purkinje cells in the rat and increased loss with alcohol. *Brain Res.* **325**: 151.
6. HAMBURGER, V., y LEVI-MONTALCINI, R. (1949): Proliferation, differentiation and the generation in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J. Exp. Zool.* **111**: 457-502.

7. LANCASTER, F.E.; PHILLIPS, S.M.; PATSALOS, P.N., y WIGGINS, R.S. (1984): Brain myelination in the offspring of ethanol-treated rats: in utero versus lactational exposure by crossfostering offspring of control, pairfed and ethanol teated dams. *Brain. Res.* **309**: 209-216.
8. LÓPEZ-TEJERO, D.; FERRER, I.; LLOBERA, M.; HERRERA, E. (1986): Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth, sensory reflex maturation and brain development in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **12**: 251-260.
9. LORENTE DE NO, R. (1934): Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neur.* **46**: 113-177.
10. OPPENHEIM, R.W. (1981): Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis. A selective historical review and progress report. In studies in developmental neurobiology. Essays in honor of Viktor Hamburger. Ed. W. M. Cowan. New York: Oxford Univ. Press.
11. PAXINOS, G. (1985): The rat nervous system. Vol. 1. pp. 335-344. Academic Press. San Diego.
12. PHILLIPS, S.L., y CRAGG, B.G. (1983): Chronic consumption of alcohol by adult mice: effect on hippocampal cells and synapses. *Exp. Neurol.* **80**: 218-226.
13. RAMÓN Y CAJAL, S. (1911): *Histologie du systeme nerveux de l' homme et des vertébrés*. Vol. 2. Instituto Ramón y Cajal. Madrid.
14. SOLANO, A.; MORA, M.J.; CILVETI, A.; SALINAS, P.; CAMPOS, V.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SMITH-ÁGREDA, J.M. (1985): Edad crítica en el crecimiento craneofacial. Un estudio comparativo en roedores. *Histol. Med.* **1**: 89-94.
15. STREISSGUTH, A.P.; LANDESMAN-DWYER, S.; MARTIN, J.G., y SMITH, D.W. (1980): Teratogenic effects of ethanol in humans and laboratory animals. *Science.* **209**: 353.
16. SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E., y COWAN, W.M. (1981): Evidence for collateral projection by neurons in Ammon' s horn, the dentate gyrus, and the subiculum: A multiple retrograde labeling study in the rat. *J. Neurosci.* **1**: 548-559.

Correspondencia: Dra. Inés Smith-Fernández  
Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina  
Universidad de Málaga  
29071 Málaga. España

## *Index*

CARRETERO, J.; GONZÁLEZ, R.; RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; ANGOSO, M.; RIESCO, J.M.; VÁZQUEZ, R.: Variations of the corporal growth following experimental manipulation of the gonadal environment in adult rats .....	3
CARVAJAL, J.C.; RODRÍGUEZ, J.; ORFAO, A. CARBAJO-PÉREZ, E.; CARBAJO, S.: Comparative study of DNA content, nuclear proteins and expression of AgNORs .....	11
GORDILLO FERNÁNDEZ, A.; PERALES MARÍN, R.; SMITH-FERRES, E.; SMITH-FERRES, V.: Hystomorphological study and study of the lipid secretional contents of the adrenal gland of the albino rat after ovaric irradiation with infrared laser beam (904 n.m.) .....	21
HERNÁNDEZ, E.R.; REVILLA, M.; RICO, H.: Bone mineral content in premenopausal women and its correlation with anthropometrical variables .....	27
HERNÁNDEZ, J.L.; CARBAJO, S.; CARVAJAL, J.C.; CARBAJO-PÉREZ, E.: Study of putative cell migration in the intermediate lobe of the rat hypophysis after bromodeoxyuridine-labelling .....	33
JUANES, J.A.; BENTIVOGLIO, M.; RIESCO, J.M.; BERTINI, G.; CHEN, S.; CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Quantitative analysis of the labelled neurons in the substantia nigra following injection of fluoro gold in the striatum of the rat .....	41
MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; BALLESTER VALLÉS, E.; BARJAU GUIÑÓN, I.; PÉREZ IGLESIAS, C.: Upper dental nerves anatomy with an special account of the medial dental nerve .....	53
MARTÍNEZ ÁLVAREZ, C.; PEÑA MELIÁN, A.L.; NIETO JIMÉNEZ, Y.; VIEJO TIRADO, F.; MERCADAL TALLADA, C.; PUERTA FONOLLA, A.J.: Quail otic anlage grafts placed in the cephalic area of chick embryos: development and interactions with host nervous system .....	61
MORA, M.J.; SOLANO, A.; SMITH-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SMITH-ÁGREDA, J.M.: A study histological and histochemical enzymatic of cerebellum in the alcoholic wistar white rat ...	71
NIETO, J.L.; CAMPO, L.; GIMENO, A.: Morphology and biometry study of thorax and sternoclavicular joint during embryogenic and foetal development .....	77
PASTOR, F.E.; SÁNCHEZ, A.; ZAMARRÓN, C.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G.; AMAT, P.: Effects of neonatal administration of estrogens on gonadotroph cells of the adenohypophysis of the male rat	85
PINAZO-DURÁN, M.D.; SMITH-FERRES, V.; SMITH-ÁGREDA, V.: Morphological and morphometrical study in the rat optic nerve. I: in fetuses at the end of prenatal period .....	95
SMITH-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SALINAS, P.; SMITH-FERNÁNDEZ, V.: A study of neuronal death in the hippocampus and of the behaviour in rats gestated by normal mother and lactant in alcoholic nurse .....	103



## 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.

## Índice

CARRETERO, J.; GONZÁLEZ, R.; RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; ANGOSO, M.; RIESCO, J.M.; VÁZQUEZ, R.: Variaciones en el desarrollo corporal en ratas adultas después de la manipulación experimental de la esfera gonadal .....	3
CARVAJAL, J.C.; RODRÍGUEZ, J.; ORFAO, A. CARBAJO-PÉREZ, E.; CARBAJO, S.: Estudio comparativo del contenido nuclear en ADN, las proteínas nucleares totales y la expresión de los NORs .....	11
GORDILLO FERNÁNDEZ, A.; PERALES MARÍN, R.; SMITH-FERRES, E.; SMITH-FERRES, V.: Estudio histomorfológico y del contenido secretorio lipídico de la glándula suprarrenal de rata albina tras irradiación ovárica con láser infrarrojo de 904 n.m. ....	21
HERNÁNDEZ, E.R.; REVILLA, M.; RICO, H.: Contenido mineral óseo en mujeres premenopáusicas y su relación a variables antropométricas .....	27
HERNÁNDEZ, J.L.; CARBAJO, S.; CARVAJAL, J.C.; CARBAJO-PÉREZ, E.: Estudio de posibles fenómenos de migración celular en el lóbulo intermedio de la hipófisis de la rata tras el marcaje con bromodesoxiuridina	33
JUANES, J.A.; BENTIVOGLIO, M.; RIESCO, J.M.; BERTINI, G.; CHEN, S.; CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E.; VÁZQUEZ, R.: Análisis cuantitativo de las neuronas marcadas en la sustancia negra tras la inyección de fluoro-gold en el estriado de la rata .....	41
MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; BALLESTER VALLÉS, E.; BARJAU GUIÑÓN, I.; PÉREZ IGLESIAS, C.: Anatomía de los nervios dentarios superiores con especial referencia al nervio dentario medio .....	53
MARTÍNEZ ÁLVAREZ, C.; PEÑA MELIÁN, A.L.; NIETO JIMÉNEZ, Y.; VIEJO TIRADO, F.; MERCADAL TALLADA, C.; PUERTA FONOLLA, A.J.: Injertos de esbozo ótico de codorniz en la región cefálica de embriones de pollo: Desarrollo e interacciones con el sistema nervioso del huesped .....	61
MORA, M.J.; SOLANO, A.; SMITH-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SMITH-ÁGREDA, J.M.: Alcoholismo: Estudio histológico e histoquímico del cerebelo en la rata blanca Wistar alcohólica ..	71
NIETO, J.L.; CAMPO, L.; GIMENO, A.: Contribución a la morfología y biometría de la cintura escapular y del torax embrionario y fetal .....	77
PASTOR, F.E.; SÁNCHEZ, A.; ZAMARRÓN, C.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G.; AMAT, P.: Efectos de la administración neonatal de estrógenos sobre las células gonadotropas de la adenohipófisis de la rata macho .....	85
PINAZO-DURÁN, M.D.; SMITH-FERRES, V.; SMITH-ÁGREDA, V.: Estudio morfológico y morfométrico del nervio óptico de la rata. I: en el feto «a término» .....	95
SMITH-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SALINAS, P.; SMITH-FERNÁNDEZ, V.: Estudio de la muerte neuronal en el hipocampo y del comportamiento en ratas gestadas en madre normal y lactadas en nodriza alcohólica .....	103