

Tesis de Posgrado

Estructuras quimiorreceptoras en las fosas nasales de la rata : Su relación con la regulación endocrina de la reproducción

Settembrini, Beatriz Patricia

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Settembrini, Beatriz Patricia. (1985). Estructuras quimiorreceptoras en las fosas nasales de la rata : Su relación con la regulación endocrina de la reproducción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1885_Settembrini.pdf

Cita tipo Chicago:

Settembrini, Beatriz Patricia. "Estructuras quimiorreceptoras en las fosas nasales de la rata : Su relación con la regulación endocrina de la reproducción". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1885_Settembrini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTRUCTURAS QUIMIORRECEPTORAS EN LAS FOSAS NASALES
DE LA RATA. SU RELACION CON LA REGULACION ENDOCRINA
DE LA REPRODUCCION

Autor

Lic. Beatriz Patricia Settembrini

Director de Tesis

Dr. Juan Humberto Tramezzani

Lugar de Trabajo

Instituto de Neurobiología - CONICET

Tesis presentada para optar al título de Doctor en
Ciencias Biológicas

1985

- 1885 -
v. 1
ej. 2

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento:

al Dr. Juan Humberto Tramezzani, quien con constante entusiasmo dedicó valiosas horas de su tiempo al análisis y discusión de los resultados que forman parte de esta tesis. Generosamente me brindó su experiencia, me guió transmitiéndome su confianza y puso a mi alcance todos los medios necesarios. Su conducta en el laboratorio y su pasión por el trabajo científico me servirán de ejemplo durante toda mi vida profesional.

al Dr. Oscar Luis Vaccarezza quien me introdujo en el tema y me guió durante las primeras etapas del mismo.

a las Dras. María Rosa Gallardo y Patricia M. Louzán por su generosa y amplia colaboración en la realización de los experimentos bioquímicos.

a mi compañero en el laboratorio, Dr. Marcelo J. Villar por la ayuda brindada durante la realización de esta tesis.

a la Sra. Isabel L. de Farías por su excelente asistencia técnica.

a los Servicios de Fotografía Científica y Microscopía Electrónica del CONICET y a todo el personal del Instituto de Neurobiología.

al CONICET por haberme otorgado las becas y a la Fundación Instituto de Neurobiología por los medios necesarios para llevar a cabo estos estudios.

a mi esposo y a mis padres, por su comprensión, apoyo y estímulo.

A mi esposo, a mi hijo.

A mis padres.

<u>Introducción General</u>	6 - 9
<u>Capítulo I</u>	
"El órgano vomeronasal."	
Introducción	11 - 39
Materiales y Métodos	40 - 45
Resultados	46 - 71
Discusión	72 - 82
<u>Capítulo II</u>	
"La papila palatina y el conducto nasopalatino"	
Introducción	84 - 96
Materiales y Métodos	97 - 101
Resultados	102 - 121
Discusión	122 - 127
<u>Capítulo III</u>	
"Los estímulos olorosos y la regulación neuroendócrina de la reproducción"	
Introducción	129 - 138
Materiales y Métodos	139 - 144
Resultados	145 - 158
Discusión	159 - 161
Conclusiones	162 - 164
Referencias Bibliográficas	165 - 200
Iconografía	201 - 231

INTRODUCCION GENERAL

En los mamíferos, la recepción de estímulos olorosos puede ser mediada por alguna de las 5 estructuras morfológicamente diferenciadas de la cavidad nasal (Fig. 1): 1. Epitelio olfatorio, 2. Organo septal o de Masera, 3. Terminaciones del XIII par o nervio terminal, 4. Terminaciones del nervio trigémino, 5. Organo vomeronasal o de Jacobson (Graziadei, 1977).

El sistema vomeronasal tiene a su receptor en el órgano vomeronasal cuyos nervios terminan en el bulbo olfatorio accesorio. Evidencias morfológicas sugieren una función quimiorreceptora para el órgano vomeronasal similar a la del epitelio olfatorio. Estas se basan en un origen embriológico común en la placoda olfatoria y en la similitud neurohistológica entre el bulbo olfatorio accesorio y el principal.

A pesar de que aún no se ha demostrado unión selectiva de moléculas olorosas a estructuras de las células receptoras en el órgano vomeronasal, como en el caso del epitelio olfatorio (Rhein y Cagan, 1980), existe el consenso de que esta función corresponde a las microvellosidades de las neuronas bipolares vomeronasales. La ubicación del órgano vomeronasal en la fosa nasal sugiere que está involucrado en la recepción de moléculas de baja volatilidad, transportadas por un vehículo líquido y que requiere contacto directo de la región oronasal con el estímulo. Dichas moléculas no pueden alcanzar el epitelio olfa

torio, que sería así el receptor para olores transportados por un medio gaseoso.

El órgano vomeronasal proyecta al bulbo olfatorio accesorio y, a través del tracto olfatorio accesorio, a la amígdala corticomedia. Esta área está relacionada con el hipotálamo medial y el área/pre^{medial}óptica, ambas involucradas en generar los ascensos preovulatorios de gonadotrofinas hipofisarias en los roedores (Raisman, 1972). Aquí reside el sustrato morfológico de la relación órgano vomeronasal-sistema neuroendócrino de regulación de la función reproductora. Desde 1975 surgieron gran cantidad de publicaciones sobre esta vinculación, la mayoría de ellas realizadas en ratones, dado que en esta especie la regulación neuroendócrina de la reproducción está muy afectada por estímulos olorosos, aún cuando sea la rata el modelo experimental más utilizado por los neuroendocrinólogos.

El sistema olfatorio no está sólo relacionado con la regulación de la función reproductora. Las crías de roedores dependen de la detección de estímulos químicos para sobrevivir (Alberts, 1976). A pesar de la importancia crucial del procesamiento de estímulos olfatorios durante las primeras etapas de la vida, el sistema olfatorio de los recién nacidos es anatómica y funcionalmente incompleto y tiene desarrollo postnatal.

En el epitelio olfatorio, los receptores están morfológicamente (Cuschieri y Bannister, 1975 a,b) y funcionalmente (Gesteland, Yancey y Farbman, 1982) maduros al nacimiento. En el bulbo olfa

torio principal, la vía aferente (receptores-células mitrales, células en penacho) está desarrollada (Astic y Saucier, 1982; Greer y col., 1982), pero faltan los circuitos interneuronales característicos del adulto, ya que las células de los granos se originan postnatalmente (Mair, Gellman y Gesteland, 1982).

En el órgano vomeronasal, los resultados de los estudios morfológicos sobre la maduración de los receptores son contradictorios. En la rata ocurren pocos cambios postnatales (Kraitzing, 1971b), mientras que en el hamster se ha descrito un verdadero proceso de maduración postnatal (Taniguchi, Taniguchi y Mochizuki, 1982b). El bulbo olfatorio accesorio alcanza su volumen final antes que el principal (Smith, 1935; Hinds, 1968), pero la maduración funcional entre las conexiones de las fibras nerviosas ocurre previamente en esta última estructura (Leonard, 1975). Recientemente se aportaron evidencias de función vomeronasal en fetos y crías de rata. En el primer caso, las investigaciones estuvieron orientadas a detectar actividad neuronal "in utero". Esta se encontró en el bulbo olfatorio accesorio y no en el bulbo olfatorio principal, sugiriendo que el órgano vomeronasal sería el receptor para el análisis del medio uterino (Pedersen y col., 1983). Postnatalmente no pudo detectarse actividad neuronal en el bulbo olfatorio accesorio, probablemente debido a que los estímulos utilizados no fueron los adecuados, ya que estudios de comportamiento indicaron que a los 10 días de edad el órgano vomeronasal discrimina

ría estímulos olfatorios provenientes de la madre (Teicher, Shaywitz y Lumia, 1984). Estas discrepancias nos llevaron a es tudiar:

- . La maduración del receptor periférico vomeronasal.
- . La relación de dicho receptor con un mecanismo neuroendócrino bien caracterizado, en un modelo experimental adecuado.

Hemos señalado la ubicación del órgano vomeronasal en un compartimiento especial de la fosa nasal. Surgió la pregunta: ¿cuál es la vía de acceso? Estudios previos sugirieron un doble camino: nasal y oronasal (Wysocki, Wellington y Beauchamp, 1980) para los estímulos. Esta última está representada por el conducto nasopalatino y se establece indirectamente a través de 2 recesos paraseptales (Wörhmann-Repenning, 1980). Consecuentemente estudiamos el desarrollo postnatal de la misma, buscando una correlación con el sistema vomeronasal.

CAPITULO I

EL ORGANO VOMERONASAL

INTRODUCCION

1. Morfología comparada del órgano vomeronasal

La primera descripción anatómica de esta estructura se debe a Ruysch (1703) quien observó en el humano una formación tubular ubicada en la base del septum nasal (tubo de Ruysch). Posteriormente, Jacobson (1811) efectuó una detallada descripción comparada en mamíferos (rumiantes y roedores), a partir de la cual se la designó con su nombre.

El órgano de Jacobson se encuentra en los anfibios, reptiles y mamíferos, incluyendo al hombre. En los peces está ausente o es rudimentario, dudándose de su verdadera existencia, siendo probablemente un homólogo.

En los anfibios fue descrito por varios autores (Bawden, 1894; Seydel, 1895; Anton, 1908, 1911; Zuckerkandl, 1910; Bruner, 1914). En los urodelos más evolucionados, el órgano de Jacobson se ubica en la cavidad maxilar, que es parte del órgano nasal, existiendo una vía de comunicación entre esta estructura y la cavidad oral (Seydel, 1895). En los anuros, se encuentra en el saco lateral inferior de la cavidad nasal (Fig. 2A). A través de una cavidad maxilar la corriente espiratoria puede alcanzar fácilmente al órgano (Gaupp, 1904). El órgano de Jacobson está presente en los anfibios independientemente de si el medio que transporta los estímulos olorosos es

agua o aire (Bruner, 1914). En los monosmáticos (el órgano olfatorio recibe sólo los estímulos olorosos del medio externo) como Necturus sp., el órgano está ausente. En cambio está presente en los diosmáticos (el órgano olfatorio recibe estímulos del medio externo y de la cavidad oral), Siren sp., Cryptobranchus sp y adultos de anfibios más evolucionados. La ultraestructura fue estudiada por Kolnberger (1971) en Rana esculenta, quien describió un retículo endoplásmico agranular desarrollado y ausencia de cilios en células receptoras, mientras que las células sustentaculares los poseían.

Este sistema olfatorio accesorio alcanza su máximo desarrollo en los reptiles, siendo en algunos ofidios el principal quimiorreceptor (Parsons, 1967). El primer anatomista en reconocer el órgano vomeronasal en los reptiles y describirlo como tal fue Stannius (1854). En estos vertebrados, el área olfatoria y la vomeronasal están completamente separadas y los órganos son cámaras en forma de cúpula que se abren en la cavidad oral a través de conductos palatinos situados frente a las narinas internas. Mihalkovics (1898) describió el gran espesor de la pared sensorial de los ofidios y su rica inervación. En los lacértidos, el órgano está menos desarrollado. A través de los ductos palatinos, la lengua bifurcada de los ofidios y lacértidos podría introducir moléculas olorosas desde el ambiente externo a los receptores (Young, 1962). En los ofidios

(Fig. 2B), la parte dorsal del órgano vomeronasal está formada por el epitelio sensorial (Kolnberger, 1971 a; Gabe y Saint Girons, 1976), con neuronas bipolares cuyos axones forman los nervios vomeronasales. Estos terminan en el bulbo olfatorio accesorio del telencéfalo (Bellairs, 1942). El epitelio sensorial contiene, además de las células bipolares, las sustentaculares y las indiferenciadas (Altner, Müller y Brachner, 1970; Wang y Halpern, 1980). Bajo la capa de células sustentaculares, el epitelio se caracteriza por una organización columnar de células bipolares e indiferenciadas, aisladas del tejido conectivo y vascular por una vaina delgada de células satélite y lámina basal. Las células generativas ocupan las capas basales y las neuronas maduras, las regiones apicales (Wang y Halpern, 1980). Tanto en ofidios como lacértidos, las células sensoriales y sustentaculares poseen sólo microvellosidades. En los lacértidos, las células sustentaculares contienen gránulos secretorios densos (Bannister, 1968).

Se ha sugerido que en Squamata la función del órgano vomeronasal es para rastreo de la presa, reconocimiento sexual y cortejo (Burghardt, 1970). Estudios posteriores realizados en Thamnophis sirtalis (Ophidia) sugirieron que la lengua es capaz de llevar sustancias al lumen del órgano, pero que no es un vehículo obligatorio. En ausencia de la misma, las sustancias marcadas utilizadas en estos experimentos se acumulan, aunque en pequeña cantidad, en el órgano. Los ductos vomerona-

sales son la vía de entrada al mismo (Halpern y Kubie; 1980). En 1982, Heller y Halpern sugirieron que en esta misma especie el uso de señales químicas en la selección de refugio y agregación es mediado por el sistema vomeronasal y que el visual y el olfatorio no eran críticos para estos comportamientos.

Los cocodrilos no poseen órgano de Jacobson (Nemours, 1930), aunque Sluiter (1892) señaló la presencia de un órgano bien desarrollado en Crocodilus porosus y Röse (1893) encontró evidencias durante la vida embrionaria.

En los quelonios, los estudios de McCotter (1917) pusieron fin a una serie de controversias entre estudios previos de Seydel (1896), Mihalkovics (1898) y Zuckerkandl (1910) en distintas especies. McCotter mostró que el área olfatoria está separada del neuroepitelio del órgano de Jacobson y que las fibras nerviosas del órgano vomeronasal, diferentes de las correspondientes al órgano olfatorio, terminan en un bulbo olfatorio accesorio. En 1970, Graziadei y Tucker estudiaron la morfología del epitelio vomeronasal de Gopherus polyphemus y Terrapene carolina al microscopio óptico y electrónico. Mostraron que dicho epitelio está expuesto libremente en la cavidad nasal y rodeado por epitelio olfatorio. Está constituido por células sustentaculares (que secretan un producto granular), receptoras y basales; carece de cilios a diferencia del epitelio olfatorio. En cambio, posee microvellosidades

irregulares, bifurcadas.

En las aves, el órgano de Jacobson estaría ausente. Sin embargo, se ha postulado su presencia durante la vida embrionaria (Ganin, 1890).

En los mamíferos, el sistema vomeronasal está extremadamente desarrollado en los más primitivos, como son los monotremos y marsupiales. En los euterios es de mayor tamaño en los animales más pequeños y está mejor desarrollado en los roedores y lagomorfos. El desarrollo del paladar secundario reubica al órgano vomeronasal en el área nasal. La relación entre el órgano y los conductos nasopalatinos que atraviesan el paladar en la mayoría de estos vertebrados se discutirá en cada caso. El órgano vomeronasal de los mamíferos es una estructura bilateral cubierta por mucosa, ciega caudalmente, ubicada en la parte ventral del septum nasal cerca de los huesos maxilares y premaxilares. Las secciones coronales lo muestran en forma creciente o arriñonada. En la pared lateral existe un plexo de vasos sanguíneos cavernosos y, rodeando a todo el órgano, una pared cartílago-ósea.

Dagg y Taub (1970) no observaron dimorfismo sexual. Sin embargo, estudios posteriores de Segovia y Guillamón (1982) señalaron esta característica en la rata en cuanto al volumen del órgano, del neuroepitelio y en la población neuronal, sien-

do estos parámetros mayores en los machos.

En los monotremos, el órgano está muy desarrollado. En el ornitorrinco está constituido por una parte anterior y una posterior con una abertura próxima a su porción media. No existe desarrollo de la parte anterior en el equidna (Broom, 1897). En ambos casos, el ducto vomeronasal se abre en el conducto nasopalatino, cerca de la cavidad nasal (equidna) o de la oral (ornitorrinco), (Estes, 1972).

En los marsupiales existe un tipo general con variaciones según los grupos. En los poliprotodontes, como Dasyurus sp, la estructura es simple, el órgano está poco desarrollado y los cartílagos, reducidos. En cambio, en los diprotodontes, como Petaurus sp, el cartílago de Jacobson y el plexo vascular del órgano están más desarrollados que en el grupo anterior (Broom, 1897). En los diprotodontes, con excepción de la rata canguro (donde los ductos vomeronasales se abren en la cavidad nasal), el órgano desemboca en el conducto nasopalatino próximo a la cavidad nasal. En los marsupiales didélfidos (poliprotodontes) la comunicación es similar al grupo anterior, pero los ductos del órgano se abren en la parte media de los conductos nasopalatinos (Estes, 1972).

En los quirópteros, los estudios clásicos realizados en

distintas especies mostraron resultados dispares sobre la existencia y grado de desarrollo del órgano vomeronasal en embriones y adultos. Las descripciones histológicas se debieron a Broom (1895), Bhatnagar y Kallen (1974), Cooper y Bhatnagar (1976). Estos últimos autores en 1976 investigaron la morfología del órgano en especies del suborden Megachiroptera (familia Pteropodidae) y Microchiroptera (familias Rhinopomatidae, Megadermatidae, Rhinolophidae, Phyllostomatidae y Vespertilionidae). Según estos autores, no es posible establecer un prototipo general del órgano vomeronasal en este grupo. El bulbo olfatorio accesorio está presente sólo en aquellos murciélagos que tienen órganos bien desarrollados.

El órgano está mejor desarrollado en los phyllostomátidos y vespertiliónidos (Miniopterus sp) que en los megadermátidos. Es rudimentario en rhinopomátidos y rhinolófidos y está ausente en los pteropódidos. En todos los casos, la extremidad anterior del mismo está próxima a la desembocadura del conducto nasopalatino en la cavidad nasal.

La estructura del neuroepitelio (Bhatnagar, Matulionis y Breipohl, 1982) es similar a la observada en otros mamíferos. Sin embargo, en una de las especies estudiadas se encontraron cilios, aunque muy escasos, en células receptoras y de sostén.

Los estudios anatómicos clásicos realizados en el erizo (Insectivora) mostraron que la morfología del órgano difiere

poco de la observada en los murciélagos, pero en el primero está menos desarrollada. Tanto en el topo (Harvey, 1882) como en el erizo, el órgano se abre en la porción media del conducto nasopalatino. En las tupaias, la desembocadura en dicho conducto está más cerca de la cavidad nasal. Los estudios ultraestructurales en los insectívoros fueron realizados por Kolnberger (1971a,b), Kolnberger y Altner (1971), Loo y Kanagasuntheram (1972) y Loo (1977). En ellos se describe ausencia de cilios en las células receptoras, aunque en el topo las células sustentaculares próximas a los límites con el epitelio pseudoestratificado los poseen. También se encontraron centriolos y precursores ciliares en las dendritas de las células receptoras.

Los trabajos de Klein (1882) en los carnívoros mostraron que en el perro el arreglo de los cartílagos vomeronasales y del piso de la cavidad nasal es representativo del grupo, pero algunas de sus características indicarían cierto grado de degeneración. Los ductos vomeronasales se abren en la parte media del conducto nasopalatino. En los mustélidos (Mustela sp) la comunicación se realiza en la porción más próxima a la fosa nasal de dicho conducto. En el gato, los cartílagos alcanzan gran desarrollo y la desembocadura del órgano se hace en la parte inferior del mismo, de modo que la comunicación con la fosa nasal es indirecta.

Seifert (1971) realizó un estudio detallado de la morfología

gía microscópica del órgano vomeronasal del gato. La microscopía óptica reveló que el neuroepitelio está estratificado desde el lumen al tejido conectivo en las siguientes capas: de prolongaciones celulares, de núcleos de células sustentaculares, de núcleos de células receptoras y células basales. Las glándulas están ubicadas en los extremos laterales del tubo epitelial. La microscopía electrónica reveló que el bulbo dendrítico de las células receptoras no excede el nivel superficial de las células de sostén, pero sus microvellosidades se proyectan al lumen. Este autor también describió la ultraestructura de las células basales. En relación a las células sustentaculares encontró que se extienden a lo largo de todo el epitelio. Llama la atención en su descripción el hecho de que existan muchas comunicaciones tipo desmosoma entre las células de sostén, pero no entre éstas y las receptoras. Las células de sostén tienen prolongaciones digitiformes del tipo "microzoten" con una estructura de 10 filamentos laterales y un centro claro. El epitelio pseudoestratificado o respiratorio (al que llamó "cilíndrico vibrátil") consta de 2 tipos celulares: células oscuras con cilios y "microzoten", algunas de las cuales serían cilíndricas, células cilíndricas claras sin cilios y con retículo endoplásmico de tipo cristalóide, con probable función secretoria.

En los perisodáctilos, las primeras descripciones del órga-

no vomeronasal corresponden a Broom (1896) en el caballo y, posteriormente, a Bradley (1947), Nickel, Schummer y Seiferle (1960) y Sisson (1967). En el caballo y en el asno está formado por un par de tubos ciegos caudalmente, rodeados, excepto en sus extremidades, por cápsulas de cartílago hialino. El órgano está constituido por dos paredes epiteliales: la respiratoria y el neuroepitelio (en la pared medial). Alrededor del epitelio existe colágeno y tejido vascular (aparentemente de tipo eréctil), nervioso y glándulas mucosas (Lindsay, Clayton y Pirie, 1978). Se abre rostralmente junto con el conducto nasopalatino ipsilateral en un receso angosto ubicado en el piso del meato ventral. Los conductos nasopalatinos no se comunican con la boca, por lo tanto, el órgano está relacionado solamente con la fosa nasal.

En los artiodáctilos existen descripciones en el camello (Dellmann, Blin y Fahmy, 1968; Arnautovic, Abdala y Fahmy, 1970), cerdo (Kratzing, 1980) y oveja (Kratzing, 1971a). En el camello, el órgano es un tubo rodeado por un anillo de cartílago en forma de "J". En la parte anterior del mismo, la pared lateral está cubierta por un epitelio pseudoestratificado columnar y la medial, por epitelio vomeronasal y células caliciformes. En el segmento medio aumenta el número de células glandulares y el lumen es más ancho. La mucosa se pliega en dirección más caudal y el número de células caliciformes disminuye.

El neuroepitelio está ausente en la parte posterior del órgano. No existe conexión entre el órgano de Jacobson y el conducto nasopalatino, pero la apertura nasal de este último es 0.5 cm ventral y 3-4 mm anterior a la abertura del primero. Estudios ultraestructurales del órgano en cerdos jóvenes revelaron que las células receptoras son similares a las observadas en otras especies, pero las sustentaculares poseen una o, raramente, dos cilios del tipo 9+0. El ducto vomeronasal se abre en el conducto nasopalatino justo en la abertura de este último en la cavidad nasal (Broom 1897). En la oveja, el órgano es un tubo ciego que se abre en el conducto nasopalatino cerca de la cavidad oral. El neuroepitelio está constituido por los tres tipos celulares que se encuentran en todas las especies. Los receptores vomeronasales poseen microvellosidades y un microproceso largo con centro vesicular. Las células sustentaculares presentan escasas microvellosidades y su contorno es suave. El epitelio "no sensorial" o pseudoestratificado es ciliado y con microvellosidades; consta de dos tipos celulares: células ciliadas, y otras con citoplasma más oscuro parecidas a las células que secretan mucus. El tejido glandular está concentrado principalmente en la parte lateral del tubo vomeronasal y todas las células secretorias son PAS-positivas.

En los lagomorfos existen descripciones clásicas en conejos fetales y adultos (Klein, 1881; Lenhossék, 1892; Broom,

1896). La microscopía óptica y electrónica (Luckhaus, 1969) en los adultos mostró al órgano como un tubo ciego, de 1,5 a 2 cm de largo, paramediano en la base del septum, con abertura rostral al conducto nasopalatino, desembocando en el piso ventral de las narinas. Se distingue el neuroepitelio y el epitelio lateral cilíndrico de varias capas. Este último consta de 3 capas de células. Es ciliado, el número de cilios aumenta en dirección caudal al órgano; carece de elementos y células nerviosas. En el neuroepitelio se encuentran los tres tipos celulares básicos. En cortes perpendiculares se observan cilios, pero no puede establecerse a qué tipo celular pertenecen. Este último hallazgo no fue confirmado por otros autores (Kauer y Moulton, 1971).

En los roedores se han realizado numerosas investigaciones morfológicas en ratas, ratones y hamsters. Este interés se debe, en gran parte, a que la rata es el modelo experimental más ampliamente usado en estudios de fisiología reproductiva y comportamiento sexual donde el órgano vomeronasal ejercería una acción moduladora. La primera descripción del órgano vomeronasal de la rata se debe a Herzfeld (1888). En 1927, Addison y Rademaker proporcionaron una descripción morfológica detallada del mismo y de su desarrollo postnatal. Brevemente, encuentran un crecimiento de esta estructura desde el nacimiento hasta los 150 días de edad; el incremento en longitud y superficie

es rápido desde el nacimiento hasta los 40 días de edad, luego es más lento. Después de los 40 días, la longitud aumenta uniforme y continuamente. La superficie se incrementa en forma rápida al comienzo, y después de los 40 días de edad permanece estacionaria o disminuye. El máximo espesor del epitelio se alcanza a los 10 días, permanece inalterado hasta los 100 días y se adelgaza a los 150. Las características de crecimiento en volumen son similares a las del sistema nervioso central. En la rata y en el ratón no existe comunicación directa entre el órgano vomeronasal (que se abre en las fosas nasales cerca de las narinas) y el conducto nasopalatino, sino que existiría indirectamente a través de un receso longitudinal en la base del septum nasal (Wörhmann-Repennig, 1980). Al nacimiento, el conducto nasopalatino está situado bajo la parte media del órgano, a los 150 días se ubica debajo del extremo posterior del mismo. En la rata, el órgano forma parte del complejo vomeronasal junto con el cartílago de Jacobson, glándulas y vasos sanguíneos. El órgano ocupa la porción media del complejo y en el adulto mide aproximadamente 6-7 mm de longitud. Podemos dividirlo en un segmento rostral con el orificio, un segmento medio de aproximadamente 5 mm y uno caudal (0,5 mm de longitud). El cartílago rodea totalmente al órgano, excepto en el extremo rostral donde cubre sólo la parte inferior y medial. En el segmento medio pueden distinguirse 2 tipos de epitelio: el neuroepitelio de ubicación medial, (es decir próximo al septum nasal) y el

epitelio pseudoestratificado (ubicación lateral). En la parte caudal del segmento medio, el neuroepitelio rota tomando una ubicación ventral al techo de las fosas nasales y el pseudoestratificado es dorsal al epitelio sensorial. El segmento caudal está formado por un epitelio columnar simple (Vaccarezza, Sepich y Tramezzani, 1981). Los nervios vomeronasales (3 ó 4) atraviesan la placa cribiforme del etmoides y llegan al bulbo olfatorio accesorio.

La microscopía electrónica de transmisión mostró resultados similares en la rata y el hamster dorado (Ciges y col., 1977; Vaccarezza, Sepich y Tramezzani, 1981; Taniguchi y Mochizuki, 1982). El neuroepitelio carece de cilios. Las células receptoras tienen una densidad citoplasmática menor que las sustentaculares, su núcleo es redondeado con cromatina finamente granulada. Próximos al bulbo dendrítico se encuentran numerosos centríolos, mitocondrias y cuerpos densos. Ciges y col. (1977) distinguieron dos tipos de células receptoras (claras y oscuras); algunas oscuras pueden no tener microvellosidades. Como característica del citoplasma de las células receptoras podemos destacar el gran desarrollo del retículo endoplásmico agranular. En el borde luminal pueden distinguirse las microvellosidades de las células receptoras, sustentaculares y microprocesos cuyo origen no se ha determinado.

Las células sustentaculares poseen núcleos ovals y las basales son escasas (Ciges y col., 1977; Vaccarezza, Sepich y

Tramezzani, 1981). El epitelio pseudoestratificado también ha sido llamado respiratorio (Taniguchi y Mochizuki, 1982) no sensorial o libre de receptores (Breipohl, Bhatnagar y Mendoza, 1979). Es ciliado y con microvellosidades y estaría formado por dos tipos celulares: células claras y oscuras. Algunos autores observaron cilios y microvellosidades en ambos tipos celulares; otros encontraron que las oscuras carecen de cilios. Breipohl, Bhatnagar y Mendoza (1979) postularon que los dos tipos celulares son, en realidad, distintas fases funcionales de uno solo; las células claras serían nuevas y las oscuras, senescentes. Objetaron el uso del término no sensorial, ya que este epitelio puede ser sensorial a través de su inervación trigeminal o por el nervio terminal.

En los ratones, la microscopía electrónica de barrido (Naguro y Breipohl, 1982) permitió reconocer 2 tipos de microvellosidades: las correspondientes a las células receptoras, que son más delgadas, largas y de contorno liso, y las de las sustentaculares, más gruesas que las primeras y de contorno rugoso. En la parte media del neuroepitelio, las microvellosidades de las receptoras cubren casi completamente a las de sostén. En las regiones próximas a los sulci (zona de transición entre neuroepitelio y epitelio pseudoestratificado) la densidad de las células receptoras disminuye y, concomitantemente, su capa de microvellosidades. En el epitelio libre de receptores o pseudoestratificado, las células poseen cilios y/o microvello-

sidades no bifurcadas; los primeros son generalmente más largos que las segundas.

En la zona de los sulci, las microvellosidades son similares a las de las células sustentaculares. Existen aquí numerosas aperturas glandulares rodeadas por microvellosidades orientadas radialmente.

Los métodos de congelación-fractura revelaron un extenso complejo de unión en el neuroepitelio (Miragall y Mendoza, 1982; Miragall, Mendoza y Breipohl, 1982). Con trazadores electrón-densos como el Rojo-Rutenio se vio que no es posible su penetración al espacio intercelular. Existe un depósito diferencial de esta sustancia según sean microvellosidades de células receptoras (15-20 nm) o de sustentaculares (75 nm). Sabiendo que las glicoproteínas ácidas, los glicolípidos y, en general, los grupos acídicos dan reacción positiva con este colorante, las diferencias en el tamaño de la cubierta celular podría deberse a distintas cantidades de esos grupos en las membranas o en el mucus que las cubre y que serían necesarios para la adsorción específica de las moléculas olorosas (Mendoza y Breipohl, 1983).

El órgano vomeronasal puede reconocerse a partir del día 11 de gestación (Cuschieri y Bannister, 1975a; Taniguchi, Taniguchi y Mochizuki, 1982b) como un engrosamiento en la pared medial de la fosita olfatoria. En el día 12, se forma primero un surco y luego una estructura tubular que se abre en la fo-

sa olfatoria principal. El divertículo está cubierto por un epitelio grueso similar al olfatorio. Con técnicas de plata pueden seguirse las fibras nerviosas desde la base del neuroepitelio a lo largo de los márgenes laterales del cartílago del septum nasal. La distinción entre células receptoras y sustentaculares es difícil. Las mitosis se encontrarían en todas las capas (Cuschieri y Bannister, 1975a; Taniguchi y Mochizuki, 1982b). A los 13 días de gestación es posible diferenciar neuroepitelio de epitelio pseudoestratificado. En el hamster los senos venosos y las glándulas aparecen al día 14 de gestación. Durante la vida fetal, las células del neuroepitelio no completan su diferenciación, como ocurre en el caso del epitelio olfatorio. La comunicación con la fosa nasal aparece a los 2 días en el hamster, pero en la rata está presente al nacimiento (Addison y Rademaker, 1927). En el hamster, el neuroepitelio adquiere las características del adulto a los 10 días de edad, mientras que en la rata los estudios de Kratzing (1971) dan cuenta de pocos cambios desde el nacimiento hasta los 22 días de edad. Las diferencias con el adulto comprenden la estratificación de las capas celulares y la desaparición de los cilios de las células de sostén. En el epitelio pseudoestratificado se encontró disminución en la longitud y el número de cilios durante el desarrollo (Naguro y Breipohl, 1982). También se han realizado estudios del desarrollo de los capilares intraepiteliales del neuroepitelio. Estos capilares están ausentes en embriones de 14 días y

penetrarían la base del epitelio vomeronasal alrededor de los 18 - 19 días de gestación. En los animales de 1-2 días de edad, son frecuentes en la parte basal del epitelio, pudiendo penetrar en la porción medio-basal. En el adulto están separados del pericarion de las células receptoras por lamelas de tejido conectivo. Las receptoras están muy empaquetadas formando columnas y el citoplasma próximo a los capilares contiene retículo endoplásmico liso dispuesto en forma enmarañada. En ellas es posible observar, además, cuerpos de inclusión rodeados de membrana (Breipohl y col., 1981). Estos capilares son característicos de neuroepitelios constituidos por un gran número de capas celulares, por eso estarían ausentes en lemur, musaraña, algunos primates y murciélagos (Schilling, 1970; Loo y Kanagasuntheram, 1972; Jordan, 1972; Bhatnagar, 1980). La función sería proveer nutrición, soporte e intercambio de metabolitos (Cuschieri, 1974).

Dentro de los primates, el órgano está bien desarrollado sólo en los platirrinos, encontrándose en Cebus capucinus (Jordan, 1972), Callithrix jacchus, Saguinus fuscicollis (citado en Wysocki, 1979; Hunter, Fleming y Dixson, 1984), Callicebus sp., Samiri sp y Allouatta sp (Stark, 1975; Maier, 1980), Aotus trivirgatus y Ateles geoffroyi (Hunter, Fleming y Dixson, 1984). Tanto en Aotus t., Ateles g. como Cebus c. la relación entre el órgano y el conducto nasopalatino es tal que permite la conexión

entre el órgano y las cavidades oral y nasal. Existe el consenso de que en los primates catarrinos y en el hombre el órgano vomeronasal es sólo conspicuo durante el desarrollo fetal, aunque puede persistir en forma muy rudimentaria (Jordan, 1972).

En los prosimios, Schilling (1970) describió en Microcebus murinus un órgano vomeronasal bien desarrollado (cuanti y cualitativamente) como en otros mamíferos. Calculó aproximadamente 290.000 receptores por órgano. En el lemur, el órgano desemboca en el conducto nasopalatino, cerca de su desembocadura oral y tiene, por lo tanto, comunicación con la cavidad oral y la nasal. En los prosimios estudiados, el conducto nasopalatino y el ducto vomeronasal entran en un surco de la papila palatina (Hofer, 1980) y esto es similar en algunos primates platyrrhinos.

En los humanos, el órgano vomeronasal está presente en el feto y en los recién nacidos (Kölliker, 1887; Anton, 1895; Mihalkovics, 1899; Peter, 1925; Richter, 1932; Jordan, 1973). Se constituye al inicio de la quinta semana de gestación en la pared del septum nasal como una invaginación del epitelio sensorial que se adentra en el mesénquima. En los recién nacidos es un tubo rudimentario ubicado en la parte antero-inferior del septum nasal, con una longitud de 4 a 8 mm que se comunica sólo con las fosas nasales. Está constituido por un e-

pitelio estratificado ciliado sin células sensoriales o fibras nerviosas (Jordan, 1973). No obstante, se ha descrito la presencia del nervio vomeronasal en embriones y fetos (Kölliker, 1882, 1896; McCotter, 1915).

En el adulto es posible encontrar vestigios de cartílago, probablemente el vomeronasal, a la altura del borde inferior del cartílago septal. Si bien algunos autores consideran que el órgano vomeronasal está ausente en el adulto, otros han descrito la presencia uní o bilateral del mismo (Anton, 1895; Potiquet, 1891; Kölliker, 1887; Parker, 1922; Fenú, 1959; Gabrielli, 1967; Jordan, 1973). Tampoco existe acuerdo entre la homología de este tubo de Ruysch y el órgano vomeronasal de otras especies. Gegenbauer (1886) lo consideró un residuo de otra formación glandular del septum nasal, mientras que otros piensan que la ubicación, la histología y las relaciones nerviosas permiten sostener su homología.

2. Función vomeronasal en los roedores

En los últimos años, se sugirió la participación del órgano vomeronasal en la regulación del comportamiento reproductivo. Estos experimentos tuvieron un sustrato morfológico en los trabajos de Winans y Scalia (1970) quienes, lesionando el bulbo olfatorio accesorio, observaron degeneración terminal en el núcleo amigdalino medial y en la parte pósteromedial

del núcleo amigdalino cortical. Esta proyección se lleva a cabo por el tracto olfatorio accesorio. Inyecciones con HRP en el bulbo olfatorio accesorio resultaron en neuronas marcadas en las regiones amigdalinas citadas y en la parte póstero-ventrolateral del núcleo del lecho de la estría terminal (De Olmos, Hardy y Heimer, 1978). Estas áreas están relacionadas con el hipotálamo medial y el área medial preóptica, las cuales están involucradas en los ascensos preovulatorios de gonadotrofinas en los roedores (Raisman, 1972).

. Pubertad:

En 1976, Bronson y Maruniak encontraron que en ratones hembras prepuberales, el contacto con la orina del macho estimulaba la liberación secuencial de estradiol, hormona luteinizante, folículo estimulante y prolactina. Posteriormente, Kaneko y col. (1980) sugirieron que la vía vomeronasal estaría involucrada en la recepción de las feromonas que aceleran la maduración sexual de las hembras. Utilizaron técnicas de remoción bilateral y unilateral (con o sin sección de los nervios vomeronasales contralaterales) del bulbo olfatorio principal y accesorio, aunque no realizaron la prueba crucial de cortar sólo los nervios vomeronasales.

Lomas y Keverne, en 1982, completaron las observaciones de Kaneko a través de la extirpación del órgano vomeronasal y encontraron que la remoción del órgano evitaba el efecto acele-

rador de la orina del macho sobre el comienzo de la pubertad de las hembras observando que: a corto plazo impidió el aumento del peso uterino y ovárico y, a largo plazo, retrasó la aparición del primer estro. Los receptores para las feromonas del macho estarían en dicho órgano, no en el sistema olfatorio principal. La prolactina estaría involucrada en estos efectos. También en la rata la desaferentación de los nervios vomeronasales evitó el efecto acelerador de la feromona del macho sobre la apertura vaginal y la aparición del primero estro (Sánchez Criado, 1982).

. Función ovárica en hembras adultas

En las ratas en estro persistente por iluminación permanente, la ovulación refleja se produce, en un 50% de los casos, por contacto directo con lechos usados por machos. La obturación electrolítica de los conductos de acceso al órgano vomeronasal impidió esta respuesta sin producir disrupción hormonal, ya que estos animales pueden ovular si copulan (Johns y col., 1978). La electrocoagulación del bulbo olfatorio accesorio en ratas adultas o la sección de los nervios vomeronasales (a los 21 días de edad) provocó un aumento en la proporción de ratas con ciclos estrales de 5 días de duración (los anteriores eran de 4 días). El acortamiento de 24 horas en el ciclo estral sería, pues, debido a estímulos que siguen

la vía vomeronasal. Sin embargo, los experimentos donde se realiza la electrocoagulación del bulbo accesorio deben interpretarse con cautela, ya que esta lesión afecta las fibras del tracto olfatorio lateral dorsal, dañando la vía olfatorio principal.

Si hembras adultas de ratón se agrupan en un gran número, aumentan significativamente los ciclos anovulatorios con supresión del estro y en estas condiciones Reynolds y Keverne (1979) encontraron que la remoción del órgano vomeronasal reinstaló el ciclo normal 72 horas después de la operación. Esto sugiere que el órgano estaría relacionado también con la recepción de las feromonas producidas por las hembras. La supresión del estro se pudo evitar aplicando feromonas de machos, extirpando el órgano vomeronasal o a través de agonistas dopaminérgicos (que disminuyen la prolactina) con el mismo "timing". Las influencias feromonales actuarían sobre los mecanismos neuroendócrinos que controlan el estro a través de la prolactina.

. Preñez

El efecto Bruce (Bruce, 1959) se produce cuando una hembra de ratón recientemente inseminada es expuesta a un macho extraño coespecífico, pero particularmente si éste pertenece a una cepa distinta. Resulta en un bloqueo de la preñez. La conjunción de estímulos olorosos, visuales y/o táctiles influye en

dicho bloqueo. La presencia física del macho produce la pérdida de los embriones, pero estímulos olorosos ocasionan sólo diapausa embrionaria. La remoción del órgano vomeronasal disminuyó el efecto de estos últimos estímulos (Bellringer, Pratt y Keverne, 1980). La combinación de lesiones vomeronasales y la anosmia olfatoria permitió determinar que la remoción del órgano evita el bloqueo de la preñez por las feromonas del macho, sin afectar la discriminación y preferencia de otros olores. El reconocimiento entre machos reproductores y extraños requeriría sólo la integridad del sistema olfatorio accesorio (Lloyd-Thomas y Keverne, 1982).

. Comportamiento maternal

Fleming y Rosenblatt (1974, 1979) sugirieron que el sistema olfatorio principal y accesorio estaban involucrados en la expresión del comportamiento maternal de hembras vírgenes de rata frente a crías adoptivas. A través de su papel en la recepción de las características olorosas de las crías ambos ejercerían una inhibición sobre dicho comportamiento, ya que cuando son lesionados, éste se ve facilitado (disminuye el canibalismo a las crías y la latencia para el comienzo de las actividades maternales). Posteriormente (Fleming, Miceli y Moreto, 1983), encontraron en el mismo modelo que la facilitación del comportamiento maternal, que se produjo también por

(Powers y Winans, 1975). La anosmia periférica no produjo déficits adicionales.

Las lesiones bilaterales realizadas en el núcleo medial de la amígdala interrumpieron la cópula, mientras que si éstas afectaban la estria terminal, se alteraba la cópula aumentando la latencia de los montes, el intervalo entre intromisiones y el número de intromisiones previo a la eyaculación (Lehman, Powers y Winans, 1983).

Estudiando la atracción hacia hembras castradas y a secreciones vaginales de hembras normales, se encontraron evidencias de que el sistema vomeronasal del hamster respondería a compuestos no volátiles, mientras que el olfatorio principal sería el receptor para los volátiles. Ambos participarían en la atracción sexual y el comportamiento reproductivo (Powers, Fields y Winans, 1979).

En el cobayo, la remoción del órgano vomeronasal disminuyó la cantidad de tiempo dedicada a examinar la orina de coespecíficos, sin afectar la diferenciación entre la proveniente de uno u otro sexo ni el comportamiento sexual y social en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, el sistema vomeronasal en esta especie sería importante para mantener una respuesta normal a los olores sexuales, pero si éste falta, otros sistemas podrían ser responsables del comportamiento sexual normal (Beauchamp y col., 1982).

En los ratones, la remoción del órgano vomeronasal no afec

tó la capacidad de localizar alimento ni produjo regresión de vesículas seminales ni disminución de los niveles de testosterona plasmática (Wysocki y col., 1982). Sin embargo, esta operación evitó el ascenso de esta hormona que se produce cuando machos intactos se exponen a hembras anestesiadas (Wysocki, Katz y Bernhard, 1983). La bulbectomía o remoción del órgano vomeronasal produjeron alteraciones en el tipo de ultrasonidos emitidos frente a animales de la misma cepa o a sus olores. Este efecto no pudo ser revertido por tratamiento con testosterona. Sin embargo, este comportamiento dependía de la existencia de una experiencia heterosexual previa. Si los animales son experimentados, otros sistemas podrían compensar la falta de receptores olfatorios y mantener las diferencias entre las vocalizaciones que se producen frente a machos o hembras (Wysocki y col., 1982).

Esta introducción ha tenido por objeto compilar todas las evidencias del posible rol del órgano vomeronasal en la fisiología reproductiva de los roedores donde las feromonas olfatorias producen efectos conspicuos. Para tener una idea global de dicha función en otras especies y en otros aspectos fisiológicos puede consultarse la revisión de Estes (1972).

Uno de los investigadores más importantes en el campo del sistema olfatorio accesorio y la fisiología reproductiva ha elaborado una teoría sobre las influencias feromonales en la regulación endócrina de la reproducción (Keverne, 1983). Las

"feromonas primer o cebadoras" son pequeños péptidos de peso molecular aproximado a 860, no volátiles, involucrados en cambios en las secreciones endócrinas. El sistema olfatorio accesorio sería el receptor de las mismas, que requiere del contacto con el vehículo donde ellas se transportan. Debe reconocerse que se ha sugerido una acción de bomba al órgano vomeronasal que facilitaría el acceso de los estímulos químicos al órgano (Meredith y col., 1980). Estas feromonas "primer" tendrían un efecto endócrino único, que se expresaría en cambios en la secreción de prolactina por el lóbulo anterior hipofisario. Este mecanismo podría explicar todos los efectos reproductivos producidos por la estimulación feromonal de acuerdo con la edad y el estado reproductivo del animal en que esta estimulación se produce. Por ejemplo, en la hembra anovulatoria la feromona restauraría la ciclicidad disminuyendo la prolactina que tiene función luteotrófica en la rata. El descenso en la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo liberaría al eje hipotálamo-hipofisario de la acción inhibitoria del esteroide y restauraría los ciclos. En todos los casos, salvo en el del efecto Bruce o bloqueo de la preñez, sólo basta una señal feromonal que diga "macho" que probablemente competiría por el mismo receptor con una que diga "hembra". Para el efecto Bruce se requiere, además, que la feromona diga "macho extraño". En este caso se necesita que el complejo feromonal tenga distinta composición según la cepa, porque sólo las feromo-

nas de machos de otra cepa producen este efecto. El reconocimiento y la memoria del reproductor son necesarios para evitar que éste bloquee su propia preñez. Este último efecto podría estar mediado por las proyecciones noradrenérgicas al bulbo olfatorio principal y accesorio a través de la estría olfatoria medial. Una evidencia a favor de este mecanismo reside en que si utiliza un neurotóxico como la 6-hidroxi-dopamina que depleta alrededor del 70% de los bulbos olfatorios accesorios de noradrenalina, las hembras responden a las feromonas produciendo un bloqueo de la preñez. Sin embargo, fallan en reconocer las feromonas provenientes del macho con quien copularon y, en consecuencia, éste bloqueará la preñez de la hembra coespecífica.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Holtzman, provenientes del Bioterio del Instituto de Neurobiología, con alimentación ad libitum (Purina para gestantes, lactantes y jóvenes hasta los 3 meses de edad). Los adultos fueron alimentados con dietas Cargill RR ó ACA. El bioterio cuenta con control automático de iluminación que provee un régimen de 14 horas de luz (L0=14:10) y condiciones controladas de temperatura.

Microscopía óptica

Para este estudio se utilizaron fetos (16 días de gestación) y crías de 0,1,2,5,8 días de vida y órganos vomeronasales aislados de crías de 21 días de edad (destete) de ambos sexos. La fecha de gestación se determinó de la siguiente manera:

. Se colocaron 2 machos y 8 hembras en una jaula durante una noche. A la mañana siguiente (10 horas) se buscaron espermatozoides en los extendidos del contenido vaginal. Las hembras con espermatozoides en su vagina se consideraron en el día 0 de gestación. De manera similar, el día del nacimiento fue considerado día 0.

El material se fijó por inyección a través de la fosa nasal y posterior inmersión en Bouin durante 15 a 18 horas,

deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol y xilol. La inclusión se realizó en parafina y se obtuvieron cortes seriados coronales (desde las narinas externas hasta el extremo posterior de los ojos) entre 5-7 μ m con un micrótomo American Optical que fueron coloreados con hematoxilina de Harris-eosina. Las mediciones se realizaron con un ocular micrométrico.

Microscopía Electrónica

Se utilizó material de fetos (20 días de gestación) y de crías (0, 5, 12 y 21 días de edad) de ambos sexos. Los fetos (n=3) de madres previamente anestesiadas con nembutal se colocaron en solución fisiológica para lavado y decapitación y las cabezas, con la cavidad nasal expuesta, se sumergieron en glutaraldehído al 2% (Fluka) en buffer de Millonig (1961) (pH 7.3; 0.075 M) durante 1/2 hora. Posteriormente y bajo el fijador, se disecó el órgano vomeronasal y continuó la fijación hasta completar las 2 horas.

Las crías de 0 (n=4), 5 (n=3), 12 (n=3) y 21 (n=6) días de edad se decapitaron y bajo el fijador se disecó el órgano. Los órganos se seccionaron transversalmente al eje longitudinal, permaneciendo en glutaraldehído al 2% en el buffer citado durante 2 horas.

Posteriormente, las piezas fetales y postnatales se lavaron en buffer, post-fijaron en osmio 2%, uranilo 2% en H₂O, deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y

óxido de propilene. El material se embebió en Epon 812, cortó en un micrótomo LKB ultratome III con cuchillas de vidrio. Las secciones gruesas (1 μ m de espesor) para orientación se colorearon con azul de metileno. Los cortes ultrafinos se montaron en grillas de 100 ó 200 mesh, o en grillas de agujero sobre Formvar. La coloración se realizó con reactivo de Reynolds, aunque a los efectos de obtener mejor contraste en los ejemplares de 20 días de gestación y postnatal 0 y 5 días, se usó la combinación uranilo 5%-reactivo de Reynolds. Los cortes se observaron en un microscopio Jeol 100C.

Para la comparación entre períodos se utilizó la zona central del neuroepitelio y epitelio pseudoestratificado, aunque la zona de los sulci también fue examinada (Fig. 4A).

Lesión del órgano vomeronasal en crías lactantes

a. Lesión (Técnica y de Vaccarezza y col., 1979).

Se usaron crías entre 16 y 19 días de edad con un peso de 32-40 gramos a la fecha de la lesión. Todas las crías pertenecían a la misma camada y las madres no eran primerizas, ya que observaciones realizadas en nuestro bioterio indicaron que las crías de primíparas presentan pesos inferiores que los de multíparas.

Los animales se anestesiaron con nembutal (40 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) y colocaron en posición supina.

La maxila y la mandíbula se separaron, asegurándolas a la tabla de disección con un cordel. La mucosa palatina se separó del paladar óseo desde la base de los incisivos hasta la segunda ruga con sumo cuidado, tratando de evitar la penetración de sangre a la fosa nasal a través de los conductos nasopalatinos. Así fue posible visualizar los forámenes nasopalatinos que se alargaron hasta la base de los incisivos con el tornillo. A través de ellos, se observó la porción ventrolateral del órgano. Después de levantar con cuidado la mucosa respiratoria sumamente vascularizada, se alcanzó el cartílago vomeronasal. A continuación se efectuó la lesión del órgano vomeronasal.

. Lesión electrolítica: se hicieron pequeños orificios (2 ó 3) a través del cartílago con un bisturí, tratando de no dañar el gran vaso sanguíneo de la pared lateral. Luego se introdujo el electrodo de lesión en cada perforación y se aplicó una corriente de 2-3mA durante 10 segundos. Posteriormente, se suturó la mucosa del paladar. La observación macroscópica de los animales sacrificados mostró áreas blanquecinas por la coagulación del tejido y depósito metálico del electrodo de lesión.

. Lesión por termocauterío: los órganos fueron destruidos por coagulación térmica de manera más rápida que por la electrolítica. El análisis macro y microscópico mostró la destrucción del cartílago y órgano, sin afectar el tabique nasal aunque porciones lateroventrales de la mucosa respiratoria queda-

ron dañadas. Con esta técnica no hubo una considerable pérdida de sangre.

b. Determinación de los Pesos

Los animales se pesaron con una balanza Bosch con sensibilidad de 1 gramo, antes y después de la lesión, al destete y a la fecha de la apertura vaginal.

c. Apertura vaginal

Diariamente a partir del destete y a la misma hora, se observaba la línea urogenital de las hembras hasta detectar la apertura del orificio vaginal y constatarla por la introducción de un gotero de los que se utilizan habitualmente para la toma del contenido vaginal.

d. Autopsias

Se efectuaron tanto en los animales que se usaron en el experimento piloto como durante la puesta a punto de la lesión.

Se guillotinaba al animal, abrían las fosas nasales separando la pared lateral del cráneo y los dientes incisivos. Bajo la lupa de disección se observaba el área lesionada para detectar la presencia parcial o total o ausencia del órgano vomeronasal. Se consideraron sólo aquellos animales donde la lesión había afectado los segmentos medio y caudal de ambos órganos, de donde emergen los nervios vomeronasales, ya que el extremo anterior está constituido exclusivamente por el conducto y no

existe neuroepitelio vomeronasal.

RESULTADOS

1. Organo vomeronasal. Su desarrollo postnatal

a) Microscopía Óptica

En la rata adulta, el complejo vomeronasal está integrado por el órgano, cartílago, glándulas vomeronasales y vasos sanguíneos. Es bilateral y está ubicado a lo largo de la parte inferior del tabique nasal (Vaccarezza, Sepich y Tramezzani, 1981). El órgano está formado por dos tipos de epitelio: neuroepitelio y epitelio pseudoestratificado.

Nuestros estudios sobre el desarrollo postnatal del órgano vomeronasal mostraron un proceso de maduración del mismo y ausencia de dimorfismo sexual en cuanto a la morfología de los distintos tipos celulares y a las etapas de desarrollo que a continuación describimos.

16 días de gestación:

El órgano vomeronasal presenta comunicación rostral con la cavidad nasal (Fig. 3A). La abertura se halla limitada por las paredes del conducto del órgano: una dorsal y otra ventral. El cartílago vomeronasal rodea incompletamente a la abertura y su espesor decrece desde su origen en el septum nasal hasta su terminación en la parte media del área de abertura. Está formado por células con núcleo oval y citoplasma muy claro. El pericondrio no es fácilmente distinguible. En dirección caudal, a-

parece luego el neuroepitelio vomeronasal, que ocupa la pared medial del órgano, es decir, la próxima al tabique nasal, y el epitelio pseudoestratificado, o pared lateral, que ocupa la próxima a la luz de la fosa nasal. El cartílago en forma de U rodea al órgano excepto en la parte dorsal. Se observan vasos sanguíneos en el tejido conectivo próximo a ambos epitelios.

En la porción central del segmento medio del órgano, el cartílago vomeronasal tiene forma de J. Rodea casi la totalidad del neuroepitelio, pero está incompleto en la pared dorsal y mediolateral del órgano (Fig. 3B). El neuroepitelio tiene, en esta región, un espesor de aproximadamente 72 μm . No se observa en él zonación, pero es posible distinguir una estrecha franja de prolongaciones celulares. Si bien es posible diferenciar núcleos elongados de otros más ovales, mediante la microscopía óptica no es posible reconocer a qué tipo de células pertenecen. Las células en mitosis se ubican en la superficie próxima al lumen del neuroepitelio. En el tejido conectivo subyacente encontramos numerosos vasos sanguíneos (Fig. 3C). El epitelio pseudoestratificado tiene un espesor aproximado de 13 μm (Fig. 3C) y está constituido por 2 capas celulares. En el tejido conectivo se observa un gran vaso sanguíneo. Las áreas de transición entre ambos epitelios están constituidas por varias capas celulares. El lumen que separa a ambos epitelios es amplio. No se observaron glándulas vomeronasales (Fig. 3D).

Nacimiento (Día 0):

El órgano tiene una longitud de 2,1 mm. Su comunicación con la cavidad nasal se realiza por medio de una abertura delimitada por 2 paredes (al igual que en el feto). El cartílagos vomeronasal está bien desarrollado y, formando una U, rodea casi totalmente esta abertura. El conducto del órgano tiene un diámetro máximo de 132 μm y está tapizado por epitelio estratificado.

La morfología típica del órgano vomeronasal se observa a unos 600 μm aproximadamente en dirección caudal a la abertura. En estos ejemplares de 0 día de edad (Fig. 4C). no se distingue aún la zonación del neuroepitelio, pero es posible observar 2 tipos de núcleos: unos elongados y otros más ovales. Los primeros corresponden a las células sustentaculares y están ubicados más próximos al lumen que los ovales de las receptoras. Sin embargo, encontramos columnas de células sustentaculares que se extienden desde la lámina basal hasta el lumen. Se distingue también una delgada capa de prolongaciones celulares en el borde luminal del epitelio. Los núcleos ovales de las células receptoras están situados más basalmente. El área de los sulci está bien diferenciada y se encuentran allí sólo núcleos elongados.

En la porción central del segmento medio, el neuroepitelio tiene un espesor aproximado de 106 μm y pueden observar-

se capilares intraepiteliales (Fig. 4C). El espesor del epitelio pseudoestratificado es de 13 μm (Fig. 6A) y está formado por un solo tipo celular de células prismáticas.

El cartílago vomeronasal tiene forma de J. Dorsalmente al órgano, en la lámina propia que separa el septum nasal del epitelio respiratorio, encontramos numerosos ácinos glandulares.

En la base del neuroepitelio es posible observar el recorrido de los nervios vomeronasales formados por los axones de las células receptoras bipolares. Los nervios corren a lo largo del septum en su trayecto hacia el bulbo olfatorio accesorio (Fig. 5A). Aproximadamente a unos 1,7 - 1,8 mm de la abertura, el neuroepitelio rota de su posición en la pared medial del órgano a una ubicación ventral al techo de la fosa nasal. A partir de aquí, el órgano va disminuyendo en diámetro hasta desaparecer en forma de un tubo ciego rodeado por el cartílago. El vaso sanguíneo previamente descrito se ubica dorsalmente al neuroepitelio.

Postnatal 1:

La longitud del órgano es de aproximadamente 2,2 mm. La morfología del complejo vomeronasal es similar a la observada en los recién nacidos. El diámetro máximo del conducto del órgano es de 122 μm ; está recubierto por un epitelio estratificado.

El neuroepitelio que no muestra diferencias en cuanto a

lo observado en ejemplares de 0 día tiene un espesor de 108 μm y el pseudoestratificado, de 16,5 μm (porción central del segmento medio).

Postnatal 2:

La longitud del órgano es de 2.6 mm. A partir de este período se observa un comienzo de zonación del neuroepitelio. La capa de prolongaciones celulares es bien visible y existe una migración incipiente de los núcleos de las células sustentaculares hacia la capa inferior a la de prolongaciones celulares. Los núcleos de las receptoras se ubican en la parte medio basal del neuroepitelio. En el segmento medio central, el espesor del neuroepitelio es de 109 μm . El epitelio pseudoestratificado (21 μm de espesor) presenta núcleos elongados y pueden observarse en él algunas células con citoplasma más claro y núcleos ovales, además del tipo celular descrito al nacimiento.

Es notorio el desarrollo de ácinos glandulares ubicados en la lámina propia, entre el septum y el epitelio respiratorio (Fig. 5B). Estos ácinos están ausentes en el feto de 16 días de gestación, los encontramos en el recién nacido y su desarrollo es mayor en el período de 0-2 días de edad. El epitelio que tapiza el conducto glandular es cúbico a columnar simple.

Es evidente la diferenciación de los cartílagos del septum y vomeronasal (tipo hialino) desde la gestación hasta este es-

tadío.

Postnatal 5:

El órgano tiene una longitud de 2.9 mm. La abertura de comunicación con la fosa nasal tiene un diámetro máximo de 145 μm . El neuroepitelio diferenciable aparece a aproximadamente 370 μm caudal a la abertura y con un espesor de 92 μm (segmento medio anterior). Aumenta progresivamente su grosor hasta alcanzar en la parte media y caudal dicho segmento 132 μm (Fig. 4B), el epitelio pseudoestratificado mide 26 μm (Fig. 6B).

En este estadio, el neuroepitelio (Fig. 4B) tiene una zonación más clara que en el período previo con:

- . capa luminal de prolongaciones celulares.
- . capa de células sustentaculares.
- . capa de células receptoras.

Esta orientación es clara en la parte central del neuroepitelio, pero no es tan evidente en las regiones próximas a los sulci. No es posible distinguir con microscopía óptica las células basales.

En el epitelio pseudoestratificado podemos distinguir 2 zonas:

- . Central (Fig. 6B) con 2 tipos celulares: a) células con núcleo claro y redondeado, ubicado en la parte basal de las mismas, dejando la porción citoplasmática próxima al lumen.
- b) Células con núcleo elongado que se tiñe intensamente con la

hematoxilina. Estos núcleos se ubican tanto próximos al lumen como a la lámina basal.

. Próxima a los sulci: se encuentran sólo células con núcleo elongado.

En este estadio comienza el proceso de osificación del cartílago vomeronasal. La capa más externa al complejo se modifica, la matriz se tiñe muy intensamente con la eosina, los núcleos son elongados y picnóticos. La capa más próxima al complejo conserva las características del tipo hialino.

Postnatal 8:

La longitud del órgano es de aproximadamente 3 mm. La zona ción es clara en la parte central del neuroepitelio y se extiende a las regiones próximas a los sulci. En el segmento medio central del órgano, el espesor de este epitelio es de aproximadamente 134 μm .

El epitelio pseudoestratificado está formado por los dos tipos celulares descritos en el estadio previo, pero todos los núcleos han migrado a la porción basal de las células. Mide aproximadamente 26 μm . En el segmento medio del complejo, se observan numerosos ácinos glandulares ubicados lateralmente al gran vaso sanguíneo relacionado con epitelio pseudoestratificado (Fig. 5D). Estos estaban ya presentes a los 5 días (Figs. 4A, 5C), pero no se encuentran en los estadios previos (Figs. 3D; 5A, B).

El cartílago está casi totalmente osificado.

Postnatal 21 (Destete):

La longitud del órgano es de aproximadamente 5 mm. El neuroepitelio mide 152 μm (segmento medio central), tiene las características observables en el adulto con microscopía óptica. El cartílago está totalmente osificado. La capa de prolongaciones celulares es de mayor grosor que en los estadios previos y pueden observarse las microvellosidades en el borde luminal.

El epitelio pseudoestratificado (33 μm) presenta los núcleos ubicados próximos a la lámina basal (Fig. 6C). Es ciliado y el borde libre, festoneado. Cerca de los sulci sólo se encuentran células con núcleo elongado.

b) Microscopía Electrónica

20 días de gestación:

Epitelio pseudoestratificado

El epitelio pseudoestratificado está formado por una sola capa y un solo tipo celular: las células oscuras. Estas células poseen un citoplasma electro-denso en el cual podemos encontrar numerosas mitocondrias ovales, cuerpos multilamelares, aparato de Golgi con cisternas dilatadas, numerosos ribosomas libres, cisternas del retículo endoplásmico granular. Las cisternas del retículo agranular están dispuestas en for-

ma de huella digital. Los núcleos son irregulares con una banda delgada de cromatina periférica.

Las células están interdigitadas y los espacios intercelulares muestran prolongaciones digitiformes de las mismas.

La superficie luminal de las células presenta prolongaciones muy cortas y se observan vesículas claras de tamaño variado en el citoplasma próximo al lumen. No existen cilios ni microvellosidades. Próximos a la base del epitelio se encontraron haces de fibras nerviosas. La lámina basal separa el epitelio del conectivo subyacente.

Neuroepitelio

El neuroepitelio está constituido por células sustentaculares, basales y receptoras. No es posible diferenciar entre células receptoras y sustentaculares en función de la densidad del citoplasma.

. Células receptoras: en la región luminal podemos diferenciarlas de las sustentaculares por su extremo dendrítico dilatado y la presencia de numerosos centríolos y mitocondrias en la región post-cuello del bulbo dendrítico. No se observaron cilios. Las microvellosidades son escasas y cortas, con acumulación de material granular en sus bordes (glicocálix) (Fig. 7). También se encontraron grandes proyecciones citoplasmáticas hacia el lumen; éstas tienen un contenido granular y/o vesicular. La porción dendrítica de las receptoras contiene numerosas vesícu

las (algunas son claras, otras tienen un contenido medianamente denso), cuerpos densos y cuerpos multivesiculados. En la proximidad del lumen, estas neuronas bipolares están conectadas a las sustentaculares por uniones estrechas; alejándose de él, ambas muestran interdigitaciones. Los núcleos de las células receptoras son ovales, claros, con algunos acúmulos de cromatina en el nucleoplasma. El citoplasma contiene microfilamentos, mitocondrias elongadas con una matriz muy densa, ribosomas libres, aparato de Golgi. No encontramos en este período un gran desarrollo del retículo endoplásmico agranular. Sus formaciones en huella digital están ausentes. En la base del neuroepitelio las prolongaciones axónicas de las células receptoras forman los nervios vomeronasales. Estas prolongaciones contienen neurotúbulos y alguna mitocondria. Los axones están agrupados y en la base se observa una células de núcleo elongado.

. Células sustentaculares: en el lumen terminan en forma de copa. Es frecuente la presencia de cilios en su superficie, ancladas por el corpúsculo basal (Fig. 7). Las microvellosidades son muy escasas. Al igual que en el caso de las receptoras, se observan vesículas de tamaño y contenido variado próximas al lumen. El citoplasma supranuclear contiene ribosomas y microfilamentos. En la región infranuclear es posible encontrar cisternas del retículo endoplásmico granular orientadas paralelamente. El núcleo es elongado y la banda de cromatina periféri-

ca es más delgada que la que se observa en los estadios posteriores.

Debido a la falta de estratificación es posible encontrar también núcleos de células sustentaculares en la base del epitelio y próximas a los núcleos de las receptoras.

Recién nacido (día 0)

Epitelio pseudoestratificado

Está formado por un solo tipo celular que se extiende desde la lámina basal hasta el lumen (Fig. 8). La superficie luminal no muestra cilios ni microvellosidades bien desarrolladas, pero sí unas prolongaciones digitiformes de mayor longitud que las observadas en el feto.

El citoplasma granular contiene mitocondrias redondas y ovales, ribosomas, cisternas del retículo endoplásmico granular, aparato de Golgi, cuerpos multilamelares. El núcleo, ubicado en la porción mediobasal, posee una banda de cromatina periférica y densos acúmulos en el nucleoplasma.

En la porción próxima al lumen las células están fuertemente relacionadas y, si bien no pudieron distinguirse uniones estrechas, no existen espacios intercelulares. En la porción mediobasal la relación no es tan íntima, observándose prolongaciones digitiformes de las células en espacios intercelulares. En la base del epitelio no pudieron encontrarse hemidesmosomas.

Bajo la lámina basal se hallan fibras de colágeno, haces de fibras nerviosas amielínicas que también pueden ubicarse intrae-pitelialmente.

Ocasionalmente puede observarse un segundo tipo celular insertado en el epitelio. Esta célula, que llamaremos clara, debido a que su citoplasma y núcleo de forma oval son poco densos, no alcanza el lumen. El contenido citoplasmático es similar al del otro grupo celular. Se ubican en la parte central del epitelio pseudoestratificado, estando ausentes en las zonas próximas a los sulci donde sólo se hallan células oscuras.

Neuroepitelio

Si bien no se observan en este período diferencias en la densidad citoplasmática entre células receptoras y sustentacu-lares (como en el adulto) es posible distinguir claramente los dos tipos celulares en la superficie luminal (Fig. 9A).

. Células receptoras: la prolongación dendrítica de las mis-mas, que está en contacto con el lumen, asume la forma de "bulbo" de donde parten escasas y largas microvellosidades con un esqueleto filamentoso. En este bulbo dendrítico encon-tramos centriólos, cuerpos densos, microfilamentos, vesículas (esféricas, ovals o dilatadas) y algunas cisternas (Fig. 9A). Se han encontrado cilios en las células receptoras (Fig. 9C). Estos son poco frecuentes y en todos los casos se encontró u-no por célula. Dicho cilio está anclado por un cuerpo basal

que muestra las raíces ciliares a ambos lados. También podemos encontrar un centríolo orientado en ángulo recto respecto de él. Debido a que estos cilios en las células receptoras son es casos, no se pudieron obtener secciones transversales para determinar si corresponden al tipo 9+0 ó 9+2.

Algunas receptoras presentan proyecciones o protuberancias hacia el lumen conteniendo centríolos, vesículas y microfilamentos.

Luego del bulbo sigue una estrangulación o cuello. Las células receptoras se hallan separadas entre sí por sustentaculares.

En la región próxima al lumen ambas células están vinculadas por uniones estrechas; en la región posterior al cuello los contactos son de tipo desmosómico. Esta última región es ensanchada y encontramos allí centríolos en número de 5 a 8, numero sas mitocondrias elongadas, microfilamentos y precursores ciliares (Fig. 9A).

El citoplasma de las células receptoras atraviesa la zona donde se encuentran los núcleos de las sustentaculares hasta alcanzar la región donde se ubica su núcleo. Este es oval, menos denso que el de las sustentaculares y la cromatina está finamente granulada. Posee una delgada banda periférica de cromati na condensada y algunos acúmulos en el nucleoplasma. La región perinuclear es ensanchada y encontramos allí cisternas del apa rato de Golgi, mitocondrias, ribosomas libres, lisosomas. El retículo endoplásmico agranular adquiere un gran desarrollo en

forma de huella digital. Las células terminan en una prolongación axónica que dará origen a los nervios vomeronasales. Encontramos en esta prolongación neurotúbulos y mitocondrias.

. Células sustentaculares: en la porción luminal terminan en forma de copa. De ella parten microvellosidades y cilios (1 por célula) que pueden coexistir. En esta región el citoplasma es granular y casi no se encuentran vesículas (Fig. 9A).

La célula sustentacular se ensancha en la porción correspondiente al cuello de la dendrita y allí podemos observar una zona transversal de mayor densidad. Luego, el citoplasma se comprime. En la región próxima al núcleo encontramos el mayor acúmulo citoplasmático. Las organelas presentes son: ribosomas, retículo endoplásmico granular con cisternas dilatadas, mitocondrias elongadas. El núcleo es elongado, indentado, denso y se distingue fácilmente del de las receptoras. El citoplasma perinuclear está reducido a una delgada banda con microfilamentos, ribosomas y mitocondrias. La célula termina en una prolongación aguzada. En esta región no existen especializaciones de unión entre receptoras y sustentaculares sino que están interdigitadas entre sí. Cuando este tipo celular se encuentra relacionado con los capilares intraepiteliales (Fig. 11B), podemos observar en la porción cercana al capilar que el citoplasma de las células está vacuolado, con numerosas cisternas paralelas del retículo endoplásmico granular, mitocondrias y cuerpos densos.

.
.
. Células basales: tienen una ubicación próxima al tejido conectivo subepitelial. El núcleo es indentado, la cromatina finamente granulada menos densa que las de las células sustentaculares. La cromatina perinuclear está reducida a una delgada banda. Su citoplasma es escaso con mitocondrias, ribosomas y algunas cisternas como únicas organelas. Las características de estas células son similares a las que se observan en los ejemplares de 21 días (Fig. 13B).

.
Postnatal 5

.
Epitelio pseudoestratificado

.
.
.
Entre el nacimiento y los 5 días de vida ocurren profundas modificaciones en este epitelio. La aparición de cilios y el incremento en el número de células claras constituyen la expresión más notoria de este cambio. En este estadio, el epitelio es verdaderamente pseudoestratificado, con 2 tipos celulares diferentes. Los núcleos se ubican en él a distintos niveles (Fig. 6B). Los cilios son del tipo 9+2. Coexisten con microvellosidades en el epitelio y en el mismo tipo celular (Fig. 10A). En la región próxima a los sulci, el número de cilios disminuye y predominan microvellosidades cortas. Estos cilios aparecen por primera vez en las células claras. El citoplasma próximo a los cilios muestra una gran concentración de mitocondrias, sugiriendo un gran aporte energético de estas es-

estructuras al movimiento ciliar. También allí se ubican vesículas claras pequeñas. Próximas a la superficie luminal las células están fuertemente conectadas y es posible observar, en dirección más basal, desmosomas e interdigitaciones.

En el citoplasma supranuclear de las células claras encontramos cisternas aisladas del retículo endoplásmico granular, granos de glucógeno y cuerpos densos rodeados de membrana (de posible función secretoria), centríolos, ribosomas libres, cuerpos multilamelares y aparato de Golgi. Cercano al Golgi y próximo a las cisternas del retículo pueden verse numerosas vesículas pequeñas con un contenido opaco. Esto indicaría que las células no sólo están involucradas en el movimiento sino también en la producción de material para secreción. El núcleo es redondo a oval (a veces con alguna indentación) y posee una banda delgada y periférica de cromatina condensada (Fig. 10A). A esta altura las células están muy interdigitadas entre sí. Las células oscuras que ya estaban presentes al nacimiento tampoco muestran cilios en este período. Las características de las mismas son similares a las descritas en ejemplares recién nacidos, excepto en que las microvellosidades son más largas. En la parte basal del epitelio la unión entre células es más laxa, existen interdigitaciones y espacios intercelulares. Las células se asientan sobre una lámina basal. No fue posible observar hemidesmosomas entre ambas. Debajo de la sustancia densa de la lámina basal encontramos fibras de colágeno, haces de

fibras nerviosas, capilares.

Neuroepitelio

Los principales cambios que ocurren en el neuroepitelio en tre el nacimiento y los 5 días de edad están representados por un incremento gradual en las microvellosidades, desaparición de los cilios en las células receptoras y migración de los núcleos de las sustentaculares (Fig. 4B) para formar una capa di ferenciada.

. Células receptoras: Podemos diferenciar 2 estadios morfológicos: a) Células donde encontramos un acúmulo de centriolos (5 a 8), precursores ciliares (Kolnberger y Altner, 1971) y es casas vesículas en el bulbo dendrítico; b) Células donde los centriolos migraron a la región post-cuello y en el bulbo exis ten numerosas vesículas. Ambos tipos poseen microvellosidades, pero éstas parecerían más abundantes (y a veces bifurcadas) en el tipo b (Fig. 11A).

Algunas células del tipo a presentan una proyección engrosada y vacuolada del bulbo dendrítico. El citoplasma supranuclear tiene características similares al observado en los recién nacidos en ambos casos. Alrededor del núcleo éste es vacuolado. El retículo endoplásmico granular está orientado en cisternas paralelas. El agranular muestra gran desarrollo, similar a lo que se observa en el recién nacido. Las cisternas del aparato de Golgi aparecen dilatadas.

posible ver células con numerosos gránulos citoplasmáticos (probablemente macrófagos) rodeando a las células oscuras, pero no a las claras.

Neuroepitelio

Desde el nacimiento hasta este período se pueden reconocer los siguientes cambios en la ultraestructura del epitelio vomeronasal: a) incremento en el número de microvellosidades, b) comienzo de la diferenciación en base a la densidad citoplasmática entre células receptoras y sustentaculares, c) la estratificación completa del neuroepitelio en 3 capas perfectamente diferenciables: prolongaciones celulares, núcleo de células sustentaculares, núcleos receptores, desde el lumen hacia la lámina basal (Fig. 4D).

Este es el último estadio en el cual encontramos cilios y proyecciones citoplasmáticas de las células sustentaculares (Fig. 9D).

Las características generales de ambos tipos celulares son similares a las observadas en los ejemplares de 5 días de edad, pero aparentemente en las células receptoras existe un mayor desarrollo del retículo endoplásmico agranular que en el período previo.

Postnatal 21

Epitelio pseudoestratificado

Adquiere la morfología del adulto. Es similar al que se observa en los ejemplares de 12 días, pero su relieve aparece festoneado con saliencias y surcos (Fig. 6C, 10B). Tanto las células claras como las oscuras poseen cilios y microvellosidades. Los dos tipos celulares están en contacto con la lámina basal. Las mitocondrias se concentran en la porción del citoplasma próximo a los cilios (donde existe además depósito de glucógeno), luego su número disminuye al acercarse a la base del epitelio.

El citoplasma de las células claras es muy vacuolado, las cisternas del retículo granular están dilatadas pero no muestran ordenamiento especial. Llama la atención la concentración de vesículas muy pequeñas ubicadas entre el núcleo y la región de acúmulo de mitocondrias. Algunos cuerpos densos están formados por un centro muy denso y una matriz más clara.

Se observan hemidesmosomas que relacionan las células a la lámina basal. En algunas secciones se puede encontrar una célula fagocitaria proveniente del tejido conectivo subyacente, con funciones de probable remoción de células en degeneración. El resto de las características de los 2 tipos celulares, tejido conectivo, se mantienen similares a las descritas en los períodos previos.

Neuroepitelio

El neuroepitelio alcanza en este estadio la maduración mor

fológica, presentando las características del adulto. Esta maduración se evidencia por:

- . desaparición de cilios en las células sustentaculares.
- . incremento conspicuo en número de microvellosidades de las receptoras y sustentaculares desde el nacimiento, siendo este aumento más notorio entre los 12 y 21 días (Fig. 9B; 12A,B).
- . diferenciación de las microvellosidades de ambos tipos celulares, las correspondientes a las células sustentaculares son de mayor grosor que las de las receptoras y con un contenido fibrilar más denso.
- . migración de los centriolos, precursores ciliares y mitocondrias desde la región del bulbo a las áreas posteriores al cuello de la dendrita. El bulbo dendrítico presenta grandes acúmulos de vesículas al destete (Fig. 9B; 12A,B).
- . diferenciación neta en base a la densidad citoplasmática entre las sustentaculares y receptoras, siendo estas últimas las más claras (Fig. 9B).

En la región próxima a los sulci, la cantidad de microvellosidades es menor que en la parte central del neuroepitelio.

. Células receptoras: La región dendrítica presenta características similares a los períodos previos, excepto por el hecho de que el acúmulo de centriolos y mitocondrias está ahora posteriormente al cuello. El bulbo dendrítico es el origen de numerosas microvellosidades y está ocupado por numerosas vesí-

culas claras como única estructura (Fig. 9B).

Los núcleos ubicados basalmente a los de las células sustentaculares son claros y el citoplasma perinuclear es muy vacuolado a expensas del retículo endoplásmico agranular que está en este estadio mucho más desarrollado que en los anteriores (Fig. 13C). Las mitocondrias son también abundantes en el citoplasma perinuclear. En las proximidades del retículo agranular se ven también cuerpos densos de tamaño y forma variada (redondos, ovales, piriformes, claviformes). El retículo granular se dispone en cisternas paralelas. El resto de las características permanecen similares a los períodos previos.

. Células sustentaculares (Fig. 13A): A excepción de la modificación en su densidad citoplasmática, las microvellosidades y la presencia de unos pocos gránulos densos, se mantienen las características observadas a los 12 días de edad.

. Células basales: Son claramente distinguibles por su núcleo irregular (Fig. 13B) con una gruesa banda periférica de cromatina condensada, el escaso citoplasma perinuclear donde ribosomas, mitocondrias, lisosomas son las únicas organelas. Estas células forman prolongaciones citoplasmáticas que rodean a grupos de axones de células receptoras (Fig. 13B). Las células basales están ubicadas en la base del neuroepitelio próximas a la lámina basal.

. Prolongación axónica de las células receptoras: Se observan en

los neurotúbulos y las mitocondrias (Fig. 13D).

2. Lesiones del órgano vomeronasal en crías lactantes

La técnica de lesión del órgano vomeronasal de Vaccarezza y col. (1979) es útil para el estudio de la relación entre el órgano y el sistema neuroendócrino que regula la función reproductiva, ya que las ratas adultas lesionadas no presentan alteraciones ni en el peso ni en el estado general después de 20 días de realizada la operación.

En nuestro caso, se usaron ejemplares de 16 a 19 días de edad, con el objetivo de estudiar la contribución del órgano vomeronasal a los mecanismos neuroendócrinos que controlan la pubertad. La descripción completa de la técnica se encuentra en la sección Materiales y Métodos. El período para realizar la lesión se eligió teniendo en cuenta que el incremento más notorio en el número de microvellosidades (que estarían involucradas en el proceso de quimiorrecepción; Bhatnagar, Matulionis y Breipohl, 1982) se produce entre los 12 y 21 días de edad. Por otro lado, en este período los animales se recuperan con éxito de la anestesia, el acceso al órgano es más sencillo que en los estadios previos por la constitución ósea del paladar y la forma prominente que adopta el órgano en su ubicación a lo largo del borde inferior del septum nasal.

La lesión efectuada por termocauterío fue preferida a la lesión electrolítica dado que:

nasal no es adecuado para el estudio de la función vomeronasal dado que:

. Si bien el peso al destete no es afectado por la lesión, se produce una mortalidad por causas desconocidas entre el destete y el comienzo de la pubertad. Esto reduce las posibilidades de trabajar con grandes números de animales requeridos para validar las conclusiones en experimentos de fisiología reproductiva.

. El órgano vomeronasal parecería no estar implicado en la recepción de estímulos feromonales entre el destete y el comienzo de la pubertad que afecten la alimentación y/o reproducción, ya que no se modifican ni el peso ni la edad de apertura vaginal. Monteiro y Falconer (1966) postularon que en el ratón, la fecha de apertura vaginal depende más del peso corporal que de la edad.

. El órgano vomeronasal parecería no tener efecto alguno en la aparición del primer estro.

Tabla I: Efecto de la remoción del órgano vomeronasal sobre el peso (gramos) a los 21 días de edad y sobre el peso corporal (gramos) y edad (días) en la que se produce la apertura vaginal.

	Peso al destete (gr.)	Edad de apertura vaginal (días)	Peso a la fecha de apertura vag. (gr.)
C O N T R O L	36.72 ± 1.33 (n = 9)	40.2 ± 2.2 (n = 5)	112 ± 5 (n = 5)
L E S I O N	33.42 ± 2.1 (n = 7)	38 ± 2 (n = 5)	98.48 ± 3.65 (n = 5)
	t = 1.355, ns	t = 0.6553, ns	t = 2.1, ns

DISCUSION

Durante las 3 primeras semanas de vida ocurre una maduración morfológica del complejo vomeronasal representada por los cambios que afectan:

ambos epitelios del órgano
glándulas del complejo
cartílago vomeronasal

En relación al desarrollo de ambos epitelios, la microscopía óptica sólo permite diferenciar los estadios en base a la estratificación de las distintas capas celulares, el espesor de los epitelios y, en el epitelio pseudoestratificado, las variaciones entre los dos tipos celulares.

En nuestro material, la comunicación del órgano con la fosa nasal está presente ya en el feto a los 16 días de gestación. Addison y Rademaker (1927) la encontraron en el recién nacido, pero en el hamster aparece recién a los dos días de edad. Estas diferencias interespecíficas podrían indicar también diferencias en el comienzo de la sensibilidad vomeronasal.

Las medidas de longitud del órgano y el espesor del neuroepitelio son similares a las previamente obtenidas por Addison y Rademaker (1927). A los efectos de adquirir una información más detallada de las modificaciones sufridas por ambos epitelios del órgano, se recurrió a la microscopía electrónica de

transmisión. La elección de la porción media del neuroepitelio y del epitelio pseudoestratificado para efectuar las comparaciones entre los períodos es adecuada, ya que en las áreas de transición o sulci se originan las células de reemplazo que luego migrarían a la parte central (Barber y Raisman, 1978 a,b; Graziadei y Monti-Graziadei, 1978). Se encontró que la disposición de las microvellosidades de las células receptoras y sustentaculares muestra variaciones regionales. En la parte media del neuroepitelio, las microvellosidades de las células receptoras cubren prácticamente las de las sustentaculares, mientras que en las regiones más periféricas (sulci), como la densidad de receptoras es menor, existe una capa menos densa de microvellosidades. En estas regiones las microvellosidades de las células sustentaculares no están tapadas por las de las receptoras (Naguro y Breipohl, 1982).

El estudio ultraestructural de nuestro material a los 21 días de edad mostró que la densidad de microvellosidades disminuía desde el centro del neuroepitelio hacia las regiones de los sulci, donde éstas eran notablemente más escasas. Se encontró allí una formación parecida a un cilio, aunque sin cuerpo basal. Se ha postulado que los cilios podrían ser indicio de células recién formadas, por eso los resultados obtenidos surgen de la comparación entre las áreas centrales del neuroepitelio de los distintos períodos.

El neuroepitelio y el epitelio pseudoestratificado sufren

un proceso de maduración desde los últimos días de gestación hasta el destete. Ambos muestran diferentes velocidades de desarrollo hasta alcanzar la forma madura. El proceso de maduración postnatal del órgano en la rata es similar al observado en el hamster, sólo que en este último progresa mucho más rápido, alcanzándose características similares a las del adulto a los 10 días de edad (Taniguchi, Taniguchi y Mochizuki, 1982b).

El epitelio pseudoestratificado de la rata presentó características similares a las del adulto a los 12 días de edad, ya que a los 21 días sólo se producen pliegues en el borde epitelial. Su diferenciación se evidencia por una transición de no ciliado a ciliado. La ciliogénesis sería un proceso evolutivo postnatal, como fuera postulado para el hamster. En los fetos observados, el epitelio pseudoestratificado tampoco presenta cilios. Sin embargo, otros autores creen que tanto en la rata como en el ratón la ciliogénesis disminuye, dado que observaron reducción en el número y la longitud de los cilios durante el desarrollo pre y postnatal (Naguro y Breipohl, 1982). Nuestras observaciones no permiten concluir si las diferentes características celulares corresponden a tipos celulares distintos (Loo y Kanagasuntheram, 1972; Ciges y col., 1977; Vacca rezza, Sepich y Tramezzani, 1981), o a diferentes fases funcionales de un mismo tipo (Breipohl, Bhatnagar y Mendoza, 1979; Naguro y Breipohl, 1982). Este segundo grupo postula que las células claras son células jóvenes y que a lo largo del tiempo

se produce la transición al tipo oscuro. Esta hipótesis no puede explicar por qué al nacimiento el epitelio está formado sólo por células con las características de las células oscuras. Estas células oscuras carecen de cilios durante la gestación y hasta los 5 días de edad, presentándolos a los 12 y 21 días. Se ha encontrado en ejemplares de 12 días de edad fagocitos en relación con algunas células oscuras. La cuestión del "turnover" y el origen celular en este epitelio podría determinarse mediante el uso de técnicas morfológicas de incorporación de aminoácidos marcados.

El desarrollo del neuroepitelio acompaña el desarrollo del bulbo olfatorio accesorio, el cual alcanza el 81% de su volumen alrededor de la 3ª semana de vida. Esta maduración pre y postnatal produce modificaciones en la parte apical del neuroepitelio (Fig. 12 A,B). Las más conspicuas son:

- . Desaparición de estructuras celulares como cilios y proyecciones celulares.

- . Aumento en el número de microvellosidades.

- . Migración de centríolos y precursores ciliares a regiones más lejanas al lumen.

Los cilios y las proyecciones de las células sustentaculares son formaciones temporarias. Los primeros son más abundantes y persisten más tiempo en las células sustentaculares que en las receptoras. Kraitzing (1971b) los encontró en las célu-

las sustentaculares hasta los 7 días de edad, pero sus observaciones fueron realizadas en períodos distintos de los aquí estudiados y en la región donde el neuroepitelio se ubica ventralmente al pseudoestratificado. En células receptoras de embriones se encontraron cilios (Breipohl, 1979). Estos cilios no son tan frecuentes como los de las células sustentaculares. Se ha sugerido que probablemente los cilios indicarían células recién formadas y, dado que son raros, esto concuerda con el lento recambio celular en el neuroepitelio.

En fetos y recién nacidos se observaron cilios en células sustentaculares próximas a los sulci. También en estas células y en esta región se vio una imagen similar a un cilio sin cuerpo basal en un ejemplar de 21 días. Las células del neuroepitelio vomeronasal y las células olfatorias tienen un origen común en la placoda olfatoria. Este origen embriológico podría explicar la existencia de cilios en algunas células receptoras. El neuroepitelio pierde la capacidad de ciliogénesis durante la maduración, determinando que las células adultas presenten las características de ciliogénesis incompleta descritas anteriormente (Kolnberger y Altner, 1971).

Balboni y Vanelli (1982) emitieron la hipótesis que las proyecciones de las células sustentaculares podrían ejercer una acción moduladora sobre las células receptoras. Sin embargo, el significado de estas proyecciones es aún oscuro.

A la tercera semana de vida, el neuroepitelio y el bulbo

accesorio muestran una imagen estructural muy similar a los adultos, lo cual podría relacionarse con fenómenos fisiológicos que ocurren posteriormente al destete. Sin embargo, Teicher, Shaywitz y Lumia (1984) correlacionaron fenómenos de conducta con función vomeronasal a los 10 días de edad, un período en el cual la porción apical del neuroepitelio no está madura. Si milarmente, en el epitelio olfatorio se encontró que las células receptoras olfatorias de la rata responden a soluciones olorosas antes de completar su desarrollo, pero la selectividad en la respuesta ocurre sólo cuando las células alcanzan su madurez morfológica (que para este epitelio es justo antes del nacimiento) (Gesteland, Yancey y Farbman, 1982).

Los resultados obtenidos muestran que el incremento en el número de microvellosidades y, en consecuencia, de la superficie receptora apical, ocurre entre 12 y 21 días de edad, período en el cual se encontró crecimiento en el tamaño y contenido de organelas de las células receptoras (Dodson y Bannister, 1980). Si las microvellosidades están relacionadas con la recepción de las moléculas olorosas, el aumento en el número y la diferenciación de las mismas podría modificar la sensibilidad en forma cuali-cuantitativa.

Las glándulas del complejo vomeronasal, que se ubican en la proximidad del vaso sanguíneo relacionado con el epitelio pseudoestratificado, se encuentran en los ejemplares de 5 días

de edad, pero no en los estadios previos estudiados, y adquieren un desarrollo notorio a los 8 días de edad. Sin embargo, Taniguchi, Taniguchi & Mochizuki (1982b) encontraron ácinos en las glándulas de Jacobson en hamsters a partir de los 14 días de gestación. Los ácinos glandulares ubicados entre el septum y el epitelio respiratorio, ausentes en el feto de 16 días de gestación y presentes al nacimiento, sufren gran desarrollo en tre 0-2 días de edad. Este hecho está, probablemente, relacionado con el comienzo de la funcionalidad de las vías respiratorias.

Kratzing (1971b), en un estudio del desarrollo postnatal del neuroepitelio, da cuenta que las glándulas del complejo es tán ausentes en buena parte del órgano, pero las encuentra hacia el extremo caudal del mismo, en la misma ubicación en que se encontraron en nuestros ejemplares. Sin embargo, no menciona si existe una secuencia en la aparición.

A los 5 días de edad comienza el proceso de osificación del cartílago vomeronasal. A los 21 días está totalmente osificado. En el hamster, este proceso de osificación es más rápido, completándose a los 10 días (Taniguchi, Taniguchi y Mochizuki, 1982b).

Los resultados obtenidos sugirieron que en el modelo utilizado la remoción del órgano vomeronasal no afectó los pesos al

destete, ni la edad de apertura vaginal y aparición del primer estro.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Lomas y Keverne (1982) en ratones quienes encontraron que dicha remo
ción producía dos tipos de efectos:

. a corto plazo, impedía el aumento del peso uterino que se produce por exposición a lechos usados por machos.

. a largo plazo, retrasaba la aparición del primer estro.

La discrepancia entre resultados podría explicarse a través de diferencias de especies. Se sabe que la biología reproductiva del ratón hembra está fuertemente influenciada por las feromonas tanto en el adulto como en el prepúber. En la rata, los efectos estimulatorios de los machos sobre la función reproductiva de las hembras son de menor magnitud y más limitadas. De hecho, el efecto Bruce no se produce en esta es
pecie.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos también difieren de los obtenidos por Sánchez Criado (1982) quien observó un retraso en la apertura vaginal y aparición del primer es
tro en hembras de rata con desafección vomeronasal desde los 21 días de edad. Estas habían sido criadas a partir de esa fecha en presencia de estímulos provenientes de machos, que producen en animales intactos y con operación simulada un adelanto de la apertura vaginal y del primer estro. Sin embargo,

dos consideraciones pueden hacerse a estos experimentos:

. Aunque la lesión electrolítica de los nervios vomeronasales en su ruta intracraneal no produzca daño en el bulbo olfatorio principal ni en la irrigación del área, las fibras aferentes del nervio terminal y del órgano de Masera viajan junto con los nervios vomeronasales después de atravesar la placa cribosa del etmoides (Bøjsen-Møller, 1975). Por eso el corte de los nervios vomeronasales puede dañar también otros sistemas neurales sensoriales.

Para interpretar los resultados de estos experimentos en los que los estímulos exteroceptivos utilizados consistían en colocar jaulas con machos adultos sobre las cajas de las hembras (de modo que las hembras pudieran oler pero no tener contacto físico con los machos), es necesario tener en cuenta los experimentos realizados por Johns y col. (1978) quienes mostraron que en ratas anovulatorias por iluminación continua la ovulación se producía sólo cuando éstas tenían contacto directo con la fuente del estímulo. Wysocki (1980), en el cobayo, mostró que si existía contacto directo entre la nariz y la orina marcada con una sustancia fluorescente, la fluorescencia aparecía en el órgano vomeronasal: los efectos mediados por vía vomeronasal parecen requerir contacto directo con las sustancias estimulantes que por su baja volatilidad no pueden alcanzar el epitelio olfatorio y solo llegarían al órgano vomeronasal.

La información obtenida en los estudios morfológicos sugirió que la función vomeronasal podía ser mejor estudiada en un estadio en el cual los receptores presentaran características de madurez, es decir, posteriormente al destete. Esto no excluye capacidad de recepción en estadios inmaduros (Pedersen y col., 1983; Teicher, Shaywitz y Lumia, 1984). La técnica de lesión vomeronasal no afecta la nutrición y, por ende, el peso corporal que es uno de los factores que influyen sobre la apertura vaginal en otros roedores, como los ratones (Monteiro y Falconer, 1966). Sin embargo, el órgano vomeronasal posee componentes de los nervios terminal y trigeminal; su remoción afecta algo más que la información aferente al bulbo olfatorio accesorio.

Estudios realizados en los peces proporcionaron bases para pensar que la mediación de respuestas a las feromonas sexuales podría realizarse por el sistema del nervio terminal más que por el olfatorio. En Carassius auratus, el tracto olfatorio medial, que es el haz de fibras que contiene los axones del nervio terminal, debe estar intacto para la activación quimiosensorial del cortejo del macho. Las fibras de este nervio terminan en los núcleos supracomisurales, cuyas lesiones alteran drásticamente este cortejo (citados por Demski y Northcutt, 1983).

Se encontró inmunorreactividad similar a LH-RH en células y fibras del nervio terminal de cerebros fetales y adultos de cobayo (Schwanzel-Fukuda y Silverman, 1980). Estos autores

observaron neuronas y axones LH-RH positivos en la mucosa nasal mezclados con fibras de los nervios olfatorios en ganglios a lo largo de la superficie ventromedial del bulbo olfatorio y telencéfalo y en grupos relacionados con ramas de la arteria cerebral anterior en la región de los núcleos septales y tubérculo olfatorio. No se detectó inmunorreactividad semejante a LH-RH en el bulbo olfatorio principal y accesorio o en los tractos olfatorios lateral o medial. Por lo tanto el sistema del nervio terminal que contiene LH-RH estaría separado de los complejos vomeronasal y olfatorio. Dado que este nervio se encuentra en la mucosa nasal y en regiones del telencéfalo involucradas en la recepción y coordinación de estímulos que provocan cambios hormonales y comportamentales relacionados con funciones reproductivas, el posible rol de esta estructura en ciertos aspectos de la reproducción debe ser tenido en cuenta. Hasta tanto la contribución del sistema del nervio terminal a la quimiorrecepción no esté aclarada, los resultados de las técnicas de desferentación, remoción, destrucción del bulbo olfatorio accesorio y principal deben ser interpretados con prudencia.

Concluyendo, los resultados aquí obtenidos aconsejaron la elección de otro modelo experimental para el estudio de las influencias de los estímulos químicos sobre la regulación neuroendócrina de la reproducción, como se verá en los capítulos II y III.

CAPITULO II

LA PAPILA PALATINA Y EL

CONDUCTO NASOPALATINO

INTRODUCCION

Papila y conducto nasopalatino

La relación entre el conducto nasopalatino, o *canalis incisivus*, y el órgano vomeronasal se conoce desde el siglo pasado y ha sido explicada en el capítulo previo. En 1927, Kolmer volvió a llamar la atención sobre este conducto, describiendo sus características histológicas en carnívoros y roedores.

En los roedores el gran desarrollo de los incisivos superiores determina el crecimiento del paladar primario rostral a los conductos. Se modifica así la relación entre el órgano y dichos conductos; éstos se abren en la fosa nasal en la región correspondiente al segmento medio posterior del complejo vomeronasal. Wörhmann-Repenning (1980, 1981) mostró la existencia de una comunicación indirecta entre el órgano y la cavidad oral a través del sistema conducto nasopalatino-recesos paraseptales ventrales de las fosas nasales y describió la morfología de la papila palatina en ratas adultas.

En algunos primates prosimios (como *Nycticebus coucang*) la papila palatina está bien desarrollada con sulci a ambos lados. El órgano vomeronasal desemboca en el conducto nasopalatino y éstos en la parte aboral de los sulci. En primates platirrininos, como *Cebuela pygmae* y *Callithrix jacchus*, el órgano se abre en el ducto nasopalatino que, a su vez, desemboca en un sulcus de la papila palatina.

Receptores gustativos en el paladar duro

La primera descripción sobre la presencia de corpúsculos gustativos en el conducto nasopalatino de la rata se debe a Kolmer (1927). Los ubicó a lo largo de todo el conducto, pero creyó que este hallazgo era excepcional, ya que le fue imposible encontrarlos en otras especies, como lirón, conejo, ratón y perros jóvenes. Posteriormente, Kaplick (1953) proporcionó una descripción detallada sobre la morfología de los receptores gustativos palatinos en algunos mamíferos. En la rata, los ubicó en los conductos nasopalatinos, en una franja gustativa ubicada en el límite entre el paladar duro y el blando, y en el paladar blando. Otras descripciones sobre la presencia de corpúsculos gustativos en la papila palatina y el conducto se debieron a Wörhmann-Repenning (1980), quien les atribuyó función probatoria gustativa para sustancias que ingresan a los recesos paraseptales ventrales. El estudio cuantitativo indicó la presencia de 66.3 ± 7.4 corpúsculos en los 2 conductos y en la ruga adyacente, con una simetría en la distribución (Miller y Spangler, 1982).

En los primates, Hofer (1980) encontró receptores gustativos sólo en el epitelio lateral de la papila, orientados hacia los sulci de ésta, raramente en la superficie ventrolateral y nunca en la superficie palatal de la papila.

Inervación

La inervación de los corpúsculos gustativos palatinos de la

rata ha sido estudiada mediante la denervación y la observación de su degeneración. La sección unilateral de los nervios palatinos en su curso a través del foramen nasopalatino resultó, después de 2 semanas, en la supervivencia de 2 ± 2 corpúsculos en un conducto y en el otro de 32.3 ± 3.7 . La sección bilateral de estos nervios produjo la degeneración de la totalidad de los corpúsculos gustativos en los conductos. Los experimentos de sección unilateral sugirieron una leve superposición de fibras nerviosas (Miller, 1977). Estudios posteriores de transección bilateral del nervio petroso superficial mayor (división del VII par) a través del oído medio, distalmente a 2 mm del ganglio geniculado, resultaron en la supervivencia del 2.5% del total de los corpúsculos de ambos conductos (Miller y Spangler, 1982). Con esta misma técnica degeneraron la totalidad de los corpúsculos ubicados en la franja gustativa entre el paladar duro y el blando, y el 70% de los ubicados en el paladar blando. En consecuencia, el 85% de los corpúsculos palatinos estarían inervados por el nervio petroso superficial mayor. Si la lesión de este nervio se realizaba entre el canal de Eustaquio y la placa pterigoidea medial, desaparecían sólo aproximadamente el 60% de los corpúsculos del paladar blando. La sección bilateral del glosofaríngeo a través del foramen lacerado posterior produjo una pérdida del 20% de los corpúsculos gustativos del paladar blando, pero la sección conjunta del glosofaríngeo y facial produjo una pérdida de corpúsculos similar a la que

se obtuvo sólo por sección del VII par (Cleaton-Jones, 1976). Según los autores del primer estudio, la discrepancia entre ambos experimentos se debería a que la lesión entre el canal de Eustaquio y la placa pterigoidea medial no afectó fibras sensoriales del VII par que parten del ganglio geniculado con el pe
troso superficial mayor, pero que se desvían del nervio vidiano para alcanzar el paladar siguiendo un aporte vascular y auto
nómico. La Fig. 14 resume estos resultados mostrando los sitios de las lesiones y el curso probable de las fibras.

Ultraestructura

Los estudios ultraestructurales se han realizado exclusivamente en los corpúsculos gustativos de las papilas fungiformes, circunvaladas, foliadas de varias especies de mamíferos, y de humanos.

Los corpúsculos gustativos ubicados en las papilas fungiformes han sido los preferidos en estudios morfológicos y fisiológicos, ya que estas papilas son fácilmente disecables. Experimentos electrofisiológicos mostraron que responden a los 4 sabores básicos. La ultraestructura de estos corpúsculos ha sido estudiada en ratón (Hoffman, 1965), rata (Farbman, 1965a,b; Farhmann, Hoffman y Schuchardt, 1965; Murray, Murray y Hellekant, 1972), hamster (Miller y Chaudry, 1976), monos y humanos (Arvidson, Cottler-Fox y Friberg, 1981a,b; Zahm y Munger, 1983 a,b). La clasificación morfológica de los distintos tipos celu

lares se basa en la localización, morfología y relación con los procesos neviosos.

En la rata y en el hamster pudieron distinguirse células: tipo I (oscuras), tipo II (claras), periféricas o perigemales y basales. Murray (1971) distinguió además un tercer tipo celular (tipo III).

La función gustativa que requeriría: a) accesibilidad al estímulo, b) relación íntima con la fibra nerviosa ha sido asignada al tipo I (Farbman, 1965b) o al tipo III (Murray, 1971), aunque esta última célula no pudo ser encontrada en relación al poro. En cuanto a las características del poro, también existen divergencias entre las distintas descripciones: en la rata se ha descrito presencia de material amorfo denso con vesículas (Farbman, 1965b) o de una sustancia vacuolada (Murray, 1971). En el hamster se describió la presencia ocasional de un material heterogéneo con partículas electro-densas y vesículas.

La relación entre las células y las fibras nerviosas puede clasificarse:

- a) Contacto simple aposicional
- b) Relación tipo mesaxón
- c) Con densidad postsináptica en la célula del corpúsculo. Correspondería a las "sinapsis eferentes" y requeriría, además, la presencia de cisternas membranosas próximas a la membrana celular.

- d) Sin densidad postsináptica y con vesículas tanto en las células como en la fibra nerviosa.
- e) Con especialización de la membrana celular próxima a la fibra nerviosa. En estos puntos existe acumulación de vesículas tipo sináptico en la célula. Sería la "sinapsis aferente".

En los primates y humanos, la clasificación morfológica de las células dependería de la técnica de fijación usada. En estudios donde se utilizó fijación con osmio solamente, no se pudo diferenciar entre distintos tipos celulares en base a forma, densidad citoplasmática, presencia de organelas o relación a procesos nerviosos (por ejemplo, mono). Sin embargo, en el caso de los humanos se observaron los distintos tipos de relación célula-nervio. Por otra parte, en esta última especie la fijación con glutaraldehído-osmio permitió a otros autores clasificar 3 tipos celulares: tipo I (claras), tipo II (oscuras), tipo III. Estas últimas eran muy escasas, no se sabe si llegarían al poro y vesículas próximas a la fibra nerviosa indicarían que es la célula transductora (Paran, Mattern y Henkin, 1975).

Durante el desarrollo de los corpúsculos gustativos de las papilas fungiformes de la rata, se pudieron distinguir 5 estadios desde la formación de la papila hasta la diferenciación de los distintos tipos celulares y formación del poro (Farbman, 1965a). En el mono, Zahm y Munger (1983) encontraron, en esta-

díos de gestación temprana, células que llamaron quimiosensoriales, con sinapsis aferentes, y que se diferenciarían más rápidamente que otras células con función sustentacular.

La ultraestructura de los corpúsculos gustativos de las papilas foliadas del conejo ha sido estudiada usando secciones seriadas (Murray, 1967), donde se distinguieron 4 tipos celulares además de las células perigemales: Tipo I (oscuras) con gránulos densos en su parte apical, que probablemente sean los precursores de la sustancia densa que se encontró en la fosita del corpúsculo y con microvellosidades. Tipo II (claras), con citoplasma más claro por una mayor dispersión de las organelas, en particular de las fibrillas, sin gránulos densos apicales, con vesículas y microvellosidades gruesas e irregulares en la base de la fosita gustativa. Tipo III, que alcanzan la fosita en forma de clavo, con acúmulos de vesículas "sinápticas", serían las células transductoras. Tipo IV (basales), similares a las perigemales, no llegarían al poro. La relación de las células con las fibras nerviosas es mesaxonal para las células tipo I, "sinapsis aferente" con las tipo III, aposición con las tipo II. La ultraestructura de las papilas foliadas en el hamster (Miller y Chaudry, 1976) es similar a la observada en el ratón; esta similitud alcanza también a las papilas circunvaladas.

Los corpúsculos gustativos de las papilas circunvaladas

han sido investigados en varias especies (Gray y Watkins, 1965; Farbman, 1967; Murray y Murray, 1969; Uga, 1969), aunque las células tipo III se han encontrado en una sola descripción, se han descrito contactos especializados entre célula y fibra, "tipo sináptico".

Citoquímica e histoquímica

La sustancia densa de la fosita gustativa ha sido caracterizada como un mucopolisacárido neutro (Scalzi, 1967) o como un material Pas positivo, basofílico y diastasa resistente (Miller y Chaudry, 1976). Sin embargo, otros autores no pudieron obtener resultados similares. En los corpúsculos gustativos de las papilas fungiformes este material estaría ausente. En estudios ultraestructurales, el poro y la fosita contendrían fosfatasa ácida (Scalzi, 1967) y las microvellosidades serían ricas en ATPasa (Iwayama, 1968).

En ratones tratados con L- β -3,4-dihidroxifenilalanina o 5-hidroxitriptofano se encontró con técnicas de fluorescencia para monoaminas, reacción positiva en células elongadas y ahuecadas que se extendían desde la lámina basal al poro.

En el conejo se demostró fluorescencia en los corpúsculos de las papilas foliadas, aunque ésta era débil. Después de administrar serotonina, 5-hidroxitriptofano ó 5,6 dihidroxitriptamina, aparecieron células fluorescentes en los de las papi-

las circunvaladas, pero no en los de las fungiformes. En el caso de las papilas foliadas, la célula fluorescente era la Tipo III (Nada e Hirata, 1977), siendo la fluorescencia de tipo amarillo con emisión máxima a 520 μm , o sea, "similar a serotonina". Como esta característica se encontró en células que tienen contactos especializados indicando polaridad célula-nervio, esta monoamina sería un candidato como transmisor químico en el proceso gustativo.

Otras reacciones citoquímicas positivas encontradas fueron: negro de Sudán, acetilcolinesterasa, ATPasa y fosfatasa ácida (en algunos tipos celulares y, más frecuentemente, hacia la parte apical).

La inmunocitoquímica, para sustancia P, mostró que tanto las papilas fungiformes como las circunvaladas de la lengua recibían una rica inervación por fibras sustancia P-érgicas, pero su localización en relación a los corpúsculos gustativos era perigemal. La mayoría de estas fibras (en las circunvaladas) provenía del nervio glossofaríngeo, mientras que en las fungiformes toda la sustancia P tenía origen en el ganglio trigeminal. La activación de estas fibras por las células gustativas podría descartarse dado su ubicación perigemal, tampoco tendrían un rol trófico sobre los corpúsculos. Hasta el momento, su relación con los corpúsculos no es clara (Nagy y col., 1982).

Renovación de las células en el corpúsculo. Degeneración y regeneración de los corpúsculos

Estudios realizados con inyecciones de timidina tritiada permitieron determinar el origen de las células del corpúsculo, así como su vida media. Las células epiteliales que penetraban al corpúsculo eran sólo aquellas que están inmediatamente adyacentes a él y moviéndose lentamente hacia el centro; la velocidad de entrada fue de 1 célula cada 10 horas y su vida media, aproximadamente 250 ± 50 horas (Beidler y Smallman, 1965).

En la denervación de los corpúsculos gustativos de los mamíferos se produjo degeneración de sus células, extrusión de ellas a través del poro (Olmsted, 1921) y descamación del corpúsculo degenerado de la superficie epitelial (Guth, 1971). La desaparición no ocurrió antes de las 24 horas del tratamiento. Después de la regeneración de los nervios, los corpúsculos reaparecieron (Guth, 1971). Se ha encontrado también que un nervio no gustativo podría inducir a la formación de corpúsculos gustativos si sus axones se dirigen al tejido apropiado (Zalewski, 1981).

Desarrollo postnatal de la función gustativa en la rata

En la rata, los corpúsculos gustativos de la lengua comienzan a formarse a los 20 días de gestación. Durante la

primera semana postnatal se produce la diferenciación de las células en los tipos: perigemales, basales y tipo I. La configuración característica del adulto se adquiere a los 12 días de edad con la aparición del poro y de las células tipo II (Farbman, 1965a). Sin embargo, utilizando el poro como índice de maduración, se vio que 1 día después del nacimiento, el 2% de los corpúsculos de las papilas fungiformes lo poseían, a los 12 días estaría presente en el 70% (Mistretta, 1972). En muchos sistemas sensoriales, la función precede a la maduración estructural (Gottlieb, 1971). Hill y Almlí (1980) registraron la actividad eléctrica de la cuerda del tímpano (que inerva los corpúsculos gustativos de las papilas fungiformes y los de la parte anterior de las foliadas) en respuesta a estímulos químicos (NaCl, LiCl, NH_4Cl , ácido cítrico y sacarosa) aplicados a la superficie de la lengua. Encontraron que en ratas de 2 y 3 días de edad este nervio respondía a cada uno de los estímulos químicos aplicados. La respuesta era diferente (en modo y/o intensidad) para los distintos estímulos. Este mismo nervio respondía a la estimulación mecánica y térmica de la lengua, que no se modificaba sustancialmente durante el desarrollo. Desde los 10 hasta los 40 días en adelante se produjo un cambio en la respuesta electrofisiológica a los distintos estímulos:

en ratas antes del destete, ClNH_4 era un estímulo más efectivo que el NaCl o de Li, pero este comportamiento se

invirtió en animales de 20-30 días.

la respuesta a los ácidos y a la sacarosa disminuyó durante el desarrollo (Ferrell, Mistretta y Bradley, 1981).

Cuando se midió la ingesta y otros parámetros (Hall y Bryan, 1981), como locomoción, movimientos bucales, raspadas de mentón o pisoteos, se encontró que desde los 3 días de edad las crías podían discriminar sacarosa de agua, prefiriendo la sacarosa a partir de los 6 días.

La ingesta de quinina disminuyó en comparación a la de agua a los 12 y 15 días de edad, pero los parámetros de comportamiento sugirieron sensibilidad a partir de los 9 días. Las reacciones de aversión características del adulto no aparecieron antes de los 12 días de edad. En crías de 15 días, la preferencia por sacarosa y la aversión a la quinina fue clara. Estas variaciones se produjeron en un período de la lactancia donde la succión se modifica (Blass, Hall y Teicher, 1979) y probablemente estén relacionadas con el destete fisiológico.

En otra especie investigada, la oveja, se encontraron cambios similares que ocurren pre y postnatalmente en respuesta a los mismos estímulos utilizados en la rata.

Significado funcional del sistema Papila palatina - conducto nasopalatino - corpúsculos gustativos

Los conductos nasopalatinos serían la vía directa de acceso de estímulos olorosos al órgano vomeronasal en las especies

en las que el órgano se abre en dichos conductos. La llegada de los estímulos al órgano se produciría por la inhalación a través de los conductos, ayudada por la expansión-contracción del tejido eréctil vomeronasal (Estes, 1972). El acceso de los estímulos podría controlarse regulando la abertura oral de los conductos nasopalatinos, por ejemplo, a través de la presión ejercida por la lengua sobre la papila palatina podría estrecharse o cerrarse esta desembocadura oral (Negus, 1958; Schilling, 1970).

En los roedores y lagomorfos, el órgano no está relacionado directamente con el conducto. Sin embargo, la comunicación indirecta órgano-conducto a través de los recesos paraseptales y un mecanismo de bomba vascular vomeronasal con control neural (Meredith y col. 1980, 1982), actuando conjuntamente podrían permitir el ingreso de moléculas olorosas al órgano a través del conducto nasopalatino. Estas moléculas llegarían al órgano vomeronasal y al órgano de Mäsera probablemente por ingestión o lamido de los estímulos (Wysocki, Wellington y Beauchamp, 1980). Los corpúsculos gustativos ubicados en el conducto nasopalatino podrían tener la función de probar las sustancias que ingresan al mismo (Kolmer, 1927; Hofer, 1980; Wörhmann-Repenning, 1980) y también función gustativa complementaria de la realizada por los linguales (Miller, 1977).

MATERIALES Y METODOS

Animales

Las características de los animales utilizados fueron descritas en la sección Materiales y Métodos del capítulo I.

Microscopía Óptica y Electrónica de Transmisión

Para microscopía óptica se utilizaron papilas palatinas de crías de ratas, de ambos sexos, de 0 (n=4), 1 (n=2), 3 (n=3), 5 (n=2), 8 (n=3), 21 días (n=5) y adulto (n=3), y papilas de hembras de 2, 10, 13 y 16 días de edad.

Este material se disecó desde la base de los incisivos hasta la segunda ruga palatina. La fijación se realizó en Bouin, deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol y xilol e incluyó en parafina. Los cortes seriados de 5 a 7 μm , coronales en su mayoría y sagitales en algunos ejemplares, se tiñeron con hematoxilina de Harris-Eosina. Las fotografías se tomaron en un microscopio Zeiss RS III y las mediciones se realizaron con un ocular graduado.

En base a los resultados de la microscopía óptica se eligieron los períodos 3 (n=2), 8 (n=2), 21 (n=4) y adulto (n=5) de ambos sexos para microscopía electrónica. En cada ejemplar se observaron varios corpúsculos de cada uno de los conductos nasopalatinos. Como la fijación por inmersión en glutaraldehído al 4% en buffer de Millonig no permitió buena preservación del

material, se siguió el siguiente procedimiento:

1. Anestesia con Nembutal (40 mg/kg peso, i.p.) en los ejemplares de 8, 21 días y adultos. Los animales de 3 días de edad se anestesiaron por hipotermia.

2. Perfusión intracardíaca, con solución salina hasta observar la salida de líquido transparente por la aurícula derecha (aproximadamente 50 ml de SN fisiológica en el adulto y 21 días, 10 ml para 8 y 3 días).

Luego perfusión con solución de 2% Paraformaldehido: 2% Glutaraldehido en buffer cacodilato 0,075M pH 7.2, con 2mM CaCl_2 .

En el adulto se utilizó la misma solución fijadora pero en buffer cacodilato 0.1M. La molaridad del buffer se disminuyó para las crías porque cuando se usó 0.13M ó 0.1M, se observaron alteraciones en el material (en particular en mitocondrias y espacios intercelulares).

3. Extracción de la pieza del animal perfundido y postfijación en glutaraldehido al 4% en el mismo buffer hasta completar las 2 horas. Después de esta fijación la papila palatina se seccionó sagitalmente, de modo de obtener cada conducto nasopalatino de 1 ejemplar por separado en 1 taco.

4. Lavados en buffer. Postfijación en Tetróxido de osmio al 2% en el mismo buffer y uranilo 2% en agua. Posteriormente, el material se deshidrató con concentraciones crecientes de alcoholes y óxido de propilene, para su inclusión en Epon 812.

Fue necesario realizar en cada taco cortes semifinos seriados a

fin de localizar los corpúsculos; luego se redujo el tamaño de la pieza para realizar el corte fino.

El material se cortó en un micrótomo LKB Ultratome III y las secciones se montaron en grillas de 100, 200 mesh, o de un solo orificio con membranas de Formvar. La tinción se efectuó con reactivo de Reynolds y uranilo al 5% ó con el primero solamente. El material se observó en un microscopio Jeol 100C.

Microscopía Electrónica de Barrido

Se utilizaron 5 ó más ratas de ambos sexos en cada período. Estos fueron 0, 1, 3, 5, 12, 21 días y adultos de 3 meses de edad. El material se disecó después de decapitar a los animales de forma similar a como se procedió para microscopía óptica. La fijación se realizó en glutaraldehído al 4% en buffer de Millonig (pH 7.3, 0.13M, 0.075M) previo lavado con solución fisiológica. Luego de varios lavados con agua, el material se deshidrató con concentraciones crecientes de acetona, secó por punto crítico y metalizó con una capa de 200 Å de oro-paladio. Tanto la superficie oral y la nasal (en contacto con el paladar duro) se montaron en tacos adecuados y observaron en un microscopio Jeol JSM U-3.

Técnica de lesión del conducto nasopalatino

Se trató de obtener una obturación eficaz y permanente del conducto nasopalatino para estudiar el rol de esta estructura

y de los corpúsculos gustativos presentes en ella, en la alimen
tación, pasaje de feromonas u otros compuestos de la cavidad na
sal a oral o viceversa.

Los experimentos se realizaron con crías de 5-6 días, de 12 a 13 gr. de peso corporal y de madres no primíparas.

Las crías se anestesiaron por hipotermia, colocándolas en un recipiente de telgopor con hielo picado. Se aseguraron a una tabla de disección por medio de cintas adhesivas; la mandíbula y la maxila se separaron atándolas con un cordel a la tabla. Los conductos nasopalatinos pudieron observarse bajo una lupa de disección.

Se probaron varias sustancias como: Hystoacryl (Gador), siliconas, celoidina al 2%, 5% en éter, cianocrilatos y cemento dental. En todos los casos la película formada por estas sustancias había desaparecido al día siguiente, probablemente debido a la humedad propia de la cavidad bucal, la descamación del epitelio oral y los movimientos efectuados durante la succión.

Posteriormente se probó con un electrodo de tungsteno construído al efecto, introduciéndolo en los conductos y aplicando una corriente de 4mA durante 12 segundos que produce una lesión de dicho conducto. Los animales se colocaron bajo una lámpara para recuperarse y tomar temperatura normal antes de volverlos a la jaula con la madre. Las crías lesionadas se recuperaron rápidamente y no mostraron trastornos durante la lactancia. La mor
talidad fue muy baja, alrededor del 5%. A los 15 días de edad se

realizó la autopsia y el examen en fresco del área lesionada observándose el aplanamiento de la papila. La abertura oral de los conductos no era visible.

A los 21 días de edad, los animales lesionados y controles se pesaron en una balanza Sartorius con sensibilidad de 0.5 gr y se procesaron para microscopía electrónica de barrido. Otros ejemplares se siguieron para determinar la fecha de aparición de la apertura vaginal y se pesaron ese día.

La obturación del conducto nasopalatino, producida de acuerdo a la técnica descrita persiste a lo largo de toda la vida. En cambio no hemos tenido éxito para obtener una obturación del conducto cuando la lesión electrolítica se realizó en animales adultos. Es posible en los animales adultos canular directamente los ductos con una fina cánula de polietileno (PLRivero, PE-50), y obturarlos formando un botón que ocluye su abertura oral.

RESULTADOS

1. Conducto Nasopalatino. Papila palatina

La papila palatina es una prominencia ventral triangular ubicada en el paladar duro inmediatamente rostral a la primera ruga del paladar. A ambos lados se abren los orificios orales de los conductos nasopalatinos.

El conducto nasopalatino conecta la cavidad oral con la nasal penetrando el paladar duro a través de los forámenes nasopalatinos.

No se encontraron diferencias sexuales en cuanto a las características morfológicas de la papila y del conducto en ninguno de los estadios.

Microscopía Óptica

16 días de gestación

En el feto de 16 días de gestación, la papila palatina es una formación aplanada (en sección coronal) que forma la pared medial de ambos conductos nasopalatinos, es decir, la próxima al tabique nasal (Fig. 3B). Está constituida por un epitelio estratificado de tipo escamoso y un conectivo subyacente donde se observan algunos vasos sanguíneos. El epitelio no muestra pliegues de su capa germinativa basal. El epitelio que recubre la pared medial del conducto nasopala-

tino es similar al de la superficie oral de la papila (Fig. 3B). No se encuentran corpúsculos gustativos en ninguna de las dos regiones epiteliales. El ancho máximo de la papila palatina es de aproximadamente 330 μm ; la longitud del conducto es de 220 μm . La pared lateral de este último está tapizada por un epitelio del mismo tipo que la medial y no presenta ningún tipo de especializaciones, como los que se verán en los períodos siguientes. El conducto nasopalatino es permeable ya en la vida fetal, es decir, que existe conexión entre la cavidad oral y la fosa nasal atravesando los forámenes nasopalatinos ubicados en el paladar duro. No se encuentra cartílago en la parte central de la papila palatina.

Postnatal 0 (recién nacido)

Las características histológicas de la papila palatina son similares a las que se observan en el feto de 16 días de gestación, pero el epitelio muestra algunas indentaciones suaves hacia la lámina propia (Fig. 15A). En la parte central de la lámina propia, encontramos una porción central elongada de cartílago hialino. Las indentaciones se observan en el epitelio de la superficie oral de la papila palatina, pero no en el de la pared medial del conducto. El ancho máximo de la papila es de aproximadamente 589 μm y la longitud del conducto nasopalatino es de aproximadamente 483 μm .

Podemos observar una diferenciación digitiforme de la pa

red lateral del conducto nasopalatino, en su extremo oral, que llamaremos lengüeta (Fig. 15A). No se encuentran corpúsculos gustativos (Fig. 15A).

Postnatal 1

Es similar al estadio previo, pero la porción de cartílago hialino se ha modificado tomando forma claviforme, con el extremo ensanchado hacia la cavidad oral. El pericondrio la rodea. El diámetro máximo de la papila es de 607 μm , aproximadamente, y la longitud del conducto, de 552 μm . Existirían diferencias entre el espesor del epitelio oral de la papila palatina (2.97 μm), conducto nasopalatino pared medial (3.8 μm) y conducto nasopalatino pared lateral en la zona de la desembocadura oral del conducto (2.30 μm). En la lámina propia pueden observarse haces de fibras nerviosas. No se encuentran corpúsculos gustativos.

Postnatal 2

Histológicamente, no existen diferencias entre este período y el previo, pero el epitelio oral de la papila comienza a mostrar indentaciones hacia la lámina propia de su capa basal (rete pegs) (Fig. 15B). El diámetro máximo de la papila es de aproximadamente 648 μm . No se encuentran corpúsculos gustativos. Se diferencia la lengüeta separándose del resto del epitelio oral por medio de un surco profundo. La longitud del conducto nasopalatino sería de aproximadamente 600 μm .

Postnatal 3

El diámetro máximo de la papila palatina es de 641 μm aproximadamente y la longitud del conducto, de 621 μm . Comienza a observarse que la zona central oral de la papila palatina se hace prominente. Aparecen corpúsculos gustativos en la papila palatina próximo al ángulo que forman la pared medial del conducto y la superficie oral de la papila (Fig. 19B).

Postnatal 5-8

(Fig. 15C-D). Se incrementan las indentaciones del epitelio estratificado hacia la lámina propia en la superficie oral de la papila palatina (rete pegs). Es posible observar en alguna de ellas, células en mitosis. El epitelio del conducto nasopalatino no muestra rete pegs. El diámetro máximo de la papila es de aproximadamente 760 μm a los 5 días (Fig. 15C).

Se observan corpúsculos gustativos en la desembocadura y en las porciones más orales de los conductos (Fig. 19C).

Postnatal 10-13-16-21

El diámetro máximo de la papila palatina es de 761 μm (10 días, Fig. 15E), 826 μm (13 días); 935 μm (16 y 21 días).

El conducto nasopalatino que tiene una longitud de 660 μm a los 10 días (Fig. 15E), alcanza aproximadamente 956 μm al destete (Fig. 15F). El epitelio oral de la papila palatina presenta numerosos rete pegs. La queratinización es bien evidente, tanto en la pared oral de la papila como en la pared medial y lateral del conducto nasopalatino. La lengüeta está bien diferenciada y encontramos corpúsculos tanto en la abertura como en el interior del conducto.

Adulto

La papila posee un diámetro máximo de 1,24 mm, es bien prominente en la parte media de su superficie oral (Fig. 16). La matriz del cartílago se tiñe intensamente con la eosina. Aparecen cuerpos de tejido adiposo que no se encontraban presentes en las crías.

Ubicación del conducto nasopalatino en relación a la apertura rostral del órgano vomeronasal

Como puede observarse en el corte sagital de la cabeza de una rata adulta (Fig. 17 A,B), existe una comunicación indirecta entre el órgano vomeronasal y la cavidad oral a través del conducto nasopalatino. Esta comunicación indirecta se realiza a través de dos recesos longitudinales angostos ubicados a lo largo de la base del septum nasal (recesos paraseptales)

ventralmente al complejo vomeronasal. El órgano de Jacobson tiene su abertura rostral en estos recesos que están tapizados por un epitelio estratificado. La abertura nasal de los conductos nasopalatinos está en relación a estos recesos. En el adulto, la abertura nasal del conducto nasopalatino está ubicada a proximadamente a 3.1-3.2 mm de la abertura del órgano vomeronasal. Se encuentra a 658 μ m a los 16 días de gestación, a 1.3 mm en el recién nacido, a 1.2 mm a los 2 días de edad y a los 5 días de edad a 1.2 mm del poro del órgano.

Microscopía Electrónica de Barrido

No existe dimorfismo sexual en la morfología externa de la papila palatina.

En el recién nacido (Fig. 18A) puede observarse una forma ción triangular, separada del resto del epitelio del paladar, por dos surcos que se reúnen rostralmente para formar el vértice del triángulo. La papila palatina es aplanada, pero muestra una región central sobreelevada. A ambos lados de esta región y próximos a la base del triángulo se encuentran los orificios de los conductos nasopalatinos, fácilmente distinguibles como dos aberturas curvas. Lateralmente a ellos se encuentra una banda separada del resto del epitelio palatino por un surco angosto. Esta corresponde a la lengüeta que se observa en las secciones coronales como una diferenciación de la pa red lateral del conducto nasopalatino. La longitud de la for-

mación triangular en sentido rostrocaudal es de aproximadamente 880 μ m.

En la cría de un día se observa un mayor crecimiento dorsoventral de la porción prominente de la papila palatina.

A los 5 días de edad (Fig. 18C), la longitud del área triangular es de 900 μ m aproximadamente. Los surcos laterales se han profundizado a partir de los 3 días de edad (Fig. 18B). La porción central de la papila es mucho más prominente a los 5 que a los 3 días de edad. Este crecimiento ha desplazado lateralmente a los orificios de los conductos nasopalatinos, que no son visibles como en el recién nacido, sino que parecen surcos estrechos. La lengüeta, que es una banda regular al nacimiento, toma una forma irregular. En la formación triangular podemos distinguir 2 regiones: una rostral más aplanada y, a partir de la porción media, una caudal más prominente en sentido dorsoventral. La diferencia entre esta porción rostral y la caudal se acentúa a los 10 y 12 días bajo la forma de un surco transversal que las separa nítidamente (Fig. 18D). A los 10 días la longitud rostrocaudal del área triangular es de aproximadamente 1.3 mm y la pieza rostral es de contorno liso. A los 12 días, la pieza rostral tiene su superficie muy plegada (Fig. 18D). A partir de este período, debido al crecimiento dorsoventral de la papila que determina su convexidad, no es posible obtener medidas lineales rostrocaudales. El crecimiento dorsoventral del área caudal del triángulo, sobre todo

en la parte central de la papila palatina, ocasiona el desplazamiento lateral de los orificios de los conductos nasopalatinos y su enmascaramiento.

A los 21 días de edad (Fig. 18E), el límite entre el área rostral y caudal de la papila no es muy claro. La papila presenta el aspecto del adulto, aunque en estos últimos sería más prominente (Fig. 18F).

2. Corpúsculos gustativos en la Papila Palatina y Conducto Nasopalatino

Microscopía Óptica

Los corpúsculos gustativos se ubican en la pared medial del conducto nasopalatino, nunca en la lateral. También los encontramos sobre la superficie oral de la papila palatina próxima a la desembocadura de los conductos pero no en la parte central de la misma. Estos corpúsculos en la papila palatina y el conducto nasopalatino son de aparición postnatal.

Postnatal 0

Tanto en los machos como en las hembras se observa una estructura esférica de un diámetro aproximado de 25 μm , fuera del conducto nasopalatino, en el ángulo que forman la papila palatina y la desembocadura oral del conducto. Se observa un solo tipo de núcleos, algo elongados. Esta estructura es bila

teral. También se observan algunas figuras mitóticas en las capas basales del epitelio de la pared medial del conducto nasopalatino y de su desembocadura oral.

Postnatal 1

La estructura redondeada y con núcleos oscuros alcanza un diámetro aproximado de 33 μm (Figs. 19A, 20A). Es posible observar áreas modificadas del epitelio de la pared medial del conducto. Estas modificaciones se refieren a acúmulos de núcleos celulares en zonas epiteliales menos teñidas, en número de 2 ó 3, que se diferencian muy fácilmente del epitelio circundante.

Postnatal 2

Es similar al estadio previo. Se observan algunas células elongadas orientadas transversalmente al epitelio.

Postnatal 3

Se encuentran por primera vez corpúsculos gustativos (longitud aproximada 43 μm), en la porción próxima a la desembocadura del conducto nasopalatino frente a la lengüeta de la pared lateral (Fig. 19B). Estos corpúsculos no alcanzan la superficie epitelial. Es posible reconocer 2 tipos de núcleos: claros ovals y elongados oscuros (Fig. 20B). Se observan en el epitelio medial del conducto figuras mitóticas y zonas mo-

dificadas que podrían ser corpúsculos en formación.

Postnatal 5

Las características son semejantes al estadio previo. Los corpúsculos ubicados en la superficie oral de la papila palatina (longitud aproximada 57 μm) están más desarrollados que los del conducto nasopalatino. Ambos carecen de poro externo.

Postnatal 8

Aparece el poro externo (Fig. 20C), de forma circular, en los corpúsculos gustativos que están ubicados fuera del conducto, pero éste no se observa en los del conducto nasopalatino (Fig. 19C), que en este estadio están próximos a la superficie del epitelio.

Postnatal 10

Los corpúsculos gustativos ubicados en la desembocadura del conducto nasopalatino, sobre la superficie oral de la papila (Fig. 19D), tienen una longitud aproximada de 63 μm y un diámetro máximo de 59 μm . Están claramente delimitados del epitelio circundante por células fusiformes, tienen forma de pera y poseen poro externo (Fig. 20D). Los núcleos, de dos tipos: ovales y elongados, se ubican en la porción mediobasal del corpúsculo, aunque es posible encontrar algunos en la parte apical. Esta región es principalmente citoplasmática. La

longitud y las características citológicas de los corpúsculos gustativos ubicados en el conducto es similar a los que están afuera, pero los primeros carecen todavía de poro externo.

Postnatal 13, 16 y 21

A los 13 días de edad (Figs. 19E, 20E) aparece el poro externo en los corpúsculos gustativos ubicados en el interior del conducto nasopalatino. Las características citológicas son similares a las descritas para los ejemplares de 10 días de edad. La longitud es de aproximadamente 66 μ m y el diámetro de 58 μ m (Figs. 19E, 20E). En secciones longitudinales de una papila palatina de un ejemplar de 21 días se han encontrado 19 corpúsculos gustativos en un conducto. En esas mismas secciones, los núcleos celulares tienen una ubicación más central que las porciones citoplasmáticas. Los corpúsculos están rodeados por 2 capas de células perigemales.

Adulto

No se observan diferencias citológicas en relación al destete (Fig. 20F).

En ninguno de los períodos estudiados se observa dimorfismo sexual ni en la secuencia de aparición ni en las características citológicas de los corpúsculos gustativos de la papila y conducto nasopalatino.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Los períodos para el estudio de las características ultraestructurales de los corpúsculos gustativos del conducto nasopalatino se eligieron en base a los resultados de la microscopía óptica, es decir, a partir de los 3 días de vida, cuando aparecen en el conducto estructuras reconocibles como esbozos de corpúsculos gustativos.

Postnatal 3

En todos los ejemplares estudiados y en todos los corpúsculos observados éste se ubicó en la base del epitelio estratificado sin alcanzar la totalidad del espesor del mismo. No se encontró poro.

Aunque pueden distinguirse dos tipos celulares, el predominio de uno, la célula oscura, es bien claro. El otro tipo: las células claras, no presentan la totalidad de las características que se observan en estas células en los adultos.

. Células oscuras: constituyen la mayoría de las células. Están ancladas a la lámina basal por hemidesmosomas bien notorios (Fig. 21).

El núcleo de las células oscuras es elongado con densos acúmulos de cromatina periférica. Alrededor del núcleo, a modo de corona, encontramos haces de citofilamentos. El citoplasma granular de estas células contiene ribosomas libres,

gránulos probablemente de glucógeno, algunas cisternas del retículo granular, aparato de Golgi, mitocondrias con matriz densa y algunos lisosomas (Fig. 22).

En la proximidad de la lámina basal (Fig. 21) encontramos algunas vesículas muy pequeñas, cuerpos densos de un tamaño mayor, mitocondrias y numerosos haces de citofilamentos. También se observan vesículas pequeñas próximas a las fibras nerviosas.

En el tejido conectivo próximo a la lámina basal pueden verse numerosas fibras nerviosas y entre éstas, una célula con citoplasma muy vacuolado a expensas de numerosas cisternas del retículo endoplásmico granular, agranular y aparato de Golgi (Fig. 21). Si bien el citoplasma de esta célula no rodea totalmente a las fibras nerviosas, éstas se ubican en indentaciones del mismo.

. Células claras: es el otro tipo celular presente; son muy escasas (Fig. 22). Poseen un núcleo ovalado con la cromatina periférica formando una banda más delgada que la que se observa en las células oscuras. Alrededor del núcleo se observan filamentos muy delicados. El citoplasma es menos denso que el de las células oscuras, sumamente vacuolado, con cisternas dilatadas del retículo endoplásmico granular y aparato de Golgi. Aparecen también algunas vesículas con centro denso.

Se observan prolongaciones digitiformes de ambos tipos ce-

lulares para interconexión y, ocasionalmente, algún desmosoma.

. Fibras nerviosas: Existen numerosas fibras nerviosas, agrupadas, ubicadas entre las células y próximas a la lámina basal en el interior del corpúsculo.

Postnatal 8

El corpúsculo no tiene poro, y no ocupa todo el espesor del epitelio. En este período podemos distinguir claramente 3 tipos celulares:

. Células claras: son escasas y presentan características similares a las del período previo. Encontramos uniones de tipo desmosómico con las células oscuras, pero con las fibras nerviosas su relación es de simple vecindad aposicional (Fig. 23A).

. Células oscuras: similares a las descritas para ejemplares de 3 días de edad (Fig. 23A).

. Células perigemales: se ubican lateralmente en la periferia del corpúsculo, son fusiformes (Fig. 23C). El núcleo es muy elongado. El citoplasma perinuclear está reducido a una delgada banda y tiene una densidad mayor que el de las células oscuras. Se encuentran también haces de citofilamentos. Están relacionadas con las células vecinas por prolongaciones digi-tiformes.

. Fibras nerviosas: son de diámetro variable con contenido

de vesículas claras, vesículas con centro denso, mitocondrias. Su relación con la célula oscura es de tipo mesaxonal (Fig. 23A), es decir, está rodeada totalmente por las prolongaciones de éstas y es muy frecuente ver a las fibras inmersas en el citoplasma de estas células. En otros casos, cuando esta relación está en vías de formación, pueden verse las prolongaciones de las células rodeando a las fibras (Fig. 23B).

La relación de las fibras con las células claras es de tipo aposicional (Fig. 23A). No se encontraron imágenes "tipo sinápticas", aunque pueden encontrarse en la célula vesículas claras y con centro denso, de tamaño variado, próximas a la fibra nerviosa.

Postnatal 21

El corpúsculo se distingue claramente del epitelio circundante como una estructura oval-piriforme que se extiende desde la lámina basal hasta el lumen del conducto. Las células perigemales lo rodean desde la base hasta el apex. La densidad citoplasmática y el gran contenido de filamentos sirven para diferenciar las células del corpúsculo de las del epitelio que lo rodea. En este estadio encontramos poro.

. Células oscuras (Fig. 24A): Las características del núcleo y el contenido citoplasmático es similar al descrito en el estadio previo. La relación entre esta célula y la fibra nerviosa es de tipo mesaxonal (Fig. 24B) y las fibras están

rodeadas o incluidas por el citoplasma celular. Las células oscuras llegan hasta el poro del corpúsculo (Fig. 25B); en esta zona, como en la apical (Fig. 25A), se vinculan con las células claras a través de intrincadas interdigitaciones (Figs. 25A,B) y desmosomas. La porción apical de la célula contiene numerosas vesículas claras, de tamaño y forma variables (ovales, esféricas) y termina en microvellosidades cortas. Encontramos gránulos lipídicos en el citoplasma próximo al núcleo.

. Células claras (Fig. 24A): Describiremos sólo la parte apical (Fig. 25A), ya que el resto de las características son similares a las observadas en el ejemplar de 8 días. En esta región encontramos vesículas claras en menor número que en las células oscuras y algunos cuerpos densos.

. Células perigemales.

. Fibras nerviosas: podemos distinguir 2 tipos: intragemales (Fig. 24B), ubicadas en el interior del corpúsculo, y perigemales, entre las células perigemales y los otros tipos celulares. Las perigemales son muy grandes (Fig. 26A) con numerosas mitocondrias.

Las intragemales ya fueron descritas. En las células oscuras se encontraron vesículas con contenido poco denso en la proximidad de las fibras nerviosas (Fig. 26B). En la fibra observamos vesículas claras, con centro denso (escasas) y mitocondrias.

. Poro: Llamamos poro al orificio externo del corpúsculo, que comunica a las células con el exterior. Sigue luego un corto conducto, la fosita gustativa que está formada por las células del corpúsculo. Es similar al de las papilas fungiformes de la lengua del hamster, ya que carece de sustancia extracelular electro-densa, y las microvellosidades cortas de las células no sobrepasan el poro, es decir no se proyectan más allá del borde libre del epitelio (Fig. 25B). Aparentemente, si bien ambos tipos celulares alcanzan la porción apical del corpúsculo (Fig. 25A), sólo las células oscuras llegan a la fosita gustativa. Las fibras nerviosas se encuentran a corta distancia de la fosita. Alrededor del área del poro, el epitelio posee una capa de queratina; debajo de ésta, células con citoplasma fibrilar están conectadas por cadenas de desmosomas y no existen espacios intercelulares.

Adulto

Las características del poro de los corpúsculos gustativos son similares a los del estadio previo.

En la base del corpúsculo encontramos una célula cuyo núcleo tiene las características del grupo células oscuras, pero su citoplasma tiene una densidad menor y contiene vesículas, aparato de Golgi y cisternas del retículo granular paralelas en la base de la célula. No se observó relación con las fibras nerviosas. Podría ser clasificada como célula basal (Fig. 27B).

Los contactos de adherencia son poco frecuentes y se establecen entre fibras nerviosas y las células oscuras que la rodean. Se caracterizan por engrosamientos semejantes entre las membranas que se enfrentan y vesículas claras en la célula, unas más pequeñas y otras de mayor tamaño. En la fibra también se encuentran vesículas. En el área del contacto de adherencia el espacio entre célula y fibra contiene un material denso (Fig. 27A). La morfología no permite concluir si existe transmisión de la información de la célula a la fibra.

3. Lesión del Conducto Nasopalatino

Las figuras 18E y 28A,B permiten comparar la morfología de la papila palatina y del conducto nasopalatino a los 21 días de edad en un animal normal y en animales lesionados. Puede observarse el achatamiento de la papila y la desaparición de la comunicación oral de los conductos nasopalatinos.

En un ejemplar de 21 días de edad (Fig. 28B) después de la fijación se removió el epitelio oral de la papila palatina dejando expuesta la lámina propia. La lesión determinó la desaparición del conducto (probablemente por tejido de cicatrización) en todo su recorrido hacia el foramen nasopalatino del paladar duro. Esta lesión efectuada a los 5 días de edad determina la pérdida de la conexión boca-fosa nasal, a través del conducto nasopalatino en todo el trayecto del mismo. Los forámenes nasopalatinos en el paladar duro permanecen inalterados.

Las características observadas en los animales lesionados al destete persisten también en los adultos.

Se realizaron experimentos de lesión del conducto nasopalatino cuyos resultados pueden observarse en las tablas II/^y III. La lesión es permanente y no afecta el crecimiento y la alimentación de las crías, ya que en ambos sexos no existen diferencias entre controles y lesionados en el peso al destete. Tampoco se afectaría el peso a la fecha de la apertura vaginal. Este hecho es importante ya que se ha demostrado en el caso de los ratones que el peso corporal es uno de los factores que influyen la apertura vaginal (Monteiro y Falconer, 1966).

Tabla II : Lesión Electrolítica del Conducto Nasopalatino y
Peso Corporal a los 21 días de Edad (destete)

Peso al Destete (gramos)

	♂	♀
Control	33.94 ± 2.12 (n=11) (*)	27.22 ± 2.62 (n=7) +
Lesión	29.41 ± 2.05 (n=15) (*)	24.19 ± 1.95 (n=14) +

(*) t= 1.502, n.s.

+ t= 0.91, n.s.

Tabla III : Lesión Electrolítica del Conducto Nasopalatino y
Edad en días, a la que se produce la apertura vaginal y peso
corporal a dicha edad.

	Peso corporal a la Edad de a- pertura vaginal (gramos)	Edad de apertura va- ginal (Edad en días)
Control	115.76 ± 4.76 (n=3) +	43.66 ± 1.33 * (n=3)
Lesión	110.72 ± 4.4 (n=4) +	46.75 ± 1.37 * (n=4)

+ t= 0.7679, n.s.

* t= 1.5616, n.s.

DISCUSION

Los resultados de las técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido muestran:

. Crecimiento de la papila palatina en sus 3 dimensiones: rostrocaudal, transversal y dorsoventral. Como resultado de este crecimiento, los orificios de los conductos nasopalatinos que eran bien visibles al nacimiento se desplazan lateralmente y enmascaran.

. Crecimiento en dirección oro-nasal de los conductos nasopalatinos y diferenciación de la lengüeta de la pared lateral. La morfología de la lengüeta sugiere una posible acción valvular en forma pasiva al adosarse a la pared medial ocluyendo la entrada del conducto. Otra forma de oclusión podría ejercerse mediante la acción de la punta de la lengua presionando sobre la porción prominente de la papila. Esta, al ensancharse, produciría aposición de las paredes lateral y medial del ducto.

. Existe un incremento en la superficie epitelial de la cara oral de la papila. Sin embargo, los corpúsculos gustativos no se ubican en esta área, sino que lo hacen en el tercio inicial oral del conducto.

. Los corpúsculos gustativos son de aparición postnatal, existe una diferenciación más precoz, si se tiene en cuenta la aparición del poro como criterio funcional, en los que están ubicados fuera del conducto (8 días) que los ubicados dentro

del mismo (13 días). La disposición de los corpúsculos se conserva en el adulto y constituye una diferencia con las observaciones de Kolmer (1927) que los ubica a lo largo de todo el conducto. Tampoco es un hallazgo excepcional, ya que los hemos encontrado en todos ejemplares estudiados y con un proceso de desarrollo. Su presencia ha sido confirmada también por otros autores (Miller, 1977).

La microscopía electrónica de transmisión mostró un proceso de desarrollo desde los 3 días hasta los 21 días. Farbman (1965a), describió el desarrollo postnatal de los corpúsculos de las papilas fungiformes dividiéndolos en 5 estadios. En un intento de clasificar la evolución observada podríamos ubicar a los corpúsculos en las crías de 3 días perteneciendo al estadio 3 de Farbman por las siguientes razones: ausencia de poro, masiva invasión del epitelio por fibras nerviosas agrupadas en haces, predominio de un solo tipo celular: la célula oscura, ausencia de relaciones mesaxonal o "tipo sináptica" entre fibra y célula, presencia de vesículas con contenido poco denso y algunas de tipo espinoso en el citoplasma de la célula próxima a la fibra. En relación a estas vesículas, no son tan numerosas como las ha visto Farbman.

El corpúsculo de 8 días de edad puede ubicarse en el estadio 4 de Farbman por: ausencia de poro, relación entre las células oscuras de tipo mesaxonal y mesaxonales en formación, el corpúsculo se extiende casi a todo lo largo del epitelio, célu-

las oscuras están bien diferenciadas. En nuestros ejemplares las diferencias radican en: ausencia de microvellosidades, presencia de escasas células claras, pero bien diferenciables, no se pudieron reconocer células basales.

El corpúsculo de 21 días de edad presenta las características del estadio 5 de Farbman. En los corpúsculos de las papilas fungiformes esta configuración se alcanza a los 12 días de edad. Si se toma el poro como índice de maduración, no todos los corpúsculos maduran al mismo tiempo, 2% de los corpúsculos poseen poro en las crías de 1 día (Mistretta, 1972) y esto podría ser la causa de las respuestas observadas frente a distintos estímulos en la cuerda del tímpano antes de que se alcance la maduración morfológica. Sin embargo, en nuestro caso y considerando sólo los corpúsculos del conducto (ya que los más exteriores tienen maduración más precoz) la maduración progresaría en forma paralela en todos los corpúsculos. No se encontró poro en ninguno de ellos a los 3 y 8 días, tanto con microscopía óptica como con electrónica de transmisión.

El poro de estos corpúsculos es similar al descrito en las papilas fungiformes del hamster en el sentido de la ausencia de sustancia densa en la fosita gustativa, corroborado por la ausencia de gránulos densos en la parte apical de las células. En las papilas fungiformes de la rata se encontró que el poro presentaba un material amorfo denso y se le adjudicó origen extracelular (queratina, debris celular) ya que no encon-

traron gránulos densos secretorios intracelulares. Ambos difieren de los receptores gustativos de las papilas circunvaladas y foliadas.

La similitud estructural entre estos 2 tipos de corpúsculos (papilas fungiformes y conducto nasopalatino) podría deberse a su inervación dado que el petroso superficial mayor y la cuerda del tímpano son ramas del nervio facial (VII par). Del mismo modo, la semejanza entre los corpúsculos de las papilas foliadas y circunvaladas se debería a que ambos tipos son inervados por el glossofaríngeo (IX par).

Si bien los estudios puramente morfológicos no bastan para dilucidar cuál es la célula transductora, sugieren que esta función podría ser realizada por las células oscuras ya que serían las únicas en alcanzar la fosita gustativa, y poseen vesículas concentradas tipo sináptico en regiones donde existen contactos de adhesión célula-fibra.

Se ha descrito una aposición funcional entre, los corpúsculos gustativos del conducto nasopalatino y de las papilas fungiformes; otra entre las papilas foliadas y la franja gustativa del paladar y, entre las papilas circunvaladas y la parte media de esta franja. Esta disposición formaría un torniquete sensorial que el alimento ingerido debe atravesar aumentando la capacidad de recepción de los estímulos (Miller, 1977). La aposición funcional entre los corpúsculos del conducto y los de la punta de la lengua podría también servir pa

ra introducir al primero sustancias lamidas y analizar conjuntamente los estímulos químicos. Podría pensarse también que, al igual que los corpúsculos de la epiglotis los nasopalatinos tendrían un rol en reflejos protectivos de las vías aéreas, y estarían relacionados con la protección del acceso a las fosas nasales de sustancias provenientes de la cavidad bucal. Esta hipótesis se apoya en la morfología de la pared lateral del conducto con un repliegue que podría actuar como válvula (Wörhmann-Reppenning, 1980). Sin embargo, si analizamos el desarrollo postnatal del sistema papila-conducto-corpúsculos, en los primeros días de vida la abertura del conducto es bien notoria y el repliegue valvular no está desarrollado. Las crías en la vida temprana carecerían de esta protección.

Los corpúsculos gustativos presentan madurez morfológica a los 21 días, si bien de acuerdo con las evidencias fisiológicas detalladas en la introducción de este capítulo es posible tener respuesta a estímulos químicos antes de la maduración. Esto requeriría la presencia de un poro. A partir de los 11-13 días sería factible que este sistema respondiera a estímulos químicos. Durante la tercera semana de vida, la lactancia se modifica y entonces los corpúsculos estarían preparados a responder a estímulos provenientes de una ingesta más variada. Este sistema sería complementario de los otros receptores gustativos orales, dado que las lesiones del conducto no afectan la alimentación en las crías si nos basamos en el peso al destete.

Otra posibilidad sería que el sistema actuase como vía para el pasaje de estímulos feromonales al órgano vomeronasal y órgano de Maserà (Wysocki, Wellington y Beauchamp, 1980). En este caso, el conducto sería una vía de pasaje selectiva, los corpúsculos sensarían a los estímulos y, si estos no son apropiados, el repliegue valvular obturaría el conducto. Esta función sería posible a partir de los 13 días, ya que la lengüeta está diferenciada, los corpúsculos poseen un poro y la papila es prominente.

La técnica de lesión desarrollada no afecta la nutrición evidenciada por los pesos al destete y peso a la apertura vaginal ni la fecha de la apertura vaginal, pero podría afectar otros parámetros no investigados aquí, como la aparición de la pubertad, los ciclos estrales o el comportamiento reproductivo. En animales donde el órgano vomeronasal se abre en el conducto nasopalatino, el bloqueo de los conductos por cauterización y sutura no permitió el ingreso de una sustancia marcada (Ladewig y Hart, 1980), pero no redujo la actividad del flehmen en respuesta a orina de hembras en distintos períodos reproductivos y a hembras receptivas (Ladewig, Price y Hart, 1980).

CAPITULO III

LOS ESTIMULOS OLOROSOS Y LA REGULACION
NEUROENDOCRINA DE LA REPRODUCCION.

INTRODUCCION

El modelo experimental de la rata en iluminación permanente

1. Ciclos Estralés

La exposición a la iluminación permanente produce en la rata una cornificación vaginal prolongada. Esta respuesta a la falta de alternancia luz-oscuridad (L:0) se produce en aproximadamente un 50% de las ratas expuestas (Browman, 1937). Otros estímulos aplicados en forma intermitente (por ejemplo, ruido) pueden o no alterar los ciclos estrales.

La rapidez con que se desarrolla el estado de cornificación vaginal persistente en iluminación permanente aumenta con la edad. Así, ratas jóvenes pueden tardar 20-40 días en mostrar el primer episodio de cornificación vaginal. En ratas de 6-8 meses de edad puede aparecer dentro de los diez días de exposición (Everett, 1964).

La sensibilidad al efecto de la iluminación permanente para producir estro persistente (EPLL) puede variar con la cepa debido, probablemente, a diferencias genéticas o al tipo de régimen de iluminación previo con que son criadas. Algunas cepas (DA; Charles River, Crl CD (SD) (BR) desarrollan estro espontáneo a muy temprana edad, alrededor de los 6-7 meses. En el caso de la cepa DA, la manifestación espontánea temprana del estro persistente está unida a una tendencia para respon-

der en forma rápida a la iluminación permanente. La cruce entre esta cepa y otra "normal" (en cuanto a la manifestación del estro persistente espontáneo) produjo en la descendencia una modificación de la respuesta de los ciclos estrales a la iluminación permanente y de la edad de aparición del estro persistente espontáneo. Ambos fenómenos estaban bajo control de un factor hereditario (Everett, 1972).

La historia previa en cuanto a iluminación es un factor importante a considerar cuando se planean experimentos de este tipo. Dos cepas pueden reaccionar en forma diferente a distintas combinaciones de L:O y a la iluminación permanente de acuerdo al régimen de iluminación en el cual se criaron (Hoffmann, 1972). La iluminación permanente adelanta la edad de apertura vaginal (Fiske, 1941). Sin embargo, si las madres son criadas y expuestas durante la preñez a la iluminación permanente, las crías en esas mismas condiciones presentan pubertad, ciclos estrales, ovulación espontánea y elevación en la concentración plasmática de estrógenos previa a la de hormona luteinizante (LH) que no difiere de las controles en L:O = 14:10. Esto sugirió que la liberación de LH estaría bajo control de fotoperíodo y que en ausencia de éste otras señales exógenas como temperatura, manejo, ruidos (Weber y Adler, 1978) podrían ser usadas por las ratas para mantener la periodicidad en su descarga (Hagino y col., 1983). El efecto de la iluminación permanente sobre la periodicidad en la liberación de las gonadotropinas sería más deletéreo

que el de la oscuridad continua (00), porque en este último caso los ciclos estrales normales se mantienen. En numerosas especies, otros ritmos biológicos son también más alterados por la iluminación permanente que por la oscuridad continua.

En relación a las primeras etapas de la exposición a la iluminación permanente (1-4 ciclos) se modifica la relación temporal entre la citología vaginal, ovulación y otros eventos del ciclo estral (Lawton y Schwartz, 1967; McCormack y Sridaran, 1978; Campell y Schwartz, 1980).

Al aumentar la intensidad de la iluminación permanente se produce un incremento en el porcentaje de ratas que desarrollan cornificación vaginal, en el número de días de estadio cornificado y un descenso del peso ovárico. Las retinopatías se producen sólo a intensidades de luz muy altas (Lambert, 1975). Sin embargo, si ratas albinas expuestas a varias semanas de iluminación permanente intensa vuelven a colocarse en regímenes con periodicidad L:0 reasumen ciclos estrales normales, aunque sus retinas no se recuperen (Brown-Grant, 1974).

El EPLL puede coexistir con retinas dañadas, pero animales cegados por enucleación bilateral orbital presentan ciclos estrales regulares en iluminación permanente (Browman, 1937; Hoffmann, 1967). Surge entonces la pregunta de cuál es la vía neural involucrada. Se ha sugerido un rol al haz prosencefálico medial (Wurtman y col., 1967) en el control de la función gonadal por la luz. También se han descrito fibras nerviosas

que relacionan la retina con el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Moore y Lenn, 1972; Hendrickson y col., 1972; Moore, 1973).

2. Perfil hormonal de las ratas en EPLL

La descripción de este perfil puede dividirse en dos etapas determinadas por el advenimiento de las técnicas de radioinmunoensayo.

Bioensayo

Estas técnicas sirvieron para tener una idea aproximada de cuáles eran las descargas hormonales que se modificaban en este modelo experimental.

Ya en 1937, Browman sugirió que la cornificación vaginal prolongada podría ser el resultado de la liberación de "oestrin" (estróna) por los ovarios.

Posteriormente, Fiske (1941) encontró que el contenido pituitario de hormona folículo-estimulante (FSH) disminuye con el tiempo transcurrido en iluminación permanente, mientras que el de hormona luteinizante (LH) es más bajo que en los animales en alternancia L:0.

Lawton y Schwartz (1967) caracterizaron el EPLL en dos fases: hasta 60 días en iluminación permanente, con ovulación esporádica y alto contenido de LH pituitaria.

61-120 días en iluminación permanente, con cornificación crónica

y bajo contenido de LH pituitaria. También encontraron que la concentración sérica de LH era elevada y no dependía de la duración a la exposición a la iluminación permanente.

Debemos tener en cuenta al analizar los resultados de estas técnicas (depleción del ácido ascórbico ovárico, aumento del peso de las vesículas seminales de machos inmaduros) la baja sensibilidad de las mismas. El contenido hormonal de la glándula pituitaria, al medir la hormona presente al tiempo de extracción, puede no ser índice real de su actividad.

Radioinmunoensayo para gonadotrofinas hipofisarias

Hormona luteinizante (LH)

Durante el primer ciclo en iluminación permanente disminuye el porcentaje de ratas que presentan un ascenso de LH sérica comparable al que se produce en condiciones de alternancia L:0 en la tarde del proestro (Daane y Parlow, 1971; Campbell y Schwartz, 1980). Este ascenso es menor que el de las ratas controles en L:0 (Takeo, 1984; Campbell y Schwartz, 1980). En los ciclos sucesivos disminuye aún más dicho porcentaje y el tamaño de los picos hormonales. La aparición de estos últimos se retrasa en cada ciclo.

Los valores de LH sérica en ratas EPLL desde las 20-200 de exposición a iluminación permanente son superiores a los determinados en el estro de ratas en L:0=14:10, pero mucho más bajos que los de la tarde y noche temprana del proestro. Se en

contró también una disminución en dichos valores entre los 24 y 90 días de permanencia en iluminación permanente (Daane y Parlow, 1971; Naftolin, Brown-Grant y Corker, 1972; Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973). La medición de LH plasmática durante 2-7 días de estro consecutivo arrojó valores semejantes a los de la mañana del proestro en alternancia L:0 (Takeo, 1984).

Si ratas ovariectomizadas son colocadas en iluminación permanente, persiste la descarga pulsátil de LH, tal como se observa en los animales en periodicidad L:0. La administración de estrógenos por medio de cápsulas de Silastic produjo una caída en la concentración plasmática de esta gonadotrofina. Es decir que el feed-back negativo de los estrógenos sobre LH no se afecta por iluminación permanente (Watts y Fink, 1981).

Hormona folículo estimulante (FSH)

La descarga cíclica de esta hormona es alterada por la iluminación permanente de un modo similar a lo que ocurre con la LH. Durante los primeros 5 ciclos, el pico característico del proestro de ratas en alternancia L:0 está retrasado. La altura del mismo disminuye (Takeo, 1984). En ratas EPLL entre 20-200 días de exposición a iluminación permanente, los valores de FSH sérica son superiores a los del diestro normal, pero inferiores a los de la primera parte del estro (Daane y Parlow, 1971; Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973). No se encontró di-

ferencia en los valores de FSH sérica durante 2 a 7 días de estro consecutivo. Estos fueron inferiores a los basales del ciclo normal (Takeo, 1984).

Prolactina (PRL)

Los valores de PRL sérica en ratas en iluminación permanente son bajos, inferiores a los de la tarde del proestro. Existen elevaciones irregulares durante el día, sin período dominante (Bethea y Neill, 1979; Koiter et al., 1982). Otros autores dan cuenta de valores plasmáticos elevados de PRL, que aumentan en función del tiempo de exposición a la iluminación permanente y disminuyen con la castración (Vaticon y col., 1980). La falta de valores de referencia en este último estudio, como sucede durante el ciclo normal o la lactancia, no permite la comparación. Las diferencias podrían deberse a condiciones propias del ensayo.

Estradiol (E)

Las técnicas de radioinmunoensayo mostraron que durante los primeros ciclos en iluminación permanente, la elevación de los niveles de estradiol plasmático se produce antes del pico de LH. La relación temporal entre el valor máximo y el descenso de la concentración sérica del esteroide y el pico de la gonadotrofina está alterada. (Campbell y Schwartz 1980, Takeo, 1984).

La exposición prolongada a iluminación permanente ocasiona que los niveles circulantes de estradiol se mantengan elevados. Durante 2 a 7 días de estro consecutivo éstos son comparables a los del mediodía del proestro del ciclo normal (Takeo, 1984).

Progesterona (P)

Durante los primeros 5 ciclos en iluminación permanente, el pico de progesterona se retrasa con respecto al ciclo previo. El nivel máximo de esta hormona ocurrió generalmente despúes del pico de LH. Durante el estro persistente (2 a 7 días) los valores de progesterona fueron comparables a los basales del ciclo normal (Takeo, 1984). Se encontró variabilidad entre animales en cuanto a la sincronización en la aparición de dicho pico, y éste puede/^{no}aparecer en algunos. (Campbell & Schwartz, 1980).

3. Ovulación inducida en ratas en estro persistente por iluminación permanente (EPLL)

En 1943, Dempsey y Searles observaron formación de cuerpos lúteos en ratas anovulatorias por iluminación permanente, que habían recibido estímulos copulatorios de machos. Fue la primera evidencia de ovulación refleja en este modelo experimental.

El 90% de las ratas EPLL entre 55-65 días de exposición se rían receptivas sexualmente (Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973; Davidson, Smith y Bowers, 1973). Sin embargo, otros autores trabajando con estas mismas ratas pero con 2 a 4 meses en iluminación permanente, encontraron variabilidad en su receptividad (Johns, Feder y Komisaruk, 1980).

En este modelo se produciría ovulación en respuesta a estímulos sexuales (cópula, montes, intromisión), sensoriales (olfatorios, táctiles, visuales), stress, inyección de progesterona o gonadotropina coriónica. En todos los casos, el número de ovocitos es menor que el ovulado por ratas en alternancia L:0. La denervación pineal no afecta el comienzo de la cornificación vaginal, la receptividad sexual ni la ovulación después de la cópula (Brown-Grant y Ostberg, 1974). La adrenalectomía reduce considerablemente la ovulación por estímulos olorosos, pero no afecta la receptividad sexual ni la ovulación por cópula o intromisiones (Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973; Johns, Feder y Komisaruk, 1980). Este efecto podría explicarse a través del conocimiento de que el stress aumenta la liberación de ACTH, que produce salida al torrente sanguíneo de progesterona o alguno de sus metabolitos de la glándula adrenal (Lawton, 1972). Algunos estímulos no coitales no requerirían de la progesterona adrenal ya que si bien la adrenalectomía disminuye a la mitad la proporción de ratas que ovulan frente a estímulos olorosos (25%), no hay ovulación en ratas controles

adrenalectomizadas.

Todos los estímulos sexuales no son igualmente efectivos para producir ovulación. Casi todas las ratas EPLL ovulan por cópula o intromisión, La ovulación por montes, estímulos olorosos, stress o inyección de progesterona se produce aproximadamente en la mitad de los animales investigados. Los estímulos coitales ocasionan una liberación rápida de LH, FSH y PRL. Producida la cópula, la LH aumenta a los 10 minutos y alcanza un "plateau" a los 60', para luego decrecer. Algo similar ocurre con FSH, pero el aumento no es muy superior a los valores basales. La PRL aumenta 10' después de la cópula y permanece elevada por lo menos hasta los 60' (Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973; Davidson, Smith y Bowers, 1973).

La recepción de los estímulos olorosos para producir ovulación ha sido adjudicada al órgano vomeronasal (Johns y col., 1978).

MATERIALES Y METODOS

1. Modelo experimental de la rata en estro persistente por iluminación permanente (EPLL)

a. Infraestructura

Las ratas fueron alojadas en un cuarto aislado de 1,50 m x 2 m y de una altura de 2,60 m dentro del bioterio general. Su circuito de iluminación estaba separado del correspondiente al resto del bioterio, que posee un control automático de encendido y apagado de las luces. La sala de luz permanente estaba conectada a un generador de emergencia que garantizaba que en caso de producirse una falta en el suministro de energía eléctrica, éste se reanudaba dentro de los 5 minutos de producida la interrupción. El acceso a la sala se realiza a través de una única puerta y el extractor ubicado a 1,70 m del piso estaba equipado con una trampa de luz para evitar todo tipo de filtraciones lumínicas del exterior.

Las jaulas se colocaron en un rack móvil equipado con tubos fluorescentes de 40 W ubicados a 10 cm del techo de la jaula. Estos tubos proporcionan la iluminación adecuada sin elevar consistentemente la temperatura del recinto. La ventilación se realizó por medio del extractor auxiliado con un turboventilador. Las jaulas se construyeron con delgadas varillas de alambre que permiten la iluminación uniforme en el interior

de las mismas. La alimentación fue "ad libitum" (Cargill-ACA) y se usó aserrín como lecho. Se colocaron 10 ratas por jaula.

Los ciclos estrales y los experimentos se realizaron dentro del recinto de luz permanente y en una sala habilitada al efecto.

b. Animales

Para el estudio del modelo se usaron 100 ratas Holtzman de 2 meses de edad criadas en L0=14:10. Durante esta primera etapa se tomaron muestras del contenido vaginal durante 3 ciclos consecutivos utilizándose sólo aquellas ratas que presentaban ciclos estrales con una duración de 4 días, 5 días o mixtos (es decir, con ciclos de 4 y 5 días alternados). Las ratas se trasladaron a la sala de iluminación permanente en la mañana del diestro I del 4º ciclo y se continuó tomándoles muestras del contenido vaginal hasta su matanza.

En una segunda etapa se utilizó otro lote de 100 ratas de 2 meses de edad y se colocaron en dicha sala sin toma previa de los ciclos estrales. En este caso, durante los 15 días previos a la realización de los experimentos, se tomaron muestras del contenido vaginal.

Cada rata se individualizó mediante marcas en las orejas. La sala de iluminación permanente poseía, constantemente, una jaula con 2 machos adultos.

c. Determinación de los ciclos estrales

La toma del contenido vaginal se realizó diariamente a la misma hora (9 a 11 hs) con goteros individuales cargados con solución fisiológica. La observación de los extendidos se realizó en fresco bajo microscopio. Los extendidos se clasificaron de la siguiente forma:

Proestro (Pr): Células ovaladas o circulares, grandes (24 μ m) con un núcleo central.

Estro (Es): Células alargadas con forma de escama, anucleadas (32 μ m).

Diestro I (DI): Presencia de células redondas pequeñas (7 μ m) (leucocitos). En este estadio por lo general coexisten con algunas escamas aisladas y con células ovaes nucleadas.

Diestro II (DII): Presencia exclusiva de leucocitos.

La presencia de leucocitos en todas las fases del ciclo estral sugiere alguna infección del tracto genital. Es frecuente que en un mismo extendido puedan coexistir 2 o más tipos celulares, (por ejemplo, en el proestro puede haber algunas anucleadas) por eso es necesario tener en cuenta la proporción de cada tipo celular al realizar la clasificación.

En los ciclos de 4 días la secuencia de extendidos es Pr, Es, DI, DII; en la de 5 días es de Pr, Es, DI, DII, DII o Pr, Es, Es, DI, DII.

En las ratas con ciclo mixto coexisten estos 2 tipos alternada-

d. Autopsias

Se realizaron diversas autopsias exploratorias en las ratas EPLL anestesiadas con eter, obteniéndose muestras de ovario, oviducto, útero, corazón, timo, bazo, hígado, riñón y glándulas adrenal, hipofisaria, submaxilar, pineal y tiroidea.

Los órganos fueron pesados de a pares en el caso de los bilaterales en una balanza Mettler PC 180 con sensibilidad de 1 mg. La hipófisis y la pineal se pesaron en una balanza Roller-Smith con sensibilidad de 0,01 mg. Los controles utilizados fueron ratas mantenidas en L:D=14:10 y en el estadio estro del ciclo vaginal.

Después de pesados, el tracto genital y la hipófisis, se fijaron con Bouin y se realizó la técnica de rutina de inclusión en parafina. Los cortes semiseriados de 5 μ m se tiñeron con hematoxilina-eosina.

e. Búsqueda de ovocitos

Los oviductos, separados del ovario y del útero, se colocaron en cápsulas de Petri sobre una gota de solución fisiológica. Bajo una lupa de disección se localizó la abertura infundibular del oviducto y se introdujo una aguja de 28 gauge.

A través de ésta se inyectó 0.1 cm³ de hialuronidasa testicular (Sigma), 450 UI/ml en buffer fosfato pH 7.2, 0.1 M. Esta solución se requiere en el caso de la rata para despegar a los

ovocitos de la pared del oviducto, ya que si el lavado se realiza únicamente con solución salina éstos no pueden ser removidos de la región ampolla-istmo. El examen bajo lupa de esta región permite una evaluación a priori de la ocurrencia de la ovulación. La porción de la trompa está dilatada y aparece más transparente en las ratas que han ovulado. Los ovocitos aparecen rodeados de las células del cúmulo en la solución de lavado y después de 5' se han separado de las mismas y pueden contarse fácilmente. El lavado debe realizarse por inyección a través del infundíbulo y no a través del útero porque las características morfológicas de la unión útero-tubal en la rata son tales que impiden el reflujo de líquido desde el útero al oviducto.

f. Estímulos olorosos utilizados

Lecho usado:

Se utilizó el lecho (aserrín) usado durante una semana por 10 machos adultos mezclados con el lecho usado durante el mismo tiempo proveniente de una jaula de apareo que contenía 7 hembras y 2 machos. Ambos lechos fueron removidos de las jaulas de origen 10 minutos antes de comenzar el experimento y mezclados inmediatamente antes de ser colocado en las bandejas de las ratas a investigar. Estos contenían orina de machos, y de hembras y heces. Las ratas EPLL utilizadas tuvieron

contacto directo con el lecho durante 30 minutos.

Orina:

Se recogió orina de 30 machos adultos en un recipiente de vidrio presionando suavemente sobre el abdomen. Esta recolección se efectuó 1 hora antes de su utilización. El material se guardó a 4°C y antes de aplicarlo se lo dejó tomar temperatura ambiente (0.03 cm³ c/15 minutos en el surco oronasal). Transcurrido el tiempo de estimulación se cambió el lecho por uno limpio.

Radioinmunoensayo. Gonadotrofinas hipofisarias y prolactina (RIA)

Las ratas EPLL se decapitaron y se recogió sangre del tronco en tubos de centrífuga con la ayuda de embudos adecuados. Luego de dejar coagular la sangre a temperatura ambiente, aproximadamente 2 horas, se centrifugaron los tubos y se separó el suero. Este se conservó a -20°C hasta el momento de realizar el ensayo.

En todos los sueros se midió hormona luteinizante (LH) folículoestimulante (FSH) y Prolactina (PRL) por RIA de doble anticuerpo. Cada muestra se valoró por duplicado, utilizando una curva que construyó con la hormona standard RP-1 para FSH y LH y RP-3 para PRL provista por el NIAMDD, NIH.

RESULTADOS

Ciclos estrales

La primera respuesta de las ratas a la iluminación permanente consistió en un alargamiento del ciclo estral, ya sea aumentando el número de días en estro o diestro. El análisis de contingencia (Tabla IV) indica que existe una relación ($P < 0.05$) entre el tipo de ciclo previamente presentado en L:O = 14:10 y la respuesta de los animales a la iluminación permanente para producir cornificación vaginal persistente, constante o continuar con ciclos estrales. Las ratas con ciclo previo de 4 días serían más sensibles al efecto de la iluminación permanente para producir estro persistente y constante que las con ciclo de 5 días y éstas últimas más susceptibles que los animales con ciclo mixto. Se encontró que después de 120 días bajo este régimen de iluminación permanente, el 49.28% del total de ratas utilizadas habían presentado por lo menos un ciclo con 8 ó más días de estro consecutivo.

Si los animales en L:O = 14:10 se colocan en iluminación permanente sin discriminar entre los tipos de ciclos previamente citados y otras combinaciones posibles, el rendimiento en ratas con 8 ó más días de estro consecutivo es menor, aproximadamente 40%.

El primer ciclo con 4 ó más días de estro consecutivo se produjo aproximadamente un mes después de instalarlas bajo iluminación permanente. Posteriormente podían presentarse 2 tipos

de comportamiento en relación al ciclo estral.

. Varios días de estro consecutivo seguidos por 2 ó 3 días de diestro, repitiéndose nuevamente el período de estro.

. Presentando el estro, las ratas no mostraron más extendi dos tipo diestro o proestro (Estro constante).

Las causas de este comportamiento diferencial no pudieron dilucidarse.

Autopsias. Características morfológicas del tracto genital

A los 45 días de permanencia en iluminación permanente se autopsiaron ratas con:

a) 4 días de estro consecutivo; b) 14 días de estro consecutivo; c) 8 días de estro consecutivo, pero inyectadas a las 16 horas con 100 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG); d) con extendido tipo estro, habiendo pasado el día previo por proestro (L:0=14:10).

En la autopsia exploratoria se determinaron los pesos de todos los órganos, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, lavaron los oviductos para determinar ovulación y se fijó el tracto genital para microscopía óptica.

Se encontró que el peso de ambos ovarios disminuye en las ratas EPLL (aprox. 51 mg grupo a; 39 mg en el b) en relación a los controles (67 mg grupo d). Esta disminución estaría relacionada con el número de días de estro consecutivo.

El examen en fresco de los ovarios de las ratas EPLL, du-

rante las numerosas autopsias realizadas, mostr6 que 6stos tenían: color blanquecino, grandes folículos cargados de líquido y los cuerpos hemorrágicos estaban ausentes. No se encontraron ovocitos en los oviductos.

La bursa ovárica estaba extremadamente dilatada por la presencia de líquido, en algunos casos se ha recogido hasta 1 ml.

En las ratas que ciclan normalmente, el día del estro el ovario presenta pequeños puntos sanguinolentos (cuerpos hemorrágicos) indicando aquellos folículos que han ovulado la noche anterior. El número total de ovocitos varía entre 10 y 12 (ambas trompas).

La exposición a la iluminación permanente produce un incremento en el peso uterino (aprox. 600 mg) en relación al de animales en alternancia L:O=14:10 (500 mg). Se produce además una modificación del epitelio de este 6rgano que es de tipo estratificado escamoso en las ratas EPLL. En los animales normales 6ste es columnar simple.

Las secciones histol6gicas de los ovarios en los distintos grupos autopsiados mostraron las siguientes características:

a) 4 días consecutivos de cornificación vaginal: escasos folículos quísticos y numerosos folículos en distintos períodos de crecimiento. Cuerpos lúteos de distinto tamaño; los más grandes indicarían una ovulación reciente (Fig. 29D).

b) 14 ó más días consecutivos de cornificación vaginal: grandes

folículos quísticos, ausencia de cuerpos lúteos recientes. Escaso tejido luteal y folículos en distintas etapas de crecimiento (con epitelio simple, con epitelio estratificado, con cavidad folicular) (Fig. 29A).

c) 8 ó más días de estro consecutivo inyectadas con 100 UI de hCG: Persisten los grandes folículos (Fig. 29C). Pocos cuerpos lúteos recientes. Esto estaría relacionado con el hecho de que el número de ovocitos ovulados (5-7 ovocitos/x 2 oviductos) es menor que en las ratas en L:O=14:10.

d) Estro, L:O=14:10: Cuerpos lúteos recién formados con infiltrado de sangre, numerosos folículos en crecimiento y raramente folículos con gran cavidad folicular (Fig. 29B).

En la determinación de los valores plasmáticos de las hormonas hipofisarias y en los experimentos de ovulación inducida se utilizaron ratas con 8 ó más días de estro consecutivo ya que:

- . los ovarios presentaban características similares a los de los animales con 14 ó más días de estro consecutivo.
- . se produjo ovulación por inyección de gonadotrofina coriónica humana.
- . habían sido utilizados previamente por otros autores en estudios sobre ovulación inducida (Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973; Johns y col., 1978).

Valores plasmáticos de prolactina (PRL), hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) en las ratas EPLL

Para la comparación entre los valores plasmáticos de estas hormonas en las ratas EPLL y los animales controles se eligieron los períodos del ciclo estral donde se producen las descargas relacionadas con la ovulación (tarde del proestro) y donde dichos valores séricos son basales (tarde del diestro I). No se encontraron diferencias significativas en los niveles hormonales de LH y FSH de las ratas EPLL a la mañana y a la tarde. En el caso de la prolactina los valores obtenidos por la tarde son superiores a los de la mañana (Tabla Va). Para la comparación entre ciclo normal y estro persistente se utilizaron los valores de las tomas a las 16.30 hs.

La tabla Vb muestra que para:

LH: las ratas EPLL poseen valores similares a los basales del diestro.

FSH: sus valores son superiores a los basales y similares a los de la tarde del proestro. Los niveles máximos de esta gonadotrofina se producen durante la noche de dicho estadio.

PRL: las ratas EPLL muestran valores elevados de esta hormona, similares a los de la tarde del proestro, cuando se produce la máxima descarga.

Se encontró variabilidad en los valores de la PRL entre individuos (Fig. 30). Este hecho está de acuerdo con las observaciones de Koiter y col., 1982, quienes encontraron en estas

ratas picos diarios en la PRL plasmática. La disparidad entre valores se debería a asincronía en las descargas individuales por falta de una señal temporal exógena. Los valores del ciclo normal son comparables a los previamente obtenidos en el Instituto de Neurobiología (Chiocchio, Chafuen y Tramezzani, 1980).

En ese mismo gráfico puede observarse la disminución de los valores de PRL plasmática después de la ovulación provocada por inyección de hCG (Grupo I₂). Las diferencias en los valores de PRL sérica entre las ratas EPLL y las del grupo I₂ no son significativas debido a la variabilidad en los valores individuales de esta hormona en el primer grupo.

En relación a la LH los valores son bajos en las ratas EPLL, aumentan 6 horas después de la inyección de hCG (grupo I₁) y se mantienen elevados al día siguiente. Estos valores elevados no se deberían a LH endógena sino a reactividad cruzada de hCG durante el radiounmunoensayo. Las diferencias entre los 3 grupos no son significativas. Los valores de FSH no muestran cambios en los 3 grupos.

Ovulación inducida por estímulos olorosos

Las características del estímulo aplicado se han explicado en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizaron ratas con 10 ó más días de estro consecutivo que habían permanecido en luz permanente durante 120-150 días. En cada caso se autopsiaron ratas L:O=14:10 en estro para control.

1. Lecho usado

El día previo a su utilización los animales se trasladaron a jaulas individuales con lecho limpio. El experimento consistió en remover el lecho del día anterior y colocar el "lecho estímulo" durante 30 minutos a las 13 horas en un grupo y a las 16 horas en el otro.

Durante la exposición los animales efectuaron movimientos rápidos del hocico y lo frotaron con las patas delanteras. Transcurrido el tiempo de estimulación, el lecho se cambió por uno limpio. Después de 19 a 22 horas de realizado este procedimiento, se autopsiaron las ratas y buscaron ovocitos mediante la técnica descrita. Los ovarios mostraron grandes folículos, sin cuerpos hemorrágicos. No se encontraron ovocitos (Tabla VI).

2. Orina

Las condiciones experimentales fueron las mismas que en

el punto 1, pero el estímulo consistió en 2 aplicaciones de 0.03 cm³ en el surco oronasal cada 15 minutos, comenzando a las 13,00 horas. Transcurrido el tiempo de estimulación se removió el lecho para asegurarse que éste no contuviera residuos de orina. El contacto con el estímulo produjo reacciones de movimientos rápidos con el hocico. No se encontraron ovocitos (Tabla VI).

Tanto en el caso 1 como en el 2, el día del sacrificio el extendido vaginal fue tipo estro.

3. Inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG)

Se utilizaron animales con las mismas características que en el caso 1 y 2 en cuanto a días de estro consecutivo y en iluminación permanente para inyectarlos con 100 UI de hCG a las 16 horas. Se autopsiaron 19-22 horas después de la inyección; 8/9 ratas ovularon demostrando que los ovarios pueden responder a la hormona y que no existe atresia folicular importante aunque el número ovulado es algo inferior (5-7/x2 trompas) a los controles L:O=14:10 (Tabla VI).

Ovulación inducida por contacto prolongado con machos-Cópula

Las ratas utilizadas habían permanecido en iluminación permanente entre 150-250 días. Se utilizaron machos probados mantenidos en L:O=14:10.

Las hembras fueron colocadas en las jaulas ocupadas por los machos, ya sea:

- A) 1 hembra con 2 machos por 30 minutos, a las 16 horas. n=3.
- B) 7 hembras con 2 machos desde las 22 horas hasta las 9 horas del día siguiente. n=25.

A) Se realizó en condiciones de luz permanente, observándose el comportamiento de los machos y hembras. Los primeros lamieron el área genital de las hembras, se aproximaron al dorso intentando montarlas. La respuesta al intento de monte fue un rechazo que se manifestó por un alejamiento de la hembra.

B) Se llevó a cabo en luz permanente (n=14) o en oscuridad desde 22-6 h (n=11). En este último caso se encontraron espermatozoides en 1 sola hembra. Cuando el experimento se realizó en oscuridad, transcurrido el tiempo las hembras se colocaron nuevamente en luz permanente.

Después de 24-26 h de separarlas de los machos, se realizó la autopsia con examen de los ovarios. No se encontraron ovocitos en ninguna de las hembras (Exp. AyB; Tabla VII). El extendido estaba formado por células cornificadas. Como control se utilizaron ratas en L:O=14:10, en estro. La inyección de hCG en ratas EPLL con las mismas características que las utilizadas en estos experimentos produjo ovulación (positivo 3/3).

Tabla IV: Relación entre Estro constante, persistente y ciclos previos (en L:0=14:10). Análisis de contingencia.

Ciclos anteriores				
	4	5	Mixto	χ^2
Estro constante	17/31	3/10	5/28	P<0.025
Estro persistente (no incluye estro constante)	3/31	2/10	4/28	P<0.05
No presentaron Estro persistente o constante	11/31	5/10	19/28	

Tabla Va: Niveles hormonales en el suero de las ratas en estro persistente por iluminación permanente (EPLL); (media \pm error standard). Radioinmunoensayo de doble anticuerpo.

Niveles hormonales (ng/ml)

	LH	FSH	PRL
EPLL			
10 h	97.8 \pm 11.8 (8)	165.5 \pm 2.7 (9)	44.6 \pm 8.5 (7) *
16.30 h	84.1 \pm 7.4 (11)	177 \pm 12.5 (6)	179.6 \pm 56.2 (10)

* $p < 0.03$, "U" test.

El número de animales utilizados figura entre paréntesis.

Tabla Vb: Comparación entre los niveles hormonales de las ratas EPLL a las 16.30 y de ratas con ciclo estral de 4 días mantenidas en L:O=14:10 (media \pm error standard). Radioinmuno ensayo de doble anticuerpo.

Niveles hormonales (ng/ml)

	LH	FSH	PRL
EPLL 16.30h	84.1 \pm 7.4 (11)**	177 \pm 12.5 (6)**	179.6 \pm 56.2(10)*
Ciclo Normal			
Proestro 16.30h	257.9 \pm 33.3 (8)**	184.2 \pm 19.2 (9)	291.6 \pm 34.1(10)
Diestro I 16.30h	59.1 \pm 6.5 (18)	98.3 \pm 5.1(10)**	30.2 \pm 3.3(6)*

El número de animales figura entre paréntesis.

Análisis de la varianza y test de Newmann-Keuls.

** p < 0.01; * p < 0.05

Tabla VI: Ovulación inducida en ratas en estro persistente por iluminación permanente (EPLL) frente a estímulos olorosos.

	N°de ovocitos (x 2 oviductos)
EPLL + contacto con lecho usado (n=11)	-
EPLL + contacto con orina de machos (n=3)	-
Control EPLL + 100 UI de hCG (n=9)	5-7 (ovulación 8/9 animales)
L:O=14:10 (Estro)	7-10

Tabla VII: Ovulación inducida en las hembras en estro persistente por iluminación permanente (EPLL) por contacto prolongado-cópula con machos.

	N°de Ovocitos (x 2 oviductos)	Presencia de espermatozoides
EPLL + contacto 1 hora (n=3)	-	-
EPLL + contacto prolongado en luz permanente (n=14)	-	-
EPLL + contacto prolongado en oscuridad desde 20h-6hs (n=11)	-	1/11
<hr/>		
L:O=14:10 (estro)	10	
<u>Control</u>		
EPLL+100 UI de hCG (n=3)	5-7 (ovulación 3/3 ratas)	

DISCUSION

El análisis del modelo de la rata en estro persistente por iluminación permanente (EPLL) mostró que nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en cuanto a:

- . Porcentaje de ratas que responden a la luz permanente con cornificación vaginal persistente.
- . Características morfológicas del tracto genital.
- . Niveles hormonales de gonadotrofinas hipofisarias y prolactina.
- . Ovulación por inyección de gonadotrofina coriónica humana y número de ovocitos ovulados.

Las diferencias radican en:

1. Atracción y receptividad sexual:

En las ratas EPLL se ha descrito un aumento en la receptividad sexual y en la atracción al macho. El 90% de las ratas expuestas a la luz permanente durante 55-65 copulaban dentro de los 30' de exposición al macho y los coeficientes de lordosis eran altos (Brown-Grant, Davidson y Greig, 1973). Hardy (1970) encontró también un aumento en la receptividad sexual, al incrementarse el tiempo de permanencia en iluminación continua. En este último caso, debe tenerse en cuenta el posible efecto de la experiencia sexual previa.

Por otra parte, Johns, Feder y Komisaruk (1980), trabajan

do con ratas que habían permanecido 2-4 meses en luz permanente, encontraron variabilidad entre las mismas en cuanto a su receptividad al macho.

Nuestros experimentos realizados con ratas mantenidas 4-6 meses en luz permanente mostraron que estas ratas EPLL no son receptivas a los machos. Esto se manifiesta por un comportamiento de rechazo (alejamiento) a los intentos de monte realizados por el macho.

2. Ausencia de ovulación inducida por estímulos sensoriales:

Se encontraron espermatozoides en 1/28 ratas probadas. Podemos estudiar entonces si se produce ovulación por estímulos sensoriales generales (olorosos, táctiles, visuales). Si bien se ha probado que la exposición a altas intensidades de luz permanente produce retinopatías, estudios de comportamiento sugirieron que la función visual persistiría en esas retinas dañadas (Anderson y O'Steen, 1972; Bennett, Dyer y Dunn, 1973). En los experimentos realizados con estímulos de lechos usados y orina, tendríamos sólo el estímulo olfatorio. No se detectó ovulación ni en la rata que copuló ni en las expuestas a los estímulos no coitales. Esta se produjo, no obstante, por inyección de hCG, con un número de ovocitos menor que en ratas controles en L:O=14:10.

Las discrepancias encontradas en cuanto a receptividad

sexual y ovulación inducida por estímulos sensoriales podría deberse a diferencias de cepa. Esto parece poco probable ya que la ovulación inducida por estímulos coitales también se produce en ratas pigmentadas, o bien a los efectos de una permanencia más prolongada en luz permanente. Si este fuera el caso, podríamos distinguir 2 períodos:

0-4 meses: los efectos deletéreos de la luz permanente sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadal no estarían totalmente establecidos. Las hembras serían receptivas y los estímulos coitales y no coitales producirían descargas de gonadotrofinas y ovulación. Existe una ovulación espontánea ya que un 15% de las ratas EPLL ovulan aún cuando se encuentran aisladas en su propia jaula (Johns, Feder y Komisaruk, 1980). En relación a los animales expuestos a estímulos olorosos (50% ovulan), la proporción se reduce a la mitad por adrenalectomía.

4 meses o más de luz permanente: los ovarios pueden responder a las hormonas, pero los estímulos sensoriales no son efectivos para producir ovulación. Se ha producido un cambio en la receptividad al macho.

CONCLUSIONES

Se ha descrito un proceso de maduración postnatal del órgano vomeronasal de modo que el complejo vomeronasal presenta, en ejemplares de 21 días de edad (destete) las características morfológicas que se encuentran en los animales adultos. Este proceso de maduración no excluye la posibilidad de función vomeronasal durante el mismo; la característica de los estímulos y/o la modalidad de recepción podrían variar mientras el órgano está en desarrollo. De esta forma la información sensorial podría ser recibida y transmitida a los centros superiores en estas primeras etapas de la vida.

Durante las primeras semanas de la vida se modifica el sistema conducto nasopalatino-papila palatina. Los corpúsculos gustativos podrían probar sustancias químicas desde los 13 días de edad en adelante, momento en el cual aparece el poro gustativo. Al destete (21 días) todo el sistema está bien desarrollado.

Como consecuencia de los cambios observados en ambas estructuras en el transcurso de las 3 primeras semanas de vida podemos suponer que ambos sistemas actuarían en:

1. Forma integrada: órgano vomeronasal-conducto nasopalatino-papila palatina. El conducto nasopalatino regularía la

entrada de estímulos tanto al órgano vomeronasal como al órgano de Maser, a través de la acción combinada del repliegue valvular y de los corpúsculos gustativos. Los corpúsculos gustativos probarían las sustancias antes de su entrada al conducto, si éstas no fueran apropiadas, el repliegue valvular en forma activa o pasiva ocluiría la entrada de los mismos desde la boca a las fosas nasales. Los conductos nasopalatinos no son la única vía de acceso al órgano, ya que también pueden penetrar estímulos a través de las fosas nasales.

El feto se encuentra en un medio apropiado para su crecimiento. Se sabe que éstos efectúan movimientos de deglución y tragan grandes cantidades de líquido uterino. En esta etapa no existe la protección del repliegue valvular ni presencia de corpúsculos gustativos en la papila palatina. La abertura oral de los conductos es amplia. Si la función vomeronasal en esta etapa consiste en muestrear las características del líquido uterino, la vía oronasal es altamente permeable, permitiendo el acceso de estímulos químicos a los receptores vomeronasales.

2. Forma independiente. En este caso, el órgano vomeronasal recibiría los estímulos por la vía nasal exclusivamente. El sistema papila palatina-conducto nasopalatino tendría una función gustativa complementaria, a través de su participación en la integración de un torniquete quimiosensorial como ya se ha descrito. A favor de esta función, estaría el hecho de que las lesiones que provocan la oclusión del conducto no afectan la

nutrición y el desarrollo de las crías en lactancia. Los corpúsculos gustativos podrían ser funcionales desde los 13 días de edad, período a partir del cual la lactancia se modifica, y permitirían al animal responder a los requerimientos de una ingesta más completa. El conducto permeable sería la vía de acceso al órgano sólo durante la vida fetal.

En relación al modelo elegido para el estudio de la participación vomeronasal en la regulación neuroendócrina de la reproducción, existirían 2 fases. Durante la fase estudiada, cuando la ovulación espontánea ya no se produce, los estímulos sensoriales no coadyuvarían para desencadenar la ovulación. El estímulo utilizado no fue caracterizado químicamente, pero es de tipo natural, fisiológico. Incluye un componente feromonal y podría también tener uno que utilice la vía trigeminal. Nuestros resultados indican que, transcurridos 4 meses en iluminación continua, los estímulos olfatorios no producen ovulación. Durante la fase previa la participación adrenal en la ovulación refleja es muy importante.

De la Cruz P. Seltzer

Trameres

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Addison, W. & Rademaker, L.A. (1927). The postnatal growth of the vomeronasal organ of the albino rat. J. Comp. Neurol. 44, 69-86.

Alberts, J.R. (1976). Olfactory contributions to behavioral development in rodents. Mammalian olfaction, reproductive processes and behavior. R.L. Doty (Ed). Academic Press, New York. 67-91.

Altner, H., Müller, W. & Brachner, I. (1970). The ultra-structure of the vomeronasal organ in reptilia. Z. Zellforsch. 105, 107-122.

Anderson, K.V. & O'Steen, W.K. (1972). Black-White and pattern discrimination in rats without photoreceptors. Exp. Neurol. 34, 446-454.

Anton, W. (1895). Beitrag zur Kenntnis des Jacobson'schen Organ des Erwachsensen. Verh. d. Deut. otol. Gesellsch. Jena. 4, 55-57.

(1908). Beiträge zur Kenntniss des Jacobson'schen Organ der Erwachsenen. Z.F. Heilk. B. 16, H. 4.

(1911). Beiträge zur Kenntnis des Jacobson'schen Organ bis Erwachsenen. Vhdlgn. d. Deutsch. otolog. Ges. 4 Vers., Jena.

Arnautovic, I., Abdalla, O. & Fahmy, M.F.A. (1970).

Anatomical study of the vomeronasal-organ and the nasopalatine duct of the one humped camel. Acta Anat. 77, 144-154.

Arvidson, K., Cottler-Fox, M. & Friberg, U. (1981a). Taste buds of the fungiform papilla in Cynomolgus monkey. J. Anat. 33 (2), 271-280.

(1981b). Fine structure of taste buds in the human fungiform papilla. Scand. J. Dent. Res. 89, 297-306.

Astic, L. & Saucier, D. (1982). Ontogenesis of the functional activity of rat olfactory bulb: autoradiographic study with 2-deoxyglucose method. Dev. Brain Research. 2 (2), 243-256.

Balboni, G.C. & Vannelli, G.B. (1982). Morphological features of the olfactory epithelium of prepubertal and postpubertal rats. Olfaction and Endocrine Regulation. W. Breipohl (Ed.). IRL Press; London. 285-298.

Bannister, L.H. (1968). Fine structure of the sensory endings in the vomeronasal organ of the slow-worm Anguis fragilis. Nature (Lond.). 217, 275-276.

Barber, R.C. & Raisman, G. (1978a). Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. Brain Research. 141, 57-66.

(1978b). Replacement of receptor neurons after section of the vomeronasal nerves in the adult mouse. Brain Res. 147 (2), 297-313.

Bawden, H.H. (1894). The nose and Jacobson's Organ, with special reference to the Amphibia. J. Comp. Neurol. Vol. 4, 139.

Beauchamp, G.K., Martin, I.G.; Wysocki, C.J. & Wellington, J.L. (1982). Chemoinvestigatory and sexual behavior of male guinea pigs following vomeronasal organ removal. Physiol. & Behav. 29, 329-336.

Beidler, L.M. & Smallman, R.L. (1961). Renewal of cells within taste buds. J. Cell. Biol. 27, 263-272.

Bellairs, A. (1942). Observations on Jacobson's organ and its innervation in Vipera berus. J. Anat. 76, 167-177.

Bellringer, J.F., Pratt, H.E. & Keverne, E.B. (1980).

Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *J. Reprod. Fertil.* 59 (1), 223-228.

Bennett, M.H., Dyer, R.F. & Dunn, J.P. (1972). Light induced retinal degeneration: effect upon light-dark discrimination. *Exp. Neurol.* 34, 434-445.

(1973). Visual Dysfunction after long-term continuous light exposure. *Exp. Neurol.* 40, 652-660.

Bethea, C.L. & Neill, J.D. (1979). Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. *Endocrinology.* 104, 870-876.

Bhatnagar, K.P. & Kallen, F.C. (1974). Morphology of the nasal cavities and associated structures in Artibeus jamaicensis and Myotis lucifugus. *Am. J. Anat.* 139, 329-346.

Bhatnagar, K.P. (1980). The chiropteran vomeronasal organ: Its relevance to the phylogeny of bats. Proceedings of the Fifth International Bat Research Conference. D.E. Wilson & A.L. Gardener (Eds.). Texas Tech. Univ. Press, Lubbock,

Texas. 289-316.

Bhatnagar, K.P., Matulionis, D.H. & Breipohl, W. (1982).
Fine structure of the vomeronasal neuroepithelium of bats:
A comparative study. *Acta Anat.* 112, 158-177.

Blass, E.M., Hall, W.G. & Teicher, M. (1979). The ontogeny
of suckling and ingestive behaviors. *Progress in psychobiology and physiological psychology*. J.M. Sprague, &
A.N. Epstein (Eds.). Vol. 8. Academic Press, New York.

Björnsen-Møller, F. (1975). Demonstration of terminalis,
olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat
nasal septum. *J. Comp. Neurol.* 159, 245-256.

Bradley, O.C. (1947). The topographical anatomy of the
head and neck of the horse. 2nd. Ed. Green, Edinburgh.

Bradley, R.M., Cheal, M.L. & Kim, Y.H. (1980). Quantitative
analysis of developing epiglottal taste buds in sheep. *J. Anat.* 130 (1), 25-32.

Breipohl, W. (1979). Developmental studies on the rat vomero-
nasal organ. 5th Eur. Cong. Anat. Prag. 1979, 47.

Breipohl, W., Bhatnagar, K.P. & Mendoza, A. (1979). Fine

structure of the receptor-free epithelium in the vomero-nasal organ of the rat. Cell Tissue Res. 200, 383-395.

Breipohl, W., Bhatnagar, K.P., Blank, M. & Mendoza, A.S. (1981). Intraepithelial blood vessels in the vomero-nasal neuroepithelium of the rat. A light and electron microscopic study. Cell Tissue Res. 215, 465-473.

Broom, R. (1895). On the organ of Jacobson in an australian bat (Miniopterus). Proc. Linn. Soc. N.S.W., 2nd. ser., vol.10.

(1896). Observations on the relations of the organ of Jacobson in the horse. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 21, 9-13.

(1897). A contribution to the comparative anatomy of the mammalian organ of Jacobson. Trans. R. Soc. Edimb. 39 (1), 231-255.

Bronson, F.H. & Maruniak, J.A. (1976). Differential effects of male stimuli on FSH, LH and prolactin secretion in pre-pubertal female mice. Endocrinology. 98, 1101-1108.

Browman, L.G. (1937). Light in its relation to activity and estrous rhythms in the albino rat. J. Exp. Zool. 75 (3), 375-388.

Brown-Grant, K., Davidson, J.M. & Greig, F. (1973). Induced ovulation in albino rats exposed to constant light. *J. Endocr.* 57, 7-22.

Brown-Grant, K. (1974). The role of the retina in the failure of ovulation in female rats exposed to constant light. *Neuroendocrinology.* 16, 243-254.

Brown-Grant, K. & Ostberg, A.J.C. (1974). Lack of effect of pineal denervation on the responses of the female albino rat to exposure to constant light. *J. Endocr.* 62, 45-50.

Bruce, H.M. (1959). An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature (London).* 4680, 105.

Bruner, A.L. (1914). Jacobson's Organ and the Respiratory Mechanism of Amphibians. *Morphol. Jahrb., Leipzig.* 48, 157-165.

Burghardt, G.M. (1970). Chemical perception in reptiles. Communication by chemical signals. J.W. Johnston, D.G. Moulton & A. Turk (Eds.). *Appleton Century Crofts, New York.* 241-308.

Campbell, C.S. & Schwartz, N.B. (1980). The impact of constant light on the estrous cycle of the rat.

Endocrinology. 106 (4), 1230-1238.

Ciges, M., Labella, T., Gayoso, M. & Sánchez, G. (1977).
Ultrastructure of the organ of Jacobson and comparative
study with olfactory mucosa. Acta Otolaryngol. 83, 47-58.

Cleaton Jones, P. (1976). A denervation study of taste buds
in the soft palate of the albino rat. Arch. Oral Biol.
21, 79-82.

Cooper, J.G. & Bhatnagar, K.P. (1976). Comparative anatomy
of the vomeronasal organ complex in bats. J. Anat. 122,
571-601.

Cuschieri, A. (1974). Enzyme histochemistry of the
olfactory mucosa and vomeronasal organ in the mouse. J.
Anat. 118, 477-489.

Cuschieri, A. & Bannister, L.H. (1975 a). The development
of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy.
J. Anat. 119 (2), 277-286.

(1975 b). The development
of olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. J.
Anat. 119, 471-498.

- Chiocchio, S.R., Chafuen, S. & Tramezzani, J.H. (1980).
Changes in adenohypophysial dopamine related to prolactin
release. *Endocrinology*. 106 (6), 1682-1685.
- Daane, T.A. & Parlow, A.F. (1971). Serum FSH and LH in
constant light induced persistent estrus: Short term and
long term studies. *Endocrinology*. 88, 964-968.
- Dagg, A.I. & Taub, A. (1970). Flehmen. *Mammalia*. 34 (4),
686-695.
- Davidson, J.M., Smith, E.R. & Bowers, C.V. (1973). Effects
of mating on gonadotropin release in the female rat.
Endocrinology. 93 (5), 1185-1192.
- Dellmann, H.D., Blin, P.C. & Fahmy, M.F.A. (1968).
Contribution à l'étude de l'anatomie microscopique du
tube digestif chez le Chameau. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays
trop.* 21, 1-32.
- Dempsey, E.W. & Searles, H.F. (1943). Environmental
modification of certain endocrine phenomena. *Endocrinology*
32, 119-128.
- Demski, L.S. & Northcutt, R.G. (1983). The terminal nerve:
a new chemosensory system in vertebrates. *Science*. 220,

435-437.

De Olmos, J., Hardy, H. & Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.* 181, 213-244.

Dodson, H.C. & Bannister, L.H. (1980). Structural aspects of ageing in the olfactory and vomeronasal epithelia in mice. *Proc. of the Seventh International Symposium on olfaction and taste*. H. van der Starre (Ed.). I R L Press, London. 151-154.

Eccles, R. (1982). Autonomic innervation of the vomeronasal organ of the cat. *Physiol. & Behav.* 28, 1011-1015.

Estes, R.D. (1972). The role of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia*. 36, 315-341.

Everett, J.W. (1964). Neural control of adenohipophysis. *Physiol. Rev.* 44, 373-431.

(1972). The third Annual Carl. G. Hartman lecture. Brain, Pituitary Gland and the ovarian cycle. *Biol. Reprod.* 6, 3-12.

Farbman, A.I. (1965 a) Electron microscope study of the developing taste bud in rat fungiform papilla. Dev. Biol. 11, 110-135.

(1965 b) Fine structure of the taste bud. J. Ultrastruct. Res. 12, 328-350.

(1967). Structure of chemoreceptors. Symposium on foods, chemistry and physiology of flavors. Westport. Avi. Publ., Co. 25-51.

Fährmann, W, Hoffman, G. & Schuchardt, E. (1965). Die Zellen der Geschmacksknospe und der Zellersatz. Naturwissenschaften. 52, 438.

Fenú, G. (1959). Sulla persistenza dell'organo vomeronasale nell'uomo. Rass. Med. Sarda. 61 (5), 623-630.

Ferrell, M.F., Mistretta, C.M. & Bradley, R.M. (1981). Chorda tympani taste responses during development in the rat. J. Comp. Neurol. 198, 37-44.

Fiske, V.M. (1941). Effect of light on sexual maturation, estrous cycle, and anterior pituitary of the rat. Endocrinology. 29, 187-196.

- Fleming, A. & Rosenblatt, J. (1974). Olfactory regulation of maternal behaviour in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and unexperienced lactating and cycling females. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 221-232.
- Fleming, A., Vaccarino, F., Tambosso, L. & Chee, P. (1979). Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Science.* 209, 372-374.
- Fleming, A.S., Miceli, M. & Moretto, D. (1983). Lesions of the medial preoptic area prevent the facilitation of maternal behavior produced by amygdala lesions. *Physiol. & Behav.* 31, 503-510.
- Gabe, M. & Saint Girons, H. (1976). Contribution a la morphologie comparee des fosses nasales et de leurs annexes chez les lepidosoriens. *Mémoires du Museum National D'Histoire Naturelle. Serie A.* 98, 1-87.
- Gabrieli, O.F. (1967). Persistent vomeronasal organ. *Am. J. Roentgenol. Radiumther.* 99 (3), 697-699.
- Ganin, M. (1890). Einige Thatsachen zur Frage über Jacobson'schen organ des Vögel. *Zool. Anz. Jahrb.* 13, 336.
- Gaupp: (1896-1904). *Anatomie des Frosches.* 3 vol.

Braunschweig.

Gegenbauer, C. (1886). Über das Rudiment einer septalen Nasedrüse beim Menschen. *Morph. Jahrb.* 11, 3. 486.

Gesteland, R.C., Yancey, R.A. & Farbman, A.I. (1982). Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat fetus. *Neuroscience*. 7 (12), 3127-3136.

Gottlieb, G. (1971). Ontogenesis of sensory function in birds and mammals. *The biopsychology of development.* E. Tabach, L.R. & E. Shaw (Eds.). Academic Press, New York. 67-128.

Gray, E.G. & Watkins, K.C. (1965). Electron microscopy of taste buds of the rat. *Z. Zellforsch.* 66, 583-595.

Graziadei, P.P.C. & Tucker, D. (1970). Vomeronasal receptors in turtles. *Z. Zellforsch.* 105, 498-514.

Graziadei, P.P.C. (1977). Functional anatomy of the mammalian chemoreceptor system. *Chemical signals in vertebrates.* D. Müller-Schwarze & M.M. Mozell (Eds.). Plenum Press, New York. 435-454.

Graziadei, P.P.C. & Monti-Graziadei, G.A. (1978).

Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. Handbook of sensory physiology IX. Development of sensory systems. M. Jacobson (Ed.). Springer, Berlin-Heidelberg, New York. 55-83.

Greer, C.A., Stewart, W.B., Teicher, M.H. & Shepherd, G.M. (1982). Functional development of the olfactory bulb and a unique glomerular complex in the neonatal rat. J. Neuroscience. 2 (12), 1744-1759.

Guth, L. (1971). Degeneration and regeneration of taste buds. Handbook of sensory physiology. IV. Chemical senses (Parte 2), Taste. L.M. Beidler (Ed.). Springer Verlag, Berlin. 63-73.

Hagino, N., Sako, T., Nakamoto, O. & Saito, H. (1983). Prevention of continuous light-induced anovulation in rats by early exposure to continuous light. Biol. Reprod. 29, 355-361.

Hall, W.G. & Bryan, T.E. (1981). The ontogeny of feeding in rats: IV. Taste development as measured by intake and behavioral responses to oral infusions of sucrose and quinine. J. Comp. Physiol. Psychol. 95 (2), 240-251.

- Halpern, M. & Kubie, J.L. (1980). Chemical access to the vomeronasal organs of garter snakes. *Physiol. & Behav.* 24, 367-371.
- Hardy, D.F. (1970). The effect of constant light on the estrous cycle and behavior of the female rat. *Physiol. & Behav.* 5, 421-425.
- Harvey, R. (1882). Note on the organ of Jacobson. *Q.J.M.S.* 50-52.
- Heller, S.B. & Halpern, M. (1982). Laboratory observations of aggregative behavior of garter snakes, Thamnophis sirtalis: roles of the visual, olfactory, and vomeronasal senses. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96, 984-999.
- Hendrickson, A.E., Wagoner, N. & Cowan, W.M. (1972). An autoradiographic and electron microscopic-study of retino-hypothalamic connections. *Z. Zellforsch.* 135, 1-26.
- Herzfeld. P. (1888). Ueber das Jacobson'sche organ des Menschen und der Saugerthiere. *Zool. Jahr.* 3, 551-574.
- Hill, D.L. & Almlie, C.R. (1980). Ontogeny of chorda tympani nerve responses to gustatory stimuli in the rat. *Brain Res.* 197, 27-38.

Hinds, J.W. (1968). Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I Time of origin of neurons and neuroglia. J. Comp. Neurol. 134, 287-304.

Hofer, H.O. (1977). The anatomical relation of the Ductus vomeronalis and the occurrence of taste buds in the papilla palatina of Nycticebus coucang (Primates, Prosimiae) with remarks on stepsirrhinism. Gegenbauns. morphol. Jahrb., Leipzig. 123 (6, S), 836-856.

(1980). Further observations on the occurrence of taste buds in the papilla palatina of Primates. Gegenbauns. morphol. Jahrb., Leipzig. 126 (1, S), 110-117.

Hoffman, G. (1965). Elektron mikroskopische Untersuchungen an den Geschmacksknospen der Pilzpapillen beider Maus. Dissertation. Göttingen.

Hoffmann, J.C. (1967). Effects of light deprivation on the rat estrus cycle. Neuroendocrinology. 2, 1-10.

(1970). Light and reproduction in the rat: effects of photoperiod length on albino rats from two different breeders. Biol. Reprod. 2, 255-261.

(1973). The influence of photoperiods on

reproductive functions in female mammals. Handbook of Physiology. Vol. 2. R.O. Greep (Ed.). Waverly Press, Baltimore. 57-78.

Hunter, A.J., Fleming, D. & Dixson, A.F. (1984). The structure of the vomeronasal organ and nasopalatine ducts in Aoutus trivirgatus and some other primate species. J. Anat. 138 (2), 217-225.

Iwayama, T. (1968). Electron microscopic observation on ATPase activity of taste buds. J. Electr. Micr. 17, 269.

Jacobson, L. (1811). Description anatomique d'un organe observé dans les mammiferes. Ann. Mus. d'Hist. Nat., Paris. 18, 412-424.

Johns, M.A., Feder, H.H., Komisaruk, B. & Mayer, A.D. (1978). Urine induced reflex ovulation in anovulatory rats may be a vomeronasal effect. Nature. 272, 446-448.

Johns, M.A., Feder, H.H. & Komisaruk B.R. (1980). Reflex ovulation in light induced persistent estrus (LLPE) rats. Role of sensory stimuli and the adrenals. Horm. Behav. 14, 7-19.

Jordan, J. (1972). The vomeronasal organ (of Jacobson) of

primates. Folia Morphol. (Warz). 31, 418-432.

(1973). Narząd Lemieszowo-Nosowy (Jacobsona) u Człowieka. Otolaryngol. Pol. 27 (1), 93-100.

Kaneko, N., Debski, E.A.; Wilson, M.C. & Whitten, W.K.

(1980). Puberty acceleration in mice. Evidence that the vomeronasal organ is a receptor for the primer pheromone in male mouse urine. Biol. Reprod. 22, 873-878 .

Kaplick, M. (1953). Über Vorkommen, Verteilung und Histologische Beziehungen der Geschmacksknospen am Munddach uniger Sanger, besonders der Nagetier. Z. Zellforsch. 38, 571-590.

Kauer, J.S. & Moulton, D.G. (1970). Ultrastructure of vomeronasal and olfactory sensory epithelia in the rat and rabbit. Fed. Proc. 129, 251.

Keverne, E.B. (1983). Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. Trends Neurosci. 9, 381-384.

Klein, E. (1881). The organ of Jacobson in the rabbit. Quart. J. Micr. Sci. Vol. 21, 549-570.

(1882). The organ de Jacobson in the dog. Quart.

J. Micr. Sci., vol. 22, 299-310.

Koiter, T.R., van der Gugten, A.A., Pols-Valkhof, N., van Eekeren, J. & Schuiling, G.A. (1982). Pattern of prolactin secretion and pituitary responsiveness to LRH in pseudo-pregnant rats maintained in constant light. Acta Endocrinol. 99. 31-38.

Kölliker, A. (1877). Über die Jacobson'schen Organe des Menschen. Rinecker, F. Festschrift, Leipzig. 4, 1-12.

(1882). Der Lobus olfactorius und die Nervi olfactorii bei jungen menschlichen Embryonen. Sitzungsber. d. phys. med. Gesellschaft, Würzburg. 5, 68-72.

(1896). Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Bd. 3. W. Engelmann, Leipzig.

Kolmer, W. (1927). Über Vorkommen von Geschmacksknospen im Ductus Nasopalatinus der Ratte. Anat. Anz. 63, 248-251.

Kolnberger, I. (1971 a). Vergleichende Untersuchungen am Riechepithel insbesondere des Jacobsonschen Organ von Amphibien, Reptilien und Säugetieren. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 122, 53-67.

(1971b). Über die Zugänglichkeit des Interzellularraums und Zellkontakte im Riechepithel des Jacobson'schen Organs. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 122, 546-573.

Kolnberger, I. & Altner, H. (1971). Ciliary-structure precursor bodies as stable constituents in the sensory cells of vomero-nasal organ of reptiles and mammals. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 118, 254-262.

Kratzing, J. (1971a). The structure of the vomeronasal organ in the sheep. J. Anat. 108 (2), 247-260.

(1971b). The fine structure of the sensory epithelium of the vomeronasal organ in suckling rats. Aust. J. Biol. Sci. 24, 787-796.

(1980). Unusual features of the vomeronasal organ of young pigs. J. Anat. 130 (1), 213.

Ladewig, J. & Hart, B.L. (1980). Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. Physiol. & Behav. 24, 1067-1071.

Ladewig, J., Price, E.O. & Hart, B.L. (1980). Flehmen in male goats: role in sexual behavior. Behav. Neural Biol. 30, 312-322.

- Lambert, H.H. (1975). Intensity of continuous light: Threshold lower for persistent estrus than for retinal degeneration. *Biol. Reprod.* 13, 576-580.
- Lawton, I.E. & Schwartz, N.B. (1967). Pituitary-ovarian function in rats exposed to constant light: A chronological study. *Endocrinology.* 81, 497-508.
- Lawton, I.E. (1972). Facilitatory feedback effects of adrenal and ovarian hormones on LH secretion. *Endocrinology.* 90, 575-579.
- Lehman, M.N., Powers, J.B. & Winans, S.S. (1983). Stria terminalis lesions alter the temporal pattern of copulatory behavior in the male golden hamster. *Behav. Brain Res.* 8, 109-128.
- Lenhossèk, M.V. (1892). Die Nervenursprünge u. Endig. im Jacobson'schen organ des Kaninchen. *Anat. Anz.* 7, 628-635.
- Leonard, C.M. (1975). Developmental changes in olfactory bulb projections revealed by degeneration argyrophilia. *J. Comp. Neurol.* 162, 467-486.
- Lindsay, F.E.F.; Clayton, H.M. & Pirie, M.E.S. (1978). The vomeronasal organ of the horse and donkey. *J. Anat.* 127 (3), 655.

Lloyd-Thomas, A. & Keverne, E.B. (1982). The role of the brain and accessory olfactory system in the block of pregnancy in mice. *Neuroscience*. 7 (4), 907-913.

Mc.Cormack, C.E. & Sridaran, R. (1978). Timing of ovulation in rats during exposure to continuous light: Evidence for a circadian rhythm of luteinizing hormone secretion. *J. Endocr.* 76, 135-144.

Mc. Cotter, R.E. (1912). The connection of the vomero-nasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other mammals. *Anat. Rec.* 6 (8), 299-318.

(1915). A note on the course and distribution of the nervus terminalis in man. *Anat. Rec.* 9, 243-246.

(1917). The vomero-nasal apparatus in Chrysemys punctata and Rana catesbiana. *Anat. Rec.* 13, 51-67.

Maier, W. (1980). Nasal structures in Old and New World primates. *Evolutionary biology of the new World Monkeys and Continental Drifts*. R.L. Ciochon & A.B. Chiarelli (Eds.). Plenum Press, New York. 219-241.

Mair, R.G., Gellman, R.L. & Gesteland, R.C. (1982). Post-

natal proliferation and maturation of olfactory bulb neurons in the rat. *Neuroscience*. 7 (12), 3105-3116.

Mendoza, A.S. & Breipohl, W. (1983). The cell coat of the olfactory epithelium proper and vomeronasal neuroepithelium of the rat as revealed by means of the Ruthenium-red reaction. *Cell Tissue Res.* 230, 139-146.

Meredith, M., Marques, D.M., O'Connell, R.J. & Stern, F.L. (1980). Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science*. 207 (4436), 1224-1226.

Meredith, M. (1982). Stimulus access and other processes involved in nasal chemosensory function: potential substrates for neuronal and hormonal influence. *Olfaction and Endocrine Regulation*. W. Breipohl (Ed.). IRL Press, London. 223-236.

Mihalkovics, V. von (1898). Nasenhöhle und Jacobson'sches Organ. *Anat. Hefte*. 11, 3-107.

Miller, R.L. & Chaudhry, A.P. (1976). Comparative ultrastructure of vallate, foliate and fungiform taste buds of golden syrian hamster. *Acta Anat.* 95, 75-92.

Miller, I.J. (1977). Gustatory receptors of the palate.

Food Intake and Chemical senses. Y. Katsuki, M. Sato, S.F. Takagi & Y. Oomura (Eds). University of Tokyo Press, Tokyo. 173-185.

Miller, I.J. & Spangler, K.M. (1982). Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat. Chem. Senses. 7, 99-108.

Millonig, G. (1961). Advantages of phosphate buffer for O_2 solutions in fixation. J. Appl. Physiol. 32: 1637.

Miragall, F., Mendoza, A.S. & Breipohl, W. (1982). Intercellular junctions of the main and vomeronasal olfactory sensory epithelia in rodents. A freeze fracture study. Verh. Anat. Ges. 77.

Miragall, F. & Mendoza, A.S. (1982). Intercellular junctions in the rat vomeronasal neuroepithelium. A freeze fracture study. J. Submicrosc. Cytol. 14 (4), 597-605.

Mistretta, C.M. (1972). Topographical and histological study of the developing rat tongue, palate and taste buds. Third Symposium on oral sensation and perception: The mouth of the infant. J.F. Bosma (Ed.). Springfield III: Charles Thomas, 163-187.

(1981). Neurophysiological and Anatomical aspects of taste development. Development of perception. Vol. 1. Academic Press, New York. 433-455.

Monteiro, L.S. & Falconer, D.S. (1966). Compensatory growth and sexual maturity in mice. Anim. Prod. 8, 179-192.

Moore, R.Y. & Lenn, N.Y. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. J. Comp. Neurol. 146, 1-14.

Moore, R.Y. (1973). Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. Brain Res. 49, 403-409.

Murray, R.G. & Murray, A. (1967). Fine structure of taste buds of rabbit foliate papillae. J. Ultrastruct. Res. 19, 327-353.

(1969). Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. J. Ultrastruct. Res. 27, 444-461.

Murray, R.G., Murray, A. & Fujimoto, S. (1969). Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. J. Ultrastruct. Res. 27, 444-461.

- Murray, R.G. (1971). Ultrastructure of taste receptors. Handbook of sensory physiology. IV. Chemical Senses. (Parte 2), Taste. L.M. Beidler (Ed.). Springer-Verlag, Berlin. 31-60..
- Murray, R.G., Murray, A. & Hellekant, G. (1972). Fine structure of taste buds of rat fungiform papillae. Proceedings of the Fourth International Symposium on olfaction and taste. D. Schneider (Ed). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH. 56-67.
- Nada, O. & Hirata, K. (1977). The monoamine-containing cell in the gustatory epithelium of some vertebrates. Arch. histol. Jap. 40, (Suppl.) 197-206.
- Nagy, J.I., Goedert, H., Hunt, S.P. & Bond, A. (1982). The nature of the substance P-containing nerve fibers in taste papillae of the rat tongue. Neuroscience. 7 (12), 3137-3151.
- Naftolin, F., Brown-Grant, K. & Corker, C.S. (1972). Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrus cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. J. Endocr. 53, 17-30.

- Naguro, T. & Breipohl, W. (1982). The vomeronasal epithelia of NMRI mouse. A scanning electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 227, 519-534.
- Negus, V.E. (1958). *Comparative Anatomy of the nose and paranasal sinuses.* E.& S. Livinstone Ltd., Edingburgh and London.
- Nemours, (1930). Studies on the accessory nasal sinuses. The comparative morphology of the nasal cavities of reptiles and birds. *Ann. Otol., Rhinol & Laryngol.* 39, 1086-1100.
- Nickel, B., Schummer, A. & Seiferle, E. (1960). *Lerbuch der Anatomie der Haustiere.* Vol. 2. Parey. Berlin-Hamburg.
- Olmstead, J.M.D. (1921). Effect of cutting the lingual nerve of the dog. *J. Comp. Neurol.* 33, 149-154.
- Paran, N., Mattern, C.F. & Henkin, R.I. (1975). Ultra-structure of the taste bud of the human fungiform papilla. *Cell Tissue Res.* 161, 1-10.
- Parker, G.H. (1922). *Smell, Taste and allied Senses in the Vertebrates.* Lippincott. Philadelphia.

Parsons, T.S. (1967). Evolution of the nasal structure in the lower tetrapods. *Am. Zool.* 7 (3), 397, 413.

Pedersen, P.E., Stewart, W.B., Greer, C.A. & Shepherd, G.M. (1983). Evidence for olfactory function in utero. *Science.* 221 (4609), 478-480.

Peter, K. (1925). *Vergleichende Anatomie un Entwicklungsgeschichte der Nase und thren Nebenhöhlen.* Denker-Kahler Handbuch der Hals-,Nasen-,u. Ohrenheilkunde. Springer, J. Berlin. 1-95.

Pirlot, P. (1976). *Morfología evolutiva de los cordados.* Ed. Omega, Barcelona.

Potiquet, D. 1891. Le canal de Jacobson. *Rev. de Laryngol,* Paris. 12, 737-753.

Powers, J.B. & Winams, S.S. (1975). Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* 187, 961-963.

Powers, J.B., Fields, R.B. & Winans, S.S. (1979). Olfactory

and vomeronasal system participation in male hamster's attraction to female vaginal secretions. *Physiol. Behav.* 22, 77-84.

Raisman, G. (1972). An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. *Exp. Brain Res.* 14, 395-405.

Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate as high pH electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.

Reynolds, J. & Keverne, E.B. (1979). The accessory olfactory system and its role in the pheromonally mediated suppression of oestrus in grouped mice. *J. Reprod. Fertil.* 57, 31-35.

Rhein, L.D. & Cagan, R.H. (1980). Isolation, Biochemical characterization and odorant binding of Cilia. Second Annual Meeting ACHEMS, Sarasota, Florida. 30.

Richter, H. (1932). Ein Beitrag zur Frage des Vorhandenseins des Jacobson'schen Organ beim Menschen und zur Histologie seiner naheren umgebung. *Fol. Otolaryngol.* Vol. 22.

- Röse, C. (1893). Ueber das rudim. Jacobson'sche Organ der Crocodile und des Menschen. Anat. Anz. 8 (16), 766-768.
- Ruysch, F. (1703). Thesaurus anatomicus III. Amsterdam Wolters.
- Sánchez Criado, J.E. (1982). Involvement of the vomeronasal system in the reproductive physiology of the rat. Olfaction and Endocrine Regulation. W. Breipohl (Ed). IRL Press, London, 209-222.
- Scalzi, H. (1967). The cytoarchitecture of gustatory receptors from the rabbit papillae. Z. Zellforsch. 80, 413-435.
- Schilling, A. (1970). L'organe de Jacobson du lémurien malgache Microcebus murinus (Miller 1977). Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle. Série A, Zool. 61, 203-280.
- Schwanzel-Fukuda, M. & Silverman, A.J. (1980). The nervus terminalis of the guinea-pig: A new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal system. J. Comp. Neurol. 191, 213-225.
- Segovia, S. & Guillamón, A. (1982). Effects of sex steroids

on the development of the vomeronasal organ in the rat.
Dev. Brain Res. 5, 209-212.

Seifert, K. (1971). Licht und elektronenmikroskopische
Untersuchungen am Jacobsonschen Organ (Organon vomero-
nasale) der Katze Arch. Klin exp. Ohren-Nasen. u. Kehlk.
Heilk. 200, 223-251.

Seydel, O. (1895). Ueber die Nasenhöhle und das Jacobson'sche
Organ der Amphibien. Morph. Jahrb. Bd. XXIII, 453.

(1896). Über die Nasenhöhle und das Jacobson'sche
Organ der Land- und Sumpfschildkröte. Festsch. zum
70sten Geburtstage von C. Gegenbaur Vol. 2. Leipzig,
W. Engelmann (Ed.).

Simonetta, B. (1932). Origine e sviluppo del nervo
terminale nei mammiferi. Sua funzione e i suoi rapporti
con l'organo di Jacobson. Z. Anat. Entw.-gesch. 97,
425-463.

Sisson, S. (1967). The anatomy of the domestic animals.
4th Ed. Saunders-London.

Sluiter, C.P. (1892). Das Jacobson'sche Organ von
Crocodylus porosus. Anat. Anz. 7, 540-545.

Smith, C.C. (1935). The change in volume of the olfactory and accessory olfactory bulbs of the albino rat during postnatal life. *J. Comp. Neurol.* 61, 447-508.

Stannius: (1854). *Handb. d. Anatomie der Wirbeltiere*, Berlin.

Stark, D. (1975). The development of the chondrocranium in primates. *Phylogeny of Primates*. W.P. Luckett & F.S. Szalay (Eds). Plenum Press, New York. 127-155.

Takeo, Y. (1984). Influence of continuous illumination on estrous cycle of rats: Time course of changes in levels of gonadotropins and ovarian steroids until occurrence of persistent estrus. *Neuroendocrinology*. 39 (2), 97-104.

Taniguchi, K. & Mochizuki, K. (1892). Morphological studies on the vomeronasal organ in the golden hamster. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44(3), 419-426.

Taniguchi, K., Taniguchi, K. & Mochizuki, K. (1982 a). Comparative developmental studies on the fine structure of the vomeronasal sensory and the olfactory epithelia in the golden hamster. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44 (6), 881-890.

(1982 b).

Developmental studies on the vomeronasal organ in the golden hamster. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44, 709-716.

Teicher, M.H., Shaywitz, B.A. & Lumia, A.R. (1984).

Olfactory and vomeronasal system mediation of maternal recognition in the developing rat. *Dev. Brain Res.* 12, 97-110.

Uga, S. (1969). A study on the cytoarchitecture of taste buds of rat circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jap.* 31, 59-72.

Vaccarezza, O.L., Reguero, M., Berra, M. & Tramezzani, J.H.

(1979). Techniques for the lesion of the vomeronasal organ in the rat. *Acta Physiol. Latinoam.* 29, 95-99.

Vaccarezza, O.L., Sepich, L.N. & Tramezzani, J.H. (1981).

The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.* 132 (2), 167-185.

Vaticon, M.D., Fernández-Galaz, C., Esquifino, A., Tejno,

A. & Aguilar, E. (1980). Effects of constant light on prolactin secretion in adult female rats. *Hormone Res.* 12, 277-288.

Wang, R.T. & Halpern, M. (1980). Light and electron microscopic observations on the normal structure of the vomeronasal organ of garter snakes. *J. Morphol.* 164, 47-67.

Watts, A.G. & Fink, G. (1981). Constant light blocks diurnal but not pulsatile release of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *J. Endocr.* 89, 141-146.

Weber, A.L. & Adler, N.T. (1979). Delay of constant light-induced persistent vaginal estrus by 24-hour time cues in rats. *Science.* 204, 323-325.

Winans, S.S. & Scalia, F. (1970). Amygdaloid nucleus. New afferent input from the vomeronasal organ. *Science.* 170, 330-332.

Wörhmann-Reppenning, A. (1980). The relationship between Jacobson's organ and the oral cavity in a Rodent. *Zool. Anz., Jena.* 204 5/6 (s), 391-399.

(1981). The embryological and early postnatal development of Jacobson's organ in relation to the nasopalatine duct in the rat. *Zool. Anz., Jena.* 206 (3/4), 203-214.

- Wurtman, R.J., Axelrod, J., Chu, E.W., Heller, A. & Moore, R.Y. (1967). Medial forebrain bundle lesions: blockade effects of light on rat gonads and pineal. *Endocrinology*. 81, 509-514.
- Wysocki, C.J. (1979). Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Neurosc. Behav. Rev.* 3 (4), 301-341.
- Wysocki, C.J., Wellington, J.L. & Beauchamp, G.K. (1980). Access of urinary non volatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science* 207, 781-783.
- Wysocki, C.J., Nyby, J., Whitney, G., Beauchamp, G.K. & Katz, Y. (1982). The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiol. Behav.* 29, 315-327.
- Wysocki, C.J., Katz, Y. & Bernhard, R. (1983). Male vomeronasal organ mediates female induced testosterone surges in mice. *Biol. Reprod.* 28, 917-922.
- Young, J.Z. (1962). *The life of Vertebrates*. Oxford Univ. Press, New York and Oxford.

Zahm, D.S. & Munger, B.L. (1983a). Fetal development of primate chemosensory corpuscles. I Synaptic relationships in late gestation. J. Comp. Neurol. 213, 146-162.

(1983b). Fetal development of primate chemosensory corpuscles. II Synaptic relationships in early gestation. J. Comp. Neurol. 219, 36-50.

Zalewski, A.A. (1981). Regeneration of taste buds after reinnervation of a denervated tongue papilla by a normally nongustatory nerve. J. Comp. Neurol. 200, 309-314.

Zuckerkindl, E. (1910). Über die Wechselbeziehung in der Ausbildung des Jacobson'schen Organs und des Riechlappens nebst Bemerkungen über das Jacobson'sche organ der Amphibien. Anat. Heft. Wiesb. 41, 1-73.

ICONOGRAFIA

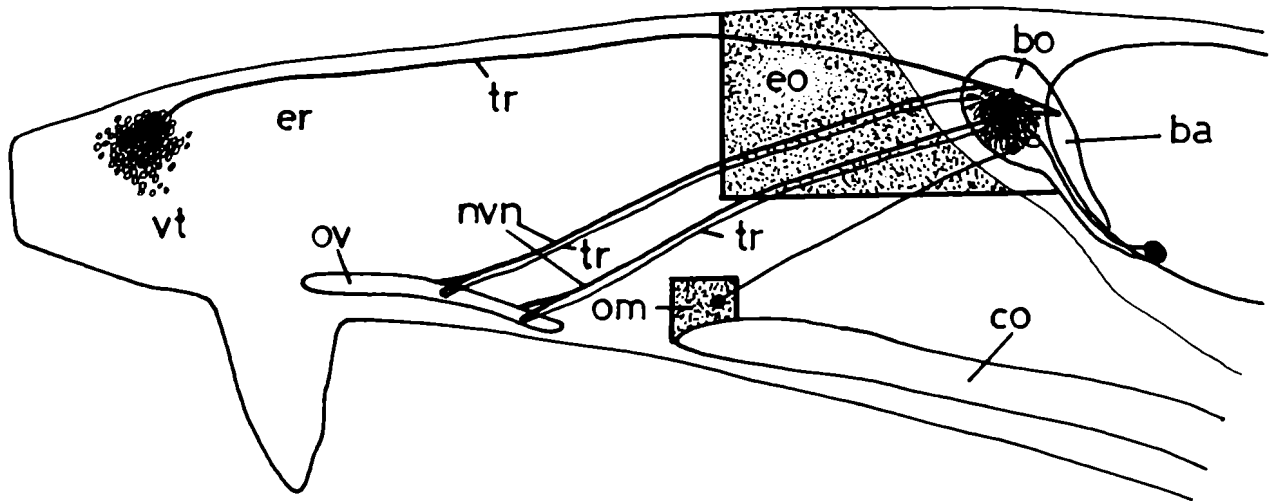
- 1885 -
v. 2
g. 2

•

Figura 1: Esquema de la fosa nasal de la rata donde se observan los sistemas sensoriales allí ubicados.

Abreviaturas: ba, bulbo olfatorio accesorio; bo, bulbo olfatorio principal; co, coana; eo, epitelio olfatorio; er, epitelio respiratorio; nvn, nervio vomeronasal; tr, rama del nervio terminal; vt, ganglio vestibular.

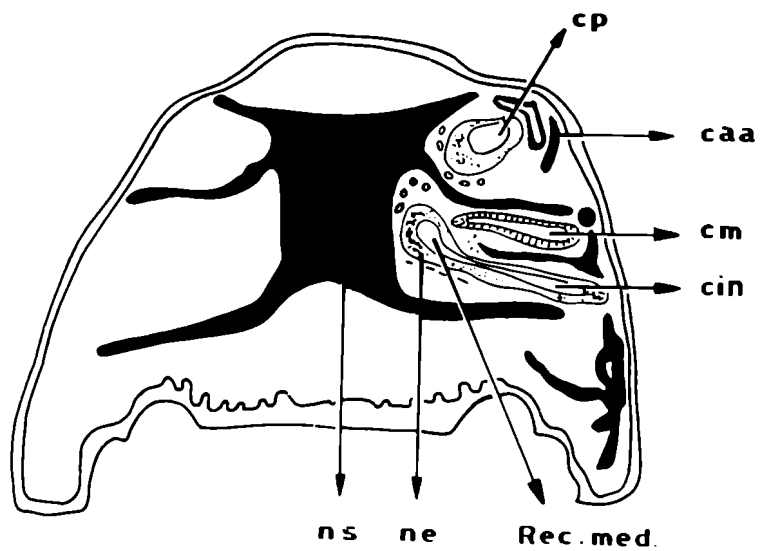
101489



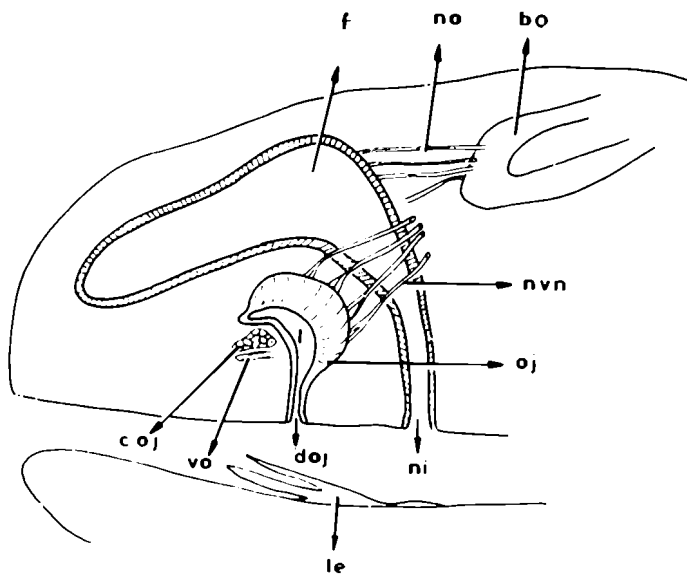
VO-1301

Figura 2: A. Esquema de las fosas nasales de un anfibio anuro, donde puede observarse la ubicación del neuroepitelio del órgano de Jacobson (adaptado de Gaupp, 1904). B. Esquema de la fosa nasal de un ofidio. El órgano de Jacobson se comunica sólo con la cavidad oral (adaptado de Pirlot, 1976).

Abreviaturas: bo, bulbo olfatorio; caa, cartílago alar; cin, cavidad inferior; cm, cavidad medial; coj, cartílago del órgano de Jacobson; cp, cavidad principal; doj, ducto del órgano de Jacobson; f, fosa nasal; l, lumen; le, lengua; ne, neuroepitelio; ni, narina interna; no, nervio olfatorio; ns, septum nasal; nvn, nervio vomero-nasal; oj, órgano de Jacobson; Rec. med, receso mediano; vo, vomer.



A



B

Figura 3: Microfotografías del complejo vomeronasal de un feto de 16 días de gestación.

A: comunicación del órgano vomeronasal con la fosa nasal.

B: comunicación oro-nasal a través del conducto nasopalatino.

C: órgano vomeronasal donde se observan el neuroepitelio y el epitelio pseudoestratificado.

D: segmento medio del órgano (caudal a B). Las glándulas están ausentes en el complejo vomeronasal y a los lados del septum nasal.

Barra en A, B, D = 286 μm ; en C = 45 μm .

Abreviaturas: cr, comunicación del órgano vomeronasal con la fosa nasal; cv, cartílago vomeronasal; f, fosa nasal; l, lumen; le, lengua; ne, neuroepitelio vomeronasal; ns, septum nasal; pp, papila palatina; ps, epitelio pseudoestratificado; ov, órgano vomeronasal.

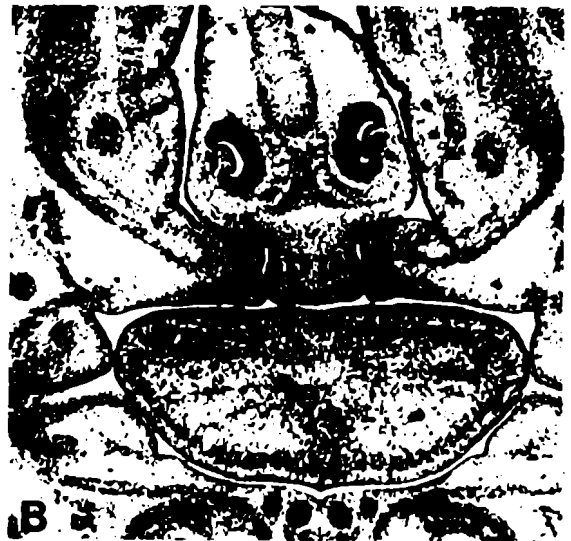
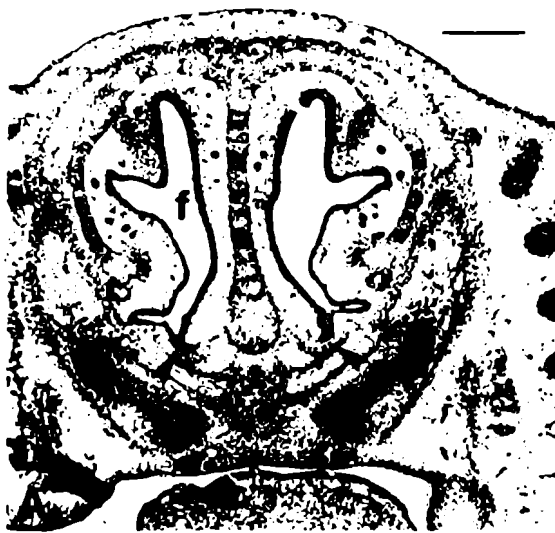


Figura 4: A: Microfotografía del complejo vomeronasal en una cría de 5 días de edad. Barra = 215 μm .

B, C, D : Neuroepitelio de crías de 5, 0 y 21 días de edad, respectivamente. Barra = 19.5 μm .

Abreviaturas: f, fosa nasal; l, lumen; ne, neuroepitelio vomeronasal; ns, septum nasal; ps, epitelio pseudoestratificado; r, célula receptora; s, célula sustentacular.



A



B



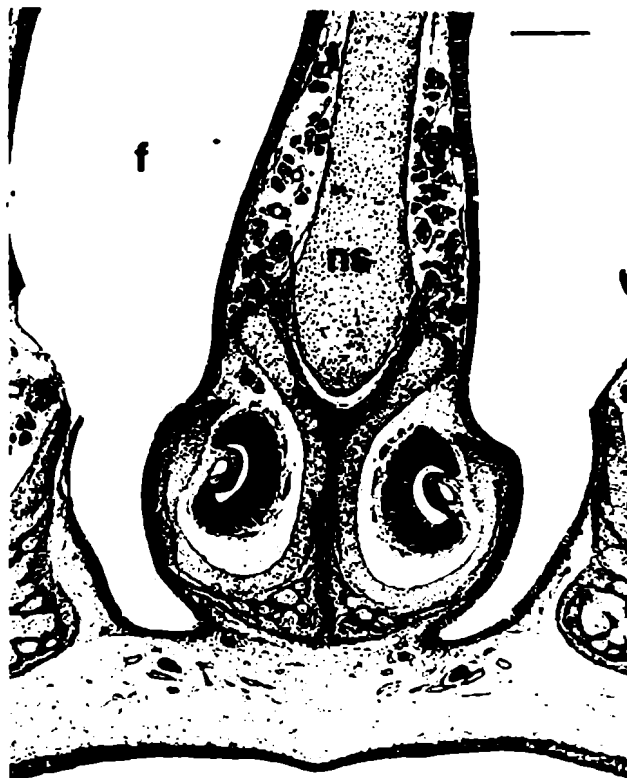
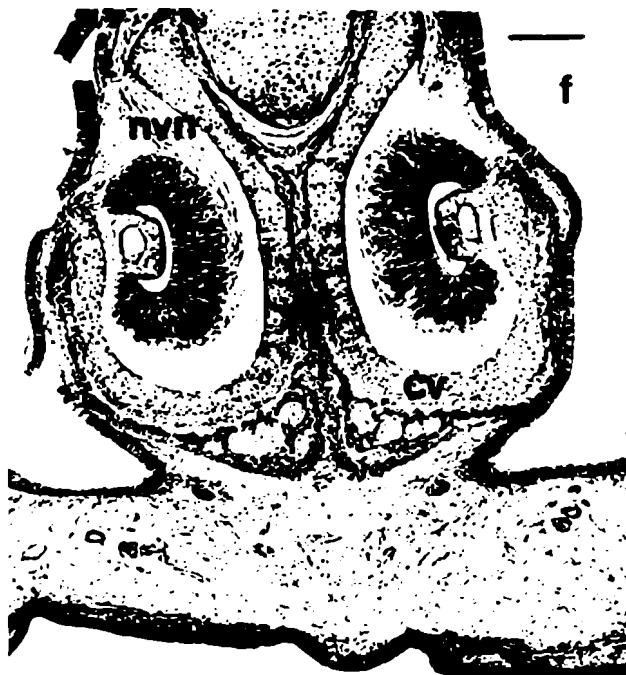
C



D

Figura 5: Microfotografías del segmento medio del complejo vomeronasal. Las glándulas vomeronasales están ausentes al nacimiento (A) y a los 2 días de edad (B). Aparecen a los 5 días (C) y su desarrollo es mayor a los 8 (D). Barra en A = 179 μm ; B y C = 286 μm ; D = 223 μm .

Abreviaturas: cv, cartílago vomeronasal; f, fosa nasal; gs, glándulas próximas al septum nasal; gv, glándulas vomeronasales; ns, septum nasal; nvn, nervio vomeronasal; or, cavidad oral; ov, órgano vomeronasal.



A

B



C

D

Figura 6: Microfotografías del epitelio pseudoestratificado del órgano vomeronasal. A: 0 día; B: 5 días; C: 21 días de edad. Barra = 19.5 μm .

Abreviaturas: c, célula clara; d, célula oscura; l, lumen.

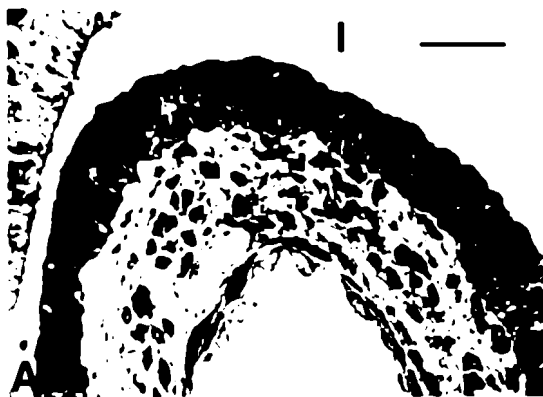


Figura 7: Porción próxima al lumen del neuroepitelio vomeronasal de un feto de 20 días de gestación. Microscopía electrónica de transmisión. Barra = 0.5 μm .

Abreviaturas: ci, cilio; l, lumen; r, célula receptora; s, célula sustentacular.

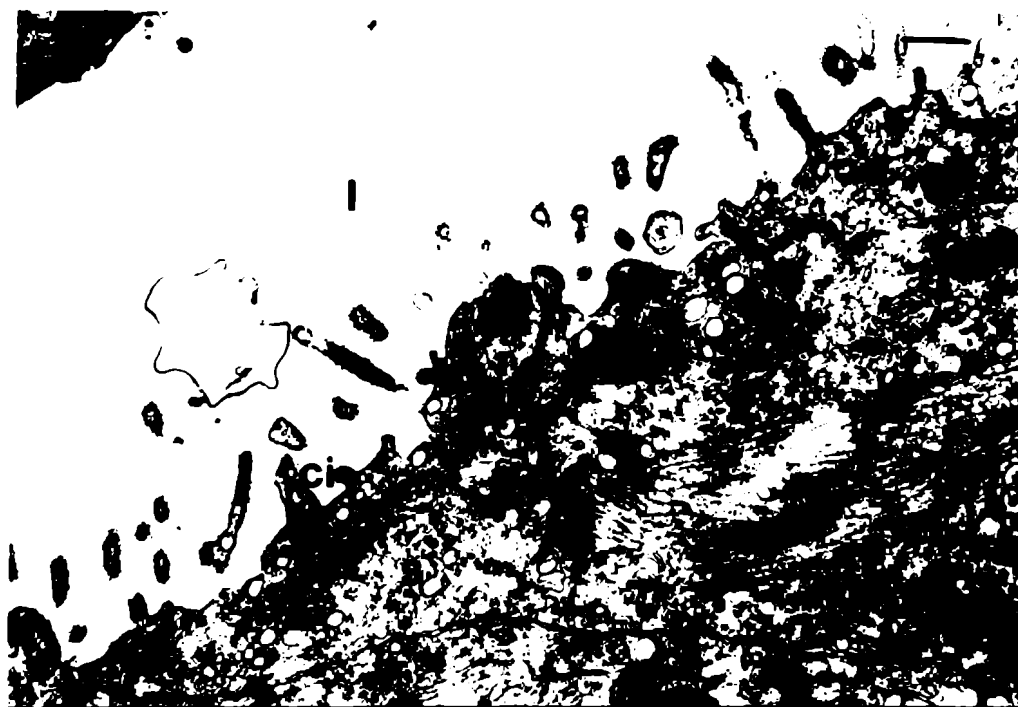


Figura 8: Microfotografía electrónica de transmisión.
Porción central del epitelio pseudoestratificado del ór
gano vomeronasal de una cría recién nacida. Barra = 1
 μm .

Abreviaturas: c, célula clara; d, célula oscura; l, lu-
men.



Figura 9: Microscopía electrónica de transmisión del neuroepitelio vomeronasal. Se observa un incremento en las microvellosidades entre el nacimiento (A) y los 21 días de edad (B). Barra en A y B = 1 μ m.

Presencia de cilios en las células receptoras al nacimiento (C) y en las sustentaculares hasta los 12 días de edad. Barra en C = 0.5 μ m; en D = 1 μ m.

Abreviaturas: ci, cilio; l, lumen; m, microvellosidades; p, proyección; r, célula receptora; s, célula sustentacular.



Figura 10: A: célula clara del epitelio seudoestratificado del órgano vomeronasal de una cría de 5 días de edad. Barra = 1 μm .

B: epitelio seudoestratificado a los 21 días de edad. Barra = 1,25 μm .

Abreviaturas : c, célula clara; ci, cilio; d, célula oscura; l, lumen.

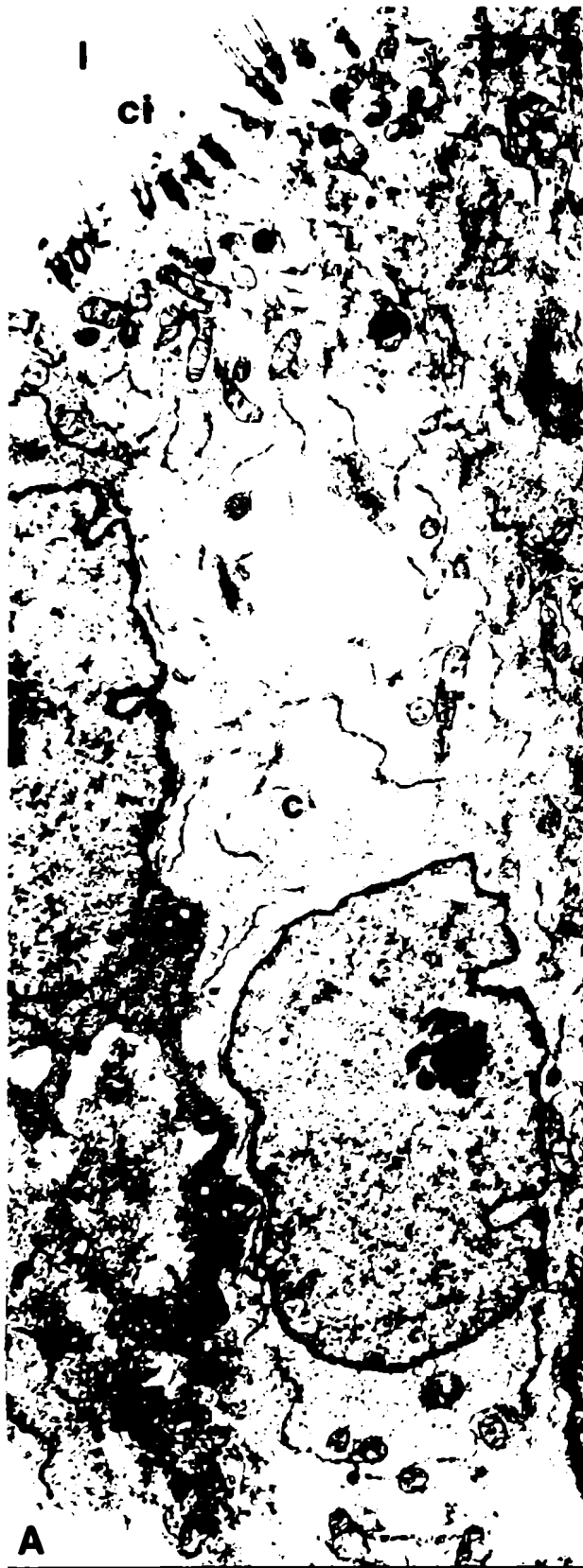


Figura 11: A: Neuroepitelio vomeronasal a los 5 días de edad. Porción próxima al lumen donde se observan una célula receptora con numerosos centríolos en el bulbo dendrítico y otra donde los centríolos migraron a la región posterior al cuello de la dendrita. Barra = 1 μ m.

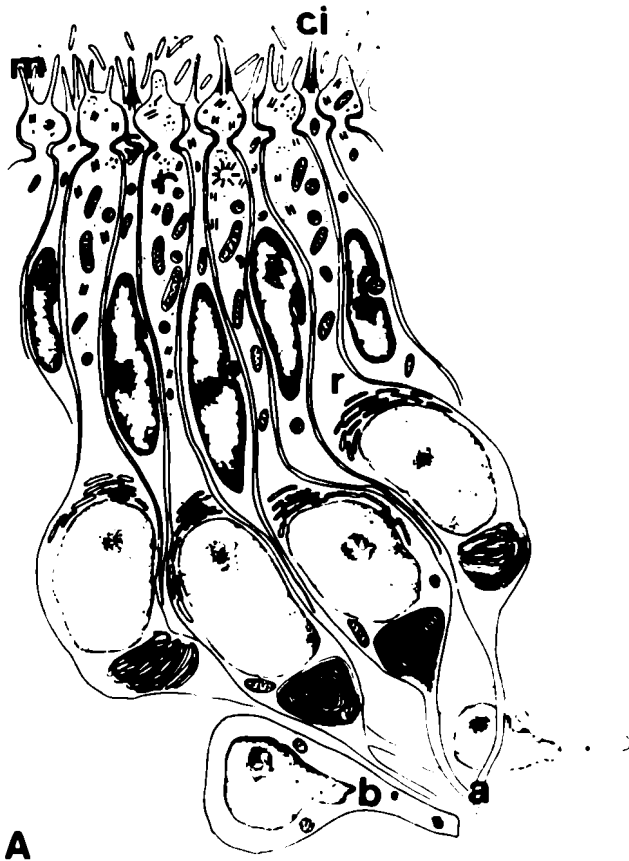
B: Neuroepitelio al nacimiento. Células sustentaculares próximas a un capilar intraepitelial. Puede observarse la disposición en cisternas paralelas del retículo endoplásmico granular y algunos cuerpos densos en su proximidad. Barra = 1 μ m.

Abreviaturas: cd, cuerpo denso; ce, centríolo; cip, capilar intraepitelial; eg, retículo endoplásmico granular; l, lumen; m, microvellosidades; r, célula receptora; s, célula sustentacular; sn, núcleo de célula sustentacular; v, vesícula.



Figura 12: Neuroepitelio vomeronasal. Esquema que muestra las principales modificaciones que ocurren en el mismo desde el nacimiento (A) hasta los 21 días de edad (B).

Abreviaturas: a, axón; b, célula basal; ci, cilio; m, microvellosidades; r, célula receptora; s, célula sustentacular; v, vesícula; w, retículo endoplásmico agranular.



A



B

Figura 13: Microscopía electrónica de transmisión. Neuroepitelio vomeronasal de una cría de 21 días de edad.

A: núcleos de células sustentaculares. Barra = 4 μm .

B: célula basal. Barra = 1 μm .

C: citoplasma perinuclear de una célula receptora donde se observa el desarrollo del retículo endoplásmico agranular. Barra = 1 μm .

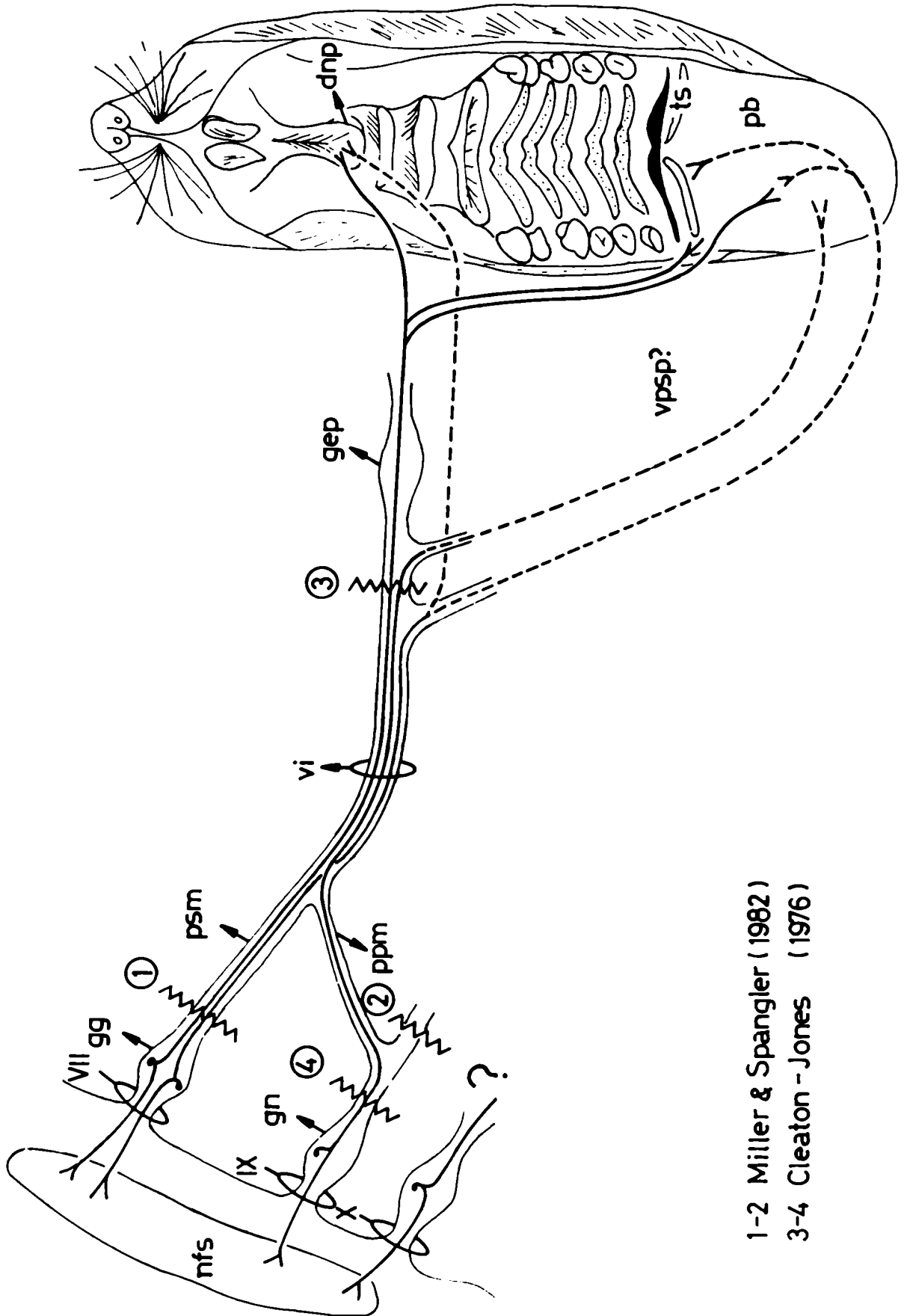
D: prolongación axónica de las células receptoras. Barra = 0.5 μm .

Abreviaturas: a, axón; bn, núcleo de célula basal; rn, núcleo de célula receptora; sn, núcleo de célula sustentacular; w, retículo endoplásmico agranular.



Figura 14: Esquema sobre el origen y curso probable de las fibras responsables de la inervación de los receptores gustativos palatinos en la rata.

Abreviaturas: dnp, conducto nasopalatino; gep, ganglio esfenopalatino; gg, ganglio geniculado; gn, ganglio nodoso; nfs, núcleo de fascículo solitario; pb, paladar blando; ppm, nervio petroso profundo mayor; psm, nervio petroso superficial mayor; ts, franja gustativa entre el paladar duro y el blando; vi, nervio vidiano; vpsp, vía anastomótica con el plexo simpático perivascular; VII, IX y X, pares craneanos.



1-2 Miller & Spangler (1982)

3-4 Cleaton-Jones (1976)

Figura 15: Microfotografías de secciones coronales de la papila palatina. A = 0 día, B = 2 días, C = 5 días, D = 8 días, E = 10 días y F = 21 días de edad.

Barras en A-F = 250 μ m.

Abreviaturas: dnp, conducto nasopalatino; lt, lengüeta; or, cavidad oral; pp, papila palatina.

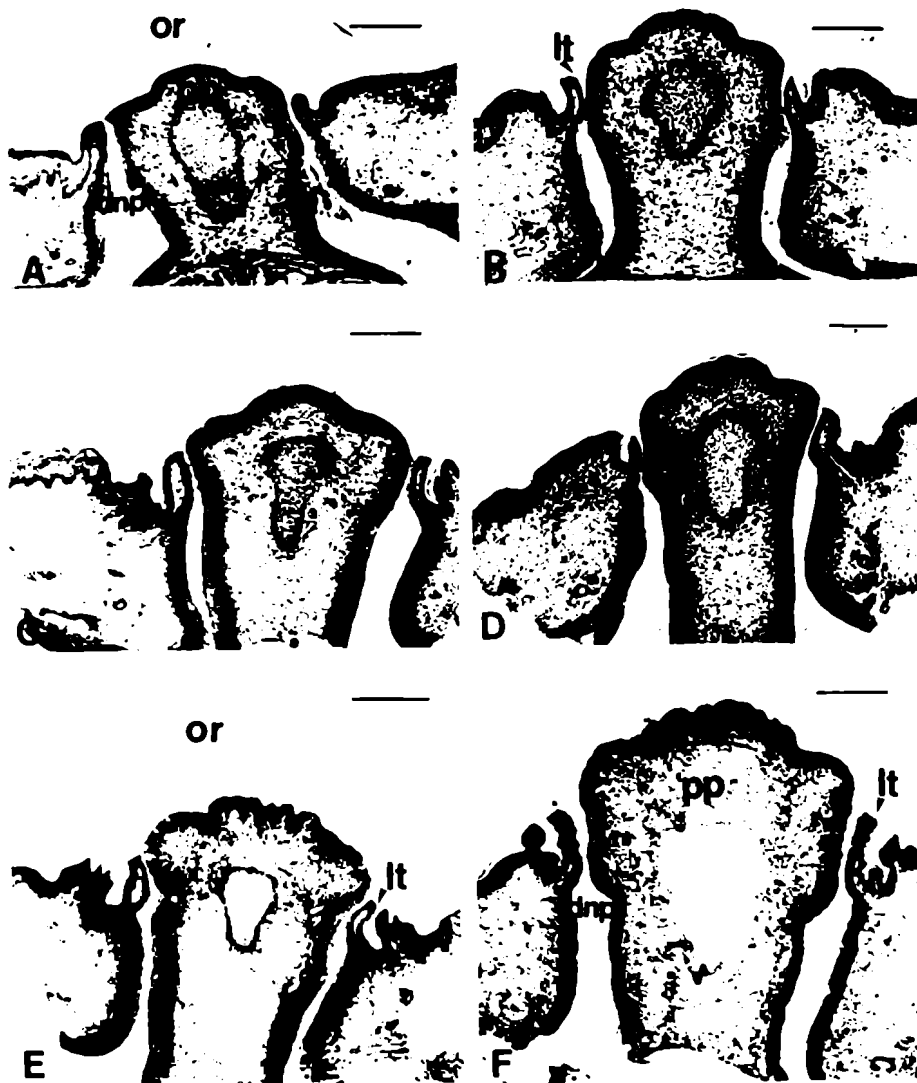


Figura 16: Microfotografía de una sección coronal de la papila palatina de una rata de 3 meses de edad. Barra = 200 μ m.

Abreviaturas: dnp, conducto nasopalatino; lt, lengüeta; or, cavidad oral; pp, papila palatina.

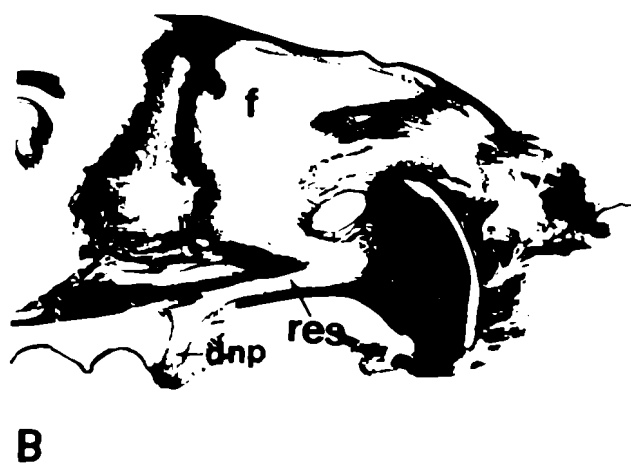
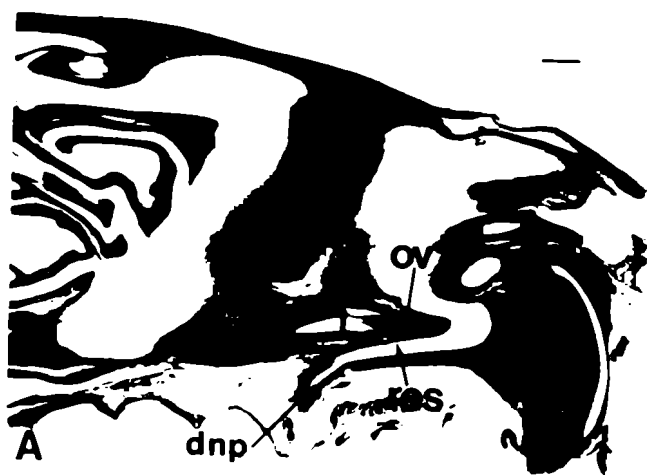
or



Figura 17: Microfotografías de secciones sagitales de la fosa nasal de una rata adulta. Puede observarse la comunicación indirecta conducto nasopalatino-receso paraseptal, abertura del órgano vomeronasal. Barra = 1 μ m.

Abreviaturas: dnp, conducto nasopalatino; f, fosa nasal; l, lumen; res, receso paraseptal; ov, órgano vomeronasal.

1024-87



www.doi

Figura 18: Microscopía electrónica de barrido. Desarrollo postnatal de la papila palatina donde se observa el crecimiento dorsoventral de la misma y el enmascaramiento de la desembocadura oral del conducto nasopalatino desde el nacimiento (A) hasta los 21 días de edad (E). A-E, 0, 3, 5, 12 y 21 días, respectivamente. Barra = 100 μm . F: papila palatina de un adulto de 3 meses. Barra = 208 μm .

Abreviaturas: at, anterior; dnp, conducto nasopalatino; pp, papila palatina; pt, posterior; sl, sulcus entre la parte rostral y caudal de la papila palatina.

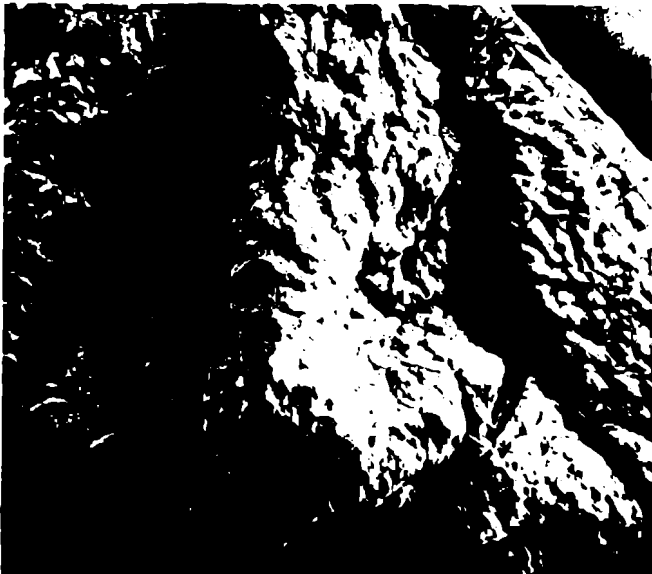
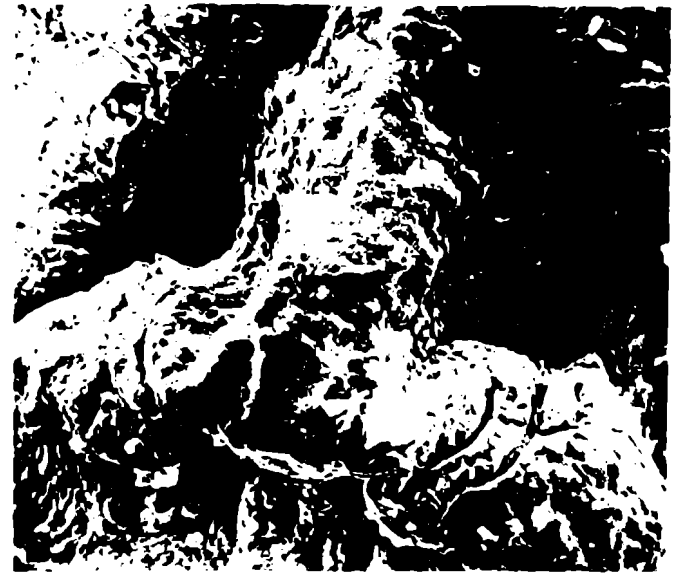


Figura 19: Microfotografías donde se observa la ubicación de los corpúsculos gustativos en la papila palatina y conducto nasopalatino desde el 1° (A) hasta los 21 días de edad (F). A-F: 1, 3, 8, 10, 13 y 21 días de edad, respectivamente.

Barra en A = 50 μ m. Barras en B-F = 50 μ m.

Abreviaturas: ao, abertura oral del conducto nasopalatino; cg, corpúsculo gustativo; dnp, conducto nasopalatino; la, pared lateral del conducto nasopalatino; lt, lengüeta; me, pared medial del conducto nasopalatino; pp, papila palatina.

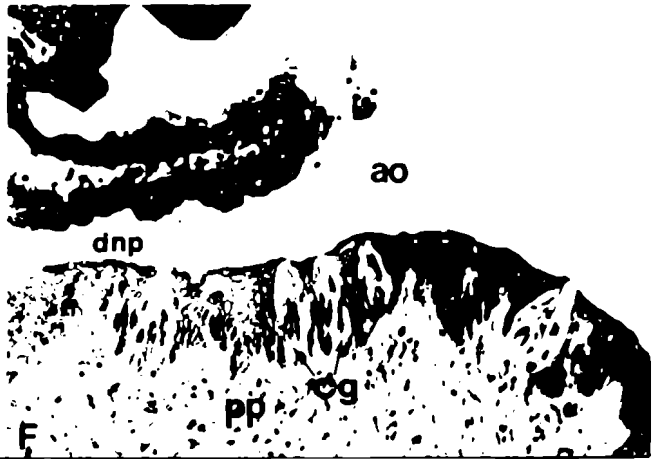
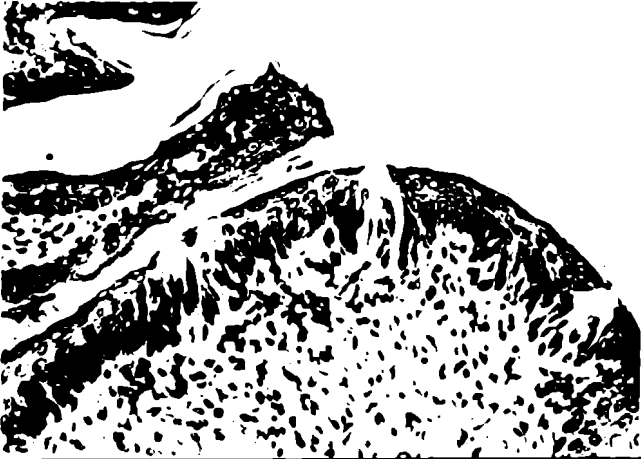
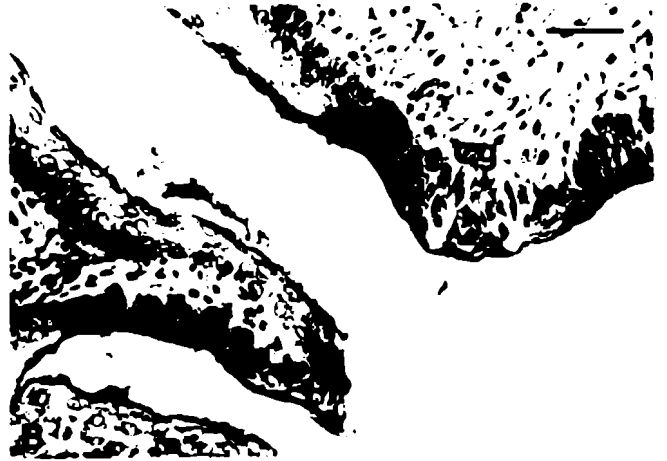
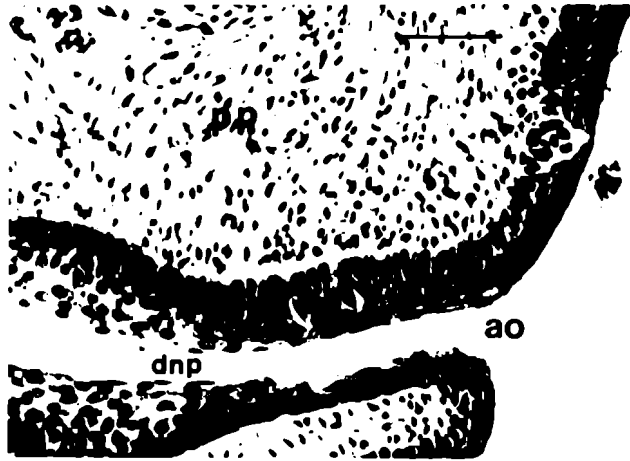


Figura 20: Microfotografías de los corpúsculos gustativos de la papila y conducto nasopalatino. A-F = 1, 3, 8, 10, 13 y 21 días de edad, respectivamente. La flecha indica el poro externo del corpúsculo. Barra = 20 μm .

Abreviatura: cg, corpúsculo gustativo.

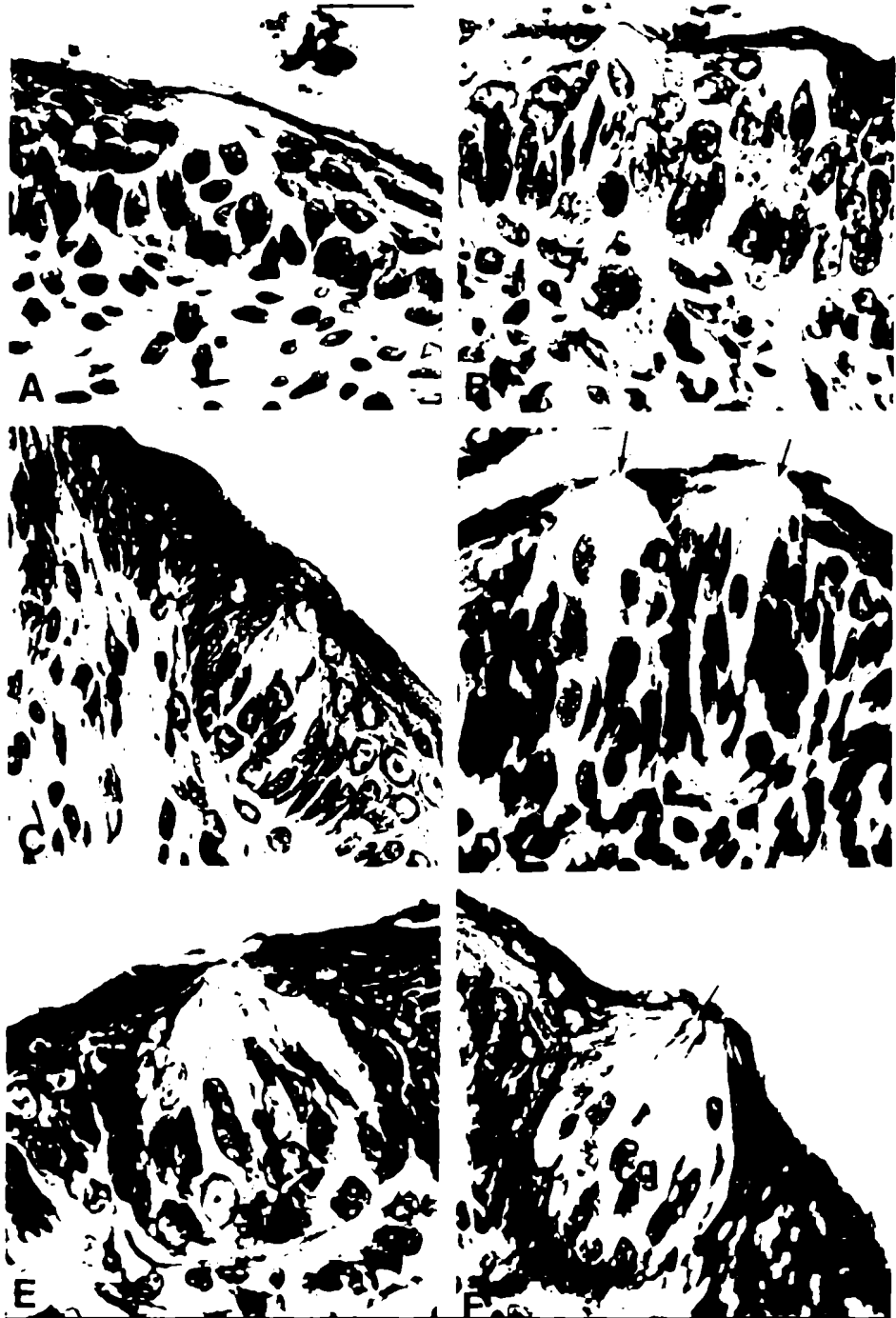


Figura 21: Microfotografía electrónica de transmisión.

Porción basal de un corpúsculo gustativo de una cría de 3 días de edad. Barra = 1 μm .

Abreviaturas: cd, cuerpo denso; ct, citofilamentos; dg, célula oscura del corpúsculo gustativo; fn, fibra nerviosa; lb, lámina basal; v, vesícula.

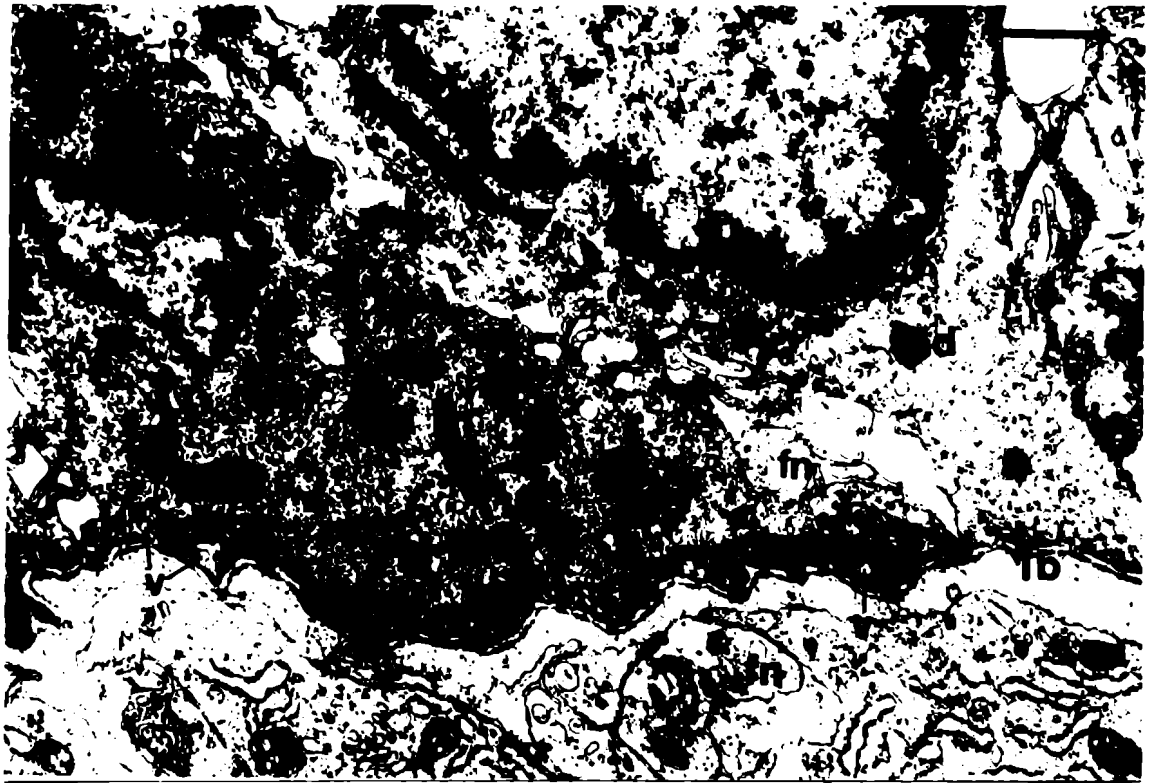


Figura 22: Microscopía electrónica de transmisión. Porción mediobasal de un corpúsculo gustativo de una cría de 3 días de edad donde pueden observarse las células claras y las oscuras. Barra = 1 μ m.

Abreviaturas: cd, cuerpo denso; cl, célula clara del corpúsculo gustativo; ct, citofilamentos; dg, célula oscura del corpúsculo gustativo; fn, fibra nerviosa.



Figura 23: Microscopía electrónica de transmisión. Corpúsculo gustativo a los 8 días de edad. A: porción medio basal del corpúsculo, donde se observa una célula clara. La relación de ésta con la fibra nerviosa es de tipo aposición, mientras que la célula oscura establece contactos "tipo mesaxonales" con la fibra. Barra = 1.4 μm . B: porción basal de un corpúsculo donde se observa la penetración de numerosas fibras nerviosas al mismo. Barra = 1 μm . C: célula perigemal. Barra = 2 μm .

Abreviaturas: cl, célula clara del corpúsculo gustativo; dg, célula oscura del corpúsculo gustativo; fn, fibra nerviosa; lb, lámina basal; pg, célula perigemal.

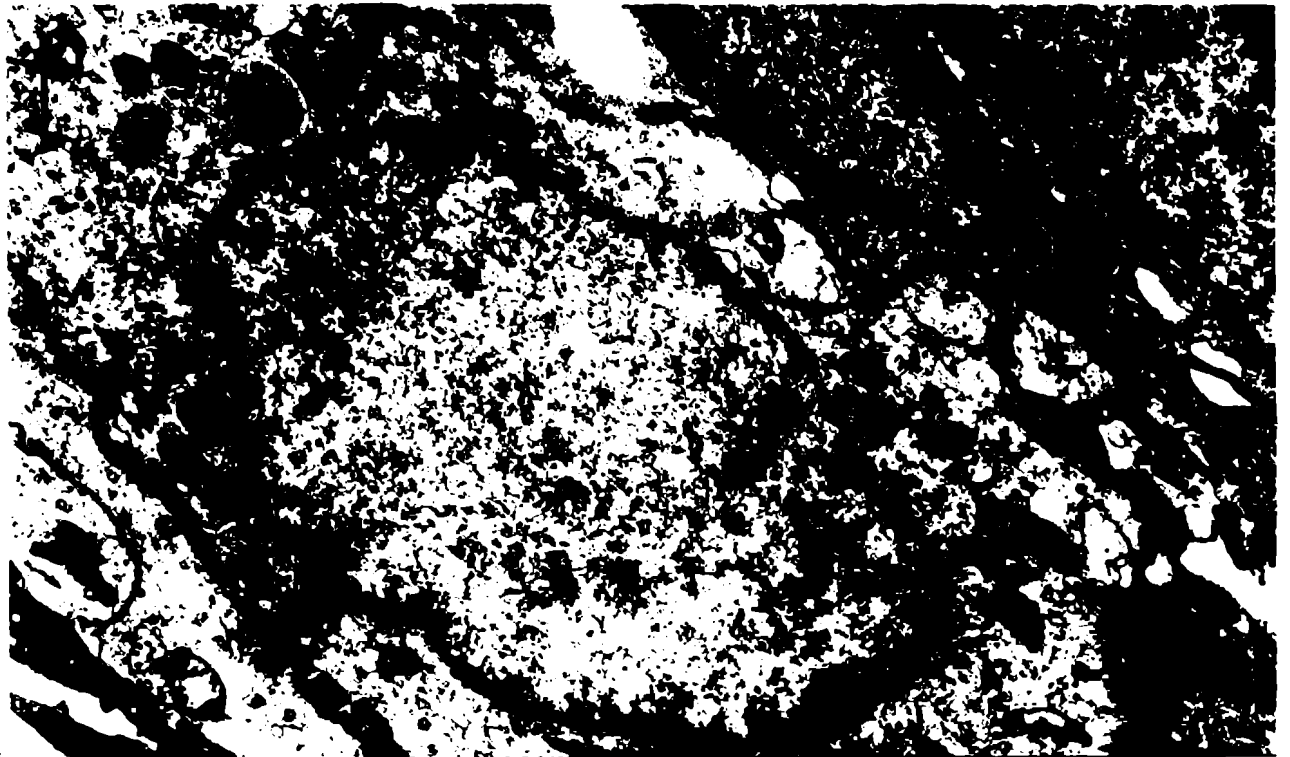
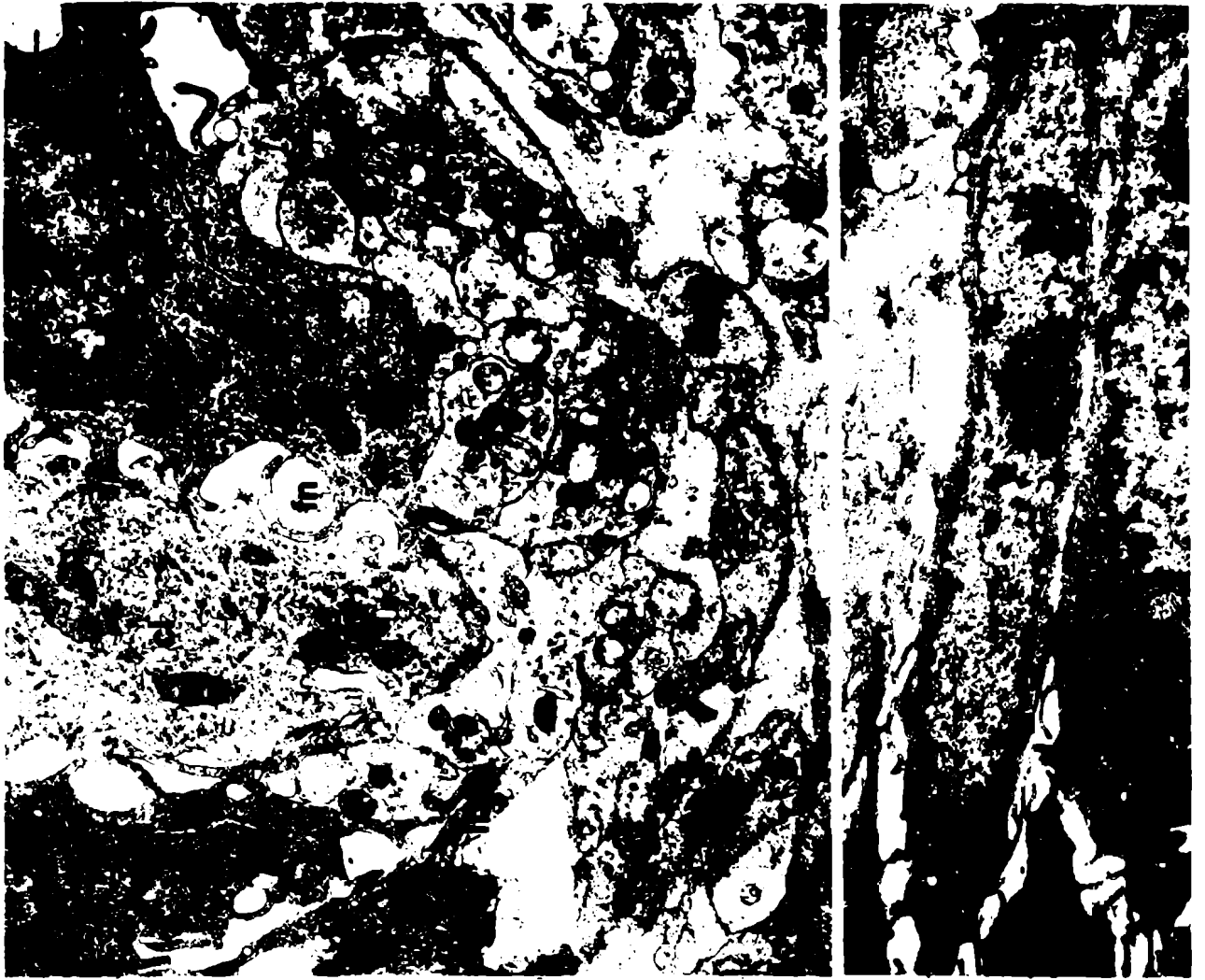


Figura 24: Microscopía electrónica de transmisión. Corpúsculo gustativo a los 21 días de edad. A: células claras y células oscuras. Barra = 0.5 μm .

B: relación entre las fibras nerviosas y los dos tipos celulares. Barra = 0.5 μm .

Abreviaturas: cl, célula clara del corpúsculo gustativo; ct, citofilamentos; dg, célula oscura del corpúsculo gustativo; fn, fibra nerviosa. -



Figura 25: Microscopía electrónica de transmisión. Corpúsculo gustativo a los 21 días de edad. A: porción apical. Las células claras y las oscuras están relacionadas entre sí por interdigitaciones y desmosomas. Barra = 0.6 μ m. B: poro externo del corpúsculo gustativo. Se observan células oscuras con microvellosidades cortas. Barra = 1 μ m. Abreviaturas: cl, célula clara del corpúsculo gustativo; cd, cuerpo denso; dg, célula oscura del corpúsculo; dnp, conducto nasopalatino; fg, fosita gustativa; fn, fibra nerviosa; m, microvellosidades; po, poro externo; v, vesícula.

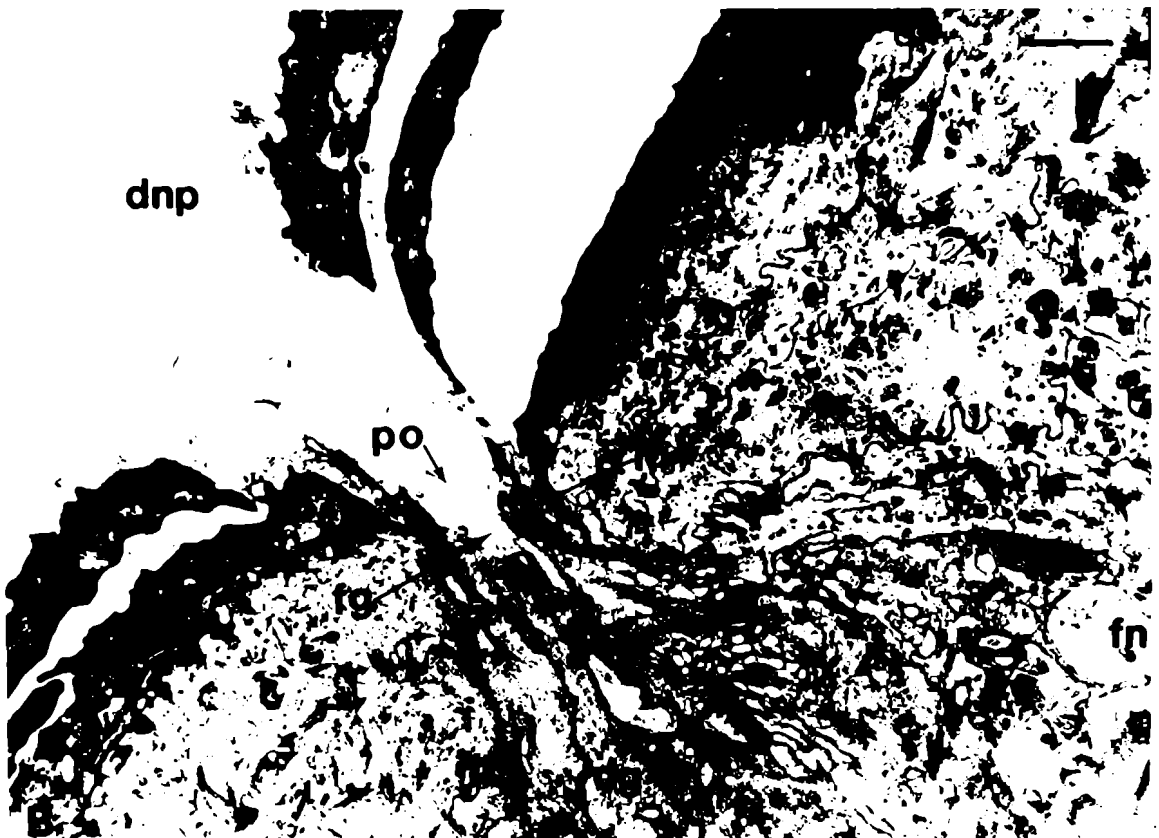


Figura 26: Microscopía electrónica de transmisión. Corpúsculo gustativo a los 21 días de edad. A: fibra nerviosa perigemal. Barra = 0.5 μm .

B: célula oscura. Agrupación de vesículas en la célula (flecha), próxima a una fibra nerviosa.

Barra = 0.5 μm .

Abreviaturas: cg, corpúsculo gustativo; dg, célula oscura del corpúsculo gustativo; fn, fibra nerviosa; fp, fibra nerviosa perigemal; v, vesícula.



Figura 27: Microscopía electrónica de transmisión. Corpúsculo gustativo de un adulto. A: contacto de adherencia entre una célula oscura y una fibra nerviosa. Las flechas indican la zona del contacto. Las vesículas se acumulan en las proximidades de dicha zona. El espacio intercelular presenta un material denso. Barra = 0.5 μm ;

B: célula basal. Barra = 1 μm .

Abreviaturas: bg, célula basal del corpúsculo; dg, célula oscura del corpúsculo; fn, fibra nerviosa; lb, lámina basal; v, vesícula.



Figura 28: Microscopía electrónica de barrido. Lesión electrolítica del conducto nasopalatino efectuada a los 5 días de edad. Los animales se sacrificaron a los 21 días. A: lesión unilateral. Se observa el aplanamiento de la papila palatina y la desaparición de la comunicación oral del conducto lesionado (flecha).

Comparar con Figura 18E. Barra = 100 μm .

B: Lesión bilateral. Se ha removido el epitelio palatino. La lesión y el cierre de los conductos se extiende a la lámina propia. Las flechas indican la ubicación aproximada que tendrían los conductos en un animal control. Barra = 208 μm .

Abreviaturas: at, anterior; ld, lesión del conducto nasopalatino; pt, posterior.



Figura 29: Microfotografías del ovario de la rata. A: animal con 14 días de cornificación vaginal consecutiva por exposición a la iluminación permanente. Se observan grandes folículos y ausencia de cuerpos lúteos recientes.

B: animal en estadio "estro" del ciclo vaginal normal en L0 = 14:10 donde pueden verse cuerpos lúteos recientes y folículos en distintas etapas de crecimiento.

C: Idem A, pero inyectado con gonadotrofina coriónica humana.

Persisten los grandes folículos, pero pueden verse algunos cuerpos lúteos recién formados.

D : animal con 4 días de estro consecutivo, por iluminación permanente.

Barra A-D = 286 μ m.

Abreviaturas: fo, folículo ovárico tipo quístico; foc, folículo ovárico en crecimiento; lur, cuerpo lúteo reciente.

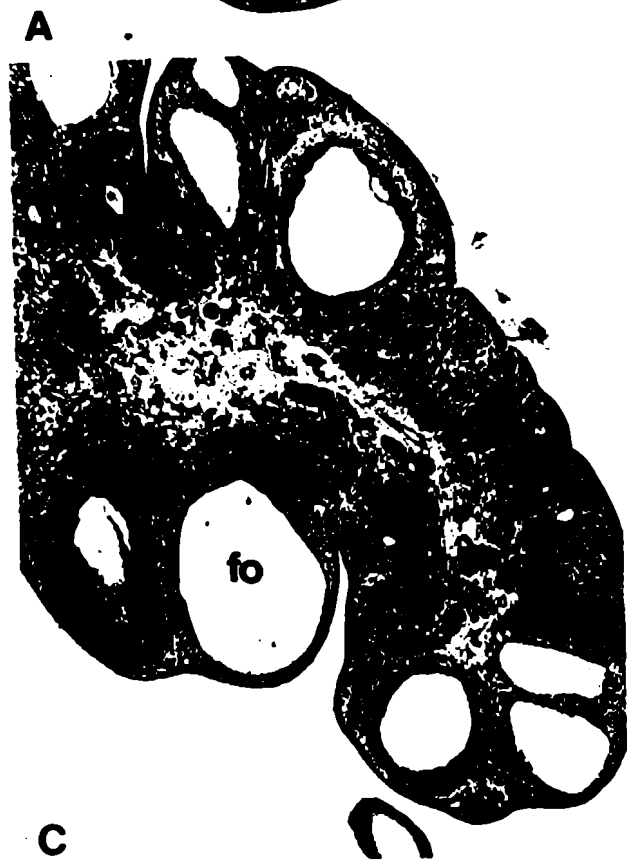


Figura 30: Radioinmunoensayo para hormona luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y prolactina.

C.L.P.: ratas en estro persistente por iluminación continua (8 ó más días consecutivos).

I₁: 6 horas después de la inyección de 100 UI de gonadotrofina coriónica humana.

I₂: 18 horas después de inyección de 100 UI de gonadotrofina coriónica humana. Los animales habían ovulado.

nanogramos/ml de suero

