

Tesis de Posgrado

Las estructuras olfatorias de los armadillos *ChaetophRACTUS villosus* y *DasyPUS hybridus*

Ferrari, Carina Cintia

1997

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:

Ferrari, Carina Cintia. (1997). Las estructuras olfatorias de los armadillos *ChaetophRACTUS villosus* y *DasyPUS hybridus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2913_Ferrari.pdf

Cita tipo Chicago:

Ferrari, Carina Cintia. "Las estructuras olfatorias de los armadillos *ChaetophRACTUS villosus* y *DasyPUS hybridus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2913_Ferrari.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Las estructuras olfatorias de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*.

RESUMEN

Esta Tesis se divide en: 1- El modelo experimental y la importancia de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus* en la investigación biomédica; 2- Adaptación del armadillo *Dasypus hybridus* a las condiciones de cautiverio; 3- Estudio de las estructuras nasales de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*, con especial atención en la mucosa olfatoria; 4- Estudio neuroanatómico del armadillo *Dasypus hybridus*. En la primera parte, se realizó un resumen de la sistemática y taxonomía de ambos armadillos y se mencionan algunas líneas de investigación biomédica que han utilizado ambos modelos experimentales. En la segunda parte, se exponen las tareas realizadas en cuanto a la mantención y reproducción en cautividad del armadillo *Dasypus hybridus*. La tercera parte, consta de una revisión de los conocimientos actuales sobre la mucosa olfatoria, un estudio topográfico y macroscópico de las estructuras nasales y un estudio de la mucosa olfatoria mediante microscopía óptica y microscopía electrónica, incluyendo estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos. La última parte, consta de un estudio neuroanatómico de la especie *Dasypus hybridus*. El trabajo consiste en una revisión sobre los trabajos neuroanatómicos realizados en Edentados y en el análisis de las estructuras cerebrales más importantes de este armadillo con especial referencia a las estructuras nasales.

Palabras claves: armadillo, cautiverio, cavidad nasal, mucosa olfatoria, neuroanatomía

The olfactory structures of the armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*.

ABSTRACT

This Thesis is divided in: 1- The armadillos *Chaetophractus villosus* and *Dasypus hybridus* as experimental models in biomedical research; 2- The maintenance in captivity of the armadillo *Dasypus hybridus*; 3- Nasal structures of the armadillos *Chaetophractus villosus* and *Dasypus hybridus*, with special reference to olfactory mucosa; 4- Neuroanatomical study of *Dasypus hybridus*.

In the first part an abstract of the systematic, taxonomy and the most important features of the biomedical research about *Chaetophractus villosus* and *Dasypus hybridus* was mentioned. The second part includes the tasks related with maintenance and reproduction in captivity of the armadillo *Dasypus hybridus*. The third part includes a literature review about the olfactory mucosa, a topographic study of the nasal structures and a study of the olfactory mucosa of both armadillos by optic and transmission electron microscopy, including histochemical and immunohistochemical analysis. The last part consists in a literature review about neuroanatomical studies in Edentates and analysis of the most salient neuroanatomical features of the South American armadillo *Dasypus hybridus*, with special reference to the nasal structures.

Key words: armadillo, captivity, nasal cavity, olfactory mucosa, neuroanatomy.

A mi familia

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

***“LAS ESTRUCTURAS OLFATORIAS DE LOS
ARMADILLOS CHAETOPHRACTUS VILLOSUS Y
DASYPUS HYBRIDUS”***

AUTOR: CARINA CINTIA FERRARI

DIRECTOR: PROF. DR. JORGE MARIO AFFANNI

*INSTITUTO DE NEUROCIENCIA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
CONICET*

- 1997-

h2

INDICE

	Página
FUNDAMENTOS DE LA TESIS	1

CAPITULO I : Revisión de las características más importantes de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*. Importancia en la investigación biomédica.

1.1. Taxonomía y caracterización del Orden Xenarthra	20
1.2. Caracterización de la Familia Dasypodidae	21
1.3. Caracterización biológica de la especie <i>Dasypus hybridus</i>	22
1.3.1 Armadillo <i>Dasypus hybridus</i> como modelo de investigación biológica y médica	23
1.4.1 Caracterización biológica de la especie <i>Chaetophractus villosus</i>	28
1.4.2. Armadillo <i>Chaetophractus villosus</i> como modelo de investigación biológica y médica	29

CAPITULO II : Adaptación a las condiciones de cautiverio del armadillo *Dasypus hybridus*. Tareas realizadas referentes al alojamiento, alimentación, sanidad, reproducción y manipulación en cautividad del armadillo *Dasypus hybridus*

Introducción	35
Materiales y métodos	35
2.1. Origen de los animales	35
2.2. Alojamiento en cautiverio	36
2.3. Alimentación en cautiverio	37

2.4. Sanidad en cautiverio.....	38
2.5. Reproducción en cautiverio	38
2.6. Adaptación de los ejemplares al cautiverio.....	39
Resultados	43
Discusión.....	47

CAPITULO III : Estudio estructural de la cavidad nasal de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*, con especial atención a la mucosa olfatoria.

Introducción.....	48
Generalidades sobre el sistema olfatorio.....	48
3.1. Sistema olfatorio periférico.....	49
3.1.1. Peces.....	50
3.1.2. Anfibios.....	51
3.1.3. Reptiles.....	52
3.1.4. Aves.....	52
3.1.5. Mamíferos.....	52
3.2. Estructura de la mucosa olfatoria.....	53
3.2.1. Estructura del epitelio olfatorio.....	53
3.2.2. Estructura de la lámina propia.....	56
3.2.3. Estructura de la mucosa olfatoria en peces.....	57
3.2.4. Estructura de la mucosa olfatoria en anfibios y reptiles.....	58
3.2.5. Estructura de la mucosa olfatoria en mamíferos.....	60
3.3. Estructuras subepiteliales.....	66
3.4. Mucus olfatorio.....	68
3.5. Bioquímica de la mucosa olfatoria.....	69
3.6. Inervación de la mucosa olfatoria.....	73
Materiales y Métodos.....	84

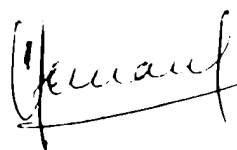
3.1. Animales utilizados.....	84
3.2. Estudios de microscopía óptica.....	84
3.2.1. Anatomía topográfica e histología.....	85
3.2.1. Estudios histoquímicos.....	86
3.2.2.1. Mucosustancias.....	86
3.2.2.2. Lípidos.....	91
3.2.2.3. Proteínas.....	91
3.2.3. Técnicas hiestoquímicas mediante la utilización de lectinas.....	93
3.3. Técnicas inmunohistoquímicas.....	96
3.4. Estudios de microscopía electrónica.....	100
Resultados.....	101
Estudio sobre las estructuras nasales de los armadillos <i>Chaetophractus villosus</i> y <i>Dasypus hybridus</i>	101
3.1. Cavidad nasal.....	101
3.1.1. Anatomía e histología interna de las fosas nasales.....	103
3.2. Microscopía óptica.....	114
3.2.1. Caracterización histológica de la mucosa olfatoria de <i>Chaetophractus villosus</i>	114
3.2.2. Caracterización histológica de la mucosa olfatoria de <i>Dasypus hybridus</i>	116
3.3. Estudios histoquímicos.....	128
3.3.1. Estudios histoquímicos de la mucosa olfatoria de <i>Chaetophractus villosus</i>	128
3.3.1.1. Glicoconjugados.....	128
3.3.1.2. Lípidos.....	131
3.3.1.3. Proteínas.....	131
3.3.2. Estudios histoquímicos de la mucosa olfatoria de <i>Dasypus hybridus</i>	132
3.3.2.1. Glicoconjugados.....	132
3.3.2.2. Lípidos.....	135

3.3.2.3. Proteínas.....	135
3.4. Estudios inmunohistoquímicos.....	140
3.4.1. Estudios inmunohistoquímicos de la mucosa olfatoria de <i>Chaetophractus villosus</i>	140
3.4.2. Estudios inmunohistoquímicos de la mucosa olfatoria de <i>Dasypus hybridus</i>	142
3.5. Microscopía electrónica.....	147
3.5.1. Estudios con microscopía electrónica de la mucosa olfatoria de <i>Chaetophractus villosus</i>	147
3.5.1. Estudios con microscopía electrónica de la mucosa olfatoria de <i>Dasypus hybridus</i>	156
Discusión.....	181

CAPITULO IV : Estudio neuroanatómico de *Dasypus hybridus*

El sistema nervioso de los armadillos.	
Antecedentes históricos.....	202
Materiales y Métodos.....	206
4.1. Puesta a punto de las técnicas histológicas.....	206
4.2. Preparación de los cortes histológicos.....	213
4.3. Fotografía de las secciones histológicas.....	214
4.4. Nomenclatura.....	214
Resultados.....	214
4.1. Peso y medidas del sistema nervioso central.....	214
4.2. Consideraciones macroscópicas del sistema nervioso central.....	215
4.3. Consideraciones microscópicas.....	218
4.3.1. Telencéfalo.....	218
4.3.1.1. Parte olfatoria primaria.....	218
4.3.1.2. Región septal.....	221
4.3.1.3. Sistema límbico.....	222

4.3.1.4. Telencéfalo no olfatorio.....	224
4.3.2. Diencefalo.....	225
4.3.3. Mesencefalo.....	227
4.3.4. Protuberancia.....	229
Discusión.....	246
CONCLUSIONES FINALES.....	249
Bibliografía.....	254



FUNDAMENTOS DE LA TESIS

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos sobre el estudio de las principales estructuras olfatorias, con especial atención en la mucosa olfatoria de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*.

Los objetivos de esta Tesis fueron tres a saber:

- 1- Adaptación de la especie *Dasypus hybridus* a las condiciones de cautiverio.
- 2- Estudiar las características macroscópicas, microscópicas (fotónicas y electrónicas), histoquímicas e inmunohistoquímicas de la mucosa olfatoria junto con algunas características estructurales de la cavidad nasal en los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*.
- 3- Estudio general de la estructura del encéfalo con el objeto de adquirir un mejor conocimiento de aquellas partes de la misma relacionadas con las estructuras de la cavidad nasal.

CONSIDERACIONES Y TAREAS PRELIMINARES

Para llegar a cumplir los mencionados objetivos debimos realizar una serie de tareas absolutamente necesarias para el correcto desarrollo del trabajo. Por lo tanto, como primera tarea se realizó una revisión completa de las características más importantes de ambas especies. Nuestra segunda tarea fue obtener la adaptación y reproducción de *Dasypus hybridus* en condiciones de cautiverio. El Instituto de Neurociencia tiene una amplia experiencia en la mantención en cautividad del armadillo *Chaetophractus villosus*. La experiencia anterior indicaba que la adaptación

de ejemplares de *Dasypus hybridus* en cautiverio era bastante difícil. En consecuencia fue necesaria, como primera parte de esta Tesis, acondicionar a estos animales a la vida de Bioterio.

FUNDAMENTOS QUE JUSTIFICAN NUESTRO INTERES POR LA MUCOSA OLFATORIA EN LA PRESENTE TESIS.

El creciente interés por los estudios de mucosa olfatoria por parte de distintos grupos de investigación crece día tras día. Las razones del mismo residen en una serie de notabilísimas propiedades de considerable relevancia fisiológica y neurobiológica.

Detalles sobre las mismas son suministrados más adelante. A continuación, a modo de introducción, pasamos solamente revista a dichas notables propiedades:

1- Algunas derivan de las características exclusivas de la neurona receptora olfatoria (NRO):

1.1- Las NRO son las únicas neuronas del organismo animal que están en contacto físico directo con el medio ambiente, constituyendo por lo tanto, una fase intermedia entre dicho medio y el sistema nervioso central (SNC). Esta importante propiedad entraña como veremos más adelante un peligro potencial para el sistema nervioso.

1.2- Las proyecciones de las NRO hacia el SNC, a diferencia de todas las otras vías sensoriales por las que circula información, arriban directamente a una corteza filogenéticamente primitiva sin hacer sinapsis con el tálamo. Por lo tanto, están en condiciones de interactuar directamente entre el medio ambiente y el SNC (Farbman, 1992; Crews y Hunter, 1994).

1.3- Las NRO se regeneran continuamente a lo largo de toda la vida adulta. Esto determina que en un momento determinado la población neuronal exhibe

neuronas recién nacidas, neuronas inmaduras, neuronas diferenciadas y neuronas en proceso de degeneración. Resulta fácil comprender la enorme importancia de este hecho, pues implica que en la mucosa olfatoria (MO) residen importantes secretos relacionados nada menos que con la regeneración neuronal de mamíferos adultos (Graziadei y Monti Graziadei, 1979; Costanzo y Graziadei, 1983).

2- Como consecuencia de ser la neurona olfatoria la única neurona en contacto directo con el medio ambiente cabe señalar un hecho de importancia: la NRO es la única neurona del organismo homeotérmico que está sometida a oscilaciones de temperatura (Affanni, com. pers.).

3- Otros motivos del interés suscitado por la mucosa olfatoria (MO) derivan de investigaciones demostrativas de que varios materiales incluyendo metales se trasladan al bulbo olfatorio luego de la instilación nasal. Estos materiales son posteriormente transportados en sentido anterógrado y retrógrado hacia distintas regiones del SNC (Crapper McLachlan, 1986; Dahl y Hadley, 1991).

4- Otro motivo de interés por la MO es que aunque muchos materiales instilados penetran en el SNC dicho transporte no ha podido ser demostrado en todos los animales estudiados. Esto sugiere que la MO provee de algún modo una barrera protectora del sistema nervioso denominada barrera nasoencefálica, que se sumaría a la conocida barrera hematoencefálica (Morgan, 1984).

5- Hay otro importante motivo de interés por la MO. Este consiste en el altísimo nivel de actividad enzimática metabolizante xenobiótica (Hadley y Dahl, 1982).

6- La MO posee células del sistema inmunitario y ha sido demostrada la presencia de inmunoglobulinas y citoquinas en las secreciones nasales (Getchell y Getchell, 1991).

7- En el curso del desarrollo embriológico, en la placoda olfatoria se generan células GnRHérgicas que migran desde allí hacia el hipotálamo (Witkin y Silverman, 1983; Witkin, 1987).

8- La MO presenta sitios de ligamiento para melatonina (Affanni *et al.*, 1996).

9- Las glándulas nasales segregan un tipo de proteínas-odorante ligante (*odor binding proteins*)- que tiene la función de combinarse con las moléculas odorantes y permitir de este modo el avance de moléculas hidrofóbicas a través de un medio acuoso hidrofílico (Pelosi *et al.*, 1982).

10- En la actualidad la MO es utilizada como sitios para la administración de medicamentos (cefalexina y sulfonamidas) (Lewis y Dahl, 1995).

11- Hay un hecho que merece ser destacado: la MO despliega una importante interacción con distintas partes del organismo además de hacerlo con el medio ambiente (Maruniak *et al.*, 1983; Bradbury, 1984). En efecto, la misma es alcanzada desde distintas fuentes, a saber:

- a) El aire inspirado.
- b) El aire espirado.
- c) El líquido cefalorraquídeo
- d) La sangre.
- e) La secreción de las glándulas perioculares: lacrimal y glándula de Harder.

12- La falta de MO provoca importantes cambios en el crecimiento del cuerpo y en el desarrollo de los bulbos olfatorios y del cerebelo (Shafa *et al.*, 1976; Singh y Nathaniel, 1977).

Las mencionadas propiedades de la MO demuestran claramente que la misma es un sitio muy activo de importantes fenómenos fisiológicos y neurobiológicos. Esto señala la considerable importancia de una renovada investigación sobre la misma. Este ha sido precisamente el motivo que nos indujo a la elaboración de la presente Tesis.

ANALISIS DE LAS PROPIEDADES

1- La habilidad de las NRO para detectar e identificar moléculas odorantes ilustra la primera de sus particulares características: son las únicas neuronas que hacen contacto físico directo con el medio externo. Este contacto ocurre en las cilias que se proyectan desde las dendritas de las NRO, específicamente en la capa de mucus que cubre el epitelio nasal. Las NRO envían procesos hacia el SNC. Esta proyección representa la segunda característica distintiva: las NRO llegan a una corteza primitiva sin hacer sinapsis con el tálamo (Farbman, 1992; Crews y Hunter, 1994). La información proveniente del epitelio olfatorio, se diferencia de las demás informaciones sensitivas y sensoriales por ser enviada directamente desde el bulbo olfatorio hacia la corteza cerebral olfatoria, sin hacer previamente un relevo talámico. Sin embargo, parte de la corteza olfatoria, especialmente la corteza piriforme se proyecta al tálamo y la información olfatoria pasa al neocortex, donde presumiblemente ocurra la percepción consciente de los olores. (Farbman, 1992). Por otro lado, las neuronas olfatorias son las únicas neuronas que exhiben un continuo recambio y reemplazo a partir de células precursoras durante la vida adulta (Graziadei y Monti Graziadei, 1979). La evidencia experimental de la regeneración neuronal fue suministrada por estudios de autorradiografía con los cuales se rastreó la migración apical de células marcadas con ^3H -Timidina a través del epitelio de roedores adultos (Camara y Harding, 1984). La neurogénesis se incrementa luego de una injuria producida en el epitelio, permitiendo la rápida reconstitución del epitelio dañado (Graziadei y Monti Graziadei, 1979; Costanzo y Graziadei, 1983; Carr y Farbman, 1992; Pellier y Astic, 1994; Hoolbrook *et al.*, 1995; Schowb *et al.*, 1995). Sin embargo, existe aún mucho por comprender acerca de la neurogénesis, especialmente acerca de la biología de las células basales y de los mecanismos regulatorios del mismo (Hoolbrook *et al.*, 1995).

2- Una consecuencia de que la NRO sea la única neurona del organismo en contacto directo con el medio ambiente hace que la misma esté sometida a fuertes oscilaciones de temperatura. Esto se debe a la llegada del aire inspirado, que en muchas oportunidades está muy por debajo de la temperatura corporal. A esto se añade la

existencia de mecanismos refrigerantes en la cavidad nasal (Schmidt-Nielsen, 1972; 1990). Es de destacar la posible relación de este hecho con la desaparición de la neurogénesis en los organismos homeotérmicos o endotérmicos adultos. Cabe, pues preguntarse si la mencionada conservación neurogenética de la MO guarda alguna relación con las oscilaciones de temperatura que guardarían una cierta semejanza con las neuronas de los animales poiquilotérmicos (ectotérmicos) (Affanni, 1997, com. pers.).

3- Numerosas investigaciones han demostrado que varios materiales incluyendo metales se trasladan al bulbo olfatorio luego de la instilación nasal. Estos materiales son posteriormente transportados en sentido anterógrado y retrógrado hacia distintas regiones del SNC. Al respecto cabe señalar la elaboración de una teoría de transporte directo transepitelial de sustancias tóxicas inhaladas. El gran atractivo de dicha teoría deriva precisamente de una característica neuroanatómica exclusiva del sistema olfatorio: la NRO contacta tanto la luz de la cavidad nasal como los bulbos olfatorios proveyendo así una vía unineuronal por la que distintas sustancias tóxicas pueden invadir el SNC.

Numerosas sustancias son internalizadas, transportadas y acumuladas en el sistema olfatorio. Estas sustancias presentan un amplio rango, varían de metales a virus e incluyen lectinas, colorantes, solventes, inmunoglobulinas, aminoácidos y drogas.

Metales como el aluminio, cadmio, cobalto y oro son internalizados en el epitelio olfatorio y transportados directamente al cerebro vía axones olfatorios o por el espacio subaracnoideo o perineural (Jackson *et al.*, 1979). La evidencia de este transporte hacia el SNC ha sostenido la hipótesis de que algunos de estos metales pueden ser etiológicamente significativos en algunos síndromes patológicos. Como por ejemplo, el aluminio en la enfermedad de Alzheimer (Crapper McLachlan, 1986; Roberts, 1986; Ferreyra-Moyano y Barragan, 1989). Las lectinas, específicamente la WGA (aglutinina del germen de trigo), también se transportan desde las NRO hacia el bulbo olfatorio (Shipley, 1985; Itaya, 1987), y de allí por transporte anterógrado y retrógrado a distintas regiones del SNC (Broadwell y Balin, 1985). Además, se ha reportado el transporte de varios virus como consecuencia de la inoculación nasal de los mismos. Entre ellos, el virus herpes, el virus murino coronavirus, el virus de la enfermedad Borna y el virus de

la rabia (Baker, 1995). Colorantes como el amarillo Lucifer, azul de Evans y azul Tripan penetran en las NRO (Kristensson y Olsson, 1971; Suzuki, 1984). Por otro lado, también se comprobó que la peroxidasa del rábano picante (HRP) es captada por la neurona olfatoria y transportada hacia los glomérulos olfatorios (Kauer, 1981; Steward, 1985). Es menester destacar además, el transporte de: aminoácidos -leucina, alanina, taurina- (Weiss y Buchner, 1988); drogas como el ácido valproico y la cocaína (Dahl y Hadley, 1991); solventes que incluyen benceno, tolueno y xileno (Ghantous *et al.*, 1990).

Las sustancias luego de penetrar a las NRO, pueden ser transportadas al SNC mediante transporte rápido o lento, característico de los sistemas neuronales. A su vez algunas moléculas sólo arriban al bulbo olfatorio mientras que otras pueden llegar a otras regiones del SNC mediante transporte transneuronal (Weiss and Buchner, 1988). Las consecuencias de este transporte se hallan generalmente asociadas con desórdenes neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Ferreira Moyano y Barragan, 1989).

También hay un hecho digno de ser destacado. El hipocampo está separado del epitelio olfatorio por solamente dos sinapsis. Huelga destacar la importancia de esta estructura en los procesos de aprendizaje y memoria, entre otros. No deja de ser extraordinariamente llamativo que una estructura tan importante pueda ser alcanzada tan fácilmente por distintas sustancias tóxicas presentes en el medio ambiente.

4- El hecho de que el transporte de ciertas sustancias instiladas a la cavidad nasal no ocurra en todos los animales ha llevado a sugerir la idea de una barrera nasoencefálica (BNE). El SNC se halla protegido por una barrera hematoencefálica (BHE), formada por uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares y una actividad enzimática en estas células endoteliales (Cutler, 1980). A pesar de las diferencias entre la BHE y la BNE existen ciertas características comunes que hacen que la BHE sirva como modelo para caracterizar a la BNE. Así por ejemplo, en el epitelio olfatorio hay uniones estrechas entre las NRO y las células de sostén (Graziadei, 1966; Graziadei y Graziadei, 1979) y existe una alta actividad xenobiótica y metabólica dentro de las células epiteliales (Dahl y Lewis, 1993). En otros aspectos la BNE difiere bastante de la BHE, especialmente en el aspecto que las dendritas de las neuronas receptoras se hallan en directo contacto con el lumen nasal y el transporte neuronal y la pinocitosis

parecen ser rutas de acceso al SNC más importantes que aquellas provenientes de la circulación. Por otro lado, el aparato mucociliar también funcionaría como un componente de la barrera (Morgan *et al.*, 1984). El concepto de BNE debería ser tomado en cuenta a la hora de estudiar el transporte de tóxicos inhalados.

5- A pesar de que la citoarquitectura de la MO es remarcablemente similar en las diferentes especies, la capacidad y localización del metabolismo xenobiótico puede ser muy diferente. Desde los primeros reportes que la actividad de la citocromo P-450 en la mucosa nasal de la rata excede a la actividad en el hígado cuando se normaliza al contenido de proteínas en el tejido (Hadley y Dahl, 1982), se han realizado numerosos trabajos sobre la actividad en la mucosa nasal de enzimas xenobióticas (Shapiro, 1970; Hadley y Dahl, 1982; Asanuma y Nomura, 1991; Asanuma y Nomura, 1993).

El metabolismo xenobiótico cumple múltiples funciones: (1) detoxificación de xenobióticos inhalados; (2) protección de otros tejidos, tales como cerebro y pulmones, de tóxicos inhalados; (3) activación de tóxicos inhalados; y (4) modificación de sustancias odorantes inhaladas, especialmente en el caso de esteroides que funcionan como estímulo reproductivo (Lewis y Dahl, 1995). Cabe aclarar que las enzimas xenobióticas nasales no sólo actúan sobre sustratos inhalados sino también lo hacen sobre sustratos provenientes de la circulación sistémica (Belinsky *et al.*, 1990).

6- La presencia de células del sistema inmunitario, inmunoglobulinas, lactoferrina y lisozima ha sido registrada en la MO de ratas y anfibios (Brandtzaeg, 1974; Getchell y Getchell, 1991). Esto se asocia con unas de las funciones de la MO que es la de ser una barrera para impedir la penetración de agentes patógenos del medio al interior del organismo, especialmente al SNC y al tracto respiratorio (Getchell y Getchell, 1991).

7- Durante el desarrollo embriológico, la aparición de fibras y neuronas inmunorreactivas a GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas) en el septo nasal precede a su aparición en otras partes del cerebro (Witkin y Silverman, 1983; Witkin, 1987; Jennes, 1989). Las neuronas GnRhérgicas se diferencian desde la placoda olfatoria. Siguiendo su diferenciación estas neuronas migran a través del septo nasal y

entran en la región ventral del encéfalo junto con el nervio terminal y el nervio vomeronasal (Silverman *et al.*, 1994). Por lo tanto, el origen de las neuronas que expresan GnRH en la placoda olfatoria nos provee el primer nexo entre los sistemas reproductivo y olfatorio, una asociación que permanece a lo largo de toda la vida.

8- En nuestro Instituto se demostró la ausencia de glándula pineal en los armadillos. La glándula de Harder produce melatonina y lípidos en los cuales dicha sustancia es altamente soluble. La secreción se vuelca a la cavidad orbitaria y por el canal nasolacrimal a la cavidad nasal. Se han hallado sitios de ligamiento de melatonina en la mucosa olfatoria. La melatonina podría tener una función local desconocida (¿intervención en la regeneración neuronal?), y luego llevada al cerebro (Affanni *et al.*, 1996).

9- La existencia de proteínas que se unen a los estímulos odorantes se dedujo del hecho de que el epitelio olfatorio se encuentra bañado en un mucus acuoso y que de alguna manera debería contener moléculas que transporten las moléculas hidrofóbicas a un medio hidrofílico. Así, se llegó a purificar la primera proteína que liga moléculas odorantes (*odor binding protein*) (OBP) (Pelosi *et al.*, 1982). Se ha podido tener una idea de la función de estas proteínas a partir de la secuencia de sus aminoácidos, determinada por clonado molecular. Así pudo saberse que la OBP es un miembro de una pequeña familia de proteínas que actúan como transportadores proteicos de pequeñas moléculas lipofílicas (Pevsner *et al.*, 1986, 1988).

10- La administración de medicamentos por vía nasal presenta ventajas sobre la administración oral o intravenosa. La absorción sistémica vía cavidad nasal parece ser un mecanismo mejor que el metabolismo que se encuentra en la administración de drogas por otras vías, las cuales pasan por la circulación portal del intestino al hígado. Además, la administración nasal presenta ventajas para los pacientes ya que se evitan los efectos secundarios que pueden generarse al administrar los medicamentos por vía oral o intravenosa (Lewis y Dahl, 1995). La administración intranasal de drogas específicas para el SNC -cefalexina y sulfonamida- sugiere que el mecanismo de entrada sería el mismo por el cual los agentes tóxicos entran al cerebro (Sakane *et al.*, 1991a y 1991b).

11- La MO despliega una importante interacción con distintas partes del organismo además de hacerlo con el medio ambiente. En efecto, la misma es alcanzada desde distintas fuentes. En primer lugar interactúa con el aire inspirado y expirado a través de los movimientos respiratorios.

Por otro lado, la placa cribiforme ha sido considerada como el punto de salida por el cual el líquido cefalorraquídeo (LCR) llega al sistema linfático cervical superior. Las prolongaciones del espacio subaracnoideo que rodean a los axones olfatorios contienen LCR (Bradbury, 1984). La función del flujo del LCR a través de la placa cribiforme es desconocido, pero podría estar relacionada con el sentido del olfato (Bradbury, 1984).

Bajo ciertas condiciones los estímulos olfatorios pueden ser provocados por estímulos odorantes que llegan a través de la sangre. Este fenómeno denominado olfacción intravascular u olfacción hematogénica fue detectado por primera vez en humanos y se utilizó para testear la función olfatoria (Maruniak *et al.*, 1983). Se ha comprobado -por medio de registros electrofisiológicos- que los estímulos odorantes pueden estimular o modificar la respuesta de los receptores olfatorios (Maruniak *et al.*, 1983).

Además de las influencias anteriormente mencionadas, la cavidad nasal recibe la secreción de las glándulas perioculares: lacrimal y glándula de Harder, especialmente a través del conducto nasolacrimal (Affanni, 1996, com. pers.).

12- La anosmia temprana inducida por denervación olfatoria periférica o por bulbectomía conduce a una tasa de mortalidad más alta en individuos tratados que en individuos controles y un decrecimiento en el crecimiento corporal (Shafa *et al.*, 1976; Singh y Nathaniel, 1977). Por otro lado, también se comprobó que la anosmia temprana produce un decrecimiento en el crecimiento del cerebro, especialmente del cerebelo y de los bulbos olfatorios. Esto sugiere la existencia de algún tipo de olfacción en el neonato, lo cual implica que en esa etapa del desarrollo el sistema olfatorio posee un mínimo requerimiento estructural para sostener una función básica y vital. La existencia de la olfacción en etapas tempranas provee de ciertas pistas olfatorias necesarias para el cuidado y la alimentación del neonato (Shafa *et al.*, 1980).

Como corolario consideramos oportuno citar un texto de P. Graziadei (1974) en la cual se refiere a la importancia del estudio anatómico y estructural comparado:

"Es bien establecido el hecho que en todos los vertebrados la mucosa olfatoria muestra básicamente un arreglo similar de células receptoras, células de sostén y basales, el estudio comparativo podría parecer a primera vista como no esencial para la comprensión de la función del órgano. Esto se deba posiblemente a que no se han llevado a cabo estudios sistemáticos en diferentes clases de vertebrados. Sin embargo, información básica se podría obtener de tales investigaciones. Si se postula que el mecanismo olfatorio para la transducción de olores es básicamente similar en todos los vertebrados, por lo tanto solamente aquellas estructuras que son comunes a todas las especies necesariamente deben ser consideradas como "esenciales" con respecto a la función olfatoria. Recíprocamente, peculiaridades específicas podrían podar nuestro modelo básico, mientras que los caracteres comunes deberían ser enfatizados. Un segundo propósito podría ser encontrar ciertas especies en las cuales los arreglos anatómicos sean más favorables para estudios experimentales. La dificultad de registrar una única células es bien conocida por los electrofisiólogos, y una especie con grandes receptores podría colaborar en estos estudios. Nuestro esfuerzo actual para el estudio comparativo de el órgano olfatorio reside básicamente en el análisis de los datos obtenidos por diferente autores usando diferentes técnicas y proporcionando diferentes ideas....."

Es difícil, debido a la carencia de muestras representativas de muchas especies aseverar el valor de cambios diminutos indicados esporádicamente por observaciones fortuitas. Es aceptable que cambios mayores en la organización de la mucosa olfatoria podrían haber sido ocasionados como consecuencia de cambios ambientales. Otros cambios más sutiles, tales como la presencia de microvellosidades en los receptores o diferencias en el arreglo del retículo endoplasmático son más difíciles de confirmar. Debemos recordar, sin embargo, que aún falta un amplio análisis de la mucosa olfatoria en muchas especies de cada una de las clases de vertebrados. Es de estos estudios que se podrán obtener datos comparativos significativos".

Los datos disponibles en la literatura sobre la mucosa olfatoria y la discusión de algunos problemas aún sin resolver nos indican que el estudio de este órgano a pesar de ser filogenéticamente primitivo, se halla asociado a estructuras y mecanismos complejos. Esto queda demostrado en la extraordinaria capacidad de este órgano de percibir y discriminar olores a umbrales excesivamente bajos. La revisión de la bibliografía parece indicar la necesidad del estudio funcional de este órgano, del cual se consideran que la mayoría de sus caracteres morfológicos son bien conocidos. Un fino estudio comparativo, proporcionaría datos muy importantes para comprender al fenómeno olfatorio en integridad (Adaptado de Graziadei, 1974).

Debido a lo expuesto anteriormente nos hemos propuesto estudiar la estructura del aparato olfatorio en dos especies de armadillos, siendo éste el primer estudio de estas estructuras en Edentados.

La Tesis está organizada del siguiente modo:

CAPITULO I. Revisión de las características más importantes de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*. Importancia en la investigación biomédica.

CAPITULO II. (Corresponde al objetivo 1) Adaptación a las condiciones de cautiverio del armadillo *Dasypus hybridus*.

CAPITULO III. (Corresponde al objetivo 2) Estudio estructural de la cavidad nasal de los armadillo *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*, con especial atención a la mucosa olfatoria.

CAPITULO IV. (Corresponde al objetivo 3). Estudio neuroanatómico de *Dasypus hybridus*.

BIBLIOGRAFIA

- AFFANNI J.M., BARRANTES G., ALDANA MARCOS H.J. (1996). Sitios de ligamiento de melatonina en la mucosa olfatoria del armadillo *Chaetophractus villosus*. Presentado en las XI Jornadas de Mastozoología, San Luis.
- ASANUMA N., NOMURA H. (1991). Cytochemical localization of cyclase activity in rat olfactory cells. *Histochem J.* 23: 83-90.
- ASANUMA N., NOMURA H. (1993). Cytochemical localization of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase activity in the rat olfactory mucosa. *Histochem. J.* 25: 348-356.
- BAKER H. (1995). Transport phenomena within the olfactory system. En: *Handbook of olfaction and taste* (Doty R. (ed.)). New York: Marcel Dekker, Inc. pp: 173-190.
- BAKER H., KAWANO T., MARGOLIS F.L., JOH T.H. (1983). Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.* 3: 96-78.
- BELINSKY S., FOLEY J.F., WHITE C.M., ANDERSON M.W., MARONPOT R.R. (1990). Dose-response relationship between O-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* 50: 3771-3780.
- BRADBURY M. (1984). Lymphatics and the central nervous system. *TINS-April* 100-101.
- BRANDZAEG P. (1974). Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components. Immunohistochemisry with a cold ethanol-fixation technique. *Immunology* 26: 1101-1114.

- BROADWELL R.D., BALIN B. (1985). Endocytosis and exocytosis pathways of the neuronal secretory process and trans-synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in vivo. *J. Comp. Neurol.* 242: 632-650.

- CAMARA C.G., HARDING J.W. (1984). Thymidine incorporation in the olfactory epithelium of mice: Proliferation exponential response induced by olfactory neurectomy. *Brain res.* 308: 63-68.

- CARR V., FARBMAN A.I. (1992). Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium. *Exp. Neurol.* 115: 55-59.

- COSTANZO R.M., GRAZIADEI P. P. (1983). A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following the bulbectomy in hamster. *J. Comp. Neurol.* 215: 370-381.

- CRAPPER MCLACHLAN D.R. (1986). Aluminum and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 7: 525-532.

- CREWS L., HUNTER D. (1994). Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspectives in developmental biology* 2(2): 151-161.

- DAHL A.R., HADLEY W.M. (1991). Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants. *Toxicology* 21: 345-372.

- DAHL A.R., LEWIS J.L. (1993). Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 383-407.

- FARBMAN A.I. (1992). *Cell biology of olfaction*. Cambridge University Press, London.

- FERREYRA-MOYANO H., BARRAGAN E. (1989). The olfactory system and Alzheimer's disease. *Intern. J. Neuroscience* 49: 157-197.
- GETCHELL M.L., GETCHELL T.V. (1991). Immunohistochemical localization of components of the immune barrier in the olfactory mucosae of salamanders and rats. *Anat. Rec.* 231: 358-374.
- GHANTOUS H. DENCKER L., GABRIELSSON J., DANIELSSON B.R., BERGMAN K. (1990). Accumulation and turnover of metabolites of toluene and xylene in nasal mucosa and olfactory bulb in the mouse. *Pharmacol. Toxicol.* 66: 87-92.
- GRAZIADEI P. (1966). Electron microscopic observations of the olfactory mucosa of the mole. *J. Zool. Lond.* 149: 89-94.
- GRAZIADEI P.P. (1974). The olfactory organ of vertebrates: a survey. En: *Essays on the nervous system*. Bellairs R., Gray E.G. (eds.). Oxford: Clarendon Press. pp: 191-222.
- GRAZIADEI P.P., MONTI-GRAZIADEI G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory neurons. *J. Neurocytol.* 8: 1-18.
- HADLEY W.M. Y DAHL A.R. (1982). Cytochrome P-450 dependent monooxygenase activity in rat nasal epithelial membranes. *Toxicol. Lett.* 10: 417-422.
- HOLBROOKE E.H., MIELESZKO K.E., SCHOWB J.E. (1995). An immunohistochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 363: 129-146.
- ITAYA S.K. (1987). Anterograde transsynaptic transport of WGA-HRP in rat olfactory pathway. *Brain Res.* 236: 205-214.

- JACKSON R.T., TIGGES J., ARNOLD W. (1979). Subarachnoid space of the CNS, nasal mucosa and lymphatics system. *Arch. Otolaryngol.* 105: 180-184.
- JENNES I. (1989). Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone containing system in the rat brain. *Brain Res.* 482: 97-108.
- KAUER J.S. (1981). Olfactory receptor cell staining using horseradish peroxidase. *Anat. Rec.* 200: 331-336.
- KRISTENSSON K., OLSSON Y. (1971). Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropathol.* 19: 145-154.
- LEWIS J.L., DAHL A.R. (1995). Olfactory mucosa. Composition, enzymatic localization and metabolism. En: *Handbook of olfaction and taste* (Doty R. (ed.)). New York: Marcel Dekker, Inc. pp: 33-52.
- MARUNIAK J.A., LIN P. J., HENEGAR J.R. (1989). Effects of unilateral naris closure on the olfactory epithelia of adult mice. *Brain Res.* 490: 212-218.
- MARUNIAK J.A., SILVER W.L., MOULTON D.G. (1983). Olfactory receptors respond to blood-borne odorants. *Brain Res.* 265: 312-316.
- MEISAMI E. (1976). Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal anosmia. *Brain Res.* 107: 437-444.
- MORGAN K.T., JUANG X.Z., PATTERSON D.L., GROSS L.A. (1984). the nasal mucociliary apparatus. Correlation of structure and function in the rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130: 275-281.
- PELOSI P., BALDACCINI N.E., PISANELLI A.M. (1982). Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochem. J.* 201: 245-248.

- PELLIER V., Y ASTIC L. (1994). Detection of apoptosis by electron microscopy and *in situ* labelling in the rat olfactory epithelium. *Neuroreport* 5: 1429-1432.
- PEVSNER J., REED R.R., FERNSTEIN P.G., SNYDER S.H. (1988). Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family. *Science* 241: 336-339.
- PEVSNER J., SKLAR P.B., SNYDER S.H. (1986). Odorant-binding protein: localization to nasal gland and secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4942-4946.
- ROBERTS E. (1986). Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol. Aging* 7: 561-567.
- SAKANE T., AKISUKI M., YAMASHITA S., NADAI T., HASHIDA M., SEZAKI H. (1991a). The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: the relation to the lipophilicity of the drug. *Chem. Pharm. Bull* 39: 2456-2458.
- SEZAKI H. (1991b). Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 449-451.
- SCHMIDT-NIELSEN N. (1972). *How animals work*. Cambridge: Cambridge University Press.
- SCHMIDT-NIELSEN N. (1990). *Animal Physiology. Adaptation and environment* (IV edition). London: Cambridge University Press.
- SCHOWB J.E., YOUNGENTOB S.L., MEZZA R.C. (1995). Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol.* 359: 15-37.
- SHAFI F., MEISAMI E., MOUSAVI R. (1976). The role of olfaction in the nutrition of rat neonate. *Soc. Neurosci. Abstr.* 2: 162.

- SHAFI F., MEISAMI E., MOUSAVI R. (1980). Retarding effect of early anosmia on growth of the body, brain, olfactory bulbs, and cerebellum and its implications for the development of the olfactory system in the rat. *Exp. Neurol.* 67: 215-233.

- SHAPIRO B.I. (1970). Enzyme histochemistry of embryonic nasal mucosa. *Anat. Rec.* 166: 87-98.

- SHIPLEY M.T. (1985). Transport of molecules from nose to brain: transneuronal anterograde and retrograde labeling in the rat olfactory system by wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase applied to the nasal epithelium. *Brain Res. Bull.* 15: 120-142.

- SILVERMAN A.J., LIYNE I., WITKIN J.W. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*, 2nd. edition. (Knobil y Neill (eds.)). New York, Raven Press. pp: 1683-1709.

- SINGH D.N., NATHANIEL E.J. (1977). Postnatal development of mitral cell perikaryon in the olfactory bulb of the rat. A light and ultrastructural study. *Anat. Rec.* 189: 413-432.

- STEWARD W.B. (1985). Labelling of olfactory glomeruli following horseradish peroxidase lavage of the nasal cavity. *Brain Res.* 347: 200-203.

- SUZUKI N. (1984). Anterograde fluorescent labeling of olfactory receptors by Procion and Lucifer dyes. *Brain Res.* 311: 181-185.

- WEISS D.G. Y BUCHNER K. (1988). Axoplasmatic transport in olfactory receptor neurons. En: *Molecular Neurobiology of the olfactory system* (Margolis F.L. y Getchell T.V. (eds.)). New York: Plenum Press. pp: 217-236.

- WITKIN J.W. AND SILVERMAN A.J. (1983). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the rat olfactory systems. *J. Comp. Neurol.* 218: 426-432.

WITKIN J.W.(1987). Nervus terminalis, olfactory nerve, and optic nerve representation of luteinizing hormone-releasing hormone in primates. En: *The Terminal Nerve (Nervus terminalis). Structure, function and evolution.* (Demski, Schawnzell-Fukuda (eds.)). New York: Ann. New York Academy of Science. pp: 174-183.

CAPITULO I

Revisión de las características más importantes de los armadillos Chaetophractus villosus y Dasypus hybridus. Importancia en la investigación biomédica.

EL MODELO EXPERIMENTAL

Los armadillos *Dasypus hybridus* (Demarest, 1864) y *Chaetophractus villosus* (Demarest, 1804) son mamíferos pertenecientes a la subclase Eutheria, Orden Xenarthra (idem Edentata), Familia Dasypodidae, Subfamilia Dasypodinae, Tribu Euphractini (Storrs, 1971; Wetzel, 1985).

1.1. TAXONOMÍA Y CARACTERIZACIÓN DEL ORDEN XENARTHRA

El orden Xenarthra es un grupo Neotropical pequeño pero morfológicamente variado que consiste en 14 géneros y 30 especies (Wetzel, 1985). Sus representantes vivientes -los armadillos, perezosos y osos hormigueros- son un pequeño grupo remanente de un acervo fósil altamente variado.

Los xenartros retienen un número de caracteres primitivos y carecen de características presentes en la mayoría de los mamíferos actuales. Esto ha llevado a muchos autores a sugerir que los xenartros representan un grupo hermano paralelo a los otros mamíferos placentarios (Mc. Kenna, 1975; Novacek *et al.*, 1988). Así, los xenartros exhiben un amplio rango tanto morfológico como ecológico. Pero a pesar de la gran diversidad de sus modos de vida, existe una buena evidencia de el grupo Xenarthra es monofilético. Lo dicho anteriormente se basa en un gran número de modificaciones esqueléticas inusuales, que incluyen la fusión del isquio a las vertebrae caudales, la presencia de una espina escapular secundaria, la presencia de osificaciones dérmicas y la reducción y/o simplificación de la dentición (Engelmann, 1985; Gaudin y Biewenwer, 1992). También se incluyen en la lista de modificaciones esqueléticas la presencia de vértebras xenartrales (que da nombre al orden) que incluyen una articulación intervertebral suplementaria (Gaudin y Biewenwer, 1992).

Wetzel (1985) divide a los xenartros en dos grupos: vermilinguas (osos hormigueros) por un lado y perezosos y armadillos por otro. Estos últimos, a diferencia de los vermilinguas, presentan: dentición, lengua sin forma de cilindro

delgado, cola de largo variable sin pelos salvo cuando es extremadamente corta, yugal de tamaño normal, pterigoides separado sin formar parte del margen posterior del paladar.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA DASYPODIDAE

Los miembros de la familia Dasypodidae son endémicos de la región neotropical, a excepción de *Dasypus novemcinctus* que invadió América del Norte (Reig, 1981). Se extienden desde el sur de Estados Unidos hasta el estrecho de Magallanes (Wetzel, 1982).

Los dasipódidos o armadillos presentan un caparazón dérmico sobre el dorso del cuerpo y la cabeza; miembros anteriores más cortos que la cabeza más el cuerpo; cola conspicua y arco zigomático completo (Wetzel, 1985).

Se caracterizan por poseer un caparazón óseo cubierto por escamas dérmicas. El caparazón está generalmente dividido en cuatro regiones: escudo cefálico, escapular, dorsal y pélvico. Estos escudos están compuestos por anillos o bandas transversas, algunas de ellas móviles. El número de bandas, forma, tamaño y escultura de las placas es característico de cada especie (Estecondo, 1995). La parte ventral del cuerpo y la superficie de los miembros están cubiertas por una piel suave y cubierta de pelos (Walker, 1968).

La nariz puede ser corta o larga dependiendo de la especie, y poseen además una lengua larga y protrusible. Los miembros anteriores poseen tres, cuatro o cinco dedos con garras curvas, y los miembros posteriores presentan cinco dedos que también poseen garras (Walker, 1968).

Son animales macrosmáticos, con el sentido del olfato muy desarrollado (Estecondo, 1995). Según Clark (1951), *Dasypus novemcinctus* localiza su alimento exclusivamente con el sentido del olfato y de esta forma localiza también sus enemigos. Con respecto al sentido del gusto, se ha observado que éste es diferente a otros animales estudiados (Maller y Kare, 1967). En efecto esta especie es

indiferente a soluciones dulces o saladas preferidas por otros mamíferos y a soluciones de quinina rechazadas por otros (Casanave, 1989).

Son animales terrícolas, grandes cavadores, de hábitos territoriales y vida solitaria, excepto durante la época de apareamiento (Estecondo, 1995).

La familia Dasypodidae presenta ocho géneros vivientes que abarcan veinte especies que comprenden los animales vulgarmente conocidos como "mulitas", "pichis", "peludos", "quirquinchos", "matacos" y "tatúes" (Casanave, 1989).

El interés científico en la familia podría deberse a las características únicas que presentan en su anatomía y fisiología y además, por su posición biogeográfica y su antigüedad (Wetzel, 1985). Por lo tanto, considerando los aspectos anatomofisiológicos de los Dasypodidos, han sido considerado de enorme importancia en investigación biológica y médica como modelos para diversas clases de investigaciones.

1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA ESPECIE *DASYPUS HYBRIDUS*

El armadillo *Dasypus hybridus*, armadillo de siete bandas, es nativo de la República Argentina. Se lo conoce vulgarmente como "tatú" o "mulitas", debido al parecido que tiene con una pequeña mula, por la forma de sus orejas y por el trote con que se desplaza (Cuba Caparo, 1979) (Fig.1.1).

Se distribuyen en el este de Paraguay, sur de Brasil, Uruguay y en Argentina desde Misiones hasta Río Negro.

Los animales adultos, cuyo peso oscila de 1,600 a 2,000 Kg de peso, miden aproximadamente 50cm, desde el hocico hasta la punta de la cola.

Estos animales poseen un caparazón que los cubre totalmente y se halla dividido en cuatro segmentos. Como se ha mencionado anteriormente poseen siete placas móviles unidas unas a otras por pliegues cutáneos desprovistos de escamas. Carecen de pelos en la parte superior y es muy escaso en la región ventral (Walker, 1968). El cuerpo de estos armadillos es ancho pero deprimido lateralmente. Los miembros anteriores presentan cuatro dedos, siendo el del medio el más largo,

mientras que los miembros posteriores presentan cinco dedos (Walker, 1968). Presentan, además, dentición difiodonte (Casanave, 1989).

Las hembras, a diferencia de otras especies de dasipódidos, presentan mamas abdominales (Casanave, 1989). Las características reproductivas más importantes están representadas por la posibilidad de presentar poliembrionía e implantación retardada (Fernández, 1913; Storrs, 1971) (Ver más adelante).

Poseen hábitos nocturnos, aunque también salen de sus nidos durante el día para alimentarse, tomar sol y bañarse. En condiciones naturales se alimentan exclusivamente de pequeños artrópodos, especialmente hormigas (Walker, 1968). Son cavadores muy activos. Emiten sonidos cuando son molestados. Su carne se emplea para la alimentación humana en zonas rurales (Walker, 1968).

1.3.1. ARMADILLO *DASYPUS HYBRIDUS* COMO MODELO DE INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA Y MÉDICA.

A la luz de sus características tanto anatómicas como fisiológicas y considerando especialmente su peculiar tipo de reproducción y la posibilidad de obtener gemelos homocigotas, estimamos que estos animales constituyen el modelo ideal para dilucidar y discriminar:

- i) El aporte del acervo genético en las características anatomo fisiológicas de un organismo.
- ii) El papel sobre dicho aporte genético de influencias ambientales, como ser alteración del ritmo luz-oscuridad, temperatura, diversas clases de estímulos sensoriales, etc.
- iii) La influencia sobre el acervo genético de diferentes procedimientos experimentales, como ser administración de drogas, tóxicos, intervenciones quirúrgicas, ablaciones, etc.

Pasaremos a detallar las características más importantes que lo proponen como un excelente modelo para la investigación biológica y médica

1) Poliembrionía

En el género *Dasypus* se presenta el fenómeno de poliembrionía monocigótica, único en los vertebrados.

El descubrimiento de la poliembrionía fue realizado por Miguel Fernández en 1915 en una monografía escrita en alemán titulada "Die Entwicklung der Mulita".

En las primeras etapas del desarrollo se observa que, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los mamíferos, existe una inversión de las hojuelas blastodérmicas, es decir, que el endoblasto recubre al ectoblasto.

Suspendida la vesícula de la mucosa uterina por el trofoblasto se forma dentro del mismo una cavidad: la cavidad trofoblástica. En la cámara ectodérmica (Fig. 1.2), que se halla completamente cerrada, se inician una serie de notables sucesos: se adelgaza la pared ectoblástica proximal y distal en tanto se diferencia una zona anular de largas células cilíndricas. Posteriormente, y esto exclusivamente en la mulita, esa vesícula hasta ahora única e indivisa, por proliferación de las células ectoblásticas constituirá tantos sacos ciegos como embriones se diferencien, esto es de 7 a 12.

Los sacos ciegos crecen hasta formar largos tubos en forma de dedos de guante, que parten de la vesícula amniótica primaria (Fig. 1.3), la que pasará ahora a ser cavidad amniótica común, para distinguirla de las cavidades individualizadas en las digitaciones, que comunicarán naturalmente con aquella.

Cada uno de los embriones se desarrollará individualmente, pero todos estarán dentro de un gran saco vitelino común que encerrará la totalidad de los embriones en formación.

El ectodermo formará la placa medular embrionaria en que se estructurará la línea primitiva. Así, puede establecerse la orientación del embrión con la región cefálica hacia la cavidad amniótica común y la caudal hacia la trofoblástica.

Diferenciada cada vesícula embrionaria hacia la región caudal de cada uno de los embriones, comenzará a proliferar el mesodermo, que constituirá el pedículo en contacto con el trofoblasto. A él llega el amnios que recubre a cada embrión formando una prolongación caudal tubuliforme que constituye, junto con el mesodermo, el "pedículo de adhesión" (formación solo conocida en el hombre y en el mono). Aparece en este momento el alantoides. Así, se va bosquejando un embrión

con particularidades comunes a todos los mamíferos. Los canales amnióticos se alargan y se van estrechando durante el crecimiento, apareciendo como cordones que atan a los embriones a una especie de nudo central representado por la reducción de la cavidad amniótica común (Fig. 1.4). La evolución de cada embrión es la misma que para las formas de monoembrionía, con la particularidad de provenir todos los embriones de un único huevo fecundado. (Biraben, 1951). Esta característica, especial en la producción de gemelos (Figs. 1.5a y 1.5b), es de gran importancia para los trabajos sobre histocompatibilidad, inmunidad, trasplantes, herencia, biología del desarrollo.

2) Presentan médula ósea en las placas dérmicas de las bandas dorsales, las cuales tienen un ciclo hemopoyético que es afectado por los cambios estacionales.

3) Temperatura corporal baja (32° - 34°C) (Burchfield *et al.*, 1976; Casanave y Affanni, 1994).

4) Debido a la baja temperatura corporal se los considera un modelo de vital importancia para el estudio de la lepra humana, ya que serviría como reservorio de *Mycobacterium leprae* (que crece y se multiplica mejor a bajas temperaturas) (Storrs, 1971a; Storrs 1971b; Job *et al.*, 1988; West *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989; Job *et al.*, 1989; Barret y Naiff, 1990; Job *et al.*, 1990; Barr *et al.*, 1991; Truman *et al.*, 1991; Dhople, 1991; Dhople *et al.*, 1992; Job *et al.*, 1992; Rodde *et al.*, 1992).

5) Son reservorios de *Trypanosoma cruzi* (Barr *et al.*, 1991).

6) Son susceptibles a la inoculación de microorganismos productores de diversas enfermedades humanas (fiebre ondulante, tifus exatemático, triquinosis, tifus murino y esquistosomiasis) (Malgalhaes y Rocha, 1944; Storrs, 1971a).

7) Los embriones de las hembras preñadas son susceptibles a la teratogénesis por la acción de la talidomida (Storrs, 1971b).

8) La ovulación puede ser detectada mediante la presencia de 10 ng/ml o más de progesterona en el plasma. Esta cantidad de progesterona es comparable a la hallada en humanos durante la fase luteínica.

Los niveles de progesterona disminuyen después del parto (Peppler y Stone, 1976; Peppler y Stone, 1980).

9) Animales pertenecientes al género *Dasyus* poseen implantación diferida, es decir, el huevo que se divide para la formación del blastocito no se une de inmediato

al fundus uterino, sino que se halla en el fluido uterino permaneciendo en estado de diapausa embrionica (dormición) durante 2-4 meses. Además estudios con experiencias estresantes, durante el período en el cual el blastocito adormecido se implanta en el útero, han demostrado prolongar el período usual de 2-4 meses de diapausa embrionica a uno o dos años. Esta estrategia no ha sido reportada previamente dentro de los mamíferos.(Enders, 1981; Storrs *et al.*, 1989; Storrs, 1989).

La diovlación de los armadillos es rara, sin embargo, es posible que dos huevos fertilizados sean producidos por cada hembra durante un mismo año, y que uno sea almacenado durante aproximadamente 15 meses y el otro se desarrolle normalmente.

Alternativamente, el huevo podría haber sido producido en años sucesivos, y que los últimos sean fertilizados por el espermato que permanece viable en los tractos reproductivos de las hembras. Así, la activación tardía del embrión combinada con la diovlación o la fertilización tardía provee hipótesis de trabajo que pueden ser utilizadas en el diseño de estudios sobre el almacenamiento in vivo de embriones y gametas. (Storrs *et al.*, 1988).

10) Debido al tipo de desarrollo de estos animales, que normalmente involucra la producción de individuos homocigotas, son aptos para el estudio de factores, distintos del pool genético, que intervengan en el proceso de diferenciación. Esto se basa en que animales con complementos genéticos idénticos podrían tener órganos que difieran en tamaño, cantidad de hormonas, etc., debido a diferencias en el contenido citoplasmático (Storrs, 1971a).

11) Son importantes en estudios de trasplantes debido a que en cada implantación se producen cuatro individuos derivados de un único cigoto (Anderson y Benirschke, 1962).

12) En los estudios histológicos realizados sobre el sistema inmune de los *Dasypus novemcinctus*, se observó que sus órganos linfoides son semejantes a los de otros mamíferos. Sin embargo, Cuba Caparo (1976) observó la existencia de un pigmento pardo amarillento en los macrófagos de los nódulos linfáticos. *Chaetophractus villosus* también posee dicha característica.

13) Durante la vida fetal sus glándulas adrenales son de gran tamaño (Mosera, 1962); sin embargo, no serían un modelo apropiado para el estudio de la unidad feto-placentaria humana, ya que sus mecanismos endócrinos son aparentemente simples. Pero podrían ser un excelente modelo para el estudio de los factores tróficos hipofisarios del feto, los cuales a su vez controlan la producción de los esteroides adrenales, tales como los gonadales en el transcurso de la gestación (Nakakura *et al.*, 1985).

14) Poseen una tasa metabólica baja (Burchfield *et al.*, 1976).

15) En estudios varios se ha observado que luego de estímulos eléctricos presentan una recuperación espontánea de la fibrilación ventricular. En diversos experimentos se vieron 304 fibrilaciones en un total de 23 armadillos (*Dasypus novemcinctus*). Luego de cada episodio, el corazón se recuperó espontáneamente sin la necesidad de masajes cardíacos o respiración artificial. (Szabuniewicz, 1970).

16) Son portadores de rickettsias (Amescua, 1978).

17) Se describió la presencia de rabia adquirida naturalmente en un ejemplar de *Dasypus novemcinctus*.

18) Son utilizados para estudios de las diferentes fases del sueño a distintas temperaturas, aprovechando su carácter de animales homeotermos imperfectos (Van Twyver y Allison, 1974).

19) Poseen gran habilidad para recuperarse de una deuda de oxígeno después de la anoxia (Scholander *et al.*, 1943).

Cabe aclarar la dificultad que tienen los investigadores en el mantenimiento y reproducción de algunas especies del género de los *Dasypus*, ya que se han encontrado diversos problemas sanitarios relacionados con el proceso de adaptación. Sin embargo, actualmente se han desarrollado sistemas de jaulas, que minimizan la ocurrencias de heridas que pudiesen ocurrir en jaulas metálicas (Gilbert y Giacometti, 1972; Burchfield *et al.*, 1976), así como también sistemas de semicautividad (ver Capítulo II).



FIGURA 1. 1. Armadillo *Dasypus hybridus* (adulto).

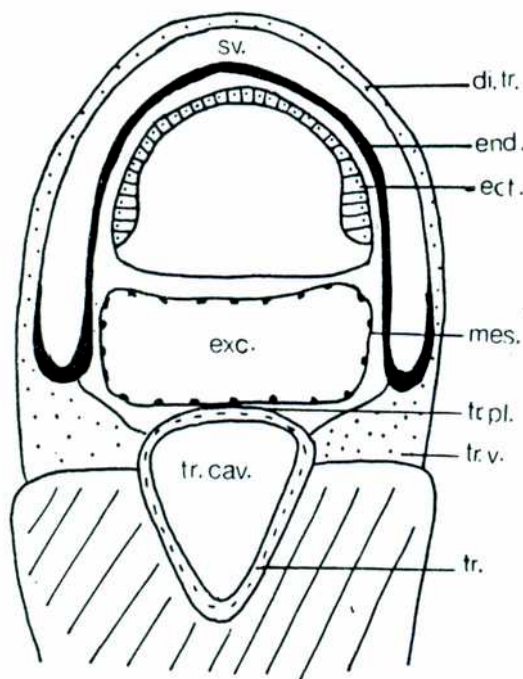


FIGURA 1. 2. Corte longitudinal de una vesícula embrionaria muy joven. di.tr. diplotrofoblasto, ect: ectodermo, end: endodermo, exc:exoceloma, mes: mesodermo, muc. ut.: mucosa uterina, s.v.: saco vitelino, tr. cav.: cavidad trofodermal. (Extraído de Birabén, 1951).

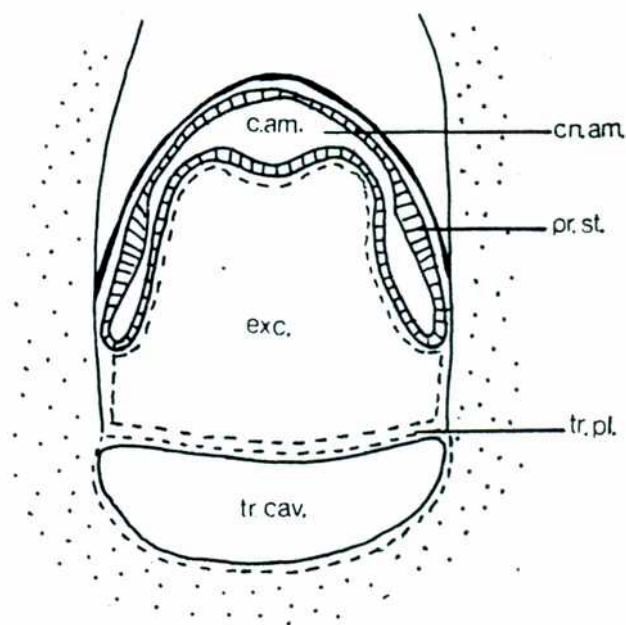


FIGURA 1.3. Corte esquemático de una vesícula embrionaria en un estadio más avanzado. c. am.: cavidad amniótica común. cn.am.: canal amniótico, exc.: exoceloma, pr.st.: línea primitiva, tr. cav.: cavidad trofodermal, tr. pl.: placa trofodermal. (Extraído de Birabén, 1951).

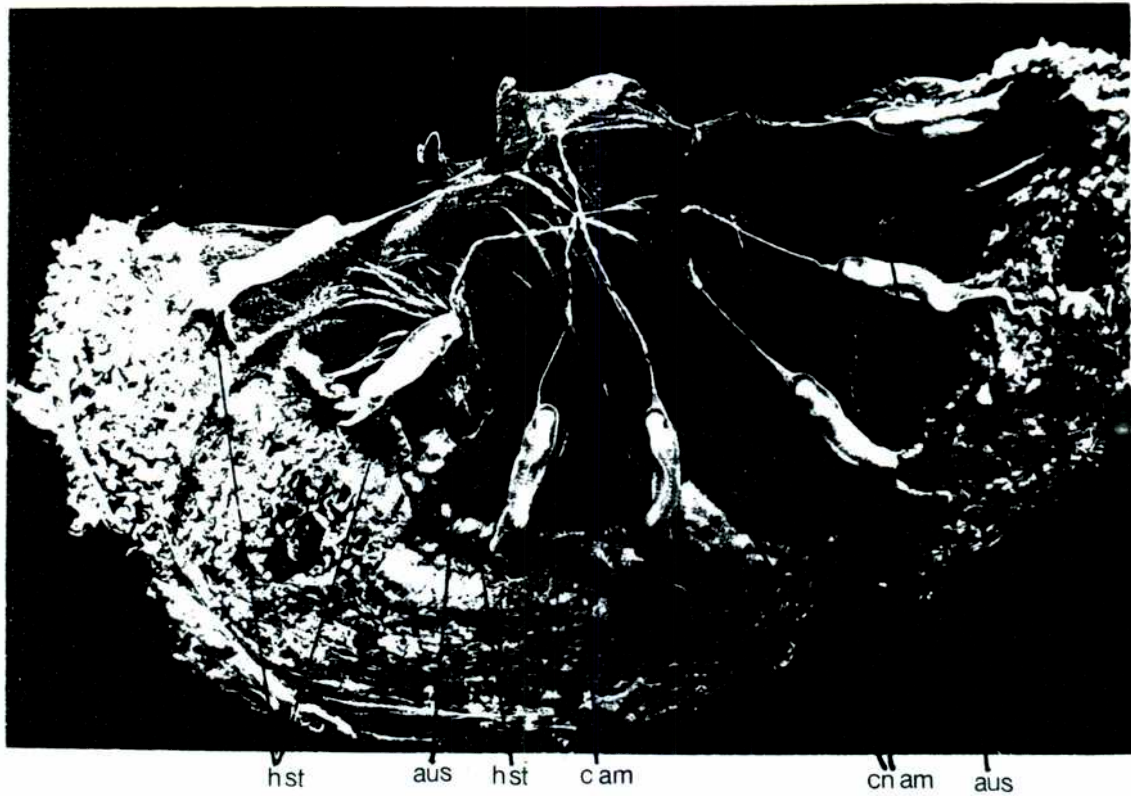


FIGURA 1.4. Vesícula embrionaria extendida, lado interno (A=5x)

c.am.: cavidad amniótica común, cn. am.: canal amniótico, h. st.: pedículo de adhesión, s.v.: saco vitelino, tr.: trofoderma, v.v.: vasos vitelinos. (Extraído de Fernández, 1913).

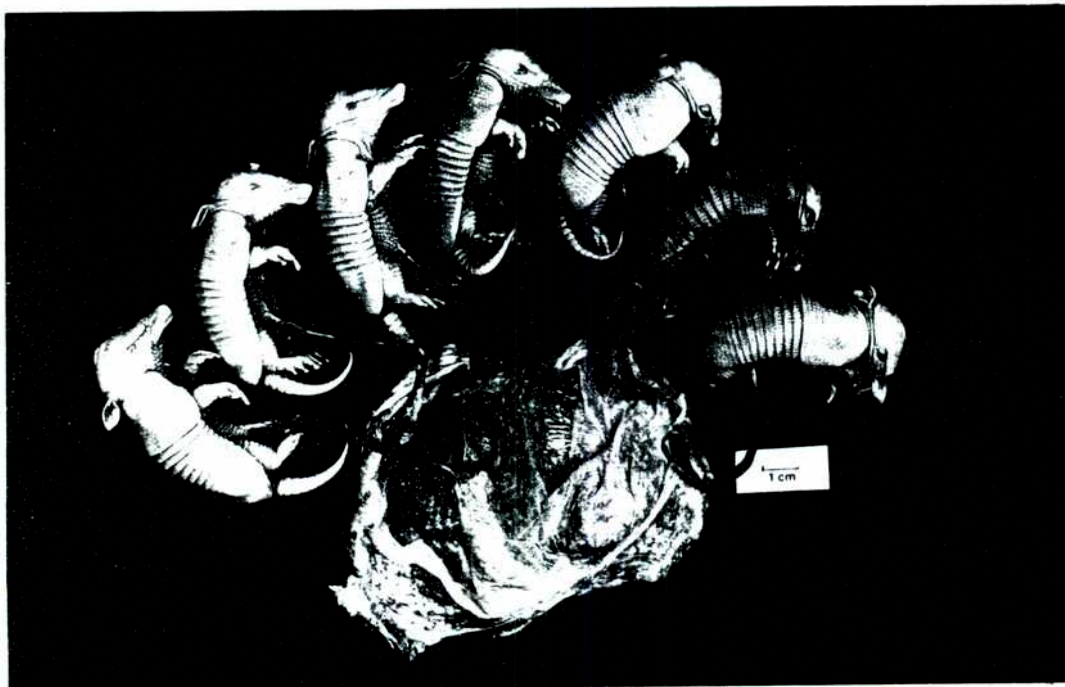


FIGURA 1.5a. Embriones de *Dasypus hybridus*. Obsérvese como se unen a la placenta a través del cordón umbilical (Foto original).

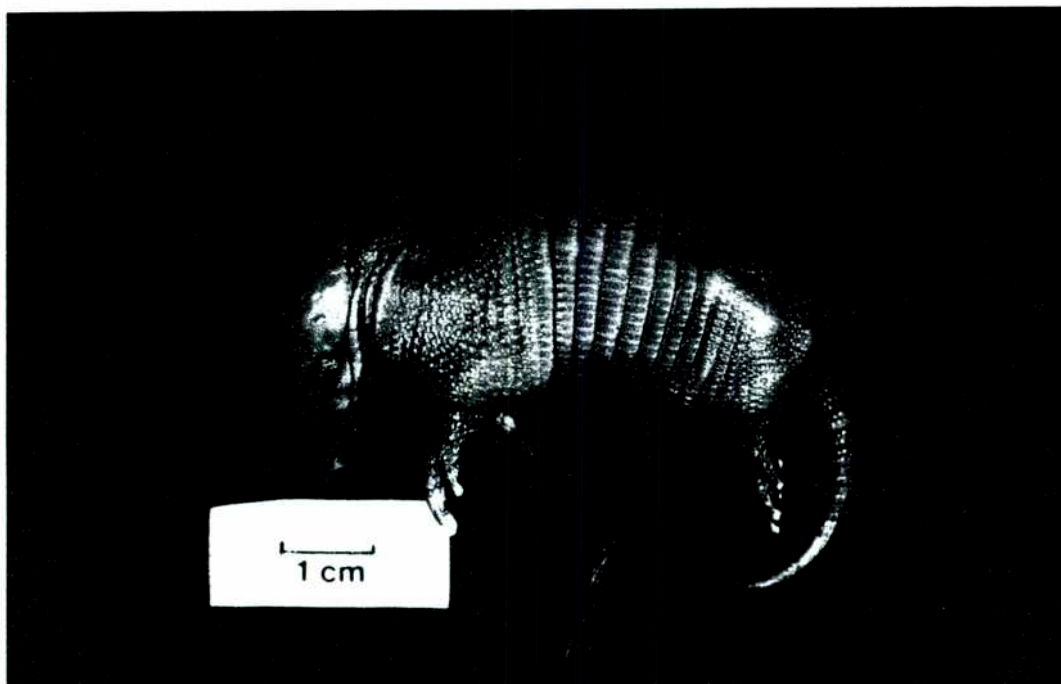


FIGURA 1.5b. Detalle de un embrión de *Dasypus hybridus* (Foto original)..

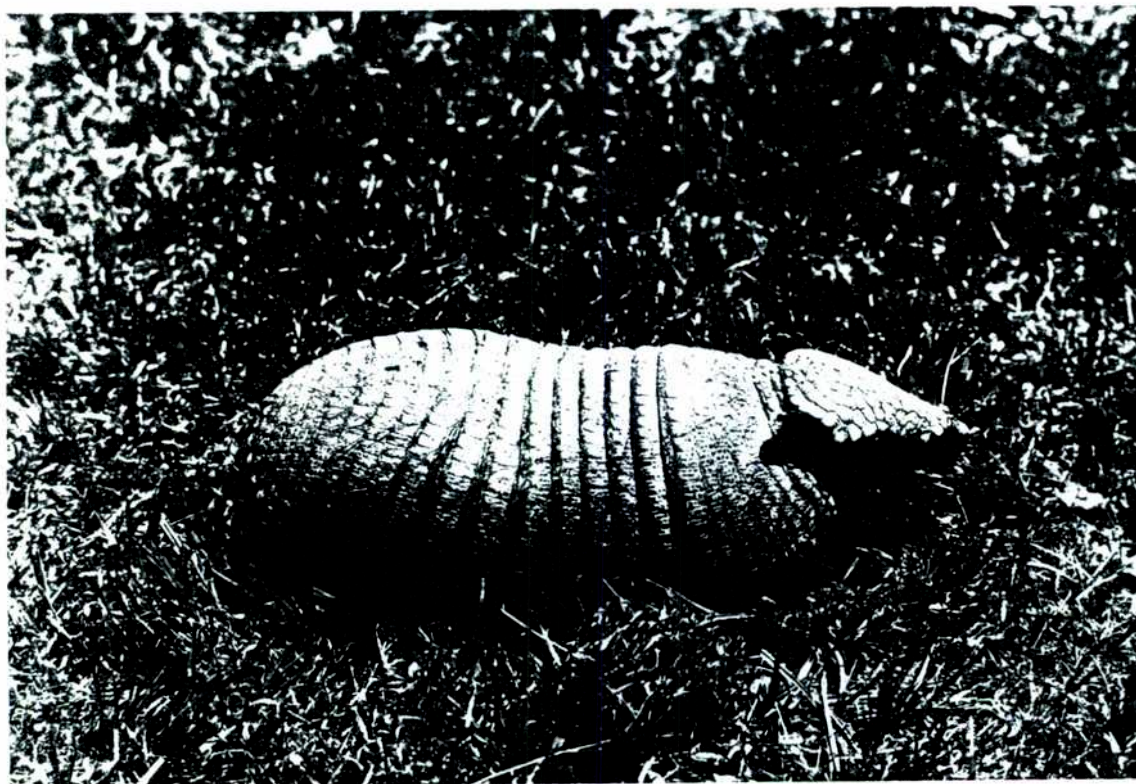


FIGURA 1.6. Armadillo *Chaetophractus villosus*.

CAPITULO II

Adaptación a las condiciones de cautiverio del armadillo Dasypus hybridus. Tareas realizadas referentes al alojamiento, alimentación, sanidad, reproducción y manipulación en cautividad del armadillo Dasypus hybridus

INTRODUCCION

Pasamos a continuación a dar una idea de las enormes dificultades vencidas para poder disponer de un número apreciable de animales de experimentación mantenidos en condiciones de semicautividad.

Muchos investigadores se han mostrado renuentes a utilizar la mulita *D. hybridus* como animal no tradicional en la investigación biológica y médica. Algunas razones por las cuales no se los ha adoptado como animales de laboratorios no tradicionales hasta el momento han sido:

- falta de adaptación a las condiciones de bioterio, con un altísimo porcentaje de mortalidad.
- enfermedades parasitarias.
- susceptibilidad a las infecciones.
- hábitos cavadores inusuales, lo cual dificulta su supervivencia en cautividad.
- dificultades reproductivas en condiciones de bioterio.
- necesidad de un espacio vital mínimo suficientemente amplio, lo cual requiere instalaciones especiales.
- dificultad para realizar ensayos de control cotidianos.

En el presente trabajo se detallarán las medidas necesarias, diseñadas y probadas, para la adecuada mantención de estos animales en el bioterio.

MATERIALES Y METODOS

2.1 - ORIGEN DE LOS ANIMALES

Los animales fueron obtenidos en diferentes campañas que se han realizado en Tandil, Cacharí y Bahía Blanca (Pcia. de Bs. As., Argentina).

Las campañas se organizaron en los meses Septiembre, Diciembre y Febrero, obteniéndose un mayor número de animales en Diciembre y Febrero.

El traslado de los animales se realizó en cajones de madera, especialmente contruidos para este fin, provistos con paja para mayor comodidad de los animales.

2.2- ALOJAMIENTO EN CAUTIVERIO

Sus características anatómicas inusuales y el particular diseño de sus cuevas, requirió un cuidado particular a la hora de diseñar el alojamiento.

Las jaulas estandares para otro tipo de animales no resultaron aptas debido a que los animales se cortan la nariz, las patas y la cola con los barrotes, lo cual a veces origina posibles infecciones que generalmente terminan con la muerte del animal. Además, los diferentes ensayos con estas especies demuestran que requieren un espacio mínimo bastante grande para su normal desarrollo en cautiverio.

La bibliografía cita la experiencia realizada en colonias de *Dasyus novemcinctus*. Burchfield *et al.* (1976) reportaron el uso de jaulas de polietileno que se venden para el traslado de animales domésticos. Por otra parte, Gilbert y Giacometti (1972) propusieron el uso de jaulas hechas con tablas de madera (18' x 4' x 4'). Estas jaulas se complementan con el arenado del piso, el agregado de viruta, la instalación de un desagüe, y además la adición de un fardo de heno para que aniden. En cada jaula se le agrega un cobertizo más pequeño (4' x 2' x 1/2') y una caja con arena que sirva como área de desecho para los animales (Talmage *et al.*, 1954).

En base a datos preliminares suministrados por el INMPAZ en su colonia de animales de Azul, hemos adaptado condiciones similares a nuestro bioterio.

Se utilizaron jaulas de grandes dimensiones (2m de ancho por 4m de largo), con piso de cemento, paredes de mampostería y alambre tejido y techo de este último material (Figs. 2.1, 2.2). Estos "cubiles" también cuentan con una zona totalmente techada (Fig. 2.3). En estas zonas se construyeron cobertizos de cemento (80x70x100cm) con una entrada trampa de luz para que los animales puedan anidar

(Fig. 2.4). Estos cobertizos se llenan con paja y se mantienen totalmente a oscuras a fin de proporcionar un lugar similar a las cuevas en las cuales viven naturalmente (Fig.2.5).

Cada jaula está equipada con una pileta llena de agua, donde los animales se pueden bañar y una bandeja con tierra que los animales usan para defecar y orinar (Fig. 2.2).

Los cubiles se barren una vez por semana y se baldean con lavandina cada 15 días. La paja de los cobertizos se cambia cada 20 días aproximadamente.

En cada uno de estos "cubiles" se alojan como máximo 4 animales.

2.3- ALIMENTACIÓN EN CAUTIVERIO

La alimentación de los armadillos silvestres consiste aproximadamente en un 75% de insectos, 15% de material animal y 10% de material vegetal (Walker, 1968). En cautiverio se han probado numerosas dietas. Watson (1964) desarrolló una dieta a base de carne cruda y leche. También se ha utilizado alimento para perros de uso comercial (Anderson y Benirshke, 1971), así como también comida para gatos y perros suplementadas con vitaminas, minerales, huevos, hígado y frutas (Storrs, 1971; Gilbert y Giacometti, 1972). En el centro de cría de animales de Azul la dieta consiste en leche y alimento para perros.

En base a nuestra propia experiencia nos hemos decidido por una dieta que consiste básicamente en: 500g de alimento para perros con un alto índice de proteínas (26%), 250 ml de leche, agua, 150g de carne picada (las medidas anteriormente indicadas son para 5 armadillos). Dos veces por semana se le agrega un huevo y también frutas. A la preparación diaria del alimento se le agrega un suplemento de vitaminas, aminoácidos y minerales

Los animales se alimentan con comida fresca todos los días.

2.4- SANIDAD EN CAUTIVERIO

Estas especies son muy susceptibles al estrés del cautiverio, especialmente si las condiciones en las cuales se los mantienen no son las adecuadas, lo cual hace que este factor sea el principal causante de mortandad en una colonia. Además, estos animales son muy propensos a cortaduras en el hocico, cola y patas, lo cual puede provocar infecciones. Si esto ocurre, utilizamos habitualmente antibióticos y soluciones antisépticas y desinfectantes, de uso corriente en Medicina Veterinaria. Es importante mantener a la colonia aislada de otras especies para impedir posibles contagios de éstas últimas.

2.5- REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO

La reproducción es uno de los factores más difíciles de manejar en especies silvestres mantenidas en condiciones de cautiverio.

La deficiente calidad del alojamiento y la alimentación se evidencian inmediatamente en patologías reproductivas. Por la misma razón, la obtención de reproducción en cautiverio es una contraprueba de la eficiencia de las medidas nutricionales y ambientales implementadas.

En *D. mexicanus* en Texas y Florida, la ovulación ocurre en el verano, la implantación del blastocisto en otoño y la parición en Marzo y Abril (Galbreath, 1985).

En cuanto a *D. hybridus* hemos observado en las diferentes campañas hembras preñadas en Septiembre y la presencia de crías en el campo entre Noviembre y Diciembre.

Según datos obtenidos en el campo, en Marzo comienza la temporada de apareamiento y las parejas permanecen juntas hasta Octubre aproximadamente. En nuestra colonia, hemos apareado parejas que consideramos las mejores adaptadas a la vida en cautividad. En el Instituto de Neurociencia hemos obtenido cría durante dos años consecutivos.

2.6- ADAPTACIÓN DE LOS EJEMPLARES AL CAUTIVERIO

La evolución de los especímenes traídos del campo se controló principalmente por observaciones diarias de cada uno de los individuos. Se los pesó una vez por semana para confeccionar la curva de crecimiento de cada animal durante los dos primeros meses de su vida en cautividad.

Es importante destacar que para una correcta adaptación a la vida en cautiverio, es condición primordial el colocar animales ya adaptados junto a los nuevos ejemplares recién traídos del campo, para que éstos últimos aprendan fundamentalmente a alimentarse en las nuevas condiciones de vida.

Actualmente en nuestra colonia, fundada hace tres años, contamos con 6 machos adultos, 2 hembras adultas, 4 machos jóvenes y 1 hembra joven, la mayoría de los cuales llevan dos o tres años de vida en cautiverio.

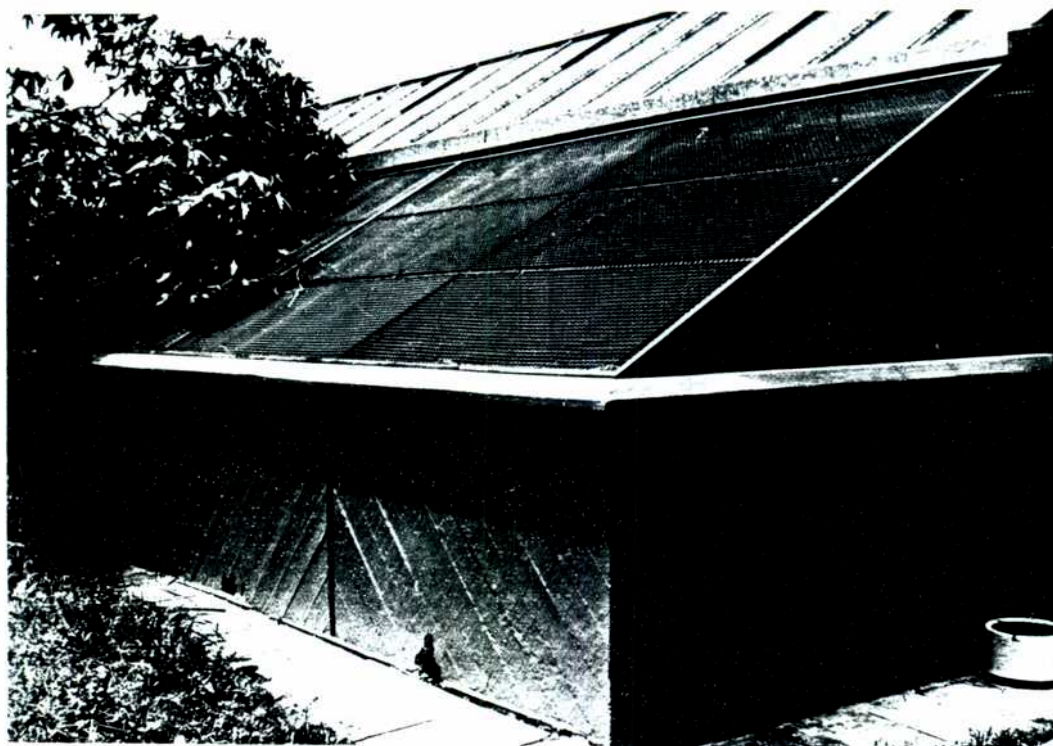


FIGURA 2.1. Vista externa de los cubiles.



FIGURA 2.2. Vista interna de los cubiles

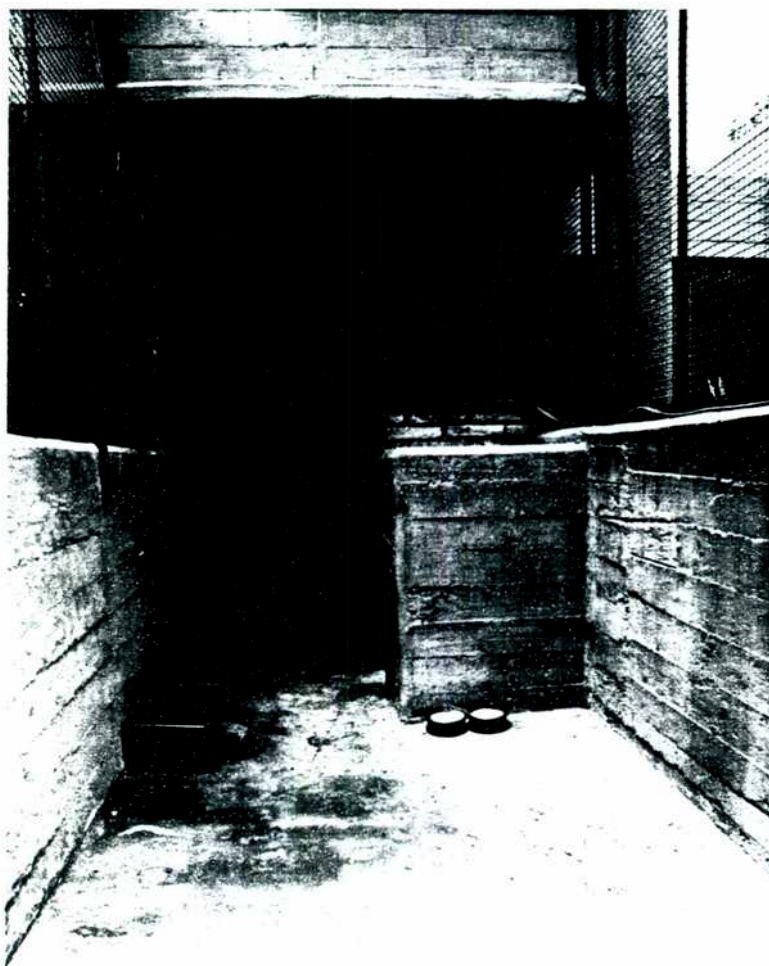


FIGURA 2.3. Vista interna de los cubiles, en la cual se aprecia la zona techada.

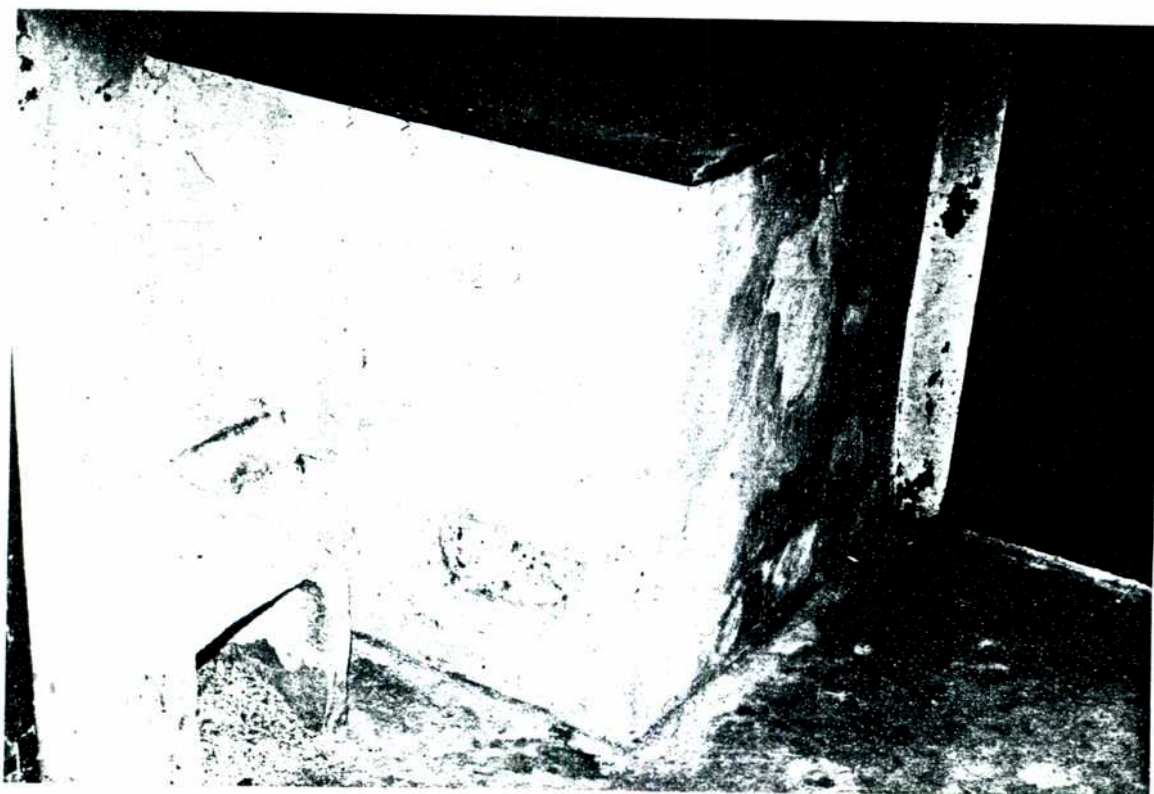


FIGURA 2.4. Vista externa de los cobertizos



FIGURA 2.5. Vista interna de los cobertizos.

RESULTADOS

La adaptación de estos animales a las condiciones de cautividad se evaluó considerando observaciones diarias en cuanto a comportamiento, alimentación y estado de salud general de los animales. Se observó que los animales realizan sus actividades diarias en forma absolutamente normal. Estas actividades consiste en alimentarse correctamente, bañarse, asolearse, etc. Lo expresado anteriormente indica una buena adaptación al cautiverio.

Además se realizaron las curvas de peso de cada animal desde su captura hasta los cuatro meses después de su ingreso al bioterio. Los datos de los pesos se resumen en las tablas I, II y III y las curvas correspondientes se observan en las figuras 2.6, 2.7, 2.8, 2.9.

Analizando las curvas de peso podemos resumir la adaptación de los animales en cuatro situaciones distintas:

- a) Animales adultos recién capturados sufren una caída del peso que culminan con la muerte del animal.
- b) Animales adultos recién capturados sufren inicialmente una caída de peso de la cual se reponen favorablemente. Esto indica una correcta adaptación.
- c) Crías recién capturadas no registran caídas de peso como el caso de animales adultos y se observa una evolución favorable de su crecimiento en condiciones de cautiverio.

Tabla 2.I. Peso de *D. hybridus* (primera captura)

EJEMPLAR DIAS	96	σ2	σ3	σ8
1	570	1510	1710	1560
8	610	1520	1760	1610
26	840	1510	1810	1710
33	800	1640	1750	1700
48	1060	1710	1910	1895
67	1110	1810	1910	1910
81	1210	1910	1910	1910
98	1160	1960	1960	1910
118	1318	1960	1910	2010
155	1810	2010	1810	2040

TABLA 2.II. Peso de *D. hybridus* (segunda captura)

EJEMPLAR DIAS	♀ 9	♂ 10	♂ 11
1	1810	1960	720
3	1710	1810	625
5	1550	1750	700
12	1510	2060	930
25	1710	2210	1110
47	1810	2210	1110
62	1960	2360	1310
85	2210	2260	1360
102	2510	2410	1610
130	2460	2410	1700

Tabla 2.III. Peso de *D. hybridus* (tercera captura)

EJEMPLAR DIAS	♀ 16	♀ 19	♂ 12	♂ 13	♂ 14	♂ 23	♂ 24
1	1140	1810	1610	890	930	2260	1010
13	1310	1610	1810	1010	910	1960	1210
33	1410	1460	1810	1110	1010	2110	1310
70	1610	2410	2110	1710	1610	2510	1810
96	1710	2410	2300	1810	1710	2500	1900
125	1700	2500	2410	1900	1690	2410	2100

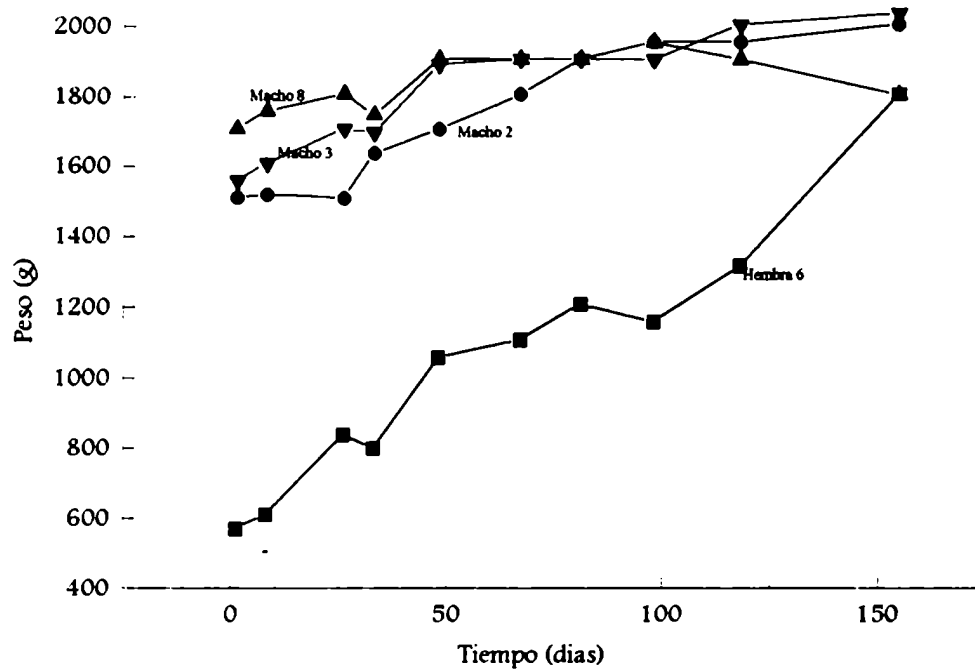


FIGURA 2.6. Curvas de pesos de los animales de la primera captura de *D. hybridus*.

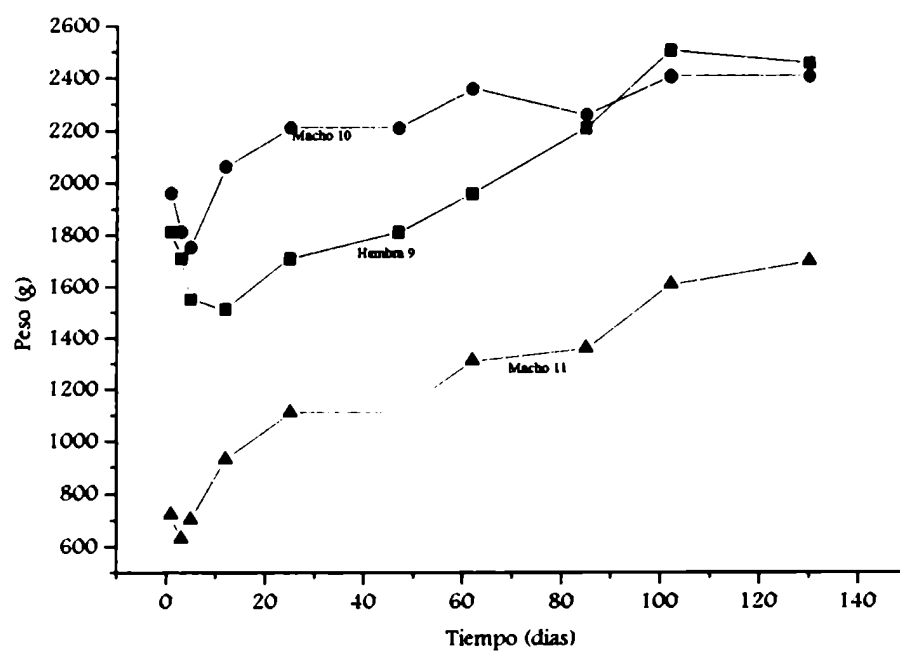


FIGURA 2.7. Curvas de pesos de los animales de la segunda captura de *D. hybridus*.

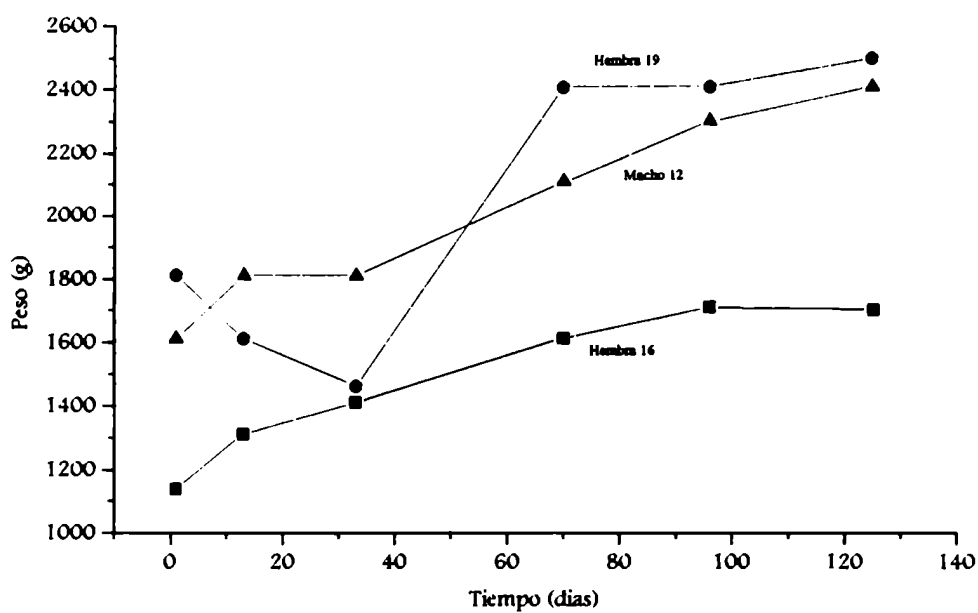


FIGURA 2.8. Curvas de pesos de los animales de la tercera captura de *D.hybridus*.

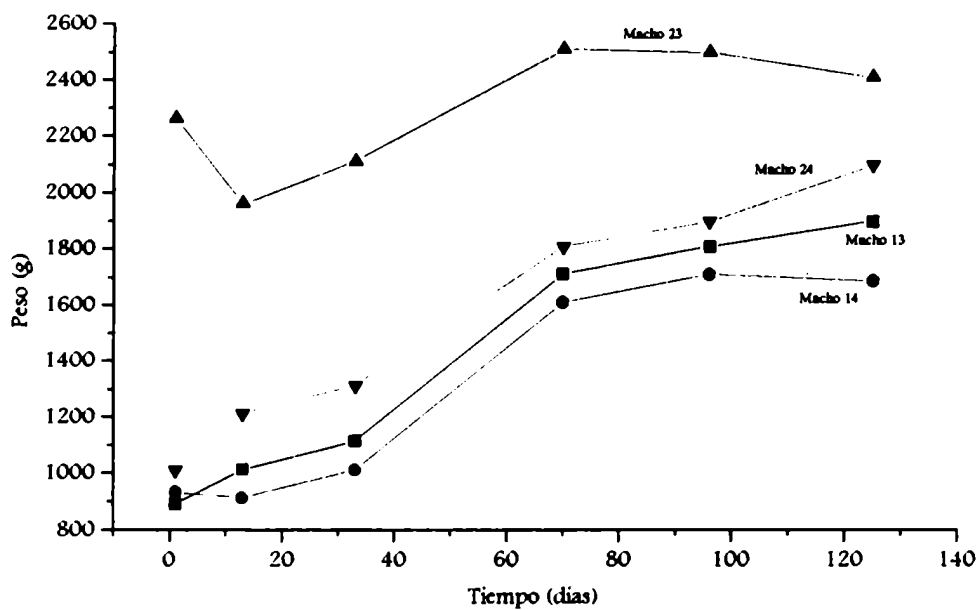


FIGURA 2.9. Curvas de pesos de los animales de la tercera captura de *D.hybridus*.

DISCUSION

A partir de los resultados obtenidos en cuanto a la conservación en cautiverio del armadillo *Dasypus hybridus*, se podría concluir que las condiciones adoptadas por nuestro bioterio son las adecuadas para la correcta mantención de los animales. Esto se evidencia por las curvas de peso indicativas de un aumento de peso en los animales más pequeños y una mantención e incluso un aumento de peso en los animales adultos. Además, a partir de la construcción de los cubiles hemos tenido porcentajes de mortalidad mínimos.

A partir de estos resultados y de las ventajas que representan los armadillos como posibles modelos para la investigación biomédica, se podría incluir a la especie *D. hybridus* como animales de laboratorios no tradicionales para diversos estudios de índole biomédica.

CAPITULO III

*Estudio estructural de la cavidad nasal de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus*, con especial atención a la mucosa olfatoria.*

INTRODUCCION

Comenzaremos esta parte de la Tesis haciendo una revisión de los conocimientos actuales sobre la estructura de la cavidad nasal con especial referencia en la mucosa olfatoria.

GENERALIDADES SOBRE EL SISTEMA OLFATORIO

El sentido del olfato tiene fundamental importancia en la mayoría de las especies animales. En los vertebrados, interviene en reacciones comportamentales, especialmente en aquellas asociadas con la alimentación y el cortejo (Dryer y Graziadei, 1994).

A pesar de su organización, aparentemente simple y de la presencia de un único tipo de célula sensorial, el epitelio olfatorio es capaz de realizar una fina discriminación sensorial. Los receptores olfatorios responden a sustancias estimulantes en muy bajas concentraciones y además, son sensibles a un rango enorme de sustancias odoríferas. Mediante estudios electrofisiológicos se ha sugerido que la discriminación de los diversos estímulos olfatorios dependen de la existencia de células olfatorias receptoras que electrofisiológicamente responden de diferentes formas y de la distribución espacial de los receptores (Farbman, 1992).

Las neuronas olfatorias son especialmente peculiares debido a que son las únicas neuronas sensoriales primarias cuyo cuerpo celular se halla en contacto con el medio externo. En los invertebrados es común hallar neuronas en contacto con el medio externo, razón por la cual se considera al sistema olfatorio como la región filogenéticamente más antigua del sistema nervioso de los vertebrados. Tanto en vertebrados como en invertebrados las neuronas sensoriales son bipolares, y poseen una dendrita corta y una axón más largo.

Por otro lado, las neuronas olfatorias son las únicas neuronas de los mamíferos que exhiben un continuo recambio y reemplazo a partir de células precursoras durante la vida adulta (Monti Graziadei y Graziadei, 1979).

Los axones olfatorios son amielínicos y forman paquetes envueltos por el citoplasma de una única célula de Schwann (Fig. 3.1). Esta disposición es similar a la que se observa en los axones no olfatorios de los estadios embrionarios del sistema nervioso periférico (Fig. 3.2). El nervio olfatorio es el único nervio del sistema nervioso periférico que mantiene una relación embrionaria con las células que lo envuelven.

La información proveniente del epitelio olfatorio se diferencia de las demás informaciones sensitivas y sensoriales por ser enviada directamente desde el bulbo olfatorio hacia la corteza cerebral olfatoria sin hacer previamente un relevo en el tálamo. Sin embargo, parte de la corteza olfatoria, especialmente la corteza piriforme se proyecta al tálamo y desde allí, la información olfatoria pasa al neocortex, donde presumiblemente ocurra la percepción consciente de los olores. (Farbman, 1992).

Los órganos olfatorios representan mucho más que un simple sistema sensorial, forman una matriz neurogenética a partir de la cual se derivan otras neuronas que posteriormente migran dentro del cerebro, utilizando, tal vez, axones olfatorios como guía (Dryer y Graziadei, 1994). Por último, Dryer y Graziadei (1994) han sugerido que existe una relación directa entre los órganos olfatorios y el desarrollo cerebral, debido a una influencia morfogenética o tal vez inductiva de la placoda olfatoria sobre el cerebro. Por lo tanto, si el epitelio olfatorio no está formado, el telencéfalo no se desarrolla correctamente, a pesar de que las estructuras del cerebro posterior se estén desarrolladas en forma normal.

3.1- SISTEMA OLFATORIO PERIFÉRICO

La participación del olfato en las diferentes conductas, particularmente en la alimentación y en la reproducción, ha sido preservada en casi todos los vertebrados.

A excepción de algunos vertebrados -aves, cetáceos y primates- que poseen un sistema olfatorio reducido, la mayoría de los vertebrados tienen sistemas olfatorios muy desarrollados. La importancia del sistema olfatorio puede demostrarse al analizar la proporción relativa del cerebro dedicado a él. En peces y anfibios, la región olfatoria del cerebro ocupa aproximadamente un sexto del volumen total, y en algunos

mamíferos (por ejemplo, zarigueya e insectívoros) ocupa un cuarto de la superficie de la corteza cerebral (Fig. 3.3) (Allison, 1953; Negus, 1958).

El sistema olfatorio posee un interés muy especial para los neuroanatomistas, dado que conserva una morfología constante a través de todos los vertebrados. En todos los vertebrados -excepto cetáceos- el bulbo y los demás centros olfatorios son esencialmente similares en estructura, y forman la única parte del cerebro que no ha sufrido cambio alguno. Esto ha sido tomado como evidencia de que el sentido del olfato es primitivo estableciéndose muy temprano en la evolución, y que el resto del encéfalo evolucionó a partir del sistema olfatorio (Allison, 1953).

En los vertebrados no acuáticos el órgano olfatorio se incorpora al sistema respiratorio. La cavidad nasal forma el extremo más anterior del sistema respiratorio. Está dividida en tres sectores: un vestíbulo o región de entrada, una región respiratoria y una región olfatoria. En contraposición, los vertebrados acuáticos poseen órganos olfatorios que usualmente no están incorporados al sistema respiratorio. (Negus, 1958).

3.1.1- PECES

En los ciclóstomos (lampreas y mixines) existe una única abertura sobre la boca que comunica con un par de órganos olfatorios a través del conducto nasal-hipofisiario (Fig. 3.4). En las lampreas el conducto se halla cerrado en la parte posterior. En mixine el conducto desemboca en la faringe. Parte de la pared plegada de los órganos olfatorios se halla tapizada por epitelio olfatorio. Estos órganos son los representantes más simples de los órganos olfatorios pares presentes en los demás vertebrados (Allison, 1953; Farbman, 1992). En los elasmobranquios (peces cartilagosos: tiburones y rayas) existen dos órganos olfatorios pares localizados en cápsulas nasales cartilaginosas. Se ubican en la parte ventral del hocico, completamente separados de la boca. Cada órgano olfatorio presenta una abertura incurrente anterior (narina anterior) y una abertura excurrente posterior (narina posterior) separadas por un pliegue nasal (Fig. 3.4). La presión de flujo es obtenida por el movimiento hacia adelante del animal en el agua (Farbman, 1992).

En los peces óseos, la morfología externa e interna del órgano olfatorio o roseta es similar a la de los cartilaginosos, pero se localizan en el lado dorsal de la cabeza (Fig. 3.5). Cada órgano se ubica dentro de una cavidad con dos aberturas, una anterior y una posterior. Sin embargo, existen algunas variaciones en los teleósteos: algunos órganos olfatorios presentan una narina anterior que se abre al exterior, mientras que la posterior desemboca en la faringe. En otros ambas desembocan al exterior (Fig. 3.4) (Allison, 1953; Farbman, 1992).

En las rosetas el epitelio olfatorio se encuentra en proyecciones cartilaginosas o lamelas que salen de un eje central. El epitelio sensorial se halla en el seno y en la mitad inferior de cada lamela, mientras que, el epitelio no sensorial se ubica en el extremo superior (Singh, 1994; Byrd y Brunjes, 1995).

3.1.2- ANFIBIOS

Los anfibios que conservan las branquias -como el ajolote *Ambyostoma sp*- poseen las cavidades nasales divididas en una cámara anterior -respiratoria- y una posterior -olfatoria-. La mucosa de la cámara olfatoria presenta numerosos pliegues transversos que se conectan con un pliegue longitudinal, muy similar a lo descrito en los peces. El epitelio olfatorio se localiza en la base de los pliegues. La cavidad nasal desemboca en la faringe.

Los anfibios adultos que respiran aire, poseen los órganos respiratorios dentro de las vías respiratorias. Los movimientos respiratorios permiten el paso del aire dentro de la cavidad nasal pasando así sobre la superficie de los órganos olfatorios. Dos narinas permiten la entrada del aire en la cavidad nasal, que se halla tapizada principalmente por epitelio olfatorio. Luego el aire sale por las coanas hacia la faringe y los pulmones. Los anfibios poseen una cavidad nasal sencilla que carece de pliegues (Figs. 3.6, 3.7, 3.8), aunque en algunas especies presenta cavidades accesorias.

3.1.3- REPTILES

La cavidad nasal de los reptiles también se halla dividida en dos compartimientos: una cámara respiratoria anterior y una cámara posterior que posee mucosa olfatoria.

La estrategia principal para aumentar la superficie de las estructuras olfatorias se pone de manifiesto por primera vez en los reptiles. Las paredes laterales de la cavidad nasal se proyectan como extensiones óseas o cartilaginosas -turbinales- que se dirigen hacia el septo nasal. (Figs. 3.9, 3.10). La superficie medial del turbinal, presenta epitelio olfatorio (Fig. 3.10). De esta forma puede aumentarse la superficie ocupada por el epitelio olfatorio dentro de la cavidad nasal sin aumentar su volumen (Farbman, 1992).

3.1.4- AVES

La cavidad nasal de las aves es larga y comprimida lateralmente. Posee tres compartimientos: la cámara anterior o vestibulo, con epitelio estratificado; la cámara media con epitelio respiratorio y una cámara pequeña posterosuperior con epitelio olfatorio (Allison, 1953; Grasse, 1955; Wenzel, 1987).

3.1.5- MAMÍFEROS

En los mamíferos, la cavidad nasal es relativamente grande. Sus paredes laterales poseen una compleja serie de extensiones turbinales. Además del vestibulo -un área pequeña cerca de las narinas con epitelio estratificado- se pueden distinguir dos compartimientos principales: la cámara respiratoria situada entre las narinas y la coana, y la cámara posterior o superior con epitelio olfatorio (Fig. 3.4) (Allison, 1953; Lewis y Dahl, 1995). En animales macrosmáticos, los maxiloturbinales que se proyectan en la

cámara respiratoria están cubiertos por una mucosa respiratoria muy vascularizada. Esta superficie, varias veces amplificada, permite que el aire que pasa a través de ella se caliente, humedezca y filtre. En la cámara posterior olfatoria, los turbinas originados del etmoides -etmoturbinas-, forman filas laterales y mediales referidas como endoturbinas y ectoturbinas (Fig. 3.11). La mayoría de los turbinas del etmoides se hallan cubiertos por mucosa olfatoria. Los nasoturbinas (una parte del sistema nasoturbinal) están bien desarrollados y se extienden a lo largo del techo de la cavidad nasal en ambas cámaras y solamente su mitad posterior posee epitelio olfatorio (Allison, 1953) (Fig. 3.4).

Por otro lado, en la mayoría de los primates, incluyendo el hombre (mamíferos microsmáticos), los turbinas superiores y medios poseen arreglos más sencillos -con tres vueltas o conchas-, y solamente en el aspecto medial del turbinal superior, encontramos epitelio olfatorio. (Figs. 3.4, 3.11) (Farbman, 1992).

3.2- ESTRUCTURA DE LA MUCOSA OLFATORIA

El órgano olfatorio periférico está constituido por una mucosa que consiste en dos partes fundamentales: un epitelio y una lámina propia de tejido conectivo, separadas por una delgada membrana basal. Esta mucosa se mantiene húmeda por medio de secreciones glandulares que forman una capa de mucus que cubren la superficie externa del epitelio (Fig. 3.12).

3.2.1- ESTRUCTURA DEL EPITELIO OLFATORIO

La estructura del epitelio olfatorio es básicamente similar en la mayoría de los vertebrados. Desde su primera descripción por Schultze (1856), se han reconocido tres componentes celulares: las células sensoriales, las células de sostén y las células basales.

La organización celular del epitelio es del tipo pseudoestratificado, con los núcleos ubicados a diferentes niveles, por lo que parece estar compuesto por varias capas. Pero en realidad todas las células mantienen contacto con la membrana basal, si bien no todas ellas alcanzan la superficie luminal (Fawcett, 1993a; Griep y Robbins, 1986).

Células de sostén. Las células de sostén poseen un núcleo ovalado que generalmente se encuentra alineado en una única hilera, formando la capa de núcleos más superficial del epitelio (Fig. 3.12). La región distal de estas células es de aspecto cilíndrico y presenta microvellosidades apicales. En cambio, la región proximal o tallo se presenta como un delgado trozo de citoplasma ubicado entre las células sensoriales para terminar finalmente en una expansión sobre la membrana basal. Esta expansión puede estar en contacto con las glándulas de Bowman o con capilares del tejido conectivo subyacente (Farbman, 1992). Debido a esto, se podría considerar que una de las funciones de las células de sostén sería la de regular el pasaje de sustancias entre la superficie epitelial y el conectivo subyacente (Rafols y Getchell, 1983). En mamíferos se cree que estas células participarían en la regulación de la composición iónica del mucus y además, intervendrían en funciones de detoxificación, ya que en el retículo endoplasmático liso se halló la presencia de la enzima citocromo P-450 (Farbman, 1992). Algunos autores consideran que dichas células poseen características de células gliales, ya que su citoplasma envuelve a los receptores de manera semejante a las células de Schwann de los nervios olfatorios (Moulton y Breidler, 1967). La presencia de gotas secretorias rodeadas por membrana en la región distal de las células argumenta la posible función secretora de estas células (Reese, 1965). Por lo dicho anteriormente, existen evidencias crecientes que indicarían que las células de sostén, lejos de ser una componente insignificante en el epitelio olfatorio, constituirían más bien un accesorio esencial para la célula receptora, con complejas funciones secretoras y nutricias (Moulton y Breidler, 1967).

Células basales. Las células basales son más o menos poliédricas. Descansan sobre la membrana basal, y en algunos casos envuelven pequeños paquetes de axones (Fig. 3.12). Mediante estudios de microscopía electrónica se han podido describir dos tipos de

células basales, una ligeramente plana con citoplasma oscuro y otra globosa, con forma redondeada y citoplasma claro (Kratzing, 1978; Graziadei y Monti Graziadei, 1979; Vollrath *et al.*, 1985; Suzuki y Takeda, 1991; Farbman, 1992; Holbrook *et al.*, 1995). Las células oscuras contienen ribosomas libres y tonofilamentos, presentando inmunorreactividad a las citoqueratinas (Yamagishi, 1989; Holbrook *et al.*, 1995). Las células claras son usualmente más superficiales que las células oscuras y no son inmunorreactivas a anticuerpos anti-citoqueratinas (Farbman, 1992; Holbrook *et al.*, 1995). Las células basales envuelven a los axones de las células sensoriales en los lugares donde no son protegidas por las células de sostén. Poseen además, estrecho contacto con las células de Schwann (Moulton y Beidler, 1967; Holbrook *et al.*, 1995). Además, ayudan a mantener la integridad del epitelio olfatorio ya que participan en la recuperación luego de una injuria (Holbrook *et al.*, 1995).

Células sensoriales. La mayor parte del epitelio olfatorio se halla compuesto por neuronas receptoras bipolares, que ocupan la mayor parte del epitelio olfatorio (alrededor de los dos tercios inferiores). Estas neuronas tienen un cuerpo celular de forma fusiforme, cuyo eje longitudinal es perpendicular a la superficie del epitelio. El polo apical da origen a una dendrita que llega a la superficie y el polo basal origina un axón (Fig. 3.12). El centro del cuerpo celular está ocupado por el núcleo, que generalmente es de forma oval y contiene un nucléolo evidente y cromatina dispuesta en forma de grumos (Rafols y Getchell, 1983). La dendrita finaliza en una expansión, denominada vesícula olfatoria o "knob dendrítico" que se extiende una distancia muy corta sobre la superficie del epitelio. Esta expansión dendrítica puede incluir cilias o microvellosidades, y representa la parte de la célula directamente expuesta a los estímulos olorosos en la cavidad nasal. Los axones se disponen formando pequeñas ramas o fascículos. Estos emergen del epitelio y se unen con otros constituyendo los filetes olfatorios, que se proyectarán al bulbo olfatorio (Moulton y Beidler, 1967; Farbman, 1992).

En la porción apical del epitelio, las células sensoriales están aisladas unas de otras por el citoplasma de las células de sostén, en otras palabras, la parte distal de las dendritas y las vesículas olfatorias no se encuentran en contacto entre sí. Las células sensoriales y las de sostén se relacionan apicalmente mediante uniones estrechas, formando una barrera

epitelial que impide el pasaje de moléculas e iones entre las células en cualquier dirección (Farbman, 1992).

3.2.2- ESTRUCTURA DE LA LÁMINA PROPIA

La lámina propia puede tener de dos a tres veces el espesor del epitelio. Contiene fibras colágenas, fibras elásticas, fibroblastos, macrófagos, mastocitos y leucocitos. Presenta además vasos sanguíneos de gran tamaño que permite un flujo importante de sangre a la mucosa (Fig. 3.12). En la lámina propia también se encuentran glándulas exócrinas (glándulas de Bowman) y terminaciones de los nervios olfatorios, trigémino y terminal (Bojsen-Møller, 1975; Grunditz *et al.*, 1994).

Antes de describir las glándulas de Bowman es útil mencionar la terminología utilizada en la citología glandular. Los gránulos secretorios serosos son osmiofílicos y electrón-densos. Presentan material, de tipo proteico, rodeado de membrana y su secreción generalmente se halla asociada con una delgada capa acuosa de mucus. Las vesículas secretorias del tipo mucoso presentan material glicosilado claro a los electrones, rodeado de membrana. La secreción generalmente se asocia con una gruesa capa de mucus viscoso (Sakai, 1989; Getchell y Getchell, 1992). En general, las glándulas de Bowman de anfibios, reptiles y aves se describen como serosas; las de mamíferos no primates presentan componentes serosos y mucosos; mientras que las glándulas del hombre parecen ser exclusivamente serosas (Frisch, 1967; Shapiro, 1970; Kratzing, 1984a; Kratzing, 1984b; Getchell *et al.*, 1984; Morrison y Moran, 1995). La secreción se produce en el adenómero y es conducida a través del epitelio por medio de los ductos hasta la superficie luminal del mismo.

La mayoría de los vertebrados terrestres poseen la superficie del epitelio olfatorio continuamente cubierta por secreciones acuosas derivadas de las glándulas de Bowman, a pesar de que estas glándulas están ausentes en los peces, se considera que juegan un rol único y esencial en la olfacción. Se asume que la capa mucosa puede actuar

a modo de barrera para la libre difusión de moléculas con hidrosolubilidad limitada (Moulton y Beidler, 1967).

Hasta aquí se han comentado los aspectos generales de la mucosa olfatoria, pasaremos a detallar las diferencias que se pueden hallar en las distintas clases de vertebrados.

3.2.3- ESTRUCTURA DE LA MUCOSA OLFATORIA EN PECES

El epitelio olfatorio de la mayoría de los teleósteos, a nivel de microscopía óptica, presenta aparentemente los tres tipos de células característicos: las células de sostén con procesos apicales, neuronas sensoriales con dendritas apicales y axones basales y células basales sin procesos aparentes. También cabe destacar la presencia de células caliciformes en el epitelio (Singh, 1994).

A nivel de microscopía electrónica y de barrido, el epitelio olfatorio presenta cinco clases de células: neuronas sensoriales ciliadas, que presentan el característico abultamiento apical (vesícula olfatoria) en su superficie, neuronas sensoriales con microvellosidades, células de sostén con microvellosidades, células caliciformes y células basales (Singh, 1994; Fernandes y Oliveira Ribero, 1995; Singh *et al.*, 1995).

1- Neuronas sensoriales: en algunas especies de teleósteos se ha encontrado otro tipo de neuronas sensoriales, que poseen un único proceso con forma de varilla (Bannister, 1965; Singh *et al.*, 1995), pero aún no se ha establecido si es o no una neurona sensorial (Byrd y Brunjes, 1995).

En los elasmobranquios se diferencian dos tipos de neuronas sensoriales, ambas poseen microvellosidades pero carecen de cilias (Zeiske *et al.*, 1987; Takamai *et al.*, 1994). Las neuronas tipo I son similares las descritas para otros peces, con núcleo redondeado, nucléolo prominente, las dendritas presentan los típicos abultamientos apicales. En cambio las neuronas tipo II poseen abultamientos dendríticos más grandes provistos de microvellosidades más cortas y gruesas que las halladas en el tipo I y un complejo de Golgi más desarrollado acompañado por un conspicuo sistema de retículo endoplasmático rugoso del tipo lamelar (Takami *et al.*, 1994).

2- Células de sostén: en los teleósteos presentan numerosas vesículas secretorias en sus procesos apicales, y su citoplasma posee manojos de fibras citoesqueletales (Frabman, 1992). En los elasmobranquios las células de sostén son ciliadas pero no se observan gránulos secretorios en su superficie (Takami *et al.*, 1994)

3- Células caliciformes: las células caliciformes poseen un núcleo de forma irregular y un citoplasma con vesículas secretorias grandes y numerosas (Byrd y Brunjes, 1995). La superficie apical presenta microvellosidades o agrupamientos de cilias cortas, esta superficie varía según el estadio del ciclo secretor (Getchell y Getchell, 1992).

Otro tipo de glándula unicelular ha sido descrita en el epitelio olfatorio del pez dorado (Breipohl *et al.*, 1973). La superficie apical de estas células forma una protrusión similar a un globo en la superficie del epitelio. Estas células presentarían escasa actividad secretoria (Breipohl *et al.*, 1973).

La lámina propia carece de las glándulas de Bowman, típicas en los demás vertebrados. Los axones de las neuronas sensoriales, presentes debajo de la lámina basal, se unen primero entre sí y luego a otros paquetes que se hallan en el eje central de la roseta. Estos paquetes emergen de la roseta y forman el nervio olfatorio.

3.2.4- ESTRUCTURA DE LA MUCOSA OLFATORIA EN ANFIBIOS Y REPTILES

Como característica general se observó los tres tipos de células mencionadas anteriormente y una lámina propia con glándulas de Bowman.

En la salamandra adulta (*Ambystoma tigrinum*) se ha observado que la mucosa olfatoria ventral presenta mayor espesor que la mucosa olfatoria dorsal. Las diferencias están dadas por las capas de células sensoriales y además por un mayor desarrollo de la lámina propia. El epitelio olfatorio consiste de células sensoriales; células de sostén, con el núcleo ubicado en la región apical del epitelio y células basales con citoplasma claro (Graziadei y Monti Graziadei, 1976; Getchell *et al.*, 1984).

Las células sensoriales similares a las ya descritas, poseen forma fusiforme y el núcleo se ubica en posición central (Rafols y Getchell, 1983).

Las células de sostén poseen dos tipos morfológicos diferentes, tipo I y tipo II. Las células tipo I presenta forma cilíndrica y en su base el cuerpo celular se constriñe formando un largo eje. Las células tipo II son más delgadas y de contorno más irregular que las tipo I, además el eje basal es más corto y tortuoso y no presenta límites definidos (Rafols y Getchell, 1983).

Los ductos de las glándulas de Bowman y la parte apical del cuello del acino generalmente se hallan dentro del epitelio. La superficie del epitelio está compuesta por las vesículas olfatorias de las dendritas y expansiones apicales de las células de sostén. No se observan gránulos secretorios en las células de sostén de la salamandra adulta (Getchell *et al.*, 1984).

La lámina propia incluye: glándulas de Bowman, nervios olfatorios amielínicos, células de tejido conectivo -fibroblastos y mastocitos, células pigmentarias- y en la capa más profunda de la lámina propia, manojos de fibras nerviosas mielínicas. Los axones se hallan asociados a células de Schwann para formar los fascículos olfatorios (Rafols y Getchell, 1983).

Las células acinares de las glándulas de Bowman son del tipo serosos, poseen un núcleo basal y gránulos secretorios basófilos apicales. El lumen del acino es pequeño y ocasionalmente se observan vacuolizaciones apicales. Los ductos de las glándulas poseen núcleos aplanados y elongados (Getchell *et al.*, 1984). La secreción de las glándulas de Bowman responden directamente a una estimulación del tipo adrenérgico, ya que los acinos reciben inervación proveniente de neuronas simpáticas (Zielinski *et al.*, 1989).

La mucosa olfatoria del ajolote *Ambystoma sp* está compuesta por un epitelio pseudoestratificado con los tres tipos celulares típicos y una lámina propia con glándulas de Bowman. Las células sensoriales poseen procesos dendríticos heterogéneos con microvellosidades o cilias. Las células de sostén generalmente carecen de procesos en su superficie, sin embargo, se observa la presencia de cortas prolongaciones digitiformes. El citoplasma apical de estas células contiene grandes gránulos secretorios electrón densos, mitocondrias y filamentos desorganizados. Las células del epitelio olfatorio se unen en la región apical mediante uniones estrechas y desmosomas (Graziadei y Monti Graziadei, 1976; Eisthen *et al.*, 1994).

La estructura del epitelio sensorial de la lagartija *Cynops pyrrhogaster* es pseudoestratificado con los tres tipos de células. Las células de sostén se caracterizan por

un núcleo elongado, gránulos secretorios apicales, microvellosidades y protusiones citoplasmáticas. Las células sensoriales son neuronas bipolares con dendritas que llegan a la superficie, algunas presentan cilias y otras solamente tienen microvellosidades. Debajo de las células sensoriales se hallan células basales. La lámina propia presenta axones amielínicos y algunos mielínicos, glándulas de Bowman con gránulos prominentes y abundante retículo endoplasmático liso (Jones *et al.*, 1994).

Histoquímicamente, las células de sostén presentan glicoconjugados sulfatados, mientras que en glándulas de Bowman se detectaron únicamente del tipo neutros. Estos resultados fueron demostrados en salamandras, ranas y lagartijas (Getchell y Getchell, 1977; Getchell *et al.*, 1984; Ferri y Liquori, 1989). Las células ductales del epitelio olfatorio de la rana toro poseen características ultraestructurales muy similares a las células acinares, presentando además evidencia de secreción merocrina (Getchell y Getchell, 1992).

3.2.5- ESTRUCTURA DE LA MUCOSA OLFATORIA EN MAMÍFEROS

a) MICROSCOPIA FOTÓNICA.

El epitelio olfatorio de los mamíferos conserva la estructura clásica cuando se lo estudia con microscopía óptica. Se observan los tres tipos de células característicos: sensoriales receptoras, de sostén y basales, todas ellas descansan sobre una delgada membrana basal. Subyacente al epitelio se halla la lámina propia que presenta células de tejido conectivo, glándulas de Bowman con sus ductos y fascículo de los nervios olfatorios (Graziadei, 1966; Frisch, 1967; Kratzing, 1969; Shantha y Nakajima, 1970; Graziadei y Monti Graziadei, 1979).

b) HISTOQUÍMICA

Las células de sostén presentan en su citoplasma apical glicoconjugados neutros (Shantha y Nakajima, 1970) y en otros casos se los halla asociados con ácidos (Cuschieri

y Banniester, 1974). Además, se ha demostrado la presencia de compuestos lipídicos en la misma localización (Shantha y Nakajima, 1970; Cuschieri y Banniester, 1974).

La secreción de las glándulas de Bowman ha sido caracterizada en algunas pocas especies de mamíferos. Se ha detectado la presencia de glicoconjugados ácidos (sin especificar su naturaleza) y neutros en la oveja (Kratzing, 1969) y en el gato (Moulton y Beidler, 1967). Por otra parte, en el mono *Rhesus* y en el conejo se reportó la presencia de glicoconjugados neutros, pero no se realizaron estudios para la detección de glicoconjugados ácidos (Zinnin, 1964; Shantha y Nakajima, 1970). En el ratón se ha detectado la presencia de glicoconjugados ácidos carboxilados y sulfatados (Cuschieri y Banniester, 1974). También se ha revelado, utilizando lectinas, la existencia de glicoproteínas que contienen acetilgalactosamina sobre la superficie epitelial, especialmente cuando el epitelio olfatorio se halla en proceso de formación (Franceschini *et al.*, 1994).

En general en los mamíferos no primates con glándulas de Bowman de tipo mucosas predominan los glicoconjugados ácidos, que incluyen a aquellos con residuos de ácido siálico y sulfatados (Getchell y Getchell, 1992). En humanos, con la utilización de técnicas histoquímicas y mediante el uso de lectinas se ha podido demostrar que en los acinos serosos de las glándulas de Bowman predominan los glicoconjugados, incluyendo sulfomucinas (Menco, 1992a; Getchell y Getchell, 1992; Pestean *et al.*, 1995).

c) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Células Sensoriales

Las células olfatorias receptoras se describen como neuronas bipolares con un proceso superficial llamado distal y un proceso basal denominado proximal que termina finalmente en el bulbo olfatorio. Las células son delgadas, elongadas y se extienden en casi toda la altura del epitelio (Graziadei, 1966; Kratzing, 1969; Graziadei y Monti Graziadei, 1979). Sus pericaria se hallan en contacto unos con otros (Frisch, 1967). Los

núcleos son generalmente ovales y se caracterizan por poseer un carioplasma denso en el cual se puede observar uno o más nucléolos (Kratzing, 1969). El citoplasma es bastante escaso, pero en la región supranuclear se puede observar un gran aparato de Golgi y retículo endoplasmático liso (Graziadei, 1966; Frisch, 1967; Loo, 1977). En el marsupial *Isodon macrourus* la densidad citoplasmática varía de clara a oscura. Las células claras poseen un gran aparato de Golgi, cantidades limitadas de retículo rugoso y pocas mitocondrias. En cambio, las células oscuras poseen abundante cantidad de retículo rugoso, numerosas mitocondrias y cuerpos oscuros que probablemente corresponderían a lisosomas (Kratzing, 1978). La porción dendrítica se extiende desde el cuerpo celular hasta la superficie luminal del epitelio. Esta dendrita en su extremo apical se constriñe formando un cuello a partir del cual comenzará a aumentar nuevamente su diámetro originando una estructura globosa -vesícula olfatoria o *knob* dendrítico- con proyecciones hacia la superficie del epitelio. Estos procesos olfatorios presentan cilias, que varían en largo y número en las distintas especies (Frisch, 1967; De Lorenzo, 1957; Okano *et al.*, 1967; Loo, 1977; Kratzing, 1978; Chuah y Zheng, 1992). En el citoplasma de la vesícula olfatoria se encuentran cuerpos basales ciliares, neurotúbulos, mitocondrias y algunas pocas vesículas (Graziadei, 1965; Graziadei, 1966; Frisch, 1967; Kratzing, 1969; Loo, 1977). En algunos primates, debajo de la vesícula olfatoria existen complejos de unión entre las membranas celulares laterales de las células sensoriales y las células de sostén adyacentes (Loo, 1977). En el perro los corpúsculos basales de las cilias presentan dos estructuras accesorias, los pies basales y las fibras radicales. Los pies basales son estructuras que se extienden en forma radial a modo de molinete; las fibras radicales consisten en manojos de finos filamentos que presentan apariencia estriada (Okano *et al.*, 1967). El proceso axonal o proximal a medida que atraviesa la parte basal del epitelio es rodeado en forma incompleta por procesos de células basales y posteriormente se asocia a otros axones para formar los filetes olfatorios, rodeados por las células de Schwann (Kratzing, 1966; De Lorenzo, 1967; Vollrath *et al.*, 1985; Holbrook *et al.*, 1995).

En la musaraña, se ha observado otro tipo de célula receptora que posee solamente microvellosidades. Este tipo de receptor ocurre ocasionalmente. También se puede observar células sensoriales que carecen de vesículas olfatorias (Loo, 1977).

Células de Sostén

Las células de sostén son células epiteliales columnares que se extienden desde la superficie epitelial hasta la membrana basal. En los mamíferos estas células aparentemente no cumplirían funciones secretorias. Poseen un núcleo de mayor tamaño y un nucléolo más pequeño comparado con el de las células sensoriales (Loo, 1977). Estas células pueden tener cilias (De Lorenzo, 1957) o no (Frisch, 1967; Loo, 1977; Kratzing, 1978), pero su superficie libre generalmente se caracterizan por presentar microvellosidades y protrusiones (Getchell y Getchell, 1992). En el hombre las células de sostén presentan numerosas microvellosidades (Chuan y Zheng, 1992). En la porción apical del citoplasma se observa gran cantidad de mitocondrias, cuyas formas varían de redondeadas a ovoides, como así también retículo endoplasmático liso y rugoso (De Lorenzo, 1957; Kratzing, 1978). No se han observado vesículas de secreción en dicha porción celular (De Lorenzo, 1967; Kratzing, 1969), excepto en el ratón, en el cual se ha detectado la presencia de algunos gránulos secretorios (Frisch, 1967). El citoplasma basal contiene membranas de retículo endoplasmático liso, las cuales se asocian con gránulos de glucógeno (Frisch, 1967). Las células de sostén presentan además manojos de tonofilamentos, unos paralelos a la superficie luminal del epitelio a nivel de las uniones estrechas que conectan células epiteliales adyacentes y otros, en cambio se disponen perpendiculares a la superficie (paralelos al eje mayor de la célula) a nivel de las uniones estrechas en las expansiones basilares (Getchell y Getchell, 1992). Es bastante frecuente observar que una dendrita receptora aparezca rodeada de citoplasma de las células de sostén, las cuales rodean a las dendritas en forma similar al mesoaxón formado por las células de Schwann alrededor de los axones (De Lorenzo, 1957). Esta relación entre la célula receptora y la célula de sostén podría reflejar un parecido funcional entre las células de sostén y la glia, en cuanto al aislamiento de las células sensoriales y la posible regulación de la composición iónica extracelular que rodea a las mismas (Menco, 1992b; Getchell y Getchell, 1992).

Las expansiones basilares de las células de sostén muestran frecuentemente interdigitaciones con la membrana basal y se conectan a ella por medio de hemidesmosomas (Getchell y Getchell, 1992).

Células Basales

Las células basales, en contacto con la membrana basal, forman un estrato basal irregular e interrumpido en el epitelio olfatorio. El citoplasma presenta finas prolongaciones y contiene mitocondrias, retículo endoplasmático liso, gránulos citoplasmáticos y grandes gránulos densos (De Lorenzo, 1957). Estas finas prolongaciones citoplasmáticas se interdigitan con los axones rodeándolos (Graziadei, 1966; Kratzing, 1969; Kratzing, 1978; Holbrook *et al.*, 1995). Existen dos tipos morfológicos de células basales: las células basales oscuras -horizontales- y las células basales claras -globosas- (Vollrath *et al.*, 1985; Suzuki y Takeda, 1991; Holbrook *et al.*, 1995). Las células basales oscuras, que se hallan en contacto directo con la membrana basal, son aplanadas, contienen tonofilamentos, gran cantidad de ribosomas libres y escasa cantidad de mitocondrias y retículo endoplasmáticos rugoso. Las células basales claras poseen forma globosa, abundante cantidad de ribosomas y retículo endoplasmático liso, carecen de tonofilamentos y se hallan generalmente sobre las células basales oscuras (Kratzing, 1978; Vollrath *et al.*, 1985; Suzuki y Takeda, 1991; Holbrook *et al.*, 1995).

La función estas células en la regeneración del epitelio olfatorio es confusa. Estudios en ratones sugerirían que las células basales globosas y no las células basales oscuras serían las células madres de las células olfatorias (Suzuki y Takeda, 1991). Basándose en la expresión de queratinas, los mismos autores han demostrado que las células basales oscuras se diferencian en células de sostén más que en células olfatorias (Suzuki y Takeda, 1991). Además, también se ha demostrado que las células basales claras se pueden diferenciar tanto en células sensoriales como en células basales oscuras (Vollrath *et al.*, 1985). Por otro lado, se ha demostrado que las células basales oscuras pueden originar a las células basales claras y jugar un rol importante en la regeneración del epitelio luego de una injuria (Holbrook *et al.*, 1995).

Otros Tipos Celulares.

Adicionalmente a los tres tipos celulares descritos anteriormente en la mucosa olfatoria de los mamíferos, se han hallado otros tipos celulares.

En la mucosa olfatoria del hombre se ha descrito un cuarto tipo celular denominado célula microviliar. Esta célula posee forma de botella con un núcleo redondeado y de gran tamaño. En la parte apical de la célula existe una constricción del cual se origina un manojito de microvellosidades que se proyecta hacia la capa de mucus (Morrison y Costanzo, 1992). En el otro extremo se extiende un proceso citoplasmático -similar a un axón- hacia la membrana basal. El citoplasma de esta célula contiene mitocondrias, retículo endoplasmático liso, un aparato de Golgi muy desarrollado, gran cantidad de ribosomas libres y escasa cantidad de retículo endoplasmático rugoso (Moran *et al.*, 1982). Un tipo celular muy similar a lo descrito anteriormente ha sido descrito en ratas. Los autores consideran que se trataría de un tipo de célula de sostén (Carr *et al.*, 1991).

En el marsupial *Isodon macrourus*, Kratzing (1978) describió las células pálidas y las células en cepillo.

Las células pálidas son células muy grandes, con citoplasma claro. Presentan numerosas mitocondrias, vacuolas de forma irregular, cuerpos multivesiculares, escasos cuerpos densos y algunos lisosomas. Carecen de cilias, pero en su superficie apical presentan microvellosidades irregulares, en cuyas bases se pueden observar vesículas de micropinocitosis. Su superficie basal parece descansar sobre la membrana basal y no se observa procesos axonales a manera de células sensoriales.

Las células en cepillo aparecen menos frecuentemente en el epitelio. Poseen microvellosidades no ramificadas que poseen un centro fibrilar que se continúa con el citoplasma apical. Como las células sensoriales, éstas poseen pericarion alargado, y procesos proximales y distales. El núcleo es ovalado y grande, de manera tal que no es posible diferenciarlo del de las células de sostén. El citoplasma posee escaso retículo rugoso, ribosomas libres, mitocondrias y un complejo de Golgi muy desarrollado. Poseen complejos de unión con las células de sostén.

En el perro también se ha descrito un cuarto tipo celular formando parte del epitelio olfatorio. Esta célula presenta un citoplasma traslúcido, con escasa sustancia reticular y mitocondrias. En el borde apical presenta microvellosidades cortas y dispersas (Okano *et al.*, 1967).

3.3- ESTRUCTURAS SUBEPITELIALES

a) Nervios Olfatorios

Los procesos proximales de las células olfatorias atraviesan la membrana basal, disminuyen rápidamente su diámetro al extenderse por entre el tejido glandular, y se agregan para formar los filetes olfatorios. Estos paquetes de axones amielínicos son rodeados por células de Schwann (Kratzing, 1969; Chuau y Zheng, 1992). A diferencia de lo observado en otros axones amielínicos, las células de Schwann no envuelven axones individuales sino que las prolongaciones de citoplasma rodean a grupos de axones, o sea que la membrana plasmática de la célula de Schwann forma un mesoaxón para un grupo de fibras (Fig. 3.1)(De Lorenzo, 1957). Además, las células de Schwann olfatorias carecen de membrana basal y presentan inmunorreactividad positiva a la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que es considerada un marcador de astrocitos (Barber y Lindsay, 1982). Estas células se originan de precursores que se hallan dentro del epitelio olfatorio, emigran del mismo y una vez en el conectivo extienden sus procesos y envuelven a los axones olfatorios (Chuah y Au, 1991).

b) Glándulas de Bowman

En general, las glándulas de Bowman son glándulas exócrinas tubulares simples, que pueden ser ramificadas o no.(Frisch, 1967; Kratzing, 1969)

Las glándulas de Bowman del ratón poseen dos tipos diferentes de células. Las primeras poseen un citoplasma vesicular claro y el segundo posee un citoplasma electrón denso con numerosos gránulos secretorios claros. Estas glándulas no presentan

una estructura acinar discernible. Ambos tipos de células contribuyen a la formación de unidades secretorias y ambos tipos celulares comparten el lumen. La parte luminal de ambos tipos de células presentan microvellosidades. Las células oscuras presentan, además de los gránulos secretorios, una enorme cantidad de retículo endoplasmático liso que se disponen en forma de espiral generalmente alrededor de una mitocondria o de restos de mitocondrias (Frish, 1967).

En la oveja, las células glandulares presentan abundantes mitocondrias y una cantidad elevada de cuerpos secretorios densos. El citoplasma perinuclear se caracteriza por una elevada concentración de retículo endoplasmático liso y rugoso (Kratzing, 1969).

El mecanismo celular de secreción de las glándulas de Bowman no ha sido estudiado sistemáticamente a nivel ultraestructural, aunque se ha descrito la presencia de secreción apócrina en las células mucosas del conejo y del hombre y secreción merócrina en la rana toro (Getchell y Getchell, 1992). Sin embargo, se requieren más estudios a nivel ultraestructural que permitan aclarar los mecanismos celulares de la secreción acinar.

Las células de los ductos de las glándulas de Bowman son aplanadas y elongadas con el eje mayor paralelo al eje mayor de las otras células del epitelio olfatorio. Estas células se hallan en contacto directo con las células de sostén, sin interposición de una membrana basal (Getchell y Getchell, 1992). En la literatura aparecen datos conflictivos cuando se considera la capacidad secretora de las células ductales de algunos mamíferos. Los marsupiales aparentemente poseen células ductales no secretoras (Kratzing, 1978; Kratzing, 1984). La misma característica poseen las células ductales de perros, gatos, conejos, ratas y ratones (Seifert, 1971 en Getchell y Getchell, 1992). Por otro lado, existe evidencia ultraestructural de la naturaleza secretora en las células ductales del ratón, perro y conejo (Getchell y Getchell, 1992). Aún no se ha reportado descripciones de las células ductales de la mucosa olfatoria del hombre, pero existe una evidencia preliminar realizada por estudios inmunohistoquímicos referida a la secreción del sistema inmune en la mucosa olfatoria humana (Mellert *et al.*, 1992).

3.4- MUCUS OLFATORIO.

La superficie del epitelio olfatorio tanto de vertebrados acuáticos como de vertebrados terrestres está cubierto por una capa de mucus en el cual las moléculas odorantes se disuelven antes de llegar al sitio de estimulación olfatoria -las cilias de las neuronas sensoriales-. Debido a la influencia del mucus en cuanto a la transducción sensorial, se ha tratado de determinar las células que lo originan y su composición. Se han identificado tres orígenes diferentes en las distintas clases de vertebrados: 1- En peces, las células de caliciformes; 2- En los demás vertebrados, las glándulas de Bowman; 3- En los anfibios y en el ratón, las células de sostén colaboran junto con las glándulas de Bowman en la formación del mucus (Frisch, 1967; Getchell y Getchell, 1977; Getchell *et al.*, 1984).

Estudios ultraestructurales han demostrado la existencia de diferencias regionales en el mucus que cubre la mucosa olfatoria. Consiste en dos zonas:

1- una externa, denominada filum terminal, que aparece como una línea densa, en la cual se localizan los receptores olfatorios en las cilias, y

2- una zona interna que cubre los segmentos proximales de las cilias, las microvellosidades de las células de sostén y la superficie apical del epitelio (Getchell y Getchell, 1992). Esta última zona posee material del tipo acuoso (Menco-y Farbman, 1992). a- La zona externa está compuesta por finos filamentos. Se comprobó la existencia de una marcada similitud entre la zona externa y el material secretorio de las glándulas de Bowman (Getchell y Getchell, 1992). b- La zona interna está compuesta por un material filamentosos de apariencia translúcida. En especies en las cuales las células de sostén tienen función secretora, esta zona se origina del contenido de los gránulos secretorios de las células de sostén que se liberan por exocitosis. En especies en las cuales las células de sostén no tienen función secretora, la cantidad y composición del mucus podría ser regulado a través de micropinocitosis de las células de sostén (Getchell y Getchell, 1992).

En anfibios se han utilizado anticuerpos contra glicoconjugados aisladas de las cilias olfatorias de la rana -anti Mab y anti olfactomedina- para examinar su

distribución en la superficie epitelial. Los autores demostraron que el mucus que cubre el epitelio olfatorio posee una estructura muy compleja, en la cual se diferencian los dos estratos anteriormente mencionados, pero además han podido diferenciar varios subdominios dentro de cada zona (Menco y Farbman, 1992).

3.5- BIOQUÍMICA DE LA MUCOSA OLFATORIA

La mayoría de los criterios para caracterizar la mucosa olfatoria se basaron en caracteres de tipo morfológicos, pero recientemente se han realizado importantes esfuerzos para tratar de determinar similitudes y diferencias entre las neuronas olfatorias sensoriales y otro tipo de neuronas.

Así, el Dr. Margolis descubrió y caracterizó una proteína única de las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio. Esta proteína se conoce con el nombre de proteína marcadora olfatoria (OMP), se sintetiza en los receptores nerviosos primarios y se transportan a lo largo del axón hasta su terminación en los glomérulos olfatorios (Margolis, 1972; Farbman y Margolis, 1980; Monti Graziadei, 1983; Wensley *et al.*, 1995). La OMP se encuentra en el citoplasma de neuronas sensoriales maduras y se distribuye a lo largo de toda la célula. Los nervios olfatorios y los glomérulos olfatorios en los bulbos también son inmunorreactivos para esta proteína (Graziadei *et al.*, 1977). Las funciones de la OMP aún permanecen desconocidas. Además se han descubierto otras proteínas que parecen ser exclusivas de las neuronas del epitelio olfatorio. La mayoría de ellas son glicolípidos, aislados de membranas de las ciliolarias olfatorias (Chen y Lancet, 1984; Chen *et al.*, 1986). Estas proteínas podrían ser moléculas del tipo receptoras (Chen y Lancet, 1984; Chen *et al.*, 1986; Lancet, 1986).

Un dipéptido, carnosina (β -alanil-L-histidina), ha sido hallado en abundancia en las neuronas olfatorias de varias especies de vertebrados, así como también en las células de sostén (Margolis, 1974; Burd *et al.*, 1982; Margolis *et al.*, 1983). Este dipéptido se sintetiza a partir de sus aminoácidos precursores por medio de la enzima carnosina sintetasa (Burd *et al.*, 1982). Actualmente se discute su posible rol como neurotransmisor de las neuronas olfatorias.

Recientemente, la proteína producto del gen 9.5 (PGP 9.5) ha llamado la atención como un marcador específico neuronal. El PGP 9.5 es una proteína soluble aislada del cerebro humano, y se la encuentra predominantemente en el citoplasma de neuronas y de células neuroendócrinas. La inmunohistoquímica revela que en el epitelio olfatorio todas las células sensoriales son inmunorreactivas. Dentro de las células receptoras, el soma y la dendrita son altamente positivas, mientras que el axón en el epitelio y en la lámina propia presentaban menor intensidad de marca. Ni las células basales ni las de sostén presentan inmunorreactividad a este anticuerpo. En el bulbo olfatorio, las células mitrales son altamente positivas, en cambio, las células periglomerulares y las granulares no lo son (Taniguchi *et al.*, 1993). La PGP 9.5 ha sido hallada tanto en neuronas olfatorias embrionarias como en neuronas adultas, razón que ha llevado a los autores a considerar que la PGP 9.5 podría estar relacionada con el desarrollo y mantenimiento de los receptores quimiosensoriales (Johnson *et al.*, 1995). Por otro lado, en la lámina propia de humanos recién nacidos se observó que las fibras PGP 9.5 inmunorreactivas presentan morfología y distribución similar a la sustancia P trigeminal y a la proteína relacionada con el gen de la calcitonina. Esto último podría sugerir que la PGP 9.5 funcionaría, además, como marcador de fibras trigeminales nasales (Johnson *et al.*, 1995). Por lo dicho anteriormente sería interesante tratar de determinar si la PGP 9.5 co-localiza inmunohistoquímicamente con marcadores conocidos de fibras trigeminales.

Debido a que la mucosa olfatoria está en contacto con el medio externo, es de esperar que ésta presente algún tipo de mecanismo que permita la protección contra la pérdida de agua y que favorezca el equilibrio de los minerales. Por ello, se estudió la inmunorreactividad del factor natriurético atrial (ANF) -hormona con propiedades natriuréticas, diuréticas y vasodilatadoras (Genest y Cantin, 1989)- en la mucosa olfatoria (Gutkowska y Marcinkiewicz, 1989; Bachar *et al.*, 1995). Se observó que el ANF se localiza principalmente en algunas células acinares de las glándulas de Bowman y, además, en algunas células dentro del epitelio olfatorio. Cabe aclarar que los autores no han podido identificar que tipo de célula dentro del epitelio presenta reacción positiva. (Gutkowska y Marcinkiewicz, 1989).

Por otra parte, las neuronas olfatorias contienen moléculas que son comunes a la mayoría de las neuronas, tales como una enolasa específica, una enzima glicolítica (Takahashi et al, 1984) y las moléculas de adhesión neuronal (Key y Akerson, 1990).

El grupo de glicoproteínas de superficie de alto peso molecular, conocidas colectivamente como moléculas de adhesión neuronal (N-CAMs) se observó principalmente, en fetos humanos, en los nervios olfatorios de la lámina propia, mientras que en el epitelio olfatorio se halló en las neuronas sensoriales olfatorias y en las células basales claras. Las células basales oscuras y las células de soporte carecen de N-CAMs (Chuah y Au, 1992; Crews y Hunter, 1994; Satoh and Takeuchi, 1995; Aoki *et al.*, 1995).

Yamagishi et al. (1989) examinaron el epitelio olfatorio de fetos humanos y chanchitos de guinea utilizando antisueros contra algunas proteínas específicas del sistema nervioso. Se analizó la presencia de proteínas tales como proteínas para neurofilamentos (NFP), enolasa neuroespecífica (NSE), proteína S-100 glia específica (S-100), la proteína S-35 específica de la células de Purkinje, nestina (Osada *et al.*, 1995), vimentina (Aoki *et al.*, 1995) y citoqueratinas. Estas inmunotinciones combinadas hacen posible discriminar todos los elementos celulares en la mucosa olfatoria excepto las células de sostén. Las dos proteínas neuroespecífica, NFP y NSE, se hallan en las células sensoriales. La enolasa es una enzima glicolítica específica de neuronas e interviene en la maduración morfológica y funcional de las mismas. La existencia de esta proteína estaría indicando que estas células tienen funciones de auténticas neuronas. No se observó inmunorreactividad a S-100 en las células de sostén, a pesar de que estas células eran consideradas un tipo de células gliales (Hirsch y Margolis, 1970). Pero, se encontró reacción en las glándulas de Bowman, lo que sugeriría que las glándulas de Bowman podrían derivar de un elemento glial (Yamagishi *et al.*, 1989). Inmunorreactividad a S-35 se encontró solamente en algunas células cerca de la superficie apical del epitelio olfatorio. Estas células serían similares en distribución y forma a las células microviliares, un cuarto tipo de células que se halla en el epitelio olfatorio del hombre. La inmunorreactividad a la nestina, una proteína marcadora de precursores neuronales, se investigó en ratas en desarrollo y se determinó que durante el desarrollo las neuronas perdían su capacidad de expresar nestina. Por lo tanto, se podría sugerir que las células que expresan nestina podrían funcionar como células

marcadoras en estudios de neurogénesis y desarrollo de sistemas sensoriales (Osada *et al.*, 1995).

Recientemente, se ha estudiado la distribución dentro de la mucosa olfatoria de moléculas que interviene en la actividad reguladora del calcio tales como: calmodulina, calbindina-D-28K, calretinina, neurocalcina y recoverina. Todas estas moléculas han sido halladas en las células sensoriales del epitelio olfatorio de ratas y ratones (Kishimoto *et al.*, 1993; Bastianelli *et al.*, 1995).

También se ha tratado de localizar la distribución de los componentes del sistema inmune en la mucosa olfatoria de ratas y salamandras. La presencia de estos compuestos en la mucosa olfatoria demuestran que ésta se encuentra protegida de invasiones patogénicas mediante la secreción del sistema inmune, así como también de otras inmunoglobulinas, lactoferrina, lisosima y glicoproteínas que actuarían como una primera línea de defensa. (Getchell y Getchell, 1991).

Las células basales presentan inmunorreactividad a diferentes citoqueratinas (incluyendo a la vimentina), proteínas que forma los tonofilamentos de células epiteliales (Aoki *et al.*, 1995; Osada *et al.*, 1995). Por lo tanto se han probado diferentes tipos de citoqueratinas a fin de intentar una caracterización bioquímica que permita la discriminación de los tipos de células basales. Las células basales claras carecen de tonofilamentos, por lo tanto no reaccionan con las citoqueratinas, en cambio las células basales oscuras presentan tonofilamentos siendo así inmunorreactivas a las citoqueratinas 14 y 5/6. Las células basales claras se caracterizan, además, por presentar incorporación de bromo de deoxiuridina (BrdU), que actúa como un marcador específico de división celular (Zupanc y Horschke, 1995). Por otro lado, la citoqueratina 18 (humana) funciona como marcador específico de las células de sostén (Schowb *et al.*, 1995). Este último marcador tiñe, además, los ductos y los acinos de las glándulas de Bowman (Holbrook *et al.*, 1995). Se han utilizado anticuerpos anticitoqueratinas monoclonales para caracterizar los distintos tipos celulares en rana, las células basales oscuras -y no las claras- y las células de sostén presentaron inmunomarca al ser tratadas con el anticuerpo MA902 (Suzuki y Takeda, 1991). Además, se halló inmunomarca al teñir con proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la misma se localiza sobre la membrana basal, en asociación con las células de Schwann

que rodean los axones (Barber y Lindsay, 1982; Chuah y Zheng, 1991) y con las células basales oscuras (Holbrook *et al.*, 1995).

En sapos, por otro lado, se han utilizado métodos inmunohistoquímicos para comprobar que el mucus que se halla sobre el epitelio olfatorio es una matriz extracelular altamente especializada. Para este estudio se han utilizado dos anticuerpos: uno es un anticuerpo monoclonal denominado Mab, que reacciona contra una glicoproteína, gp 9.5, aislada de cilias olfatorias de sapo; y el otro también es un anticuerpo monoclonal, olfactomedina, aislado de una preparación de cilias de sapo. Estos anticuerpos se unen a moléculas específicas dentro del mucus, permitiendo así la división en varios dominios morfológicamente diferenciables. Estas proteínas se unen también a los gránulos secretorios de las células de sostén (Menco y Farbman, 1992).

3.6- INERVACIÓN DE LA MUCOSA OLFATORIA

La inervación de la mucosa olfatoria ha sido escasamente estudiada. Sin embargo, las fibras nerviosas fueron descritas originariamente en estudios anatómicos y posteriormente han sido caracterizados inmunohistoquímicamente. Por otro lado, estudios ultraestructurales han demostrado la presencia de terminales adrenérgicas, colinérgicas y peptidérgicas.

En la lámina propia se ha detectado la presencia de fibras nerviosas distintas a las originadas en las neuronas olfatorias. A pesar de que la inervación extrínseca de la mucosa olfatoria es pobremente entendida, se sabe que los músculos lisos, la secreción exócrina y otras funciones epiteliales en la nariz son reguladas por fibras nerviosas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales; y que estas fibras nerviosas se hallan rodeando los vasos sanguíneos y los acinos de las glándulas de Bowman y dentro y debajo de la superficie del epitelio olfatorio (Eccles y Wilson, 1973; Zielinski *et al.*, 1989; Lacroix *et al.*, 1990; Grunditz *et al.*, 1994). Estudios previos indicaron que las fibras simpáticas de la mucosa nasal derivan del ganglio cervical superior y que la estimulación eléctrica de las fibras simpáticas reducen el flujo sanguíneo nasal y la secreción nasal (Malm, 1973). Las fibras parasimpáticas tendrían su origen del ganglio esfenopalatino (Eccles y Wilson,

1973). Finalmente las fibras sensoriales no viscerales parecerían originarse del ganglio trigémino (V par). El sistema trigeminal nasal responde únicamente a estímulos irritantes (Doty, 1995). Las fibras trigeminales han sido identificadas por presentar inmunorreactividad a los anticuerpos contra CGRP y sustancia P (Finger *et al.*, 1990; Grunditz *et al.*, 1994). El nervio terminal también ha sido considerado como un nervio sensorial que inerva la mucosa olfatoria (Bojsen-Møller, 1975; Witkin y Silverman, 1983). En la mayoría de los vertebrados el nervio terminal forma un plexo ganglionar en el lado medial de los bulbos olfatorios y dentro de la cavidad nasal. Las fibras del nervio terminal se distinguen de otras fibras por presentar reacción positiva a la acetilcolinesterasa (Bojsen-Møller, 1975) y por ser inmunorreactiva a la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (Witkin y Silverman, 1983).

Inmunohistoquímicamente, se ha podido demostrar que la lámina propia contiene dos tipos de elementos neurales, que derivan de las células olfatorias sensoriales y de los ganglios trigéminos. Se encontró la enzima enolasa (NSE) tanto en los nervios olfatorios como en el trigémino. Por otra parte, la proteína presente en los neurofilamentos (NPF) no está presente en los axones de las neuronas sensoriales y en los filetes olfatorios, por lo tanto sería un marcador específico para los nervios trigéminos de la lámina propia. Además, nervios olfatorios envueltos en células de Schwann reaccionan con la proteína S-100. Por lo tanto, realizando inmunotinciones combinadas de los tres anticuerpos mencionados anteriormente es posible determinar la distribución de los nervios olfatorios y trigéminos (Yamagishi *et al.*, 1989).

Para estudiar la inervación extrínseca de la mucosa olfatoria se han utilizado otros métodos inmunohistoquímicos. La distribución del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en la cavidad nasal, revela la disposición diferencial de las fibras CGRP en ciertas áreas que estarían directamente expuestas a la inhalación del aire, inervando a los senos venosos y produciendo de este modo vasodilatación (Lee *et al.*, 1994). Se ha demostrado que las fibras nerviosas que contiene CGRP y sustancia P derivan del ganglio trigeminal (Grunditz *et al.*, 1994) y que estas fibras terminan dentro del epitelio en contacto directo con las neuronas olfatorias. Cabe preguntarse si existe alguna relación entre los elementos trigeminales y las neuronas olfatorias que pueda afectar las respuestas fisiológicas.

Por otro lado, las fibras que presentan inmunorreactividad al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y al neuropéptido Y, se originarían en el ganglio esfenopalatino y ótico (Grunditz *et al.*, 1994).

La inmunorreactividad a hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) se halló principalmente a lo largo del nervio terminal, en los bulbos olfatorios principales y en los bulbos olfatorios accesorios. También, se encontraron fibras en la mucosa olfatoria y especialmente en la mucosa del órgano vomeronasal. Lo dicho pone de manifiesto la posibilidad de que las neuronas y fibras LHRH sean parte del substrato anatómico para integrar las señales olfatorias en una conducta reproductiva (Witkin y Silverman, 1983).

El primer trabajo ultraestructural para identificar y caracterizar las fibras nerviosas extrínsecas en la mucosa olfatoria fue realizado por Graziadei y Gagne (1973) (en Getchell y Getchell, 1992). Ellos observaron que dentro de los paquetes olfatorios en la lámina propia de sapos, había por lo menos dos tipos de fibras que no conformaban los criterios que caracterizan a las fibras como axones olfatorios primarios, estos criterios incluyen: diámetro uniforme de 0.2 mm, ausencia de mielina, escasos neurofilamentos y el agrupamiento en paquetes de fibras rodeados por una única célula de Schwann (De Lorenzo, 1957). En los estudios de Graziadei y Gagne (1973), un grupo de fibras no olfatorias, algunas mielinizadas y otras no, tenían diámetros de 1 a 10 mm y contenían gran abundancia de neurofilamentos, pocas mitocondrias y vesículas irregulares. Cada fibra, de las cuales aproximadamente dos eran mielinizadas y casi una docena eran amielínicas, se hallaban dentro de una única célula de Schwann. Las fibras mielínicas perdían la mielina cuando se ramificaban en fibras más pequeñas, y entraban en el epitelio olfatorio. Una vez dentro del epitelio estas fibras se observan con algunas mitocondrias y grupos de pequeñas vesículas claras. El segundo grupo de fibras eran no mielínicas, con diámetro que variaba entre 0.5 y 0.9 mm, contenían pocos filamentos, pocas mitocondrias y característicamente poseían una población de vesículas de centro denso. Estos autores sugirieron que las fibras que pierden la mielina y contiene vesículas claras se originan dentro del sistema cerebro espinal, en cambio las fibras que poseen vesículas con centro denso se originan del sistema simpático. Zielinski *et al.* (1989) localizó y caracterizó las fibras y terminales nerviosas en la mucosa olfatoria de la salamandra. Terminales nerviosas conteniendo

vesículas de centro denso pequeñas (o vesículas granulares pequeñas) y unas pocas vesículas de centro denso grandes (o vesículas granulares grandes) fueron halladas en la periferia de los acinos de las glándulas de Bowman, alrededor de los vasos sanguíneos y cerca de los melanocitos y fibroblastos. Estas terminales se localizan en la proximidad de los capilares entre el epitelio y la lámina propia y fueron identificadas como terminales simpáticas postganglionares con vesículas adrenérgicas que contienen neurotransmisores de tipo catecolaminérgicos. Otros tipos de terminales nerviosas contienen vesículas claras pequeñas y algunas pocas vesículas densas grandes que se ubican entre las células acinares de las glándulas de Bowman. Estas terminales no poseen membrana basal entre ellas y las células acinares. Fueron identificadas como terminales nerviosas de axones parasimpáticos postganglionares con vesículas colinérgicas que contienen acetilcolina (Fig. 3.13).

Aún quedan muchos temas por resolver en lo referente a la innervación extrínseca de la mucosa olfatoria. De lo descrito anteriormente se desprende que las fibras trigeminales y el sistema autónomo y posiblemente el nervio terminal jueguen un papel importante en la regulación de la actividad vasomotora y secretora. Nuevos experimentos se requerirán para tratar de aclarar: 1- la variedad de neurotransmisores y neuromoduladores, 2- determinar, sobre las bases de características estructurales, los orígenes de fibras extrínsecas para poder especificar las estructuras blanco, 3- definir patrones espaciales de células que reciben múltiples innervaciones de nervios extrínsecos con diferentes neurotransmisores. De esta forma se podría dilucidar como diversas señales neurales se integrarían para regular los procesos celulares complejos que intervienen en el mecanismo de la olfacción.

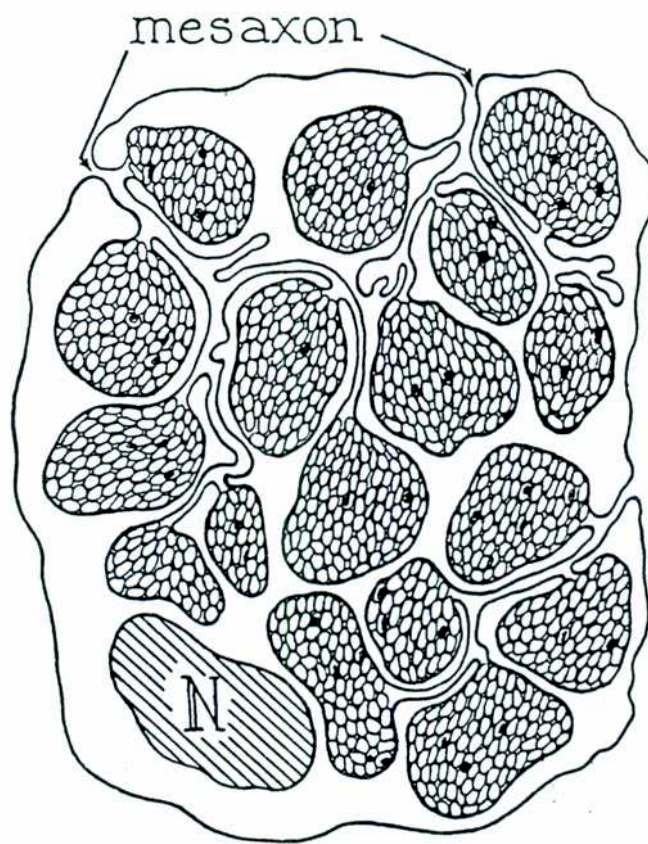


FIGURA 3.1. Representación esquemática de la relación de los axones olfatorios con las células de Schwann. Varios nervios comparten un único mesoaxon, que está formado por la membrana de la célula de Schwann, cuyo núcleo se ubica en la región inferior (N). (Extraído de Lorenzo, 1957).

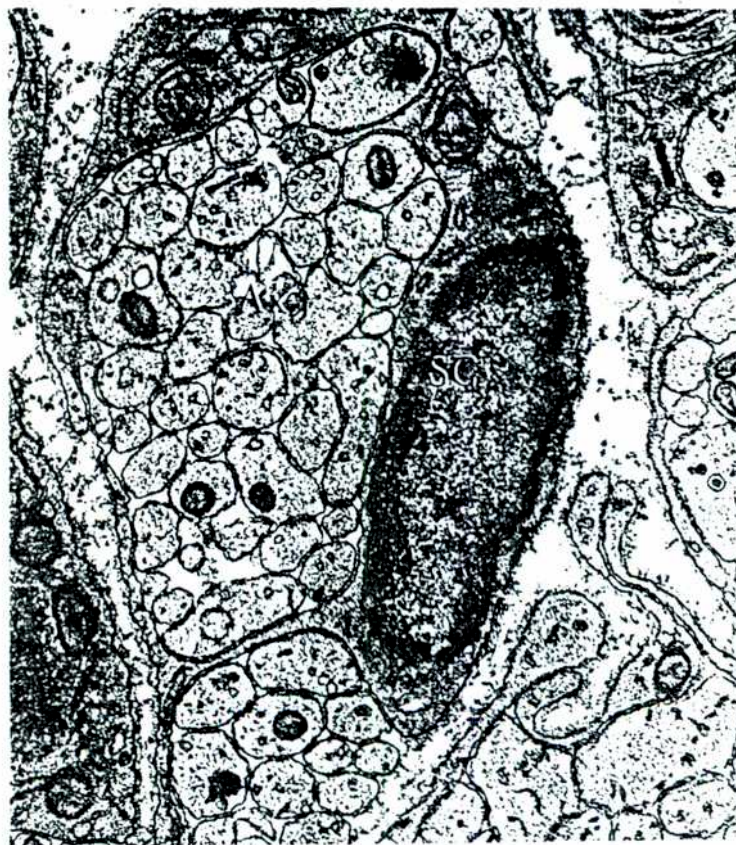


FIGURA 3.2. Fotomicrografía que muestra la relación de los axones en desarrollo con las células de Schwann. (Extraído de Peters *et al.*, 1991).

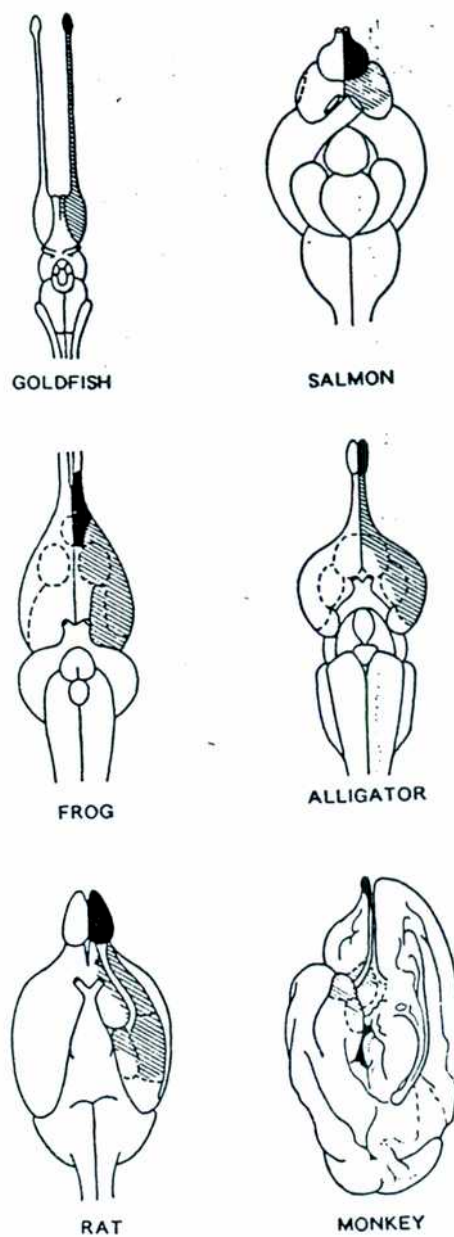


FIGURA 3.3. Diagrama de los cerebros de diferentes especies de vertebrados, mostrando el tamaño relativo de los bulbos olfatorios (negro) y la distribución de las proyecciones desde el bulbo (rayado). (Extraído de Farbman, 1992).

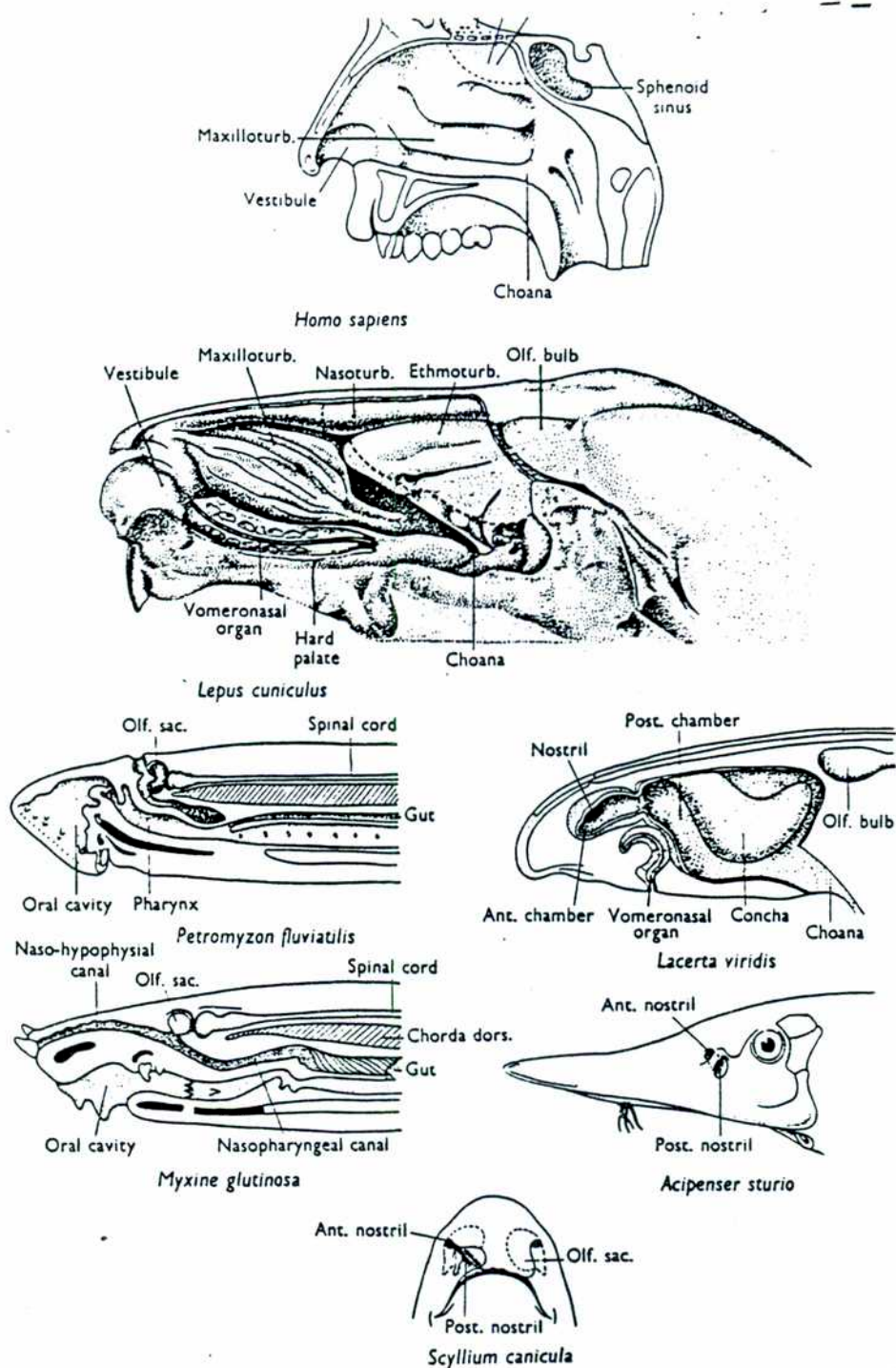


FIGURA 3.4. Esquemas que ilustran la disposición de la cavidad nasal y su relación con la cavidad oral y la faringe en una serie de vertebrados (Extraído de Allison, 1953).

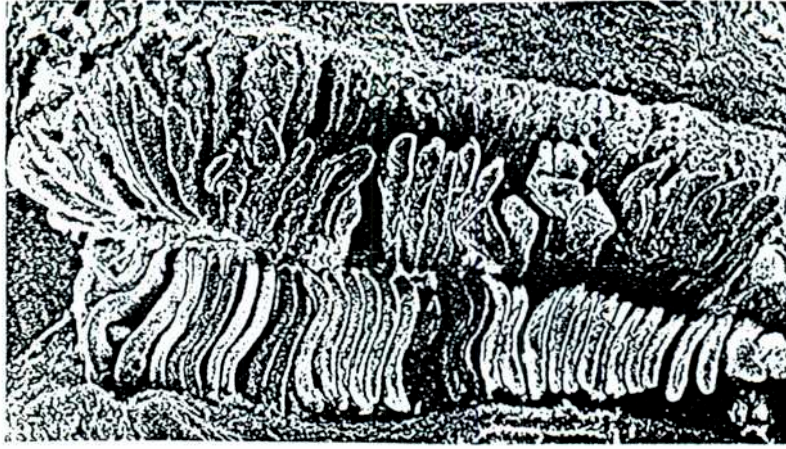


FIGURA 3.5. Micrografía de scanning mostrando la región sensorial de un pez óseo. (extraído de Farbman, 1992).

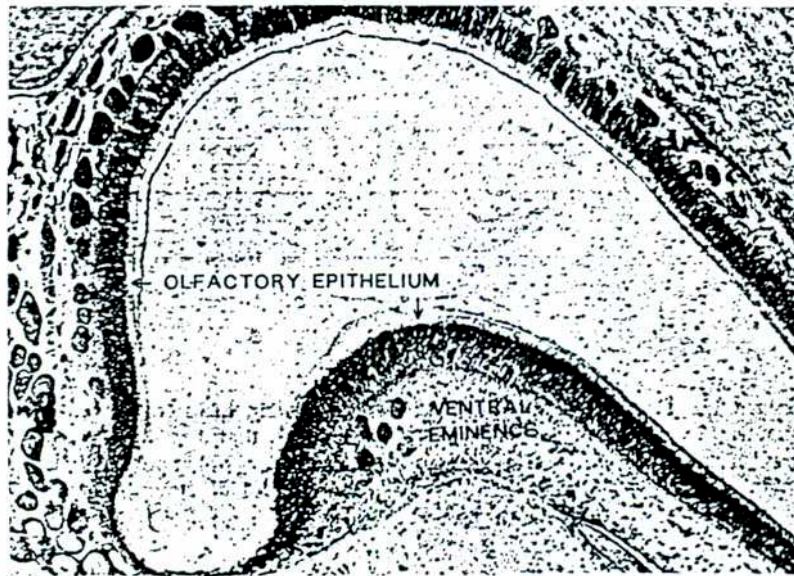


FIGURA 3.6. Micrografía de la sección frontal de la cavidad nasal de la rana. La eminencia ventral y la región dorsal presentan mucosa olfatoria (Extraído de Farbman, 1992).

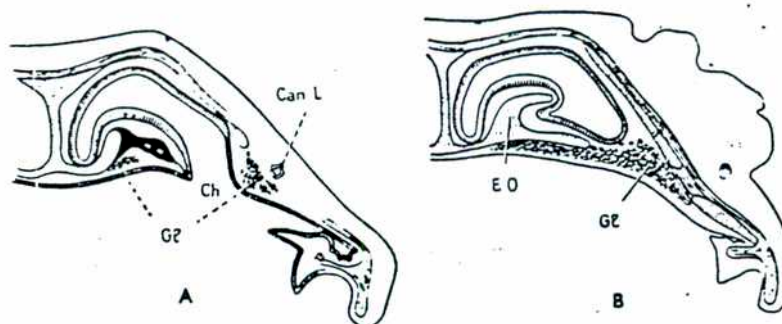


FIGURA 3.7. Cortes transversal de la cavidad nasal de *Bufo viridis*. A. A nivel de el orificio de las coanas. Can L. Canal lacrimal, Ch coana, Gl. Glándulas, EO. Eminencia olfatoria (Extraído de Grassé, 1955).

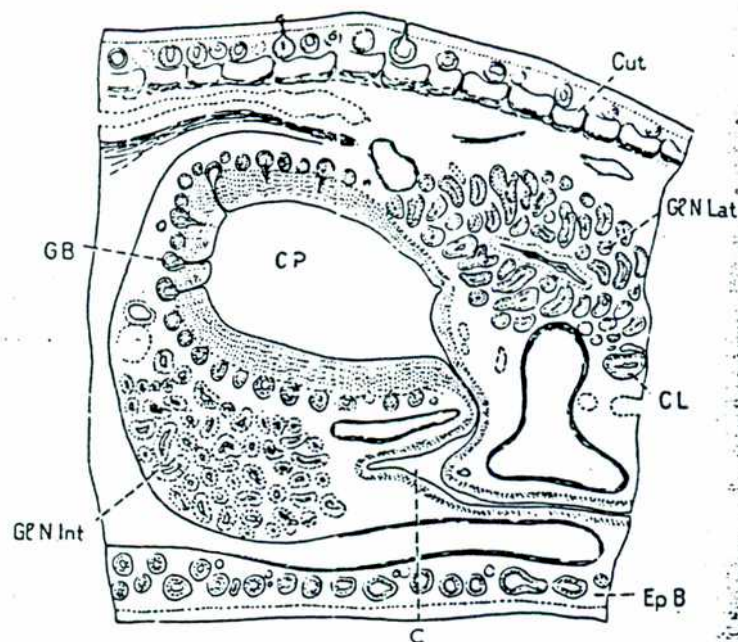


FIGURA 3.8 Corte longitudinal de la cavidad nasal de *Rana temporaria*. C. Cavidad inferior, CP. Cavidad principal, CL. Canal lacrimal, EpB. Epiteio bucal, GB. Glándulas de Bowman, G.N. Int. glándulas nasales internas, G.N. Lat. Glándulas nasales laterales (Extraído de Grassé, 1955).

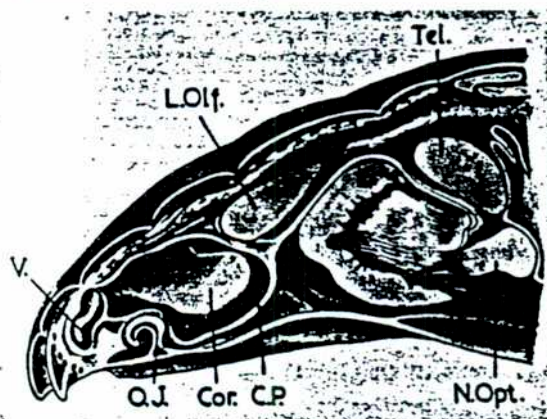


FIGURA 3.9. Corte sagital de la cabeza de *Lacerta viridis*. Cor. Cornetes, CpP. Cavidad principal, L.Olf. lóbulo olfatorio, N.O. nervio óptico, O.J. órgano de Jacobson, Tel. Telencéfalo, V. Vestíbulo (Extraído de Grassé, 1955).

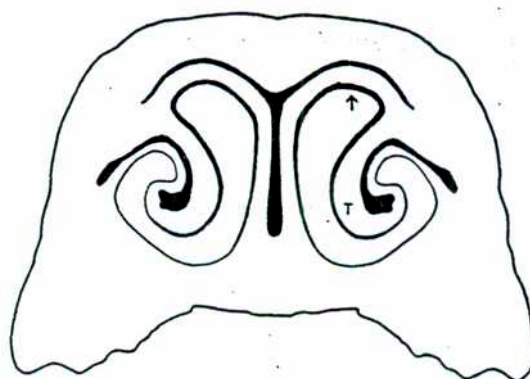


FIGURA 3.10. Esquema de una sección frontal de la cabeza de un reptil. Se muestran las cavidades nasales y los turbinales (T). (Extraído de Farbman, 1992).

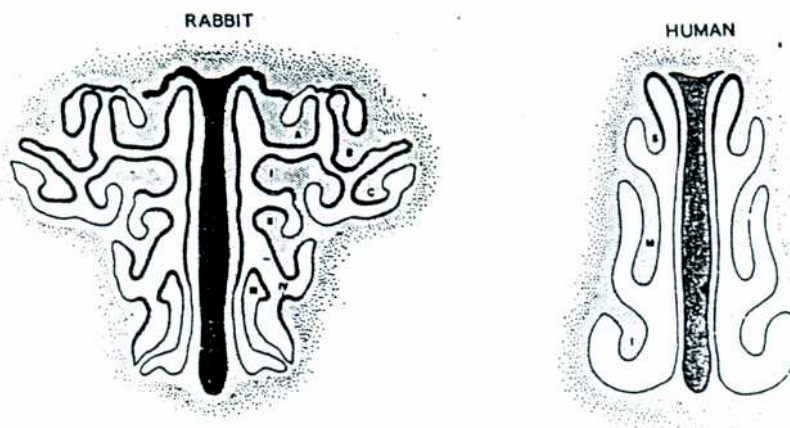


FIGURA 3.11. En la izquierda se representa la sección frontal de la cavidad nasal de un conejo, donde se muestran los ectoturbinates (A, B, C) y los endoturbinates (I, II, III, IV). En la derecha se representa la sección frontal de la cavidad nasal del hombre, mostrando los turbinates superior (S), medio (M) e inferior (I). En ambos casos en línea gruesa se representa el epitelio olfatorio (Extraído de Farbman, 1992).

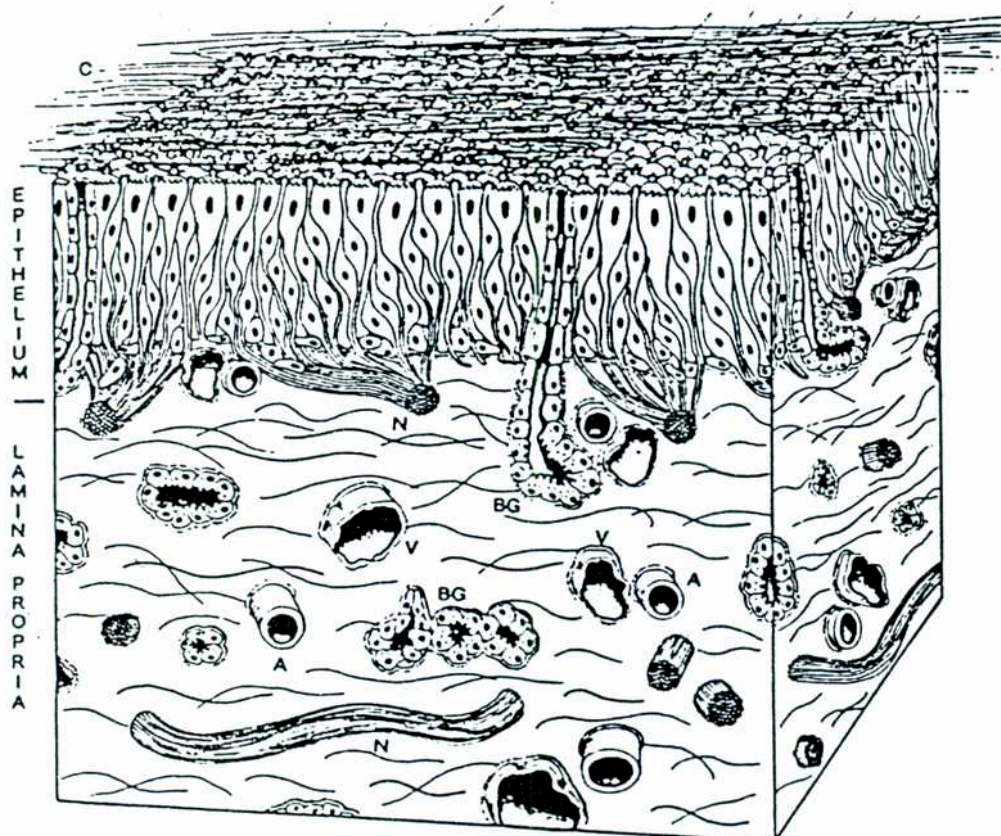


Figure 2.1. Diagrammatic illustration of the olfactory mucous membrane. The epithelium and lamina propria are shown. The long cilia on the surface are matted in a layer of mucus on the epithelial surface and lie parallel to the surface. Within the lamina propria are Bowman's glands (BG), bundles of olfactory nerve processes (N), and blood vessels, both small arteries (A) and veins (V). Ducts from Bowman's glands open onto the surface. For clarity, the numbers of olfactory nerve bundles and the cell bodies from which they originate are understated in this diagram. Compare with Figure 2.2A.

FIGURA 3.12. Esquema de la mucosa olfatoria (Extraído de Farbman, 1992).

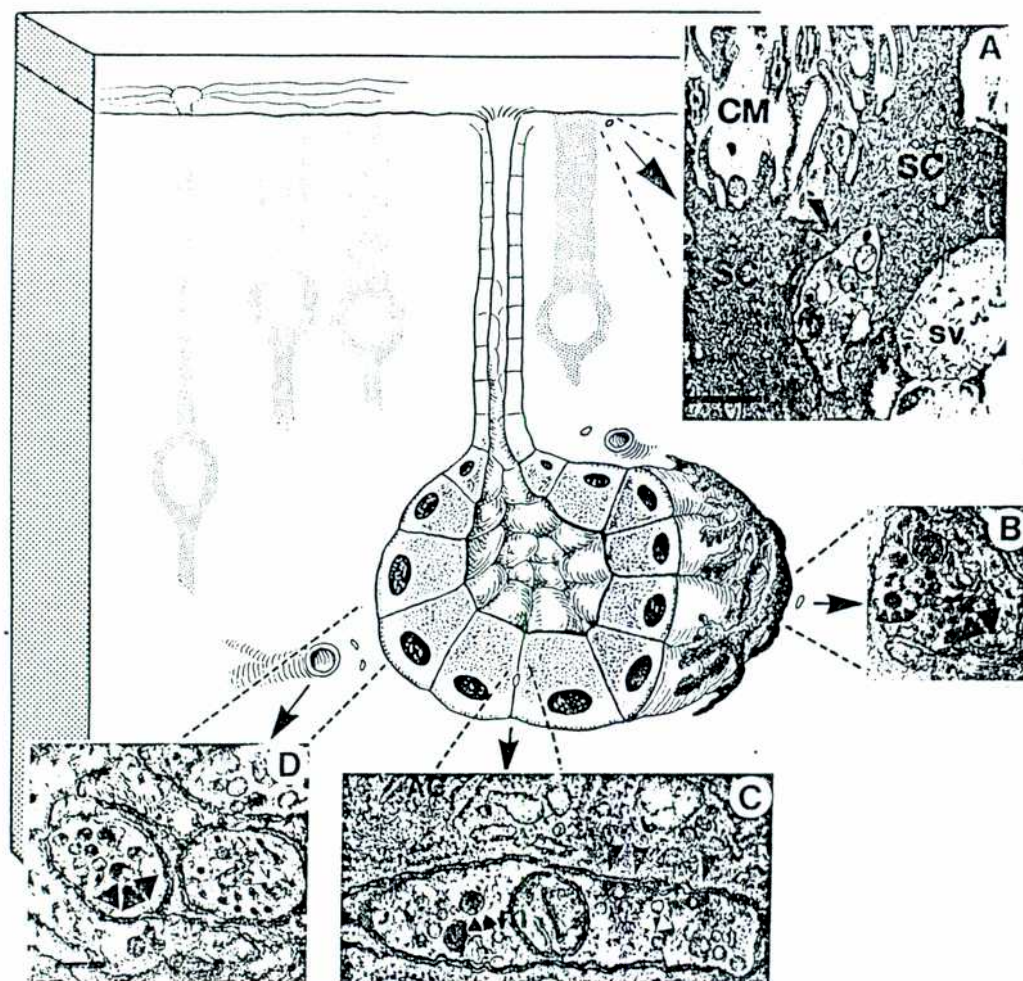


Fig. 4. Diagram of representative amphibian olfactory mucosa showing characteristic types of nerve terminals found in various locations. A: Nerve terminals (arrow) found near the surface of the olfactory epithelium occur most often between adjacent sustentacular cells (SC). CM, mucociliary complex; sv, secretory vesicle. Bar = 0.5 μ m. B: Terminals occurring in proximity to melanocytes contain large granular vesicles (small black triangles) and small agranular vesicles (white triangles). Arrowheads mark sites of synaptic membrane specializations. m, mitochondrion. Magnification same as D. D: Terminals in proximity to blood vessels and to the basal membranes of Bowman's glands contain large granular vesicles (black triangles) and small agranular vesicles (white triangles). Bar = 0.2 μ m. (Modified from Zielinski et al., 1989a,b; original drawing by William Loechel.)

FIGURA 3.13. Inervación de la mucosa olfatoria (Extraído de Getchell y Getchell, 1992).

MATERIALES Y METODOS

3.1- ANIMALES UTILIZADOS

Para el presente estudio se utilizaron ejemplares machos y hembras de *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus* sexualmente maduros.

Los ejemplares de *C. villosus* fueron capturados en las localidades Bahía Blanca y Cacharí y mantenidos en cautiverio en el Bioterio Central de la FCEyN (UBA). Fueron alimentados con comida balanceada para perros y agua *ad-libitum* (Iódice, 1986).

Los ejemplares de *D. hybridus* fueron capturados en la localidad de Cacharí y mantenidos como se explicó en el Capítulo II.

3.2- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA OPTICA

Se utilizaron 20 ejemplares adultos (11) machos y (8) hembras de *Chaetophractus villosus* y 7 ejemplares adultos (4) hembras y (3) machos de *Dasypus hybridus*. La anestesia utilizada fue clorhidrato de Ketamina (40mg/Kg, i.m.) y tiopental sódico (60 mg/Kg i.p.). Bajo anestesia se expuso el corazón y se inyectaron intracardiamente 0,5 ml de heparina 5000 U.I. (anticoagulante) y 0,5 ml de nitroprusiato de sodio al 2,4 % (vasodilatador). Los animales fueron perfundidos vía aorta con 2 l de solución fisiológica (0,9% de ClNa) seguida de fijador.

De acuerdo a la técnica a seguir los fijadores utilizados fueron el líquido de Bouin y el formol al 10%. En los casos donde sólo era necesario un estudio de las características histológicas de una porción de la mucosa olfatoria, luego de la fijación se realizó un abordaje a la cavidad nasal, previa remoción del escudo cefálico. En la cavidad nasal se tomaron con sumo cuidado porciones de los etmoturbinales. Con el fin de seleccionar para el estudio la misma región en los diferentes animales, las muestras se obtuvieron, en primer lugar, de los etmoturbinales dorsales localizados por delante de la placa

cribosa. En segundo lugar, se removieron los bulbos olfatorios con la placa cribosa asociada y se tomaron muestras de los etmoturbinales localizados por debajo de estas estructuras. En algunos casos, etmoturbinales de la región dorsal fueron disecados en fresco y fijados por inmersión en los mismos fijadores.

Los estudios de la cavidad nasal completa fueron realizados en animales fijados por perfusión.

Debido a la presencia de estructuras óseas en los turbinales que dificultan la obtención de secciones histológicas de los turbinales y de la nariz entera, se realizó previamente una decalcificación. Luego de numerosas pruebas de ensayo y error con diferentes métodos de decalcificación, la que nos dio mejor resultado fue la técnica del ácido fórmico y del citrato de sodio (Luna, 1968). La misma consiste en sumergir la pieza en una solución 50:50 de citrato de sodio al 20% y ácido fórmico al 50%. La permanencia de las piezas en esta solución depende del tamaño de las mismas. Los turbinales permanecieron 1 hora en el líquido decalcificador, la cavidad nasal entera de *Dasyus hybridus* durante dos semanas en la solución y la de *Chaetophractus villosus*, 1 mes. Luego, las muestras se lavaron rápidamente en agua destilada y se las pasa a una solución saturada de alumbre de potasio, durante 1 día (Romeis, 1936). Finalmente se realiza un pasaje por una solución de glicerina con ácido acético al 1% durante dos días a 4°C (López, com. pers.). Después de la decalcificación el tejido se procesa de la forma convencional.

3.2.1- ANATOMÍA TOPOGRÁFICA E HISTOLOGÍA.

1) Se realizaron seriados transversales (15 μ m) de las cavidades nasales enteras incluidas en parafina.

2) También se realizaron secciones de material incluido en parafina (5 μ m) y secciones obtenidas por crióstato de material congelado de etmoturbinales previamente disecados. Para los cortes de congelación luego de la fijación con formol Baker, las piezas fueron lavadas toda la noche en agua corriente. Luego se las colocó a 4°C en buffer fosfato salino a pH 7,4 con el agregado de sacarosa al 20% como crioprotector. Se realizaron

cortes entre 5 y 7 μm con el crióstato los que se adhirieron al portaobjetos mediante la técnica de Pappas (1971).

Los tejidos fueron teñidos con:

- a) Hematoxilina de Harris y eosina alcohólica 1% en alcohol 70%.
- b) Tricrómico de Masson modificado¹.
- c) Coloración de Mallory (Azan) Heidenhain.
- d) Técnica de Rubens-Dubal ¹ para la detección de fibras elásticas.
- e) Técnica de Gomori, para la determinación de fibras reticulares (Pearse, 1985)
- f) Técnica de Holmes (Ramón y Cajal y De Castro, 1972) para la detección de procesos neuronales.

3.2.2- ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS

3.2.2.1- MUCOSUSTANCIAS

Mucosustancias es un término colectivo que incluye macromoléculas compuestas principalmente por carbohidratos.

Las mucosustancias pueden ser clasificadas en: 1) glicanos y 2) glicoconjugados (GC).

- 1) Los glicanos a su vez incluyen: a) polisacáridos (grandes agregados de monosacáridos) y b) glicosaminoglicanos (por ejemplo: ácido siálico, queratan sulfato, sulfato de ácido hialurónico, dermatán sulfato, etc.).
- 2) Los glicoconjugados incluyen: a) proteoglicanos (largas cadenas de polisacáridos, unidas covalentemente a un pequeño centro proteico), b) glicoproteínas (proteínas unidas covalentemente a cadenas de oligosacáridos) y c) glicolípidos (lípidos unidos a cadenas de hidratos de carbono).

¹ Modificación de la Cátedra de Histología Animal. FCEyN. UBA.

A estas moléculas anteriormente mencionadas, cuya caracterización estructural frecuentemente ofrece una alta complejidad, se le introducen modificaciones tales como sulfatación y adición de grupos carboxilos que contribuyen aún más a aumentar su grado de organización (Danguy *et al.*, 1994).

Los métodos histoquímicos para la determinación de GC dependen inicialmente de su contenido de azúcares con hidroxilos vecinos y de su contenido ácido. Así, los GC que contiene exclusivamente hexosas con hidroxilos vecinos se visualizan selectivamente por el método del ácido periódico-Schiff (PAS). Adicionalmente, los ésteres sulfatados fuertemente ácidos y los grupos carboxilos de los ácidos siálicos y urónicos en los GC, menos ácidos, se unen a una gran variedad de colorantes catiónicos que no reaccionan con los aminoácidos dicarboxílicos de las proteínas o los ácidos nucleicos. Estos agentes básicos incluyen comúnmente al azul alcian (AB), azur A, fucsina aldehida y las diaminas férricas (Spicer y Schulte, 1992).

a) El PAS representa una de las técnicas más utilizadas en la histoquímica de los carbohidratos. Este método oxidativo depende del clivaje de los grupos glicoles por la acción del ácido periódico (HIO_4). El ácido periódico oxida los grupos 1,2 glicoles convirtiéndolos en aldehídos, los cuales reaccionan con el reactivo de Schiff, dando como resultado un dialdehído inestable e incoloro que luego se transforma en un compuesto coloreado (magenta) por la restauración de los grupos cromógenos. Este método da positivo con estructuras que contienen hexosas neutras. El término hexosas neutras es utilizado para residuos de monosacáridos que no poseen ésteres sulfatos, ácidos carboxílicos o grupos funcionales que contengan nitrógeno (Danguy *et al.*, 1994). Los proteoglicanos (que contienen glicosaminoglicanos) no son visualizados por el método del PAS utilizado usualmente (Spicer y Schulte, 1992).

Por lo tanto la positividad del PAS se debe a la presencia de glicoproteínas (neutras o con residuos de ácido siálico) y glucógeno (Pearse, 1985). Además, esta técnica permite detectar, fibras reticulares y glicoproteínas de la membrana basal y algunos glicolípidos (cerebrósidos y gangliósidos) (Sheenan y Hrapchak, 1980).

Para poner en evidencia la presencia de glucógeno el método más utilizado consiste en tratar previamente al tejido con la enzima diastasa. Esta enzima despolimeriza al glucógeno en azúcares pequeños, que son lavados con agua luego de

aplicar la diastasa. La posterior disminución de la reacción PAS positiva luego de este tratamiento, indica claramente la presencia de glucógeno (Sheenan y Hrapchak, 1980).

Por otra parte, se puede utilizar la técnica del PAS, para la detección de glicosaminoglicanos como son los residuos de ácido siálico, requiriéndose para ello la utilización de condiciones que oxiden completamente los residuos de ácido siálico sin alcanzar a oxidar los dioles de las hexosas vecinas. Voltz y col. (1987) demostraron que utilizando concentraciones diluidas de ácido periódico (0.4 mM) se produce la oxidación selectiva (PA*S) para los residuos de ácido siálico. Bajo estas condiciones no se observa tinción de los azúcares neutros. La oxidación suave con ácido periódico produce aldehídos selectivamente en los residuos de ácido siálico. La única parte potencialmente periodato-reactiva del ácido siálico unido en posición C₂, es la cadena (C₇, C₈, C₉) unida al C₆, que lleva tres grupos hidroxilos adyacentes. La cadena lateral reacciona con el periodato mucho más rápidamente que los glicanos de las hexosas. Por lo tanto, usando una solución diluida de ácido periódico, es posible oxidar solamente los residuos de ácido siálico, y el aldehído resultante puede ser visualizado con el reactivo de Schiff (Danguy *et al.*, 1994). En algunas glicoproteínas ácidas, los C₆, C₇, C₈ de los residuos de ácido siálico pueden estar acetilados (Pearse, 1985) y por lo tanto pueden no ser reactivos ni a la técnica de PAS ni a la técnica de Voltz y col. (1987). La saponificación con KOH produce desacetilación y por lo tanto, la reacción con PAS vuelve a dar positiva (Pearse, 1985). Por lo tanto un aumento en la reacción estaría indicando la presencia de ácido siálico acetilado. Para poder reconocer la presencia de ácidos siálicos totales es necesaria la saponificación y posterior oxidación selectiva.

Para reconocer la presencia de azúcares neutros en un tejido, se requiere: a) la saponificación con KOH (para eliminar los acetilos de los residuos 1,2 glicoles y de los residuos de ácido siálico), b) Oxidación selectiva (Voltz *et al.*, 1987) para oxidar los residuos de ácido siálico, c) reducción de los grupos aldehídos a alcoholes con borohidruro de sodio, d) realización de la técnica de PAS. De esta forma reaccionan sólo los residuos 1,2 glicoles de los azúcares neutros, ya los grupos reactivos de los residuos de ácido siálico fueron transformados en alcoholes y por lo tanto no son PAS reactivos.

Existen además otros procedimientos químicos que pueden ser aplicados para el estudio de los hidratos de carbono. Estos procedimientos se basan en bloquear los grupos reactivos e impedir su visualización histoquímica. El tratamiento de las secciones

de tejido con acético anhidro disuelto en piridina anhidra convierte los grupos hidroxilos reactivos en grupos ésteres acetilos (esterificación), también puede ocurrir la acetilación de los grupos aminos utilizando este método. Al aplicar la técnica de PAS, los carbohidratos PAS reactivos no estarán disponibles para que la reacción ocurra. Por otra parte, la hidrólisis de los ésteres acetilos puede realizarse mediante la saponificación con KOH, lo cual revierte de este modo la reacción de esterificación (Pearse, 1985),

b) Las técnicas que utilizan colorantes catiónicos permiten visualizar la presencia de glicoconjugados ácidos y glicosaminoglicanos en un tejido. Los dos colorantes más utilizados son el azur A y el azul alcian (AB). Los glicoconjugados aniónicos pueden presentar ésteres sulfato, con o sin la presencia de carboxilos, y ésteres carboxilos que no poseen residuos polisulfatados (Danguy *et al.*, 1994). La identificación de ambos componentes se lleva a cabo sobre la base de una mayor acidez de los grupos sulfatados respecto a los grupos carboxilados.

El Azur A, presenta el fenómeno que se denomina metacromasia. Esto es, que al reaccionar con algunas sustancias aniónicas cambia su color azul original a rojo o púrpura (Bancroft y Stevens, 1990). El efecto metacromático se produce cuando los iones del colorante, se encuentran en proximidad. Esto generalmente ocurre cuando los centros aniónicos de las mucosustancias están en proximidad espacial (Danguy *et al.*, 1994). La reacción es importante en la histoquímica de los hidratos de carbono debido a que solamente ciertos compuestos como glicoconjugados ácidos (especialmente algunos proteoglicanos) tiene la propiedad de reaccionar con colorantes metacromáticos.

El azul alciano (AB) (una ftalocianina soluble en agua que debe su color azul a un núcleo de cobre) usado a pH controlados permite clasificar a las sustancias de acuerdo a su acidez (Spicer y Schulte, 1992). El AB utilizado a pH 2.5-3 identifica tanto ésteres sulfatos como ésteres carboxilos, ya que a ese pH, tanto los grupos sulfatos como carboxilos disocian su protón. A pH 1-0.5, la tinción es selectiva para macromoléculas con grupos sulfatos, ya que sólo estos últimos quedan ionizados. La excesiva acidez no permiten que los grupos carboxilos liberen su protón, lo que produce una disminución de la afinidad del colorante por estos grupos (Spicer y Shultz, 1992). Los grupos carboxilos pueden ser bloqueados mediante una reacción suave con ácido clorhídrico y metanol a 37°C (metilación suave), por lo tanto la posterior tinción con AB a pH 2.5 mostrará solo los grupos sulfatados, ya que los grupos carboxilos han sido bloqueados

por la metilación previa (Bancroft y Stevens, 1990). Este método bloquea, además, los GC sulfatados de los tejidos conectivos. Por lo tanto, permite diferenciar solamente entre mucinas carboxiladas y sulfatadas de origen epitelial (Bancroft y Stevens, 1990). La metilación fuerte a 60°C, bloquea la basofilia tanto de los GC carboxilados como sulfatados. La posterior saponificación restaura la basofilia de los GC carboxilados. La reacción diferencial se basa en que la metilación hidroliza los grupos sulfatados, pero no los carboxilados; que forman grupos metil-ésteres. Estos grupos se hidrolizan con la saponificación lo cual permite la restauración de la basofilia (Bancroft y Stevens, 1990).

La utilización de AB y amarillo alcian (AY) permite diferenciar glicoconjugados ácidos carboxilados y sulfatados en un mismo preparado mediante la utilización de colores contrastantes. Este método involucra inicialmente la tinción con AB a pH 0.5, seguida posteriormente por AY a pH 2.5. De esta manera se obtiene: GC carboxilados y sulfatados, amarillos; GC sulfatados, azul; mezcla de ambos, verde (Ravetto, 1964, en Cook, 1990).

La orceína y el AB también han sido utilizados para la determinación de glicoconjugados sulfatados y carboxilados (Singh y Gordon, 1989). Este método tiñe los GC sulfatados de marrón y los GC carboxilados en azul. La orceína y el AB reaccionan con los grupos sulfatos de CG epiteliales y residuos de ácido sulfónico resultantes de la oxidación de grupos sulfuros (S-S o S-H) en el núcleo proteico de las glicoproteínas (Singh y Gordon, 1989).

La fucsina aldehído-AB es otra tinción adicional que permite diferenciar GC carboxilados y sulfatados en una misma preparación. La fucsina aldehído presenta gran afinidad por las entidades que presentan grupos sulfatos, tiñéndolos de color púrpura. La posterior tinción con AB tiñe los GC carboxilados de azul (Bancroft y Stevens, 1990).

c) La técnica de PAS junto con el AB (Mowry, 1956 en: Cook, 1990) permite diferenciar la presencia de glicoconjugados ácidos y neutros en un mismo preparado (Cook, 1990). La técnica consiste en una primera tinción con AB pH 2.5 seguida por la tinción con PAS. El AB colorea los glicoconjugados ácidos, incluso los glicoconjugados ácidos que puedan reaccionar con el PAS. Por lo tanto, la posterior tinción con PAS solo revelará los glicoconjugados neutros (Cook, 1990). Por lo tanto, los GC ácidos y

glicosaminoglicanos se tiñen de color azul, los GC neutros de color magenta y una mezcla de ambas sustancias se observará en diferentes gradaciones del púrpura.

3.2.2.2- LIPIDOS

Los lípidos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con la característica de su solubilidad en solventes orgánicos (Sheenan y Hrapchak, 1980).

Actualmente los lípidos pueden ser clasificados en:

- a) Triglicéridos (aceites y grasas)
- b) Glicerofosfatos (ácidos fosfatídicos, fosfatidil ésteres, inositol).
- c) Esfingolípidos (esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos)
- d) Ceras (ceras verdaderas, ésteres de vitamina A y D₃). (Sheenan y Hrapchak, 1980).

Para la correcta determinación de los lípidos lo importante es no exponer los tejidos a solventes tales como, xilol, alcoholes, cloroformo. Como estas sustancias se utilizan en forma corriente durante el procesamiento histológico de la mayoría de los lípidos no son preservados en este procedimiento. Por lo tanto, para tal fin se deben utilizar secciones obtenidas por congelación en las cuales se realicen tinciones con colorantes como el Sudan y el sulfato de azul de Nilo.

3.2.2.3- Proteínas

Para la detección de proteínas se utilizan métodos para determinar las secreciones de naturaleza proteica en su conjunto. Por lo tanto conviene utilizar métodos que demuestren los grupos aminos distribuidos en todas las proteínas. Para ello, se utilizó la técnica de Ninhydrina-Schiff que es una reacción basada en la desaminación oxidativa con liberación de aldehídos y la posterior reacción con el reactivo de Schiff (Martoja y Martoja Pierson, 1970).

Otra técnica utilizada es la tinción con mercurio-azul de bromofenol. Este colorante presenta dicromatismo, a elevadas concentraciones de colorante la transmitancia vira desde el azul al rojo (Pearse, 1985). Así, las proteínas tisulares se tiñen de color azul claro o grisáceo. Las regiones tisulares que presentan una elevada concentración de proteínas presentan una coloración roja (Pearse, 1985).

Para el estudio de la histoquímica de la mucosa olfatoria se realizaron la siguientes técnicas:

- 1) PAS (ácido periódico-Schiff) (De McManus en ¹⁹⁴⁶ ~~Pearse, 1985~~)
- 2) AB pH 0.5 y pH 2.5 (^{Bancroft} ~~Cook, 1990~~)
- 3) Técnica combinada de PAS-AB (Mowry, 1956 en: ~~Cook, 1990~~)
- 4) Técnica combinada de AB y AY (Ravetto, 1964 en: ~~Cook, 1990~~)
- 5) Diastasa-PAS (Sheehan y Hrapchak, 1980).
- 6) Oxidación selectiva con ácido periódico (PA*S) (Volz, 1987).
- 7) Saponificación (KOH/PAS) (Volz, 1987).
- 8) Reducción con borohidruro seguida de saponificación (PA*S/Bh/KOH/PAS) (Volz, 1987).
- 9) Saponificación-oxidación-reducción con borohidruro (KOH/PA*S/Bh/PAS) (Volz, 1987).
- 10) Orceína de Shikata (Singh y Gorton, 1989).
- 11) Azur A (Cook, 1985). ^{Técnica de Shikata}
- 12) Fucsina aldehído-AB (Bancroft y Stevens, 1990).
- 13) Metilación suave (37°C)/AB (^{Bancroft y Stevens, 1990} ~~Bancroft y Stevens, 1990~~).
- 14) Metilación fuerte (60°C)/AB (^{Bancroft y Stevens, 1990} ~~Bancroft y Stevens, 1990~~).
- 15) Técnica de Sudan Black en propilenglicol (^{Sheehan y Hrapchak, 1980} ~~Sheehan y Hrapchak, 1980~~).
- 16) Técnica de Azul de Nilo (Sheehan y Hrapchak, 1980): ^{He}
- 17) Técnica de Ninhydrina-Schiff (Sheehan y Hrapchak, 1980). ^{He}
- 18) Técnica de Mercurio-Azul de bromofenol (Pearse, 1985).

17 11/10 2012, 1 2012, 1990,

3.2.3- TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LECTINAS

Los métodos anteriormente mencionados permiten diferenciar las principales categorías de mucosustancias y proveer las bases fundamentales para su clasificación. Sin embargo, estos métodos nos otorgan una información limitada acerca de la estructura detallada de los carbohidratos. La introducción de proteínas que se unen a los carbohidratos -lectinas- ha introducido nuevos avances en la histoquímica de los hidratos de carbono.

Las lectinas son proteínas de origen no inmune -animales o vegetales-, cuya importancia fundamental reside en su afinidad por azúcares terminales o algunos azúcares internos, por diferentes uniones de estos azúcares o por algunos oligosacáridos que forman carbohidratos más complejos (Spicer y Schulte, 1992). La unión de una molécula de lectina a una determinada mucosustancia no involucra la formación de uniones covalentes. La naturaleza de la unión es similar a la que ocurre en el caso de la unión de un antígeno a un anticuerpo (Danguy *et al.*, 1994). Las lectinas se utilizan para identificar no sólo diferentes residuos de azúcares, sino también, en algunos casos permite reconocer su posición relativa dentro de la cadena. Además, mediante el uso de lectinas que presenten especificidades ya sean diferentes o que se superpongan, es posible identificar el origen celular de tipos específicos de glicoconjugados (Foster *et al.*, 1991).

Las glicoproteínas (GP) representan las mucosustancias más frecuentes y diversas, aún comparados con los glicosaminoglicanos (GAGs). Las GP constituyen los componentes que frecuentemente son visualizados por la histoquímica de las lectinas. Frecuentemente, los GAGs, a excepción del queratán sulfato, no se marcan con las lectinas en secciones de parafina. Alternativamente, también se cree que las lectinas podrían diferenciar algunos glicolípidos (Spicer y Schulte, 1992).

Las GP se pueden clasificar en dos categorías considerando la unión de los oligosacáridos a la cadena peptídica principal: O- y N-glicosil unidos. Los oligosacáridos O- unidos tienen residuos de N-acetilgalactosaminil unidos a los oxígenos de los grupos hidroxilos de la serina y la treonina. Las uniones N-glicosil poseen uniones N-glucosaminil unidos al nitrógeno de la amida asparragina. Ambos tipos de GP difieren

en su función biológica (Foster *et al.*, 1991; Spicer y Schulte, 1992). Las GP halladas en células mucosas son principalmente del tipo O-unidas y hacia este tipo de GP están dirigidas la mayoría de las lectinas (Foster *et al.*, 1991).

Para la detección de lectinas se han adaptado métodos que han dado resultados satisfactorios en las técnicas inmunohistoquímica. Por lo tanto, de acuerdo a la elección del marcador, éste puede ser fluorescente, como por ejemplo rodamina o fluoresceína (FITC), o una enzima, como la peroxidasa del rábano picante (HRP) (Danguy *et al.*, 1994).

La histoquímica mediante el uso de lectinas puede ser llevada a cabo tanto en secciones de parafina como en secciones de crióstato. En ambos métodos, se han utilizado una amplia gama de fijadores, aunque se han obtenido resultados satisfactorios con formol, soluciones alcohólicas, acetona y Carnoy (Foster *et al.*, 1991; Spicer y Schulte, 1992).

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de la histoquímica de la mucosa olfatoria mediante el uso de lectinas se utilizaron las secciones de parafina (6 μ m) obtenidas para las técnicas clásicas. La utilización de los fijadores Bouin o formol 10% no mostraron diferencias significativas en la tinción.

TÉCNICA UTILIZADA

El siguiente protocolo se ha diseñado para el análisis de lectinas con marcadores fluorescentes de acuerdo a una modificación de Foster y col. (1991).

- 1) Los cortes se desparafinan completamente con dos cambios de 40 minutos en xilol y luego se hidratan correctamente.
- 2) Lavado en buffer fosfato salino (PBS)-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.

- 3) Incubación con suero normal de caballo (Vectastain Kit; Vector Laboratories, Burlingame) o con leche descremada al 5% en PBS durante 45 minutos. El objetivo de este paso es bloquear el pegado inespecífico de los anticuerpos utilizados.
- 4) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 5) Incubación con las lectinas marcadas con FITC durante 1 hora.
- 6) Dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- 7) Montaje en glicerina.
- 8) Observación bajo microscopio de fluorescencia REICHERT POLIVAR 2, para lo cual se utilizó un filtro B1, que transmite la luz entre 450 nm y 495 nm.

TABLA 3.I. Lectinas utilizadas

LECTINA	CONCENTRACION	RESIDUO DE HIDRATO DE CARBONO AL CUAL SE UNE
<i>Pisatum sativum</i> (PSA)	1:50	Centro fucosilado de azúcares N-glicosidil unidos ¹
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	1:50	(GlcNAc β 1,4) _n >NeuAc ^{1,2}
<i>Arachis hypogea</i> (PNA)	1:50	Gal β 1,3Gal NAc terminal ²
<i>Glycine maximus</i> (Soybean) (SBA)	1:40	GalNAc ²

GlcNAc: N-acetilglucosamina; NeuAc: ácido neuroamínico (ácido siálico); GalNAc: N-acetilgalactosamina (¹ Adaptado de Danguy *et al.*, 1994; ² Adaptado de Foster *et al.*, 1991 y Spicer y Schulte, 1992).

- 1) Si las secciones se obtuvieron a partir de muestras incluidas en parafina, los cortes se desparafinan completamente con dos cambios de 40 minutos en xilol. En el caso de los cortes obtenidos por congelación, se comienza directamente por el paso 2).
- 2) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 3) Incubación con H_2O_2 al 0.5% durante 30 min. El objetivo de este paso es el bloqueo de las peroxidasas endógenas
- 4) Lavado en PBS-Tritón X-100% durante 10 min.
- 5) Incubación en leche descremada al 5% en PBS durante 60 min. La leche descremada puede ser reemplazada por suero normal de caballo (Vectastain Kit; Vector Laboratories, Burlingame) durante 30 min. El objetivo de este paso es bloquear el pegado inespecífico de los anticuerpos utilizados.
- 6) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 7) Incubación en cámara húmeda con el anticuerpo específico durante toda la noche a 4°C.
- 8) Incubación con el anticuerpo específico durante 60 min a 37°C.
- 9) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 10) Incubación durante 60 min con leche descremada al 5% en PBS en PBS o con suero normal de caballo durante 30 min. Esta incubación se realiza para bloquear el pegado inespecífico del segundo anticuerpo.
- 11) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 12) Incubación con el segundo anticuerpo biotinilado durante 60 min (Vectastain Kit; Vector Laboratories, Burlingame).
- 13) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 14) Incubación de las secciones con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) durante 30 min. (Vectastain Kit; Vector Laboratories, Burlingame).
- 15) Lavado en PBS-Tritón X-100 (0.2%) durante 10 min.
- 16) Revelado con el agregado de 3-3'-diaminobencidina (Sigma) 0.03% en Tris salino 0.05M (pH 7.4), con H_2O_2 0.04%. Se observa bajo microscopio la aparición de reacción positiva (se observa como precipitado de color marrón oscuro)
- 17) La reacción se detiene pasando las secciones a PBS.
- 18) Deshidratar los cortes en alcoholes, aclaración con xilol y montaje en bálsamo sintético.

3.3- TECNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.3.1- OBTENCION DE LAS SECCIONES

Para las técnicas inmunohistoquímicas se utilizaron ejemplares machos y hembras de *C. villosus* y *D. hybridus*. Los animales fueron perfundidos (como se describió anteriormente) con líquido fijador de Bouin o con formol al 10%, dependiendo del anticuerpo a ser utilizado (Tabla 3.II). Las muestras a procesar fueron obtenidas de los etmoturbinales dorsales.

Al momento de procesar las muestras existen dos aspectos generalmente no compatibles: la correcta preservación de los antígenos y el mantenimiento de la morfología. Las técnicas de procesamiento del tejido que son aptas para los estudios morfológicos generalmente no permiten la correcta preservación del antígeno. Así, el uso de fijadores usualmente utilizados en las técnicas histológicas convencionales, tienden a la desaparición total o parcial de la inmunorreactividad. Por otro lado, las inclusiones en parafina son aptas para la detección de algunos determinados tipos de antígenos. En cambio las secciones cortadas en crióstato son las más indicadas para la detección de antígenos más sensibles a la temperatura y a los diferentes pasos implicados en la inclusión. Por lo tanto, se obtuvieron secciones de parafina o secciones obtenidas en crióstato de acuerdo al tipo de anticuerpo a utilizar (ver Tabla 3.II). En el caso del material incluido en parafina, el tiempo de inclusión en estufa se redujo a 40 minutos, lo que disminuye la posible desaparición o disminución de la inmunorreactividad.

TECNICA UTILIZADA

Se utilizó la técnica inmunohistoquímica de Hsu (1993) y Paz y col. (1993).

La Tabla 3.II muestra los anticuerpos utilizados en el presente estudio.

TABLA 3.II. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos o Antisueros	Desarrollado en	Dilución	Tipo	Secciones	Fijador	Origen
Anti-OMP ¹	Cabra	1:200	Policlonal	Parafina	Bouin	Cedido por el Dr. Margolis
Anti-PGP 9,5 ²	Conejo	1:100	Policlonal	Parafina	Bouin	Ultraclone Limited
Anti-LP34 ³	Ratón	1:100	Monoclonal	Congelación	Formol 10%	Novocastra Lab.
Anti-NF-200 ⁴	Ratón	1:100	Monoclonal	Congelación	Formol 10%	Novocastra Lab.
Anti-NF-160 ⁵	Ratón	1:100	Monoclonal	Congelación	Formol 10%	Novocastra Lab.
Anti-VIM ⁶	Ratón	1:100	Monoclonal	Congelación	Bouin	Novocastra Lab.
Anti-VIP ⁷	Conejo	1:100	Policlonal	Congelación	Bouin	Amersham International plc.
Anti-CTK18 ⁸	Ratón	1:200	Monoclonal	Congelación	Bouin	SIGMA Chemical Co.
Anti-KS8-pan ⁹	Ratón	1:15	Monoclonal	Congelación	Bouin	Progen Heidelberg
Anti-PCNA ¹⁰	Ratón	1:30	Monoclonal	Parafina. Tratamiento con microondas	Bouin	Enzo Diagnostics
Anti-GAP43 ¹¹	Ratón	1:30	Monoclonal	Parafina	Bouin	Oncogene Science

¹ Anti OMP: anticuerpo específico para la marcación de neuronas olfatorias, desarrollado por el Dr. Margolis.

- ² Anti PGP 9.5: anticuerpo se une a una proteína neuro-específica aislada del cerebro humano, y que se halla principalmente en el citoplasma de neuronas y células neuroendócrinas.
- ³ Anti citoqueratina 5, 6 y 18: estos anticuerpos muestran reactividad con tejidos epiteliales, ya sean glandulares, simples o estratificados.
- ⁴ Anti neurofilamentos de 200 kD: estos anticuerpos muestran reactividad en procesos neuronales del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico.
- ⁵ Anti neurofilamentos de 160 kD: estos anticuerpos muestran reactividad con procesos neuronales del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico.
- ⁶ Anti vimentina: este anticuerpo reconoce un tipo de filamentos intermedios -la vimentina- que se expresa en la mayoría de las células de origen mesenquimático, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células musculares, células sanguíneas y melanocitos.
- ⁷ Anti péptido intestinal vasoactivo: este antisuero ha sido evaluado fundamentalmente en su habilidad para inmunomarcas células ganglionares de las capas superficiales y profundas del intestino delgado como principales controles.
- ⁸ Anti citoqueratina 18: Este anticuerpo muestra una inmunorreactividad específica contra la citoqueratina formada por el péptido 18 y reacciona específicamente con una amplia variedad de epitelios simples (por ejemplo: Intestino delgado, conductos biliares, epitelios glandulares y secreción apocrina de glándulas sudoríparas).
- ⁹ Anti KS8-pan: Este anticuerpo reconoce un grupo amplio de citoqueratinas principalmente la 1 y 8. Marca todos los epitelios, inclusive aquellos derivados de neoplasmas.
- ¹⁰ Anti antígeno de proliferación celular: Identifica células en todas las fases activas de su ciclo celular.
- ¹¹ Anti proteína asociada al crecimiento: Este anticuerpo identifica la proteína involucrada en el crecimiento de las neuritas y en la sinaptogénesis.

CONTROLES

En todos los casos se utilizaron dos tipos de controles:

- 1- la omisión del primer anticuerpo y,
- 2- la omisión del segundo anticuerpo. En ambos casos fueron reemplazados por PBS.

3.4- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

3.4.1- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Para la MET, se utilizaron 5 ejemplares hembras de *C. villosus* y 3 ejemplares machos de *D. hybridus*. Bajo anestesia se instiló el fijador a través de la cavidad nasal. Posteriormente pequeñas muestras de mucosa olfatoria de los etmoturbinales dorsales fueron disecadas y fijadas rápidamente por inmersión en glutaraldehído 2% en buffer cacodilato 0.1M (pH: 7.2) durante 5 horas a 4° C. Luego de la obtención de muestras de mucosa olfatoria para fijarlas por inmersión, los animales fueron perfundidos vía aorta con 1 litro de solución fisiológica modificada (0.8% de ClNa, 0.8% de sacarosa y 0.4% de glucosa, seguida por 1 litro de fijador (glutaraldehído 2%, paraformaldehído 2% en buffer cacodilato 0.1M a pH 7.4). En ambos casos, las piezas luego fueron transferidas al buffer cacodilato pH 7.4 con el agregado de 0.2M de sacarosa, donde permanecieron durante toda la noche. Luego de tres lavados de 5 minutos en el mismo buffer, fueron postfijadas durante 1 hora en 1% O_5O_4 en el mismo buffer. Posteriormente, se lavaron de la misma forma que el paso anterior; se deshidratan con etanol a concentraciones crecientes, se aclaran con acetona y se infiltran con araldita. Secciones semifinas fueron obtenidas con un ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B. Posteriormente, las secciones fueron teñidas con azul de toluidina-bórax (Bancroft y Stevens, 1990; Bozzola y Russell, 1992). Secciones ultrafinas fueron obtenidas con el mismo ultramicrotomo con navaja de diamante. Las secciones se montaron en grillas de 200 mesh y fueron teñidas con acetato de uranilo (1% en etanol al 70%) y con citrato de Plomo de Reynolds. Las secciones fueron analizadas en un ME Siemens ELMISKOP I de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA o mediante un ME Zeiss M-109 Turbo de la Facultad de Ciencias Médicas (LANAIS MIE-UBA-CONICET) ambos operando a 80 kV.

RESULTADOS

3. ESTUDIO SOBRE LAS ESTRUCTURAS NAALES DE LOS ARMADILLOS - *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS* Y *DASYPUS HYBRIDUS*-

En esta primera parte del trabajo se describirá anatomo e histológicamente la cavidad nasal de ambos armadillos con especial atención en los estudios de la mucosa olfatoria.

La descripción que sigue a continuación está restringida a las características morfológicas que son más parecidas en ambas especies. Esta es la razón por la cual las describo conjuntamente. Los caracteres diferenciales serán señalados donde corresponda.

3.1. CAVIDAD NASAL

La cavidad nasal ocupa el macizo facial con una dirección longitudinal. Se extiende desde el extremo anterior del hocico hasta el etmoides -que la separa del cerebro- y la coana -que la comunica con la nasofaringe- (Fig 3.14, 3.15). Se divide en dos fosas nasales por medio de una tabique denominado septo nasal (Fig 3.14A). Sin embargo, esta división es incompleta, la cavidad nasal se halla completamente dividida en una cavidad izquierda y derecha solamente en su tercio rostral (Fig. 3.14A). Caudalmente, ambas están en continuidad a través de el extremo ventral del septo nasal (Fig. 3.14A).

Debido a su forma rectangular, la cavidad nasal presenta dos extremos -anterior y posterior- y cuatro lados -dorsal, medial o interno, lateral o externo y ventral.

Extremos:

a) El extremo anterior o rostral se comunica con el exterior a través de las narinas. Estas aberturas se hallan limitadas por una porción cartilaginosa en forma de anillo incompleto. Este anillo cartilaginoso es una prolongación rostral de los extremos libres del hueso nasal y del premaxilar. Ambas narinas se hallan separadas por la porción membranosa del septo nasal (el que se discutirá más adelante).

b) El extremo posterior se halla subdividida en dos cavidades -dorsal y ventral- por la lámina basal de la papiracea (subdivisión del etmoides) unida a la cresta esfenotmoidal del palatino y del vomer (Fig. 3.14C y 3.15B). La cavidad dorsal está ocupada por el laberinto etmoidal, formado por los turbinales del etmoides y separada de la cavidad craneana por la lámina cribosa del etmoides (Fig. 3.14C y 3.15B). La cavidad ventral forma el conducto naso-faríngeo, que se abre a la coana (Fig. 3.14C y 3.15B).

Lados:

El lado dorsal o techo está formado principalmente por los huesos nasales y por la porción rostral de los frontales (Fig. 3.17A). Con forma de canal se pone en contacto con el meato dorsal (Fig. 3.18B, C y D)

El lado medial o interno está formado por un tabique medial el septo nasal que separa, como dijimos anteriormente, ambas fosas nasales. El septo nasal se divide en tres regiones anatómicas: un septo membranoso, un septo cartilaginoso y el septo óseo. El septo membranoso, es la porción más anterior que separa a ambas narinas. Se compone externamente de epitelio estratificado e internamente de tejido conectivo. El septo cartilaginoso se sitúa posterior al septo membranoso. Se encuentra tapizado por una mucosa respiratoria glandular (Fig. 3.18B). El septo óseo se halla inmediatamente posterior al septo cartilaginoso y se sitúa en la mayor parte de la cavidad nasal. La parte ósea está formada por el vómer en posición ventral y la lámina perpendicular del etmoides en posición dorsal. En su parte anterior está recubierta por epitelio respiratorio cuya lámina propia carece de glándulas (Fig. 3.18C). En su parte media, la porción inferior se halla tapizada por epitelio respiratorio y la porción superior presenta mucosa

olfatoria (Fig. 3.18D). En su parte posterior, a nivel del laberinto etmoidal se halla tapizado en su mayor parte por epitelio olfatorio (Fig. 3.18E y F).

El tejido conectivo de la mucosa que rodea al septo óseo presenta una gran cantidad de paquetes vasculo-nerviosos.

Lado lateral o externo: Lateralmente la cavidad nasal, se halla limitada principalmente por el hueso maxilar y se completa en el extremo anterior por el premaxilar y en el extremo caudal por el frontal (Fig. 3.17A).

Lado ventral El lado ventral o piso de la cavidad nasal se forma por los huesos premaxilares -en la región anterior-, maxilares -medialmente- y palatinos -en la región posterior- (Fig. 3.17A).

3.1.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA INTERNA DE LAS FOSAS NAALES

Como mencionamos anteriormente, las fosas nasales se comunican con el exterior a través de las narinas, estos orificios se hallan tapizados por piel con glándulas sudoríparas y sebáceas. Los orificios desembocan dentro de la cavidad nasal en una región denominada vestíbulo. Por su ubicación el vestíbulo representa la porción más anterior de la cavidad nasal, presentando como límite posterior el comienzo de los cornetes o turbinas rostrales (Fig. 3.14C). El vestíbulo se halla tapizado por un epitelio estratificado con capa córnea, en el corion pueden observarse algunas glándulas sudoríparas. En *Chaetophractus villosus* la cara laterointerna del vestíbulo presenta una estructura muy llamativa que a modo de evaginación oblitera parcialmente el lumen vestibular (Figura 3.18A, 3.21). Esta estructura se halla tapizada por numerosas espinas que se proyectan hacia las narinas. Mediante el análisis histológico puede observarse que las espinas son proyecciones de la epidermis fuertemente queratinizadas. Las espinas se localizan en la cara lateral y ventral de la estructura, también se las puede observar en la cara lateral y ventral del vestíbulo (Fig. 3.18, 3.21). Un cilindro cartilaginoso recorre el eje longitudinal de la estructura para continuarse con el eje óseo

del maxiloturbinal, el que se origina en continuidad con la estructura. En *Dasypus hybridus* una estructura similar a la anterior oblitera parcialmente el lumen del vestibulo, sin embargo, se diferencia de la de *C. villosus* ya que carece por completo de procesos espinosos.

En la región posterior del vestibulo el epitelio estratificado pasa gradualmente de estratificado a pseudoestratificado ciliado también denominado -epitelio respiratorio-.

A partir del vestibulo la pared lateral de las fosas nasales es irregular y anfractuosa debido a la saliencia de los turbinales (cornetes o conchas nasales) que delimitan depresiones longitudinales llamadas meatos. Este complejo sistema de cornetes nasales, proveen una enorme superficie cubierta por diferentes mucosas.

Existen dos grupos de cornetes: 1- los cornetes rostrales y 2- los cornetes caudales.

1- Los cornetes rostrales, también denominados cornetes nasales son finas láminas óseas enruladas sobre sí mismas. Existen dos grupos de cornetes nasales: a) dorsal y b) ventral.

a) El cornete nasal dorsal -o nasoturbinal- es el más largo y más simple. Representa una evaginación ósea del hueso nasal (Fig. 3.18C). En su extremo posterior se adhiere a la lámina papirácea del etmoides (Fig. 3.14A) por lo que algunos autores la consideran como el primer endoturbinal. En su extremo anterior finaliza en una prolongación fibrocartilaginosa asociada al anillo cartilaginoso del vestibulo. Analizando el recorrido del cornete nasal dorsal observaremos que rostralmente invade el lumen nasal por medio de dos pliegues simples (Fig. 3.18C) que delimitan los meatos dorsal y medial, ambos tapizados por mucosa respiratoria con presencia de glándulas nasales únicamente en la pared en contacto con el meato medial (Fig. 3.18C). Posteriormente se pone en contacto con el seno maxilofrontal, presentando mucosa olfatoria en su porción dorsal (Fig. 3.18D). A nivel del hueso frontal rodea medialmente el laberinto etmoidal presentando su pared exclusivamente mucosa olfatoria (Fig. 3.18E).

b) El cornete nasal ventral -o maxiloturbinal- es más grueso y corto que su homólogo dorsal. Representa una evaginación ósea del maxilar. Este cornete presenta un doble enrollamiento, dorsal y ventral, que ocupa gran parte de la cavidad nasal. Se halla recubierto por un epitelio típicamente respiratorio y una lámina propia glandular (Figs. 3.18B, C y D). Dorsalmente limita con el meato medial y ventralmente con el meato

ventral. Nace como una prolongación de la estructura llamativa vestibular y finaliza poco antes del comienzo del conducto nasofaríngeo (Figs. 3.14 y 3.15).

2- Los cornetes caudales, formados por los turbinales del etmoides, forman lo que se denomina "laberinto etmoidal" (Figs. 18E, F y G). En ambas especies el laberinto etmoidal se halla sumamente desarrollado, invadiendo incluso la cara lateral de los bulbos olfatorios. Los turbinales del etmoides -etmoturbinales- son finas lamelas óseas que se enrollan sobre si mismas. Estas láminas se insertan por su extremo caudal o base a la lámina cribosa del etmoides y por su borde ventral sobre la cara interna de la lámina papirácea (Fig. 3.16). El borde medial y la extremidad rostral son libres. De estas láminas principales parten lamelas secundarias y terciarias, formando lamelas cada vez más pequeñas delimitando espacios anfractuosos que forman el lumen del laberinto etmoidal. Entre los etmoturbinales se pueden diferenciar dos tipos: los ectoturbinales y los endoturbinales. Los ectoturbinales se sitúan lateralmente y no es posible observarlos en una corte sagital de la cavidad nasal. Los endoturbinales avanzan medialmente y son visibles en cortes sagitales. Estos últimos están más desarrollados que los ectoturbinales. La cantidad de endoturbinales varía en las diferentes especies, en *C. villosus* encontramos 7 endoturbinales y en *D. hybridus* 8. Los etmoturbinales están tapizados por mucosa olfatoria (Figs. 3.19, 3.20). Del laberinto etmoidal parte un turbinal -denominado cornete medio- muy desarrollado. Este avanza rostralmente y se ubica entre el cornete nasal dorsal y el ventral (Figs. 18D y E). En su extremo anterior sólo su cara dorsal se halla tapizada por mucosa olfatoria (Fig. 18D), posteriormente está rodeado completamente por mucosa olfatoria (Fig. 18 E).

Meatos:

Los turbinales delimitan espacios denominados meatos nasales. Existen cuatro meatos: el dorsal, el medio y el ventral. El meato dorsal se halla entre el hueso nasal, que forma el techo de la cavidad nasal, y el cornete nasal dorsal (Figs. 3.14C, 3.18B, C, D). El meato medio en la región anterior se sitúa entre los cornetes nasales dorsal y ventral (Figs. 3.14, 18 B, C, D). En la región posterior se bifurca en una región superior -que se

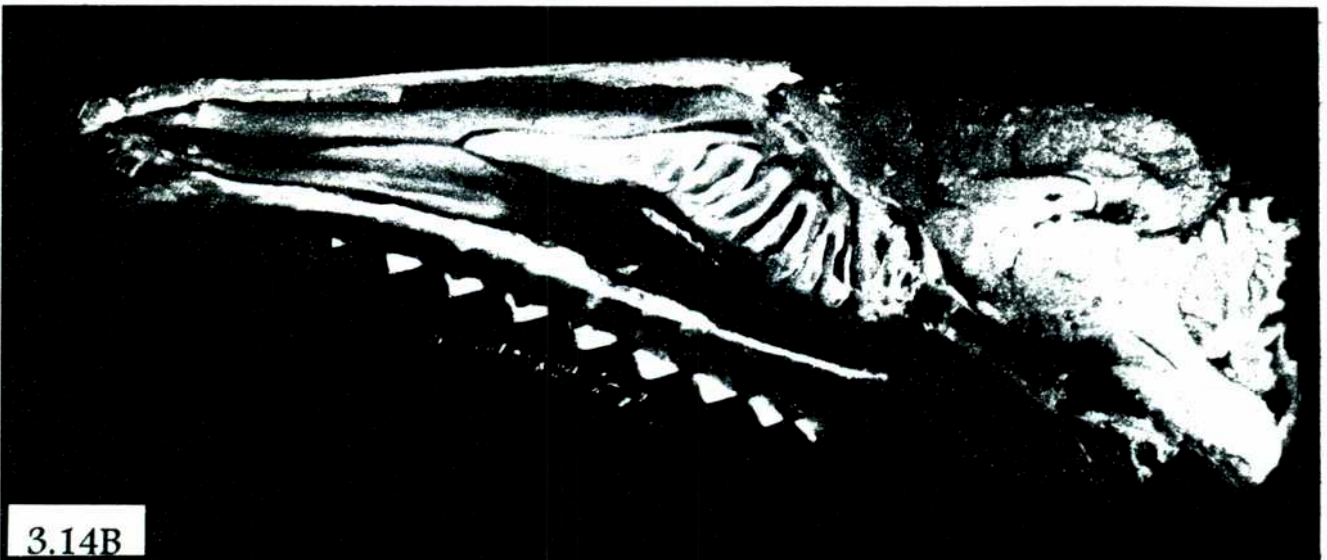
localiza entre el cornete dorsal y el cornete medio- y en una inferior que se ubica por debajo del cornete medio y se dirige hacia el laberinto etmoidal (Fig. 3.14C). El meato ventral discurre por debajo del cornete ventral y se dirige posteriormente hacia el conducto nasofaríngeo (Figs. 3.14C y 3.18 B, C, D). Por la cara medial los tres meatos se comunican entre sí por un espacio que se ubica entre los cornetes y el septo nasal, el meato común (Figs. 18B, C; D). Este discurre desde la abertura rostral hacia la abertura caudal de la cavidad nasal en el laberinto etmoidal.

Senos paranasales:

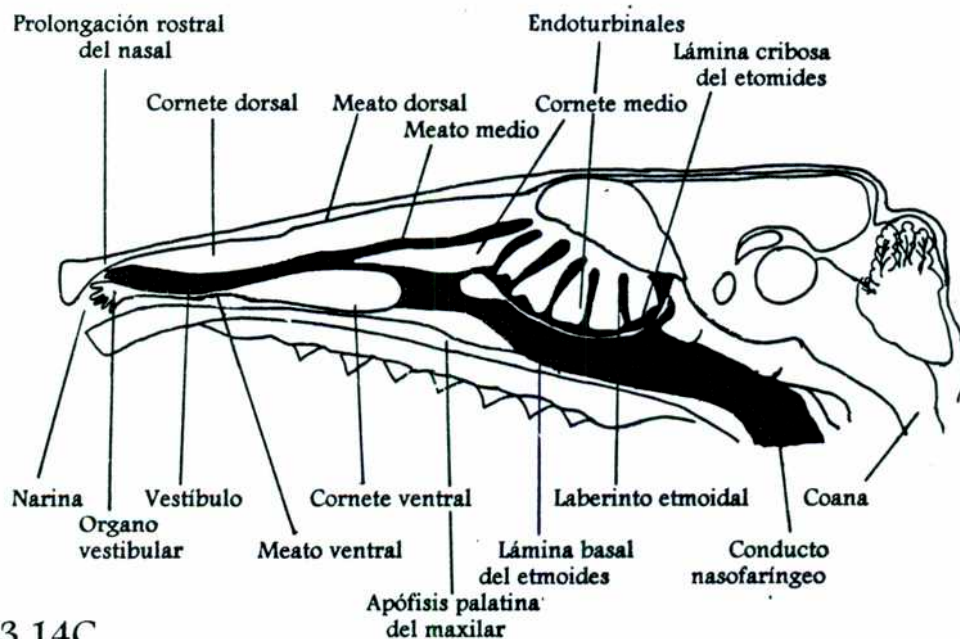
Los senos paranasales son cavidades anfractuosas anexas a las fosas nasales. En estos armadillos se ha observado un único seno que denominamos seno maxilofrontal. Alcanza su mayor desarrollo a nivel del sexto al octavo molar ubicándose dentro de los huesos frontal y palatino (Figs. 3.18E, F), de esta cavidad parten dos prolongaciones una dorsal que discurre rostralmente dentro del hueso maxilar (Fig. 3.18D) y una ventral que discurre caudalmente dentro del palatino (Fig. 3.18F). Se halla completamente tapizado por un epitelio pseudoestratificado ciliado no sensorial, con una lámina propia con abundantes glándulas nasales (Figs. 3.19, 3.20). En ambas especies este seno presenta una única abertura que desemboca a nivel del meato medial entre el cuarto y quinto molar.



3.14A



3.14B



3.14C

FIGURA 3.14A. Preparado sagital de la cabeza del armadillo *Chaetophractus villosus*. El * señala la región donde comienza el conducto nasofaríngeo. Desde la flecha (►) hacia adelante el septo nasal es incompleto (1.8x).

B. Preparado sagital luego de la remoción del septo nasal. Referencias en la figura 3.1C.

C. Referencias correspondientes a la figura anterior.

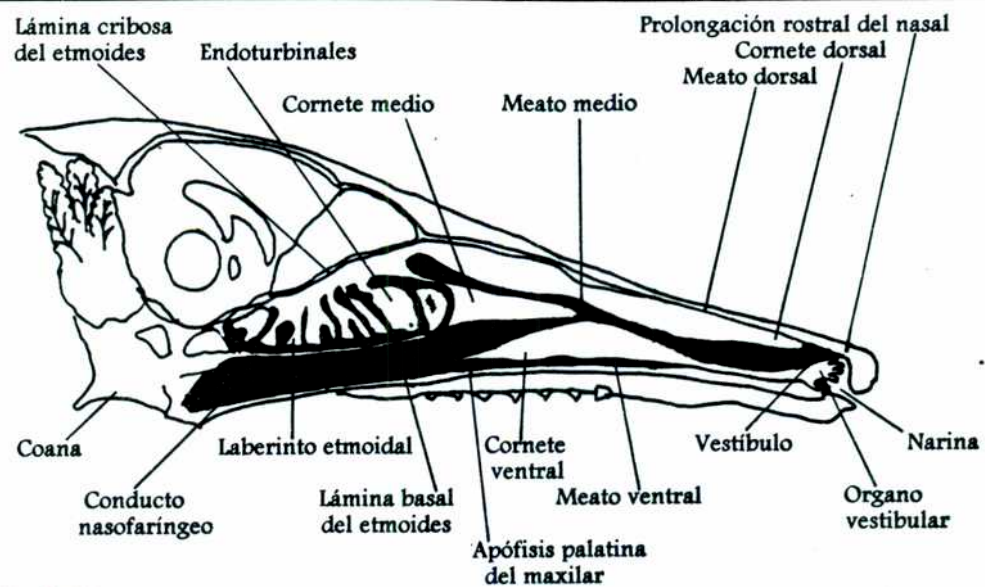
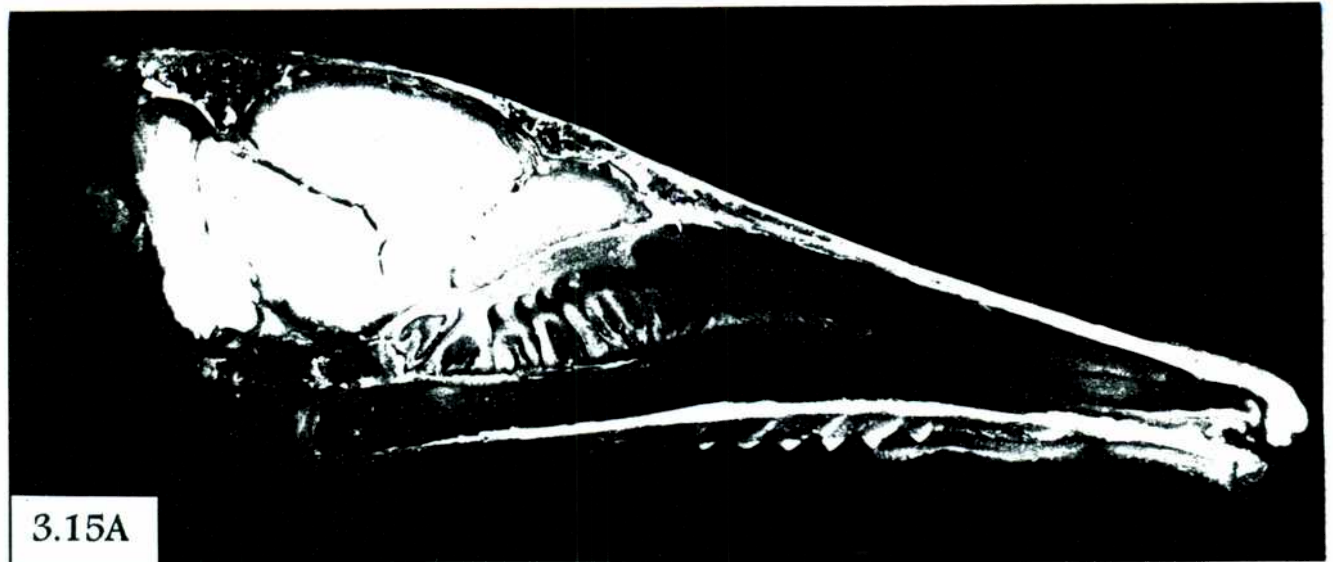


FIGURA 3.15A. Preparado sagital de la cabeza del armadillo *Dasypus hybridus*, luego de la remoción del septo nasal. El * señala la región donde comienza el conducto nasofaríngeo. Referencias en la figura 3.2B (2x).

B. Referencias correspondientes a la figura anterior.

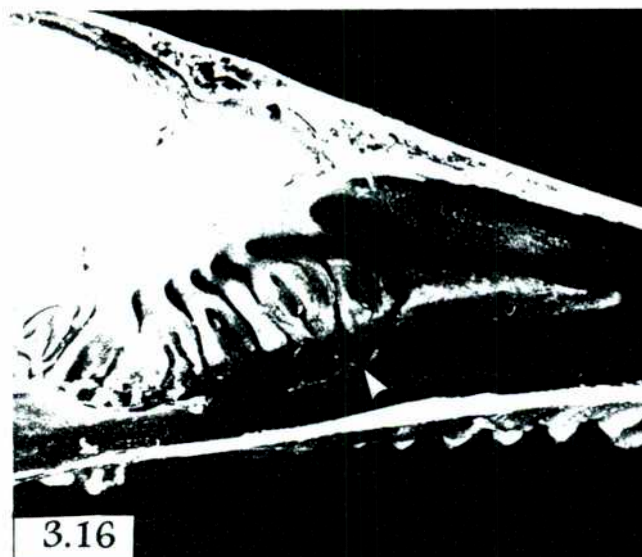
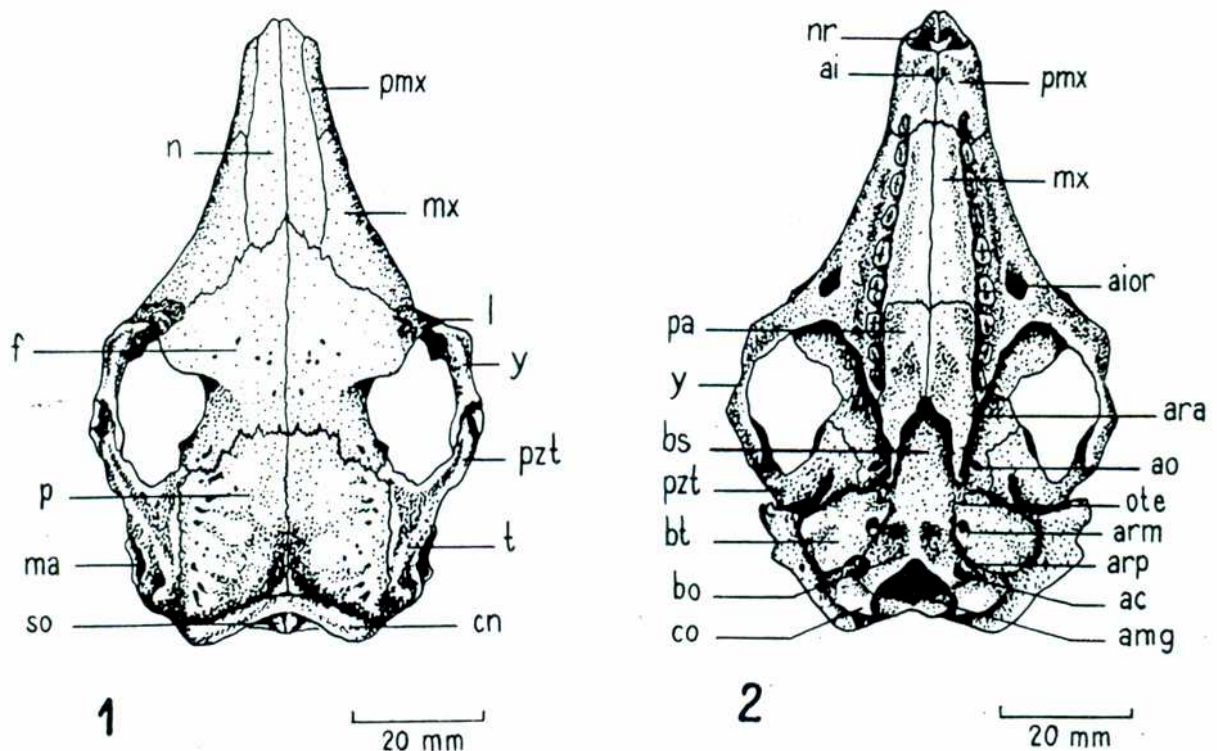


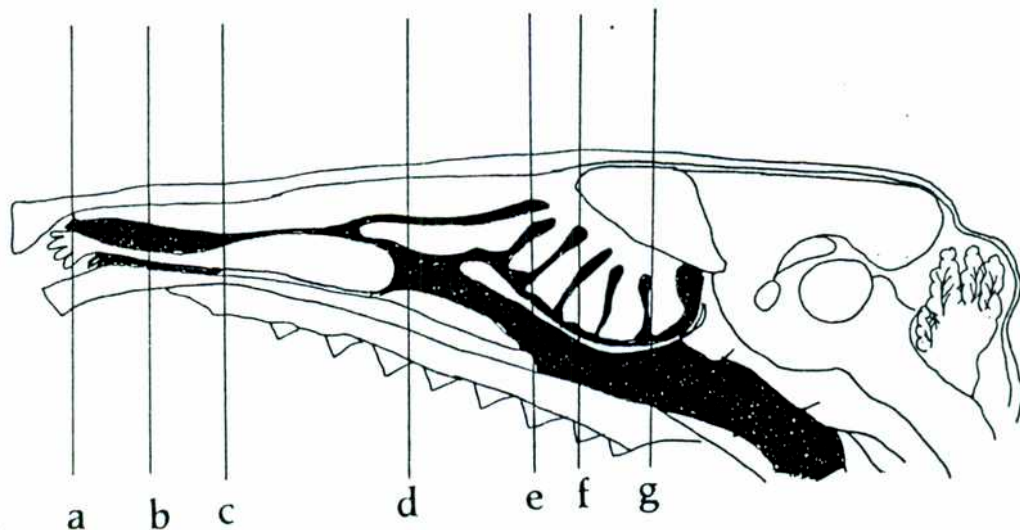
FIGURA 3.16. Detalle de la cavidad nasal de *Dasypus hybridus*, que muestra la conexión entre los endoturbinales y la lámina papirácea del etmoides (flecha) (2x).

FIGURA 3.17A. Esquemas del cráneo de *Chaetophractus villosus*. Vistas dorsal (1) y ventral (2).
B. Esquema sagital de la cabeza del armadillo, en la cual se indican el nivel de los cortes de la figura 5A a 5G.



Figs. 1-2. *Chaetophractus villosus*. Cráneo: 1. dorsal; 2. ventral. (ac, agujero condilar; ai, agujero incisivo; aior, agujero infraorbitario; amg, agujero magno; ao, agurejo oval; ara, agujero rasgado anterior; arm, agurejo rasgado medio; arp, agujero rasgado posterior; bo, basioccipital; bs, basiesfenoides; bt, bula timpánica; cn, cresta nugal; co, cóndilo del occipital; f, frontal; l, lacrimal; ma, meato auditivo externo; mx, maxilar; n, nasal; nr, narial; ote, orificio de la trompa de Eustaquio; p, parietal; pa, palatino; pmx, premaxilar; pzt, proceso cigomático del temporal; so, supraoccipital; t, temporal; y, yugal. (Extraído de Squarcia *et al.*, 1993)

3.17A



3.17B

FIGURA 3.18A-G. Esquemas de cortes transversales seriados de la cavidad nasal de los armadillos. (A) estructura vestibular, (nt) nasoturbinal, (mt) maxiloturbinal, (N) hueso nasal, (PM) hueso premaxilar, (SN) septo nasal, (L) conducto naso-lacrimal, (SMF) seno maxilofrontal, (M) hueso maxilar, (e) endoturbinal, (NF) conducto nasofaríngeo, (PA) hueso palatino, (F) hueso frontal, (p) placa cribosa del etmoides, (BO) bulbo olfatorio, (1) meato dorsal, (2) meato medio, (3) meato ventral, (4) meato común.

Referencias:

Cartilago
Hueso
Epitelio sensorial
Epitelio no sensorial
Lámina propia glandular

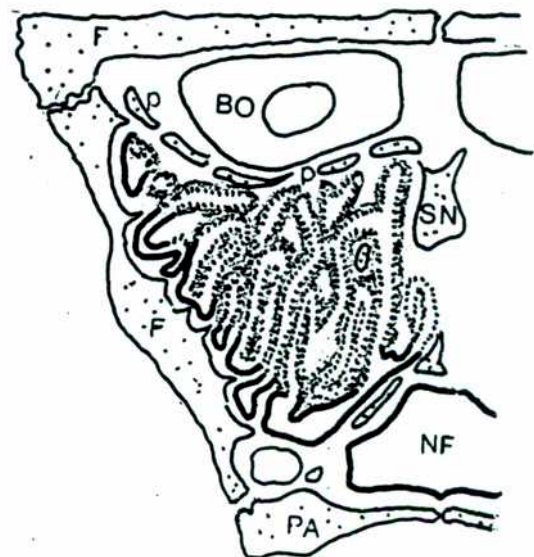
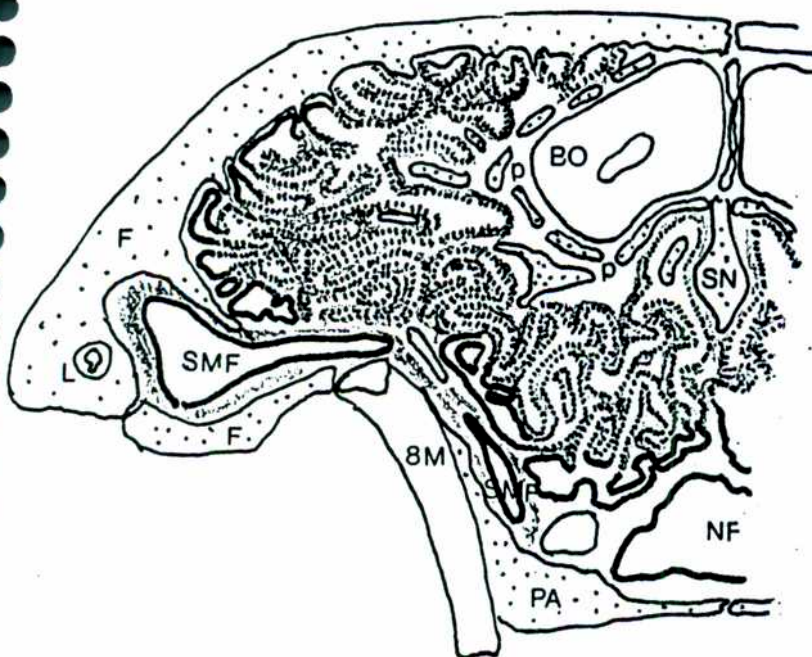
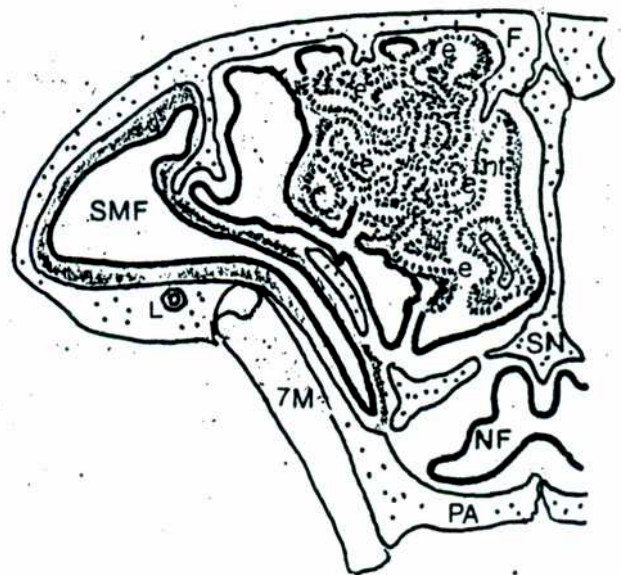
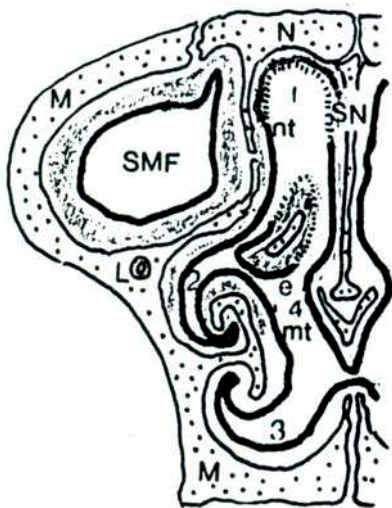
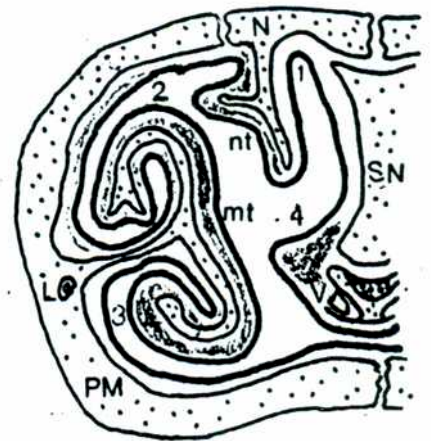
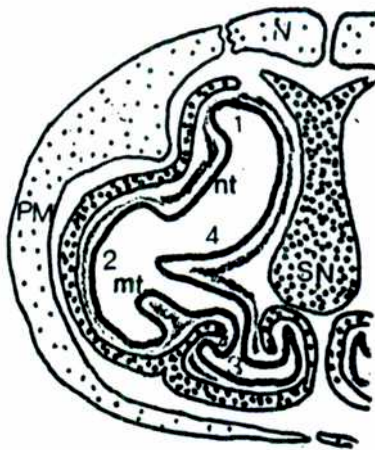
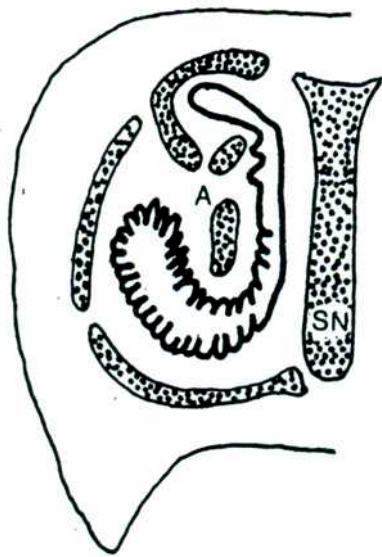


FIGURA 3.19. Corte transversal de la cavidad nasal del armadillo *Chaetophractus villosus* (9x). Se detallan los distintos tipos de mucosas presentes en la misma. 1. Mucosa olfatoria (1000x). 2. Mucosa del seno maxilofrontal (1000x). C. Mucosa con epitelio respiratorio. (S) septo nasal, (f) hueso frontal, (p) palatino, (NF) conducto nasofaríngeo, (SMF) seno maxilofrontal, (e) endoturbinas. Tricrómico de Masson (1000x).

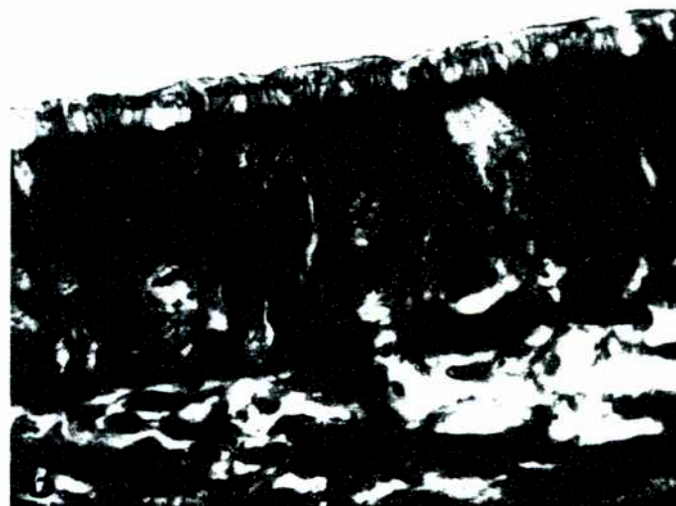
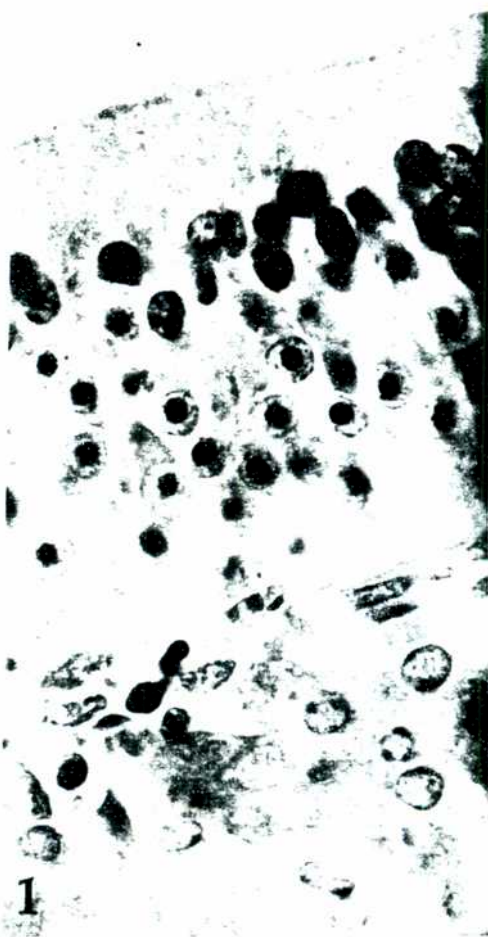
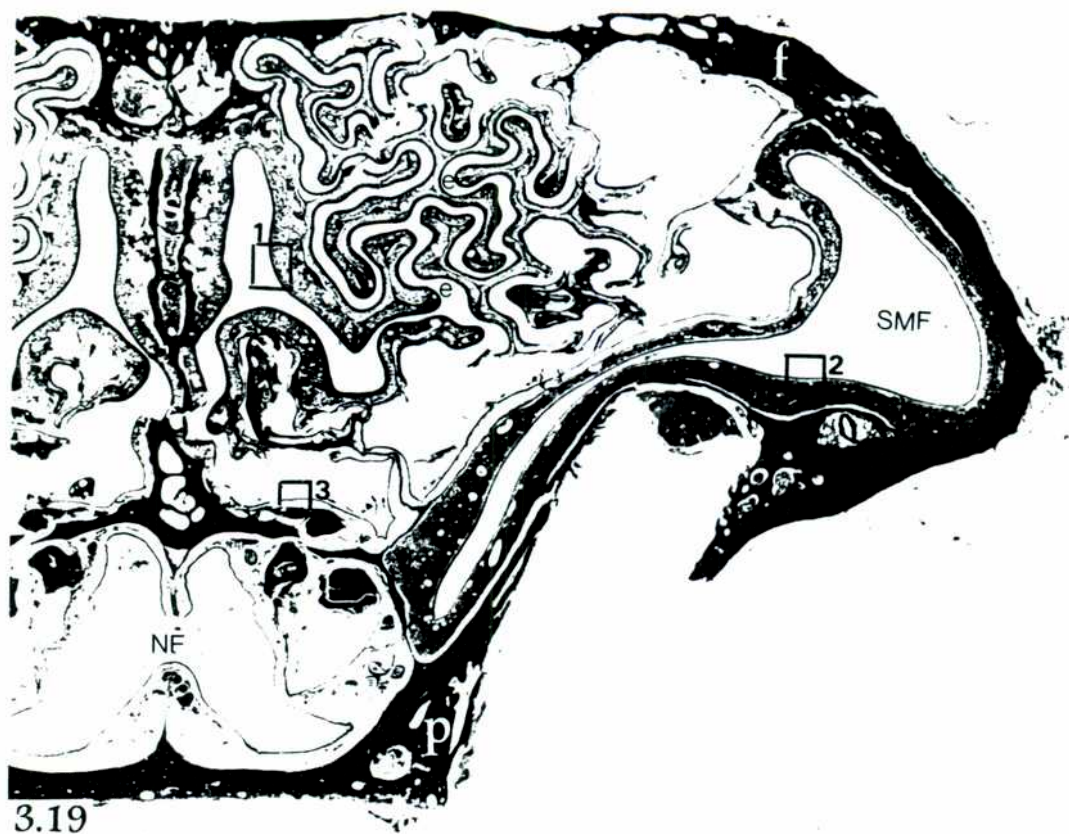


FIGURA 3.20. Corte transversal de la cavidad nasal del armadillo *Dasypus hybridus* (9x). Se detallan los distintos tipos de mucosas presentes en la misma. 1. Mucosa olfatoria (1000x). 2. Mucosa del seno maxilofrontal (1000x). 3. Mucosa respiratoria con lámina propia glandular (1000x). 4. Mucosa con epitelio respiratorio (1000x). 5. Transición entre el epitelio respiratorio y el epitelio olfatorio. (SMF) seno maxilofrontal, (m) maxilar, (4M) cuarto molar, (S) septo nasal, (e) endoturbinales. Tricrómico de Mallory (Azan) Heidenhain (1000x).



3.20

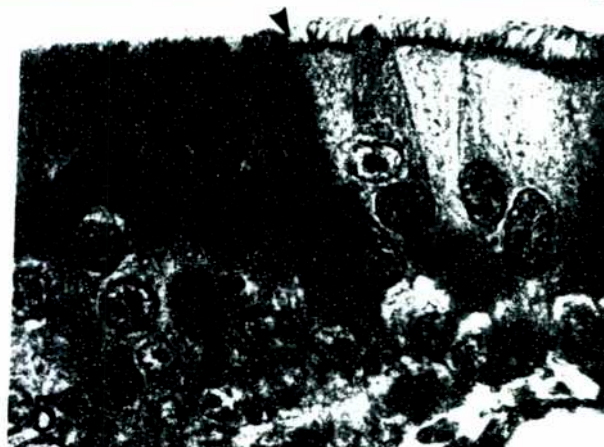
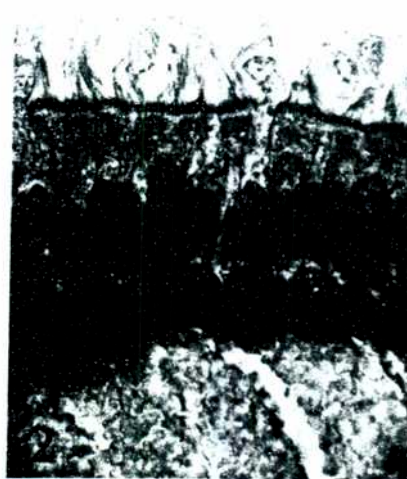
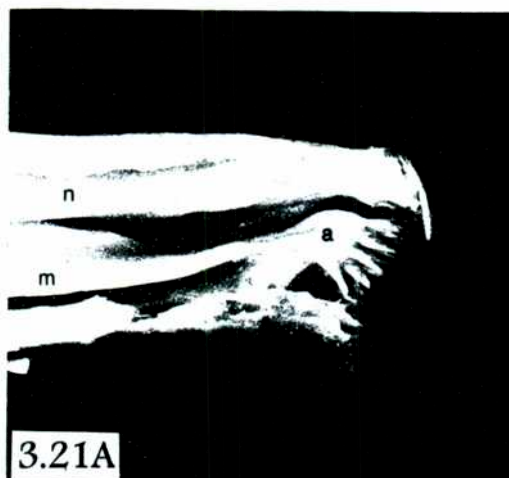


FIGURA 3.21A. Preparado del vestíbulo del armadillo *Chaetophractus villosus*, en el cual se aprecia la estructura vestibular (a), (m) maxiloturbinal, (n) nasoturbinal (7x).

B. Corte sagital de la región vestibular (a). (n) cartilago del nasoturbinal. Tricrómico de Masson (5.3x).

C. Corte transversal de la región vestibular. (a) estructura vestibular, (e) espinas, (c) cartilago. H-E (8.5x).



3.2. MICROSCOPIA OPTICA

3.2.1. CARACTERIZACIÓN HISTOLOGICA DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS*

La mucosa olfatoria está constituida por dos componentes: un epitelio olfatorio y la lámina propia o corión subyacente. Debajo de la lámina propia se encuentra el eje óseo del turbinal (Fig. 3.22).

1- Epitelio. El epitelio, a nivel de microscopía óptica (MO), se compone de tres tipos de células: a) células de sostén, b) células receptoras o sensitivas y c) células basales. La disposición de estas células da la apariencia de un epitelio del tipo pseudoestratificado, debido a la disposición de las capas de núcleos (Figs. 3.22. 3.23). El epitelio mide $77,9 \pm 17,6 \mu\text{m}$ de altura, hallándose un mínimo de $53 \mu\text{m}$ y un máximo de $115,4 \mu\text{m}$.

a) Las células de sostén se hallan en la parte apical del epitelio. Presentan núcleos de forma oval y citoplasma fuertemente basófilo. El núcleo es claro, no presenta la cromatina dispuesta en grumos y no se observan nucléolos (Fig. 3.23A). En los cortes semifinos se pueden diferenciar dos tipos de células de sostén. El tipo I, presenta el citoplasma claro y el núcleo eucromático (Fig. 3.25). El tipo II presenta tanto el citoplasma como el núcleo muy teñidos. En ambos casos se pueden diferenciar los procesos citoplasmáticos que aparentemente llegan a la membrana basal (Fig. 3.25). En la superficie apical del epitelio se hallan protrusiones, aparentemente de estas células, tanto libres en el lumen como así también unidos al epitelio por un pedicelo (Figs. 3.23B, 3.24B). Estas estructuras podría tratarse de secreciones del tipo apocrina.

b) Las células sensoriales, forman la capa media del epitelio constituida aproximadamente por 5 a 8 capas de células (Figs. 3.24A, 3.25). Presentan un núcleo claro muy grande con un falso nucléolo central muy conspicuo. Estas células, neuronas bipolares, tienen una prolongación apical, la dendrita (Figs. 3.23C, 3.24B) que se

prologa hacia la superficie del epitelio y allí forma una proyección que invade el lumen formando las vesículas olfatorias, observadas también por las técnicas inmunohistoquímicas (Fig. 3.36B). En los cortes semifinos las neuronas presentan un citoplasma que varía desde ligeramente a intensamente basófilo (Figs. 3.24B, 3.25). En el borde apical también se distinguen las vesículas olfatorias ciliadas (Fig. 3.24B). El axón no se observa a MO.

b) Las células basales se encuentran confinadas a la parte del epitelio que se halla en contacto con la membrana basal. Estas células se presentan en dos formas: planas - oscuras- o globosas -claras-. Las células planas tienen el citoplasma más oscuro y el núcleo se tiñe intensamente con la cromatina dispuesta en grumos periféricos. Las células globosas tienen citoplasma claro y el núcleo escasamente teñido con eucromatina dispersa. (Figs. 3.24B, 3.25). Además, atravesando el epitelio pueden observarse los ductos de las glándulas de Bowman que se hallan en la lámina propia. Estos ductos están formados por 3 ó 4 células aplanadas con escaso citoplasma rodeando un lumen estrecho.

La superficie externa del epitelio presenta una capa de mucus cuyas características histoquímicas se analizarán posteriormente.

2- Lámina propia. La lámina propia posee un grosor de 3 ó 4 veces el del epitelio. Está formada por escasa cantidad de fibras colágenas y reticulares (Fig. 3.22). Presenta, además, escasos elementos del tejido conectivo, grandes senos venosos y enormes paquetes de nervios amielínicos, que en su gran mayoría corresponden a los nervios olfatorios (Fig. 3.22).

Las glándulas de Bowman constituyen los elementos más abundantes en la lámina propia (Figs. 3.22 y 3.23). Estas glándulas exocrinas son del tipo tubuloacinares simples ramificadas. Los adenómeros están formados por células piramidales con grandes núcleos esféricos basales intensamente teñidos y cromatina en grumos periféricos. Además de este tipo celular es frecuente hallar células con forma muy variada ya que se las observa cilíndricas o con forma de clava (Figs. 3.26A, B, C). Por otro lado, a pesar que en algunos casos se diferencia perfectamente la forma acinar, algunas de las células que forman los adenómeros no son continuas a nivel basal, lo cual

dificulta enormemente delimitar algunos adenómeros. El citoplasma de estas células presenta gránulos secretorios que pueden ser basófilos o acidófilos. Así, se puede hallar adenómeros íntegramente basófilos, otros totalmente acidófilos y algunos mixtos (Fig. 3.23A). El lumen acinar en general es estrecho e irregular, cual dificulta su observación al MO.

En las secciones semifinas se observa que los adenómeros están formados por dos tipos de células acinares. Las tipo I, son células con apariencia mucosa, se observan gránulos claros y confluyentes en todo el citoplasma (Figs. 3.26A, B). Pero a diferencia de las típicas mucosas el núcleo es esférico (Fig. 3.26A). Las células tipo II -de apariencia serosa- presentan el citoplasma perinuclear basal generalmente basófilo y en el apical se distinguen gránulos oscuros y discretos (Figs. 3.26B, C). El núcleo generalmente es esférico (Fig. 3.26C).

Los acinos pueden estar compuestos solamente por un único tipo de células o pueden hallarse ambos tipos celulares en un mismo acino (Figs. 3.26B, C). También es frecuente encontrar células acinares que no presentan ninguno de los tipos de gránulos descritos anteriormente. Células con núcleos planos, similares a mioepiteliales son observadas rodeando la superficie externa del acino (Fig. 3.26C). Los adenómeros se hallan rodeados de escasas fibras colágenas y reticulares.

3.2.2. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *DASYPUS HYBRIDUS*

La mucosa olfatoria está constituida, fundamentalmente, por dos partes: un epitelio y el conectivo subyacente o lámina propia, debajo de la lámina propia se encuentra la varilla ósea, que forma el eje de cada turbinal (Fig. 3.27).

1) Epitelio. En una sección histológica el epitelio olfatorio presenta una altura de $75,38 \pm 6,2 \mu\text{m}$, con un mínimo de $68,6 \mu\text{m}$ y un máximo de $90,48 \mu\text{m}$. Está formado, a nivel de microscopía óptica, por varias capas de núcleos ubicados a diferentes alturas, lo cual aparentemente estaría indicando que se trataría de un epitelio pseudoestratificado. En el epitelio se diferencian claramente tres tipos de células: a) las

células de sostén o sustentaculares, b) las células sensoriales o neuronas olfatorias y c) las células basales (Fig. 3.27).

a) Las células de sostén se hallan en la parte apical del epitelio en contacto con la superficie. Estas células presentan citoplasma basófilo y núcleos de forma oval y elongados, típicos de células cilíndricas. El núcleo se tiñe más intensamente que el núcleo de las neuronas y la cromatina se dispone en pequeños grumos. En algunas células se puede observar el nucléolo (Fig. 3.28B). En los cortes semifinos se diferencian un único tipo de células de sostén. Presenta el citoplasma basófilo y el núcleo se tiñe menos intensamente que los núcleos de las neuronas (Figs. 3.29A, B). En el borde apical del epitelio se pueden observar algunas vesículas olfatorias y un ribete en cepillo muy alto (microvellosidades) (Figs. 3.29A, B).

b) Las células sensoriales o receptoras forman la capa media de células dentro del epitelio. Esta capa, generalmente, está formada por 5 ó 6 capas de neuronas. En los cortes semifinos se pueden observar que las vesículas olfatorias presentan cilias (Fig. 3.29). Poseen, además, un gran núcleo central con uno o dos falsos nucléolos pequeños y cromatina dispuesta en pequeños grumos periféricos (Figs. 3.28B, 3.29).

c) Las células basales se hallan en la parte basal del epitelio, descansando sobre la membrana basal. Pueden presentar dos formas: ligeramente aplanadas (u oscuras) o globosas (o claras). Las células basales globosas presentan un citoplasma escasamente teñido y un núcleo claro (Fig. 3.29B). Las células basales aplanadas tienen el citoplasma y el núcleo más intensamente teñido (Fig. 3.29B).

Adicionalmente, puede observarse los ductos y los cuellos de las glándulas de Bowman que atraviesan el epitelio, para alcanzar la superficie. El conducto de las glándulas de Bowman se encuentra generalmente formado por 3 ó 4 células, con núcleos planos muy teñidos y escaso citoplasma formando el conducto (Fig. 3.28B). También, en la parte basal del epitelio se pueden encontrar algunas células glandulares que forman el cuello de las glándulas, haciendo protrusión en el epitelio (Fig. 3.28A, B).

La superficie del epitelio se encuentra recubierta por una capa de mucus, cuyas características histoquímicas analizaremos más adelante.

2) Lámina propia. La lámina propia subyacente al epitelio posee un espesor que puede ser de dos a tres veces el del epitelio olfatorio. Contiene escasas fibras colágenas y

reticulares y escasos componentes celulares del tejido conectivo como fibrocitos y algunos elementos sanguíneos. Además, presenta grandes senos venosos de paredes muy delgadas y una enorme cantidad de paquetes nerviosos en su gran mayoría del tipo amielínico, que probablemente correspondan a los nervios olfatorios. Es característica la presencia de núcleo de células de Schwann dentro de los paquetes nerviosos. Estos paquetes nerviosos se hallan rodeados por fibras colágenas y fibras reticulares (Fig. 3.28C). También pueden observarse, especialmente en el septo nasal, paquetes de axones mielínicos que corresponderían a la inervación proveniente del nervio trigémino.

Uno de los componentes más importantes de la lámina propia está constituido por una gran cantidad de glándulas de Bowman. Las glándulas de Bowman son glándulas exocrinas, tubuloacinares simples ramificadas (Fig. 3.28A). Estos adenómeros presentan una disposición complicada. Según la sección del corte, pueden observarse redondeados, tubulares, o como masas celulares de forma irregular (Fig. 3.28A). El lumen acinar, en general es estrecho, lo cual hace difícil su observación al MO. Sin embargo, algunos acinos presentan un lumen distinguible de contorno generalmente irregular.

Los adenómeros están formados por una capa de células glandulares en contacto con el lumen, por debajo de esta capa pueden observarse células similares a las mioepiteliales.

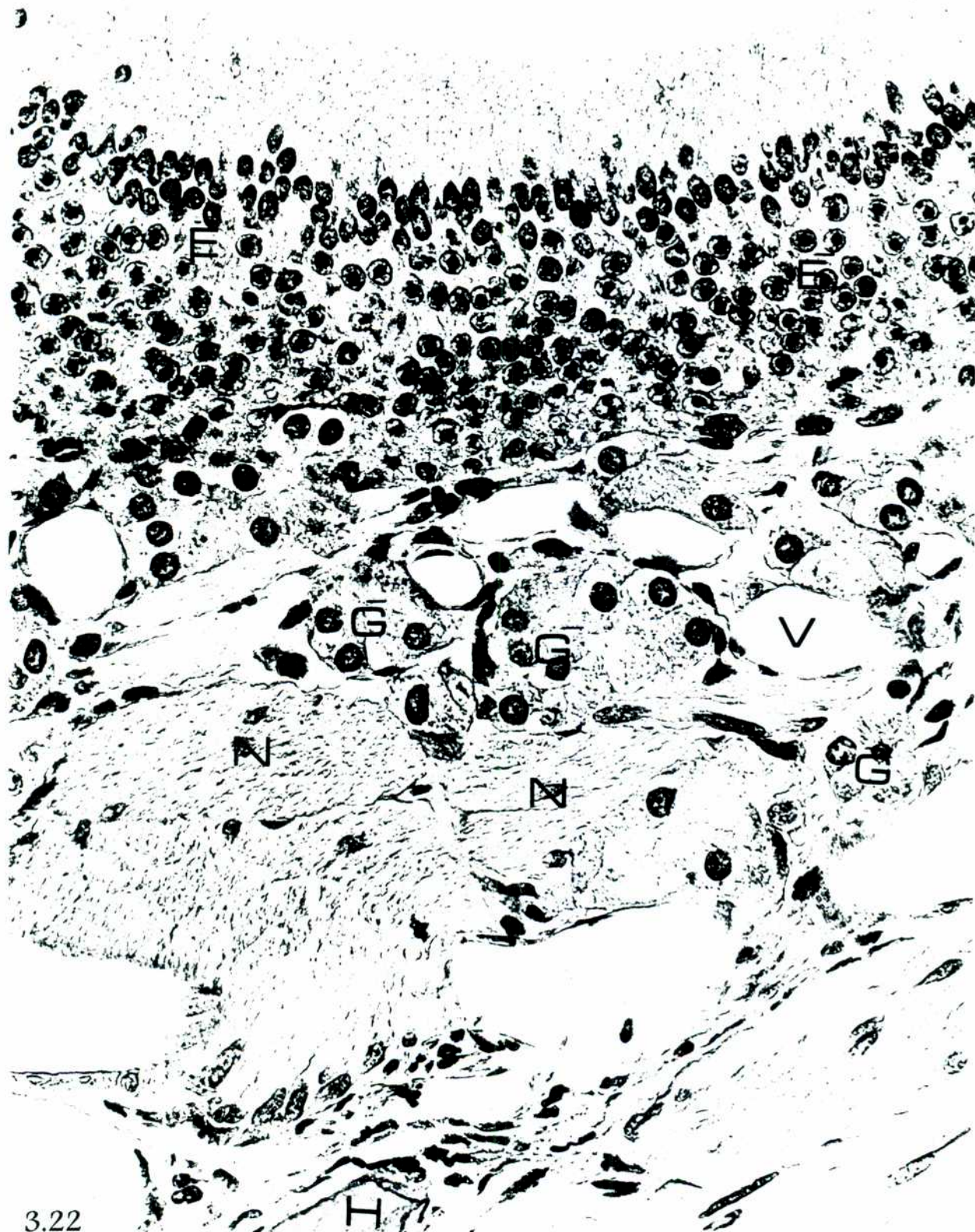
Las células glandulares tienen formas muy variadas pueden ser piramidales o cilíndricas, sin embargo algunas presentan formas de clavos con un extremo angosto en contacto con el lumen, otras son cilíndricas pero el eje mayor es paralelo al lumen glandular (Figs. 3.30A, B). Una característica muy llamativa de la mayoría de los adenómeros es que sus células no son continuas a nivel basal, lo que determina que la base del acino presente contornos irregulares (Figs. 3.30A, B, C). Existen dos tipos celulares, los que sólo pueden distinguirse en las secciones semifinas. El tipo I son células de apariencia mucosa: son células que presentan numerosas vacuolas claras en la porción apical de la célula -raras veces las vacuolas rodean el núcleo-, en las cuales las vacuolas -aparentemente- han perdido parte de sus límites, anastomosándose unas con otras (Figs. 3.30A, B, C, D). Las formas celulares son muy variadas. Se diferencian de las típicas mucosas de otras glándulas ya que el núcleo es esférico. Las células tipo II son

células de apariencia serosa, presentan numerosas vacuolas pero a diferencia de las tipo I se las observa oscuras, no anastomósicas. La forma celular es piramidal o cilíndrica, siempre de menor tamaño que las tipo I. Los núcleos generalmente son redondeados aunque también pueden ser irregulares u ovals (Figs. 3.30A, B, C, D).

Los adenómeros generalmente son mixtos, presentando ambos tipos celulares. Las secreciones que son producidas en las células que forman los adenómeros se descargan, aparentemente en la superficie del epitelio olfatorio a través de conductos que atraviesan el mismo. Los acinos glandulares se hallan rodeados de fibras reticulares y escasas fibras colágenas.

Los ductos de las glándulas de Bowman, como se mencionó anteriormente, se hallan formados por 3 ó 4 células con núcleo plano y escaso citoplasma (Figs. 3.28B, 3.29A). En la mayoría de los casos puede observarse material secretorio dentro del lumen de los conductos. (Fig. 3.28B)

FIGURA 3.22. Mucosa olfatoria del armadillo *Chaetophractus villosus*. Se diferencia el epitelio (E) y la lámina propia. (N) nervio olfatorio, (G) glándulas de Bowman, (V) seno venoso, (H) turbinal óseo. Tricrómico de Masson (400x).



EPITELIO

LAMINA
PROPIA

3.22

FIGURA 3.23A. Mucosa olfatoria del armadillo *Chaetophractus villosus*. Obsérvese los diferentes tipos celulares: células de sostén (s), neuronas olfatorias (n), células basales (b). Se distinguen la distintas afinidad tintorial de las células acinares de las glándulas de Bowman (g). Tricrómico de Mallory (Azan) Heidenhain (400x).

B. Detalle de la región apical del epitelio, donde se aprecian las protrusiones apicales

(►). Tricrómico de Masson (1000x).

C. Detalle de las neuronas olfatorias en algunas de las cuales se han marcado las dendritas apicales (flecha) (►). Técnica de Holmes (1000x)

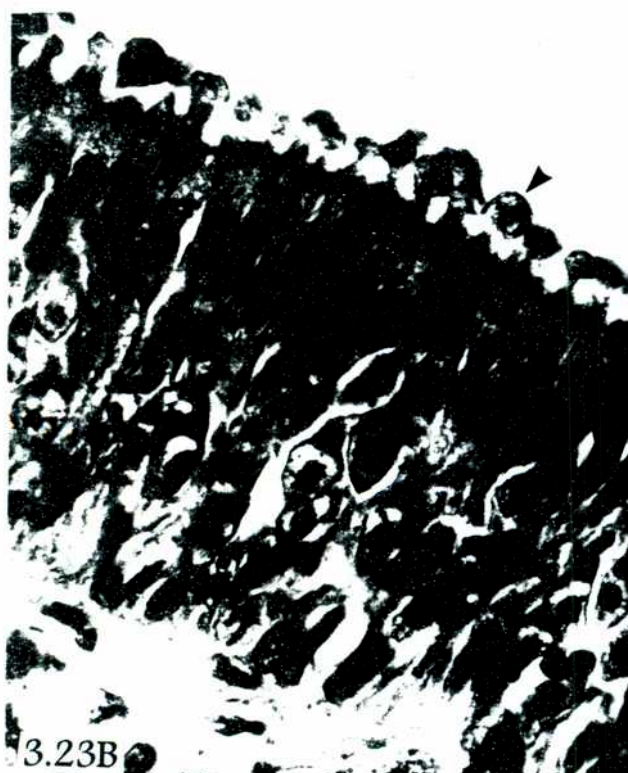
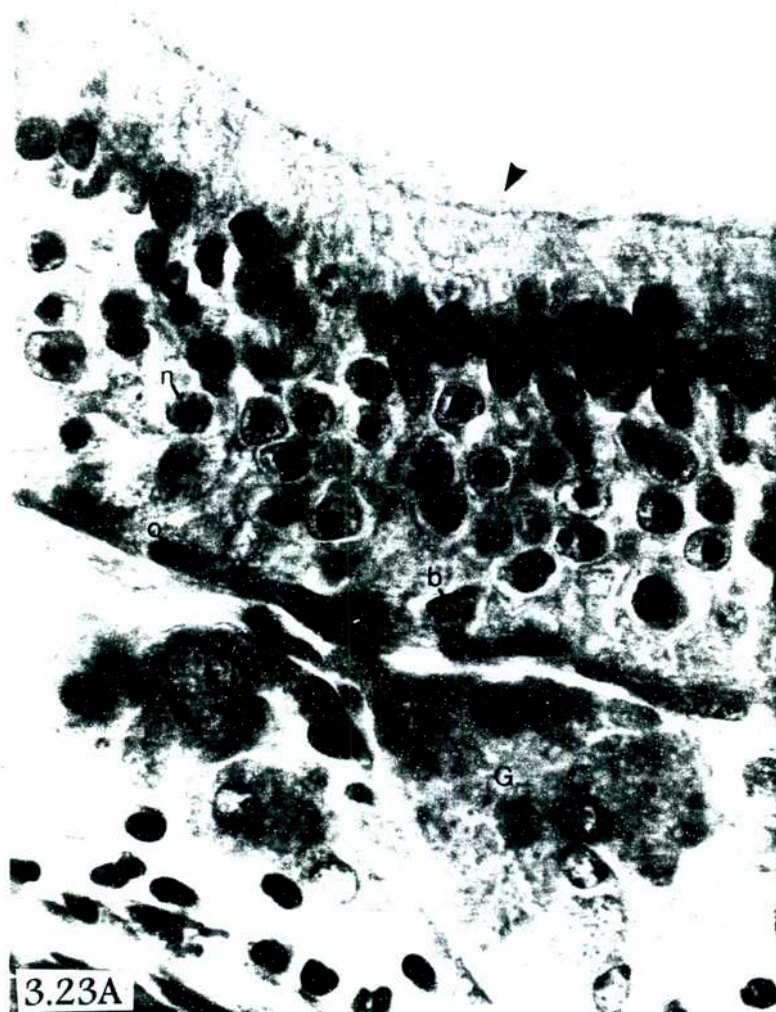


FIGURA 3.24A. Mucosa olfatoria del armadillo *Chaetophractus villosus*. (E) epitelio, (G) glándulas de Bowman, (N) nervio olfatorio. Azul de toluidina (250x)

B. Detalle de la región apical del epitelio olfatorio de *Chaetophractus villosus*, en el cual se observan las protrusiones apicales de las células de sostén (*). (s) células de sostén, (o) células de sostén oscuras, (b) células basales claras, (n) neuronas, (d) dendrita apical, (v) vesícula olfatoria, (flecha) célula de sostén oscura, (v) vesícula olfatoria. Azul de toluidina (1000x).

FIGURA 3.25. Epitelio olfatorio de *Chaetophractus villosus* con los distintos tipos celulares: células de sostén claras (s), células de sostén oscuras (flecha), neuronas (n), células basales oscuras (o), células basales claras (b). (G) glándulas de Bowman, (N) nervios olfatorios. Azul de toluidina (1000x).

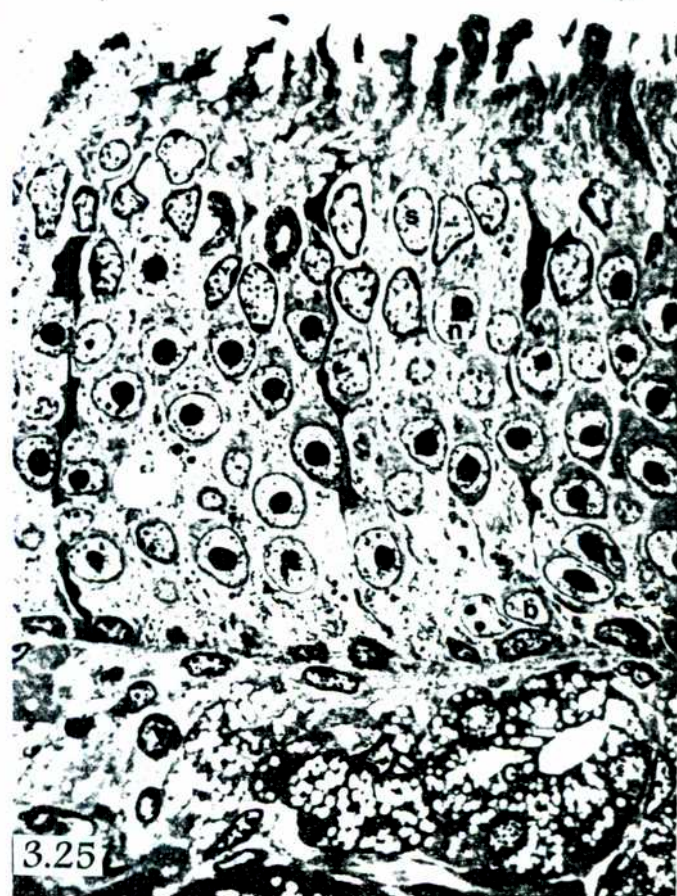
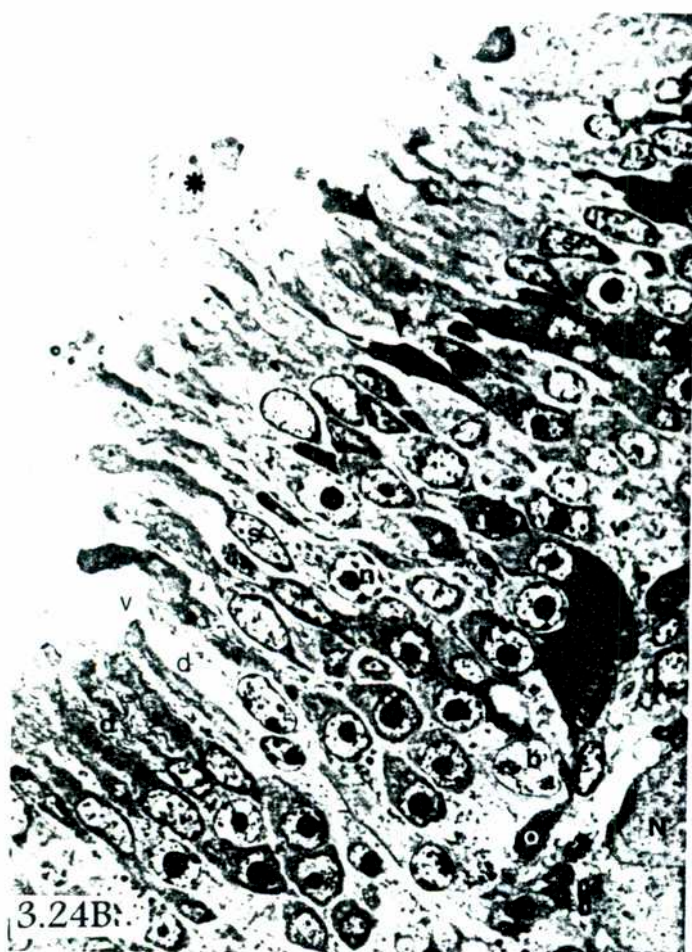
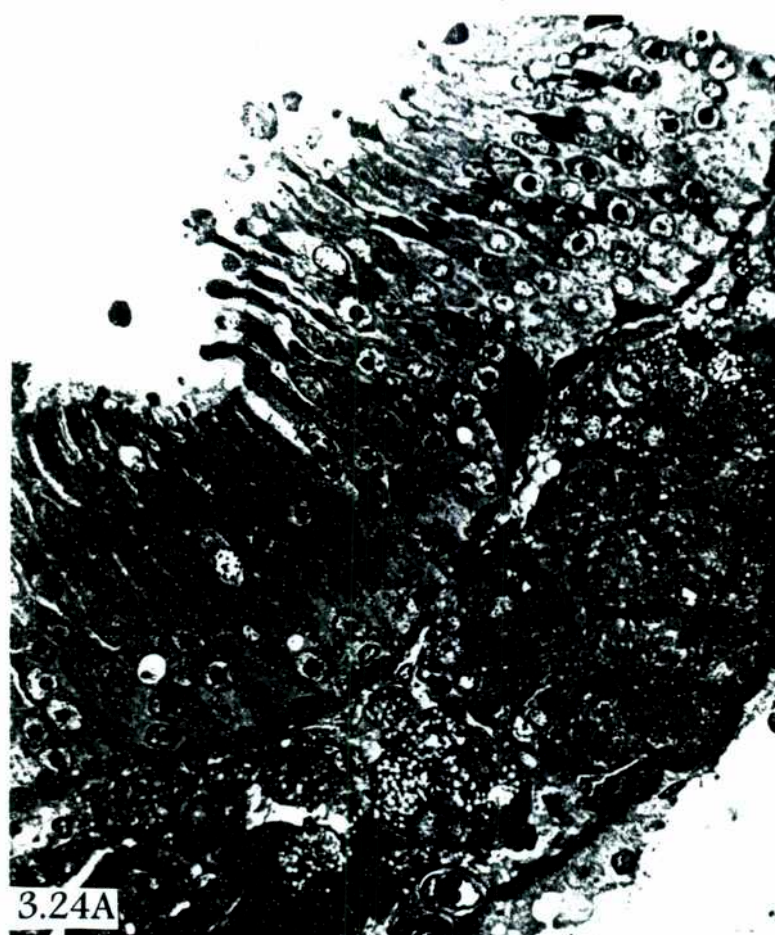


FIGURA 3.26A. Acinos de las glándulas de Bowman con numerosas células de apariencia mucosa (1) y escasas células tipo serosas (2). (E) epitelio, (N) nervio olfatorio, (a) arteria pequeña, (c) capilar. Azul de toluidina (1000x).

B. Células del tipo mucosas con gránulos claros y confluyentes (1) y células del tipo serosas con gránulos oscuros y discretos (2). (E) epitelio, (N) nervio olfatorio. Azul de toluidina (1000x).

C. Acinos de las glándulas de Bowman de *Chaetophractus villosus* con células glandulares de apariencia mucosa (1) y células tipo serosas (2). (E) epitelio, (o) célula basal oscura, (N) nervio olfatorio, (flecha) núcleo plano basal. Azul de toluidina (1000x).

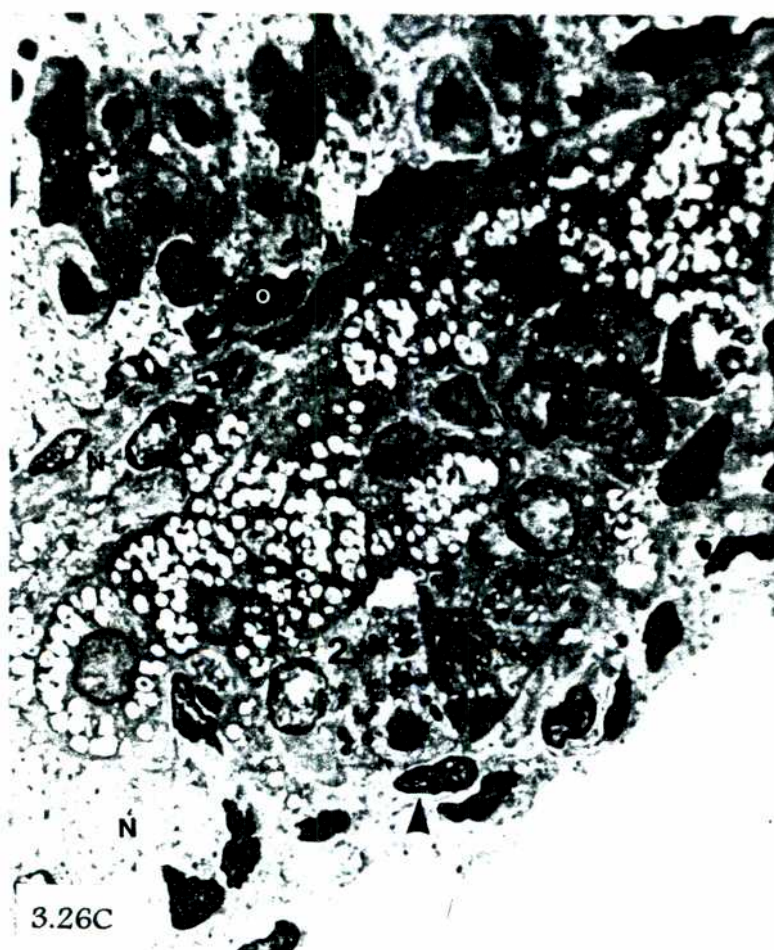
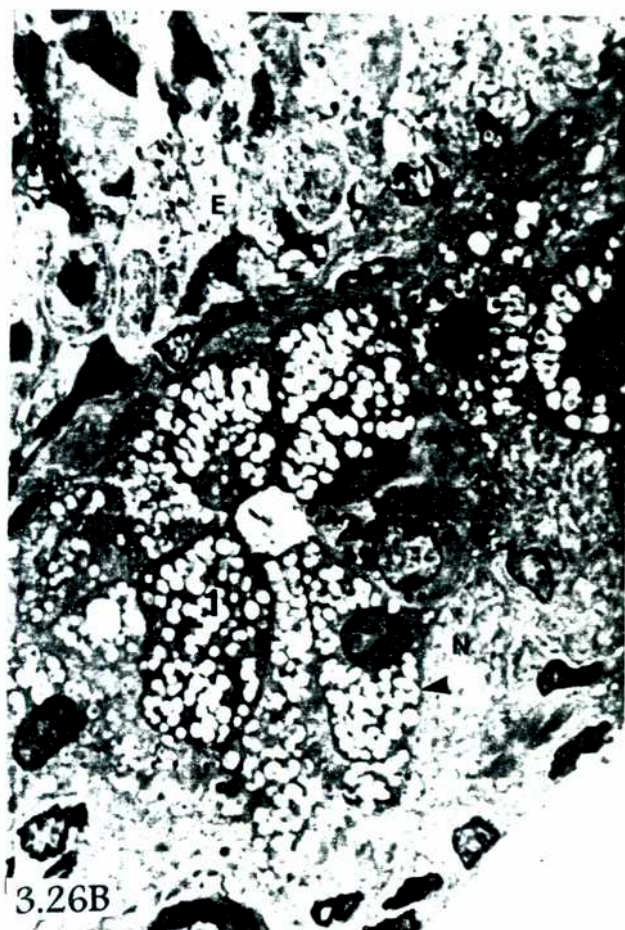
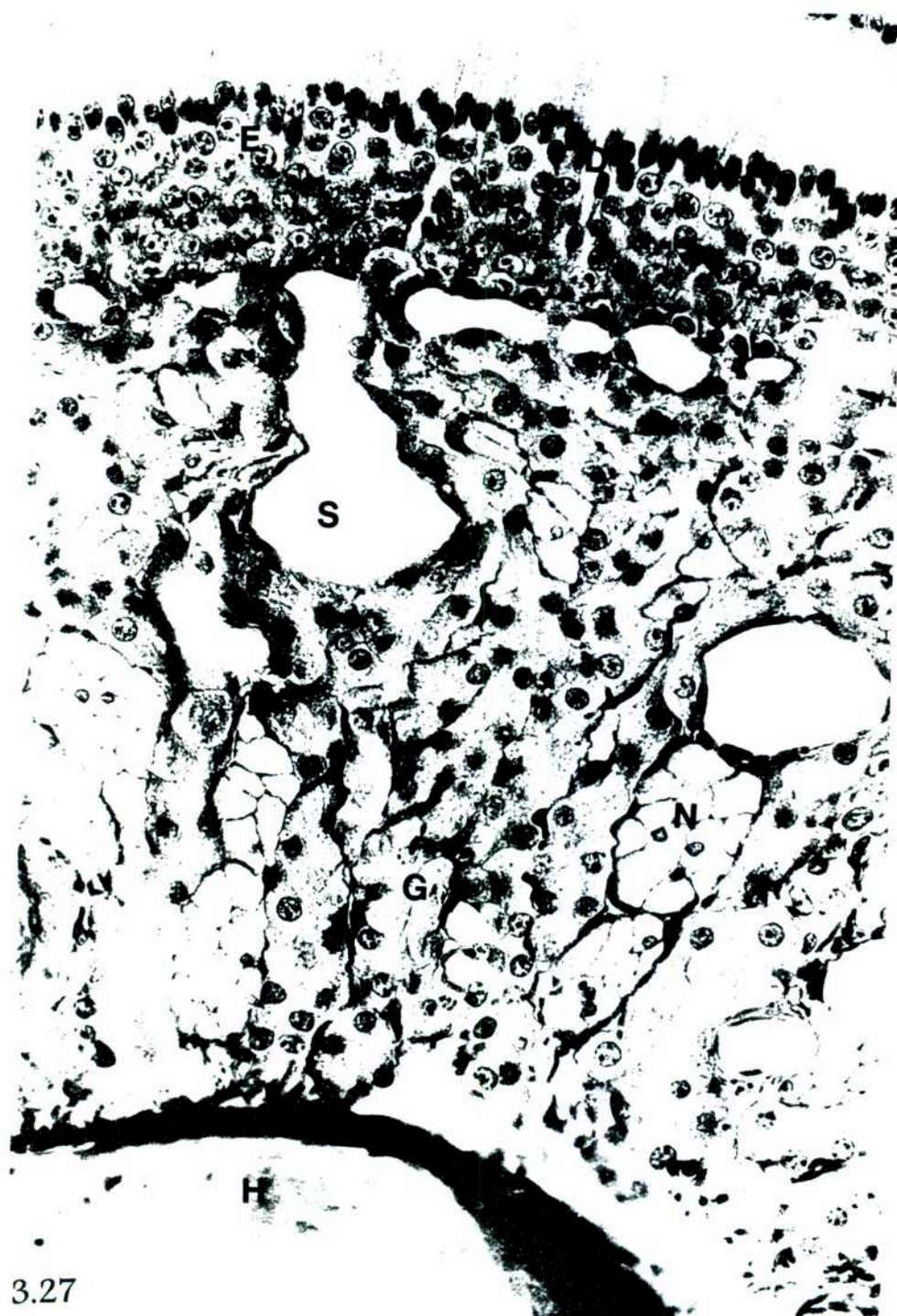


FIGURA 3.27. Mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*. Se diferencia el epitelio (E) y la lámina propia. (G) glándulas de Bowman, (N) nervio olfatorio, (S) senos venosos, (H) turbinal óseo, (D) ductos de las glándulas de Bowman. Tricrómico de Mallory (Azan) Heidenhain (250x).



EPITELIO

LAMINA
PROPIA

3.27

FIGURA 3.28A. Aspecto general de la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*. Se aprecia el epitelio olfatorio (E) y la lámina propia con abundantes glándulas de Bowman túbuloalveolares (G). En el centro del preparado se observa una glándula cuyo lumen se continua en el ducto (D) que atraviesa el epitelio. (s) seno venoso, (H) turbinal óseo, (flecha) transición entre el epitelio olfatorio y el respiratorio. Tricrómico de Mallory (Azan) Heidenhain (250x).

B. Detalle del epitelio olfatorio en el cual se observa células de sostén (s), células basales oscuras (o) y neuronas (n). El epitelio está atravesado por un conducto (D) de la glándula de Bowman (G), el cual está formado por células ductales (d). (►) falso nucleólo. En la base de los ductos se ven células glandulares que forman los cuellos de las glándulas (k). (S) seno venoso, (flecha) falso nucleólo. Tricrómico de Mallory (Azan) Heidenhain (1000x).

C. Detalle de un nervio olfatorio amielínico. Se observan las células de Schwann (s) y escasa fibras colágenas rodeando al paquete nervioso (►) (1000x).

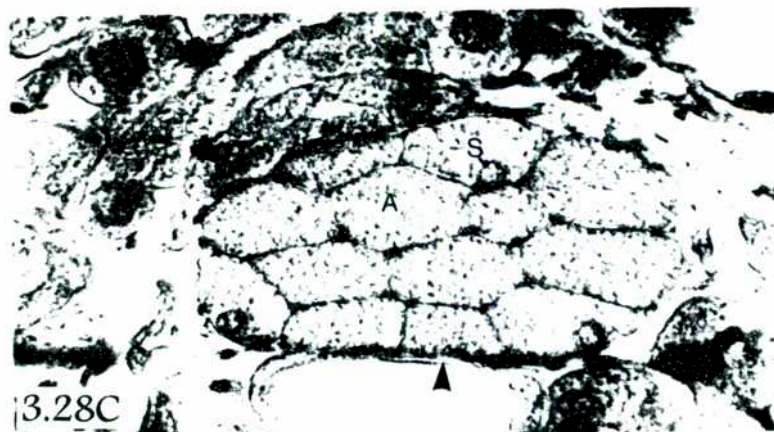
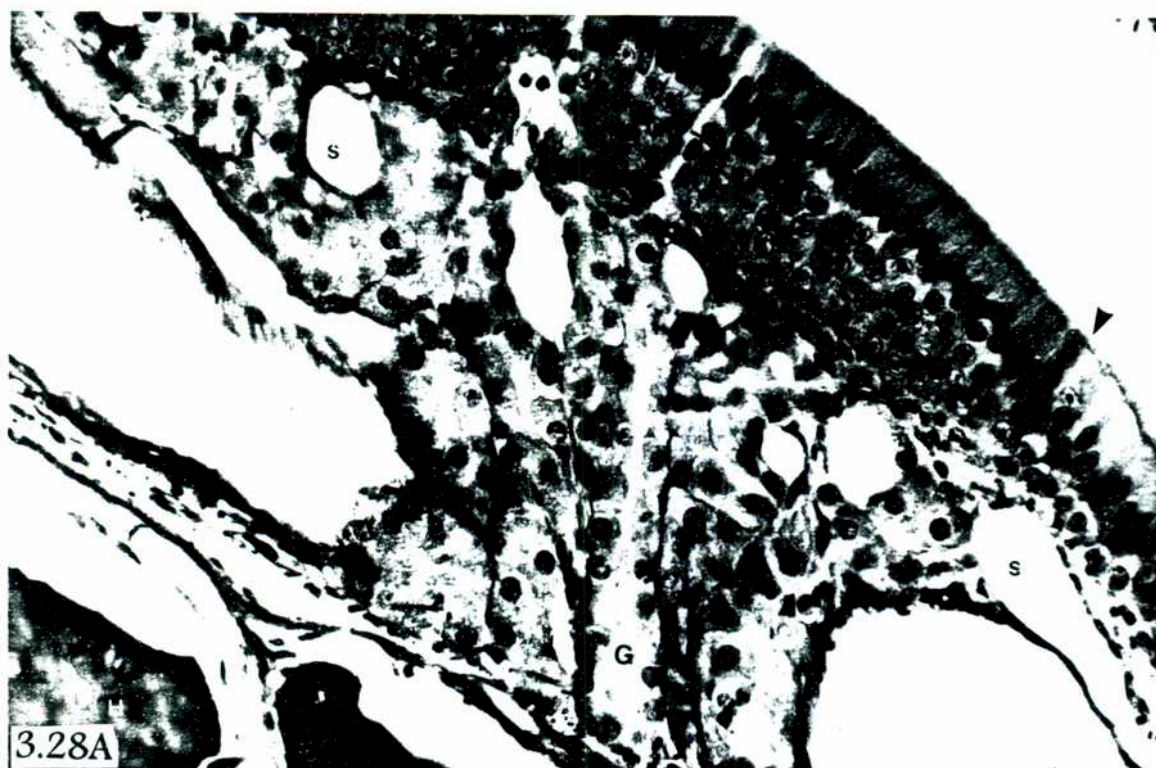


FIGURA 3.29A. Sección semifina de la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*. En el epitelio se observan las células de sostén (s), neuronas (n), células basales claras (b) y células basales oscuras (o) y los ductos de las glándulas de Bowman (d). En la lámina propia se aprecian las glándulas de Bowman (G). (*) célula basal en mitosis. Azul de toluidina (400x).

B. Detalle del epitelio olfatorio para distinguir los tipos celulares. En el borde apical del epitelio se observa un ribete en cepillo muy alto (microvellosidades) y las vesículas olfatorias (flecha). Azul de toluidina (1000x).

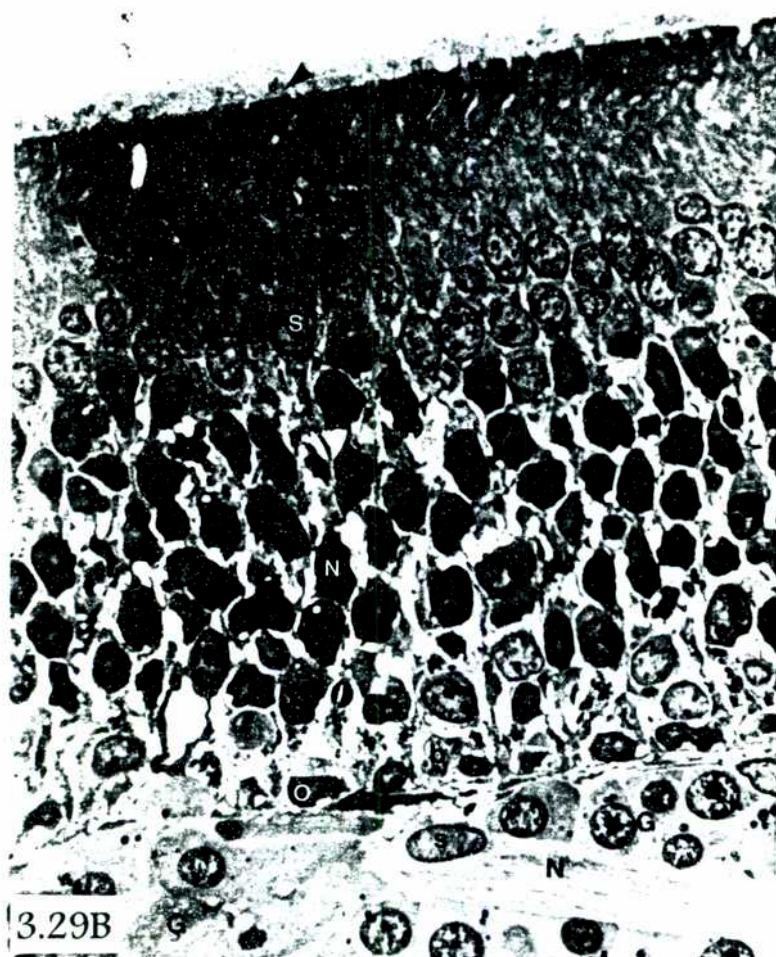
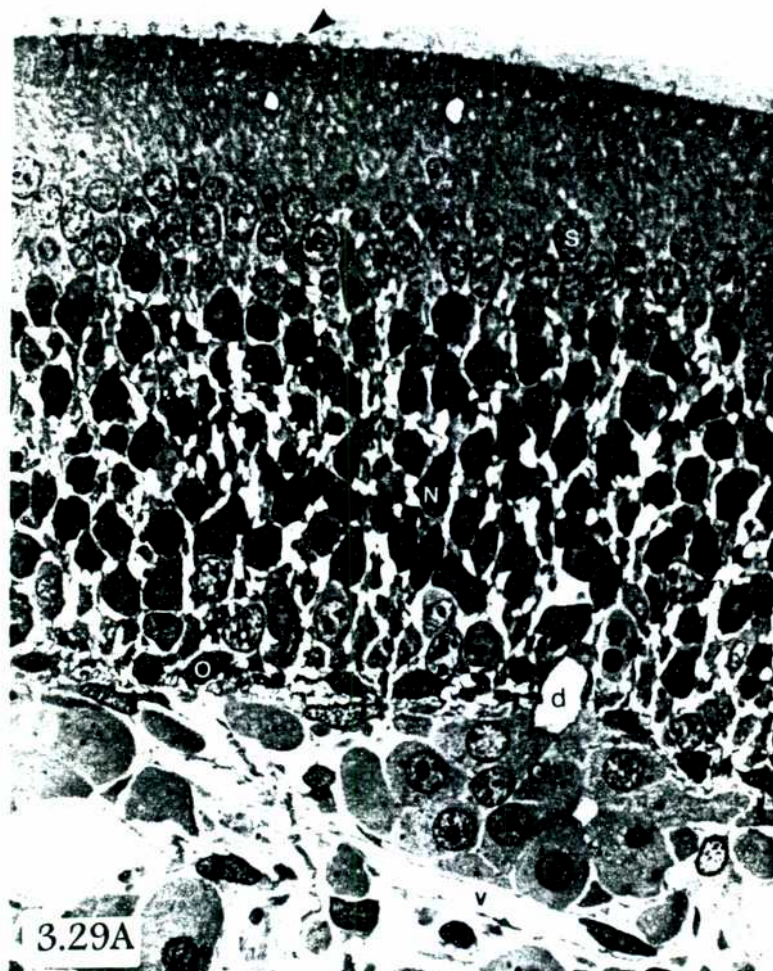
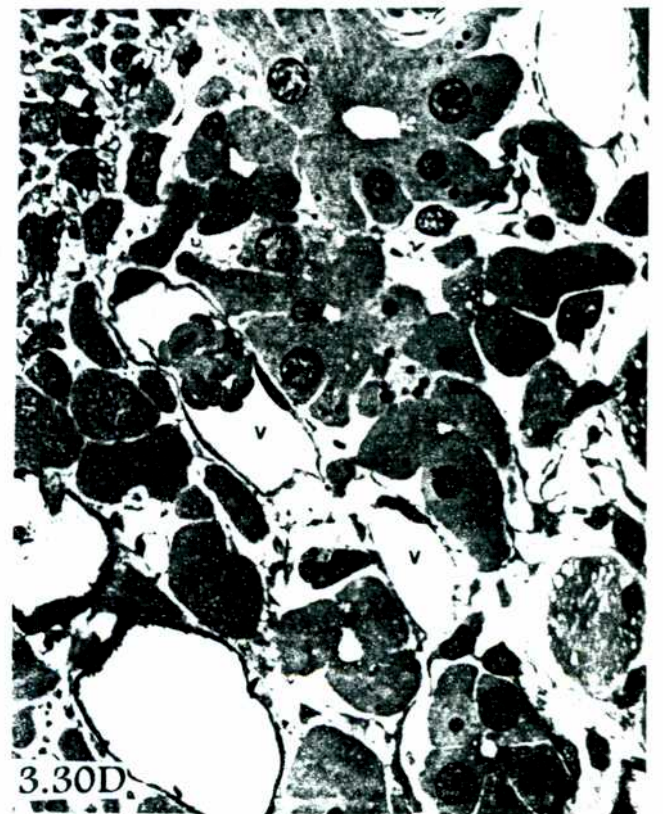
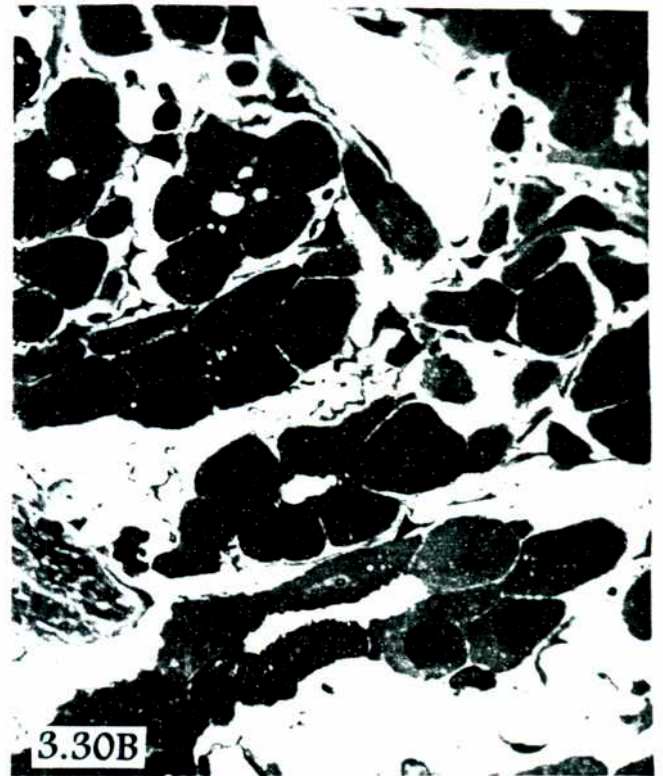


FIGURA 3.30. A., B, C, D. Las glándulas de Bowman (G) de *Dasypus hybridus* presentan formas muy variadas. Pueden ser piramidales o cilíndrica (A,B,C,D). Otras tienen forma de clava (*) (A) o cilíndricas con el eje mayor paralelo al lumen (flecha) (B). (n) mucus, (v) vénula. Azul de toluidina (1000x).



3.3. ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS

3.3.1. ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS*.

3.3.1.1. GLICOCONJUGADOS

a) HISTOQUÍMICA CLÁSICA

Las células de sostén poseen GC neutros en la zona apical, donde se observa una reacción fuertemente PAS+. Resultados similares a los anteriores se han registrado en la zona basal del epitelio olfatorio y en la mayoría de los acinos de las glándulas de Bowman, lo cual indica la presencia de GC neutros tanto en las células basales como en la membrana basal (Fig. 3.31A) y en la mayoría de las células acinares. Los datos obtenidos con la reacción del PAS no descartan la presencia de GC ácidos. Estos probablemente sean debidos a los residuos de ácido siálico presentes en los GC, lo cual se comprobó con la utilización de la técnica de la oxidación selectiva de Volz y col. (1987). Este método no sólo reveló la presencia de ácido siálico, sino que además se pudo inferir que presentaban sustituyentes acetilados en sus cadenas laterales.

Por otra parte, las glándulas de Bowman presentan GC ácidos carboxilados y sulfatados, debido a que se obtiene reacción positiva con AB 2.5 y 0.5 (Fig. 3.31B). La presencia de GC ácidos sulfatados y carboxilados se comprobó, además, utilizando la técnica del AB/AY y de la orceína/AB, que permite apreciar la presencia de células glandulares con GC sulfatados, algunas con GC carboxilados exclusivamente y otras con ambos tipos de GC (Fig. 3.31C). En todos los casos se observaron células glandulares que no presentan reacción alguna. La presencia de GC ácidos sulfatados y carboxilados también se observó en el mucus que reviste la superficie del epitelio olfatorio y en los ductos de las glándulas de Bowman.

La combinación AB/PAS permitió diferenciar GC neutros y ácidos en una misma preparación. (Figs. 3.31D, E). La región basal del epitelio presenta GC neutros

exclusivamente. Las glándulas de Bowman poseen células glandulares que contienen solamente GC ácidos, células glandulares con GC neutros exclusivamente y células glandulares con ambos tipos de GC (Fig. 3.31E). Los ductos de las glándulas de Bowman presentan GC ácidos y neutros (Fig. 3.31D).

La capa de mucus que se halla tapizando la superficie luminal del epitelio presenta una marcada división en dos regiones: una externa o superficial y una interna o profunda. La capa superficial reacciona positivamente al AB (a ambos pH estudiados), y por lo tanto presenta GC ácidos carboxilados y sulfatados. La capa profunda presenta reacción PAS+, indicativa de la presencia de glicoconjugados neutros.

Los resultados de las técnicas histoquímicas del *Chaetophractus villosus* se encuentran en la tabla 3.III

b) HISTOQUÍMICA MEDIANTE EL USO DE LECTINAS

El epitelio olfatorio presenta reacción con la lectina PNA, especialmente en las vesículas olfatorias y en el citoplasma supranuclear de las neuronas (Fig. 3.33E). La secreción que reviste el epitelio olfatorio muestra tinción con la lectina WGA (Figs. 3.33C, D), lo cual implica la presencia de N-acetilgalactosamina terminal y en menor proporción ácido siálico. La secreción no presenta reacción con SBA ni con PSA. Cabe aclarar que los ductos de las glándulas de Bowman que atraviesan el epitelio presentan reacción positiva con SBA.

Las glándulas de Bowman de la lámina propia presenta reacción positiva con PSA, WGA, PNA y SBA. Lo cual se debería a la presencia de N-glicosidil con centros fucosilados, N-acetilglucosamina, ácido siálico, galactosamina y N-acetilgalactosamina terminal y además, de residuos de N-acetilgalactosamina (Figs. 3.33A, B, C, D, E, F).

Los resultados de las técnicas histoquímicas utilizando lectinas del *Chaetophractus villosus* se encuentran en la tabla 3.IV

Tabla 3.III. Estudios histoquímicos de la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*.

TECNICA	EPITELIO		SECRECION		GL. DE LA LAMINA PROPIA	
	Región apical	Región basal	Capa ext.	Capa int.	Cel. acinares	Ductos
PAS	++	+++	-	++	+++	+++
AB 2.5	-	-	+++	-	+++	++
AB 0.5	-	-	+++	-	+++	++
AB/AY	-	-	+AB/AY	+AB/AY	++AB, ++AY +++AB/ AY	+++AB/ AY
PAS/AB	-	+++PAS	++AB	++PAS	++AB ++PAS +++PAS /AB	++AB ++PAS
PA*S ¹	-	-		+	+++	-
KOH/PAS ²	+	-	-	+	++	-
PA*S/Bh/K OH/PAS ³	-	+	-	+	+++	-
KOH/PA*S /Bh/PAS ⁴	-	+	-	+	+++	-
Orceína/ AB	-	-	+++AB	+Orc.?	++Orc/A B + Orc. +AB	+Orc./A B
Azur A	-	-	++	-	++	++
Metilación 37°C	-	-	++	-	++	++
Metilación 60°C	-	-	-	-	-	-

Referencias: +++: Reacción fuerte; ++: Reacción moderada; + Reacción débil; -: No se presenta reacción. ¹ Ácidos siálicos sustituidos en C₇ y C₉. ² Ácidos siálicos totales. ³ Ácidos siálicos no sustituidos en C₇ y C₉. ⁴ Azúcares neutros.

Tabla 3.IV. Estudios histoquímicos utilizando lectinas, de la mucosa olfatoria del *Chaetophractus villosus*.

LECTINAS	EPITELIO	SECRECION	GL. DE BOWMAN
PSA	-	-	++
WGA	-	++	++
PNA	+ vesículas olfatorias + citoplasma. supranuclear de las neuronas		+
SBA	-		++

3.3.1.2. LÍPIDOS

Las técnicas de Sudan Black en propilenglicol y Azul de Nilo han dado resultados positivos en la región apical, algunos gránulos en la región basal del epitelio y en algunas células glandulares de la lámina propia (Fig. 3.32).

3.3.1.3. PROTEÍNAS

Las técnicas de Ninhydrina-Schiff y de Azul de bromofenol demostraron reacción positiva en la parte apical del epitelio y en escasas células acinares.

3.3.2- ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *DASYPUS HYBRIDUS*.

a) GLICOCONJUGADOS

Los criterios histoquímicos en cuanto al análisis de los resultados fueron los mismos que los expuestos para el caso de *Chaetophractus villosus*, y por lo tanto, nos limitaremos a resumir los datos más importantes hallado en el armadillo *Dasypus hybridus*.

Los resultados histoquímicos revelan que las células de sostén poseen GC neutros, debido a la presencia de una zona fuertemente PAS positiva en la parte apical del epitelio (Figs. 3.34A, B). En la zona basal del epitelio olfatorio se observa una reacción fuertemente PAS positiva (Fig. 3.34A, D), lo cual indica la presencia de GC neutros en esa región del epitelio. En los ductos de las glándulas de Bowman que atraviesan el epitelio olfatorio se detecta la presencia de GC neutros y GC ácidos tanto carboxilados como sulfatados, utilizando la técnica de AB 2.5 y 0.5 (Fig. 3.34A).

En cuanto a los elementos de la lámina propia, las glándulas de Bowman presentan gran cantidad de GC neutros y ácidos tanto carboxilados como sulfatados, debido a que se obtiene reacción positiva tanto con PAS (Fig. 3.34A, B), como con AB 2.5 y 0.5 (Fig. 3.34C), AB/PAS (Fig. 3.34E) y orceína/AB. Se observan células glandulares que contienen solamente GC ácidos, otras con GC neutros exclusivamente y algunas con ambos tipos de GC. La presencia de GC ácidos sulfatados y carboxilados se comprobó utilizando la técnica de AB/AY, donde también se observan células glandulares con GC ácidos sulfatados, otras con GC carboxilados exclusivamente y en la gran mayoría de los acinos hallamos ambos tipos de GC (Fig. 3.34D). En todos los casos cuando se utilizaron técnicas para diferentes GC se observa que algunas células glandulares no presentan reacción alguna. Los ductos de las glándulas de Bowman presentan una mayor cantidad de GC ácidos en comparación con los neutros (Fig. 3.34B). La metilación (a 37° y a 60°) confirman los resultados expuestos anteriormente.

Las diferentes técnicas combinadas de peroxidación selectiva confirmaron la presencia de GC con residuos de ácidos siálico en la parte apical de las células de sostén y en la capa interna del mucus. Por otro lado, en las glándulas de Bowman la positividad de la técnica KOH/PA*S junto con la ausencia de tinción de el método PA*S/Bh/KOH/PAS en las células glandulares permitieron revelar la existencia de ácido siálico, especialmente aquellos que no poseen sustituyentes acetilados en sus cadenas laterales.

La capa de mucus que se halla tapizando la superficie luminal del epitelio presenta una marcada división en dos regiones: una externa o superficial y una interna o profunda. La capa superficial presenta una fuerte reacción AB+ (a ambos pH estudiados), lo cual indica la presencia de GC ácidos carboxilados y sulfatados. La capa profunda presenta reacción PAS+, indicativa de la presencia de glicoconjugados neutros y débilmente ácidos.

Los resultados de las técnicas histoquímicas de *Dasypus hybridus* se encuentran en la tabla 3.V

b) ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS MEDIANTE EL USO DE LECTINAS

El epitelio olfatorio presenta reacción en el borde apical con la lectina WGA, lo cual indica la presencia de N-acetilglucosamina y ácido siálico en el extremo apical de las células de sostén (Fig. 3.35A). La lectina PNA da reacción positiva en el citoplasma perinuclear de las neuronas olfatorias y en algunos *knobs* dendríticos apicales (Fig. 3.35G). Además, se observa marca en algunos axones de los nervios olfatorios que se encuentran en la lámina propia (Fig.3.35A).

La secreción que reviste el epitelio olfatorio muestra tinción sólo con la lectina WGA, lo cual implica la presencia de glicoconjugados que presentan N-acetilgalactosamina (Fig. 3.35A). La secreción no presenta reacción con PSA, BSA y PNA.

Las glándulas de Bowman de la lámina propia presenta reacción positiva con WGA y SBA (Fig. 3.34A, B, C, D). Lo cual indica la presencia de N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y ácido siálico.

Tabla 3.V. Estudios histoquímicos de la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*.

TECNICA	EPITELIO		SECRECION		GL. DE LA LAMINA PROPIA	
	Región apical	Región basal	Capa externa	Capa interna	Células acinares	Ductos
PAS	+	++	-	++	+++	++
AB 2.5	-	-	++	-	++	++
AB 0.5	-	-	++	-	++	++
AB/AY	-	-	++	++	+AB, +AY ++AB/A Y	++AB/A Y
PAS/AB	-	++PAS	+AB	+PAS	+AB ++PAS +++PAS /AB	++AB +PAS
PA*S ¹	++	-	-	+	++	++
KOH/PAS ²	++	-	-	+	++	++
PA*S/Bh/K OH/PAS ³	-	-	-	-	+	-
KOH/PA*S /Bh/PAS ⁴	-	-	-	-	+++	++
Orceína/A B	-	-	++	?	++Orc/A B + Orc. +AB	++Orc./ AB
Azur A	-	-	++	-	++	++
Metilación 37°C	-	-	++	-	++	++
Metilación 60°C	-	-	-	-	-	-

Referencias: +++: Reacción fuerte; ++: Reacción moderada; + Reacción débil; -: No se observa reacción.¹ Ácidos siálicos sustituidos en C₇ y C₉. ² Ácidos siálicos totales. ³ Ácidos siálicos no sustituidos en C₇ y C₉. ⁴ Azúcares neutros.

Tabla 3.VI. Estudios histoquímicos utilizando lectinas, de la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*.

LECTINAS	EPITELIO	SECRECION	GL. DE BOWMAN
PSA	-	-	-
WGA	+ en células de sostén	++	++
PNA	+ Citoplasma supranuclear de neuronas. + en <i>knobs</i> olfatorios ¹		
SBA	-	-	++

¹ También se observó reacción positiva en algunos axones de los paquetes de nervios olfatorios.

3.3.2.2. LÍPIDOS

Se ha detectado la presencia de lípidos utilizando las técnicas de Sulfato de Azul de Nilo y Sudan Black en propilenglicol. Se halló una intensa tinción en el borde apical del epitelio y en las células glandulares. También se observaron gránulos en la región basal del epitelio.

3.3.2.3. PROTEÍNAS

Las técnicas de azul de bromofenol y la de Ninhydrina-Schiff, han detectado la presencia de proteínas en la parte apical del epitelio y en algunas células glandulares.

FIGURA 3.31. Detección de glicoconjugados en el armadillo *Chaetophractus villosus*.

A. Detección de glicoconjugados neutros. Reacción PAS positiva en la porción apical del epitelio, en la región basal del epitelio y en algunas glándulas de Bowman. (*) células que no presentan reacción PAS positiva (400x).

B. Detección de glicoconjugados y glicosaminoglicanos ácidos sulfatados. Reacción AB 0.5 positiva en el borde apical del epitelio, en las glándulas de Bowman y en los ductos de las glándulas. AB-Hematoxilina (1000x).

C. Detección de glicoconjugados y glicosaminoglicanos ácidos sulfatados y carboxilados. Las glándulas de Bowman y los ductos que atraviesan el epitelio presentan reacción AB/AY positiva. AB/AY-Hematoxilina (1000x).

D. Detección de glicoconjugados ácidos y neutros utilizando la técnica combinada de PAS y AB pH 2.5. Las glándulas de Bowman presentan reacción PAS/AB positiva. La parte basal del epitelio presenta reacción PAS positiva. La secreción que cubre el epitelio presenta una región PAS positiva inferior y una región AB superior (flecha) (400X).

E. Detalle de una acina de una glándula de Bowman en el cual se observan células PAS positivas, células PAS/AB positivas y células que no presentan reacción. AB/PAS (1000x).

FIGURA 3.32. Detección de lípidos mediante la técnica de Sudan en propilenglicol. El citoplasma apical de las células de sostén (s) presenta una importante reacción positiva (250x).

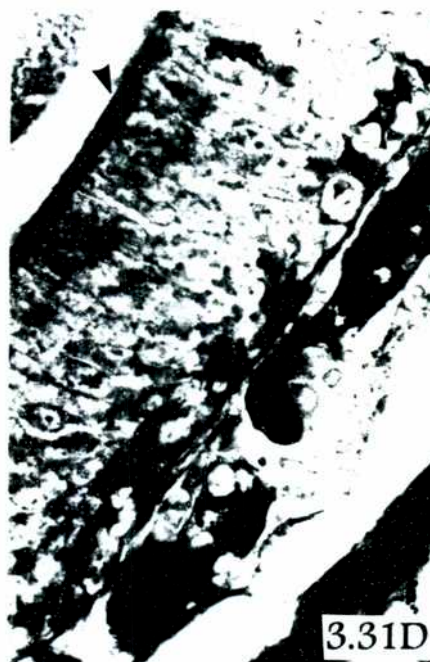
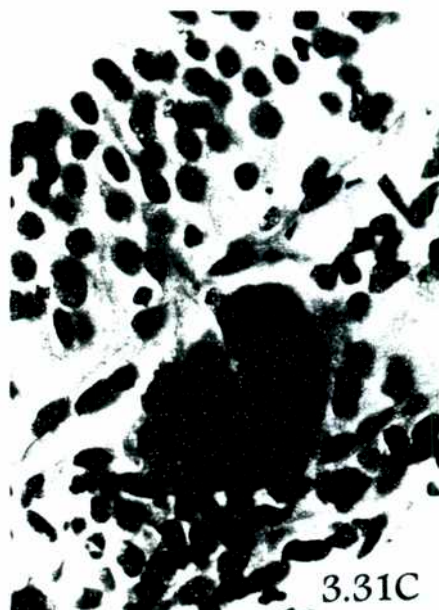


FIGURA 3.33. Identificación de glicoproteínas mediante el uso de lectinas.

- A. SBA tiñe las glándulas de Bowman de la lámina propia del armadillo *Chaetophractus villosus* (E) epitelio (250x).
- B. La lectina SBA marca las glándulas de Bowman (G) en la lámina propia (LP) y los ductos de las mismas que atraviesan el epitelio (E) (400x).
- C. WGA marca la secreción que recubre el epitelio (e), las glándulas de Bowman (G) y los ductos (flecha).
- D. Detalle de la secreción que recubre el epitelio (e). (1000x).
- E. La lectina PNA tiñe las vesículas olfatorias de las neuronas (flecha) en el epitelio (e) y algunas glándulas de Bowman en la lámina propia (lp) (250x).
- F. PSA tiñe las células acinares de las glándulas de Bowman (G). El epitelio (E) no presenta reacción positiva (400x).

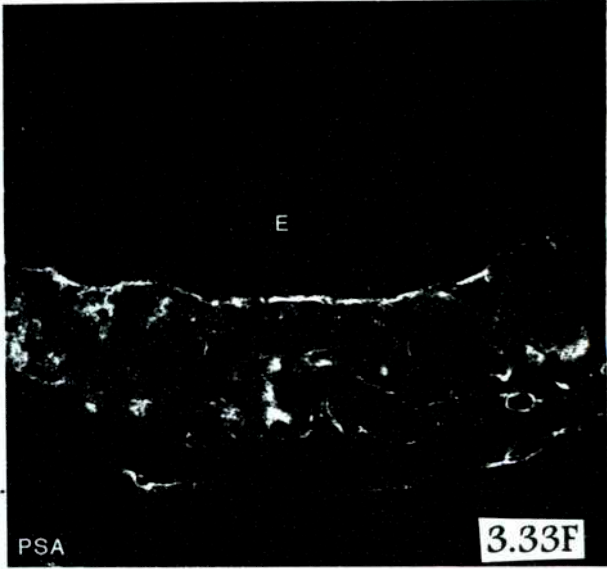
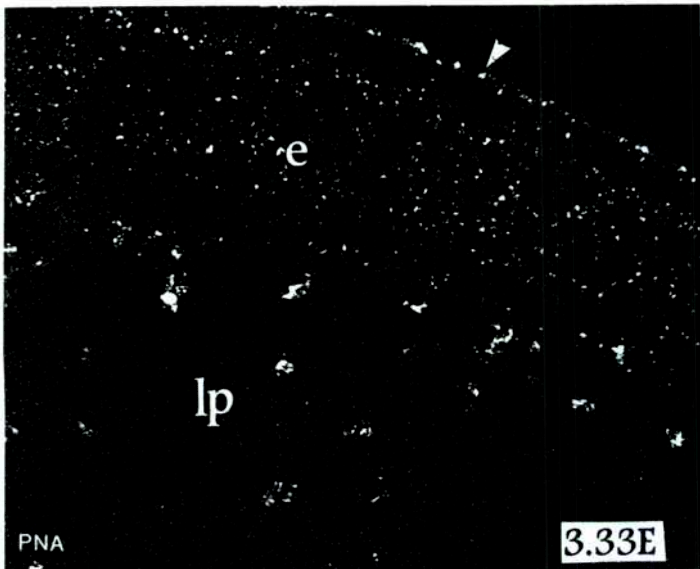
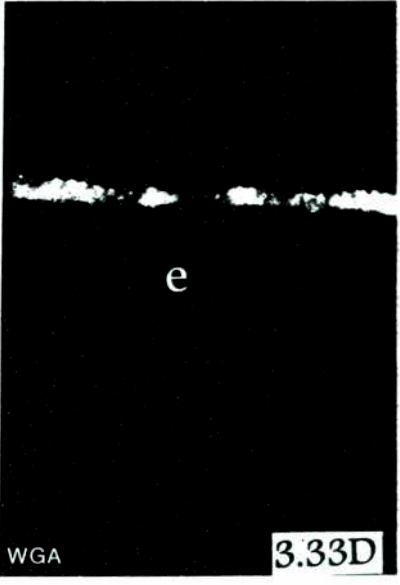
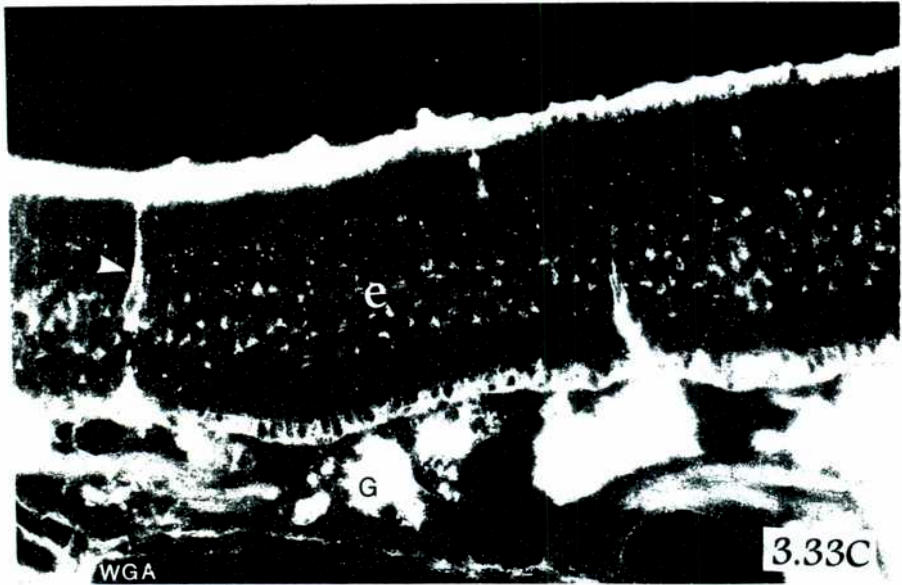
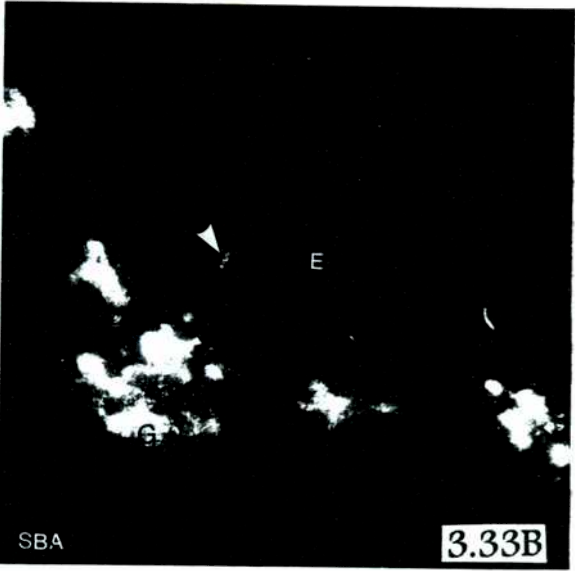
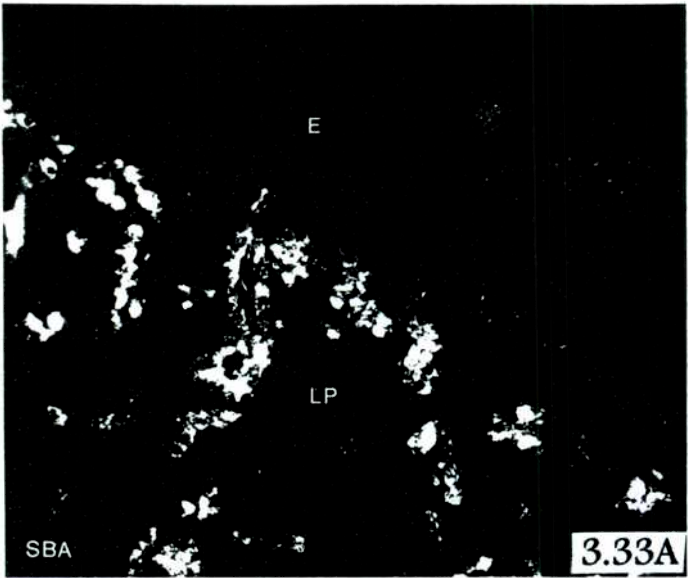


FIGURA 3.34. Detección de glicoconjugados en el armadillo *Dasypus hybridus*

A. Detección de glicoconjugados neutros. Reacción PAS positiva en la porción apical de las células de sostén (s), en la región basal del epitelio y en algunas glándulas de Bowman. El ducto (D) que atraviesa el epitelio también presenta reacción PAS positiva. (N) nervio olfatorio (400x).

B. Detalle de las glándulas de Bowman en el cual se observa que la mayoría de las células glandulares presentan reacción PAS positiva. (g) células acinares que no muestran reacción, (E) epitelio. PAS-Hematoxilina (1000x)

C. Detección de glicoconjugados y glicosaminoglicanos ácidos sulfatados. Reacción AB 0.5 positiva en la secreción que recubre el epitelio y en las glándulas de Bowman. (N) nervio. AB-Hematoxilina (400x).

D. Detección de glicoconjugados y glicosaminoglicanos ácidos sulfatados y carboxilados. Las glándulas de Bowman presentan reacción AY y AB/AY positiva. AB/AY-Hematoxilina (1000x).

E. Detección de glicoconjugados ácidos y neutros utilizando la técnica combina de PAS y AB pH 2.5. El borde apical de las células de sostén (s) y la región basal del epitelio (b) presenta reacción PAS positiva. Las glándulas de Bowman (G) presentan reacción PAS/AB positiva. La secreción que cubre el epitelio presenta una región levemente (E) epitelio. PAS positiva inferior y una región AB superior (flecha) (400X).

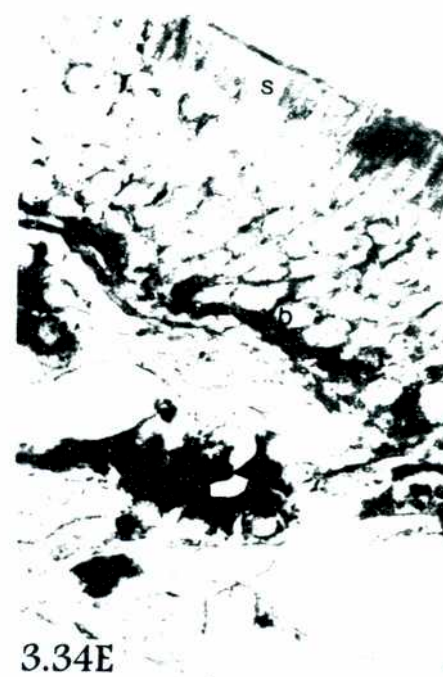
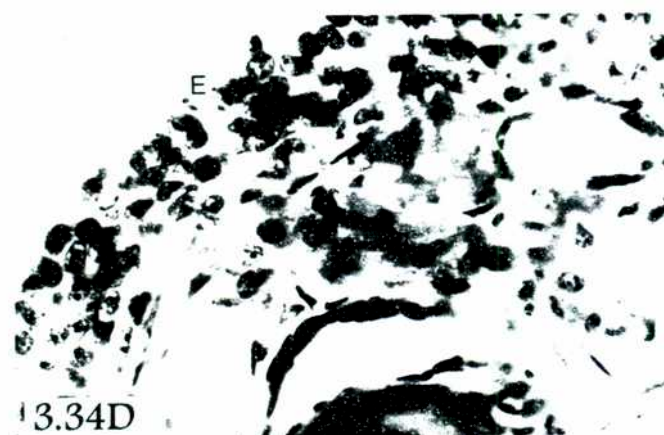
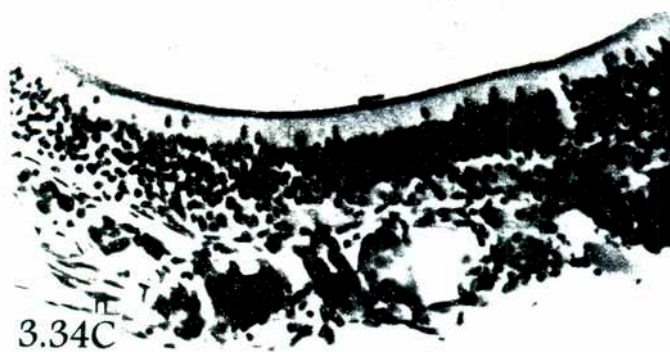
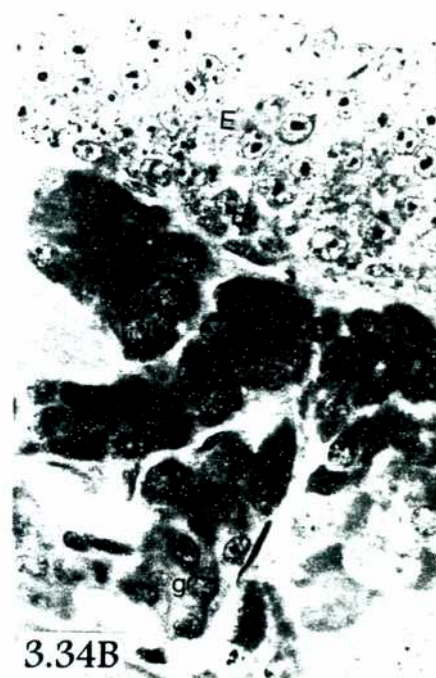
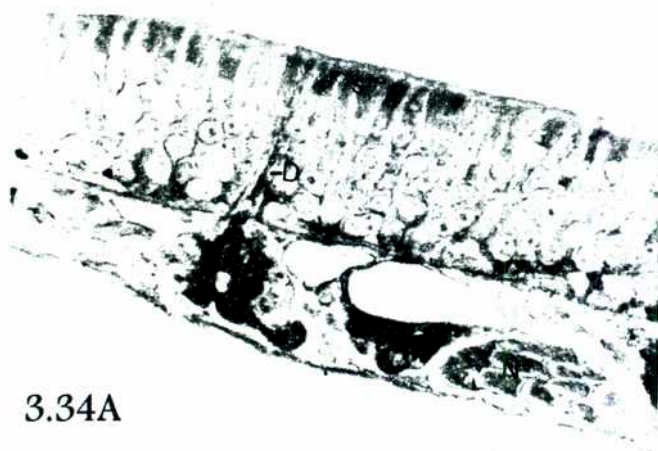


FIGURA 3.35. Identificación de glicoproteínas mediante el uso de lectinas en la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*.

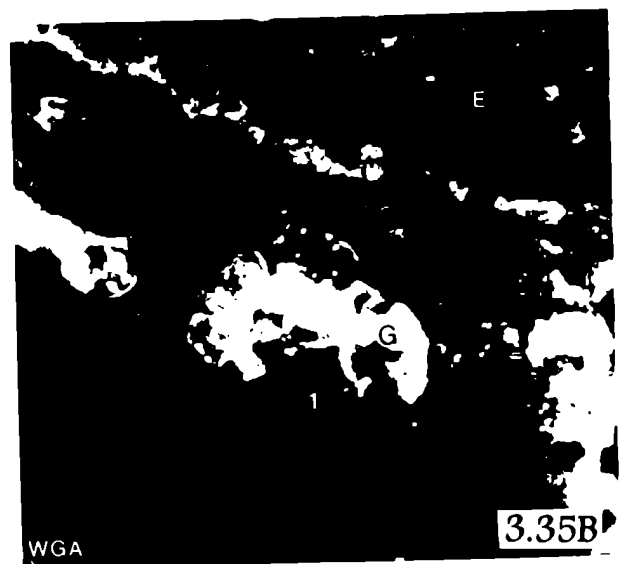
A. WGA tiñe la secreción que recubre el epitelio (E), las glándulas de Bowman (G) y los ductos de las mismas (flechas) (400x).

B. Detalle de una glándula de Bowman (G) en el cual se observan algunas células acinares marcadas y otras que presentan marca (1). (E) epitelio (1000x).

C. La lectina SBA marca únicamente células acinares de las glándulas de Bowman (G). (E) epitelio (400x).

D. Detalle de un acino glandular en el cual se aprecia las diferentes intensidades de tinción con WGA (1000x).

E. PNA marca únicamente las vesículas olfatorias de las neuronas (►). También se observa alguna marca en el citoplasma apical de las mismas. (E) epitelio (1000x).



3.4. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Para completar la caracterización morfológica e histoquímica se consideró necesaria una caracterización a nivel bioquímico, de manera tal que nos permitiese analizar algunos de los componentes más importantes tanto de las neuronas olfatorias, así como también de las otras células que componen tanto el epitelio olfatorio como los constituyentes de la lámina propia subyacentes.

3.4.1. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS*.

El anticuerpo OMP reacciona con la proteína o con una proteína similar que se halla únicamente en el citoplasma de las neuronas receptoras olfatorias (Figs. 3.36A, B). Con el anticuerpo anti OMP, se observó inmunorreactividad en las células sensoriales del epitelio olfatorio. Se diferencia el soma y las dendritas intensamente teñidos. El axón se inmunomarca menos intensamente y se lo observa sólo ocasionalmente (Fig. 3.36B). También se diferencian los *knobs* dendríticos que hacen protrusión hacia el lumen. No se observa inmunorreactividad de los otros tipos celulares dentro del epitelio. En la lámina propia se observó inmunomarcación en todos los paquetes nerviosos, y no se distinguió marcación en ninguna otra estructura de la lámina propia (Fig. 3.36A).

Por otro lado, se utilizó un anticuerpo (PGP 9.5) que funcionaría como un marcador neuronal específico. El PGP 9.5 se distribuyó de forma similar al OMP, esto es, en las neuronas del epitelio olfatorio. Se observa también, las dendritas, dirigiéndose hacia la superficie apical, y los *knobs* haciendo protrusión hacia el lumen (Fig. 3.37B). También se observó inmunomarca en los nervios que se encuentran en la lámina propia (Fig. 3.37A).

Para analizar la presencia de neurofilamentos en las neuronas olfatorias hemos utilizado anticuerpos anti-neurofilamentos. No se obtuvo marca con los anticuerpos contra neurofilamentos de 160 y 200kD en ninguna célula del epitelio.

Por otro lado, dado el carácter epitelial de los componentes de la mucosa olfatoria, hemos estudiado la presencia de diferentes filamentos intermedios, utilizando anticuerpos que reaccionan con diferentes citoqueratinas.

Los anticuerpos anti citoqueratina 5, 6 y 18 (NCL-34) y anti vimentina han dado resultados positivos en las células basales oscuras del epitelio en ambos casos (Fig. 3.38). Las células, de apariencia aplanadas, se observaron como una única hilera en la base del epitelio.

Otros anticuerpos que también indican la presencia de citoqueratinas, presentan una distribución diferente de la reactividad a la obtenida con los anticuerpos mencionados anteriormente. Los anticuerpos anti-CTK18 y anti-KS8-pan inmunomarcaron algunas glándulas de Bowman de la lámina propia (Figs. 3.40, 3.41). Ninguno de los dos anticuerpos presentó reacción en el epitelio. La inmunomarca con anti-CTK18 se ubicó principalmente en la parte basal de las células acinares. En cambio, la marca con KS8-pan se distribuyó en toda la célula acinar.

Para analizar la innervación de la mucosa olfatoria, se utilizó el anticuerpo anti-VIP. Este presentó inmunomarcación en el borde apical del epitelio olfatorio (Fig.), por lo tanto la marca se podría ubicar tanto en las cilias de las neuronas como en el mucus que rodea las cilias. En la lámina propia se observó, además, inmunomarcación en las paredes de los vasos sanguíneos.

Las células basales claras se marcaron con el anticuerpo PCNA - que marca células en proliferación o en división- indicando así la posible actividad regenerativa de estas células (Figs. 3.43A, 3.43B).

Por otro lado, la inmunoreactividad para GAP43 se distribuyó en algunas neuronas olfatorias y en algunos filetes olfatorios en la lámina propia, probablemente en aquellos que estén en algún grado de maduración y crecimiento (Fig. 3.44A, B).

Los resultados anteriores se resumen en la Tabla 3.VII

Tabla 3.VII: Resultados inmuohistoquímicos de la mucosa olfatoria del *Chaetophractus villosus*.

Antisueros o Anticuerpos	EPITELIO OLFATORIO					LAMINA PROPIA		
	CS	NO	CBO	CBC	BA	AO	GB	TC
Anti OMP	-	+++	-	-	-	+++	-	-
Anti PGP 9,5	-	+++	-	-	-	+++	-	-
Anti Nf 160	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti Nf 200	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti LP 34	-	-	++	-	-	-	-	-
Anti VIM	-	-	++	-	-	-	-	-
Anti VIP	+	-	-	-	+	-	-	+ ¹
Anti CTK 18	-	-	-	-	-	-	+ ²	-
Anti KS8-pan	-	-	-	-	-	-	+ ²	-
Anti PCNA	-	-	-	++	-	-	-	-
Anti GAP 43	-	+++ ³	-	-	-	++	-	-

Referencias: ¹ : Vasos sanguíneos del tejido conectivo; ² : Reacción positiva en algunas glándulas de Bowman; ³ : Sólo en neuronas de diferenciación. CS: Células de sostén; NO: Neuronas olfatorias; CBO: Célula basal oscura; CBC: Célula basal clara; BA: Borde apical; AO: Axones olfatorios; GB: Glándulas de Bowman; TC: Tejido conectivo.

3.4.2. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *DASYPUS HYBRIDUS*.

Al igual que para el caso de *Chaetophractus villosus* se utilizaron anticuerpos para caracterizar los componentes de la mucosa olfatoria

Con el anticuerpo específico para la marcación de neuronas olfatorias (OMP) se obtuvo una reacción positiva en las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio. Dentro de las células receptoras, los somas y las dendritas se observan fuertemente inmunomarcadas. Los axones se observa menos intensamente teñidos y sólo se los reconoce ocasionalmente (Figs. 3.45A, B). Las neuronas se observan con el citoplasma

oscuro, el núcleo claro y las dendritas proyectándose hacia la superficie del epitelio para finalizar en las vesículas olfatorias que hacen protrusión en el lumen. (Fig. 3.45). No se observó reactividad ni en las células de sostén ni en las células basales. En la lámina propia se diferenciò inmunoreactividad en los nervios olfatorios subyacentes (Fig. 3.45A).

Con el anticuerpo PGP 9.5, se obtuvo una marca muy similar a la observada con el OMP. Se observa inmunorreactividad en las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio y en los paquetes nerviosos de la lámina propia (Fig. 3.46A). Las neuronas presentan el soma y la dendrita intensamente teñidos (Fig. 3.46B).

No se han obtenido resultados positivos con los anticuerpos contra neurofilamentos de 160 y 200kD.

El VIP muestra una fuerte reacción positiva en el borde apical del epitelio olfatorio. La microscopía óptica no nos permite resolver si la inmunomarca pertenece a las cilias de las neuronas olfatorias o al mucus que rodea a las cilias (Fig. 3.46C). También se observó inmunomarcación en los vasos sanguíneos de la lámina propia.

El anticuerpo CTK18 demostró que aparentemente se estaría expresando una proteína similar a la citoqueratina 18 en la región apical de las células de sostén. Por otro lado, no se ha obtenido reacción positiva al utilizar el anticuerpo LP34, que identifica las citoqueratinas 5, 6 y 18.

Los datos mencionados anteriormente se resumen en la Tabla 3.VIII.

Tabla 3.VIII : Resultados inmuohistoquímicos de la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*.

Antisueros o Anticuerpos	EPITELIO OLFATORIO					LAMINA PROPIA		
	CS	NO	CBO	CBC	BA	AO	GB	TC
Anti OMP	-	+++	-	-	-	+++	-	-
Anti PGP 9,5	-	+++	-	-	-	+++	-	-
Anti Nf 160	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti Nf 200	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti VIP	-	-	-	-	++	-	-	+ ²
Anti LP 34	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti CTK 18	+ ¹	-	-	-	-	-	-	-

Referencias: ¹ : Sólo en el borde apical de las células de sostén; ² : Reacción positiva los vasos sanguíneos de la lámina propia. CS: Células de sostén; NO: Neuronas olfatorias; CBO: Célula basal oscura; CBC: Célula basal clara; BA: Borde apical; AO: Axones olfatorios; GB: Glándulas deBowman; TC: Tejido conectivo.

FIGURA 3.36A. Inmunorreactividad a OMP en la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*. En el epitelio (E) se observa reacción en las neuronas, en la lámina propia en los nervios olfatorios (N) (250x).

B. Detalle del epitelio (E) para ver la marca en el citoplasma de las neuronas. También se distinguen las dendritas apicales y las vesículas olfatorias (►). (LP) lámina propia. (1000x).

FIGURA 3.37A. Inmunorreactividad a PGP 9.5 en la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*. Hay intensa reacción en las neuronas en el epitelio (E) y en los nervios olfatorios (N) en la lámina propia (250x).

B. Intensa inmunorreacción positiva a PGP 9.5 se observa en el citoplasma de las neuronas. Se observa, además, reacción en las dendritas apicales de las neuronas receptoras (►). (LP) lámina propia. (1000x).

FIGURA 3.38. Inmunorreactividad a LP34. Las células basales oscuras (flecha) del epitelio (E) presenta reacción positiva. No se ve reacción en la lámina propia (LP). (400x).

FIGURA 3.39. Inmunorreactividad a vimentina. Las células basales oscuras (►) del epitelio (E) presenta reacción positiva (400x).

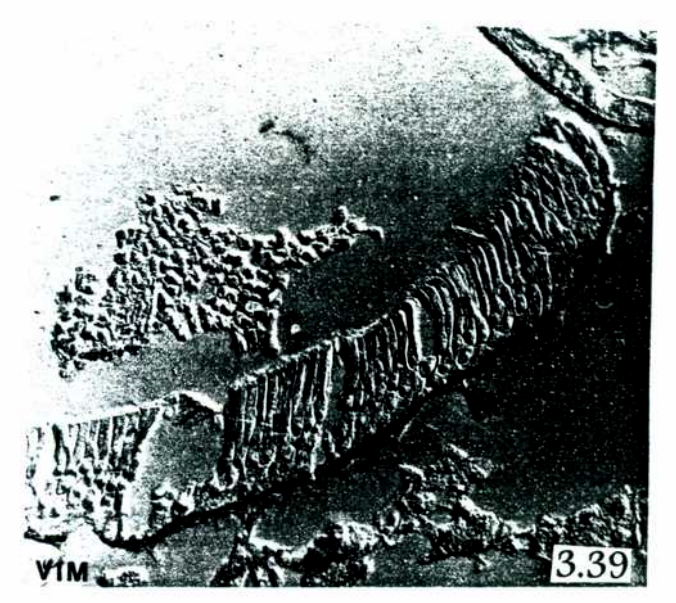
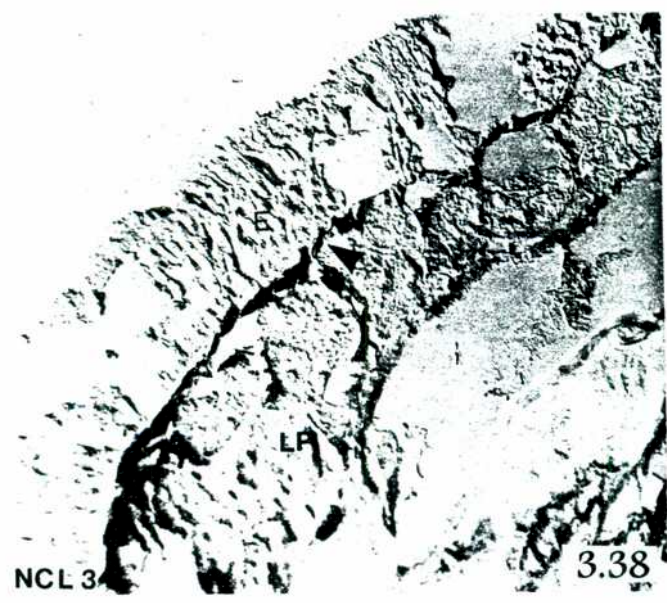
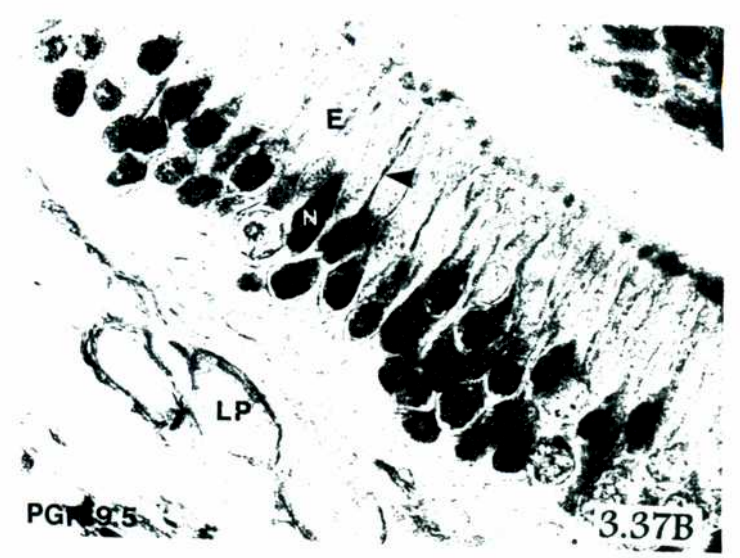
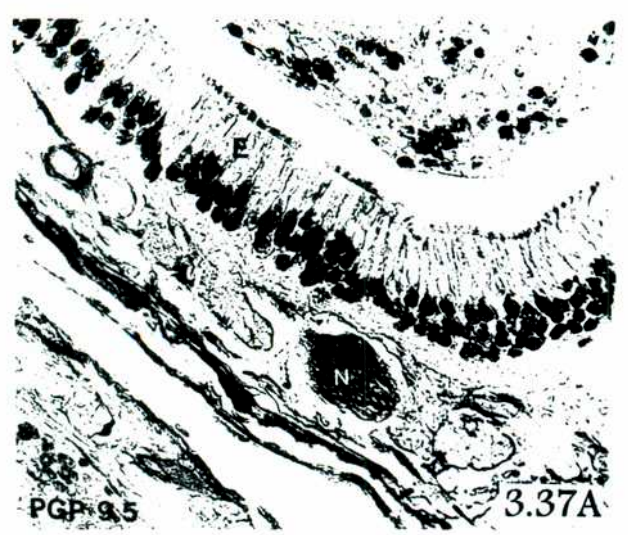
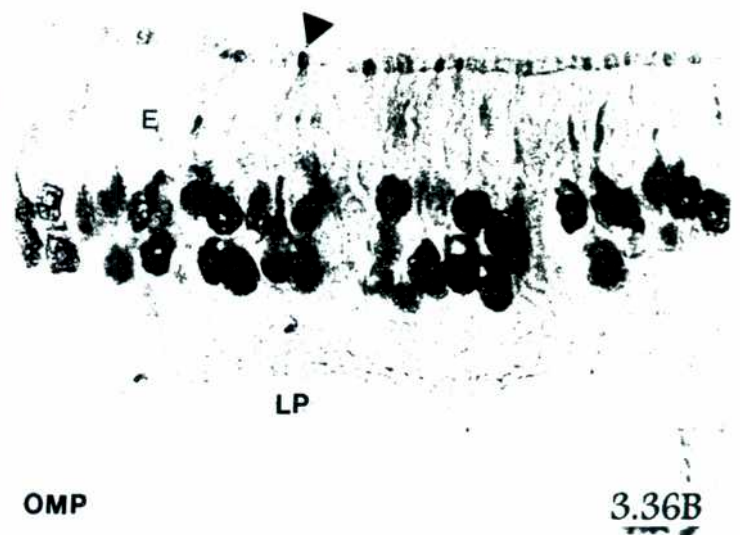
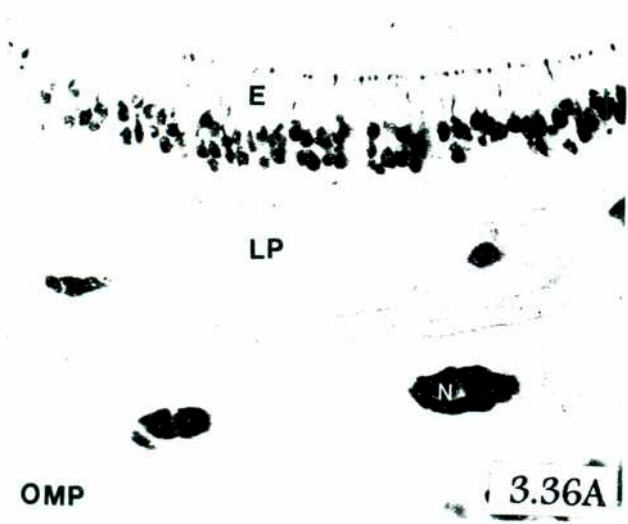


FIGURA 3.40. Inmunorreactividad a citoqueratinas 5,6, y 18 (PKS8-pan). No se observa marca en el epitelio (E). En la lámina propia (LP) hay reacción positiva en las glándulas de Bowman (G) (400x).

FIGURA 3.41. Inmunorreactividad a citoqueratina 18 (CTK18). No se observa marca en el epitelio (E). En la lámina propia (LP) hay reacción positiva en las glándulas de Bowman (G) (400x).

FIGURA 3.42. Inmunorreactividad a VIP en la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*. Se observa reacción en el borde apical del epitelio (E). La lámina propia (LP) no presenta reacción (400x).

FIGURA 3.43A. Inmunorreactividad a PCNA. La reacción se observa en las células basales claras del epitelio (E). En la lámina propia (LP) no se observa reacción (400x).

B. Detalle de las células basales inmunoreactivas a PCNA (flecha) (1000x).

FIGURA 3.44A. Inmunorreactividad a GAP43. La reacción se observa en algunas neuronas en el epitelio (E). En la lámina propia (LP) la reacción se observa en los paquetes nerviosos (400x).

B. Detalle de las neuronas inmunoreactivas a PCNA (N). En el borde apical se observan algunas vesículas olfatorias (flecha) (1000x).

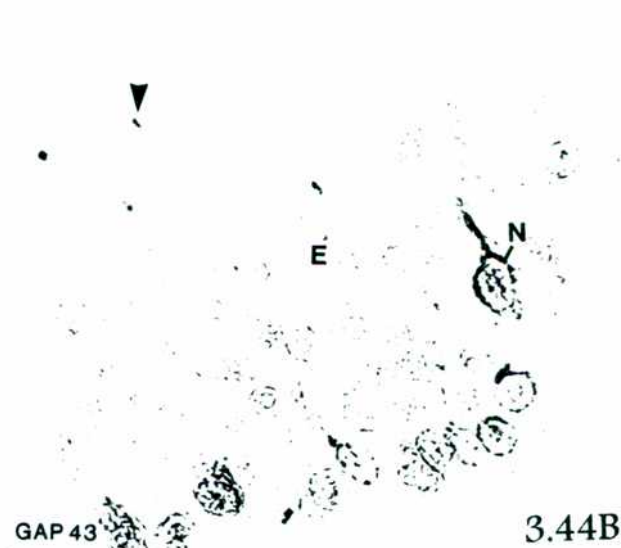
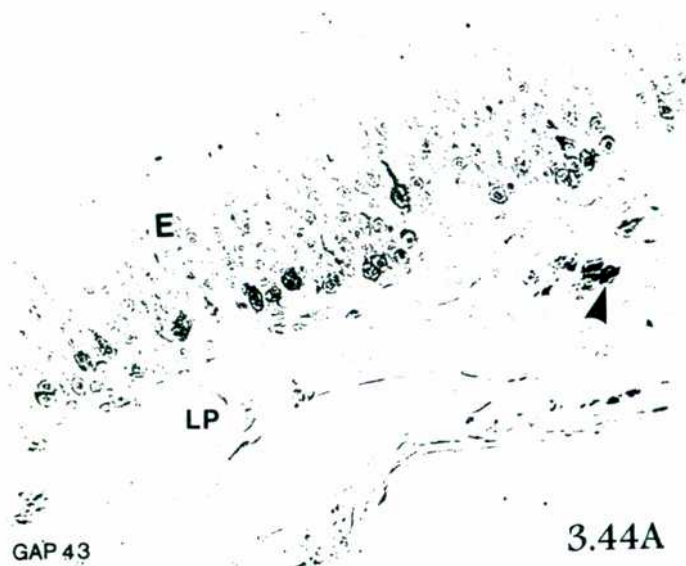
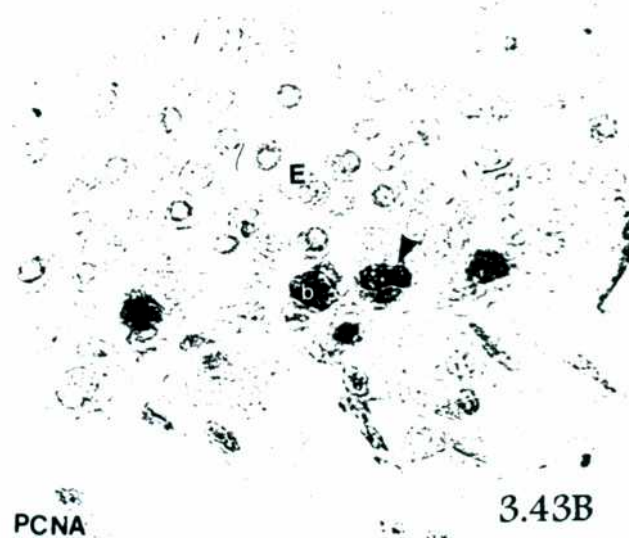
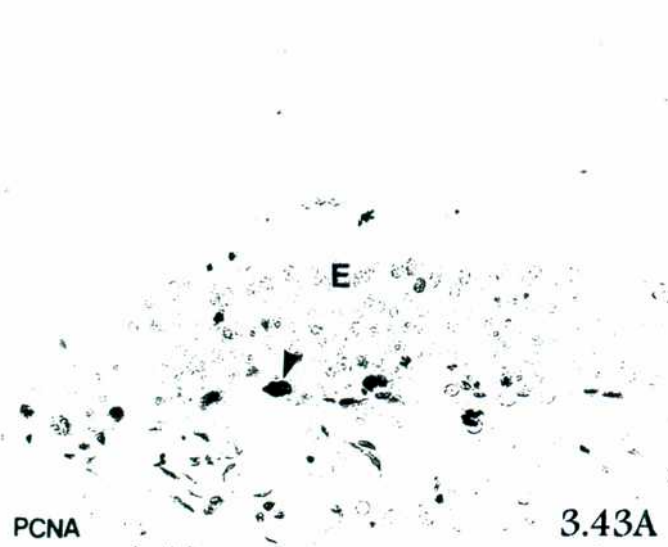
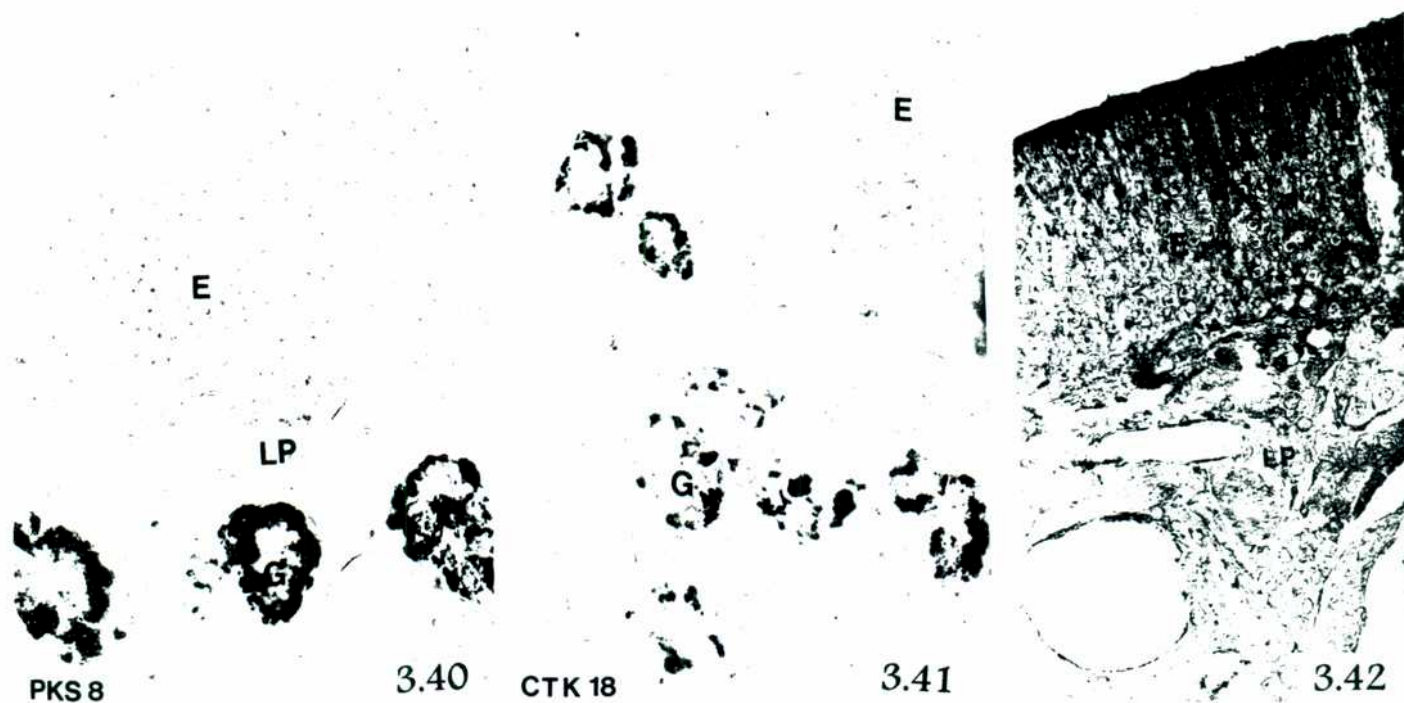


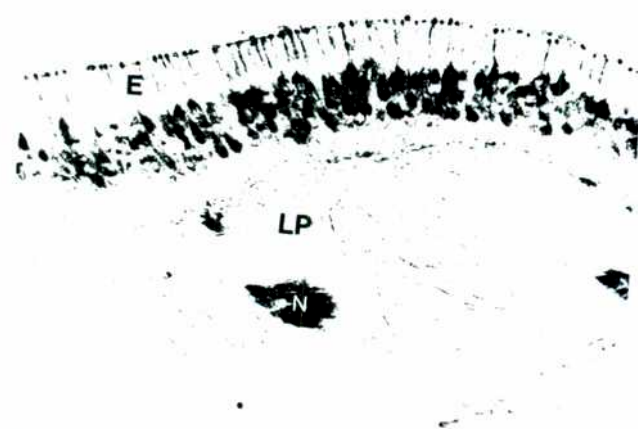
FIGURA 3.45A. Inmunorreactividad a OMP en la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*. En el epitelio (E) se observa reacción en las neuronas, en la lámina propia en los nervios olfatorios (N) (250x).

B. Detalle del epitelio (E) para ver la marca en el citoplasma de las neuronas. También se distinguen las dendritas apicales y las vesículas olfatorias (flecha) (1000x).

FIGURA 3.46A. Inmunorreactividad a PGP 9.5 en la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*. Hay intensa reacción en las neuronas en el epitelio (E) y en los nervios olfatorios (N) en la lámina propia (250x).

B. Intensa inmunorreacción positiva a PGP 9.5 se observa en el citoplasma de las neuronas. Se observa, además, reacción en las dendritas apicales de las neuronas receptoras. (E) epitelio, (LP) lámina propia. (1000x).

C. Inmunorreactividad a VIP en la mucosa olfatoria de *Dasypus hybridus*. Se observa reacción en el borde apical del epitelio (E). La lámina propia (LP) no presenta reacción (250x).



OMP

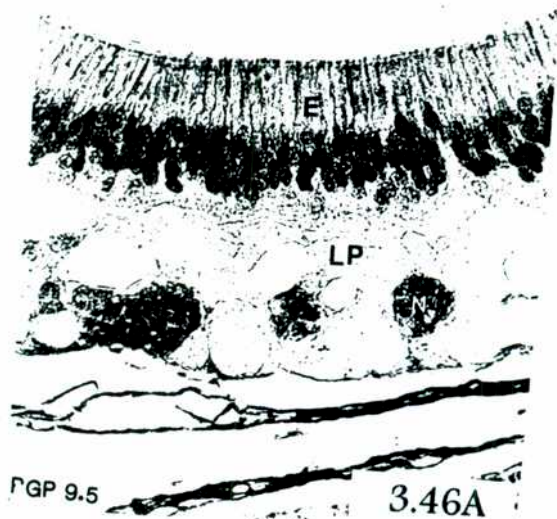
3.45A



OMP

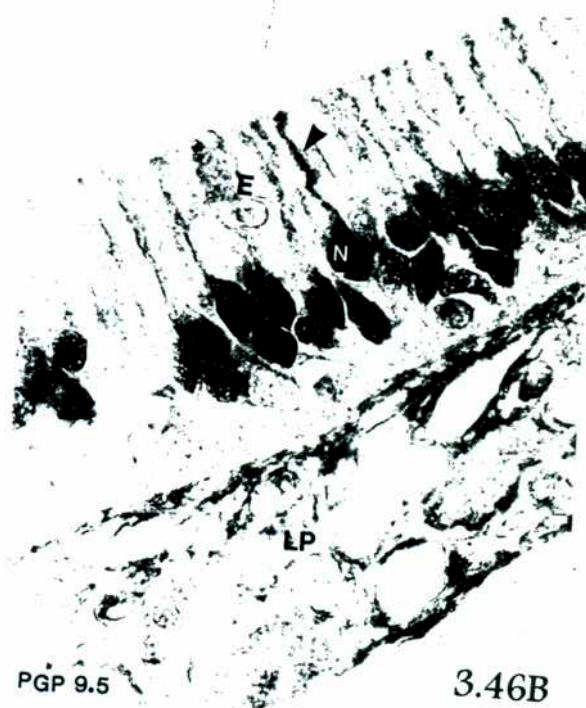
LP

3.45B



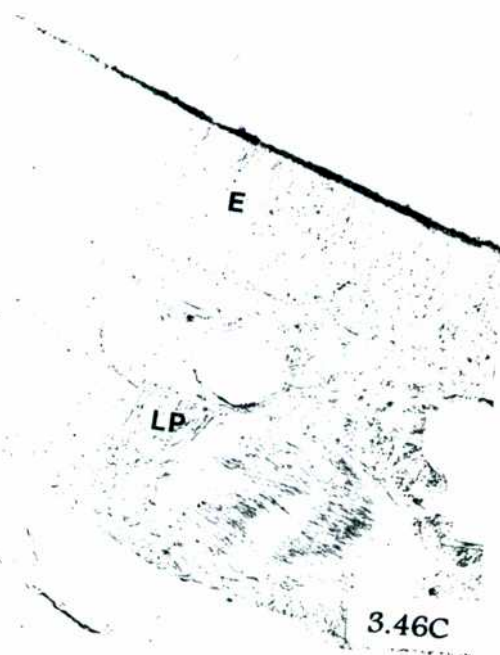
PGP 9.5

3.46A



PGP 9.5

3.46B



3.46C

3.5- MICROSCOPIA ELECTRONICA

3.5.1- ESTUDIOS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS*.

Los estudios de microscopía electrónica comprueban claramente el carácter pseudoestratificado del epitelio olfatorio. Las distintas poblaciones celulares mediante diferentes procesos, toman contacto con la membrana basal. Pueden distinguirse, al igual que con MO, tres tipos celulares: a) células de sostén, b) células neuronales y c) células basales (Figs. 3.47, 3.48). Los dos tipos celulares principales, las neuronas y las de sostén son fácilmente distinguibles en la región apical debido a las especializaciones de sus ápices, y también por las diferencias de electrón densidad y organelas citoplasmáticas. La homogénea distribución de los tipos celulares sólo es interrumpida en algunas zonas por el recorrido de los conductos secretorios de las glándulas de Bowman.

El borde libre está formado principalmente por las microvellosidades y las protrusiones de las células de sostén pero, también incluyen las proyecciones redondeadas de las vesículas olfatorias con sus cilias. (Fig.3.49A).

a) CELULAS DE SOSTEN

Las células de sostén son células columnares que se extienden desde la superficie del epitelio hasta la membrana basal. La superficie celular presenta largas microvellosidades, cortadas transversal o longitudinalmente (Figs. 3.47, 3.51). No se observó un gran desarrollo del glicocáliz ni un esqueleto microfibrilar. Entre las microvellosidades se pueden observar enormes protrusiones que sobresalen hacia la cavidad nasal (Figs. 3.49A, B). Estas protrusiones en general son pedunculadas y se las puede ver tanto unidas a un pedicelo a la célula como también sueltas en el lumen, por

lo cual parecerían secretarse a la capa mucosa que reviste el epitelio olfatorio (Figs. 3.50A, B). El contenido de estas protrusiones presenta gran cantidad de retículo endoplasmático liso muy desarrollado (Figs. 3.49B). La disposición de estos elementos es muy llamativa presentando en los bordes y a veces en el interior de la protrusión numerosos apilamientos de túbulos paralelos similares a las cisternas de un aparato de Golgi, entre las cisternas paralelas, el retículo endoplasmático liso forma un complejo sistema en el cual las cisternas aparecen cortadas transversalmente, oblicuamente o longitudinalmente sin un orden aparente, constituyendo una red densa que invade el centro de la protrusión (Fig.3.49B).

La mayor parte del citoplasma se halla en la región supra y perinuclear. El citoplasma supranuclear es más electrón denso que el de las neuronas y el de las células basales claras, pero más claro que las células basales oscuras vecinas. Presentan gran cantidad de mitocondrias y retículo endoplasmático liso y rugoso así como también algunos cuerpos multivesiculares y manojos de tonofilamentos (Fig. 3.51). No se han observado gránulos secretorios en el citoplasma apical. Los procesos que se extienden desde la zona infranuclear hasta la zona basal del epitelio presentan un citoplasma claro a los electrones, mitocondrias, retículo endoplasmático liso y algunas vesículas (Figs. 3.47, 3.51). En la región donde se hallan los cuerpos neuronales, el citoplasma presenta la forma de procesos que se insinúan entre los cuerpos neuronales y llegan hasta la membrana basal (Fig. 3.52).

El núcleo, ubicado en el tercio superior del epitelio, posee forma ovoide, orientado perpendicular a la membrana basal, con cromatina periférica dispuesta en acumulos y escasos grumos heterocromáticos distribuidos en todo el núcleo (Fig. 3.51). No es frecuente la presencia de nucléolos.

En el límite entre las células de sostén y las dendritas e inmediatamente por debajo de la superficie libre, se revela un complejo de unión constituido por *zonula occludens* y *zonula adherens* (Fig. 3.54A). No se ha observado la presencia de desmosomas en esta zona. Sin embargo algunos desmosomas unen las células de sostén con las células basales oscuras y las células basales claras (Fig. 3.58).

Además del tipo celular descrito anteriormente es común hallar otro tipo, o tal vez otro estadio del tipo celular anterior. Este tipo celular se halla en mucho menor proporción y se lo diferencia por presentar un citoplasma muy electrón denso con gran

cantidad de mitocondrias. Las mitocondrias pueden presentar hasta dos membranas (Fig. 3.52). El núcleo es muy electrón denso (Fig. 3.51). Los procesos citoplasmáticos de estas células se observan entre las demás células que componen el epitelio olfatorio con citoplasma muy electrón denso, con gran cantidad de mitocondrias, autofagosomas, lisosomas y zonas con aparente edematización del citoplasma o zonas que pudieron haber estado ocupadas por lípidos (Fig. 3.52). Todas características de células en picnosis.

b) NEURONAS OLFATORIAS

El pericarión de las neuronas olfatorias se ubica generalmente en el tercio medio del epitelio olfatorio aunque en algunos casos se observan cuerpos neuronales muy cerca de la membrana basal (Figs. 3.48, 3.58). Así, como regla general las neuronas se ubican entre las células de sostén y las células basales. Pero existen excepciones a esta regla ya que se pueden observar, aún a microscopía fotónica, neuronas sobre la capa de células de sostén y también neuronas maduras aún entre células basales inmaduras. Presentan la típica forma de una neurona bipolar. Por lo tanto, es más delgada en sus porciones proximal y distal y alcanza su ancho máximo a nivel del núcleo (Fig. 3.53).

El citoplasma perinuclear es escaso y presenta gran cantidad de ribosomas libres y asociados a retículo endoplasmático. Mitocondrias tubulares se ubican tanto longitudinales como transversales al eje mayor de la célula. En la región supranuclear se observa el aparato de Golgi asociado a numerosas vesículas y a cuerpos multivesiculares. También es frecuente la presencia de retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres, pequeñas vesículas, gránulos de lipofucsina, neurofilamentos y cuerpos multivesiculares (Fig. 3.53). La región infranuclear presenta menos organelas que la porción supranuclear. Sólo se observan mitocondrias tubulares, ribosomas libres y cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 3.53).

El pericarión de las neuronas pueden estar en contacto directo con otras neuronas o estar separado por los procesos citoplasmáticos de las células de sostén (Fig.

3.48, 3.58). En todos los casos, la relación entre los procesos es por simple aposición de membranas plasmáticas.

El núcleo tiene forma esférica, con cromatina periférica dispuesta en grumos. En *Chaetophractus villosus* es característica la presencia de un enorme grumo de heterocromatina central muy conspicuo (falso nucléolo), que en los cortes de microscopía fotónica se confunde con el nucléolo. El nucléolo se halla asociado a este grumo cromatínico central (Fig. 3.53).

En el extremo distal, la dendrita olfatoria, se extiende desde el cuerpo de la neurona hasta la superficie libre del epitelio. En sus comienzos a nivel del citoplasma supranuclear presenta un citoplasma poco denso a los electrones en el cual se distinguen numerosos microtúbulos que discurren paralelos al eje principal de la célula, algunas mitocondrias tubulares y una gran cantidad de pequeñas vesículas. (Fig. 3.54A). Cerca del extremo libre se observa la presencia de una gran cantidad de vesículas de centro claro entre paquetes de microtúbulos (Fig. 3.54A). El extremo libre de la dendrita se dilata formando lo que se denomina vesícula olfatoria o *knob* dendrítico. Las dendritas se unen a las células de sostén adyacentes por medio de complejos de unión formados por: *zonula occludens* y *zonula adherens*. (Fig. 3.54A). De la vesícula olfatoria parten las cilias olfatorias, pero no se observan microvellosidades (Fig. 3.54A). Estas cilias protruyen en ángulos agudos, casi paralelo al eje principal del knob (Fig. 3.54A). La estructura interna de la cilia presenta un aspecto similar a las cilias móviles de otros órganos. En cortes transversales se observa el típico axonema, constituido por dos microtúbulos centrales y nueve dobletes periféricos (Fig. 3.54B). En la base de cada cilio hay un corpúsculo basal, que en corte transversal presenta nueve tripletes dispuestos característicamente en forma de molino (Fig. 3.54A). En algunos corpúsculos basales existe una estructura accesoria, los pedículos basales (Fig. 3.54B). Estos son prolongaciones densas que se originan a partir de los tripletes extendiéndose radialmente aproximadamente a 90° del eje longitudinal del cuerpo basal, lo cual le otorga una apariencia de rueda de carro (Fig. 3.54B). Otra estructura característica asociada a los cuerpos basales son las raicillas ciliares (Fig. 3.54A). Estas aparecen como un manojo estriado de finos filamentos paralelos adheridos, que se extienden por debajo de los cuerpos basales.

Además de las estructuras que acompañan a las cilias no se distinguen muchas organelas en las vesículas olfatorias, a excepción de microtúbulos, pequeñas vesículas y raramente mitocondrias (Fig. 3.51).

En el extremo basal, el cuerpo neuronal se estrecha para formar el axón. Dicho proceso es muy difícil de observar entre las células de sostén. En algunas ocasiones numerosos axones se relacionan con las células basales antes de atravesar la membrana basal. Los axones presentan mitocondrias y microtúbulos que corren longitudinalmente a lo largo de la fibra nerviosa. El axón se dirige hacia la membrana basal para luego unirse a axones de células vecinas y forma los filetes olfatorios amielínicos (Fig. 3.60B).

c) CELULAS BASALES

Las células basales se localizan en el tercio inferior del epitelio sobre o cerca de la membrana basal. Se diferencian dos tipos de células basales: las células basales globosas o claras y las células basales planas u oscuras, también denominadas células basales propiamente dichas (Fig. 3.55).

CÉLULAS BASALES CLARAS O GLOBOSAS.

Se ubican generalmente sobre la capa de células basales oscuras. Tienen un aspecto redondeado, el citoplasma es claro a los electrones y presenta escasa cantidad de organelas. Solamente se observan algunas mitocondrias y numerosos ribosomas libres pero carece de filamentos intermedios. El núcleo generalmente es esférico, muy eucromático aunque puede presentar algunas indentaciones. La heterocromatina finamente granulada puede formar algunos grumos (Fig. 3.58A, B).

CÉLULAS BASALES OSCURAS O PLANAS

Se ubican sobre la membrana basal del epitelio, relacionándose con esta por medio de desmosomas (Fig. 3.56B). El citoplasma es fuertemente electrón denso (supera en electrón densidad a los otros tipos celulares que componen el epitelio). Presenta numerosas organelas como ser: mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, pequeñas vacuolas, aparato de Golgi pequeño, cuerpos multivesiculares y una gran cantidad de filamentos intermedios (Figs. 3.56, 3.57). El núcleo, de forma ovoide, puede presentar indentaciones y la cromatina se dispone en forma de grumos gruesos que se distribuyen a lo largo del mismo (Fig. 3.56). Es común la presencia de nucléolo

Un rasgo característico de esta célula es que el citoplasma forma finos procesos que se interdigitan con el citoplasma de los procesos de las células de sostén (Fig. 3.55). Estas interdigitaciones no se observan cuando el contacto se da con las células basales claras (Fig. 3.55). Es frecuente observar axones de las neuronas olfatorias en íntimo contacto con el citoplasma de estas células (Fig. 3.56A). En la región en contacto con la membrana basal es común observar la presencia de numerosas vesículas de pinocitosis (Fig. 3.57).

d) DUCTOS DE SECRECIÓN DE LAS GLÁNDULAS DE BOWMAN

Las células que forman los ductos de las glándulas de Bowman son aplanadas. Se sitúan paralelas a las demás células que forman el epitelio. Presentan el citoplasma más electrón denso que las células de sostén adyacentes. La superficie luminal presenta microvellosidades. En el citoplasma puede observarse las típicas organelas: mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático liso y rugoso. También hemos observado la presencia de gránulos de secreción que en su interior tiene un material homogéneo finamente granulado (Fig. 3.59), similar a los gránulos de secreción de las células glandulares tipo I.

e) LAMINA PROPIA

Incluimos dentro de la lámina propia los paquetes nerviosos, las glándulas de Bowman y vasos sanguíneos.

NERVIOS OLFATORIOS

Los procesos proximales de las neuronas olfatorias se reúnen para formar los paquetes de nervios olfatorios amielínicos en la lámina propia. La estructura de estos nervios olfatorios y las características citológicas de las células de Schwann que los envuelven difieren de las que podemos encontrar en otros nervios amielínicos periféricos. Las células de Schwann recuerdan a astrocitos. Presentan el citoplasma relativamente claro a los electrones y presentan gran cantidad de mitocondrias (Fig. 3.60A). La forma del núcleo varía de esférica a arriñonada. El carioplasma es claro a los electrones -rico en eucromatina- y es frecuente hallar grumos de heterocromatina asociada a la membrana nuclear (Fig. 3.60A). Las células de Schwann envían procesos citoplasmáticos que envuelven a grupos de axones, lo cual permite el contacto entre los axones -de forma similar a lo que ocurre durante las etapas del desarrollo de los nervios (Peters *et al.*, 1991). Los axones presentan un diámetro pequeño y el citoplasma contiene microtúbulos y mitocondrias. Rodeando a todo el paquete nervioso hemos hallado una delgada membrana basal y escasas fibras colágenas inmersas en una densa matriz extracelular (Fig. 3.60A, B).

GLANDULAS DE BOWMAN

El sistema de glándulas es confuso a nivel de ME, el escaso tejido conectivo no delimita correctamente al sistema glandular lo cual hace difícil la diferenciación entre los adenómeros. Aparentemente los acinos presentan dos tipos de células glandulares. Estos pueden estar formados por un único tipo celular o por ambos tipos celulares (Fig. 3.26).

Las células glandulares tipo I, son las más abundantes, presentan una apariencia mucosa caracterizada por la presencia de una gran cantidad de gránulos de secreción rodeados de membrana que contienen un material claro a los electrones, finamente granulado. Estas células, en general son cilíndricas presentando un enorme núcleo esférico basal, con abundante eucromatina y escasa heterocromatina en grumos periféricos (Fig. 3.61). Ocasionalmente se observa un nucléolo. El borde apical de la célula glandular presenta microvellosidades cortas. Las células se relacionan apicalmente por complejos de unión formados por *zonula occludens* y *zonula adherens* (Fig. 3.62A). No se observan desmosomas en estos complejos de unión. El citoplasma es electrón denso y presenta dos estadios aparentemente diferentes del ciclo secretor. El primer estadio, presenta gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático liso, mitocondrias y gránulos de secreción grandes (Fig. 3.62B). El segundo estadio presenta el citoplasma repleto de pequeñas vacuolas y menos cantidad de retículo liso que el primer estadio (Fig. 3.62C). Las vacuolas se halla íntimamente relacionadas con cisternas de retículo endoplasmático liso (Fig. 3.62C). En la región supranuclear se observa el aparato de Golgi, en general en estrecho contacto con vesículas de secreción pequeñas. Estas vesículas pequeñas aparentemente se fusionan a los gránulos secretorios más grandes que finalmente invaden todo el citoplasma celular (Fig. 3.62C). Los gránulos de secreción, como se indicó anteriormente, contienen un material claro, finamente granular y se hallan distribuidos en toda la célula glandular (Figs. 3.61, 3.62A, B). Estos gránulos presentan un tamaño variable y coalescen entre sí, especialmente en la región apical de la célula, donde van a ser liberados (Fig. 3.62D). La descarga de los gránulos al lumen, aparentemente ocurriría por medio del tipo de secreción merocrina compuesta. Este tipo de secreción consta de varias etapas: una

primera fusión o coalescencia de las vesículas secretorias entre sí, y una segunda etapa donde sólo las vesículas apicales en contacto con la membrana plasmática se fusionan a ella, por lo que se libera el producto de secreción de varias vesículas por un único punto de fusión (Fig. 3.62D).

En algunas células glandulares se ha observado, en el borde apical, grandes evaginaciones circulares que presentan en su interior un gran desarrollo de retículo endoplasmático liso (Fig. 3.62A). Estas estructuras son muy similares a las protrusiones de las células de sostén halladas en la región apical del epitelio (Fig. 3.49). Estas evaginaciones se expanden hasta formar una estructura similar a un globo que permanece adherida al citoplasma apical por medio de un pedicelo corto (Fig. 3.62A). No hemos observado vesículas de secreción en su interior. Debido a su ultraestructura podríamos inferir que se trata de un tipo de secreción apocrina de diferentes características y secreción que la merocrina.

Las células glandulares tipo II son de apariencia serosa. Se caracterizan por la presencia de gránulos fuertemente electrón densos. Estas son células cilíndricas altas (Fig. 3.63). Presentan un núcleo basal que puede ser redondo o presentar indentaciones. Generalmente presentan eucromatina dispersa en todo el núcleo y heterocromatina asociada con la membrana nuclear. El borde apical de las células tiene gran cantidad de microvellosidades cortas y se relacionan con otras células glandulares por los típicos complejos de unión formados por *zonula occludens*, *zonula adherens* y desmosomas (Fig. 3.64B). En la región supranuclear es común observar el aparato de Golgi (Fig. 3.64A). El citoplasma es más claro que las tipo I. Presenta algunas mitocondrias y una enorme cantidad de retículo endoplasmático rugoso distribuido en toda la célula, presentando en la zona infranuclear una forma de espiral característica (Fig. 3.64A). Los gránulos, de forma esférica, se distribuyen en el citoplasma supranuclear. Presentan diferente densidad a los electrones, que va desde moderada a fuertemente electrón densa (la electrón densidad no se relaciona con el tamaño de los gránulos) (Fig. 3.64A). No se observó la secreción de estos gránulos.

En el caso de cortes transversales de este tipo celular, el lumen es pequeño (Fig. 3.63). En cambio, los acinos formados por varios tipos celulares presentan un lumen más amplio, en los cuales es común observar secreción (Fig. 3.26).

Es frecuente observar en algunos acinos un tercer tipo celular. Este último tipo celular, tal vez, podría considerarse como un estadio no funcional, un estadio pre-secretorio o post-secretorio de las células que presentan gránulos oscuros. Estas células presentan forma cilíndrica (Fig. 3.65). El núcleo es redondo con eucromatina dispersa en todo el carioplasma y heterocromatina asociada a la membrana nuclear. El citoplasma es más claro a los electrones que las células tipo mucosas. El citoplasma supranuclear presenta algunas mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso (Fig. 3.66). Es rara la presencia de gránulos, pero si se los observa, éstos presentan tamaño pequeño. En cambio, la porción infranuclear presenta una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso que se dispone llamativamente en forma de espiral (similar a las tipo II) (Fig. 3.66). El borde apical posee escasas microvellosidades cortas y entre las células es común observar los complejos de unión formados por *zonula occludens*, *zonula adherens* y desmosomas (Fig. 3.65).

Al MO hemos descripto la posible presencia de células mioepiteliales. Sin embargo, el análisis de los adenómeros a nivel ultraestructural no ha revelado la presencia de las mismas. En algunas ocasiones células planas con descripción similar a que las típicas células mioepiteliales fueron observadas en relación con los adenómeros. Estas células carecen de filamentos o vesículas pinocíticas -características de las células mioepiteliales-. En su citoplasma se observa retículo endoplasmático liso, mitocondrias y algunos gránulos de secreción (Fig. 3.63, 3.64). Lo que indicaría que se tratan de células de reposición.

3.5.2- ESTUDIOS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *Dasypus hybridus*.

Los estudios de ME comprobaron el carácter pseudoestratificado del epitelio olfatorio. Se observan las tres poblaciones celulares que se diferencian a nivel de MO (a) células de sostén, b) neuronas y c) células basales, pero se observan, además, los procesos celulares que toman contacto con la membrana basal. Los grupos celulares característicos pueden observarse interrumpidos por la presencia de conductos de las

glándulas de Bowman. En el borde apical se distinguen microvellosidades, protrusiones y las vesículas olfatorias con cilias (Fig. 3.67).

a) CELULAS DE SOSTEN

Las células de sostén son células altas, columnares que se extienden desde la superficie hasta la membrana basal del epitelio. La mayor cantidad de citoplasma y el núcleo se hallan formando la llamada capa de células de sostén (Fig. 3.67). Procesos laminares o prolongaciones basales se extienden entre las neuronas y llegan a la membrana basal (Fig. 3.71).

La mayoría de las células presentan en su superficie libre sólo microvellosidades largas (Fig. 3.67, 3.68A). No se observó glicocáliz desarrollado ni endoesqueleto microfibrilar. Entre estas microvellosidades también se observan pequeñas invaginaciones pinocíticas recubiertas (Fig. 3.68B). Otras células presentan, además de microvellosidades, protrusiones que invaden el lumen de la cavidad nasal. En el interior de estas protrusiones se observa gran cantidad de retículo endoplasmático liso, algunas mitocondrias y pequeñas vesículas.

En las células que poseen sólo microvellosidades, es común hallar barras terminales constituidas por paquetes de filamentos intermedios que corren paralelos a la superficie celular a nivel de las *zónulas occludens* (Fig. 3.64A). La presencia de estos filamentos cerca de la superficie crea una zona libre de organelas, en la cual se hallan algunas vesículas pequeñas.

La relación entre estas células y las dendritas apicales de las neuronas y entre dos células de sostén está dada por complejos de unión. Estos están compuestos por *zonula occludens* y *zonula adherens* (Fig. 3.70B). No se observan desmosomas.

El núcleo, de forma oval, se ubica perpendicular a la membrana basal del epitelio. Se caracteriza por tener una elevada concentración de eucromatina y algunos grumos grandes de heterocromatina asociados con la membrana nuclear (Fig. 3.67).

El citoplasma perinuclear presenta gran cantidad de mitocondrias tubulares, retículo endoplasmático rugoso, paquetes de filamentos intermedios, retículo

endoplasmático liso -sin una ordenación aparente- y algunos cuerpos multivesiculares (Fig. 3.68C). El citoplasma supranuclear presenta una ordenación muy particular de las cisternas de retículo rugoso. Las cisternas se ubican paralelas entre sí, a su vez el conjunto de cisternas se dispone en forma paralela al eje principal de la célula, inmediatamente por encima del núcleo (Fig. 3.67). Los procesos citoplasmáticos que se dirigen hacia la membrana basal presentan mitocondrias, paquetes de filamentos intermedios, gránulos de lipofucsina y espacios claros que podrían estar ocupados por lípidos extraídos durante el procesamiento de la muestras (Fig. 3.71).

La relación, tanto con otras células de sostén como con las neuronas, se produce por simple aposición de membrana (Fig. 3.69) (a excepción de la zona apical, como se explicó anteriormente).

b) NEURONAS OLFATORIAS

Las neuronas olfatorias presentan la típica forma fusiforme de las neuronas bipolares. El pericarion se ubica en el tercio medial del epitelio, aunque es frecuente hallar cuerpos neuronales cerca de la membrana basal. El citoplasma supranuclear presenta retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, gránulos de lipofucsina, aparato de Golgi y cuerpos multivesiculares (Fig. 3.69). El núcleo es de forma esférica y generalmente presenta uno o dos grandes grumos de heterocromatina en el centro del mismo (Fig. 3.69). El nucléolo puede estar asociado a un grumo heterocromatínico (Fig. 3.69). El citoplasma infranuclear presenta cisternas de retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres y mitocondrias (Fig. 3.69).

La dendrita apical presenta gran cantidad de microtúbulos, mitocondrias y pequeñas vesículas (Fig. 3.70B). En su extremo distal se constriñe para formar un cuello delgado antes de incrementar su diámetro para formar una estructura redondeada -vesícula olfatoria o knob dendrítico- que se proyecta sobre el epitelio (Fig. 3.70A). En este nivel se pueden observar complejos de unión entre las neuronas olfatorias y las células de sostén, los que están constituidos por *zonula occludens* y *zonula adherens*, pero no se observan desmosomas (Fig. 3.70B). La vesícula olfatoria presenta

mitocondrias tubulares, pequeñas vesículas y neurofilamentos que se orientan en forma paralela al eje principal de la célula (Fig. 3.70B). En la zona de constricción observamos una llamativa concentración de mitocondrias tubulares dispuestas en posición longitudinal al eje principal de la dendrita (Fig. 3.70A). La vesícula olfatoria presenta cilias, que se extienden en varias direcciones y se entremezclan con las microvellosidades de las células de sostén (Fig. 3.70A). Estas cilias de la región apical protruyen en ángulos agudos y en la región del cuello lo hacen ángulos rectos. Presentan la típica estructura de 9 + 2. En la base de cada cilia se observa un corpúsculo basal, pero no se observó la presencia de raicillas ciliares (Fig. 3.70A).

El extremo proximal de la neurona olfatoria se constriñe para formar el axón, cuyo citoplasma presenta microtúbulos y mitocondrias.

c) CELULAS BASALES

Las células basales se ubican sobre o cerca de la membrana basal del epitelio. Se diferencian dos tipos celulares: las células basales claras o globosas y las células basales planas u oscuras (Figs. 3.71, 3.72A).

CELULAS BASALES CLARAS

Se ubican sobre la capa de células basales oscuras. Presentan un aspecto ligeramente redondeado. El citoplasma posee escasas organelas. Entre ellas hallamos gran cantidad de ribosomas libres y mitocondrias. El núcleo es muy eucromático, pero es frecuente hallar algunos grumos heterocromáticos dispersos en el carioplasma (Fig. 3.71).

CELULAS BASALES OSCURAS

Son células aplanadas ubicadas sobre la membrana basal del epitelio olfatorio. El núcleo tiene forma oval, y su eje principal se ubica paralelo a la membrana basal. Presenta heterocromatina distribuida en todo el carioplasma y algunos grumos de heterocromatina ubicados tanto en la periferia como en el interior del núcleo. Es frecuente la presencia de nucléolo (Fig. 3.72A). El citoplasma presenta mitocondrias, cuerpos multivesiculares, retículo endoplasmático liso y un aparato de Golgi no muy desarrollado. Además, es común observar la presencia de paquetes de filamentos intermedios y al menos un centriolo por célula (Fig. 3.72B). Estas células se relacionan generalmente con los axones olfatorios.

DUCTOS DE LAS GLÁNDULAS DE BOWMAN

Las glándulas de Bowman descargan su secreción por medio de ductos que atraviesan el epitelio olfatorio. Estos ductos están limitados por células ductales, que son elongadas en sentido perpendicular a la membrana basal. Estas células presentan un citoplasma más electrón denso que el de las células de sostén, y en su superficie luminal poseen microvellosidades cortas (Fig. 3.73A). En la zona de contacto entre estas células y las de sostén se observan desmosomas (Fig. 3.73B). El citoplasma tiene gran cantidad de mitocondrias, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi cuerpos multivesiculares y algunos gránulos de secreción. Estos gránulos contienen un material finamente puntillado, muy similar al hallado en las células glandulares tipo I (Fig. 3.73A). Estos gránulos coalescen entre sí, lo cual podría estar indicando un tipo de secreción merocrina compuesta, tal como ocurre con las células acinares. Cabe señalar que en este caso no hemos observado la descarga de estos gránulos al lumen. En el interior del conducto se observa un material de apariencia similar al contenido de los gránulos (Figs. 3.73A, B).

d) LAMINA PROPIA

La lámina propia contiene paquetes nerviosos, las glándulas de Bowman y los vasos sanguíneos.

NERVIOS OLFATORIOS

Los axones de las neuronas olfatorias atraviesan la membrana basal y llegan a la lámina propia para formar, junto con las células de Schwann, los paquetes de nervios olfatorios. De la misma forma que lo hemos descrito para *Chaetophractus villosus* las células de Schwann envían procesos citoplasmáticos que rodean a grupos de axones, que permanecen en contacto entre sí (Fig. 3.74A, B). El resto de los caracteres ultraestructurales son similares a los descritos en *Chaetophractus villosus*.

GLANDULAS DE BOWMAN

En *Dasypus hybridus* las glándulas de Bowman presentan un sistema glandular muy heterogéneo debido a que las células glandulares presentan formas muy variadas y a que estas células no delimitan en forma regular al adenómero, como se observó en el estudio de las secciones semifinas. Aparentemente se diferencian dos tipos de poblaciones de células glandulares. El primero se caracteriza por la presencia de gránulos claros -apariencia mucosa- y el segundo por su contenido de gránulos electrón densos -apariencia serosa (Fig. 3.75).

Los acinos pueden presentar un único tipo celular o ser mixtos. Los adenómeros en los cuales se observan sólo células tipo I y los mixtos presentan un lumen amplio (Fig. 3.76). En cambio, los adenómeros en los cuales se observan solamente células tipo II el lumen es estrecho (Fig. 3.82).

Las células de apariencia mucosa o tipo I, como se describió en las secciones semifinas presentan formas muy variadas y se caracterizan por la presencia de enormes gránulos de secreción rodeados de membrana que contienen un material heterogéneo que puede variar de finamente puntillado a un puntillado grueso (Figs 3.76, 3.77). Estas células tienen un núcleo esférico basal -aunque también es común que presente indentaciones-, con abundante eucromatina y heterocromatina periférica (Figs. 3.76, 3.78). Generalmente se observa el nucléolo. El borde apical posee microvellosidades cortas y un complejo de unión formado por *zonula occludens* y *zonula adherens* (Fig. 3.77). El citoplasma presenta un gran desarrollo del retículo endoplasmático liso, abundantes gránulos de lipofucsina, mitocondrias y un aparato de Golgi muy desarrollado, generalmente relacionado con vesículas de secreción pequeñas (Fig. 3.78, 3.80). Los gránulos secretorios grandes -que raramente se distribuyen basales al núcleo- coalescen entre sí. La descarga de este material secretorio ocurriría aparentemente a través del mecanismo de secreción merocrino compuesto (Fig. 3.79) (como se explicó para *C. villosus*). El material que contiene estos gránulos invade el lumen del adenómero. No se han observado las protrusiones del tipo apocrina que se observaron en *C. villosus*. Rodeando a este tipo de adenómero se encuentran células mioepiteliales (Fig. 3.81A). Estas células presentan forma alargada. Se caracterizan por la presencia de áreas de citoplasma repletas de miofilamentos, que se disponen en forma paralela al eje mayor de la célula. El citoplasma contiene, además, retículo endoplasmático liso, mitocondrias, aparato de Golgi y a veces puede observarse la presencia de un centriolo (Fig. 3.81B). No se observaron vesículas de pinocitosis.

Las células de apariencia serosa o tipo II presenta gránulos electrón densos (Fig. 3.82). Estas células tienen forma piramidal y núcleo esférico -aunque puede presentar indentaciones-. La cromatina puede, en algunos casos, presentar grumos de heterocromatina o simplemente la eucromatina se distribuye homogéneamente en todo el núcleo (Fig. 3.83). Lateralmente se observan espacios intercelulares con microvellosidades (Fig. 3.83). La región apical presenta escasas microvellosidades cortas (Figs. 3.82, 3.83). En la superficie luminal observamos los típicos complejos de unión formados por *zonula occludens*, *zonula adherens* y desmosomas (Fig. 3.83).

El citoplasma contiene una enorme cantidad de cisternas de retículo endoplasmático rugoso -ordenadas en forma paralela-, mitocondrias y cisternas del

aparato Golgi. Característicamente el citoplasma apical presenta una enorme cantidad de gránulos no anastomosados con material homogéneo intensamente electrón densos (Fig. 3.83). Estos gránulos presentan diferencias en cuanto a la densidad a los electrones, pero estas variaciones de densidad a los electrones no se relacionan con el tamaño de los gránulos. No se observó la secreción de los mismos.

La superficie externa de los adenómeros presenta una delgada membrana basal y por debajo una escasa cantidad de fibras colágenas, que separan al adenómero de los otros componentes de la lámina propia (Fig. 3.83).

Al MO hemos descripto la posible presencia de células mioepiteliales. Sin embargo, el análisis de los adenómeros a nivel ultraestructural no ha revelado la presencia de las mismas. En algunas ocasiones células planas con descripción similar a que las típicas células mioepiteliales fueron observadas en relación con los adenómeros. Estas células carecen de filamentos o vesículas pinocíticas -características de las células mioepiteliales-

. En su citoplasma se observa retículo endoplasmático liso, mitocondrias y algunos gránulos de secreción. Lo que indicaría que se tratan de células de reposición.

FIGURA 3.47. Fotomicrografía electrónica que muestra la región apical del epitelio olfatorio de *Chaetophractus villosus*. Las células forman un epitelio pseudoestratificado. El borde apical en contacto con la cavidad nasal presenta microvellosidades y vesículas olfatorias (k). Se diferencian las células de sostén claras (CS) intercaladas con algunas células de sostén oscuras (CSO). Estas últimas presentan procesos de citoplasma electrón denso (*), que se aprecian entre las neuronas olfatorias (N). Los procesos proximales de las neuronas -dendritas (D)- presentan un citoplasma claro con gran cantidad de mitocondrias (2.700x).

FIGURA 3.48. Fotomicrografía electrónica que muestra la región basal del epitelio olfatorio de *Chaetophractus villosus*. Las neuronas olfatorias (N) presentan un enorme núcleo (n) esférico con un grumo heterocromático (h) asociado al nucleólo (u). Los procesos de las células de sostén clara (CS) -con citoplasma claro y gran cantidad de mitocondrias- se intercalan con algunos procesos citoplasmáticos de las células de sostén oscuras (*). Las células basales claras o globosas (Cb) - con citoplasma claro a los electrones- se encuentran sobre las células basales oscuras o planas (CO). Estas células presentan el citoplasma más denso a los electrones, núcleo con grumos heterocromáticos e interdigitaciones con la membrana basal de los procesos de las células basales claras (CS). La lámina propia presenta paquetes de nervios amielínicos (A), células de Schwann (SW) y células glandulares de las glándulas de Bowman (G). (3.360x).

FIGURA 3.49

A. Fotomicrografía electrónica de la región apical del epitelio olfatorio de *Chaetophractus villosus*. Las vesículas olfatorias (KO) se intercalan entre las protrusiones apicales (P) de las células de sostén (CS). El borde apical de las células de sostén presentan enormes protrusiones (P) entre las microvellosidades (m) (N) cavidad nasal. (5.800x).

B. Detalle de la protrusión del tipo apocrina de las células de sostén. En su interior se observa una enorme cantidad de retículo liso formando una trama (REL). También se observan algunas mitocondrias en su interior (mit).(m) microvellosidades. (15.100x).

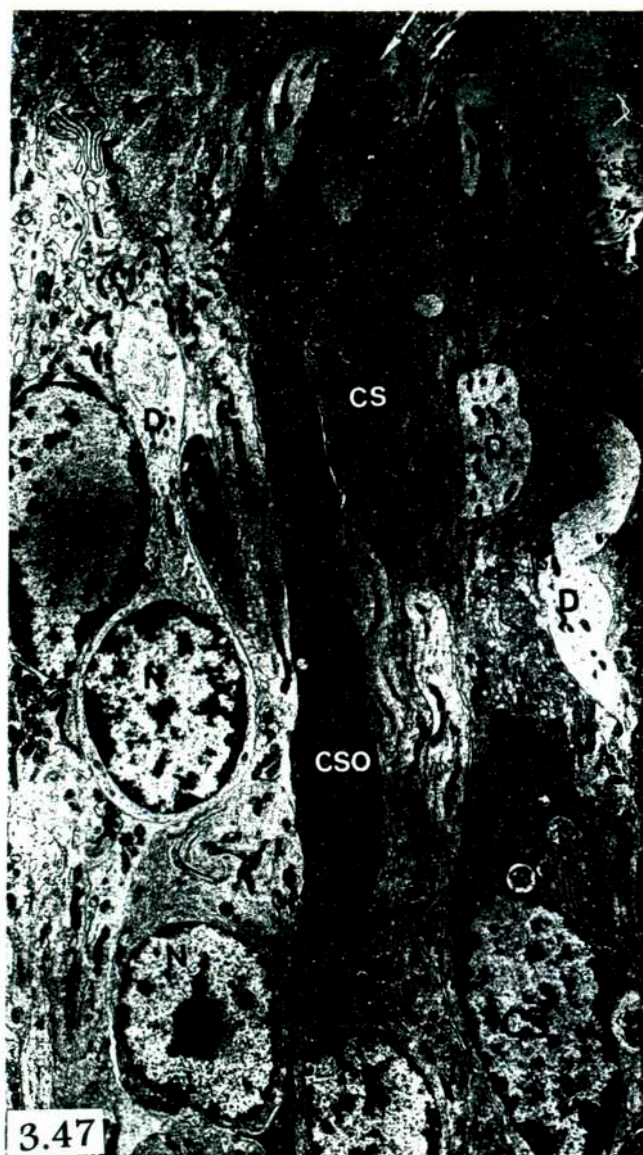


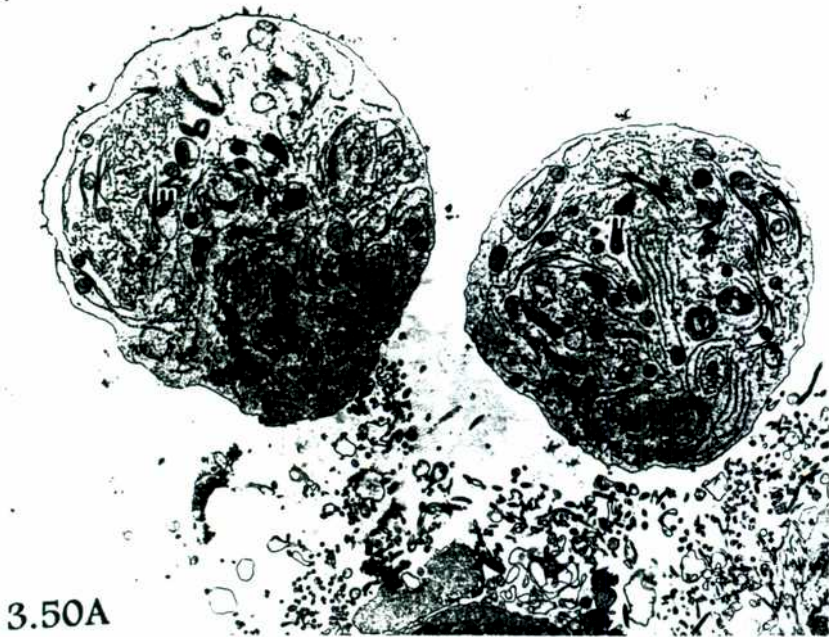
FIGURA 3.50

A. Fotomicrografía electrónica de las protrusiones apocrinas sueltas en la cavidad nasal de *Chaetophractus villosus*. En su interior se observa gran cantidad de retículo endoplasmático liso (rel) y mitocondrias (m). (6700x)

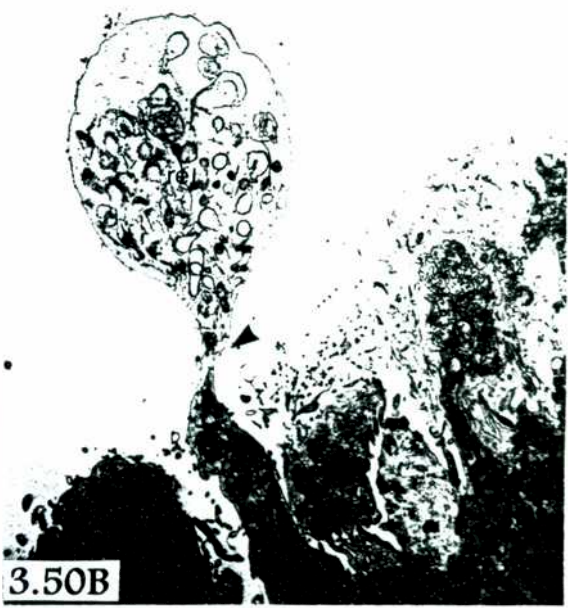
B. Fotomicrografía electrónica de una protrusión apocrina unida a la célula de sostén por un pedicelo (►). En su interior presenta gran cantidad de retículo endoplasmático liso (rel). (4000x).

FIGURA 3.51. Fotomicrografía electrónica de la capa de células de sostén de *Chaetophractus villosus*. Las células de sostén claras (CS) tienen un núcleo eucromático (nu) con escasos grumos heterocromáticos. Los procesos citoplasmáticos de estas células (CS) presentan gran cantidad de retículo endoplasmático liso (rel) y mitocondrias (m). Las células de sostén oscuras (CSO) poseen un núcleo (n) más denso a los electrones que el tipo celular anterior y el citoplasma -también denso a los electrones- presenta gran cantidad de mitocondrias (m). Entre las células de sostén pueden observarse algunas neuronas (N), cuyos procesos proximales -dendritas (D)- se ubica entre el citoplasma apical de las células de sostén. Las dendritas (D) presentan gran cantidad de microtúbulos (mt), mitocondrias (m) y cuerpos multivesiculares (mb). El núcleo de las neuronas es eucromático y puede presentar un gran grumo heterocromático central. (5.100x).

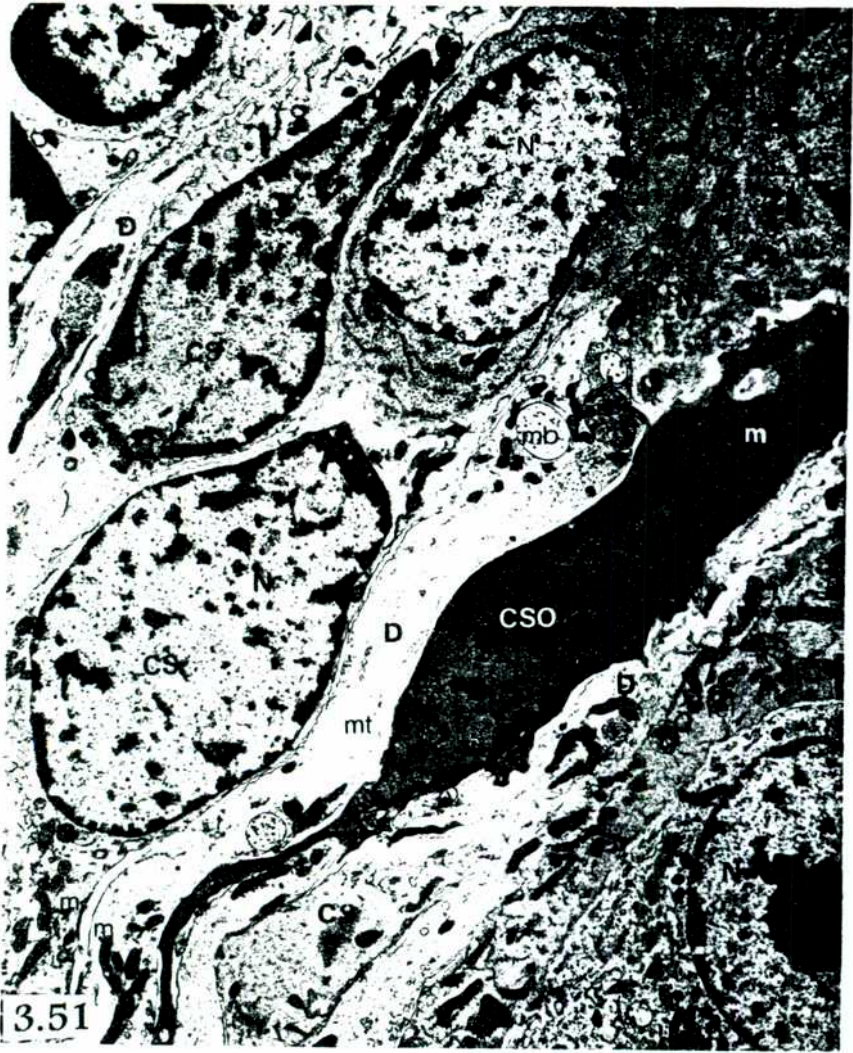
FIGURA 3.52. Fotomicrografía electrónica del citoplasma de los procesos basales de las células basales oscuras. En los cuales se observa gran cantidad de mitocondrias (M). Es frecuente observar, además, mitocondrias con doble membrana (►). Estos procesos también contienen autofagosomas (A) y lisosomas (L). El citoplasma, en general muy electrón denso, presenta zonas más claras (*) de aparente edematización celular o el lugar que pudo haber sido ocupado por lípidos, los cuales se perdieron durante el tratamiento de las muestras. (26.300x).



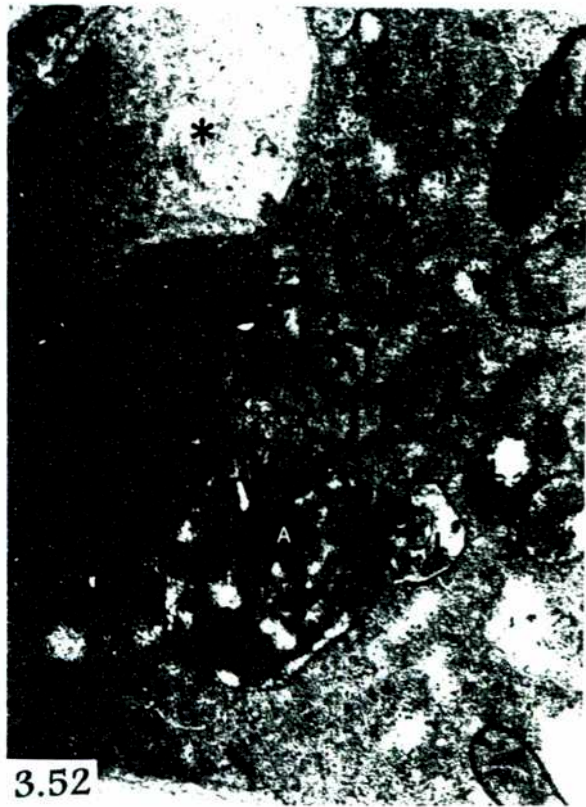
3.50A



3.50B



3.51



3.52

FIGURA 3.53. Fotomicrografía electrónica de las neuronas olfatorias de *Chaetophractus villosus*. El núcleo (N) presenta carioplasma claro a los electrones. En la mayoría de las neuronas se observa un enorme grumo heterocromatínico central (h), al cual se encuentra asociado el nucleólo (nu). El citoplasma supranuclear presenta gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (rer), retículo endoplasmático liso (rel), mitocondrias (mit), aparato de Golgi (g), cuerpos multivesiculares (mb). En la región apical de la célula se diferencia una dendrita apical (D). El citoplasma infranuclear presenta mitocondrias (mit), retículo endoplasmático rugoso (rer) y ribosomas libres (r). Entre las neuronas es común observar proceso citoplasmáticos de células de sostén (CS) con gran cantidad de retículo endoplasmático liso (rel) y mitocondrias (mit). (9.700x).

FIGURA 3.54.

A. Fotomicrografía electrónica de una vesícula olfatoria ciliada de *Chaetophractus villosus*. Las vesículas olfatorias se hallan inmersas entre las microvellosidades (mv). En el extremo libre se observa la presencia de una gran cantidad de vesículas (v) entre paquetes de microtúbulos (m). En la base de cada cilia se encuentra un corpúsculo basal (b) y raicillas ciliares (►). (17.250x).

B. Fotomicrografía electrónica de un corte transversal de una vesícula olfatoria. En el corte transversal se observa el típico axonema, constituido por dos microtúbulos centrales y nueve dobletes periféricos (1). En la base de cada cilia se observa un corpúsculo basal que en corte transversal presenta nueve tripletes dispuestos en forma de molino (2), debido a la presencia de pedículos basales (►). También se observa la relación con las células de sostén a través de *zónula occludens* (1) y *zónula adherens* (2) (42.000x).

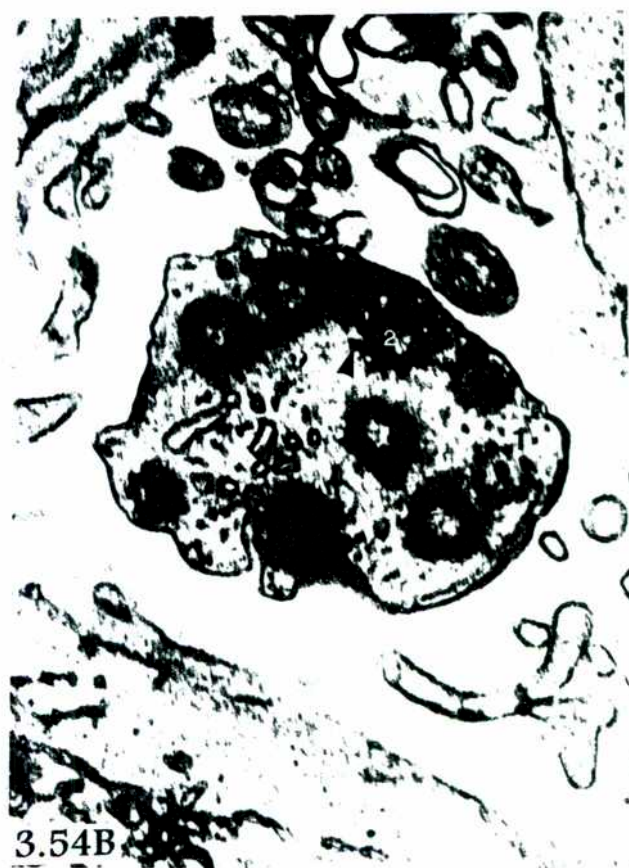


FIGURA 3.55. Fotomicrografía electrónica de la región basal del epitelio olfatorio de *Chaetophractus villosus*. La célula basal clara o globosa (CB) presenta el núcleo muy eucromático y el citoplasma claro a los electrones. La célula basal oscura (CBO) presenta el citoplasma muy electrón denso y el núcleo con grumos heterocromatinicos periféricos. El citoplasma de esta célula forma finos procesos (►) que se interdigitan con los procesos basales de las células de sostén claras (CS). No se observan interdigitaciones cuando las células basales oscuras (CBO) se relacionan con las células basales claras (CB). Es frecuente observar axones de las neuronas olfatorias en íntimo contacto con las células basales oscuras (8.800x).

FIGURA 3.56.

A. Fotomicrografía electrónica que muestra la asociación entre el citoplasma de la células basal oscura con los axones olfatorios (A) y las interdigitaciones citoplasmáticas con los procesos de las células de sostén (CS). Las células basales oscuras presentan un núcleo (nu) con grumos cromatinicos periféricos. En su citoplasma se hallan gran cantidad de filamentos intermedios (f) y mitocondrias (m). Estas células se relacionan con la membrana basal (mb). (13.000x).

B. Fotomicrografía electrónica que muestra la relación de la célula basal oscura (CBO) con la membrana basal (MB) a través de desmosomas (►). (15.000x).

FIGURA 3.57. Fotomicrografía electrónica de una célula basal oscura -plana- de *Chaetophractus villosus*. El núcleo (nu) presenta grumos heterocromatinicos. El citoplasma contiene gran cantidad de filamentos intermedios (f), mitocondrias (m), aparato de Golgi (g), cuerpos multivesiculares (mb). El citoplasma se interdigita al realcionarse con las células de sostén (CS) (►) (8.800x). El detalle inferior derecho muestra la membrana plasmática, en contacto con la membrana (mb), con numerosas vesículas de pinocitosis (➤) (14.400x).

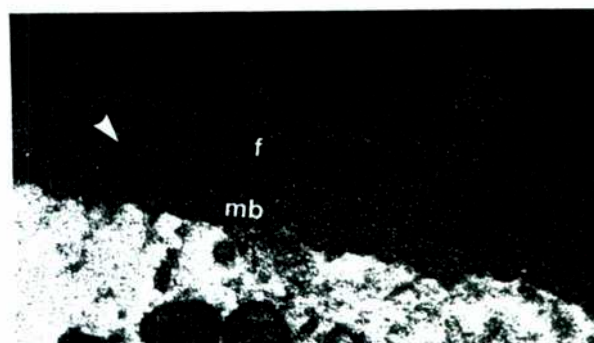
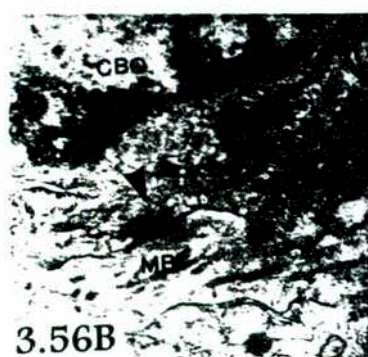
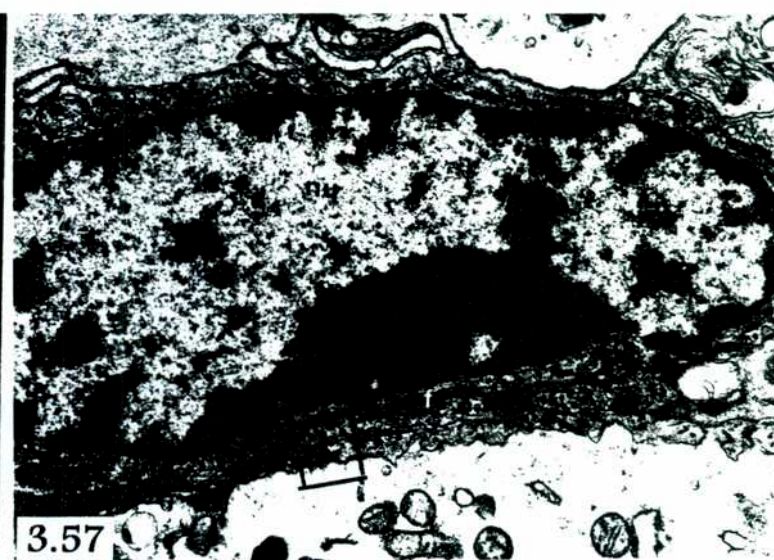
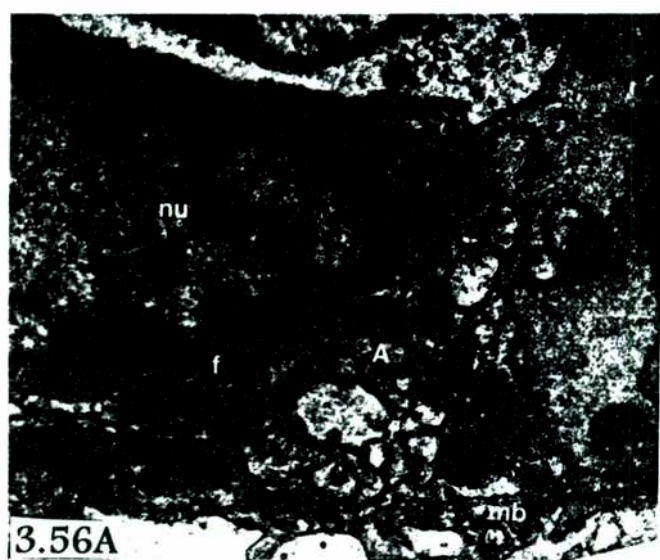


FIGURA 3.58.

A. Fotomicrografía electrónica que muestra la región basal del epitelio olfatorio de la mucosa olfatoria de *Chaetophractus villosus*. Las células basales claras (CS) presentan el núcleo eucromático (N) y el citoplasma presenta numerosos ribosomas (r) y mitocondrias (m). También se observan células basales claras en mitosis (1 y 2). En relación con las células basales claras se observan células basales oscuras (CBO), neuronas (NE) y procesos basales de células de sostén (CS). (5.000x)

B. Fotomicrografía electrónica de una célula basal clara -globosa- de *Chaetophractus villosus*. Presenta un aspecto redondeado y núcleo eucromático (nu). El citoplasma presenta escasas organelas sólo algunas mitocondrias (mit) y numerosos ribosomas libres (r). No presenta interdigitaciones citoplasmáticas al relacionarse con los procesos basales de las células de sostén (CS). (8.500x).

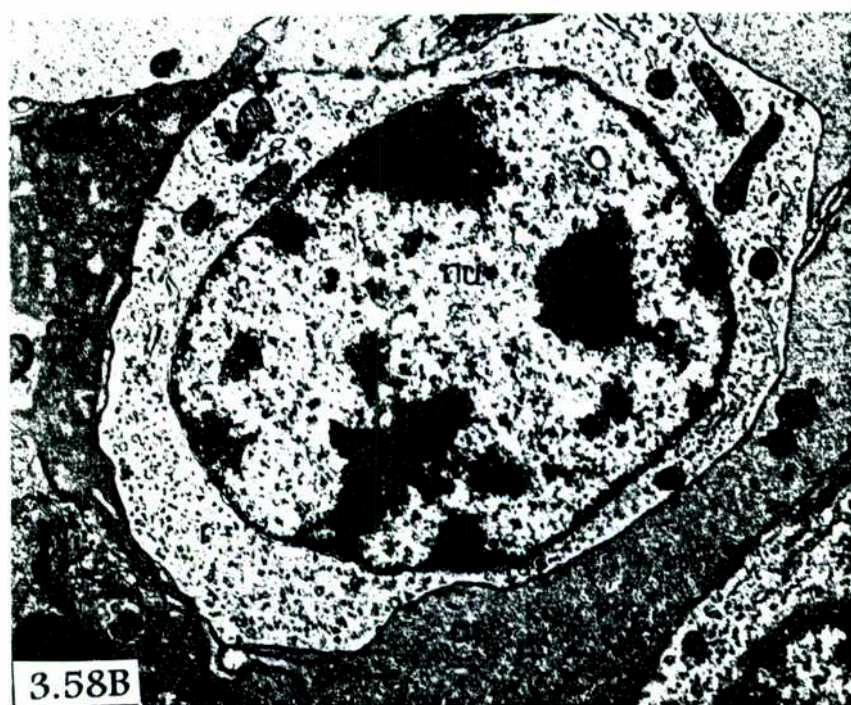


FIGURA 3.59. Fotomicrografía electrónica de una porción del ducto de las glándulas de Bowman. En la superficie lateral de la célula hay numerosas microvellosidades cortas (mv) en contacto con el lumen del conducto (L). El citoplasma de la célula ductal (CD) presenta retículo endoplasmático liso (rel, retículo endoplasmático rugoso (rer), mitocondrias (m) y filamentos intermedios (f). Lateralmente se encuentran células de sostén (CS). (13.600x)

FIGURA 3.60

A. Fotomicrografía electrónica de la célula de Schwann (SW) que rodea a los axones olfatorios (A). Presenta el citoplasma claro a los electrones con escasas organelas, algunas mitocondrias (m) y un aparato de Golgi (g). El núcleo es bastante eucromático (nu) y es frecuente hallar grumos heterocromáticos asociados a la membrana nuclear. Los axones olfatorios (A) se hallan en grupos divididos por procesos citoplasmáticos de las células de Schwann (s). (G) glándulas de Bowman (6.700x).

B. Fotomicrografía electrónica de un nervio olfatorio en el cual se observan los axones olfatorios (A) en estrecho contacto entre sí. En su interior se diferencian mitocondrias (m) y microtúbulos (►). Rodeando al grupo de axones se observa el citoplasma de la célula de Schwann (S) (30700x).

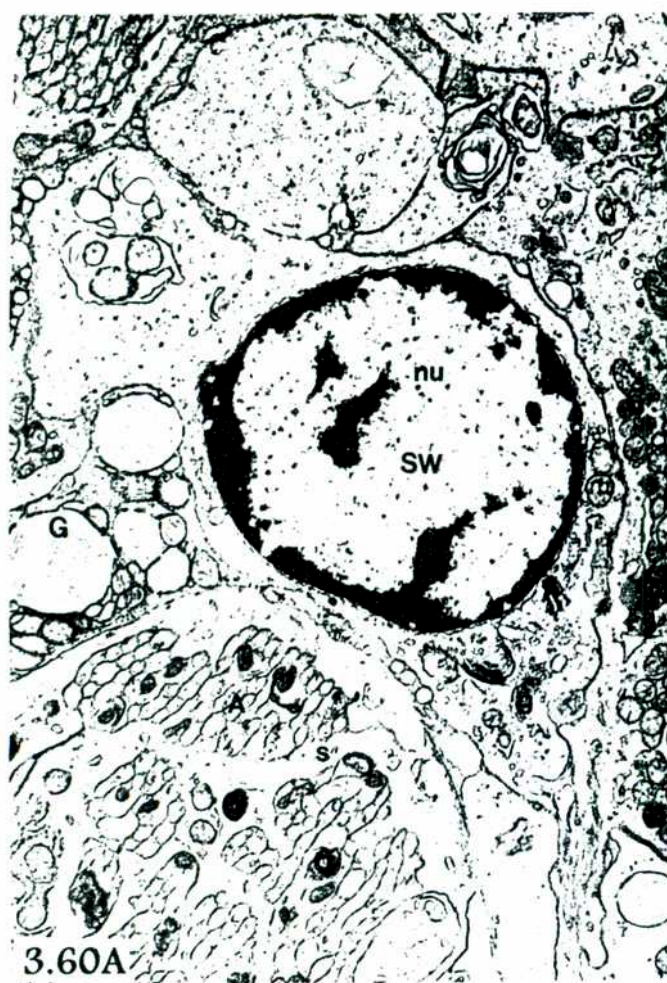
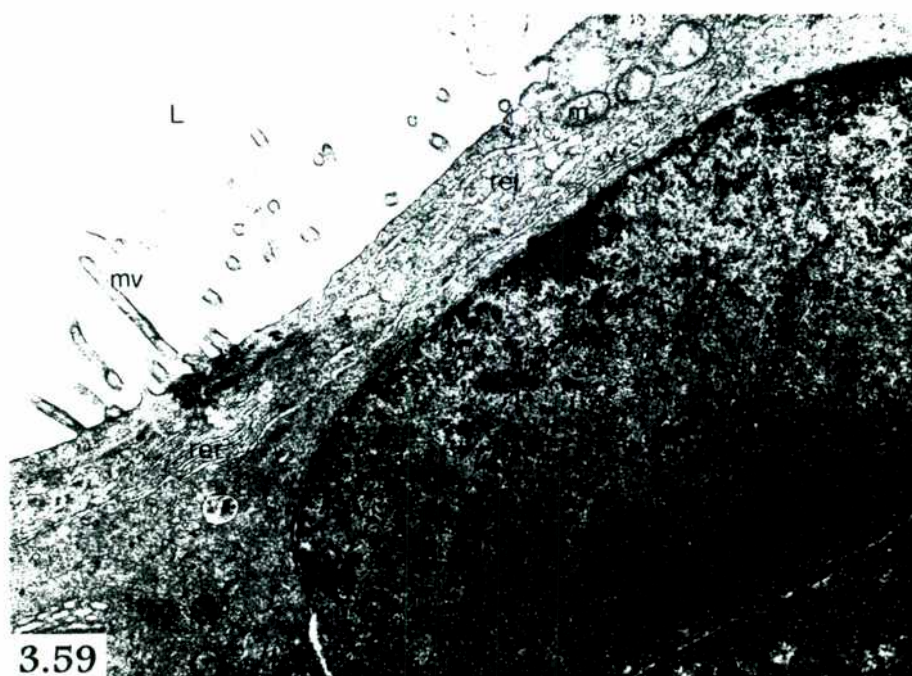


FIGURA 3.61 Fotomicrografía electrónica de una región de un acino con células tipo mucosas (Tipo I) de *Chaetophractus villosus*. Se observan las células cilíndricas acinares con núcleo basal esférico claro a los electrones (nu). En el citoplasma se observan numerosos gránulos tipo mucosos (G) . En la región apical en contacto con el lumen (L) se puede observar la enorme protrusión apocrina (P) (3.600x).

FIGURA 3.62

A. Fotomicrografía electrónica de la región apical de una célula glandular tipo I. En contacto con el lumen (L) - además de microvellosidades (mv)- se observa una protrusión apocrina, en cuyo interior se observan gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático liso (REL). El citoplasma apical también presenta numerosas cisternas de retículo endoplasmático liso (REL) y gránulos secretorios (G). La flecha (►) indica la presencia de complejos de unión apicales. (6.000x).

B. Fotomicrografía electrónica que muestra dos estadios aparentes del ciclo secretorio de las células tipo I (A y B). En la célula A entre los gránulos de secreción (g) se observa una gran cantidad cisternas de retículo endoplasmático liso (REL) y mitocondrias (M). La célula B presenta el citoplasma repleto de pequeñas vacuolas (v). (15.800x)

C. Detalle del citoplasma de una celula glandular tipo I, que presenta gran cantidad de vacuolas (v) que se relacionan con el retículo endoplasmático liso (►). Luego, estas vacuolas pequeñas se fusionan a las vacuolas más grandes (*). (M) mitocondrias. (26.300x).

D. Fotomicrografía electrónica de la zona en contacto con el lumen (L) de las células glandulares tipo I, en la cual se señala (►) la zona del aparente vuelco de la secreción por el mecanismo de secreción merocrino compuesto. (REL) cisternas de retículo endoplasmático liso dilatadas, (G) gránulos de secreción, (M) mitocondrias. (7.000x).

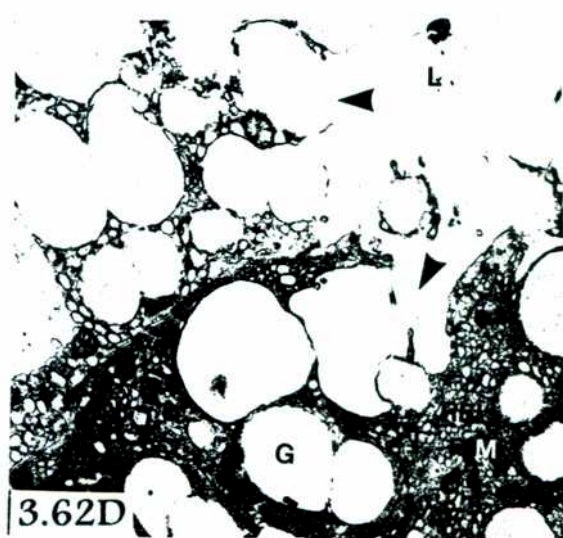
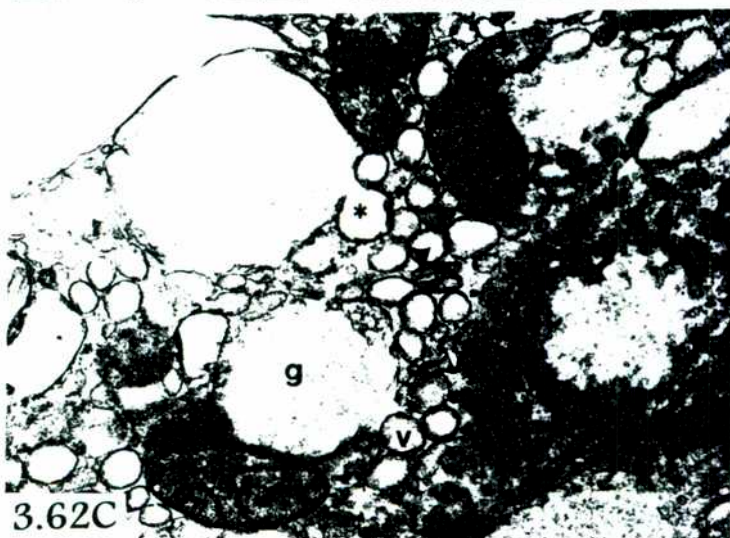
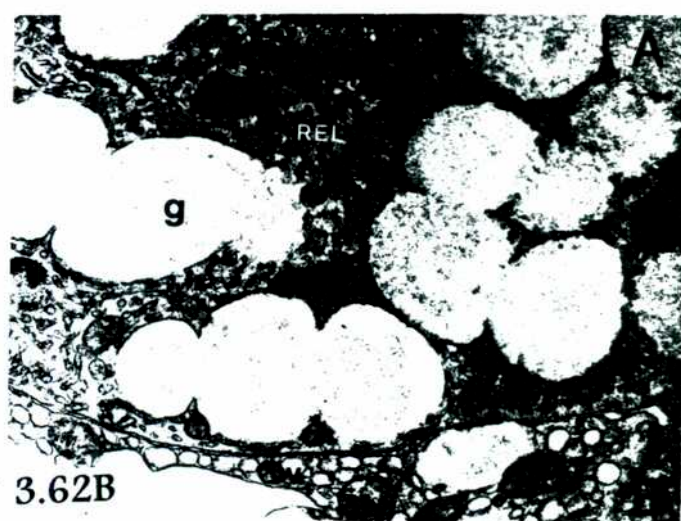
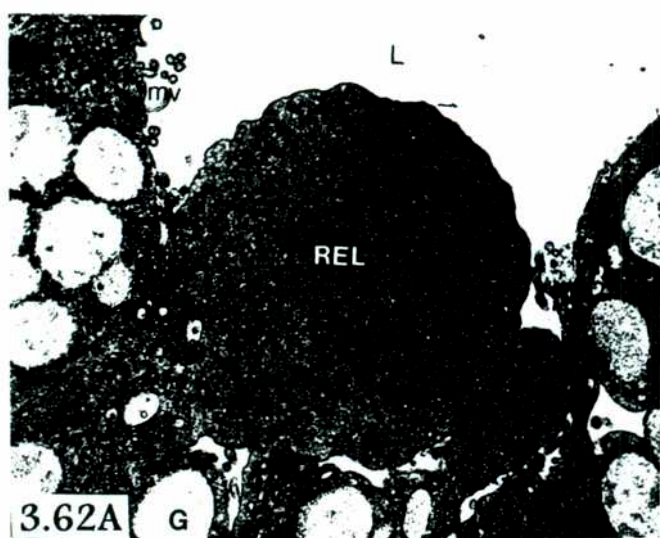
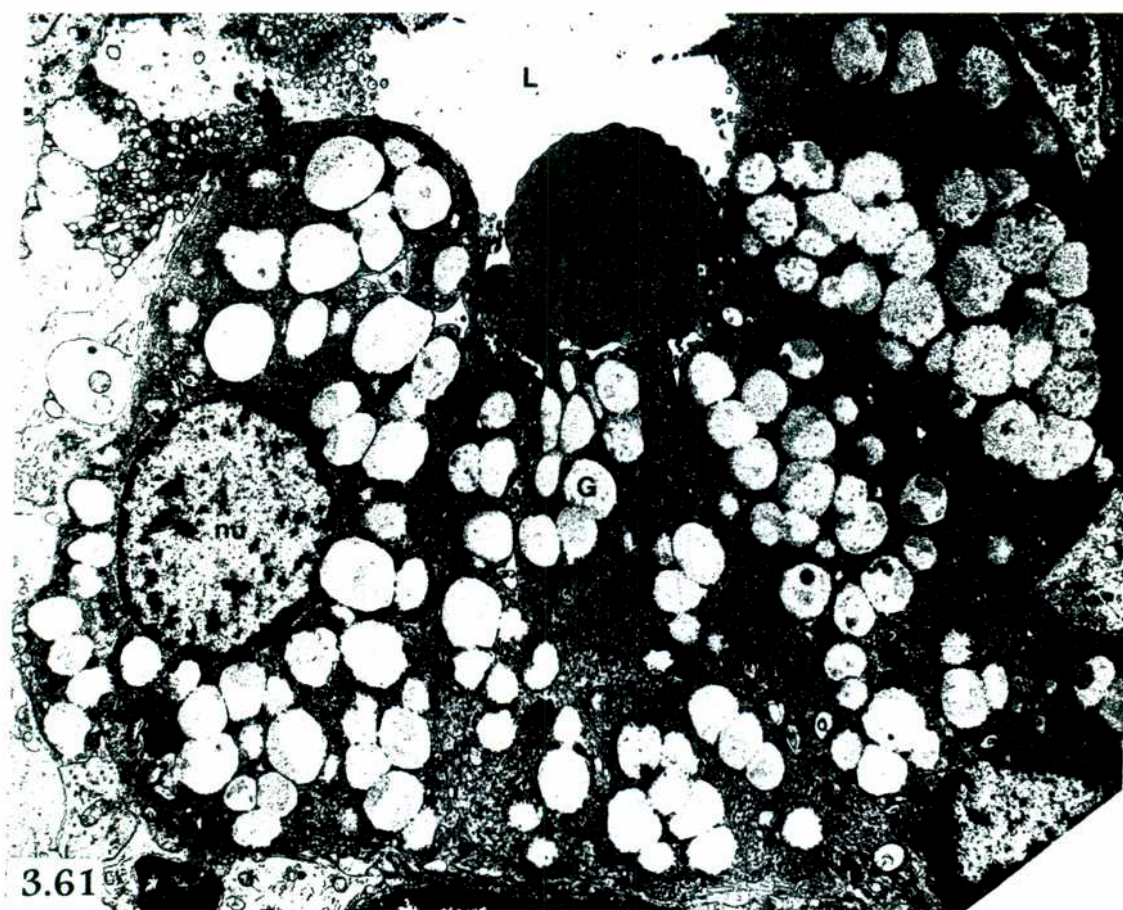


FIGURA 3.63 Fotomicrografía electrónica de un acino con células glandulares del tipo serosas (Tipo II) de *Chaetophractus villosus*. Las células acinares presentan un núcleo basal (N) con numerosos gránulos de secreción electrón densos (g). El lumen (L) es estrecho y presenta una abundante cantidad de microvellosidades (m). En la región basal del adenómero se observa una célula plana, cuyo citoplasma presenta características similares a las células acinares (2)

FIGURA 3.64.

A. Fotomicrografía electrónica de una célula glandular del tipo serosa. El núcleo (N), situado en la región basal- presenta grumos heterocromatinicos periféricos. El citoplasma en su región apical presenta gránulos de diferente densidad a los electrones (G). Posee, además, mitocondrias (M), retículo endoplasmático liso (REL), aparato de Golgi (g). En la región basolateral se aprecia el retículo endoplasmático rugoso (RER), que dispone en forma de espiral. (3.650x).

B. Detalle de la región apical de las células acinares. El lumen (L) se encuentra invadido por numerosas microvellosidades (v). En el borde apical de las células se aprecian los complejos de unión formados por: *zónula occludens* (1), *zónula adherens* (2), desmosomas (3). (8.000x).

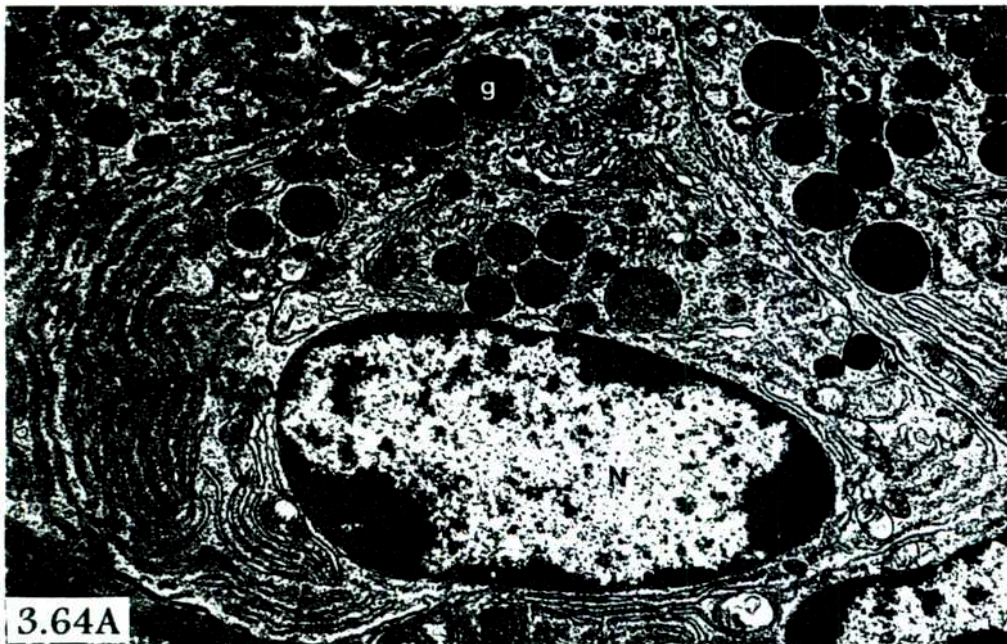
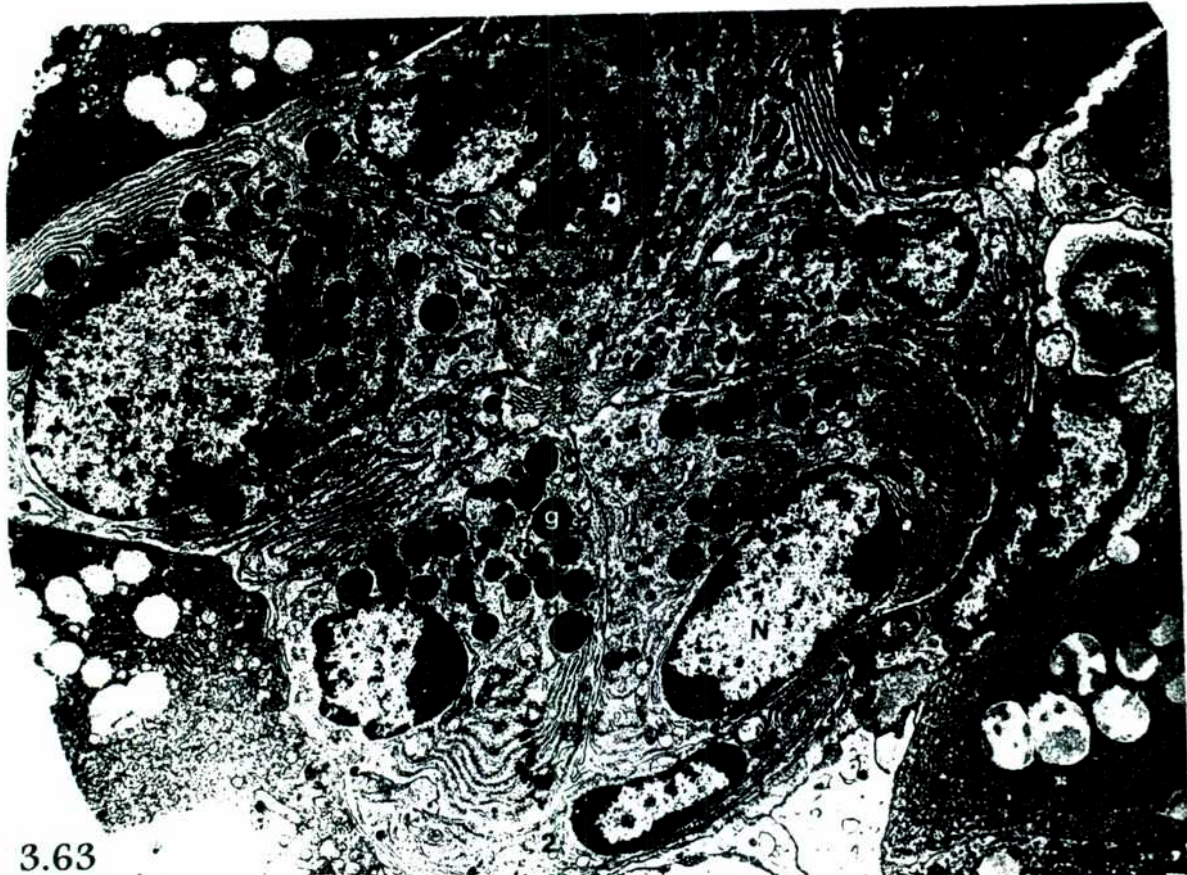


FIGURA 3.65. Fotomicrografía electrónica de una región de un acino en el cual se observan las células con escasos gránulos de secreción (Tipo III) de *Chaetophractus villosus*. El núcleo (nu) se encuentra en la región basal. La región apical que se encuentra en contacto con el lumen (L) presenta escasa microvellosidades. En la región apical se observan los complejos de unión (►). En la región basal se aprecia el retículo endoplasmático liso (re) que adopta forma de espiral. Rodeando al acino se observa una delgada membrana basal y fibras colágenas (C). (3.380x).

FIGURA 3.66. Fotomicrografía electrónica de una célula acinar del tipo III. El citoplasma presenta mitocondrias (m), escasos gránulos de secreción pequeños (g), complejo de Golgi (G). Es característica la disposición en espiral del retículo endoplasmático rugoso (RE) en la región basal. (nu) núcleo. (6.000x).

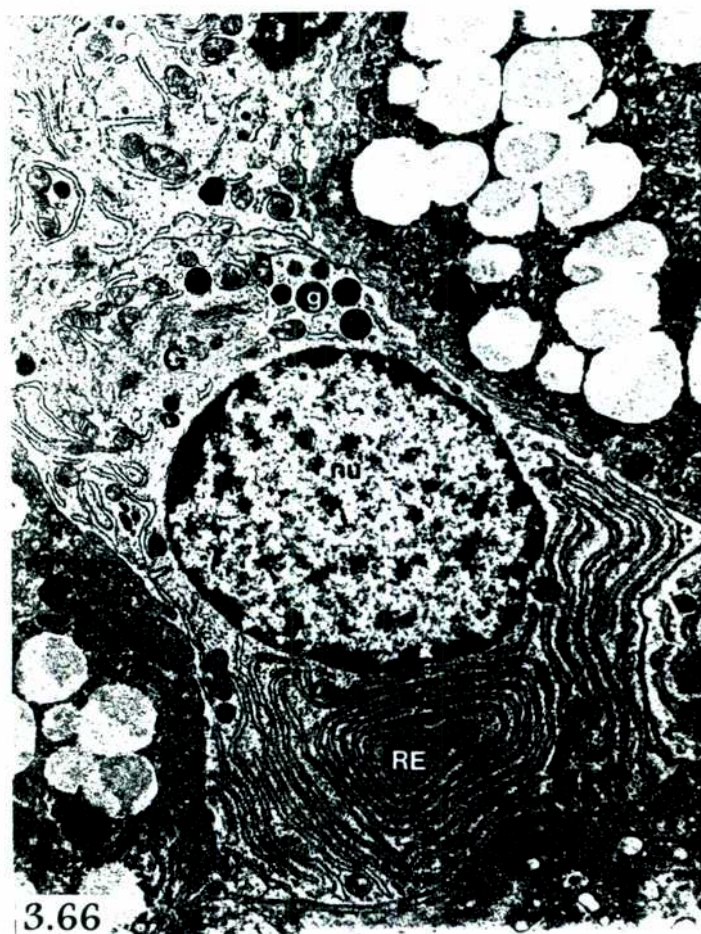


FIGURA 3.67. Fotomicrografía electrónica de la región apical del epitelio olfatorio de *Dasypus hybridus*. La superficie apical presenta una gran cantidad de microvellosidades (MV), entre las cuales se observan las vesículas olfatorias de las neuronas (k). El citoplasma apical de las células de sostén (CS) presenta una gran cantidad de retículo endoplasmático liso (rel) y mitocondrias (n). En la región supranuclear se encuentra una gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (re), ubicado en forma paralela al eje mayor de la célula. Entre las células de sostén es común observar las dendritas (D) de las neuronas olfatorias, las cuales presentan un citoplasma claro con una gran cantidad de mitocondrias tubulares ()

FIGURA 3.68.

A. Fotomicrografía electrónica del borde apical de la célula de sostén. El borde apical presenta un gran número de microvellosidades (MV), entre las cuales se observan algunas vesículas pinocíticas (►). Inmediatamente por debajo del borde apical se encuentra una zona que presenta una gran cantidad de tonofilamentos, formando la barra terminal (bt). Por debajo de la barra terminal se observan gran cantidad de mitocondrias (M) y cisternas de retículo endoplasmático liso (RE). (7.600x). El recuadro inferior muestra un detalle de las vesículas pinocíticas (►) que se encuentran entre las microvellosidades (22200x).

B. Fotomicrografía electrónica de un detalle del citoplasma apical de una célula de sostén donde se observan gran cantidad de mitocondrias tubulares (m) y cuerpos multivesiculares (mb). (32.300x).

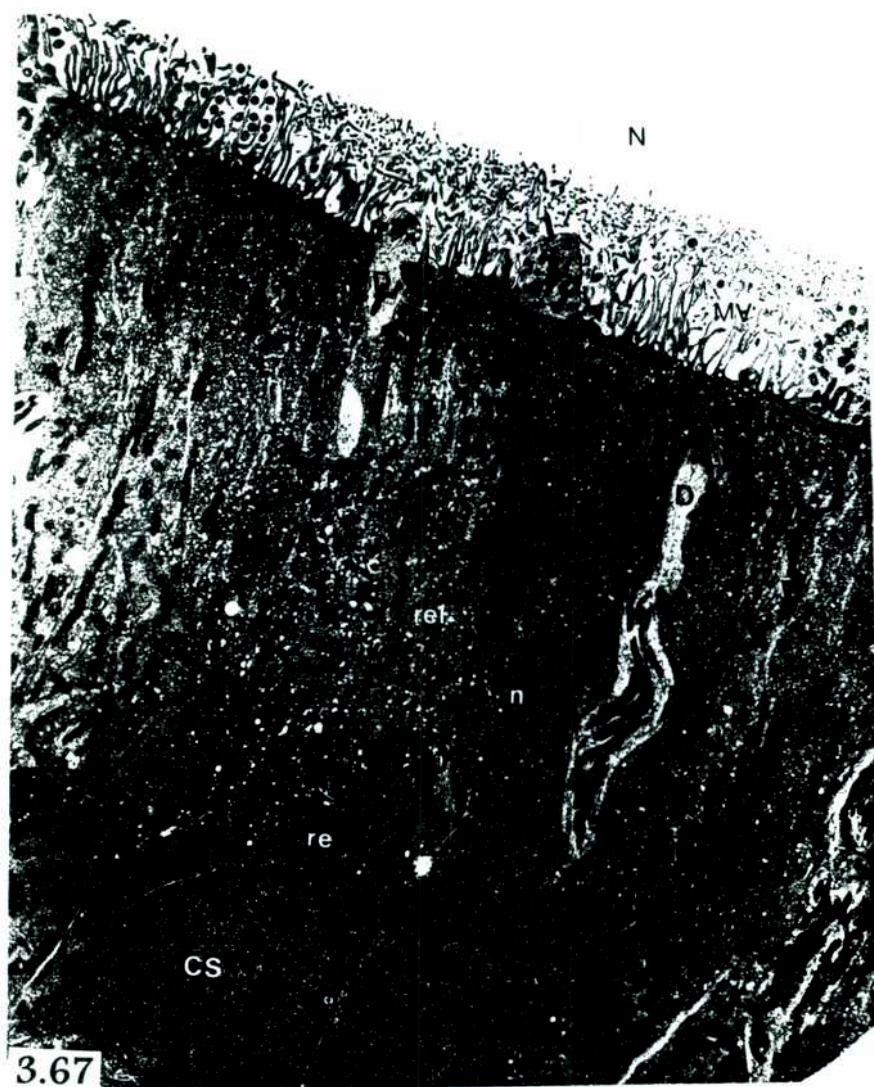


FIGURA 3.69. Fotomicrografía electrónica de neuronas olfatorias de *Dasypus hybridus*. El núcleo (N) presenta un carioplasma claro a los electrones. Es común observar un enorme grumo heterocromatínico (h) asociado al nucleólo (nu). El citoplasma supranuclear presenta gran cantidad de mitocondrias tubulares (m), retículo endoplasmático liso (RL), retículo endoplasmático rugoso (RE), cuerpos multivesiculares (mb) y gránulos de lipofucsina (lf). El citoplasma infranuclear presenta mitocondrias y gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso. (13.600x).

FIGURA 3.70.

A. Fotomicrografía electrónica de una vesícula olfatoria (k) en la cual se observan una gran número de cilias (c). En su interior hay una enorme cantidad de mitocondrias (m) y algunas vesículas (v). (MV) microvellosidades, (➤) zona de unión a las células olfatorias (CS), (b) corpúsculo basal (22.500x).

B. Fotomicrografía electrónica que muestra un detalle de la zona de unión entre una neurona olfatoria (N) y una célula de sostén (CS). La zona de unión está formada por *zónula occludens* (1) y *zónula adherens* (2). En la neurona (N) se observan mitocondrias (m), neurofilamentos (mt) y algunas vesículas (v). En la célula de sostén (CS) se observa una gran cantidad de retículo endoplasmático liso (rl). (74.500x).

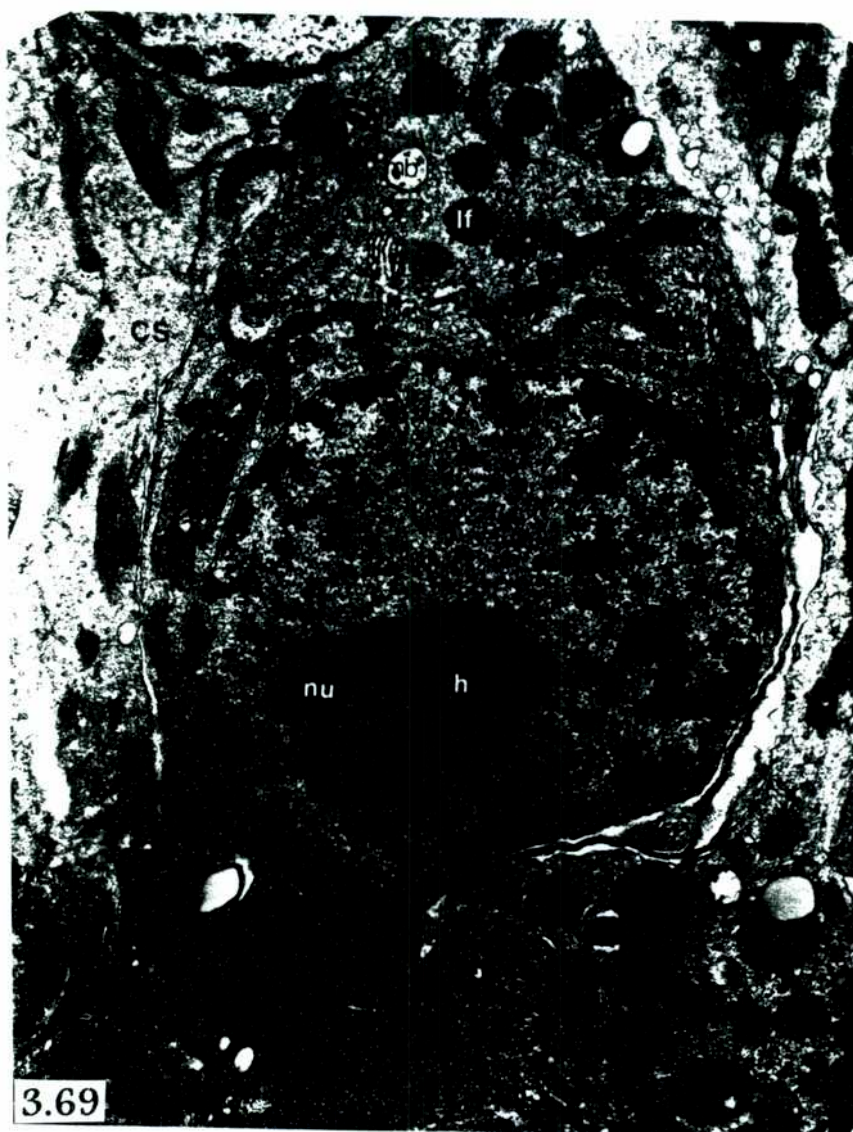


FIGURA 3.71. Fotomicrografía electrónica de una célula basal clara -globosa- de *Dasypus hybridus*. El núcleo es muy eucromático (N) y presenta escasos grumos heterocromáticos. El citoplasma presenta escasas organelas, sólo se observan algunas mitocondrias (m) y gran cantidad de ribosomas libres (R). En la región basal es común observar procesos citoplasmáticos de las células de sostén (CS) en los cuales se observa gran cantidad de gránulos de lipofucsina (lf) y espacios que pudieron haber estado ocupados por lípidos (d) (8.300x).

FIGURA 3.72.

A. Fotomicrografía electrónica de una célula basal oscura -plana- de *Dasypus hybridus*. El núcleo (N) tiene forma aplanada y es frecuente observar grumos heterocromáticos y un nucleólo central (nu). El citoplasma es denso a los electrones y presenta gran cantidad de filamentos intermedios (F). En la superficie nasal se observan interdigitaciones del citoplasma con la membrana basal (M). (12.800x).

B. Fotomicrografía electrónica que muestra una región de una célula basal oscura en cuyo citoplasma se observa la presencia de centriolo (C). (F) filamentos intermedios. (8.700x)

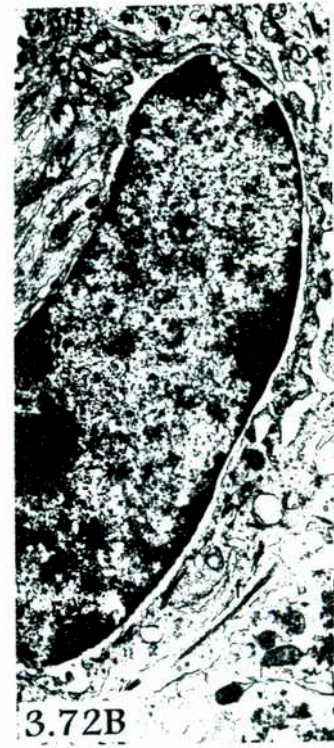
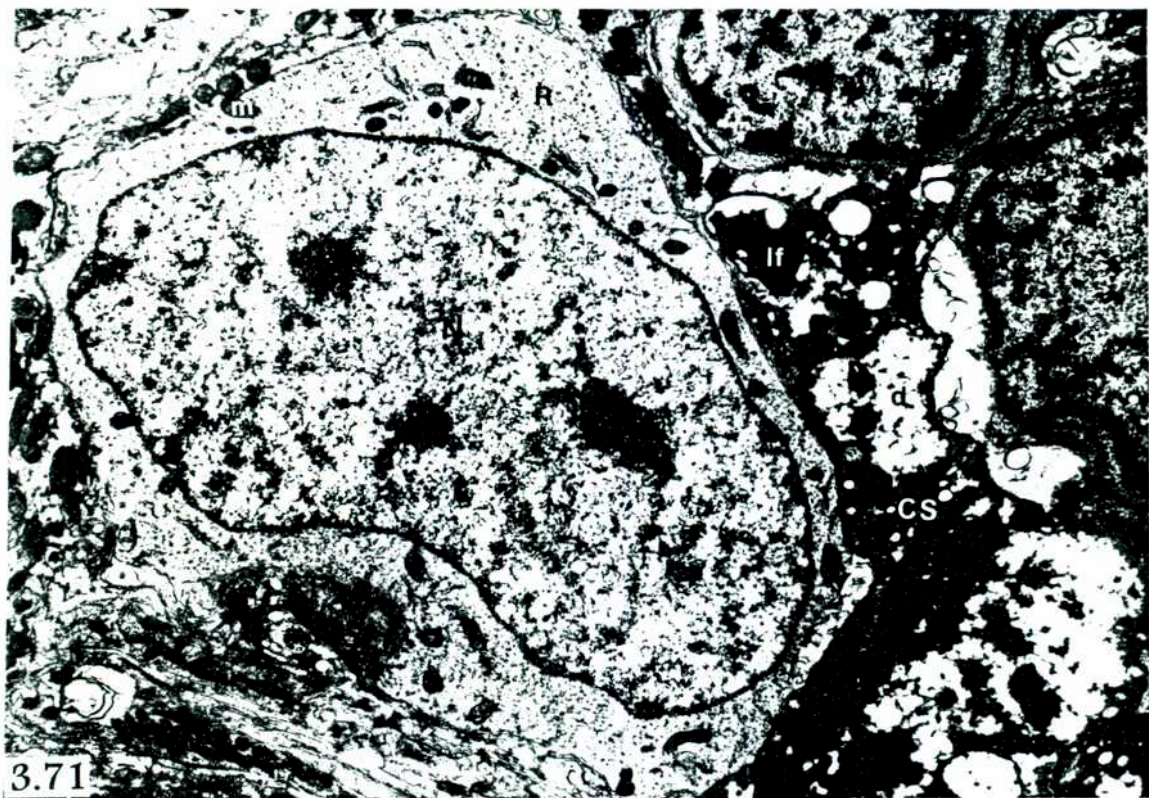


FIGURA 3.73.

A. Fotomicrografía electrónica una región del conducto de la glándula de Bowman de *Dasypus hybridus*. La superficie luminal (L) presenta gran cantidad de microvellosidades (mv). La célula del conducto (CD) presenta un núcleo electrón denso. El citoplasma presenta una gran cantidad de mitocondrias tubulares (m), gránulos de secreción (g) y retículo endoplasmático liso (rel). (N) neurona. (13.000x).

B. Fotomicrografía de un detalle del citoplasma de la célula ductal. En el cual se observan gránulos de secreción (g), cisternas de retículo endoplasmático liso (RE), pequeñas vacuolas (v), mitocondrias (m) y cuerpos multivesiculares (mb). Estas células se unen a las células de sostén (CS) por medio de desmosomas (►). (L) lumen, (MV) microvellosidades. (28.900x).

FIGURA 3.74. A. Fotomicrografía electrónica de una nervio olfatorio de *Dasypus hybridus*, en el cual se observa el núcleo eucromático de una célula de Schwann (SW). El citoplasma presente escasas organelas y eventualmente presenta un centriolo (►). La célula de Schwann se encuentra rodeando a grupos de axones amielínicos olfatorios (AX). Rodeando al nervio olfatorio se observa una delgada membrana basal y escasa fibras colágenas (Col). (m) mitocondrias. (16.100x).

B. Detalle de los axones olfatorios amielínicos, en cuyo interior se aprecian microtúbulos (►). (122.800x).

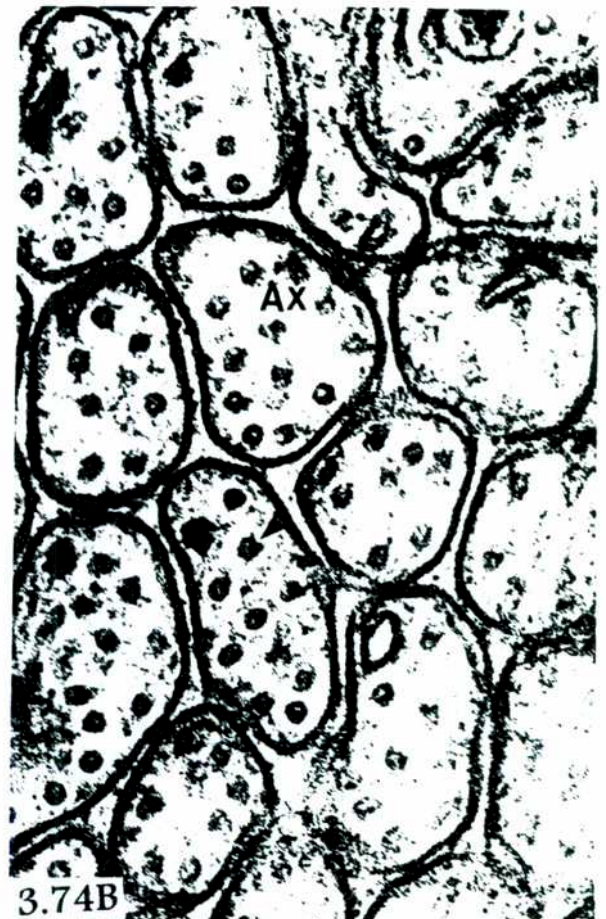
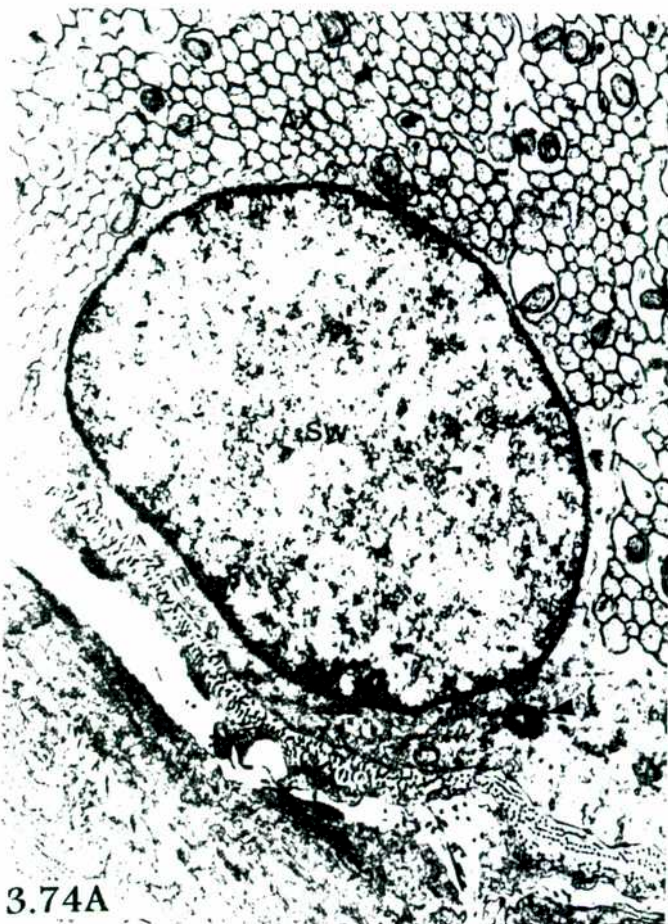


FIGURA 3.75. Fotomicrografía electrónica de una región acinar formado por células acinares que presentan gránulos de secreción tipo mucosos (Tipo I) (2) y por células acinares que presentan gránulos de secreción tipo serosos (Tipo II) (1) (L) lumen. (7.000x).

FIGURA 3.76. Fotomicrografía electrónica de una célula acinar tipo I. Estas células presenta un enorme núcleo basal (N) y el citoplasma se encuentra invadido por una enorme cantidad de gránulos tipo mucosos (g). Entre las organelas se encuentran: mitocondrias (M), cisternas de retículo endoplasmático liso (RE), pequeñas vacuolas (v) y aparato de Golgi (G). La ► señala la posición de los complejos de unión. (6.000x).

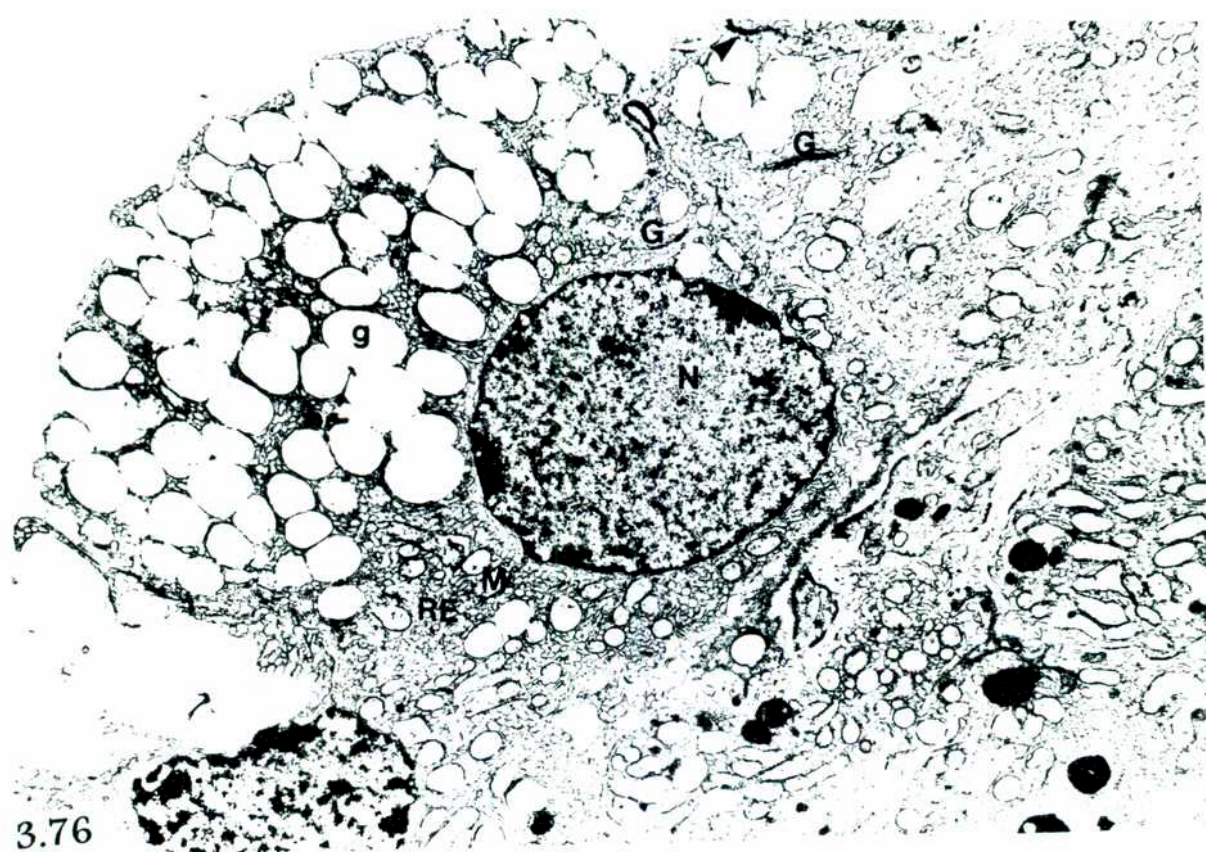
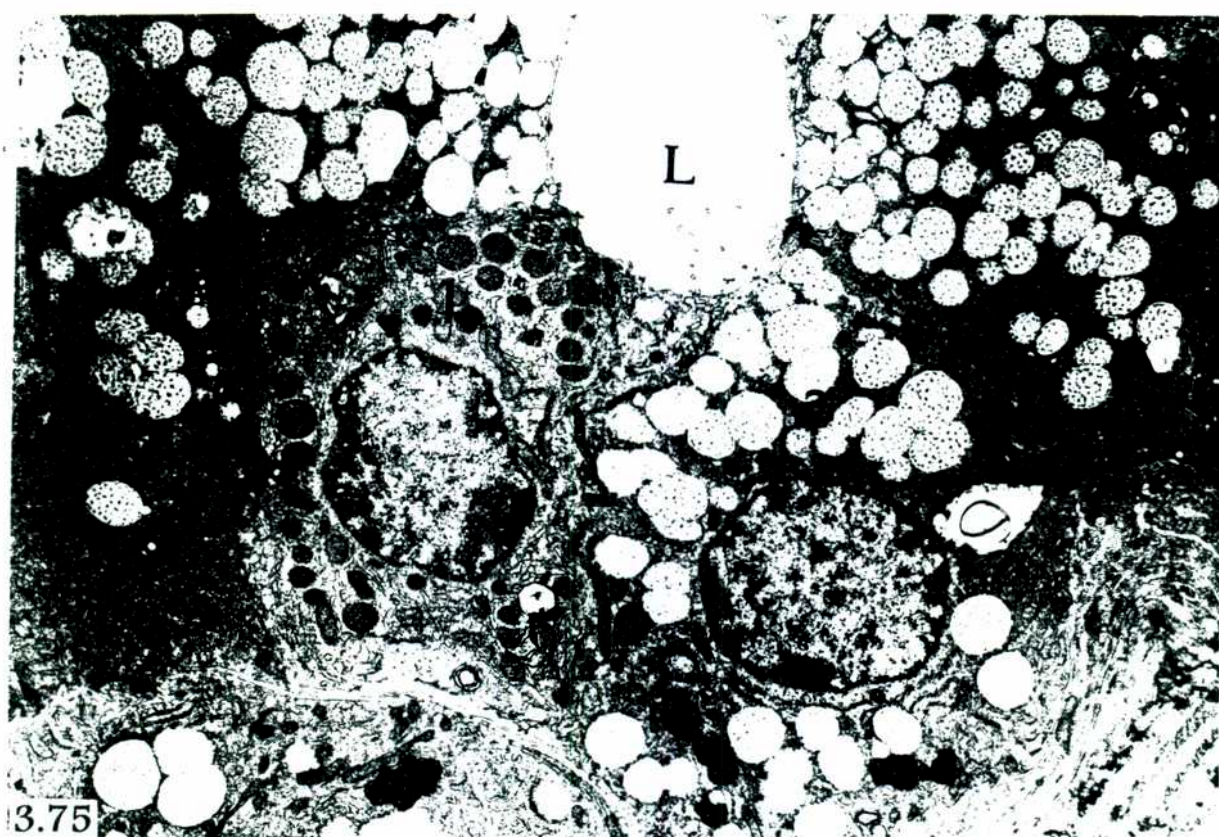


FIGURA 3.77. Fotomicrografía electrónica de un acino tipo I. Las células acinares presentan un enorme núcleo basal (N). El citoplasma presenta una gran cantidad de gránulos de secreción (g). La superficie luminal (L) presenta microvellosidades (mv) (6.400x).

A.B.C. Detalle de los diferentes tipos de gránulos de secreción (20.000x).

FIGURA 3.78. Fotomicrografía electrónica de una célula acinar tipo I. Esta célula presenta un núcleo basal esférico (N) y en el citoplasma apical una gran cantidad de gránulos tipo mucosos (g). Se encuentran además gran cantidad de mitocondrias (m) y retículo endoplasmático liso (RE). (5.600x).

FIGURA 3.79. Fotomicrografía electrónica de la zona en contacto con el lumen (L) de las células glandulares tipo I, en la cual se señala (►) la zona del aparente vuelco de la secreción por el mecanismo de secreción merocrino compuesto. (RE) cisternas de retículo endoplasmático liso dilatadas, (G) gránulos de secreción, (m) mitocondrias. (7.000x).

FIGURA 3.80. Fotomicrografía electrónica de una región citoplasmática de una célula acinar tipo I, en la cual se detalla las cisternas de retículo liso dilatadas (RE) y el complejo de Golgi (G) en asociación con vacuolas (v). (423.000x).

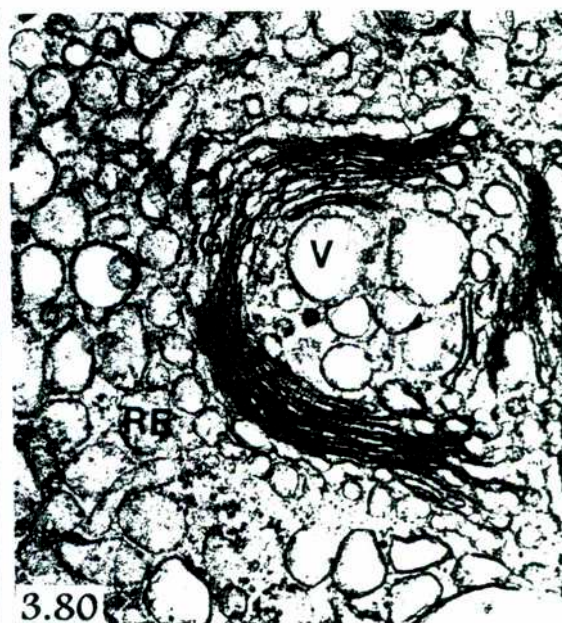
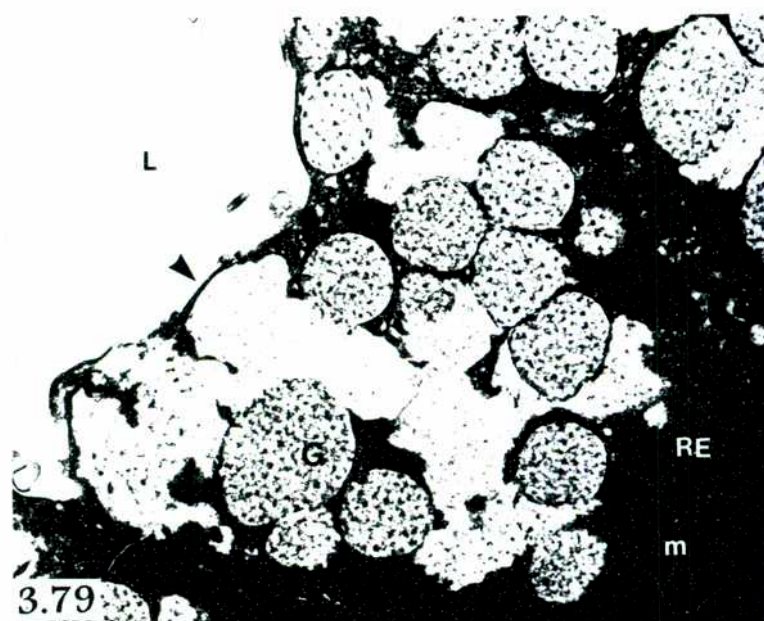
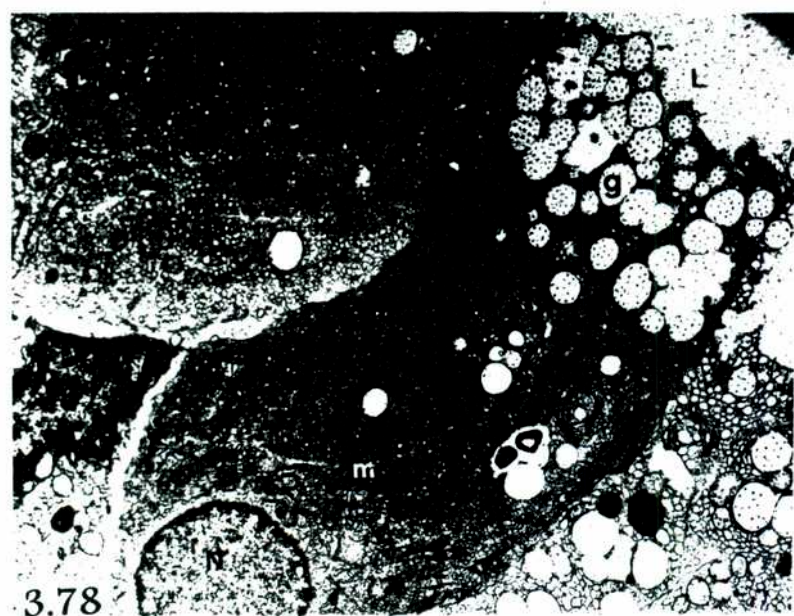
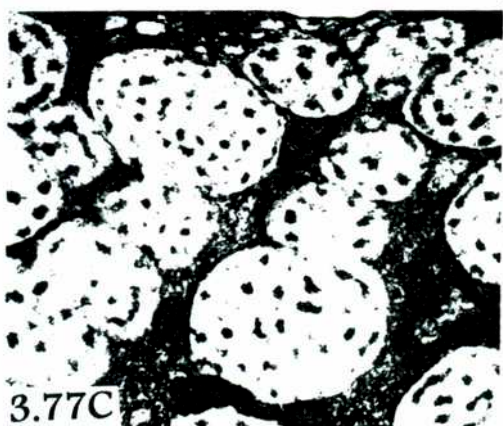
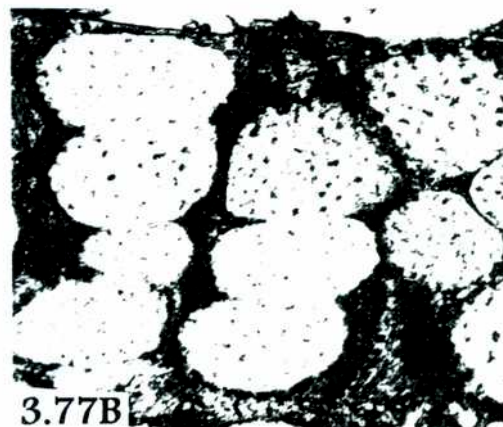
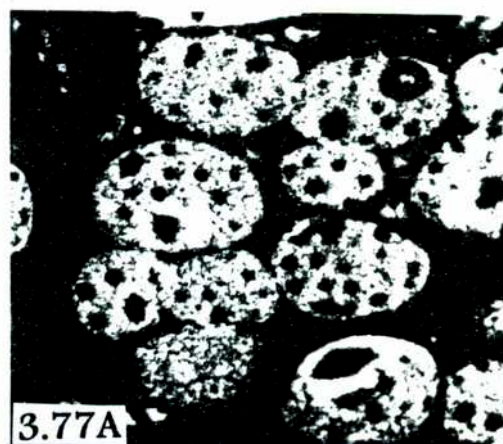
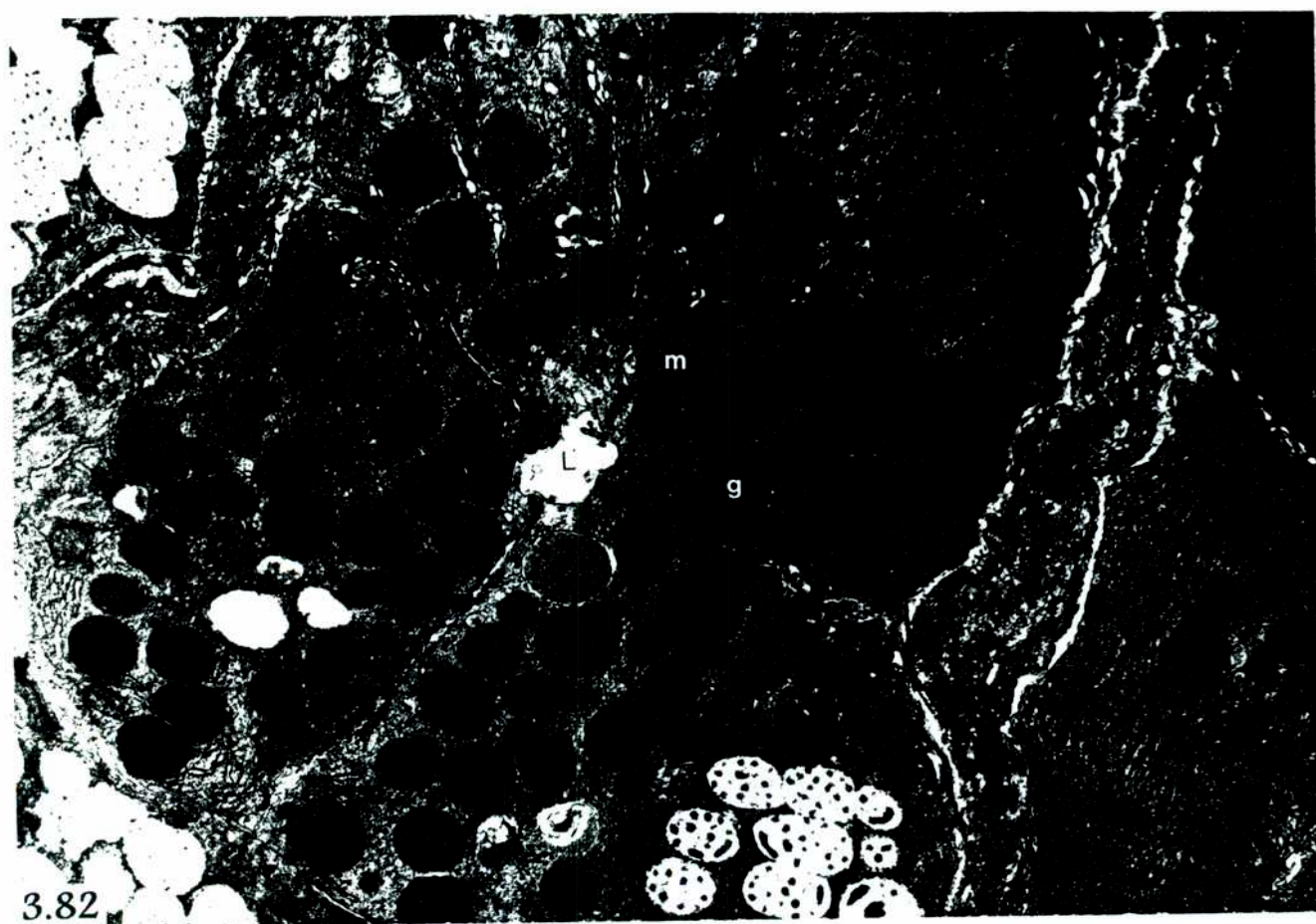
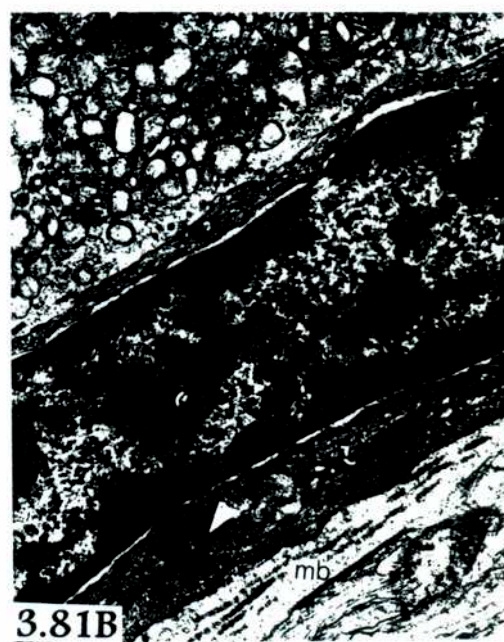
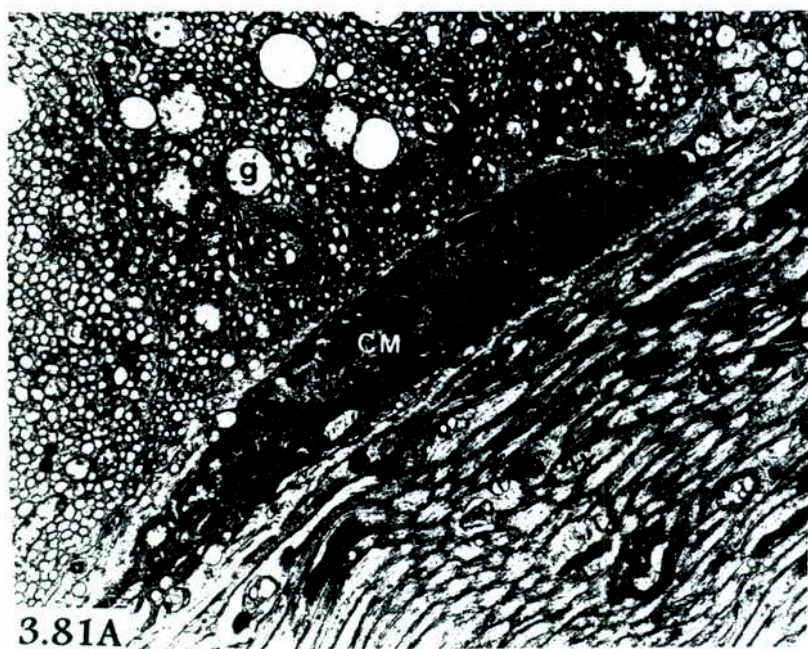


FIGURA 3.81.

A. Fotomicrografía electrónica de la región basal de un acino tipo I de *Dasypus hybridus*. Las células mioepiteliales (CM) yacen en la base de los adenómeros, por encima de la membrana basal. (Ax) axones olfatorios, (g) gránulos de secreción, (G) aparato de Golgi. (9.600x)

B. Detalle de una región citoplasmática de la célula mioepitelial (CM) en la cual se observa un centriolo (➤) y el aparato de Golgi (G). (RE) retículo endoplasmático liso, (mb) membrana basal (25.500x).

FIGURA 3.82. Fotomicrografía electrónica de un acino formado por células tipo serosas (Tipo II). El lumen (L) es estrecho y presenta escasa microvellosidades (►). La superficie apical presenta *zónula occludens* (1) y desmosomas (2). Las células glandulares presentan el citoplasma invadido por numerosos gránulos electrónicos (g) (9.000x).



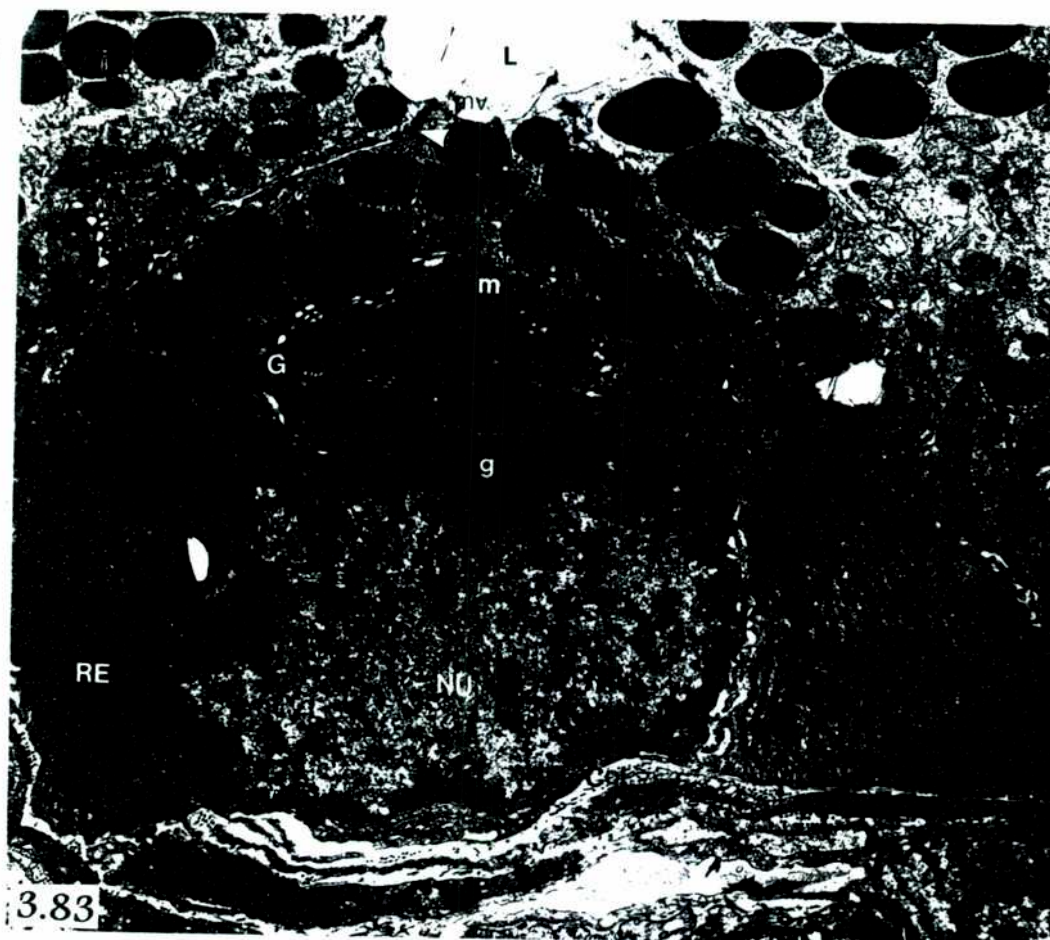


FIGURA 3.83. Fotomicrografía electrónica de una célula acinar tipo II. Estas células presentan un enorme núcleo basal (NU). La superficie luminal (L) presenta escasas microvellosidades (mv) y complejos de unión ($\triangleright$). El citoplasma basolateral presenta una enorme cantidad de retículo endoplasmático rugoso (RE) que se organiza en forma de espiral. Rodeando al acino se encuentra una delgada membrana basal y fibras colágenas (Col). La superficie lateral presenta espacios intercelulares (*). (10.400x).

DISCUSION

Hemos caracterizado macro y microscópicamente las estructuras de la cavidad nasal *C. villosus* y *D. hybridus* con especial referencia a la mucosa olfatoria, usando métodos histológicos de microscopía óptica y electrónica, histoquímicos e inmunohistoquímicos.

CAVIDAD NASAL Y MUCOSA OLFATORIA. ANATOMIA E HISTOLOGIA

La cavidad nasal de los armadillos presentan características similares a las halladas en animales macrosmáticos (Grassé, 1955). Sin embargo, son muy escasos los trabajos en los cuales se realizan un análisis detallado de la cavidad nasal. Los armadillos presentan un gran desarrollo de los etmoturbinales y por lo tanto una enorme superficie cubierta con mucosa olfatoria, lo cual facilita la realización de experimentos bioquímicos, químicos y fisiológicos. Hay un hecho llamativo de estos animales que merece destacarse las fosas no están completamente separadas. Este hecho deberá tenerse en cuenta para la interpretación de ciertos experimentos fisiológicos o experimentos referentes a los efectos de la oclusión unilateral de narinas para averiguar las consecuencias de tal procedimiento sobre los fenómenos de regeneración neuronal olfatoria y apoptosis. En los armadillos hemos hallado -en lugar de los cuatro grupos senos paranasales característicos (conchal, frontal, maxilar y esfenoidal)- un único seno, que se extiende en gran parte de la cavidad nasal y que hemos denominado seno maxilofrontal. Estos senos presentan una lámina propia con numerosas glándulas, característica que difiere de lo hallado en el koala en el cual los senos presentan una mucosa aglandular (Kratzing, 1984). El gran desarrollo glandular en los senos podría intervenir en mantener la humedad de la cavidad nasal una vez liberada su secreción (Bojsen-Moller, 1964)

La organización de la mucosa olfatoria de *C. villosus* y *D. hybridus* poseen características histológicas similares a las encontradas en otros grupos de mamíferos. Esto es, presentan en el epitelio olfatorio los tres tipos celulares: de sostén, sensoriales y basales (Graziadei, 1966; Frisch, 1967; Okano, 1967; Kratzing, 1969; Shantha y Nakajima, 1970; Graziadei y Monti Graziadei, 1976; Loo, 1977; Kratzing, 1978; Kratzing, 1984; Wenzel, 1987; Morrison y Costanzo, 1992; Getchell *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1994). La lámina propia posee características histológicas similares a las halladas en otros grupos de vertebrados (Frisch, 1967; Shantha y Nakajima, 1970; Getchell *et al.*, 1984; Kratzing, 1984; Jones *et al.*, 1994), a excepción de los peces cuyo rasgo fundamental es la ausencia total de glándulas de Bowman en la lámina propia y la presencia de células caliciformes en el epitelio olfatorio (Takami *et al.*, 1994; Fernandes y Ribeiro, 1995; Byrd y Brunjes, 1995). Sin embargo, la superficie apical del epitelio presentan protrusiones apocrinas muy desarrolladas en *Chaetophractus villosus*. Por otra parte, son muy poco frecuentes los trabajos en los cuales se describe la citoarquitectura de las glándulas de Bowman. La presencia de glándulas túbulo acinares ramificadas como las que hemos hallado han sido descripta solamente en las células glandulares oscuras del ratón (Frisch, 1967). Esta citoarquitectura y la escasa cantidad de tejido conectivo entre los acinos dificulta enormemente discernir la forma de los adenómeros.

ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS EN LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS* Y *DASYPUS HYBRIDUS*

El epitelio de los armadillos estudiados presenta GC neutros tanto en su porción apical como en su parte basal, incluyendo a la membrana basal, en cambio no se ha observado la presencia de GC ácidos en el mismo.

Las glándulas de Bowman producen GC neutros y ácidos sulfatados y carboxilados, aunque se observa otro tipo de células glandulares que no se tiñen con ninguna de las técnicas utilizadas para la detección de GC. También se ha observado la presencia de ácido siálico tanto en el mucus como en las glándulas de Bowman.

Nuestros resultados difieren de los hallados en anfibios. En la salamandra, las células de sostén del epitelio olfatorio producen GC neutros aunque en el borde apical también producen una pequeña cantidad de GC ácidos carboxilados y sulfatados en muy poca cantidad. En cambio, las glándulas de Bowman producen exclusivamente GC neutros (Getchell *et al.*, 1984). En las glándulas de Bowman de la mayoría de los reptiles se ha detectado únicamente la presencia de GC neutros, sin embargo, las víboras producen GC ácidos (Ferri y Liquori, 1989). En aves, las células de sostén y las glándulas de Bowman producen GC ácidos y neutros (Ferri y Liquori, 1989). En mamíferos, el esquema es similar a los hallados en las dos especies de armadillos. En el mono *Rhesus*, conejo, ratón y hámster, se ha reportado la presencia de GC neutros en las células de sostén y de GC neutros y ácidos en las células acinares de las glándulas de Bowman (Zinnin, 1964; Shantha y Nakajima, 1970; Frisch, 1967; Foster *et al.*, 1991).

El mucus que baña la superficie del epitelio olfatorio se divide en dos capas: la capa profunda presenta GC neutros y la capa superficial GC ácidos sulfatados y carboxilados. En los estudios realizados en otros mamíferos no se detalla la doble composición de la capa de mucus, aunque no mencionan haber realizados estudios para detectar gliconjugados ácidos. (Zinin, 1964; Shantha y Nakajima, 1970). En el caso del mono se han hecho estudios que permitieron analizar la composición enzimática del mucus y se han hallado una gran variedad de enzimas, lo que estaría indicando que el mucus es metabólicamente activo. El origen y la función de estas enzimas podrían explicar el alto papel xenobiótico que desempeña la mucosa olfatoria (Hadley y Dahl, 1982). Los estudios realizados en anfibios demuestran una estratificación del mucus, pero la distribución de los GC es inversa a la observada tanto en *D. hybridus* como en *C. villosus*, esto es la capa superficial presenta GC neutros y la capa superficial presenta GC ácidos (Getchell *et al.*, 1984).

Al analizar más específicamente la composición glicoproteica de la mucosa olfatoria mediante el uso de lectinas, los estudios revelaron que entre los armadillos existen diferencias en cuanto a la composición histoquímica de los diferentes componentes de la mucosa olfatoria. El epitelio olfatorio de ambos armadillos presenta reacción positiva con PNA en las vesículas olfatorias y en el citoplasma supranuclear de las neuronas. Lo cual implica reactividad con residuos de N-acetilgalactosamina. Por otra parte, el epitelio olfatorio de *D. hybridus* presenta, además, residuos de N-

acetilglucosamina y ácido siálico en las células de sostén, debido a la reacción -tenue- con WGA. Estos datos coinciden con la presencia de ácido siálico detectado con la técnica de Volz y col.(1987). La reacción tenue con WGA puede deberse a que este lectina se une mayoritariamente a los residuos de N-acetilglucosamina y en menor proporción al ácido siálico. A diferencia de los armadillos, en el epitelio olfatorio de hamster y ratones no se encontrado reactividad con ninguna de las lectinas estudiadas (WGA, PNA, SBA, PSA) (Foster *et al.*, 1992). La presencia de las glicoproteínas halladas en las células de sostén de *D. hybridus* se corresponden en parte con lo hallado en salamandras y lagartijas, ya que tanto en los reptiles como en el armadillo las células de sostén presentan reactividad con WGA. En salamandras y lagartijas se ha registrado, además, la presencia de residuos de D-galactosa, N-acetil D-galactosamina, N-acetil D-glucosamina, D-manosa, D-glucosa y ácido siálico (Ferri y Liquori, 1989; Foster *et al.*, 1992). Por otro lado, la reactividad de las vesículas olfatorias de las neuronas del epitelio olfatorio y en algunos axones olfatorios de *D. hybridus* y *C. villosus* con PNA indica la presencia de glicoproteínas con residuos de galactosa β 1,1,3N-acetilgalactosamina terminal en estas estructuras. Los sitios de unión a PNA podrían estar asociados con funciones de barrera, pero por otro lado estos sitios se hallan presentes, además, en los nervios olfatorios en desarrollo, por lo tanto los autores postulan la posible relación con la degeneración y regeneración de los axones después de una lesión (Gong y Shipley, 1996). Nosotros hemos detectado la presencia de PNA en algunas vesículas olfatorias y en algunos axones en la lámina propia de animales adultos y tal vez esto esté demostrando algún tipo de regeneración neuronal. La presencia de glicoproteínas específicas en las vesículas olfatorias, cuyos residuos terminales son detectados por lectinas, podrían estar relacionados con la quimiorrecepción y transducción de los mensajes odoríferos en señales nerviosas. Esta hipótesis se apoya en algunos reportes que indican que las membranas de las cilias olfatorias presentan tanto receptores para sustancias odoríferas como para glicoproteínas involucradas en la transducción de la señal (Menco y Farbman, 1992; Franceschini *et al.*, 1994). Es probable, además, que las glicoproteínas de superficie que se marcan con las lectinas puedan representar una gran parte de las proteínas transmembrana involucradas en la olfacción (Menco, 1992). Otra posibilidad es que diferencias en la marcación con lectinas estén relacionadas con otras funciones importantes tales como, reconocimiento celular, adhesión y fasciculación, que

en el sistema olfatorio ocurren no sólo durante el desarrollo embrionario sino también en la vida adulta (Franceschini *et al.*, 1994; Gong y Shipley, 1996). No hemos obtenido reacción con SBA en las neuronas de armadillos adultos. Sin embargo, Franceschini y col. (1994) utilizando la lectina SBA han detectado la presencia de glicoproteínas con residuos de acetilgalactosamina en neuronas olfatorias y vomeronasales en ratas durante estadios embrionarios, lo cual podría relacionarse con la formación de los primeros contactos sinápticos en el bulbo olfatorio. Por otro lado, SBA también se une a las cilias de las neuronas olfatorias, pero lo hace más débilmente y PNA se une únicamente a las microvellosidades de las escasas células microviliarias que se hallan en la superficie del epitelio olfatorio de ratas (Menco, 1992a).

En el mucus hemos obtenido reacción positiva únicamente con la lectina WGA. No reacciona con PSA, BSA y PNA. Datos similares hemos obtenido con la técnica de Voltz y col. (1987) para detectar residuos de ácido siálico. Menco (1992a) estudió la marcación diferencial con lectinas en cilias y microvellosidades del epitelio olfatorio de ratas, así, comprobó que WGA marca el mucus que rodea la región apical de las células receptoras y de las células de sostén. El mucus está compuesto por dos capas: la zona próxima al epitelio es la que se tiñe más intensamente con WGA y la distal que se tiñe menos intensamente con WGA (Menco, 1992).

La bibliografía analizada no detalla la marcación diferencial entre el mucus y las glándulas de Bowman o de las células de sostén (en el caso de anfibios y reptiles) como se han hallado en los armadillos.

El mucus protege la superficie epitelial de la desecación y las temperaturas extremas y además ayuda a prevenir el daño causado por agentes infecciosos y por partículas no infecciosas (Farbman, 1992). Además, las glicoproteínas que contienen residuos de ácido siálico servirían para protección y aquellas que contengan residuos fuertemente sulfatados funcionarían primariamente como lubricantes (D'Ottavio *et al.*, 1989). Otras de las funciones de los residuos de ácido siálico son: protección, reconocimiento celular, bactericida, regulación de las propiedades viscosas de la secreción (Castells *et al.*, 1994). La otra función del mucus es la de permitir que el estímulo odorante llegue a los sitios receptores. Por lo tanto, cualquier molécula olorosa debería ser soluble en el mucus. Para el caso de los vertebrados terrestres la mayoría de

los estímulos olorosos son hidrofóbicos, cabe preguntarse: cómo penetran a las células receptoras a través de un medio acuoso como lo es el mucus?. La respuesta estaría dada en diversos agentes que están en el mucus y que modifican a las moléculas odorantes a las que se unen, de manera tal que pueda ser presentado al receptor (Farbman, 1992). Los residuos de azúcar en las glicoproteínas que forman el mucus determinan la viscosidad y la permeabilidad del mismo. En particular, los residuos de ácido siálico, que se encuentran cargados negativamente a pH fisiológico, contribuyen a la viscosidad del mucus, a la unión iónica y al atrapamiento de bacterias en la capa de mucus (Foster *et al.*, 1991).

El estudio con lectinas en las glándulas de Bowman presentan diferencias entre los dos armadillos estudiados. *C. villosus* presenta, a diferencia de *D. hybridus*, tinción con PSA y PNA. Esto implica que ambos armadillos presentan glicoproteínas con residuos de N-acetilglucosamina, ácido siálico y N-acetilgalactosamina, pero *C. villosus* presenta, además, glicoproteínas con residuos N-glicosidil con centros fucosilados y N-1,3 β -acetilgalactosamina. Las glándulas de Bowman de la salamandra también contienen residuos de N-acetilgalactosamina, que generalmente están fucosilados, pero no se han observado residuos de ácido siálico (Foster *et al.*, 1992). La lagartija presenta gliconjugados neutros que contienen N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, D-galactosa, D-manosa, pero los residuos de L-fucosa están ausentes en sus glándulas de Bowman (Ferri y Liquori, 1989). En el epitelio olfatorio de ratas PNA tiñe selectivamente ductos y glándulas de Bowman (Hempstead y Morgan, 1983). En el hámster y el ratón, se han observado dos subpoblaciones de células acinares. La mayoría de las células acinares presentan GC con residuos de N-acetil-galactosamina y terminales con ácido siálico. Una subpoblación de las células acinares reaccionan positivamente con las lectinas que marcan los residuos de D-galactosa y N-acetil-galactosamina, pero estos GC nunca se hallan sialatados (Foster *et al.*, 1992). En nuestro estudio hemos comprobado que en los acinos sólo se marcan algunas células acinares, lo cual nos podría estar indicando la presencia de subpoblaciones de células glandulares o células en diferentes periodos de maduración.

Los resultados obtenidos de los estudios realizados por medio de lectinas nos dan, fundamentalmente, dos tipos de información. Por un lado, la utilización de diferentes lectinas nos proporciona datos acerca de los componentes tisulares específicos, ya sea sobre variaciones en la composición misma como variaciones en la composición de las secreciones en diferentes estadios de funcionamiento y maduración de las células. Por otro lado, el uso de estas moléculas permite marcar específicamente diferentes tipos celulares dentro de la mucosa olfatoria, permitiendo, así, identificar tanto a los diferentes tipos celulares dentro del epitelio como caracterizar los tipos celulares que conforman las glándulas de Bowman.

En cuanto a la presencia de lípidos los hemos detectado en el citoplasma apical de las células de sostén, en la región basal y en algunas glándulas de Bowman. La presencia de lípidos también se ha registrado en la región apical de las células de sostén, en la porción apical de las neuronas olfatorias y en las glándulas del mono *Rhesus* y en las glándulas de Bowman del ratón (Shantha y Nakajima, 1970; Frisch, 1967).

Los armadillos presentan similitudes y diferencias con otras especies de vertebrados estudiados. Existen, además, diferencias y similitudes entre ambas especies estudiadas. Resta analizar si estas discrepancias se deben a diferentes actividades olfatorias o a diferentes estrategias evolutivas.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS* Y *DASYPUS HYBRIDUS*.

La utilización de anticuerpos contra la proteína marcadora del sistema olfatorio (OMP) (Margolis, 1972) permite revelar la presencia de neuronas olfatorias maduras y la distribución de los nervios olfatorios dentro de la mucosa (Johnson *et al.*, 1995; Wensley *et al.*, 1995; Graziadei *et al.*, 1977). En ambas especies estudiadas la inmunomarcación con OMP revela la localización y la morfología de las neuronas

olfatorias inmunoreactivas para OMP, así como también la localización de los filetes olfatorios en la lámina propia. Las neuronas se observan como células bipolares con un axón el cual raramente se observa, y una dendrita apical que termina en una expansión apical. La proteína OMP se encuentra en el citosol de neuronas sensoriales maduras y se distribuye a lo largo de toda la célula, desde la parte proximal de la cilia hasta el axón (Farbman, 1992). Esta proteína se expresa en neuronas maduras y por lo tanto sirve para diferenciar éstas últimas de neuronas inmaduras (Farbman, 1992).

La función de la OMP no es muy clara. Sin embargo, Farbman y Margolis (1980), sugieren que la presencia de una proteína marcadora de la célula receptora olfatoria señala de alguna manera la maduración de la célula y más específicamente podría estar relacionada con la formación de la sinapsis. El OMP no es detectado cultivos *in vitro* de células olfatorias. Esta ausencia se podría relacionar con la carencia de una neurona de segundo orden y con la consecuente falta de oportunidad para la célula receptora de formar sinapsis. Por lo tanto, de estas observaciones se deduce que la formación de la sinapsis induce a las células receptoras a sintetizar OMP.

El producto de la expresión del gen 9,5 (PGP 9,5) ha atraído mucho la atención como un nuevo marcador neuronal específico. El PGP 9,5 es una proteína soluble aislada del cerebro humano (Taniguchi *et al.*, 1993) y es específica del citoplasma de células nerviosas y neuroendócrinas. En los estudios realizados en las dos especies de armadillos se halló inmunomarcación en el epitelio olfatorio y en los filetes nerviosos de la lámina propia. Dentro de una célula receptora el soma y la dendrita presentaron una intensa marca inmunopositiva, mientras que el axón en general fue difícil de reconocer. Por lo tanto en el presente estudio, hemos demostrado que el PGP 9,5 puede ser considerado como un marcador de neuronas olfatorias que se conserva en la vida adulta. De acuerdo con su expresión en humanos adultos (Takami *et al.*, 1993). en ratas (Iwanaga *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1993; Wensley *et al.*, 1995) y en armadillos, se podría sugerir que el PGP 9,5 es un componente bioquímico importantes de las neuronas olfatorias maduras (Taniguchi *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995). Por otra parte, la presencia de inmunoreactividad positiva para ambos antisueros estudiadas - OMP y PGP 9.5-, en armadillos como así también en otros grupos de vertebrados (rana, rata, ratón, humanos (Iwanaga *et al.*, 1992; Takami *et al.*, 1993; Wensley *et al.*, 1995))

confirman la conservación de estas moléculas a lo largo de la evolución ya que ha mantenido en animales tan primitivos y distantes como son los Edentados.

El anticuerpo anti-VIP, en ambas especies estudiadas dió inmunomarcación positivos en el borde apical del epitelio olfatorio. Se requerirán estudios de inmunohistoquímica con microscopía electrónica para tratar de dilucidar si la marca con este anticuerpo se halla en las cilias, en el mucus que rodea a las cilias, o en las terminales nerviosas extrínsecas. Los estudios sobre la innervación de la mucosa olfatoria indican que las fibras que contienen péptido intestinal vasoactivo se originan en los ganglios esfenopalatinos yóticos (parasimpáticos) (Grunditz *et al.*, 1994). De estos mismos estudios se deduce que los neuropéptidos que contienen las neuronas que innervan a la mucosa olfatoria, podrían actuar como mediadores en las funciones nasales (Grunditz *et al.*, 1994). La bibliografía carece de datos que se asemejen a los obtenidos en los armadillos. Por lo tanto una posible explicación podría ser que las terminales nerviosas que contiene VIP terminen directamente en los *knobs* olfatorios y que intervengan de alguna forma en la función olfatoria.

Debido a la propiedad regenerativa que presenta el epitelio olfatorio de la mayoría de los vertebrados, se probaron en el armadillo *C. villosus* dos anticuerpos que nos dan información acerca de la división y el crecimiento celular: GAP43 y PCNA. GAP43 se halla presente en terminales axónicas presinápticas y parece estar involucrado en el crecimiento neuronal y la sinaptogénesis (Milosevic *et al.*, 1995; Zou y Martin, 1995). La presencia en *Chaetophractus villosus* de algunas neuronas y axones inmunoreactivos a GAP 43 que se hallan en la lámina propia indicarían el hallazgo de ciertas neuronas y de axones en estadio de maduración, lo cual implicaría una constante renovación de las neuronas del epitelio olfatorio. Durante el desarrollo, GAP43 es transportada desde el soma neuronal hasta la parte distal de los axones, donde es utilizada en el crecimiento de conos axónicos y sinapsis (Skene y Willard, 1981). Por otro lado, la proliferación celular es una característica de daño celular y reparación. La renovación celular estaría confirmada por la presencia de células basales claras inmunoreactivas a PCNA de *Chaetophractus villosus*, un anticuerpo que marca neuronas en proliferación (Casasco *et al.*, 1993; Ortego *et al.*, 1994).

Para analizar la inmunohistoquímica del resto de las células que componen el epitelio olfatorio, se utilizaron anticuerpos, especialmente aquellos que reaccionan con las citoqueratinas.

Las citoqueratinas que típicamente se hallan en tejidos epiteliales, presentan una distribución diferencial a lo largo de la mucosa olfatoria. El anticuerpo monoclonal anti citoqueratinas 5, 6 y 18 (LP34), dió, en *C. villosus*, inmunomarcación en las células basales oscuras del epitelio olfatorio. Por otro lado, las observaciones al ME revelaron la presencia de una gran cantidad de filamentos intermedios en estas células. La presencia de diferentes citoqueratinas en las células basales oscuras ha sido demostrada en otras especies tanto en tejidos adultos como embrionarios (Vollrath *et al.*, 1985; Yamagashi *et al.*, 1989; Susuki y Takeda, 1991; Hoolbrook *et al.*, 1995). No se obtuvo el mismo resultado en *D. hybridus*. Posiblemente, la presencia de estos tipos de citoqueratinas deba analizarse usando otras metodologías (tratamientos con proteasas o con microondas (Szekeres *et al.*, 1994; Portiansky *et al.*, 1996)) de modo tal de exponer los epitopes inmunorreactivos. También cabe la posibilidad de que, en *D. Hybridus*, las células basales oscuras expresen otro tipo de citoqueratinas no identificadas por este anticuerpo. El anticuerpo LP34 reconoce tres tipos de citoqueratinas (5, 6 y 18). Cuando analizamos la expresión de citoqueratinas usando un anticuerpo específico para un tipo de citoqueratina (18) (ver tabla de resultados) no se observa inmunomarcación, por lo cual posiblemente las citoqueratinas de las células basales oscuras sean del tipo 5 ó 6. Los estudios de ME demostraron una gran cantidad de manojos de filamentos intermedios en el citoplasma de las células basales oscuras de *Dasyus hybridus*. Por lo tanto, consideramos necesaria tratar de buscar anticuerpos específicos para estos tipos de citoqueratinas a fin de dilucidar este punto.

En *D. hybridus* la zona apical de las células de sostén reaccionaron positivamente con el anticuerpo anti-citoqueratina 18 humana. El mismo anticuerpo en *C. villosus* dió inmunomarcación en algunas glándulas de Bowman. Pero en ninguna de las dos especies de armadillos hemos tenido marca en las células basales oscuras. Por otro lado, la presencia de citoqueratinas 18 ha sido reportada en las células de sostén y en las glándulas de Bowman (Hoolbrook *et al.*, 1995). Estos autores, estudiando el epitelio olfatorio de ratas adultas, relacionan -basándose en la expresión de citoqueratinas- a las células basales oscuras con las células de sostén. La tinción tanto de las células de sostén

como la de las células acinares de las glándulas de Bowman podría deberse a que los anticuerpos policlonales reaccionan con más de una subunidad de citoqueratina. Sin embargo contrariamente a esta hipótesis existe una relación embriológica entre las células de sostén y las glándulas de Bowman, ya que ambos tipos celulares derivan de la misma región de la placoda olfatoria (Klein y Graziadei, 1983). Por otro lado, también se ha reportado la regeneración del epitelio olfatorio a partir de las glándulas de Bowman después de su destrucción (Matulionis, 1975). Por lo tanto, si las glándulas de Bowman se diferencian a partir del epitelio olfatorio durante el desarrollo, la regeneración del epitelio olfatorio a partir de las glándulas de Bowman puede ser posible ya que estas glándulas poseen propiedades epiteliales (Taniguchi *et al.*, 1996a; Taniguchi *et al.*, 1996b). La presencia de inmunoreactividad a citoqueratinas, generalmente presentes en el epitelio, en las glándulas de Bowman confirmarían lo expresado anteriormente.

La vimentina está presente en neuronas en proliferación y su expresión a lo largo del desarrollo es reemplazada por la expresión de neurofilamentos (Aoki *et al.*, 1995; Osada *et al.*, 1995). La marca obtenida en el armadillo *Chaetophractus villosus* en las células basales oscuras, difiere con los resultados hallados por Osada y col. (1995) en el epitelio olfatorio y en el órgano vomeronasal de ratas adultos, en los cuales sólo se hallan unas pocas células inmunoreactivas en los adultos. Vollrath *et al.* (1985), por un lado, no halló marca con anti-vimentina en ninguna célula del epitelio olfatorio, mientras que Schwob y col. (1986) hallaron que las neuronas olfatorias continúan expresando vimentina o una proteína similar en lugar de expresar neurofilamentos. La presencia de células basales oscuras inmunoreactivas a vimentina en *Chaetophractus villosus*, podría estar sugiriendo que la expresión de vimentina jugaría un papel importante en la diferenciación temprana de las neuronas olfatorias aún en la vida adulta y que las células basales oscuras que expresan vimentina podrían ser consideradas como neuronas olfatorias en uno de sus primeros estadios de diferenciación.

Los anticuerpos anti-neurofilamentos de 160 y 200kD han dado resultados negativos tanto en *D. hybridus* como en *C. villosus*. Estos resultados difieren de los hallados por Yamaguishi *et al.* (1989), en los cuales la inmunomarcación se localizó en las neuronas sensoriales, especialmente en las dendritas y los somas pero no en los axones. Cabe aclarar que este autor no especifica el tipo de anticuerpo que utilizó para marcar los neurofilamentos. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los

resultados obtenidos por Vollrath et al. (1985), en los cuales no se halla marca en ninguna célula del epitelio olfatorio con ninguno de los dos anticuerpos contra neurofilamentos. Por otro lado, es importante señalar que hemos demostrado al ME la presencia de manojos de filamentos intermedios en el citoplasma de las neuronas olfatorias de ambos armadillos, razón por la cual probablemente estas células sintetizan otro tipo de neurofilamentos distintos a los que hemos probado.

Los resultados obtenidos empleando metodologías inmunohistoquímicas demuestran que, si bien la expresión de los distintos antígenos en los diferentes tipos celulares es coincidente, en líneas generales con lo observado en otros mamíferos, existen algunas diferencias particulares en los armadillos. Además, es posible observar diferencias en los patrones de inmunomarcación entre *C. villosus* y *D. hybridus*, los que pueden estar relacionados con diferencias en la actividad olfatoria o bien con variaciones ocurridas durante la evolución.

ESTUDIO DE LA MUCOSA OLFATORIA DE *CHAETOPHRACTUS VILLOSUS* Y *DASYPUS HYBRIDUS* A NIVEL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las dos especies de armadillos estudiados presentan a nivel ultraestructural -del mismo modo que a nivel de MO- características similares a las halladas en rata mole, ratón, oveja, algunos primates, rata, koala y en el hombre (Graziadei, 1966; Frisch, 1967; Kratzing, 1970; Loo, 1973; Kratzing, 1978; Graziadei y Monti Graziadei, 1979; Kratzing, 1984; Morrison y Constanzo, 1992) en cuanto a la presencia de tres tipos celulares típicos: células de sostén, neuronas olfatorias y células basales. Carecen de otros tipos celulares adicionales hallados en perros, marsupiales y en el hombre (Okano *et al.*, 1967; Kratzing, 1978; Morrison y Constanzo, 1992).

CELULAS DE SOSTEN

En el armadillo *Chaetophractus villosus* hemos hallado dos tipos diferentes de células de sostén mientras que *Dasypus hybridus* presenta un único tipo celular fue demostrado a nivel ultraestructural. El primer tipo celular -el más frecuente- de *Chaetophractus villosus* es muy similar al único tipo hallado en *Dasypus hybridus*. Presenta caracteres morfológicos similares a los hallados en otros mamíferos (Graziadei, 1966; Kratzing, 1970; Graziadei y Monti Graziadei, 1979; Getchell y Getchell, 1992). Sin embargo, se deben destacar varias diferencias estructurales. El primer rasgo característico es la presencia de enormes protrusiones -a modo de secreción apocrina- en la superficie apical de las células de sostén de *C. villosus*. Estas protrusiones son escasas en *D. hybridus*. En los mamíferos han descriptas en la rata mole (Graziadei, 1966), destacándose que en este animal presenta un escaso desarrollo. En cambio, es común la presencia de protusiones en algunos reptiles (Getchell y Getchell, 1992). Según estos autores la presencia de estas especializaciones apicales pueden colaborar en incrementar la superficie, especialmente para la secreción por pinocitosis y las funciones absorptivas. Sin embargo no hemos observado la presencia de gránulos secretorios ni en las células ni en las protrusiones.

Las protrusiones halladas en las células de sostén de los armadillos son muy similares a las descripciones del tipo de secreción apocrina descripta en otras glándulas (glándula infraorbital de la cabra japonesa, glándula de Harder de conejo) (Smith y Hearn, 1979; Wooding, 1979; Atoji *et al.*, 1983; 1987; 1989). En los primeros estadios durante la formación de las protrusiones apócrinas, aparece una saliencia en la superficie de la célula. Esta estructura se agranda y protruye en el lumen pero aún sigue conectada a la célula por un pedicelo, hasta que finalmente se suelta en el lumen (Smith y Hearn, 1979; Atoji *et al.*, 1993). Estudios de ME en otras glándulas demostraron que las protrusiones apicales pueden presentar una fina matriz que contiene una forma vesicular de retículo endoplasmático rugoso y algunos ribosomas (como ocurre en las glándulas sudoríparas del hombre) (Kurosomi y Kurosomi, 1982). Otro tipo de protrusión apócrina carece totalmente de cualquier tipo de organela en su interior (como ocurre en la glándula infraorbital de la cabra japonesa y en las glándulas odoríferas de algunas aves) (Smith y Hearn, 1979; Atoji *et al.*, 1987). Por otro lado, es

importante remarcar la presencia de retículo endoplasmático liso y vesículas en el interior de las protrusiones, hecho sobre el cual no hemos hallado datos en la literatura.

La presencia de retículo liso en el citoplasma apical de las células de sostén es un rasgo característico presente en perros, ovejas y algunos primates (Okano *et al.*, 1967; Kratzing, 1970; Loo, 1977). Esta región se corresponde con la zona de alta sudanofilia hallada en los estudio histoquímicos, la cual puede deberse a la alta concentración de retículo endoplasmático liso.

Las células que presentan una gran cantidad de retículo liso se asocian, en general, a células productoras de hormonas esteroideas (Seliger y Smith, 1968; Hoffer y Karnovsky, 1981; Pudney y Fawcett, 1977). Por otro lado, las membranas del retículo endoplasmático liso juegan un papel muy importante como sitios para las enzimas que intervienen en la biosíntesis de los andrógenos (Christensen y Fawcett, 1966). Sin embargo, células con abundante cantidad de retículo endoplasmático liso no se encuentran asociadas solamente con las células secretoras de esteroides, sino que además puede hallarse en células que metabolizan lípidos, en células adiposas y en células hepáticas que intervienen en el metabolismo del colesterol. Esta característica podría relacionarse, además, con el hecho de que el sistema de retículo endoplasmático liso puede estar involucrado en el mecanismo de transporte iónico, tal como ocurre en las células de la mucosa gástrica del intestino o en el retículo sarcoplasmático de los músculos (Sisson y Fahrenbach, 1967). Esta propiedad podría relacionarse con la posible función de las células de sostén de intervenir en el intercambio iónico y en el metabolismo detoxificante de la mucosa olfatoria (Getchell y Getchell, 1992; Lewis y Dahl, 1995).

Las células de sostén de *C. villosus* carecen de las barras terminales que encontramos en *D. hybridus*, especialización que se ha encontrado también en el perro (Okano *et al.*, 1967).

El segundo tipo hallado solamente en *C. villosus* podría considerarse como un estadio en degeneración del primer tipo celular. La posibilidad de considerar al segundo tipo celular como una célula en degeneración se debe a la presencia de núcleo picnótico, vacuolas autofágicas, edematización del citoplasma y cuerpos densos -características halladas en células en degeneración (Simmons *et al.*, 1981; Monti Graziadei y Graziadei, 1979; Schmidt *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995)-. Estas características degenerativas se

hallan en las neuronas olfatorias de los epitelios sometidos a algún tipo de injuria. Estos indicios ultraestructurales indicarían un posible recambio en las células de sostén. No hemos hallado datos en la bibliografía sobre algún tipo de recambio en las células de sostén, aunque en ratones se ha observado escasos núcleo en mitosis (Graziadei y Monti-Graziadei, 1979). Sin embargo, aún no se ha logrado dilucidar si las células de sostén derivan de las células basales claras o si representan una entidad que se puede regenerarse a sí misma (Vollrath *et al.*, 1989)

La relación entre las células de sostén y las neuronas han sido descritas en la mayoría de los vertebrados. Las células de sostén rodean y envuelven a las células receptoras, en ambas especies de armadillos mediante complejos de unión y simple aposición de membrana. Esta relación estaría reflejando funciones similares a las gliales, en cuanto a aislar y regular el contenido iónico extracelular de las células olfatorias (Kratzing, 1970; Rafols y Getchell, 1983; Getchell y Getchell, 1992).

NEURONAS OLFATORIAS

Las neuronas receptoras olfatorias presentan vesículas olfatorias muy desarrolladas similares a las halladas en otros mamíferos (Graziadei, 1967; Okano *et al.*, 1967; Kratzing, 1970; Loo, 1977; Graziadei y Monti Graziadei 1979; Kratzing, 1984). Las cilias representan la parte de la neurona expuesta al medio externo y por lo tanto son consideradas como el sitio en el cual se produce la percepción olfatoria (Allison, 1953). El armadillo *C. villosus* presenta en la vesícula olfatoria raicillas ciliares, las cuales podrían tener una función del tipo contráctil e intervenir en el movimiento de las cilias (Kratzing, 1970; De Robertis y De Robertis, 1984). Esta característica estructural no parece ser una constante en el epitelio olfatorio de la mayoría de los mamíferos, ya que se ha reportado su presencia sólo en algunas especies de primates (Loo, 1977) y en el perro (Okano *et al.*, 1967). En el armadillo *D. hybridus* no observamos estas estructuras asociadas a las cilias. Las diferencias en cuanto a la constitución de las estructuras ciliares en ambos armadillos podría deberse a una cuestión funcional en cuanto al movimiento de la capa de mucus sobre el epitelio. La presencia de las enormes

protrusiones halladas en *C. villosus* provocarían un impedimento para el movimiento del mucus, razón por la cual sería necesario que las cilias colaboren con el movimiento del mismo.

Un rasgo llamativo de las neuronas olfatorias de ambos armadillos es la presencia de nucléolos asociados a grumos heterocromáticos -falsos nucleólos a MO-, característica que no ha sido observada en otros mamíferos.

CELULAS BASALES

Las células basales -tanto las oscuras como las claras- presentan características similares a las halladas en otros mamíferos (Graziadei y Monti Graziadei, 1979; Vollrath *et al.*, 1985; Suzuki y Takeda, 1991; Hoolbrook *et al.*, 1995). La función de las células basales claras en la regeneración del epitelio es un tema muy discutido en la literatura. Para algunos autores las células basales claras serían las posibles progenitoras de las neuronas olfatorias (Suzuki y Takeda, 1991). Otros autores sugieren que las células basales claras representan una forma de transición entre las células basales oscuras y las neuronas (Graziadei y Graziadei, 1979). Vollrath y col. (1985) consideran que las células basales claras son capaces de diferenciarse en dos direcciones: hacia una neurona receptora olfatoria o hacia una célula basal oscura. Por otro lado, Hoolbrook y col. (1995) proponen hacer estudios más profundos para tratar de resolver la naturaleza de las células progenitoras pluripotenciales que intervienen en la regeneración del epitelio. Nuestros estudios con el anticuerpo PCNA -antígeno de proliferación celular- han dado resultados positivos solamente en las células basales claras, lo que estaría indicando la fenómenos de división en estas células. Por otro lado, no hemos hallado inmunoreactividad con este anticuerpo en ningún otro tipo celular del epitelio olfatorio.

DUCTOS DE LAS GLANDULAS DE BOWMAN

Las células de los ductos de las glándulas de Bowman presentan gránulos de secreción. No hemos observado mecanismos secretorios en estas células. Las células acinares de las glándulas de Bowman y las células ductales presentan muchas características comunes, especialmente en cuanto a al aspecto al ME de los gránulos secretorios y a la presencia de microvellosidades luminales. Es posible que las células ductales represente una modificación de las células glandulares para formar el conducto. Por otra parte, es probable que la secreción de las células ductales modifique de alguna manera las características de las secreciones de las glándulas de Bowman o que simplemente la secreción proveniente de estas glándulas se modifique en la superficie del epitelio, ya que nuestros estudios histoquímicos con lectinas demuestran una afinidad diferente entre las células glandulares y el mucus que recubre el epitelio. Evidencia de actividad secretora se ha observado en las células ductales de ratones, perros y conejos (Breipohl, 1972; Yamamoto, 1976). Por otro lado se ha observado que las células ductales de los marsupiales no presentan ningún indicio de actividad secretora (Kratzing, 1984).

NERVIOS OLFATORIOS

La relación anatómica entre los axones olfatorios y las células de Schwann que los envuelven, nunca va más allá de lo que podría ser considerado un estado embrionario. Los axones pequeños en estadios de desarrollo se halla aún agrupados en paquetes envueltos por procesos de las células de Schwann (Peters *et al.*, 1991). El hecho de que la relación permanezca inmadura concuerda con la idea que las células no están programadas para vivir mucho tiempo.

Los axones son de calibre muy fino y de diámetro uniforme. En los axones amielínicos de nervios no olfatorios, las fibras individuales están envueltas por células de Schwann, lo que corresponde un axón a un mesoaxón (Peters *et al.*, 1991). En cambio

los axones olfatorios, presentan varios axones por un único mesoaxón (De Lorenzo, 1957). Lo dicho anteriormente implica que los axones están en contacto unos con otros, y que las células de Schwann envían procesos citoplasmáticos que separan los axones en paquetes, en lugar de aislar a cada nervio, como ocurre en los axones amielínicos periféricos (Peters *et al.*, 1991). También a diferencia de otros nervios periféricos no se observa una membrana basal ni fibras colágenas entre los nervios olfatorios. Esta característica se ha observado en los nervios olfatorios y en los nervios vomeronasales (De Lorenzo, 1957; Barber y Lindsay, 1982; Fraher, 1982). Consecuencia de ello podría ser que los cambios de concentración iónica resultante de la actividad de una axón podría reducir la excitabilidad de sus vecinos (Fraher, 1982).

Las células de Schwann que rodean a los nervios olfatorios poseen características inusuales. Además, estas células de Schwann a nivel estructural son similares a los astrocitos (Barber y Lindsay, 1982). Presentan núcleos eucromáticos con escasa heterocromatina y procesos citoplasmáticos claros a los electrones en los cuales es común observar filamentos intermedios y gránulos de glucógeno, características que comparten con los astrocitos (Barber y Lindsay, 1982; Peters *et al.*, 1991). Por otro lado, también hemos comprobado que el citoplasma de las células de Schwann que rodean a los axones olfatorios de los armadillos presentan una proteína inmunoreactiva para el péptido ácido presente en la glia (GFAP) (datos no presentes en esta tesis). GFAP ha sido hallado en astrocitos y glia de Bergman (Bignami *et al.*, 1972). Estos datos concuerdan con los hallados por otros autores en los nervios olfatorios (Barber y Lindsay, 1982; Vollrath *et al.*, 1985; Hoolbrook *et al.*, 1995). La presencia de una proteína inmunoreactiva para GFAP y las características antes mencionadas podrían relacionar a estas células de Schwann con los astrocitos más que con otras células de Schwann (Barber y Lindsay, 1982).

Los hallazgos que las células de Schwann no son las típicas halladas en otros nervios periféricos podrían resultar interesantes en relación con las actividades regenerativas de los nervios olfatorios y vomeronasales (Barber y Lindsay, 1982; Dryer y Graziadei, 1994).

GLANDULAS DE BOWMAN

La clasificación de las glándulas de Bowman, en cuanto a su carácter de mucosa o serosa, resulta bastante complicado. Las designaciones de mucosa y serosa pueden hacerse en base a las características histoquímicas (Mochizuki *et al.*, 1982), o en base a la ultraestructura (Spicer *et al.*, 1982). Los acinos serosos presentan núcleos redondos, lumen angosto, canalículos intracelulares, abundante retículo rugoso basal y gránulos electrón denso discretos, pero a su vez presentan una respuesta muy débil a la reacción de PAS y no reaccionan con la tinción de AB (Spicer *et al.*, 1981; Sakai, 1989). Los acinos mucosos presentan núcleos desplazados hacia la base y aplanados, gránulos claros a los electrones grandes y confluyentes e histoquímicamente son fuertemente PAS positivas (Spicer *et al.*, 1982; Sakai, 1989). Sin embargo se han clasificado además tipos glandulares intermedios, pudiéndose diferenciar además, de los tipos serosos y mucosos dos tipos más: acinos seromucosos y serosos especiales. Las células serosas especiales presentan características histológicas e histoquímicas de las células serosas pero al ME sus gránulos se observan débilmente electrón densos. Presentan escasa cantidad de retículo endoplasmático rugoso en la región basal (Wilborn y Shackleford, 1971; Sakai, 1989). Las células seromucosas presentan características similares a las células mucosas, pero al ME sus gránulos son fuertemente electrón denso (Sakai, 1989).

Las glándulas de Bowman de los armadillo son tubuloacinares simples ramificadas. La presencia de glándulas ramificados se ha observado únicamente en las células glandulares oscuras de los ratones (Frisch, 1967). Histológicamente e histoquímicamente presentan características similares a las halladas en otras especies de vertebrados (Frisch, 1967; Kratzing, 1969; Getchell y Getchell, 1977; Getchell *et al.*, 1984; Ferri y Liquori, 1989; Getchell y Getchell, 1992). A diferencia de los que ocurre en *Chaetophractus villosus*, *Dasyus hybridus* presenta especializaciones laterales y basales como las halladas en marsupiales, ratas, perros, gatos, murciélagos y ratones (Getchell y Getchell, 1992).

Los estudios de ME demuestran que las células acinares -tanto las de apariencia mucosa como las de apariencia serosa- presentan características tanto de células mucosas como de células serosas. Al MO no se diferencian los tipos celulares descriptos

anteriormente al ME, lo cual nos dificulta enormemente correlacionar los estudios histoquímicos con lo observado al ME y por lo tanto no es posible dar una clasificación basada en caracteres morfológicos e histoquímicos.

Una característica importante de remarcar es la presencia de una enorme cantidad de retículo endoplasmático liso en el citoplasma de las células acinares de apariencia mucosa. La presencia de una importante cantidad de retículo liso también la hemos descrito en el citoplasma apical y en las protusiones de las células de sostén. El retículo endoplasmático liso predomina en células productoras de triglicéridos colesterol y hormonas esteroideas. Pero, además, el retículo endoplasmático liso -como ocurre en las células hepáticas- juega un papel importante en la síntesis de enzimas que intervienen en el metabolismo y detoxificación de drogas (De Robertis y De Robertis, 1984; Fawcett, 1993b). Se han realizado numerosos trabajos sobre la actividad en la mucosa nasal de enzimas xenobióticas (Shapiro, 1970; Hadley y Dahl, 1982; Asanuma y Nomura, 1991). La actividad de la enzima citocromo P-450 excede a la del hígado cuando se normaliza al contenido de proteínas en el tejido (Hadley y Dahl, 1982)

La secreción parece liberarse mediante un mecanismo de secreción merocrina compuesta (Douglas, 1978). El mecanismo de secreción de las glándulas de Bowman no se ha estudiado sistemáticamente a nivel ultraestructural. La presencia de secreción merocrina se describió únicamente en la rana toro (Getchell y Getchell, 1992).

En *C. villosus* se ha observado, además, la presencia de lo que podría considerarse un tipo de secreción apocrina. La secreción apocrina se describió en la región basal de las células acinares del conejo y las células serosas de las glándulas de Bowman del hombre (Yamamoto, 1976; Lucheroni *et al.*, 1986). Estructuras similares a las halladas en las glándulas de Bowman del armadillo se han observado en las células de sostén del epitelio -indicando también un tipo de secreción apocrina-. La similitud entre las células del epitelio y las células glandulares podría explicarse por la posibilidad del epitelio de regenerarse a partir de las glándulas de Bowman, lo cual se explica por las propiedades epiteliales que mantienen las glándulas de Bowman (Taniguchi *et al.*, 1996). Por otro lado, Matulionis (1975) reportó la regeneración del epitelio olfatorio a partir de las glándulas de Bowman luego de su destrucción con ZnSO_4 .

Los estudios anatómicos de la mucosa olfatoria demuestran un sorprendente grado de similitud entre las diferentes especies de vertebrados. Esta característica también se atribuye a las glándulas de Bowman. Sin embargo, tanto el epitelio como las glándulas de Bowman de los armadillos presentan características -especialmente a nivel de mecanismos secretorios- diferentes a la mayoría de las especies estudiadas. Por lo tanto, sería necesaria la realización de estudios estructurales utilizando agonistas que induzcan la secreción, para tratar de clarificar los mecanismos secretorios del epitelio y de las glándulas de Bowman.

CAPITULO IV

Estudio neuroanatómico de Dasypus hybridus

EL SISTEMA NERVIOSO DE LOS ARMADILLOS

ANTECEDENTES HISTORICOS

Los Edentados comprenden un grupo muy heterogéneo, cuyos miembros poseen particularidades somáticas que los nuclea como un grupo con caracteres particulares y diferentes a otros mamíferos. Por lo tanto, es de esperar que su sistema nervioso, también, posea características distintivas.

Uno de los primeros estudios sobre el sistema nerviosos de los Edentados fue realizado por Elliot Smith en 1898. En el trabajo se describen las características macroscópica más sobresalientes de varias especies de Edentados tales como: *Orycteropus sp*, *Myrmecophaga sp*, *Tamandua sp*, *Bradypus sp*, *Dasypus sexcinctus*, *Chlamydophorus truncatus*. Aparecen, de este modo, las primeras descripciones sobre la anatomía del sistema nervioso de algunas especies de armadillos.

Los estudio relacionados con el sistema nervioso de los armadillos son muy escasos. Con respecto a la neuroanatomía del armadillo de nueve bandas (*Tatusia novemcincta*), Shuddemagen (1907) es la primera autora en realizar un detallado estudio macroscópico del cerebro y la médula espinal con particular énfasis en la apariencia del encéfalo, sus comisuras primarias, ventrículos y nervios. En ese estudio, también, observa la similitud del cerebro con el de los mamíferos inferiores.

En 1932, Papez, estudiando los núcleos talámicos de *T. novemcincta*, compara el cerebro de este armadillo con el de los del género *Insectivora* en los cuales su organización nerviosa se basa fundamentalmente en sensibilidades olfatorias, trigeminales y propioceptivas. Además, describe el cerebro anterior formado por un corto rinencéfalo con centros olfatorios bien desarrollados, rodeados por un neopalio pequeño y rudimentario. La fisura rinal, que consiste de dos partes, está ubicada sobre la superficie lateral, como en algunos insectívoros. Los ojos y los nervios ópticos, por otra parte, están reducidos. En cuanto al tálamo, propone que estos animales, siendo particulares en muchos aspectos, estas características distintivas se reflejan en la organización de los núcleos talámicos. Debido al escaso desarrollo del neopalio y de su

aparato visual, el armadillo posee un tálamo reducido en tamaño y en complejidad, lo cual representa el patrón de los mamíferos en su forma más simple, comparable a la rata, la zarigüeya y los insectívoros. Esta reducción del tálamo afecta casi exclusivamente al tálamo dorsal y esto se correlacionaría con la reducción de las conexiones tálamo-corticales y del neocortex. El epitálamo, hipotálamo y subtálamo están bien desarrollados como en otros animales macrosmáticos.

Howe (1933), estudió el diencefalo del armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcincta texana*). A grandes rasgos describe el cerebro como del tipo de los roedores. El neopallio es escaso y poco desarrollado. Las porciones olfatorias basales del telencéfalo, el bulbo olfatorio, el tubérculo olfatorio y el lóbulo piriforme están bien organizadas. Paralelamente al pequeño tamaño de los ojos, los tractos ópticos y las conexiones centrales están muy reducidas. Por otra parte, el tamaño del nervio trigémino podría ser correlacionado con el alto desarrollo de la sensibilidad táctil, tanto en su nariz como en la lengua, lo cual le permite al animal alimentarse de insectos y otros invertebrados pequeños. Además, describe los tubérculos cuadrigéminos inferiores mucho más grandes que los superiores, y el cuerpo geniculado medial como una protuberancia macroscópica sobre el tálamo posterior, mientras que el cuerpo geniculado lateral no puede ser observado de esta forma. Esto se lo atribuye a un mayor desarrollo del sistema auditivo.

Además de los trabajos mencionados anteriormente sobre el armadillo de nueve bandas, las estructuras anatómicas del cerebro de los edentados también han sido objeto de varias publicaciones.

En 1943, Crosby y Woodburne analizaron el patrón nuclear de las porciones no tectales del cerebro medio y del istmo. Estudios más recientes describen otras porciones del sistema nervioso de los armadillos. En 1970, Harting y Martin, estudiaron el patrón de proyecciones neocorticales a la protuberancia y a la médula sobre cerebros de armadillos (*D. novemcinctus*) sujetos a ablaciones neocorticales. Por otro lado, Royce y col. (1975) estudió la arquitectura cortical del armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus mexicanus*). Way (1963), realizó un estudio comparativo del aparato olfatorio de tres edentados (dos osos hormigueros y un armadillo), en el cual se destaca la presencia de un enorme bulbo olfatorio y un gran desarrollo de los tractos olfatorios y del núcleo olfatorio anterior.

Jakob (1913), en Argentina, mencionó algunas características de los armadillos y en 1943, estudió el sistema nervioso del "pichiciego". Allí demostró que el rinencéfalo representa más de la mitad de su encéfalo entero (casi las dos terceras partes) y con respecto al cerebro de este animal tan particular dice: "*Afirmaremos que el encéfalo de *Clamydophorus truncatus* es del todo comparable al del hombre; no le falta absolutamente nada, ni un núcleo, ni un nervio periférico, ni un sistema o ganglio subcortical o central: tiene todos los haces y centros inferiores y superiores y sólo en cuanto al tamaño y cantidad de los elementos existen enormes diferencias*".

El epitálamo de los armadillos ha sido objeto de numerosos estudios, debido a la peculiar característica de carecer de una glándula pineal discreta. Estos trabajos examinaron el epitálamo embriones de armadillos de la especie *D. novemcinctus*, neonatales y adultos para constatar la presencia de un tejido semejante al de la glándula pineal. Los resultados hallados fueron que no existe un tejido similar a la glándula pineal en el epitálamo de los armadillos (Creutzfeldt, 1912; Oksche, 1965; Wurtman *et al.*, 1968; Hofer *et al.*, 1976; Phillips *et al.*, 1986; Benítez *et al.*, 1994). Cabe aclarar que el cerebro adulto de estos animales está dominado por un órgano subcomisural muy desarrollado, el cual se halla enteramente rodeado por la comisura posterior (Phillips *et al.*, 1986).

En 1994, Benítez *et al.*, realizaron una descripción de las características principales del encéfalo de *Chaetophractus villosus* (peludo). En él se hallaron características sobresalientes como ser: gran desarrollo de los bulbos olfatorios y los tubérculos olfatorios, elevada posición de la fisura rinal sobre la cara lateral de los hemisferios, ausencia de glándula pineal discreta, gran desarrollo del hipocampo y del *induseum griseum*.

Se han realizado estudios sobre el sistema nervioso de otros edentados. Entre ellos, Smith (1932) estudio el cuerpo estriado, la amígdala y la *estria terminalis* de *Tamandua tetradactyla*. Este trabajo presenta, además, una breve descripción de la anatomía macroscópica del cerebro de este animal. Kaelber (1966) analizó la configuración nuclear de *Tamandua tetradactyla* y *Myrmecophaga jubata* y por último, Gerebtzoff y Goffat (1966) realizaron un estudio de la corteza del perezoso (*Choloepus hoffmanni* Peters).

Hasta la fecha no se ha realizado un estudio neuroanatómico en la especie *D. hybridus*. Debido a las características de la especie, mencionadas anteriormente, consideramos que una guía neuroanatómica sería necesaria para estudios farmacéuticos, veterinarios y otras investigaciones del tipo biomédico, tales como registros fisiológicos, intervenciones quirúrgicas, estudios neurobiológicos, etc.

MATERIALES Y METODOS

4.1- PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Existen numerosas técnicas para la tinción del sistema nervioso. Dentro de las clásicas figuran, para cortes de parafina, la técnica de Nissl y la de Klüver-Barrera. Aunque ambas técnicas son muy utilizadas en los laboratorios, cada libro de técnicas menciona una variante distinta de los procedimientos originales de Nissl (Ramon and Cajal, 1972) y de Klüver y Barrera (1953). Acerca de la técnica de Nissl (Luna, 1968; Ramon and Cajal, 1972; Carson, 1980; Lowe and Cox, 1990) estas requieren o un largo tiempo de acción del colorante o mezclas diferenciadoras complejas y costosas. En esta primera parte del trabajo nos dedicamos a poner a punto ambas técnicas y mediante ensayos de prueba y error se introdujeron algunas modificaciones a las mismas. Se propone una solución de Nissl diferente de acción rápida y de fácil diferenciación. Tanto el Klüver como el Nissl utilizan como colorante del soma neuronal diferentes concentraciones de violeta de cresilo. Se ha utilizado la misma solución de violeta de cresilo para ambas técnicas.

Con respecto al procesamiento del sistema nervioso, sin considerar a la tinción, se han encontrado una serie de dificultades:

- 1- Hallar una técnica de fijación correcta para las tinciones.
- 2- Los libros de histotecnología tratan en capítulos específicos, la deshidratación y la correcta impregnación de diferentes tamaños de tejidos. Sin embargo, el sistema nervioso no se ajusta a los tiempos requeridos para otros tejidos de similares tamaños. Los problemas de una mala inclusión se expresan en secciones histológicas friadas o de diferente grosor. El trabajo requiere un análisis seriado completo del cerebro. Poner a punto el método de inclusión era fundamental para obtener buenos resultados. Mediante diferentes pruebas se ha puesto a punto dicho procesamiento no solo para el análisis del cerebro requerido por nuestro trabajo, sino que también se ha ensayado en el tejido nervioso de peces, anfibios, reptiles y mamíferos.
- 3- Los cortes debían adherirse firmemente al portaobjetos durante las diferentes etapas de las tinciones. La adición mediante la albúmina de Mayer no era suficiente, algunos

cortes se despegaban fácilmente del portaobjetos en uno de los pasos de la tinción, siendo imposible hacer un análisis exhaustivo de un seriado completo. Se realizaron pruebas de ensayo y error de numerosos métodos aditivos. Uno de ellos resultó exitoso.

5- La tinción se desvanecía con el tiempo. Tanto en investigación como en instituciones de enseñanza, es importante que la coloración de los preparados dure muchos años sin desmerecimiento de la tinción. Las resinas naturales como el bálsamo de Canada son ácidas y preservan mal los colorantes compuestos por anilinas básicas como el violeta de cresilo (Lillie *et al.*, 1953). En nuestra experiencia, el uso de resinas sintéticas como el DPX para secciones de un grosor mayor a los 15 μ m produce con el tiempo retracción de la resina y entrada de aire entre el cubre y el portaobjetos. El medio de montaje Eukitt presenta características notables: es sumamente soluble en xilol, endurece rápidamente (20 min.) sin la formación de burbujas. Posee un buen índice de refracción en estado líquido de 1.510 (Sheehan y Hrapchak, 1980). El uso del mismo ha dado excelentes resultados.

ETAPAS PREPARATORIAS:

FIJACION: Una óptima fijación fue obtenida por perfusión intracardiaca de los animales con la mezcla de Bouin o con una solución de formol bufereado (ver apéndice). Se inicia la perfusión con 50-100ml de solución salina lavadora cada 100 g de peso corporal (solución salina 0.9% NaCl para mamíferos, 0.65% NaCl para animales de sangre fría). El momento en que un líquido transparente fluye por la aurícula derecha es indicio que se ha lavado la casi totalidad de la sangre y que puede continuarse la perfusión con el líquido fijador. El fijador consta de 200-250 ml de la mezcla fijadora cada 100 g de peso corporal. Luego de dejar el tejido nervioso in situ toda la noche procedemos a tomar las muestras. El animal perfundido puede dejarse en la mezcla de Bouin por varios días o semanas, sin que se observe endurecimiento de los tejidos. A veces, este procedimiento resulta ventajoso como solución descalcificadora, lo que hace más fácil la disección del cráneo o los arcos dorsales de las vértebras.

IMPREGNACION Y SECCION DE LOS BLOQUES DE PARAFINA

De los numerosos métodos ensayados, el procedimiento de Ramón y Cajal y Castro (1972) nos ha dado los mejores resultados.

- 1- Lavar las piezas en agua corriente toda la noche.
- 2- Deshidratar mediante la transferencia gradual de las piezas desde alcohol 70% hasta alcohol absoluto (Tabla 1).
- 3- Las piezas se sumergen en una mezcla de alcohol absoluto y cloroformo (50:50 v/v). Esta mezcla debe ser realizada de la siguiente forma: colocar alcohol absoluto en un frasco. Con la ayuda de una pipeta agregar lentamente la misma cantidad de cloroformo en el fondo del frasco. Como resultado se forman dos capas: una superior de alcohol 100% y una inferior de cloroformo. Esta mezcla puede utilizarse una vez al día ya que ambas capas se mantienen separadas durante un corto periodo de tiempo. El volumen necesario a preparar depende del tamaño de la pieza y debe cubrir totalmente a la misma. Al colocar la pieza en la mezcla ésta permanece en la capa alcohólica superior. Cuando la pieza se hunde en la capa clorofórmica se transfiere a cloroformo puro. Los tejidos pueden ser abandonados en cloroformo durante 12 horas sin que se afecte la consistencia de los mismos. Desafortunadamente, el cloroformo no afecta el índice de refracción de los tejidos, lo que hace difícil determinar cuando el tejido está completamente aclarado. Sin embargo, esto es asegurado dejando las piezas en cloroformo durante toda la noche.
- 4- Transferir el tejido a una solución concentrada de parafina en cloroformo a 37°C (ver tabla 1). Trasladar el tejido desde el agente aclarante al primer baño de parafina (56-58°C) y luego al segundo baño de parafina (56-58°C) según la Tabla 1.

Tabla 4.I: Tiempo (en horas) del procedimiento de inclusión.

	70%	96%	100% I	1100% II	C-100 ^a	C ^b	C-P ^c	P1 ^d	P2 ^e
Cerebro de Pez	0.5	0.5	0.5	0.5	*	12	1	2	2
Cerebro de rata	7	5	4	4	*	12	3	12	4
Cerebro de <i>D.hybridus</i>	14	9	8	8 o	*	12	7	12	12

^a Mezcla Cloroformo-alcóhol 100%.

^b Cloroformo puro

^c Cloroformo-parafina

^d Primer baño de parafina

^e Segundo baño de parafina

* Toda la noche

5- Tallado del bloque (Mahoney, 1966). Antes de realizar las secciones el bloque de parafina debe ser tallado mediante el uso de gilletes o cuchillas descartables usadas. El bloque debe ser tallado de tal forma que cuando las tiras de secciones se monten sobre el porta queden todas correctamente orientadas al ser observadas en el microscopio (Fig. 4.1). Nótese que las dos superficies del bloque AB y DC, son paralelas y cuando se coloca el bloque en el micrótopo también deben ser paralelas al filo de la cuchilla. El lado BC se tallará de tal forma que forme un ángulo que por ejemplo indique el lado posterior de la pieza además de indicar claramente la unión entre cada sección individual de la tira de cortes. Siempre conviene dejar un margen de parafina alrededor del espécimen.

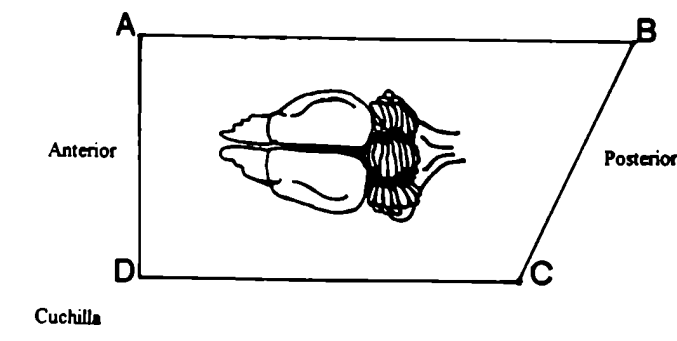


FIGURA 4.1. Esquema adaptado de Mahoney (1966)

6- Adhesión de los cortes al portaobjetos. El siguiente método puede ser utilizado tanto para adherir cortes seriados como individuales (Pappas, 1971). Un número suficiente de portaobjetos, tanto usados como nuevos, deben ser lavados toda la noche en una solución sulfocrómica, luego se lavan toda la noche en agua corriente y se enjuagan en agua destilada antes de ser inmersos en la solución de gelatina. Esta solución se prepara del siguiente modo: disolver completamente en 100 ml de agua destilada caliente 1 g de Nutrient gelatin (Merck) o gelatina sin sabor (Sigma o Merck); luego agregar 0,1g de alumbre de cromo (Sulfato cromo potásico. $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Se deja enfriar y se filtra. La solución puede ser almacenada durante 48hs. a 5°C y luego debe ser descartada. Luego de sumergir los portaobjetos en la solución de gelatina deben ser almacenados verticalmente en un lugar libre de polvo. Es importante que los portaobjetos no se sequen entre el lavado y la inmersión en la gelatina, debido a que la solución de gelatina no se adhiere correctamente a los portaobjetos secos.

Las secciones de parafina se estiran y se orientan haciéndolas flotar en un baño de agua destilada caliente (preferentemente termostáticamente controlado), que se mantiene a 10°C por abajo del punto de fusión de la parafina utilizada. Luego se adhieren por tensión superficial a los portas secos cubiertos con gelatina.

7-TINCIÓN

a) MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE BURK (1969): Mediante el uso de esta tinción se observan los grumos de Nissl y las formas celulares.

- 1- Secciones de parafina de 15-20mm.
- 2- Desparafinar las secciones en xilol, hidratar con concentraciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada.
- 3- Teñir durante 3 a 5 minutos en la solución de violeta de cresilo (ver apéndice).
- 4- Lavar en agua corriente o destilada 1min.
- 5- Diferenciar en alcohol 96°. La diferenciación debe ser chequeada bajo microscopio, hasta obtener coloreados los grumos de Nissl y el nucléolo en violeta. Si la diferenciación es sumamente lenta agregar algunas gotas de ácido acético al 1% en el alcohol 96° para acelerar el proceso. Es importante asegurarse de que no queden restos ácidos pasando los portaobjetos por alcohol 96° sin ácido antes de deshidratar completamente.
- 6- Alcohol 100% 1min., aclaración en xilol y montaje en Eukitt. Si se quiere diferenciar varios preparados antes del paso 6 puede detenerse la diferenciación colocando los portas en agua destilada, luego se los pasa rápidamente por alcohol 96° y se continua con el paso 6.

Resultados: grumos de Nissl, heterocromatina y nucléolo en violeta.

b) MODIFICACIÓN DE LA TINCIÓN DE KLÜVER Y BARRERA (1953). Tinción de la mielina con luxol fast blue y de las neuronas con el Nissl modificado.

- 1- Secciones en parafina de 15-20mm.
- 2- Desparafinar las secciones en xilol y llevarlas hasta alcohol 96°.

3- Teñir en la solución de Luxol Fast blue (ver apéndice) a 58°C toda la noche o 1 minuto a 350W (Medium) en un microondas de uso doméstico con bandeja rotatoria (Daewoo, Mod. KOR-6005, con una potencia máxima de 700W). Al usar el microondas, se deben colocar solamente 5 portaobjetos colocados verticalmente en recipientes para 20 portaobjetos con 150 ml de solución. Los recipientes se colocan en el centro de la bandeja, que debe contener un recipiente adicional con agua. La temperatura de la solución medida inmediatamente luego de la irradiación fue de 62-63° C.

4- Cuando la solución se enfrie, lavar el exceso de luxol colocando los cortes en alcohol 96°.

5- Lavar con agua destilada.

6- Comenzar la diferenciación con una inmersión homogénea y rápida de los portaobjetos en una solución saturada de carbonato de litio. Si la diferenciación es muy rápida utilizar una solución de carbonato de litio al 0.05%.

7- Sumergir en agua destilada hasta que la primera diferenciación con carbonato de litio finalice por completo. Observar con microscopio que la sustancia blanca permanece azul y la sustancia gris pasa desde el azul claro a perder el color. Debe tenerse cuidado con la solución de carbonato de litio ya que esta sólo se utiliza para una primera diferenciación grosera, la diferenciación delicada se realiza en alcohol 70%. Colocar los cortes en alcohol 70% y bajo microscopio detener la diferenciación en agua destilada cuando la sustancia gris pierde completamente el color.

10- Teñir con la coloración de violeta de cresilo como en la técnica modificada de Burk.

Resultado: mielina en azul, grumos de Nissl, heterocromatina y nucléolo en violeta.

APENDICE:

Solución de Luxol Fast Blue:

Luxol Fast Blue (MBS)	1g.
96 % alcohol	100ml.
10 % ácido acético	0.5ml.

Mezclar y filtrar antes de usar. Esta solución es muy estable y puede utilizarse alrededor de un año (Ramon y Cajal y De Castro, 1972).

Solución de violeta de cresil:

Violeta de cresilo (Kresylviolett-Merck)	0.1g.
Agua destilada	50ml.
Buffer acetato 0.2M pH 3.6	50ml.

Disolver el violeta de cresilo en el agua destilada. Agregar el bufer acetato. Esta solución es muy estable puede usarse durante 5 meses dando excelentes resultados.

4.2- PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.

Se utilizaron ejemplares machos y hembras de *Dasypus hybridus* (1.300 - 1.800 Kg.). Los animales se anestesiaron con Clorhidrato de Ketamina (40mg/kg) por vía intramuscular y Tiopental sódico (60mg/kg) por vía intraperitoneal. Luego de la apertura de la cavidad torácica los animales fueron inyectados en forma intacardiaca con 0.5ml de heparina y 0.5ml de nitroprusiato de sodio (2.4%). A continuación se los perfundió, por aorta, con solución fisiológica (0.9%), seguido por liquido de Bouin como fijador.

Luego de la perfusión se expone el cerebro y se lo deja "*in situ*" una semana aproximadamente en formol. Al cabo de ese tiempo se extrae el cerebro y la médula.

Los cerebros fueron procesados de acuerdo a la descripción detallada anteriormente. Las secciones se tiñeron alternativamente con cresyl violeta y con el método de Klüver-Barrera modificado. Las vainas de mielina se colorean de azul, mientras que los cilindros permanecen sin colorear y las células nerviosas se tiñen de violeta.

4.3- FOTOGRAFÍA DE LAS SECCIONES HISTOLÓGICAS

Las fotografías fueron realizadas con un microscopio REICHERT POLIVAR 2.

4.4- NOMENCLATURA

La nomenclatura figura con los nombres tradicionales y entre parentesis aparece su equivalencia según la Terminología Anatómica adoptada por el Comité de Nomenclatura Anatómica Internacional (1966).

RESULTADOS

4.1. PESO Y MEDIDAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

4.1.1. En la siguiente tabla se exponen los pesos corporales y del Sistema Nervioso¹.

Tabla 4.I: Características morfométricas del SNC de *Dasypus hybridus* (en gs)

	Macho1	Macho 2	Hembra 1	Hembra 2	Hembra 3	Hembra4
Peso corporal	1800	1900	1600	1380	1210	1.390
Peso del SNC.	9.393	10.104	9.857	10.320	--	7.88
Peso del cerebro	6.127	6.984	6.483	6.902	5.026	3.67
Peso del cerebro/peso corporal	0.0034	0.0037	0.004	0.005	0.0041	0.0026

¹Los valores han sido tomados de cerebros fijados.

4.1.2. En la siguiente tabla se exponen algunas características del cerebro de *D. Hybridus*.

Tabla 4.II Características morfométricas del encéfalo de *Dasytus hybridus* (en cm)

	Macho 1	Macho 2	Hembra 1	Hembra 2	Hembra 3	Hembra 4
Largo total ¹	25	25.5	21.9	22.9	--	17
Largo del encéfalo ²	3.76	4.12	4.10	3.97	3.15	3.1
Largo del cerebro	1.94	2.01	1.74	2.71	1.95	2.19
Ancho del encéfalo	2.43	2.49	2.2	2.25	2.24	2.08
Largo de los bulbos olfatorios	0.79	0.8	0.7	0.81	0.5	0.52

¹ El largo se midió desde el extremo rostral de los bulbos olfatorios hasta el fin del cono medular

² El largo del encéfalo se midió desde el extremo anterior de los bulbos olfatorios hasta la emergencia del primer nervio espinal

4.2. CONSIDERACIONES MACROSCOPICAS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El examen *in situ* del encéfalo y de la médula espinal que se encuentra en las figuras 4.2 y 4.3, permite una primera impresión de como los huesos y las meninges sostienen y protegen al sistema nervioso central. La extremidad anterior del cerebro se halla en un plano que cruza al cráneo directamente en frente de los ojos. Los huesos occipital, interparietal, parietal y frontal deben ser retirados para lograr una buena visión de la superficie dorsal del cerebro. Para la completa remoción del mismo, sin causar ningún tipo de laceración se debe retirar los restos de hueso de los laterales.

Debido a la profunda inserción de los bulbos olfatorios en las placas cribiformes del etmoides, del paraflóculo en la cápsula preótica, y de la hipófisis en una fosa profunda enteramente rodeada de duramadre, todas estas estructuras debieron ser disecadas con extremo cuidado.

VISTA DORSAL

En una vista dorsal (Fig. 4.4, 4.7A), se observa que el cerebro tiene forma de pera con el ápice en dirección rostral. La característica más sobresaliente del cerebro de *D. hybridus* es el notable desarrollo de los bulbos olfatorios. Estos presentan una forma triangular. Se relacionan con el resto del encéfalo a través de un corto pedúnculo olfatorio, que no aparece en vista dorsal, de esta manera el bulbo se pone en contacto con el lóbulo frontal.

Los hemisferios cerebrales constituyen la mayor parte del encéfalo. La superficie cerebral carece de circunvoluciones, a excepción de las fisuras rinales anterior y posterior. Aunque las fisuras rinales existen podemos concluir que presentan un hemisferio del tipo lisencefálico. Los hemisferios cerebrales se presentan como estructuras bilateralmente simétricas y se hallan separados por una cisura longitudinal, la cisura interhemisférica. Los colículos cuadrigéminos están cubiertos por la extensión posterior de los hemisferios. En el extremo caudal, una profunda cisura transversa -ocupada por duramadre formando el tentorio del cerebelo- separa el cerebro del cerebelo.

VISTA VENTRAL

Anteriormente se observan nuevamente los bulbos olfatorios prominentes, que representan aproximadamente el 30% del largo total de los hemisferios (Figs. 4.5, 4.7B). Una banda de sustancia blanca -el tracto olfatorio lateral- se extiende lateralmente a los

tubérculos olfatorios. El tubérculo olfatorio representa una masa de sustancia gris de gran tamaño y superficie muy irregular que protruye ventralmente. El lóbulo piriforme se extiende en dirección ventro-caudal y constituye una gran parte de la porción ventral del hemisferio. Dorsalmente se halla rodeado en toda su extensión por la fisura rinal, que lo separa del lóbulo no olfatorio o neocortex. En la línea media, se hallan las dos ramas de los nervios ópticos, de tamaño muy reducido debido probablemente al escaso desarrollo de los ojos. El extremo posterior de estos nervios se une para formar el quiasma óptico, que luego se bifurca para formar el tracto óptico con dirección caudal y dorsal. Inmediatamente detrás del quiasma se halla la hipófisis, que se halla unida a la base del cerebro por el infundíbulo. Como la hipófisis fue removida para una mejor visualización de las estructuras, el infundíbulo ha sido cortado y su cavidad se distingue como una pequeña hendidura que se abre dorsalmente al tercer ventrículo. Esta hendidura está rodeada por una pequeña elevación de sustancia gris, el tuber cinereum, el cual se continua con el cuerpo mamilar, una masa poco conspicua que se proyecta postero-ventralmente.

Los pedúnculos cerebrales, que se observan como dos gruesas bandas divergentes, rodean la superficie interna la fosa interpeduncular. El límite caudal de los pedúnculos está representado por la protuberancia.

Ventralmente solo se observa las partes más laterales del cerebelo. Caudalmente se observa el tronco cerebral con protuberancia, bulbo y médula espinal hasta la emergencia de los primeros pares cervicales.

VISTA LATERAL

La superficie lateral (Fig. 4.6, 4.7C) muestra anteriormente los grandes bulbos olfatorios, que se continúan con los tractos olfatorios laterales y con los tubérculos olfatorios. Lateralmente se observa, además, la enorme superficie ocupada por el lóbulo piriforme y se lo puede comparar con la pequeña porción de neocortex visible desde esta vista. El límite superior de la corteza piriforme está indicada en toda su extensión por la fisura rinal, que separa la superficie del neocortex del lóbulo piriforme.

Se diferencia una fisura rinal anterior y una fisura rinal posterior. La fisura rinal anterior, menos conspicua, comienza en el surco que se forma entre los bulbos olfatorios y el ápice del palio y se dirige hacia atrás horizontalmente. La fisura rinal posterior, mucho más marcada que la anterior, se extiende por sobre la mitad superior y ocupando los dos tercios posteriores de la superficie lateral de los hemisferios. Esta fisura presenta una leve curvatura cuya convexidad es ventral y también se dirige en dirección dorsal hacia el polo caudal del cerebro.

4.3. CONSIDERACIONES MICROSCOPICAS

La figura 4.8 muestra los niveles de las secciones transversales que se muestran en las figuras 4.9 a 4.20.

4.3.1. TELENCEFALO

4.3.1.1. PARTE OLFATORIA PRIMARIA

D. hybridus presenta los centro olfatorios primarios masivamente desarrollados, lo cual coincide con su clasificación como animal macrosmático (Grassé, 1955).

Los bulbos olfatorios (*bulbus olfactorius*) (Fig. 9) representan un alargamiento del extremo rostral del telencéfalo. Está constituido por siete capas, cuatro de las cuales contiene células y las tres restantes están formadas por fibras. Las capas, de afuera hacia dentro, según la nomenclatura de Cajal (1902), son (Fig. 4.10B, 4.29):

- a) capa fibrosa (Fig. 4.29A)
- b) capa glomerular (Fig. 4.29B)
- c) capa plexiforme externa (Figs. 4.29B, C)
- d) capa de células mitrales (Figs. 4.29 C, D)

e) capa plexiforme interna (Figs. 4.29D)

f) capa granular interna (Figs. 4.29 E, F)

g) lámina medular (Fig, 4.29F)

Desde la cavidad nasal pasan a través de los orificios de la lámina cribiforme delicados fascículos de fibras amielínicas y penetran en la superficie ventral del bulbo (Fig. 4.29A). Estos filetes son las prolongaciones de las células receptoras bipolares de la mucosa olfatoria y constituyen colectivamente el nervio olfatorio.

Así, el bulbo recibe fibras aferentes provenientes de las células olfatorias que se hallan en la mucosa nasal, que constituyen, como veremos más adelante, parte del sistema olfatorio periférico. Estas fibras forman la primera capa denominada lámina fibrosa. Penetrando en la superficie anterior y ventral del bulbo, estas fibras amielínicas terminan en la segunda capa, la capa glomerular, donde participan en la formación de los glomérulos olfatorios. Estos son pequeños penachos de terminaciones nerviosas de los axones olfatorios que se mezclan con neuritas de las células mitrales que forman la tercera capa, la capa plexiforme externa. A esto también se le une la capa de grandes células mitrales de la cuarta capa, la capa de células mitrales. Los axones de las células mitrales pasan a través de la quinta capa, la capa plexiforme interna, hacia la capa granular interna y allí convergen para formar la séptima capa, la lámina medular.

El bulbo olfatorio contiene una cavidad, el ventrículo olfatorio, que se comunica a través del pedúnculo olfatorio con la cavidad de los ventrículos laterales (Figs. 4.9, 4.10, 4.23). Un pedúnculo olfatorio muy corto conecta los bulbos olfatorios a los hemisferios (Fig. 4.22).

En la zona dorsomedial interna de los bulbos olfatorios existe una pequeña estructura de forma triangular, el bulbo olfatorio accesorio (Fig. 4.10A, 4.27C). Esta estructura, descrita por Cajal en 1902, recibiría aferentes del nervio vomeronasal que viene del órgano vomeronasal, según lo observado en rata y zarigüeya. Axones amielínicos del nervio vomeronasal entrarían en el bulbo como un fascículo y terminarían formando glomérulos (Takami y Graziadei, 1991). Debajo de la capa glomerular, se halla la capa plexiforme externa donde se encuentran algunas células mitrales, con intensa tinción alrededor del núcleo, y por debajo la capa plexiforme interna. En la base del bulbo olfatorio accesorio, se encuentra una población de células muy pequeñas intensamente teñidas que forma la capa glomerular (Fig. 4.27). A

diferencia de lo observado en la rata y en *Chaetophractus villosus* (Takami y Graziadei, 1991; Benitez et al., 1994), en *Dasyus hybridus* no se observan paquetes de fibras mielínicas entre la capa plexiforme interna y la capa granular que forma el tracto olfatorio lateral (*tractus olfactorius*) (Fig. 4.12).

El ganglio del nervio terminal se ubica en posición caudal y nedial a los bulbos olfatorios y se lo observa como un conjunto de células típicamente ganglionares (Fig. 4.27A, B).

Los bulbos olfatorios se continúan caudalmente con el tubérculo olfatorio y con la corteza piriforme. Anteriormente al tubérculo olfatorio se diferencia un grupo de neuronas, que forman en conjunto el núcleo olfatorio anterior (Fig. 4.10, 4.11).

El núcleo olfatorio anterior, se ubica entre el bulbo olfatorio y la región septal anterior. En su extremo caudal está limitado por varias masas nucleares. La parte lateral es continua con la corteza piriforme, la parte medial limita con el hipocampo precomisural y el septum, y en su parte ventral limita con el tubérculo olfatorio.

Los sistemas de fibras eferentes forman los tractos olfatorios. Estas fibras olfatorias forman tres ramas: tracto olfatorio medial, intermedio y lateral. El más largo y más conspicuo es el tracto olfatorio lateral, y se extiende en una posición ventrolateral sobre la mitad anterior del hemisferio cerebral (Fig. 4.12). Después de su emergencia del bulbo olfatorio, aumenta su tamaño a medida que avanza caudalmente, probablemente debido al aporte constante de fibras que recibe de la lámina medular.

El tracto olfatorio medial estaría constituido por haces de fibras esparcidos a lo largo de la superficie medial del bulbo y del pedúnculo olfatorio. En otras especies se originaría, según Young, en las células mitrales y se conecta con el hipocampo precomisural, el núcleo medial septal y el tubérculo olfatorio. En contraposición, Allison (1953), encontró que la mayoría de las fibras se conectan con el núcleo olfatorio anterior.

El tracto olfatorio intermedio estaría relacionado con la parte anterior de la comisura anterior. Sus fibras corren paralelas y cercanas a la superficie del ventrículo olfatorio, y converge caudalmente para formar un haz conspicuo que termina en el centro del núcleo olfatorio anterior (Zeman e Innes, 1963).

El tubérculo olfatorio se presenta como una elevación redondeada sobre la superficie ventral del encéfalo ubicado entre el bulbo olfatorio y el quiasma óptico (Fig.

4.11, 4.21, 4.22). La sustancia gris del tubérculo olfatorio tiene un arreglo similar a una "corteza" (Fig. 4.27D). Esta corteza microscópicamente presenta tres capas: el estrato plexiforme externo, el estrato piramidal medio y el grueso estrato polimórfico interno (Fig. 4.27D). El estrato plexiforme externo presenta unas pocas células. El estrato piramidal es una lámina muy festoneada de células piramidales de tamaño de pequeño a mediano. El estrato polimórfico presenta algunas células piramidales y células granulares diseminadas. Las estructura más características del tubérculo olfatorio están representadas por numerosos islotes formados un agrupamiento de células, denominados islotes de Calleja. Estos islotes, generalmente están formados por células granulares (Fig. 4.11, 4.27). En zarigüeya se han descripto también islotes formados por células piramidales de pequeñas a medianas (Loo, 1931). Los islotes de Calleja, de tamaño variable, se encuentran generalmente en el estrato plexiforme externo, aunque también se los pueden hallar en los estrato piramidales y polimórficos.

El núcleo accumbens constituye una gran masa rodeada por el tubérculo olfatorio en su extensión ventral y ventromedial, formando una masa continua alrededor de la proyección ventral del ventrículo lateral (Fig. 4.11).

La corteza piriforme está separada por del neocortex por la fisura rinal. Se ubica en posición ventral (Figs. 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.21). Se distingue como una estructura muy festoneada, formada por una capa de células piramidales de tamaño mediano y rodeada por una banda densamente teñidas que forma parte de el tracto olfatorio lateral.

4.3.1.2- REGIÓN SEPTAL

El área septal, muy conspicua en esta especie, se extiende ventralmente a la rodilla del cuerpo calloso y comprende una masa de sustancia gris que contiene a los núcleos septales (Figs. 4.12, 4.24, 4.25). Anteriormente, el área septal está limitada por el hipocampo precomisural. Posteriormente, está limitada por la comisura fornical. Lateralmente forma la pared medial del ventrículo lateral y dorsalmente se relaciona con el cuerpo calloso.

4.3.1.3- SISTEMA LÍMBICO

Incluiremos aquí las tres partes estructuralmente diferentes que forman el lóbulo límbico: la corteza propiamente dicha, los núcleos subcorticales y los sistemas de fibras que los conectan (Zeman e Innes, 1963).

La parte cortical del sistema límbico está representada por el hipocampo (*hippocampus*). La formación del hipocampo está dividida en dos partes: 1) el hipocampo propiamente dicho y 2) la circunvolución dentada (*fascia dentada*).

1) El hipocampo propiamente dicho, se encuentra plegado en la fisura hipocampal y forma una saliencia en el ventrículo lateral. La superficie ventricular del hipocampo está cubierta por una capa de sustancia blanca, el alveus (*alveus hippocampi*) (Figs. 4.15, 4.16). El alveus se compone de proyecciones de fibras hipocámpicas, las cuales se unen y forman un manojito de fibras en la parte interna de la formación hipocámpica que se denomina fimbria. La fimbria constituye el comienzo del sistema del fórnix (Fig. 4.15, 4.16). La corteza de la formación del hipocampo consta sólo de tres capas: la capa molecular superficial (rica en fibras), la capa de células piramidales y la capa polimórficas, con numerosas células pequeñas.

2) La circunvolución dentada, al igual que el hipocampo propiamente dicho, presenta tres capas: la capa molecular superficial y la capa polimórfica profunda. El estrato medio está formado por una capa de células granulares.

Sobre la superficie superior del cuerpo calloso se extiende una delgada capa de sustancia gris que representa la circunvolución supracallosa o *induseum griseum* (*induseum griseum*), estructura muy conspicua formada por fibras y células nerviosas (Figs. 4.13, 4.14, 4.15, 4.25, 4.26, 4.27E, 4.27F). Incluidos en la formación del *induseum griseum*, hay dos cordones delgados de fibras mielínicas que se extienden en la superficie dorsal del cuerpo calloso, por encima de la capa celular. Estos cordones son conocidos como estrías longitudinales internas y externas o estrías de Lancisi (Fig. 4.27F).

Dentro de los núcleos subcorticales el más importante es el complejo nuclear amigdalino (Figs. 4.14, 4.11, 4.16, 4.23). Se extiende entre la corteza piriforme (que constituye su límite lateral) y el hipotálamo (que representa su extremo ventral anterior), mientras que su techo anterior está representado por el complejo caudado-putamen y parcialmente por el globo pálido. El tracto óptico representa el límite medial posterior.

Las fibras de conexión más importantes están representadas por la comisura anterior (*commissura anterior*), el fórnix (*fornix*) y el cuerpo calloso (*corpus callosum*).

La comisura anterior es un tracto de fibras muy conspicuo que corre horizontalmente en el plano frontal entre los núcleos septales y el área preóptica, inmediatamente por delante de las columnas anteriores del fórnix (Figs. 4.12, 4.23, 4.24).

El fórnix representa el sistema principal de fibras eferentes de la formación del hipocampo. Las fibras del alveus se reúnen para formar la fimbria. Cuando la formación del hipocampo termina cerca del rodete del cuerpo calloso la fimbria se convierte en haces separados llamados pilares posteriores del fórnix. En esta región algunas fibras pasan al otro lado formando la comisura del fórnix o comisura hipocámpica (Figs. 4.13, 4.14). Los pilares se unen en la línea media y forman el cuerpo del fórnix que se dirige hacia delante, hacia el borde anterior del tálamo. Aquí las fibras nuevamente se dividen para formar las columnas anteriores del fórnix, que se dirigen en dirección ventro-caudal. En este punto algunas fibras descienden caudalmente a la comisura anterior - fórnix postcomisural-, mientras que otras lo hacen rostralmente a la comisura anterior - fórnix precomisural-. En la zona medial de la superficie ventral de la comisura del fórnix se encuentra una masa bastante desarrollada de células pequeñas con capilares que forman el órgano subfornical (Figs. 4.14, 4.27E, G).

El cuerpo calloso - a pesar de no ser considerada una estructura límbica- es la mayor de las comisuras interhemisféricas. Se ubica en una posición medial a los hemisferios conectándolos (Figs. 4.14, 4.15, 4.24, 4.25). Su superficie aparece como una ancha faja de sustancia blanca, cuyo extremo caudal se espesa formando el rodete. El borde anterior se curva abruptamente hacia abajo para formar la rodilla

4.3.1.3- TELENCEFALO NO OLFATORIO

El telencéfalo, convencionalmente, se divide en los ganglios basales y el neocórtex.

Según Ariëns-Kappers (1960), los ganglios basales comprenden los núcleos lenticulares (formados por el globo pálido (*globus pallidus*) y el putamen (*putamen*)) y el caudado (*nucleus caudatus*) y el complejo nuclear amigdalino. Los núcleos lenticular y caudado, junto con la cápsula interna que los separa constituye el cuerpo estriado. En la figura 4.12, se observa el núcleo caudado como una masa gris relacionada, lateralmente, en toda su extensión con el ventrículo lateral. Este núcleo presenta pocas fibras mielínicas contrastando en este aspecto con el putamen. La porción anterior del caudado, se ensancha formando lo que se denomina cabeza del caudado. Esta se encuentra delante del tálamo y sobresale en la proyección frontal del ventrículo lateral. Su porción media o cuerpo del caudado se extiende a lo largo del borde dorsal del tálamo y finalmente, su extremo posterior o cola del caudado, se arquea ventralmente para llegar al núcleo amigdalino.

El núcleo lenticular, se halla íntimamente adherido a la superficie externa de la cápsula interna, que lo separa del caudado y del tálamo (Fig. 4.12). En la región basal del encéfalo, la comisura anterior y la cápsula externa separan al caudado y al putamen del tubérculo olfatorio y de la corteza piriforme (Fig. 4.12). El putamen está rodeado lateralmente por la cápsula externa en toda su extensión y medialmente se halla rodeado por el caudado, la cápsula interna y una parte del núcleo accumbens, en su porción rostral (Figs. 4.11, 4.12, 4.13, 4.22). El globo pálido aparece ventral a la porción lateral de la comisura anterior y medialmente esta rodeado por fibras que forman la cápsula interna (Figs. 4.12, 4.13). Característicamente se encuentra atravesado por gran cantidad de fibras mielínicas.

El complejo amigdalino aparece como una masa gris en la región de transición entre la corteza piriforme y la formación del hipocampo (Figs. 4.13, 4.14, 4.15).

4.3.2- DIENCEFALO

El diencefalo, que se forma alrededor del tercer ventrículo, ocupa una posición dorsoventral.

Tal como lo define Ariëns-Kappers et al. (1960), el diencefalo está delimitado anteriormente por el quiasma óptico y caudalmente por el cuerpo mamilar y la comisura posterior.

Anatómicamente el diencefalo consiste en cuatro zonas más o menos delimitadas: 1) el epitálamo (*epithalamus*) que ocupa la región dorsomedial, 2) El hipotálamo (*hypothalamus*) formando la región alrededor de la base del tercer ventrículo, 3) entre estas dos zonas se encuentra el tálamo (*thalamus*) y 4) el subtálamo (*subthalamus*) que se ubica ventralmente.

1) El epitálamo, incluye los núcleos habenulares, la estria habenular y los tractos habénulos-pedunculares. Ocupa la región medial del diencefalo (Figs. 4.16, 4.17, 4.25).

Los núcleos habenulares forman una saliencia fusiforme a lo largo de los extremos dorsales de las paredes del tercer ventrículo (*ventriculus tertius*). Las dos habénulas se hallan conectadas por la comisura habenular. Dorsalmente los núcleos habenulares se hallan cubiertos por una capa de fibras mielínicas, que forman la estria medular (Figs. 4.17, 4.24). Así, estos núcleos reciben terminales de la estria medular que es un manojito compuesto por fibras de los núcleos septales, del hipocampo y del núcleo talámico anterior. Además, los núcleos habenulares dan origen al fascículo habénulo-peduncular o fascículo retroflejo de Meynert, el cual toma curso recto en dirección ventrocaudal y termina en el núcleo interpeduncular (*nucleus interpeduncularis*) (Figs. 4.18, 4.19, 4.24, 4.28E).

La característica más sobresaliente esta dada por la ausencia de una glándula pineal discreta presente en la mayoría de los vertebrados. El aspecto dorsocaudal de la comisura habenular (*commissura habenularum*) es continuo con el plexo coroideo en la porción rostral de receso suprahabenular. La comisura habenular se continúa dorsal y posteriormente con la comisura posterior (Fig. 4.27E). El epitálamo está dominado por el

órgano subcomisural, el cual rodea a la comisura posterior (*comissura posterior*), formando una evaginación continua con el tercer ventrículo.

El órgano subcomisural, muy conspicuo en esta especie, consiste en un engrosamiento del epitelio endimario del techo del tercer ventrículo ventral a la comisura posterior en la transición del tercer ventrículo al acueducto mesencefálico (Figs. 4.18, 4.19, 4.27G, 4.27H). Está formado por un epitelio alto, estratificado e intensamente teñido que lo diferencia del epitelio endimario (Figs.4.27H).

2) El hipotálamo comprende la pared ventral del tercer ventrículo, incluyendo el quiasma óptico (*chiasma opticum*), tuber cinereum con el infundíbulo (*infundibulum hypothalami*) y los tubérculos mamilares (*corpus mamillare*) (Figs. 4.14, 4.15, 4.17, 4.23, 4.24, 4.25). La región inmediatamente por delante del quiasma, que se extiende desde el éste hasta la comisura anterior, es conocida como el área preóptica y, se la incluye generalmente como estructuras hipotalámicas. El área preóptica caudalmente se continua con el hipotálamo, rostralmente pasa debajo de comisura anterior (Fig. 4.12, 4.24).

La región anterior situada por encima del quiasma óptico es la región supraóptica. Esta región contiene dos de los núcleos hipotalámicos mejor definidos, el núcleo paraventricular (*nucleus paraventricularis*) y el núcleo supraóptico (*nucleus supraopticus*) que aparece en el borde lateral del quiasma óptico (Fig. 4.14). Ambos están compuestos de células grandes, con nucléolo bien conspicuo y sustancia de Nissl distribuida periféricamente.

Dorsalmente el hipotálamo está cubierto por el tálamo y a los lados se continua directamente la región subtalámica. La parte basal, esto es el piso del tercer ventrículo entre el quiasma óptico y los tubérculos mamilares, está formada por el *tuber cinereum* (Fig. 4.13). En su centro hay un pequeño agujero que se abre en una extensión en forma de embudo -el infundibulum- que se extiende en dirección ventrocaudal.

Las columnas del fórnix al pasar a los tubérculos mamilares, dividen groseramente al hipotálamo en núcleos internos y externos. Dorsal a las columnas del fórnix se encuentran los fascículos bien delimitados de fibras de los tractos maminotalámicos. Las fibras de este tracto tendrían su origen en el tubérculo mamilar,

cruzarían diagonalmente hacia arriba y adelante para terminar probablemente en el núcleo anterior del tálamo (Strong y Elwin, 1967).

3) El tálamo representa la mayor parte del diencefalo. Está dividido por una lámina vertical de fibras, la lámina medular interna, en una porción interna y otra externa, conteniendo cada una de ellas varias masas celulares (Figs. 4.14, 4.15, 4.16, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26). Las masas celulares son muy similares a las descritas por Papez (1932) en *Tatusia novemcincta*. Es importante destacar que el cuerpo geniculado lateral está reducido en esta especie (Fig. 4.18).

4) El subtálamo, como conjunto, es relativamente grande en los armadillos (Papez, 1932). Está limitado dorsalmente por el tálamo; ventral y externamente, por el pie peduncular y la porción adyacente de la cápsula interna; por dentro y rostralmente por el hipotálamo. Se continúa caudalmente con el tegmento y la porción basilar del mesencéfalo y contiene, de hecho, las porciones rostrales del núcleo rojo (*nucleus ruber*) y la sustancia negra (*substantia nigra*). (Figs. 4.18, 4.19)

4.3.3- MESENCEFALO

El mesencéfalo consiste en tres regiones: una parte dorsal, la lámina cuadrigémina o *tectum*, una parte media -*tegmentum* o calota- y una parte ventral más maciza que son los pedúnculos cerebrales o *crus cerebri*. Su estrecho canal o cavidad que se extiende entre el tercer y el cuarto ventrículo, es el acueducto de Silvio (Figs. 4.19, 4.20).

El acueducto de Silvio separa a la lámina cuadrigémina o *tectum* de la calota. Por otro lado, dorsal a los pedúnculos cerebrales se halla una masa nuclear -la sustancia *nigra*- separando a los pedúnculos cerebrales de la calota (Figs. 4.19, 4.20).

Sobre la cara dorsal, la lámina cuadrigémina exhibe, a ambos lados de un marcado surco mediano, dos saliencias redondeadas llamados colículos o tubérculos cuadrigéminos. Los colículos rostrales o anteriores (*colliculus superior*) son dos eminencias aplanadas que forman la mitad rostral del mesencéfalo. Estos colículos, no presenta en el armadillo una estructura laminar, es decir formado por láminas

superpuestas (a diferencia de lo observado en rata y conejo) (Zeman e Innes, 1963; Shek et al., 1986) (Figs. 4.18, 4.19, 4.23, 4.24, 4.25). Los colículos posteriores están compuestos por masa celular ovoide, el núcleo del colículo posterior y revestido por una fina capa de sustancia blanca (Figs. 4.20, 4.21, 4.22). Es de destacar que los colículos anteriores presentan una conspicua reducción en *Dasyus hybridus*, pero, por el contrario, se observa un aumento en el tamaño relativo de los colículos posteriores.

El acueducto cerebral o de Silvio (*aqueductus cerebri*) está rodeado por la sustancia gris periacueductal. Esta sustancia gris contiene varias masas celulares más o menos distinguibles. Entre ellos encontramos el núcleo del nervio oculomotor (*nuclei n. oculomotorii*), que se ubica ventralmente, y del nervio troclear, también con ubicación ventral que en su extremo caudal se continua con el núcleo coeruleus. El núcleo mesencefálico del nervio trigémino (*nuclei mesencephali n. trigemini*), se presenta con células unipolares muy conspicuas bordeando la sustancia gris periacueductal (Figs. 4.19, 4.27F).

En la zona de unión del acueducto con el tercer ventrículo (área pretectal), el techo contiene un fascículo muy conspicuo de fibras entrecruzadas conocido como comisura blanca posterior (*commissura posterior*), que marca los límites entre el diencefalo y el mesencefalo.

Dorsal a la sustancia negra, en el *tegmentum* o calota, se encuentra la formación reticular mesencefálica (Fig. 4.20). En ella se encuentran englobados varios núcleos y haces o tractos de fibras que forman parte de la calota mesencefálica. La sustancia gris forma el núcleo rojo, el núcleo mesencefálico del nervio trigémino, los núcleos de los nervios motores del ojo, núcleos asociados con la comisura posterior, los núcleos dorsales del rafe. El núcleo rojo (Figs. 4.18, 4.19, 4.28C) está formado por células poligonales grandes y medianas es predominantemente magnocelulares y se diferencia de la formación reticular que lo rodea por una cápsula, que no está tan definida como en el humano (Strong y Elwin, 1967), lo cual hace que el núcleo se vea menos definido en una corte. Ocupa la porción medial del tegmento mesencefálico.

La sustancia negra es una masa nuclear voluminosa, de forma fusiforme que se extiende a lo largo de todo el mesencefalo y se proyecta en el extremo caudal del diencefalo. En los cortes se distinguen dos zonas: una zona dorsal compacta y otra ventral reticular. La zona compacta aparece como una faja irregular de células

multipolares intensamente teñidas y estrechamente unidas. Dicha zona se extiende hasta la parte caudal del mesencéfalo. La zona reticular se encuentra junto al pes pedunculi, y está compuesto por células irregulares (Fig. 4.28D).

Ventral a la sustancia *nigra* se encuentra un haz de fibras denominado pedúnculos cerebrales (Fig. 4.19) que están compuestos por fibras longitudinales que corren a ambos lados de la superficie ventral del mesencéfalo. Por otro lado, situado en una posición medial en la superficie ventral del tegmento y dorsal a la fosa interpeduncular se halla el núcleo interpeduncular (Fig.). El núcleo interpeduncular está formado por células de tamaño pequeño a mediano e intensamente teñidas con la coloración de cresil violeta. Como ya se dijo anteriormente, este núcleo recibe fibras del fascículo retroflejo del núcleo habenular del diencefalo (Zeman e Innes, 1963).

4.3.4- PROTUBERANCIA (*pons*)

Este segmento del tronco del encéfalo aparece ventralmente como una masa convexa de fibras transversales y está separado del cerebelo, en su parte posterior, por el cuarto ventrículo.

En su cara ventral, la característica llamativa de la protuberancia es una cinta ancha de fibras predominantemente transversales. Lateralmente, estas fibras se reúnen en un manojo grueso, los pedúnculos cerebelosos medios (*pedunculus cerebellaris medius*). Este puente de fibras pasa hacia atrás y ligeramente hacia abajo para abrirse en forma de abanico y terminar dentro de los hemisferios cerebelosos.

En este segmento emerge lateralmente el nervio trigémino.

La protuberancia comprende dos pisos o niveles muy diferentes y bien visibles en los cortes transversales. El piso dorsal llamado porción tegmental, representa la prolongación craneal de la formación reticular del bulbo. Dentro de esta porción se encuentran los núcleos sensoriales y motores de los nervios craneales: nervio trigémino (V), el nervio abducens (motor ocular externo) (VI), nervios facial (VII), vestibulococlear (VIII).

Dentro de la porción ventral o porción basilar de la protuberancia, se encuentran fibras y núcleos protuberanciales y fascículos descendentes de las vías corticobulbares y corticoespinales. Estos últimos están reunidos en un haz compacto a ambos lados de la porción inferior de la protuberancia y forman las pirámides del bulbo (Truex y Carpenter, 1967).

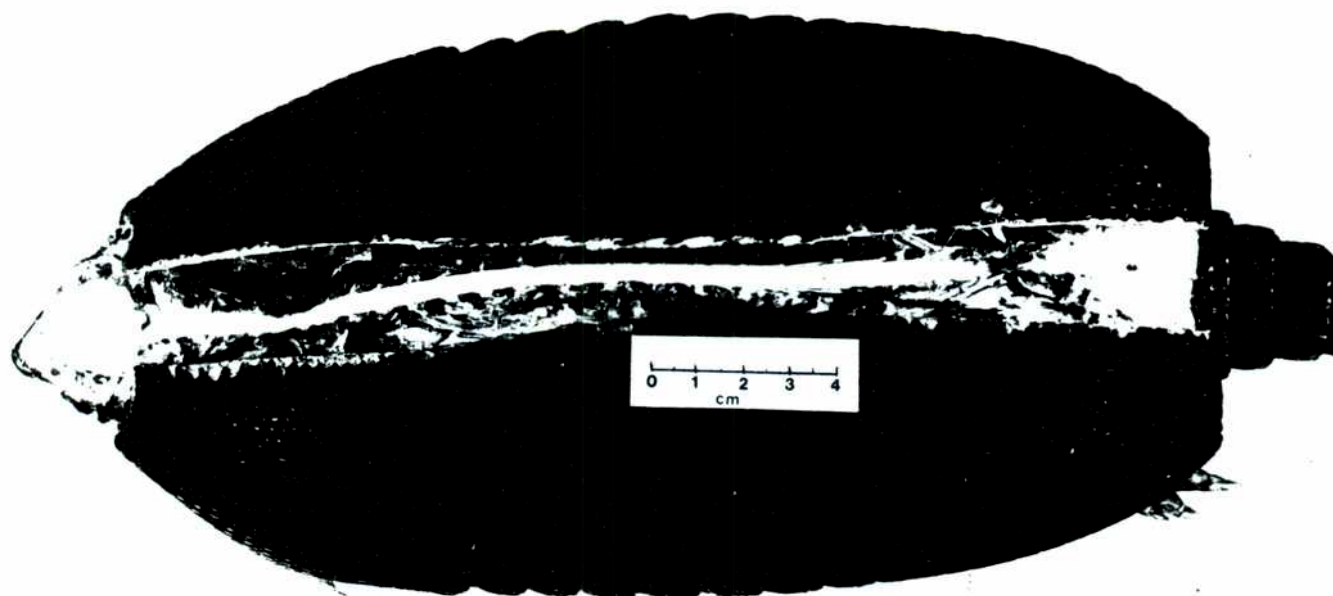


FIGURA 4.2. Vista dorsal del sistema nervioso central *in situ* de *D. hybridus*



FIGURA 4.3. Detalle del encéfalo *in situ*. Obsérvese como las meninges cubren al SNC.

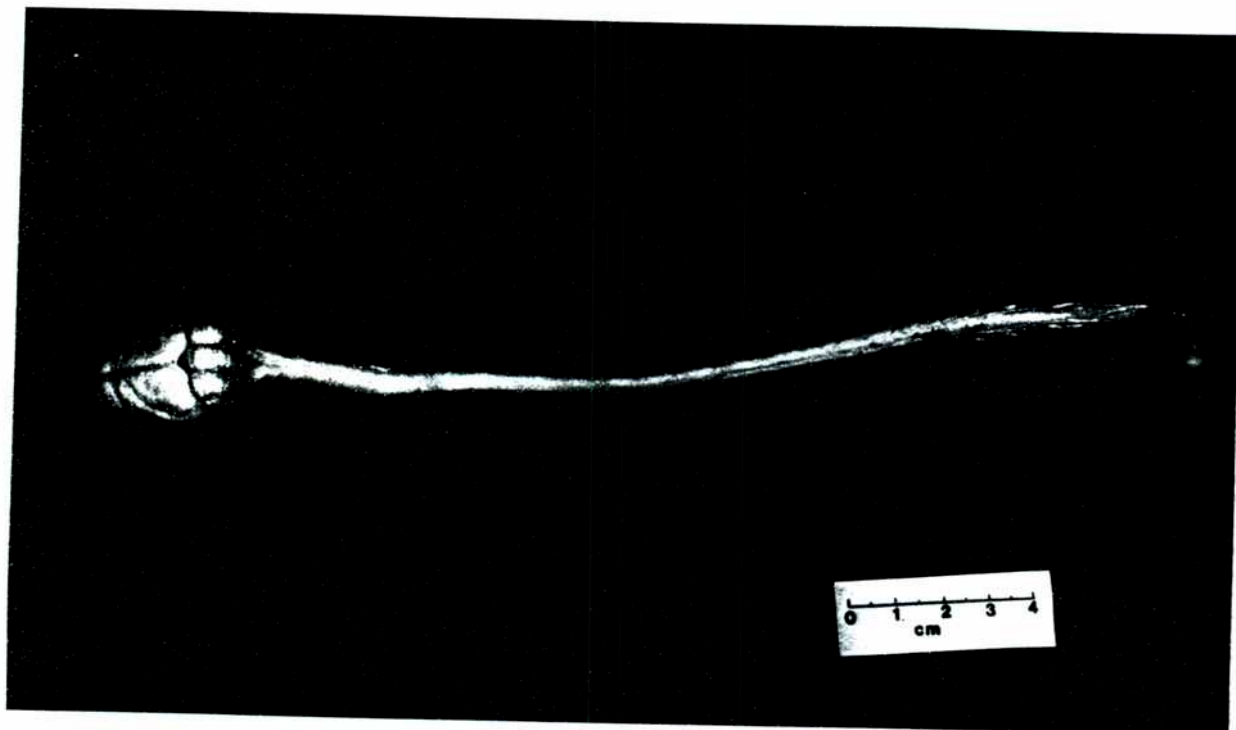


FIGURA 4.4. Vista dorsal del SNC.

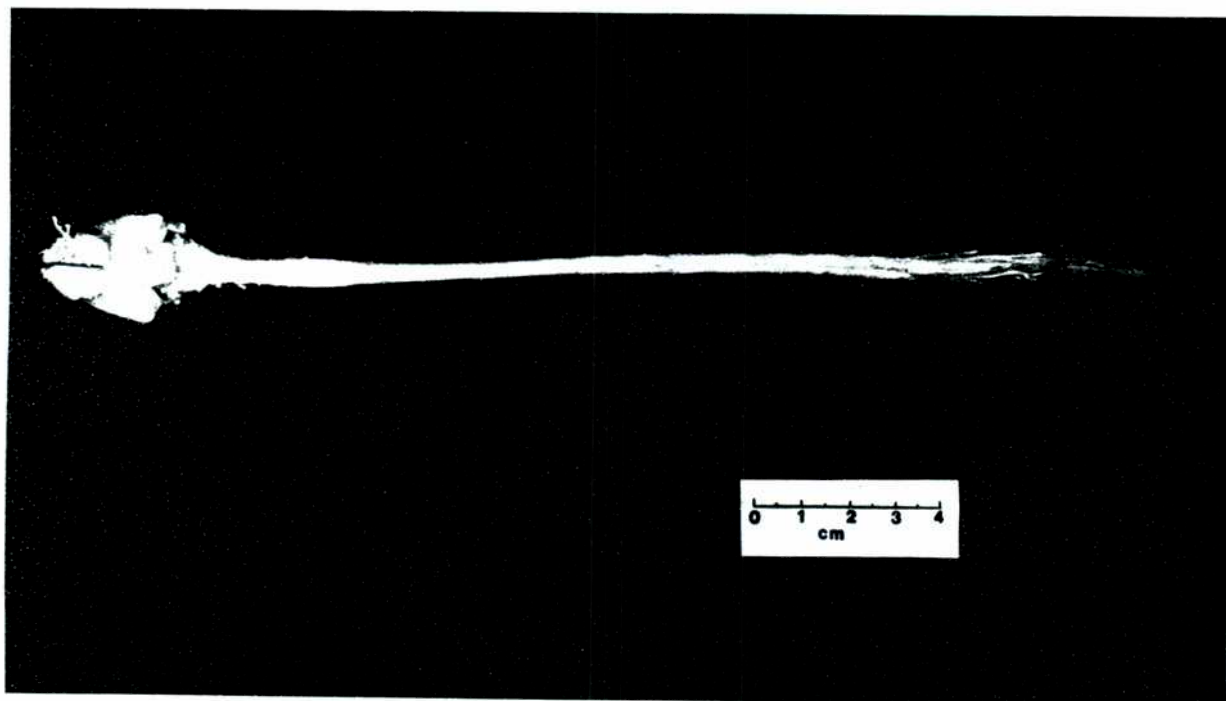


FIGURA 4.5. Vista ventral del SNC.



FIGURA 4.6. Vista lateral del SNC. (0.9x).

Abreviaturas

<i>a</i>	alveus	<i>ml</i>	lemnisco medial
<i>ac</i>	comisura anterior	<i>mlla</i>	capa medular
<i>aco</i>	colículo anterior	<i>mo</i>	bulbo raquídeo
<i>afr</i>	fisura rinal anterior	<i>mob</i>	bulbo olfatorio principal
<i>agn</i>	núcleo amigdalino	<i>mt</i>	tracto mamilotalámico
<i>an</i>	núcleo accumbens	<i>mtr</i>	raíz mescencefálica del n. trigémino
<i>aob</i>	bulbo olfatorio accesorio	<i>na</i>	núcleo amigdalino
<i>ca</i>	acueducto central	<i>nc</i>	neocortex
<i>cb</i>	cerebelo	<i>nll</i>	nervio óptico
<i>cc</i>	cuerpo calloso	<i>oc</i>	quiasma óptico
<i>cn</i>	núcleo caudado	<i>om</i>	mucosa olfatoria
<i>cp</i>	pedúnculo cerebral	<i>on</i>	nervio óptico
<i>dh</i>	hipocampo dorsal	<i>opt</i>	tracto óptico
<i>cc</i>	cápsula externa	<i>ot</i>	tubérculo olfatorio
<i>cml</i>	lámina medular externa	<i>ov</i>	ventrículo olfatorio
<i>epl</i>	capa plexiforme externa	<i>p</i>	protuberancia
<i>f</i>	fornix	<i>pa</i>	área preóptica
<i>fc</i>	corteza frontal	<i>pc</i>	corteza piriforme
<i>fd</i>	fascia dentada	<i>pce</i>	comisura posterior
<i>fh</i>	fimbria hipocámpica	<i>pco</i>	colículo posterior
<i>fl</i>	capa fibrosa	<i>pfr</i>	fisura rinal posterior
<i>fr</i>	fascículo retroflexo	<i>pg</i>	sust. gris periacueductal
<i>gl</i>	capa glomerular	<i>ph</i>	capa piramidal del hipocampo
<i>gp</i>	globo pálido	<i>pl</i>	capa plexiforme externa
<i>h</i>	hipotálamo	<i>plc</i>	plexo coroideo
<i>hc</i>	comisura habenular	<i>pol</i>	estrato polimórfico
<i>hn</i>	núcleo habenular	<i>pu</i>	putamen
<i>hp</i>	hipófisis	<i>qb</i>	tubérculo cuadrigéminos
<i>hpc</i>	comisura hipocámpica	<i>rn</i>	núcleo rojo
<i>ic</i>	cápsula interna	<i>ro</i>	radio óptica
<i>iC</i>	islotes de Calleja	<i>rpn</i>	núcleos del rafe
<i>if</i>	infundíbulo	<i>sa</i>	área septal
<i>ig</i>	induseum griseum	<i>sco</i>	órgano subcomisural
<i>igl</i>	capa granular interna	<i>sd</i>	decusación supramamilar
<i>III n</i>	III nervio, nervio oculomotor	<i>sfo</i>	órgano subfornical
<i>III V</i>	tercer ventrículo	<i>smt</i>	estría <i>medullaris thalami</i>
<i>iml</i>	lámina medular interna	<i>sn</i>	substantia <i>nigra</i>
<i>in</i>	núcleo interpeduncular	<i>srV</i>	raíz sensorial del n. trigémino
<i>iot</i>	tracto olfatorio intermedio	<i>st</i>	estría <i>terminalis</i>
<i>ipl</i>	capa plexiforme interna	<i>stn</i>	núcleos subtalámicos
<i>ir</i>	receso intercomisural	<i>t</i>	tálamo
<i>IV V</i>	IV ventrículo	<i>tc</i>	<i>tuber cinereum</i>
<i>lg</i>	cuerpo geniculadolateral	<i>Tg</i>	ganglio del n. terminal
<i>lm</i>	lemnisco lateral	<i>to</i>	tracto óptico
<i>ln</i>	núcleo lenticular	<i>tt</i>	<i>tactia tecta</i>
<i>lot</i>	tracto olfatorio lateral	<i>vh</i>	hipocampo ventral
<i>lv</i>	ventrículo lateral	<i>Vn</i>	V nervio, nervio trigémino
<i>mb</i>	cuerpo mamilar	<i>xa</i>	comisura del colículo anterior
<i>mlc</i>	capa de células mitrales	<i>xp</i>	comisura del colículo posterior

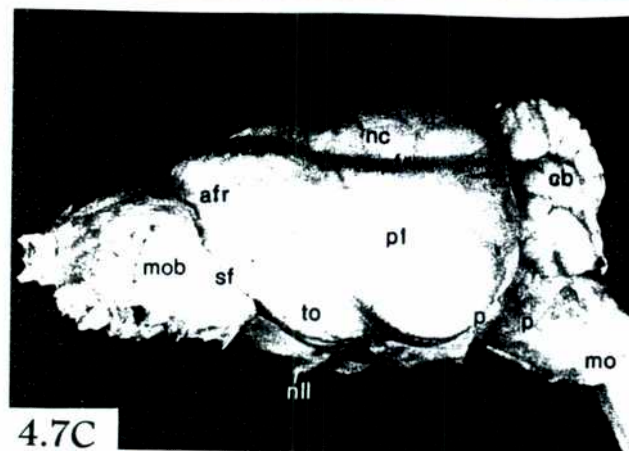
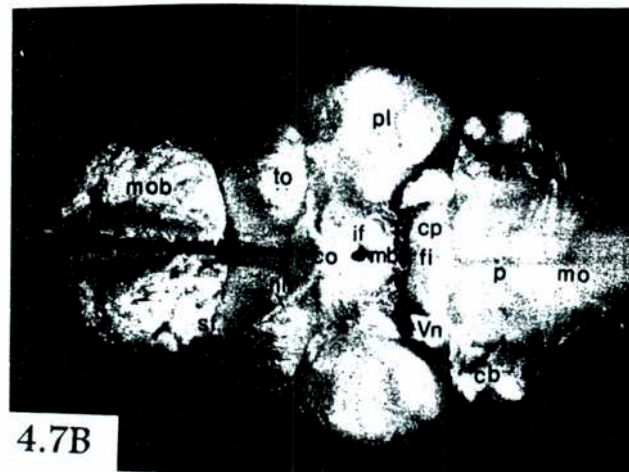
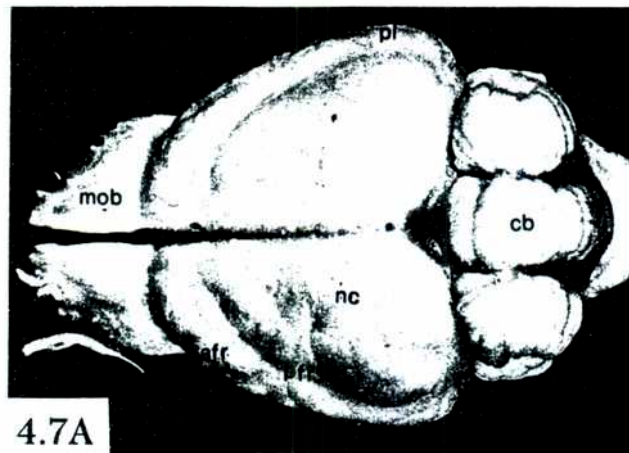
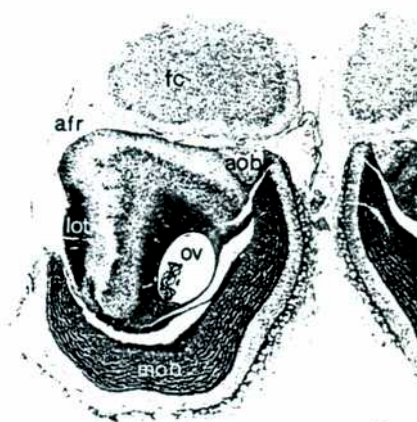


FIGURA 4.7. Detalle de la vista dorsal (A), ventral (B) y lateral (C) del encéfalo (2.5x).



4.9



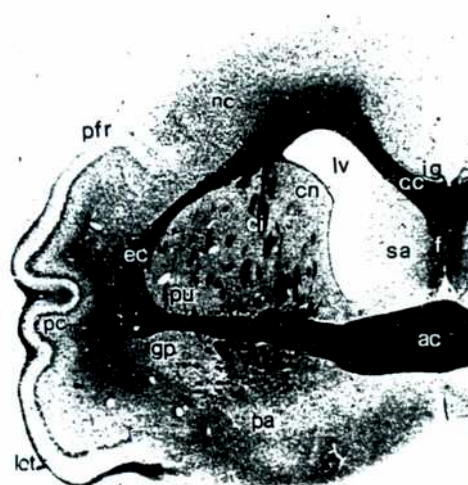
4.10A



4.10B



4.11



4.12

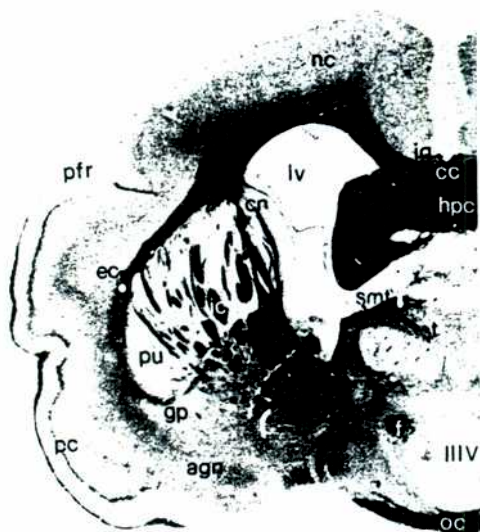
FIGURA 4.9. Corte transversal a nivel la región anterior de los bulbos olfatorios principales (6x)

FIGURA 4.10. A. Corte transversal a nivel la región posteriorde los bulbos olfatorios principales (6x)

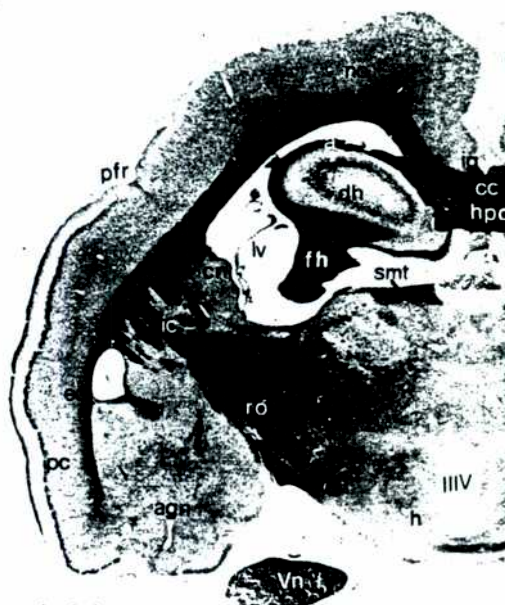
B. Detalle de las capas que compoen el bulbo olfatorio principal (400x).

FIGURA 4.11 Corte transversal a nivel del tubéculo olfatorio (6x).

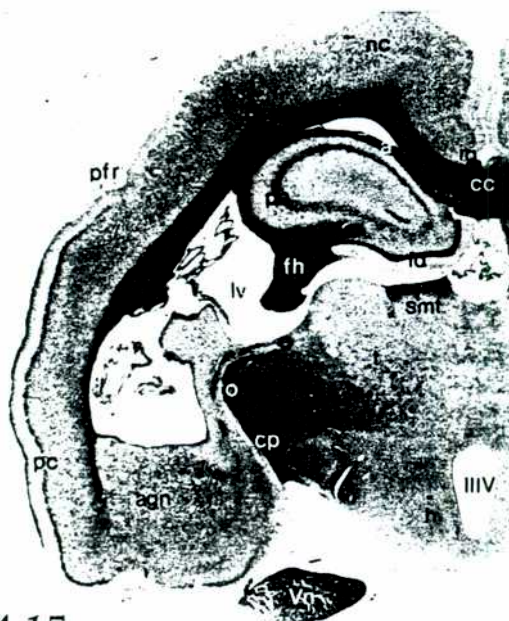
FIGURA 4.12 Corte transversal a nivel de la comisura anterior (6x).



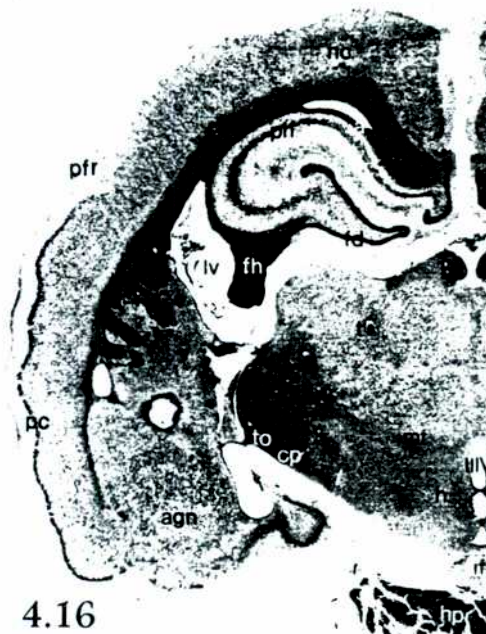
4.13



4.14



4.15



4.16

FIGURA 4.13 Corte transversal a nivel del cuerpo estriado (6x).

FIGURA 4.14 Corte transversal a nivel del órgano subfornical (6x).

FIGURA 4.15 Corte transversal a nivel del hipocampo dorsal (6x).

FIGURA 4.16 Corte transversal a nivel de los núcleos habenulares (6x).

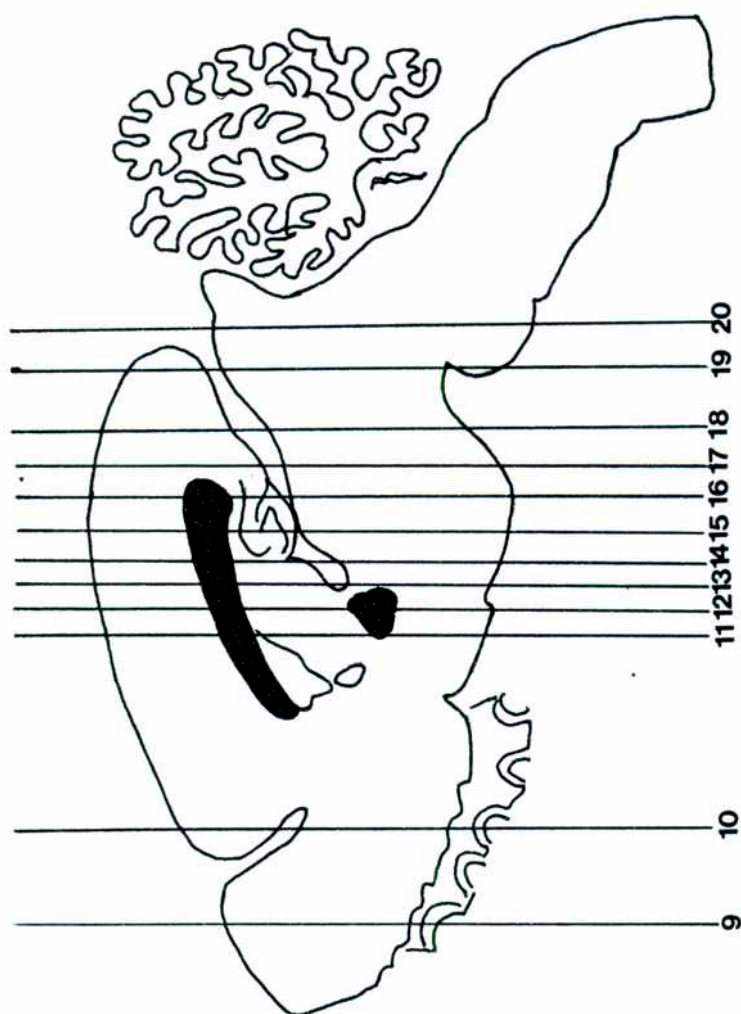
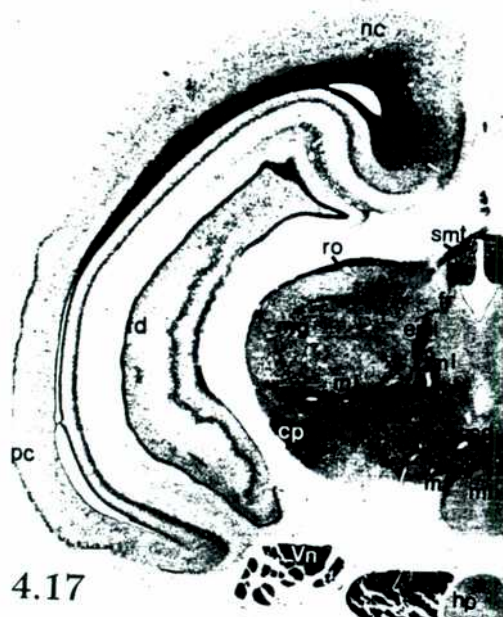
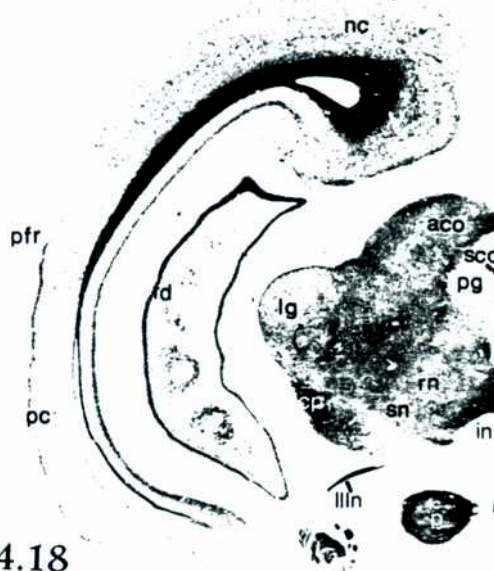


FIGURA 4.8. Esquema que muestra la altura de los cortes transversales que se muestran en las figuras de la 4.9 a la 4.20.



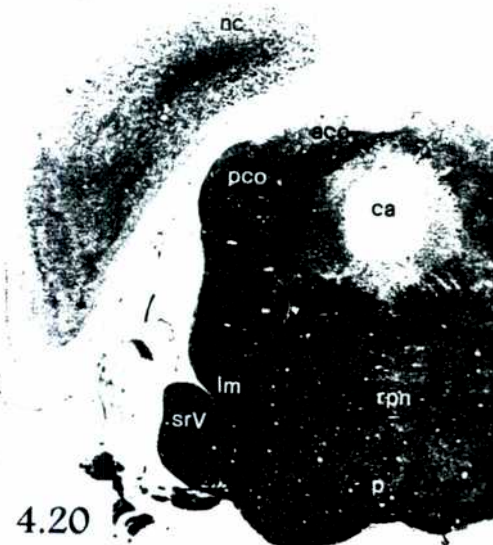
4.17



4.18



4.19



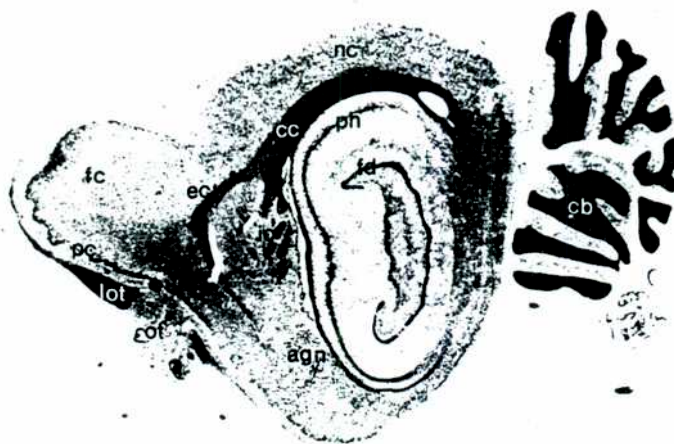
4.20

FIGURA 4.17 Corte transversal a nivel del cuerpo mamilar (6x).

FIGURA 4.18 Corte transversal a nivel de los colículos anteriores (6x).

FIGURA 4.19 Corte transversal a nivel del núcleo interpeduncular (6x).

FIGURA 4.20 Corte transversal a nivel de los colículos posteriores (6x).



4.21

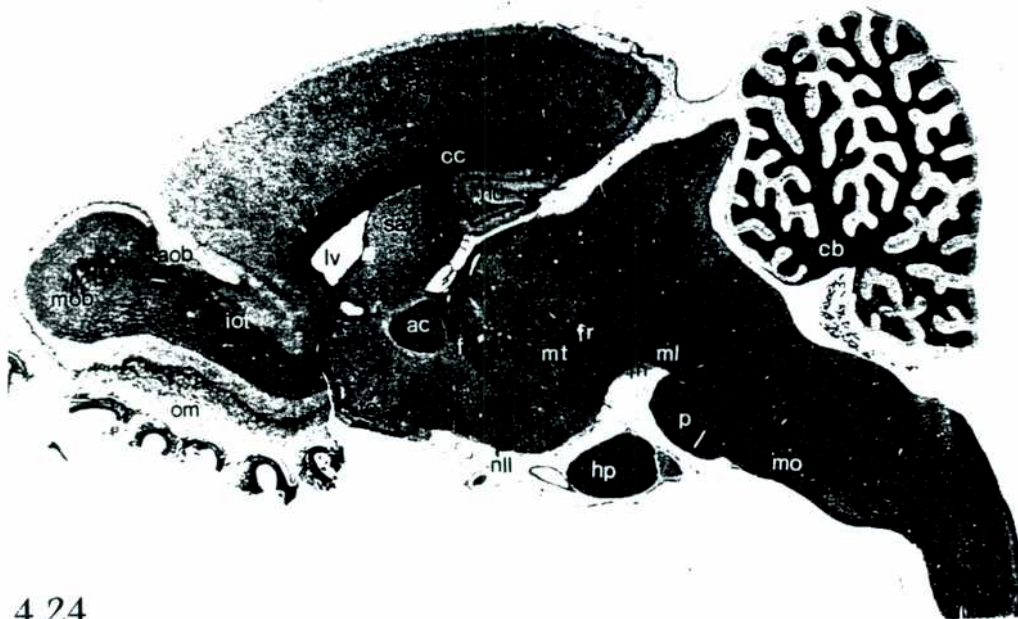


4.22

FIGURA 4.21 Corte parasagital a nivel del hipocampo (4x).
 FIGURA 4.22 Corte parasagital a nivel del cuerpo estriado (4x).



4.23

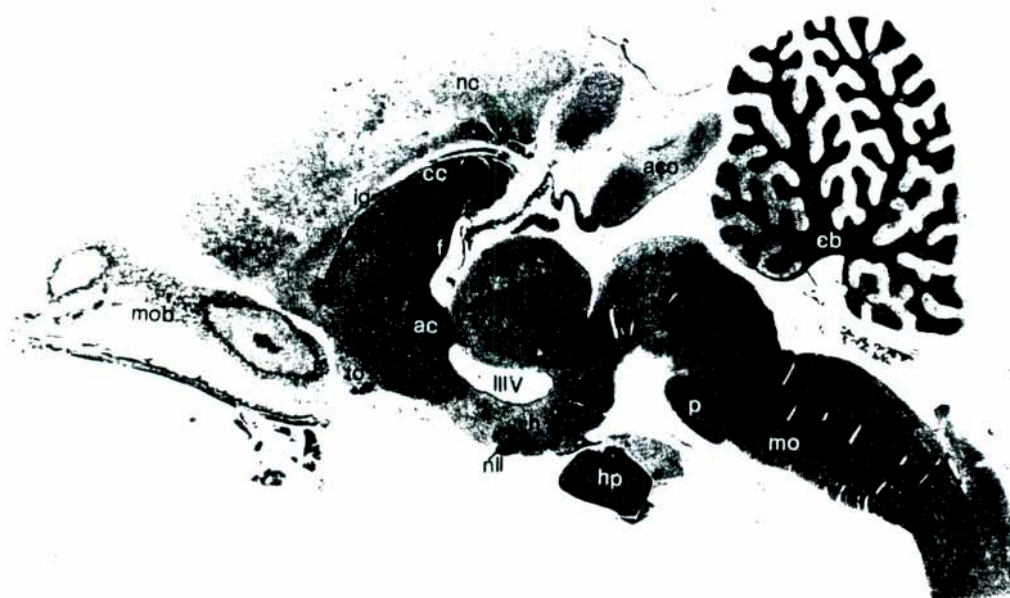


4.24

FIGURA 4.23 Corte parasagital a nivel del ventrículo olfatorio (4x).
 FIGURA 4.24 Corte parasagital a nivel de la comisura anterior (4x).



4.25



4.26

FIGURA 4.25 Corte parasagital a nivel del núcleo habenular (4x).

FIGURA 4.26 Corte parasagital a nivel del colículo anterior (4x).

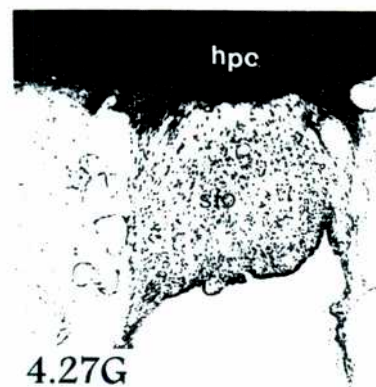
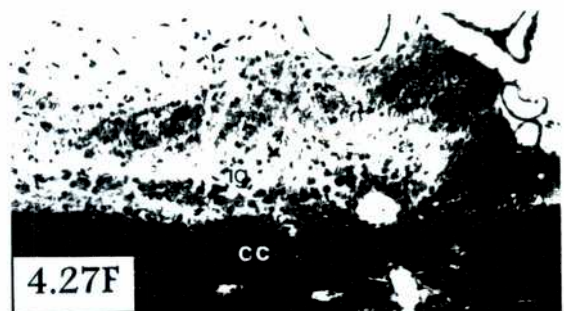
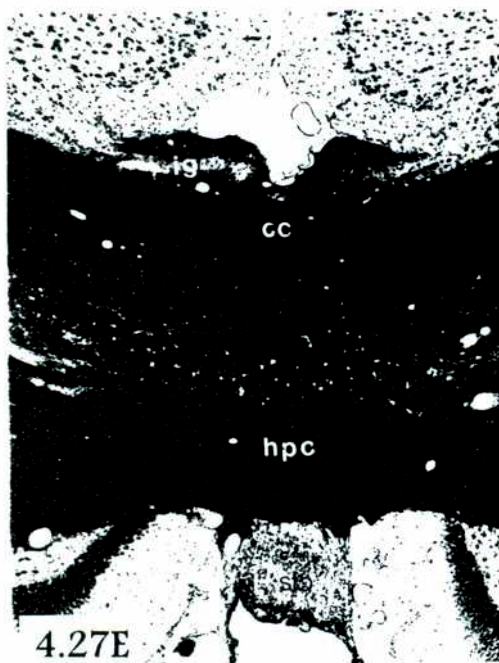
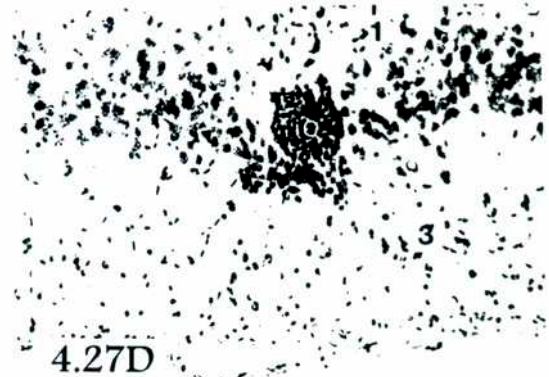
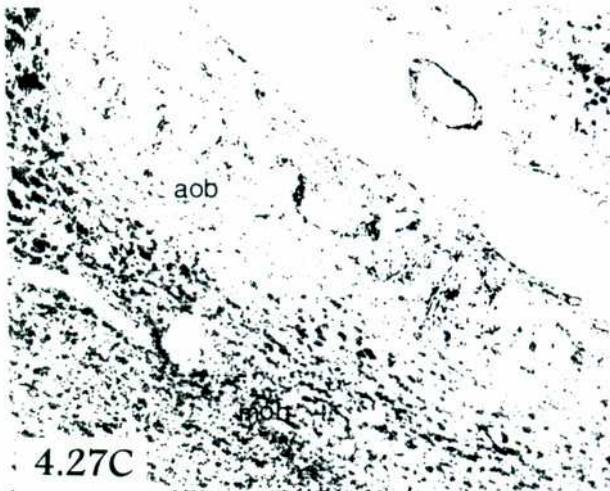


FIGURA 27. A. Ganglio del nervio terminal (250x). B. Detalle de las neuronas del ganglio del nervio terminal (1000x).

C. Corte sagital del bulbo olfatorio accesorio (100x).

D. Tubérculo olfatorio, Detalle de las capas de neuronas que lo forman e islotes de Calleja (1) capa polimórfica, (2) capa de células piramidales, (3) capa plexiforme externa (250x)

E. Corte transversal a nivel de la comisura hipocámpica. Ubicación del *Induseum griseum* y del órgano subfornical (40x)

F. Detalle del *induseum griseum*. (100x)

G. Detalle del órgano subfornical (100x).

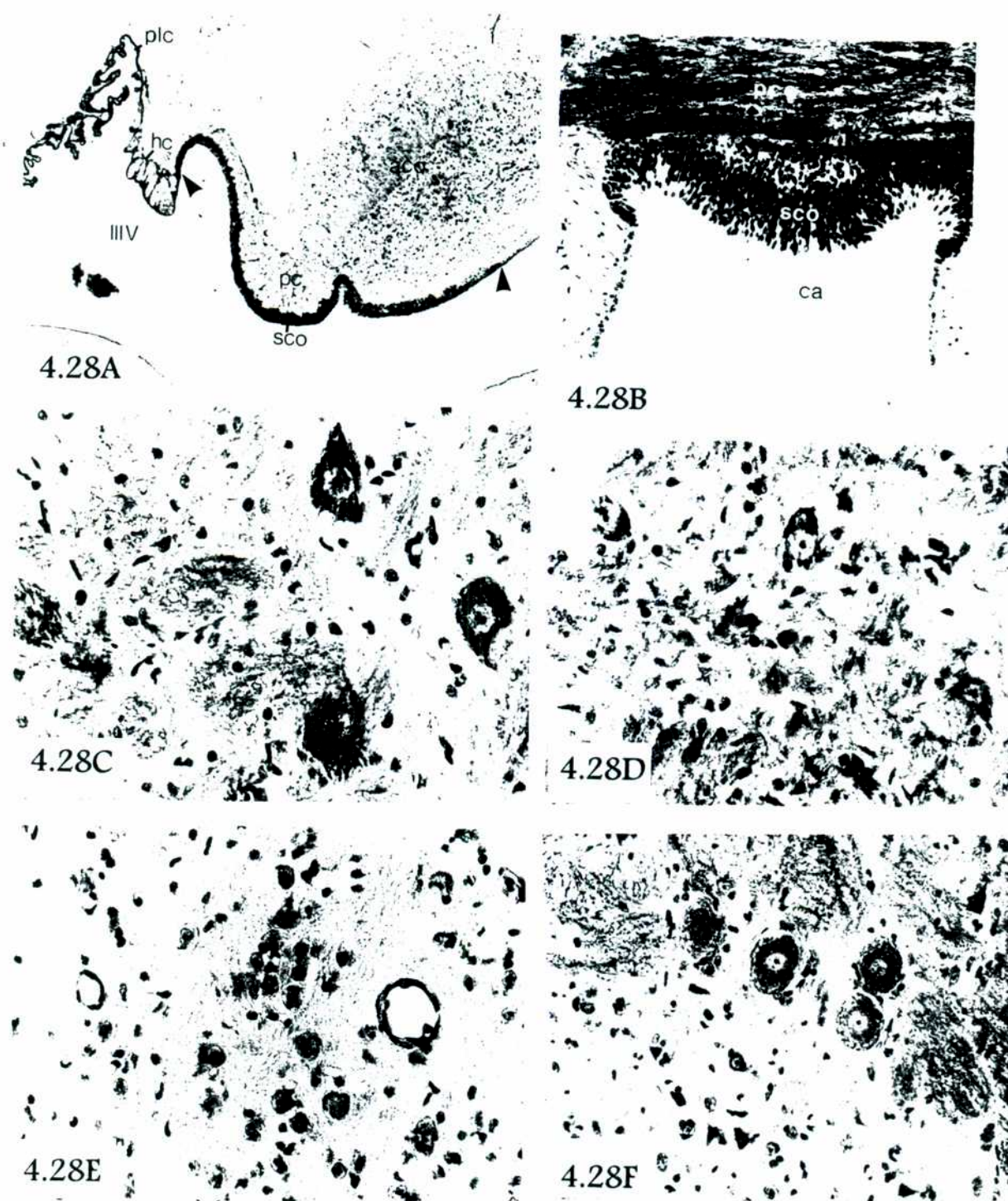


FIGURA 28 A. Aspecto general de la región epitalámica, en la cual se observa la extensión del órgano subcomisural (40x).

B. Detalle de un corte transversal del órgano subcomisural (100X)

C. Detalle del núcleo rojo (400x).

D. Detalle de la neuronas de la zona reticular de la sustancia negra (400x).

E. Detalle del núcleo interpeduncular (400x).

F. Detalle de las neuronas de la raíz mesencefálica del trigémino (400x).

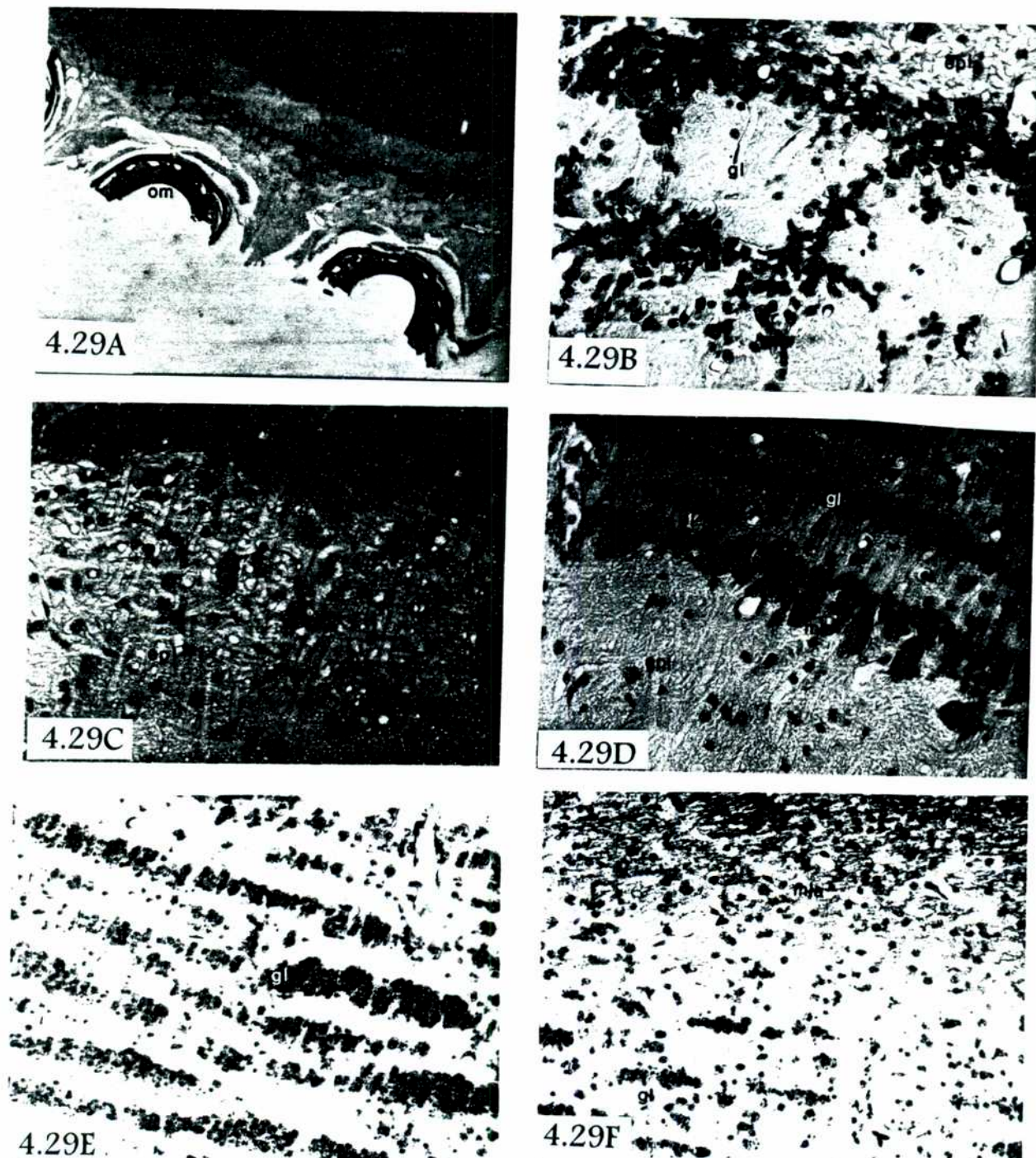


FIGURA 29. Bulbo olfatorio principal

A. Aspecto general de la entrada de los filetes olfatorios al bulbo olfatorio principal (40x).

B. Detalle de la capa glomerular (400x).

C. Detalle de la lámina plexiforme externa (400x).

D. Detalle de la capa de células mitrales y de la lámina plexiforme interna (400x).

E. Detalle de la capa granular (400x).

F. Detalle de la capa granular y de la lámina medular (400x)

DISCUSION

A pesar de que la literatura concerniente a la organización neuroanatómica de los mamíferos es bastante extensa, no existe aún registro de la neuroanatomía general de este armadillo Sudamericano. Hasta donde se conoce este estudio representa la primera aproximación al estudio general de la anatomía del cerebro de este animal.

El cerebro del armadillo *Dasypus hybridus* presenta características anatómicas dignas de mencionarse.

La principal característica está representada por el gran desarrollo del rinencéfalo que presenta enormes bulbos y tubérculos olfatorios. De aquí que este animal represente un excelente modelo para una variedad de estudios que conciernen a la electrofisiología, neurobiología y farmacología. El gran tamaño de las estructuras olfatorias facilita todo tipo de procedimientos experimentales. El bulbo olfatorio de otro armadillo (*Chaetophractus villosus*), que también presenta una gran tamaño relativo de estas estructuras, se caracteriza por la presencia de un ritmo bioeléctrico conspicuo y novedoso (Affanni, 1972; García Samartino *et al.*, 1987). Adicionalmente, el bulbo desaferentado muestra una actividad eléctrica diferente tanto durante el sueño paradójico como en el sueño lento (Affanni, 1972).

El cerebro de *Dasypus hybridus* carece de glándula pineal distintiva. Cabe aclarar que Smith (1898) y Shuddemagen (1907), reportaron la presencia de glándula pineal en *D. novemcinctus*, pero esta situación se revierte en estudios posteriores. Los animales del género *Dasypus* (Oskche *et al.*, 1965; Phillips *et al.*, 1986) comparten con otros armadillos tal ausencia (Benítez *et al.*, 1994). No se observaron evidencias de tejido similar al tejido pineal en el epítalamo de *D. novemcinctus* aún utilizando tinciones específicas para tejido pineal (Phillips *et al.*, 1986). La falta de glándula pineal se reportó también en el *Myxine*, en el caimán, en pangolines y en otros edentados, como perezosos y otros armadillos (Creutzfeldt, 1912; Osksche, 1965; Wurtman *et al.*, 1968; Pevet, 1983; Phillips *et al.*, 1986; Roth *et al.*, 1995). Se podría pensar que la ausencia de un órgano cuya presencia es constante en casi todos los vertebrados esconde un oscuro significado biológico que aún no ha sido resuelto.

Los colículos anteriores presentan una reducción conspicua en *Dasyus hybridus*, por el contrario se observa un aumento en el tamaño relativo de los colículos posteriores y una reducción del cuerpo geniculado lateral. Los tubérculos cuadrigéminos anteriores reciben fibras del cuerpo geniculado lateral y de la retina. En cambio el colículo posterior presenta fibras eferentes que van al cuerpo geniculado medial y de allí a la corteza auditiva, por lo tanto funcionaría a modo de relevo de la integración de la vía auditiva (Papez, 1932). La reducción del colículo anterior estaría relacionado con el escaso desarrollo de los ojos, correlacionado con el gran desarrollo de la sensibilidad táctil en su hocico largo y en su lengua (Howe, 1933). La misma característica se presenta en el oso hormiguero *Tamandua tetradactyla*, el cual también presenta ojos pequeños y adquiere su presa principalmente por el sentido del olfato (Kaelber, 1966). Además, el colículo anterior de *D. hybridus* carece de laminación. La laminación de los colículos permite especificidad en la recepción y proyección de los impulsos (Huber y Crosby, 1943). Esta ausencia, también, se correlacionaría con el escaso desarrollo de la vía visual. Concomitantemente, los armadillos poseen una buena audición y pabellones auditivos bastantes desarrollados, por ello el colículo posterior adquiere un tamaño considerable respecto al colículo anterior y el cuerpo geniculado medial aparece como una protuberancia en el tálamo posterior (Howe, 1933; Smith, 1898).

Otras características neuroanatómicas interesantes son:

- Gran desarrollo del *induseum griseum*.
- Presencia de órganos subfornical y subcomisural muy desarrollados.
- Elevada posición de la fisura rinal sobre la cara lateral de los hemisferios, lo cual permite la extensión laterodorsal de la corteza piriforme.
- Comisura anterior de tamaño bastante grande, acompañada por un gran desarrollo del lóbulo piriforme.
- Los nervios y núcleos trigéminos están bien desarrollados, esto se podría relacionar con el gran desarrollo de la sensibilidad táctil especialmente en la nariz y en la lengua (Howe, 1933).

Las propiedades neuroanatómicas mencionadas anteriormente llevaron a muchos autores a considerar que los armadillos representan el patrón típico de mamífero en su forma más simple, lo cual hace que su cerebro sea comparable -aunque en algunos caracteres anatómicamente más interesante- con el de rata, zarigüeyas y algunos

insectívoros (Shuddemagen, 1907; Papez, 1932) que se utilizan en forma rutinaria en la investigación biomédica.

Por lo tanto, las características neuroanatómicas unidas a las propiedades que posee este armadillo en cuanto a su modo particular de reproducción, a su capacidad de adquirir ciertas enfermedades que representan aún un peligro para la humanidad y adaptación al cautiverio hacen de este armadillo autóctono un modelo interesante para una enorme cantidad de estudios biológicos.

CONCLUSIONES FINALES

1- Sobre el armadillo *Dasypus hybridus*

El armadillo *Dasypus hybridus* se ha adaptado a las condiciones del cautiverio, razón por la cual podría -al igual que *Chaetophractus villosus*- utilizarse como animal de laboratorio no tradicional. Esta nueva ventaja sumada a su modo particular de reproducción haría de este animal el modelo ideal para dilucidar:

a) El aporte del acervo genético sobre las características anátomo-fisiológicas de un organismo.

b) El papel sobre dicho aporte genético de influencias ambientales, como ser: alteración del ritmo luz-oscuridad, temperatura, diversas clases de estímulos sensoriales, etc.

c) La influencia sobre el acervo genético de diferentes procedimientos experimentales (administración de drogas, tóxicos, intervenciones quirúrgicas, ablaciones, etc).

2- Sobre el encéfalo de *Dasypus hybridus*

En esta Tesis se ha realizado la primera aproximación al estudio general de la anatomía del encéfalo del armadillo *Dasypus hybridus*, el cual presenta características anatómicas particulares. Mencionaremos solamente las más importantes. La primera se refiere al gran desarrollo del rinéncéfalo, especialmente bulbos y tubérculos olfatorios. El gran tamaño de las estructuras olfatorias facilita todo tipo de procedimientos experimentales. Otra característica de fundamental importancia es la carencia de una glándula pineal distintiva. También se distinguen el gran desarrollo de los órganos subcomisural y subfornical. Las características neuroanatómicas señaladas en la presente Tesis hacen que este animal represente un excelente modelo para una variedad de estudios que conciernen a la electrofisiología, neurobiología y farmacología.

3- Sobre la cavidad nasal de los armadillos

La cavidad nasal de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus* presenta una enorme superficie cubierta por mucosa olfatoria, evidenciada en el enorme desarrollo de los etmoturbinales.

4- Sobre la mucosa olfatoria de los armadillos

Nuestros estudios sobre la mucosa olfatoria (MO) de los armadillos *Chaetophractus villosus* y *Dasypus hybridus* representa el primer trabajo que describe estas estructuras en Endentados, grupo que se encuentra entre los mamíferos placentarios más primitivos. Estos estudios podrían considerarse como el punto de partida para el estudio de los numerosos aspectos -especialmente aquellos referidos a regeneración, innervación y fisiología- que aún permanecen oscuros en cuanto al sistema olfatorio.

El epitelio olfatorio presenta tres tipos celulares característicos de este tejido: células de sostén, neuronas olfatorias y células basales.

Las células de sostén presentan enormes de proyecciones apicales. Las características peculiares -estructurales e inmunohistoquímicas- de las células de sostén en los armadillos podría colaborar con la dilucidación del origen y función de estas células dentro del epitelio. Por otro lado la existencia de células de sostén que presentan signos de degeneración celular, podrían estar indicando la posibilidad de que exista algún tipo de recambio en estas células.

La estructura e histoquímica de las neuronas receptoras olfatorias de animales evolutivamente distantes de la mayoría de los animales estudiados colaborarían en la mejor comprensión de los mecanismos olfatorios así como también de los de regeneración neuronal.

Las células basales presentan inmunoreactividad positiva a anticuerpos que indican fenómenos de proliferación y crecimiento celular. Esta propiedad colaboraría en dilucidar el papel de las células basales en la regeneración del epitelio.

Las glándulas de Bowman históricamente han sido poco estudiadas en comparación con el epitelio olfatorio. Los resultados obtenidos en el presente trabajo señalan por un lado, la existencia de diferentes productos de secreción, que colaborarían en la formación del mucus que cubre el epitelio. Estos productos de secreción se liberan en forma merocrina y aparentemente -en el armadillo *Chaetophractus villosus*- en forma apocrina. El estudio de mecanismos escasamente comprendidos -como lo son la secreción apocrina y merocrina- en nuestro modelo sería útil para el estudio de señales que regulan y desencadenan estos mecanismos secretorios. Por otro lado, se demuestra la similitud -histoquímica e inmunohistoquímica-entre las células epiteliales y las células glandulares, lo cual explicaría -en acuerdo con Taniguchi *et al.*, 1996a- la posible regeneración del epitelio a partir de las glándulas de Bowman.

El hallazgo de células de Schwann particulares en la mucosa olfatoria y su relación -del tipo embrionaria- con los axones olfatorios, podrían relacionarse con una posible actividad regenerativa de los nervios olfatorios.

PREGUNTAS QUE AUN HOY CARECEN DE RESPUESTA CON RESPECTO AL SISTEMA OLFATORIO

Existe mucha bibliografía referente a las características estructurales, bioquímicas, moleculares y fisiológicas del sistema olfatorio. Pero, paradójicamente, permanecen aún muchas preguntas básicas sin contestar que nos permitan comprender al sistema olfatorio. Trataremos de analizar algunas de las preguntas.

1- No se ha resuelto aún la identidad de las moléculas olfatorias receptoras. Se han realizado muchos trabajos a nivel bioquímico y molecular, pero todavía no hay una evidencia directa sobre estas moléculas.

2-Cuál es la composición y función de la capa de mucus que recubre el epitelio olfatorio? Ultimamente se ha analizado la composición compleja del mucus y, además, se ha determinado que los componentes no están homogéneamente distribuidos. Se ha detectado la presencia de enzimas, gran variedad de sustancias e incluso componentes del sistema inmune. Por lo tanto falta dilucidar cuáles son exactamente los componentes del mucus y en que grado estos componentes afectan a las sustancias odoríferas.

3- Cómo codifica y envía el sistema olfatorio la información al cerebro de manera que el mismo pueda interpretar la información y responder en consecuencia?. Una de las posibles respuestas sería determinar si existen diferentes subtipos de neuronas receptoras olfatorias. Existen datos estructurales e inmunohistoquímicos que sugieren la posibilidad de la existencia de varios subtipos de neuronas olfatorias, pero aún no se ha comprendido cómo y en qué grado estos subtipos están relacionados con la especificidad celular. Cabe preguntarse, además, si esta especificidad está relacionada con la respuesta celular a ciertas clases de olores. Por otro lado, estos subtipos celulares ¿Están basados en diferentes combinaciones de moléculas receptoras o en diferentes señales transductoras?. Otra pregunta relacionada con lo dicho anteriormente es si existen diferentes subtipos de glomérulos y de neuronas secundarias en el bulbo olfatorio?. Nuevamente, trabajos estructurales e histoquímicos nos da una respuesta. Pequeñas regiones dentro del bulbo olfatorio están relacionadas con diferentes olores. Sin embargo, se desconoce la forma en que se analiza esta información a nivel cortical.

4- ¿Cuál es el rol exacto de las células de sostén?. ¿Poseen funciones exclusivamente de soporte o intervienen además en la regulación y en la composición del mucus?. Se podría pensar que regulan el intercambio iónico dentro del mucus o que colaborarían en mantener un pH adecuado para permitir la correcta actividad enzimática. Otra posible función de las células de sostén, sería la de intervenir en la detoxificación y remoción de ciertas moléculas olorosas y otros componentes xenobióticos.

5- La regeneración neuronal en el epitelio olfatorio ha sido estudiada por numerosos autores. Sin embargo, queda sin resolver el hecho de que la población neuronal permanece constante y que como consecuencia, las células receptoras deberían estar muriéndose periódicamente. Por lo tanto, ¿Cómo se controla la tasa de muerte celular en las neuronas olfatorias? Las neuronas olfatorias podrían servir como modelo para el estudio del reemplazo celular en otras zonas del sistema nervioso central. Si se conociese la respuesta de porqué las células basales responden a diversos agentes que inducen la mitosis, esto podría conducir a la búsqueda de células con propiedades similares dentro del cerebro. De hallar estos tipos celulares, ¿Cuáles son los estímulos necesarios para que ello ocurra?.

6- Los nervios olfatorios presentan características que raramente se hallan en otros nervios que entran al sistema nervioso central. Se ha demostrado que la mielina del sistema nervioso central posee factores inhibitorios para el crecimiento axonal. Se ha demostrado, también, que los axones olfatorios pueden desarrollarse en un medio con mielina dentro del sistema nervioso central y que éstos invaden regiones mielinizadas. Por lo tanto, se ha sugerido que los axones olfatorios carecen de receptores para las proteínas inhibitorias del crecimiento axonal provenientes de la mielina del sistema nervioso central. ¿Cuál es el rol de las células de Schwann tan particulares que rodean a los nervios olfatorios? ¿Cuáles son sus propiedades? ¿Qué similitudes y que diferencias presentan con los oligodendrocitos del sistema nervioso central?. ¿Cuál sería la función de las células de sostén en cuanto a su ubicación rodeando a las neuronas olfatorias?

7- La particular inervación de la mucosa olfatoria a través de los nervios trigéminos y terminal lleva a inferir algunas reflexiones. Ramas del nervio trigémino terminan dentro del epitelio olfatorio, en contacto con las neuronas olfatorias. Existe alguna relación entre los elementos trigeminales y las neuronas olfatorias de manera tal de alterar las repuestas fisiológicas?. Los péptidos del sistema trigeminal modulan de alguna manera la actividad olfatoria?.

Por otro lado, el nervio terminal sigue siendo aún hoy un nervio enigmático y su presencia en la cavidad nasal lleva a pensar si este nervio tendrá alguna función olfatoria o no.

De lo expuesto anteriormente se desprende que aún quedan varias piezas por descifrar que nos ayudarían a entender como funciona el complejo rompecabezas del sistema olfatorio.

Los resultados obtenidos en esta Tesis podrían colaborar con la mejor comprensión de algunos de los interrogantes planteados anteriormente.

La gran cantidad de mucosa olfatoria que presenta la cavidad nasal de estos animales facilitaría los estudios químicos -para analizar la composición del mucus- y bioquímicos -especialmente para identificar receptores-, en los cuales es crítica la masa mínima de tejido necesaria para llevar a cabo estos experimentos.

El enorme desarrollo del rinencéfalo colaboraría en una mejor comprensión en la codificación y envío de la información olfatoria al SNC. Esta característica se complementa con una gran resistencia a intervenciones quirúrgicas -especialmente *Chaetophractus villosus*- lo cual facilita la implantación de electrodos para estudios electrofisiológicos.

La presencia de células de sostén con características estructurales que difieren de las halladas en otros mamíferos, otorgaría datos que ayuden a dilucidar el papel de estas células en el mecanismo olfatorio.

La bulbectomía y la axotomía de los nervios olfatorios -operaciones ya realizadas en nuestro Instituto- podrían ayudar a comprender los mecanismos de regeneración neuronal y de crecimiento axonal dentro del SNC.

La presencia de los nervios trigéminos y terminal muy desarrollados y accesibles facilitarían los estudios de inervación de la mucosa olfatoria y la posible influencia de esta inervación sobre la respuesta fisiológica de las neuronas receptoras olfatorias. Se requerirán nuevos experimentos para tratar de aclarar: 1- la variedad de neurotransmisores y neuromoduladores, 2- determinar, sobre las bases de características estructurales, los orígenes de fibras extrínsecas para poder especificar las estructuras blanco, 3- definir patrones espaciales de células que reciben múltiples inervaciones de nervios extrínsecos con diferentes neurotransmisores.

Los armadillos -a pesar de pertenecer al grupo Eutheria- son considerados como unos de los miembros más primitivos y, además, un grupo hermano de todos los demás euterios (Englemann, 1985). Por lo tanto el estudio de estructuras olfatorias -tanto centrales como periféricas- en los armadillos representa el punto de partida para futuros estudios experimentales, en los cuales se requieran arreglos anatómicos y fisiológicos más favorables para diferentes tipos de investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

- AFFANNI J.M. (1972). Observations on the sleep of some South American marsupials and edentates. En: The sleeping brain. Perspectives in the brain science. Vol 1. M.M. Chase (Ed.) Univ. Calif. Los Angeles.

- AFFANNI J.M. (1972). Observations on the sleep of some South American marsupials and edentates. En: The sleeping brain. Chase M.M. (ed.). Los Angeles: Perspectives in the brain science (Vol. I).

- AFFANNI J.M., CARUSO R.C., GARCIA SAMARTINO L., MASCITTI T.A., PAVIA M.A., PRIMAVERA DE BASSO H., VACAREZZA O.L. (1969). Interbulbar commissural olfactory pathway: an experimental study in the armadillo *Chaetophractus villosus*. Acta Physiologica Latino Americana 19(4): 384-388.

- AFFANNI J.M., CASANAVE E.B., GARCIA SAMARTINO L., FERRARI L. (1986). Neocortical and olfactory bulb activity in armadillos submitted to covering with soil. Archives international de Physiologie et Biochemie 94: 271-279.

- AFFANNI J.M., DANIELE C., SACARAVILLI A.M., GARCIA SAMARTINO L. (1972a). Efecto de la sección del tracto olfatorio lateral sobre las actividades rhinocentrífugénicas y reoprivogénicas en el armadillo *Chaetophractus villosus*. Rev. Soc. Arg. Biol. 54: 37-38.

AFFANNI J.M., GARCIA SAMARTINO L. (1984). Comparative study of electrophysiological phenomena in the olfactory bulb of some South American marsupials and edentates. En: Comparative Physiology of sensory Systems. Bolis, L.; Keynes, R.D. and Madrell, S.H.P. (Eds.), Cambridge University Press.

- AFFANNI J.M., GARCIA SAMARTINO L., CASANAVE E.B., DEZI R. (1987). Absence of apnea in armadillos covered by soil. Respiration Physiology 67: 239-243.

- AFFANNI J.M., GARCIA SAMARTINO L., MORITA E. (1968). Observaciones sobre la actividad bioeléctrica del neocortex, paleocortex y bulbo olfatorio de *Chaetophractus villosus*. Rev. Soc. Arg. Biol. 44: 189-196.

- AFFANNI J.M., LISOGORSKY E., SCARAVILLI A.M. (1972). Sleep in the giant South American armadillo *Priodontes giganteus* (Edentata, Mammalia). Experientia 28(9): 1046-1047.

- AFFANNI J.M., PAPINI M., GARCIA SAMARTINO L. (1978b). Acción del haloperidol sobre la actividad bioeléctrica del bulbo olfatorio de *Chaetophractus villosus*. Rev. Soc. Arg. Biol. 54: 21-22.

- AFFANNI, J.M., E. LISOGORSKY, AND A.M. SCARAVILLI. (1972). Sleep in the Giant South American armadillo *Priodontes giganteus* (Edentata, Mammalia). Experientia, 28: 1046-1047.

- ALDANA MARCOS, H.J., FERRARI C.C., BENÍTEZ I., AND AFFANNI J.M. (1996). Standardization of Fixation, Processing and Staining Methods for the Central Nervous System of Vertebrates. Biocell, in press.

- ALLISON A.C. (1953). The morphology of the olfactory system in the vertebrates. Biol. Rev. 28: 195-244.

- AMESCUA M.E. (1978). The armadillo as an experimental model for leprosy research in Mexico. PAHO, Sct. Public. Nro. 366. pp: 108-109.

- ANDERSON J.M., BENIRSCHKE K. (1971). The armadillo, *Dasypus novemcinctus*, in experimental biology. Lab Anim Care 16: 202-216.

- ANDERSON J.M., BERNIRSCHKE K. (1962). Tissue transplantation in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. Annals New York Academy of Science. Vol: 99: 399-414.

- AOKI K., OSUMI-YAMASHITA N., ETO K. (1995). differential expression of N-CAM, vimentin and MAP1B during initial pathfinding of olfactory receptor neurons in the mouse embryo. *Anat Embryol.* 192: 211-220.

- ARIËNS KAPPERS C.U., G.C. HUBER, AND E.C. CROSBY (1960). The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates including the man Vol. II. NewYork: Hafner Publishing Company.

- ASANUMA N., NOMURA H. (1991). Cytochemical localization of cyclase activity in rat olfactory cells. *Histochem J.* 23: 83-90.

- ATOJI Y., HORI Y., SUGIMURA M., SUZUKI T. (1987). Lectin histochemical study on the infraobital gland os the japanese serow (*Capricornis crispus*). *Acta Morph. Neerl. Scand.* 25: 201-213.

- ATOJI Y., SIGIMURA M., SUZUKI Y. (1989). Sebaceous glands of the infraorbital gland of the japanese serow *Capricornis crispus*. *J. submicrosc. cytol. pathol.* 21(2): 375-383.

- ATOJI Y., YAMAMOTO Y., SUZUKI Y. (1993). Apocrinfe secretion in the infraorbital gland of the japanese serow, *Capricornis crispus*. a sacnning electron- microscopic study. *Acta Anat.* 148: 8-13.

- BACHAR C., HAVER E., KADAR T., LEVY A., LICHTSTEIN D. (1995) Possible involvement of atrial natriuretic peptides in olfaction. *Brain Res.* 682: 231-234.

- BALIÑA L.M., CARDAMA J.E., GATTI R.P., VALDEZ J.C. Y BIANCHI O. (1978). Reserch on armadillos in Argentina. Armadillo as experimental model for biomedical reserch. Scientific publication Nro. 366. Washington D.C.: Pan American Health Organization pp: 103-105.

- BALIÑA L.M., CUBA CAPARÓ A., CARDAMA J.E., GATTI J.C., SANTABAYA E. Y VALDEZ R. (1975) Inoculación del *Mycobacterium leprae* a tres especies de armadillos autóctonos de la Argentina. *Leprología* 20: 11-14.

- BALIÑA L.M., VALDEZ R.P., RESOAGLI E., MARTINEZ A., DIAZ P., BIANCHI O. Y GARCIA BELLOQ N. (1980). Estudios con *Dasypus hybridus* (mulita), *Dasypus novemcinctus* (tatú), y *Chaetophractus villosus* (peludo). *Rev Argent Dermatol.* 61: 151-154.

- BANCROFT J.D. AND STEVENS A. (1990: Theory and practice of histological techniques. Bancroft J.D. and Stevens A. (Eds.). Churchill Livingstone, United Kindom.

- BANNISTER L.H. (1965): The fihe structure of the olfactory surface of teleostean fishes. *Quart. J. Microsc. Sci.* 106: 333-342.

- BARBER P. Y LINDSAY R.M. (1982). Schawn cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* 7: 3077-3090.

- BARR S.C., BROWN C.C., DENNIS V.A., KLEI T.R. (1991). The lesions and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossum and the armadillos from southern Louisiana. *J Parasitol*, 77(4): 624-627.

- BARRET T.V., NAIFF R.D. (1990). Trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum* from armadillos (Xenarthra: Dasypodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85(4): 407-411.

- BASTIANELL E., POLANS A.S., HIDAKA H., POCHET R. (1995). Differential distribution of six calcium-binding proteins in the rat olfactory epithelium during postnatal development and adulthood. *J. Comp. Neurol.* 354: 395-409.

- BENITEZ I., ALDANA MARCOS H.J., AFFANNI J.M. (1994) The encephalon of *Chaetopractus villosus*. A general view of its most salient features. *Comunicaciones biológicas* 12 (1): 57-73.

- BIGNAMI A., ENG L.F., DAHL D., UYEDA T.C. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43: 429-435.

- BIRABEN M. (1951). Semblanza de Miguel Fernández descubridor de la poliembrionía en los mamíferos. *Investigación y Ciencia*. Mayo: 224-229.

- BOJSEN-MOLLER F. (1964). Topography of the nasal glands in rats and some other mammals. *Anat. Rec.* 150: 11-24.

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

- BOZZOLA J.J. Y RUSSELL L.D. (1992). *Electron Microscopy*. Jones and Bartlett Publishers. Boston.

- BREIPOHL W., BIJVANK G.J., ZIPPEL H.P. (1973). Die oberflächenstruktur der bowmanischen drüsen des goldfisches (*Carassius auratus*). *Z. Zellforsch. mikr. Anat.* 131: 329-346.

- BURCK H.C. (1969). *Coloración de Nissl*. En: *Técnica Histológica*. Madrid: Paz Montalvo, pp. 129-130.

- BURCHFIELD H.P., STORRS E.E., WALSH G.P., VIDRINE M.F. (1976). Improved caging for nine-banded armadillos. *Laboratory animal science*. Vol: 26(2): 243-236.

- BURD G., DAVIS B., MACRIDES F., GRILLO M., MARGOLIS F. (1982). Carnosine in primary afferents of the olfactory system: an autoradiographic and biochemical study. *J. Neuroscience* 2: 244-255.

- BYRD C.A., BRUNJES P.C. (1995). Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *J. Comp. Neurol.* 358: 247-259.

- CACCHIONE R.A., CASCELLI E.S., ZUBERBUHEER J.M., MARTINEZ E.S. (1966). Leptospirosis en animales silvestres. Aislamiento de una cepa de *Leptospira canicola* de un peludo (*Chaetophractus villosus*). Rev Med Vet 47: 363-366.
- CARR V., FARBMAN A.I., COLLETTI L.M., MORGAN J.I. (1991). Identification of a new non-neuronal cell type in the rat olfactory epithelium. Neuroscience 45: 433-449.
- CARSON F. (1980). *Nerve tissue*. En: Theory and Practice of Histotechnology. Sheehan D. and Hrapchack B. (eds). London: The C.V. Mosby Company, pp. 252-266.
- CASANAVE E.B. (1989). El modelo experimental y su importancia biológica en medicina. En: Estudio sobre las reacciones fisiológicas de *Chaetophractus villosus* sometido a enterramiento experimental. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- CASANAVE E.B., GARCIA SAMARTINO L., AFFANNI J.M. (1995). Bradycardia in armadillos experimentally covered by soil. Arch. Physiol. Biochem. 103: 51-53.
- CASANAVE, E.B., AND J.M. AFFANNI. (1994). Body temperature of the Armadillo *Chaetophractus villosus*. Archives Internationales de Physiologie et Biochemie. 102: 243-245.
- CASASCO A., GIORDANO M., DANOVA M., CASASCO M., ICARO CORNAGLIA A., CALLIGARO A. (1993). PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissue. A combined immunocytochemical and flow cytometric study. Histochemistry 99: 191-199.
- CASTELLS M.T., MADRID J.F., AVILES M., MARTINEZ-MENARGUEZ A.J., BALLESTA J. (1994). Cytochemical characterization of sulfo-and sialoglycoconjugates of human laryngeal glandular cells. J. Histochem. Cytochem. 42(4): 485-496.

- CLARK W.K. (1951). Ecological life history of the armadillo in the eastern Edwards Plateau region. *Am. Midl. Nat.* 46: 337-358.

- COOK H.C. (1990). Carbohydrates. En: *Theory and practice of histological techniques*. Bancroft J.D. and Stevens A. (Eds.). Churchill Livingstone, United Kindom. pp: 177-212.

- CREUTZFELD, H.G. (1912). Über das Fehlen der Epiphysis cerebri bei einigen saugern. *Anat.Anz.*, 42: 517-521.

- CREWS L., HUNTER D. (1994). Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspectives in developmental biology* 2(2): 151-161.

- CROSBY E.C., HUMPREY T., LANER E.W. (1962). Rhinencephalon, Limbic Lobe. En: *Correlative Anatomy of the Nervous System*. New York: The Macmillan Company. pp: 412-433.

- CROSBY E.C., WOODBURNE R.T. (1943). The nuclear pattern of the non tectal portions of yhe armadillo of the midbrain and isthmus in the armadillo. *J. Comp. Neurol.* 78:191-211.

- CUBA CAPARO A. (1976). Some hematologic and temperature determinatios in the 7-banded armadillo, *Dasypus hybridus*. *Lab Anim Sci*, 26: 450-455.

- CUBA CAPARO A. (1979). Atlas de Histología del armadillo de siete bandas (*Dasypus hybridus*). Centro Panamericano de Zoonosis. Organización Mundial de la Salud.

- CUBA CAPARO A. Y MYERS D.M. (1978). Interstitial nephritis in the seven-banded armadillo, *Chaetophractus villosus* and its association with infections caused by several types of leptospiral serotypes. Armadillo as an experimental model for biomedical reserch. Scientific Publication Nro. 366. Washington D.C. Pan American Health Organization, pp: 110-114.

- CUSCHIERI A., BANNIESTER L.H. (1974). Some histochemical observations on the mucosubstances of the nasal glands of the mouse. *Histochemical Journal* 6: 543-558.

- CHATAIN I. (1967). *Terminologia anatomica referida a la nomenclatura internacional*. Colombia: Ed. Norma-Cali.

- CHEN Z., LANCET D. (1984). Membrane proteins unique to vertebrate olfactory cilia: the candidates for sensory receptor molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1859-1863.

- CHEN Z., PACE U., RONEN D., LANCET D. (1986). Polypeptide gp95. A unique glycoprotein of olfactory cilia with transmembranes receptor properties. *J. Cell. Biol.* 261: 1299-1305.

- CHRISTENSEN A., FAWCETT D. (1966). The structure of testicular interstitial cells in mice *Am. J. Anat.* 118: 551-569.

- CHUAH M.I., Y AU C., (1991). Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium. *J. of Neurosci. Res.* 29: 172-180.

- CHUAH M.I., Y AU C., (1992). Neural Cell adhesion molecules are present in the fetal human primary olfactory pathway. *Dev. Neurosci.*, 14: 357-361.

- CHUAH M.I., Y ZHENG A.D. (1992). The human primary olfactory pathway: fine structural and cytochemical aspects during development and in adults. *Micros. Res. and Tech.* 23: 76-85.

- DANGUY A., AKIF F., PAJAK B., GABLUS H.J. (1994). Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. *Histol. Histopath* 9:155-171.

- DE LORENZO A.J. (1957). Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *J. Biophysic. and Biochem.* 3(6): 839-848.

- DE NICOLA A.F., AFFANNI J.M. (1971). Biosynthesis of steroids by the adrenal glands of the peludo *Chaetophractus villosus* a South-american armadillo. Acta Physiol Latinoam, 21: 297-302.
- DE ROBERTIS E., DE ROBERTIS E. (1984). Biología celular y molecular. Buenos Aires: El Ateneo. pp: 171-193.
- DHOPLE A.M. (1991). Changes in hydrolytic enzyme activities in armadillos infected with *Mycobacterium leprae*. Microbios, 66(266): 55-64.
- DHOPLE A.M., STORRS E.E., LAMOUREUX L.C. (1992). Isolation of cultivable mycobacteria from feces and lungs of armadillos infected with *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. other Mycobact. 60 (2): 244-249.
- DOTY R.L. (1995). Intranasal trigeminal chemoreception. En: Handbook of olfaction and gustation (Doty R. (ed.)). New York: Marcel Dekker, Inc. pp: 821-833.
- DOUCETTE J.R. (1982). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. Anat. Rec. 210: 385-391.
- DOUGLAS W.W. (1978). Stimulus-secretion coupling: variations on the theme of calcium-activated exocytosis involving cellular and extracellular sources of calcium. Respiratory tract mucus. Ciba Foundation Symposium 54. Amsterdam: Excerpta medica.
- DRYER L., GRAZIADEI P.P (1994). Influence of the olfactory organ on brain development. Perspectives on Developmental Neurobiology. 2(2): 163-174.
- ECCLES R., Y WILSON H. (1973). The parasympathetic secretory nerves of the nose of the cat. J. Physiol. 230: 213-220.

- EISTHEN H.L., SENGELAUB D.R., SCHOEDER D.M., ALBERTS J.R. (1994). Anatomy and forebrain projections of the olfactory and vomeronasal organs in axolots (*Ambystoma mexicanum*). Brain. Behav. Evol. 44: 108-124.
- ENDERS A.C. (1981). Embryonic diapause- perspectives. J Reprod Fert Suppl. Vol: 29: 229-241.
- ENGELMANN G. (1985). the phylogeny of the Xenarthra. En: G.G. Montgomery (ed.) The ecology and evolution of armadillos, sloths and vermilinguas. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, pp: 51-64.
- ESTECONDO S.G. (1995). Presentación del grupo en estudio. En: Las glándulas pelvianas de los armadillos (Mammalia, Dasypodidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
- FARBMAN A. I. Y MARGOLIS F.L. (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. Dev. Biol. 74: 205-215.
- FARBMAN A.I. (1992). Cell biology of olfaction. Cambridge University Press, London.
- FAWCETT D (1993a). Epitelio. En Tratado de Histología. Buenos Aires: Editorial Interamericana. pp. 57-82.
- FAWCETT D. (1993b). Tratado de Histología. Buenos Aires: Editorial Sudamericana.
- FERNANDES L.M., OLIVEIRA RIBEIRO C.A. (1995). Ultrastructural study of the olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis* (Reinhardt) (Pisces, Siluroidei). Biocell 19(3): 223-228.
- FERNANDEZ M. (1913). Die Entwicklung der Mulita. Revista del Museo de La Plata. Tomo XXI, 1913.

- FERRI D. Y LIQUORI G.E. (1989). Lectin histochemistry of secretory cell glyconjugates in the nasal mucosa of *Podarcis sicula campestri* De Betta (Reptilia, Lacertidae)
- FINGER T.E., ST. JEOR V., KINNAMON J.C., SILVER W.L. (1990). Ultrastructure of substance P and CGRP immunoreactive nerve fibres in the nasal epithelium of rodents. J. Comp. Neurol. 294: 293-305.
- FLOWER S.S. (1931). Contributions to our knowledge of the duration of life in vertebrates animals. V Mammals. Proceedings of hte Zoo. Soc. of London 145-234.
- FOSTER J.D., GETCHELL M.L., GETCHELL T.V. (1991). Identification of sugar residues in secretory glycoconjugates of olfactory mucosa using lectin histochemistry. Anat. Rec. 229: 525-544.
- FRAHER J.P. (1982). The ultrastructure of sheath cells in the developing rat vomeronasal nerve. J. Anat. 134(1): 149-168.
- FRANCESCHINI V., LAZZARI M., REVOLTELLA R.P., CIANI F. (1994). Histochemical study by lectins binding of surface glyconjugates in the developing olfactory system of rat. Int. J. Devl. Neuroscience 12(3): 197-206.
- FRISCH D. (1967). Ultrastructure of mouse olfactory mucosa. Am. J. Anat, 121: 87-120.
- GALBREATH G.J. (1985). The evolution of monozygotic polyembryony in *Dasypus*. En: The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Montgomery GG. (ed.) Wsahington: Smithsonian Institution Press. pp: 243-246.
- GARCIA SAMARTINO L., AFFANNI J.M., CASANAVE E.B., FERRARI R. AND IODICE O. (1987). On the presence of a peculiar alpha rhytm in the olfactory tubercle of Waking armadillos. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 66: 185-190.

- GARCIA SANMARTINO L., SCARAVILLI A.N., AFFANNI J.M., CINTO R.O. (1974). Estudio cuantitativo de la vigilia y el sueño en *Chaetophractus villosus* (Mammalia, dasypodidae). *Physis* (Sección C) 33: 145-150.
- GAUDIN T.J., BIEWENER A.A. (1992). The functional morphology of xenarthrous vertebrae in the armadillo *Dasypus novemcinctus* (Mammalia, Xenarthra). *J. Morph.* 214: 63-81.
- GENEST J., CANTIN M. (1989). The atrial natriuretic factor: its physiology and biochemistry. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 110: 1-145.
- GEREBTZOFF, M.A., GOFFART M. (1966). Cytoarchitectonic study of the isocortex in the sloth (*Choloepus hoffmanni* Peters). *J. Comp. Neurol.* 126: 523-534.
- GETCHELL T.V., GETCHELL M.L. (1977). Histochemical localization and identification of secretory products in salamander olfactory epithelium. *Olfaction and Taste VI*, Paris. pp: 108-112.
- GETCHELL M.L., GETCHELL T.V. (1991). Immunohistochemical localization of components of the immune barrier in the olfactory mucosae of salamanders and rats. *Anat. Rec.* 231: 358-374.
- GETCHELL M.L., GETCHELL T.V. (1992). Fine structural aspects of secretions and extrinsic innervation of the olfactory mucosa. *Microsc. Res. Tech.* 23: 111-127.
- GETCHELL M.L., RAFOLS J. A., GETCHELL T.V. (1984). Histological and histochemical studies of the secretory components of the salamander olfactory mucosa: effects of isoproterenol and olfactory nerve section. *Anat. Rec.* 208: 553-565.
- GILBERT B.M., GIACOMETTI L. (1972). An environmental caging system and maintenance program for the nine-banded armadillos, *D. novemcinctus*. *Laboratory Animal Science*. Vol: 22(5): 739-740.

GONG Q., y SHIPLEY M.T. (1996). Expression of extracellular matrix molecules and cell surface molecules in the olfactory nerve pathway during early development. *J. Comp. Neurol.* 366: 1-14.

- GORDON K.C. (1992). Tissue processing. En: *Theory and Practice of Histological Techniques*. J. Bancroft and A. Stevens, (eds) London; Churchill Livingstone, pp. 43-59.

- GRASSE P. (1955). Organe olfactif. En *Traité de Zoologie* (Tomo XII). Masson et C^{ie} éditeurs. Paris: Libraires de L' Académie de médecine. pp: 522-552.

- GRASSE P. (1955). *Traité de Zoologie* (Tomo XVII). Masson et C^{ie} éditeurs. Paris: Libraires de L' Académie de médecine. pp: 522-552.

- GRAZIADEI P. (1965). Electron microscopic observations of the olfactory mucosa of the cat. *Experientia* XXI/5: 247-275.

- GRAZIADEI P. (1966). Electron microscopic observations of the olfactory mucosa of the mole. *J. Zool. Lond.* 149: 89-94.

- GRAZIADEI G.A., MARGOLIS F.L., HARDING J.W., GRAZIADEI P.P. (1977). Immunohistochemistry of the olfactory marker protein. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 1311-1316.

- GRAZIADEI P.P., MONTI-GRAZIADEI G.A. (1976). Olfactory epithelium of *Necturus maculosus* and *Ambystoma tigrinum*. *J. Neurocytol.* 5: 11-32.

- GRAZIADEI P.P., MONTI-GRAZIADEI G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory neurons. *J. Neurocytol.* 8: 1-18.

- GRIEPP E., ROBBINS E. (1986) Epitelio. En: Histologia. Weiss L. (Ed.). Editorial El Ateneo, Bs. As. pp. 99-126.

- GRUNDITZ T., UDDMAN R., SUNDLER F. (1994). Origin and peptide content of nerve fibers in the nasal mucosa of rats. *Anat. Embryol.* 189: 327-337.

- GUESDON J.L., TERNYNCK T., AVRAMEAS S. (1979). The use of avidin biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1131-1139.

- GUTKOWSKA J., MARCINKIEWICZ M. (1989). does the olfactory system mediate water and mineral regulating mechanisms? Evidence of immunoreactive atrial natriuretic factor within olfactory mucosa. *J. Neurochem.* 53(6): 1830-1836.

- HADLEY W.M. Y DAHL A.R. (1982). Cytochrome P-450 dependent monooxygenase activity in rat nasal epithelial membranes. *Toxicol. Lett.* 10: 417-422.

- HARPER, J.W., WATSON J.D.(1975). A macroscopic study of the brain of *Bison bison* the Anerica plains buffalo. *Anat. Rec.* 184: 187-202.

- HARTING J.K., MARTIN G.F. (1970). Neocortical projections to the pons and medulla of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *J. Comp. Neurol.* 138: 483-500, 1970.

- HEMPSTEAD J.L., MORGAN J.I. (1983). Flourescent lectins as cell-specific markers for the rat olfactory epithelium. *Chem. Senses* 8: 107-120.

- HERRICK C.J. (1955) The function of the olfactory parts of the cerebral cortex. *Proc.Nac.Ac sci. USA.* 19: 7-14.

- HIRSH J.D., MARGOLIS F.L. (1979). Cell suspensions from rat olfactory neudroepithelium, bichemical and histochemical characterization. *Brain Res.* 253: 39-46.

- HOAR W.S., HICKMAN C.P. (1978). *Preparación de salinos, soluciones fisiológicas y tampones*. In: Manual de Laboratorio para Fisiología General y Comparada. Barcelona: Ediciones Omega, pp. 259-263.
- HOFER H.O., MERKER G., OKSCHE A. (1976). Atypische formen des pinealorgans der säugetiere. Verh. Anat. Ges. 70(8): 97-102 (1976).
- HOFFER A., KASNOVSKY M. (1981). Studies on zonation in the epididymis of the guinea pig. I. Ultrastructural and biochemical analysis of the zone rich in large lipid droplets (Zone II). Ant. Rec. 201: 623-633.
- HOLBROOKE E.H., MIELESZKO K.E., SCHOWB J.E. (1995). An immunohistochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. J. Comp. Neurol. 363: 129-146.
- HOWE H.A. (1933). The basal diencephalon of the armadillo. J. Comp. Neurol. 58: 311-371.
- HSU S. (1993). The use of avidin-biotin interaction in immunocytochemistry. En: Immunohistochemistry II. Cuello A.C. (Ed.). John Wiley & Sons, New York. pp: 169-180.
- HUBER G., CROSBY E.C. (1943) A comparison of the mammalian and reptilian tecta. J. Comp. Neurol. 78: 133-190.
- IÓDICE O.H. (1986). On the importance of armadillos and marsupials in biomedical research. Their maintenance and reproduction in laboratory conditions. En: Laboratory Animal Science. Proceedings of Regional/International Scientific Meeting (Rothschild H., Rosenkranz A., Mora Duarte F. (eds.)). Brazil. pp: 292-302.
- IWANAGA T., HAN H., KANAZAWA H., FUJITA T. (1992). Immunohistochemical localization of protein gene product 9,5 (PGP 9,5) in sensory paraneurons of the rat. Biomed. Res. 13: 225-230.

- JAKOB C. (1934). El Pichiciego (*Chlamydophorus truncatus*). Estudios neurobiológicos de un mamífero misterioso de la Argentina. Tomo II. Anicet López (Ed.). Folia Neurobiológica Argentina. Buenos Aires: Facultad de Filosofía y Letras.
- JOB C.K., SANCHEZ R.M., HASTINGS R.C. (1988). Lepromatous meningoencephalitis in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). Int J Lepr other Mycobact Dis. Vol: 56(2): 291-295.
- JOB C.K., HEIDT G.A., LAND E.D., WILKINS L. (1989). Intracellular parasitism of parenchymal cells by *Mycobacterium leprae*. Int J Lepr other Mycobact, 57(3): 659-670.
- JOB C.K., DRAIN V., TRUMAN R.W., SANCHEZ R.M., HASTINGS R.C. (1990). Early infection with *M. leprae* and antibodies to phenolic glycolipid-I in the nine banded armadillo. Indian J Lepr, 62(2): 193-201.
- JOB C.K., DRAIN V., TRUMAN R., DEMING A.T., SANCHEZ R.M. (1992). The pathogenesis of leprosy in the nine-banded armadillo and the significance of IgM antibodies to PGL-1. Indian. J. Lepr. 64(2): 137-152.
- JOHNSON E.W., ELLER P.M., JAFEK B.W. (1995). Distribution of OMP, PGP 9,5 and CaBP-like immunoreactive chemoreceptor neurons in the developing human olfactory epithelium. Anat. Embryol. 191: 311-317.
- JONES F.M., PFEIFFER C.J., ASASHIMA M. (1994). Ultrastructure of the olfactory organ of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Ann. Anat. 176: 269-275.
- KAELEBER W.W. (1966). Nuclear configuration of the diencephalon of *Tamandua tetradactyla* and *Myrmecophaga jubata*. J. Comp. Neurol. 128: 133-170.

- KEENLAND J., FAHRENBACH W. (1967). The structure of steroidogenic cells of a primate cutaneous organ. *Anat. Rec.* 121: 337-368.

- KEY B. AKESON R. (1990). Olfactory neurons express a unique glycosylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J. Cell Biol.* 110: 1729-1743.

- KISHIMOTO J., KEVERNE E.B., EMSON P.C. (1993). Calretinin, calbindin-D28K and parvalbumin-like immunoreactivity in mouse chemoreceptor neurons. *Brain Res.* 910: 325-329.

- KLEIN S.L. Y GRAZIADEI P.P.C (1983). The differentiation of the olfactory placode in *Xenopus laevis*: a light and electron microscope study. *J. Comp. Neurol.* 217: 17-30.

- KLÜVER H., BARRERA E. (1953). *A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system.* *J Neuropath Exp Neurol.* 12: 400-403.

- KÖNIG J.F., KLIPPEL R.A. (1967). The rat brain. An stereotaxic atlas. New York: R. Krieger Publishing Co. Inc.

- KRATZING J.E. (1969). The olfactory mucosa of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 447-458.

- KRATZING J.E. (1978). The olfactory apparatus of the bandicoot (*Isodon macrourus*): fine structure and presence of a septal olfactory organ. *J. Anat.* 125: 601-613.

- KRATZING J.E. (1984a). The structure and distribution of nasal glands in four marsupial species. *J. Anat.* 139: 553-564.

- KRATZING J.E. (1984b). The anatomy and histology of the nasal cavity of the koala (*Phascolactos cinereus*). *J. Anat.* 138(1): 55-65.

- KUROSUMI K., KUROSUMI I., (1982). Further studies on the ultrastructure of the human axillary apocrine sweat glands. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 58: 305-324.
- LACROIX J.S., ANGGARD A., HOLFELT T., O'HARE M.T., FAHRENKRUG J., LUNDBERG J.M. (1990). Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa. *Cell Tissue Res.* 259: 119-128.
- LAHILLE F. (1920). Enumeración sistemática de los pedicúlidos, malófagos, pulícidos, linguatúlidos y ácaros (1a. parte) encontrados en la República Argentina, con una nota sobre una especie de piojo de las ovejas. Buenos Aires.
- LANCET D. (1986). Vertebrate olfactory reception. *Ann. Rev. Neuroscience.* 9: 329-355.
- LEE S.H., IWANAGA T., HOSSHI O., ADACHI I., FUJITA T. (1994). Regional differences of CGRP-immunoreactive nerve fibers in nasal epithelium of the rat. *Arch. Histol. Cytol.* 58(1): 117-126.
- LEWIS J.L., DAHL A.R. (1995). Olfactory mucosa. Composition, enzymatic localization and metabolism. En: *Handbook of olfaction and taste* (Doty R. (ed.)). New York: Marcel Dekker, Inc. pp: 33-52.
- LILLIE R.D., ZIRKLE C., GRECO J.P. (1953). Final report of the committee on histologic mounting media. *Stain Techn* 28(2): 57-80.
- LIU T.C., JI Z.M., SKINSNES O.K. (1989). Light and electron-microscopic study of *M.leprae* infected armadillo nerves. *Int J Lepr other Mycobact Dis.* Vol: 57(1): 65-72.
- LOO Y.T. (1930). The forebrain in the opossum, *Didelphis virginiana*. Part I. *J. Comp. Neurol.* 51 (1): 1- 148.

- LOO Y.T. (1931). The forebrain in the opossum, *Didelphis virginiana*. Part II. J. Comp. Neurol. 52 (1): 1- 148.

- LOO S.K. (1977). Fine structure of the olfactory epithelium in some primates. J. Anat. 123: 135-145.

- LOWE J., COX G. (1990). *Neurophatological techniques*. In: Theory and Practice of Histological Techniques. Bancroft J. And Stevens A. (eds.). London: Churchill Livingstone, pp. 343-378.

- LUCHERONI A., MAURIZI M., SPRECA A., PALMERINI C.A., BINAZZI M. (1986). Some aspects of the secretion activity of the human olfactory glands. *Rhinology* 24: 57-60.

- LUNA L.G. (1968). *Methods for nerve cells and fibers*. En: Manual of histology staining method of the Armed Forces. Institute of Pathology. Luna L.G., De. New York: The Bakiston-McGrow Hill Inc. Company, pp. 189-220.

- LUNA L.G. (1968). Preparation of tissue. En: Manual of Histology Staining Method of the Armed Forces. Institute of pathology. The Bakiston-McErow Hill Inc. Company. New York. pp. 1-11

- MACRIDES F., SCHOENFELD T.A., MARCHAND J.E., CLANEY A.N. (1985). Evidence for morphologically, neurochemically and functionally heterogeneous classes of mitral and tufted cells in the olfactory bulb. *Chem. Senses* 10: 175-202.

- MAGALHAES O., ROCHA A. (1944). Contribucao para o conhecimento do tipo exantemático neotropico no Brasil. *Mem Inst O Cruz.* 40: 1-8.

- MAHONEY R. (1966). *Histological techniques*. En: Laboratory Techniques in Zoology. Great Britain: Butterworth & Co. (Publishers) Ltd., pp. 177-266.

- MALM L. (1973). Stimulation of sympathetic nerve fibers to the nose in cats. *Acta Otolaryngol.* 75: 519-526.

- MALLER O. Y KARE M.R. (1967). Observation on the sense of taste in the armadillo *Dasypus novemcinctus*. *Anim. Behav.* 5(1): 8-10.

- MANNS E. (1960). *A combined myelin-Nissl stain*. *Stain Tech.* 35: 349-351.

- MARGOLIS F. (1972). A brain unique to the olfactory bulb. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 60(5): 1221-1224.

- MARGOLIS F. (1974). Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science* 184: 909-911.

- MARGOLIS F., GRILLO M., GRANNOT-REISFELDT N., FARBMAN A. (1983). Purification, characterization and immunohistochemical localization of the mouse kidney carnosine. *Biochim. Biophys. Acta* 744: 237-248.

- MARTOJA R. y MARTOJA PIERSON M. (1970) *Técnicas de histología animal*. Eds. Masson Et Cie. Toray-Masson S.A., Barcelona.

- MAZZA S. Y ROMANA C. (1935). Ulceras y edema cutáneo del tatú naturalmente infectado por T. Cruzi. *Reunión Soc Argent Patol Reg* 1:526.

- MC. KENNA M.C. (1975). Toward a phylogenetic classification of the Mammalian. En W.P. Luckett and F.S. Szalay (eds.): *Phylogeny of primates*. New York: Plenum Press, pp: 21-46.

- MELLERT T.K., GETCHELL M.L., SPARKS D.L., GETCHELL T.V. (1992). Characterization of the immune barrier in human olfactory mucosa. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 106: 181-188.

- Menco B. (1992a). Lectins bind differentially to cilia and microvilli of major and minor cell populations in olfactory and nasal respiratory epithelia. *Microsc. Res. Tech.* 23: 181-199.
- Menco B. (1992b). Ultrastructural studies on membrane, cytoskeletal, mucous, and protective compartment in olfaction. *Microsc. Res. Tech.* 23: 215-224.
- Menco B.P., Farbman A. (1992). Ultrastructural evidence for multiple mucous domains in frog olfactory epithelium. *Cell Tissue Res.* 270: 47-56.
- Milosevic A., Kanazir S., Zecevic N. (1995). Immunocytochemical localization of growth-associated protein GAP-43 in early human development. *Dev. Brain Res.* 84: 282-286.
- Mochizuki I., Setser M.E., Martinez J.R., Spicer S.S. (1982). Carbohydrate histochemistry of rat respiratory glands. *Anat. Rec.* 202: 45-59.
- Monnier, M., Gangloff H. (1961) Atlas for stereotaxic brain research on the conscious rabbit. New York: Elsevier Publishing Company.
- Monti-Graziadei G.A., Graziadei P.P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* 8: 197-213.
- Monti-Graziadei G.A. (1983). Experimental studies on the olfactory marker protein. III. The olfactory marker protein in the neuroepithelium lacking connections with the forebrain. *Brain Res.* 262: 303-308.
- Moran D. T., Carter Rowley J.III., Jafeck B.W. (1982). Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res.* 253: 39-46.

- MORI K., KISHI K., Y OJIMA H. (1983). Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted and granular cells in the rabbit olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 219: 339-355.

- MORRISON E.E., COSTANZO R.M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 23: 49-61.

- MORRISON E.E., MORAN D.T. (1995). Anatomy and ultrastructure of the human olfactory neuroepithelium. En: *Handbook of olfaction and gustation*. R. Doty (ed.). New York: Marcel Dekker, Inc. pp: 75-97.

- MOSERAG O., BENIRCHKE K. (1962). Fetal zone of the agrenal in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Anat Rec.* 143: 47-59.

- MOULTON D.G., BEIDLER L.M. (1967). Structure and funtion in the peripheral olfactory system. *Physiological Review.* 47(1): 1-52.

- MUSTACA, A.E., M.R. PAPINI, AFFANNI J.M. (1985). Aprendizaje de probabilidad en el armadillo *Chaetophactus villosus*. *Interamerican Journal of Psychology*, 19: 45-56.

- NAKAKURA K.C., LASLEY B.L. (1985). Fetal endocrinology of the common long-nosed armadillo. En: *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Montgomery G. (ed.) New York: Smithsonian Institute. pp: 247-254.

- NEGUS V. (1958). *The Comparative anatomy and physiology of the nose and paranasal sinuses*. Edinburgh: E. & S. Livingstone Ltd.

- NIÑO F.L. (1937). Triquinosis experimental en el "peludo". IX reunión Argent. Pat. Reg. 2: 640.

- NOVACEK M.J., WYSS A.R., Mc. KENNA M.C. (1988). The mayor groups of eutherian mammals. En M.J. Benton (ed.): The phylogeny and classification of tetrapods. Syst. Assoc. Spect. Paper 35B: 31-71.

- OKANO M., WEBER A.F., FROMMES S. (1967). Electron microscopic studies of the distal border of the canine olfactory epithelium. J. Ultrastruct. Res. 17: 487-505.

- OKSCHE, A., (1965). Survey of the development and comparative morphology of the pineal organ. Prog.Brain.Res., 10: 3-29.

- ORTEGO L., HAWKINS W., WALKER W., KROL R., BENSON W. (1994). Detection of proliferating cell nuclear antigen in tissue of three small fish species. Biotechnic & Histochemistry 69(6): 317-323. ·

- OSADA T., ICHIKAWA M., COSTANZO R.M. (1995). Is a nestin a marker for chemosensory precursor cells?. Brain Res. 683: 254-257.

- OSWALDO-CRUZ, E., ROCHA-MIRANDA C.E. (1967) The diencephalon of the opossum in stereotaxic coordinales. I. The epithalamus and dorsal thalamus. J. Comp. Neurol. 129: 1-38.

- PAPEZ J.W. (1932). The thalamic nuclei of the nine banded armadillo (*Tatusia novemcincta*). J. Comp. Neurol. 56 (1): 49-103.

- PAPINI, M.R., A.E. MUSTACA, AFFANNI J.M. (1984). Spatial learning in South American opossums and armadillos. The Journal of General Psychology. 111: 45-55.

- PAPINI, M.R., A.E. MUSTACA AFFANNI J.M. (1985). Discrimination learning in the armadillo *Chaetophactus villosus*. A study of positional strategies. The Journal of General Psychology. 112(1): 119-127.

- PAPPAS P. (1971). The use of a chrome-alum gelatine (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections. *Stain Techn.* 46(3): 121-124.

- PAXINOS G., WATSON C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Australia: Academic Press.

- PAZ D.A., RUIZ G., CASCO V.H., PISANÓ A. (1993). The presence of atrial natriuretic peptide (ANP) in spermatozoa of *Bufo arenarum*, and effects of GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 31-37.

- PEARCE A.G.E. (1985). *Lipids, lipoproteins and proteolipids*. En: *Histochemistry. Theoretical and Applied*. New York: Churchill Livingstone, pp. 768-849.

- PEARSE AG. (1985). *Histochemistry, theoretical and applied (Vol 2)*. William Clowes Limited, Beccles and London.

- PEPPLER R.D., STONE S. (1976). Plasma progesterone level in the female armadillo during delayed implantation and gestation: Preliminary report. *Laboratory Animal Science*. Vol; 26(3): 501-504.

- PEPPLER R.D., STONE S. (1980). Plasma progesterone level during delayed implantation, gestation and postpartum period in the armadillo. *Laboratory Animal Science*. Vol: 30(2): 188-191.

- PESTEAN A., KRIZBAI I., BÖTTCHER H., PÁRDUCZ A., JOÓ F., WOLFF J.R. (1995). Identification of the *Ulex europaeus* agglutinin-I-binding protein as a unique glycoform of the neural cell adhesion molecule in the olfactory sensory axons of adults rats. *Neuroscience Letters* 195: 117-120.

- PETERS J.H., STORRS E.E. (1972). Amino acid levels and L- asparaginase and histaminase activities in plasma of the armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Laboratory Animal Science*. Vol:22(2): 233-236.

- PETERS A., PALAY S., WEBSTER H. (1991). The fine structure of the nervous system (Third edition). Oxford: Oxford University Press.

- PEVET, P., (1983). Anatomy of the pineal gland of mammals. En: The Pineal Gland. Relkin R. (Ed.), New York: Elsevier Biomedical. pp. 1-76.

- PHILLIPS J.A., HARLOW H.J., McARTHUR N.H., RALPHS C.L. Epithalamus of the nine banded armadillo *Dasypus novemcinctus*. Comp. Biochem. Physiol. 85 (3): 477-481.

- PORTIANSKY E.L., GIMENO E.J. (1996). A new epitope retrieval method for the detection of structural cytokeratins in the bovine prostatic tissue. Applied Immunohistochemistry 4(3): 208-214.

- PUDNEY J., FAWCETT D. (1977) Putative steroidogenic cells associated with the ductuli efferents of the ground squirrel (*Citellus lateralis*). Anat Rec. 188: 453-476.

- QUEVEDO F., LASTA J., MARTINEZ B. (1978). The armadillo as a reservoir host of *Salmonella*. En: Armadillo as an experimental model for biomedical research. Washington: Scientific Publication Nro. 366. Pan American Health Organization. pp: 115-117.

- RAFOLS J.A., GETCHELL T.V. (1983). Morphological relations between the receptors neurons, sustentacular cells and Schwann cells in the olfactory mucosa of the salamander. Anat. Rec. 206: 87-101.

- RAMÓN Y CAJAL S. (1902). Trabajos del laboratorio de investigaciones biológicas de la Universidad de Madrid, Tomo I, Madrid, 1902.
- RAMÓN Y CAJAL S., DE CASTRO F. (1972). Coloración de las neurofibrillas en material incluido en parafina. En: Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso. Salvat Ed.. Buenos Aires. pp. 249-270.

- RAMON Y CAJAL S., DE CASTRO F. (1972a). Procederes generales de disociación, métodos de inclusión en celoidina, parafina y gelatina. Inclusiones superficiales. En: Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Barcelona: Salvat, pp. 23-31.
- RAMON Y CAJAL S., DE CASTRO F. (1972b). Estructura de la célula nerviosa. En: Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Barcelona: Salvat, pp.97-100.
- REESE T.S. (1965). Olfactory cilia in the frog. J. Cell. Biol. 25:209-230.
- REIG O.A. (1981). Teoría del origen y del desarrollo de la fauna de los mamíferos de América del Sur. Monographie Naturae. Mar del Plata: Mus. Munic. Ciencias Nat. "Lorenzo Scaglia". pp: 159.
- RHODIN J.A (1975). An atlas of histology. New York: Oxford University Press.
- ROBINSON G., ELLIS I.O., MACLENNAN K.A. (1990). Immunocytochemistry. En: Theory and practice of histological techniques. Bancroft J.D. and Stevens A. (Eds.). Churchill Livingstone, United Kindom. pp: 413-436.
- RODDE C., MOHAMED A., LUESSE H.G., KAZDA J. (1992). Improved method for purification of *Mycobacterium leprae* from armadillo tissues. Int. J. Lepr. other Mycobact. Dis. 60 (2): 277-278.
- ROMEIS B. (1936). Investigación del tejido óseo. En: Guía Formulario de técnica histológica. Labor S.A.. Buenos Aires. pp. 371-387.
- ROTH J.J., W. A. GERN, E.C. ROTH, C.L. RALPH, JACOBSON E. (1995). Nonpineal melatonin in the alligator (*Alligator mississippiensis*). Adv. exp. Med. Biol. 377: 1-14.

- ROYCE G.J., MARTIN G.F., DOM R.M. (1975). Functional localization and cortical architecture in the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus mexicanus*). J. Comp. Neurol. 164: 495-522.
- SAKAI T. (1989). Major ocular glands (Harderian gland and lacrimal gland) of the musk shrew (*Suncus murinus*) with a review on the comparative anatomy and histology of the mammalian lacrimal glands. J. Morph. 201: 39-57.
- SATOH M., TAKEUCHI M., (1995). Induction of NCAM expression in mouse olfactory keratin-positive basal cells in vitro. Develop. Brain Res. 57: 111-119.
- SCOTT J.W., MC DONALD J.K., PEMBERTON J.L. (1987). Short axon cells of the rat olfactory bulb displays NADPH-diaphorase activity, neuropeptide Y-like immunoreactivity and somatostatin-like immunoreactivity. J. Comp. Neurol. 260: 378-391.
- SCHMIDT R.E., BEAUDET L., FLURAD S.B., SNIDER W.D., RUIT K.G. (1995). Pathologic alterations in pre-and postsynaptic elements in aged mouse sympathetic ganglia. J. Neurocytol. 24(3): 189-206.
- SCHNEIDER S.P., MACRIDES F. (1978). Laminar distribution of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. Brain Res. Bull.3: 73-82.
- SCHOENFELD T.A., MACRIDES F. (1984). Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster. J. Comp. Neurol. 227: 121-135.
- SCHOLANDER P.F., L. Irving and S.W. Grinell (1943) Respiration of the armadillo with possible implication as to its burrowing. J. Cell. Comp. Physiol. 21: 53-63.
- SCHOWB J.E., FARBER N.B., GOTTLIEB D. (1986). Neurons of the olfactory epithelium in adult rats contain vimentin. The Journal of Neuroscience 6(1): 208-217.

- SCHOWB J.E., YOUNGENTOB S.L., MEZZA R.C. (1995). Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol.* 359: 15-37.
- SCHULTE E.K.W. (1991). Standardization of biological dyes and stains: pitfalls and possibilities. *Histochemistry* 95: 319-328.
- SCHULTZE M. (1856). Ueber die endigungsweise der geruchsnerven und die epithelialgebile der nasenschleimhaut. *Mber. Akad. Wiss.* p. 504, Berlin.
- SELIGER W., SMITH W. (1968). The fine structure of the adrenal cortex of the 13-lined ground squirrel. *Am. J. Anat.* 123: 297-314.
- SHANTHA T.R., NAKAJIMA Y. (1970). Histological and histochemical studies on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) olfactory mucosa. *Z. Zellforsch.* 103: 291-319.
- SHAPIRO B.I. (1970). Enzyme histochemistry of embrionic nasal mucosa. *Anat. Rec.* 166: 87-98.
- SHEEHAN D.C., HRAPCHAK B.B. (1980). Mounting media. In: *Theory and practice of Histotechnology*. London: The C.V. Mosby Company, pp. 86-88.
- SHEK J.W., WEN G.Y., WISNIEWSKI H.M. (1986). *Atlas of the rabbit brain and spinal cord*. Basel; New York; Karger.
- SHEPHERD G.M. (1994). *Neurobiology* (Third edition). New York: Oxford University Press.
- SHUDDMAGEN L.C. (1907). On the anatomy of the central nervous system of the nine-babded armadillo (*Tatusia novemcinctus Linn.*). *Biol. Bull.* 12: 285-301.
- SIMMONS P.A., RAFOLS J.A., GETCHELL T. (1981). Ultrstructural changes in olfactory receptors neurons following olfactory nerve section. *J. Comp. Neurol.* 197: 237-257.

- SINGH N. (1994). Scanning electron microscopic study of the olfactory epithelium of four coldwater hillstream teleosts from Garhwal hills (India). J. Biosci. 19(1): 91-102.
- SINGH N., BHATT K.C., BAHUGUNA M.K., KUMAR D. (1995). Fine structure of olfactory epithelium in *Schizothoracichthys protgastrus* McClelland and *Schizothorax richardsonii* Gray (Cyprinidae: Teleostei) from Garhwal Himalaya (India). J. Biosci. 20(5): 385-396.
- SINGH R, AND GORDON W.P. (1989). Orcein-alcian blue staining: a new technique for demonstrating acid mucins in gastrointestinal epithelium. J. Clin. Pathol. 42: 581-584.
- SKENE J.H., WILLARD M. (1981). Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. J. Cell. Biol. 89: 96-103.
- SMITH O.C. (1932). The corpus striatum, amygdala, and stria terminalis of *Tamandua tetradactyla*. J. Comp. Neurol. 51: 65-127.
- SMITH E. (1898). The brain in the Edentata. Trans of the Linnean Society of London (second series), part 7: 277-394.
- SMITH J., HEARN G. (1979). Ultrastructure of the apocrine-sebaceous anal scent gland of the woodchuck, *Marmota monax*: evidence for apocrine and merocrine secretion by a single cell type. Anat. Rec. 193: 269-262.
- SPICER S., SCHULTE B. (1992). Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. J. Histochem. Cytochem 40: 1-38.
- SPICER S.S., SETSER M.E., MOCHIZUKI I., SIMSON J.A. (1982). The histology and fine structure of glands in the respiratory tract. Anat. Rec. 202: 33-43.

- SQUARCIA S.M., CASANAVE E.B., CIRONE G.R. (1993). Morfologia craneana de *Chaetophractus villosus* (Demarest, 1904) (Mammalia, Dasypodidae). Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre 75: 55-61.
- STORRS E.E., WILLIAMS R.J. (1968). A study of monozygous quadruplet armadillos in relation to mammalian inheritance. Proc. N.A.C. 60: 910-914.
- STORRS E.E. (1971). The nine-banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. International Journal of Leprosy. 39(3): 703-714.
- STORRS E.E., BURCHFIELD H.P., REES R.J. (1988). Superdelayed parturition in armadillos: A new mammalian survival strategy. Lep. Rev. 59: 11-15.
- STORRS E.E. (1989). Delayed birth. Nature. Vol: 340: 106.
- STORRS E.E., BURCHFIELD H.P., REES R.J. (1989). Reproduction delayed in the common long-nose armadillo, *Dasypus novemcinctus* L. Advances in Neotropical Mammalogy. 535-548.
- STRUBLE R.G., WALTERS C.P. (1982). Light microscopic differentiation of two populations of rat olfactory bulb granule cells. Brain Res. 236: 237-251.
- SUZUKI Y., SCHAFER J., FARBMAN A.I. (1995). Phagocytic cells in the rat olfactory epithelium after bulbectomy. Exp. Neurol. 136: 225-233.
- SUZUKI Y., TAKEDA M. (1991). Basal cells in the mouse olfactory epithelium after axotomy: immunohistochemical and electron-microscopic studies. Cell Tissue Res. 266: 239-245.
- SZABUNIEWICZ M., HOFF H.E., Mc CRADY J.D. (1970). Spontaneous ventricular defibrillation in the armadillo. Cardiovascular Res. Center Bull. 8(4): 135-147.

- SZEKERES G., LUTZ Y., LE TOURNEAU A., DELAAGE M. (1994). Steroid hormone receptor immunostaining on paraffin sections with microwave heating and trypsin digestion. *The Journal of Histotechnology* 17(4): 312-324.
- SZYFRES B., SULZER C.R., GALTONA M.M. (1967). A new leptospiral serotype in the batavial serogroup from Argentina. *Trop Geograf Med.* 19: 344-346.
- TAKAHASHI S., IWANAGA T., TAKAHASHI Y., NAKANO Y., FUJITA T. (1984). Neuron specific enolase and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses. *Cell Tissue Res.* 238: 231-234.
- TAKAMI S. Y GRAZIADEI P.P. (1991). Light microscopic Golgi study of mitral/tufted cells in the accesory olfactory bulb of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 311: 65-83.
- TAKAMI S., GETCHELL M.L., CHEN Y., MONTI-BLOCH L., BERLINER D.L., STENSAS L.J., GETCHELL T.V. (1993). Vomeronasal epithelial cells of the adult human express neuron-specific molecules. *Neuroreport* 4: 375-378.
- TAKAMI S., LUER C.A., GRAZIADEI P.P. (1994). Microscopic structure of the olfactory organ of the clearnose skate, *Raja eglanteria*. *Anat. Embryol.* 190: 211-230.
- TALMAGE R.V., BUCHANAN G.D. (1954). The armadillo *Dasypus novemcinctus*. a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. *Rice Inst Pamph* 41 (2): 1-135.
- TANIGUCHI K., SAITO H., OKAMURA M., OGAWA K. (1993). Immunohistochemical demonstration of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the primary olfactory system of the rat. *Neuroscience Letters* 156: 24-26.
- TANIGUCHI K., TOSHIMA Y., SAITO T.R., TANIGUCHI K. (1996a). Development of the Bowman's and Jacobson's glands in the japanese reddish frog, *Rana japonica*. *J. vet. Med. Sci.* 58(1): 17-22.

- TANIGUCHI K., TOSHIMA Y., SAITO T.R., TANIGUCHI K. (1996b). Development of the olfactory epithelium and vomeronasal organ in the japanese reddish frog, *Rana japonica*. J. vet. Med. Sci. 58(1): 7-15.

- TRUEX R.C. Y CARPENTER M.B. (1967). Neuroanatomía humana (Tercera edición). Buenos Aires: El Ateneo.

- TRUMAN R.W., KUMARESAN J.A., MCDONOUGH C.M., JOB C.K., HASTINGS R.C. (1991). Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. Epidemiol infect, 106(3): 549-560.

- VAN TWYVER H., ALLISON T. (1974). Sleep en the armadillo *Dasypus novemcinctus* at moderate and low ambient temperatures. Brain, Behav. and Evol. 9: 107-120.

- VOLZ D., REID P.E., PARK C.M., OWEN D.A., DUNN W.L. (1987). Anew histochemical method for the selective periodate oxidation of total tissue sialic acids. Histochemical Journal 19: 311-318.

- VOLLRATH M., ALTMANNNSBERGER M., WEBER K., OSBORN M. (1985). An ultrastructural and inmunohistological study of the rat olfactory epithelium: unique properties of olfactory sensory cells. Differentiation 29: 243-253.

- WALKER E.P. (1968). Mammals of the World, 2nd ed, Vol I, Baltimore: Johns Hopkins Press, pp 482-503, 1968.
- WATSON W. (1964). An account of an American armadillo. Phil Trans Roy Soc 54: 57-58.

- WAY J.S. (1963). A comparative study of the olfactory apparatus of three edentates brains-two anteaters and armadillo. Anat. Rec. 145(2): 296-297.

- WEIGERT C. (1882). Über eine neue Untersuchungsmethode des Zentralnervensystems. Zeitschr. f.m. Wissensch., N° 42-43.

- WENZEL B.M. (1987). The olfactory and related systems in birds. En: The terminal nerve (*Nervus Terminalis*). Structure, function and evolution (Demski, Schawanzel-Fukuda (eds.)). New York: Ann. New York Academy of Science. Vol. 519.

- WENSLEY C.H., STONE D.M., BAKER H., KAUER J.S., MARGOLIS F.L., CHIKARAISHI D.M. (1995). Olfactory marker protein mRNA is found in axons of olfactory receptor neurons. The Journal of Neuroscience 15(7): 4827-4837.

- WEST B.C., TODD J.R., LARY C.H., BLAKE L.A., FOWLER M.E., KING J.W. (1988). Leprosy in six isolated residents of northern Louisiana: Time-clustered cases in an essentially nonendemic area. Arch Intern Med, 148(9): 1987-1992.

- WETZEL R.M. (1982). Systematics, distribution, ecology and conservation of South American Edentates. En: Mammalian biology in South America, Univ. Pittsburg. Pittsburg: Special Publication Pymatuning Laboratory of Ecology. Vol:6, pp: 345-375.

- WETZEL R.M (1985) Systematics, distribution, ecology and conservation of South American Edentates. Special Publication Pymatuning Laboratory of Ecology.

- WETZEL R.M. (1985). Taxonomy and distribution of armadillos, Dasypodidae. En: Montgomery, G.G. (ed.). The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Washington D.C.: Smithsonian Institute Press. pp: 145-175.
- WILBORN W.H., SHACKLEFORD J.M. (1971). The cytology of submandibular gland of the opossum. J. Morph. 128: 1-34.

- WILLIAMS P.L., WARNICK R. (1980). Gray's Anatomy. Williams P.L., Warnick R. (eds.). London: Churchill Livingstone.

- WINDLE W.F., RHINES R., RANKIN J. (1943). A Nissl method using buffered solutions of thionin. *Stain Techn*, 18: 77-86.

- WITKIN J.W., SILVERMAN A.J. (1983). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the rat olfactory systems. *J. Comp. Neurol.* 218: 426-432.

- WOODING F. (1979). Lipid droplet secretion by the rabbit Harderian gland. *J. Ultrastuc. Res.* 71: 68-78.

- WURTMAN, R.J., J. AXELROD., D.E. KELLY. (1968). Pineal anatomy. En: *The Pineal*. New York: Academic Press. pp. 2-39.

- YAMAGISHI M., HASEGAWA S., TAKAHASHI S., NAKANO Y., IWANAGA T. (1989). Immunohistochemical analysis of the olfactory mucosa by use of antibodies to brain proteins and cytokeratin. *Ann. Otol, Rhinol and Laringol* 96(5): 384-388.

- YAMAMOTO M. (1976). An electron microscopic study of the olfactory mucosa in the bat and the rabbit. *Arch. Histol. Japon* 35: 359-412.

- ZEISKE E., THEISEN B., GRUBER S.H. (1987). functional morphology of the olfactory organ of two carcharhinid shark species. *J. Can. Zool.* 65: 2406-2412.

- ZEMAN W., INNES J.R. (1963). *Craigie's Neuroanatomy of the rat*. New York: Academic Press.

- ZERBA E.M., CATTANEO P. (1976). Estudio sobre lípidos de animales autóctonos II Lípidos de órganos de los dasipodideos *Chaetophractus villosus* (peludo) y *Dasypus septemcinctus* (mulita). *Anales Asoc Quim Argent.* 64, 401-423.

- ZERBA E.N., CATTANEO P. (1976). Estudio sobre lípidos de animales autóctonos, grasas de depósito de los dasipodideos *Chaetophractus villosus* (peludo) y *Dasypus septemcinctus* (mulita). *Anales Asoc Quim Argenti*, 64: 115-125.

ZIELINSKI B.S., GETCHELL M.L., WENOKUR R.L., GETCHELL T.V. (1989). Ultrastructural localization and identification of adrenergic and cholinergic nerve terminals in the olfactory mucosa. *Anat. Rec.* 225: 232-245.

- ZINNIN K. (1964). Histochemical studies of the olfactory mucosa of the rabbit. *J. Wakayama Med. Soc.* 15: 213-221.

- ZOU X.C., MARTIN G.F. (1995). The distribution of GAP-43. Immunoreactivity in the central nervous system of adult opossums (*Didelphis virginiana*) with notes on their development. *Brain Behav. Evol.* 45: 63-83.

- ZUPANC G.K., HORSCHKE I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353: 213-233.