

Tesis de Posgrado

Microanatomía del sistema respiratorio en *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae)

Hermida, Gladys N.

2003

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:

Hermida, Gladys N.. (2003). Microanatomía del sistema respiratorio en *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3655_Hermida.pdf

Cita tipo Chicago:

Hermida, Gladys N.. "Microanatomía del sistema respiratorio en *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3655_Hermida.pdf

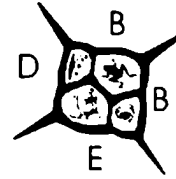
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires, Argentina
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

*“Microanatomía del sistema respiratorio
en Bufo arenarum y
Melanophryniscus stelzneri stelzneri
(Anura, Bufonidae)”*

Autor: Lic. Gladys M. Hermida

Director: Dra. Gladys M. Pellerano

Co-Director: Lic. Luisa E. Fiorito

Laboratorio de Histología Animal
Microanatomía de Anfibios
Dto de B.B.E. - F.C.E y N. (U.B.A.)

3655

Trabajo de tesis presentado para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Noviembre 2003

"Microanatomía del sistema respiratorio en *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae)"

RESUMEN

En el presente estudio se ha determinado que la microanatomía del sistema respiratorio de *B. arenarum* y *M.s.stelzneri* son en algunos aspectos muy diferentes.

Utilizando técnicas macroscópicas, de microscopía óptica y de microscopía electrónica, se caracterizaron anatómicamente e histológicamente el sistema respiratorio de ambas especies. Para ello se dividió el estudio en I) vías aéreas extrapulmonares, II) pulmón y III) cuerpos neuroepiteliales.

Las vías extrapulmonares están reducidas a una laringotráquea constituida por un par de cartílagos aritenoides y el cricoides. En *B. arenarum* a diferencia de *M. s. stelzneri* la laringotráquea está dividida en dos cámaras, una anterior y otra posterior delimitadas ambas por membranas. La mucosa que reviste el lumen de la laringotráquea así como las membranas que tapizan las cámaras presenta una diversidad celular importante. En *B. arenarum* la última porción de la laringotráquea se continúa con dos cámaras "bronquiales" que se abren cada una de ellas a un pulmón mientras que en *M. s. stelzneri* la laringotráquea se comunica directamente con los pulmones.

Los pulmones son diferentes en ambas especies. En *B. arenarum* la estructura interna es más compleja por la presencia de tres tipos de septos: primarios, secundarios y terciarios con características histológicas propias, mientras que en *M. s. stelzneri* la organización interna es simple por la presencia solamente de septos terciarios. El parénquima pulmor es del tipo faveolar para *B. arenarum* y edicular para *M. s. stelzneri*. El epitelio respiratorio está constituido por neumocitos los cuales emiten prolongaciones citoplasmáticas que cubren a los capilares sanguíneos. Estas prolongaciones junto con el endotelio de los capilares constituyen la barrera de intercambio gaseoso.

En *M. s. stelzneri* se determinó la presencia sobre los septos de cuerpos neuroepiteliales a los cuales se les adjudica una posible función secretora y/o receptora.

Palabras claves: anuros, Bufonidae, sistema respiratorio, laringotráquea, cuerda vocal, cámara bronquial, pulmones, septos pulmonares, cuerpos neuroepiteliales, microscopía óptica y electrónica.

**"Microanatomy of the respiratory system of *Bufo arenarum*
and *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae)"**

ABSTRACT

The present study has determined that the microanatomy of the respiratory system of *B. arenarum* and *M.s.stelzneri* are different in some aspects.

Light and electron microscopy were used to study the anatomy and histology of the respiratory system of both species. For it was divided the study in I) extrapulmonary airways, II) lung and III) neuroepithelial bodies.

The extrapulmonary airways in these species are reduced to a laryngotrachea constituted by a couple of arytenoid cartilages and a cricoid cartilage. In *B. arenarum* contrary to *M.s.stelzneri* the laryngotrachea is divided in two laryngeal chambers, anterior and posterior. The epithelia of the chambers as well as the membranes that limit this chambers present an important cellular diversity. In *B. arenarum* the last portion of the laryngotrachea connected with two bronchial chambers which give out onto the lung.

The lungs in both species are different. In *B. arenarum* the internal structure is more complex by the presence of three types of septa: first, second and third order. In *M.s. stelzneri* the parenchyma forms a polygonal network arrangement, therefore the parenchyma is edicular in both. These space are delimited by the interconnection of septa which are covered by respiratory epithelium. This epithelium consists of one type of pneumocytes, which emit a thin cytoplasmic process that cover the pulmonary capillaries to form the outer layer of the air-blood barrier.

In *M.s. stelzneri* neuroepithelial bodies (NEB) appear randomly distributed over the septa. Each NEB consists of special cells, the corpuscular cells (cc) which contains numerous dense core vesicles (dcv). The NEB are associated with afferent and efferent terminal nerves. The location of the NEB, the presence of the dcv, the occurrence of synaptic contacts between nerve endings and the cc and the occurrence of capillaries close to the NEB, suggest a receptosecretory function for the NEB in the lung of *M.s. stelzneri*.

Key words: Anura, Bufonidae, respiratory system, laryngotrachea, vocal chord, bronchial chamber, lungs, septa, neuroepithelial body, light and electronic microscopy.

Agradecimientos

Quede de lo hecho aquí hubiera sido posible de haberme sentido sola. Por suerte siempre conté con una mano amiga capaz de prestarme una ayuda. Por eso creo que lo único que me queda por hacer es agradecer a cada uno de ellos su inmensa e invaluable colaboración.

... gracias a la Dña. Gladys Pellerano por permitirme trabajar con total libertad y estar siempre dispuesta a tenderme una mano.

gracias Luisi por todo. Por abrirme las puertas del laboratorio hace ya 14 años, si la memoria no me traiciona. Por transmitirme tus conocimientos y amor por la histología. Por "prestarme" tus ojos para investigar juntas los preparados histológicos. Por ser una madre postiza, en todo lo que ello implica. Por estar a mi lado siempre, por dejarme crecer libremente. En fin cualquier palabra que utilice se queda corta para agradecer. ¿Sabés que sin vos esto no lo hubiera conseguido. Gracias jefa!

... gracias a la Facultad y al Ex-Departamento de Biología y claro está al actual DBBE ya que tuve de ellas mi

formación de grado, mi formación científica y docente.

... gracias al CONICET ya que parte de los resultados de esta tesis se gestaron durante la época de becaria.

... gracias a la Dra. Graciela Guerrero (para mí G. G.) por ser mi consejera de tesis.

... gracias a Lilia, Fabian y Marianito por el tiempo compartido

... gracias Morocha (Mariano I.)... que te puedo decir... pasé de ser tu docente de Histo para convertirme en compañera de ruta y de vida.

¡Qué suerte que estés acá! Gracias por tu ayuda, por insistir que las fotos de esta tesis se veían mejor si le hacíamos un recuadro al que yo me negaba hacer. Gracias por acercarme una taza de café o brindarme un gesto cariñoso siempre que lo andaba necesitando. Gracias por el esfuerzo de estos últimos tiempos.

Gracias Juliana por estar a mi lado siempre que te necesito y tolerar mis bajones. Por brindarme en tu forma de ser una cuota de alegría diaria.

Gracias Faby por tu paciencia y por permitirme instalarme en tu casa para trabajar juntas. Por las charlas, secutos y

los buenos momentos compartidos.

gracias Mati por tu consideración y ayuda, por alinearme el trabajo en Histo y por ordenar "la cochambre" del lab. 81.

gracias a Diana Pcherenio, Ana Felipe, Nora Ceballos y Mauro Busch por facilitarme mucho de los animales con los que trabajé en esta tesis.

gracias Dante por tus préstamos con total desinterés y sobre todo por facilitarme alguna cuota dulce (helado, torto, etc) siempre que lo necesitaba.

gracias a Cristina Daponte y en su nombre, a todos los de Zoología por permitirme entrar y salir del lab. 33 como si fuera mío.

... gracias a Daniel Medesani por su excelente predisposición siempre que requiera de su ayuda.

... gracias a Pablo P. y a los chicos de invertebrados I por permitirme que los invadiera, casi a diario, y me apropiara de su microscopio y lupa.

gracias a Anita por su ayuda con alguno de los dibujos de esta tesis.

gracias Andie y Adri por estar siempre ahí alentándome y dándome fuerzas para seguir adelante y por ver en mí cualidades que ni yo me reconozco.

Van las gracias a los que tengo lejos, pero que siento muy cerca. Muchas gracias por estar siempre dispuesta a darme un telefonazo desde Chicago cuando lo andaba necesitando.

Gracias por acompañarme a la distancia... gracias Vicente por tu compañía y aliento desde el otro lado del "ordenador".

gracias MAE por compartir mis alegrías y tristezas y por alentarme a seguir adelante en este mundo.

gracias Jani, por hacerme dar cuenta, entre tapas y cara, que debía terminar con la tesis para poder iniciar cosas nuevas. Gracias por tu paciencia y cariño a la distancia.

gracias a mis padres por amarme, por ser incondicionales, por tolerar todo... y un poco más también. Por estar siempre conmigo, por su apoyo, por su esfuerzo, por enseñarme el verdadero valor de las cosas.

A vos, Eli, mi hermano, por ayudarme siempre que lo necesito. Esto es para ustedes, los quiero..

Y a vos Ale un sin fin de gracias
porque como siempre oligo todos el
don de ser buena gente y era no es
muyada corriente en estos tiempos

Gracias por tu paciencia, consejos, gestos,
por tus horas sacadas a tu trabajo
para ayudarme, por acompañarme
siempre.

Y por último gracias a los sapos, que
sin saberlo son los principales protagonistas
de todo esto

Gracias a todos

Gledys

"Si los hombres de ciencia se limitan a acumular el saber por el saber, la ciencia se quedará debilitada para siempre y nuestras nuevas máquinas no serán más que una fuente de nuevas tribulaciones para el hombre. Y cuando, con el paso del tiempo, hayáis descubierto todo lo descubrible, nuestro progreso no será más que un alejamiento gradual de la humanidad. Entre vosotros y la humanidad puede abrirse un abismo tan grande que, un día, corramos el peligro de que a cada eureka nuestro responda un grito de dolor universal..."

Brecht (Vida de Galileo)

INDICE

ÍNDICE	I
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Origen y radiación de los tetrápodos	1
2. Generalidades del sistema respiratorio en vertebrados	5
3. Generalidades del sistema respiratorio en anfibios	9
4. Biología general de las especies estudiadas	16
4.1 Caracterización de la Familia Bufonidae	16
4.2 Caracterización biológica de <i>Bufo arenarum</i>	17
4.3 Caracterización biológica de <i>Melanophryniscus stelzneri stelzneri</i>	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Animales utilizados	23
2. Estudio anatómico de la cavidad laringotraqueal	23
3. Estudio microanatómico	24
3.1 Con microscopía óptica	24
3.1.1 Técnicas topográficas	24
3.1.2 Técnicas histoquímicas	26
a) Mucosustancias	27
b) Lípidos	32
c) Proteínas	33
3.1.3 Técnicas inmunohistoquímicas	34
3.1.4 Mediciones	35
3.2 Estudio de microscopía electrónica	35
3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	35
3.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)	36

CAPÍTULO I: VÍAS EXTRAPULMONARES.....	37
INTRODUCCIÓN.....	38
1. Terminología.....	39
2. Laringotraquea en los anuros.....	41
3. Histología de la cámara laringotraqueal.....	45
3.1 Microscopía óptica e histoquímica.....	45
3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	47
RESULTADOS.....	48
1. Laringotraquea de <i>Bufo arenarum</i>	48
1.1 Estudio anatómico.....	48
1.2 Estudio microanatómico.....	52
1.2.1 Microscopía óptica.....	52
1.2.1.1 Estudio topográfico.....	52
1.2.1.2 Estudio inmunohistoquímico.....	55
1.2.1.3 Estudios histoquímicos.....	56
1.2.2 Microscopía electrónica de barrido.....	59
2. Laringotraquea de <i>Melanophryniscus stelzneri stelzneri</i>	61
2.1 Estudio anatómico.....	61
2.2 Estudio microanatómico.....	64
2.2.1 Microscopía óptica.....	64
2.2.2 Microscopía electrónica de barrido.....	68
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	69

CAPÍTULO II: PULMÓN	78
INTRODUCCIÓN	79
1. Anatomía general del pulmón en los anfibios	79
1.1 Irrigación pulmonar	79
1.2 Inervación pulmonar	83
2. Aspectos histológicos	84
2.1 Pared pulmonar	84
2.2 Parénquima pulmonar	85
2.2.1 Generalidades	85
2.2.2 Parénquima pulmonar en los tres órdenes de anfibios	86
a) Epitelio ciliado	88
b) Epitelio respiratorio – Neumocitos	89
c) Macrófagos	91
d) Capilares sanguíneos y la barrera de intercambio gaseoso	92
RESULTADOS	94
2.1 Pulmón de <i>Bufo arenarum</i>	94
2.1.1. Micranatomía	94
2.1.1.1 Microscopía óptica	94
2.1.1.1.1 Estudio topográfico	94
2.1.1.1.2 Estudio histoquímico	96
2.1.1.2 Microscopía electrónica	97
2.1.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido	97
2.1.1.2.2 Microscopía electrónica de transmisión	97
2.2 Pulmón de <i>Melanophryniscus stelzneri stelzneri</i>	100
2.2.1 Microanatomía	100
2.2.1.1 Microscopía óptica	100
2.2.1.2 Microscopía electrónica	101
2.2.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido	101
2.2.1.2.2 Microscopía electrónica de transmisión	101
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	104

CAPÍTULO III: CUERPOS NEUROEPITELIALES.....	113
INTRODUCCIÓN.....	113
RESULTADOS.....	115
3.1 Microscopía óptica.....	115
3.2 Microscopía electrónica.....	115
3.2.2 Microscopía electrónica de barrido.....	115
3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	115
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	119
 CONCLUSIONES GENERALES.....	 126
APÉNDICE	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Origen y radiación de los tetrápodos

Durante más de una centuria, los zoólogos se han cuestionado acerca del origen de los primeros tetrápodos (Romer, 1958; Szarski, 1962; Schaeffer, 1965 y Bray 1985). Mediante el análisis de cráneos, dientes y extremidades se han emparentado a los peces sarcopterigios de la Familia Panderichthyidae como grupo hermano de los tetrápodos (Ahlberg y Milner, 1994). Éstos hicieron su aparición entre el Devónico medio y tardío. El paso siguiente en la evolución de los tetrápodos fue su radiación en diferentes linajes durante el Paleozoico tardío y el Mesozoico. Sin embargo, fue durante el Devónico tardío y el Carbonífero temprano donde los tetrápodos se dividieron en dos linajes: los batracomorfos y los reptilomorfos. Los anfibios modernos (Lissamphibia) podrían haber tenido su origen dentro de éste primer grupo (Fig. 1).

Existen diferentes teorías que tratan de explicar el pasaje de los panderichthyidos desde el agua a la tierra. La teoría clásica propuesta es que se produjeron durante la segunda mitad del Devónico sequías estacionales. Las charcas temporarias poco profundas que se formaron durante los períodos de lluvia, frecuentemente desaparecieron por la evaporación durante la estación seca y como consecuencia sus habitantes quedaban varados en las aguas estancadas. Los peces atrapados en tal situación estaban condenados a muerte al menos que la siguiente estación de lluvia se iniciara antes que en las charcas estuviesen completamente secas. Es sabido que los peces pulmonados vivientes de África y Sudamérica se han adaptado a este tipo de situación ya que son capaces de estibar en el barro de las charcas hasta el momento en que comiencen las lluvias.

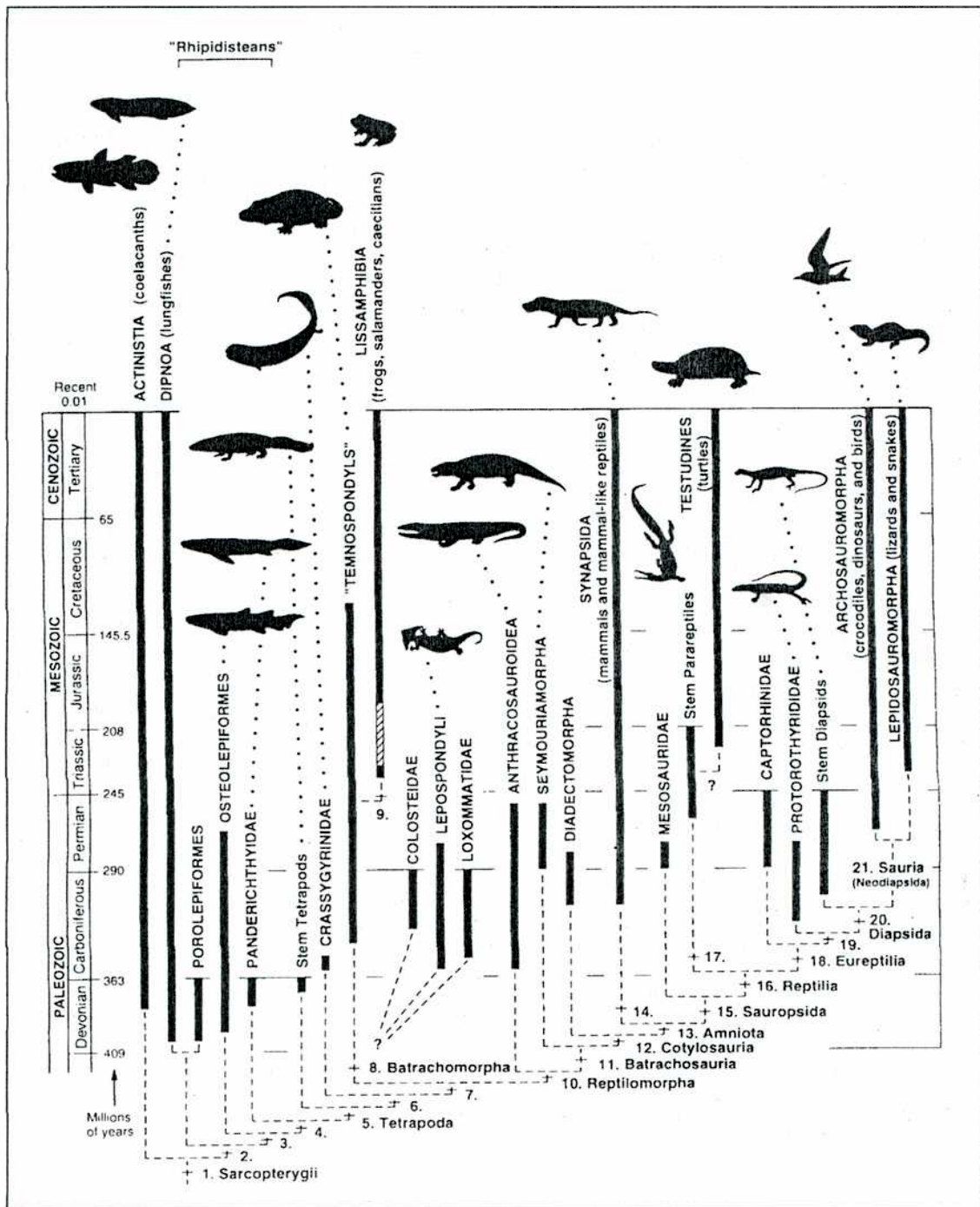


Fig. 1 Relación filogenética de los sarcopterigios y tetrápodos (Pough *et al.*, 1999)



Tal vez ciertos peces sarcopterigios devónicos tenían extremidades que les permitían arrastrarse desde una charca seca, moverse por tierra y alcanzar otras charcas que todavía contenían agua. Esta teoría sin embargo ha estado sujeta a muchas críticas. Fueron propuestas otras teorías. Unas, enfatizan el contraste que existía durante el Devónico entre el hábitat terrestre y el acuático. En el agua habitaban una variedad de peces que se fueron expandiendo en una diversidad de nichos ecológicos. Por otra parte, existían predadores activos, fuertemente competitivos en este medio. En contraste, la tierra estaba libre de vertebrados por lo que algunos sarcopterigios podrían haber ocupado ese ambiente que estaba libre de predadores y competidores; este proceso debió ser gradual.

La reinterpretación de los primeros tetrápodos como animales básicamente acuáticos sugiere que la colonización de la tierra debería considerarse como una selección a la actividad terrestre.

Los juveniles de *Acanthostega* e *Ichthyostega* podrían haberse reunidos en aguas poco profundas, como lo hacen los juveniles de los peces y de los anfibios vivientes, para escapar de los grandes peces predadores que estaban restringidos a aguas profundas. Muchas de las características morfológicas y fisiológicas de los vertebrados terrestres podrían haber sido útiles para un tetrápodo acuático en la orilla de un lago o estuario. Las aguas cálidas contienen poco oxígeno y las orillas de las charcas poco profundas están especialmente calientes durante el día. De esta manera los pulmones son importantes en un vertebrado en este tipo de ambiente, ya sea este pez o tetrápodo. De la misma forma, las patas habrían soportado el peso del animal en ausencia de suficiente agua como para flotar. En aguas poco profundas un ejemplar tetrápodo con respiración aérea, podría haber alzado su cabeza fuera del agua, y los cambios en la forma del cristalino del ojo podría producirse debido a la diferencia en el índice de refracción del agua y del aire.

Estas características comportamentales y morfológicas podrían ser encontradas entre un número de especies de peces vivientes los cuales hacen una incursión fuera del agua, trepan árboles y capturan a sus presas sobre la tierra.

Considerando que existían tetrápodos acuáticos que se lanzaban sobre los invertebrados terrestres y que caían dentro del agua, uno puede pensar en una gradual progresión de formas cada vez más ágiles capaces de explotar ambientes terrestres tanto para alimentarse como para protegerse de los predadores acuáticos. La agilidad terrestre debería haberse desarrollado en el estadio en el cual los juveniles tetrápodos se movían sobre la tierra desde su lugar de origen (una charca) para colonizar nuevos ambientes. Este tipo de comportamiento es tan general entre los vertebrados vivientes que se puede suponer que esto ocurrió también en los tetrápodos primitivos (Pough *et al.*, 1999).

La conquista del nuevo ambiente obligó a cambios morfológicos y fisiológicos importantes los cuales desencadenaron modificaciones que llevaron a producir la transición entre los peces y los tetrápodos. Entre las más destacadas, se cuenta el paso de la natación a la locomoción en cuatro patas. Esto llevó a cambios en el esqueleto y el sistema locomotor en su conjunto que se vieron sometidos a una suma de fuerzas completamente nuevas al verse privados de la función de soporte que ofrecía el agua y al hacerse más importante los efectos de la gravedad. Por otro lado la respiración pasó de ser branquial, donde los animales acuáticos extraían el oxígeno por medio de un flujo unidireccional del agua a través de las branquias a una respiración pulmonar donde tenían que adaptarse a la utilización de oxígeno atmosférico. Al mismo tiempo la piel debió modificarse para evitar la desecación y el sistema sensorial tuvo que adaptarse a la percepción de nuevos estímulos provenientes del nuevo ambiente.



Sin embargo la marcha de la evolución es tan lenta que los únicos anfibios conocidos del Devónico y muchos de los del Carbonífero eran todavía semejantes a peces. Animales de este tipo, por ejemplo *Eogyrinus* realizaron vacilantes incursiones a la tierra firme durante 30 millones de años o quizás más, antes de que aparecieran tipos claramente terrestres, como *Eryops*, del Pérmico (Young, 1977).

La palabra "amphibia" significa que los miembros de esta clase llevan una "doble vida". Algunos sapos pasan gran parte de su vida en tierra, pero la mayor parte de los anfibios no se alejan mucho del agua, y algunos animales actuales siguen siendo acuáticos, como sus antecesores. La reproducción de los anfibios en general, por ejemplo, la de las ranas y sapos, es semejante a la de los peces. Las hembras desovan en el agua, y de los huevos salen renacuajos acuáticos que respiran por branquias. Sólo cuando se produce la metamorfosis, desaparecen las branquias para ser sustituidas por pulmones, se desarrollan las extremidades y se hace posible la vida terrestre (Romer, 1966).

En su intento de independencia del agua y colonización de la tierra, los anfibios han experimentado una extraordinaria radiación adaptativa, exhibiendo una gran diversidad de modos de vida en comparación con otros grupos de vertebrados y alcanzando gran éxito en los niveles ecológicos que ocupan constituyendo un importante eslabón en muchas de las cadenas alimentarias.

2. Generalidades del sistema respiratorio en vertebrados

Para que una célula realice un metabolismo efectivo y sobreviva, debe abastecerse de oxígeno y liberarse de los productos de desecho acumulados. Estas funciones están a cargo de dos sistemas de transporte: el sistema circulatorio y el respiratorio.



Estos dos sistemas se ayudan en el proceso de difusión pasiva, movimiento azaroso de moléculas desde un área de mayor presión parcial hacia un área de menor presión parcial. El oxígeno se encuentra usualmente (aunque no siempre) a altas presiones parciales en el ambiente y tiende a difundirse dentro del organismo. El dióxido de carbono se acumula en los tejidos y tiende a difundirse hacia el exterior. La difusión pasiva por si sola es insuficiente para enfrentarse con las necesidades que requiere un organismo multicelular, por eso un sistema de transporte eficiente ayuda al proceso de difusión pasiva.

Durante la evolución de los animales para optimizar la difusión de los gases en el diseño de los órganos respiratorios se han producido grandes modificaciones. La tasa de difusión pasiva entre un organismo y su ambiente depende de algunos factores. Uno de ellos es la superficie aérea: cuanto más grande es la superficie aérea, mayor es la oportunidad que tienen las moléculas de moverse a través de la superficie epitelial. Otro factor es la distancia. El tiempo que tardan las moléculas para alcanzar la profundidad de los tejidos depende de la distancia que deban recorrer. Los tejidos gruesos retardan el proceso de difusión mientras que las barreras delgadas ayudan a este proceso. El tercer factor es la resistencia de los propios tejidos a la difusión. La humedad de la piel de los anfibios vivientes facilita el transporte de gases. En contraste, la piel de otros vertebrados (como reptiles y mamíferos) está cornificada y es gruesa, características que le impiden la difusión de los gases con el ambiente. Otro factor importante que afecta la tasa de difusión son las diferencias parciales de los gases a través de la superficie de intercambio. Los peces que viven en aguas estancadas y calientes se encuentran con una presión parcial de oxígeno en el agua inferior a la que tienen en su sangre, lo que lleva a que el oxígeno difunda en sentido contrario con lo que el pez se encuentra en peligro.

Tanto el sistema respiratorio como el circulatorio con el fin de movilizar los fluidos (aire, agua o sangre) tienen bombas como el corazón, el aparato branquial o en el caso de algunos tetrápodos una caja torácica.

Los sistemas respiratorio y circulatorio están funcionalmente asociados con el proceso de respiración en la distribución de oxígeno a los tejidos y la eliminación de desechos, principalmente dióxido de carbono.

Es importante diferenciar algunos términos que muchas veces son usados erróneamente. El término *respiración* debe ser reservado para el proceso de respiración celular donde mediante rutas metabólicas se produce la degradación de algún sustrato por vía aeróbica. La *ventilación* es el proceso activo de movimientos del medio respiratorio, agua o aire, a través de una superficie de intercambio. El pasaje de la sangre a través de los capilares de un órgano se conoce como *perfusión*.

La ventilación en los vertebrados puede ser unidireccional, el agua entra a través de la boca a la cavidad bucal, atraviesa las branquias y sale hacia el exterior siguiendo una única dirección. En otros vertebrados pulmonados, la ventilación es bidireccional ya que el aire entra y sale a través de las mismas vías.

Son varios los tipos de órganos que utilizan los vertebrados para llevar a cabo el intercambio gaseoso alguno de los cuales actúan de forma complementaria: branquias (internas y externas), vejiga gaseosa, piel, porciones del tubo digestivo y pulmones.

Con respecto al pulmón es importante destacar que es una característica primitiva de los peces óseos. Así que, aunque los pulmones son de importancia crítica para los tetrápodos, ellos no se han desarrollado con el expreso propósito de respirar en la tierra. Por muchos años se pensó que los pulmones se desarrollaban en los peces con el único objetivo de respirar aire en ambientes donde las



aguas estaban estancadas y eran pobres en oxígeno, de esta forma tragando aire rico en oxígeno se ayudaba al suministro del mismo a los tejidos corporales. Sin embargo aunque algunos peces pulmonados se encuentran en ambientes anóxicos, otros peces de respiración aérea se encuentran en ambientes ricos en oxígeno. Farmer (1997) ofreció una explicación alternativa para la evolución de los pulmones. La autora sugirió que la respiración aérea podría haberse producido en aguas bien oxigenadas, en peces activos donde el oxígeno es necesario primariamente para proveer al músculo cardíaco más que a los tejidos corporales de este gas.

Una consecuencia de la anatomía del sistema circulatorio en los peces es que el corazón recibe y bombea sólo sangre desoxigenada. La sangre se oxigena en las branquias, después que aquella deja el corazón. Muchos peces carecen de arterias coronarias que llevan sangre oxigenada al corazón, por eso el corazón de los peces rayas deber extraer el oxígeno que éste necesita desde la sangre que ha sido disminuida de ese gas en su viaje a través del cuerpo.

Farmer sugiere que los pulmones podrían haberse desarrollado como una manera de proveer sangre oxigenada directamente al corazón y de esta manera cubrir las necesidades metabólicas de las células cardíacas. Un pez raya primitivo no usa sus pulmones para conseguir oxígeno adicional en aguas estancadas, sino que traga aire desde la superficie cuando está activo, incluso cuando el agua está bien aireada. En los peces teleósteos, la vejiga natatoria proviene evolutivamente de dichos pulmones, tal vez porque la flotabilidad provista por esta estructura sea más importante para este grupo que un pulmón respiratorio. Sin embargo ciertos teleósteos activos, han desarrollado también un sistema circulatorio coronario. Estos hechos son coherentes con la hipótesis de que los pulmones se desarrollan inicialmente para proveer de oxígeno al músculo cardíaco.

Los pulmones en los vertebrados tetrápodos están diseñados para una respiración aérea como en el caso de los adultos de anfibios, reptiles, aves y mamíferos. En general son sacos elásticos ubicados dentro del cuerpo que tienen la propiedad de que su volumen se expande cuando el aire es inhalado y decrece cuando el aire es exhalado.

3. Generalidades del sistema respiratorio en los anfibios

Los anfibios constituyen un grupo extremadamente diverso entre los vertebrados, capaces de habitar tanto el medio acuático como el terrestre, por lo menos en alguna etapa de su vida. La transición de un medio a otro condiciona la morfología, fisiología y el desarrollo embrionario de estos animales.

Uno de los aspectos principales del desarrollo de los anfibios y de su adaptación al medio acuático o terrestre, lo constituye la formación de órganos diferentes capaces de llevar a cabo los procesos respiratorios, exhibiendo cambios muy complejos en los mismos a lo largo de su vida embrionaria y larval. Parte de esta complejidad reside en el hecho de que casi todos los integrantes de esta clase son capaces de utilizar simultáneamente más de un órgano en el intercambio gaseoso, obteniendo oxígeno a partir del aire, del agua o de una combinación de ambos (Bürggren y Just, 1992). Esta es una adaptación fundamental de los anfibios ya que la menor capacidad de disolución del oxígeno y el dióxido de carbono en el agua respecto del aire, implican que un animal acuático debe ventilar, bajo las mismas condiciones, unas veintiocho veces más que uno terrestre (Virtel y Richter, 1999).

En los anfibios el intercambio gaseoso se realiza a través de distintas estructuras: la piel, las branquias, la mucosa bucofaríngea y los pulmones.



El tegumento, en toda su extensión, o en especial en ciertas áreas, juega un rol importante, si bien de mayor o menor alcance, según el caso, en los procesos respiratorios de estos animales. En aquellos anfibios que carecen de pulmones o que están dotados de pulmones rudimentarios, la eficacia respiratoria del tegumento aumenta, no sólo por el adelgazamiento de la epidermis sino también por una rica red de capilares que inclusive pueden penetrar en la capa epidérmica (Noble, 1954). En los anfibios terrestres la función respiratoria de la piel está en gran medida relacionada con la humedad de la superficie corporal, lo que se alcanza generalmente por la actividad de glándulas esencialmente mucosas.

Algunos anfibios han desarrollado repliegues tegumentales ricamente vascularizados y móviles con una significación respiratoria importante como en el caso del urodelo *Cryptobranchus* y de la rana *Batrachophrynus*. La larva del anuro africano *Xenopus laevis* presenta sobre su cabeza bárbulas y *Astylosternus robustus*, otro anuro africano, desarrolla sobre los costados del cuerpo y los muslos numerosas excrecencias largas y finas, con aspecto de "pelos" (Gavrilov, 1978).

La respiración cutánea de los batracios con pulmones reducidos o atrofiados es además casi siempre auxiliada en mayor o menor grado por la respiración bucofaríngea independientemente del modo de vida predominante del animal. Así *Salamandrina*, más bien terrestre, tiene respiración bucofaríngea en el agua, mientras que *Pseudotriton ruber*, más bien acuático, tiene una respiración bucofaríngea atmosférica (Noble, 1954).

En muchas larvas de anuros las branquias son externas e internas como por ejemplo en *Rana catesbeiana*, pero externa en urodelos y cecílicos. Son el principal órgano respiratorio previo al desarrollo de los pulmones. Su función es relevada por los pulmones durante la metamorfosis. De esta manera no es sorprendente que la



total reabsorción de las branquias ocurra en forma relativamente tardía, alrededor del mismo estadio o ligeramente más temprano que la reabsorción de la cola. La reabsorción de las branquias comienza alrededor de los estadios XX-XXI (según Gosner) para *R. catesbeiana*, equivalente al estadio 61/62 para *X. laevis*. Cuando este proceso toma lugar, la morfología de las branquias cambia completamente. El epitelio llega a separarse de la red vascular cuando éste experimenta histólisis. Las branquias se tornan negras en apariencia, en el estadio XXIII (equivalente al estadio 64 en *X. laevis*) y simultáneamente degeneran rápidamente. Cuando las branquias han sido completamente reabsorbidas, su espacio es ocupado por melanocitos en los estadios más avanzados (Schi, 2000).

Desde un punto de vista anatómico, el sistema respiratorio en los anfibios adultos puede dividirse en dos grandes porciones: vías aéreas extrapulmonares y pulmones.

En líneas generales las vías extrapulmonares no siempre resultan expresadas de la misma manera y en igual grado entre los distintos anfibios. Está formada por tres porciones: una parte inicial cercana a la parte posterior de la faringe, la laringe. Una parte media que persiste como tráquea, dotada por lo común de un sostén cartilaginoso en forma de anillos y que se divide en dos ramas, los bronquios primarios o extrapulmonares o troncos bronquiales, derecho e izquierdo, que puede estar completamente reducidos (Anura), de suerte que los pulmones se unen directamente con el propio tubo traqueal.

La laringe es una cámara provista de elementos esqueléticos cartilaginosos, músculos particulares y, en varios casos, cuerdas vocales. Göppert (1937) define a la laringe como la porción inicial especializada del aparato respiratorio aéreo, provista de dispositivos particulares y separada de la tráquea, menciona a este órgano ya al

referirse a los Dipnoos (*Protopterus* y *Lepidosiren*). No obstante el autor subraya que, en los Dipnoos, dicha "laringe" primitiva carece de esqueleto cartilaginoso y que los músculos reconocidos, incluso el llamado esfínter laríngeo, no son equiparables con los músculos de la laringe de los batracios. Schimkiewitsch (según Gavrilov, 1979) designa como laringe la parte inicial del conducto neumático de los Dipnoos, provista de musculatura propia, a pesar de la ausencia del esqueleto cartilaginoso.

En oposición a estos zoólogos, otros investigadores como Goodrich (1930), Romer (1956), Hyman (1956), Gavrilov (1979) definen a la laringe solamente como la parte inicial de la vía traqueal de los Tetrápodos, destacando como característica fundamental, entre otros rasgos, el sostén cartilaginoso de sus paredes, presumiblemente proveniente de los últimos arcos viscerales reducidos y por lo común estrechamente relacionado con el esqueleto hioideo.

La laringe está pobremente desarrollada en los urodelos en comparación con los anuros (Pastor y Pascual, 1995).

En Urodela no se observa a menudo una delimitación nítida de la laringe, la cual ya está provista aquí de un par de cartílagos laterales. Los mismos sostienen con sus partes anteriores los márgenes apenas levantados de la glotis (orificio de comunicación con la parte postero-ventral de la faringe) y se extienden, a ambos lados, a lo largo de la laringe, ya sea hasta el comienzo de la tráquea como en el caso de *Necturus*, o aún más hacia atrás, hasta la última porción de la tráquea, próxima a los pulmones como en *Proteus*, *Siren*, *Amphiuma* (Göppert, 1937). En el caso de *Necturus* en cada cartílago lateral pueden distinguirse una porción oral, anterior, aplanada (parte aritenoidea) y una porción caudal, posterior (parte crico-traqueal). Debido al carácter particular del límite entre ambas porciones, las mismas poseen cierta movilidad, una con respecto a

otra, bajo la influencia de la musculatura laríngea (Göppert, 1937). Los cartílagos de *Siren* y *Amphiuma*, que son largos, llegan hasta la bifurcación posterior de la tráquea, sin impedir el encorvamiento de ésta gracias a su elasticidad, conservan aún su individualidad de cada lado del cuerpo, pese a que en opinión de otros autores como Noble (1954) estos cartílagos ya presentan un verdadero desmembramiento de su porción posterior en cartílagos traqueales como en *Siren*.

En los salamandroideos, la laringe está constituida por dos cartílagos laterales, cada uno de los cuales está dividido en dos porciones separadas: el cartílago aritenoides y el cartílago cricotraqueal (Göppert, 1937).

Mayor diferencia aún se observa en Gymnophiona (Apoda), donde además de un par de cartílagos aritenoides se separan, inmediatamente detrás y en íntima relación con ellos, las porciones cricoideas de los cartílagos cricotraqueal, fusionándose dorsalmente en calidad del único y amplio cartílago cricoideo, mientras que el resto de las partes cricotraqueales se subdividen en una serie de anillos traqueales, en forma de semicírculos cerrados dorsalmente.

La tráquea en Urodela y Gymnophiona es generalmente larga y bien definida, aunque como indica Matsumura y Setoguti (1986) en *Hynobius nebulosus* un cartílago traqueal diferenciado no existe, la porción inferior de la cavidad laringotraqueal se corresponde con la porción cricotraqueal. Los bronquios son siempre muy cortos y están conectados con los pulmones en todos los órdenes.

En los Anuros, la tráquea prácticamente no existe o es extremadamente corta, apenas perceptible, abriéndose sin delimitación marcada con la porción laríngea, que le precede, en la constitución de la llamada laringotráquea o cámara laringotraqueal. Estas denominaciones adoptadas por varios autores (Gavrilov, 1979) y quien escribe, no es la única referencia a esta parte de las vías

respiratorias de los Anuros. Varios zoólogos (Holmes, 1927; Weicher, 1953) la denominan simplemente laringe, mientras que Henle (1839) habla al respecto como "caja vocal" ("Stimmlade", en alemán). Marcus (1937) distingue, en ella, una laringe propiamente dicha, y un "espacio laringo-traqueal" que le sigue también impar.

Es evidente que este último espacio debe equipararse con la "cavidad laringotraqueal" que le sigue también impar, en su oposición al vestíbulo laríngeo más anterior, que correspondería a la parte propiamente laríngea de la laringotráquea. En la mayoría de los batracios anuros, los pulmones se unen directamente con dicho conducto, a veces se presentan adelgazados en su parte inicial a manera de cuello (*Pseudis*, *Bufo*). Solamente en los anuros aglossos (pípidos) se observan los bronquios, que salen del extremo caudal de la laringotráquea y que, en *Pipa*, pueden ser bastante largos.

La laringe de los anuros, con su esqueleto cartilaginoso de diferentes aspectos según las especies, se ubican entre las apófisis postero-medianas de hueso hioideo. En su interior se encuentran las cuerdas o ligamentos vocales que junto con otras adaptaciones de fonación (*sacos vocales* o *resonantes*, impares o pares) contribuyen a la emisión del canto. El esqueleto laríngeo consta de dos amplios cartílagos semiovalados, los aritenoides, uno a cada lado de la hendidura de entrada o *glotis*, y un cartílago cricoideo, más caudal, en forma de anillo completo o incompleto, con sus prolongaciones (Pirlot, 1976) (Fig. 2).

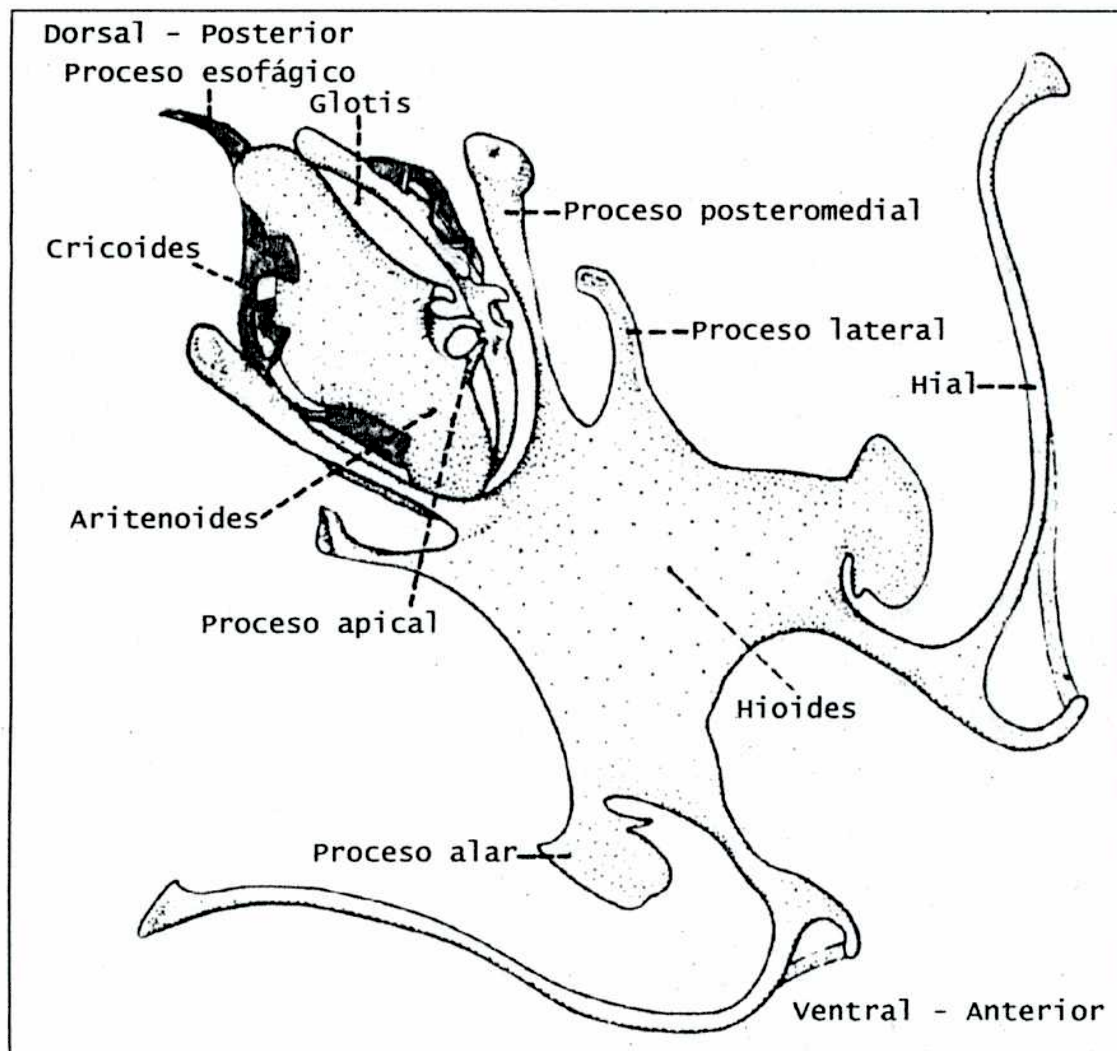


Fig. 2 Esqueleto laringotraqueal generalizado de un anuro. (Modificado de Grassé, 1986).

En cuanto a los pulmones de los anfibios, estos son sacciformes y se unen ya sea directamente con la laringotráquea, en los anuros faneroglosos; o de manera directa con una tráquea poco extendida en algunos urodelos (*Proteus*, *Necturus*); o con los bronquios, que pueden ser muy cortos, sólo apenas insinuados (*Siren*, *Amphiuma*), o pequeños pero bien diferenciados en los gimnofiones (*Chtonerpethon*) y varios urodelos (*Salamandra*), o inclusive relativamente más largos pero sin límite neto, en los anuros aglosos (Pipidae).

En los gimnofiones y los urodelos, en relación con la conformación serpentiforme o extendida de su cuerpo, estos sacos son alargados, más o menos cilíndricos, con superficie exterior lisa o provista de estrangulaciones y surcos que le proporcionan un aspecto "racimoso" o "alveolar". Pueden tener además el extremo posterior adelgazado como en algunos gimnofiones; o estrechos en su región media (*Menobanchus*) o anterior (*Triturus*, *Cryptobranchus*, varios Salamandridae); o extendidos a manera de un tubo en su mayor parte desde la tráquea, de modo que sólo el extremo distal aparece ampliado a modo de vesícula (*Proteus*).

En estos batracios pueden ser del mismo tamaño (*Siren*, *Pleurodeles*), o el izquierdo más largo que el derecho (*Proteus*, *Amphiuma* y algunos otros urodelos), o al contrario, se desarrolla el derecho, mientras que el izquierdo sufre una considerable reducción, a veces muy acentuada (gimnofiones).

En los anuros, los pulmones son cortos, redondeados, por lo común exteriormente son lisos, o muy raramente dotados en su parte anterior de algunos lóbulos como en *Bufo marinus*.

La estructura interna de los pulmones en los distintos grupos se ampliará en el capítulo II.

4. Biología general de las especies estudiadas

Los sapos *Bufo arenarum* (Hensel, 1867) y *Melanophryniscus stelzneri* (Weyenberg, 1875) son anfibios pertenecientes a la familia Bufonidae del Orden Anura (Gallardo, 1987).

4.1. Caracterización de la Familia Bufonidae

La familia Bufonidae es una familia cosmopolita donde sus miembros habitan tanto las regiones templadas como las tropicales,

a excepción, originalmente de Madagascar, Nueva Zelanda y Australia (Ceï, 1980).

Según Duellman y Trueb (1986) los bufónidos se caracterizan por presentar de 5 a 8 vértebras holocordales, procélicas, presacrales con arcos neurales imbricados. La variación del número de vértebras presacrales, es el resultado de la fusión de las vértebras presacrales I y II. Las costillas están ausentes. El sacro tiene una diapófisis dilatada y una articulación bicondilar con el coxis. Los procesos transversos están ausentes en el coxis. La cintura pectoral es del tipo arcífera o pseudofirmisternal por fusión de los epicoracoides. El omosternun está ausente mientras que el esternón está presente; la escápula no está cubierta anteriormente por la clavícula. El anillo cricoideo es completo. Tanto el maxilar como el premaxilar son edentados. El astrágalo y calcáneo están fusionados solamente proximal y distalmente y presentan un tubérculo metatarsal externo. Las falanges son normales, sin elementos intercalares; fórmula de falanges de la mano: 2-2-3-3 y del pie: 2-2-3-4-3. Presentan una pupila horizontal. El amplexo es axilar. Con órgano de Bidder en alguna época del desarrollo. Muchos bufónidos depositan ristras con numerosos huevos pequeños pigmentados en el agua donde generalmente se desarrollan en renacuajos. Estos presentan un pico córneo y una hilera simple de denticulos.

La familia Bufonidae contiene 335 géneros vivientes, entre ellos *Bufo* y *Melanophryniscus*, y 20 especies extinguidas.

4.2. Caracterización biológica de *Bufo arenarum*

El género *Bufo* está representado en la Argentina por diez especies, entre los cuales se halla *Bufo arenarum* (Hensel 1867). Es la especie de anuro quizás más conocido en el país, su distribución se extiende desde el norte de la Provincia de Jujuy hasta el río



Chubut, cerca de la costa patagónica. Hacia el oeste, éste alcanza el borde sur de la Provincia de Neuquén, próximo al río Limay. Habita desde ambientes húmedos, 1000 mm anuales, hasta áridos de menos de 500 mm anuales. Su localización se extiende hasta el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Bolivia (Cochabamba) (Fig. 3).

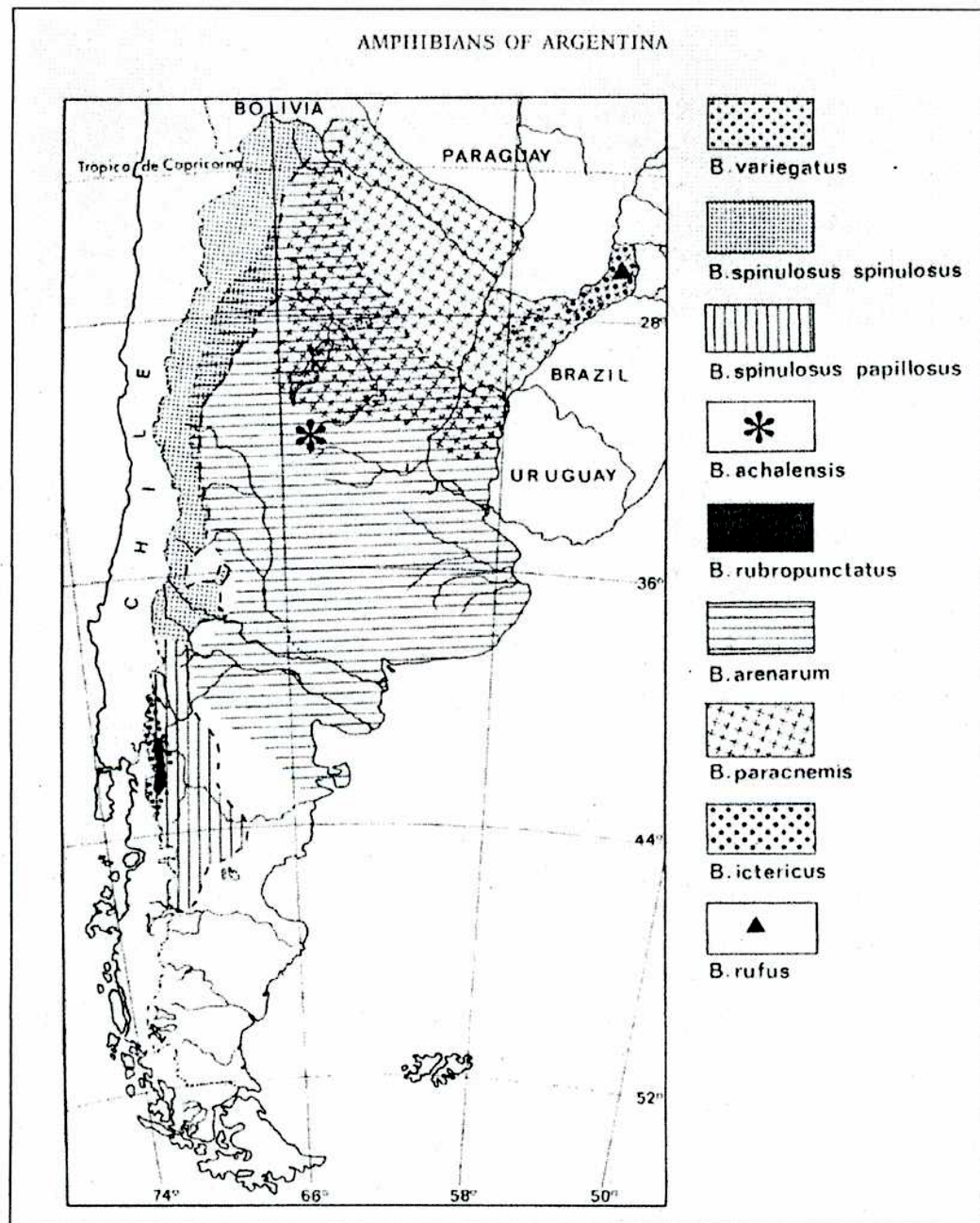


Fig. 3 Mapa de distribución del Género *Bufo* según Ceí (1980)



Según Gallardo (1987) estos animales se caracterizan por tener una cabeza levemente cóncava, hocico redondeado y crestas tanto cefálicas como a lo largo del labio superior. Los ojos son prominentes y los tímpanos visibles y redondeados. Con glándulas paratoides, seguidas por glándulas verrucosas. Las manos pueden o no presentar reborde cutáneo; el tubérculo metatarsal interno tiene forma de azada, el externo es redondeado mientras que los subarticulares son cónicos. La piel dorsal tiene verrugas pequeñas y obtusas con una o varias espinas córneas. El vientre es granular y blancuzco. Los machos además de presentar unas patas delanteras robustas tienen un saco vocal externo azulado y callosidades nupciales en el 1º, 2º y 3º dedo de la mano. Ellos tienen un dorso amarillento o verdoso, mientras que las hembras el color es grisáceo, marrón brillante y azulado con grandes manchas amarronadas (Fig. 4). Se puede escuchar su canto desde agosto hasta abril en lagunas y lagos. Ponen huevos pequeños, negros, en ristras gelatinosas adheridas a las plantas sumergidas.



Fig. 4 *Bufo arenarum* (Cortesía del Dr. Mario Ravaglia)



4.3. Caracterización biológica de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*

El género *Melanophryniscus*, Gallardo 1961, se caracteriza porque los sapos son de tamaño pequeño, carecen de dientes, crestas cefálicas y glándulas paratoides. La pupila es circular y el tímpano está oculto. La piel presenta granulaciones y la coloración es aposemática. Las extremidades son cortas y los dedos de las manos presentan una membrana interdigital basal, más desarrollada en el pie. Los cóndilos occipitales están separados entre sí, mientras que las apófisis transversas sacrales están dilatadas. La cintura escapular tiene precoracoides y las clavículas son horizontales. No hay omosternón y tanto el estilo external como el xifisternón son cartilaginosos.

Melanophryniscus stelzneri stelzneri es un bufónido con cabeza pequeña y corta, de aproximadamente 25 a 30 mm de longitud desde el hocico a la cloaca. Tanto el dorso como sus extremidades son negros u oscuros con manchas amarillas. El vientre negro es granuloso con manchas rojas a igual que las palmas y las plantas. Las manos presentan tubérculos metacarpales cónicos. En el caso de los machos se puede observar callosidades nupciales marrones (Fig. 5).



Fig. 5
Melanophryniscus
stelzneri stelzneri
(Cortesía de la Lic.
L.E. Fiorito)



Es frecuente hallar ejemplares de *M.s.stelzneri* activos durante el día, luego de fuertes lluvias, cerca de arroyos o pequeños cuerpos de agua de zonas serranas de Córdoba y San Luis, entre los 900 y 2000 m sobre el nivel del mar (Fig. 6).

Debido a lo restringido de su distribución y a que estos animales son comercializados como mascotas, se hallan entre las especies que la UICN (Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza) y la FVSA (Fundación Vida Silvestre Argentina) coinciden en llamar "rara" (especies sujetas a riesgo) y comercialmente amenazada, respectivamente. La explotación de estos animales de su medio ambiente, llevada a cabo en forma indiscriminada, podría afectar, por ejemplo, la abundancia y distribución de las poblaciones de *M.s.stelzneri* en los ambientes serranos.

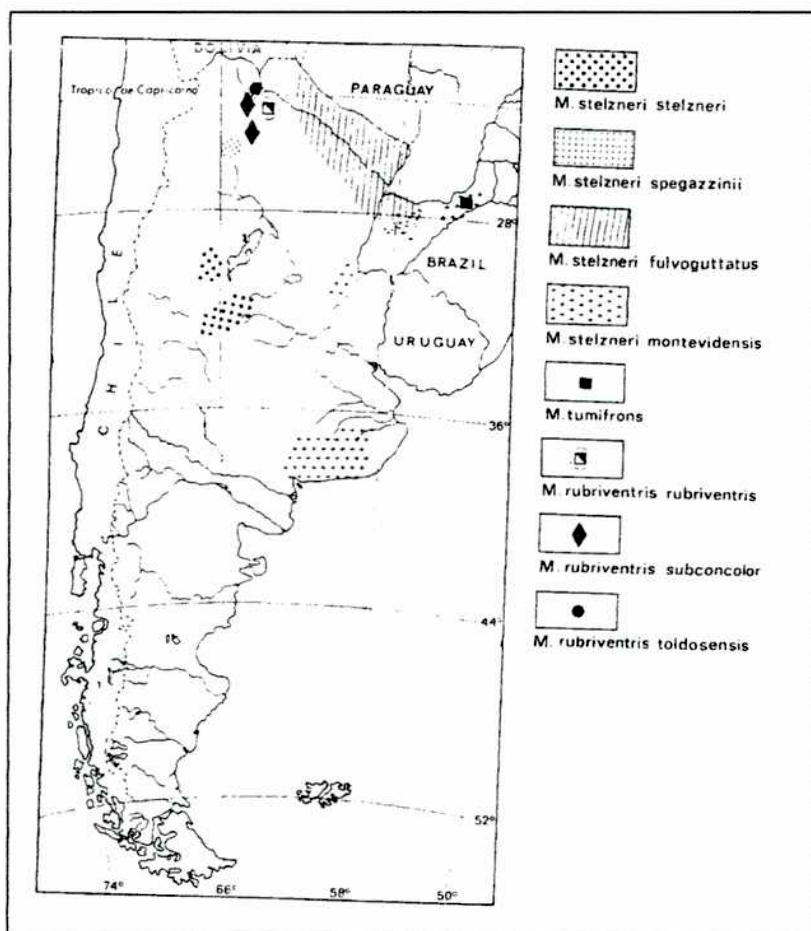


Fig. 6 Mapa de distribución del Género *Melanophryniscus* según Ceí (1980)

OBJETIVOS

En la actualidad el estudio de la anatomía de los sistemas blandos de los Anuros ha tomado importancia en el mundo de la batracología y sus resultados son aplicados a estudios filogenéticos.

Dado a que hasta el momento en la bibliografía no hay ningún estudio histológico comparado del sistema respiratorio en dos especies de bufónidos de nuestra fauna, el propósito de la presente tesis doctoral es conocer aspectos de la morfología respiratoria de *Bufo arenarum* (Hensel 1867) y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenberg 1875) (Bufonidae, Anura).

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos dividiendo el trabajo de tesis en tres capítulos:

- 1) Caracterizar anatómica e histológicamente (a nivel óptico y electrónico de barrido) las vías extrapulmonares (Capítulo I)
- 2) Estudiar la morfología pulmonar (Capítulo II)
- 3) Caracterizar morfológicamente los cuerpos neuroepiteliales presentes en *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Capítulo III)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales utilizados

Para el presente estudio se utilizaron ejemplares adultos de *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* sexualmente maduros.

Los ejemplares de *B. arenarum* fueron capturados en las localidades de Escobar y Gral. Pacheco, Provincia de Buenos Aires, mientras que los ejemplares de *M.s. stelzneri* fueron obtenidos en las localidades de Tanti, Provincia de Córdoba, y Valle de Pancata y Trapiche, provincia de San Luis.

En ambos casos, las especies en estudio fueron mantenidas en cautiverio en el laboratorio durante un breve período bajo condiciones adecuadas. Se los alimentó con organismos vivos: Dípteros (*Drosophila* sp., *Musca domestica*), larvas de Coleópteros, Oligoquetos (*Lumbricus* sp., *Pheretima* sp.). En el caso de carecer de lo mencionados, se les suministró día por medio a cada individuo, un trozo pequeño de hígado de vaca fresco. Se ataba en un extremo de un hilo el alimento y se lo movía lentamente, a fin de imitar el movimiento de un insecto o lombriz. El movimiento atraía a los sapos hacia el hilo, de donde tomaban directamente el alimento. Esto evitó tener que alimentarlos de manera forzada por medio de una sonda que se introduce directamente en el esófago.

2. Estudio anatómico de la cavidad laringotraqueal

Se utilizaron ejemplares adultos de ambos sexos para cada especie en estudio. Se los anestesió con MS222 al 1% y se los fijó por

inyección con formol al 10% vía glotis y posterior inmersión en el mismo fijador.

Una vez fijado el sistema respiratorio completo (vías aéreas y pulmones), se procedió a la separación del mismo del resto de los órganos alojados en la cavidad.

Se procedió a la tinción de los cartílagos "*in toto*" que conforman la laringotráquea con azul de toluidina siguiendo la técnica de Lundwall (Romeis, 1928).

Con el fin de destacar todos los elementos esqueléticos de la laringotráquea se utilizó una tinción diferencial de cartílago y hueso de acuerdo con la técnica de Wassersug (1976) la cual fue sujeta a ligeras modificaciones, (ver apéndice). Para ello se utilizó azul alcian para colorear el tejido cartilaginoso y rojo de alizarina para la coloración del tejido óseo previa maceración de los tejidos con hidróxido de potasio, finalmente se procedió a la diafanización y conservación de las piezas en glicerina para su posterior análisis.

Las observaciones del esqueleto laringotraqueal fueron realizadas con un microscopio estereoscópico Wild. Las fotografías fueron obtenidas con una cámara digital SV Micro-Sound Vision adosada a un microscopio estereoscópico Zeiss (Stemi 2000C).

3. Estudio microanatómico

3.1. Con microscopía óptica

3.1.1 Técnicas topográficas

Se utilizaron ejemplares adultos de ambas especies para esta parte del estudio. La anestesia utilizada fue MS222 al 1%.

De acuerdo a la técnica a emplear posteriormente se utilizaron diferentes soluciones fijadoras: formol neutro al 10%, líquido de Bouin, líquido de Zenker los cuales fueron inyectados por la glotis. Se

procedió a la disección del tracto respiratorio completo y a su posterior inmersión en el mismo fijador utilizado (ver Fig. 2.1).

Según la metodología a seguir posteriormente se separó la laringotráquea de los pulmones y se los conservó hasta el momento de ser utilizados en la misma solución fijadora (formol al 10%), o bien en alcohol 70° (Martoja y Martoja Pierson, 1970; Pearse, 1985).

Las piezas fueron deshidratadas en una gradación creciente de alcohol etílico (70°-80°-90°-96°). A fin de poder incluir el material en parafina o paraplast (punto de fusión 56-58°C), el material biológico fue sumergido en un líquido intermediario (alcohol butílico) que es miscible con el alcohol y con el medio de inclusión. Las muestras se las pasó a una solución 50:50 de butílico-parafina o paraplast líquida, en estufa. Finalmente se procedió a la impregnación del tejido con parafina o paraplast puro en caliente. Antes de la solidificación se procedió a la orientación de la pieza con el fin de obtener cortes transversales y longitudinales.

El tiempo de permanencia de las piezas en cada solución dependió tanto del tamaño como de la naturaleza del material.

Se realizaron cortes seriados con micrótomos de deslizamiento de 20 µm, 10 µm y 7 µm de grosor de la cavidad laringotraqueal y de 7 µm de espesor para los pulmones.

Las secciones obtenidas según la metodología a aplicar posteriormente, fueron montadas en portaobjetos con albúmina de Mayer.

En el caso de los pulmones de *Melanophryniscus stelzneri* una vez deshidratadas las piezas hasta alcohol etílico 100°, se procedió a incluir las piezas en metacrilato. Se realizaron cortes de 3 µm de espesor.

Los cortes fueron coloreados con las siguientes técnicas:

- Hematoxilina & Eosina
- Tricrómico de Masson modificado según De Carlo (ver apéndice)
- Coloración de Mallory-Heidenhain (AZAN) (Preece, 1959)
- Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (PTAH) (Preece, 1959)
- Tricrómico de Cajal-Gallego para fibras colágenas (Gabe, 1968)
- Método de la orceina de Rubens Duval para fibras elásticas (Langeron, 1949)
- Técnica de Fränkel para la detección de fibras elásticas (Burck, 1969).
- Técnica de azul de toluidina combinada con ácido periódico-Reactivo de Schiff (Perry, 1981) (realizada en cortes con metacrilato)

Las fotomicrografías topográficas de la cavidad laringotraqueal fueron efectuadas según la técnica propuesta por Carmanchahi *et al.*, (1998).

Las observaciones y fotografías fueron realizadas con un microscopio Wild y un microscopio Zeiss-Axioplan con una cámara Wild MP5 51 y con un microscopio Zeiss Axiostar el cual tenía adosada una cámara digital SV Micro-Sound Vision, respectivamente. Se utilizó película fotográfica Ilford Pan 50 asas blanco y negro y Kodak color de 100 y 400 asa.

3.1.2 Estudios histoquímicos

Como consecuencia de los estudios microanatómicos surge la necesidad de identificar la secreción de los epitelios secretores y estructuras tisulares presentes en el material de estudio.

El estudio histoquímico se aplicó a la determinación de mucosustancias, lípidos y proteínas.

a) Mucosustancias

Mucosustancias es un término muy general que incluye macromoléculas compuestas principalmente por carbohidratos. La clasificación de los mismos ha sufrido cambios considerables en las últimas tres décadas por haberse logrado una mayor comprensión de la forma en que son sintetizados por la célula, y por conocer los distintos compuestos que son capaces de formar a partir de su unión con otras moléculas.

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

1) Los **glicanos** incluyen: a) **polisacáridos** (grandes agregados de monosacáridos) y b) **glicosaminoglicanos** (por ejemplo: ácido siálico, queratán sulfato, 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).

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 contienen

exclusivamente hexosas con hidroxilos vecinos se visualizan selectivamente por el método del ácido periódico-Reactivo de Schiff (APS). 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 aldehída y las diaminas férricas (Spicer y Schulte, 1992).

El **método de ácido periódico-reactivo de Schiff** es 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 convirtiéndose en aldehidos, 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 sulfatados, ácidos carboxílicos o grupos funcionales que contengan nitrógeno (Danguy *et al.*, 1994). Los proteoglicanos (que contienen glicosaminoglicanos) no son visualizados por el método del APS utilizado usualmente (Spicer y Schulte, 1992). Por lo tanto la positividad del APS se debe a la presencia de glicoproteínas (neutras o con residuos de ácido siálico) y polisacáridos (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).

Por otra parte se puede utilizar la técnica de APS, para la identificación de ácido siálico en los glicosaminoglicanos, 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. A éste método se lo conoce como **oxidación selectiva del ácido siálico de glicanos sialatados** (Voltz *et al.*, 1987). La capacidad identificatoria de esta reacción, se basa en que la oxidación del triol exocíclico de los residuos de ácido siálico es mucho más rápida que el de los dioles vecinos ubicados en los azúcares neutros. De tal manera, el empleo de ácido periódico de baja molaridad y las bajas temperaturas de la reacción pueden llevar a la oxidación completa de los residuos de ácido siálico solamente, poniéndolos en evidencia con el reactivo de Schiff (Voltz *et al.*, 1987). Sin embargo, el ácido siálico suele presentar los carbonos 7,8 y 9 acetilados lo que negativiza la reacción de APS. La saponificación con hidróxido de potasio (KOH) desacetila lo que permite luego evidenciar mediante APS modificado (APS*) por Volts (1987) la presencia de dicho ácido. Por lo tanto la secuencia: KOH (hidróxido de potasio 0,5% p/v en etanol 70%; 15 minutos); AP* (ácido periódico 0,4mM ClH 1M a 4°C; 60 minutos) y el KOH-AP*-Schiff, permite distinguir ácido siálico, unido o no a glicanos.

La corroboración de la unión del ácido siálico a azúcares neutros, está dada por la secuencia de reacción: KOH-AP*-Bh-APS según la cual se efectúa la saponificación con hidróxido de potasio (KOH); AP*; reducción con borohidruro de sodio (BH) de grupos aldehídos generados por la oxidación AP* y formados en el ácido siálico (Pearse, 1985), Estos grupos aldehidos se convierten en no reactivos al Schiff. La positividad al APS estará dada solamente por los azúcares neutros.

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 del tejido con anhídrido acético disuelto en piridina anhidra convierte los grupos hidroxilos reactivos en grupo ésteres acetilos, también puede ocurrir la **acetilación** de los grupos aminos utilizando este método. Al aplicar la técnica de APS, los carbohidratos APS reactivos no estarán disponibles para que la reacción ocurra. Por otra parte, la hidrólisis de los ésteres acetilos puede realizarse mediante la saponificación con amoníaco-alcohol 50°C, lo cual revierte de este modo la reacción de acetilación (Martoja, 1970).

La técnica 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 polisulfatos (Danguy *et al.*, 1994). La identificación de ambos componentes se lleva a cabo sobre la base de una mayor acidez de los grupos sulfatos respecto a los grupos carboxilados.

El **azul alcian** (AB) (una ftalocianina soluble en agua que debe su color azul a un núcleo de cobre) es un colorante catiónico que tiñe con diferentes intensidades, según el número de cargas (-) expuestas por el tejido. El número de cargas es función del pH al que se encuentra dicho tejido. Por lo tanto utilizando 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 permite 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 de 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 (Cook, 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 (Cook, 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 los grupos metil-ésteres. Estos grupos se hidrolizan con la saponificación de lo cual permite la restauración de la basofilia (Cook, 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, amarillos; GC sulfatados, azul; mezcla de ambos, verde (Cook, 1990).

La **orceína y el AB** también han sido utilizados para la determinación de glicoconjugados sulfatados en una misma preparación. La fucsina aldehída 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 (Singh y Gorton, 1989).

La técnica de APS junto con el AB pH 2,5, conocida como **técnica de Mowry** 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 APS. El AB colorea los glicoconjugados ácidos, incluso los glicoconjugados ácidos que puedan reaccionar con el APS. Por lo tanto, la posterior tinción con APS sólo 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 de violeta.

Con la **técnica de Hale** es posible demostrar la presencia de glicoconjugados ácidos. Esta técnica se basa en que trabajando con un pH bajo, el hierro coloidal es adsorbido por las mucinas del tejido. Esta adsorción es posteriormente visualizada cuando el hierro reacciona con el ferrocianuro potásico dando como resultado un tinte azul de prusia (Cook, 1990).

b) Lípidos

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, la mayoría de los lípidos no son preservados durante este procedimiento. Por lo tanto, para tal fin se efectuaron secciones con crióstato de pulmón y cavidad laringotraqueal de material fijado en formol al 10%. Las piezas fueron colocadas a 4°C en buffer fosfato salino a pH 7,4 con el agregado de sacarosa al 20% como crioprotector. Se obtuvieron cortes entre 10 μ m los que fueron adheridos a portaobjetos a los que se les realizó tinciones como el **Sudan** o sulfato azul de Nilo (**Método de Cain**) (Pearse, 1985).

c) 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 amino distribuidos en todas las proteínas. Para ello, se utilizó la técnica de Ninhidrina-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).

Resumiendo, para el estudio histoquímico de la laringotrachea y del pulmón se realizaron las siguientes técnicas:

- 1) APS (ácido periódico-reactivo de Schiff)
- 2) Acetilación reversible (acetilación/amoniaco/APS)
- 3) AB pH 0,5; 1; 2,5 y 3,5
- 4) Técnica combinada de APS-AB
- 5) Técnica combinada de AB-AY
- 6) Oxidación selectiva con ácido periódico-Schiff (AP*-S)
- 7) Saponificación KOH/AP*-S
- 8) Oxidación selectiva con reducción con borohidruro seguida de saponificación (AP*/Bh/KOH/S)
- 9) Saponificación con oxidación selectiva seguida de reducción con borohidruro (KOH/AP*/Bh/S)
- 10) Orceína de Shikata – AB pH 2,5
- 11) Técnica de Hale
- 12) Metilación suave (37°C)/AB
- 13) Metilación fuerte (60°C)/AB
- 14) Técnica de Sudan Black y Sudan III
- 15) Técnica de Azul de Nilo
- 16) Técnica de Ninhidrina-Schiff
- 17) Técnica de Mercurio-Azul de bromofenol

En todos los casos se hicieron controles positivos.

3.1.3 Técnicas inmunohistoquímicas

Para las técnicas inmunohistoquímicas se utiliza el mismo material que el procesado para técnicas histológicas convencionales, es decir fijado en líquido de Bouin y material incluido en paraplast. La técnica utilizada se resume en el apéndice. El anticuerpo policlonal utilizado es Anti-PGP 9,5 (Ultrasclone Limited) desarrollado en conejo y con una dilución 1:100. Este anticuerpo se une a una proteína

neuroespecífica aislada del cerebro humano, y que se halla principalmente en el citoplasma de las neuronas y células neuroendócrinas.

Los controles realizados son: la omisión del primer anticuerpo y la omisión del segundo anticuerpo. En ambos casos fueron reemplazados por PBS.

3.1.4 Mediciones

Las mediciones del diámetro de las vesículas que figuran en el capítulo III se realizaron sobre micrografías donde las células aparecían con su núcleo completo.

3.2 Estudio de microscopía electrónica

3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (M.E.B)

El sistema respiratorio completo, de ambas especies en estudio, fue fijado con líquido de Bouin por inyección del mismo a través de la glotis. Por mayor disponibilidad de ejemplares vivos de *B. arenarum*, se utilizó un segundo tipo de fijador, glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4.

Para el procesamiento de la laringotráquea, al cabo de una hora se separó la misma del animal y se la dividió obteniéndose dos hemilaringotráqueas las cuales fueron sumergidas en el mismo fijador por 3 horas más.

En el caso de los pulmones, después de una hora, los sapos fueron abiertos ventralmente exponiéndose los pulmones. Estos fueron inmersos en el mismo fijador por un lapso de 12 horas. Transcurrido ese tiempo los pulmones fueron abiertos longitudinalmente.

Tanto las hemi-laringotráqueas como los pulmones fueron deshidratados en gradación creciente de alcohol etílico hasta alcohol 100°. Para continuar con este proceso, se utilizaron mezclas de alcohol 100°: acetona en diferentes proporciones hasta llegar a acetona pura. Las muestras una vez procesadas por el método de punto crítico de desecación fueron montadas y metalizadas con un baño de oro paladio para su posterior observación.

Las muestras se analizaron bajo un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-25 II (CITEFA) a 25 kV utilizando película fotográfica en blanco y negro Agfa Pan APX 100 (Professional).

3.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.)

Pequeñas muestras de pulmón de ambas especies de 2 mm de espesor fueron fijadas durante toda la noche a 4° C con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Luego de la fijación se lavó con el mismo tampón y se postfijó en tetróxido de osmio al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcoholes hasta etanol 100°-óxido de propileno (1:1) y finalmente óxido de propileno puro. Seguidamente las muestras fueron embebidas en resina Araldita. Las secciones de 1 µm de espesor fueron seccionados con un ultramicrotomo Reichert y teñidas con azul de toluidina para ser examinadas con microscopio óptico a fin de seleccionar la zona a estudiar con M.E. Los cortes ultrafinos fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963) y examinados bajo un microscopio Zeiss EM 109 T a 80 kV (LANAIS-MIE, Facultad de Medicina, UBA). Las micrografías se realizaron utilizando película fotográfica en blanco y negro Kodak 5302.

CAPÍTULO I

VÍAS EXTRAPULMONARES



INTRODUCCIÓN

El sonido producido por los animales es un método primario de advertencia, señala la presencia de un individuo a otro de la misma especie. La vocalización es más común en especies con baja densidad de dispersión, saltadoras o voladoras y que al no dejar ninguna huella continua tienen que ser rastreados por medio de quimiosensores.

Entre los vertebrados, la vocalización está altamente desarrollada en los anuros, pájaros, murciélagos, cetáceos y primates.

En los anuros el propósito primario de la vocalización es el de anuncio, formalmente conocido como el canto de apareamiento.

Muchos estudios han demostrado que la comunicación acústica en estos animales ha alcanzado un alto nivel de desarrollo y diferenciación. Se lleva a cabo por una ingeniosa interdependencia del sistema auditivo y del sistema de vocalización, lo cual indica una coevolución de ambos sistemas (Schneider, 1988).

Como el mecanismo respiratorio es una parte integral del sistema de producción de sonido, hay una obligada interdependencia mecánica y fisiológica entre la respiración y el sistema de vocalización.

Considerando que la mayoría de los trabajos morfológicos sobre el esqueleto laríngeo existentes hasta el momento, se han centralizado en los aspectos miológicos y osteológicos, actualmente existe un renovado interés por investigar más exhaustivamente la organización histológica de las estructuras involucradas en éste órgano de emisión del sonido. Es en este contexto en que se plantea, en esta parte de la tesis, un análisis macro y microscópico comparado de la cavidad laringotraqueal en dos especies de bufónidos: *B. arenarum* y *M. s. stelzneri*.



1. Terminología

La nomenclatura utilizada para la orientación de la laringotráquea, la denominación de la musculatura asociada a esta estructura así como los cartílagos involucrados en el esqueleto de las especies incluidas estudiadas es el siguiente:

➤ *Orientación de la laringotráquea*

La ubicación anatómica de la laringotráquea es tan variada en especies del mismo género que los términos "dorsal", "ventral", "anterior" y "posterior" no siempre son fáciles de aplicar. Sin embargo con el fin de poder determinar una orientación de las diferentes estructuras involucradas, estos términos son utilizados en esta parte de la tesis, dejando de lado por su ambigüedad los términos "faringeal" y "cardíaco" utilizados por Wilder (1896) (Fig. 1.2).

➤ *Musculatura laringotraqueal*

La laringotráquea de los Anuros está dotada de una musculatura particular que presenta una variabilidad de organización en las distintas familias. Todos estos músculos se subdividen en dos categorías: los dilatadores laríngeos en sentido amplio y los constrictores laríngeos. Con respecto a ello, en la bibliografía existen diferentes nombres para señalar a un mismo músculo. En la tabla 1 se presenta un resumen de la nomenclatura utilizada por diferentes autores.



Henle (1839)	Wilder (1896)	Göppert (1898)	Gaupp (1904)	Trewavas (1933)	Schneider (1970, 77)	Martin & Gans (1972)	Duellman & Trueb (1986)
<i>m. dilatador aditus laryngis</i>	<i>m. dilatador aditus laryngis</i>	<i>m. dilatador laryngis</i>	<i>m. dilatador laryngis</i>	<i>m. dilatador laryngis</i>	<i>m. dilatador laryngis</i>	<i>m. dilatador laryngis</i>	<i>m. dilatador laryngis</i>
<i>m. constrictor aditus laryngis</i>	<i>m. constrictor laryngis</i>	<i>m. hyolaryn- geus</i>	<i>m. hyolaryn- geus</i>	<i>m. constrictor laryngis externus</i>	<i>m. hyolaryn- geus</i>	<i>m. constrictor laryngis externus</i>	<i>m. hyolaryn- geus</i>
<i>m. compresor laryngis</i>	<i>m. sphincter laryngis ventralis</i>	<i>m. sphincter anterior</i>	<i>m. sphincter anterior</i>	<i>m. constrictor laryngis anterior</i>	<i>m. sphincter anterior</i>	<i>m. constrictor laryngis anterior</i>	<i>m. sphincter anterior</i>
<i>m. compresor laryngis</i>	<i>m. sphincter laryngis dorsalis</i>	<i>m. sphincter posterior</i>	<i>m. sphincter posterior</i>	<i>m. constrictor laryngis posterior</i>	<i>m. sphincter posterior</i>		<i>m. sphincter posterior</i>

Tabla 1. Musculatura laringotraqueal

Adoptaremos en este trabajo la nomenclatura utilizada por Trewavas.

➤ *Esqueleto laringotraqueal*

De igual manera, distintos autores han nombrado de forma diferente a los cartílagos que conforman el esqueleto laríngeo (Tabla 2).



Wilder (1896)	Göppert (1898)	Gaupp (1904)	Trewavas (1933)	Schneider (1970,72)	Martin & Gans (1972)	Duellman & Trueb (1986)
Aritenoides			Aritenoides	Aritenoides	Aritenoides	Aritenoides
		Prominencia apical anterior				
		Prominencia apical posterior				
		Cartílago apical	Cartílago apical			
			Cartílago basal			
Annulus		Cricotraquealis (Pars cricoidea Pars traquealis)	Cricoides	Cricotraqueal (Pars cricoidea Pars traquealis)	Cricoides	Cricoides
		Espina esofágica	Proceso esofágico			Proceso esofágico
		Proceso articular posterior	Proceso articular			
Proceso cardíaco		Proceso articular anterior	Proceso cardíaco			
Proceso faringeo anterior		Proceso muscularis	Proceso muscular			
Proceso bronquial	Proceso traquealis	Proceso traquealis	Proceso bronquial		Proceso bronquial	Proceso bronquial
		Proceso pulmonar				
		-----	Proceso lateral			

Tabla 2. Esqueleto laringotraqueal

2. Laringotráquea en los anuros

En muchos tetrápodos el aparato laringotraqueal, o caja de resonancia, es la estructura que produce el sonido y en general puede ser visualizada como una cápsula cartilaginosa en cuyo interior se alojan las cuerdas vocales.

El aparato laringotraqueal separa la cavidad bucal de los pulmones a nivel del esófago. Dicho aparato está comunicado con la cavidad bucal por medio de una hendidura vertical, la glotis, la cual



permite el pasaje del aire entre la cavidad bucal y los pulmones (Fig.1.1).

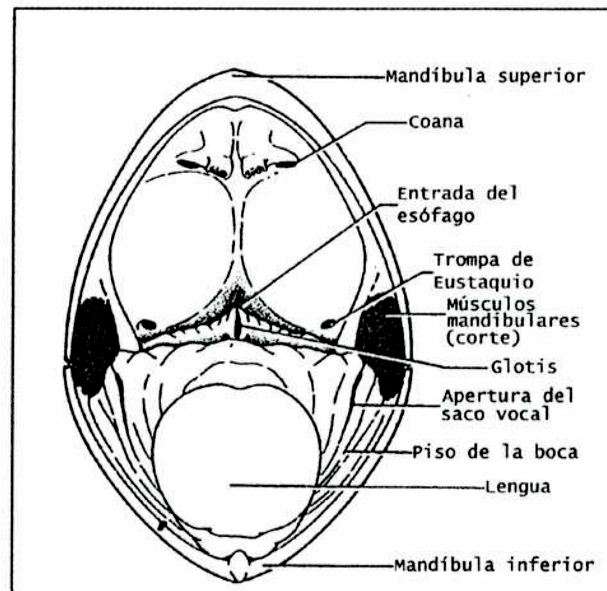


Fig. 1.1 Esquema general de la cavidad bucal de un anuro macho, indicando sus principales estructuras.(Según Duellman y Trueb, 1986)

El aire deja los pulmones, atraviesa las cuerdas vocales y los cartílagos asociados, provocando la vibración de estas estructuras. La vibración induce la pulsación de la columna de aire y se traduce como sonido. La calidad del sonido dependerá de varios factores: la masa de la estructura vibrátil, su tensión; y la naturaleza de la cámara de resonancia, a través de la cual el sonido pasa antes de dejar el cuerpo.

Aunque hay una considerable diversidad de estructuras de la laringotráquea en anuros (ver Trewavas, 1933; Martin 1972; Schneider, 1970) en muchos de ellos ésta está compuesta por dos cartílagos aritenoides que forman en conjunto una estructura hemisférica en cuyo lumen se alojan las cuerdas vocales y están balanceados dentro de una estructura anular cartilaginosa: el cricoides. Este conjunto de cartílagos junto con la musculatura



asociada, compone el aparato laringotraqueal el cual está suspendido entre los procesos posteromedial del hioides (Fig. 1.2).

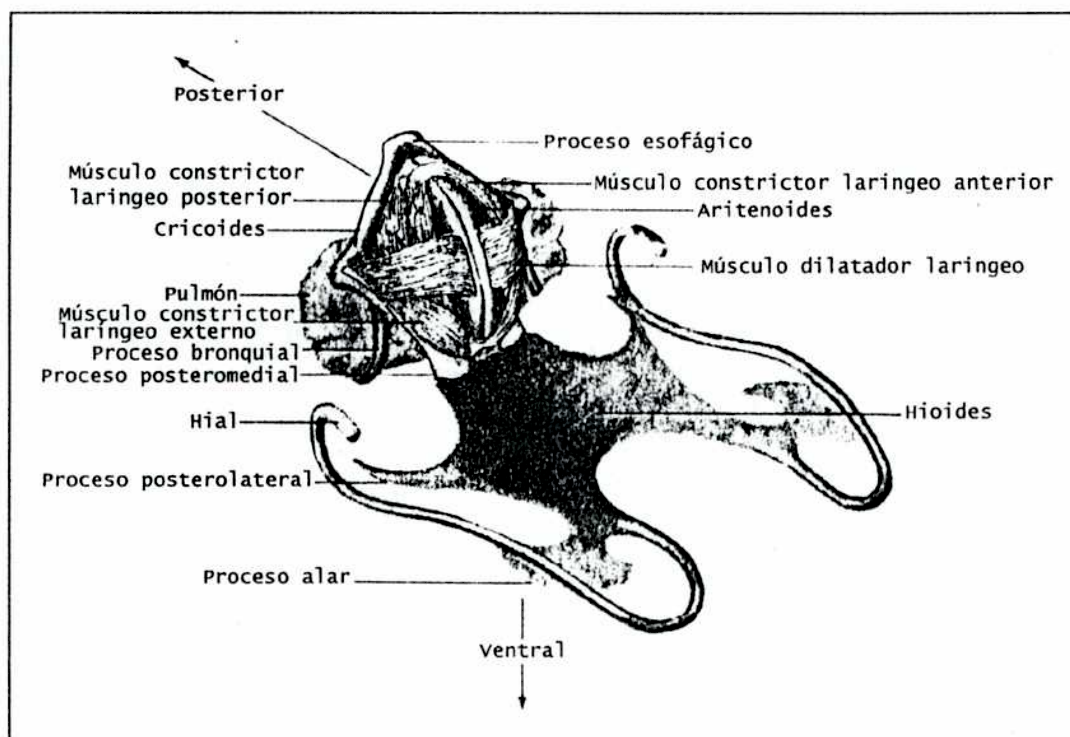


Fig. 1.2 Esquema del esqueleto hiolaríngeo de un anuro
(Según Duellman y Trueb, 1986)

El movimiento del cartílago aritenoso está afectado por tres pares de músculos asociados con la superficie superior de los cartílagos. El **músculo dilatador laríngeo**, se inserta en la superficie dorsal del proceso posteromedial del hioides y en una delgada área del ápice del cartílago aritenoso, adyacente a la glotis (Fig. 1.2). La contracción de éste músculo hace pivotear al cartílago aritenoso sobre el anillo cricoideo de tal forma que el margen anteroventral de la valva es desviada lateralmente y el margen pósterodorsal se mueve medialmente estirándose y aumentando la tensión de las cuerdas vocales.

El otro par de músculos son los constrictores. Con respecto a ellos, el **músculo constrictor laríngeo externo** que se sitúa en el margen anteroventral de los aritenoides, está unido al proceso pósteromedial y se encuentra con su homólogo en un delgado rafe



ubicado por delante al aritenoides (Fig. 1.2). El **músculo constrictor laríngeo posterior** que se ubica adyacente con el margen pósteroventral de los aritenoides, está unido cada uno por un diminuto tendón al pulvinar vocal. El **músculo constrictor laríngeo anterior** termina en la región anterior, en parte, en el rafe del constrictor externo y en parte en la membrana hioaritenoides (Fig. 1.2) (Trewavas, 1933).

Cuando estos constrictores se contraen, ellos se deslizan anteriormente sobre los cartílagos aritenoides, empujando las dos estructuras de manera conjunta (Gans, 1973).

Aunque el cartílago cricoideo, junto con sus procesos, tiene una morfología variable entre los anuros (Trewavas, 1933), ciertas estructuras son críticas para su función que es la de servir de soporte al sistema laringotraqueal. El cricoides forma una base firme contra la cual los cartílagos aritenoides pueden girar. En muchos anuros con un anillo completo y cuerdas vocales, la porción posterior de cada cuerda está unida al margen interno del cartílago cricoideo, así como al margen posterior de cada cartílago aritenoides.

El proceso esofágico y los procesos bronquiales del cartílago cricoideo soportan la región proximal de los pulmones. El primero está localizado en la línea media sobre el margen posterior del anillo cricoideo. Cada proceso bronquial se eleva sobre cada lado del cricoides, se curva pósteroventralmente por debajo de la terminación anterior del pulmón derecho e izquierdo respectivamente. El cartílago cricoideo presenta otros procesos: los procesos articulares que se elevan lateralmente desde el anillo cartilaginoso y proveen un punto de articulación en la zona de unión entre el cartílago cricoideo y los procesos pósteromediales del aparato hioideo (Duellman y Trueb, 1986).

Si se observa una sección interna del complejo laringotraqueal se puede apreciar la relación de la cámara posterior con la cámara



anterior, esta última compuesta por los cartílagos aritenoides y sus estructuras asociadas. Las dos cámaras están separadas por dos membranas, cada una de las cuales está formada por una extensión medial del revestimiento de uno de los cartílagos aritenoides. Una cuerda vocal está asociada con cada cartílago aritenoides; la terminación anteroventral está unida a la porción final interna del cartílago aritenoides, mientras que la porción final pósterodorsal usualmente está conectada a ambos cartílagos, los aritenoides y el cricoideo. Las cuerdas vocales derivan del revestimiento de los cartílagos aritenoides y por lo tanto son membranosas en su origen; sin embargo, su estructura es muy variable en las distintas especies.

3. Histología de la cámara laringotraqueal

Desde el punto de vista histológico las vías extrapulmonares de los anfibios han sido tema de muy pocos estudios. Hasta el momento se realizaron en un urodelo *Hynobius nebulosus* (Matsumura y Setoguti, 1986); en *Chthonerpeton indistinctum* (De Carlo, 1980) y en dos anuros: *Bufo calamita* (Castells *et al.* 1990) y *Rana perezi* (Pastor *et al.*, 1998).

3.1. Microscopía óptica e histoquímica

La cavidad laringotraqueal de *Hynobius nebulosus* fue dividida en dos porciones: la región aritenoides y la cricotraqueal. La primera región está tapizada por un epitelio ciliado columnar con células caliciformes y células mucosas. En la región cricotraqueal, el epitelio está formado por células mucosas, mientras que las células ciliadas están distribuidas esporádicamente. Tanto las células caliciformes



como las mucosas de ambas regiones poseen abundancia de mucopolisacáridos ácidos sulfatados (Matsumura y Setoguti, 1986).

En *Chthonerpeton indistinctum* el esqueleto de la laringe está formado por un par de cartílagos laterales, cada uno de los cuales presenta un esbozo de cartílago aritenoides y cricoideo. La mucosa laríngea está conformada por un epitelio estratificado cilíndrico con dos tipos de células superficiales: ciliadas y glandulares, distribuidas irregularmente. Por lo general las células ciliadas forman pequeños grupos diseminados entre las células glandulares. El contenido de las células glandulares se identifica por tener reacción APS positiva y teñirse con azul alcian lo cual permite suponer que estas células secretan un tipo especial de mucinas constituidas por una combinación de glicoconjugados neutros y ácidos (De Carlo, 1980).

La cavidad laringotraqueal en *Rana perezi* y *Bufo calamita* está separada en dos cámaras, por membranas y se denominan *vestibulum laryngis* (cámara anterior) y el *cavum laryngotracheale* (cámara posterior). La cámara anterior comunica con la cavidad oral. Ambas cámaras están tapizadas por un epitelio pseudoestratificado con células basales y células mucosas. Estas células forman en la porción distal de la laringe glándulas tubulares simples. En la porción anterior y posterior de la laringe se observan parches de epitelio pseudoestratificado con células ciliadas, basales y caliciformes. Las cuerdas vocales están cubiertas por un epitelio simple de células planas o cúbicas. La cámara posterior conecta con los bronquios los cuales están tapizados por un epitelio pseudoestratificado compuesto de células basales, ciliadas y caliciformes en *R. perezi*, mientras que en *B. calamita* es un epitelio pseudoestratificado constituido por células secretoras y basales únicamente.

Histoquímicamente las células secretoras muestran una débil reacción al reactivo de Schiff. Las células caliciformes y la región apical de las células ciliadas contienen sialomucinas.



3.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Ultraestructuralmente las únicas dos especies estudiadas han sido *Hynobius nebulosus* (Matsumura y Setoguti, 1986) y *Rana perezii* (Castells *et al.*, 1990).

Una porción aritenóidea y cricotraqueal se observa en *H. nebulosus* con abundantes células ciliadas y no ciliadas. Estas últimas son clasificadas como células mucosas, las cuales están individualmente localizadas entre las células ciliadas y presentan sobre su superficie cortas microvellosidades. En la región cricotraqueal las células ciliadas son más numerosas en la porción lateral y las células mucosas presentan más microvellosidades.

En *Rana perezii*, con MEB, la cámara anterior, posterior y los bronquios se distinguen. La superficie de la laringe, en ambas cámaras, presenta solamente células con una morfología poligonal y con microvellosidades apicales. A mayor aumento puede observarse la estructura de las microvellosidades apicales, así como la presencia de pequeñas oquedades sobre la membrana apical. En la cámara posterior de la laringe se observan sobre estas células aberturas "poros" circulares las cuales probablemente son aperturas glandulares. Las cuerdas presentan una superficie irregular formada por células con un diámetro pequeño. Cerca de ellas se pueden observar células ciliadas.

Desde un punto de vista estructural, los resultados obtenidos por Pastor *et al.* (1998) en *Rana perezii* parecen indicar que el epitelio de la laringe de ésta especie estudiada hasta el momento, presenta una morfología similar a la observada en la laringe y tráquea de lacértidos y ofidios (Pastor *et al.*, 1990, 1998).



RESULTADOS

1. Laringotráquea de *Bufo arenarum*

1.1. Estudio anatómico

El esqueleto laringotraqueal en *Bufo arenarum* se sitúa en la parte posterior del cartílago hioideo entre los dos procesos postero-mediales, con una inclinación ventrodorsal aproximada de 45° con respecto al eje mayor del cuerpo del hioides, el cual se considerará como eje de referencia para la orientación de las estructuras (Fig. 1.3). Este esqueleto está constituido por los cartílagos aritenoides y por el cartílago cricoideo.

Los músculos asociados con el esqueleto laringotraqueal son el músculo dilatador laríngeo, el constrictor laríngeo externo y el músculo constrictor laríngeo anterior. No se ha observado el músculo constrictor laríngeo posterior.

Entre los ejemplares estudiados, se observó que no había variaciones importantes en la estructura del hioides. Este se caracteriza por estar formado por una gran placa cartilaginosa, más larga que ancha, situada en el piso de la boca, del cual parten diferentes procesos donde se inserta la musculatura laringea. Los hiales son acintados, nacen en los extremos antero-laterales del cuerpo del hioides delimitando el seno hioglosal y se curvan posterolateralmente. Carece de procesos anteriores. El proceso alar, el cual es entre todos ellos el más conspicuo, presenta una mayor variación entre los ejemplares analizados, dado por la presencia de pequeñas indentaciones sobre su lóbulo posterior. Los procesos posterolaterales del hioides se expanden distalmente y son cortos. Los procesos posteromediales, con forma biconvexa, están osificados



en su totalidad con excepción de sus extremos distales que son cartilaginosos. Estas prolongaciones se extienden desde la región caudal del cuerpo del hioides y se dirigen en forma oblicua con una dirección ventro-dorsal. El extremo posterior óseo del proceso posteromedial se contacta con el proceso lateral del cartílago cricoideo, fijando de esta forma al esqueleto laríngeo (Fig. 1.4).

Cada cartílago aritenoides tiene, visto lateralmente, una forma triangular con una cara externa ligeramente cóncava en dirección ántero-posterior. El extremo ántero-ventral de éste cartílago, se dobla en un ángulo recto hacia adentro enfrentándose con el simétrico correspondiente al otro cartílago aritenoides. El borde ántero-dorsal tiene forma roma y se proyecta sobre la faringe. En esa región, en su cara externa, se puede observar la inserción del músculo dilatador laríngeo que se extiende hasta el proceso posteromedial. Ambos cartílagos dejan una abertura, la glotis, que permite el pasaje del aire desde la faringe, atravesando la laringotraquea, hasta los pulmones. El extremo pósterodorsal de los cartílagos aritenoides, también se curvan hacia adentro pero a diferencia de los extremos ántero-ventrales, éstos se unen por un delgado puente cartilaginoso (Fig. 1.5 a, b, c; Fig. 1.6 a, b).

La cara interna de los aritenoides se caracteriza por estar tapizada por una membrana. En un segundo plano ubicado hacia el lumen de la laringotraquea, es posible determinar la existencia de otra membrana (primaria) que si bien está unida en toda su extensión a los bordes internos del aritenoides (ántero-ventral y pósterodorsal), deja libre uno de sus lados formándose una cámara anterior. Esta membrana presenta en la zona media un engrosamiento con forma triangular mullido al tacto. El lado libre se dobla hacia afuera, alejándose de la pared del aritenoides, y adquiere una forma biconvexa constituyendo lo que se conoce como la cuerda



vocal. Ambos bordes de las cuerdas están engrosados (Fig. 1.7 a, b y c).

En *Bufo arenarum* no se observó la presencia del cartílago basal ni apical asociados a los aritenoides.

Los aritenoides se articulan con un cartílago delgado con forma de anillo completo, el cricoides. Este cartílago presenta en su porción póstero-dorsal media, un proceso esofágico impar y corta, que puede tener un mayor o menor grado de indentaciones, según el individuo. Del lado opuesto a donde se ubica éste proceso, se sitúan dos pequeños procesos acuminados a la que llamaremos (X) que se rebaten hacia el lumen de la cavidad laringotraqueal. Los procesos laterales del cartílago cricoideo son ligeramente ensanchados y hacen contacto con los procesos póstero-medial del hioides (Fig. 1.6 a, b).

El cricoides, en su porción ántero-ventral, exhibe dos procesos cortos, denominadas (Y), terminados en punta que hacen saliencia hacia el lumen de la laringotráquea. Dos procesos pulmonares alargados se curvan dorsalmente hacia la parte posterior. En su extremo distal, éstos procesos muestran una ligera expansión que sostiene la cara anterior lateral del pulmón izquierdo y derecho respectivamente (Fig. 1.5 a).

Internamente, es posible observar a la altura del cricoides, una membrana secundaria, cuyo borde libre, se extiende desde el proceso (X) hacia el proceso (Y) correspondiente a la misma mitad, mientras que el borde fijo está unido al margen inferior del cricoides. El borde libre presenta una delgada varilla cartilaginosa cerca de la superficie. De esta forma queda constituido una cámara posterior delimitada por esta membrana y la membrana primaria que formará la cuerda vocal (Fig. 1.7 a, b, c; 1.8 a, b).

Hay un mayor desarrollo en la musculatura así como del tamaño de los cartílagos en los machos más que en las hembras macroscópicamente.



Todas las observaciones se efectuaron sobre material al que se le realizó la técnica de Wassersug ya que las observaciones con la técnica de Lundwall impedía ver con detalle la organización del esqueleto laríngeo.



1.2. Estudio microanatómico

1.2.1 Microscopía óptica (MO)

1.2.1.1 Estudio topográfico

Con el propósito de poder ayudar a interpretar y relacionar el estudio anatómico de la laringotróquea de *Bufo arenarum* con las observaciones histológicas realizadas, se propone el esquema de la Fig. 1.9 a, b y c, para indicar la altura de los cortes seriados analizados en éste capítulo.

La descripción de los mismos se realizará sobre secciones orientadas paralelas a las cuerdas vocales, comenzando desde la región ántero-dorsal hacia la zona pósterio-ventral.

La mucosa faríngea se invagina a la altura de la hendidura glotídica. Está constituida por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con abundantes células caliciformes y un tejido conectivo laxo con numerosas fibras elásticas delgadas. Los cartílagos aritenoides del tipo hialino, se ubican a ambos lados de la cavidad laringotraqueal, así como los músculos esqueléticos estriados dilatadores laríngeo y constrictor laríngeo externos (Fig. 1.10, 1.21 a, b).

El epitelio que reviste la cavidad laringotraqueal muestra notables diferencias a lo largo de la misma.

El extremo ántero-dorsal de los aritenoides está revestido por una mucosa muy plegada (Fig. 1.22 a) cuyo epitelio es pseudoestratificado cilíndrico ciliado con abundantes células caliciformes (Fig. 1.22 b). Hacia la zona media del lumen, la mucosa presenta modificaciones. No sólo se reduce la cantidad y la proximidad de los pliegues (Fig. 1.22 a) sino que además va disminuyendo la altura del epitelio, las células caliciformes, las células



ciliadas, pasando de un epitelio pseudoestratificado a biestratificado cúbico (Fig. 1.22 c, d, e).

En la región media de los cartílagos aritenoides (Fig. 1.11, 1.12), el epitelio que reviste los extremos anterior y posterior son del mismo tipo que el descrito anteriormente: pseudoestratificado cilíndrico ciliado con escasas células caliciformes. Este se continúa en la región central de la cavidad con un epitelio constituido por células secretoras, células caliciformes, células ciliadas, células basales y células con morfología diferente a las anteriores. El tejido conectivo subyacente es laxo mientras que por debajo de este se encuentra un tejido conectivo denso muy capilarizado (Fig. 1.23 a, b).

Las células que constituyen el epitelio secretor se caracterizan por ser del tipo columnar, se extienden por todo el espesor del epitelio y presentan una delgada prolongación citoplasmática ahusada en la porción basal. El núcleo es esférico situándose en la región media de la célula. En la parte apical del citoplasma tiene un aspecto esponjoso debido a la secreción producida por estas células. Las células caliciformes poseen una región apical ensanchada y una porción basal más delgada, como es característico en este tipo de glándulas unicelulares aisladas. El núcleo está desplazado a la base celular y deformado por el mucus acumulado. Por su parte las células ciliadas son también del tipo columnar, las cilias aparecen como cortas prolongaciones filiformes que se proyectan desde la superficie apical. Inmediatamente por debajo de las cilias se observa una línea oscura formada por los cuerpos basales ciliares agregados. El núcleo es esférico, se ubica en el tercio apical y puede apreciarse un nucleólo en su interior. Las células basales se encuentran apoyadas a la membrana basal, tienen forma triangular, presentan un escaso citoplasma y el núcleo es esférico. La morfología del último tipo celular mencionado se caracteriza porque son células delgadas, altas,

con un citoplasma homogéneo y un núcleo ubicado en posición central.

En la Fig. 1.12 el epitelio que reviste a los aritenoides pierde casi por completo las células caliciformes, el epitelio queda constituido por pequeños parches de células ciliadas y células secretoras del mismo tipo que las descritas anteriormente. El tejido conectivo subyacente es laxo y contiene abundantes linfocitos, muchos de los cuales están infiltrados en el epitelio. Se observa una mayor capilarización del tejido conectivo laxo subyacente (Fig. 1.24).

A la altura de los aritenoides donde se produce la inserción de la membrana primaria o cuerda vocal (Fig. 1.13) la mucosa que reviste a los cartílagos no manifiesta cambio alguno. Sin embargo en los puntos de inserción de ésta membrana, el epitelio es simple cúbico y el tejido conectivo es más denso (Fig. 1.25). A todo lo largo del borde libre de la cuerda el epitelio de revestimiento es simple plano y el tejido conectivo denso presenta abundantes fibras elásticas (Fig. 1.26 a, b). En la zona media, el tejido conectivo se incrementa notablemente constituyendo una masa fibrosa elástica de forma ovoide. El epitelio que reviste ésta masa fibrosa es del tipo simple cúbico y el conectivo subyacente se caracteriza por tener capilares sanguíneos situados muy próximos al epitelio (Fig 1.27 a, b, c).

A la altura de los procesos X e Y del cartílago cricoides (Fig. 1.14) se observa la inserción en ellos de la membrana secundaria. Esta membrana está formada por dos mucosas, una que da hacia el lumen de la cámara posterior, tapizándolo, y la otra ubicada hacia el lumen de la cavidad laringotraqueal. Entre el tejido conectivo de ambas mucosas se sitúa una delgada varilla de tejido cartilaginoso hialino (Fig. 1.28). El epitelio de revestimiento de esta membrana está constituido en su mayor parte por una lámina secretora, glándulas intraepiteliales y algunas células a las que denominaremos "con morfología diferente". En la zona próxima a los procesos

aumenta el número de células caliciformes y ciliadas de manera que pasa a ser un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con abundantes células caliciformes. El tejido conectivo denso está capilarizado y presenta fibras elásticas (Fig. 1.29 a, b, c, d, e, f, g).

El epitelio de revestimiento del lumen de la cavidad laringotraqueal a la altura del cartílago cricoideo (Fig. 1.16, 1.17), está formado por un epitelio secretor con las mismas características que las descritas anteriormente.

La última porción de la cavidad laringotraqueal se encuentra dividida en dos cámaras por medio de un tabique de tejido conectivo, fibras musculares lisas y fibras elásticas (Fig. 1.19, 1.30 a). Estas cámaras están tapizadas a la altura de éste tabique por una mucosa plegada con un epitelio tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes y una lámina propia constituida por tejido conectivo laxo con fibras elásticas (1.30 b, c). El resto de la misma presenta un epitelio secretor como el descrito anteriormente.

Cada cámara se abre a la porción proximal del pulmón (Fig. 1.19) por lo tanto puede observarse una transición en el tipo de epitelio, desde un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes a simple cilíndrico o cúbico con y sin cilias. En la parte anterior de los pulmones, puede observarse muy pocas células cúbicas ciliadas que se alternan con el epitelio respiratorio. Tanto en la zona de las cámaras como en la entrada a los pulmones, se distingue en el tejido conectivo fibras elásticas y fibras musculares lisas, dispuestas circular o longitudinalmente (Fig. 1.31 a, b, c, d).

1.2.1.2 Estudio inmunohistoquímico

Se utilizó el anticuerpo PGP 9.5 con el propósito de identificar en el epitelio que reviste la mayor parte de los aritenoides y el



cricoides, a las células con morfología diferente al de las células ciliadas, secretoras y basales descritas con técnicas histológicas convencionales. Como resultado de la reacción inmunohistoquímica se obtuvo una inmunorreactividad en toda la longitud de la célula (1.32 a, b, c, d, e).

1.2.1.3 Estudios histoquímicos

a) Lípidos y proteínas

Las técnicas de Sudan III y negro Sudan con diferentes solventes de dilución así como la técnica de azul de Nilo (Método de Cain) han dado resultados negativos. Lo mismo ha sucedido para la detección de proteínas con amarillo naftol y azul de bromofenol.

b) Glicoconjugados

Los resultados de las distintas técnicas histoquímicas realizadas en la laringotróquea de *B. arenarum* se presentan en la tabla 1 y en las figuras 1. 33 a la 1.44.



Técnica	Células Caliciformes	Epitelio Secretor Aritenoides	Células Mucosas aisladas	Masa Fibrosa Membrana Primaria	Epitelio Secretor Cricoides
APS	+++	++ región apical	+++		+++ células mucosas + epitelio secretor +++ glándula intraepitelial
AB pH 0,5	+ algunos gránulos		+ algunos gránulos		- epitelio secretor
AB pH 1	+ algunos gránulos		+ algunos gránulos	+	+ algunos gránulos en epitelio secretor
AB pH 2,5	++ +	++ región apical	+++	+	++ células mucosas + región apical ep. secretor
AB pH 3,5	++ +	+	+++		+++ células mucosas ++ región apical + resto ep. secretor +
APS / AB	+++APS/++ AB	+APS/+ AB + APS	+++		- epitelio secretor +APS / +AB células mucosas
AB / AY	++ AY y +AB/+AY	+ AB/+ AY región apical + AY resto de citoplasma	+++AB/+ ++AY +AB/ ++ AY	+ AY	+AY región apical + AY y ++AB/+++AY cél. mucosas



Hale	++		++	+	+ algunas cél. ep. secreto ++ cél. mucosas
Metilación 37°C / AB	++	+ región apical	++		+
Metilación 60°C / AB					

Tabla 1. Estudios histoquímicos de la laringotróquea de *B.arenarum*.

Referencias: +++: reacción fuerte; ++: reacción moderada;
+: reacción débil; - : sin reacción.

Fig. 1.3 - Esquema del esqueleto hioideo y laringotraqueal de *Bufo arenarum*

Fig. 1.4 - Transparentado del esqueleto hioideo y laringotraqueal. Técnica de Wassersug. 5x

A: aritenoides, C: cricoides, H: hoides, h: hiales; P: pulmón, pa: proceso alar, pm: proceso pósteromedial, pe: proceso esofágico, pp: proceso pulmonar, ppl: proceso pósterolateral

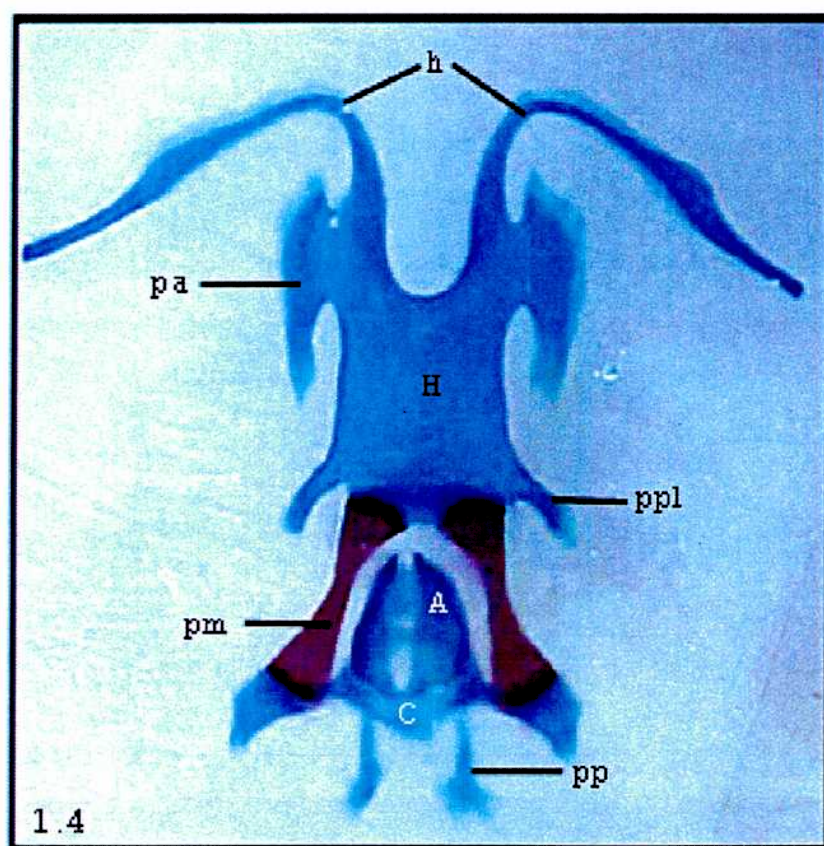
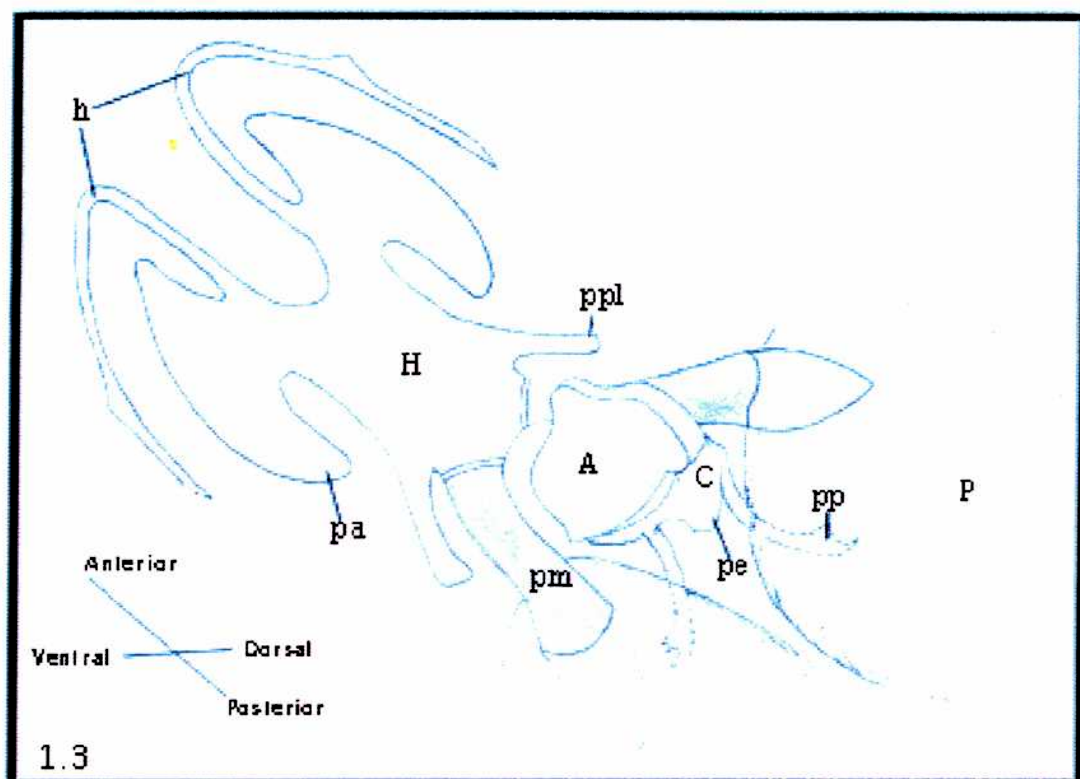


Fig. 1.5 a, b - Transparentado del esqueleto laringotraqueal. Vista ventral. Técnica de Wassersug. 65x

Fig. 1.5 c - Esquema resumiendo las observaciones realizadas. 65x

A: aritenoides, C: cricoides, g: glotis, H: hoides, h. hiales, l: lumen de la laringotraquea, m₂: membrana secundaria, P: pulmón, pa: proceso alar, pe: proceso esofágico, pl: proceso lateral, ppl: proceso póstero-lateral, pm: proceso póstero-medial, pp: proceso pulmonar, X: proceso X, Y: proceso Y. Cabeza de flecha: puente cartilaginoso

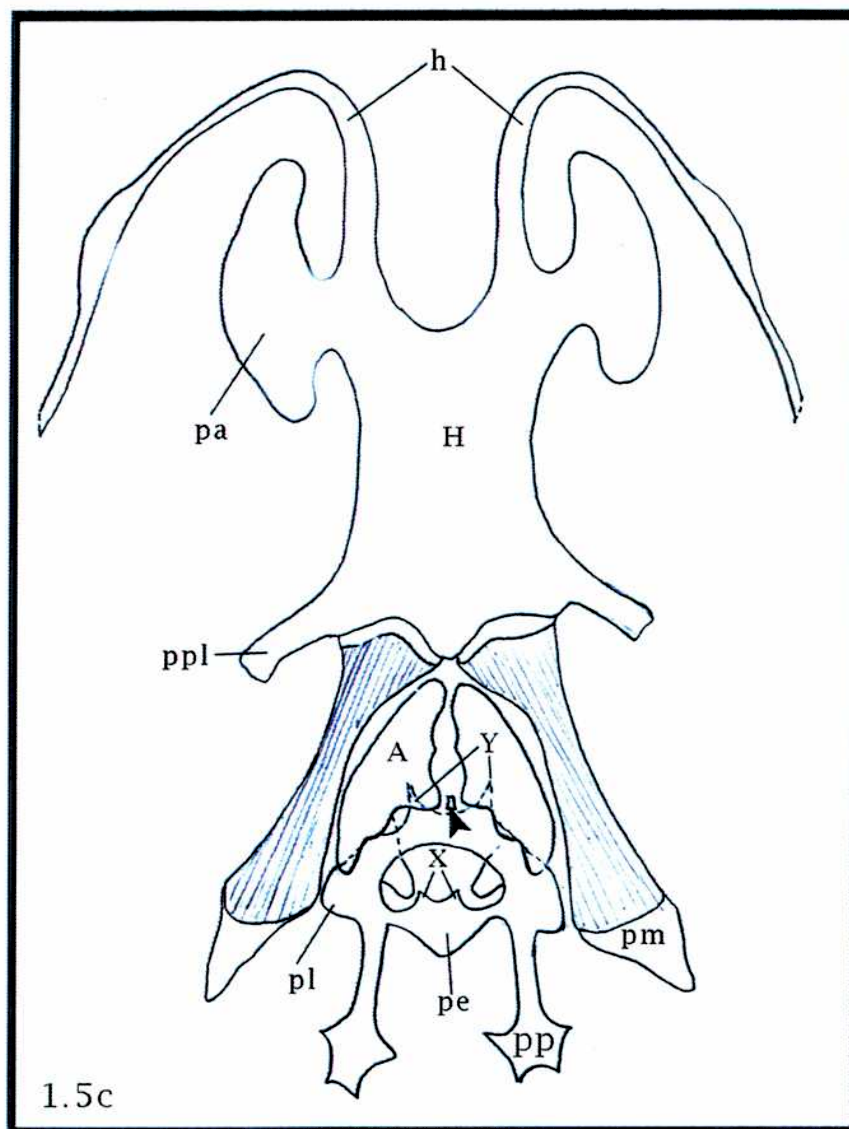
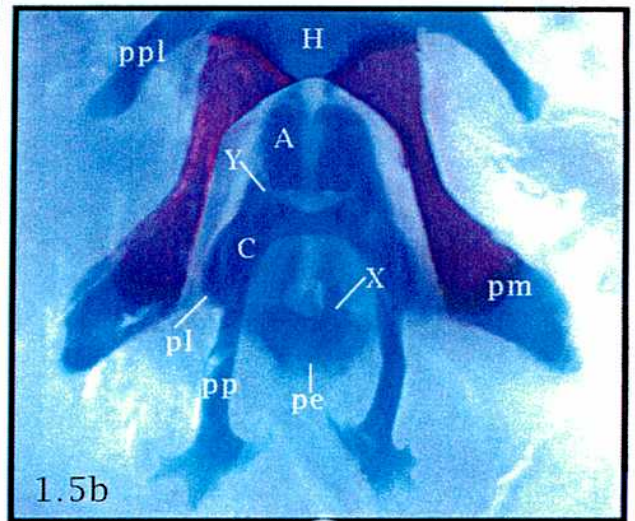
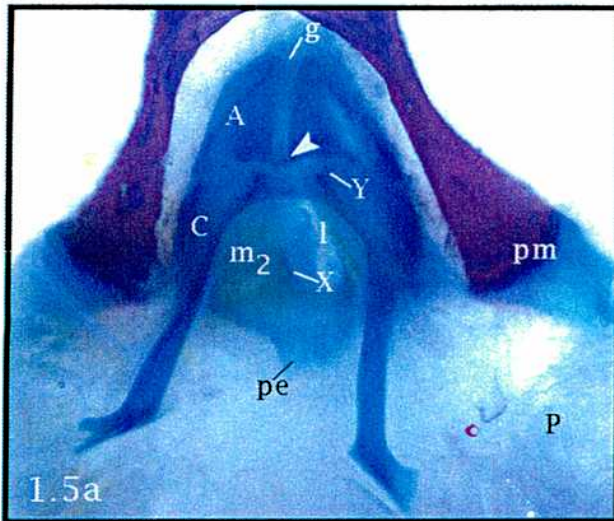


Fig. 1.6 a - Transparentado del esqueleto laringotraqueal. Vista dorsal. Técnica de Wassersug. 65x

Fig. 1.6 b - Esquema resumiendo las observaciones realizadas. 65x

A: aritenoides, C: cricoides, H: hoides, h. hiales, P: pulmón, pa: proceso alar, pe: proceso esofágico, pl: proceso lateral, ppl: proceso póstero-lateral, pm: proceso pósteromedial, pp: proceso pulmonar, X: proceso X

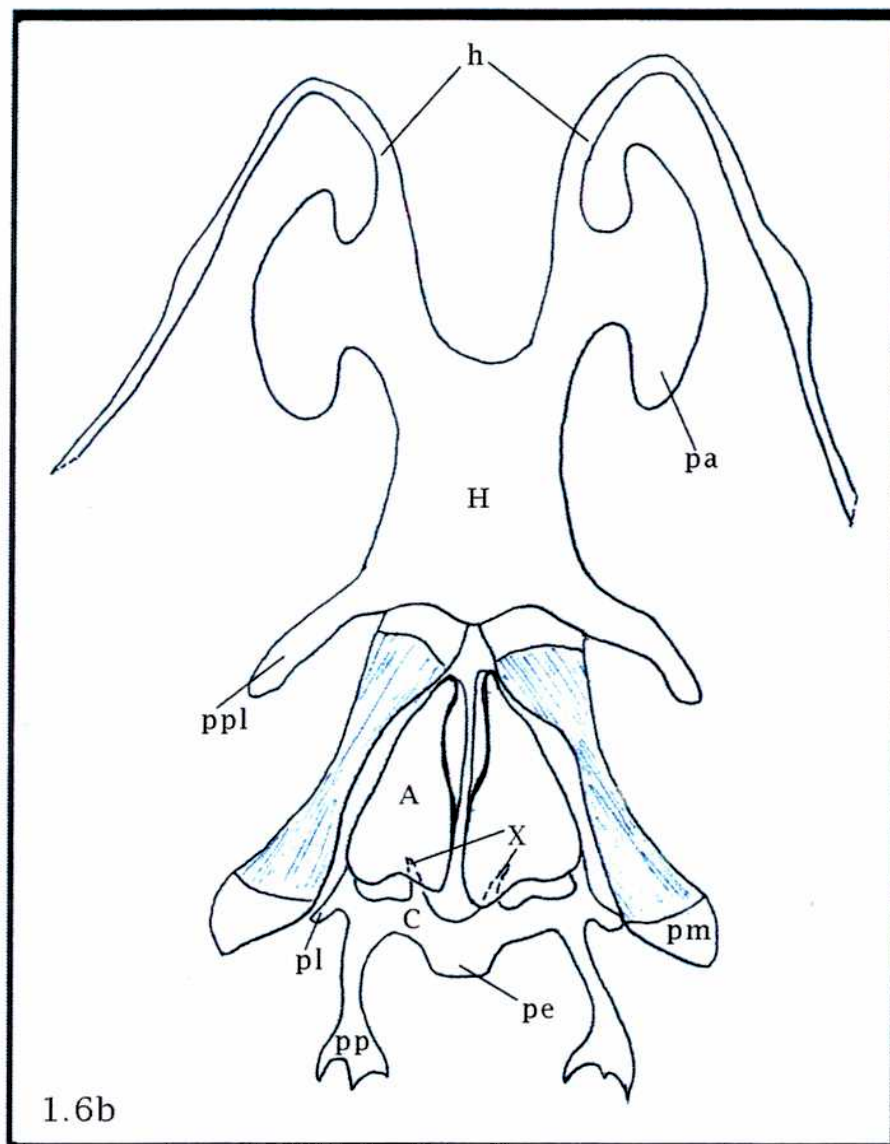
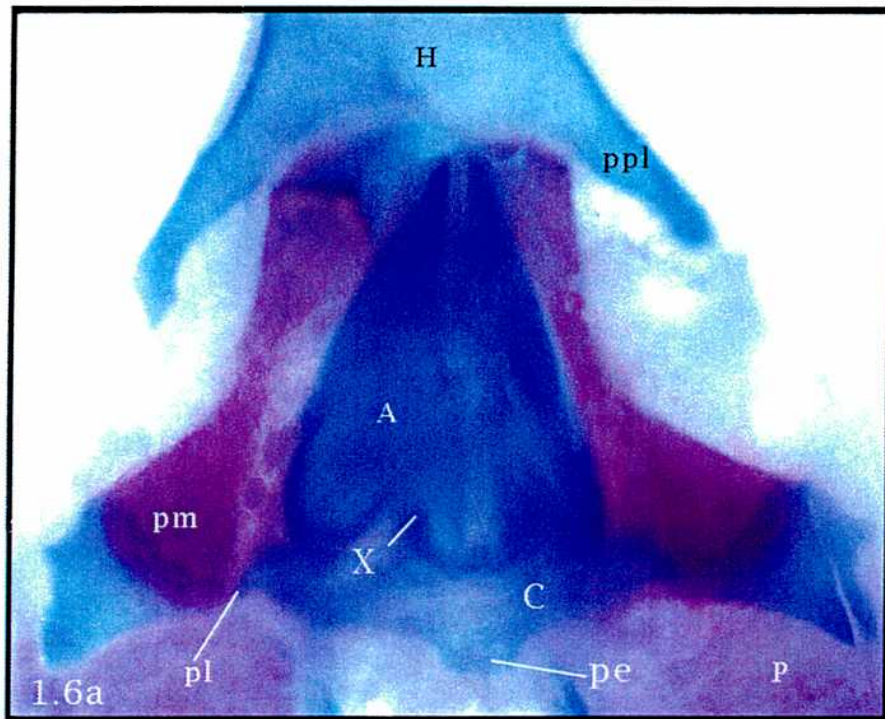


Fig. 1.7 a, b - Transparentado de una hemilaringotr  nea. Vista interna. Técnica de Wassersug. 65x

Fig. 1.7 c - Esquema resumiendo las observaciones realizadas. 65x

A: aritenoides, C: cricoides, cv: cuerda vocal, m₁: membrana primaria, m₂: membrana secundaria, pe: proceso esofágico, pp: proceso pulmonar, X: proceso X, Y: proceso Y
Cabeza de flecha: borde libre de la membrana secundaria. Flecha negra: masa fibrosa de la membrana primaria. Flecha azul: entrada a la cámara anterior. Flecha roja: entrada a la cámara posterior

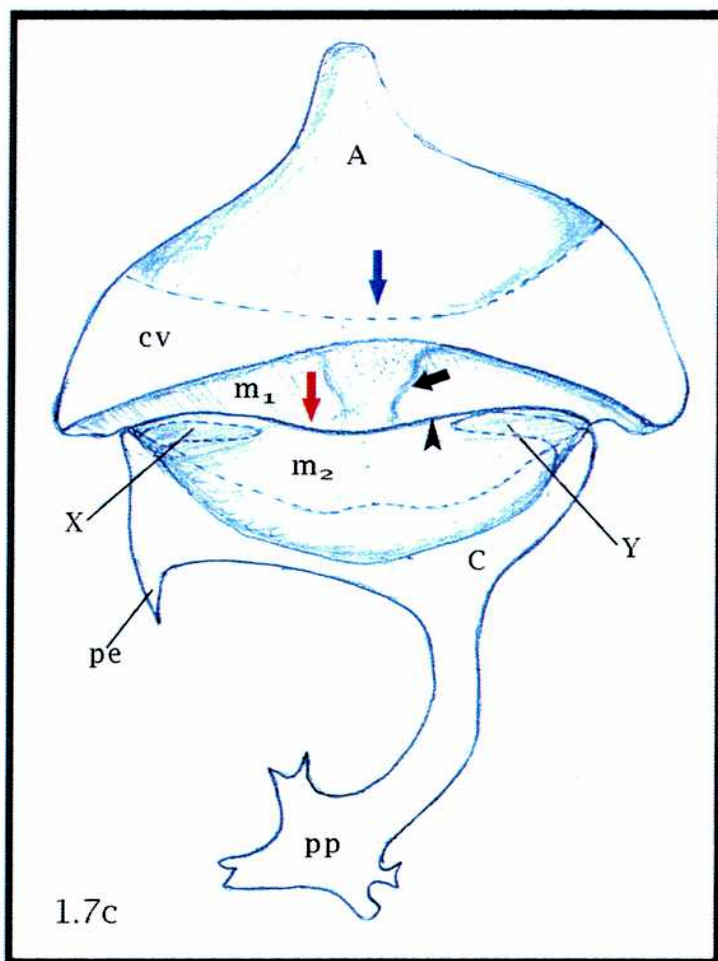
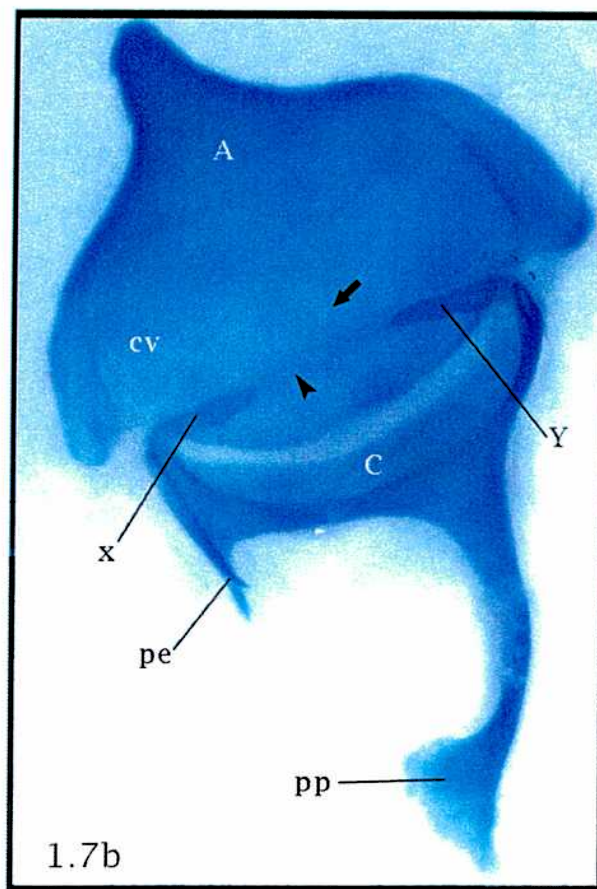
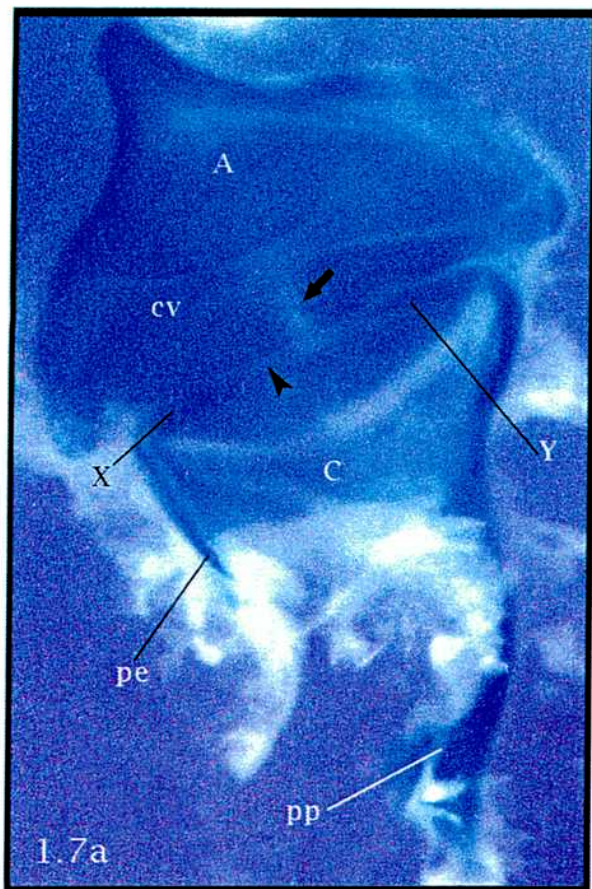


Fig. 1.8 a, b - Transparentado del esqueleto laringotraqueal. Vista interna. Técnica de Wassersug. 80x

A: aritenoides, C: cricoides, l: lumen, m₂: membrana secundaria, P: pulmón, pp: proceso pulmonar, X: proceso X, Y: proceso Y

Flecha azul: entrada a la cavidad anterior. Flecha roja: entrada a la cavidad posterior. Cabeza de flechas: borde libre de la membrana secundaria. Nótese la varilla de cartílago en el borde de una de ellas.

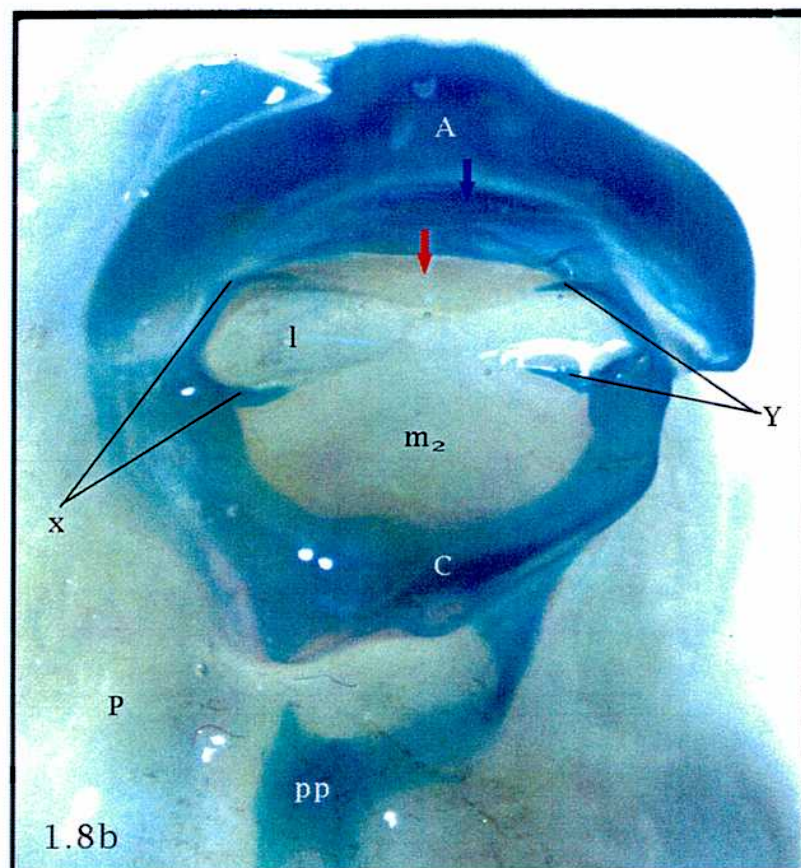
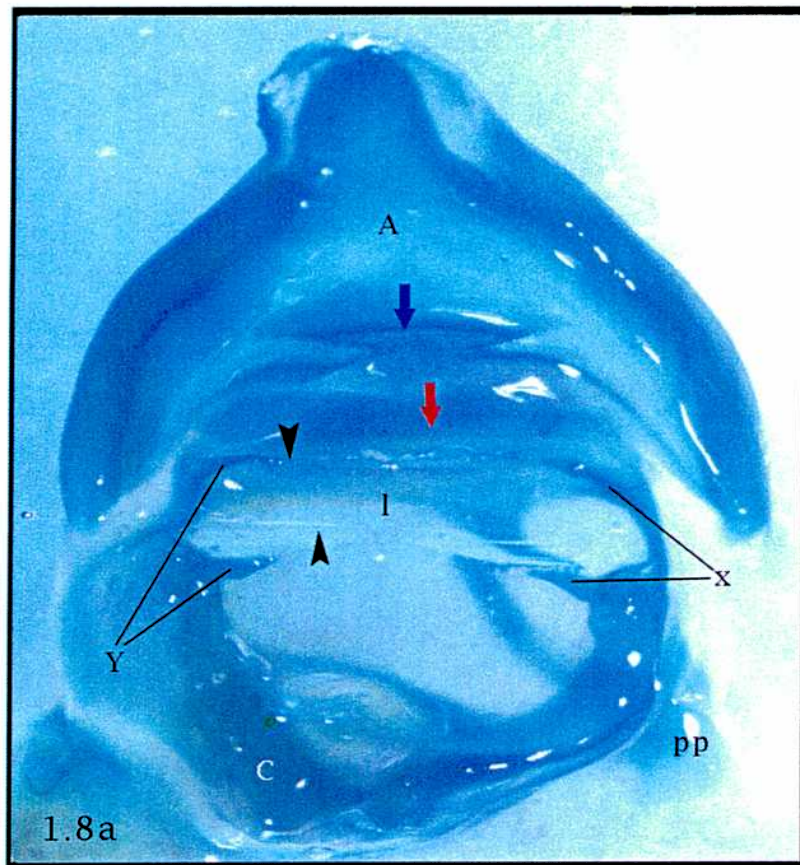


Fig. 1.9 a - Esquema indicando la altura de las secciones histológicas realizadas a la altura de los aritenoides.

Fig. 1.10 a 1.13 - Cortes transversales de la laringotráquea. Tricrómico de Masson modificado. 10x

A: aritenoides, cla: músculo laríngeo anterior, cle: músculo laríngeo externo, c₁: cámara anterior, c₂: cámara posterior, d: músculo dilatador, H: hioides, l: lumen, M: mucosa de la laringotráquea, Mf: mucosa faríngea, mf: masa fibrosa, m₁: membrana primaria, m₂: membrana secundaria,

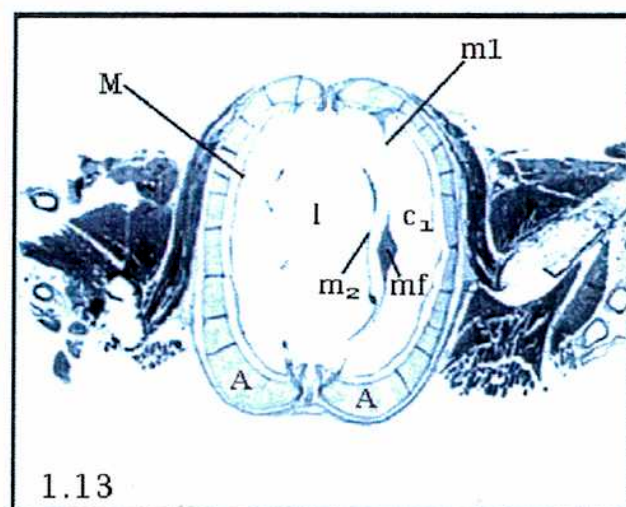
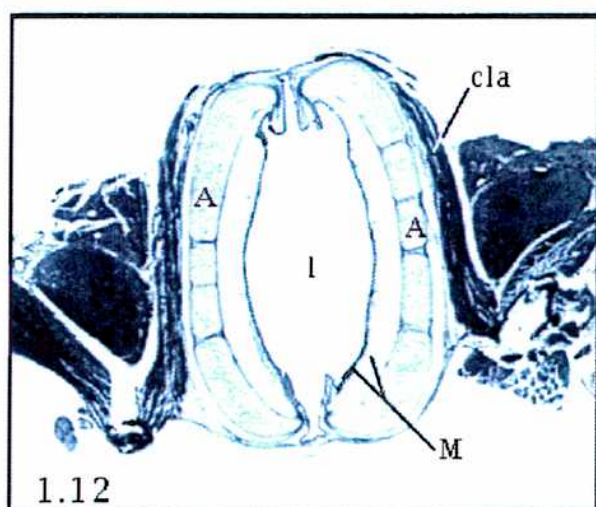
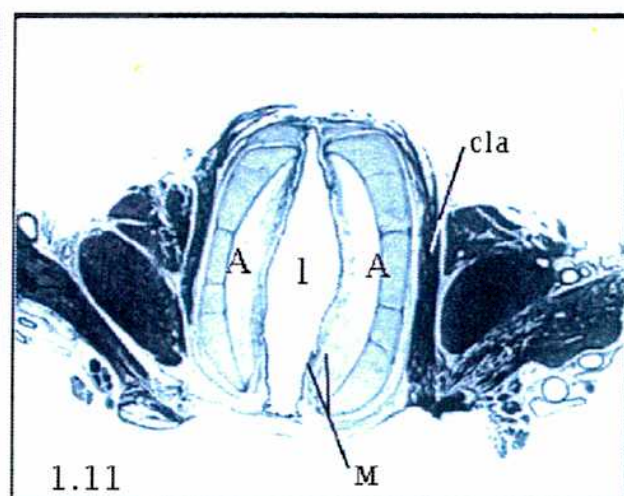
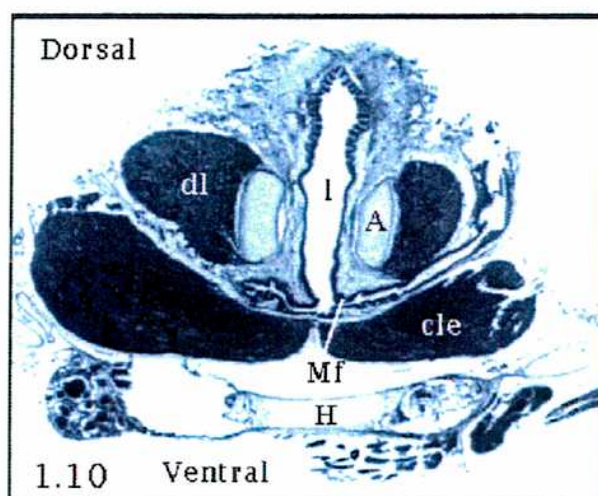
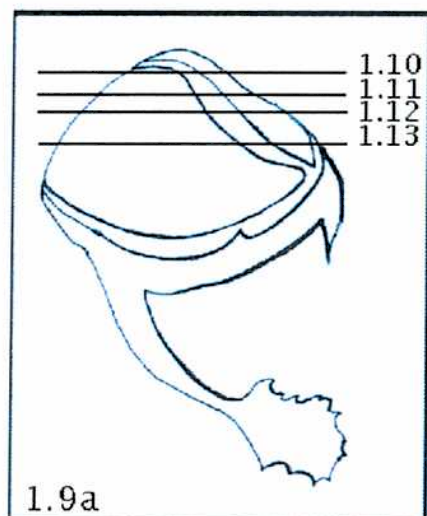


Fig. 1.9 b - Esquema indicando la altura de las secciones histológicas realizadas en la última región del aritenoides y en el cricoides de la laringotráquea.

Fig. 1.14 a 1.17 - Cortes transversales de la laringotráquea. Tricrómico de Masson modificado. 10x

A: aritenoides, C: cricoides, c₁: cámara anterior, c₂: cámara posterior, l: lumen, m₁: membrana primaria, m₂: membrana secundaria, X: proceso X, Y: proceso Y

Cabeza de flecha: varilla cartilaginosa de la membrana secundaria

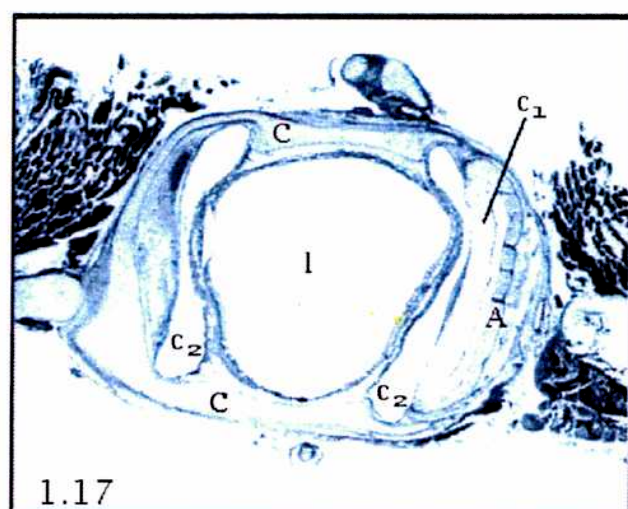
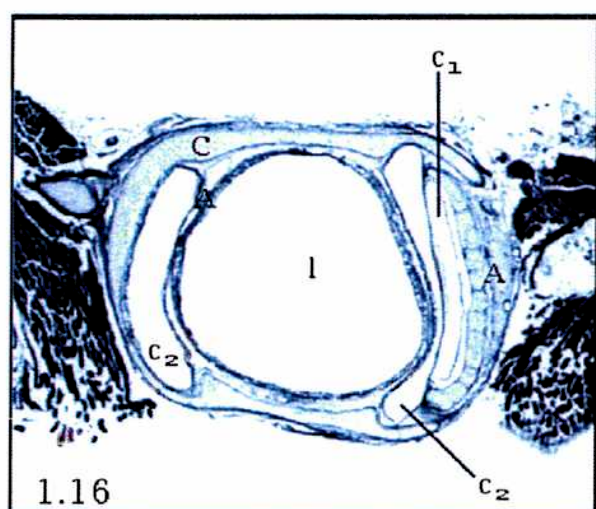
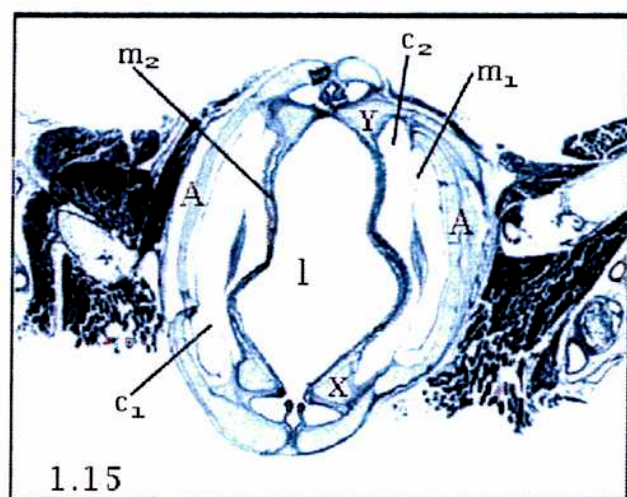
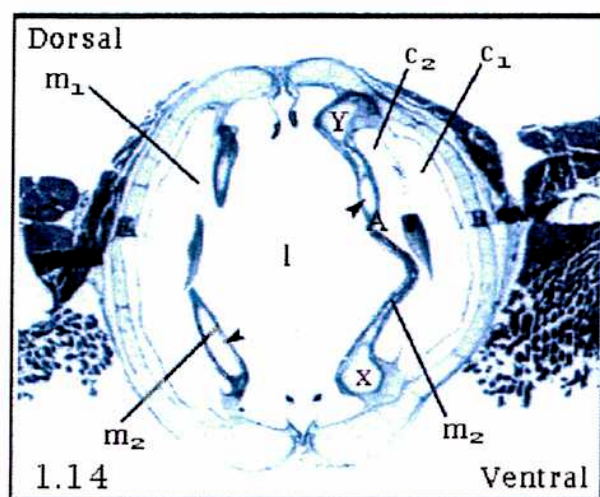
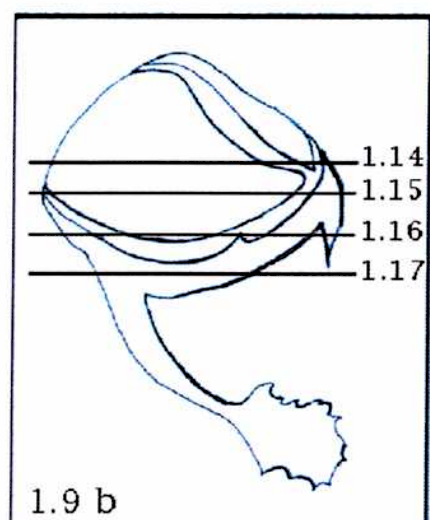


Fig. 1.9 c - Esquema indicando la altura de las secciones histológicas realizadas a nivel del proceso pulmonar

Fig. 1.18 a 1.20 - Cortes transversales. Tricrómico de Masson modificado. 10x

C: cricoides, C_a: cámara , P. pulmón, pp: proceso pulmonar, t: tabique de tejido conectivo

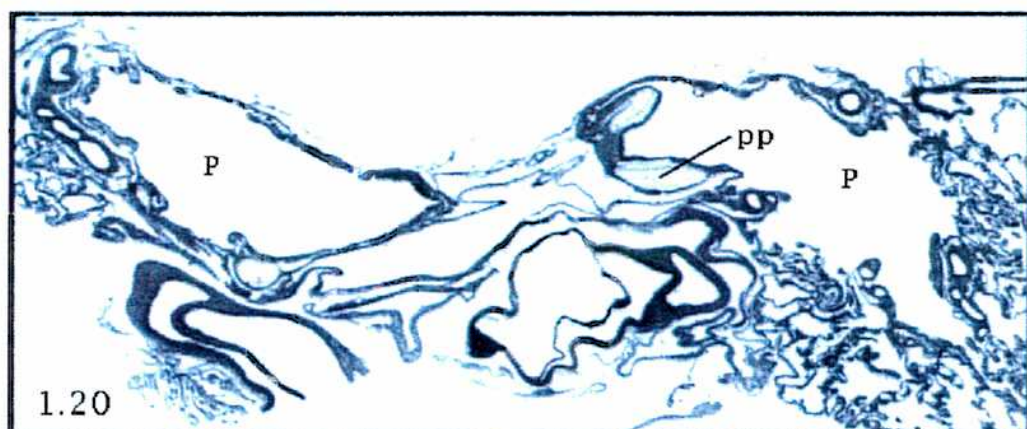
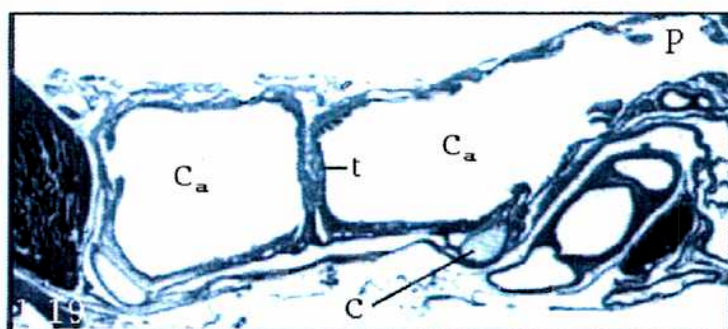
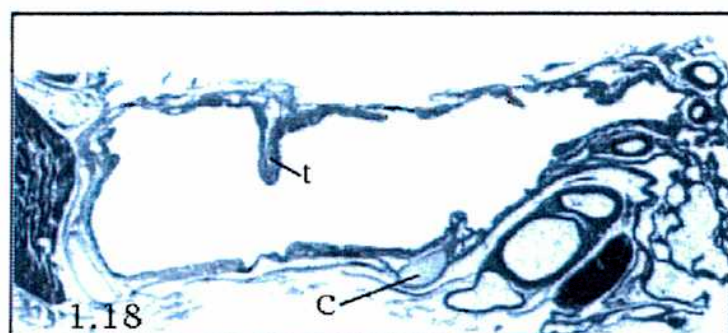
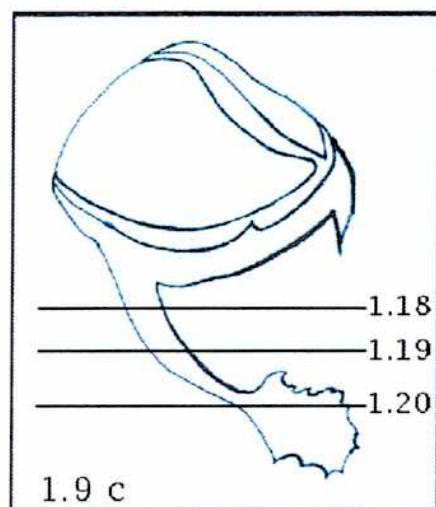


Fig. 1.21 a, b - Aspecto general y detalle del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes de la mucosa faríngea. Tricrómico de Masson modificado. 50x, 400x

Fig. 1.22 a, b - Aspecto general del extremo ántero-dorsal de la cavidad laringotraqueal y detalle del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes. Tricrómico de Masson modificado. 50x, 400x

Fig. 1.22 c,d,e - Detalles de los diferentes epitelios presentes en la zona media en el mismo plano de corte. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.22 c - Mucosa sin pliegues con un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes y tejido conectivo denso

Fig. 1.22 d - Zona de transición entre un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con escasas células caliciformes (cc) a un epitelio biestratificado cúbico

Fig. 1.22 e - Detalle de epitelio biestratificado cúbico

A: aritenoides, l: lumen, tc: tejido conectivo

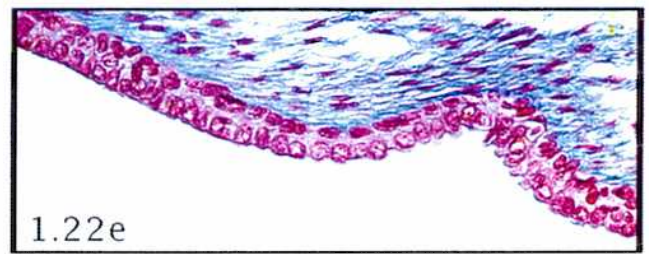
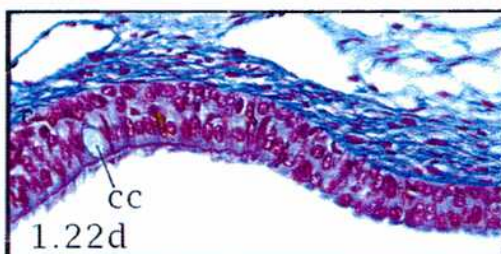
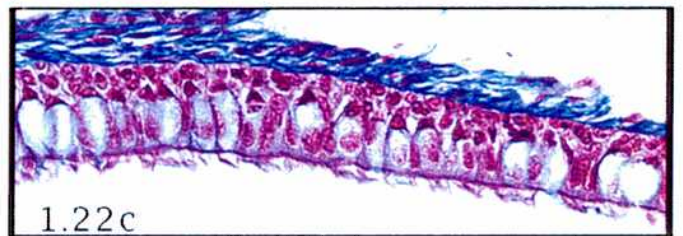
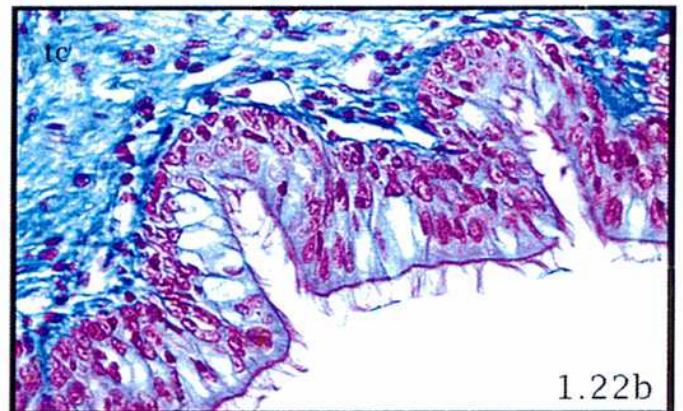
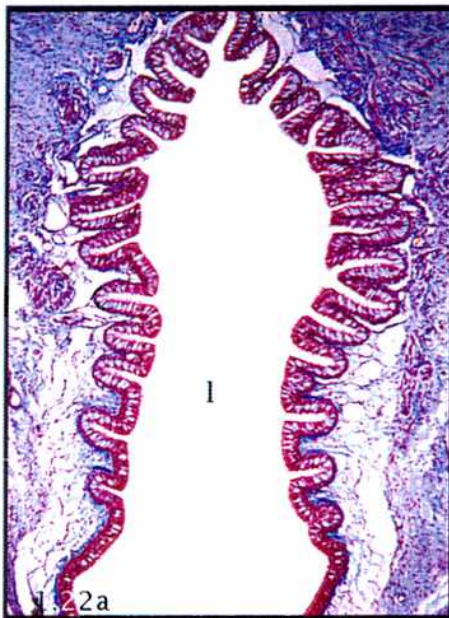
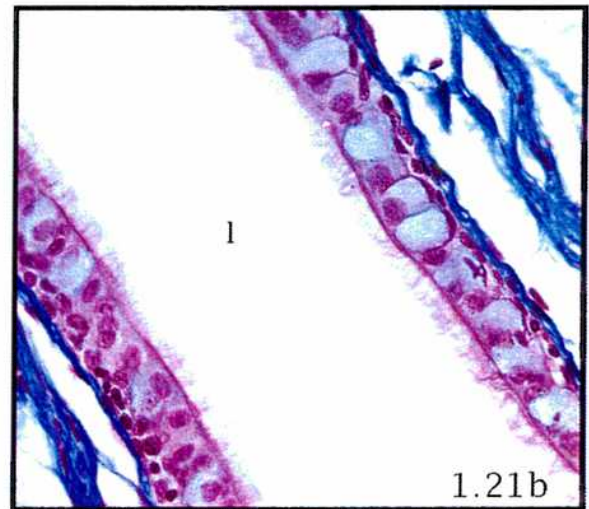
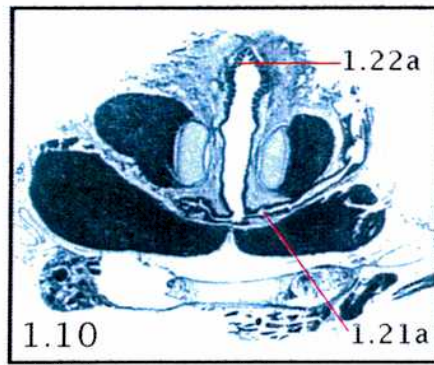


Fig. 1.23 a, b y 1.24 - Detalles de la mucosa en la región media de los cartilagos aritenoideos. Tricrómico de Masson modificado. 400x

c: capilar sanguíneo, cb: célula basal, cc: célula caliciforme, ci: célula ciliada, CM: célula con morfología diferente, cs: célula secretora, l: lumen, li: linfocitos, tc: tejido conectivo

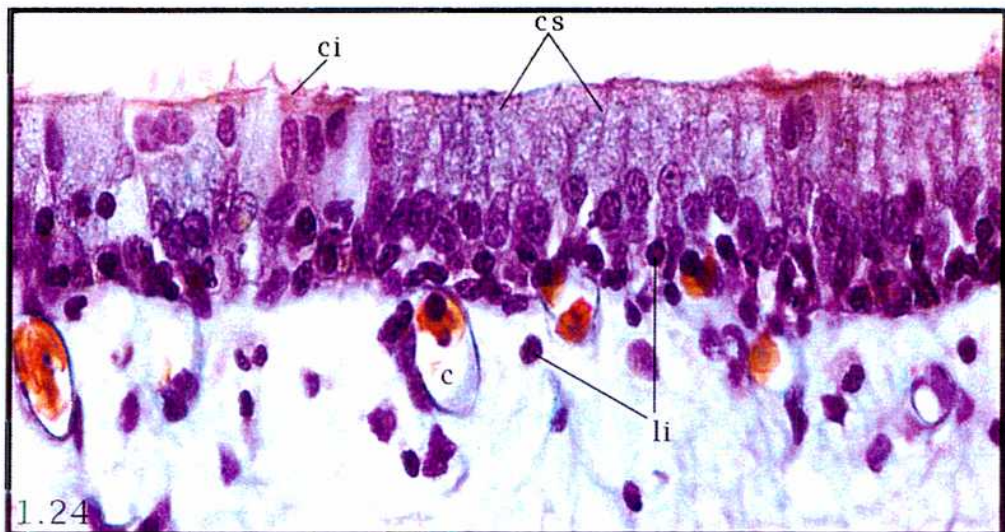
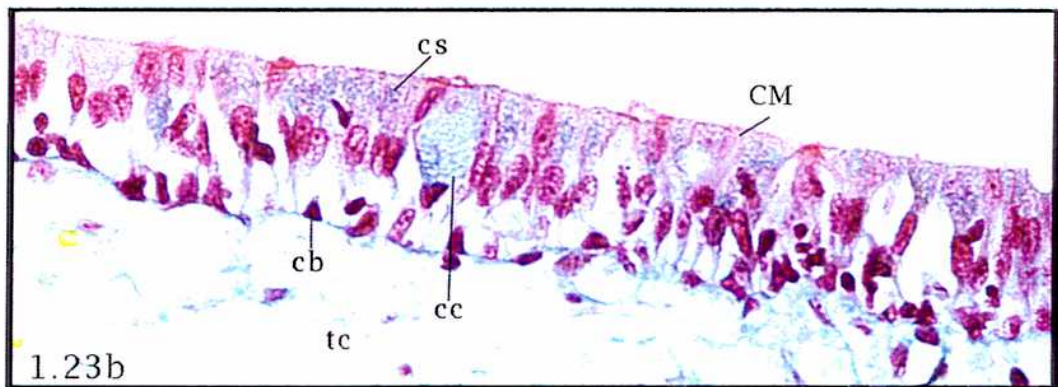
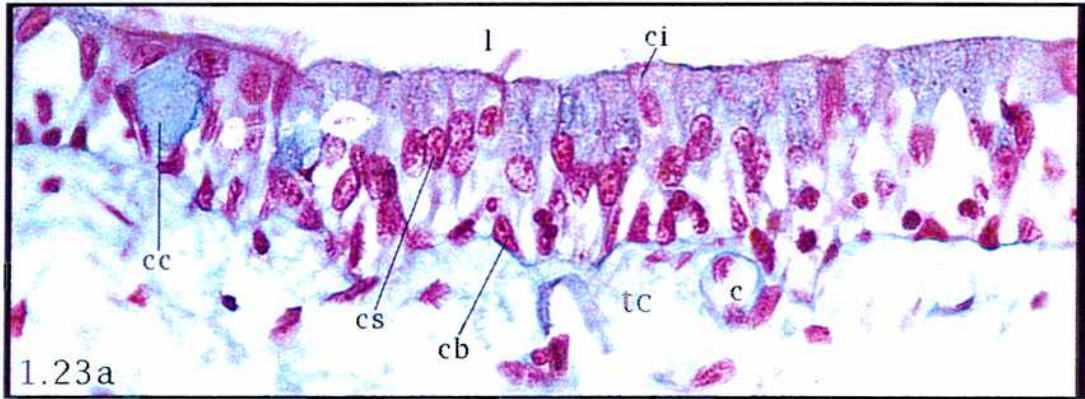
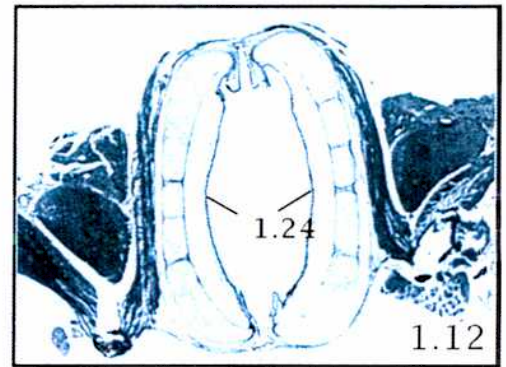
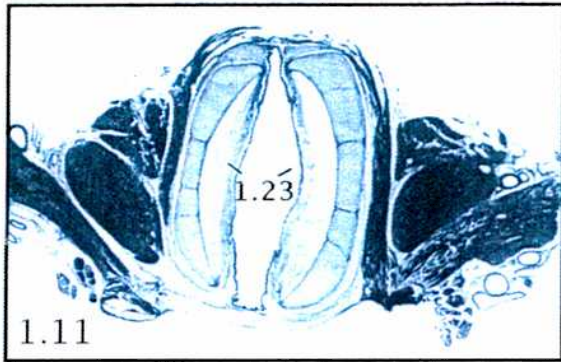


Fig. 1.25 - Zona de inserción de la cuerda vocal. Tricrómico de Masson modificado. 50x

c₁: cámara anterior. Cabeza de flecha: epitelio simple cúbico. Nótese el tejido conectivo denso en esa región.

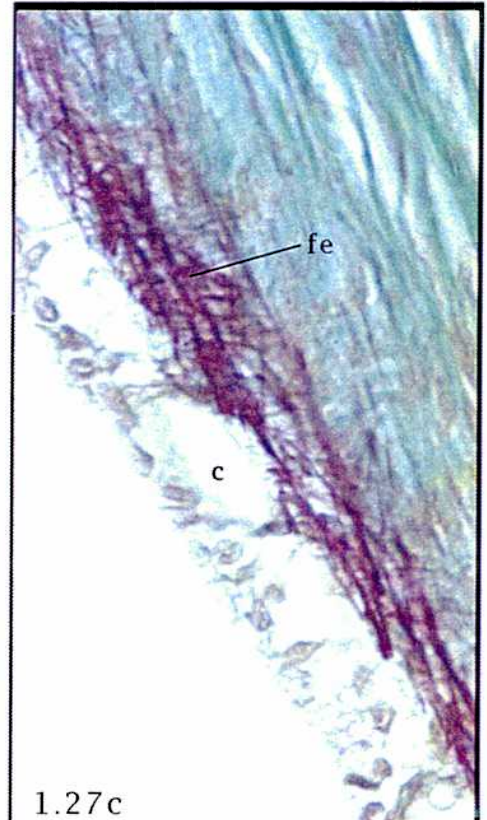
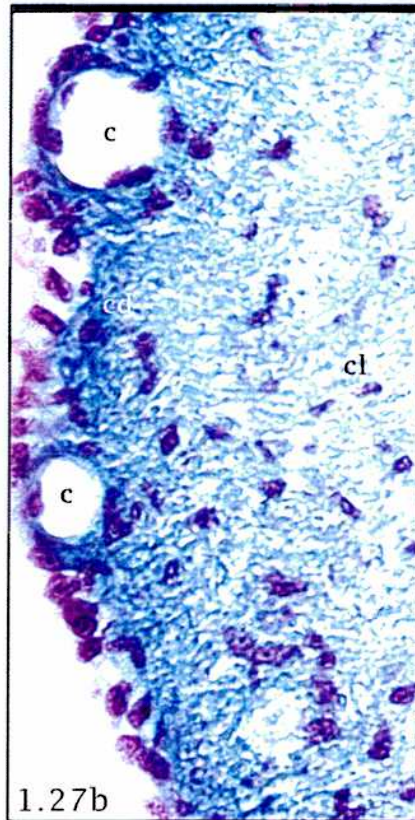
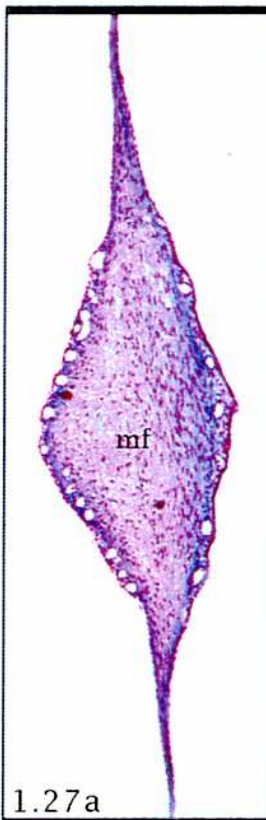
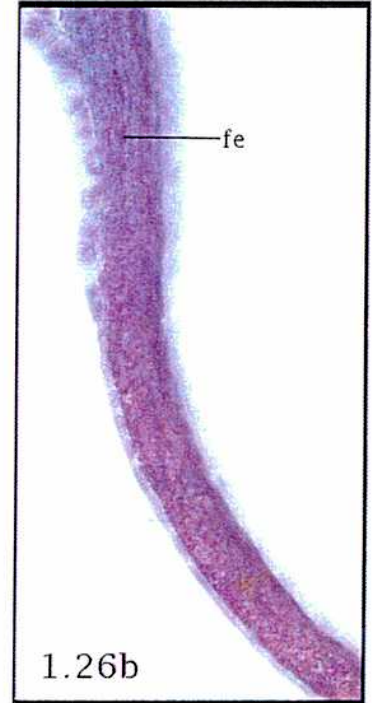
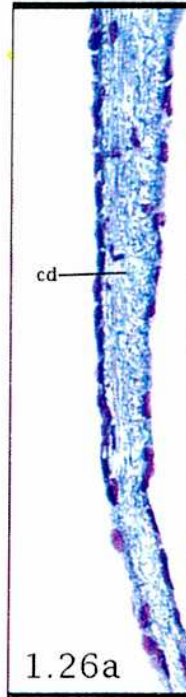
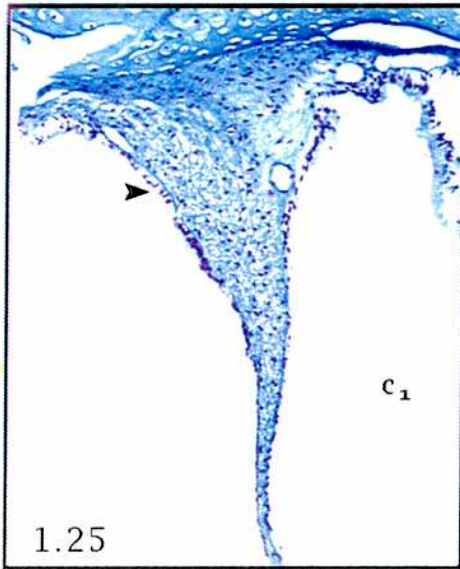
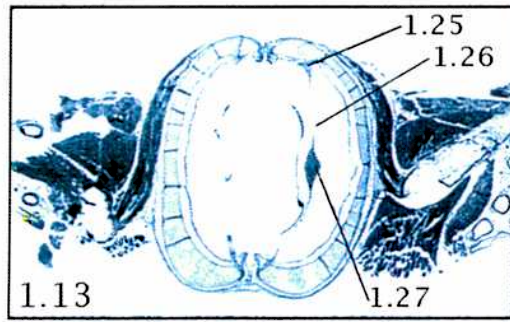
Fig. 1.26 a,b - Detalle de la cuerda vocal revestida por un epitelio simple plano. a) Tricrómico de Masson modificado, b) Técnica de Fränkel. 400x

cd: tejido conectivo denso, fe: fibras elásticas

Fig. 1.27 a - Masa fibrosa de la membrana primaria. Tricrómico de Masson modificado. 50X

Fig. 1.27 b, c - Detalle del epitelio simple cúbico que reviste la masa fibrosa así como las fibras elásticas presentes en el tejido conectivo. a) Tricrómico de Masson, b) Técnica de Fränkel. 400x

c: capilar, cd: tejido conectivo denso, cl: tejido conectivo laxo, fe: fibras elásticas



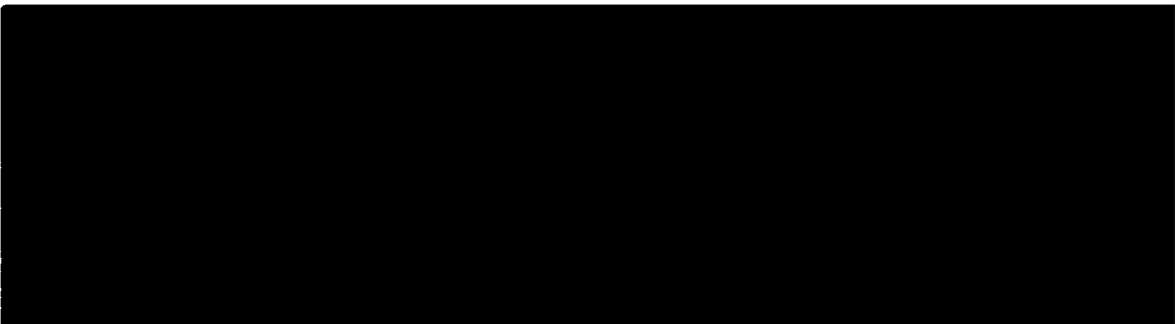
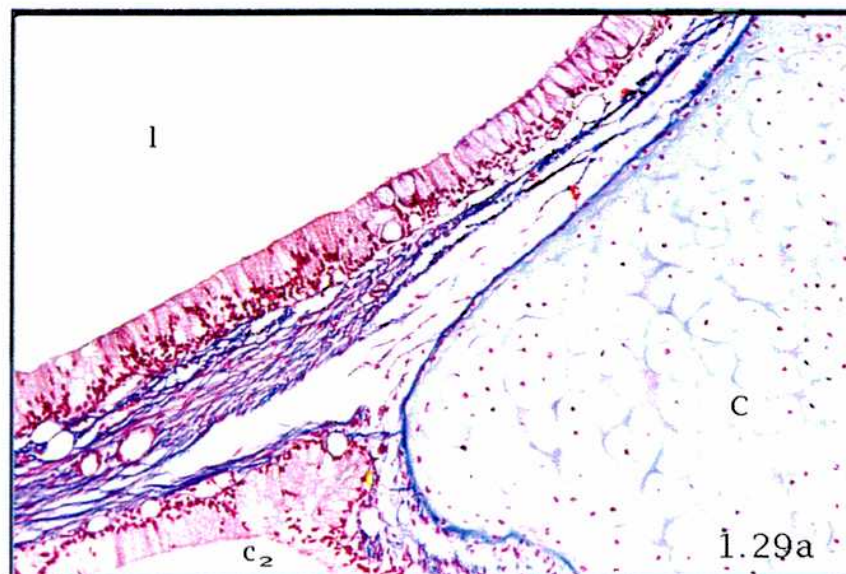
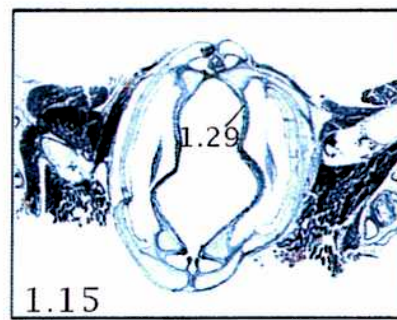
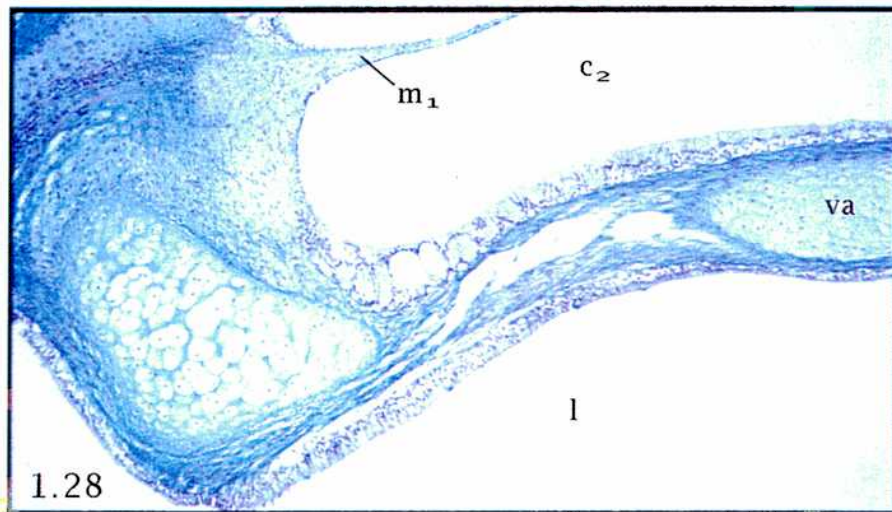
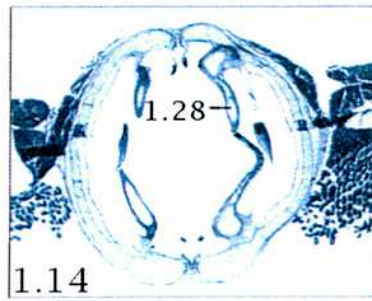


Fig. 1.28, 1.29 a - Zona de inserción de la membrana secundaria a la altura de los procesos X e Y del cartilago cricoides. Tricrómico de Masson modificado. 100x

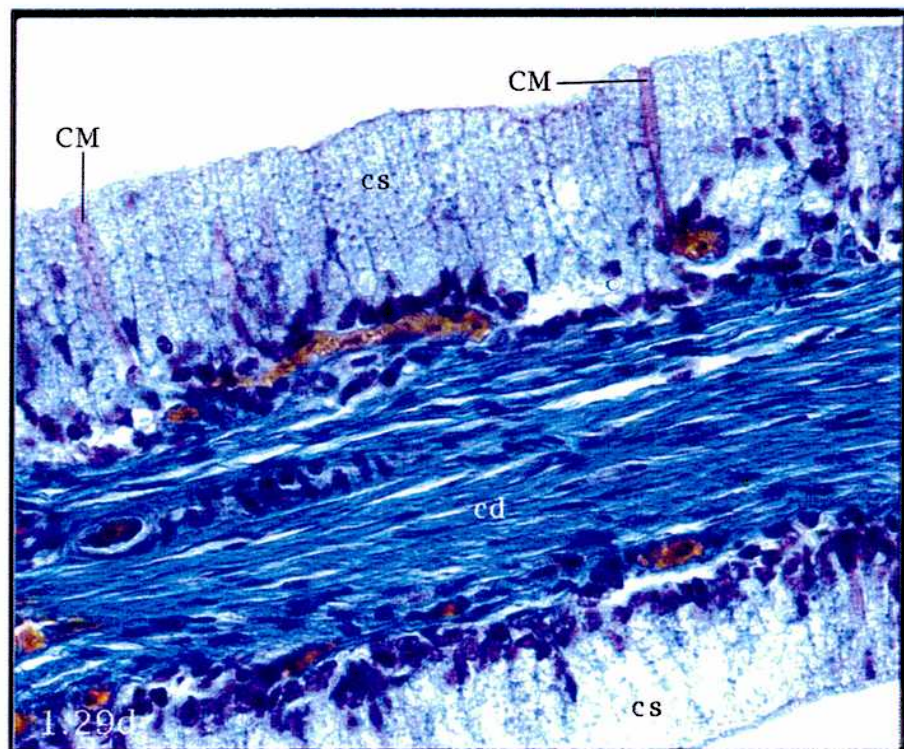
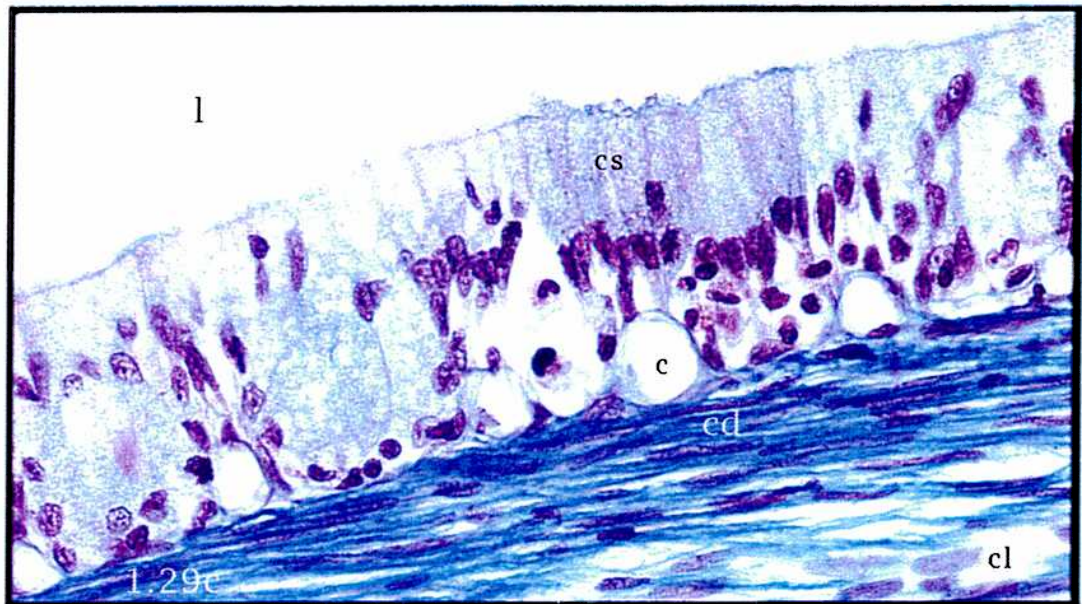
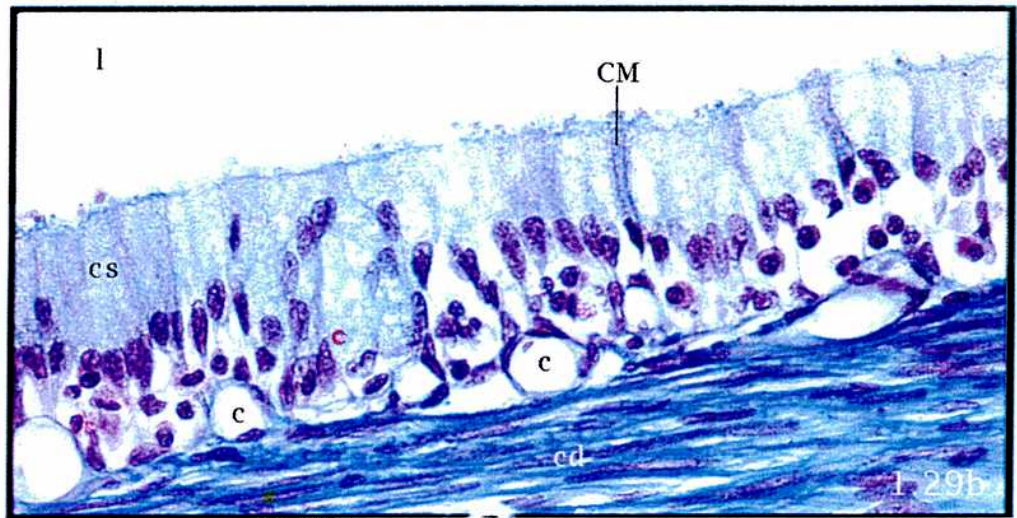
C: cricoides, c₂: cámara posterior, l: lumen, m₁: membrana primaria, va: varilla de cartilago hialino



**Fig. 1.29 b, c, d Detalle del epitelio de revestimiento de la membrana secundaria.
Tricrómico de Masson modificado. 400x**

cd: tejido conectivo denso, cl: tejido conectivo laxo, cs: célula secretora, CM: célula con características morfológicas diferentes al resto, l: lumen.

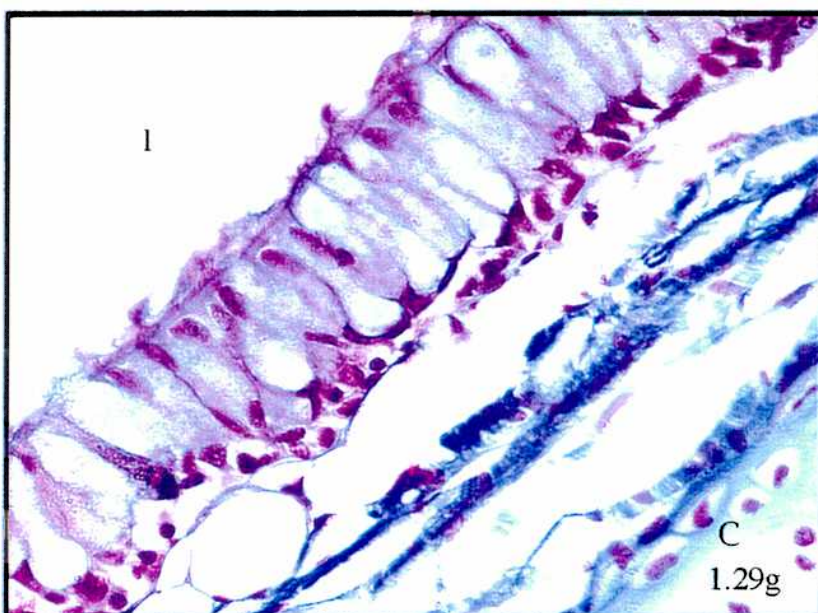
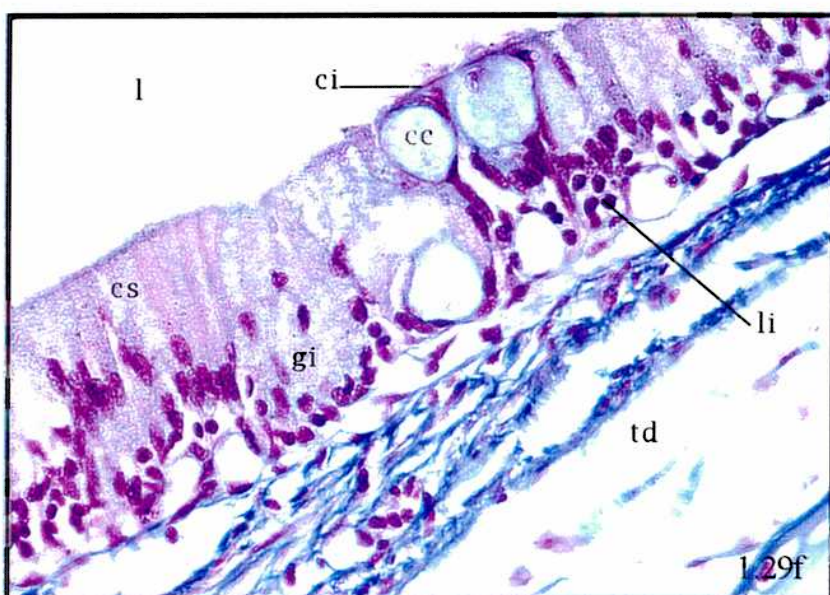
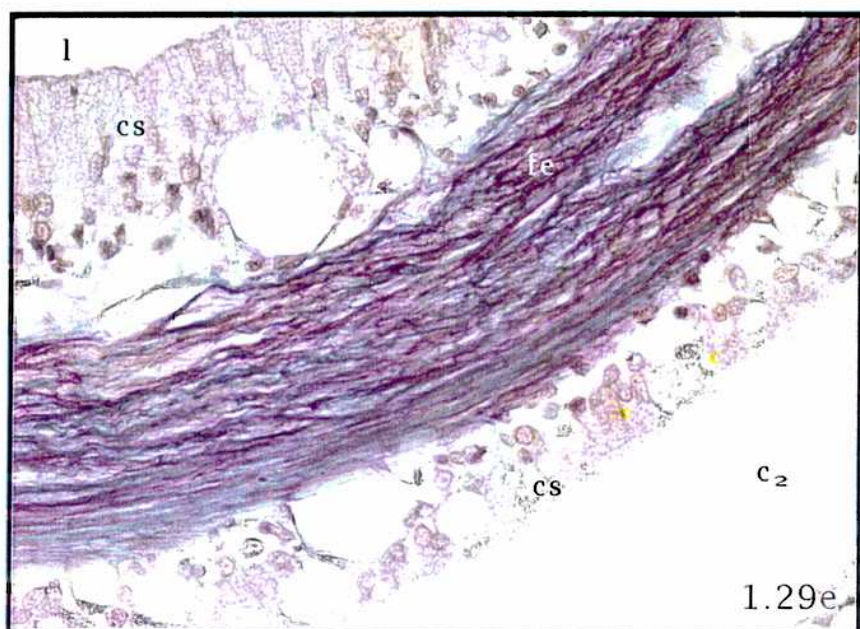
Nótese la proximidad de los capilares (c) al epitelio así como la infiltración de elementos sanguíneos.



**Fig. 1.29 e – Detalle del epitelio de revestimiento de la membrana secundaria.
Técnica de Fränkel. 400x**

**Fig. 1.29 f, g – Detalle del epitelio de revestimiento del cricoides. Tricrómico de
Masson modificado. 400x**

C: cricoides cc: célula caliciforme, cs: célula secretora, c₂: cámara secundaria, fe: fibras
elásticas, gi: glándula intrapeitelial, l: lumen, li: linfocitos, td: tejido conectivo denso



**Fig. 1.30 a – Aspecto general del tabique (t) delimitando dos cámaras (c_a).
Tricrómico de Masson modificado. 50x**

**Fig. 1.30 b, c – Detalle de la mucosa que reviste parte de las cámaras. a)
Tricrómico de Masson modificado, b) Técnica de Fränkel. 400x**

c: capilar, fe: fibras elásticas, fm: fibras musculares lisas, tc: tejido conectivo

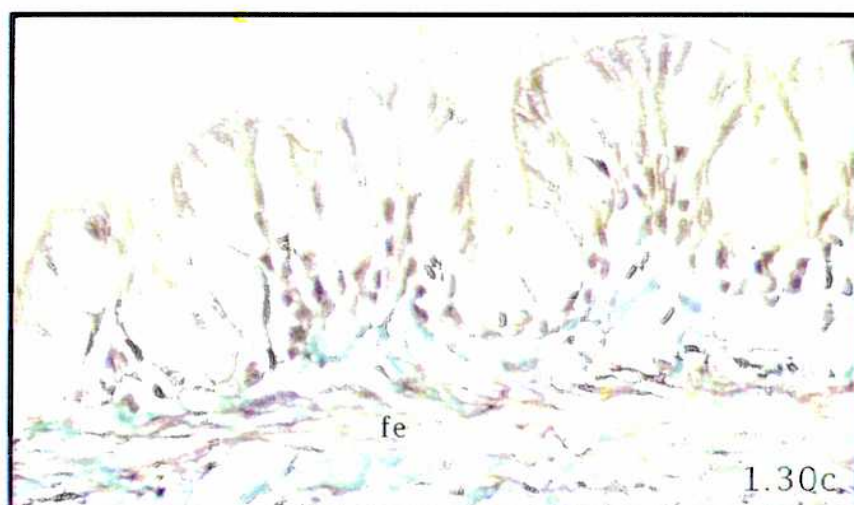
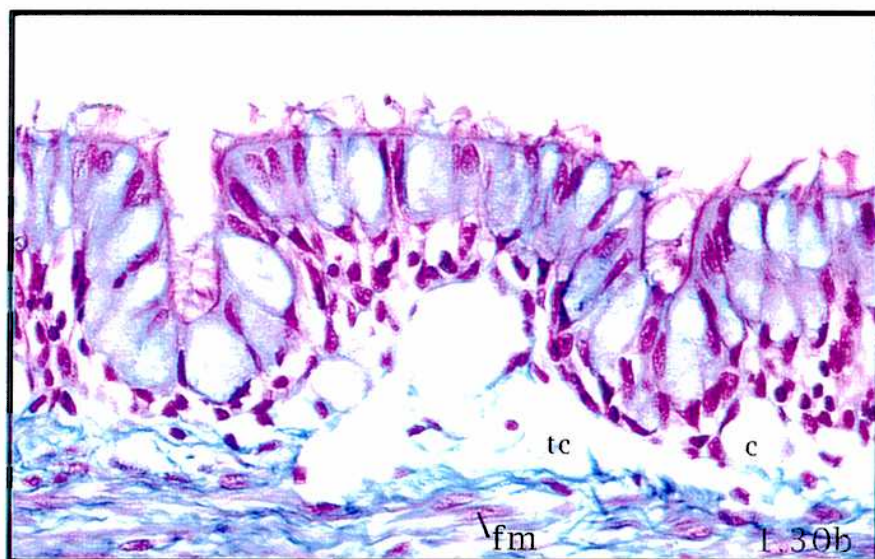
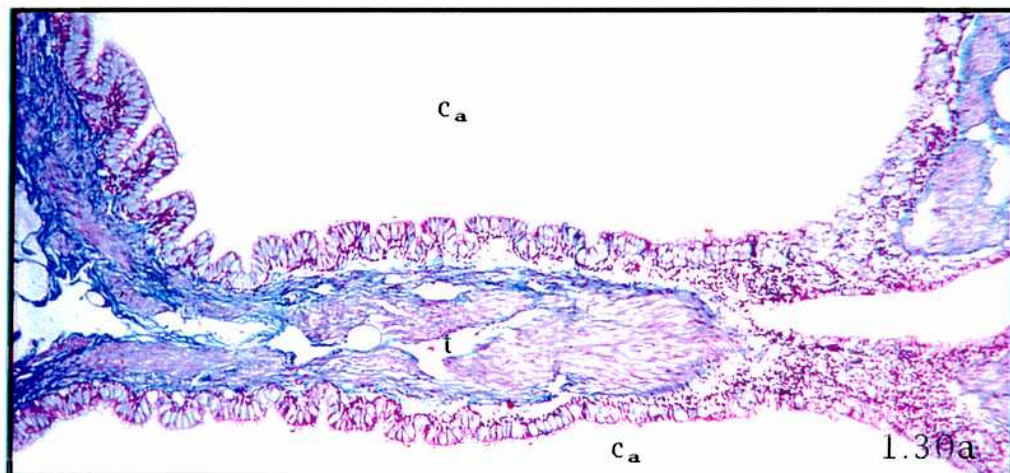
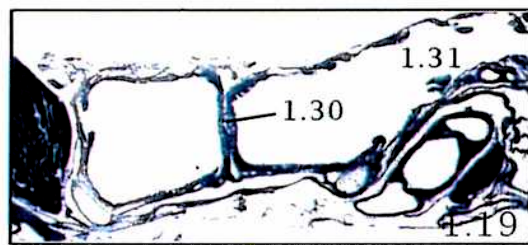


Fig. 1.31 a – Zona de transición entre un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (cabeza de flecha negra) y un epitelio simple cúbico ciliado (cabeza de flecha verde). Tricrómico de Masson modificado. 100x

Fig. 1.31 b. c – Detalle de epitelio simple cúbico ciliado (cabeza de flecha verde). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Nótese en el tejido conectivo los capilares sanguíneos (c) próximos al epitelio y la presencia de fibras musculares lisas (fm).

Fig. 1.31 d – Detalle de epitelio respiratorio. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Nótese la presencia de un pequeño rodete muscular (fm) revestido por neumocitos (ne) que cubren a los capilares sanguíneos (c).

l: lumen, tc: tejido conectivo

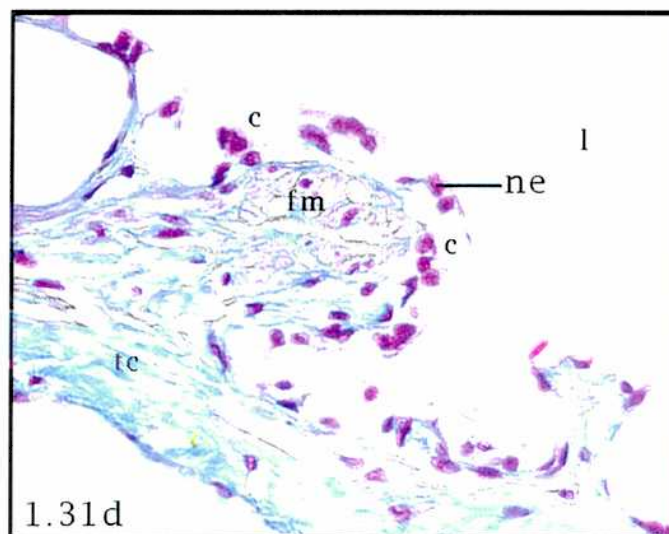
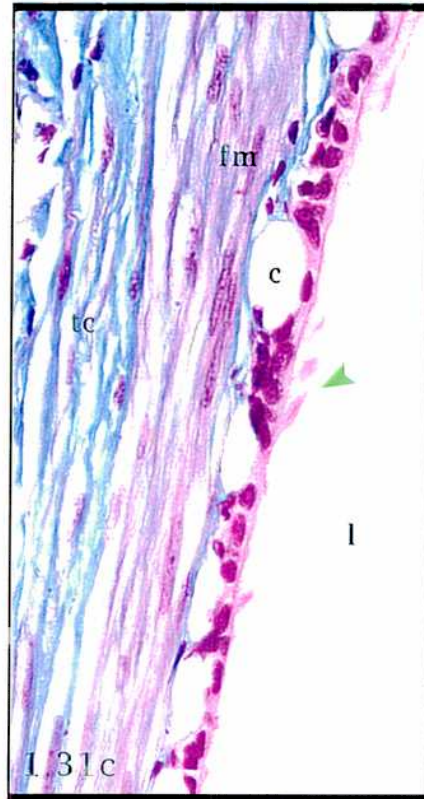
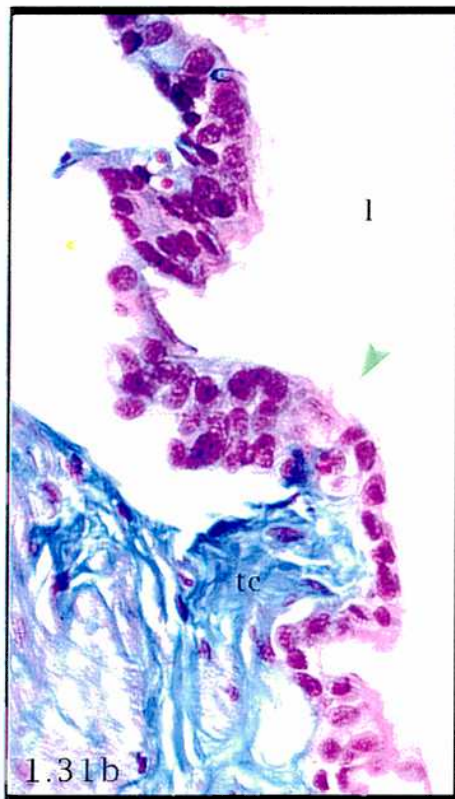
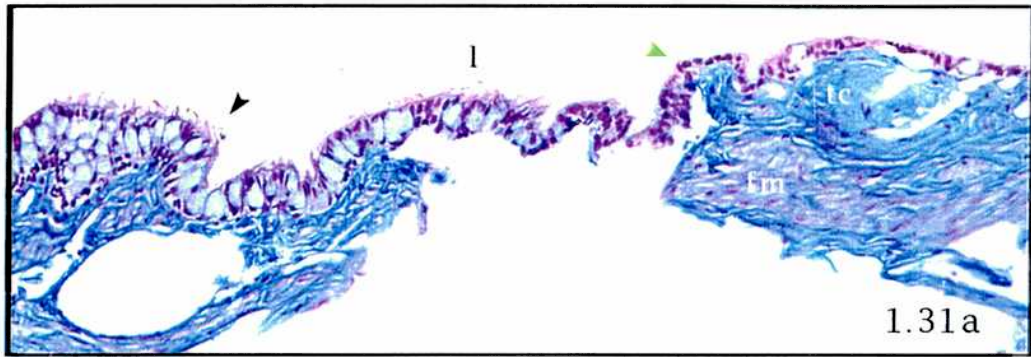


Fig. 1.32 a, b – Epitelio de revestimiento del cricoides indicando con flechas las células con morfología diferente. a) Tricrómico de Masson modificado. b) Técnica inmunohistoquímica con PGP 9.5. 100x

Fig. 1.32 c- Detalle del epitelio de revestimiento. Cabeza de flecha: células con morfología diferente. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Observése la glándula intraepitelial situada entre las células secretoras.

Fig. 1.32 d, e – Detalle de las células con morfología diferente (flechas). Técnica inmunohistoquímica. 400x

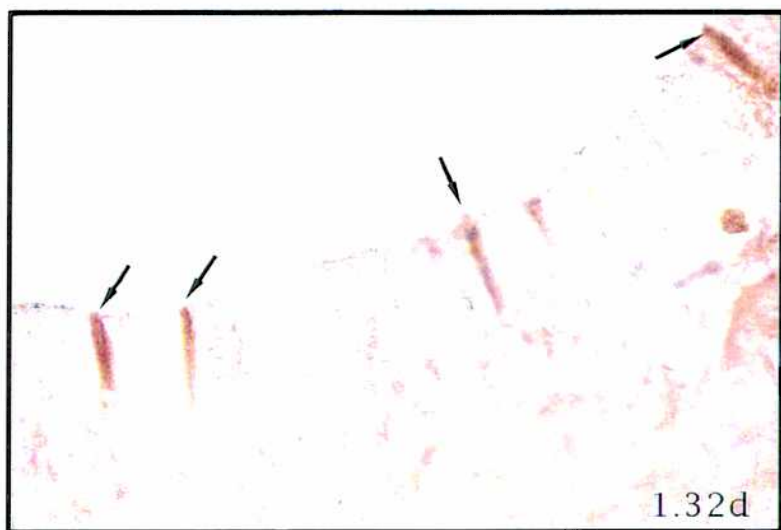
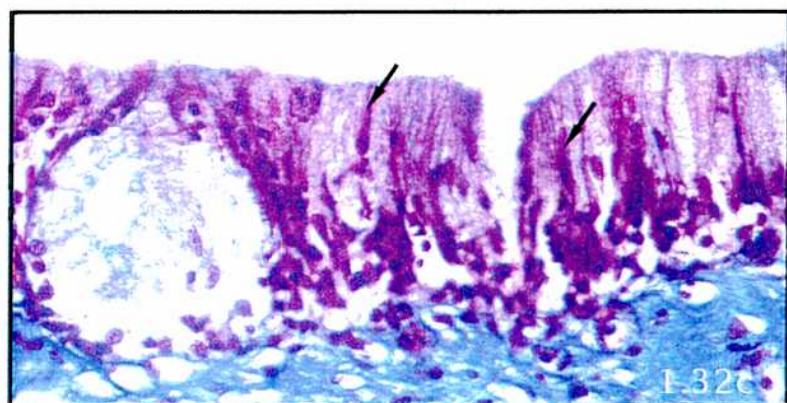
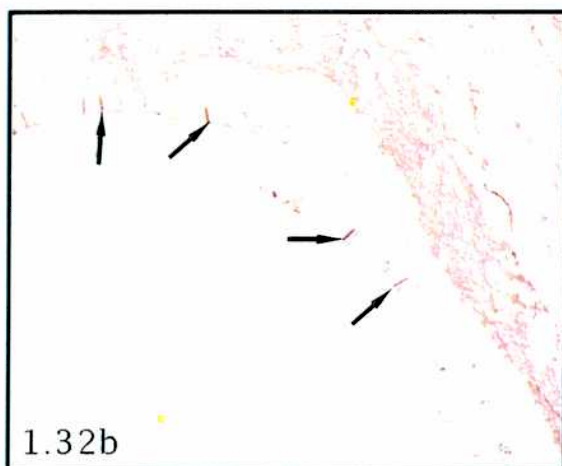
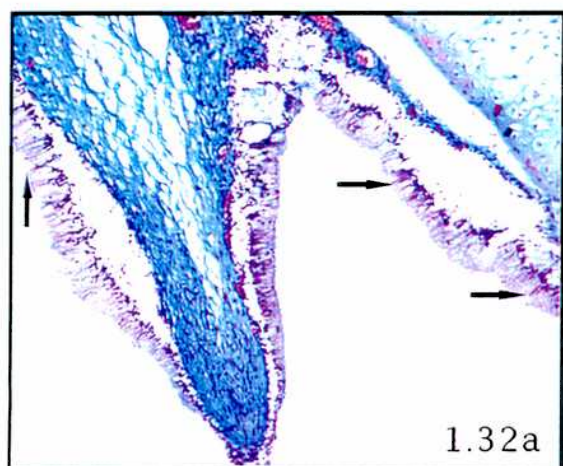


Fig. 1.33 a, b – Detalle del extremo ántero-dorsal de la laringotraquea. a) Técnica de APS. 100x, b) Técnica de AB pH 2,5. 50x

Nótese la coloración de las células caliciformes

Fig. 1.33 c – Detalle del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes. Técnica de AB/AY. 400x

Fig. 1.34 – Zona de transición entre un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con abundantes células caliciformes a un epitelio pseudoestratificado con escasas células caliciformes. Técnica de APS. 100x

Nótese como disminuye en forma abrupta la cantidad de células caliciformes del epitelio.

Fig. 1.35 a, b – Detalle de la mucosa faríngea y de la mucosa que reviste la cavidad laringotraqueal. a) Técnica de APS, b) Técnica de AB pH 2.5. 100x

l: lumen

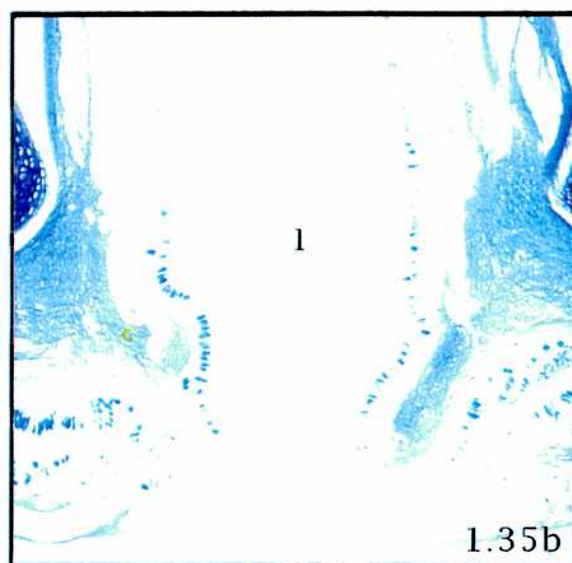
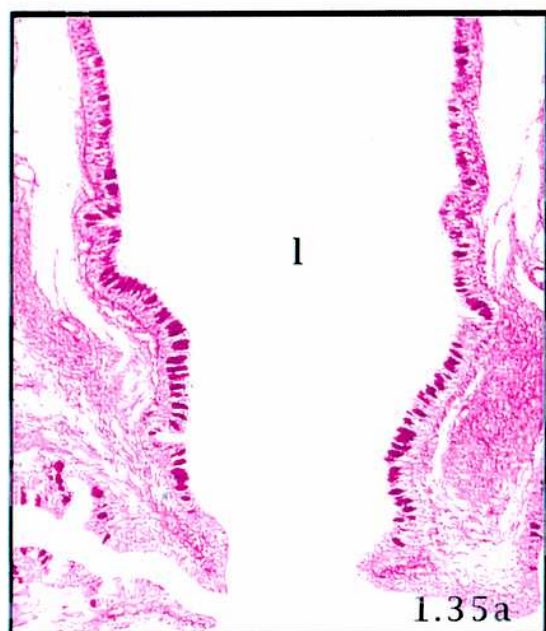
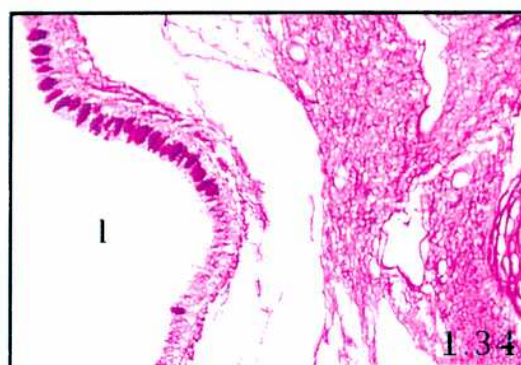


Fig. 1. 36, 1.37, 1.38 - Detalle del epitelio secretor a la altura de los aritenoides con diferentes técnicas histoquímicas. 400x

Nótese la presencia de células mucosas entre las células secretoras

Fig. 1.36 – Técnica de APS.

Fig. 1.37 – Técnica de AB pH 2,5.

Fig. 1.38 – Técnica de AB pH 0,5

Nótese en el interior de las células mucosa la presencia de un delicado puntillado alcianófilo.

Fig. 1.39 – Técnica de AB/AY

l: lumen

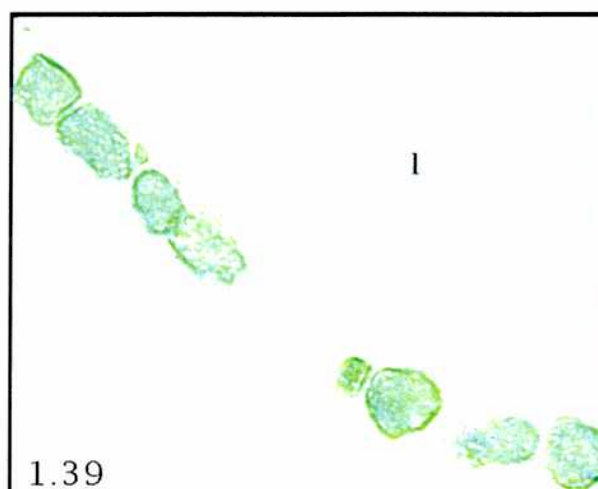
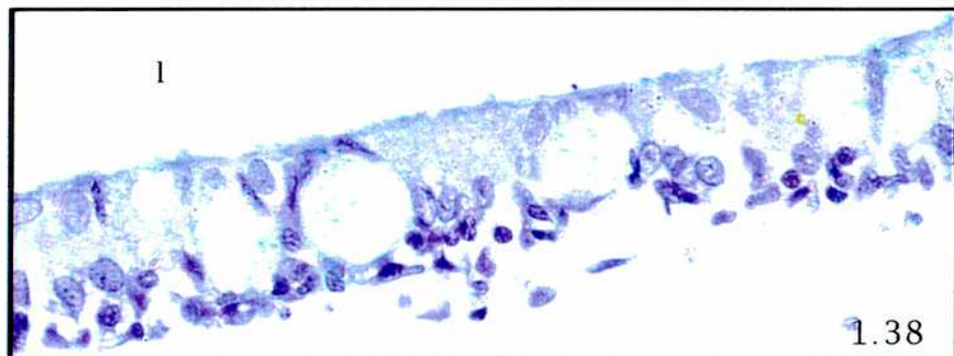
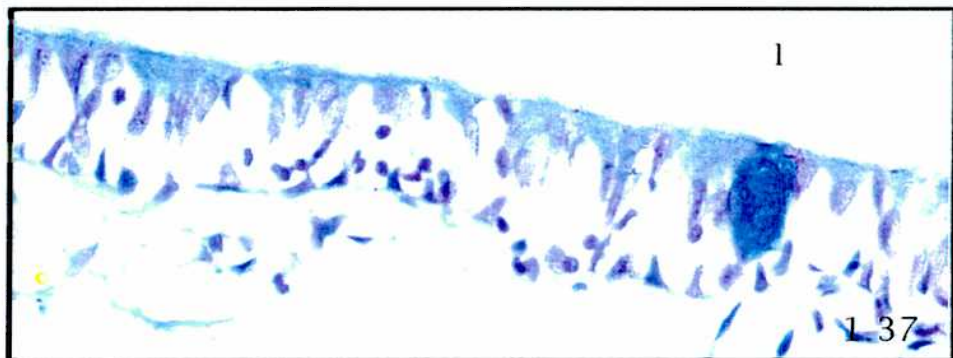
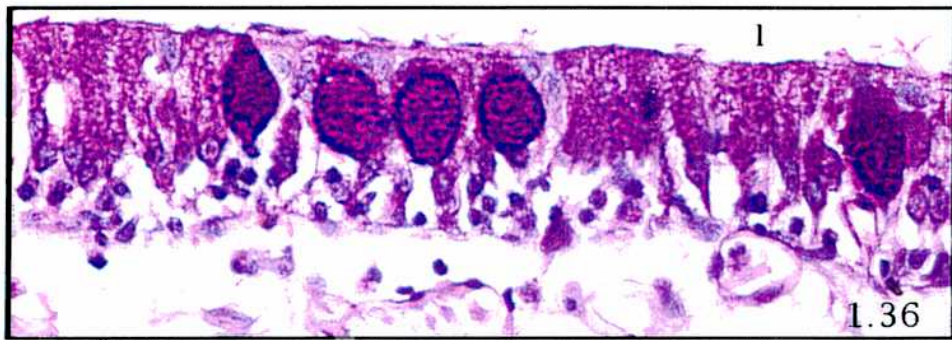


Fig. 1.40 – Detalle de la región engrosada (mf) de la cuerda vocal. Técnica de AB pH 2,5. 100x

Fig. 1.41 – Región de inserción de la membrana secundaria. Técnica de AB/AY. 100x

Nótese la presencia en el epitelio de células mucosas con distintas coloración: verdes y amarillas

Fig. 1.42 a, b - Detalle del epitelio de revestimiento del cricoides. a) Técnica de AB/AY, b) Técnica de AB pH 0,5. 400x

Fig. 1.43 a, b - Detalle del epitelio de revestimiento del cricoides. Técnica de AY. 400x

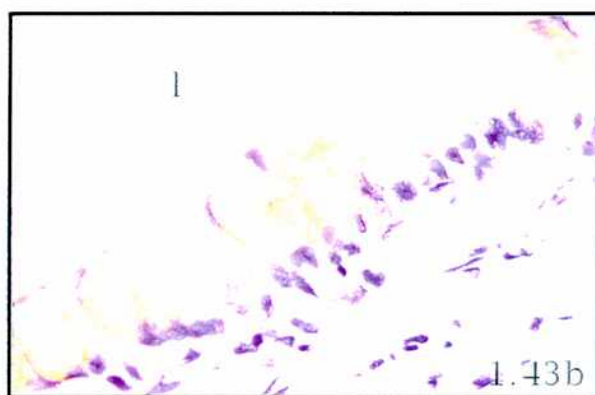
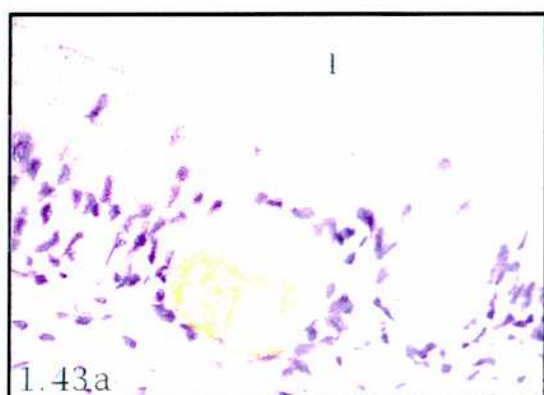
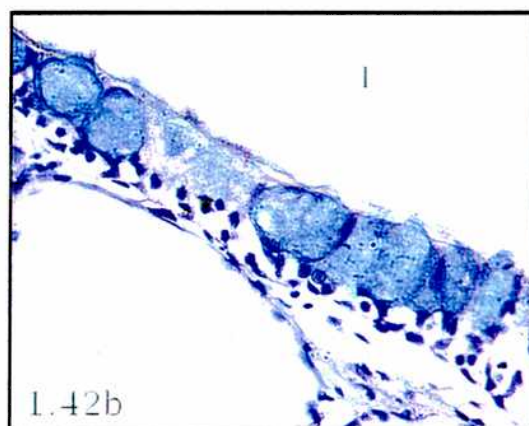
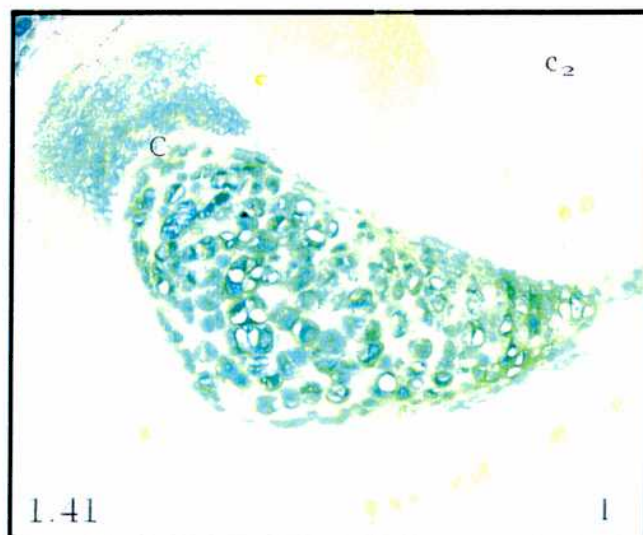
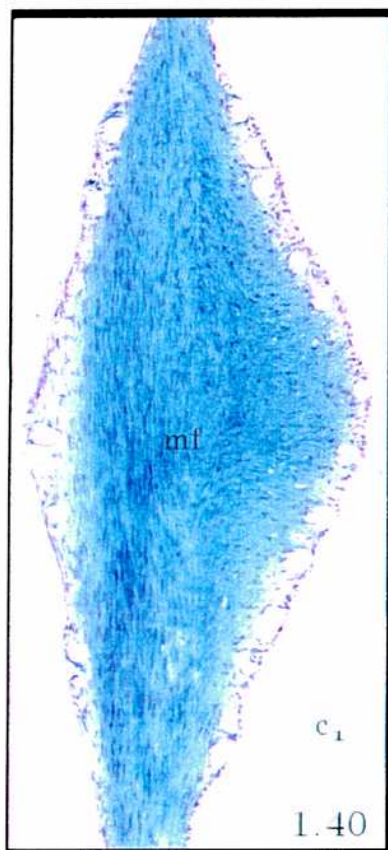


Fig. 1.44 a, b, c, d, e, f – Detalle del epitelio que reviste el tabique que delimita las cámaras en la última porción de la laringotráquea. 400x

Fig. 1.44 a – Técnica de APS

Fig. 1.44 b – Técnica de AB pH 2,5

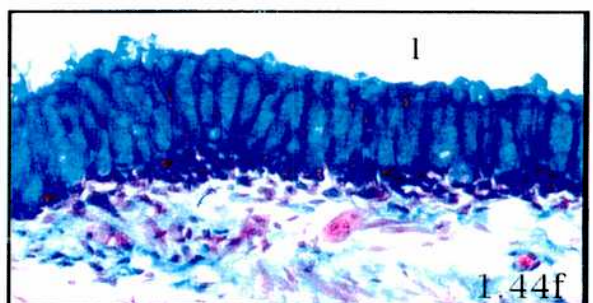
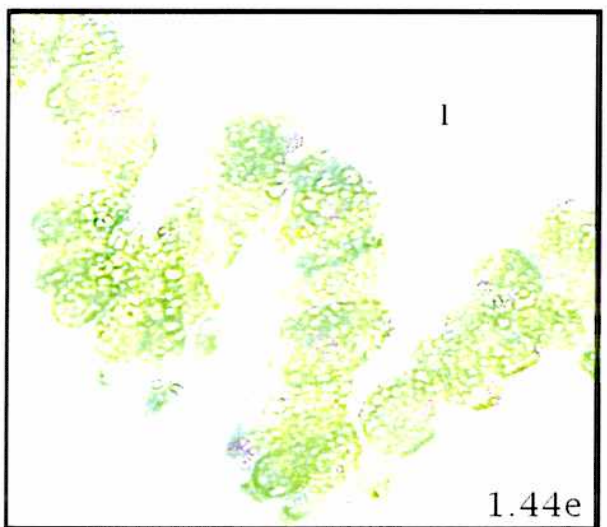
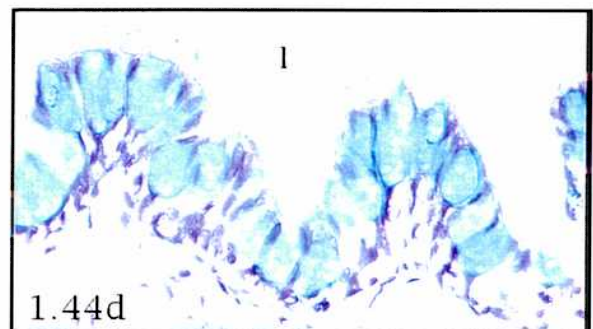
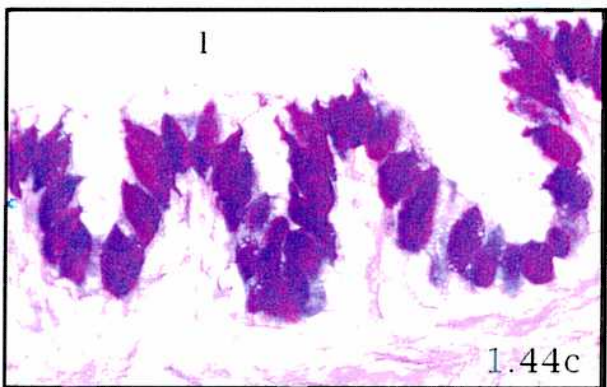
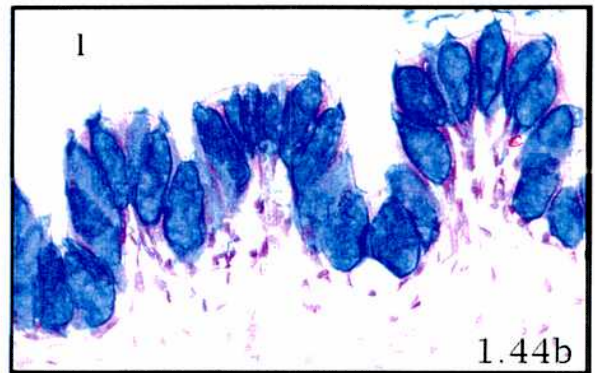
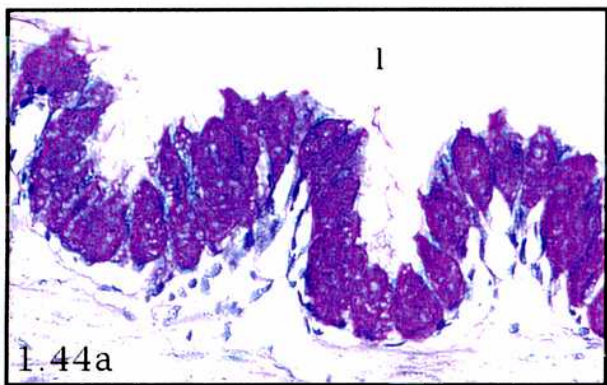
Fig. 1,44 c – Técnica de Mowry

Fig. 1.44 d – Técnica de AB pH 0,5

Fig. 1.44 e – Técnica de AB/AY

Fig. 1.44 f – Técnica de Hale

l: lumen





1.2.2 Microscopía electrónica de barrido (M.E.B.)

Las observaciones realizadas con MEB permiten diferenciar la cámara anterior y una posterior así como la membrana primaria que constituye la cuerda vocal (Fig. 1.45, 1.46 a, b).

La superficie interna de la laringotráquea de *Bufo arenarum* muestra una gran diversidad celular.

El epitelio que reviste el borde ántero-dorsal, romo, del cartílago aritenoides está tapizado por células ciliadas (Fig 1.47). Hacia el borde inferior de dicho cartílago, como se indica en la Fig. 1.48, se observa que las células ciliadas se continúan con células poligonales con límites celulares bien definidos, y con una superficie cubierta por microcrestas. Entre estas células aisladas aparecen células con cilios y cortas microvellosidades (Fig. 1.49 a, b).

En la cara interna del cartílago aritenoides se aprecian células poligonales entre los parches de células ciliadas. A mayor aumento, aquellas células se caracterizan por la presencia sobre su superficie apical de microvellosidades cortas y romas así como de pequeños orificios de distinto diámetro (Fig. 1.50 a, b). Sobre la misma cara interna, en dirección al borde libre de la cuerda vocal, aumenta la cantidad de células ciliadas. Estas células se ubican delimitando áreas de células poligonales con las mismas características que las descritas anteriormente (Fig. 1.51 a, b). En el epitelio de la cámara anterior que reviste el aritenoides, se observa solamente células poligonales cubiertas con microvellosidades cortas y romas pero con un mayor número de orificios sobre su superficie en comparación con las descritas más arriba, lo que le da a las mismas un aspecto cribado (Fig. 1.52 a, b).

La membrana que constituye junto con la cara interna del aritenoides, la cámara anterior, da forma a la cuerda vocal. Esta se pliega hacia el lumen de la laringotráquea manteniendo un borde libre



y los extremos ensanchados fijos a los extremos dorsal y ventral de cada aritenoides (Fig 1.46 a). Los extremos presentan pequeños acúmulos de células ciliadas situadas de forma espaciada entre el tipo celular predominante que son las células poligonales, las cuales se observan en el resto de la membrana (Fig. 1.53 a, b).

La membrana secundaria que delimita la cámara posterior, está revestida superficialmente por el mismo tipo de células de aspecto cribado descritas anteriormente (Fig. 1.54 a, b).

La parte posterior de la cavidad laringotraqueal, ya próximo a los pulmones, está revestida casi en su totalidad por células ciliadas, células caliciformes y pequeños parches de células poliédricas cribadas (Fig. 1.55).

Fig. 1.45 a – Aspecto general de una hemi-laringotráquea con microscopía electrónica de barrido (MEB). 12x

Fig. 1.46 a – Detalle de la entrada a la cámara anterior (c_1). MEB. 20x

Fig. 1.46 b – Detalle de la entrada a la cámara posterior (c_2). MEB. 20x

A: aritenoides, c_1 : cámara anterior, c_2 : cámara posterior, cv: cuerda vocal, mf: masa fibrosa, m_1 : membrana primaria, m_2 : membrana secundaria.

Flecha azul: entrada a la cámara primaria, flecha roja: entrada a la cámara secundaria

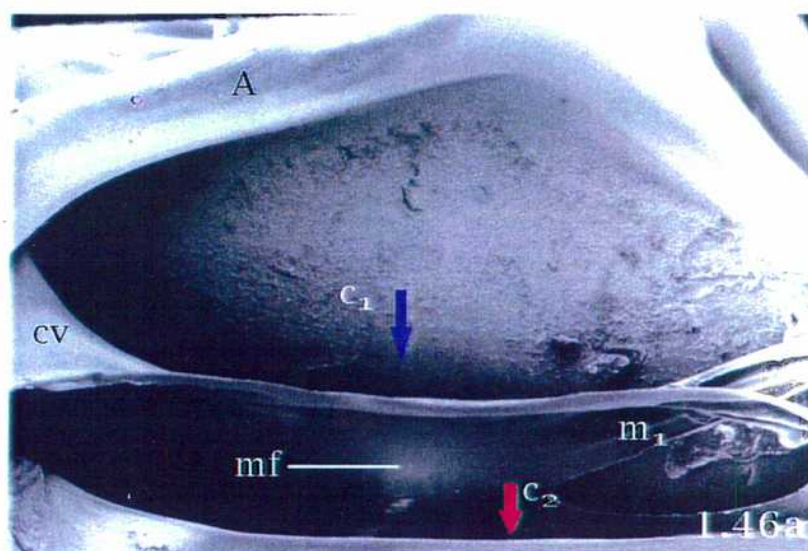
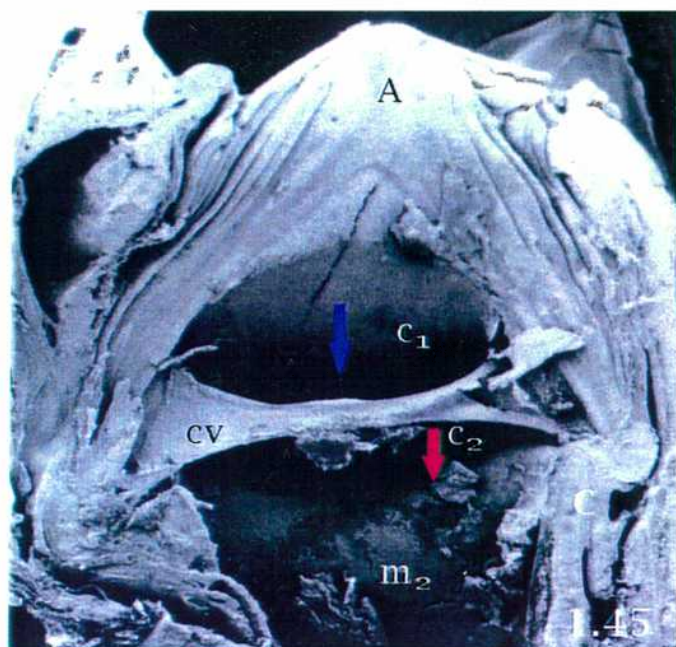


Fig. 1.47 - Detalle de las células ciliadas de la mucosa faríngea. MEB. 500x

ci: cilias

Fig. 1.48 - Detalle de aritenoides y cámara anterior para indicar la zona de donde provienen los detalles de las próximas figuras. MEB. 20x

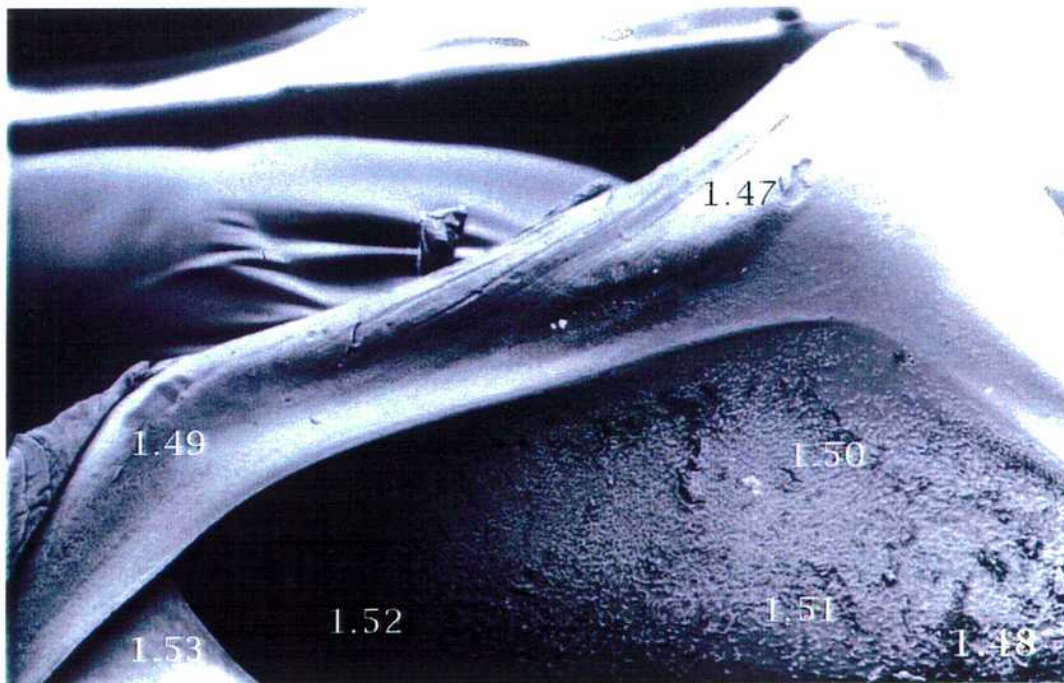
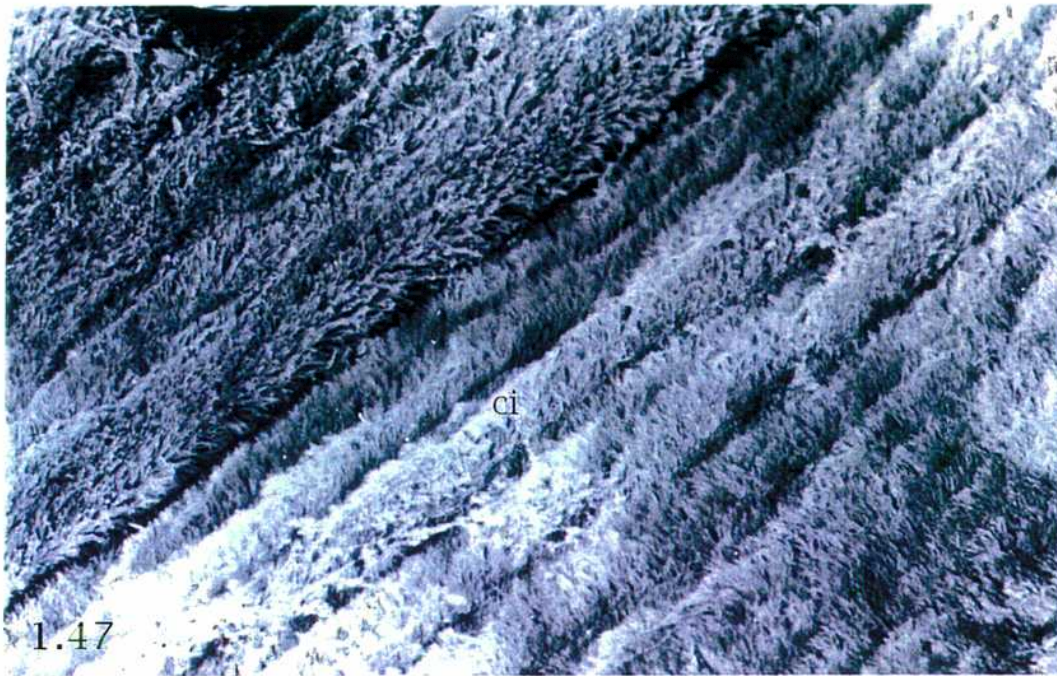
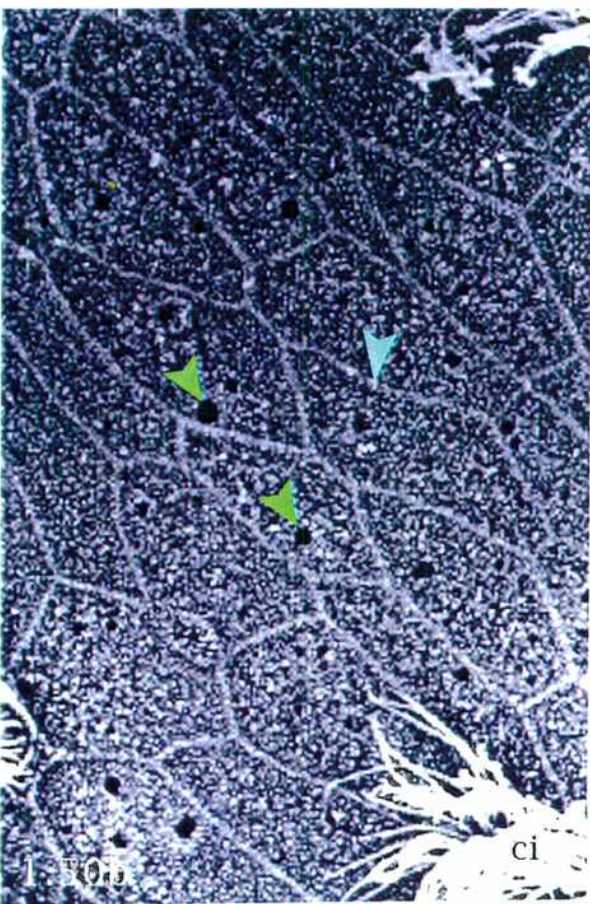
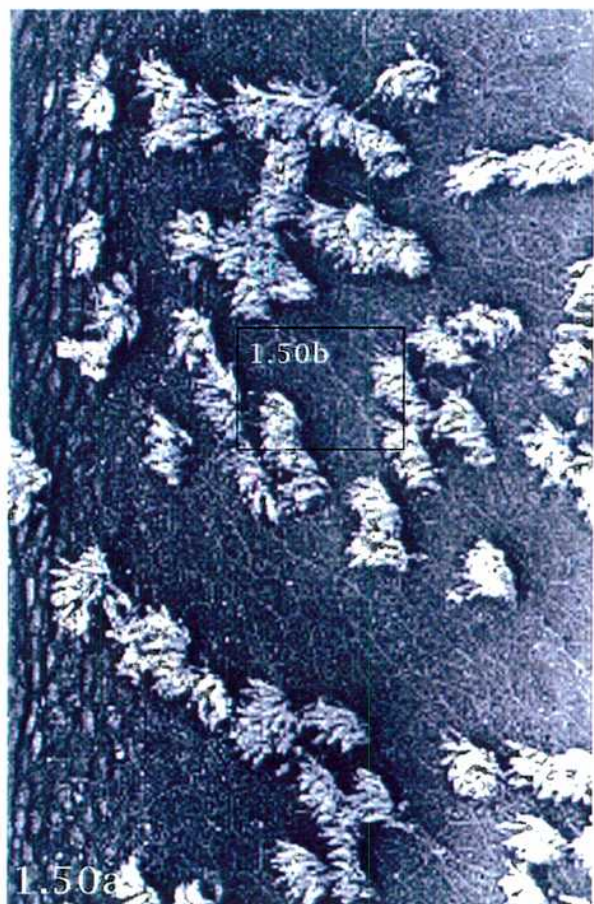
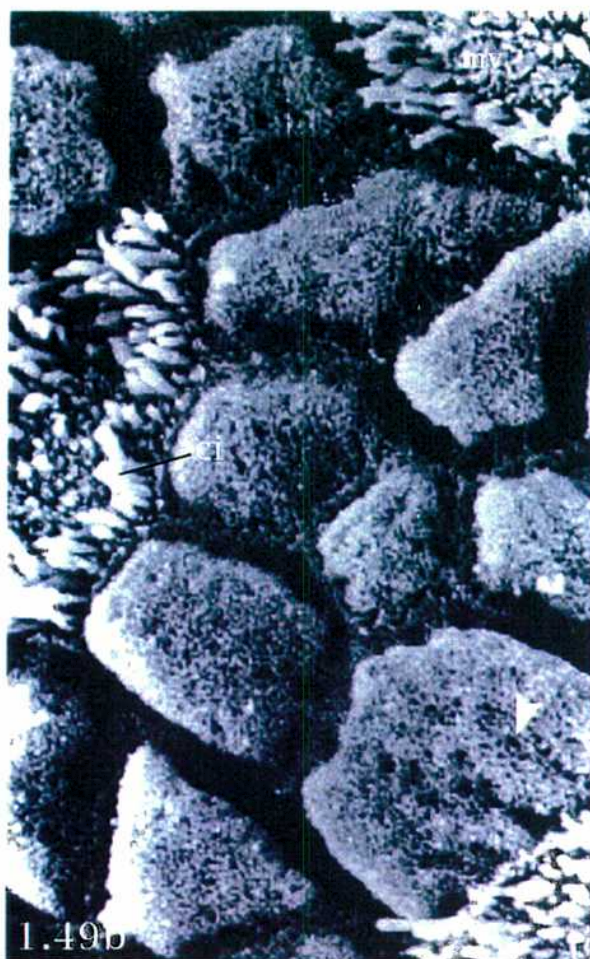
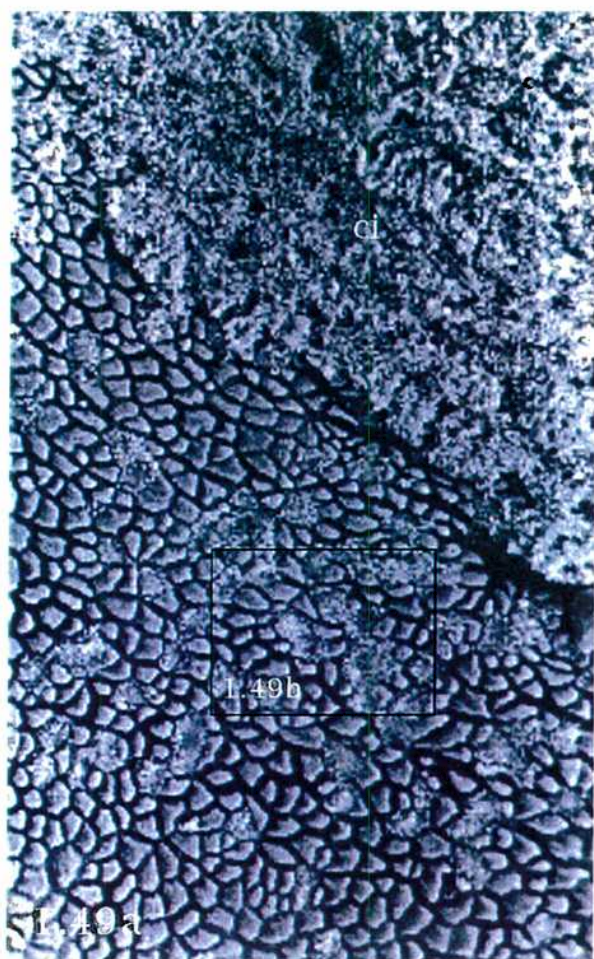


Fig. 1.49 a, b –Aspecto general y detalle de las células que tapizan el borde interno de los aritenoides. MEB. a) 600x, b) 5000x

Nótese en la Fig. 1.49 b la presencia de microcrestas (cabeza de flecha) sobre la superficie celular. Las células ciliadas (ci) presentan cortas microvellosidades.

Fig. 1.50 a, b - Aspecto general y detalle de parches de cilias (ci) y células secretoras presentes en el epitelio que reviste la cara interna de los aritenoides. MEB. a) 500x, b) 2500x

Nótese en la Fig. 1.50 b la forma poligonal de las células con microvellosidades cortas, con límites celulares bien definidos (cabeza de flecha celeste) así como las perforaciones (cabeza de flecha verde) sobre su superficie.



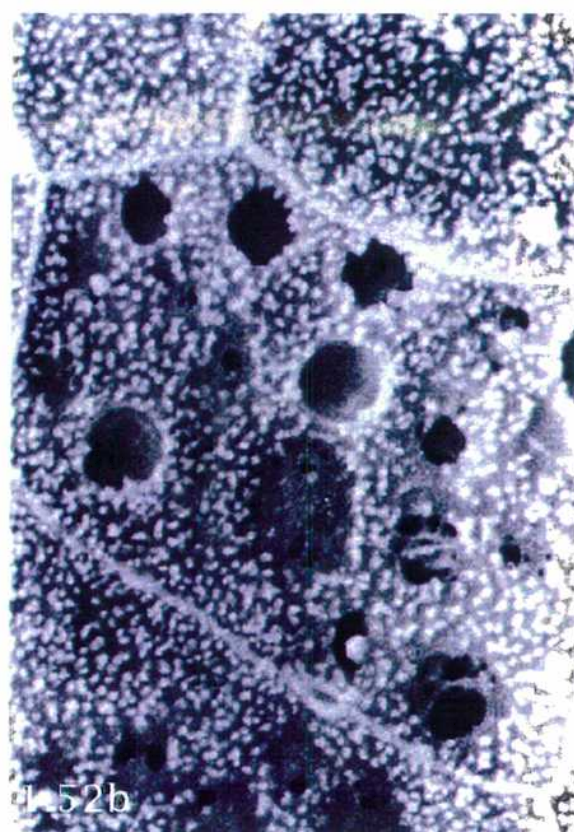
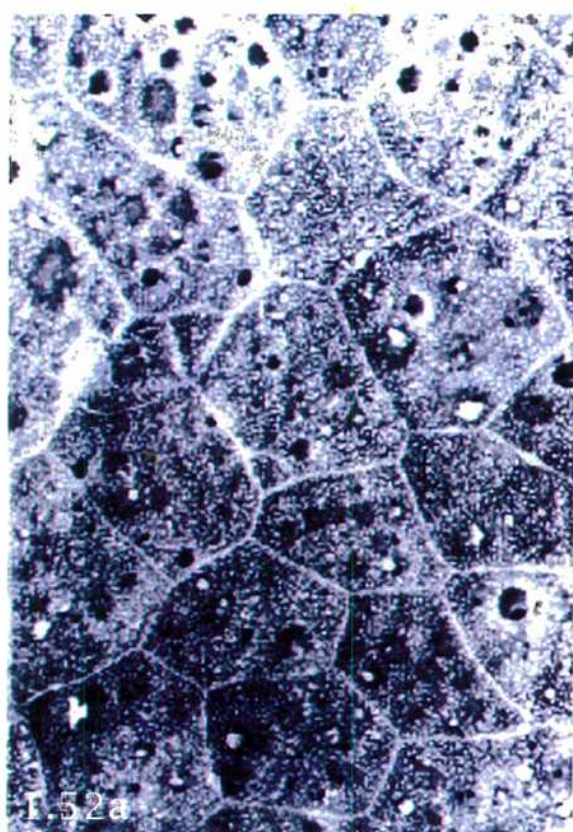
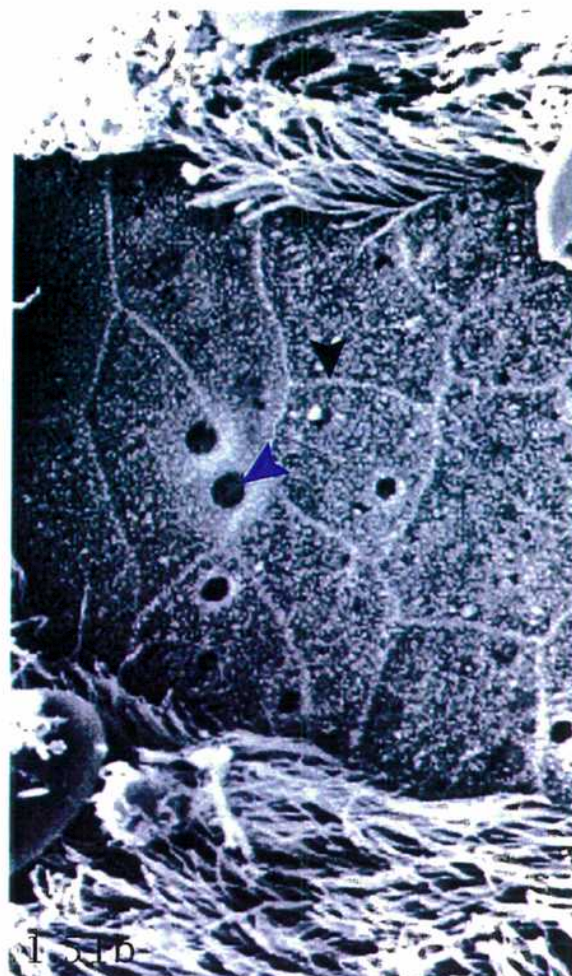
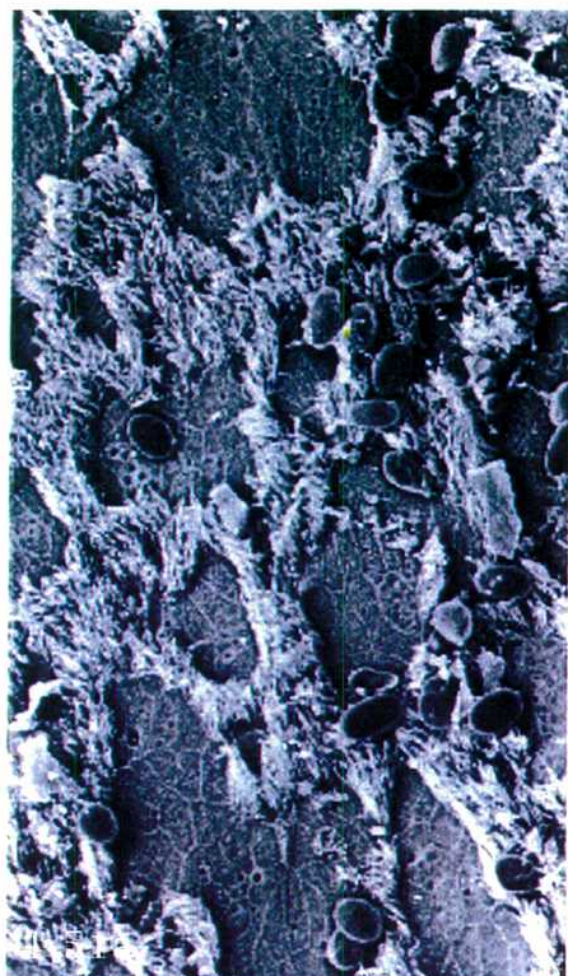


Fig. 1.53 a, b – Aspecto general y detalle de las células que tapizan la cámara posterior de la laringotráquea. MEB. a) 1000x, b) 2000x

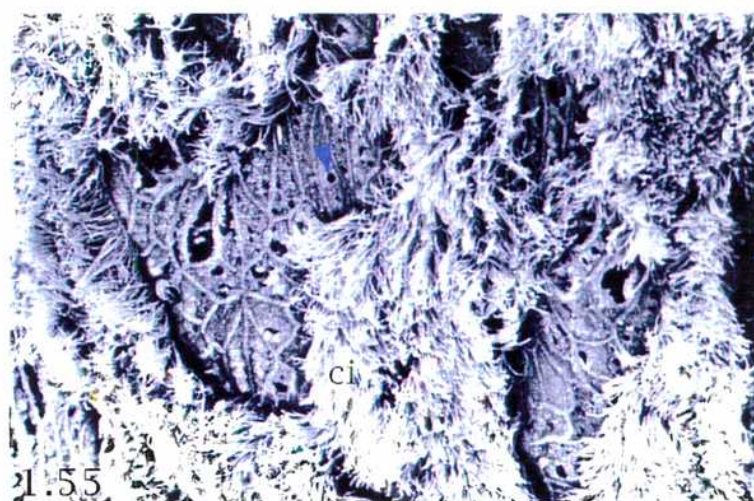
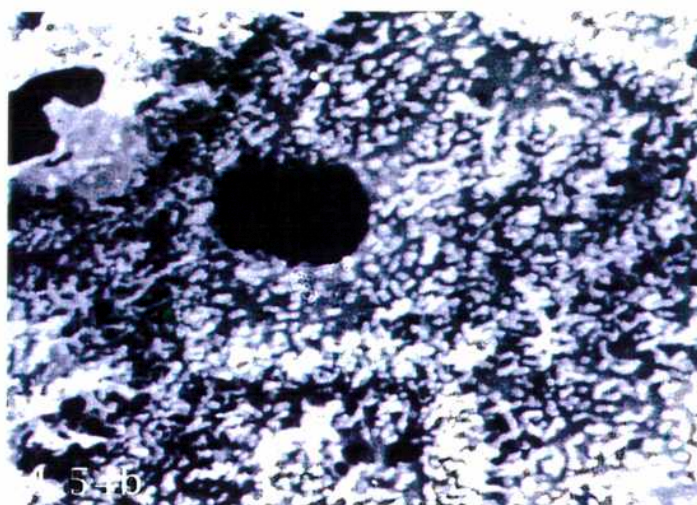
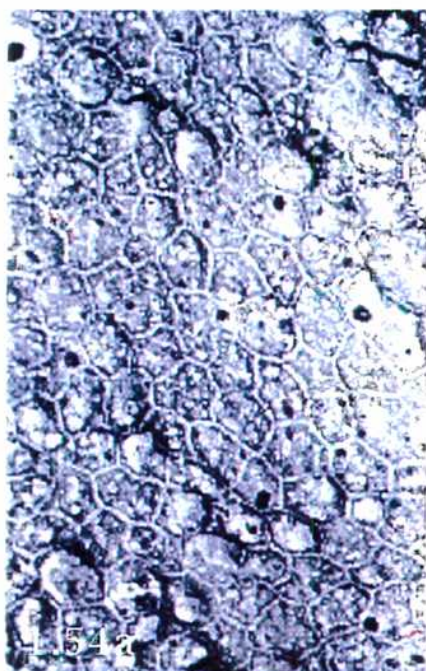
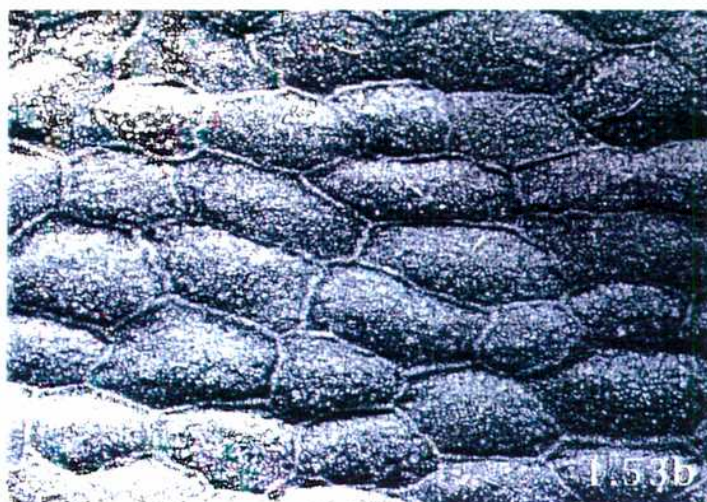
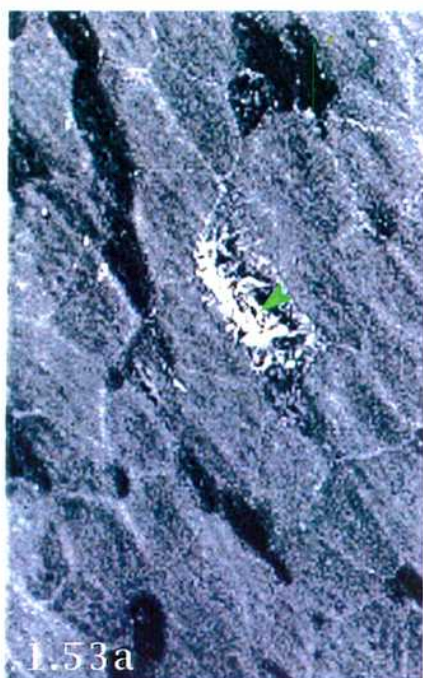
Observése en la Fig. 1.53 a la presencia de parches aislados de cilias.

Fig. 1.54 a, b – Detalle de células que revisten la cámara posterior. MEB. a) 1000x, b) 10000x

Nótese las perforaciones sobre la superficie celular.

Fig. 1.55 – Detalle de la última porción de la laringotráquea próximo a la entrada a las cámaras. MEB. 1000x

ci: células ciliadas.





2. Laringotraquea de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*

2.1 Estudio anatómico

El estudio del esqueleto laringotraqueal de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* se realizó sobre material al que se le aplicó la técnica modificada de Wassersug.

El esqueleto laringotraqueal de *M.s.stelzneri* se ubica entre los dos procesos póstero-mediales del hioides. Está constituido por un par de cartílagos aritenoideos y un cartílago cricoideo (Fig. 1.56).

Los músculos vinculados con el esqueleto laringotraqueal son: el músculo dilatador laríngeo, el constrictor laríngeo externo y el músculo constrictor laríngeo anterior. Todos ellos presentan un epimisio muy pigmentado. El músculo constrictor laríngeo posterior no fue observado.

El largo del cuerpo del cartílago hioideo es casi dos veces su ancho. De su región anterior parte un par de hiales delgados que se curvan hacia la región posterior engrosándose ligeramente. Carece de procesos anteriores. Los lóbulos anteriores y posteriores del proceso alar son estructuras conspicuas que se extienden hacia los laterales dándole a todo el esqueleto hioideo un aspecto cuadrangular. Los procesos póstero-laterales están ausentes. Los procesos póstero-mediales están osificados en casi toda su extensión con excepción de los extremos distales que son cartilaginosos. Estos procesos emergen ensanchados de la porción posterior del cuerpo hioideo, en la región media y posterior se adelgazan proyectándose ligeramente hacia afuera y en dirección dorsal.



Cada cartílago aritenoides tiene un aspecto cordiforme invertido con una cara externa cóncava en dirección ántero - posterior y un extremo acuminado ántero - dorsal el cual se proyecta sobre la faringe. Ambos cartílagos dejan una abertura, la glotis, la cual permite el pasaje de aire. Por transparencia pueden observarse los distintos constituyentes de las cuerdas vocales (Fig. 1.57 a, b; 1.58 a, b).

La cara interna de los aritenoides está revestida por una membrana. En un segundo plano, en dirección al lumen de la laringotráquea se sitúa una membrana primaria que si bien está unida en toda su extensión a los bordes internos del aritenoides (ántero-ventral y pósterodorsal), deja libre uno de sus lados formándose una cámara anterior. Por consiguiente esta cámara está delimitada por la membrana que reviste al aritenoides y por la membrana primaria. El borde libre de esta membrana se pliega hacia fuera, alejándose de la pared del aritenoides y adquiere una forma biconvexa es decir adelgazada en la zona media y expandida en los laterales constituyendo la cuerda vocal (Fig. 1.59; 1.60). La cuerda vocal, vista ántero-dorsalmente, presenta en la zona media un ensanchamiento en el cual se diferencian tres zonas pigmentadas, una situada próxima al borde libre, que se puede apreciar desde el exterior y a la que se identifica como (1) y las otras dos, más pequeñas y enfrentadas, ubicadas en el borde que se orienta hacia el lumen de la laringotráquea y que se distingue como (2). Por delante de estos dos acúmulos pigmentados se diferencia una tercera región a la que se denomina (3) (Fig. 1.59).

En el interior de la laringotráquea de los ejemplares machos a diferencia de los ejemplares hembras la membrana primaria de cada lado presenta en la región lateral media una prominencia bulbosa y un marcado frenulum (Fig. 1.59; 1.60).



El aritenoides se articula con el cricoides, un anillo cartilaginoso oval cuyo diámetro mayor es perpendicular a la glotis, y cuya altura varía según la región. La cara dorsal es más alta en comparación con la región ventral donde se limita a una delgada barra media (Fig. 1.57, 158). La región póstero-dorsal media presenta un proceso esofágico corto y obtuso. Los procesos laterales están marcados y no hacen contacto directo, sino a través de los músculos, con los procesos póstero-mediales del hioides (Fig. 1.57, 1.58). El cricoides emite dos procesos pulmonares cortos, delgados y ligeramente curvos que sostienen la porción proximal de los pulmones (Fig. 1.58 a, b).

Fig. 1.56 - Transparentado del esqueleto hioideo y laringotráqueal de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*. Técnica de Wassersug. 65x

Fig. 1.57 a – Transparentado del esqueleto laringotreaqueal. Vista dorsal. Técnica de Wassersug. 250x

Fig. 1.57 b – Esquema donde se resumen las observaciones realizadas. 120x

A. aritenoides, C: cricoides, cv:; cuerdas vocales, H: hioides, h. hiales, mf. Masa fibrosa, P: pulmón, pa: proceso alar, pe: proceso esofágico, pm: proceso pósteromedial

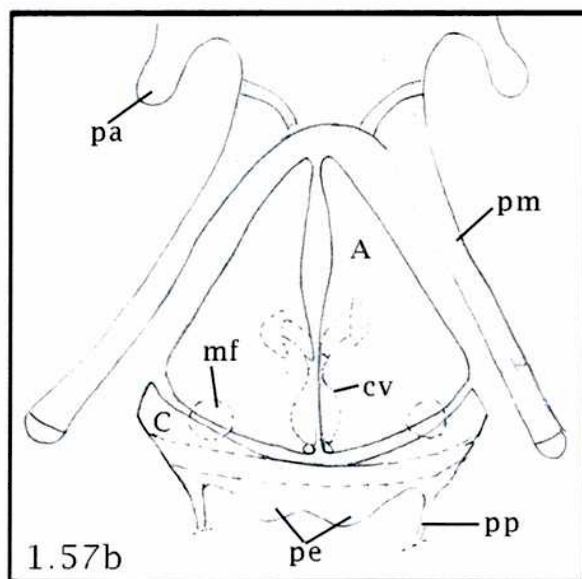
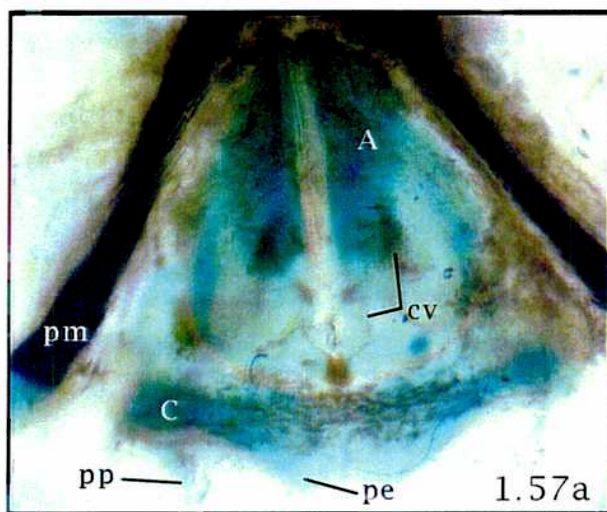
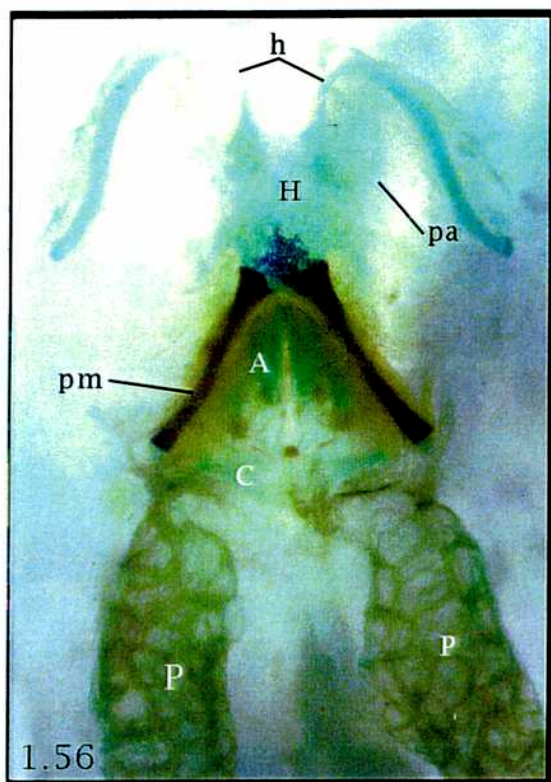


Fig. 1.58 a - Transparentado del esqueleto laringotreaqueal. Vista ventral. Técnica de Wassersug. 250x

Fig. 1.58 b – Esquema donde se resumen las observaciones realizadas. 120x

A: aritenoides, C: cricoides, cv: cuerda vocal, H: hioides, h: hiales, lf: ligamento frenular, mf: masa fibrosa, pe: proceso esofágico, pl: proceso lateral, pm: proceso pósteromedial, pp: proceso pulmonar.

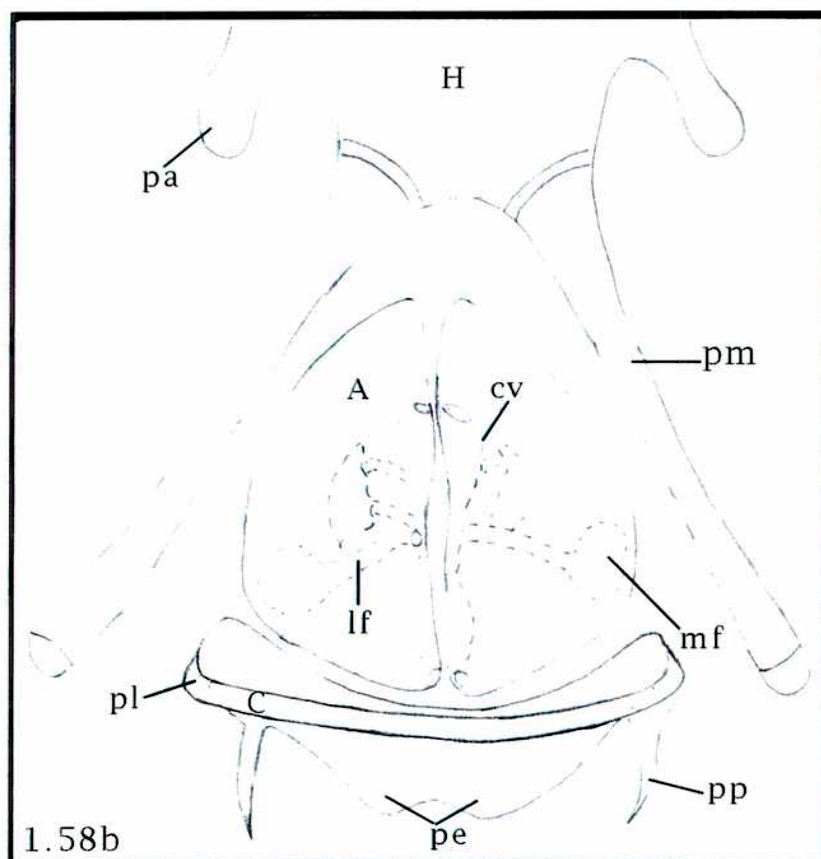
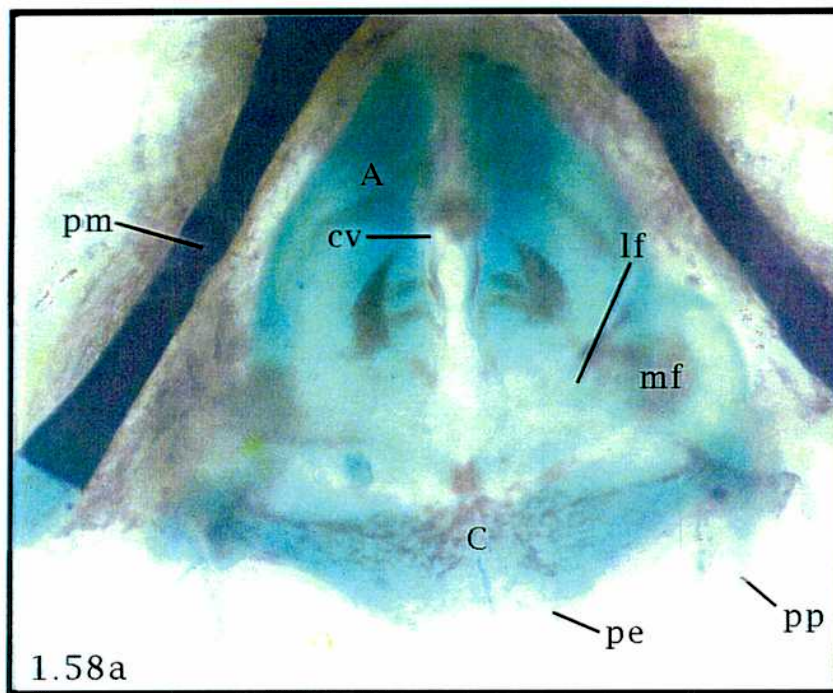
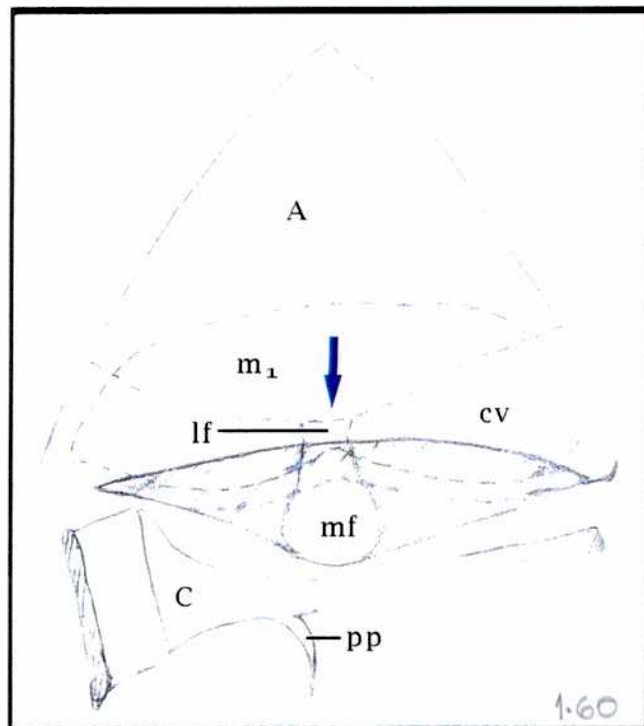
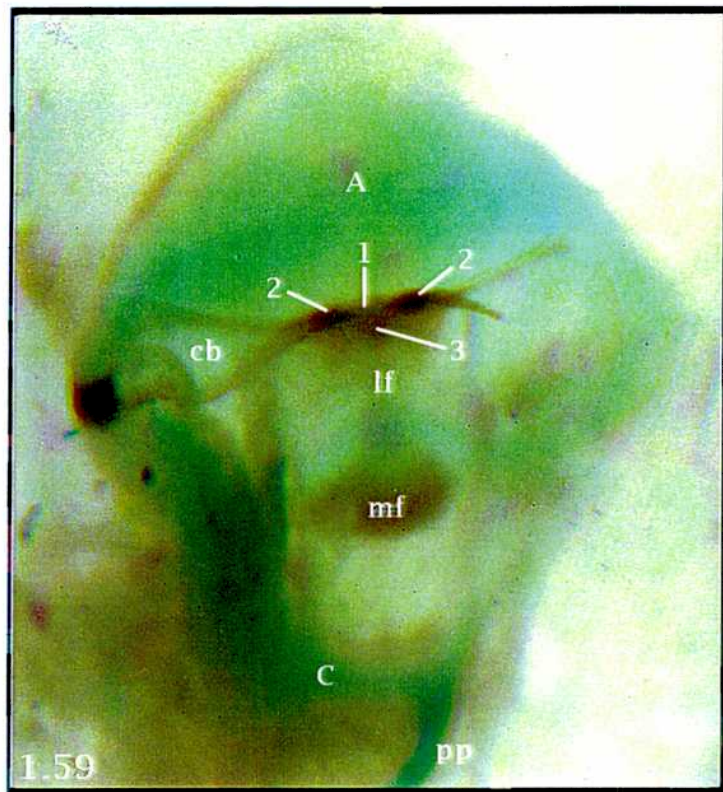


Fig. 1.59 - Transparentado de una hemi-laringotráquea. Vista interna. Técnica de Wassersug. 250x

Fig. 1.60 – Esquema donde se resumen las observaciones realizadas. 120x

A: aritenoides, C: cricoides, cv: cuerda vocal, lf: ligamento frenular, mf: masa fibrosa, m₁: membrana primaria, pp: proceso pulmonar, 1, 2, 3: regiones pigmentadas en la región media de la cuerda vocal





2.2 Estudio microanatómico

2.2.1 Microscopía óptica (MO)

Con el objeto de relacionar la anatomía de la laringotraquea y su microanatomía se presentan los esquemas de las Fig. 1.61 a, b y c, para indicar el lugar de los cortes histológicos analizados en esta parte del capítulo.

Las secciones realizadas están orientadas perpendiculares a las cuerdas vocales, comenzando desde el extremo póstero-dorsal hacia el extremo ántero-ventral.

La mucosa faríngea se invagina a la altura de la glotis y está constituida por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes y un corion de tejido conectivo laxo muy capilarizado (Fig. 1.62, 1.75).

Los cartílagos aritenoides son de tipo hialino, (Fig. 1.62 a 1.73) sus paredes tienen un grosor variable. La región superior de los aritenoides es de mayor grosor delimitando el lumen de la cavidad laringotraqueal menor mientras que en la región inferior los cartílagos

son más delgados y por consiguiente el lumen es de mayor tamaño.

A lo largo del aritenoides la mucosa que reviste el lumen de la cavidad laringotraqueal presenta una lámina propia constituida por un tejido conectivo laxo muy delgado en toda su extensión, sin embargo el tipo de epitelio que constituye la mucosa es variable. En la región anterior, el epitelio es pseudoestratificado cúbico bajo ciliado con abundantes células mucosas que reaccionan positivamente con el ácido periódico-reactivo de Schiff (APS) mientras que muestran una débil alcianofilia a un pH 2,5. Éste se continúa con un epitelio biestratificado cúbico ciliado a simple cúbico ciliado y luego en un epitelio plano. El resto de la región superior está revestida por un



epitelio pseudoestratificado ciliado con abundantes células mucosas cuya secreción da reacción positiva con el APS (Fig. 1.76, 1.77).

La región inferior de los cartílagos aritenoides está revestida por un epitelio secretor formado inicialmente por células secretoras planas (Fig. 1.81) que se continúan con células altas con un extremo apical globoso (Fig. 1.78a, 1.82). Las células secretoras presentan gránulos en su citoplasma tanto APS como azul alcian (AB) pH 2,5, positivos (Fig. 1.78 a, b).

El epitelio que se encuentra asociado con la membrana primaria es pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes que dan una reacción débil con el AB pH 2,5 (Fig. 1.79, 1.80).

El cartílago cricoideo (Fig. 1.64 a 1.66 y 1.70 a 1.72) está revestido por una mucosa formada por un epitelio secretor (Fig. 1.83) constituido por células altas, con su núcleo esférico situado basalmente. La mayor parte del citoplasma tiene un aspecto esponjoso debido a la secreción producida por estas células, la cual da reacción positiva con el APS (Fig. 1.87). Entre estas células se ubican células con características morfológicas diferentes al tipo celular predominante. Estas son delgadas, con citoplasma homogéneo y núcleo situado en su tercio basal (Fig. 1.83). En la región media del cricoides, tanto dorsal como ventral, entre las células secretoras se ubican células ciliadas y abundantes células caliciformes constituyendo un epitelio pseudoestratificado ciliado cuya secreción muestra una marcada APS positividad (Fig. 1.85, 1.86, 1.87). El corion varía de tejido conectivo denso a laxo y en este último caso está muy capilarizado. Ambos conectivos poseen melanóforos así como una infiltración leucocitaria que alcanza el epitelio (Fig. 1.83, 1.84).

La cavidad laringotraqueal se abre directamente a la parte proximal de cada uno de los pulmones, por lo tanto se distingue un cambio en el tipo de epitelio (Fig. 1.67 a 1.69, 1.89). El epitelio



secretor se continúa con un epitelio simple cúbico (Fig. 1.90) y éste con un epitelio respiratorio constituido por neumocitos los cuales se encuentran cubriendo una red de capilares (Fig. 1.91). El epitelio pseudoestratificado ciliado que reviste en parte al cricoides pasa a un epitelio cúbico ciliado a sin cilias que se continúa en el interior del pulmón con un epitelio respiratorio con las mismas características que las mencionadas anteriormente (Fig. 1.92 a, b). El corion está formado por un tejido conectivo denso cuyos capilares se sitúan muy próximos al tejido epitelial.

Con respecto a las cuerdas vocales, el borde que delimita la cámara anterior, está unido al margen interno del cartílago aritenoides mientras que el otro borde está unido al margen interno del cricoides (Fig. 1.66, 1.70). Las cuerdas están revestidas por un epitelio simple plano y el tejido conectivo subyacente es denso con abundantes fibras elásticas. La región media de la cuerda está revestida por un epitelio simple cúbico y presenta una lámina propia formada por un tejido conectivo fibroso con abundantes fibras colágenas. (Fig. 1.94 a, b).

En cuanto a los ejemplares machos, se observó sobre el lateral de cada una de las membranas primarias una protuberancia bulbosa sostenida por medio de un ligamento frenular de tejido condroide a la porción media de cada una de las cuerdas vocales (Fig. 1.88; 1.93a). Esta protuberancia está en firme contacto con cada uno de los cartílagos aritenoides (Fig. 1.69), tiene un centro de tejido cartilaginoso parenquimatoso, APS y AB pH 2,5 negativo, rodeado por tejido conectivo denso (Fig. 1.93 b, d). Ambos tipos de tejidos se caracterizan por presentar fibras elásticas (Fig. 1.93 c). El epitelio que reviste esta estructura está formado en su mayor parte por células secretoras altas con un citoplasma con gránulos que da reacción positiva con APS y con AB pH 2,5 (Fig. 1.93 d, e). Este



epitelio secretor se continúa con células secretoras planas (Fig. 1.93

f).

Fig. 1.61 a – Esquema indicando la altura de las secciones histológicas en la laringotráquea.

Fig. 1.62 a 1.65 – Cortes perpendiculares a las cuerdas vocales. Tricrómico de Masson modificado. 32x

A: aritenoides, C: cricoides, c₁: cámara anterior, cla: constrictor laríngeo anterior, dl: músculo dilatador laríngeo, Mf: mucosa faríngea, l: lumen, m₁: membrana primaria, pm: proceso pósteromedial

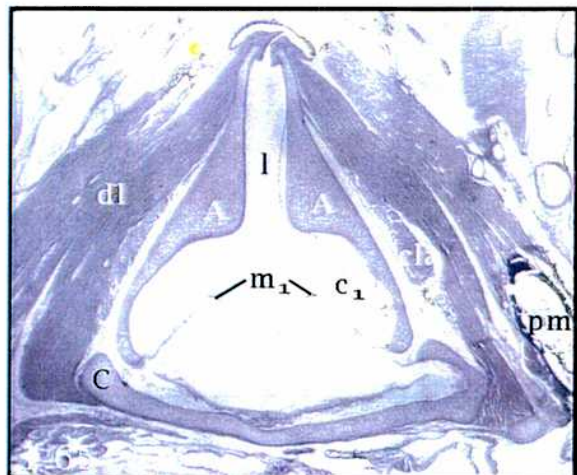
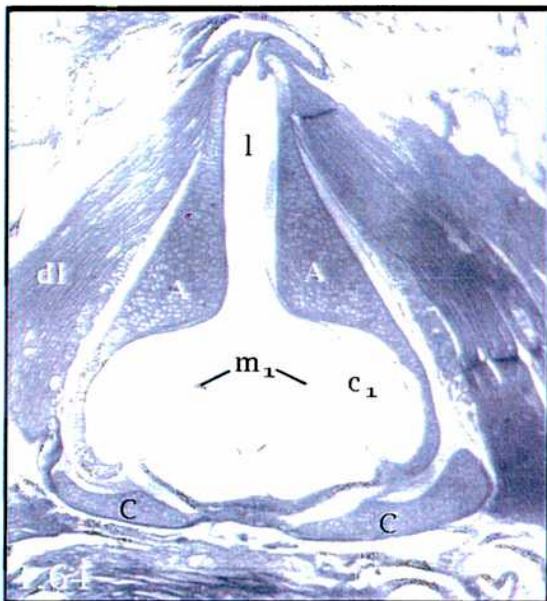
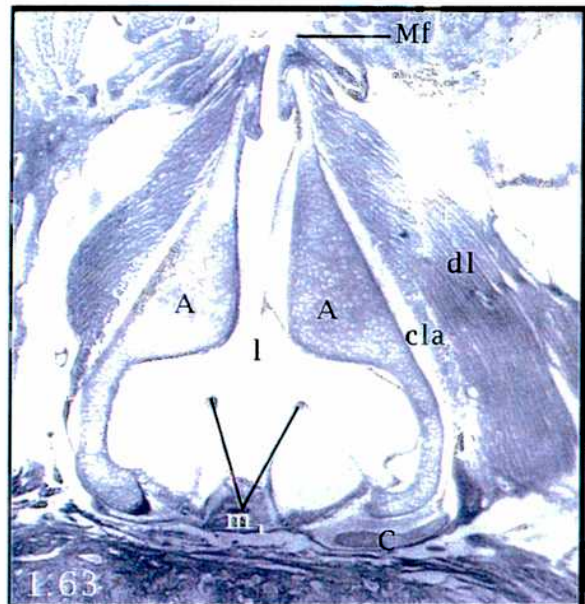
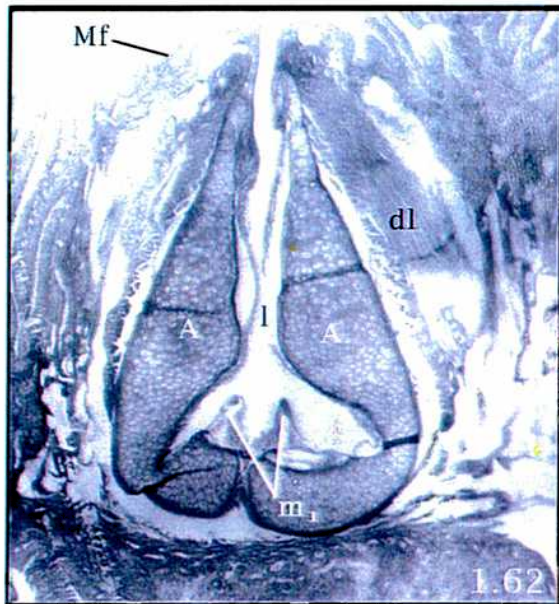
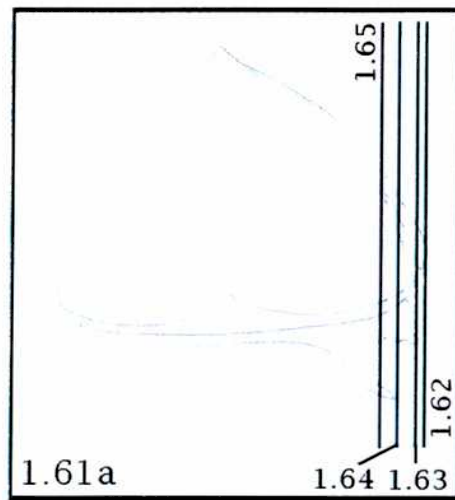


Fig. 1.61 b – Esquema indicando la altura de las secciones histológicas en la laringotráquea.

Fig. 1.66 a 1.69 – Cortes perpendiculares a las cuerdas vocales. Tricrómico de Masson modificado. 32x

A: aritenoides, C: cricoides, Co: corazón, c₁: cámara anterior, mf: masa fibrosa, l: lumen, m₁: membrana primaria, P: pulmón, pm: proceso pósteromedial

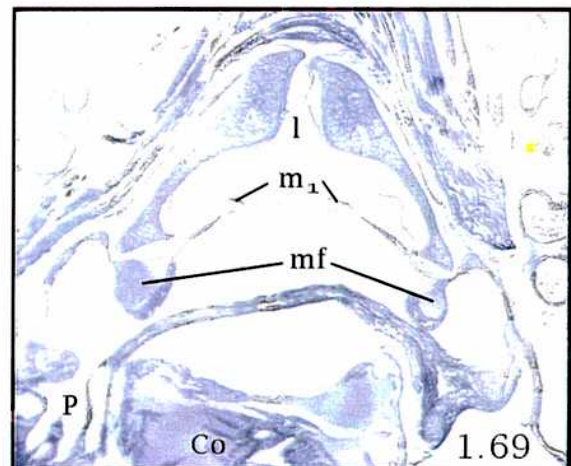
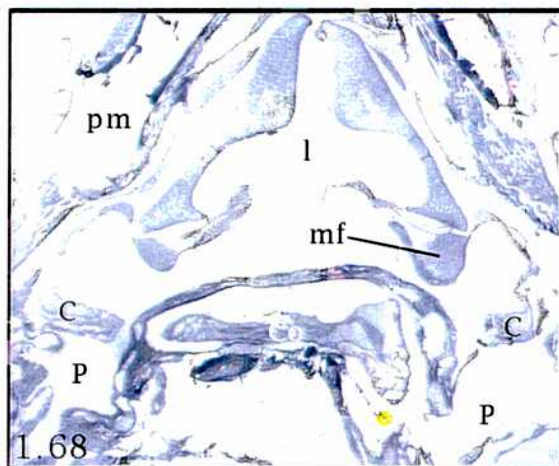
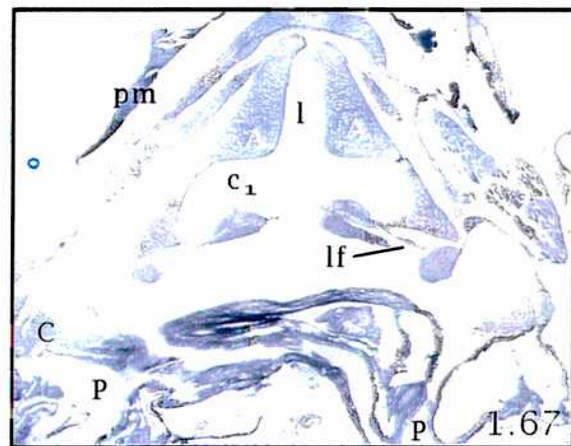
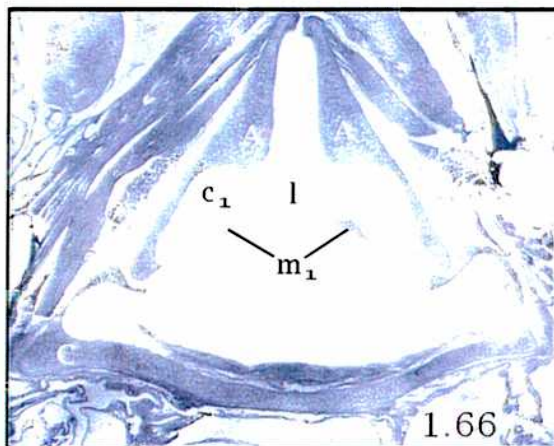
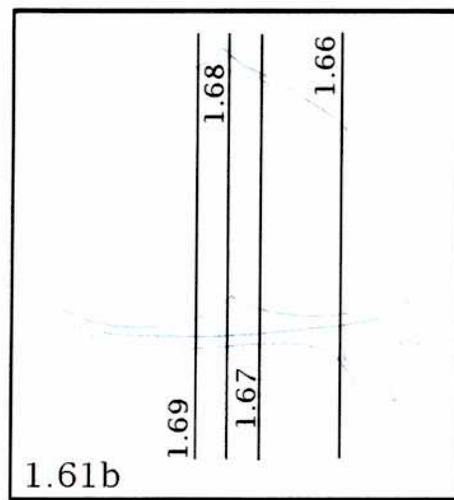


Fig. 1.61 c – Esquema indicando la altura de las secciones histológicas en la laringotráquea.

Fig. 1.70 a 1.74 – Cortes perpendiculares a las cuerdas vocales. Tricrómico de Masson modificado. 32x

A: aritenoides, Ao: arcos aórticos, C: cricoides, Co: corazón, c₁: cámara anterior, m₁: membrana primaria

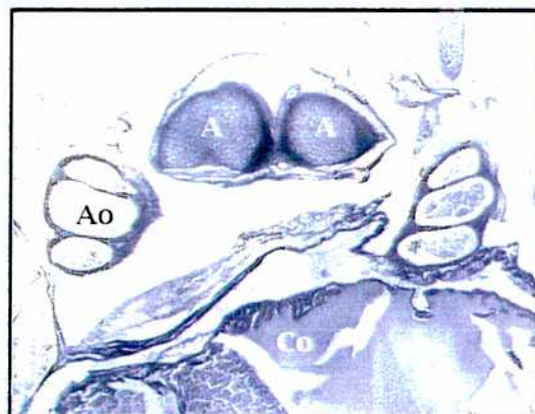
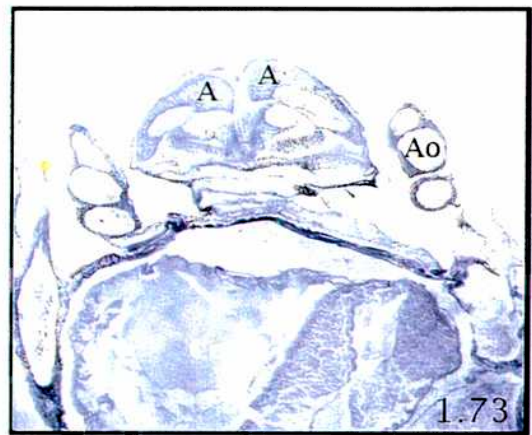
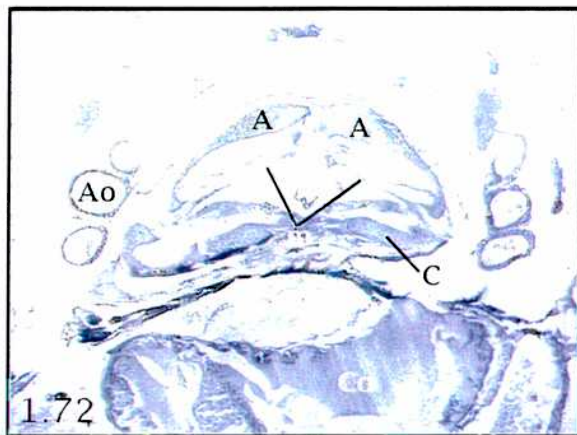
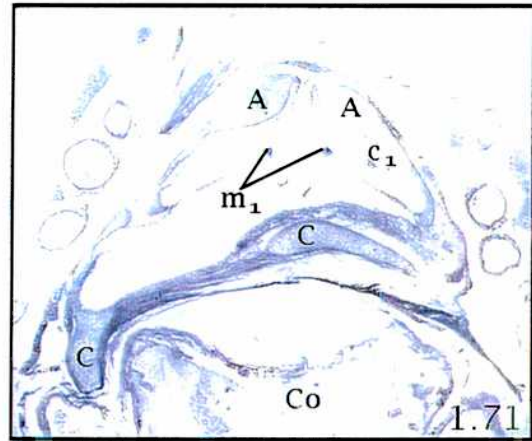
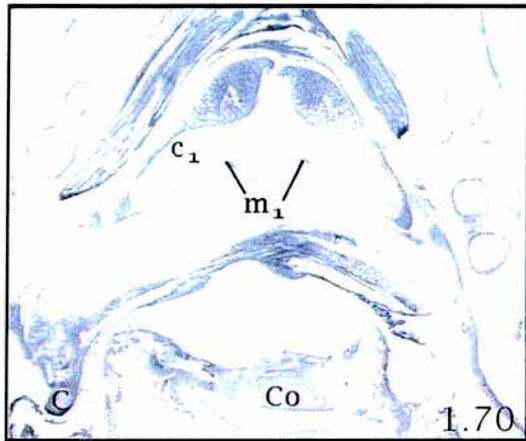
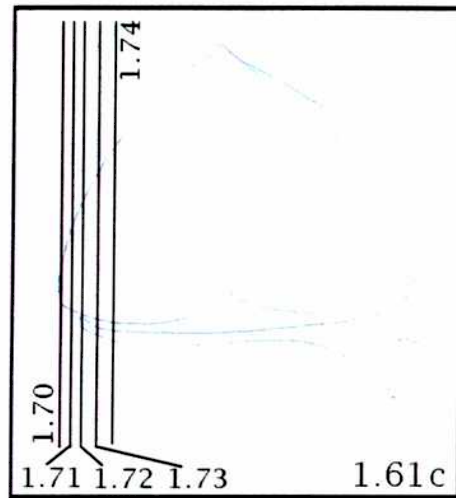


Fig. 1.75 – Detalle del epitelio de la laringotraquea próximo a la faringe. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Nótese el epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (cabeza de flecha verde) con células caliciformes (cabeza de flecha negra).

Fig. 1.76, 1.77 - Detalle de epitelio pseudoestratificado ciliado (cabeza de flecha verde) con células caliciformes (cabeza de flecha roja o negra). 1.76) Tricrómico de Masson. 1.77) Técnica de APS. 400x

Fig. 1.78 a, b – Epitelio secretor a la altura de los aritenoides. a) AB pH 2,5, b) APS 400x

Fig. 1.79, 1.80 – Región de inserción de la membrana primaria (m_1). 1.79) Tricrómico de Masson, 1.80) AB pH 2,5. 400x

A: aritenoides, l: lumen

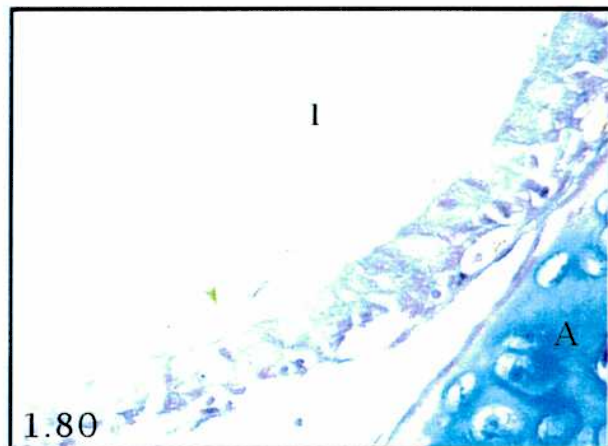
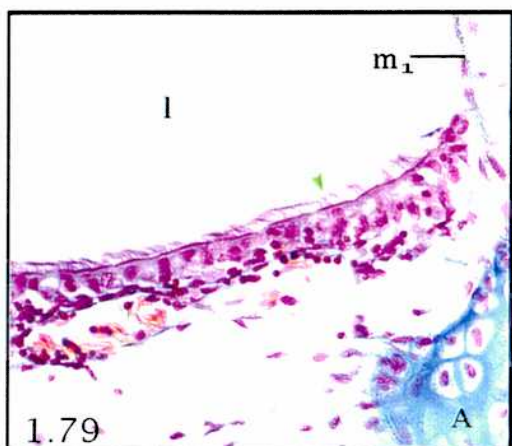
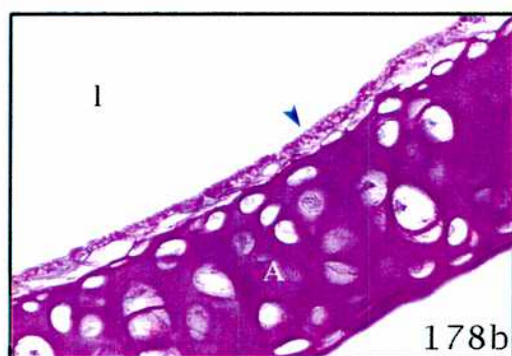
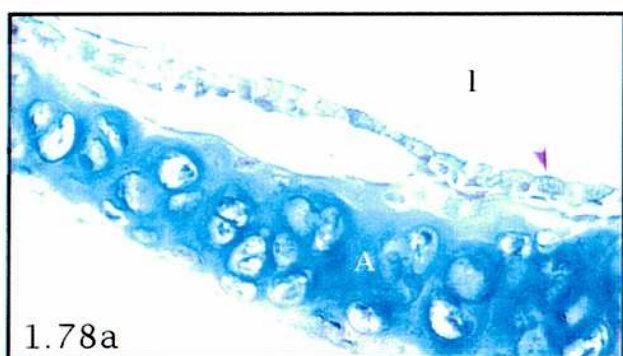
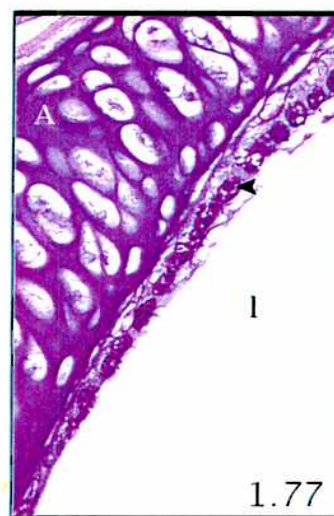
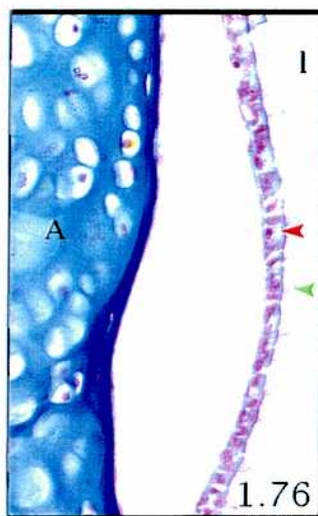
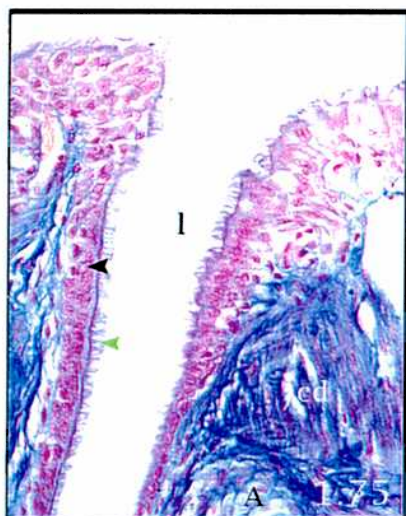
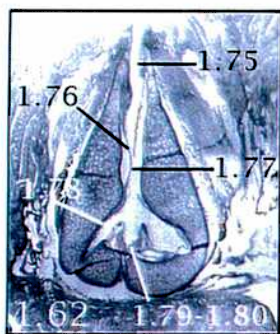


Fig. 1.81 – Epitelio secretor a la altura del aritenoides (A). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.82 - Epitelio secretor a la altura del aritenoides (A). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Compárese entre estas dos fotos la altura del epitelio secretor

Fig. 1.83, 1.84 – Epitelio secretor a la altura del cricoides (C). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.85 – Región media del cricoides (C). Tricrómico de Masson modificado. 400x
Nótese la presencia de células ciliadas entre las células secretoras.

Fig. 1.86 – Región media del cricoides (C) revestida por un epitelio pseudoestratificado ciliado con células caliciformes. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.87 – Zona de transición entre el epitelio secretor (cabeza de flecha negra) y el epitelio pseudoestratificado ciliado con células caliciformes (cabeza de flecha azul). Técnica de APS. 100x

l: lumen

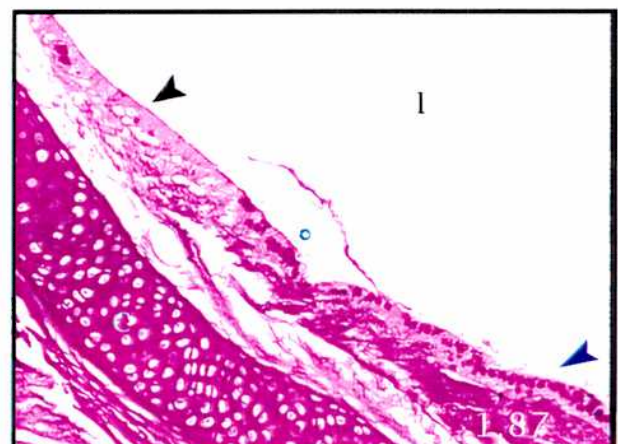
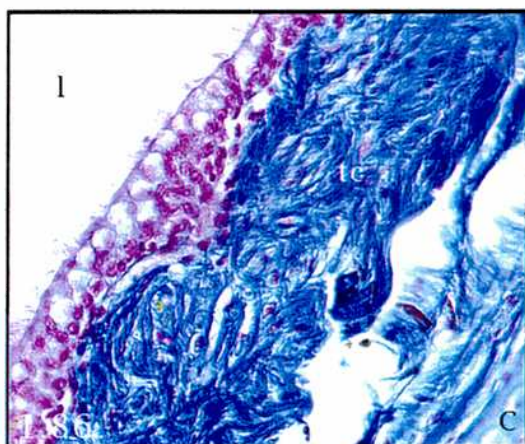
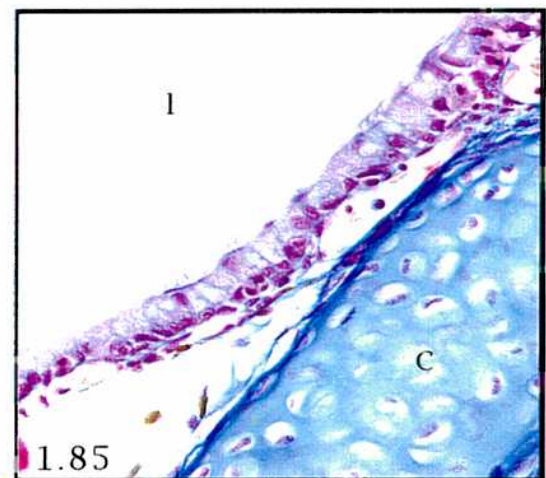
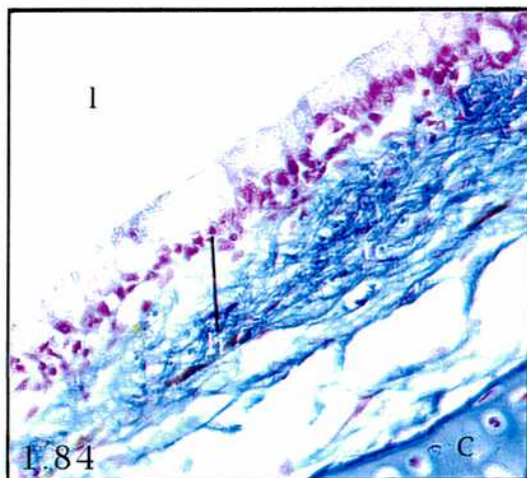
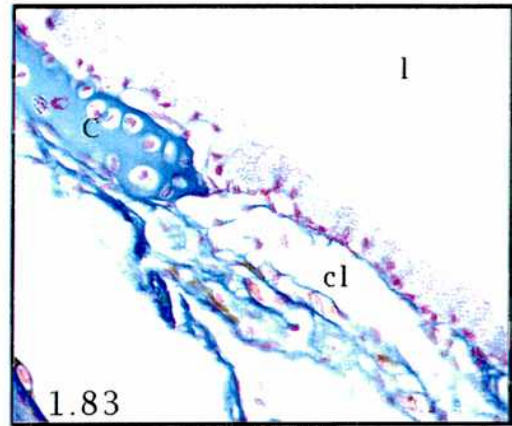
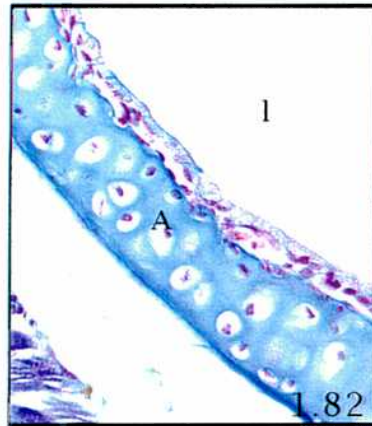
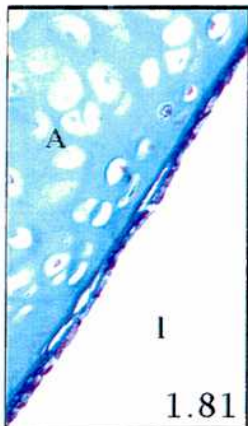
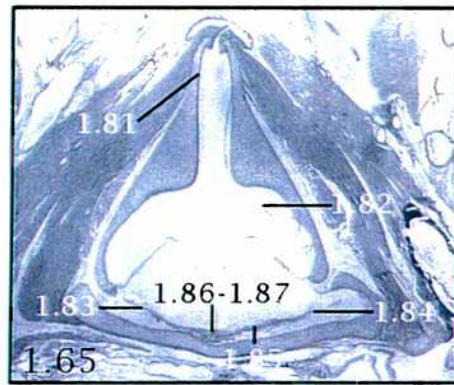


Fig. 1.88 – Detalle de la protuberancia fibrosa (mf), asociada al cartílago aritenoides (A) y a la cuerda vocal por medio de un ligamento frenular (lf). Tricrómico de Masson modificado. 20x

Nótese en la cuerda vocal la presencia de un tejido conectivo muy fibroso (cabeza de flecha) y tejido conectivo denso (cd).

Fig. 1.89 – Detalle de la zona de transición entre laringotraquea y pulmón (P). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.90 – Detalle de la transición entre un epitelio secretor (cabeza de flecha verde) y un epitelio cúbico (cabeza de flecha negra). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.91 – Epitelio respiratorio. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.92 a – Zona de transición entre un epitelio pseudoestratificado ciliado (cabeza de flecha negra) a simple cúbico. Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.92 b - Zona de transición entre un epitelio cúbico (cabeza de flecha azul) a un epitelio respiratorio (cabeza de flecha roja). Tricrómico de Masson modificado. 400x

C: cricoides, c: capilar, ne: neumocito, P: pulmón, pp: proceso pulmonar

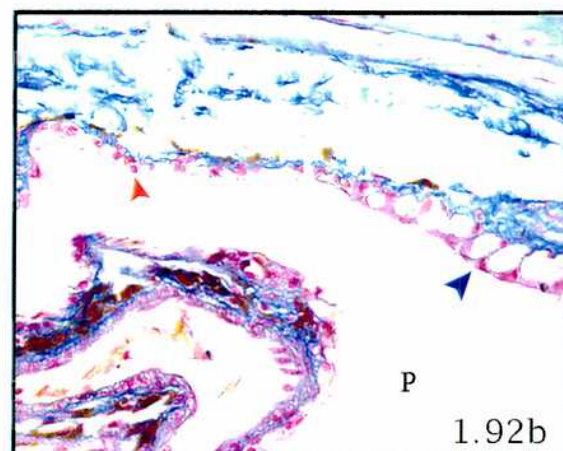
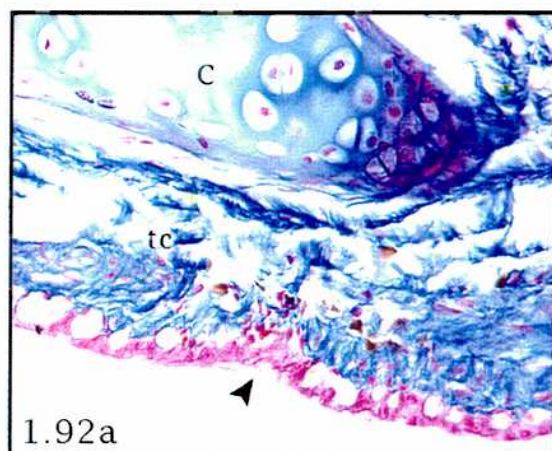
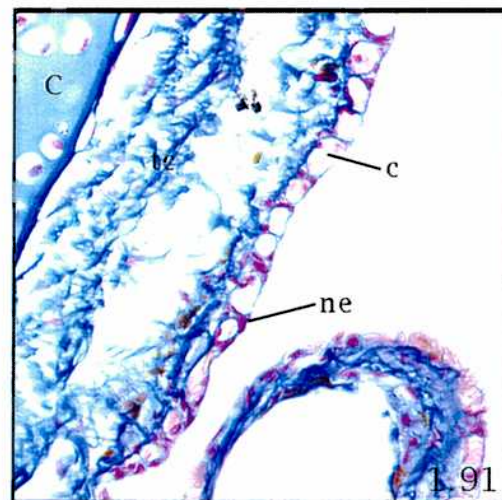
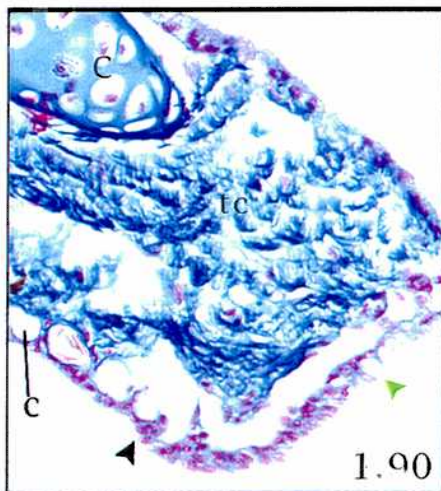
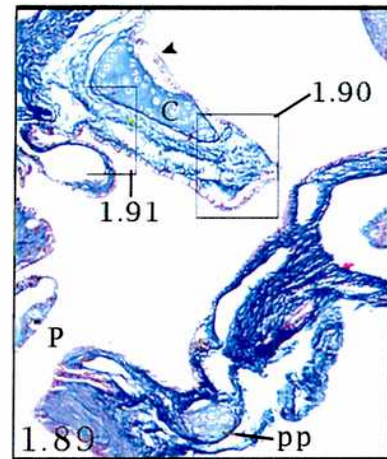
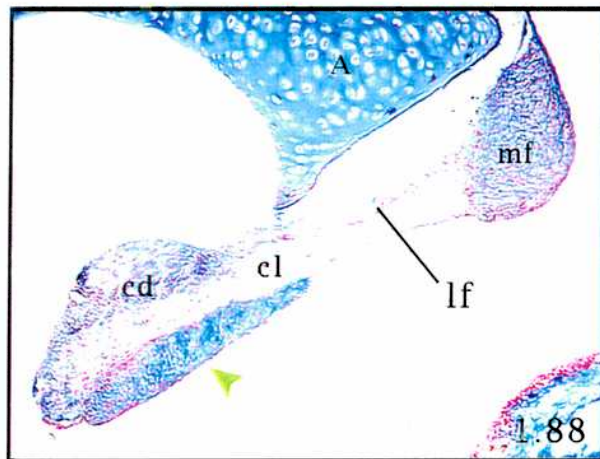
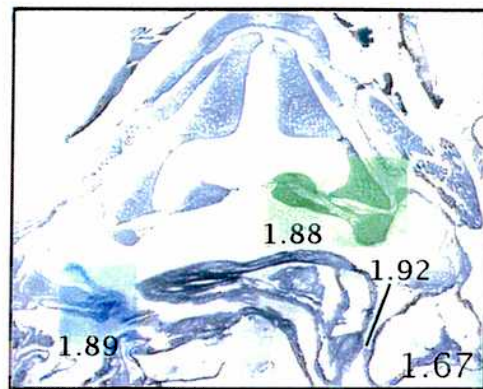


Fig. 1.93 a – Detalle del ligamento frenular de tejido condroide (co) sosteniendo a la masa fibrosa (mf). Tricrómico de Masson modificado. 400x

Fig. 1.93 b, c, d, e – Detalle de la masa fibrosa con diferentes coloraciones. 400x

Fig. 1.93 b – Tricrómico de Masson modificado

Fig. 1.93 c - Técnica de Fränkel

Fig. 1.93 d – Técnica de APS

Fig. 1.93 e – Técnica de AB pH 2,5

Fig. 1.93 f – Detalle de la transición del epitelio secretor (cabeza de flecha verde) que reviste la masa fibrosa con un epitelio plano (cabeza de flecha celeste). Tricrómico de Masson modificado. 400x

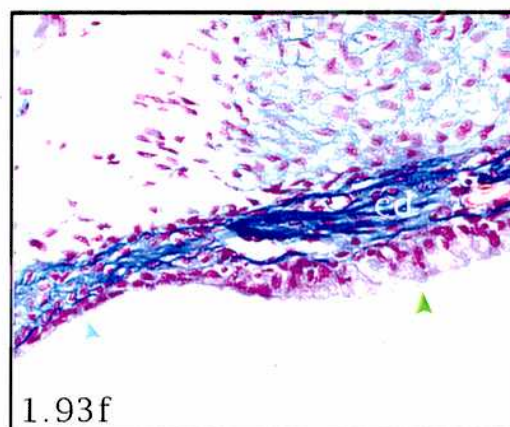
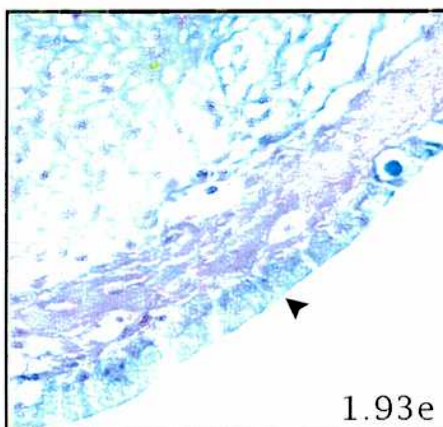
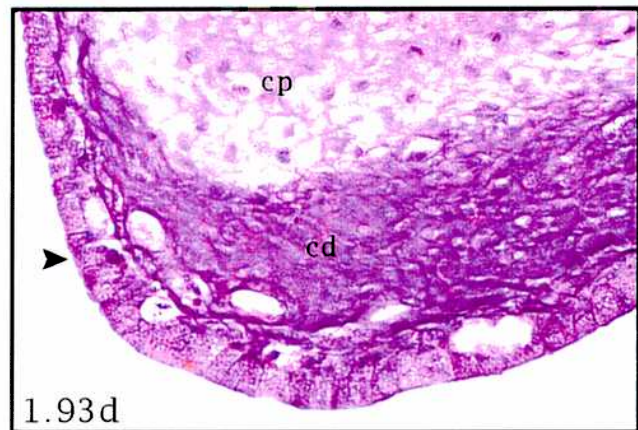
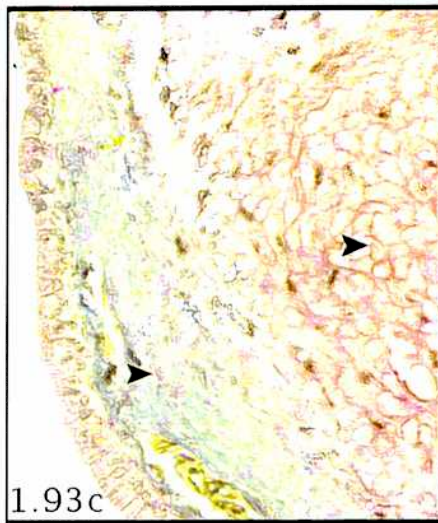
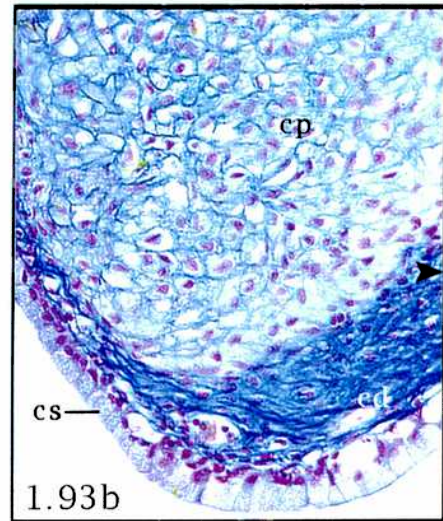
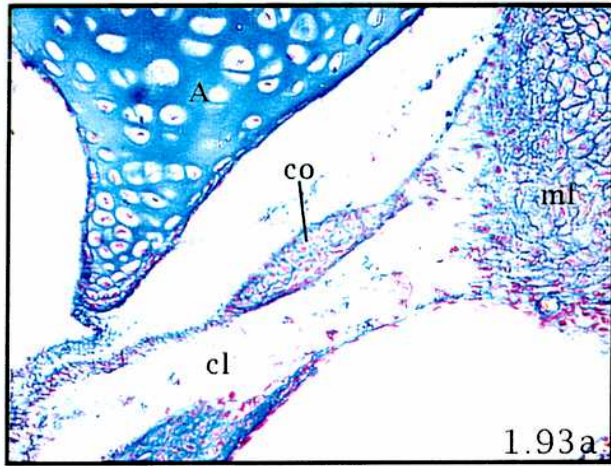
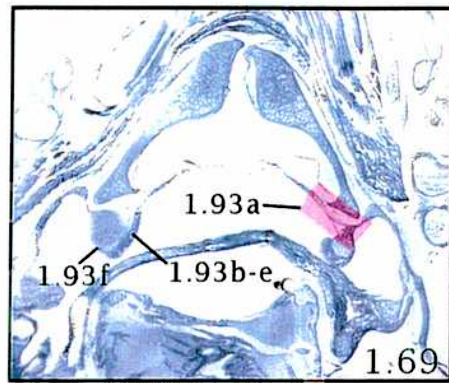
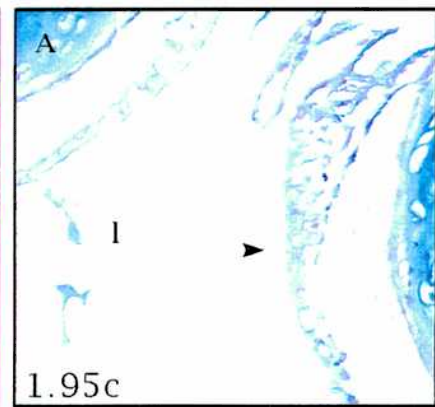
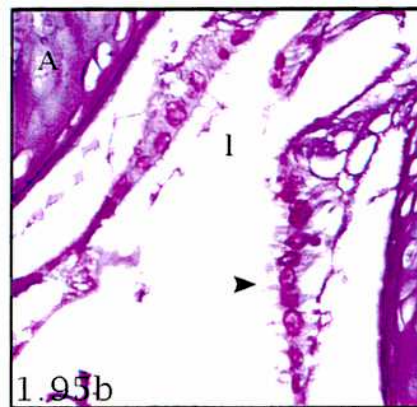
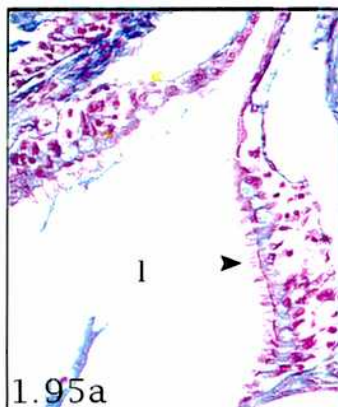
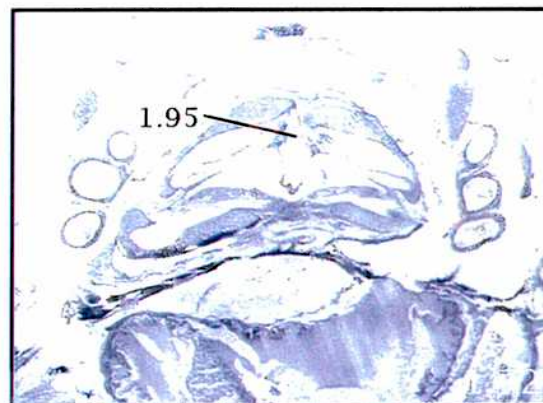
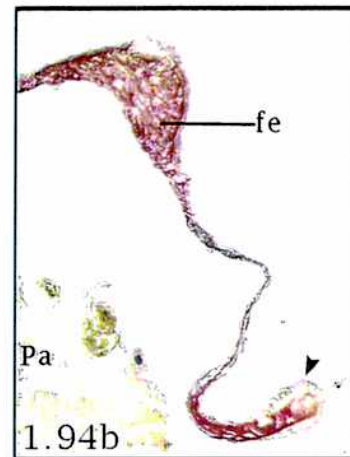
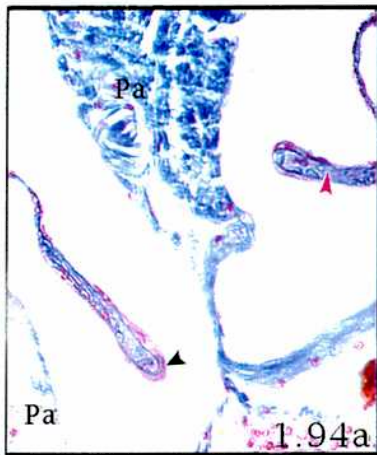


Fig. 1.94 a, b – Extremo de las cuerdas vocales. a) Tricrómico de Masson modificado, b) Técnica de Fränkel. 400x

Nótese el epitelio simple cúbico (cabeza de flecha negra) que tapiza el extremo de la cuerda, la presencia de un eje (cabeza de flecha roja) y las fibras elásticas (fe).

Fig. 1.95 a, b, c – Epitelio de revestimiento de los aritenoides (A) en el punto de inserción de las cuerdas vocales. a) Tricrómico de Masson modificado, b) Técnica de APS, c) Técnica de AB pH 2,5. 400x

Nótese el epitelio pseudoestratificado ciliado (cabeza de flecha negra) con células caliciformes





2.2.2. Microscopía electrónica de barrido (M.E.B.)

Las observaciones realizadas con MEB permiten corroborar algunas de las observaciones efectuadas con la técnica de Wassersug así como las obtenidas con microscopía óptica.

La laringotróquea de *M.s.stelzneri* presenta una única cámara anterior pequeña delimitada por una membrana que al plegarse hacia el lumen de esta cavidad da origen a la cuerda vocal. Por debajo de esta membrana se abre una cavidad amplia que se comunica directamente con cada uno de los pulmones (Fig. 1.96 a, 1.96 b).

El epitelio que reviste el borde del cartílago aritenóideo (Fig. 1.97) está tapizado por células poligonales con límites celulares bien definidos, cubiertas por microvellosidades cortas (Fig. 1.98).

La cara interna del cartílago aritenóideo presenta dos tipos celulares diferentes: 1) células con una superficie globosa y límites celulares hundidos (Fig. 1.99) y 2), células poligonales cubiertas por microvellosidades cortas y con pequeños orificios (Fig. 1.100 a, b).

La membrana primaria, que da origen a la cuerda vocal, está revestida por células poligonales con microvellosidades cortas (Fig. 1.101). En la región media de ésta se observa una protuberancia bulbosa (Fig. 1.102) cuyas células de recubrimiento son células globosas con microvellosidades cortas, morfológicamente diferentes al resto de las células que conforman la membrana primaria (Fig. 1.103, 1.104). Algunas de estas células presentan pequeños orificios (Fig. 1.105).

El epitelio que tapiza el resto de la cavidad está formado por células globosas, presentando algunas de ellas orificios pequeños (Fig. 1.106).

Fig. 1.96 a, b – Aspecto general de una hemilaringotrúquea. MEB. a) 20x, b) 35x

A: aritenoides, c₁: cámara anterior, cv: cuerda vocal, mf: masa fibrosa, m₁: membrana primaria, P: entrada a los pulmones.

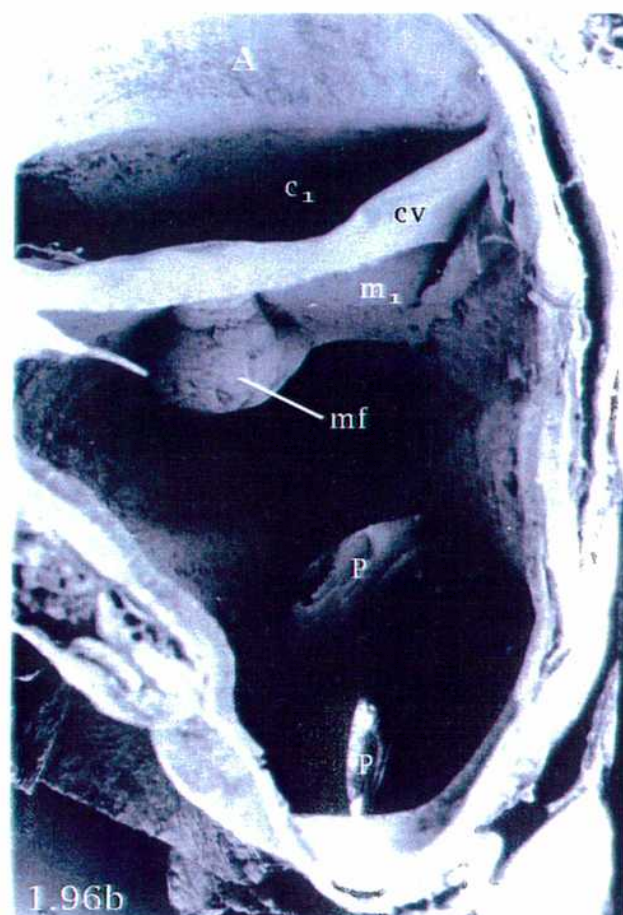


Fig. 1.97 – Cartilago aritenoides (A). MEB. 680x

Nótese los condrocitos (co).

Fig. 1.98 – Células poligonales con microvellosidades cortas y límites bien definidos (cabeza de flechas rojas). MEB. 5000x

Fig. 1.99 – Células con superficie globosa y límites celulares hundidos (cabeza de flechas rojas). MEB. 2500x

Fig. 1.100 a, b – Aspecto general y detalle de células poligonales con perforaciones (cabeza de flecha azul). MEB. 2500x

Nótese los límites celulares (cabezas de flecha rojas).

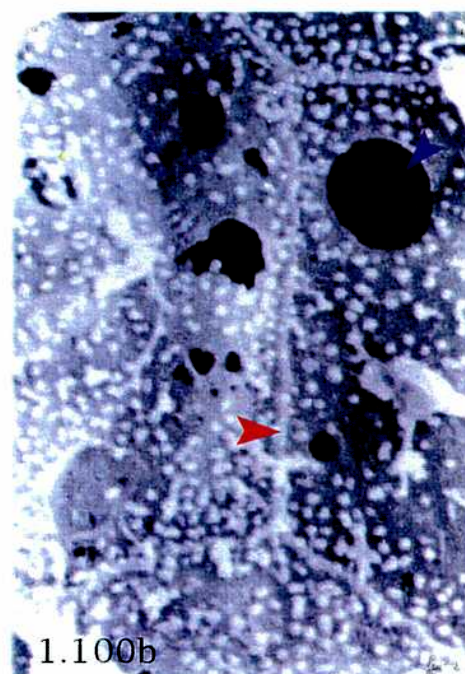
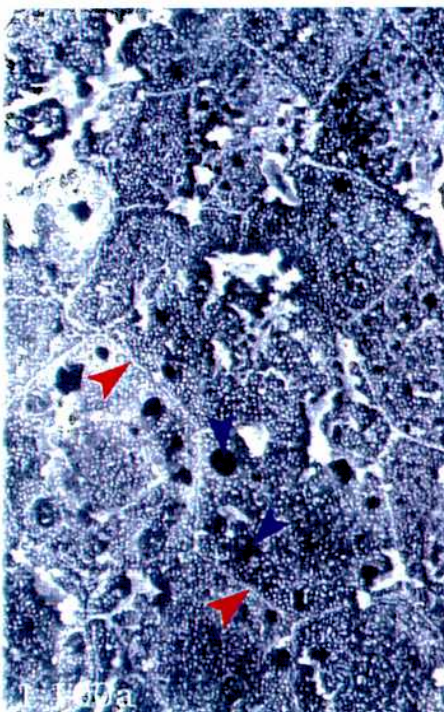
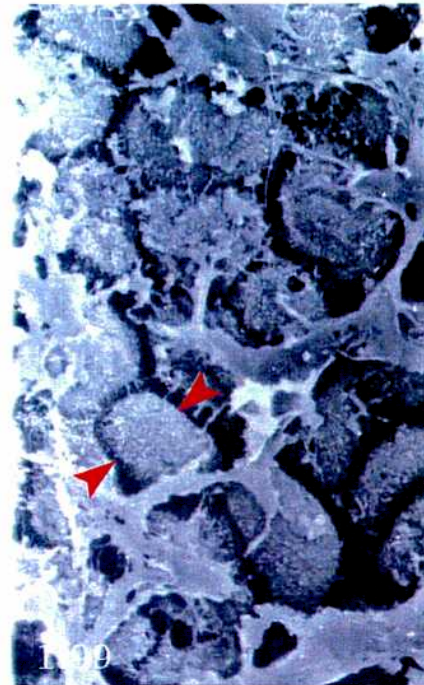
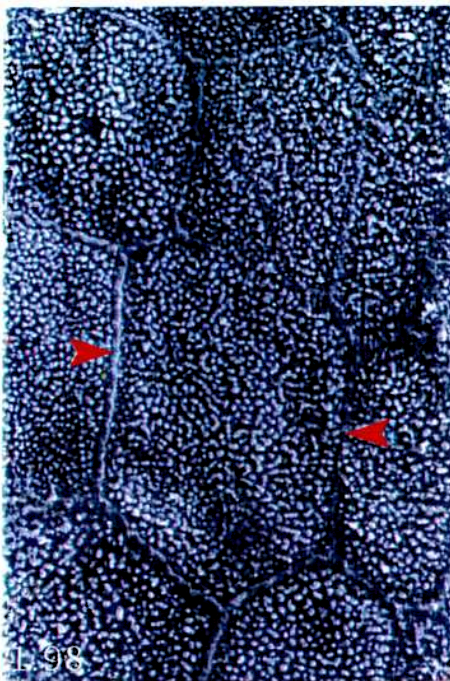


Fig. 1.101 – Células de la membrana primaria. MEB. 2500x

Fig. 1.102 – Detalle de la masa fibrosa (mf). MEB. 150x

Fig. 103 – Detalle de la zona de transición entre las células de la membrana primaria (cp) y las células que revisten a la masa fibrosa (mf). MEB. 1200x

Fig. 104 – Detalle de las células que revisten la masa fibrosa. MEB. 10000x

Nótese la presencia de microvellosidades cortas sobre su superficie (cabeza de flecha verde) como los límites celulares (cabeza de flecha fucsia).

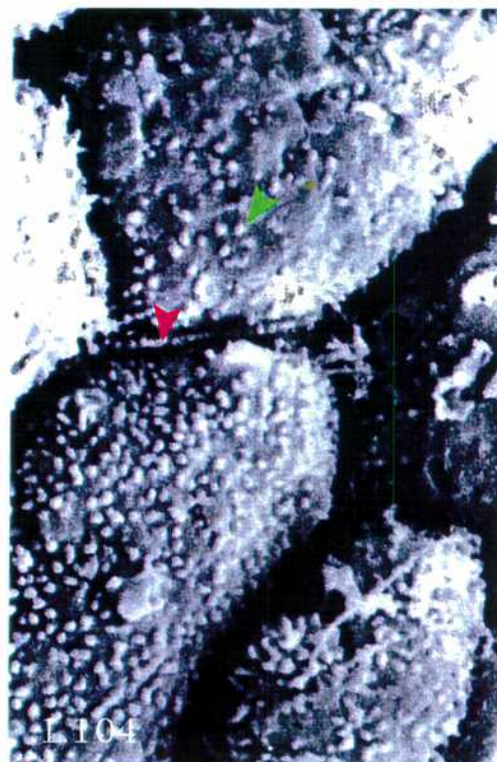
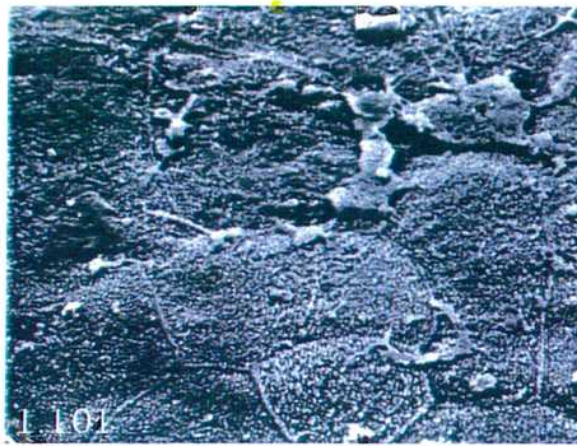
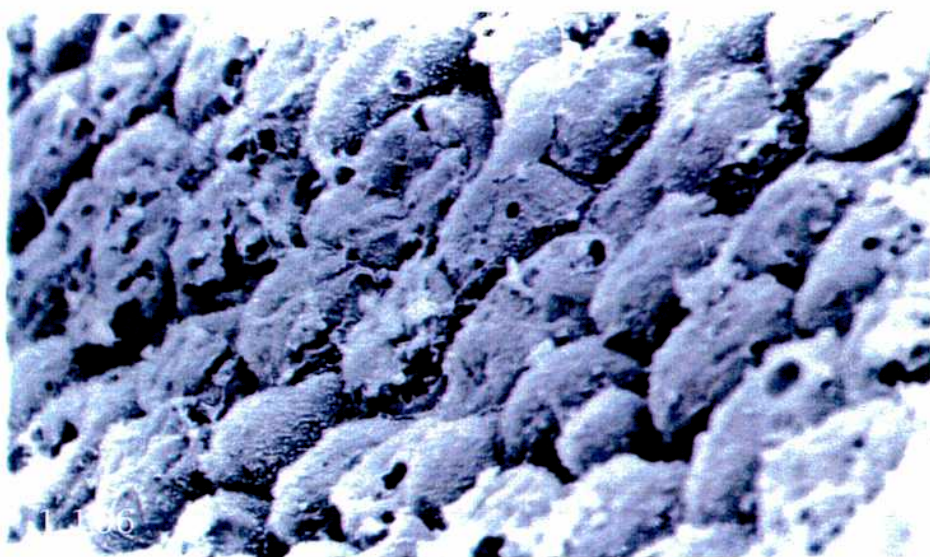


Fig. 1.105 – Detalle de células que revisten a la masa fibrosa. MEB. 5000x

Nótese la presencia de microvellosidades cortas y perforaciones (cabeza de flecha azul) sobre su superficie.

Fig. 1.106 – Detalle de células globosas que revisten la cavidad a la altura del cricoides. MEB. 2500x





DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La morfología de las vías extrapulmonares ha sido ampliamente considerada en una variedad de especies de mamíferos (Miani *et al.*, 1971; Jeffery y Reid, 1975; Kennedy *et al.*, 1978; Pack *et al.* 1981; Dalen, 1983; Plopper *et al.*, 1983, 1989; Wilson *et al.*, 1984; Robinson *et al.*, 1986). Sin embargo, en otros vertebrados tetrápodos, las investigaciones son muy escasas, existen algunos trabajos en aves, *Gallus domesticus* (Wash y McLelland, 1974) y *Gallus gallus* (Pal y Bharadway, 1970, 1971) y algunos en reptiles (Pastor, 1995).

En la actualidad, existen para los anfibios cuatro artículos científicos cuyo objetivo central es el estudio histológico de las vías extrapulmonares. Estos trabajos se realizaron en dos especies de anuros, *Bufo calamita* (Castells, *et al.* 1990) y *Rana perezi* (Pastor *et al.* 1998), un urodelo (Matsumura y Setoguti, 1996) y en *Chtonerpeton indistinctum* (ápodo) (De Carlo, 1980).

A partir del trabajo comparativo del hioides y del esqueleto laríngeo realizado por Trewavas (1933) se ha demostrado que el esqueleto hiolaringotraqueal tiene un valor importante en la interpretación de las relaciones filogenéticas. Parker (1940), Griffiths (1959) y McDiarmid (1971) confirmaron esta importancia reflejada en las diferentes afinidades filogenéticas.

En las dos especies de anuros estudiados en el presente trabajo de tesis se encontraron semejanzas y diferencias tanto anatómicas como histológicas que deben ser consideradas.

Desde un punto de vista anatómico el hioides tiene aproximadamente la misma estructura en ambas especies. En *B. arenarum* el cuerpo del hioides es más ancho en comparación con el

de *M.s. stelzneri*. Sin embargo, al tener este último la base de los procesos alares ensanchados y extendidos lateralmente con respecto al cuerpo del hioides, aparentemente parece ser más grande en comparación con el de *B. arenarum*. El proceso pósterolateral se ha conservado en esta especie mientras que en *M.s. stelzneri* se ha perdido evolutivamente. McDiarmid (1971) sugiere que la presencia del proceso pósterolateral en *Bufo* es considerada un carácter primitivo que estaría presente en la forma ancestral.

Si se compara la descripción del hioides realizada por Trewavas (1933) para los géneros *Bufo*, *Atelopus*, *Melanophryniscus* (este autor ilustró a *Melanophryniscus moreirae* bajo el nombre de *Dendrophryniscus stelzneri*) y *Oreophrynella*, con las observaciones efectuadas en este trabajo de tesis, existen coincidencias en cuanto a la ausencia del constrictor laríngeo posterior, la forma del cuerpo del hioides y la inclinación ventrodorsal del proceso pósteromedial del hioides. Estas similitudes en el aparato hiolaríngeo es un elemento más que justificaría la permanencia de *M. s. stelzneri* en la familia Bufonidae.

Teniendo en cuenta el estudio filogenético planteado por McDiarmid (1971) en el cual se analizaron 43 caracteres, entre los que se incluía el aparato hioideo y la presencia o no de cuerdas vocales, para los géneros de *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* y *Oreophrynella* se desprende que el género *Melanophryniscus* tiene el mayor número de caracteres primitivos y el menor número de caracteres derivados y es probablemente el que ha retenido muchas de las características ancestrales.

Los músculos asociados con el esqueleto hioideo y con la laringotráquea son los responsables de producir la apertura y cierre de la glotis debido al movimiento de los cartílagos aritenoides en su articulación con el cricoides.



La morfología de la laringotráquea de *B. arenarum* presenta similitudes y diferencias en los siguientes aspectos con la de *M. s. stelzneri*.

A) Los aritenoides de *B. arenarum* son triangulares mientras que los de *M. s. stelzneri* son cordiformes con una concavidad interna más pronunciada.

B) En ambas especies el cricoides es un anillo completo. En cuanto a sus procesos se encontraron diferencias. En *B. arenarum* se describen dos pares de procesos (X e Y) que hasta el momento no habían sido observados. En *M. s. stelzneri*, el proceso esofágico del cricoides es más corto mientras que los procesos laterales se marcan notoriamente.

C) Los procesos pulmonares (procesos bronquiales según Trewavas) en *B. arenarum* son mucho más largos que en *M. s. stelzneri* y presentan en su extremo distal un ensanchamiento palmiforme que se apoya sobre la cara lateral interna del pulmón.

En este trabajo de tesis se consideró que lo más apropiado es la denominación de procesos pulmonares, ya que están asociados a los pulmones.

D) Cada hemi-laringotráquea, en *M. s. stelzneri* presenta internamente una única cámara anterior, mientras que en *Bufo arenarum* como en otras especies del género *Bufo* (Martin, 1972) está dividida en dos cámaras: una anterior y otra posterior.

E) La cámara anterior en ambas especies, está delimitada por el epitelio de revestimiento del aritenoides y por el epitelio de revestimiento adluminal de la membrana primaria. Esta membrana cuando se pliega hacia el lumen de la laringotráquea forma la cuerda vocal.

F) Las cuerdas vocales en *B. arenarum* están unidas a la superficie interna del aritenoides. Sin embargo, en *M. s. stelzneri* el



margen interno de las cuerdas vocales está unido al cartílago aritenoides mientras que el otro borde está unido al margen interno del cricoides (Fig. 1.107). Éstas están revestidas por un epitelio simple cúbico a plano.

Cuando la laringotróquea está abierta, las cuerdas vocales están estiradas a lo largo del lado posterior de los aritenoides, los cuales se mueven en el plano medio mientras que los lados anteriores lo hacen lateralmente.

En todos los anuros la laringotróquea permanece cerrada cuando no actúa ninguna presión de aire o contracción muscular. La elasticidad de sus tejidos fuerza a los extremos anteriores de los cartílagos a mantenerse juntos. Esta elasticidad es importante porque los cartílagos aritenoides vibran durante la producción del sonido. Los aritenoides están forzados a separarse debido a la presión de aire proveniente de los pulmones y a retornar a su posición de cierre debido a la elasticidad de los tejidos. Como las cuerdas están deformadas por esta apertura y cierre, su vibración está mecánicamente ligada con la vibración de los aritenoides.

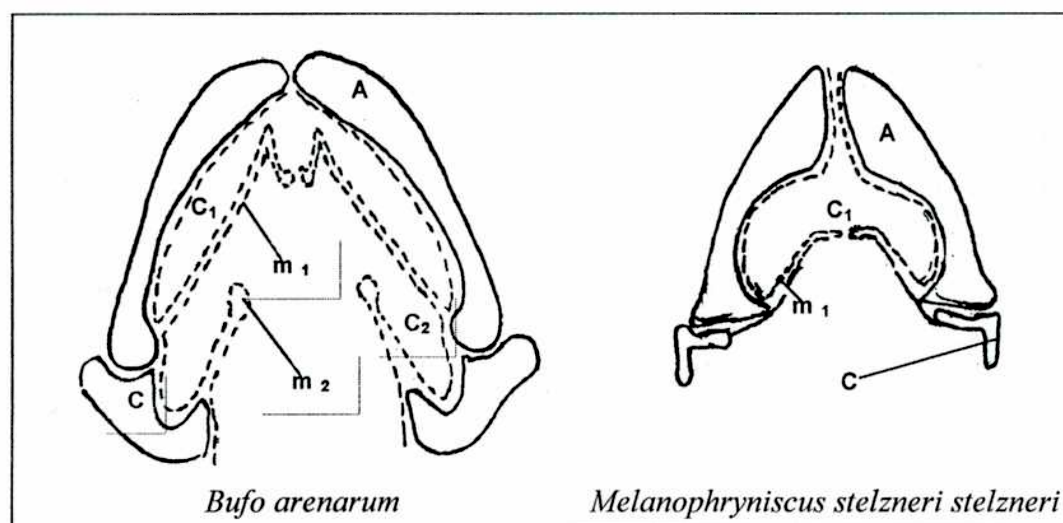


Fig. 1.107 Esquemas de la laringotróquea en corte transversal a las cuerdas vocales. Nótese la disposición de las membranas (m_1 y m_2) y cavidades (C_1 y C_2). C_1 : cámara anterior, C_2 : cámara posterior, m_1 : membrana primaria, m_2 : membrana secundaria.



G) Por lo expuesto anteriormente tanto en *B. arenarum* como en *M. s. stelzneri* la elasticidad de la laringotráquea está dada, por la abundancia de fibras elásticas en el tejido conectivo presente en las cuerdas vocales como en la lámina propia de la mucosa que reviste a los cartílagos.

H) Las cuerdas vocales presente un tejido de sostén en ambas especies: en el caso de *B. arenarum* un tejido conectivo denso, mientras que en *M. s. stelzneri* presenta, un tejido conectivo muy fibroso y un ligamento frenular condroide.

I) Todas las especies de *Bufo*, tienen en la porción lateral luminal de la membrana primaria una condensación de tejido conectivo denso (en *B. arenarum*) o bien un tejido cartilaginoso parenquimatoso (en *M. s. stelzneri*). En ambas especies se encuentran abundantes fibras elásticas. Estas protuberancias fibrosas, en el caso de *M. s. stelzneri*, están en contacto con los cartílagos aritenoides.

J) *M. s. stelzneri* diverge evolutivamente en este aspecto porque el ligamento frenular está condricado y rígidamente unido a la protuberancia fibrosa. Las observaciones realizadas con respecto al tipo de tejido presente en el ligamento frenular en el género *Melanophryniscus sp.* no coinciden con las de Martin (1972) que afirma que para este género no hay ligamentos frenulares condricados.

K) *B. arenarum* presenta (a diferencia de *M. s. stelzneri*) una membrana secundaria que se extiende entre los procesos X e Y del cricoides. El epitelio de revestimiento de ésta membrana junto con el epitelio de revestimiento de la membrana primaria delimitan una cámara posterior.

L) La última porción de la cavidad laringotraqueal de *B. arenarum* se abre en dos cámaras bien definidas, cada una de las



cuales se comunica con la porción proximal del pulmón. A pesar que las paredes de dicha cámara no presentan cartílago, debido a las características histológicas de los tejidos observados se asemejaría a la organización de un bronquio el cual se abre a cada pulmón. En *M. s. stelzneri* la cavidad laringotraqueal se comunica directamente a la porción anterior del pulmón.

M) El epitelio que reviste la laringotráquea en *B. arenarum* y *M. s. stelzneri* tiene algunas similitudes entre sí y entre otras especies de anuros estudiados (Pastor *et al.*, 1998; Castells *et al.*, 1990).

El epitelio que reviste el lumen de la laringotráquea en estas dos especies estudiadas está tapizado por un epitelio pseudoestratificado ciliado con células caliciformes y por un epitelio secretor.

- Para ambas especies el análisis histoquímico demuestra que en toda la laringotráquea existen distintos tipos de células caliciformes según su tipo de secreción o bien células caliciformes en diferentes estadios del ciclo secretorio. En todas ellas hay glicoconjugados neutros y ácidos. Éstos últimos pueden ser carboxilados y sulfatados y estar en una misma célula caliciforme o bien puede haber células caliciformes con glicoconjugados carboxilados únicamente. Con el objeto de poder determinar si existen o no distintas poblaciones de células caliciformes sería necesario realizar un estudio histoquímico utilizando lectinas así como un estudio con microscopía electrónica de transmisión para contestar este interrogante.
- Las células ciliadas se hallan presentes en ambas especies. Sin embargo en *M. s. stelzneri* no fueron observadas con M.E.B. debido posiblemente a que éstas estaban aglutinadas por la secreción .



➤ Las células poligonales sin cilias y con microvellosidades cortas y romas observadas al M.E.B., en ambas especies, se corresponden con las células secretoras descritas mediante la microscopía óptica. En el caso de *B. arenarum* todas las células secretoras tiene una superficie apical plana, mientras que en *M. s. stelzneri* hay células con superficie apical plana y/o globosa. Para ambas especies estas células secretoras apicalmente presentan orificios de distinto tamaño. Estas perforaciones les otorga un aspecto cribado el cual puede interpretarse como invaginaciones de la membrana plasmática como consecuencia de la liberación de los gránulos de secreción por exocitosis o rupturas de la misma en el caso que el mecanismo de liberación sea del tipo apócrino. Este tipo celular también fue observado en *Rana perezii* (Pastor *et al.*, 1998) y en la tráquea de algunos reptiles como *Mauremys caspica* (Pastor *et al.*, 1988) y *Natrix maura* (Pastor, 1995). Histoquímicamente la secreción de las células indica la presencia de glicoconjugados neutros y ácidos. En la laringotráquea de *R. perezii* (Pastor *et al.*, 1998) y en el epitelio de la laringe y la tráquea de los lacértidos y ofidios (Pastor *et al.*, 1988; 1989) ultraestructuralmente las células secretoras presentan abundantes cuerpos electrón-densos y estructuras mielínicas similares a los cuerpos lamelares de los neumocitos del pulmón. Esta característica morfológica indica que esta célula produce una secreción rica en fosfolípidos. Teniendo en cuenta esta característica y considerando que las células secretoras en *B. arenarum* y *M. s. stelzneri* tienen un aspecto esponjoso al microscopio óptico podemos especular que la secreción de



estas células no sólo es rica en glicoconjugados sino que también podría presentar fosfolípidos.

- En *B. arenarum* mediante técnicas inmunohistoquímicas se determinó la presencia, entre las células secretoras que revisten al cricoides y aritenoides, de células neuroendócrinas (CNE) debido a su inmunoreactividad con el PGP 9,5. Entre los vertebrados no mamíferos, la presencia de CNE han sido detectadas por microscopía electrónica e inmunocitoquímica tanto en peces pulmonados, anfibios, reptiles y aves (Pastor, 1995; Zaccane *et al.*; 1995 a,b). En las vías extrapulmonares de los urodelos *Cynops pyrrhogaster* (Adriaensen *et al.*, 1994) e *Hynobius nebulosus* (Gomi *et al.*, 1994) se han clasificado a los distintos CNE de acuerdo con su inmunoreactividad denominándolos CNE con serotonina, somatostatina, calcitonina y bombesina. En las vías extrapulmonares de anuros hasta el momento se han detectado solamente CNE en *Rana temporaria* (Bodegas *et al.*, 1995) y en *R. perezi* (Pastor, 1998) las cuales son inmunoreactivas a la bombesina, sustancia P, polipéptido 7B2, al PHI (péptido histidina-isoleucina) y CGRP (péptido liberador de gastrina). No se han detectado CNE con inmunoreactividad para la serotonina. Desde el punto de vista inmunohistoquímico estos estudios sugieren que las CNE de la laringotróquea en anuros presentan una importante heterogeneidad. A partir de la caracterización de los CNE en la laringotróquea de *B. arenarum* surge un nuevo interrogante que es el de determinar qué tipo de sustancia química producen estas células y cuál sería su función. Si bien no han sido detectados CNE en la laringotróquea de *M. s. stelzneri* por métodos inmunohistoquímicos, si se comparan



las características morfológicas de las células aisladas encontradas en el epitelio secretor del cricoides observadas al microscopio óptico con las CNE halladas en *B. arenarum* se puede inferir que se trataría del mismo tipo celular. Por lo tanto *M. s. stelzneri* también tendría CNE.

Dada la importancia que tiene la laringotráquea de los anuros para establecer relaciones filogenéticas a partir de este trabajo de tesis se dan bases morfológicas para realizar experimentos que permitan interpretar fisiológicamente y etológicamente los distintos tipos de cantos en los anuros.

CAPÍTULO II

PULMÓN



INTRODUCCIÓN

La estructura y función de los pulmones de los anfibios ha sido motivo de distintos estudios desde el siglo XVII (Burggren, 1989). Algunas de las razones para explicar este interés radica en que dentro de los tetrápodos desde el punto de vista de su morfología y fisiología los anfibios tienen los pulmones más simples. Esta simplicidad facilita enormemente la investigación de fenómenos básicos de la biología pulmonar de los vertebrados. Otra razón sería la capacidad de adaptación de la fisiología respiratoria que acompaña al proceso de metamorfosis en este grupo de vertebrados. Estos pasan por una transición ontogenética desde una larva acuática hasta un adulto semi o totalmente terrestre con un estilo de vida respaldado principalmente por un intercambio gaseoso pulmonar. La morfología y fisiología básica de tal transición es de gran interés para los biólogos.

1. Anatomía general del pulmón en los anfibios

Como se mencionó en la introducción general, los pulmones en los anfibios presentan una variabilidad anatómica donde los pulmones tienen una forma ovoide o alargada y una superficie interna lisa o plegada de acuerdo al orden considerado.

1.1 Irrigación pulmonar

En los anfibios, la sangre que ingresa a la arteria pulmonar proveniente de la aurícula derecha, cuya sangre está parcialmente oxigenada debido a que el drenaje venoso de sangre oxigenada que deja la piel se mezcla con el drenaje venoso proveniente de los



tejidos del resto del cuerpo antes de entrar a la aurícula derecha. La sangre de la arteria pulmonar también contiene algo de sangre proveniente de la aurícula izquierda porque ambas aurículas vuelcan su contenido dentro de un único ventrículo con trabéculas. La circulación de la arteria pulmonar en los anfibios se origina en la porción final del cono arterial, el cual está dotado de una válvula espiral que da un giro prácticamente completo, y hace que existan canales por los que la sangre es enviada hacia los arcos sistémicos y pulmocutáneos. En anfibios anuros, un tronco pulmocutáneo se bifurca distalmente produciendo un par de arterias pulmonares y pequeñas arterias cutáneas que irrigan a la piel (Burggren, 1989) (Fig. 2.1, a, b)

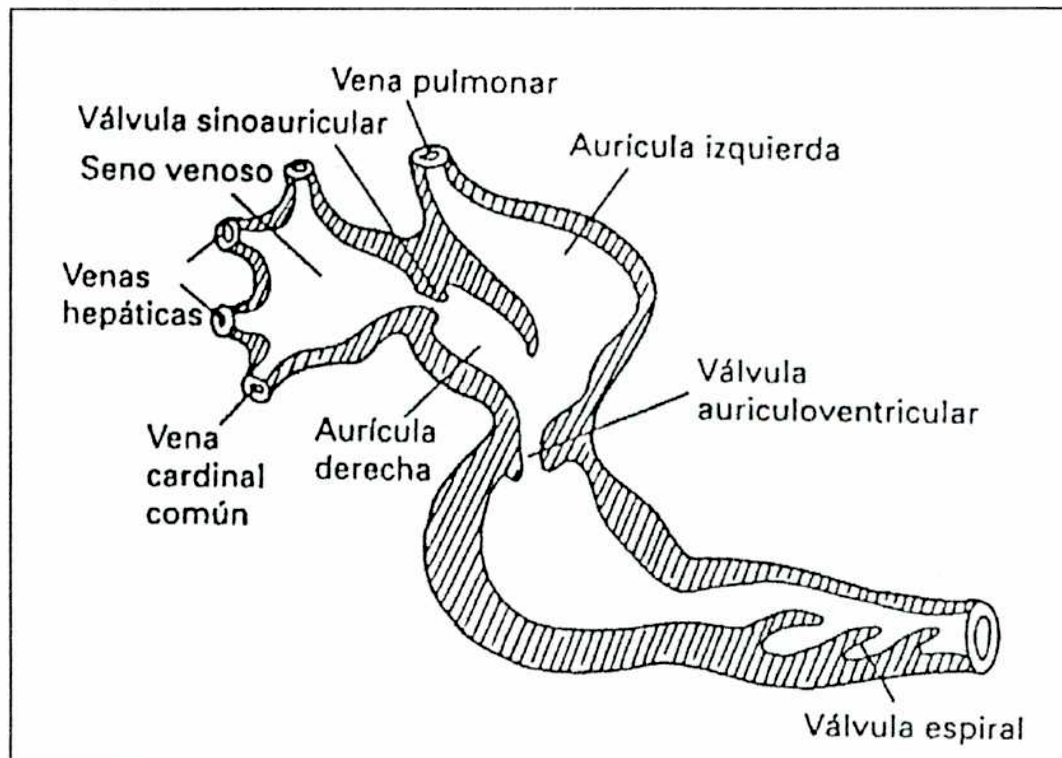


Fig.2.1 a: Esquema del corazón de un anfibio típico (Según Kardong, 1995).

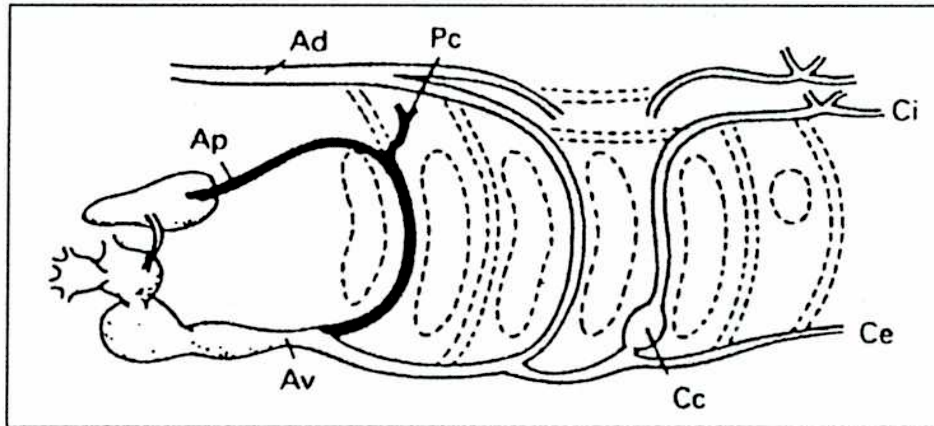


Fig.2.1 b: Circulación sanguínea en los arcos aórticos de los anfibios. (Según Kardong, 1995) Ad: aorta dorsal; Av: aorta ventral; Pc: arteria pulmocutánea; Ap: arteria pulmonar; Ce: carótida externa; Ci: carótida interna; Cc: cuerpo carotídeo

De acuerdo con la longitud y estructura de la tráquea, bronquios y pulmones, las arterias pulmonares son muy cortas como en *Bufo marinus*, o con una longitud intermedia como en *Xenopus laevis* (Smith y Rapson, 1977), o de mayor longitud como en *Typhlonectes compressicauda* (Burggren, 1989).

El patrón general de distribución de la arteria pulmonar dentro del pulmón ha sido descrito para muy pocos anfibios (Burggren, 1989; Goniakowska-Witalińska, 1995). La mayor diferencia existente en el patrón de perfusión se observa en los pulmones de dos anuros, *B. marinus* y *X. laevis* (Fig. 2.2). En *Xenopus*, el cual tiene un pulmón alargado, la arteria pulmonar corre como un tronco axial posterior a lo largo de la longitud del pulmón, del cual parten vasos perpendiculares circunferenciales a intervalos regulares. De ellas surgen desde los vasos circunferenciales: cortas arteriolas, las cuales abastecen a los capilares de la pared pulmonar y la de los septos (Smith y Rapson, 1977).

En *B. marinus*, el cual tienen un pulmón más globular, la arteria pulmonar se divide inmediatamente ingresando al parénquima pulmonar. Tres arterias mayores que corren de forma más o menos paralelas sobre la superficie pulmonar, emiten arterias radiales a



intervalos regulares (Fig. 2.2). Una descripción similar se determinó en los pulmones de *Rana esculenta* y *Rana temporaria* (Burggren, 1989).

La circulación venosa en *Bufo* y *Xenopus* es esencialmente una imagen especular de la distribución arterial de los vasos.

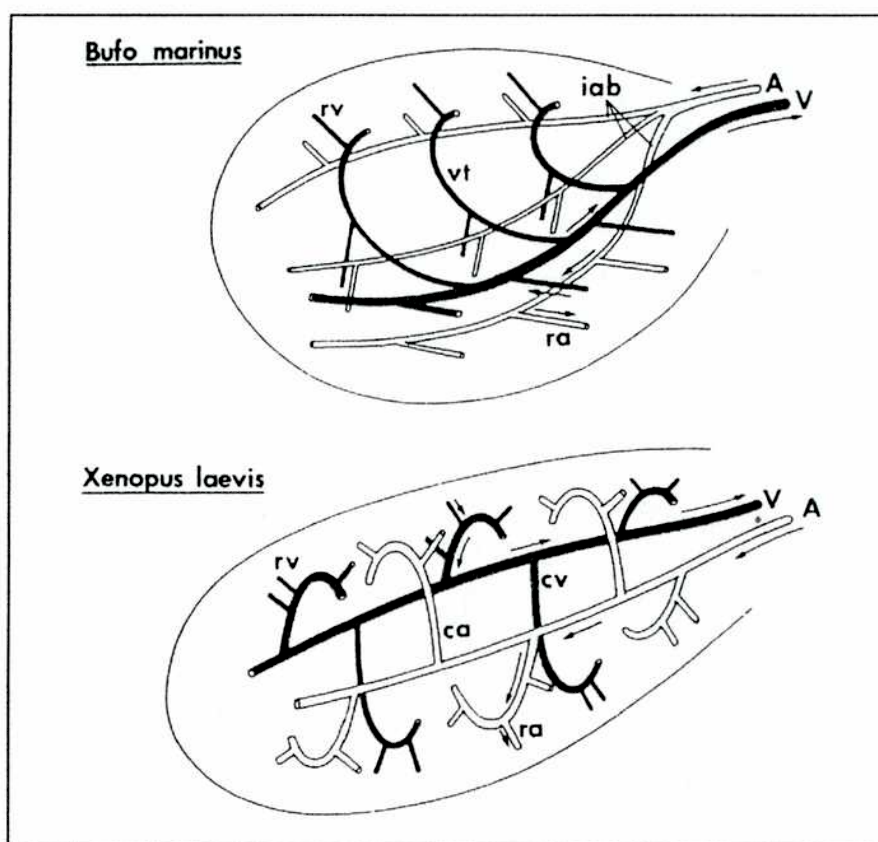


Fig. 2.2 Representación del patrón circulatorio sanguíneo en *X. laevis* y *B. marinus*.

→ Dirección del flujo sanguíneo (Según Smith y Rapson, 1977). A: arteria pulmonar; ca: arteria circunferencial; cv: vena circunferencial; iab: ramas arteriales; ra: arteria radial; rv: vena radial; vt: vena tributaria; V: vena pulmonar.

Una considerable simplificación de la circulación se da en las salamandras sin pulmones, donde el bulbo arterial es simple y el septo interventricular está poco desarrollado.

Una descripción del sistema vascular estaría incompleta si no se considera a los vasos linfáticos. Desafortunadamente es poco lo que



se sabe sobre el sistema linfático en general en los anfibios, particularmente de la morfología y fisiología del sistema linfático pulmonar. Se sospecha que el vaso linfático pulmonar podría jugar un rol crítico en mantener de manera apropiada el balance de fluidos en los pulmones (Burggren, 1989).

1.2. Inervación pulmonar

a) Fibras motoras

Existe una considerable información sobre la inervación eferente de los músculos lisos, pero ésta se extiende mucho menos cuando se refiere a la vasculatura del pulmón de los anfibios. Es de destacar que los estudios existentes han sido en anuros, particularmente en *B. marinus*.

Las fibras nerviosas tanto excitatorias como inhibitoras que alcanzan a los pulmones provienen del tronco denominado vago-simpático. En los anfibios el nervio vago está unido a una larga rama de la cadena simpática, tal que el tronco del vago contiene ambos elementos, simpático y parasimpático (Goniakowska-Witalińska, 1995).

El rol de la inervación eferente del pulmón no es muy clara, aunque su morfología ha sido descripta para algunos anuros. La contracción regional del músculo liso podría jugar un rol en el ajuste de la superficie respiratoria de los "alvéolos" pulmonares. La contracción de estos músculos durante la inspiración y espiración podrían facilitar la ventilación pulmonar (Burggren, 1989).

b) Fibras sensoriales

La inervación aferente en los pulmones de los anfibios, ha sido objeto de pocos estudios. Hasta el momento no se sabe con total

claridad el sitio exacto, y la estructura receptora sensorial en los pulmones, ni el recorrido de las fibras de regreso al sistema nervioso central.

Algunos estudios indican que los pulmones de los anuros contienen mecanorreceptores estimulados para adaptar el volumen pulmonar así como mecanorreceptores sensibles a cambios locales en los niveles de O₂ y CO₂ (Burggren, 1989).

2 Aspectos histológicos

2.1 Pared pulmonar

La pared pulmonar presenta tres componentes, una capa externa formada por un epitelio simple plano, una capa de tejido conectivo y una capa interna constituida por un epitelio ciliado o bien un epitelio respiratorio. La capa de tejido conectivo contiene fibroblastos, fibras musculares lisas, fibras elásticas, melanóforos, ocasionalmente células sanguíneas migratorias y mastocitos. Además contiene arterias, venas, arteriolas y vénulas, así como numerosos capilares sanguíneos.

La pared pulmonar, especialmente la capa media e interna, puede formar numerosos septos de primero, segundo y tercer orden, los cuales delimitan grandes cavidades descritas como sacos gaseosos o alvéolos (Fig.2.3).



2.2 Parénquima pulmonar

2.2.1 Generalidades

Los pulmones de los anfibios están bien vascularizados y presentan una superficie interna variable la cual puede ser lisa o estar septada.

Según Smith y Campbell (1976) los niveles de tabicación (primarios, secundarios, terciarios) en el pulmón de los anfibios están diferenciados por sus distintas alturas, a partir de una base común que es la capa interna de la pared pulmonar de donde se originan.

La delgada pared de los septos está dilatada en la porción apical por un rodete de fibras musculares lisas las cuales están acompañadas por venas, en el caso de los septos de primero y segundo orden (Fig. 2.3). La superficies laterales de todos los septos y el extremo apical de los septos terciarios están revestidos por un epitelio respiratorio, mientras que el extremo apical de los septos mayores están tapizados por un epitelio pseudoestratificado ciliado con o sin células caliciformes. A ambos lados de los septos se ubican los capilares sanguíneos (Goniakowska-Witalińska, 1995).

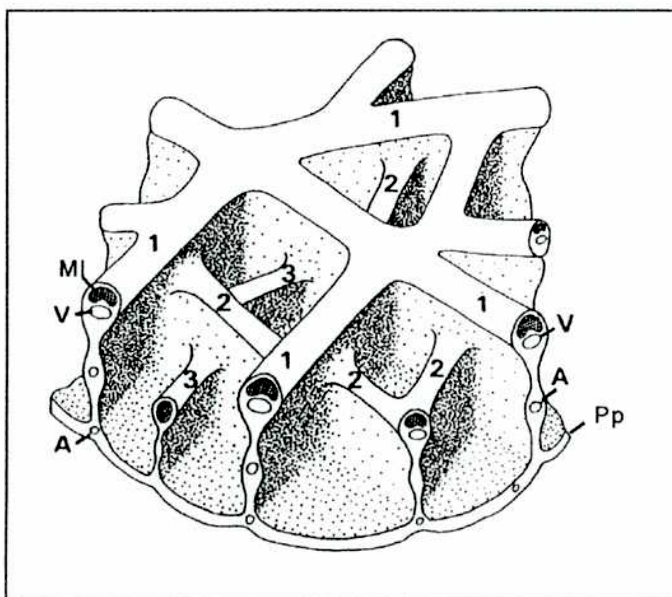


Fig.2.3

Esquema representando el patrón de septación del pulmón de un Anuro. (Según Goniakowska Witalińska, 1995).

- 1: septo primario;
- 2: septo secundario;
- 3: septo terciario;
- A: arteria;
- Ml: músculo liso;
- Pp: pared pulmonar;
- V: vena.



2.2.2 Parénquima pulmonar en los tres órdenes de anfibios

La superficie interna del pulmón en el orden Apoda como en el caso de *Chthonerpeton indistinctum* y *Siphonops annulatus* está caracterizada por la presencia de un solo tipo de septo corto y romo que forma una red de mallas poligonales, limitando cada polígono a un alvéolo poco profundo. Los septos están formados por un estroma conjuntivo, revestido exclusivamente por un epitelio respiratorio. Por ese estroma corren haces musculares lisos y una densa red de fibras elásticas. En la porción anterior del pulmón se observa en las especies estudiadas la infiltración de cartílago hialino. El epitelio ciliado existe únicamente en forma de una amplia banda diferenciada que sigue interiormente el trayecto de la arteria pulmonar a lo largo del órgano (De Carlo, 1980; Kuehne y Junqueira, 2000) (Fig. 2.4 a)

Los urodelos están asociados principalmente a ambientes acuáticos más que a terrestres. Los tritones europeos como *Triturus* y *Proteus* así como algunas especies americanas como *Cryptobranchus*, *Notophthalmus* o *Necturus* poseen pulmones pobremente vascularizados con una superficie interna lisa (Noble, 1957; Okada et al. 1962; Meban, 1977; Goniakowska-Witalińska, 1980 a,b; 1995) (Fig. 2.4 c). Esta característica pulmonar, que cumple aquí más bien una función hidrostática y menos respiratoria se considera por algunos autores (Goodrich, 1930; Marcus, 1927) como posiblemente secundaria, consecuentes al fenómeno de reducción, dada la existencia en tales pulmones de grandes arterias pulmonares, casi del mismo diámetro que el de las propias cavidades respiratorias. Para Noble (1957) la simplicidad de la estructura de los pulmones, en este grupo, podría resultar por una degeneración o bien por la conservación de rasgos larvales.

En las especies anteriormente mencionadas, el intercambio gaseoso se produce a través de la superficie bucofaríngea y la piel (Burggren, 1989).

En otras especies de urodelos como en *Amphiuma*, *Siren* (urodelos acuáticos) y *Salamandra* o *Hynobius* (urodelos terrestres) los pulmones juegan un rol predominante en el intercambio gaseoso. En estos casos, la superficie interna no es lisa, sino que está provista de numerosos, aunque cortos, septos de primer, segundo y tercer orden (Goniakowska-Witalińska, 1978; Meban, 1979; Bell y Stark-Vancs, 1983; Matsumura y Setoguti, 1984). Estos pulmones son anatómicamente similares al de los peces pulmonados (Maina, 1987; Góes de Moraes, 2001) (Fig. 2.4 d).

Los septos de primer, segundo y tercer orden, de diferente longitud, se interconectan entre sí formando una red que penetra dentro del lumen y lo dividen en numerosas cámaras de diferentes tamaños (Okada, *et al.*, 1962; Dietrich, 1975; Smith y Campbell, 1976; Goniakowska-Witalińska, 1986, Maina, 1989; Goniakowska-Witalińska y Cutz, 1990 (Fig.2.2, 2.4 c).

En el caso de anuros acuáticos como *Pipa pipa* y *Xenopus laevis*, dos géneros de la familia Pipidae, la estructura interna del pulmón muestra una importante división que produce la formación de pequeños y numerosos alvéolos lo cual lleva a un incremento de la superficie respiratoria. Además, éstas dos especies tienen la estructura interna pulmonar reforzada por cartílago. Éste se encuentra en la pared de los septos de primer orden en *P.pipa* y formando engrosamientos sobre los extremos de los principales septos en *X. laevis*. Tales engrosamientos probablemente ayuden a evitar que los pulmones se colapsen cuando los animales permanecen en el fondo de los cuerpos de agua debido a un aumento de la



presión hidrostática (Burggren, 1989; Goniakowska-Witalińska, 1995).

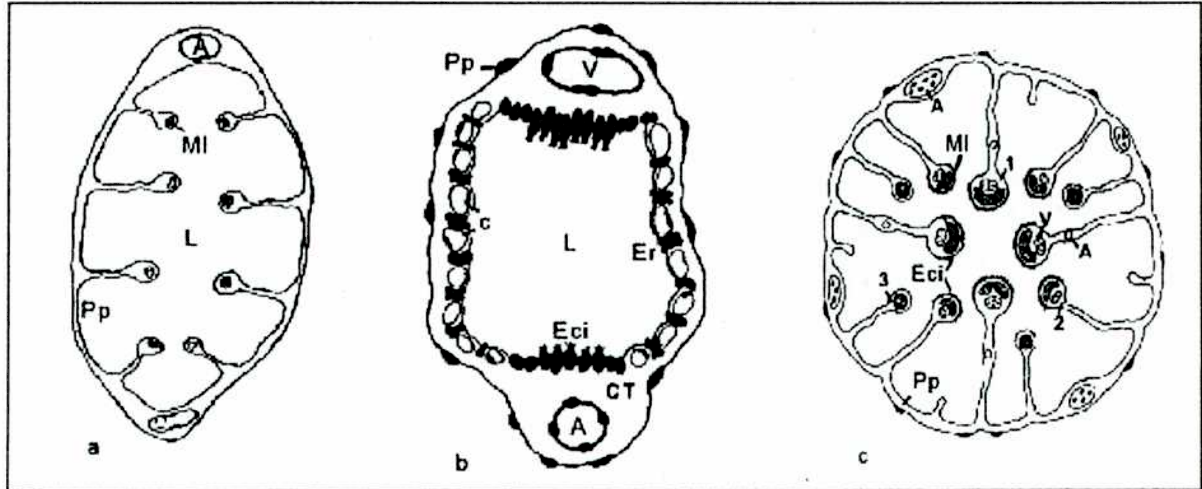


Fig. 2.4 Esquemas representando cortes transversales de pulmón en los tres ordenes de Anfibios. a: Apoda; b, c: Urodela; c: Anura. (b y c según Goniakowska-Witalińska, 1995)

a) Epitelio ciliado

En los pulmones de los urodelos y anuros, el epitelio ciliado cubre exclusivamente la parte apical de los septos de primer y segundo orden, mientras que no sucede lo mismo en los septos de los pulmones de los apodos como se describió anteriormente.

En especies del orden Urodela, como *Salamandra salamandra*, *Amphiuma tridactylum* e *Hynobius nebulosus* una capa de epitelio ciliado cubre la región apical de los septos (Goniakowska-Witalińska, 1978; Bell y Stark-Vancs, 1883; Matsumura y Setoguti, 1984). En aquellas especies que poseen una superficie interna lisa como en *Triturus vulgaris*, *T. alpestris*, *T. cristatus carnifex* el epitelio ciliado está localizado principalmente a lo largo de la vena y arteria pulmonar (Okada et al. 1962; Czopek, 1965; Goniakowska-Witalińska, 1980 a,b).

En Anura, el epitelio ciliado se ubica en el extremo apical de los septos de primero y segundo orden como se observa en *Bufo bufo*, *B. viridis*, *Bombina variegata* y *B. orientalis* (Goniakowska-Witalińska, 1990, 1995). Los pulmones de *Rana temporaria* y *R. esculenta* muestran la presencia de este tipo de epitelio sólo en los extremos de los septos de primer orden mientras que en *Hyla arborea* éste está reducido a pequeños parches irregularmente distribuidos (Goniakowska-Witalińska, 1986).

Las células ciliadas pueden estar distribuidas en un epitelio simple o en uno pseudoestratificado como se observa en la mayoría de los pulmones de los urodelos y anuros. Estas células se caracterizan por tener forma columnar y un núcleo prominente. Las observaciones con MET indican que la región supranuclear contiene numerosas mitocondrias, un aparato de Golgi prominente, retículo endoplasmático rugoso (RER), microtúbulos y ribosomas libres. Especialmente en Urodela, se observa en el citoplasma una abundante cantidad de cuerpos lamelares así como de sus precursores: cuerpos electrónicamente densos y cuerpos multivesiculares, su superficie apical muestra numerosas cilias y microvellosidades largas. Las células del epitelio ciliado y respiratorio están interconectadas por medio de *zonula adherens*, desmosomas e interdigitaciones de membrana.

Entre las células ciliadas pueden ubicarse células caliciformes, secretoras de mucus y células neuroendócrinas (ver Capítulo III para éste último tipo celular).

b) Epitelio respiratorio – Neumocitos

El epitelio respiratorio de los anfibios contiene un solo tipo de neumocitos en contraposición con los pulmones de los reptiles, aves y

mamíferos donde hay dos tipos de neumocitos (I y II) (Meban, 1973; 1977, 1979; Goniakowska-Witalińska, 1978; 1980 a, b; 1986; Matsumura y Setoguti, 1984). Sin embargo, algunos autores han postulado la presencia de dos tipos de neumocitos para los anfibios (Okada *et al.*, 1962; Nagaishi *et al.*, 1964).

Las observaciones con MEB han revelado que la mayoría de los neumocitos se encuentran directamente sobre la pared de los capilares. Esta última disposición aumenta el grosor de la barrera de intercambio gaseoso, dificultando su eficiencia. El cuerpo celular de un neumocito está localizado en la red de capilares, mientras que sus delgados procesos citoplasmáticos cubren los capilares adyacentes. La superficie de los neumocitos está cubierta por cortas microvellosidades.

Al MET se observa que los neumocitos de los anfibios tienen un núcleo de gran tamaño, abundantes mitocondrias, numerosas cisternas de RER, complejo de Golgi, cuerpos multivesiculares y retículo endoplasmático liso (REL). En la proximidad del complejo de Golgi se encuentran pequeñas vesículas cuyo contenido muestra una moderada densidad. La mayor parte del citoplasma está ocupada por cuerpos electrónicamente densos (CD) en diferentes estados de transformación, así como por numerosos cuerpos lamelares (CL). Estos últimos cuerpos son escasos en los pulmones cuya superficie es lisa como en los tritones (Goniakowska-Witalińska, 1980 a, b) o no han sido encontrados como por ejemplo en *Triturus pyrrhogaster* y *T. cristatus* (Okada *et al.*, 1962; Meban, 1977).

El surfactante, agente tensioactivo, es producido en los neumocitos, siendo posteriormente acumulado y almacenado en los CD y en los CL. En algunas especies de anuros como *Hyla arborea* se observa cuerpos multivesiculares fusionados con los CL. Los CL son liberados por exocitosis al lumen donde gradualmente van formando



una monocapa. En algunos casos los CL una vez en el espacio aéreo forman figuras tubulares de mielina. Estas figuras son observables en los pulmones de los vertebrados superiores sin embargo no son muy frecuentes en los anfibios (Goniakowska-Witalińska, 1984; Goniakowska-Witalińska, 1995).

En la mayoría de las especies del orden Urodela estudiadas como *S. salamandra*, *T. alpestris*, *T. cristatus carnifex* y *Amphiuma tridactylum*, los fosfolípidos liberados a partir de los CL forman pequeños o grandes agregados pero no pasan por un estado de figuras tubular de mielina salvo *Ambystoma mexicanum* y *Hynobius nebulosus* (Goniakowska-Witalińska, 1978; 1980a, b; Meban, 1977; 1979; Dierichs y Lindner, 1979; Stark-Vancs *et al.*, 1984, Matsumura, 1984). En el pulmón de los apodos no se han encontrado figuras de mielina (Welsh, 1981).

En los anuros las figuras de mielina son poco frecuentes, se han observado como figuras escasas en los pulmones de *H. arborea*, mientras que en *R. temporaria* y *B. bufo* las figuras de mielina consisten en una doble membrana la cual está distribuida regularmente formando un reticulado (Goniakowska-Witalińska, 1984; Dierichs y Lindner, 1979).

c) Macrófagos

En contraste con lo observado en los pulmones de los vertebrados superiores, los macrófagos no se encuentran frecuentemente en la pared pulmonar, epitelio o lumen pulmonar de los anfibios. El número de macrófagos está positivamente correlacionado con el nivel metabólico de los animales por eso es que numerosos macrófagos se encuentran por ejemplo en *A. tigrinum*, *B. bufo* y *B. viridis* (Goniakowska-Witalińska, 1995).



Los macrófagos poseen un núcleo grande reniforme, numerosas mitocondrias y lisosomas así como cuerpos electrón denso. La superficie celular presenta prolongaciones citoplasmáticas las cuales facilitan el proceso de endocitosis.

d) Capilares sanguíneos y la barrera de intercambio gaseoso

Por debajo del epitelio respiratorio se extiende una red de capilares sanguíneos que hacen protrusión al lumen. En los anuros, por ejemplo en *H. arborea* o *B. bufo*, los capilares están localizados por debajo del epitelio ciliado (Goniakowska-Witalińska, 1986; Goniakowska-Witalińska y Cutz, 1990).

Desde el punto de vista morfológico, la eficiencia del intercambio gaseoso está influenciada por dos factores principales: la densidad de la red de capilares y el grosor de la barrera de intercambio.

La barrera de intercambio gaseoso está compuesta por tres capas: un epitelio, un espacio intersticial y un endotelio. El epitelio se corresponde con las prolongaciones citoplasmáticas delgadas de los neumocitos donde la cantidad de organelas es escasa. En el caso de barreras gruesas, el espacio intersticial presenta numerosas fibras colágenas mientras que éstas están ausentes en las barreras más delgadas. El endotelio capilar es delgado y relativamente liso en las áreas que participan en el intercambio gaseoso y engrosado con algunas protrusiones en las áreas que dan hacia el tejido conectivo. Además de las típicas organelas, las células endoteliales contienen numerosas vesículas pinocíticas, cuerpos electrón denso y cuerpos elongados de Weibel-Palade que son característicos de las células endoteliales de los mamíferos (Weibel y Palade, 1973). Esta última estructura fue observada en muchas especies de anfibios, aunque al



compararse con la de los mamíferos, muestra una alta densidad electrónica (Goniakowska-Witalińska, 1978; 1986). El endotelio pulmonar es los anfibios es continuo a diferencia del observado en los mamíferos que es fenestrado (Gomi *et al.*,1987).

El objetivo de éste capítulo es el de caracterizar la anatomía e histología de los pulmones de *B. arenarum* y *M.s. stelzneri*.

RESULTADOS

2.1 Pulmón de *Bufo arenarum*

2.1.1 Microanatomía

2.1.1.1 Microscopía óptica

2.1.1.1.1 Estudio topográfico

Los pulmones de *Bufo arenarum* son sacos delicados, de aspecto esponjoso los cuales se comunican directamente con la laringotráquea (Fig. 2.5). A través de la delgada pared pulmonar puede observarse una red poligonal, donde cada polígono corresponde a una cámara. Estas cámaras son de diferentes tamaños, están delimitados por la conexión de los septos (Fig 2.6).

La vista interna de la superficie pulmonar revela la presencia de numerosos septos de primero, segundo y tercer orden, los cuales hacen saliencia dentro del lumen pulmonar incrementando la superficie respiratoria (Fig 2.7).

La pared pulmonar presenta cuatro componentes. El pleuroperitoneo, constituido por un epitelio simple plano (mesotelio) con núcleos ovoides dispuestos sobre un delgado tejido conectivo laxo. El segundo componente, de mayor grosor, está formado por un tejido conectivo denso con abundantes fibras colágenas, escasos fibrocitos y delgadas fibras elásticas. Este segundo tejido no forma parte de la estructura de los septos. El tercer componente se caracteriza por tener un escaso tejido conectivo laxo con fibras elásticas y fibras musculares lisas dispuestas como células aisladas o bien en pequeños grupos formando delicados engrosamientos, este se extiende hacia el interior del lumen pulmonar para formar el tejido de sostén (eje) de los septos. También se destaca la presencia de tres ramas provenientes de la arteria pulmonar que corren a todo lo

largo de la pared pulmonar así como ramas provenientes del nervio vago. No se observa la entrada de la vena pulmonar. Por último, se encuentra un epitelio respiratorio que rodea a los capilares sanguíneos (Fig. 2.8 a, b, c y d).

Los septos pulmonares presentan en corte transversal un eje y una dilatación apical. La parte central del eje contiene una delgada red de fibras colágenas, fibras elásticas y fibras musculares lisas aisladas, acompañadas por fibrocitos, mastocitos y plexos nerviosos. Algunas regiones de los mismos están engrosadas por rodetes de músculo liso dispuestos longitudinal y/o transversal (Fig. 2.9 a, b, c y d). Ambos lados de los septos están revestidos por un epitelio respiratorio. Los extremos apicales de los septos, en corte transversal, son redondeados u ovalados y presentan una dilatación dada por un rodete de fibras musculares lisas, fibras elásticas, tejido conectivo laxo y una vénula (Fig. 2.10)

Los tres tipos de septos presentes pueden ser reconocidos por el tipo de epitelio que reviste el extremo apical. Los septos de primer orden poseen un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes (Fig. 2.11 a, b). Los septos de segundo orden tienen un epitelio similar pero carecen de células caliciformes. Los septos de tercer orden están revestidos solamente por un epitelio respiratorio. Las células de éste epitelio, los pneumocitos, muestran un cuerpo celular prismático del cual se emiten delgados procesos citoplasmáticos que se extienden sobre la superficie de los capilares sanguíneos (Fig. 2.12 a, b, c).

Los macrófagos alveolares son escasos en el lumen pulmonar. Estas células varían su forma de acuerdo a su estado funcional pudiendo ser irregulares con filopodios. El núcleo es irregular, heterocromático y el citoplasma es vacuolado (Fig. 2.13).

Fig. 2.5 - Aspecto general del sistema respiratorio de *Bufo arenarum* fijado con líquido de Bouin. 5x

Fig. 2.6 - Detalle de pulmón. Nótese a través de la pared pulmonar cámaras de distinto tamaño. 65x

Fig. 2.7 - Corte transversal del pulmón. Tricrómico de Masson modificado. 100x

Cb: cavidad bucal, pf: pliegues faríngeos, g: glotis, l: lumen, P: pulmón, P₁: septo primario, P₂: septo secundario, P₃: septo terciario, P_p : pared pulmonar, V: rama del nervio vago

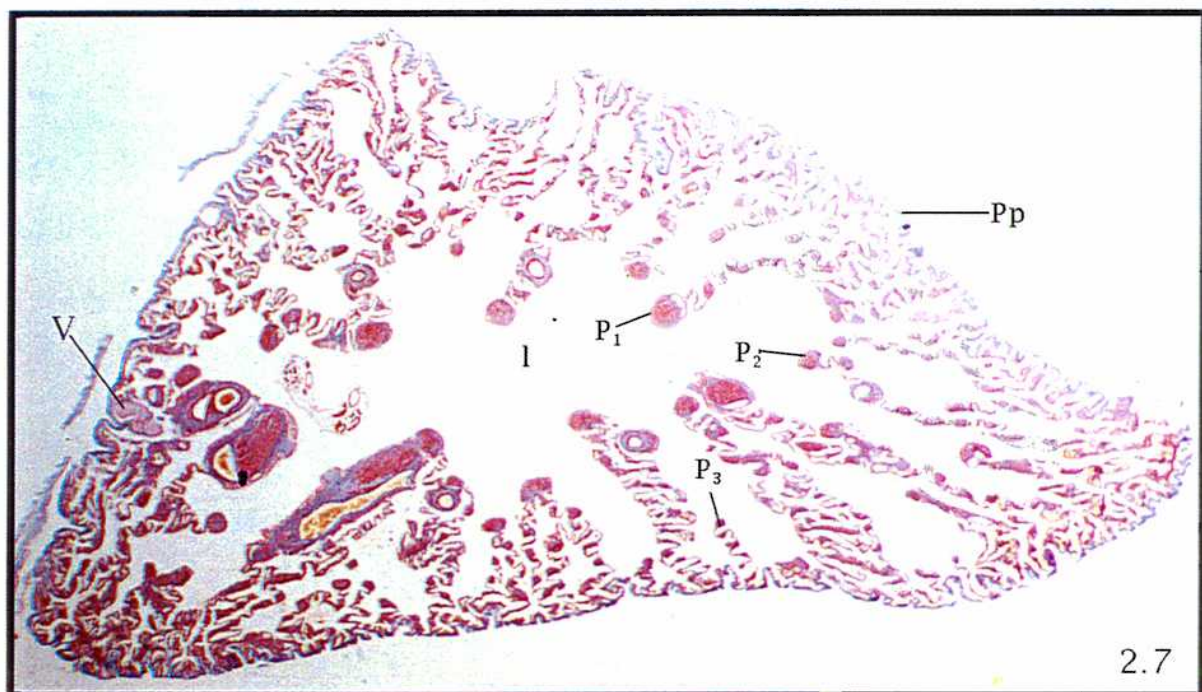
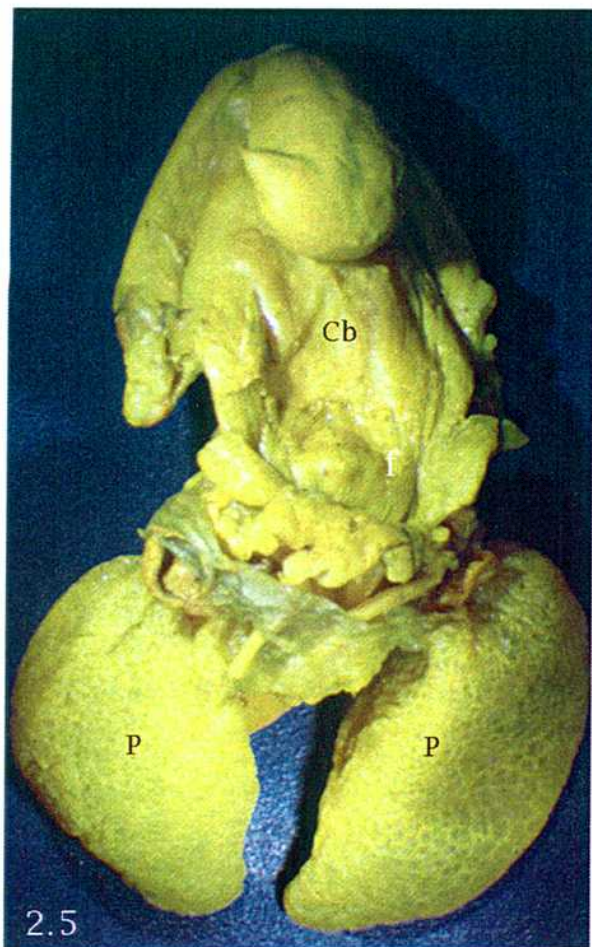


Fig. 2.8 a, b, c – Detalles de la pared pulmonar. a) Tricrómico de Masson modificado, 1000x. b) Técnica de Fränkel, 400x. c) Semifino, 400x

c: capilar, cd: tejido conectivo denso, cl: tejido conectivo laxo, Er: epitelio respiratorio, fe: fibras elásticas, fm: fibra muscular lisa, l: lumen, m: mesotelio,

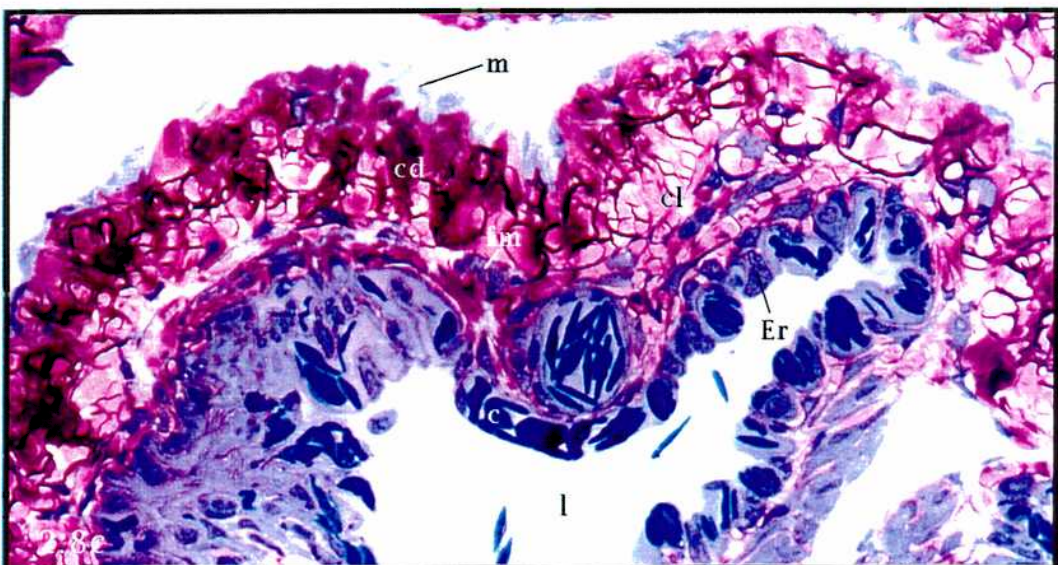
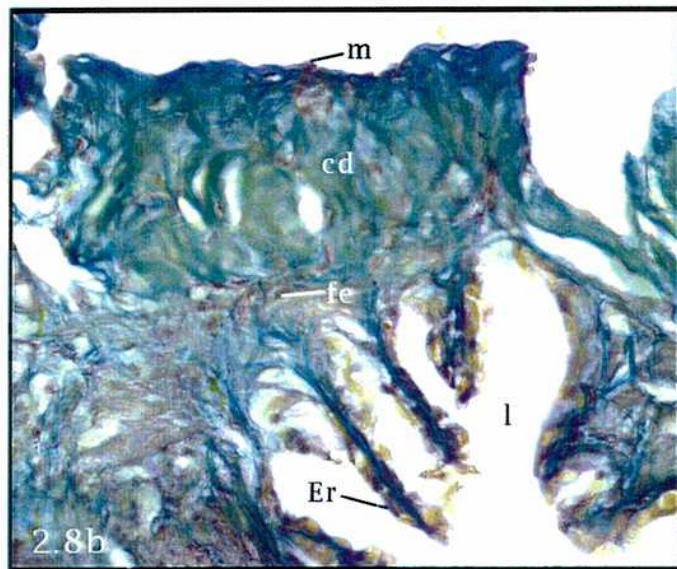
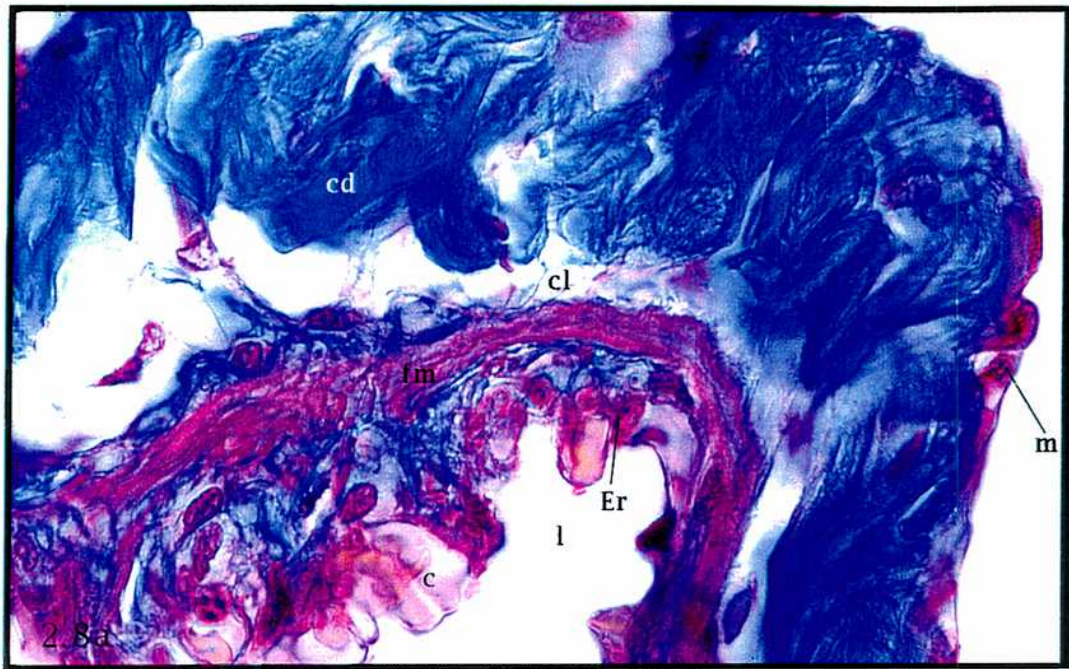


Fig. 2.8 d - Detalle de la pared pulmonar. Tricrómico de Masson modificado. 100X

ap: rama de la arteria pulmonar, Er: epitelio respiratorio, l: lumen, Pp: pared pulmonar, V: rama del nervio vago

Fig. 2.9 a, b - Detalle de septos pulmonares. a) Tricrómico de Masson modificado, b) Técnica de Fränkel. 300x

e: eje del septo, fe: fibras elásticas, fm: fibras musculares lisas, l: lumen, v: vénula

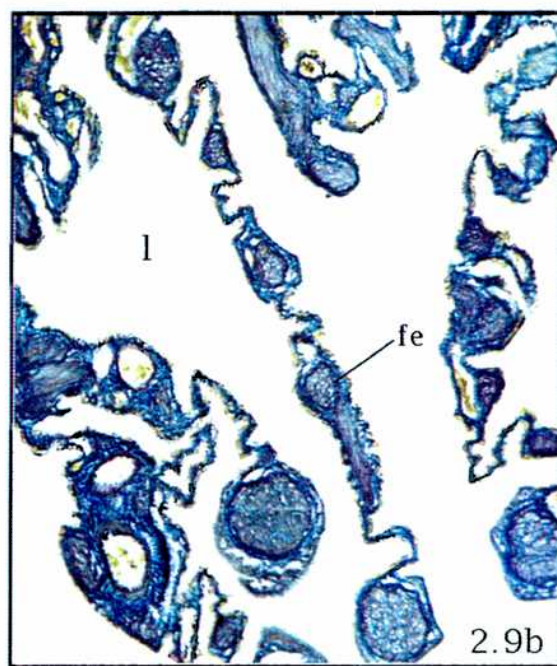
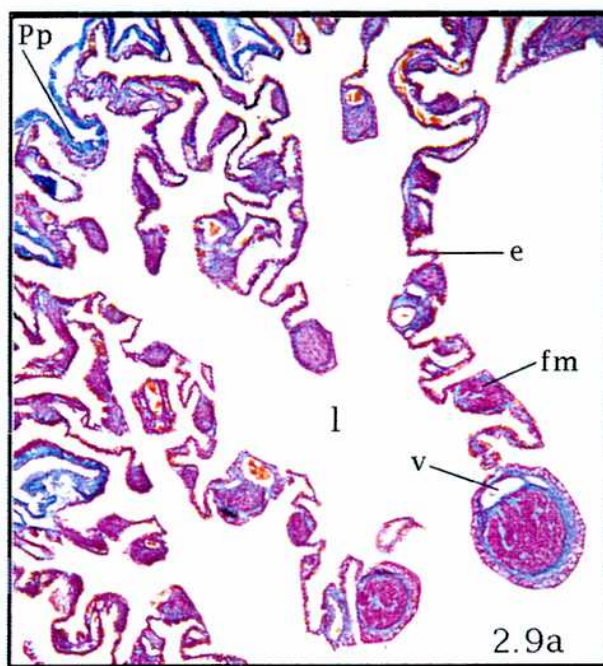
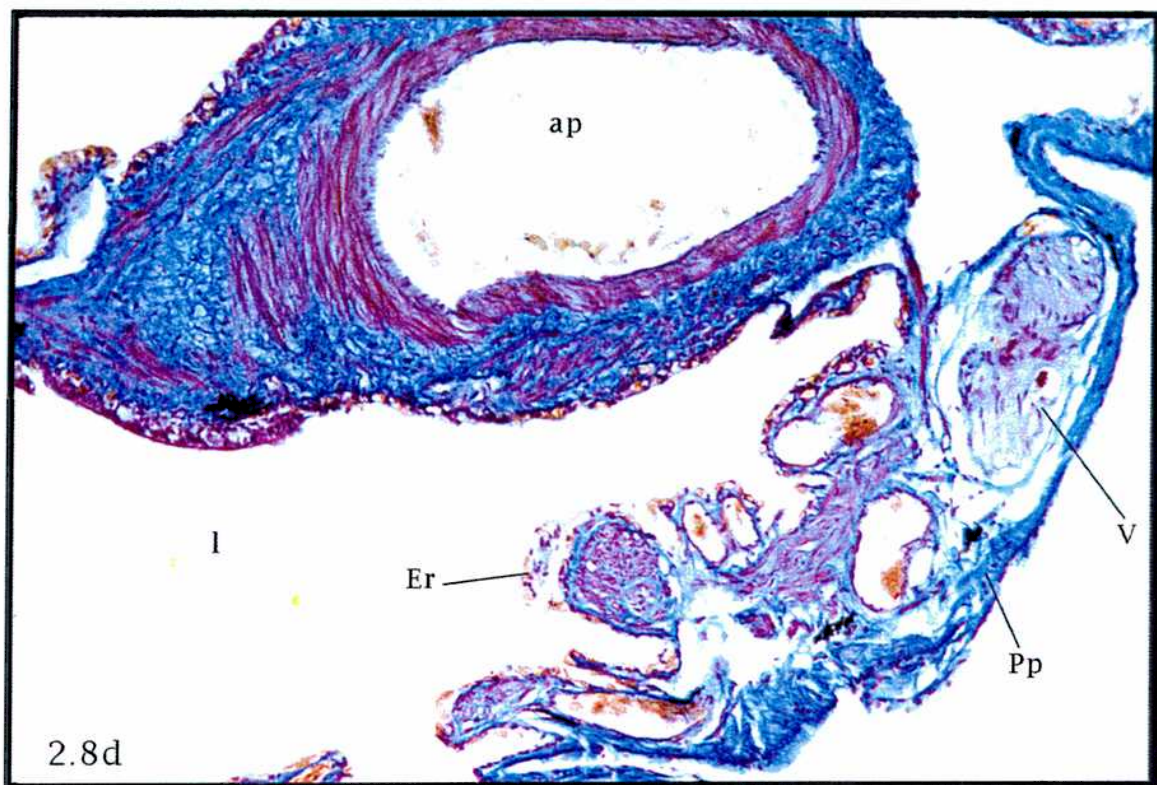


Fig. 2.9 c, d - Detalle de septo pulmonar. Tricrómico de Masson modificado. 100X

c: capilar, Er: epitelio respiratorio, fa: fibras amielínicas, fm: fibras musculares lisas, L: lumen, n: neurona

Fig. 2.10 - Detalle de extremo apical de un septo primario. Técnica de Fränkel. 320x

Epc: epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes, fe: fibras elásticas, *: rodete de fibras musculares lisas

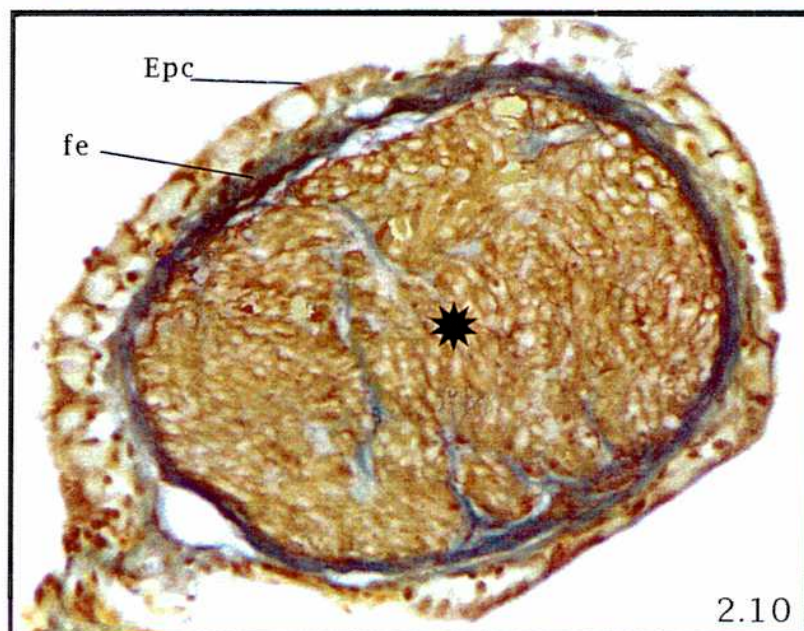
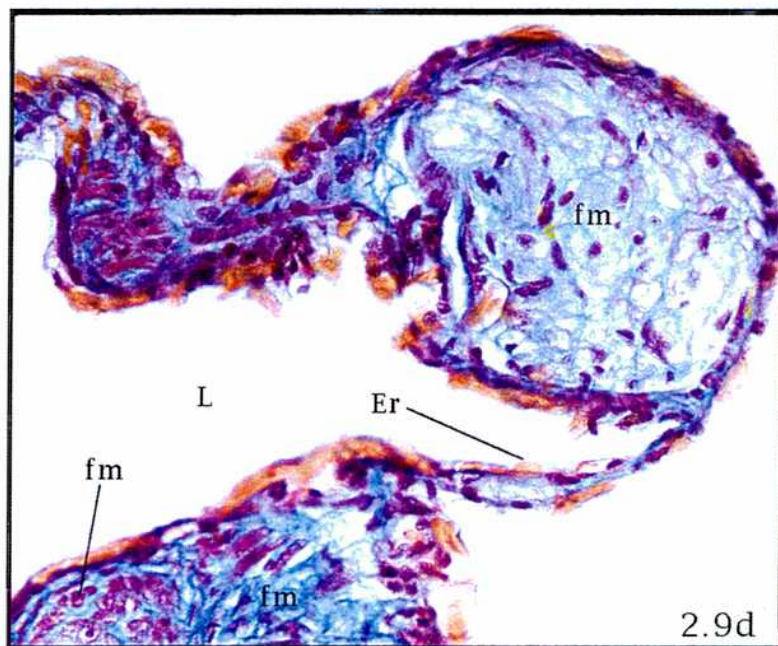
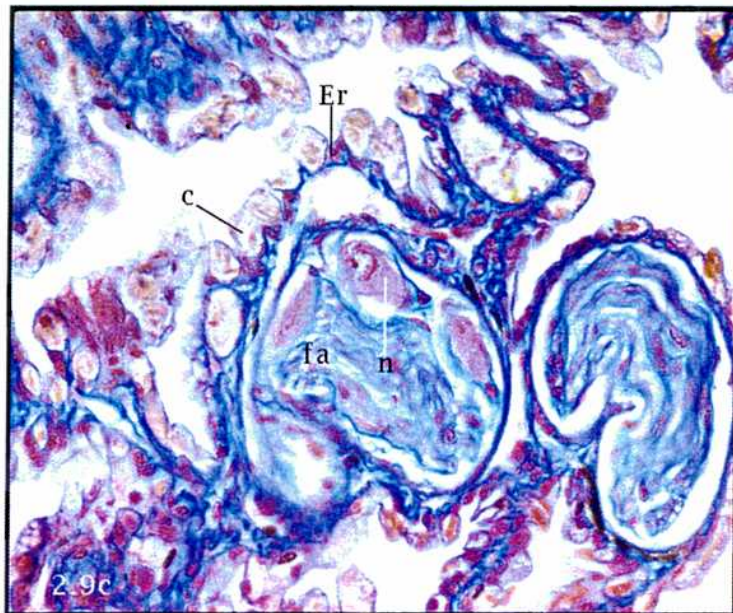


Fig. 2.11 a, b - Detalle del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes (cc) del extremo apical de un septo primario.

a) Tricrómico de Masson modificado. 1000x. c) semifino, 800x

fm: fibras musculares lisas, td: tejido conectivo denso

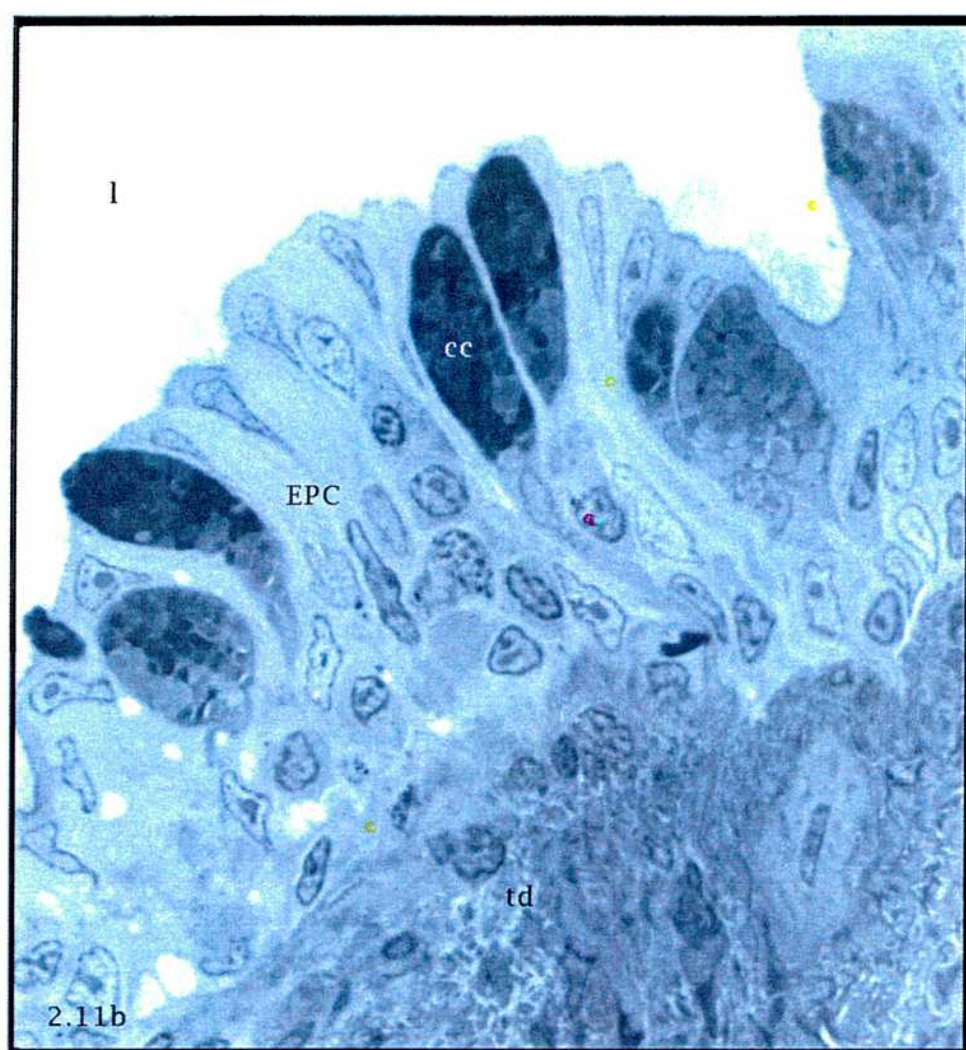
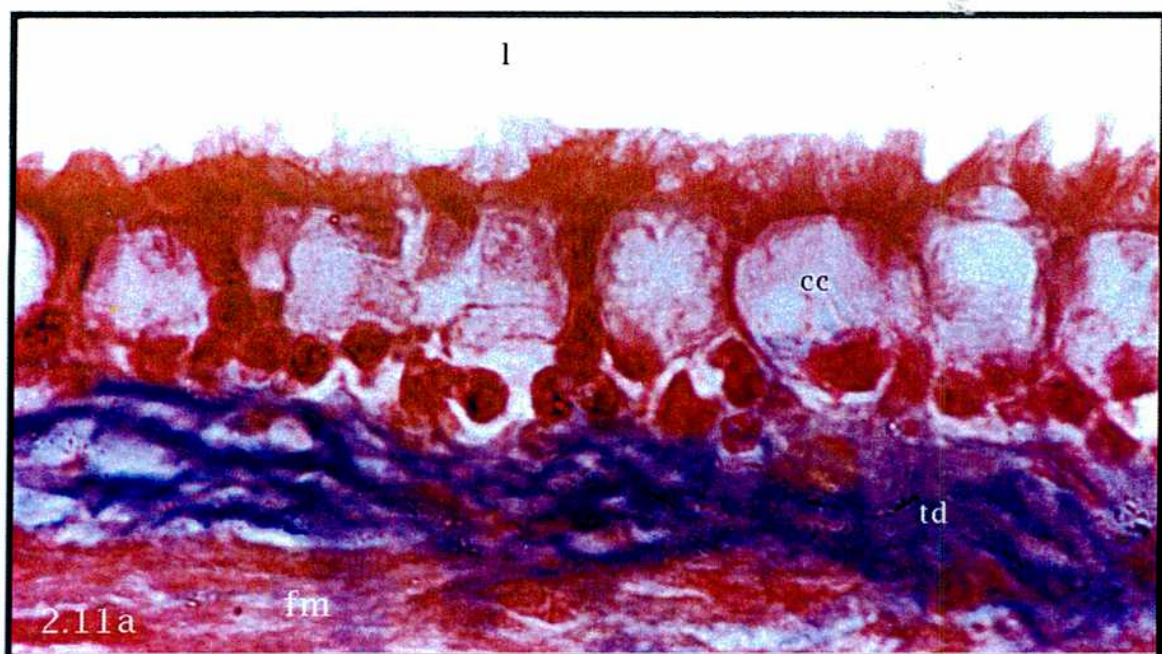


Fig. 2.12 a - Aspecto general de un septo terciario. Tricrómico de Masson modificado. 100x

Fig. 2.12 b, c - Detalle del epitelio respiratorio. b) Tricrómico de Masson modificado, 1260x. c) Semifino, 2000x

c: capilar sanguíneo, en: endotelio, Er: epitelio respiratorio, fc: fibras colágenas, fm: fibras musculares lisas, l: lumen, ne: neumocito, P₃: septo terciario, pc: proceso citoplasmático del neumocito, Pp: pared pulmonar, tc: tejido conectivo.

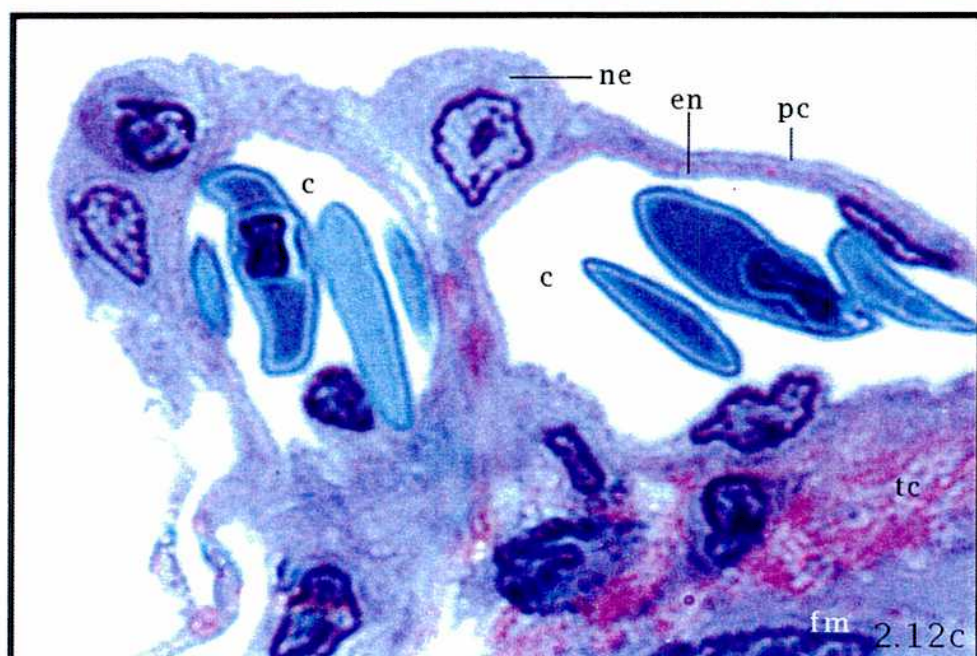
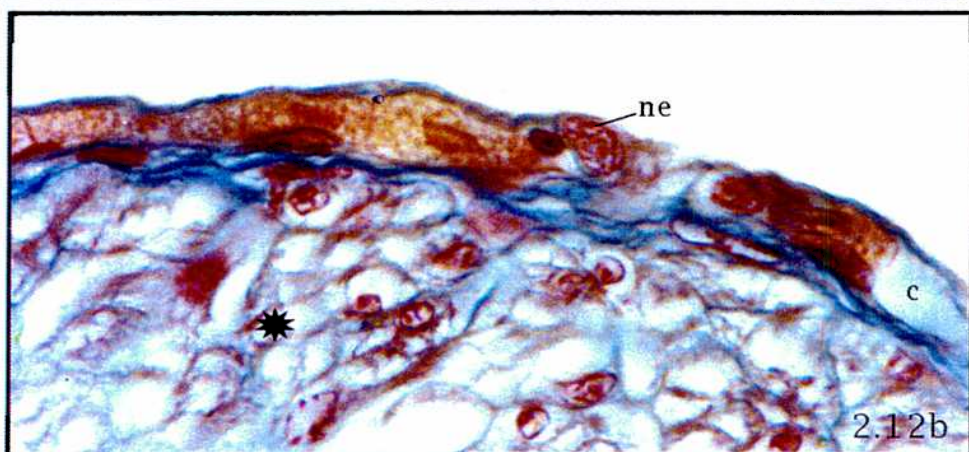
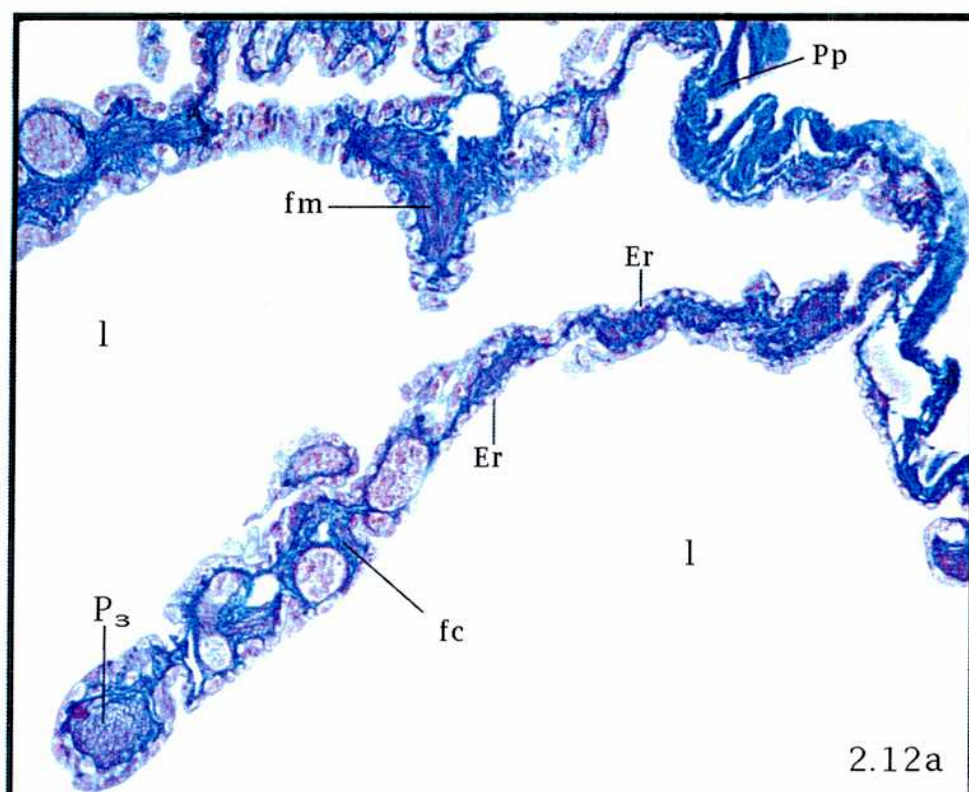
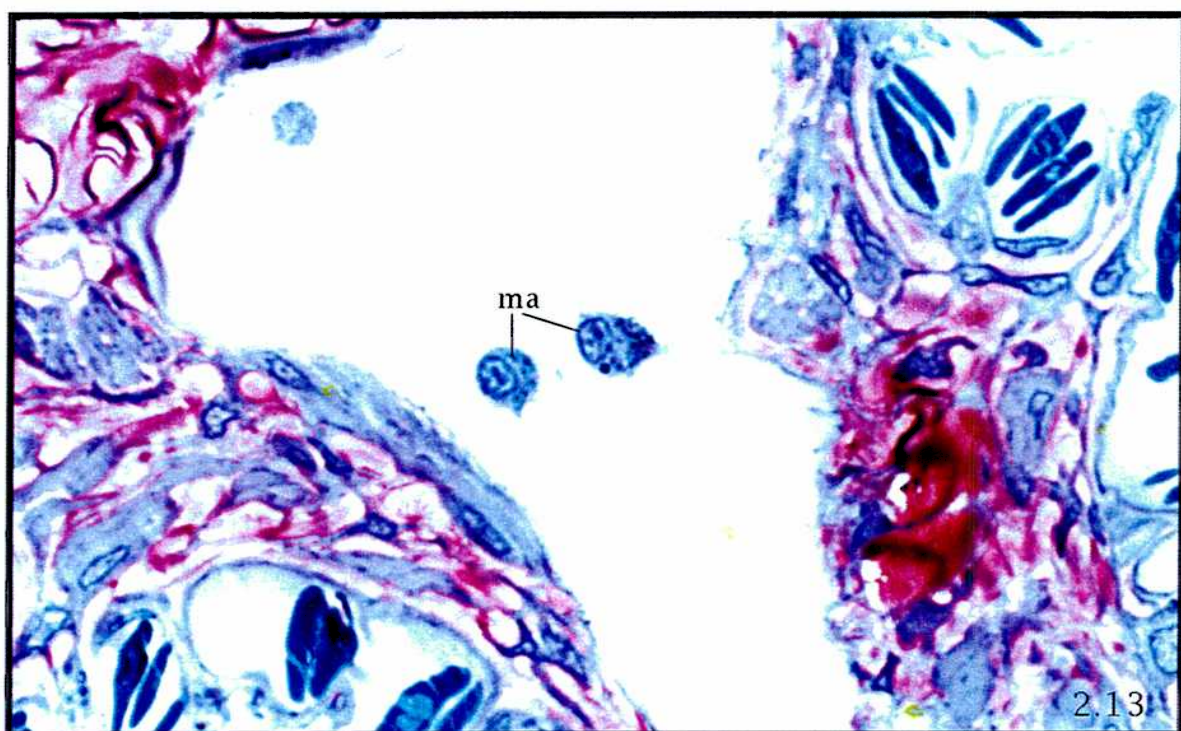


Fig. 2.13 - Detalle de macrófago en el lumen pulmonar (ma). Semifino, 1000x

Nótese el aspecto del citoplasma y las prolongaciones



2.13

2.1.1.1.2 Estudio histoquímico

En el epitelio pseudoestratificado de los pliegues primarios se alternan células caliciformes cuya secreción da reacción positiva al ácido periódico de Schiff (APS). Con el objeto de determinar con mayor exactitud la naturaleza de la secreción de éstas glándulas unicelulares se realizan las siguientes técnicas histoquímicas cuyos resultados obtenidos se resumen en la tabla 1.

TÉCNICA	RESULTADO	FIGURA N°
APS	+++	2. 14
KOH + AP*S	+	----
KOH-AP*-Bh-APS	+	----
AB pH 2,5	+++ / ++	2.15
AB pH 1,0	++	----
AB pH 0,5	+	2.16
MOWRY	+++ APS ++ AB / ++ APS	2. 17
HALE-APS	+++ HALE ++ APS	2.18
ORCEÍNA + AB	++	2.19
AY	++	2.20
AB + AY	+AY +AB / + AY	2.21 a, b
METILACIÓN SUAVE 37°C + AB pH	+	----
METILACIÓN FUERTE 60°C + AB pH	-	----

Tabla 1: APS: Reacción del ácido periódico de Schiff; AB: azul alcian; AY: amarillo alcian; KOH + AP*S y KOH-AP*-Bh-APS (ver materiales y métodos). Intensidad de la reacción: +++: fuerte; ++: moderada; +: débil; -: sin reacción

Fig. 2.14 a 2.17 - Nótese en cada una de las fotografías la coloración de las células caliciformes del epitelio apical de un septo primario de acuerdo a la técnica histoquímica realizadas. 400x

2.14 - Técnica de APS .

La secreción de las células caliciformes presenta glicoconjugados neutros.

2.15 - Técnica de AB pH 2,5

Nótese células caliciformes con distinto grado de alcianofilia (cabeza de flecha roja y amarilla). Esta técnica demuestra la presencia de glicoconjugados ácidos.

2.16 - Técnica de AB pH 0,5

Nótese células caliciformes con distinto grado de alcianofilia (cabeza roja y negra). Esto demuestra que las células que se ven celestes presentan gran cantidad de glicoconjugados sulfatados en comparación con aquellas donde la alcianofilia es débil.

2.17 - Técnica de Mowry

Nótese células caliciformes cuya secreción es de color fucsia (cabeza de flecha verde) mientras que otras presentan un color violáceo (cabeza de flecha roja) indicativo de que la secreción de esas células tiene una mezcla de glicoconjugados neutros y ácidos.

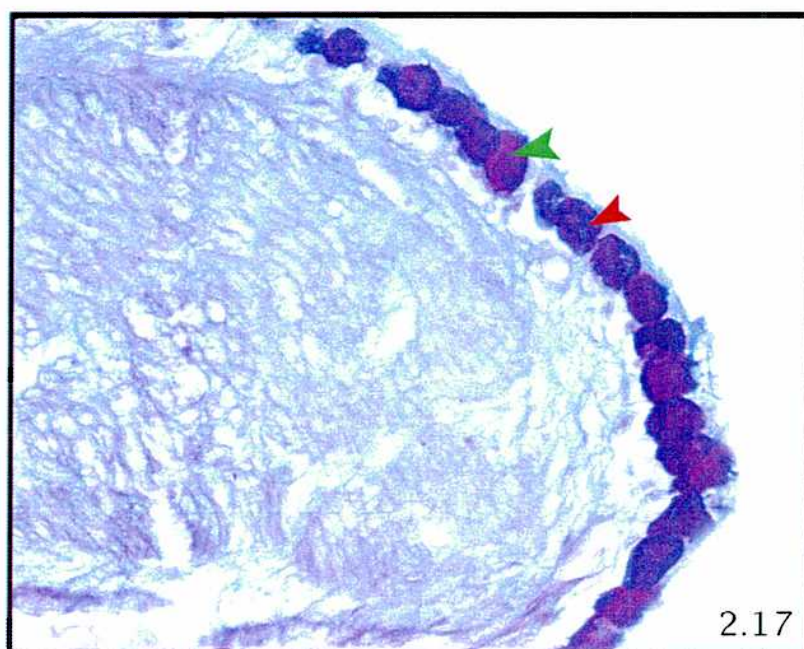
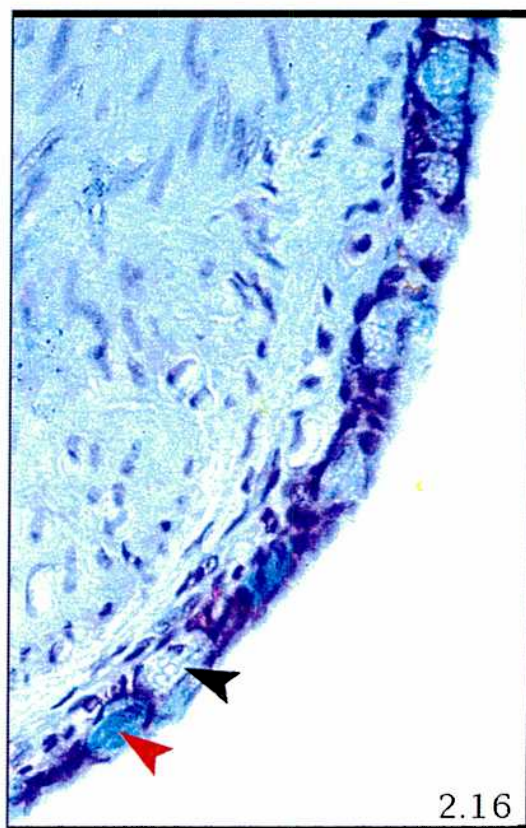
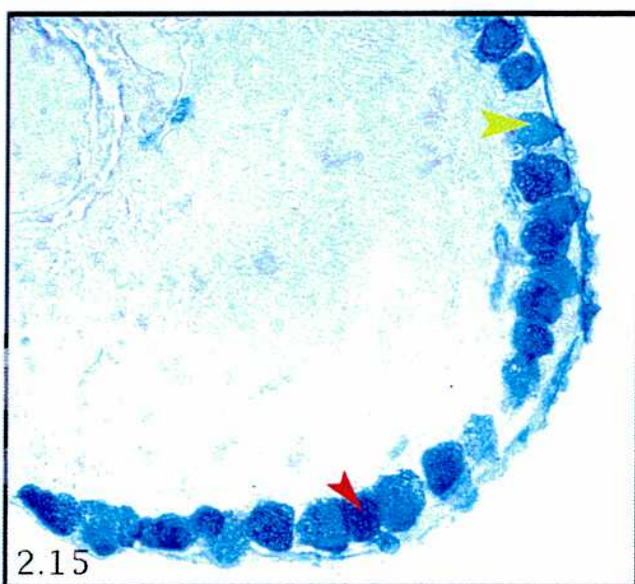
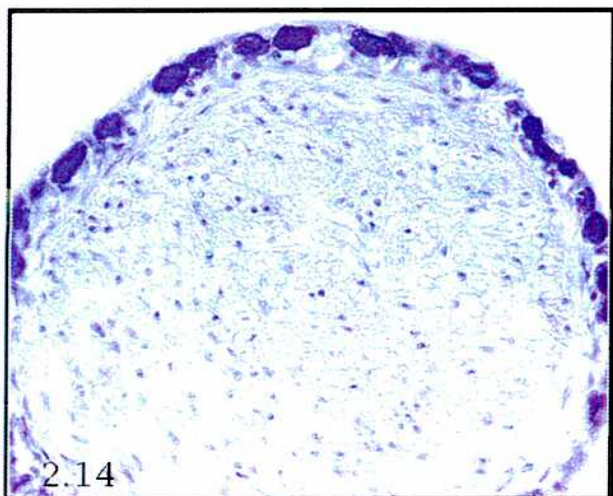


Fig. 2.18 a 2.21 - Nótese en cada una de las fotografías la coloración de las células caliciformes del epitelio apical de un septo primario de acuerdo a la técnica histoquímica realizadas. 400x

2.18 - Técnica de Hale.

La secreción de las células caliciformes presenta glicoconjugados del tipo ácidos

2.19 - Técnica de Orceína combinada con AB

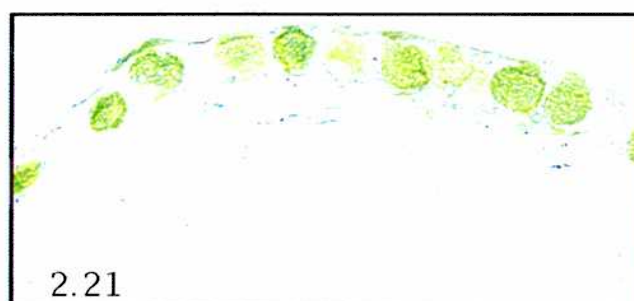
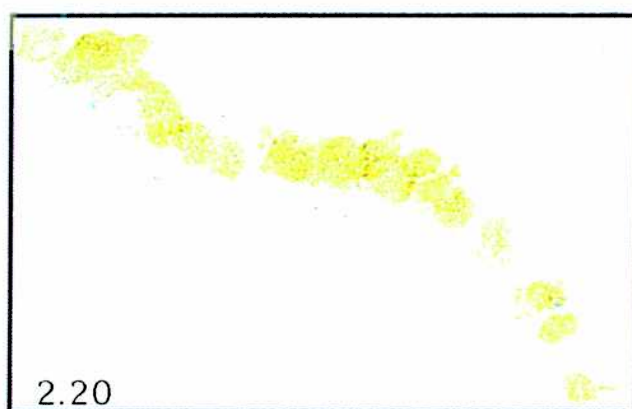
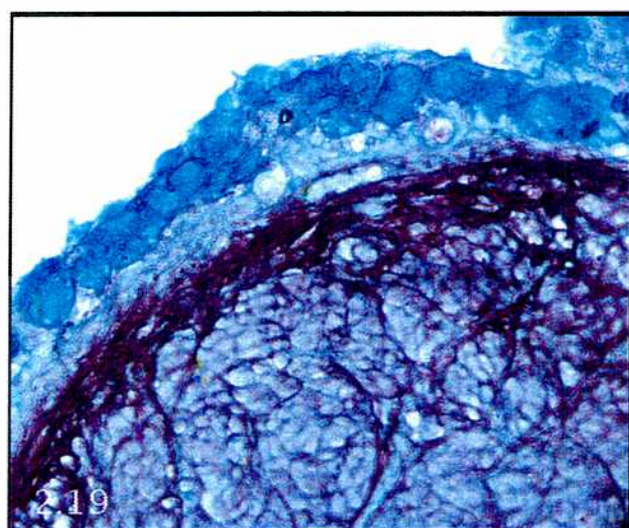
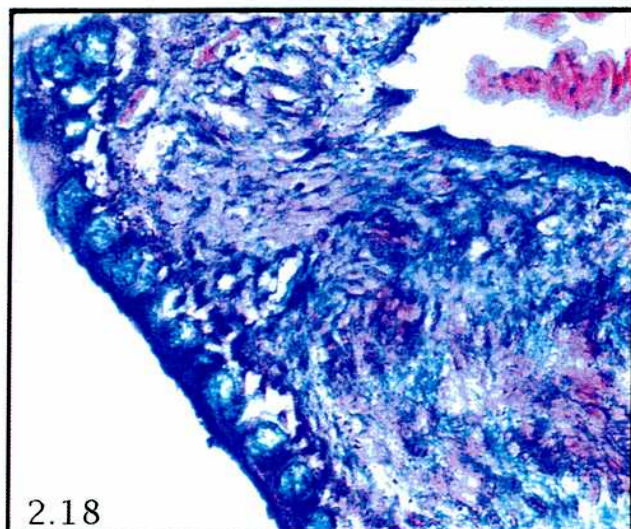
Nótese la presencia de fibras elásticas en color marrón y la reacción positiva (color turquesa) de las células caliciformes, lo que corrobora la presencia de glicoconjugados ácidos

2.20 - Técnica de AY

La coloración amarilla demuestra la presencia de glicoconjugados ácidos carboxilados.

2.21 - Técnica de AB combinada con AY

Esta técnica indica la presencia de glicoconjugados carboxilados y sulfatados en una misma célula caliciforme.



2.1.1.2 Microscopía electrónica

2.1.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las observaciones con MEB muestran que la superficie interna del pulmón de *B. arenarum* no es lisa ya que presenta numerosos septos que delimitan cámaras o celdas de tamaño decreciente (Fig. 2.22). Las cámaras de primer orden, son las más grandes, estas se subdividen en cámaras de menor tamaño, de segundo orden. Éstas últimas, a su vez, se fragmentan por los septos aún menos prominentes en las cámaras más pequeñas de tercer orden (Fig. 2.23 a, b).

Los septos de los distintos órdenes (primario, secundario y terciario) presentan cada uno de ellos una morfología diferente en su ápice que coincide con lo observado con microscopía óptica. En los septos primarios se observa una superficie ciliada interrumpida por células caliciformes mientras que los septos secundarios están cubiertos en su totalidad por células ciliadas (Fig. 2.24)

La porción apical de los septos presenta una dilatación que en corte transversal contiene una vena y un paquete de células musculares lisas constituyendo el rodete muscular (Fig. 2.25).

Las paredes laterales así como el extremo apical de los septos terciarios, poseen saliencias que se corresponde con los capilares sanguíneos revestidos por las delgadas prolongaciones de los pneumocitos (Fig. 2.26, 2.27, 2.28).

2.1.1.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Cada pneumocito tiene una porción engrosada o cuerpo celular donde se ubica el núcleo y delgados procesos citoplasmáticos. Estos procesos cubren la superficie adyacente de los capilares y forma la

capa externa de la barrera de intercambio gaseoso. La superficie apical de los pneumocitos presenta microvellosidades, más numerosas en la porción del cuerpo celular que en los procesos citoplasmáticos (Fig. 2.29).

Los pneumocitos adyacentes están unidos apicalmente por un complejo de unión el cual está formado por una *zonula occludens*, una *zonula adherens* y una *macula adherens* (Fig. 2.30). En un nivel más profundo se observan interdigitaciones entre las superficies laterales de dos células contiguas que le permiten mantenerse unidas (Fig. 2.31).

Los núcleos son pleomórficos y ocupan gran parte del volumen celular. La heterocromatina está distribuida principalmente en la periferia y en algunos casos puede evidenciarse la presencia de un nucléolo. El citoplasma presenta muchos ribosomas libres y un RER muy desarrollado. Algunas mitocondrias ovoides y crestas escasas se ubican tanto en el cuerpo celular como en la prolongación citoplasmática.

En la región supranuclear de los pneumocitos se observa un centríolo, pero el rasgo más conspicuo en este tipo celular son los diversos cuerpos de inclusión los cuales también se encuentran encontrados en la región subnuclear o en el proceso citoplasmático (Fig. 2.31). Entre estos cuerpos de inclusión se destacan: cuerpos lamelares (Cl), cuerpos multivesiculares (Cmv) y cuerpos electrondenso (Ce). Los Cl son esféricos u ovoides y contienen numerosas membranas paralelas en disposición concéntrica (Fig. 2.31). Estas membranas son lisas y muestran ondulaciones alrededor de un centro formado por un material electróndenso (Fig. 2.32). Otro tipo de Cl contienen unas pocas membranas gruesas, paralelas entre sí, inmersas en una matriz electronlúcida (Fig. 2.33). Los cuerpos multilamelares están constituidos por pequeños grupos de Cl separados entre sí por un material electronlúcido (Fig. 2.34). Los Cl

maduros pueden observarse en el lumen pulmonar donde sus membranas comienzan a disociarse (Fig. 2.35). Los Cmv se encuentran próximos a los Cl, cerca del borde apical de la célula, y contienen un número variable de pequeñas vesículas incluidas en una matriz de baja densidad electrónica (Fig. 2.36). Algunos Cmv presentan una matriz con una marcada densidad electrónica. Los Ce son cuerpos esféricos de diferente tamaño que contienen un material homogéneo electrondenso (Fig. 2.31, 2.37). Los tres tipos de inclusiones descritas están rodeados por una membrana simple.

Los componentes de la barrera de intercambio gaseoso son: la extensión citoplasmática de los pneumocitos, el espacio intersticial y las células endoteliales de la rica red capilar. El espacio intersticial está limitado por la lámina basal de los pneumocitos y la lámina basal de la célula endotelial. En algunas regiones, a menudo, estas dos láminas basales se fusionan. La barrera puede estar ensanchada debido a la presencia de fibras colágenas. Una característica típica de la barrera de intercambio es el gran número de vesículas micropinocíticas presentes tanto en el endotelio como en el epitelio del pneumocito adyacente al espacio intersticial (Fig. 2.38).

Fig. 2.22 – Aspecto general de un pulmón abierto longitudinalmente. MEB, 15x

Fig. 2.23 a – Detalle de cámaras de distinto tamaño delimitadas por pliegues. MEB. 45x

Fig. 2.23 b – Esquema tridimensional de la arquitectura pulmonar. 1, 2, 3: cámara faveola primaria, secundaria, terciaria.

c: capilares, P₁: septo primario, P₂: septo secundario, P₃: septo terciario, Pp: pared pulmonar, L: lumen

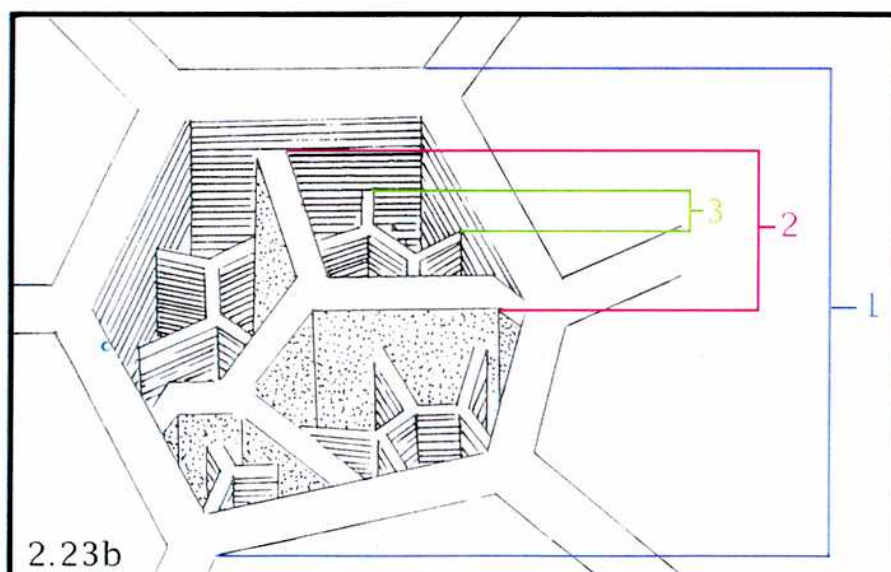
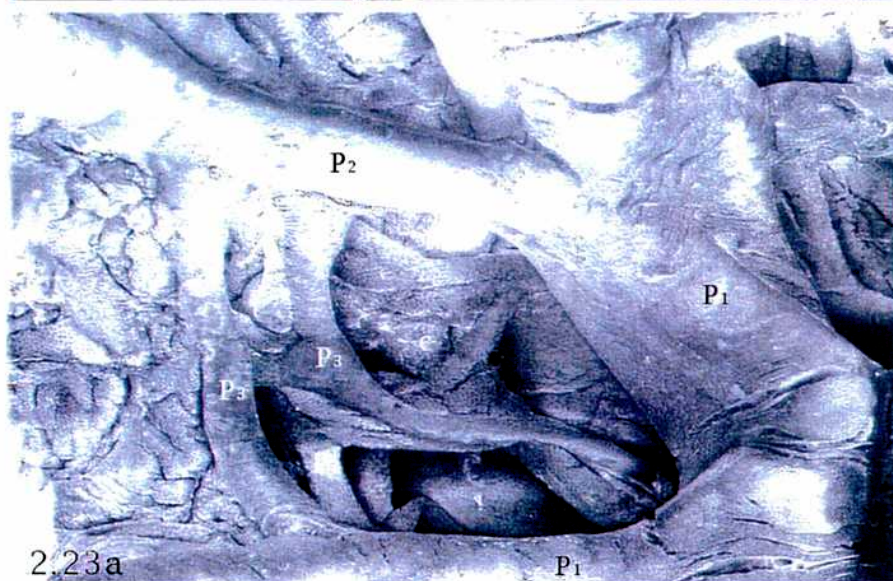


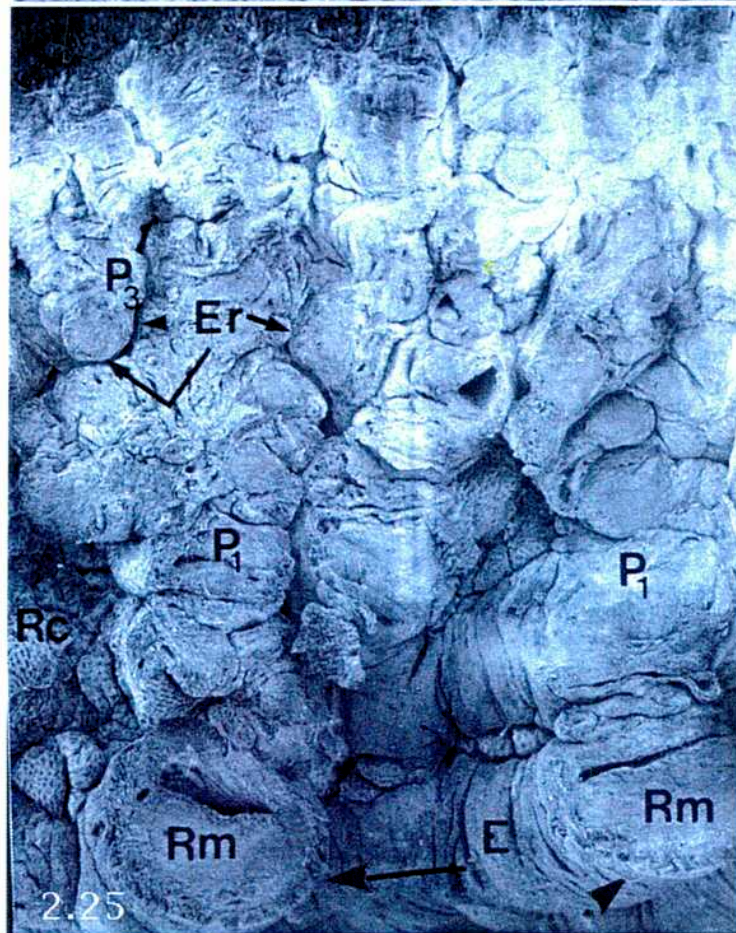
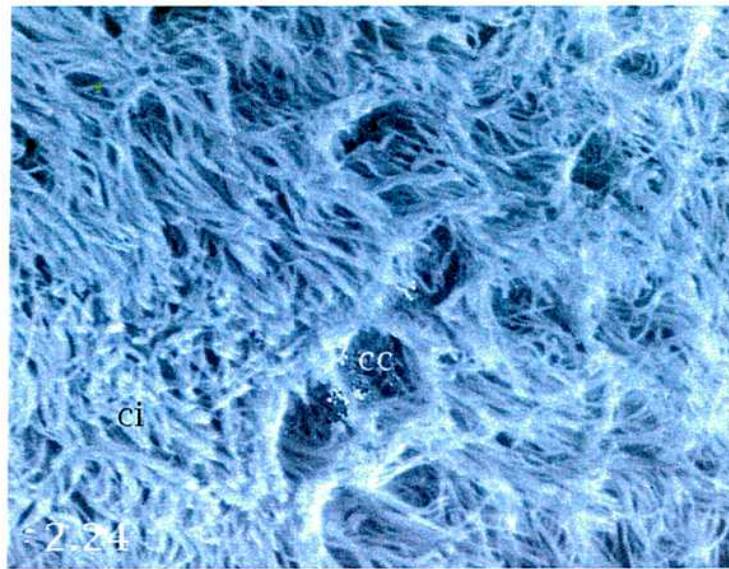
Fig. 2.24 - Detalle de la superficie luminal de un septo primario. MEB. 2000x

cc: célula caliciforme, ci: cilias

Fig. 2.25 - Corte transversal de septos pulmonares. MEB. 45x

Er: epitelio respiratorio, P₁: pliegue primario, P₃: pliegue terciario, Rc: red de capilares, Rm: rodete muscular.

Fig. 2.26 - Red de capilares (Er) tapizando al epitelio respiratorio. MEB. 200X



**Fig. 2.27 - Detalle de septo pulmonar revestido por epitelio respiratorio (Er).
MEB. 1500x**

c: capilar, er: eritrocito, fc: fibras colágenas.

Fig. 2.28 - Detalle de epitelio respiratorio. MEB. 3000x

c: capilar sanguíneo, er: eritrocito, fc: fibras colágenas, N: núcleo

**Fig. 2.29 – Neumocito cubriendo con sus procesos citoplasmáticos a capilares
sanguíneos adyacentes (c). MET. 2570x**

ce: cuerpo electródenso, cl: cuerpo lamelar, er: eritrocito, N: núcleo, nu: nucleolo.
Cabeza de flecha: microvellosidades

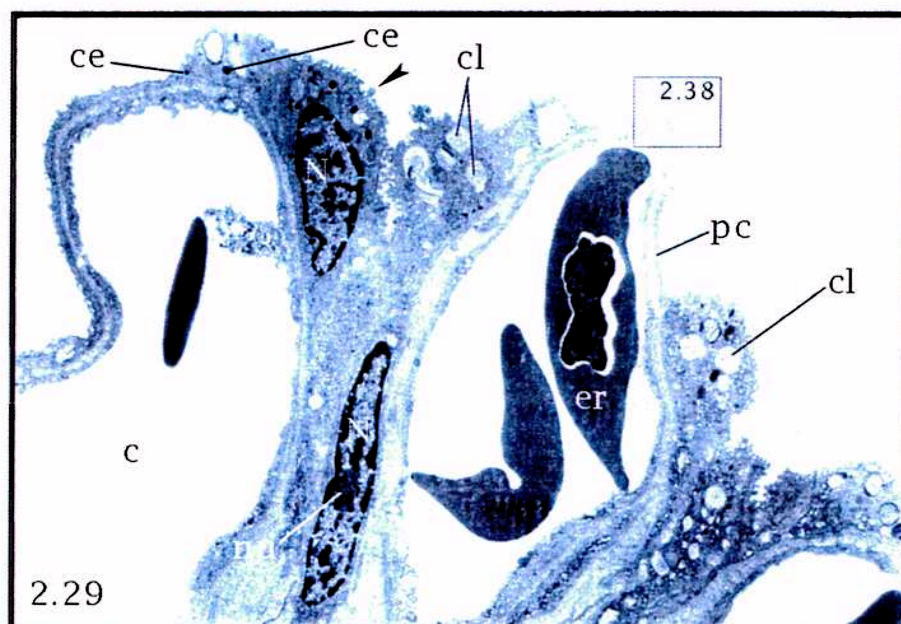
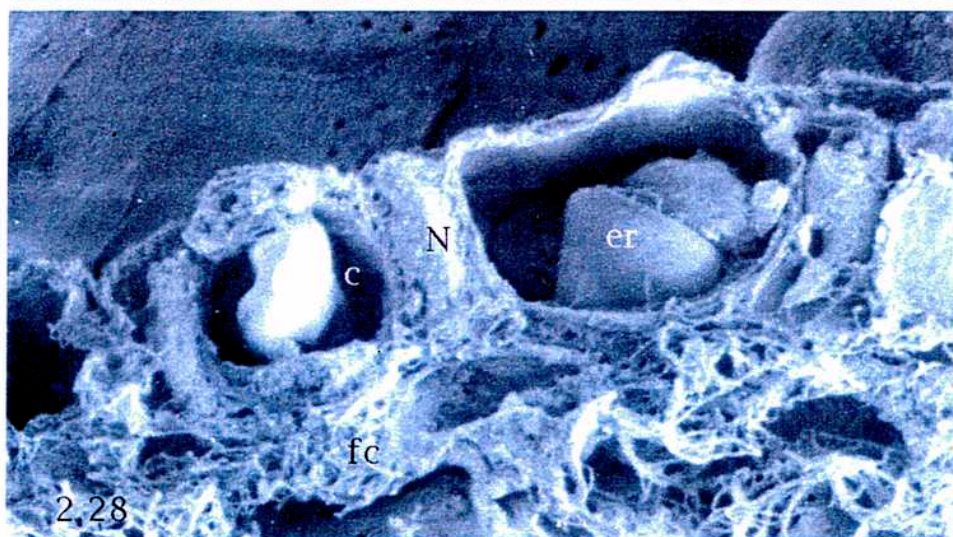
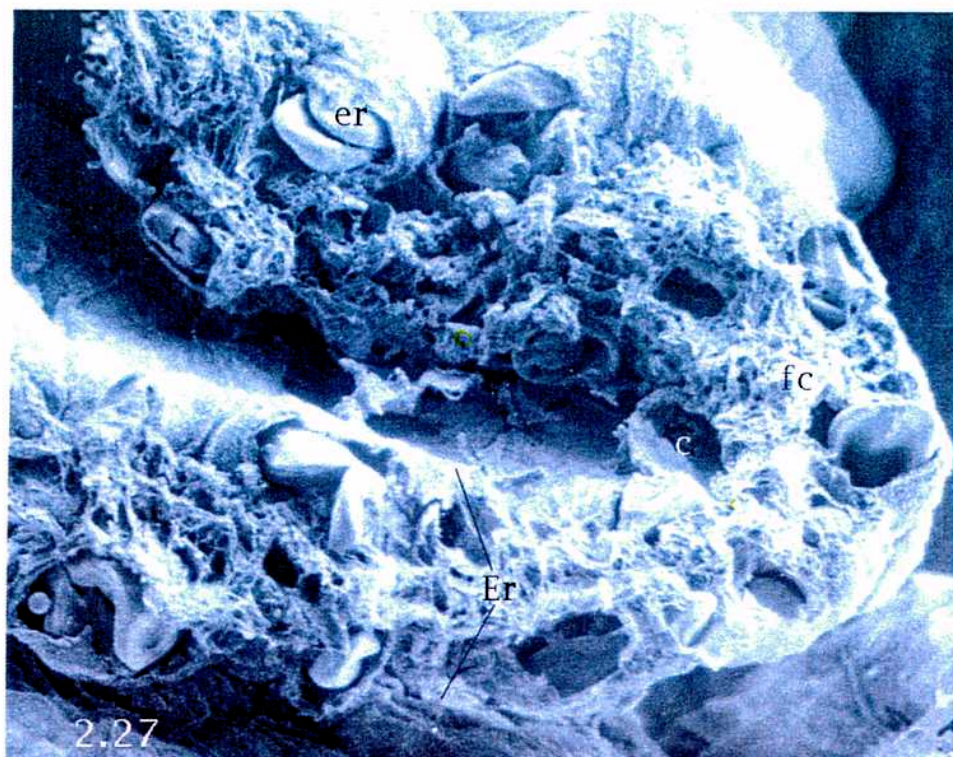


Fig. 2.30 – Detalle del complejo de unión entre dos neumocitos. MET. 36900x

Fig. 2.31 – Detalle de un neumocito. MET. 19200x

Fig. 2.32, 2.33 – Distintos tipos de cuerpos lamelares. 2.32) 33000x 2.33) 30000x

Ce: cuerpo electródenso, ce: centriolo, Cl: cuerpo lamelar, Cu: complejo de unión, Im: interdigitaciones de membrana, l: lumen, lb: ámina basal, Ma: *macula adherens*, Mv: microvellosidades, N. Núcleo, Rer: retículo endoplasmático rugoso, tc: tejido conectivo
Za: *zonula adherens*, Zo: *zonula occludens*, *: centro electródenso

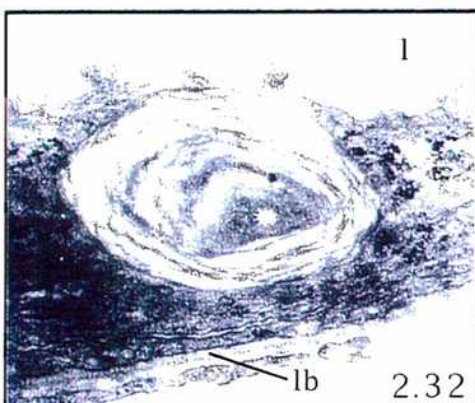
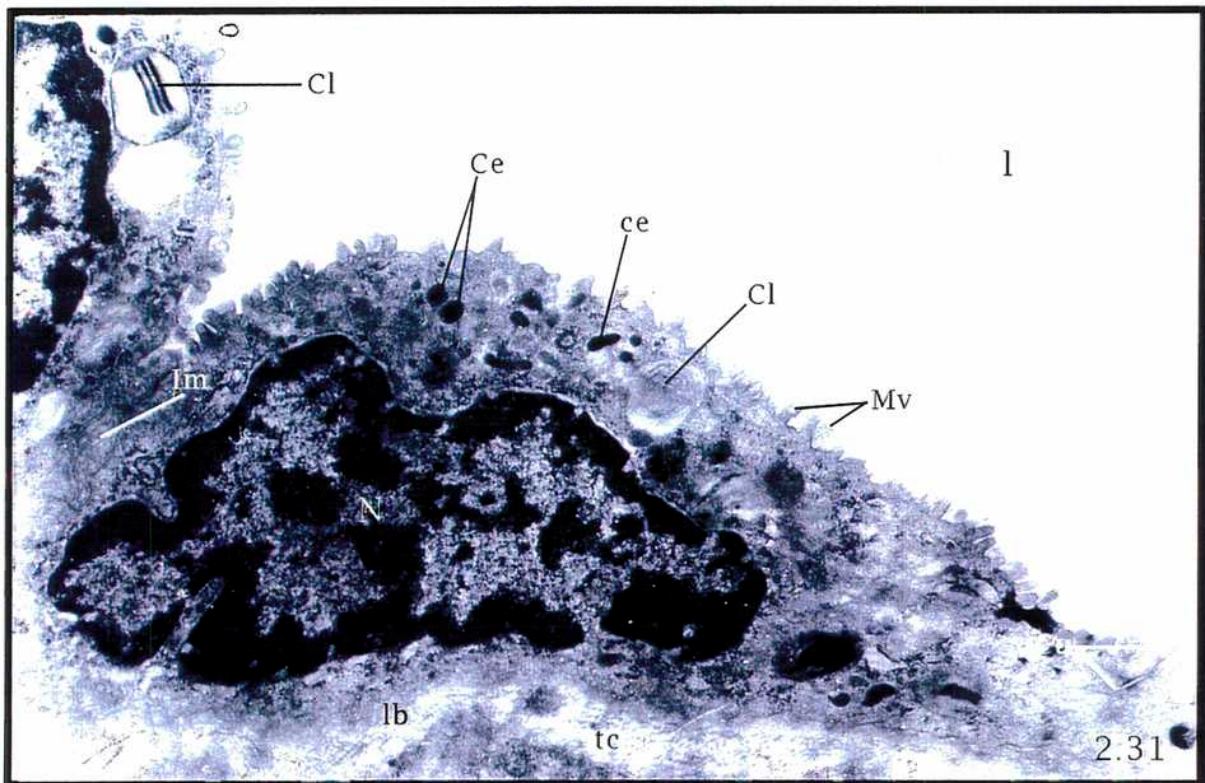
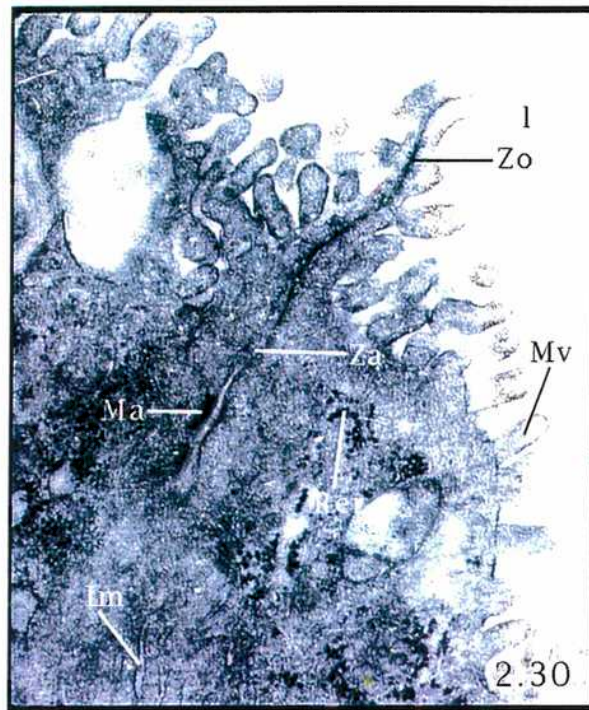


Fig. 2.34 – Detalle de cuerpos multilamelares (MI) en el citoplasma de un neumocito. MET. 53000x

Fig. 2.35 – Cuerpo lamelar secretado al lumen (l) pulmonar. MET. 20000x

Nótese el acúmulo de vesículas (cabeza de flecha negra) en el lumen del pulmón.

Fig. 2.36 - Detalle del citoplasma de un neumocito. MET. 50000x

Nótese la diversidad de cuerpos electrón-denso (Ce) y multivesiculares (Cmv) en el citoplasma.

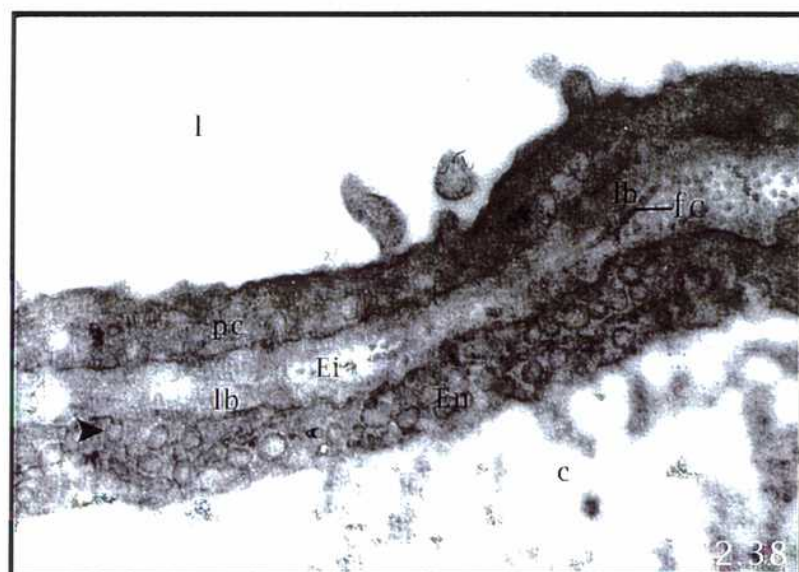
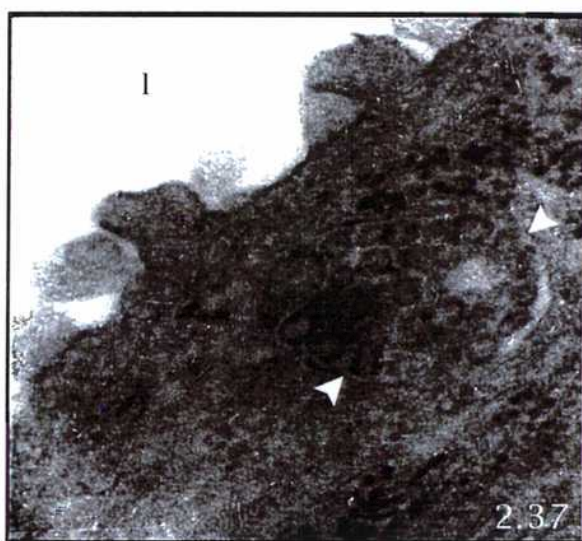
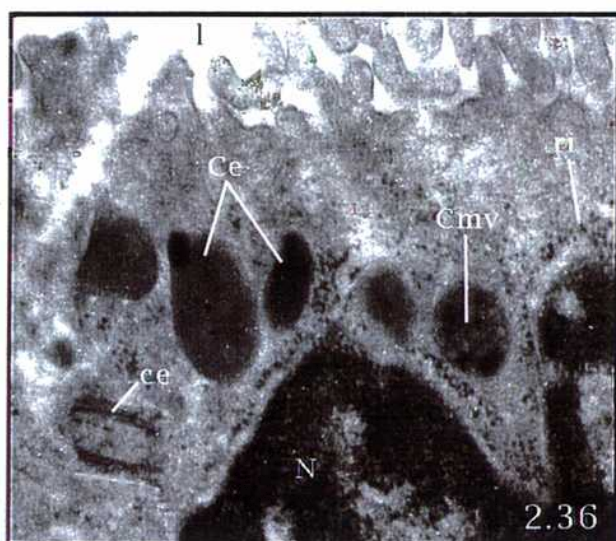
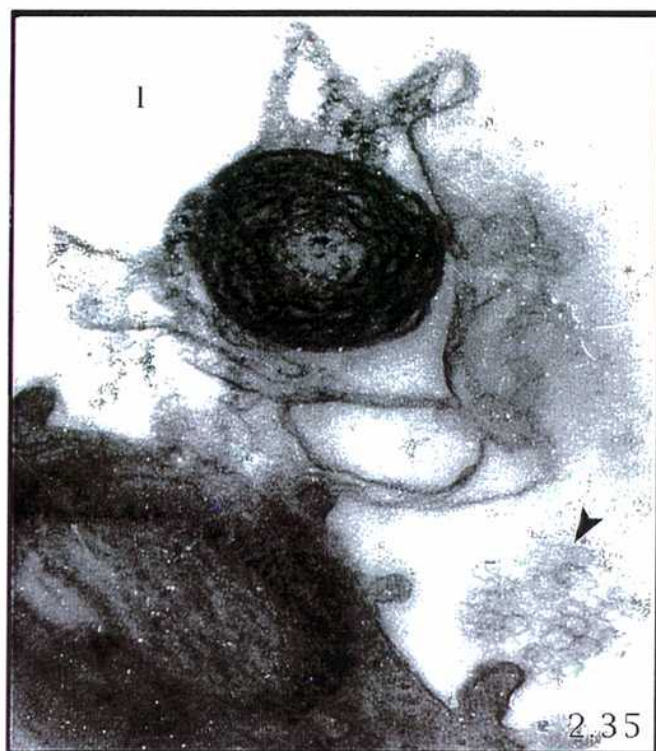
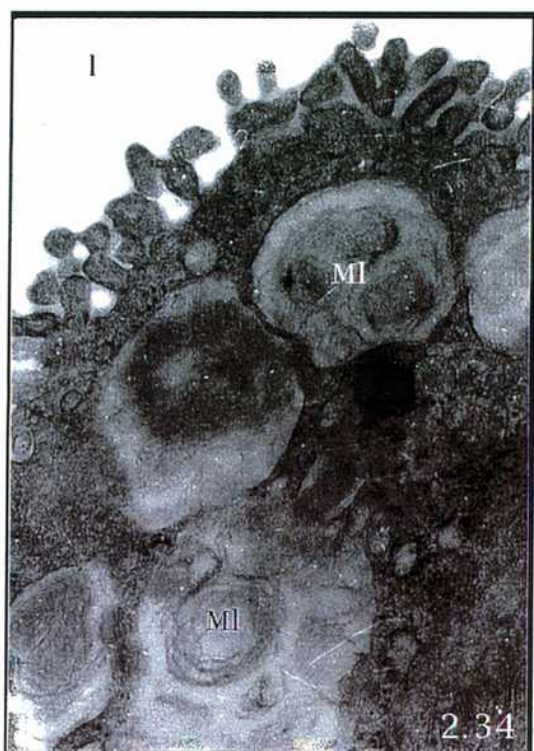
Fig. 2.37 – Cuerpo multivesicular (cabeza de flecha blancas). MET. 76500x

Fig. 2.38 – Detalle de la barrera de intercambio gaseoso. MET. 35300x

Compuesta por el proceso citoplasmático de un neumocito (pc), el espacio intersticial (Ei) conteniendo fibras colágenas (fc) y el endotelio (En) del capilar sanguíneo (c).

Nótese la abundancia de vesículas micropinocíticas (cabeza de flecha negra).

ce: centríolo, l: lumen, lb: lámina basal, N: núcleo, ri: ribosoma



2.2 Pulmón de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*

Los pulmones de *M.s.stelzneri* presentan una pared delgada muy pigmentada a través de la cual se aprecia un entramado dado por la presencia de cámaras de distinto tamaños (Fig. 2.38).

2.2.1 Estudio microanatómico

2.2.1.1 Microscopía óptica

La superficie interna del pulmón de *M. s. stelzneri* es plegada debido a la presencia de septos que al anastomosarse dividen al lumen pulmonar en cámaras (Fig. 2.39).

La pared pulmonar es delgada constituida por tres componentes: uno externo, formado por células mesoteliales situadas sobre una delgada capa de tejido conectivo denso, una capa media de tejido conectivo laxo conteniendo escasos fibrocitos, cromatóforos y delgadas fibras elásticas. Además pueden encontrarse fibras musculares lisas aisladas o bien dispuestas en paquetes asociados con vasos sanguíneos así como con nervios mielínicos. El componente más interno está formado por capilares sanguíneos revestidos por prolongaciones citoplasmáticas de los pneumocitos (Fig. 2.40).

En sección transversal puede observarse que el interior de los pulmones presenta únicamente septos terciarios orientados hacia el centro del lumen (Fig. 2.41). El eje que forma el septo, está formado por una delgada red de fibras colágenas y elásticas, fibras musculares lisas aisladas y nervios mixtos. En corte transversal el extremo apical es redondeado debido a la presencia de un rodete de tejido muscular liso, fibras elásticas y tejido conectivo y una vénula. Ambos lados de los septos así como su extremo están cubiertos por una red de capilares los cuales están revestidos por los pneumocitos (Fig. 2.42). El epitelio respiratorio puede estar ocasionalmente interrumpido por



un epitelio cúbico ciliado o por cuerpos neuroepiteliales (Fig. 2.43, 2.44).

2.2.1.2. Microscopía electrónica

2.2.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido

El parénquima pulmonar forma una red poligonal la cual divide al lumen en cámaras de distinto tamaño. Estas celdas poco profundas están definidas por la interconexión de septos terciarios (Fig. 2.45). La superficie interna del pulmón está revestida por pneumocitos. Este tipo celular presenta sobre su superficie libre numerosas microvellosidades cortas. Los pneumocitos presentan delgados procesos citoplasmáticos que se extienden sobre los capilares (Fig. 2.46). Como muestra la Fig. 2.47 y 2.48 el epitelio respiratorio está interrumpido por parches de células ciliadas largas así como por protrusiones cupuliformes cubiertas por los procesos de los pneumocitos vecinos. Estas protrusiones aparecen dispersas sobre la superficie de los septos terciarios, principalmente en la zona de unión de dos septos.

2.2.1.2.2 Microscopía electrónica de transmisión

El epitelio respiratorio está constituido por pneumocitos. Estos tienen una forma irregular con una porción engrosada que contiene el núcleo y un proceso citoplasmático delgado que cubre a los capilares. El cuerpo celular se sitúa principalmente entre los espacios intercapilares. La superficie libre de estas células respiratorias tienen cortas microvellosidades (Fig. 2.49). Los pneumocitos próximos entre sí, están unidos en la porción apical por una barra terminal, mientras que la porción más profunda presentan interdigitaciones de membrana (Fig. 2.50).

La barrera de intercambio gaseoso está compuesta por una capa externa formada por el proceso citoplasmático del pneumocito, una capa media correspondiente al espacio intersticial y una capa interna formada por las células endoteliales. El espacio intersticial está limitado por la lámina basal de los pneumocitos y de las células endoteliales y además contiene fibras colágenas. Las membranas de dos células endoteliales continuas se solapan entre sí y se unen por una *zonula occludens*. Por debajo de las superficies de las membranas plasmáticas basales y lumbinales se distinguen numerosas vesículas de pinocitosis (Fig. 2.51).

El núcleo de los pneumocitos muestra irregularidades en su contorno y ocupa gran parte del volumen de la célula. El citoplasma presenta abundantes ribosomas libres y cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Próximas al conspicuo complejo de Golgi puede observarse vesículas de variados tamaños. Las mitocondrias presentan escasas crestas y se encuentran dispersas en el citoplasma (Fig. 2.52).

En los pneumocitos pueden reconocerse tres tipos diferentes de cuerpos citoplasmáticos: los cuerpos lamelares (Cl), los cuerpos electrón denso (Ced) y los cuerpos multivesiculares (Cmv). Los Cl se distinguen con el MET como pilas de láminas membranosas paralelas entre sí. Otros tipos de Cl presentan en su interior membranas inmersas en un material lúcido. Un tercer tipo de Cl está caracterizado por la incorporación en su interior de Cmv. Los cuerpos multilamelares están formados por grupos de Cl separados uno de otros por un material electronlúcido. Después que los Cl son liberados dentro del lumen por exocitosis, gradualmente las membranas comienzan a disociarse. Los Cmv contienen un variado número de pequeñas vesículas con un contenido de densidad electrónica moderada, incluidas en una matriz lúcida. Los Ced son esféricos y contienen un material homogéneo electrondenso. Todos estos

cuerpos citoplasmáticos están rodeados por una membrana simple (Fig. 2.53 a, b, c).

Las células ciliadas son cúbicas y poseen cortas microvellosidades sobre su superficie luminal. El núcleo es pleomórfico y su membrana nuclear muestra algunas invaginaciones (Fig. 2.54 a, b). Se encuentran numerosas mitocondrias asociadas a las dos raíces estriadas de los cuerpos basales.

Fig. 2.38 - Aspecto general del pulmón de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*. 10x
Nótese la presencia de cámaras (CA) de distintos tamaño.

Fig. 2.39 - Corte transversal del pulmón mostrando la arquitectura interna. Semifino, 100x

Sólo un tipo de septo (P₃) es observado protruyendo en el interior del lumen (l) pulmonar. Nótese la presencia de engrosamientos musculares asociados con vasos sanguíneos (cabeza de flecha blanca) en la pared pulmonar (Pp).

Fig. 2.40 - Detalle de la pared pulmonar. Semifino. 1500x

Presencia de un mesotelio (m) externo, una capa central de tejido conectivo laxo (tc) y un epitelio respiratorio (Er) interno asociado a capilares sanguíneos (c). Nótese la presencia de cromatóforos (Cr) y nervios (Ne) en la pared pulmonar.

Fig. 2.41 - Detalle de un septo terciario. Semifino. 400x

El septo presenta un eje (e) y una dilatación apical formada por un rodete de fibras musculares lisas (fm). Todo el septo está tapizado por epitelio respiratorio (Er) el cual está asociado a capilares sanguíneos (c).

Fig. 2. 42 – Detalle del epitelio respiratorio. Semifino. 2000x

Epitelio respiratorio compuesto por neumocitos (ne) localizados entre capilares sanguíneos (c). El citoplasma de los neumocitos presenta una apariencia esponjosa.

Fig. 2.43 – Detalle del epitelio ciliado (ci). Semifino. 1000x

Fig. 2.44 – Detalle de cuerpo neuroepitelial (cne) ubicado en la pared pulmonar (Pp). Semifino. 1250x

c: capilar, Cr: cromatóforos, e: eritrocito, fm: fibras musculares lisas, l: lumen

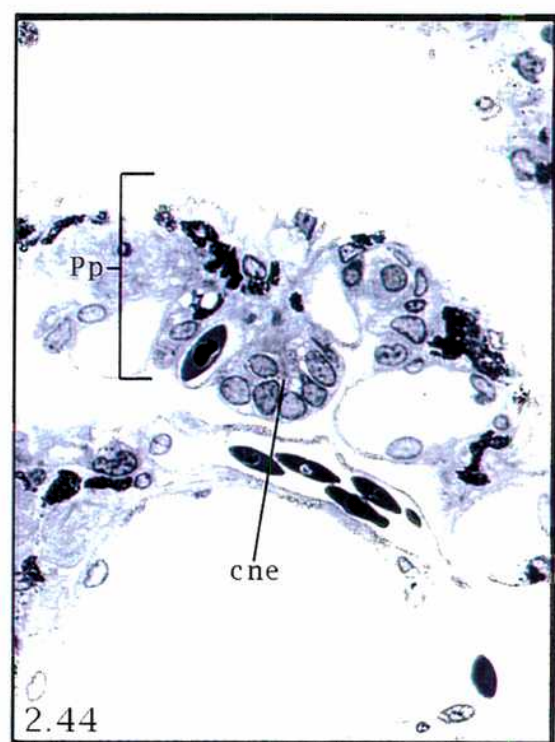
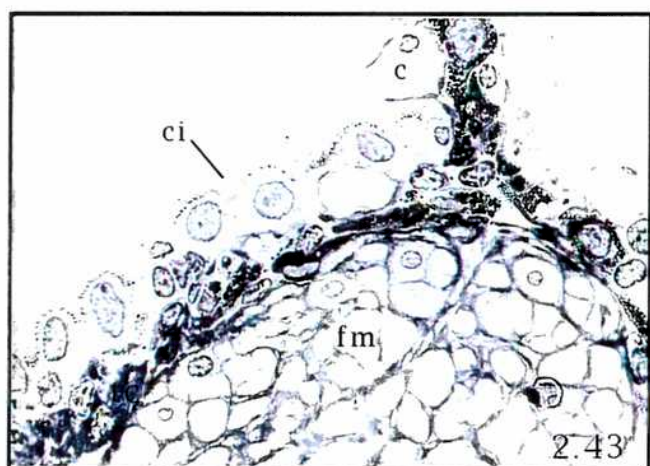
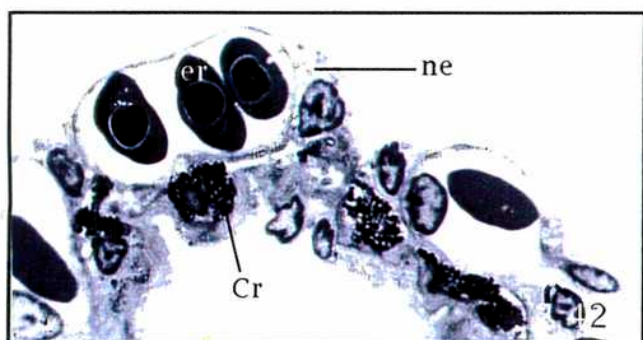
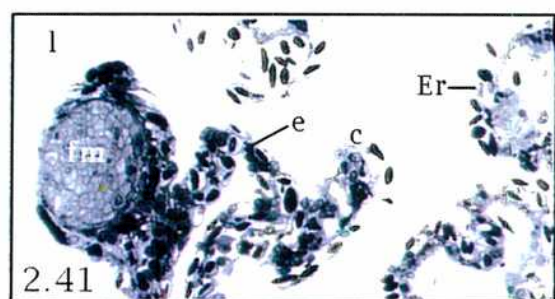
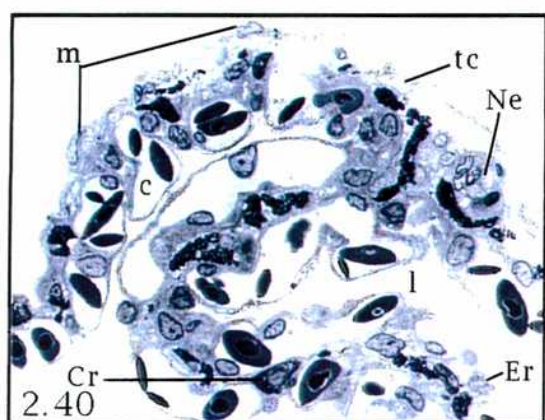
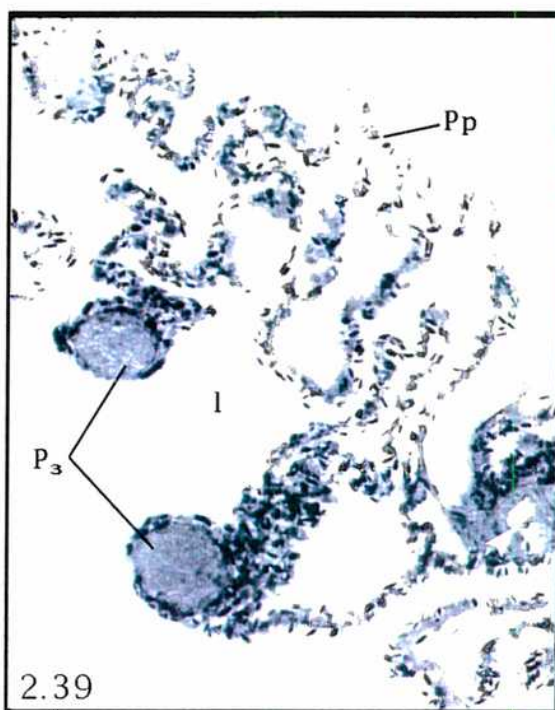
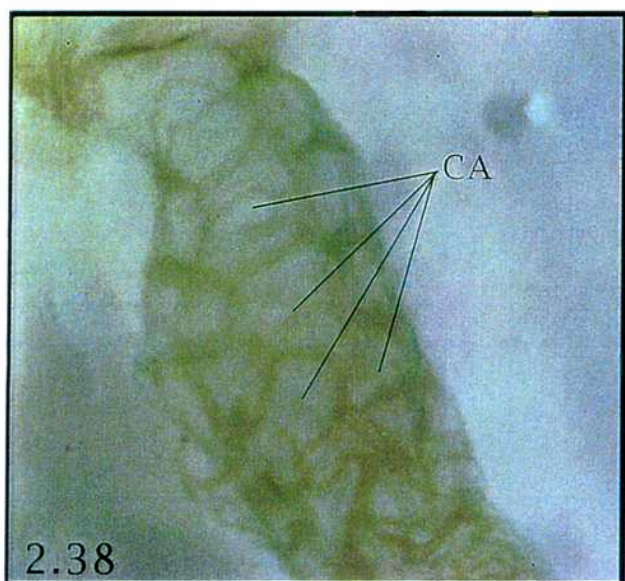


Fig. 2.45 – Superficie interna pulmonar. MEB. 85x

Las cámaras (edículos) (Ed) están formadas por la interconexión de septos terciarios (P_3).

Fig. 2.46 – Epitelio respiratorio. MEB. 1500x

La red de capilares están cubiertos por los delgados procesos citoplasmáticos (pc). Los cuerpos celulares (Cc) están localizados profundamente en la red de capilares o a los lados de los capilares. Nótese las microvellosidades (cabezas de flecha rojas) localizadas en la zona de unión entre dos células.

Fig. 2.47 – Porción de un septo terciario (P_3) con pequeñas áreas con células ciliadas (ci). MEB. 1000x

Fig. 2.48 – Detalle de protrusiones (cabeza de flechas verdes) localizadas sobre un septo terciario (P_3). MEB. 630x

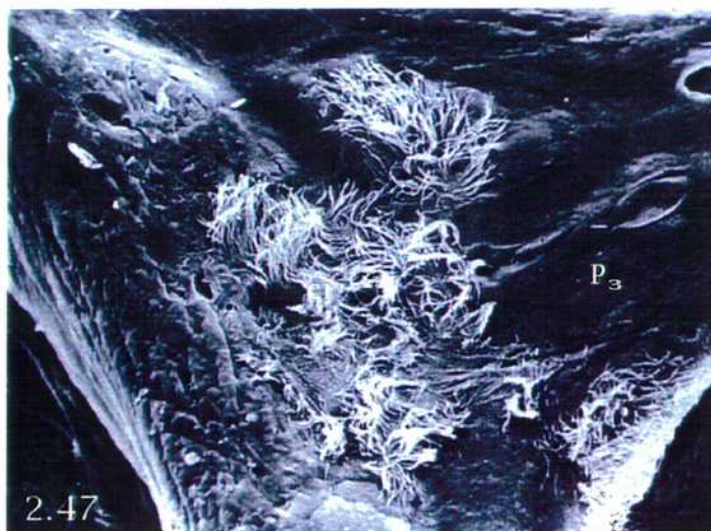
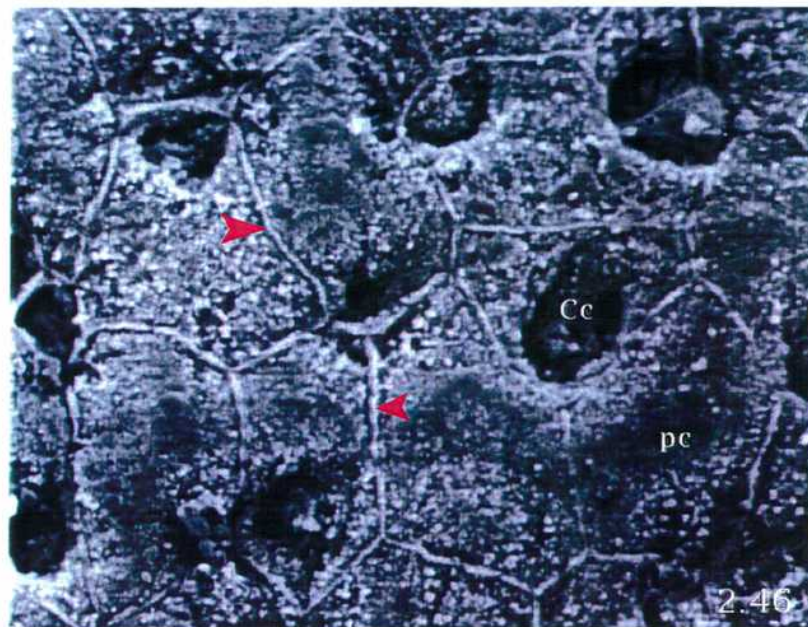
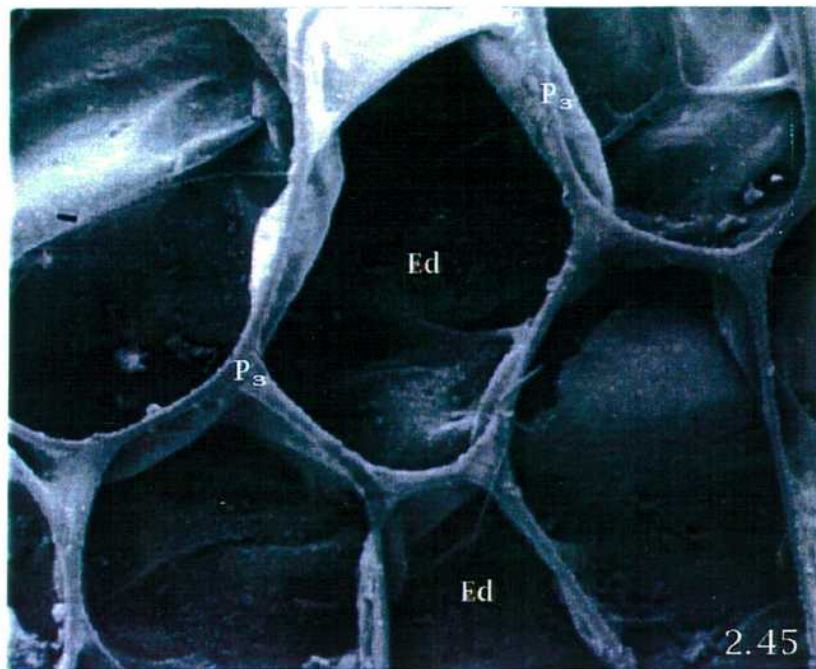


Fig. 2.49 – Capilares sanguíneos (c) cubiertos por una prolongación citoplasmática delgada proveniente de los neumocitos (ne). MET. 4400x

Fig. 2.50 – Detalle del complejo de unión (Cu) entre dos neumocitos. MET. 18000x

Fig. 2.51 – Detalle de la barrera de intercambio gaseoso. MET. 27000x

Formada por el proceso citoplasmático del neumocito (pc), un espacio intersticial (Ei) conteniendo fibras colágenas y el endotelio capilar (En). Nótese la presencia de vesículas micropinocíticas (cabezas de flecha blancas). Algunas de ellas se encuentran próximas a la lámina basal (cabezas de flecha negras).

Fig. 2.52 - Porción del citoplasma de un neumocito. MET. 28800x

Se destaca el complejo de Golgi (G) rodeado or vesículas de distinto tamaño, ribosomas libres (ri), retículo endoplasmático rugoso (Rer), y diferentes tipos de inclusiones osmiofilicas, cuerpos electrón denso (Ce), cuerpos multivesiculares (Cmv) y cuerpos multilamelares (*).

Fig. 2.53 a, b, c – Distintos tipos de cuerpos osmiofilicos. MET. a) 30000x, b) 12600x, c) 60000x

Cmv: cuerpo multivesicular, l: lumen, (*) centro electrónlucido

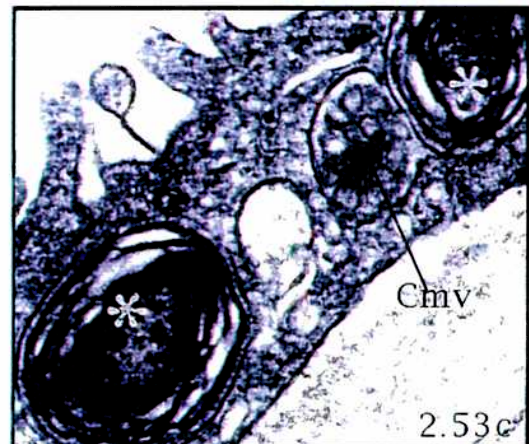
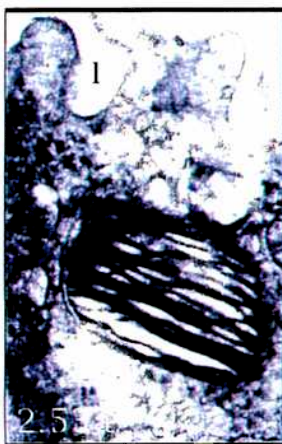
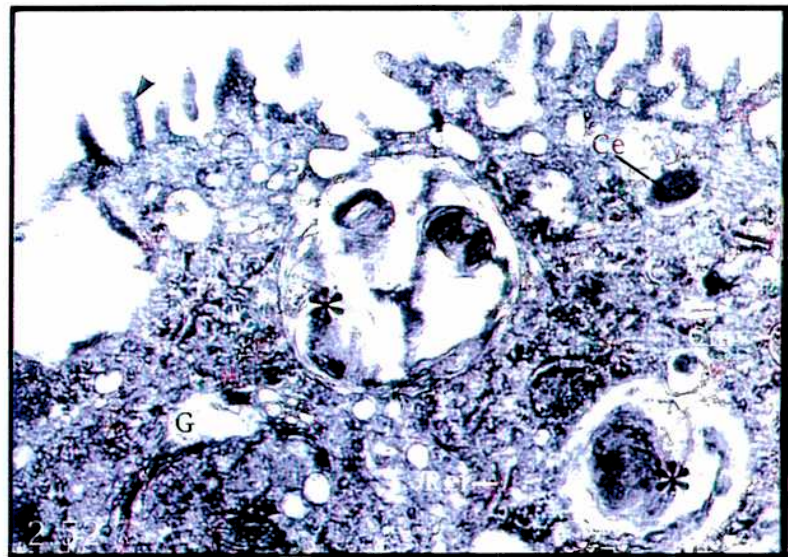
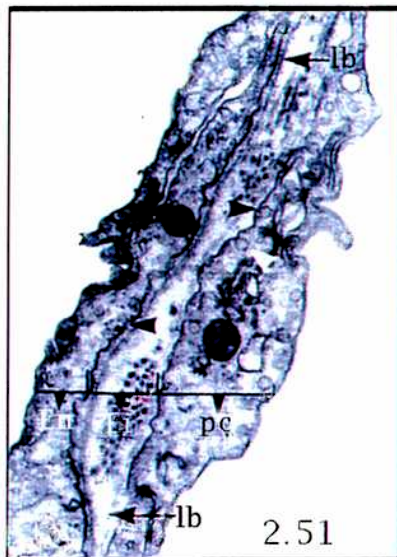
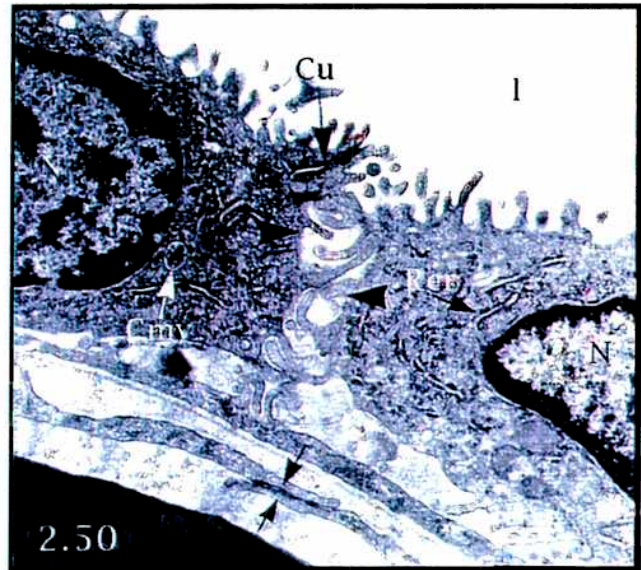
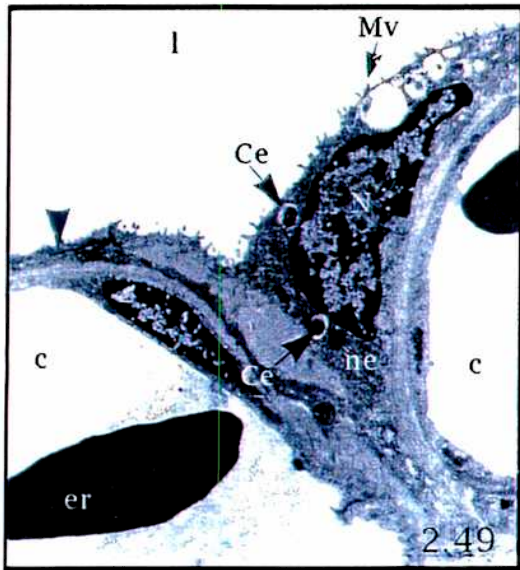
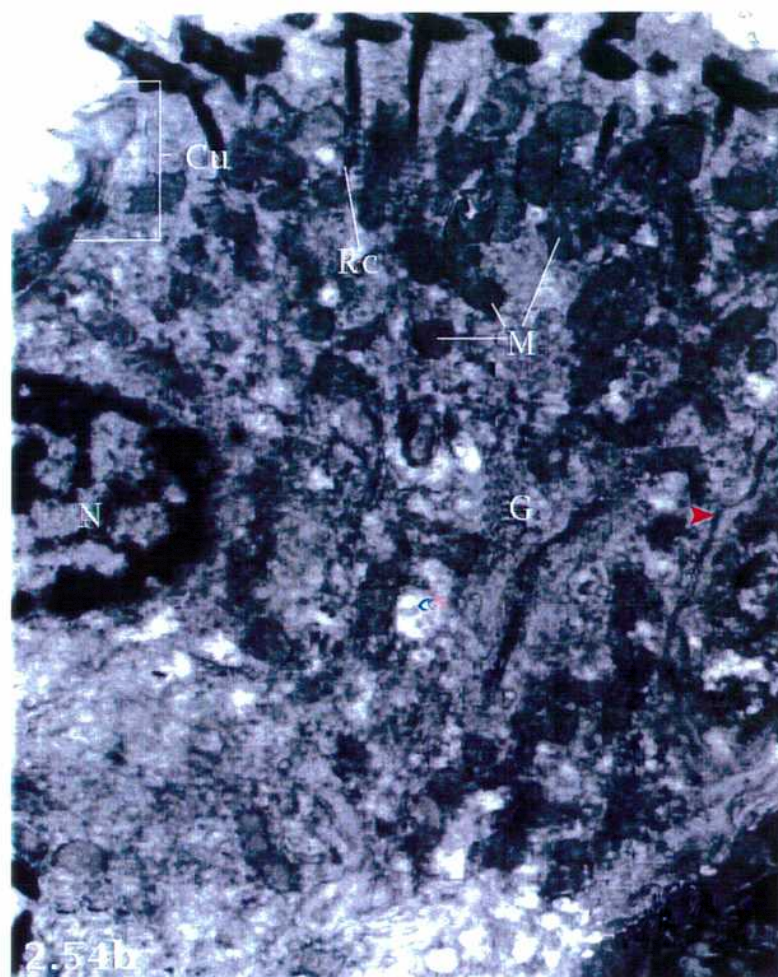
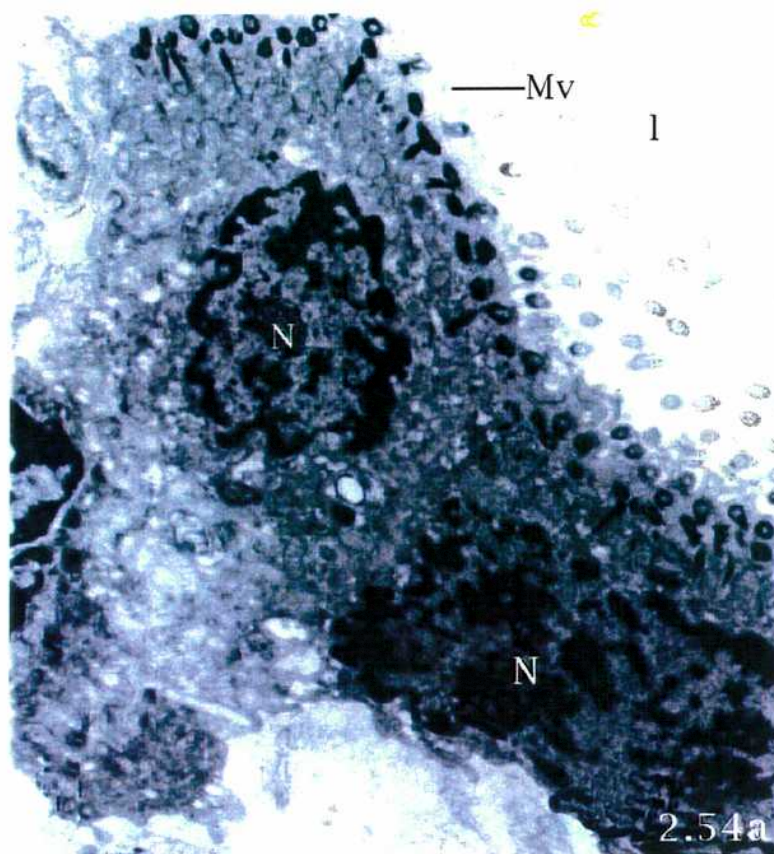


Fig. 2.54 a, b - Células ciliadas. MET. a) 9000x, b) 20000x

Cu: Complejo de unión, G: complejo de Golgi: lumen, M. mitocondrias, Mv: micovellodades, N: núcleo, Rc: raíces ciliadas. Cabeza de flecha roja: interdigitación de membrana.





DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La arquitectura general de los pulmones de *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* es similar a la de otras especies de anuros ya estudiadas como *Rana temporaria*, *R. esculenta* (Dierich, 1975), *Bufo marinus* (Smith y Campbell, 1976), *R. pipiens* (Stratton *et al.*, 1980), *Hyla arborea* (Goniakowska-Witalińska, 1985, 1986) y *Chiromantis petersi* (Maina, 1989).

Los pulmones están divididos internamente por septos que delimitan celdas o cámaras de distinto tamaño en todas las especies mencionadas. La diferencia entre estas especies citadas y *M. s. stelzneri*, radica en que en esta última hay un solo tipo de septo mientras que en las demás la estructura interna es mucho más compleja debido a la interconexión de septos de primer, segundo y tercer orden que protruyen dentro del lumen pulmonar compartimentalizándolo en dichas cámaras.

Muchos autores clasificaron a los septos teniendo en cuenta su longitud (Goniakowska-Witalińska, 1995). Por lo tanto en esta tesis se plantea que lo más adecuado para la diferenciación de los tres tipos de septo es la morfología del epitelio que reviste su extremo apical, ya que la utilización de distintos métodos de fijación, así como los distintos grados de distensión del pulmón modifican la longitud de los septos pero no la organización del epitelio.

Una segunda cuestión a considerar es la terminología que debe utilizarse para denominar a las cámaras o celdas. Los diferentes investigadores se han referido a estas unidades respiratorias de los anfibios con el término de alvéolos (Goniakowska-Witalińska, 1995). Teniendo en cuenta que el parénquima pulmonar en los anuros se asemeja mucho más al de los reptiles que al de los mamíferos, se considera que lo más apropiado sería utilizar la nomenclatura



empleada para estos últimos por Dunker (1972) y Perry (1999). Estos autores clasifican al parénquima en: trabecular, edicular y faveolar. En el parénquima trabecular los paquetes de fibras musculares lisas y el tejido elástico que forma el eje de las trabéculas (septos según este trabajo de tesis) forman parte de la pared pulmonar donde determinan una red poligonal, cada polígono (cámara) se denomina cubículo. Si un cubículo es más ancho que profundo, entonces el parénquima es edicular. Si es más profundo que ancho, es faveolar (Fig. 2.55).

El parénquima puede ser clasificado de acuerdo a su distribución dentro del pulmón como homogéneo o heterogéneo. Es homogéneo cuando el tipo de parénquima es el mismo en toda la superficie pulmonar interna, mientras que es heterogéneo cuando presenta distintos tipos de parénquima en dicha superficie (Fig. 2.55).

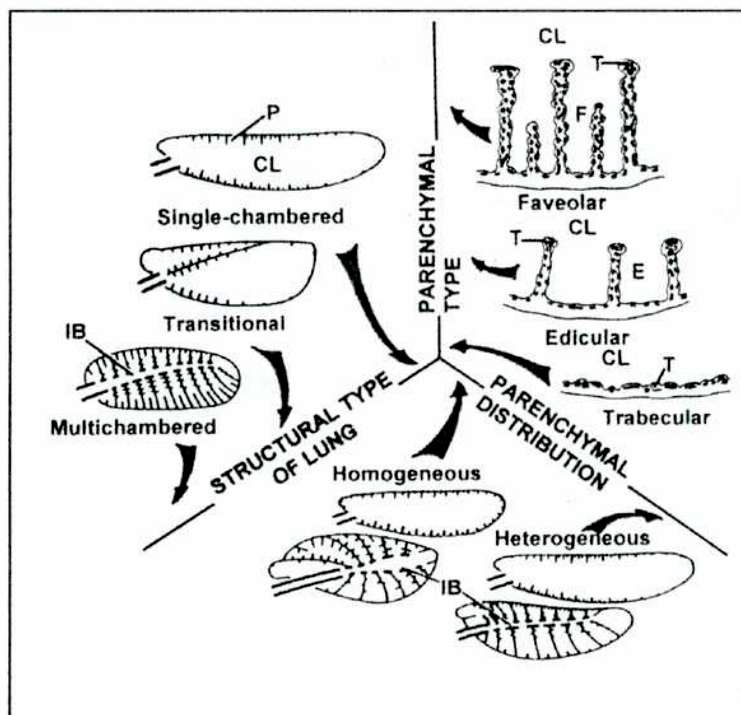


Fig. 2.55 Esquema representando las variaciones macroscópicas de la estructura pulmonar en reptiles. Se ilustra: el tipo estructural de pulmón, el tipo y la distribución del parénquima. CL: lumen central del pulmón; E: edículo; F: faveola; IB: bronquio intrapulmonar; P: parénquima; T: músculo liso de la trabécula. (Según Perry, 1999)



Por lo tanto para *B. arenarum* y *M. s. stelzneri*, se determinó que el parénquima es faveolar para el primero y edicular para el segundo y que la distribución del mismo es homogénea para ambas especies.

En el extremo apical de los septos los epitelios observados, en *B. arenarum* y el único determinado en *M. s. stelzneri* coinciden con el descrito para otras especies tanto con microscopía óptica como electrónica.

Los septos de primer orden presentan un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado con abundantes células caliciformes. Estas glándulas unicelulares secretan hacia el pulmón un mucus que de acuerdo con el análisis histoquímico y las observaciones de distintos tipos de gránulos en su citoplasma permite concluir que en *B. arenarum* hay tres poblaciones de células caliciformes: 1) con predominio de glicoconjugados neutros; 2) con glicoconjugados carboxilados y neutros y 3) con glicoconjugados sulfatados solamente.

El mucus mantiene la superficie epitelial húmeda evitando su desecación y además ayuda a prevenir el daño causado por agentes infecciosos y por partículas (Faillard y Schauer, 1972). Aquellos glicoconjugados que contienen residuos sulfatados funcionarían primariamente como lubricantes, la secreción de sialomucinas y glicoconjugados sulfatados se incrementa en condiciones irritantes. Se ha sugerido que los residuos de ácido siálico juegan un rol importante en la defensa y protección de la superficie pulmonar contra parásitos, virus o toxinas así como también una función lubricante (Castells *et al.*, 1990, 1991).

Las diferencias observadas en el contenido del mucus en las células caliciformes podrían depender de las condiciones ambientales.

La predominancia de células ciliadas en la zona apical de los septos de primero y segundo orden en *B. arenarum* y en los parches



aislados en los septos del pulmón de *M. s. stelzneri* podría indicar que estas estructuras están relacionadas con un posible rol en el desplazamiento del mucus y de partículas extrañas evitando que alcancen la superficie respiratoria. Las células ciliadas también pueden contribuir a dispersar el surfactante sobre la superficie pulmonar.

La pared pulmonar y el eje de los septos contienen fibras elásticas y fibras musculares lisas que permiten al pulmón expandirse cuando el aire es forzado a ingresar por la contracción de los músculos del piso de la cavidad bucal. Durante este proceso los pulmones están sujetos a una presión positiva.

Los pulmones de *B. arenarum* y *M. s. stelzneri*, así como en la mayoría de los anuros estudiados, presenta un único tipo de neumocito que combina las características ultraestructurales encontradas en las células alveolares tipo I y II de los pulmones de mamíferos. Sin embargo Okada *et al.* (1962) sugirió que las células alveolares de *Rana nigromaculata* y *Bufo vulgaris japonicus* pueden ser clasificadas en dos tipos de acuerdo a la ubicación de los neumocitos en relación con los capilares adyacentes. Consideramos en esta tesis que tal distinción es innecesaria ya que no existen diferencias citológicas entre dichas células. Los pulmones de la rana arborícola *Chiromantis petersi*, al igual que los pulmones de los vertebrados superiores, presenta dos poblaciones distintas de neumocitos: los neumocitos tipo I son células planas con extensas y delgadas prolongaciones y los neumocitos tipo II o granulares presentan microvellosidades y se caracterizan por la presencia de cuerpos lamelares en su citoplasma (Maina, 1989). Los neumocitos de *B. arenarum* y *M. s. stelzneri* son similares a los neumocitos tipo II de *Ch. petersi*.

Desde un punto de vista filogenético la presencia de un solo tipo de neumocito en el pulmón de los anfibios y en los peces



pulmonados es una condición primitiva mientras que en *Ch. petersi* la aparición de dos tipos distintos de neumocitos es un carácter derivado y representa una convergencia con los vertebrados superiores.

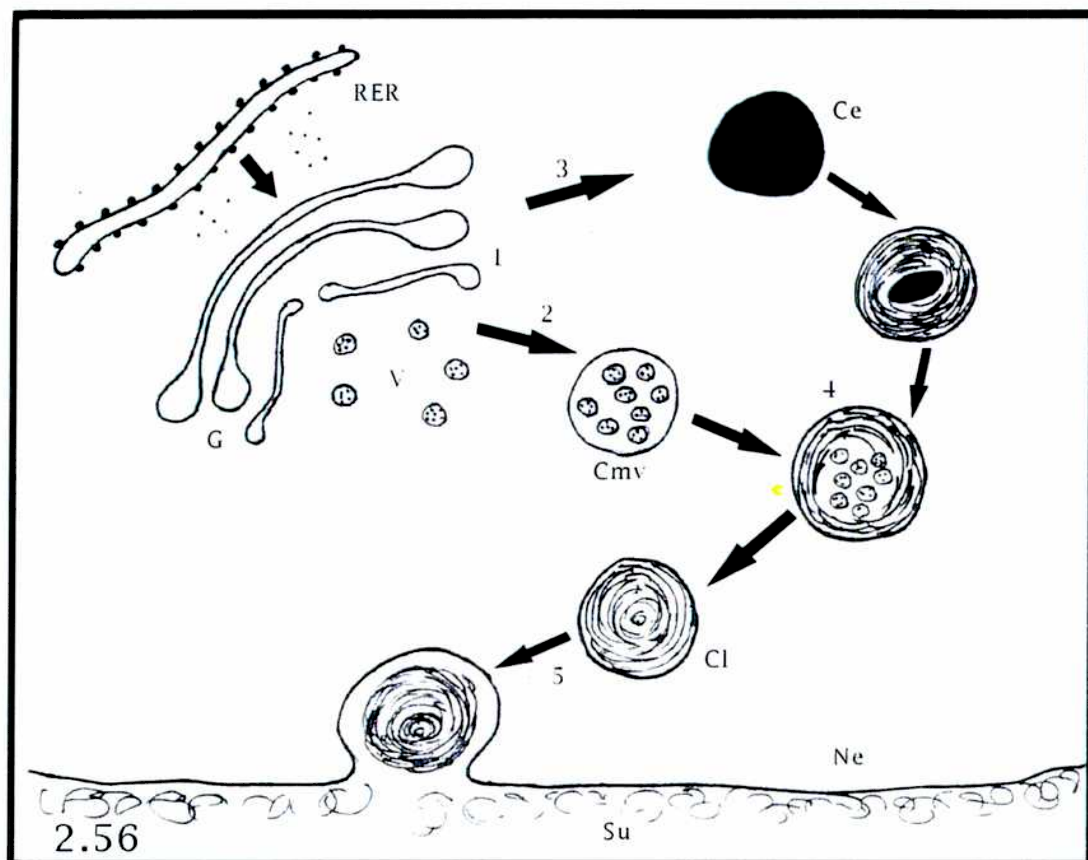
En cuanto al patrón de irrigación, el de *B. arenarum* es similar al de *B. marinus*.

La ultraestructura de los neumocitos en *B. arenarum* y *M. s. stelzneri* es básicamente similar al de otras especies de anuros citadas anteriormente. Los neumocitos de estas especies aparentan estar morfológicamente adaptados al cambio de tensiones. Aunque el rol que juegan las microvellosidades sobre el extremo apical de los neumocitos no está claramente comprendido se podría especular que las microvellosidades podrían ser reservas de membrana plasmática cuando el pulmón se distiende. Algunos autores consideran que estas expansiones celulares estarían involucradas en el mantenimiento de una capa superficial fluida (Meban, 1973). Un hecho que soporta esta hipótesis es que los neumocitos de *M. s. stelzneri* así como el de otras especies de anuros, que carecen de células caliciformes en sus pulmones, presentan abundantes vesículas citoplasmáticas. Estas vesículas podrían aportar algún tipo de mucosustancia con el propósito de proteger a los neumocitos como fue descrito por Goniakowska-Witalińska (1980 a, b; 1986).

Las interdigitaciones laterales de los neumocitos, podrían contribuir a la distensión del pulmón ocasionando cambios en la forma de la célula.

Los neumocitos en ambas especies estudiadas contienen tres tipos diferentes de cuerpos de inclusión osmiofílicos: cuerpos electrón denso, cuerpos lamelares y cuerpos multivesiculares. Existe en la literatura varias hipótesis relacionadas con el origen de los cuerpos lamelares en mamíferos. Ellas postulan que los cuerpos lamelares derivan de mitocondrias, cuerpos multivesiculares o del

retículo endoplasmático (Sorokin, 1966, Callas y De Groodt, 1976; Stratton, 1984). De acuerdo con las observaciones obtenidas en el estudio de los neumocitos de *B. arenarum* y *M. s. stelzneri* se propone que los diferentes cuerpos representan distintas etapas en la síntesis, almacenamiento y liberación del surfactante (Fig. 2.56). En la proximidad del retículo endoplasmático rugoso y cerca del complejo de Golgi aparecen vesículas con una moderada densidad (etapa 1) las cuales se mantienen independiente unas de otras, pero se rodean de una membrana limitante formándose un cuerpo multivesicular (etapa 2) o bien se pueden fusionar para dar origen a cuerpos electróndensos (etapa 3). En una etapa posterior, una disminución de la densidad electrónica de un cuerpo electróndenso va acompañada de la formación de membranas lamelares. La incorporación de cuerpos multivesiculares dentro de cuerpos lamelares (etapa 4) sólo se observó en *M. s. stelzneri*. En *B. arenarum* los cuerpos multivesiculares se han observado siempre próximo a los lamelares. La incorporación de cuerpos multivesiculares puede tener una connotación adicional. Williams y Benson (1981) utilizando técnicas inmunocitoquímicas, demostraron que los cuerpos multivesiculares presentes en los pulmones de las ratas era el sitio donde se producía la asociación proteínas-lípidos. Se puede suponer que en *M. s. stelzneri* una proteína sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, transformada en el complejo de Golgi y almacenada en las vesículas de los cuerpos multivesiculares puede incorporarse a los fosfolípidos de las membranas lamelares. Los cuerpos lamelares maduros son exocitados al lumen del pulmón (etapa 5) donde los fosfolípidos de los cuerpos lamelares forman complejas figuras de mielina. Al final el surfactante se extiende sobre el revestimiento de los edículos o faveolas como una monocapa. El surfactante reduce la tensión de la interfase aire-epitelio. Sin una adecuada secreción del surfactante los edículos o faveolas





colapsarían. En no mamíferos, el surfactante parece actuar como un anti-aglutinante previniendo la adhesión de las superficies respiratorias hecho que ocurre cuando los pulmones se colapsan y no pueden ser expandidos. Sin un anti-aglutinante, la inspiración después que los pulmones colapsan sería mucho más dificultosa a tensiones superficiales bajas del fluido que interviene entre las superficies de contacto (Daniels *et al.*, 1998).

La existencia de un grupo de células con características de células endócrinas interrumpiendo el epitelio respiratorio de *M. s. stelzneri* se amplía y se discute su posible función en el capítulo III del presente trabajo.

Los macrófagos observados en el lumen del pulmón de *B. arenarum* se encuentran asociados con el epitelio respiratorio. En esta localización, están en contacto directo con el aire inhalado, las toxinas ambientales y las bacterias y de este modo sirven como defensa contra estas partículas complementándose su función con el rol que desempeñan las células ciliadas y las células caliciformes.

La reducción de la complejidad de la estructura pulmonar en *M. s. stelzneri* en cuanto a una menor compartimentalización del pulmón en comparación con otros bufónidos como *B. arenarum* o *B. marinus* podría deberse a que la respiración cutánea y bucofaríngea podría complementar a la respiración pulmonar, consecuentemente los pulmones serían más simples.

Considerando que *M.s.stelzneri* es una especie que habita por arriba de los 1.000 m de altura en un microambiente especial, debajo de rocas, se podría suponer que una disminución en los niveles de oxígeno podría ocasionar cambios pulmonares tanto anatómicos como fisiológicos. Para asegurar una mayor distribución de oxígeno se incrementaría la cantidad de capilares sanguíneos o aumentaría la superficie de intercambio a expensas del epitelio ciliado y se reduciría el grosor de la barrera de intercambio gaseoso.

A fin de corroborar estas hipótesis sería necesario realizar un estudio morfométrico comparado entre las dos especies en estudio con el fin de analizar distintos parámetros como el volumen pulmonar, la superficie respiratoria vs. superficie no respiratoria (epitelio ciliado) así como el grosor de la barrera de intercambio gaseoso.

CAPÍTULO III

CUERPOS NEUROEPITELIALES



INTRODUCCIÓN

Está fehacientemente comprobado que el sistema neuroendócrino es un componente más del sistema respiratorio. Este sistema está constituido por células epiteliales endócrinas asociadas con fibras nerviosas (Van Lommel *et al.*, 1999). Tales células se encuentran en el tracto respiratorio ya sea aisladas o en acúmulos, en el primer caso se las denomina células neuroendocrinas (NE) mientras que en el segundo caso se habla de cuerpos neuroepiteliales (CNE).

Los CNE fueron identificados por primera vez en el pulmón de neonatos humanos (Lauweryns y Peuskens, 1972) y en conejo (Lauweryns *et al.*, 1972), y más tarde en todas las clases de vertebrados, desde los peces a los mamíferos (Cook y King, 1969; Walsh y McLelland, 1974; Goniakowska-Witalińska, 1981; 1986; Scheuermann *et al.*, 1983; 1989, Scheuermann, 1987; Zacccone *et al.*, 1989a, b; Van Lommel y Lauweryns, 1993, a, b).

Los CNE están distribuidos sobre la superficie respiratoria de los pulmones y protruyen delicadamente hacia el espacio aéreo. Cada CNE está constituido por células epiteliales especiales denominadas células corpusculares (CC) las cuales pueden o no estar en contacto con el lumen pulmonar. Ultraestructuralmente, estas células contienen numerosas vesículas con un material central granular a las cuales se las denominó vesículas con centro electrondenso (VCD) y a las que se les adjudica una función secretora (Van Lommel *et al.*, 1998).

Los CNE presentan terminaciones nerviosas que penetran entre las CC y los neumocitos y cuyas características morfológicas se asemejan a una terminación sensorial (Lauweryns y Van Lommel, 1987). Desde una perspectiva funcional, las evidencias indican que

los CNE responderían específicamente a condiciones de hipoxia (Lauweryns *et al.* 1977; Youngson *et al.*, 1993).

La presencia de NE y CNE en el epitelio del pulmón de los anfibios ha sido motivo de varios estudios por parte de muchos investigadores. Mediante el uso combinado de técnicas de microscopía de fluorescencia, inmunohistoquímica y microscopía electrónica permitieron determinar que las NE y los CNE contenían mediadores químicos citoplasmáticos como la 5- hidroxitriptamina (5-HT) y neuropéptidos hormonales como bombesina, péptido liberador de gastrina, calcitonin y sustancia P (Rogers y Haller, 1978; 1980; Wasano y Yamamoto, 1978; Cutz *et al.*, 1986; Goniakowska-Witalińska, 1986; Scheuermann *et al.*, 1989; Goniakowska-Witalińska and Cutz, 1990; Bodegas *et al.*, 1993).

Como se mencionó en el capítulo II, en el pulmón de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* el epitelio respiratorio está interrumpido por parches de células ciliadas y por cuerpos neuroepiteliales que hacen saliencia hacia el lumen pulmonar.

El propósito de éste capítulo es el de caracterizar la morfología de estos cuerpos mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido y transmisión.



RESULTADOS

3.1 Microscopía óptica

Las observaciones con microscopía óptica indican que cada cuerpo neuroepitelial (CNE) está formado por células corpusculares (CC) localizadas muy próximas entre sí. Están distribuidos sobre la superficie de los septos así como sobre la capa interna de la pared pulmonar. En ambos casos, hacen protrusión hacia el lumen pulmonar. Es característico de estos cuerpos su ubicación próxima a los capilares sanguíneos.

Las CC se caracterizan por tener un núcleo oval y un citoplasma con aspecto vacuolado (Fig. 3.1).

3.2. Microscopía Electrónica

3.2.1. Microscopía electrónica de barrido

Los CNE tienen una forma hemiesférica, se elevan sobre la superficie de los septos terciarios (Fig. 3.2). En contraste con la superficie de los neumocitos adyacentes, la superficie luminal de estos corpúsculos está caracterizada por la presencia de microvellosidades con aspecto foliáceo (Fig. 3.3).

3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las observaciones muestran que la estructura corpuscular observada al MEB se corresponde con los CNE, los cuales son cupuliformes y se extienden desde la lámina basal hacia la superficie luminal. Los CNE están separados del espacio aéreo y del tejido



conectivo basal por un proceso citoplasmático apical y basal perteneciente a los neumocitos vecinos (Fig. 3.4, 3.5a). Estos neumocitos son diferentes del resto de los neumocitos por el gran número de vesículas con una densidad electrónica baja encontradas en su citoplasma (Fig. 3.5a). Están conectados a las CC vecinas por medio de una *zonula occludens* y una *macula adherens* (Fig. 3.5b). Los capilares continuos están ubicados cerca del polo basal de los CNE, inmediatamente por debajo de la lámina basal o bien entre el tejido conectivo subyacente (Fig. 3.4, 3.5a, 3.6).

Los CNE pueden estar constituidos desde 2 a 6 CC pero la morfología, número y disposición exacta de las mismas varía con el plano de corte. Las CC están adheridas fuertemente entre sí por desmosomas. Los núcleos de las CC son esféricos u ovales con una ligera indentación. Están ubicados centralmente y contienen parches de heterocromatina situadas sobre la membrana nuclear. Es posible observar con claridad los poros de dicha membrana (Fig. 3.5a, 3.7).

El citoplasma de la CC es menos denso que el de los neumocitos adyacentes desde el punto de vista de la densidad electrónica. Presenta un complejo de Golgi bien desarrollado, con cisternas distendidas y numerosas vesículas de aspecto claro. Además contiene microfilamentos, mitocondrias, vesículas electrónlúcidas, cortos fragmentos de retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres generalmente localizados en la parte basal de la célula y un centrosoma (Fig. 3.8a, 3.8b, 3.9).

La característica más notoria de las CC es la presencia de numerosos gránulos secretores denominados vesículas con centro electrondenso (VCD). Están distribuidos en todo el citoplasma pero tienden a acumularse cerca del complejo de Golgi (Fig. 3.8a) así como en la región basolateral de la célula (Fig. 3.6, 3.7, 3.9).

Los VCD tienen principalmente forma esférica, pero también pueden ser polimórficas. Usualmente entre el material central denso



y la membrana simple que lo limita, un espacio claro de 15 a 35 nm de ancho. En el caso en que el material denso se ubique excéntricamente, éste está adherido a la membrana limitante. El diámetro externo de los VCD tiene un rango de 80 a 110 nm. El tamaño, forma y densidad electrónica de los VCD no sólo varía entre célula y célula sino que aún dentro de una misma célula. Algunos VCD se los observa en contacto con la membrana plasmática de la célula con su membrana celular limitante completa o ligeramente incompleta (Fig. 3.9, 3.10).

Las observaciones muestran que los CNE están asociados con fibras nerviosas aferentes y eferentes morfológicamente. Estas terminaciones nerviosas están localizadas entre las CC así como entre las CC y los pneumocitos. Sin embargo, la inervación más conspicua se encuentra en la región basal de los CNE (Fig. 3.5a, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 a).

Las fibras nerviosas aferentes son relativamente voluminosas y están caracterizadas por contener mitocondrias, algunas vesículas electrónlúcidas con un diámetro entre 40 nm a 100 nm y escasas VCD. Algunas terminaciones nerviosas exhiben una marcada proporción de mitocondrias desorganizadas así como cuerpos lamelares. Por otro lado, las terminaciones nerviosas eferentes son más pequeñas que las anteriores y se distinguen por la acumulación de pequeñas vesículas con un material de baja densidad y con un diámetro comprendido entre los 40 nm y 60 nm (Fig. 3.10, 3.11 a). En algunas secciones es posible observar una membrana en cuyo interior aparece una zona característicamente aferente y otra zona con una morfología típicamente eferente (Fig. 3.11 a).

Además se pudieron observar uniones sinápticas entre las CC y las terminaciones nerviosas. Estas uniones se caracterizan porque la membrana de la CC está engrosada por un depósito de material electrondenso, mientras que la membrana de la terminación nerviosa

permanece uniforme. Las membranas sinápticas están separadas por un espacio de 25 nm de ancho. Las VCD se acumulan cerca de la zona engrosada electrondensa de la superficie de la CC (Fig. 3.11 b).

Fig. 3.1 - Pulmón de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* mostrando un cuerpo neuroepitelial (NEB) formado por células corpusculares (*). Semifino. 1250x

Nótese la presencia de capilares sanguíneos próximo a un NEB.

A: espacio aéreo, m: melanóforo, W: pared pulmonar

Fig. 3.2 - Septo de tercer orden, indicando la posición de los NEB (cabeza de flecha). MEB. 540x

Fig. 3.3 - Cuerpo neuroepitelial elevándose de la superficie de un septo de tercer orden (S). MEB. 4850x

Nótese el aspecto de las microvellosidades (M)

Fig. 3.4 - Cuerpo neuroepitelial. MET. 2800x

Nótese los procesos citoplasmáticos apical (acp) y basal (bcp) separando a las células corpusculares (CC) del espacio aéreo (A) y del tejido conectivo subyacente (ct) respectivamente. Un capilar sanguíneo (c) está localizado próximo a los NEB.

p: neumocito

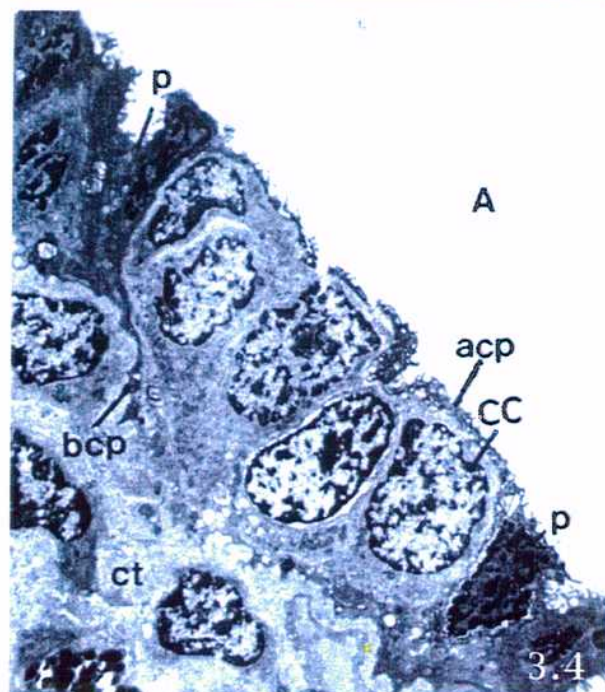
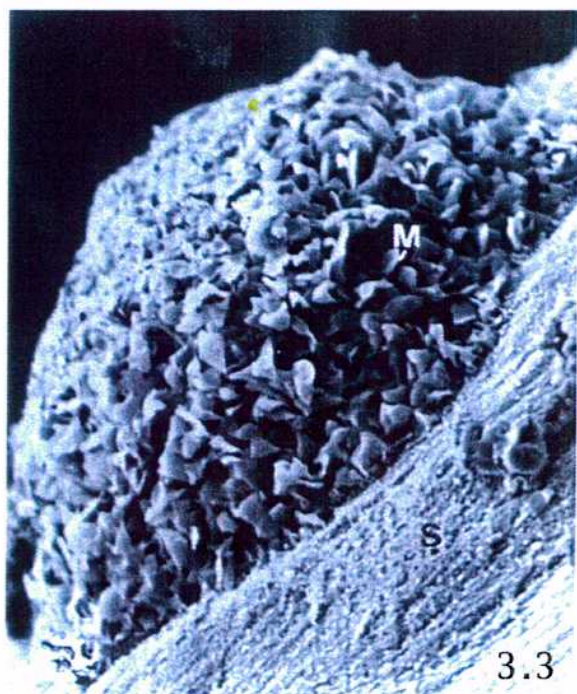
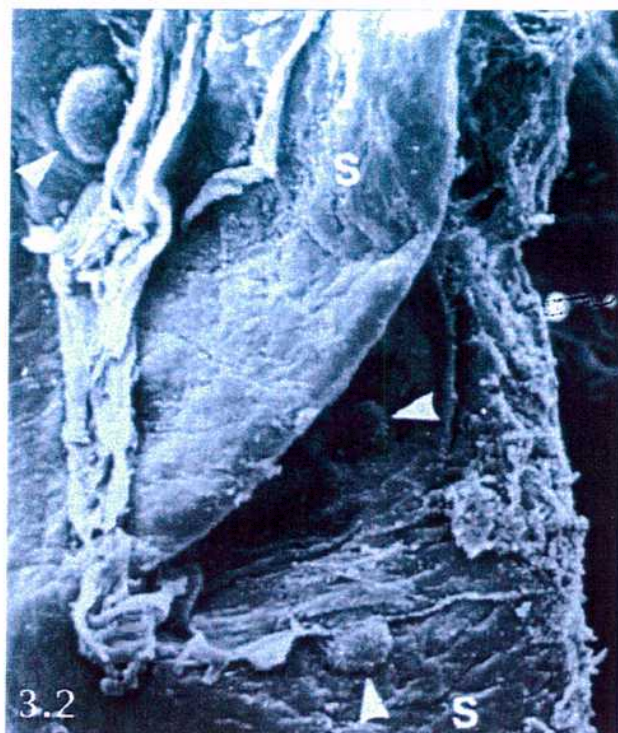
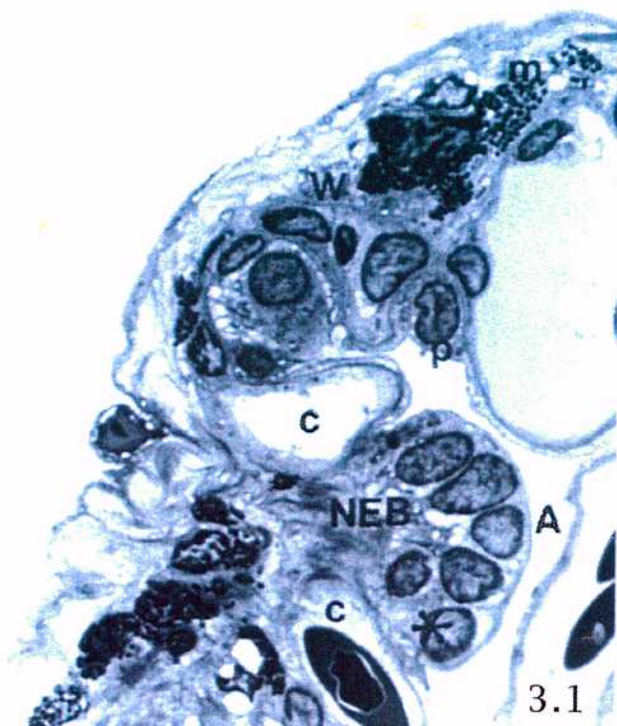


Fig. 3.5 a - Neumocito próximo a un NEB con vesículas electronlúcidas (cabeza de flecha) en el proceso citoplasmático apical (acp). MET. 5600x

Nótese terminaciones nerviosas eferentes entre las células corpusculares (CC) y los neumocitos (p).

A: espacio aéreo, bcp: proceso citoplasmático basal, c: capilar sanguíneo, ct: tejido conectivo, N: núcleo. Flecha: poro en la membrana nuclear

Fig. 3.5 b - Detalle de la unión entre procesos citoplasmáticos apicales de dos neumocitos. MET. 20000x

(*): desmosoma, cabeza de flecha: *zonula occludens*

Fig. 3.6 – Detalle del citoplasma de un NEB. (MET). 5600x

El citoplasma de las células corpusculares (CC) contienen pequeñas vesículas con centro electródenso (dcv) y mitocondrias (mi) en la región basal.

Nótese un nervio eferente (E) en la parte basal del NEB.

c. capilar sanguíneo, e: endotelio, F: fibroblasto, N. núcleo

Fig. 3.7 - Célula corpuscular y proceso apical de un neumocito. MET. 7500x

dcv: vesículas con centro electródenso, E: terminación nerviosa eferente, lb: cuerpo lamelar, mi: mitocondria. Cabeza de flecha: poro en la membrana nuclear

Fig. 3.8 a, b - Detalle del citoplasma de una célula corpuscular. MET.

a) Nótese los microfilamentos (f), las vesículas con centro electródenso (dcv) así como la mitocondria con crestas paralelas (cabeza de flecha). **49300x**

b) Obsérvese la presencia de vesículas de aspecto claro (cabeza de flecha) y vesículas con centro electródenso (dcv) en la proximidad del complejo de Golgi (G). Un centrosoma (flecha) se unifica cerca del complejo de Golgi. **46000x**

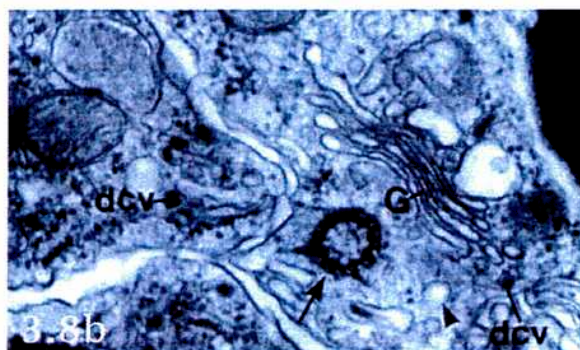
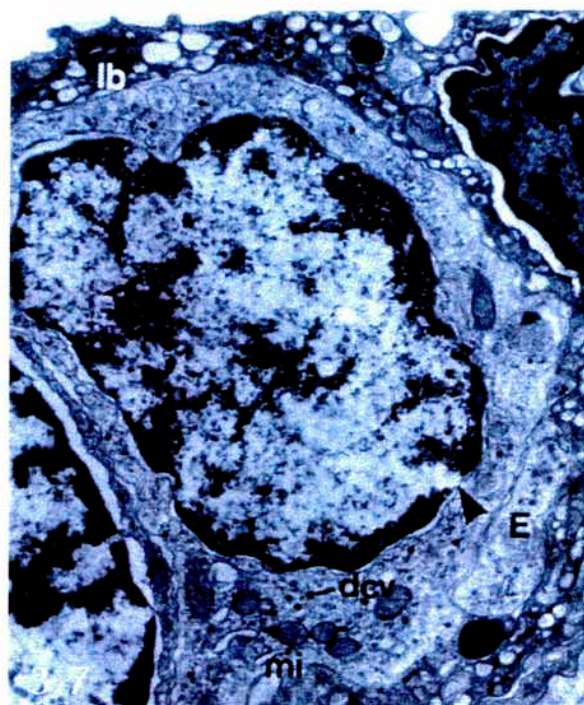
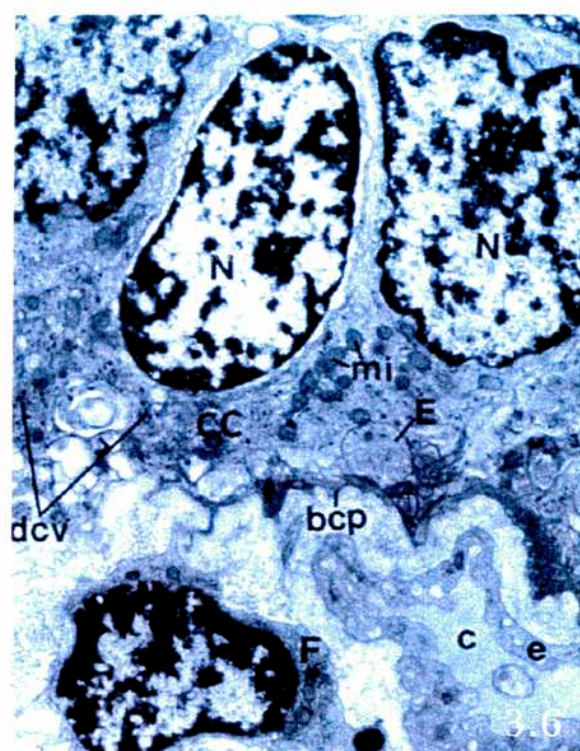
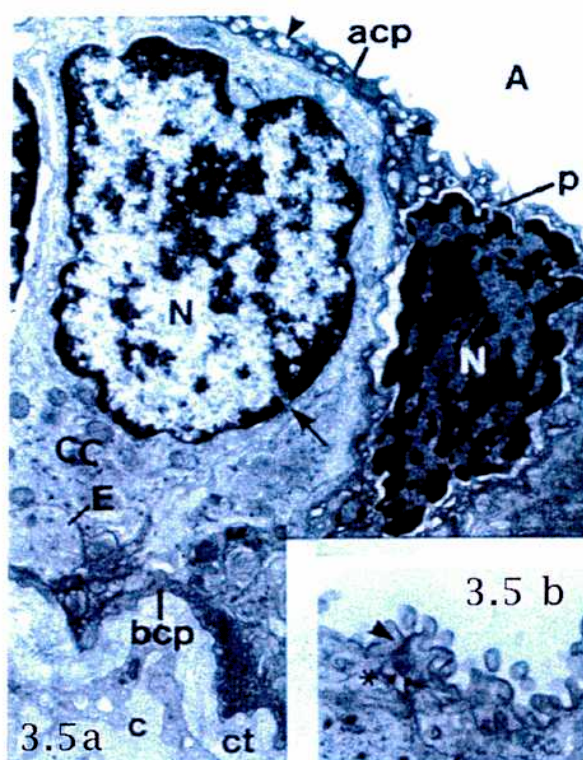


Fig. 3.9 - Porción basal de una célula corpuscular. MET. 25300x

Obsérvese la abundante cantidad de vesículas con centro electródenso. Algunas de ellas están en contacto con la membrana basal.

f: paquetes de microfilamentos, N: núcleo, RER: retículo endoplasmático rugoso

Fig. 3.10 - Vesículas con centro electródenso (cabeza de flecha) cerca de la membrana basal. MET. 17700x

Nótese las terminaciones nerviosas eferentes (E) y aferentes (A) en en tejido conectivo (ct) cerca de la lámina basal (bl).

bcp: proceso citoplasmático basal

Fig. 3.11 a - Terminaciones nerviosas aferentes (A) y eferentes (E). MET. 31000x

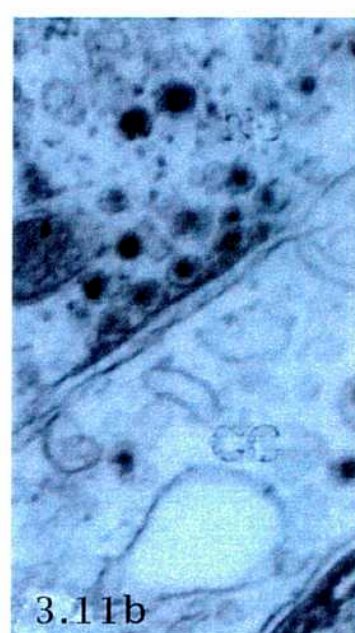
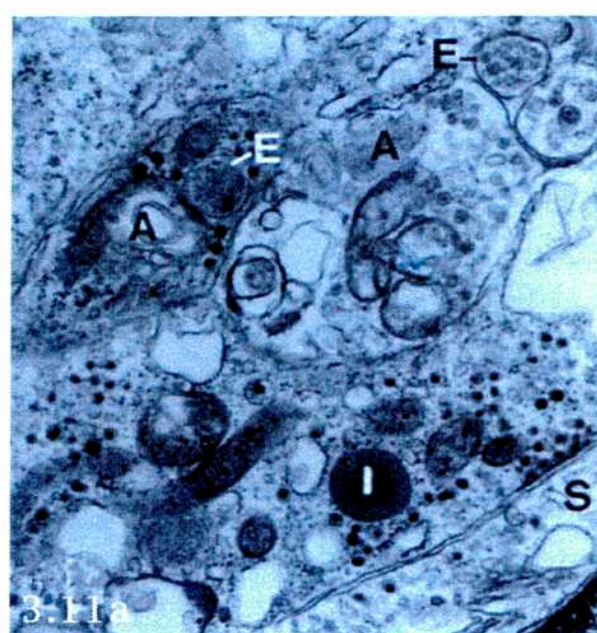
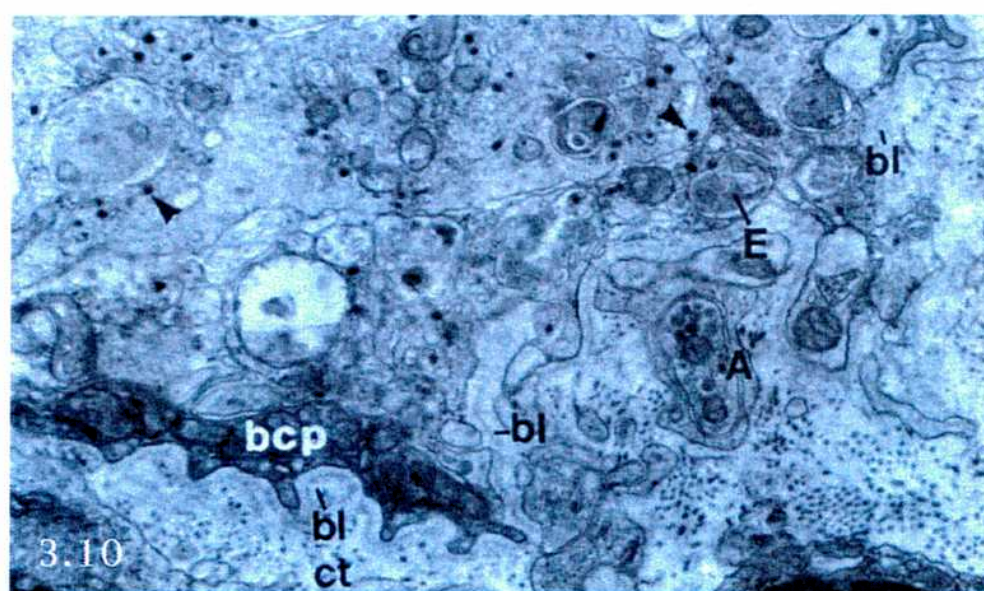
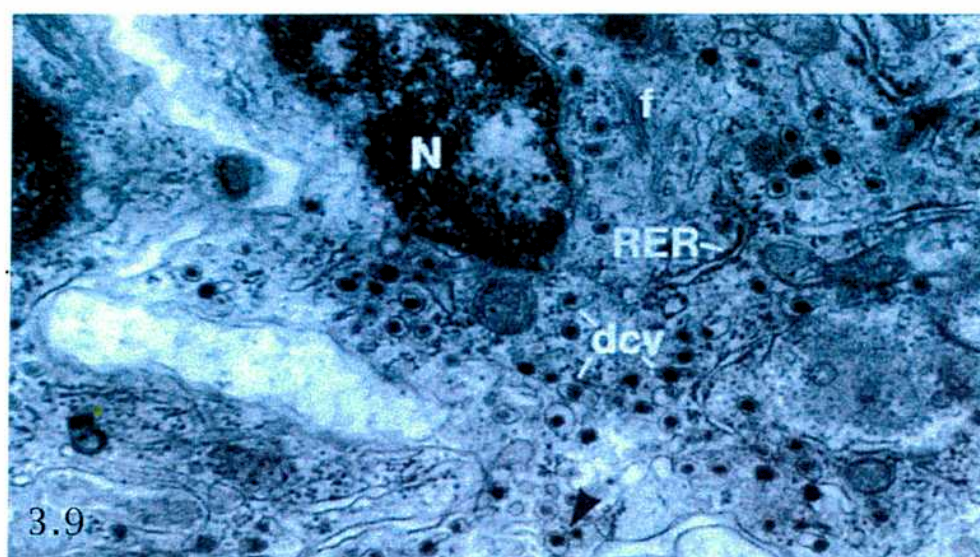
Terminaciones nerviosas morfológicamente aferentes presentan vesículas conteniendo un material electronlúcido, algunas vesículas con centro electródenso y mitocondrias (mi).

Terminaciones morfológicamente eferentes se caracterizan por tener numerosas vesículas con material electronlúcido.

Nótese la zona de contacto sináptico (S)

Fig. 3.11 b - Unión sináptica entre una célula corpuscular (CC) y una terminación nerviosa (Ne). MET. 54400x

Nótese la acumulación de vesículas con centro electródenso sobre una de las membranas engrosadas por el depósito de material electródenso





DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los cuerpos neuroepiteliales (CNE) en los anfibios han sido objeto de estudio por algunos investigadores. Fueron observados con microscopía electrónica de barrido (MEB) en muy pocas especies, situados en la región apical o lateral de los septos de primer y segundo orden, principalmente en el punto donde ellos se bifurcan, y en algunas especies de anuros, también sobre los septos de tercer orden (Goniakowska-Witalińska, 1997).

Los CNE pueden estar ubicados profundamente bajo un epitelio ciliado, lo que impide su reconocimiento con MEB, como sucede en la *Rana nigromaculata* (Wasano y Yamamoto, 1978) o bien pueden protruir hacia el lumen pulmonar. El grado de protrusión varía entre las especies: 1) ligeramente protrusible, como en *Bombina orientalis* e *Hynobius nebulosus*, 2) con forma abovedada como en *Hyla arborea*, o 3) como una protrusión esférica localizada sobre los principales septos, como en *Bufo marinus* y *B. viridis* (Goniakowska-Witalińska, 1986; 1981; Goniakowska-Witalinska y Cutz, 1990; Goniakowska- Witalińska *et al.*, 1990; Matsamura, 1985; Roger y Haller, 1978).

En el caso de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* es de destacar que los CNE además de estar ubicados sobre los septos terciarios, como se mencionó para otros representantes de este orden, se encuentran también en la capa interna de la pared pulmonar haciendo protrusión hacia el lumen pulmonar como el resto de los CNE.

Estos cuerpos en los anfibios se caracterizan por presentar una considerable diversidad, de ahí que sean clasificados de acuerdo a si están comunicados o no con el lumen pulmonar. Los CNE pueden ser del "tipo abiertos" como los que se encontraron exclusivamente en



Bufo marinus (Roger y Haller, 1980) y en *Ambystoma tigrinum* (Goniakowska- Witalińska *et al.*, 1992). En estas dos especies de anfibios, los CNE están en contacto con el espacio aéreo por medio de una única célula situada apicalmente. Esta célula posee microvellosidades cortas y una única cilia cuya organización microtubular es del tipo 8+1. Esta misma disposición ha sido encontrada en el epitelio bronquiopulmonar de los mamíferos donde los CNE están comunicados usualmente con el espacio aéreo a través de las células neuroendocrinas (NE) que se extienden hasta el lumen y poseen microvellosidades cortas sobre su superficie (Scheuermann, 1997; Adriaensen *et al.*, 2003).

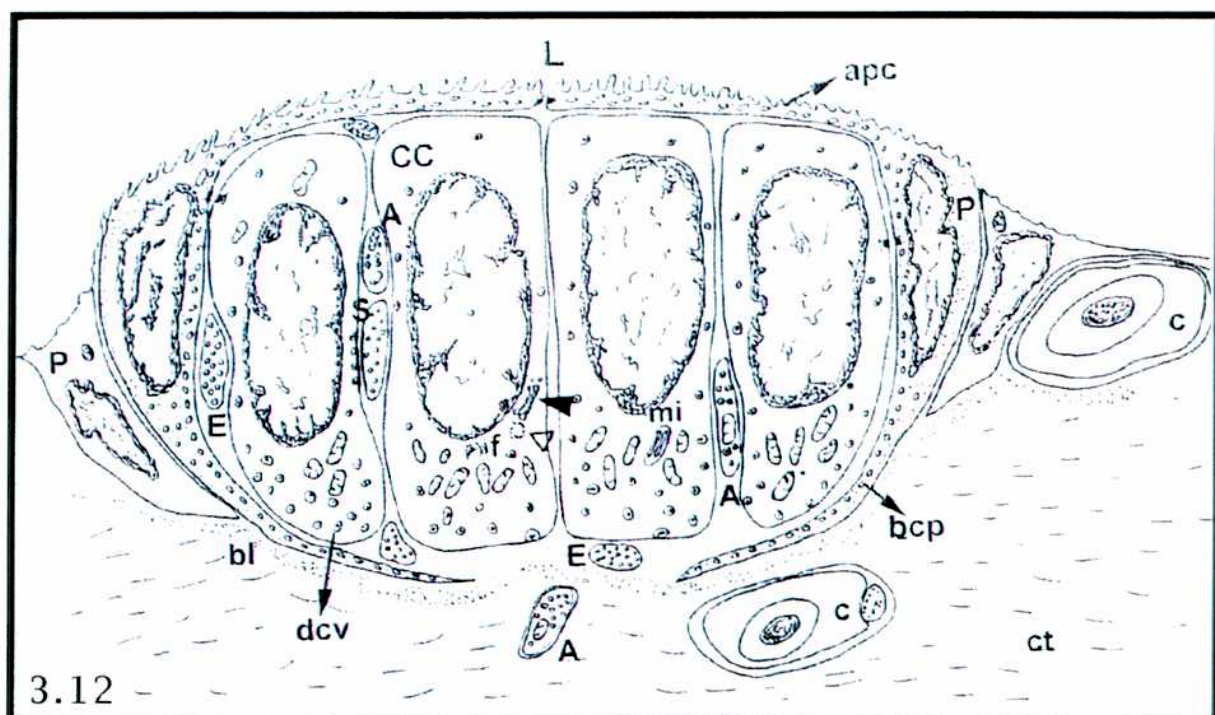
La mayoría de los anfibios poseen CNE del "tipo cerrado" los cuales están completamente cubiertos por células ciliadas como en *Rana nigromaculata* (Wasano y Yamamoto, 1978) o por células caliciformes como en *Hynobius nebulosus* (Matsamura, 1985). Los CNE pueden estar también cubiertos por una delgada capa de neumocitos y/o células ciliadas como en el caso de *Hyla arborea* (Goniakowska-Witalińska, 1986; 1981), *Bombina variegata*, *Bufo bufo*, *Bufo viridis* (Goniakowska- Witalińska y Cutz, 1990) y *Bombina orientalis* (Goniakowska- Witalińska *et al.*, 1990).

Los CNE de *M.s.stelzneri* pertenecen a éste último tipo y ellos están cubiertos por una delgada prolongación citoplasmática proveniente de los neumocitos adyacentes (Fig. 3.12).

Las observaciones con microscopía electrónica de barrido muestra que las microvellosidades de los neumocitos que cubren a los CNE en *M.s.stelzneri* es diferente al del resto de los neumocitos. A pesar de una ausencia de evidencias fisiológicas, se puede presumir que el área amplificada de la superficie provista por las microvellosidades está asociada con una mayor recepción de estímulos del tipo químico o mecánico. Debido a la conformación de

Fig. 3.12 Esquema resumiendo las observaciones realizadas en un cuerpo neuroepitelial (NEB) en el pulmón de *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*.

A: terminación nerviosa aferente, apc: proceso citoplasmático apical, bcp; proceso citoplasmático basal, bl: lámina basal, c: capilar sanguíneo, CC: células corpusculares, ce: centrosoma, ct: tejido conectivo, dcv: vesículas con centro electródenso, E: terminación nerviosa eferente, f: microfilamentos, G: complejo de Golgi, L: lumen, mi: mitocondria, P: neumocito, S: unión sináptica





los CNE en *M.s.stelzneri* sus CCs podrían responder a sustancias químicas presentes en el lumen pulmonar vía los neumocitos.

Los CNE en algunas especies están en contacto directo con la lámina basal, aunque en otras especies como en *Ambystoma tigrinum*, *Bombina orientalis* (Goniakowska- Witalińska, 1997) o *M.s.stelzneri*, están separados en algunas áreas de esa lámina por una delgada prolongación citoplasmática proveniente de las células vecinas como podrían ser neumocitos, células ciliadas o células caliciformes.

Además se han descrito células neuroendócrinas en el epitelio respiratorio de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Scheuermann, 1987; Scheuermann y De Groodt-Lasseel, 1982). Sin embargo en *M.s.stelzneri* solamente las CC se disponen en acúmulos constituyendo los CNE.

En todos los anfibios estudiados incluyendo a *M.s.stelzneri* las CC están adheridas entre sí. Una excepción a esto es *Bombina variegata*, en el cual las CC están separadas por procesos citoplasmáticos provenientes de las células ciliadas que las rodean (Goniakowska- Witalińska y Cutz, 1990). Esta morfología también fue observada en los CNE de aves (Cook y King, 1969) y algunos mamíferos (Sorokin y Hoyt, 1989).

Una comparación de las vesículas con centro electrondenso (VCE) de *M.s.stelzneri* y las presentes en otras especies de anuros estudiados indican que los VCE son similares en apariencia pero difieren ligeramente en el tamaño, además de carecer por completo de algunas de tamaño grande (ver tabla 1).



Especie	Pequeños VCE	Grandes VCE	Referencia
<i>Bufo marinus</i>	60-100	-	Roger y Haller, 1978
<i>Bufo bufo</i>	30-140 y 170-420	210-450	Goniakowska- Witalińska y Cutz, 1990
<i>Bufo viridis</i>	30-140 y 170-420	210-450	Goniakowska- Witalińska y Cutz, 1990
<i>Melanoprynciscus stelzneri stelzneri</i>	80-110	-	-
<i>Bombina orientalis</i>	60-100 y 120-200	-	Goniakowska- Witalińska et <i>al.</i> , 1990
<i>Bombina variegata</i>	52-130	300-700	Goniakowska- Witalińska y Cutz, 1990
<i>Hyla arborea</i>	54-110	290-862	Goniakowska- Witalińska, 1981
<i>Rana nigromaculata</i>	60-110	-	Wasano y Yamamoto, 1978

Tabla 1. Rango de diámetros (en nm) de los VCE presentes en los CNE de los pulmones de algunas especies de anuros.

Los resultados del presente estudio demuestran que las CC de de un CNE en el pulmón de *M.s.stelzneri* tienen características ultraestructurales similares a las células neuroendócrinas pulmonares presentes en el epitelio de las vías intrapulmonares de humanos y de todos los vertebrados con respiración aérea investigados hasta el momento. Por analogía con otras células neuroendócrinas y aunque esto todavía no ha sido verificado mediante experimentos fisiológicos o técnicas inmunohistotoquímicas en esta especie, las VCE podrían almacenar sustancias bioactivas como aminas biogénicas o péptidos reguladores (Scheuermann, 1987; Adriaensen y Scheuermann, 1993; Goniakowska-Witalińska, 1997; Van Lommel *et al.*, 1999; Adriaensen *et al.*, 2003). La principal amina biogénica presente en las CC de mamíferos y otros vertebrados incluyendo a los anfibios, es la serotonina (5-HT). Aparentemente esta sustancia está involucrada en



la síntesis, almacenamiento y liberación de péptidos reguladores que coexisten con ella y actúa como un bronco y vasoconstrictor (Goniakowska- Witalińska, 1997).

Las diferentes morfologías de VCD observados en el estudio de *M.s.stelzneri* podrían representar distintos estadios dentro de un ciclo secretor o bien podría ser fases diferentes de maduración. La variación de densidad del material ubicado en el centro de los VCD es posible que se deba a la reserva de diferentes sustancias. La localización de los VCD cerca del complejo de Golgi indica que esta organela está involucrada en la formación de estas vesículas.

Algunos estudios fisiológicos y morfológicos indican que las sustancias bioactivas son liberadas desde los VCD por exocitosis (Scheuermann, 1987; 1997). Por lo tanto, considerando que los VCD en *M.s.stelzneri* son observados en el polo basal de las CC en contacto con la membrana plasmática y que en algunos casos sus membranas limitantes están incompletas, se sugiere que las CC liberan por exocitosis su contenido hacia el espacio intercelular (función paracrina) o bien hacia los capilares sanguíneos (función endocrina). Los VCD también pueden vertir su contenido dentro de las terminaciones nerviosas intracorpúsculares, en este caso la sustancia secretada podría actuar como un neurotransmisor.

El estudio de los CNE en *M.s.stelzneri* ha demostrado que contienen terminaciones nerviosas con mitocondrias y terminaciones nerviosas pequeñas provistas con vesículas electrolúcidas. Estas terminaciones pueden ser consideradas morfológicamente del tipo aferente (sensitivas) y eferente (motoras) respectivamente. Estos términos son usados para las fibras nerviosas que conducen hacia y desde el sistema nervioso central respectivamente.

Los nervios intraepiteliales frecuentemente hacen contacto sináptico con las CC, como se observó en otros anuros (Roger y



Haller, 1978; Goniakowska-Witalińska y Cutz, 1990; Goniakowska-Witalińska, 1986; 1997).

Como en otros vertebrados, la unión sináptica entre las CC y la fibra nerviosa en *M.s.stelzneri*, muestra una polaridad aferente, la cual es deducida por la morfología de las membranas que participan en ella. La membrana engrosada y discontinua de la CC es la membrana presináptica mientras que la membrana uniforme de la terminación nerviosa es la membrana postsináptica. A lo largo de la membrana presináptica es característico observar la acumulación de VCD. Este complejo contacto sináptico fue descrito por primera vez con el nombre de sinapsis recíproca para el sistema nervioso central de los vertebrados. En el sistema nervioso periférico, este tipo de sinapsis fue encontrado en el cuerpo carotídeo y en el ganglio cardíaco. Algunos investigadores han sugerido que en la región de unión de la sinapsis recíproca, la terminación nerviosa es postsináptica a las CC, mientras que componentes sinápticos adyacentes interactúan en dirección inversa (Scheuermann, 1987). Por lo tanto en *M.s.stelzneri* las uniones sinápticas están adaptadas a transmitir impulsos desde las CC hacia las terminaciones nerviosas. Aunque hasta el momento no se tienen evidencias neuroanatómicas, se propone sobre la base de este estudio que la innervación de los CNE de *M.s.stelzneri* es principalmente del tipo sensorial.

Hasta el presente no existen estudios fisiológicos en anfibios que provean una información fidedigna sobre cómo funcionan los CNE o qué tipo de estímulo desencadenaría la liberación de la secreción almacenada en los VCE. Sin embargo las observaciones morfológicas presentadas en éste capítulo podrían indicar que los neumocitos percibirían algún tipo de estímulo tal como una sustancia química o una tensión mecánica en la pared pulmonar dado su posición estratégica en el pulmón (sobre septos o en la pared interna pulmonar). Los neumocitos que rodean a las CC con sus procesos



citoplasmáticos tanto apical como parcialmente en su base, podrían transmitir tales estímulos a dichas células. Como consecuencia, las CC liberarían una sustancia química que induciría un cambio local o sistémico o podría disparar una respuesta local sobre la musculatura lisa con el objeto de modificar la presión y/o volumen pulmonar.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a las observaciones realizadas se puede concluir que el sistema respiratorio de *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* presentan las siguientes características:

- ♦ El sistema respiratorio de *B. arenarum* y el de *M. s. stelzneri* presentan dos partes bien diferenciadas: la laringotráquea (vía extrapulmonar) y los pulmones.
- ♦ Dada la similitud del aparato hiolaríngeo de *M. s. stelzneri* con el de otros bufónidos, es un elemento más que justifica la permanencia de *M. s. stelzneri* en este grupo.
- ♦ Del análisis morfológico del aparato hioideo y las cuerdas vocales sumado a los caracteres analizados por otros autores se concluye que *M. s. stelzneri* conserva mucho de los caracteres ancestrales.
- ♦ Se propone cambiar en la terminología proceso bronquial por proceso pulmonar dado su relación anatómica con el pulmón.
- ♦ La laringotráquea de *B. arenarum* presenta una cámara anterior y otra posterior, mientras que *M. s. stelzneri* presenta solamente la cámara anterior.
- ♦ Las membranas primarias plegarse hacia el lumen de la laringotráquea forman las cuerdas vocales.
- ♦ Las cuerdas vocales presentan en la zona media un sostén cartilaginoso o fibroso.

- ♦ La cavidad laringotraqueal en *B. arenarum* a diferencia de *M. s. stelzneri* no se abre directamente a los pulmones sino que desemboca en un par de cámaras “bronquiales”.
- ♦ Los pulmones en ambas especies son delicados sacos divididos internamente por septos que protruyen dentro del lumen pulmonar compartimentalizándolo.
- ♦ La diferenciación de los tres tipos de septos debe basarse en la morfología del epitelio que reviste el extremo apical de los mismos y no en su longitud.
- ♦ Se propone un cambio en la terminología utilizada para denominar al parénquima pulmonar, dejando de lado el término de alvéolos. En el caso de *B. arenarum* el parénquima pulmonar es faveolar, mientras que en *M. s. stelzneri* es edicular.
- ♦ El parénquima pulmonar tiene distribución homogénea, en ambas especies estudiadas .
- ♦ Tanto la pared pulmonar como el eje de los septos presentan fibras musculares y elásticas las cuales permiten la variación del volumen pulmonar.
- ♦ En *B. arenarum* los septos de primer orden presentan un epitelio pseudoestratificado cilíndrico cilado con células caliciformes. Mediante el análisis histoquímico se determinó la presencia de tres poblaciones de células caliciformes de acuerdo a la naturaleza de su secreción.

- ♦ La secreción mucosa liberada por las células caliciformes mantienen la superficie pulmonar húmeda, lubricada y la protege contra el daño causado por agentes infecciosos como parásitos, virus, toxinas o partículas extrañas.
- ♦ La presencia de células ciliadas en el pulmón indican que éstas están relacionadas con el desplazamiento del mucus y de partículas extrañas así como con la dispersión del surfactante sobre la superficie pulmonar.
- ♦ Los pulmones de *B. arenarum* y *M. s. stelzneri* presentan un único tipo de neumocito que combina las características ultraestructurales encontradas en las células alveolares tipo I y II de los pulmones de mamíferos.
- ♦ Desde el punto de vista filogenético la presencia de un solo tipo de neumocito en el pulmón de los anfibios es un carácter primitivo.
- ♦ La ultraestructura de los neumocitos es básicamente similar al de otras especies de anuros estudiadas.
- ♦ Los neumocitos contienen en su citoplasma tres tipos diferentes de cuerpos de inclusión osmiofílicos: cuerpos electróndensos, cuerpos lamelares y cuerpos multivesiculares. Se propone que los diferentes cuerpos representan distintas etapas en la síntesis, almacenamiento y liberación del surfactante.
- ♦ En *B. arenarum* la presencia de macrófagos en el lumen pulmonar actúan complementando el rol que desempeñan las células ciliadas y las células caliciformes.

- ♦ La reducción en la complejidad de la estructura pulmonar en *M. s. stelzneri* en cuanto a una menor compartimentalización del pulmón en comparación con *B. arenarum* podría deberse a que la respiración cutánea y bucofaríngea complementarían a la pulmonar, por lo tanto la morfología de los pulmones sería más simple.
- ♦ Sobre la pared y los septos pulmonares se determinó la presencia de cuerpos neuroepiteliales (CNE) del tipo cerrado en *M. s. stelzneri*.
- ♦ Los CNE podrían responder a sustancias químicas presentes en el lumen pulmonar.
- ♦ Se caracterizaron vesículas con centro electródenso (VCD), en el citoplasma de las células corpusculares que conforman los CNE, las cuales podrían almacenar sustancias bioactivas.
- ♦ Los distintos tipos morfológicos de VCD son fases diferentes del ciclo de maduración.
- ♦ Las sustancias liberadas de los VCD por exocitosis se vuelcan al espacio intercelular, a los capilares sanguíneos o bien a las terminaciones nerviosas intracorporales.
- ♦ Los CNE tendrían una función receptora-secretora.

A partir del estudio del sistema respiratorio en *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* se proponen a las especies citadas como excelentes modelos biológicos para comprender la relación morfología-función de la biología respiratoria de los anuros y se plantean nuevos interrogantes para ser dilucidados mediante estudios experimentales y etológicos.



APÉNDICE

- TÉCNICA DE WASSERSUG MODIFICADO para la laringotrquea de anuros

Fijador: formol neutro al 10%

- 1- Sacar la piel y eviscerar. Es preferible raspar la superficie para lograr que penetren los colorantes.
- 2- Lavar en agua destilada. Realizar varios cambios durante 2 días.
- 3- Sacar el exceso de agua mediante una gradación creciente de alcohol etílico
 - R-OH 50°.....90 minutos
 - R-OH 70°.....60 minutos
 - R-OH 80°30 minutos
 - R-OH 96°30 minutos
- 4- Sumergir la pieza durante 3 días en una solución de 20 mg de Azul Alcian 8GX + 70 ml de R-OH 100° + 30 ml de ácido acético glacial. Controlar que no se produzca una sobrecoloración de los cartílagos.
- 5- Para sacar el exceso del colorante utilizar R-OH 100° durante 1 día, realizando por lo menos un cambio. Controlar que el cartílago no se decolore.
- 6- Realizar un pasaje por alcohol etílico utilizando para ello una gradación decreciente
 - R-OH 96°.....90 minutos
 - R-OH 70°..... 90 minutos
 - R-OH 50° 2 horas
 - R-OH 15° 2 horas

- 7- Agua destilada..... 2 horas
- 8- Sumergir el material biológico en una solución de hidróxido de potasio al 0.5% hasta observar por transparencia a través de la musculatura los huesos o bien la pérdida de tonicidad de la musculatura.
- 9- Transferir a una solución de hidróxido de potasio al 0.5% a la que se le agrega suficiente cantidad de alizarina roja S hasta tornar a la solución de un color púrpura profundo. Dejar varios días (4 días) hasta visualizar a los huesos de color rojo.
- 10- Pasar por una serie de soluciones 3:1, 1:1, 1:3 de hidróxido de potasio y glicerina. Dejar por lo menos 24 horas en cada una de ellas.
- 11- Para conservar la pieza para su posterior estudio guardar en glicerina pura con 1 o 2 cristales de timol para evitar los hongos o bacterias.

Resultados:

Cartílago: celeste

Hueso: rojo

➤ **TÉCNICA DE MASSON MODIFICADO (De Carlo, com.pers.)**

Fijador: Zenker, Bouin, etc.

1- Desparafinar e hidratar. Se puede colodionar.

2- Coloración

- a) Hematoxilina de Carazzi, Erlich, Delafield o Mayer por 10 minutos
- b) Viraje con agua común hasta que se torne color violeta
- c) Fucsina acética ponceau de xilidina por 5 minutos
- d) Lavado con agua destilada
- e) Ácido fosfomolibdico 1% por 5 minutos

f) Sin lavar colorar con azul de anilina acética de 2 a 5 minutos.

g) Lavar con agua acética 1% durante 15 minutos. Puede omitirse éste paso si no es necesario diferenciar.

3- Deshidrar y montar

Resultados:

Núcleos: violeta

Citoplasma: rojo vivo

Fibras colágenas: azul intenso

Cartílago, mucus y matriz: azul claro

➤ TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

1- A partir de muestras incluidas en parafina, los cortes se desparafinaron completamente con dos cambios de 20 minutos en xilol.

2- Hidratar a partir de R-OH 100° hasta R-OH 70°

3- Lavado con PBS, 2 cambios de 5 minutos cada uno.

4- Incubación con H₂O₂ al 10 % durante 20 minutos. El objetivo de este paso es el bloqueo de las peroxidasas endógenas.

5- Lavado con PBS, 2 cambios de 5 minutos cada uno.

6- Bloqueo de proteínas

7- Incubación en cámara húmeda con el anticuerpo específico (PGP 9.5 1:300) durante toda la noche a 4°C.

8- Lavado con PBS, 2 cambios de 5 minutos cada uno.

9- Incubación con el segundo anticuerpo biotinilado durante 60 minutos a temperatura ambiente (Vectastain Kit; Vector laboratories, Burlingame).

10- Lavado con PBS, 2 cambios de 5 minutos cada uno.

11- Incubación de las secciones con streptavidina-peroxidasa durante 60 minutos.

12- Lavado con PBS, 2 cambios de 5 minutos cada uno.

13- Revelado con el agregado de 3-3'-diaminobencidina

(Sigma). Se observa bajo microscopio la aparición de reacción positiva (se observa un precipitado de color marrón oscuro).

- 14- La reacción se detiene pasando las secciones a PBS.
- 15- Deshidratar los cortes en alcoholes de gradación creciente, aclarar con xilol y montar en bálsamo sintético.

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN GENERAL

AHLBERG P.E. y MILNER A.R. (1994). The origin and early diversification of tetrapods. *Nature* 373: 420-425

BRAY, A.A. (1985). The evolution of terrestrial vertebrates environmental and physiological considerations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B* 309: 289-322.

BURGGREN, W.W. y JUST, J.J. (1992). Capítulo 16: Environmental Physiology of Amphibians. En: *Developmental changes in physiological systems*. Eds: Feder, M. y Burggren, W.W. University of Chicago Press, pp: 467-529.

CEI, J.M. (1980). Amphibians of Argentina. *Mon. Zool. Ital., Monog.* 2, pp: 609.

DUELLMAN, W.E y TRUEB, L. (1986). Chapter 1: Introduction to the Amphibia. En: *Biology of Amphibians*. MacGraw-Hill Publishing Company, pp: 1-2

FARMER, C. (1997). Did the lungs and intracardiac shunt evolve to oxygenate the heart in vertebrates?. *Paleobiology* 23: 358-372

GALLARDO, J.M (1974). Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. Ed. Universitaria de Buenos Aires, pp. 221.

GALLARDO, J.M. (1987). Anfibios argentinos: Guía para su identificación. 1º Ed. Librería Agropecuaria S.A. Buenos Aires, pp. 98.

GÖPPERT, E. (1937). *Handbuch der vergleichender anatomie der wirtelhiere* (III. Band). Urban & Schwazenberg, Berlin and Wien, pp. 777

GRASSÉ, P.P. (1986). *Traité de zoologie. Anatomie, systématique biologie*. Tomo XIV, Fascicule IB. Masson et cie. La communication acoustique chez les amphibiens.

GAVRILOV, K. (1978). Capítulo V: Los mecanismos y dispositivos de la respiración externa. En: Curso de anatomía y fisiología comparadas. VI: Órganos respiratorios (Segunda parte). Universidad Nacional de Tucumán. Fac. de Cs. Naturales.

GAVRILOV, K. (1979). Capítulo XIII: Los pulmones y sus vías respiratorias en los tetrápodos. En: Curso de anatomía y fisiología comparadas. VI: Órganos respiratorios (Tercera parte). Universidad Nacional de Tucumán. Fac. de Cs. Naturales.

GOODRICH, E.S. (1930). Studies on the structure and development of vertebrates. London, Macmillan Company.

HOLMES, S.J. (1927). The biology of the frog. 4th ed. New York, Macmillan Company.

MATSUMURA, H y SETOGUTI T. (1986). Correlated light microscopic and transmission and scanning electron microscopic studies of the laryngotracheal epithelium in salamanders, *Hynobius nebulosus*. J. Electron. Microscop. 35 (1): 66-76

MARCUS, H. (1937). Lungen. En: Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E. y Lubosch, W. (eds.). Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere. Urban und Schwarzenberg, Berlin and Wien, 3(3B): 909-988.

NOBLE, G.K. (1954). The Biology of the Amphibia. Dover Publications, Inc., New York. Pp: 453.

PASTOR, L.M. y GÓMEZ PASCUAL A. (1995). Chapter 2: The intrapulmonary airways in Amphibians. In "Histology and ultrastructure and immunohistochemistry of the respiratory organs in non-mammalian vertebrates. Ed: L.M. Pastor. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, España. pp. 233

PIRLOT, P. (1976). Morfología evolutiva de los cordados. Ed. Omega, Barcelona. pp.510

- POUGHT, F.H.; JANIS, C.M. y HEISER, J.B.** (1999). Chapter 10: Origin and radiation of tetrapods in the late Paleozoic. En: Vertebrate life. 5º Ed. Prentice Hall Internacional, Inc. pp. 263-282
- ROMER, A.S.** (1958). Tetrapod limbs and early trtrapod life. Evolution 12: 365-369
- ROMER, A.S.** (1966). Capítulo 3: Historia Natural de los vertebrados. En: Anatomía comparada (Vertebrados). 3º Ed. Ed. Interamericana, S.A. México. Pp: 48- 51
- SCHAEFFER, B.** (1965). The rhipidistian-amphibian transition. American Zoologist 5: 267-276
- SCHI, Y.B.** (2000). Chapter 3: Morphological changes during Anuran metamorphosis. En: Amphibian metamorphosis: from morphology to molecular biology. Wiley- Liss, New York. pp: 39-40
- SZARSKI, H.** (1962). The origin of the amphibia. Quartely Review of Biology 37: 189-241
- VIERTEL, B. Y RICHETER S.** (1999). Anatomy. Viscera and endocrines. En: Tadpoles. The biology of Annuran larvae. Eds. McDiarmid R. y Altig R. The University of Chicago Press, Chicago. Pp. 92-148
- WEICHERT, Ch.K.** (1954). Chapter 3. The mud puppy (*Necturus maculosus*). Representative chordates. A manual of comparative anatomy. Mc Graw-Hill. Pp: 73-104.
- YOUNG, J.Z.** (1977). Capítulo 13: Los vertebrados terrestres: Anfibios. En: La vida de los vertebrados. 2º Ed. Ed. Omega, S.A. Barcelona. pp. 255-284

MATERIALES Y MÉTODOS

- CARMANCAHI, P.D; ALDANA MARCOS, H.J.; FERRARI. C.C. Y AFFANNI, J.M.** (1998). A simple method for taking photographs of histological sections without using neither photographic camera nor microscope. *Biocell* 22 (3): 207-210
- COOK, H.C.** (1990). Carbohydrates. En: Theory and practice of histological techniques. 3º Ed. Bancroft, J.D. and Stevens A. (eds). pp.726
- BURCK, H.C.** (1969). Técnica histológica. Manual para realizar preparaciones microscópicas en el laboratorio. Ed. Paz Montalvo. Madrid. pp. 188
- DANGUY, A.; AKIF, F.; PAJAK, B. y GABIUS H.J.** (1994). Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology. *Histol Histopath* 9:155-171.
- GABE, M.** (1968). Chapitre 9: Les colorations topographiques. En: Techniques histologiques. Ed. Masson et Cie. Paris. pp. 1113
- LANGERON, M.** (1949). Technique Histologique. En: Précis de Microscopie. 7º Ed. Masson et Cie. Paris. pp. 1155
- MARTOJA, R. y MARTOJA PIERSON, M.** (1970). Histología General y Citología: Fijación. En: Técnicas de histología Animal. Toray-Masson, Barcelona. pp. 350
- PEARSE, A.G.E.** (1985). Chapter 5: The chemistry and practice of fixation. En: Histochemistry: theoretical and applied. Vol 1 Preparative and optical technology. 4º Ed. Churchill Livingstone, New York.
- PEARSE, A.G.E.** (1985). Chapter 12: Proteins, peptides and amino acids. In: Histochemistry: theoretical and applied. Vol 2 : Analytical technology. 4º Ed. Churchill Livingstone, New York.

PEARSE, A.G.E. (1985). Chapter 15: Carbohydrates and mucosubstances. Vol 2 Analytical technology. 4º Ed. Churchill Livingstone, New York.

PEARSE, A.G.E. (1985). Chapter 16: Lipids, lipoproteins and proteolipids. En: Histochemistry: theoretical and applied. Vol 2 Analytical technology. 4º Ed. Churchill Livingstone, New York.

PERRY, S.F. (1981). Improved method for demonstration of cut surfaces of tissue in paraffin blocks. *Mikroskope* 38: 13-15

PREECE, A (1959). Chapter 13: Staining. En: A manual for Histologic Technicians. 1º Ed. Little, Brown and Company. Pp 219.

REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212

ROMEIS, B. (1928). Capítulo XVIII: Investigación del Cartílago. En: Guía formulario de Técnica histológica. Ed Labor, Barcelona. pp. 722

SHEEHAN, D.C. y HRAPCHAK, .B.B. (1980). Theory and practice of Histotechnology. C.V. Mosby Company, London.

SINGH, R. y GORTON A.W.P. (1989). Orcein-alcian blue staining: a new technique for demonstrating acid mucins in gastrointestinal epithelium. *J.Clin. Pathol.* 42:881-884

SPICER, S. S. y SCHULTE, B. (1992). Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem* 40: 1-38

VOLTZ, D.; REID, P.E.; PARK, C.M.; OWEN D.A. y DUNN, W.L. (1987). A new histochemical method for the selective periodate oxidation of total tissue sialic acids. *Histochemical Journal* 19: 311-318

WASSERSUG, R.L. (1976). A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Technol* 51 (2): 131-134.

CAPÍTULO I: VÍAS EXTRAPULMONARES

- ADRIAENSEN, D.; SCHEUERMANN, D.W.; TIMMERMANS, J.P.; GOMI, T.; MAYER, B. y DE GROODT-LASSEEL, M.H.A.** (1994). Neuroepithelial endocrine and nervous system in the respiratory tract of *Cynops pyrrhogaster* with special reference to the distribution of nitric oxide synthase and serotonin. *Microsc. Res. Tech.* 29: 79-89
- BODEGAS, M.E.; MONTUENGA, L.M. y SESMA, P.** (1995 a). Neuroendocrine diffuse system of the respiratory tract of *Rana temporaria*: an immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100: 145-161.
- BODEGAS, M.E.; VILLARO, A.C.; MONTUENGA, L.M.; MONCADA, S.; RIVEROS-MORENO, V. y SESMA, P.** (1995 b). Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the respiratory tract of the frog, *Rana temporaria*. *Histochem. J.* 27: 812-818
- CASTELLS, M.T.; BALLESTA, J.; PASTOR, L.M.; MADRID, J.F. y MARIN, J.A.** (1990). Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of the extrapulmonary airways of several vertebrates. *Histochemical Journal* 22: 24-35
- DALEN M.** (1983). An ultrastructural study of the tracheal epithelium in guinea-pig with special reference to the ciliary structure. *J. Anat.* 124: 187-210
- DE CARLO JM.** (1980). Anatomía microscópica del sistema respiratorio de *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona, Typhlonectidae). *Physis, Secc B*, 39 (96): 27-36
- DUELLMAN, W.E y TRUEB, L.** (1986). Chapter 1: Introduction to the Amphibia. En: *Biology of Amphibians*. MacGraw-Hill Publishing Company, pp: 1-2
- GANS, C.** (1973). Sound production in the Salientia: mechanism and evolution of the emitter. *Amer. Zool.* 13: 1179-1194

- GAUPP, E.** (1904). A. Ecker's und R. Wiedersheims's Anatomie des Frosches. Vol 3. 3º Ed. Vieweg, Braunschweig, pp: 1-961
- GAVRILOV, K. (1981). Curso de anatomía
- GOMI, T.; KIKUCHI, Y.; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMAN, J.P.; DE GROODT-LASSEEL, M.H.A.; KIMURA, A.; NARUSE, H.; ISHIKAWA, Y.; KISHI, K., y SCHEUERMANN, D.W.** (1994). Immunocytochemical survey of the neuroepithelial endocrine system in the respiratory tract of the Tokyo salamander, *Hynobius nebulosus tokyoensis* Tago. Histochemistry 102: 425-431
- GÖPPERT, E.** (1898). Der Kehlkopf der Amphibien und Reptilien. Morph. Jb. 26: 282-329
- GRIFFITHS, I.** (1959). The phylogeny of *Sminthillus limbatus* and the status of the Brachycephalidae (Amphibia, Salientia). Zool. Soc. London, Proc. 26: 339-352
- HENLE, J.** (1839). Vergleichend-anatomische Beschreibung des Kehlkopfes. Leipzig: Verl. L. Voss.
- JEFFERY, P.K. y REID, L.** (1975). New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron-microscopic study. J. Anat. 120: 295-320
- JONGH H.J. y GANS C.** (1969). On the mechanism of respiration in the bullfrog, *Rana catesbeiana*: a reassessment. J. Morphol. 127 (3): 259-287.
- KENNEDY, A.R., DESROISIERS, A., TERZAGHI, M. y LITTLE, L.B.** (1978). Morphometric and histological analysis of the lungs of syrian golden hamsters. J. Anat. 125: 527-55
- MARTIN W.F.** (1972). Evolution of vocalization in the toad genus *Bufo*. En: Evolution in the Genus *Bufo*, Blair, W. T. (Ed.). Austin: Univ. Texas Press, pp 279-309
- MARTIN W.F. y GANS C.** (1972). Muscular control of the vocal tract during release signaling in the toad *Bufo valliceps*. J. Morphol. 137 (1): 1-28

MATSUMURA, H. y SETOGUTTI, T. (1986). Correlated light microscopic and transmission and scanning electron microscopic studies of the laryngotracheal epithelium in Salamanders, *Hynobius nebulosus*. J. Electron Microsc. 35: 66-76.

MCDIARMID, R.W. (1971). Comparative morphology and evolution of frogs of the neotropical Genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus* and *Oreophrynella*. Bull. Mus. Nat. Hist. 12: 1-63

MIANI, A., PIZZINI, G. y DE GASPERIS (1971). Special type cells in the human tracheal epithelium. J.Submicrosc. Cytol. 3: 81-84

PACK, R.J., AL-UGAILY, L.H y MORRIS, G. (1981). The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscopic study. J. Anat. 132: 71-84

PAL, C. y BHARADWAJ, M.B. (1970). Histological and certain histochemical studies on the respiratory system of chicken I. Nasal cavity, intraorbital sinus and larynx. Indian J. Anim. Sci. 41: 538-547

PAL, C. y BHARADWAJ, M.B. (1971). Histological and certain histochemical studies on the respiratory system of chicken II. Trachea, syrinx, bronchi and lungs. Indian J. Anim. Sci. 41: 37-45

PARKER, H.W. (1940). The Australian frogs of the family Leptodactylidae. Novitates Zool. 42: 1-106

PASTOR, L.M.; BALLESTA, J.; CASTELLS, M.T.; PEREZ-TOMAS, R.; MADRID, J.F. y MARIN, J.A. (1988). A light and electron microscopic study of the epithelium of the extrapulmonary airways of *Nauremys caspica* and *Lacerta lepida* (Reptilia). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 20(1): 25-36

PASTOR, L.M. (1990). A morphological study of the tracheal epithelium of the snake *Natrix maura*. J. Anat. 172: 47-57

PASTOR, L.M. y PALLARES, J. (1995). Chapter 4: The extrapulmonary airways in reptiles. En "Histology and ultrastructure and immunohistochemistry of the respiratory organs in non-

mammalian vertebrates". Ed: L.M. Pastor. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, España. Pp 233

PASTOR, L.M.; BODEGAS, M.E.; GALLEGU-HUIDOBRO, M.A.; BURRELL, M.A. y PALLARES J. (1998). The ultrastructure and immunohistochemistry of the laryngeal mucosa of *Rana perezi* (Amphibia: Anura). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 30 (1): 55-63

PLOPPER, C.G.; HALSEBO, J.E.; BERGER, W.S.; SONSTEGARD, K.S y NETTESHEIM, P. (1983). Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra and extrapulmonary airways of the rabbit. Exp. Lung. Res. 5: 79-83

PLOPPER, C.G.; HEIDSIEK, J.C; WEIR, A.J.; GEORGE, J.A. y HYDE, D.M. (1989). Tracheobronchial epithelium in the adult Rhesus monkey: a quantitative histochemical and ultrastructural study. Am. J. Anat. 184: 31-40

ROBINSON, N.P.; VENNING, L.; KYLE, H. y WIDDICOMBE, J.G. (1986). Quantitation of the secretory cells of the ferret tracheobronchial tree. J. Anat. 145:173-188

SCHNEIDER H. (1970). Morphologie des larynx von *Hyla a. arborea* (L.) und *Hyla meridionalis* Boettger (Amphibia, Anura). Z. Morph. Tiere 66: 299-309

SCHNEIDER H. (1977). Acoustic behaviour and physiology of vocalization in the European tree frog, *Hyla arborea* (L.). En: The reproductive biology of Amphibians. Ed: Taylor D.H. & Guttman S.I. New York, Plenum Press. pp 295-335.

SCHNEIDER, H. (1988). Chapter 24: Peripheral and central mechanisms of vocalization. In: The evolution of the Amphibian auditory system. Ed. Fritzsche B. Wiley & Sons, Inc. pág. 537- 558

TREWAVAS, E. (1933). The hyoid and larynx of the Anura. Phil. Trans. Roy. Soc. London, 222 (B): 401- 527

WALSH, C. y MCLELLAND, J. (1974). The ultrastructure of the avian extrapulmonary respiratory epithelium. Acta Anat. 89: 412-422

WILDER, H.H. (1896). The amphibian larynx. Zool. Jahrbücher Abth. F. Morph. 9: 273-315

WILSON, D.W.; PLOPPER C.G. y HYDE, D.M. (1984). The tracheobronchial epithelium of the bonnet monkey (*Macaca radiata*). A quantitative ultrastructural study. Am. J. Anat. 171: 25-40

ZACCONE, G.; FASULO, S. y AINIS, L. (1995 a). Neuroendocrine epithelial cell system in respiratory organs of air-breathing and teleost fishes. Int. Rev. Cytol. 157: 277-314

ZACCONE, G.; FASULO, S. y AINIS, L. (1995 b). Chapter 1: Gross anatomy, histology and immunohistochemistry of respiratory organs of air-breathing and teleost fishes with particular reference to the neuroendocrine cells and their relationship to the lung and the gill as endocrine organs. En: "Histology and ultrastructure and immunohistochemistry of the respiratory organs in non-mammalian vertebrates". Ed: L.M. Pastor. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, España. Pp 13-52

CAPÍTULO II: PULMÓN

BELL, P.B. y STARCK-VANCS, VI (1983). Scanning electron microscopic study of the microarchitecture of the lung of the giant salamander *Amphiuma tridactylum*. Scan. Electr. Microsc. 449

BURGGREN, W.W. (1989). Chapter 6: Lung structure and function. Amphibians. En: Comparative pulmonary physiology (Lung biology in health and disease, Vol: 39). Current concepts. Wood, S.C. (Ed.). M. Dekker Inc., New York

CALLAS, G., DE GROODT, W.J. (1976). Lamellar transformation from type II pneumocyte mitochondria in rat lung. Anat Rec 184: 369

CASTELLS, M.T.; BALLESTA, J.F., PASTOR, L.M. ; MADRID, J.F. y MARIN, J.A. (1990). Histochemical characterization of glycoconjugates in the epithelium of the extrapulmonary airways of several vertebrates. Histochemical Journal 22: 24-35

- CASTELLS, M.T.; BALLESTA, J.F., MADRID, J.F.; AVILES, M. y MARTINEZ-MENARGUEZ, J.A.** (1991). Characterization of glycoconjugates in developing rat respiratory system by means of conventional and lectin histochemistry. *Histochemistry* 95: 419-426
- CZOPEJ, J** (1965). Quantitative studies on the morphology of respiratory surfaces of amphibians. *Acta Anat.* 62: 296
- DANIELS, C.B.; LOPATKO, O.V. y ORGEIG, S.** (1998). Evolution of surface activity related functions of vertebrate pulmonary surfactant. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25: 716-721
- DE CARLO JM.** (1980). Anatomía microscópica del sistema respiratorio de *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona, Typhlonectidae). *Physis, Secc B*, 39 (96): 27-36
- DIERICH, R.** (1975). Electron microscopic studies of the lung of the frog. II. Topography of the inner surface by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 160: 399-410
- DIERICH, R. y LINDNER, E.** (1979). Methods of heavy metal electron microscopic histochemistry applied to frog lung surfactant. *Histochemistry* 199: 61-68
- DUNCKER, H.R.,** (1978). Funktionsmorphologie des Atemapparates und Coelomgliederung bei Reptilien, Vögeln und Säugern. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 1978: 99-132
- FAILLARD, H. y SCHAUER, R.** (1972). Chapter 11: Glycoproteins as lubricants, protective agents, carriers, structural proteins and as participants in other functions. En: *Glycoproteins: Their composition, structure and function* Vol: 5. Ed. Glotteschalk.
- GOODRICH, E.S.** (1930). *Studies on the structure and development of Vertebrates*. London, McMillan
- GÓES DE MORALES, M.F.P.** (2001). Morfologia e morfometria das estruturas respiratórias da "Pirambóia" *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). Aspectos ecofisiológicos. Tesis doctoral: 1-64

- GOMI, T.; KIMURA A.; TSUCHIYA H.; HIGASHI, K. y SASA, S.** (1987). Electron microscopic observations of the alveolar brush cells of the bullfrog. *Zool. Sci.* 4: 613-620
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1978). Ultrastructural and morphometric study of the lung of the European salamander, *Salamandra salamandra* L.. *Cell Tissue Res.* 191: 343-356
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1980a). Scanning and transmission electron microscopic study of the lung of the newt, *Triturus alpestris* Laur. *Cell Tissue Res.* 205 (1): 133-145
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1980b). Ultrastructural and morphometric changes in the lung of newt, *Triturus cristatus carnifex*. Laur. during ontogeny. *J. Anat.* 130: 571-583
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1984). Tubular myelin structures in the lungs of amphibia. The mode of formation. *Europ. J. Cell Biol.* 33: 127-135
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1985). The structure of the lung of the tree frog *Hyla arborea* L. In: *Fortschritte der Zoologie*, Eds. Dunker-Fleischer, band 30
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1986). Lung of the tree frog, *Hyla arborea* L. A scanning and transmission electron microscopic study. *Anat. Embryol.* 174: 379-389
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.** (1995). Chapter 3: The histology and ultrastructure of the amphibia lung. In "Histology and ultrastructure and immunohistochemistry of the respiratory organs in non-mammalian vertebrates. Ed: L.M. Pastor. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, España. pp. 233
- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. Y CUTZ, E.** (1990). Ultrastructure of the neuroendocrine cells in the lungs of three anuran species. *J. Morphol.* 203: 1-9

- KARDONG, K.V.** (1995). Chapter 12. The circulatory system. Vertebrates. Comparative anatomy, function and evolution. pP: 440-489
- KUEHNE, B. y JUNQUEIRA, L.C.U.** (2000). Histology of the trachea and lung of *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona). Rev. Brasil. Biol. 60 (1): 167-172
- MAINA, J.N.** (1987). The morphology of the lung of the African lungfish *Protopterus aethiopicus*. A scanning elEctron-microscopy study. Cell Tissue Res. 250: 191-196
- MAINA, J.N.** (1989). The morphology of the lung of the east African tree frog *Chiromantis petersi* with observations on the skin and the buccal cavity as secondary gas exchange organs. A TEM and SEM study. J. Anat. 165: 29-43
- MARCUS, H.** (1927). Lungenstudien. Morphol. Jahrb. 58: 100-121
- MATSUMURA, H.** (1984). Electron microscopic studies of the lung of the salamander, *Hynobius nebulosus*. II: Osmiophilic lamellar bodies and alveolar surfactant. Okajimas Folia Anat Jpn 61: 371- 379
- MATSUMURA, H. y SETOGUTI, T.** (1984). Electron microscopic studies of the lung of the salamander, *Hynobius nebulosus*. I. A scanning and transmission electron microscopic observation. Okajimas Folia Anat. Jpn. 61: 15- 25
- MEBAN, C.** (1973). The pneumocytes in the lung of *Xenopus laevis*. J. Anat. 114: 235-244
- MEBAN, C.** (1977). Ultrastructure of the respiratory epithelium in the lungs of the newt *Triturus cristatus*. Acta Zool Stockh 58: 151- 156
- MEBAN, C.** (1979). An electron microscope study of the respiratory epithelium in the lungs of the fire salamander (*Salamandra salamandra*). J. Anat. 128 (1): 215-224
- NAGAISHI CH., OKADA Y., ISHIKO S. y DAIDO, S.** (1964). Electron microscopic observations of the pulmonary alveoli. Experim. Med. Surg. 22: 81-90

NOBLE, G.K. (1957). Chapter VII: The respiratory system. En: The biology of amphibia. McGraw-Hill, New York, 1957.

OKADA, Y.; ISHIKO, S.; DAIDO, S.; KIM, J y IKEDA, S. (1962). Comparative morphology of the lung with special reference to the alveolar epithelial cells. I. Lungs of amphibia. Acta Tuberc. Jp. 11: 63-72

PERRY, S.F. y REUTER, CH. (1999). Hypothetical lung structure of *Brachiosaurus* (dinosauria: Sauropoda). Based on functional constraints. Mitt. Mus. Nat. kd. Berl., Geowiss Reihe 2: 75-79

SMITH, D.G. y CAMPBELL, G. (1976). The anatomy of the pulmonary vascular bed in the toad *Bufo marinus*. Cell Tissue Res. 165: 199-213

SOROKIN, S.P. (1966). A morphological and cytochemical study on the great alveolar cell. J. Histochem Cytochem 14: 884-898

SPORN, L.A.; MARDER, V.J. y WAGNER, D.D. (1989). Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. J. Cell Biol. 108: 1283-1289

STARK-VANCS, V.; BELL, P.B. y HUTCHISON, V.H. (1984). Morphological and pharmacological basis for pulmonary ventilation in *Amphiuma tridactylum*. An ultrastructural study. Cell Tissue. Res. 238:1-10

STRATTON, C.J.; WETZTEIN, H.Y. y HARDY, T. (1980). The ultrastructural histochemistry and stereoscanning electron microscopy of the rodent and amphibian surfactant system. Anat. Rec. 197: 49-61

STRATTON, C.J. (1984). Morphology of surfactant producing cells and of the alveolar lining layer. En: Pulmonary surfactant. Robertson, B.; Van Golde L.M.G.; Batenburg (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 68-118

WEIBEL, E. y PALADE, G.E. (1973). New cytoplasmic components in arterial endothelia. J. Cell Biol 53: 419-427

WELSCH, U. (1981). Fine structural and enzyme histochemical observations on the respiratory epithelium of the caecilian lungs and gills. A contribution to the understanding of the evolution of the vertebrate respiratory epithelium. *Arch. Histol. Jap.* 44: 117-126

CAPÍTULO III: Cuerpos neuroepiteliales

ADRIAENSEN, D. y SCHEUERMANN, D.W. (1993). Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *Anat Rec* 236: 70-85

ADRIAENSEN, D.; BROUNS, I.; VAN GENECHTEN J. y TIMMERMANS, J.P. (2003). Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors. *Anat Rec* 270: 25-40

BODEGAS, M.E.; MONTUENGA, L.M.; POLAK, J.M. y SESMA, P. (1993). Immunohistochemical colocalization of B2 y 5 HT in the neuroepithelial bodies of the lung of *Rana temporaria*. *Cell Tissue Res.* 273: 137-140

COOK, R.D. y KING, A.S. (1969). A neurite-receptor complex in the avian lung: electron microscopical observations. *Experientia* 25: 1162-1164

CUTZ, E. ; GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. y CHAN, W. (1986). An immunohistochemical study of regulatory peptides in lungs of amphibians. *Cell Tissue Res.* 244: 227-233

GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. (1981). Neuroepithelial bodies in the lung of the tree frog, *Hyla arborea* L. A scanning and transmission electron microscopy study. *Cell Tissue Res* 210: 521-524

GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. (1986). Lung of the tree frog, *Hyla arborea* L. A scanning and transmission electron microscopy study. *Anat Embryol* 174: 379-389

GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. y CUTZ, E. (1990). Ultrastructure of the neuroendocrine cells in the lungs of three anuran species. *J Morphol* 203:1-9

GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L., LAUWERYNS, J.M. y VAN RANST, L. (1990). Neuroepithelial bodies in the lungs of *Bombina orientales* (boul). *Cell Tissue Res.* 273: 137-140

GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.; LAUWERYNS, J.M.; ZACCONE, G.; FASULO, S. y TAGLIAFIERRO, G. (1992). Ultrastructural and immunocytochemistry of the neuroepithelial bodies in the lung of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum* (Urodela, Amphibia). *Anat. Rec.* 234: 419-431

GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. (1997). Neuroepithelial bodies and solitary neuroendocrine cells in the lungs of Amphibia. *Microsc. Res. Tech.* 37: 13-30

LAUWERYNS, J.M. y PEUSKENS J.C. (1972). Neuro-epithelial bodies (neuroreceptor or secretory organs?) in human infant bronchial and bronchiolar epithelium. *Anat. Rec.* 172: 471-482.

LAUWERYNS, J.M.; COKELAERE, M. y THEUNYNCK, P. (1972). Neuro-epithelial bodies in the respiratory mucosa of various mammals. *Z. Zellforsch.* 135: 569-592

LAUWERYNS, J.M.; COKELAERE, M.; DELLERSNYDER, M. y LIEBENS, M. (1977). Intrapulmonary neuro-epithelial bodies in newborn rabbits. Influence of hypoxia, hiperroxia, hypercapnia, nicotine, reserpine, L-DOPA and 5-HT. *Cell Tissue Res.* 182: 425-440

LAUWERYNS, J.M. y VAN LOMMEL, A. (1987). Ultrastructure of nerve endings and synaptic junctions in rabbit intrapulmonary neuroepithelial bodies; a single and serial section analysis. *J. Anat.* 151: 65-83

MATSUMURA, H. (1985). Electron microscopic studies of the lung of the salamander, *Hynobius nebulosus*. III. A scanning and

transmission electron microscopic observations on neuroepithelial bodies. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 62: 187-204

ROGERS, D.C. y HALLER, C.J. (1978). Innervation and cytochemistry of the neuroepithelial bodies in the ciliated epithelium of the toad lung (*Bufo marinus*). *Cell Tissue Res.* 195: 395-410

ROGERS, D.C. y HALLER, C.J. (1980). The ultrastructural characteristics of the apical cell in the neuroepithelial bodies of the toad (*Bufo marinus*). *Cell Tissue Res.* 209: 485-498

SCHEUERMANN, D.W. y DE GROODT-LASSEEL, M.H.A. (1982). Monoamine-containing granulated cells in the Polypterus lung. *Verh. Anat. Ges.* 76: 301-302

SCHEUERMANN, D.W.; DE GROODT-LASSEEL, M.H.A.; STILMAN, C. y MEINSTERS, M.L. (1983). A correlative light, fluorescence and electron microscopic study of neuroepithelial bodies in the lung of the red eared turtle *Pseudemys scripta elegans*. *Cell Tissue Res.* 234: 249-269

SCHEUERMANN, D.W. (1987). Morphology and cytochemistry of the endocrine epithelial system in the lung. *Internat. Rev. Cytol.* 106: 35-88

SCHEUERMANN, D.W.; ADRIAENSEN, D; TIMMERMANS, J.P. y GROODT-LASSEEL, M.H.A. (1989). Neuroepithelial endocrine cells in the lungs of *Ambystoma mexicanum*. *Anat. Rec.* 225: 139-149

SCHEUERMANN, D.W. (1997). Comparative histology of pulmonary neuroendocrine cell system in mammalian lungs. *Microsc. Res. Technol.* 37: 31-42

SMITH, D.G. y RAPSON, L. (1977). Differences in pulmonary microvascular anatomy between *Bufo marinus* and *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 178: 1-15

SOROKIN, S.P. y HOYT, R.F. (1989). Neuroepithelial bodies and solitary small-granule cells. En: *lung Cell Biology*, Massaro. D. (Ed). M. Dekker Inc., New York, Basel, pp 191-344

- VAN LOMMEL, A. y LAUWERYNS, J.M.** (1993 a). Neuroepithelial bodies in the Fawn Hooded rat lung: morphological and neuroanatomical evidence for a sensory innervation. *J. Anat.* 183: 553-566
- VAN LOMMEL, A. y LAUWERYNS, J.M.** (1993 b). Ultrastructure and innervation of neuroepithelial bodies in the lungs of newborn cats. *Anat. Rec.* 236: 181-190
- VAN LOMMEL, A.; LAUWERYNS, J.M. y BERTHOUND, H.R.** (1998). Pulmonary neuroepithelial bodies are innervated by vagal afferent nerves: an investigation with in vivo anterograde Dil tracing and confocal microscopy. *Anat. Embryol.* 197: 325-330
- VAN LOMMEL, A.; BOLLÉ, T.; FANNES, W. y LAUWERYNS, J.M.** (1999). The pulmonary neuroendocrine system: the past decade. *Arch. Histol. Cytol* 62 (1): 1-16
- YOUNGSTON, C.; NURSE, H.; YEGER, H. y CUTZ, E.** (1993). Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* 365: 153-155
- WALSH, C. y MACLELLAND, J.** (1974). Granular "endocrine" cells in avian respiratory epithelia. *Cell Tissue Res.* 153: 269-276
- WASANO, K. y YAMAMOTO, T.** (1978). Monoamine-containing granulated cells in the frog lung. *Cell Tissue Res.* 193: 201-209
- ZACCONE, G.; GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.; LAUWERYNS, J.M y FASULO, S.** (1989 a). Fine structure and serotonin immunohistochemistry of the *neuroendocrine cells in the lungs of bichirs Popypterus dehhezi and P. ornatipinnis*. *Bas. Appl. Histochem.* 33: 277-287
- ZACCONE, G.; TAGLIAFIERRO, L.; GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L.; FASULO, S.; AINIS, L. y MAUCERI, A.** (1989 b). Serotonin-like immunoreactive cells in the pulmonary epithelium of ancient fish species. *Histochem.* 92: 61-63

Los resultados de la presente tesis fueron volcados en las siguientes publicaciones.

- Hermida, G.N. y Fiorito, L.E.
"Estereoultraestructura del pulmón de Anuros Bufónidos. I. *Bufo arenarum*". Cuadernos de Herpetología, 8 (1):25-29, 1994
Revista Nacional, con referato, sin indexación en el Scientific Citation Index , indexada en el Zoological Record.
- Hermida, G.N.; Fiorito, L.E. y Farías, A.
"The lung of the common toad, *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae). A light and electron microscopy study".
Biocell, 22 (1):19-28, 1998
Revista nacional, con referato, indexada en el Scientific Citation Index.
- Hermida, G.N.; Farías, A. y Fiorito, L.E.
" Ultrastructural characteristics of the lung of *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenberg, 1875) (Anura, Bufonidae)"
Biocell, 26 (3): 1-9, 2002
Revista nacional, con referato, indexada en el Scientific Citation Index
- Hermida, G.N.; Farías, A. y Fiorito, L.E.
"Neuroepithelial bodies in the lung of *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae)"
Anatomy and Embriology, 2003 (en prensa)
Revista internacional, con referato, indexada en el Scientific Citation Index