

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y topología definitiva del núcleo supraóptico de la
rata blanca mediante empleo de métodos automáticos de
registro y procesamiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Victoria Ramos Olmedo

DIRECTORES:

María Luisa Bentura Remacha
Alfredo Carrato Ibañez

Madrid, 2015

TP
1983
256

Victoria Ramos Olmedo



* 5 3 0 9 8 6 2 6 8 1 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-016848-Y

DESARROLLO Y TOPOLOGIA DEFINITIVA DEL NUCLEO SUPRAOPTICO
DE LA RATA BLANCA MEDIANTE EMPLEO DE METODOS AUTOMATICOS
DE REGISTRO Y PROCESAMIENTO

Departamento de Histología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

256/83

© Victoria Ramos Olmedo
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-39682-1983

M. VICTORIA RAMOS OLMEDO

**DESARROLLO Y TOPOLOGIA DEFINITIVA DEL
NUCLEO SUPRAOPTICO DE RATA BLANCA
MEDIANTE EMPLEO DE METODOS AUTOMA-
TICOS DE REGISTRO Y PROCESAMIENTO**

Directores:

Dr. Prof. ALFREDO CARRATO IBÁÑEZ
Director del Instituto Santiago Ramón
y Cajal del C.S.I.C.

Dra. MARIA LUISA BENTURA REMACHA
Colaborador científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID •
FACULTAD DE BIOLOGIA **1.981**

Trabajo realizado en el Instituto "Santiago Ramón
y Cajal" del C.S.I.C. (Madrid).

Bajo la dirección del Prof. Dr. Alfredo Carrato Ibañez
Jefe del Departamento de Morfología Microscópica de la
Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad
Complutense, Madrid.

V2B2

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Carrato', written over a horizontal line.

1. INDICE

1. INDICE

1. <u>INDICE</u> - - - - -	III
2. <u>FINES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO</u> - - - - -	1
3. <u>INTRODUCCION</u> - - - - -	4
4. <u>MATERIAL Y METODOS</u> - - - - -	11
4.1. TECNICA HISTOLOGICA - - - - -	14
4.2. RECONSTRUCCION DEL NUCLEO SUPRACOPTICO -	15
4.2.1. Tecnica directa - - - - -	15
4.2.2. Conversion de perspectiva - - - -	16
4.3. TECNICA CITOPHOTOMETRICA - - - - -	17
4.3.1. Células aisladas - - - - -	25
4.3.2. Agrupaciones celulares - - - - -	27
5. <u>RESULTADOS</u> - - - - -	30
5.1. TOPOLOGIA Y MORFOLOGIA DEL NUCLEO SUPRA OPTICO - - - - -	31
5.1.1. Embriones de 20 dias - - - - -	31
5.1.2. Embriones de 22 dias - - - - -	34
5.1.3. Embriones de 23 dias - - - - -	37
5.1.4. Ejemplares de 15 dias post-partum	40
5.1.5. Resultados morfológicos comunes -	40
5.2. REPRESENTACION TRIDIMENSIONAL - - - - -	43
5.2.1. Embriones de 20 dias - - - - -	44
5.2.1.1. Perspectiva dorsal - - - - -	44
5.2.1.2. Perspectiva ventral - - - - -	47

5.2.1.3. Perspectiva medial - - - - -	47
5.2.1.4. Perspectiva lateral - - - - -	48
5.2.1.5. Perspectiva anterior - - - - -	48
5.2.1.6. Perspectiva posterior - - - - -	48
5.2.2. Embriones de 22 dias - - - - -	48
5.2.2.1. Perspectiva dorsal - - - - -	48
5.2.2.2. Perspectiva ventral - - - - -	51
5.2.2.3. Perspectiva medial - - - - -	52
5.2.2.4. Perspectiva lateral - - - - -	52
5.2.2.5. Perspectiva anterior - - - - -	52
5.2.2.6. Perspectiva posterior - - - - -	53
5.2.3. Embriones de 23 dias - - - - -	53
5.2.3.1. Perspectiva dorsal - - - - -	53
5.2.3.2. Perspectiva ventral - - - - -	53
5.2.3.3. Perspectiva medial - - - - -	56
5.2.3.4. Perspectiva lateral - - - - -	56
5.2.3.5. Perspectiva anterior - - - - -	56
5.2.3.6. Perspectiva posterior - - - - -	56
5.2.4. Ejemplares post-partum de 15 dias	56
5.2.4.1. Perspectiva dorsal - - - - -	56
5.2.4.2. Perspectiva ventral - - - - -	59
5.2.4.3. Perspectiva medial - - - - -	60
5.2.4.4. Perspectiva lateral - - - - -	60
5.2.4.5. Perspectiva anterior - - - - -	60
5.2.4.6. Perspectiva posterior - - - - -	60
5.3. MEDICIONES EN RELACION CON FLANCOS DE REFERENCIA - - - - -	62

5.3.1. Perspectiva horizontal - - - - -	62
5.3.2. Perspectiva lateral - - - - -	68
5.3.3. Perspectiva frontal - - - - -	74
5.4. CITOFOTOMETRIA - - - - -	74
5.4.1. Células aisladas - - - - -	74
5.4.1.1. Áreas nucleares - - - - -	81
5.4.1.2. Diámetros nucleares - - - - -	92
5.4.2. Agrupaciones celulares - - - - -	99
5.4.2.1. Histogramas - - - - -	99
5.4.2.2. Valoraciones totales del N.so.	110
6. <u>DISCUSION</u> - - - - -	117
6.1. TCPCLOGIA DEL NUCLEO SUPRAOPTICO - - - - -	118
6.1.1. Embriones de 20 días - - - - -	118
6.1.2. Embriones de 22 días - - - - -	119
6.1.3. Embriones de 23 días - - - - -	120
6.1.4. Ratas nacidas de 15 días - - - - -	120
6.2. RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL Y EJES DE PROYECCION - - - - -	122
6.2.1. Distancias al plano sagital - - -	122
6.2.2. Distancias al plano horizontal -	124
6.2.3. Distancias al plano frontal - - -	127
6.3. CITOFOTOMETRIA - - - - -	129
6.3.1. Analisis celular - - - - -	129
6.3.1.1. Distribución de densidades ópticas y áreas de secciones nucleares	141
6.3.1.2. Aplicación de métodos estadísticos - - - - -	147
6.3.2. Analisis poblacional - - - - -	160

7. <u>RESUMEN</u> - - - - -	165
8. <u>CONCLUSIONES</u> - - - - -	168
9. <u>BIBLIOGRAFIA</u> - - - - -	172

2. FINES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

2. FINES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Han pasado más de 50 años desde que se reconoció la utilidad de la luz transmitida como medio para una evaluación cuantitativa de la imagen microscópica. Mediante acoplamiento adecuado de un fotometro, un microscopio y un ordenador es posible cuantificar y procesar datos a partir de la imagen visualmente observable de un determinado campo microscópico.

La automatización en la adquisición e interpretación de los datos en microscopía ha sido tema de investigación biomédica durante las dos últimas décadas. En la actualidad es posible abordar el estudio morfo-estructural del sistema nervioso central, a través de múltiples perspectivas de la tecnología microscópica óptica y electrónica. Muchas de las modernas técnicas de transmisión y de barrido, análisis planimétricos de imágenes histoquímicas, consiguen que la integridad del material biológico sea conservada para realizar estudios morfológicos; otras muestran características celulares específicas que pueden ser debidamente cuantificadas.

Mediante un fotomicroscopio de rastreo automatizado se obtienen datos de imágenes ópticas que pueden digitalizarse sobre una base alternativa, extinción o de transmitancia de la fuente de luz incidente sobre áreas discretas preestablecidas, todas ellas determinadas respecto a ejes o planos de referencia. El avance de la computarización ha hecho viable el procesamiento de los datos digitalizados de la imagen. Los beneficios que presta

este equipo instrumental han sido puestos en evidencia por numerosos autores (Mendelsohn, '68; Frewitt, '78; Bahr, '79; Piller, '79).

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre el núcleo supraóptico en diferentes periodos evolutivos de la rata blanca a través de imágenes de cortes para una microscopía óptica convencional, completada con citofotometría automática de rastreo y combinada con un procesamiento por computador. En el análisis realizado se ha puesto énfasis en aquellos aspectos menos estudiados hasta ahora principalmente en:

- a) La representación tridimensional del N.so. para reconstruir su verdadera morfología y poderlo proyectar desde diferentes perspectivas, haciéndose así más evidentes las transformaciones que se producen durante el desarrollo embriológico y post-natal;
- b) Un estudio citofotométrico de las neuronas integrates del N.so. de tal modo que pueden ser automáticamente definidos distintos tipos nucleares, así como los límites de agrupación celular en varios niveles de la serie anteroposterior de cortes.

4

3. INTRODUCCION

3. INTRODUCCION

Numerosos son los estudios referidos a la topología diencefálica. Entre ellos caben destacar los - realidades sobre vertebrados en general y especialmente en quelonios (Ergquist y Kallen, '54), anfibios - - (Kingsbury, '20, '30), pollo (Kuhlenbeck, '36), rata blanca (Kreig, '32; Stroer, '56; Coggeshall, '64; Hyppa, '69), hamster (Keiser, '72), conejo (Rosé, '42) y hombre (Gilbert, '35 y Dekeban, '54).

His (1893, 1904) vió que en el diencefalo podía todavía hacerse una distinción, como en el tubo medular, entre la placa alar y la basal propugnando que el hipotálamo deriva de esta última, mientras el resto del diencefalo lo hace de la placa alar; entre ambas - placas se interpone el correspondiente "surco de His".

Herrick ('10), basándose en la presencia de - tres surcos en la pared neuroepitelial del tercer ventrículo de embriones de anfibios (surcos dorsal, medial y ventral), subdividió al diencefalo en cuatro zonas - horizontales (epitálamo, tálamo dorsal, subtálamo e hipotálamo). Se aceptó ampliamente este esquema ya que - resulta aplicable al desarrollo del diencefalo de practicamente todos los vertebrados, incluyendo al hombre (Gilbert, '35; Cooper, '50; Kuhlenbeck, '54; Kahle, '56; - Coggeshall, '64; Christ, '69). Todo el diencefalo se considera derivación alar. El surco de His ya no existe - por delante del mesencefalo. En los vertebrados inferiores, estos surcos están bastante pronunciados (Christ, '69) siendo en mamíferos menos evidentes aunque si re-

conocibles durante los primeros estadios de su desarrollo.

Basándose en la citoarquitectura del adulto y en sus conexiones, Nauta y Haymaker '69, han subdividido al hipotálamo en tres zonas parasagitales: lateral, intermedia y periventricular. La zona lateral comprende de delante a atrás : área preóptica lateral, N. supraóptico, área hipotalámica lateral, área hipotalámica posterior y núcleo tubero-mamilar. La zona intermedia los núcleos: preóptico medial, hipotalámico anterior, paraventricular, ventromedial, dorsomedial, tuberal y mamilar externo. La zona medial consta de varios núcleos que bordean al tercer ventrículo: supraquiasmático, arciforme, periventricular, premamilar y mamilar medial.

El núcleo supraóptico fue reconocido por vez primera por Lenhossek quien lo designó con este nombre, aunque posteriormente ha recibido también los nombres de N. tangentialis (Cajal, Gurdjian y Rioch), y de ganglio óptico basal (Malone, Winkler y Potter). Este núcleo, neurosecretor magnocelular, tiene un desarrollo filogenético muy posterior en el tiempo y más complejo respecto al de otras agrupaciones neurosecretoras del hipotálamo. En peces teleosteos solamente existe un "núcleo preóptico magnocelular". En reptiles es donde aparece una agrupación neurosecretoras que se proyectan lateralmente por encima de la cintilla óptica, inmediatamente después del quiasma. En aves y mamíferos alcanza pleno desarrollo constituyendo el núcleo supraóptico que se encuentra en la base de las porciones quiasmática e in

fundibular del hipotálamo y está constituido por dos acúmulos neuronales: el principal, que descansa sobre el quiasma óptico y el origen de la cintilla óptica (supraóptico anterior); y el otro componente (supraóptico posterior ó tuberal) que se desarrolla hacia la parte lateral del tuber cinerum, en situación dorso-caudal al resto de la cintilla óptica.

En la rata, las primeras neuronas del N. supraóptico se manifiestan entre los días 12 y 16 de la gestación (Ifft, '72; Altman y Bayer, '78); de aquí en adelante estas neuronas no solo ven incrementado su número sino que en sus rasgos morfológicos mientras emigran hasta alcanzar su situación topográfica definitiva. La primera evidencia de su agrupación, cercana y lateral a las fibras de la cintilla óptica, ocurre en el día 16 de la gestación, adquiriendo su posición definitiva en el día 17. A partir de este momento existe un aumento celular hasta el final del periodo fetal. A estas células se las considera como neuronas de formación temprana.

El lugar de origen del N. supraóptico está en el neuroepitelio del tercer ventrículo en el límite entre los lóbulos subtalámico e hipotalámico, es decir, derivada del surco ventral de Herrick. Son al principio células fusiformes cuya migración va desde la zona matriz en la pared del tercer ventrículo, hasta su emplazamiento definitivo, junto a la cintilla óptica. Este proceso de desplazamiento se completa en 2-3 días y coincide con la llegada máxima de las fibras de la cintilla óptica que se proyectan hacia el tálamo dorsal.

Por su gran densidad celular y volumen, el N. supraóptico destaca sobre todas las unidades o masas de sustancia gris hipotalámica, resultando en general mejor individualizado que los demás núcleos hipotalámicos, generalmente formados por neuronas pequeñas y asociadas en agrupaciones no bien definidas (Ranson y Clarck, '59). El N. supraóptico (NSO), además de estar constituido por neuronas de gran tamaño (pericarion de 9 μ de diámetro en la rata), agrupa estas últimas de forma muy compacta, resultando inconfundible su conjunto (Eranko, '52; Carrato, '52; Eichner, '58; Muhlen, '66). La magnitud del grupo neuronal, así como el número y tamaño de las neuronas y la cantidad de material de secreción, varían con cada especie animal.

De este núcleo se originan gran parte de las fibras del haz hipotálamo-hipofisario, que discurren por la pared del infundíbulo para transportar la secreción hacia el lóbulo neural.

Varios investigadores del sistema neurohipofisario propusieron que el NSO sintetizaba principalmente vasopresina (Olivecrona, '57; Lederis, '61; Weylsokol y Valtin, '67). Estudios recientes con nuevas técnicas, sugieren que mediante células especializadas se agrega igualmente oxitocina, vasopresina y neurofiainas (Swaab et al., '75).

Desde el punto de vista ontogénico, se ha estudiado el diencefalo en su conjunto (Gurdjian, '27; Gilbert, '35; Cogeshall, '64; etc.), pero no se han pormenorizado los detalles evolutivos de los diferentes nú-

cleos. En la actualidad no hay un estudio profundo que aborde con precisión y objetividad todas las características (forma, tamaño, posición, volumen, etc.) que definen a un núcleo a lo largo de su desarrollo. Conscientes de la falta de información en este campo y dado el interés que pueden ofrecer los cambios paralelos que tienen lugar durante el desarrollo cerebral, hemos abordado el problema en este aspecto concreto sobre el NSO de larata blanca.

Grande ha sido el proceso en cuanto a la utilización de técnicas citoquímicas aplicadas al estudio de la génesis de los núcleos diencefálicos, pero no existen trabajos que traten de introducir métodos de cuantificación celular basados en mediciones de absorvancia fotónica, fluorescencia o refracción dentro de la microscopía óptica. Ampliando esta metodología moderna al uso de ordenadores electrónicos, se consigue el automatismo de todo el proceso junto con la eliminación de los errores subjetivos del individuo que investiga las imágenes en los preparadés. Estos métodos ofrecen las siguientes ventajas:

- 1º) Mayor resolución, fiabilidad, reproductibilidad y objetividad de los resultados.
- 2º) Error mínimo en la valoración de caracteres computarizables (p.ej.: computación de la extinción nuclear, descripciones de formas, medidas de tamaños nucleares y nucleolares, etc.).
- 3º) Registro y evaluación de importantes características que pueden ser pasadas por alto mediante los

métodos convencionales de citología e histología.

- 4ª) Obtención de valores estadísticos fiables en el estudio de la cuantificación de poblaciones celulares.
- 5ª) Mayor espectro de observación, rapidez y seguridad en la obtención de los resultados.

En la actualidad, los microscopios ópticos de rastreo, cumplen los requisitos de sensibilidad, resolución, estabilidad y precisión para examinar el material biológico elegido y hacer las medidas fotométricas dentro de un amplio rango de aumentos en la imagen y de longitudes de onda del espectro visible y cuasi visible (ultravioleta e infrarrojo cercano).

Para cumplir nuestros objetivos, hemos establecido previamente criterios básicos de planteamiento técnico siguientes:

- 1ª) Preparar un material debidamente estandarizado.
- 2ª) Mantener el análisis de imágenes dentro de un programa objetivo respecto a caracteres citológicos discriminativos.
- 3ª) Analizar fotométricamente, por rastreo secuencial en áreas discretas, campos microscópicos, convirtiéndose la información óptica en datos numéricos por un equipo combinado: citofotómetro Zeiss, ordenador Digital PDP-12.
- 4ª) Realizar programas para transformar la información numérica en mapas, histogramas, y demás resultados numéricos rápidamente asimilables y significativos.

4. MATERIAL Y METODOS

4. MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo se han empleado como progenitores ratas albinas "Wistar" de 9 meses y 200 gramos de peso medio, mantenidas a una temperatura ambiente de 20 °C, alimentadas a base de pienso compuesto Panlab y agua.

Para la obtención de hembras preñadas se colocaron en jaulas apropiadas al atardecer, 5 hembras en fase de estro y tres machos. A la mañana siguiente se realizó el frotis vaginal a las hembras para comprobar el cruce por la presencia de espermatozoides. Se ha seguido la técnica de Allen y Doisy:

- 1ª) Con un asa de platino, esterilizada al fuego, y con una gota de agua, se tomaron las muestras por medio de un raspado en la pared vaginal.
- 2ª) Se extendió la toma sobre un porta limpio, fijándola a la llama.
- 3ª) Se tiñó con colorante de Giemsa durante 15 minutos.
- 4ª) Se escurrió con agua y se dejó secar para, finalmente mirar al microscopio.

Allen y Doisy (1923) diferenciaron tres fases en el ciclo estral de la rata:

- 1ª) DIESTRO o de reposo. Prácticamente la totalidad de las células son leucocitos con algunas células epiteliales. Es la más larga, durando algo más de dos días, aunque varía de unas ratas a otras.
- 2ª) PROESTRO. Dominan las células epiteliales o nucleadas junto con algunos leucocitos. Dura unas 12 horas.
- 3ª) ESTRO o de actividad. Es la fase de celo. Aparecen

casi exclusivamente células cornificadas o queratinizadas. Son células sin núcleo y sin estructura interna y de mayor tamaño. Dura unas 12 horas.

Posteriormente se ha distinguido cuatro estadios con una subdivisión del cuarto; a la vez se tiene en cuenta el aspecto externo del órgano femenino en cada fase.

1ª) DIESTRO. Presenta una mucosa vaginal brillante.

En el frotis existen leucocitos y células epiteliales. Dura 57 horas.

2ª) PROESTRO. La mucosa vaginal está ligeramente seca y los labios secos e hinchados. Aparecen solamente células epiteliales y dura 12 horas.

3ª) ESTRO. La mucosa vaginal continua seca y sin brillo. Los labios también siguen hinchados, En el frotis persisten las células nucleadas y aparecen algunas queratinizadas. Dura 12 horas.

4ª) METAESTRO. Dura 21 horas y está subdividido en dos:

a) PRECOZ. El animal se encuentra ya fuera de celo.

Existe gran abundancia de células cornificadas.

Dura 15 horas.

b) TARDIO. La mucosa vaginal está ligeramente húmeda y los labios hinchados, Aparecen células queratinizadas y algunos leucocitos. Dura 6 horas.

La totalidad del ciclo dura de 4 a 5 días. El día en que aparecen espermatozoides en el frotis vaginal (Cogeshall, '64; Ifft, '72; McAllister, '77) se considera como el primer día de gestación de la rata.

Las ratas preñadas fueron distribuidas en cua-

tro lotes para obtener los cerebros de embriones de 20, 22 y 23 días y nacidos de 15 días. En cada fecha de las indicadas se procedió a la obtención del material mediante la parotomía bajo anestesia etérea de las madres, en el caso de los ejemplares intraxterinos; directamente en los de 15 días post-partum. El cerebro se aisló cuidadosamente mediante dirección craneana, seleccionándose 5 cerebros de cada edad, con especial cuidado de que la base diencefálica estuviera intacta y completa con su simetría bilateral perfectamente conservada. Este detalle es siempre deseable pero especialmente importante en las investigaciones estereológicas como la presente.

4.1. TECNICA HISTOLOGICA

Los cerebros fueron fijados en líquido de Bouin primero por goteo, desde el mismo instante en que fueron extirpadas las bóvedas craneanas. Luego de extraídos, permanecieron de 3 a 5 horas en el fijador para pasar a una posterior deshidratación e inclusión en celoidina-parafina.

Los tiempos de deshidratación han sido los siguientes: alcohol de 80°, 8-12 horas según tamaño; alcohol de 96°, 10 o más horas; alcohol absoluto, 3 horas en cada uno de 3 cambios sucesivos. Posteriormente se han llevado las piezas a una solución al 2% de celoidina en benzoato de metilo, durante 8-12 horas. De aquí pasan al toluol, renovado 3 veces a intervalos de 1 hora; finalmente a parafina de punto de fusión de 55 °C, con 3 cambios de 3 horas cada uno, en estufa a 60 °C. La confección del bloque se ha efectuado con la técnica habitual, teniendo buen cuidado en orientar los cerebros de tal mo

do que los cortes en serie puedan obtenerse exactamente en planos frontales con simetría bilateral.

Los cortes se han hecho ininterrumpidamente a 10 μ de grosor, montándolos sobre portaobjetos numerados y tinéndolos con hematoxilina (segun Carazzi)-eosina. La Hematoxilina de Carazzi se compone de: Agua destilada, 400 ml; glicerina, 100 ml; alumbre potásico (polvo), 25 grs; Iodato potásico, 0,10 grs; hematoxilina 0,5 grs.

La adecuación de esta técnica al rendimiento de las mediciones del fotómetro, contraste y absorbancia, ha resultado superior a otras técnicas muy frecuentes en neurohistología, derivadas del método de Nissl (tionina, azul de toluidina, y violeta de cresilo), todas ellas utilizadas en ensayos previos.

Cada colorante posee un máximo de extinción lumínica. Las longitudes de onda para los colorantes utilizados son: tionina=592 nm, violeta de cresilo= 548 nm, azul de toluidina= 620 nm, eosina= 518 nm, hematoxilina de Carazzi= 572 nm. Una vez efectuadas las mediciones citofotométricas, se pudo comprobar que la máxima resolución se obtenía al teñir las neuronas hipotalámicas de los ejemplares intrauterinos y postnatales con hematoxilina-eosina, para lo cual es preciso utilizar una longitud de onda de 540 nm.

4.2. RECONSTRUCCION DEL NUCLEO SUPRAOPTICO

4.2.1. Técnica directa

Una vez procesados los cortes seriados de los cerebros correspondientes se fotografiaron en un microscopio Leitz, objetivo 10x, ampliando la imagen hasta 100 μ .

mentos para poder hacer una reconstrucción tridimensional del N.so. Sobre la microfotografía, se dibujaron los contornos de este grupo neuronal dentro de un sistema de coordenadas en el que siempre quedaron referidas las distancias al plano sagital (línea media vertical en el tercer ventrículo) como eje X; las distancias al tercer ventrículo como eje Y; y las distancias al plano frontal de la comisura anterior (número de cortes a 10μ), como eje Z. Se recortaron los contornos del N.so. en cada microfotografía y se superpusieron prestando una atención especial a mantener invariable la relación de coordenadas anteriormente mencionada. El grosor del cartón para los dibujos utilizado ha sido de 1 mm, exactamente 100 veces mayor que el grosor de los cortes coincidente con los 100 aumentos de cada microfotografía.

4.2.2. Conversión de perspectiva.

La reconstrucción directa marca la perspectiva frontal según el eje antero-posterior (Z) en la secuencia de los cortes del N.so. De aquí y sin necesidad de nuevas series de orientación distinta se pueden obtener fácilmente las otras dos perspectivas según los ejes Y y X.

Para la perspectiva horizontal según el eje dorso-ventral (Y), basta tener en cuenta las distancias de los puntos del contorno a los planos sagital (eje X) y antero-posterior (eje Z), este último calculado con la numeración del corte frontal a partir de la comisura anterior como plano 0.

Para la perspectiva lateral según el eje lateromedial (X) basta tener en cuenta la distancia de los pun-

tos del contorno a la base del ventrículo (eje Y) y al plano frontal O (eje Z).

Teniendo en cuenta todos estos datos, se han podido construir las tres perspectivas citadas, según los tres planos cartesianos, sin recurrir mas que a la serie de cortes frontales. El número de cortes varía notablemente con la edad de las ratas, obteniéndose los siguientes promedios:

CUADRO N° 1

EDAD DIAS	N° de CORTES A PARTIR de la C.A.	N° de CORTES CONTENIEN DO al N. SUPRAOPTICO
20 i.u.	1000	42
22 i.u.	1000	72
23 i.u.	1400	72
15 p.p.	1500	96
i.u.= intrauterinos; p.p.= post-partum; c.a.= comisura anterior		

Para la reconstrucción tridimensional se han utilizado todos los cortes seriados conteniendo al N.so., es decir, desde que comienza el quiasma, hasta que desaparece la cintilla óptica de la superficie, siendo su número el expuesto mas arriba.

4.3. TECNICA CITOFOTOMETRICA

Para la cuantificación citofotométrica se ha hecho pasar a través de las preparaciones un haz luminoso de 540 nm de longitud de onda y se ha medido con un fotomultiplicador la intensidad lumínica que atraviesa la preparación (valor medio de 45) o bien la diferencia (valor medio de 35, tomando logaritmos decimales) respecto al

haz original, es decir, la absorbancia de cada punto analizado según el tipo de haz empleado. Así pues, se ha podido asociar cada punto de la preparación con un valor objetivo de luminosidad, dado por el fotomultiplicador. Para explorar cada extensión necesaria en las preparaciones, se ha efectuado un barrido de las mismas con el haz luminoso, recogiendo un muestreo adecuado y significativo de puntos con sus valores de absorbancia. Esto ha supuesto un desplazamiento sistemático en el plano, según los dos ejes coordenados X e Y. En nuestro caso, se ha conseguido manteniendo fijo el haz luminoso y desplazando la preparación en forma de barrido sobre puntos de líneas paralelas, dentro de un rectángulo.

La mayor parte de las veces no ha interesado medir toda la preparación sino solo un campo o zona determinada; o incluso unas células aisladas, estableciendo previamente los límites de la zona a explorar. Ha sido necesario también establecer la unidad de salto, es decir, la distancia entre dos puntos consecutivos de medida con el fotomultiplicador. De este modo la zona a explorar ha quedado cuantificada por una serie de medidas de absorbancia, correspondiendo cada una a un punto de la preparación separado del siguiente por la unidad de salto. Si ésta es lo suficientemente pequeña, el campo queda convertido en un retículo, correspondiendo cada medida a una celdilla del mismo.

El proceso de medición es el siguiente: en primer lugar se ha posicionado la preparación en la platina, previa elección del diafragma de medición, de la longitud de onda de la luz, de la distancia entre áreas de medida

(salto), de la superficie total a analizar, de la medida del fotomultiplicador; desplazamiento automático de la preparación en una unidad de salto; nueva medición y así sucesivamente hasta barrer todo el área fijada. Es un procedimiento lento porque la preparación debe estar fija antes de medir, pero por otra parte, también las mediciones son más precisas al hacerse así. Como ejemplo puede citarse que con una unidad de salto de 0.5μ , una zona de $15 \mu \times 15 \mu$ tarda unos 2 minutos en medirse, mientras que un campo de $140 \mu \times 170 \mu$ tarda unas 3 horas y media.

Los valores de medición se han procesado con un ordenador (Digital PDP-12), mediante un programa APAMOS cuya función básica es controlar la secuencia de operaciones citada anteriormente, imprimiendo los valores medidos en un teletipo. También graba dichos valores en cinta magnética.

Este es el proceso que suele seguirse con células aisladas o campos pequeños. Pero para agrupaciones celulares o campos más extensos, el volumen de datos es tal, que se hace precisa una reducción de los mismos para así poder ser asequibles y asimilables por el operador. Esta es la misión del programa DATPLAN, que partiendo de los valores grabados en cinta magnética por APAMOS, agrupa los valores de celdillas vecinas, a la vez que cuenta el número de células que hay en el campo medido. El programa supone que un grupo de celdillas agrupadas, cuya absorbancia supera un cierto umbral,

equivalen a una célula detectada en la preparación, o para ser más exactos, a su núcleo. Para evitar contar un núcleo por cada celdilla del grupo, una vez descubierta la primera, el programa borra los datos correspondientes a las 6 celdillas adyacentes a la misma y que se supone forman parte del mismo núcleo. Esto implica que la unidad de salto debe elegirse igual a un tercio del diámetro nuclear. Así basta explorar ordenadamente todos los datos de la cinta magnética, para saber el número de células que hay en ese campo.

El umbral se fija según la absorbancia o extinción (del haz) de las células de dicho campo y para ello, previamente a la medida del mismo, se analizan 30 células aisladas dentro de él. Esto permite conocer el diámetro (tamaño) medio y la absorción (opacidad) media de los núcleos de las células de la preparación.

Una vez explorados todos los datos, el programa DATPLAN ha impreso unas medidas generales (área total explorada, número total de células, densidad celular media y superficie ocupada por los núcleos) sobre el campo explorado, así como un mapa de distribución de densidades celulares. Como ejemplo puede citarse que se tardan unas 3 horas y media en imprimir el mapa correspondiente a un campo de $140 \mu \times 170 \mu$.

El equipo utilizado para la realización de este estudio, consta de un citofotomicroscopio Zeiss - modelo SMPH, acoplado a un ordenador Digital PDP-12-A.

El microscópio puede ser usado con dos tipos de iluminación: incandescente (que contiene todas las longitudes de onda visibles, simultaneamente) y la de Xenon - (que mediante un monocromador se reduce a una longitud de onda única, pero variable a lo largo de toda la gama visible e incluso a una parte del ultravioleta). -- También consta de un fotomultiplicador sensible a todo el espectro visible, un diafragma de campo que permite reducir el campo luminoso para que sólo limite el objeto en estudio, un diafragma de medición regulable y un obturador o seccionador del haz lumínico de modo que se presente al fotomultiplicador de manera discontinua.

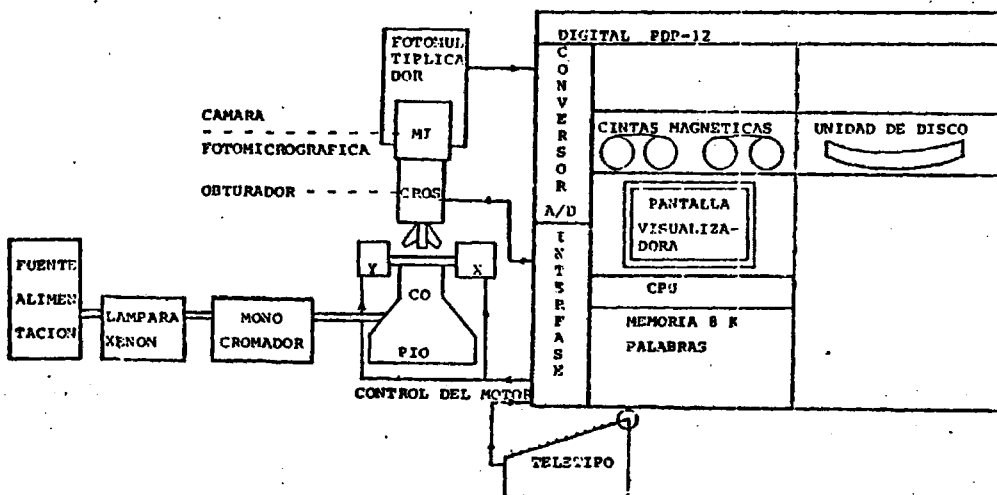


Fig. 1

Como fuente luminosa se ha utilizado la luz de Xenon monocromada a luz verde con una longitud de onda $\lambda = 540$ nm., una apertura del monocromador de 0.5 mm., un objetivo de 40 aumentos y un diafragma de medición de 0.1 mm..

Como el conversor analógico-digital que convierte la señal que le llega del fotomultiplicador tiene 8 bits, el número máximo que puede obtenerse como resultado de una medida es $2^8 - 1 = 255$ y el número mínimo es 0. El valor 255 representa el total del haz lumínico transmitido, es decir, la densidad óptica nula. El valor 0 es la medida correspondiente al haz lumínico transmitido nulo, esto es, a la densidad máxima. La densidad óptica D correspondiente a un punto en el que se ha obtenido una medida M del haz lumínico en el conversor analógico-digital es por tanto: $D = 255 - M$. Así todos los valores de la densidad óptica correspondientes a todas y cada una de las celdillas exploradas se encuentran comprendidos en el rango de 0 a 255. De este modo aparecen representados en el mapa impreso, con la única diferencia de sustituir el 1 de las centenas por un "." para las densidades comprendidas entre 100 y 199 y el 2 de las centenas, por dos puntos ":" para las densidades comprendidas entre 200 y 255. En este caso, el mapa se ha limitado al núcleo de una neurona y sus inmediaciones, ya que es la única parte bien delimitable por el procedimiento de tinción empleado. Fig. 2.

También se ha trabajado con intensidades lu-

CNLTZ 03 23
TOTAL N=21 Y=25 A=581 T1=32815 T2=57 TE=17319 D2=30 D3=23

CASL ZELOS DATA E 20 42-1 POS

CELL NAME 6 NAME

14	13	7	4	4	14	28	31	26	11	3	6	7	14	13	11	11	14	11	3	1
14	11	8	3	8	15	24	26	18	12	6	3	12	16	14	11	13	11	13	6	9
11	12	9	12	11	17	23	18	14	10	5	7	13	15	14	12	12	14	13	15	16
11	9	11	8	11	15	19	14	11	10	11	11	15	20	17	14	15	12	20	22	23
8	9	11	7	12	15	15	14	10	13	9	15	19	23	21	15	13	14	21	30	37
7	10	9	10	10	11	10	15	14	20	14	20	22	24	21	23	16	18	21	33	45
11	10	11	12	12	12	12	21	29	27	21	23	26	21	24	23	26	28	33	41	
5	4	12	12	14	15	14	14	27	33	42	32	29	33	25	20	19	25	31	37	38
5	9	12	20	15	15	12	21	29	42	48	46	44	39	32	26	18	16	24	26	25
5	8	18	23	17	14	13	23	40	52	59	58	53	55	43	31	21	12	17	23	26
5	11	17	25	20	23	23	38	50	53	64	74	78	65	69	42	22	9	14	18	23
7	9	17	21	25	26	35	63	64	72	70	84	71	66	71	51	29	14	18	16	19
11	11	21	21	23	32	46	65	70	73	92	73	63	64	59	60	41	22	13	14	14
17	20	24	21	24	30	55	77	82	85	65	68	65	54	64	61	52	32	16	12	15
13	24	24	12	21	33	57	76	82	64	69	54	64	51	56	52	48	36	16	14	15
17	20	20	19	20	33	52	70	64	64	65	71	68	57	62	39	44	39	23	18	21
21	19	15	22	21	41	63	76	61	64	76	84	84	73	61	53	40	41	29	24	20
11	6	14	14	27	43	77	93	77	81	94	96	19	76	57	52	46	43	26	21	17
6	3	12	12	25	45	92	26	22	46	62	52	96	62	49	51	53	41	24	16	13
6	8	12	15	26	43	85	22	46	82	26	82	55	51	43	44	42	34	28	23	15
9	12	12	17	23	44	96	19	65	92	95	65	52	47	40	46	45	37	25	18	17
12	11	16	21	19	33	53	61	71	71	57	53	51	49	46	46	41	32	25	22	11
17	13	15	21	22	21	37	42	55	60	52	44	46	44	46	41	42	29	26	15	13
23	20	19	26	23	16	3	22	34	48	44	41	43	39	42	34	26	21	21	12	8
25	23	19	20	16	12	2	12	19	33	37	33	26	26	25	22	20	17	15	13	0
37	27	19	18	13	10	1	2	11	22	23	17	15	15	14	9	12	11	9	10	6

Fig. 2

minosas en vez de densidades ópticas y como aquellas no son absolutas, sino relativas, ha sido preciso fijar una intensidad de referencia, respecto de la cual se expresarán todas las demás en %. De este modo la intensidad luminosa mínima será 0% y la máxima 100%. Para representar todos los valores medidos en este rango, el operador calibra el aparato inmediatamente antes de la toma de datos, fijando así la intensidad luminosa de referencia. Para ello se elige un punto de la preparación que no tenga ningún núcleo y se le asigna el valor de medida 200 en previsión de que pueda haber algún otro punto más claro (valor medido superior a 200) sin tener porqué saturar el conversor analógico-digital cuyo valor máximo es 255. Este valor 200 representará el 100% de luz transmitida (referida a ese punto). Con esta referencia ya se pueden obtener las intensidades luminosas relativas correspondientes al resto de los valores medidos. La relación que liga la densidad óptica D de un punto con la intensidad luminosa relativa asociada a él, viene dada por medio de la fórmula siguiente:

$$D = 100 \log \frac{100\%}{I(\%)}$$

Así a una intensidad relativa del 1% le corresponde una densidad de 200, mientras que a una intensidad luminosa del 100% le corresponde una densidad óptica de 0.

En general se ha operado siempre con densida

des ópticas ya que como su rango es de 0 a 255, con -- ellas se consigue una definición mucho mayor que trabando jando con intensidades cuyo rango es solo de 0% a 100%.

Para este estudio, se han utilizado las se-- rias de cortes histológicos anteriormente reseñados de los distintos periodos evolutivos. La toma de datos se efectua en todos y cada uno de los cortes seriados desde de que comienza el núcleo supraóptico hasta que desaparece. Como se ha esbozado anteriormente, el estudio es doble: células aisladas y agrupaciones celulares.

4.3.1. Células aisladas.

Su finalidad es caracterizar las células - de las distintas zonas del N.so., ademas de proporcionar los datos previos para la toma de datos de las agrupaciones celulares.

Es un estudio bastante laborioso, ya que la elección de las células ha de hacerse cuidando que estas puedan aislarse con facilidad para ser medidas por el computador. La unidad de salto elegida ha sido de - 0.5 μ .

El programa APAMOS nos ha impreso los siguientes resultados para cada célula: coordenadas X, Y, area total explorada, intensidad total, intensidad media, extinción total, extinción media y error de distribución. Ademas imprime un mapa de la distribución de densidades ópticas correspondientes a esa célula (Fig.2).

Para confirmar citofotometricamente que los valores de densidades ópticas delimitantes de los nú-

cleos de las neuronas analizadas son los más apropiados entre 30 y 40, se hicieron las siguientes pruebas: siempre se comparó el núcleo celular visto al microscopio con el mostrado por la pantalla del computador y con el impreso a través del teletipo, se hizo una superposición a escala correspondiente entre una microfotografía y el mapa proporcionado por el teletipo. Con esta técnica comprobamos definitivamente que los valores de densidades ópticas correspondientes a 35 eran los más adecuados para definir automáticamente el contorno nuclear. En el interior del núcleo el valor medio de densidad óptica (también llamada extinción luminosa) es de 60, aunque pueda contener pequeñas áreas con extinciones tan bajas como 5. El nucleolo presenta valores entre 100 y 255, con una extensión mínima de 8 celdillas o cuadrículas. Si la extensión es menor, se considera material cromatínico ópticamente denso. El citoplasma de las células tiene valores comprendidos entre 5 y 35.

Con estos criterios, se delimitan manualmente en el mapa impreso, las zonas correspondientes al citoplasma, núcleo, nucleolo y materiales cromatínicos ópticamente densos, que quedan nitidamente perfilados y situados.

Posteriormente, se calculan las áreas correspondientes al núcleo y nucleolo, para lo cual basta contar el número de cuadrículas ocupadas sabiendo que cada una tiene un área de una unidad de salto al cua--

drado, es decir, $0.25 \mu^2$. También se miden los diámetros, sabiendo que la separación entre dos cuadrículas es una unidad de salto, es decir, 0.5μ . Con estos valores se halla el tamaño y la forma nuclear y nucleolar número de nucleolos existentes en cada célula, etc., - datos todos ellos que sirven para caracterizar efectivamente los distintos tipos de células en las diferentes zonas del N.so..

4.3.2. Agrupaciones celulares.

La finalidad de su estudio es delimitar y --cuantificar objetivamente el N.so.

Partiendo de las preparaciones mencionadas, se elige manualmente una zona de barrido que comprenda enteramente al N.so. en ese corte. Igual que para células aisladas, se toman los datos de esa zona mediante el programa APAMOS, con la única diferencia de escoger la unidad de salto igual a 3μ . Esto equivale a $1/3$ de un diámetro nuclear medio de 9μ , factor necesario para ser posteriormente procesado por el programa DATPLAN.

Esta vez no se solicita ningún mapa del programa APAMOS y los únicos resultados interesantes del mismo, son las dimensiones X, Y de la zona explorada y la intensidad media de la misma, que se suministran como datos al programa DATPLAN. La estructura de este último es tal, que permite el procesamiento de hasta 3 campos celulares sucesivos sin intervención del operador, por lo que puede dejarse funcionando de modo autónomo durante la noche.

Como ya hemos mencionado, el programa DATPLAN explora los datos grabados en cinta magnética por el programa APAMCS, conteniendo las células existentes, agrupando las celdillas en cuadrículas de 6 x 6 celdillas (cada una de las cuales mide 3μ , lo cual hace que las cuadrículas sean de $18 \mu \times 18 \mu$) y asignando a cada cuadrícula, el número de células encontrado en esas 36 celdillas. Los resultados para campo celular son: área total explorada, número total de células, densidad celular media y superficie ocupada por los núcleos. Además imprime un mapa del campo análogo al proporcionado por APAMCS, pero con la diferencia de que los valores de cada posición, en vez de ser extinciones luminosas por celdilla, son el número de células existentes en esa cuadrícula de 36 celdillas, ocupando $324 \mu^2$ ($18 \mu \times 18 \mu$) de área. Este número puede oscilar entre 0 y 8 células como máximo y se interpreta empíricamente del siguiente modo:

- a) Valores de 0 a 3 células por cuadrícula, corresponden a la sustancia blanca y no se imprimen.
- b) Valores de 4 a 8 células por cuadrícula, corresponden a la sustancia gris y son los que resultan impresos en el mapa. (Figs. 27-30).

Manualmente, se delimita la zona del mapa correspondiente al N.so. y sobre ella se hace un recuento de las cuadrículas correspondientes a sustancia blanca y las correspondientes a sustancia gris. Sabiendo que cada una ocupa $324 \mu^2$, se pueden saber las áreas correspondientes en μ^2 , así como la homogeneidad de la

distribución celular y el número total de células correspondientes al N.so. en ese corte. Con esto se consigue efectivamente la delimitación y cuantificación objetiva de dicho núcleo.

Uniendo los resultados hallados al analizar células aisladas, con los hallados al estudiar agrupaciones celulares y mediante la aplicación de métodos estadísticos (curva de Gauss, $\bar{x}:2V$), se determina la existencia de una o varias poblaciones celulares en cada zona del N.so. de las diferentes edades estudiadas. Posteriormente se aplica un análisis de varianza para determinar las posibles diferencias existentes entre las células de las distintas zonas correspondientes al núcleo en un estado evolutivo concreto y las diferencias existentes entre las células de una misma zona para todos los periodos evolutivos estudiados.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. TOPOLOGIA Y MORFOLOGIA DEL NUCLEO SUPRAOPTICO.

Desde el comienzo de su aparición en la serie antero-posterior de los cortes frontales del dien- céfalo, se ha comprobado que el N.so. se inicia forman- do una serie de bandas celulares superpuestas pero sin gran compacidad como masa celular. (Figs. 3a-6a). La má- xima extensión de los cortes se alcanza cuando el N.so descansa ya sobre la cintilla óptica más allá del quias- ma (Figs. 3b-6b).

Presenta como una de sus características es- tructurales, la escasez de elementos de la astroglia y una abundante vascularización en íntima relación con - las neuronas.

En la observación comparada de los cortes -- del N.so. a lo largo de los distintos periodos evoluti- vos, se ha comprobado, que los diferentes estadios se presentan bajo las mismas características básicas en - cuanto a localización topográfica general en el hipotá- lamo, pero se observan diferencias en cuanto a tamaño, densidad y distribución celular, así como en la distan- cia con respecto a los planos frontal o vertical, hori- zontal y sagital.

5.1.1. Embriones de 20 días.

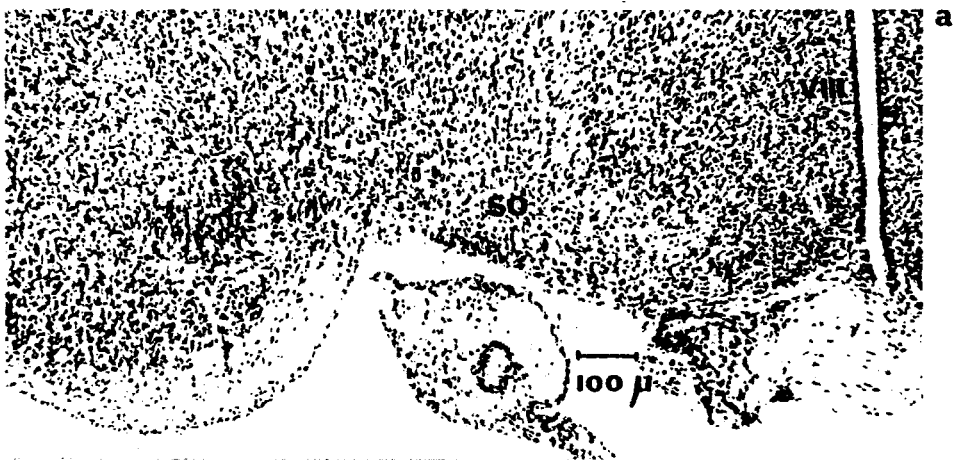
El N.so de este periodo evolutivo es el que presenta un índice más pequeño en cuanto a extensión - superficial en los cortes y en cuanto a densidad celu-

Fig. 3. Vista frontal de tres cortes situados en niveles diferentes del hipotálamo de rata de 20 días intrauterinos a 100x.

- a. Corte correspondiente a la zona anterior del N.so.
- b. Corte correspondiente a la zona intermedia del N.sc.
- c. Corte correspondiente a la zona posterior del N.so.

El N.so. aparece dividido en dos partes pequeñas situadas una por encima y otra por debajo de la cintilla óptica.

20 i.u.



lar. En los cortes más rostrales aparece bastante difuso, siendo difícil determinar el contorno del núcleo -- (Fig. 3a). Al cabo de unos veinte cortes, el núcleo aparece ya con un límite bien definido, las células aumentan en número y se incrementa espectacularmente la superficie del conjunto celular, con una agregación cada vez más compacta. (Fig. 3b). Hacia la parte caudal del núcleo, se hace evidente la segmentación en dos ramas pequeñas a manera de bandas, que se sitúan una por encima y otra por debajo de la cintilla óptica (Fig. 3c). La situación del núcleo se hace al mismo tiempo más lateral, a la vez que se desplaza dorsalmente y sufre una inclinación para formar un ángulo cada vez más agudo con el tercer ventrículo.

5.1.2. Embriones de 22 días.

En los primeros cortes (Fig. 4a) muestra un área algo oval de unas 150 μ de extensión en su eje mayor y unas 50 μ en su eje menor. La zona más cercana a la parte medial del N.so. es ligeramente puntiaguda. En cortes más caudales se comprueba que el aumento del área es muy notorio tanto en sentido medio-lateral como en sentido dorsi-ventral (Fig. 4b). La parte posterior del núcleo se encuentra formada por dos bandas estrechas situadas una sobre y otra bajo la cintilla óptica (Fig. 4c). Durante un trayecto de unas 350 μ que dista del origen aproximadamente la mitad de su longitud, el N.so. no varía en sentido ventro-dorsal, pero se eleva bruscamente

Fig. 4. Vista frontal de tres cortes pertenecientes al hipotálamo de rata de 22 días intrauterinos a 100x, situados en niveles diferentes en sentido rostro-caudal.

a. Corte correspondiente a la zona anterior del N.so.

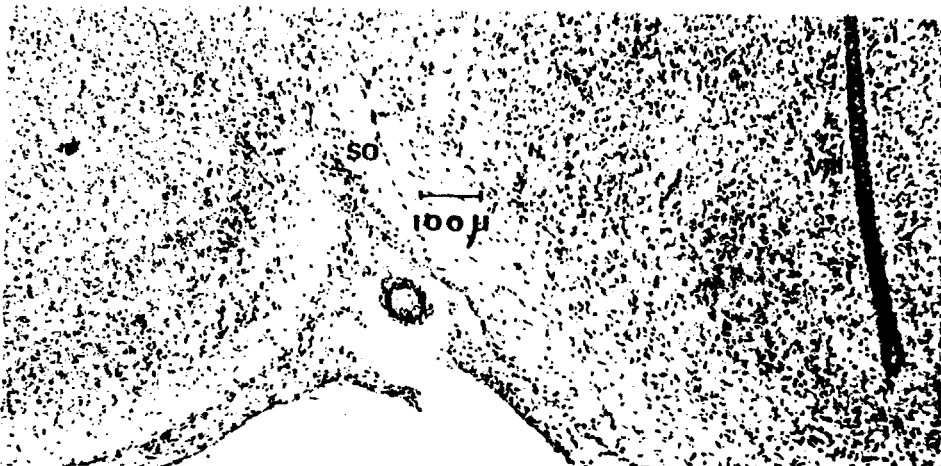
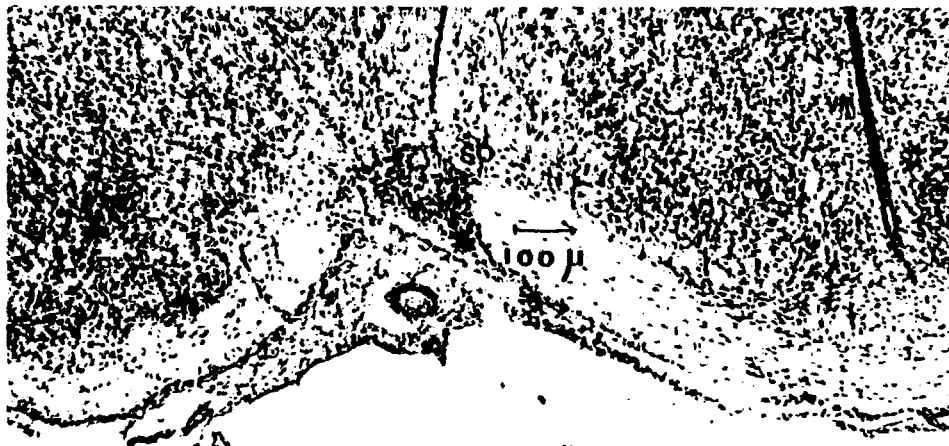
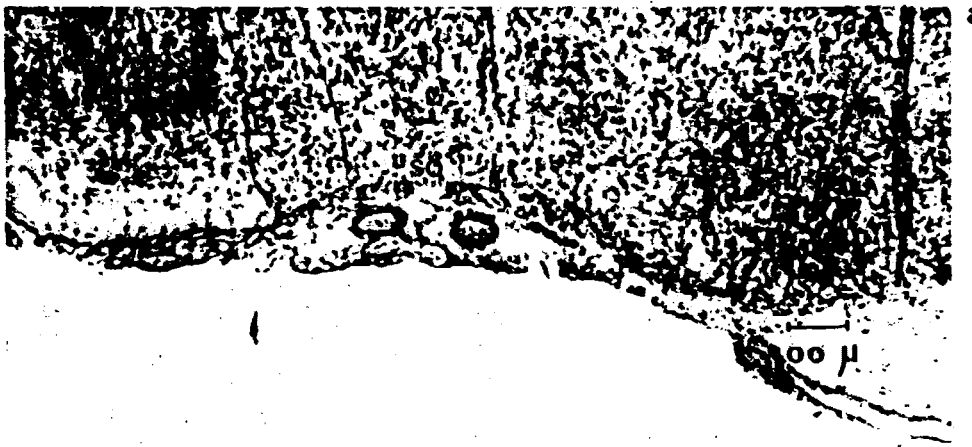
b. Corte correspondiente a la zona intermedia del N.so.

c. Corte correspondiente a la zona posterior del N.so.

El N.so. está próximo a desaparecer y se encuentra dividido en dos partes situadas una por encima y -- otra por debajo de la cintilla óptica.

36

22 i.u.



hacia el 50^o corte perteneciendo éste a territorios más caudales. En sentido latero-medial sufre desde su extremo anterior un acercamiento progresivo hacia el tercer ventrículo, para más tarde a partir del 19^o corte, seguir un desplazamiento opuesto en sentido medio-lateral. La sección del núcleo ha girado de tal modo que su eje mayor que primitivamente estaba horizontal, pasa a ser vertical.

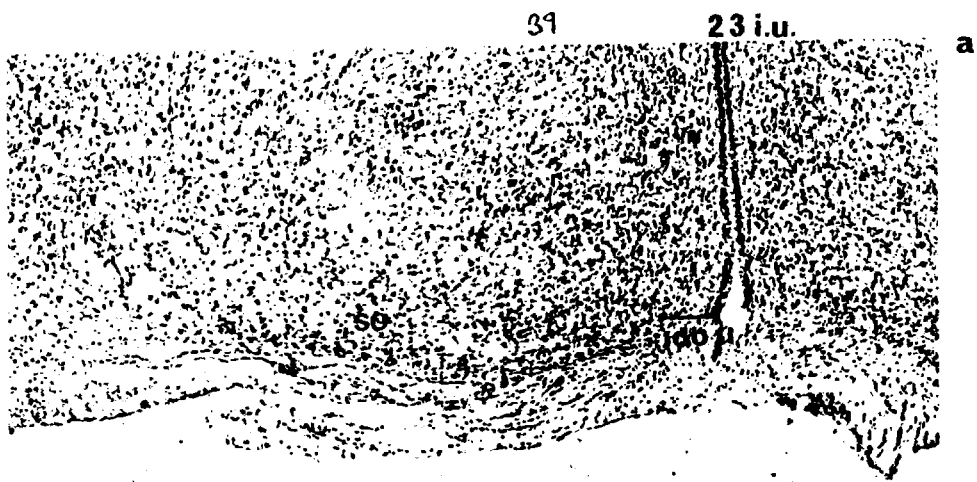
5.1.3. Embriones de 23 días.

La topología del N.so. en el día 23 de la gestación, presenta una variante en su desarrollo antero-posterior. Su imagen en los primeros 14 cortes (Fig.5a) es sensiblemente estrecha y alargada en sentido horizontal, siendo la parte medial más fina que la lateral. En la zona intermedia entre los cortes 23 y 52 aumenta considerablemente la extensión del núcleo, tanto en sentido latero-medial como en el dorsi-ventral con ejes mayor y menor de unas 450 μ y 100 μ respectivamente (Fig. 5b). En la parte posterior, a partir del corte n^o 53, queda dividida la imagen del núcleo en dos partes ventral y dorsal a la cintilla óptica, siendo de mayor extensión la ventral.(Fig. 5c).

La imagen de los primeros cortes del núcleo, es alargada también en sentido horizontal por encima del quiasma óptico; en los últimos cortes la imagen ha girado y resulta alargada en sentido vertical.

Fig. 5. Vista frontal de tres cortes situados en distintos niveles en sentido rostro-caudal del hipotálamo de rata de 23 días intrauterinos a 100x.

- a. Corte correspondiente a la zona anterior del N.so.
- b. Corte correspondiente a la zona intermedia del N.so.
En este nivel el núcleo alcanza su máximo desarrollo.
- c. Corte correspondiente a la zona posterior del N.so.
El N.so. está visiblemente dividido en dos partes situadas a ambos lados de la cintilla óptica.



5.1.4. Ejemplares de 15 días post-partum.

En los primeros 8 cortes frontales (Fig.6a), el núcleo ocupa un área pequeña de más o menos 180 μ por 20 μ siendo menor el eje dorsi-ventral que el latero-medial. El extremo más medial es puntiagudo y el más lateral de forma aplanada. Al avanzar unos 32 cortes (Fig.6b) ya en la zona intermedia del núcleo se aprecia que la extensión en superficie ha aumentado alcanzando valores de unas 160 μ por 110 μ . A partir del corte nº 70 (Fig.6c) se observa la escisión del núcleo en dos partes, la ventral y la dorsal. El núcleo sufre un desplazamiento inicial durante los primeros 13^º cortes tendente a aproximarse a territorios más mediales, después a partir del corte nº 14 invierte la trayectoria para ir alejándose hacia zonas más laterales. Continúa a partir del corte nº 25 un nuevo acercamiento hacia la zona medial y prosigue a partir del corte nº 36 alejándose lateralmente hasta la parte posterior donde el núcleo se fragmenta en las dos zonas.

5.1.5. Resultados morfológicos comunes.

El estudio de los cortes seriados, ha permitido tal como hemos ido describiendo, una serie de características morfológicas y topográficas comunes en los cuatro períodos evolutivos de los embriones de rata de 20, 22 y 23 días y nacido de 15 días.

- a) El N.so. posee una dimensión mayor en sentido latero-medial que en sentido dorsi-ventral.
- b) En la zona intermedia el extremo lateral y puntiagudo y más estrecho que el medial.

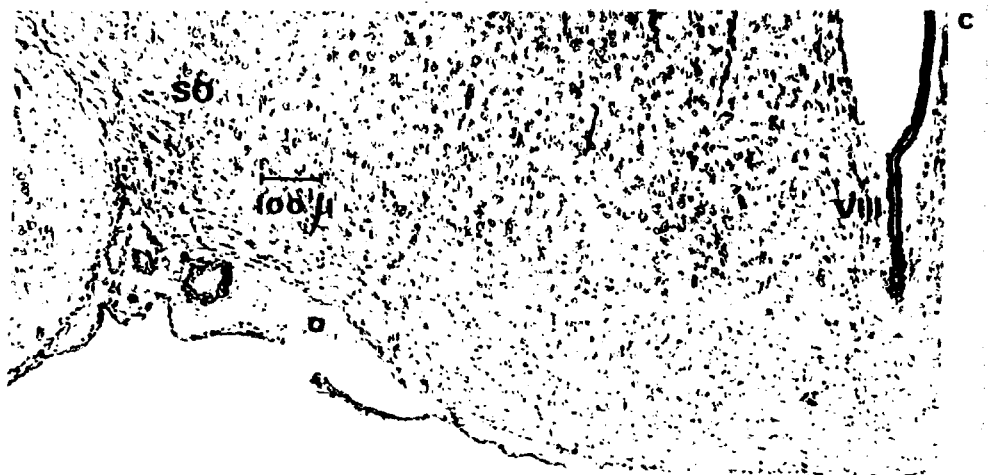
Fig. 6. Vista frontal de tres cortes pertenecientes al hipotálamo de rata nacida de 15 días, situados en niveles diferentes en sentido rostro-caudal a lCCx.

a. Corte correspondiente a la zona anterior del N.so.

b. Corte correspondiente a la zona intermedia del N.so.

Es visible la existencia de una migración celular - en este nivel del N.so. y de una gran vascularización.

c. Corte correspondiente a la zona posterior del N.so.



- c) La zona intermedia está más desarrollada que las zonas anterior y posterior, ocupando aproximadamente el 60% del volumen total.
- d) La zona posterior está segmentada en dos partes que se sitúan por encima y por debajo de la cintilla óptica.
- e) El N.so. sufre un desplazamiento inicial hacia áreas mediales, para alejarse hacia áreas laterales. Vuelve a desplazarse hacia áreas mediales en la zona intermedia e invertir de nuevo la trayectoria desplazándose en sentido lateral.
- f) Presenta un descenso en sentido dorsi-ventral, con un punto de inflexión hacia el corte nº 24, a partir del cual asciende hacia la zona dorsal hacia el área infundibular.
- g) Existe un incremento progresivo en la extensión rostro-caudal del N.so. con el aumento de la edad de los ejemplares.
- h) La imagen del N.so. en los primeros cortes es -- alargada según un eje medio-lateral horizontal y la imagen del núcleo va a hacerse vertical en -- los últimos cortes.

5.2. REPRESENTACION TRIDIMENSIONAL.

Con esta representación, se pretende dar la mayor fidelidad a la morfometría del N.so. durante los periodos del desarrollo evolutivo estudiados. Es importante que todos los datos recogidos estén referidos --

sin variación posicional alguna con respecto a los planos de origen de coordenadas, condición indispensable para poder hacer una reconstrucción fidedigna y obtener las perspectivas cartesianas del núcleo en cada fase evolutiva estudiada. Así se ha podido seguir la evolución ontogénica de la agrupación nuclear, los desplazamientos según los tres ejes rostro-caudal, medio-lateral y ventri-dorsal, tamaños parciales y de conjunto, pudiendo destacar aquel hecho que se considere peculiar por una característica determinada.

La simple observación de los cortes proporciona una idea de la forma del núcleo y sugiere una interpretación, pero es muy fácil que el modelo así imaginado difiera en importantes detalles de la forma real.

5.2.1. Embriones de 20 días.

5.2.1.1. Perspectiva dorsal (Fig. 7a). Presenta el desarrollo antero-posterior del núcleo supraóptico visto desde arriba. Al observar la gráfica se puede apreciar como los ocho primeros cortes correspondientes a la zona anterior están centrados con relación a la posición que ocupan los cortes pertenecientes a la zona intermedia, apareciendo en la zona anterior los extremos mediales del N.so. en cada corte a una 500 μ de distancia del plano sagital, mientras que en la zona intermedia esta distancia disminuye a unas 430 μ . Esta aparente lateralización es debido a que la longitud en sentido latero-medial es menor en la zona anterior que la -

115

20 i.u.

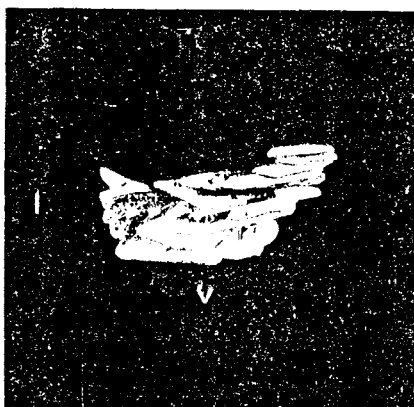
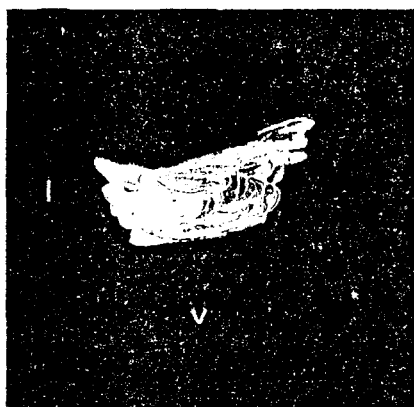
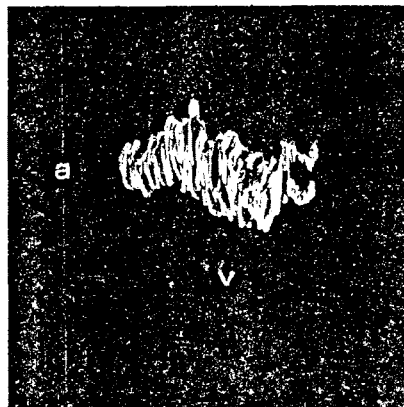
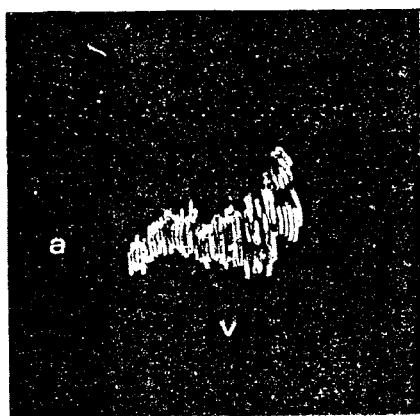
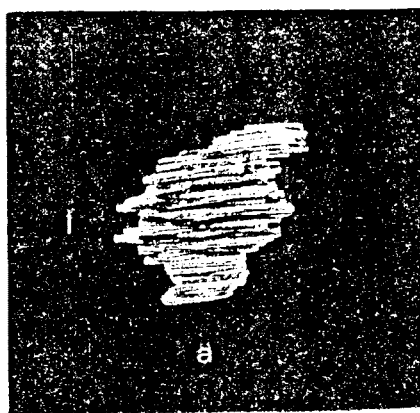
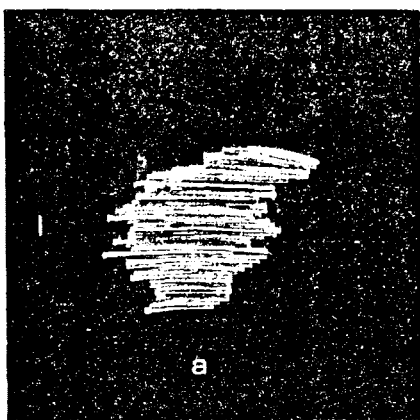
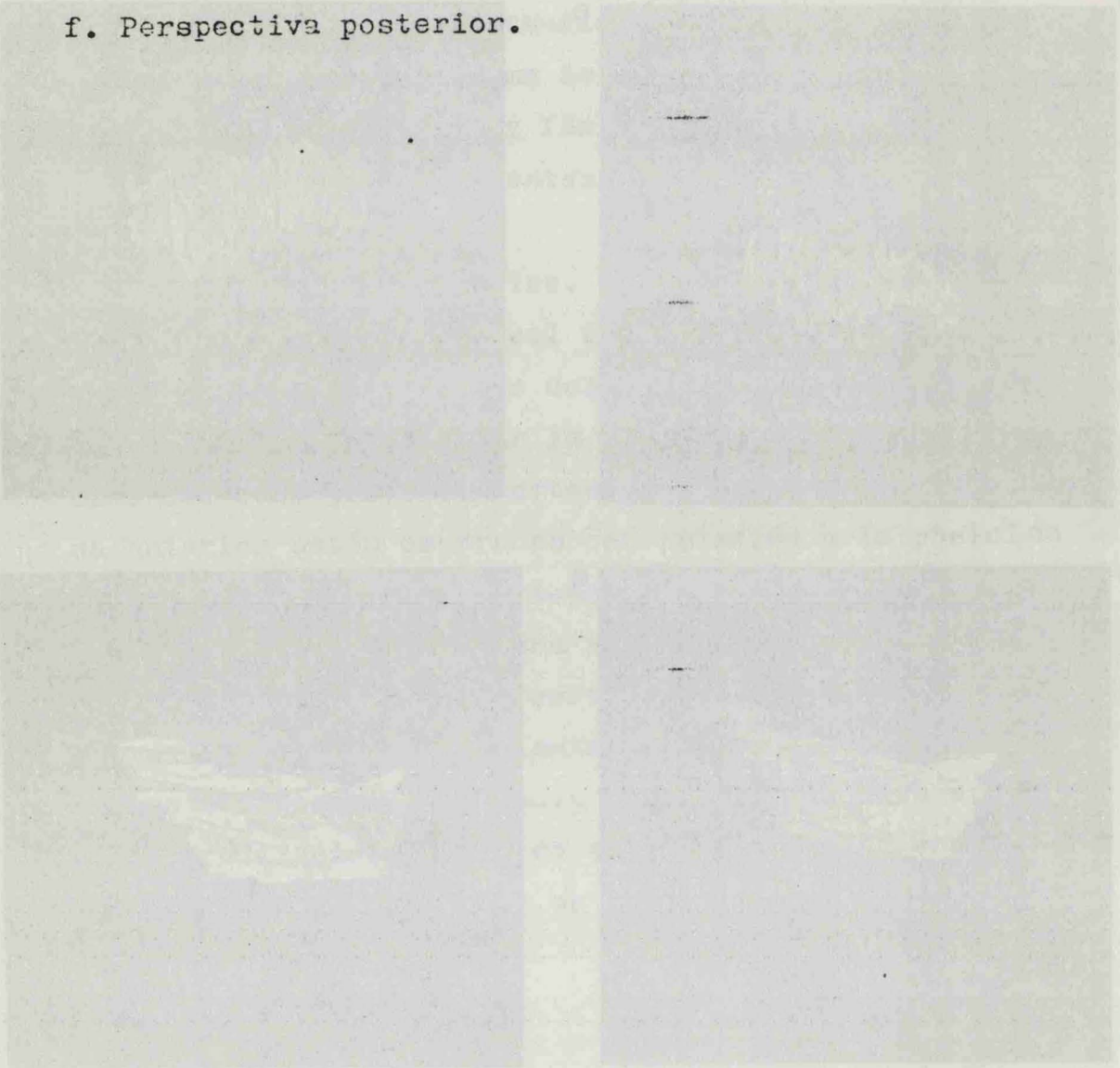


Fig. 7. Reconstrucción tridimensional del H.so. de rata de 20 días intrauterinos.

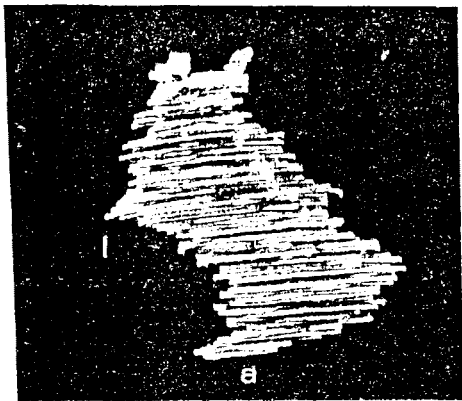
a = anterior; l = lateral; v = ventral.

- a. Perspectiva dorsal.
- b. Perspectiva ventral.
- c. Perspectiva medial.
- d. Perspectiva lateral.
- e. Perspectiva anterior.
- f. Perspectiva posterior.

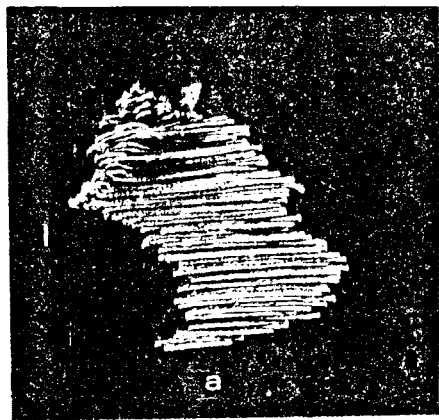


41

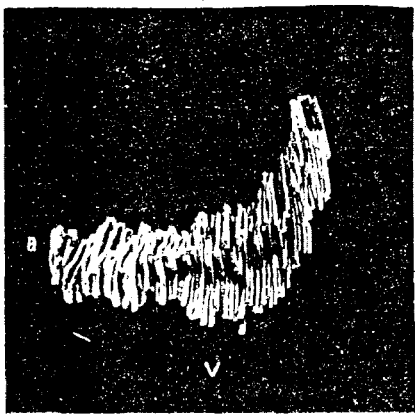
22 i.u.



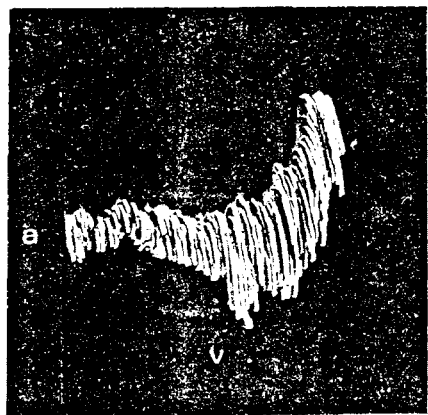
a



b



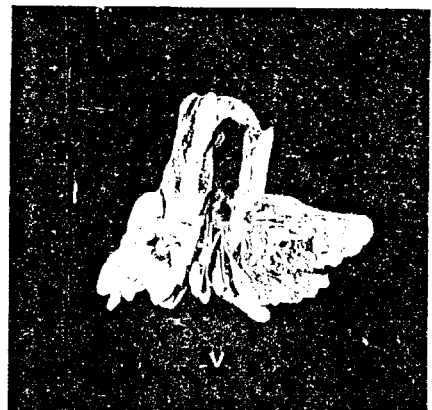
c



d



e



f

conseguida en la zona intermedia, donde duplica prácticamente el valor presentado por la zona anterior. La zona posterior sufre un desplazamiento medial con relación a los tres últimos cortes de la zona intermedia y presenta una extensión latero-medial pequeña.

Con relación al eje dorsi-ventral, la parte anterior se sitúa en lugares más profundos que las otras dos zonas. La parte intermedia sufre una discreta elevación aunque con ligeros descensos intercalados para elevarse de forma más acusada, en la zona posterior.

Con relación al eje horizontal, la parte anterior tiene una extensión pequeña, la parte intermedia es mucho mayor y la parte posterior es menor que la intermedia y algo mayor que la anterior.

5.2.1.2. Perspectiva ventral (Fig. 7b). Muestra como la zona posterior está dividida en dos partes de formas y posiciones distintas. Con respecto al eje ventri dorsal, la zona posterior ocupa lugares más ventrales que la zona media donde vuelve a sufrir un descenso gradual hasta comenzar la zona anterior que acusa una pequeña elevación.

5.2.1.3. Perspectiva medial (Fig. 7c). Resalta con gran nitidez el transcurso de la cintilla óptica a lo largo del núcleo y su inclusión en la zona posterior dividiéndola en dos partes asimétricas. Con relación al eje dorsi-ventral, la zona intermedia tiene valores promedio de diámetro hasta más del doble que las zonas

posterior y anterior, a la vez que es la más extensa - en sentido rostro-caudal. La zona anterior se encuentra situada en posición más inferior, mientras que la zona posterior es la más elevada.

5.2.1.4. Perspectiva lateral (Fig. 7d). Presenta la forma de "s" que tiene el N.so. en este estadio, correspondiendo la parte más larga y elevada a la zona intermedia. La zona posterior desciende ocupando los lugares más inferiores de las tres zonas.

5.2.1.5. Perspectiva anterior (Fig. 7e). Muestra la variación existente entre la zona anterior, intermedia y posterior en cuanto a los niveles de cada zona según - los ejes dorsi-ventral (profundidad mayor o menor) y - latero-medial (lateralización más o menos pronunciada). La parte posterior resulta ser la más elevada y tiene unas dimensiones según el eje latero-medial inferiores a las de las zonas anterior e intermedia.

5.2.1.6. Perspectiva posterior (Fig. 7f). Muestra con absoluta claridad como el área posterior está dividida en dos zonas diferentes (dorsal y ventral) en cuanto a forma, tamaño y posición. La zona intermedia presenta unas dimensiones según el eje dorsi-ventral superiores a las de las zonas posterior y anterior, quedando esta última oculta por la zona intermedia.

5.2.2. Embriones de 22 días.

5.2.2.1. Perspectiva dorsal (Fig. 8a). Muestra la trayectoria antero-posterior del núcleo supraóptico. Con relación al plano sagital, la zona anterior es la más

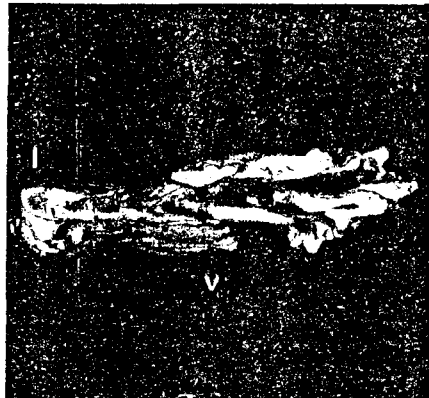
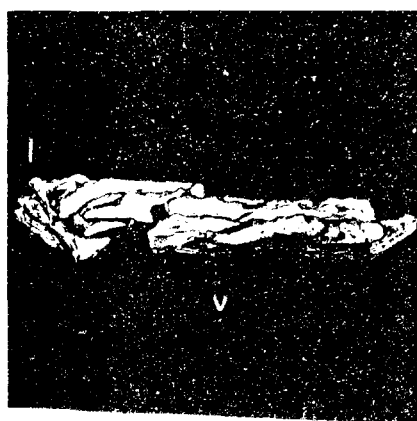
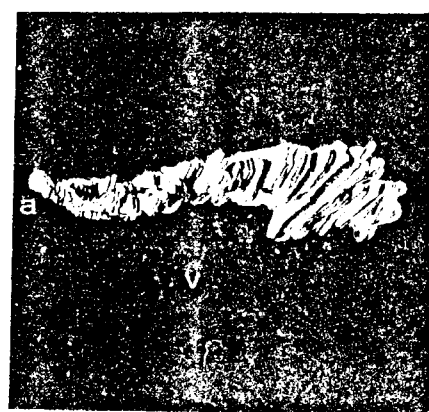
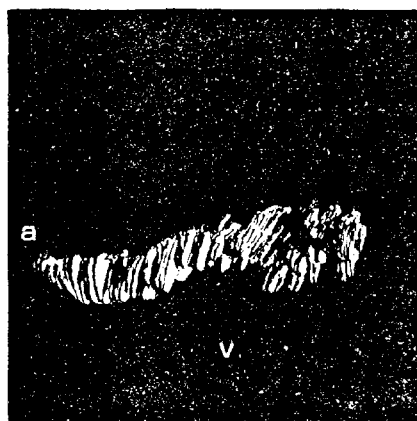
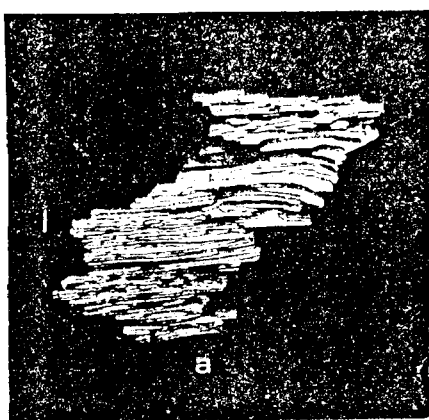
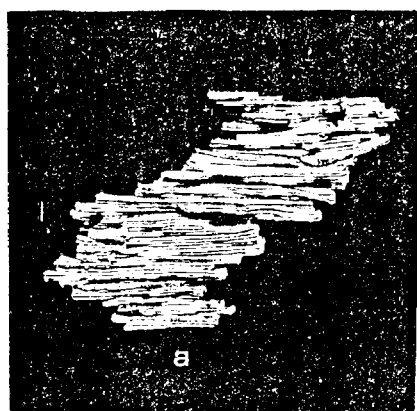
Fig. 6. Reconstrucción tridimensional del N.so. de rata
de 22 días intrauterinos.

a = anterior; l = lateral; v = ventral.

- a. Perspectiva dorsal.
- b. Perspectiva ventral.
- c. Perspectiva medial.
- d. Perspectiva lateral.
- e. Perspectiva anterior.
- f. Perspectiva posterior.

50

23 i.u.



lateral de todas. Inicialmente está muy alejada del tercer ventrículo, pero se va desplazando hacia él suavemente para conseguir un máximo de acercamiento al comenzar la zona intermedia. Esta última vuelve de nuevo a alejarse del ventrículo a la vez que aumenta sus dimensiones según el eje latero-medial. La zona posterior, se hace ligeramente más medial alcanzando posiciones equivalentes a las presentadas por las primeras secuencias de la zona anterior. Esta disposición alejada del tercer ventrículo, se mantiene más o menos constante hasta su término.

Con relación al eje dorsi-ventral, la zona anterior muestra muy ligeras variaciones. La zona media en su comienzo no sufre alteraciones pero según avanza en sentido caudal, presenta notables variaciones en las partes más mediales y laterales. La parte medial de la zona media sufre un hundimiento escalonado. Una pequeña extensión ocupada por la parte más lateral de la zona media se curva para internarse en regiones más profundas. La parte posterior presenta una elevación muy brusca hacia zonas más dorsales.

Con relación al eje antero-posterior, se observa como la zona intermedia ocupa una extensión muy superior a las de la zona anterior y posterior.

5.2.2.2. Perspectiva ventral (Fig. 8b). Presenta las notables diferencias existentes entre la zona posterior y la media y anterior, ocupando la zona posterior lugares más internos que las otras dos zonas, no siendo posible su visualización en la fotografía correspon

diente. Las zonas anterior y media sufren discretas elevaciones y descensos.

5.2.2.3. Perspectiva medial (Fig. 8c). Sigue la trayectoria de la cintilla óptica a través de todo el desarrollo del núcleo supraóptico. En sentido rostro-caudal se puede observar como la parte de la zona media - más cercana a la zona anterior, es la más elevada, - - mientras que la zona anterior y posterior están más internadas además de lateralizarse la zona posterior.

5.2.2.4. Perspectiva lateral (Fig. 8d). Muestra forma de "1" invertida, siendo la parte posterior la que sufre una gran lateralización. La zona anterior es la más estrecha en sentido dorsi-ventral y presenta una trayectoria bastante recta aunque con ligeros descensos y elevaciones. La zona intermedia es la más ancha y elevada. En la zona posterior se observa como el diámetro mayor de la sección del núcleo en los cortes seriados del mismo ha girado de tal forma que resulta perpendicular al que se comprueba en los cortes de la zona anterior.

5.2.2.5. Perspectiva anterior (Fig. 8e). Debido a la posición y forma global del núcleo supraóptico sólo se aprecia muy parcialmente este núcleo en tal proyección, ya que la zona posterior sufre un desplazamiento interno tan acusado que queda oculta por la zona anterior. Está patente como la zona media presenta variaciones entre sus extremos lateral y medial describiendo un pequeño arco.

5.2.2.6. Perspectiva posterior (Fig. 8f). Muestra de forma muy notoria la división de la zona posterior en dos partes, así como la importantísima elevación que adquiere esta zona. En sentido rostral el núcleo sufre una progresiva lateralización hacia zonas cercanas al tercer ventrículo.

5.2.3. Embriones de 23 días.

5.2.3.1. Perspectiva dorsal (Fig. 9a). Presenta las variaciones sufridas por las zonas anterior, intermedia y posterior en sentido rostro-caudal. El N.so. muestra continuos desplazamientos en sentido latero-medial acercándose y alejándose del tercer ventrículo a la vez que aumenta de grosor en la zona intermedia para disminuir en la zona posterior. Con relación al eje antero-posterior, las partes anterior y posterior tienen una extensión mucho más pequeña que la zona intermedia. La parte más lateral de ésta última sufre una elevación muy acusada hacia áreas más dorsales, pasando a formar con la base del tercer ventrículo un ángulo más agudo en la zona anterior.

5.2.3.2. Perspectiva ventral (Fig. 9b). Muestra también los desplazamientos latero-mediales que va sufriendo el núcleo supra-óptico a través del desarrollo rostro-caudal del mismo. Se observa como la zona intermedia no presenta grandes cambios en las dimensiones del núcleo en los cortes en sentido latero-medial. La zona anterior es menor que las zonas media y posterior.

54

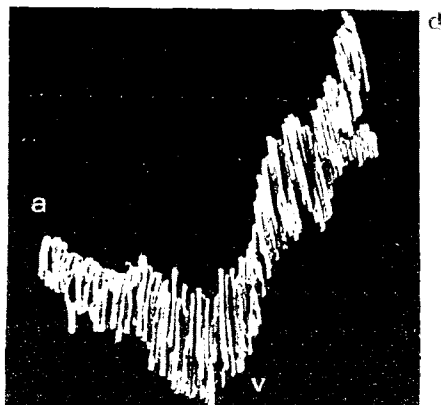
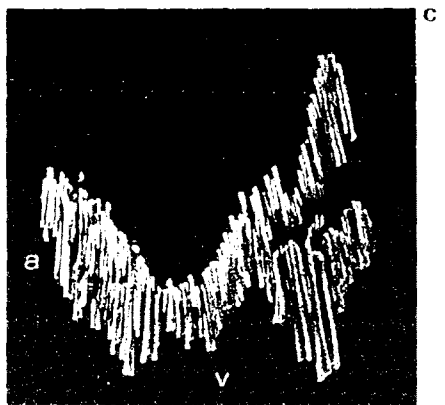
Fig. 9. Reconstrucción tridimensional del N.so. de rata de 23 días intrauterinos.

a = anterior; l = lateral; v = ventral.

- a. Perspectiva dorsal.
- b. Perspectiva ventral.
- c. Perspectiva medial.
- d. Perspectiva lateral.
- e. Perspectiva anterior.
- f. Perspectiva posterior.

55

15 p.p.



5.2.3.3. Perspectiva medial (Fig. 9c). Da una visión de la ruta seguida por la cintilla óptica, que se in- micuye en la zona posterior para dividirla en dos partes asimétricas durante un corto trayecto. La zona pos- terior sufre una lateralización progresiva.

5.2.3.4. Perspectiva lateral (Fig. 9d). Presenta el gi- ro que van sufriendo los diámetros mayores de las secciones del núcleo en los cortes a lo largo del desarrollo antero-posterior del núcleo. La zona posterior sufre una pequeña lateralización a la vez que se inclina discretamente hacia zonas más internas.

5.2.3.5. Perspectiva anterior (Fig. 9e). Se observa la no existencia de una variación brusca entre las zonas anterior, media y posterior, aunque sí son evidentes-- los pequeños arcos formados en varios trayectos del nú- cleo, debido a las distintas localizaciones ocupadas -- por los extremos mediales y laterales sobre todo de la zona intermedia.

5.2.3.6. Perspectiva posterior (Fig. 9f). Muestra a la zona posterior dividida en dos partes, ventral y dorsal asimétricas en cuanto a forma y tamaño. En sentido ros- tral, el núcleo va desplazándose con respecto al eje -- latero-medial a la vez que sufre descensos y elevaciones en sentido dorsi-ventral.

5.2.4. Ejemplares post-partum de 15 días.

5.2.4.1. Perspectiva dorsal (Fig. 10a). Presenta el desarrollo antero-posterior del N. so. Relacionando las zonas anterior, media y posterior con el conjunto del-

Fig. 10. Reconstrucción tridimensional del N.so. de rat nacida de 15 días.

a = anterior; l = lateral; v = ventral.

- a. Perspectiva dorsal.
- b. Perspectiva ventral.
- c. Perspectiva medial.
- d. Perspectiva lateral.
- e. Perspectiva anterior.
- f. Perspectiva posterior.

85

núcleo y con el plano sagital, se observa como el comienzo de la zona anterior está centrado en la figura con relación a una gran extensión de la zona intermedia. Según avanza en sentido caudal, se acerca progresivamente al tercer ventrículo para desplazarse hacia afuera al comenzar la zona intermedia. Esta zona sufre alteraciones en relación al plano de referencia tomado, mediante sucesivos pero suaves acercamientos y alejamientos del mismo, hasta que, hacia la mitad de su trayecto, inicia una lateralización paulatina hasta el comienzo de la zona posterior. La extensión de las áreas sucesivas de sección del núcleo en sentido lateromedial es muy homogénea a lo largo de toda la zona intermedia. La zona posterior se encuentra más alejada del tercer ventrículo que las zonas anterior e intermedia. Con respecto al eje antero-posterior, se observa como la zona anterior es de pequeño diámetro, mientras que las zonas posterior y especialmente la intermedia, ocupan grandes extensiones.

5.2.4.2. Perspectiva ventral (Fig. 19b). Muestra a la zona posterior dividida en dos partes situadas en niveles diferentes, ocupando el área más lateral de la parte ventral lugares tan elevados como la zona intermedia. La zona intermedia desde que se inicia, en sentido rostro-caudal, va ascendiendo notablemente hasta alcanzar un máximo que mantiene durante una pequeña trayectoria para comenzar el descenso que continúa la zona anterior.

5.2.4.3. Perspectiva medial (Fig.10c). queda patente la zona posterior dividida en dos partes asimétricas entre las cuales transcurre la cintilla óptica. tiene forma de "C" con la rama superior más alargada que la anterior y dividida en las dos subramas desiguales.

5.2.4.4. Perspectiva lateral (Fig.10d). Muestra un perfil semejante a una "C" invertida o de media luna con la parte posterior más alargada que la anterior. Se observa el gran desplazamiento sufrido por la zona intermedia así como la división de la zona posterior en dos ramas diferentes.

5.2.4.5. Perspectiva anterior (Fig.10e). Da una visión total de la parte anterior y una parcial de la parte dorsal del N. so. Existen unas fuertes variaciones entre las zonas anterior, intermedia y posterior. La zona intermedia desciende bruscamente hacia zonas más ventrales para elevarse de forma continua hasta la parte posterior del núcleo.

5.2.4.6. Perspectiva posterior (Fig.10f). Presenta claramente a la zona posterior dividida en dos ramas muy distintas entre si. Atraves del desarrollo del núcleo, la disposición de las secciones del mismo en los sucesivos cortes, va variando de tal modo que las más posteriores se posicionan con el diámetro mayor perpendicular al de las secciones de la zona intermedia.

El modelo confeccionado para los diferentes periodos evolutivos, permite concluir una serie de postulados:

- a) El N.so. muestra un contorno muy accidentado.

- b) La posición del N.so. en el hipotálamo, es al comienzo adyacente al quiasma óptico. En su trayecto, la cintilla óptica, se va introduciendo en él de tal modo que en su zona posterior, lo subdivide apareciendo en los cortes frontales, dos partes morfológica y topográficamente diferentes, situadas dorsal y ventralmente a la cintilla óptica.
- c) En el análisis rostro-caudal del N.so. ,se comprueba que el ángulo que forma el diámetro mayor de las secciones del núcleo con el tercer ventrículo, varía constantemente desde los primeros cortes en que aparece formando un ángulo casi recto, hasta un ángulo cero paralelo al plano sagital en los cortes finales.
- d) En sentido rostro-caudal, el N.so., sufre un desplazamiento con respecto al tercer ventrículo, lateralizándose e inclinándose hacia zonas más dorsales de una manera ostensible.
- e) La extensión del N.so. en sentido latero-medial se incrementa con el desarrollo embriológico de la rata.
- f) La extensión del N.so. en sentido rostro-caudal, aumenta notablemente a lo largo del desarrollo evolutivo de la rata.
- g) La extensión del N.so. en sentido dorsi-ventral, aumenta a través del desarrollo evolutivo de la rata.

5.3. MEDICIONES EN RELACION CON PLANOS DE REFERENCIA.

Con relación a los tres ejes cartesianos dorso-ventral (x), medial-lateral (y) y antero-posterior (z), se ha perseguido determinar el trayecto del N.so. al mismo tiempo que aportar datos numéricos, referidos a los planos elegidos para efectuar las reconstrucciones tridimensionales de los núcleos.

Se han tomado como planos de referencia: el sagital o plano de simetría del tercer ventrículo; el frontal, tomando como plano de origen el corte donde la comisura anterior está más desarrollada; y el horizontal, tomando como plano cero al que pasa por el quiasma en su parte media.

Las mediciones se han hecho a partir de las microfotografías de los cortes seriados del diencefalo procesados debidamente y observados a 100 aumentos. Cada microfotografía se ha situado en relación a los ejes x, y, z de acuerdo con la posición sucesiva del quiasma y de la cintilla óptica.

5.3.1. Perspectiva horizontal (dorso-ventral). Proporciona una visión de la trayectoria antero-posterior -- del N.so. en los cuatro periodos evolutivos del desarrollo de la rata blanca (Figs. 11-14).

En el cuadro 2. quedan reflejadas las distancias correspondientes a los planos de referencia, Frontal y sagital, distancias que definen los desplazamientos y modificaciones que experimenta el N.so. de delante atrás. la lateralización de dicho núcleo es bastan-

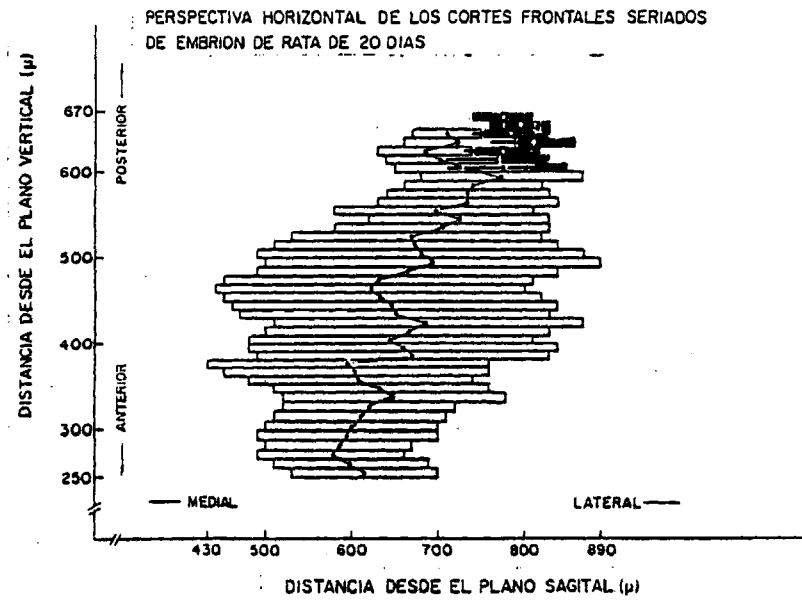


Fig. 11

PERSPECTIVA HORIZONTAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS
DE EMBRION DE RATA DE 23 DIAS

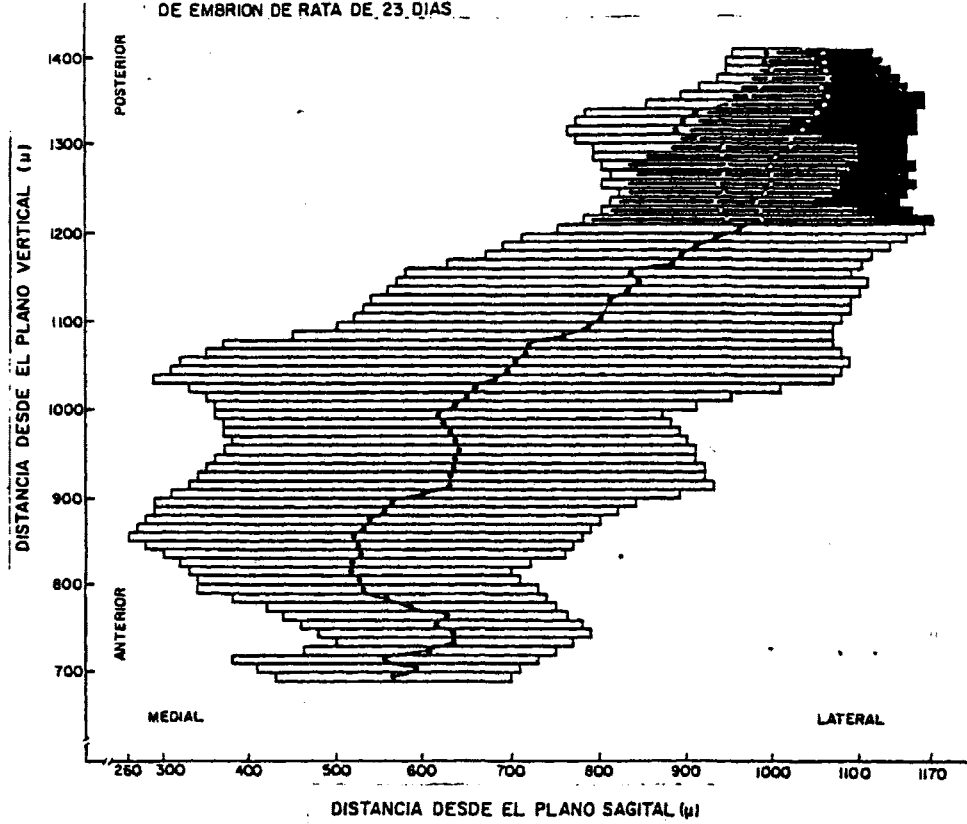


Fig. 12

49

PERSPECTIVA HORIZONTAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS DE
EMBRION DE RATA DE 22 DIAS

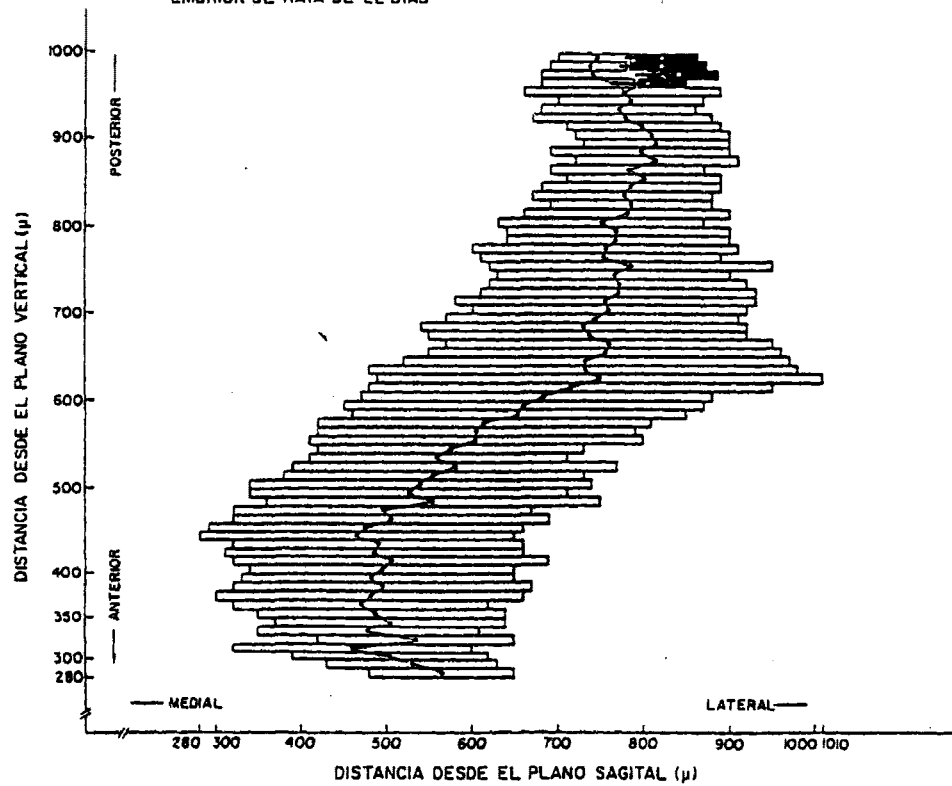


Fig. 13

PERSPECTIVA HORIZONTAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS DE RATA DE 15 DIAS

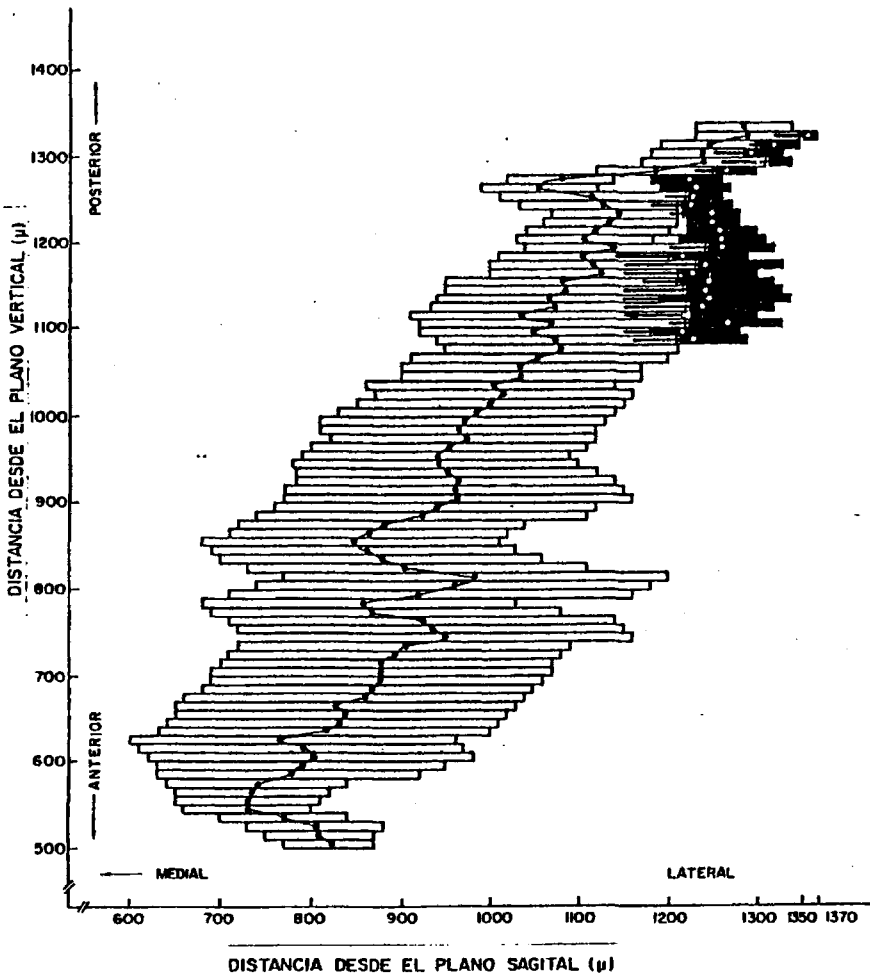


Fig. 14

te similar en todos los ejemplares. Lo más interesante de estas figuras es el hecho de su desplazamiento inicial hacia el tercer ventrículo, durante un cierto trayecto, alcanzando el territorio más medial en el tercio posterior de la zona anterior, para alejarse paulatinamente del tercer ventrículo, siendo evidente que las últimas porciones del núcleo, ocupan el lugar más lateral con respecto al plano Frontal.

EDAD	DISTANCIAS AL PLANO FRONTAL DE REFERENCIA		DISTANCIAS AL PLANO SAGITAL		
	COORTE 1º	ULTIMO	COORTE 1º	PROX.	ULTIMO
20i.u.	240 u	660 u	530 u	430 u	1040 u
22i.u.	280 u	1000 u	480 u	260 u	700 u
23i.u.	690 u	1410 u	430 u	260 u	950 u
15p.p.	500 u	1330 u	770 u	600 u	1230 u

1.u.=intrauterino; p.p.=post-partum; PROX.=proximal.

CUADRO 2.

El núcleo supraóptico de los embriones de 20 días, destaca por ser el que presenta una menor distancia al plano Frontal, sufrir una mayor lateralización respecto al plano sagital y ocupar una extensión mucho menor en dirección rostro-caudal que en los demás estados evolutivos, prácticamente la mitad de la extensión ocupada en los ejemplares de 15 días post-partum. Un hecho que merece especial atención es que -

la parte posterior del núcleo se bifurca precozmente - en dos ramas asimétricas en cuanto a forma y tamaño, - no guardando una proporción entre la extensión antero-posterior del núcleo y el número de cortes que presentan las dos zonas separadas.

Como expresión gráfica más simbólica del desarrollo antero-posterior del N.so., se ha construido una línea, más o menos zigzagueante, que une los puntos medios de cada corte.

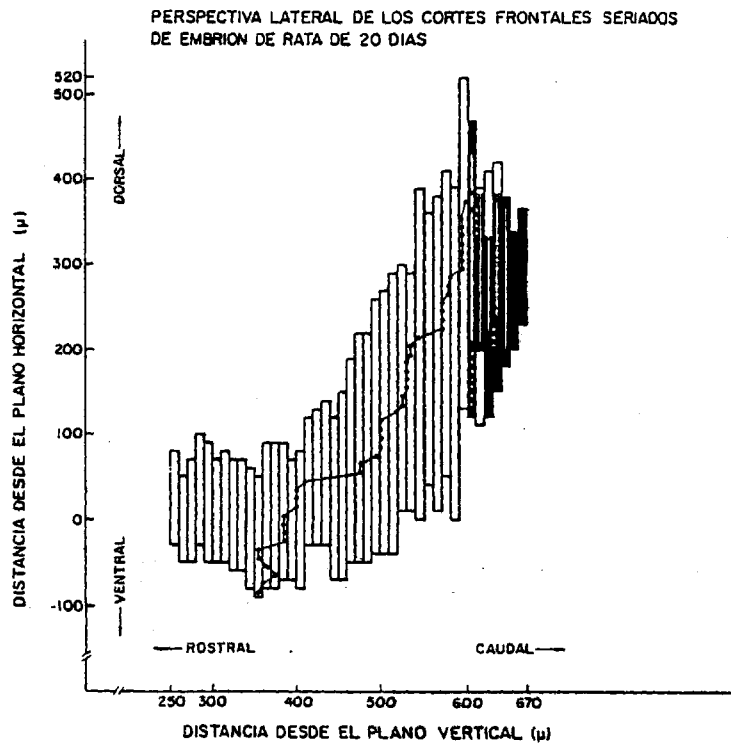
5.3.2. Perspectiva lateral (latero-medial). Reproduce con máxima fidelidad los desplazamientos dorsi-ventrales del N.so. en el trayecto antero-posterior de los cortes, a lo largo de los cuatro periodos evolutivos estudiados (Figs. 15-18).

EDAD	DISTANCIAS AL PLANO HORIZONTAL H_0			DISTANCIAS AL PLANO FRONTAL F_0	
	CORTE 1 ^a	PROX.	ULTIMO	CORTE 1 ^a	ULTIMO
20i.u.	-30 μ	-90 μ	230 μ	240 μ	660 μ
22i.u.	100 μ	-150 μ	370 μ	280 μ	1000 μ
23i.u.	-60 μ	-180 μ	100 μ	690 μ	1410 μ
15p.p.	-40 μ	-300 μ	100 μ	500 μ	1330 μ

i.u.=intrauterino; p.p.=post-partum; PROX.=proximal.

CUADRO 3.

En este cuadro aparecen los resultados de las distancias del N.so., a los planos de referencia H_0 y F_0 elegidos.



69

Fig. 15

PERSPECTIVA LATERAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS
DE EMBRION DE RATA DE 22 DIAS

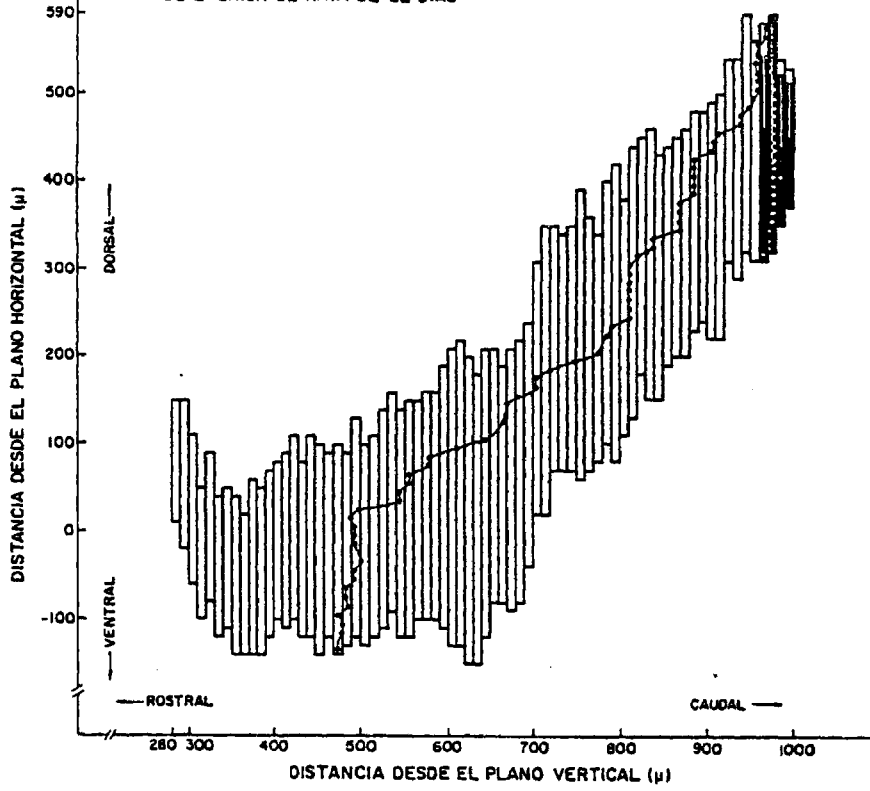
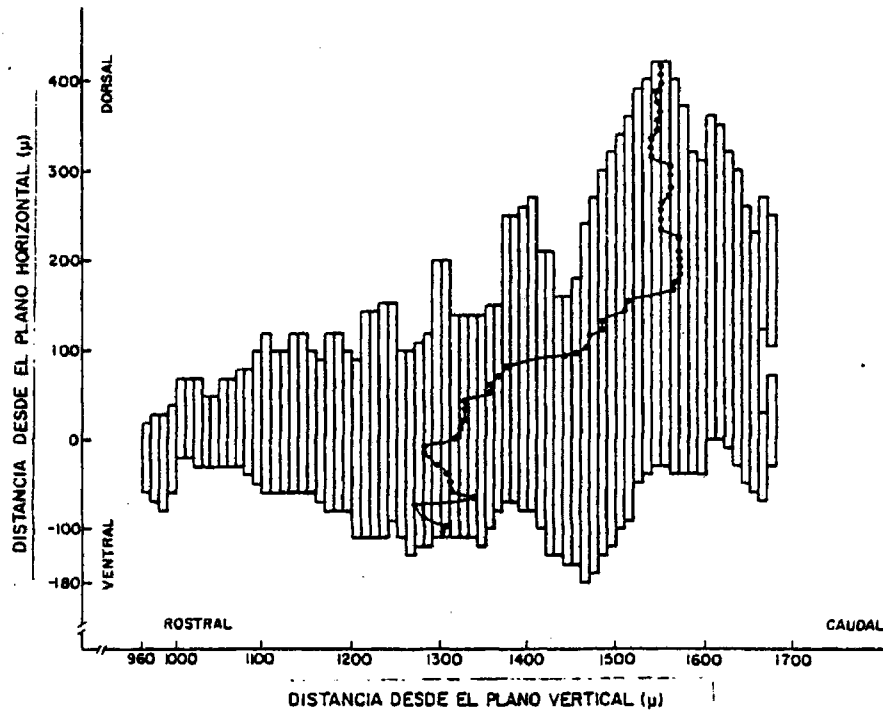


Fig. 16

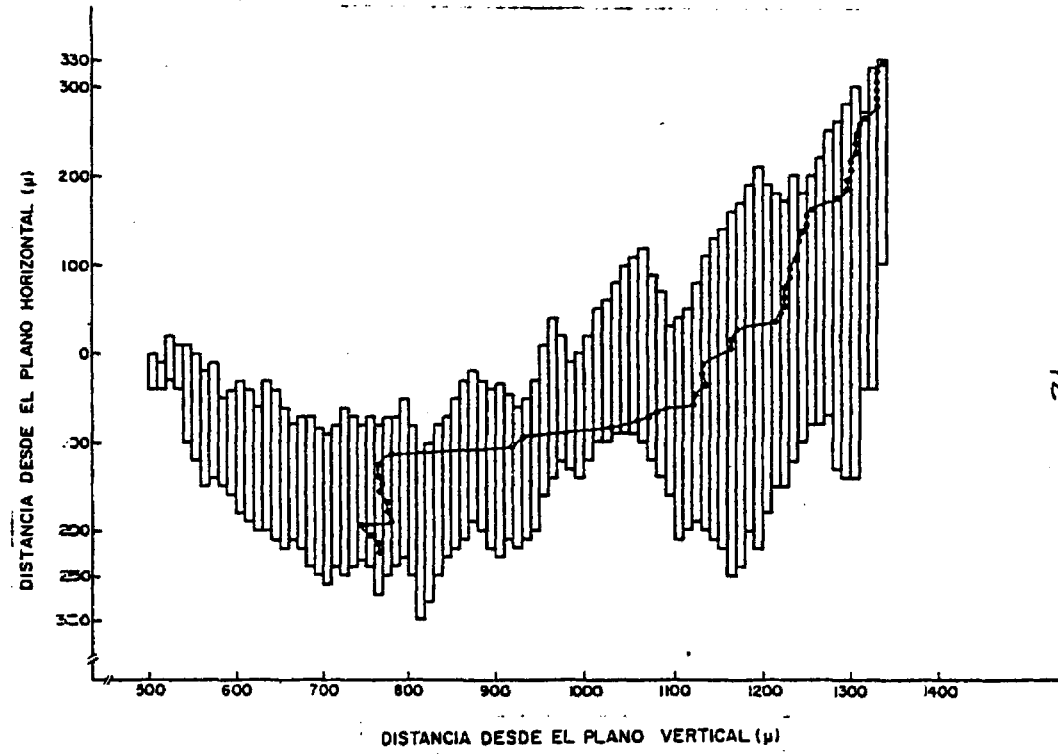
PERSPECTIVA LATERAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS DE EMBRION DE RATA DE 23 DIAS



11

Fig. 17

PERSPECTIVA LATERAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS DE RATA DE 15 DIAS



72

Fig. 18

Igual que sucede con la perspectiva horizontal, el curso de los desplazamientos dorsi-ventrales, sigue características comparables en los cuatro periodos del desarrollo estudiados. Aquí, se muestra el recorrido del núcleo en sentido dorsi-ventral, ya que -- los cambios con relación al tercer ventrículo son imposibles de determinar en esta perspectiva. En general, el N.so., está situado al comienzo por debajo de la base del tercer ventrículo, considerando a estas distancias como valores negativos. Continúa descendiendo a territorios más internos para ulteriormente, iniciar una rápida elevación hacia zonas más dorsales. la parte anterior del núcleo, descansa sobre zonas más mediales entre la parte intermedia no identificable situada más internamente y la parte posterior (alojada en territorios más elevados).

Comparando el N.so. en los estados evolutivos estudiados, se observa que en los embriones de 20- y 23 días, este núcleo experimenta descripciones menos acusadas que en los otros estadios. En los embriones de 22 días, aunque el N.so. inicialmente está situado por encima del tercer ventrículo, sufre un descenso considerable, para elevarse bruscamente hacia su zona más posterior. Los ejemplares post-partum de 15 días-- presentan inicialmente un descenso más profundo que el embrión de 22 días, para luego elevarse más suavemente en la zona posterior.

La trayectoria de los puntos medios de los -

cortes según el eje dorsi-ventral, es una línea sinu--soide.

5.3.3. Perspectiva frontal (antero-posterior). Proporciona una visualización de las desviaciones según el - eje medial-lateral en los distintos períodos evolutivos estudiados (Figs. 19-22).

EDAD	DISTANCIAS AL PLANO HORIZONTAL (H ₀)			DISTANCIAS AL PLANO SAGITAL		
	CORTE 1º PROX. ULTIMO			CORTE 1º PROX. ULTIMO		
20i.u.	-30µ	-90µ	230µ	530µ	430µ	1040µ
22i.u.	100µ	-150µ	370µ	480µ	280µ	700µ
23i.u.	-60µ	-180µ	100µ	430µ	260µ	950µ
15p.p.	-40µ	-300µ	100µ	770µ	600µ	1230µ

i.u.=intrauterino; p.p.=post-partum; PROX.=proximal.

CUADRO 4.

En este cuadro, se muestran los valores de las distancias del N.so. a sus planos de referencia horizontal y sagital, descritos anteriormente. Continuando con la misma pauta de perspectivas anteriores, se observa que las desviaciones según este eje siguen una pauta similar en las distintas edades estudiadas. Esta perspectiva es la que presenta menores variaciones.

5.4. CITOFOTOMETRIA

5.4.1. Células aisladas. Como ya hemos mencionado anteriormente, una característica destacable de los núcleos neuronales del N.so., es la presencia de microáreas --

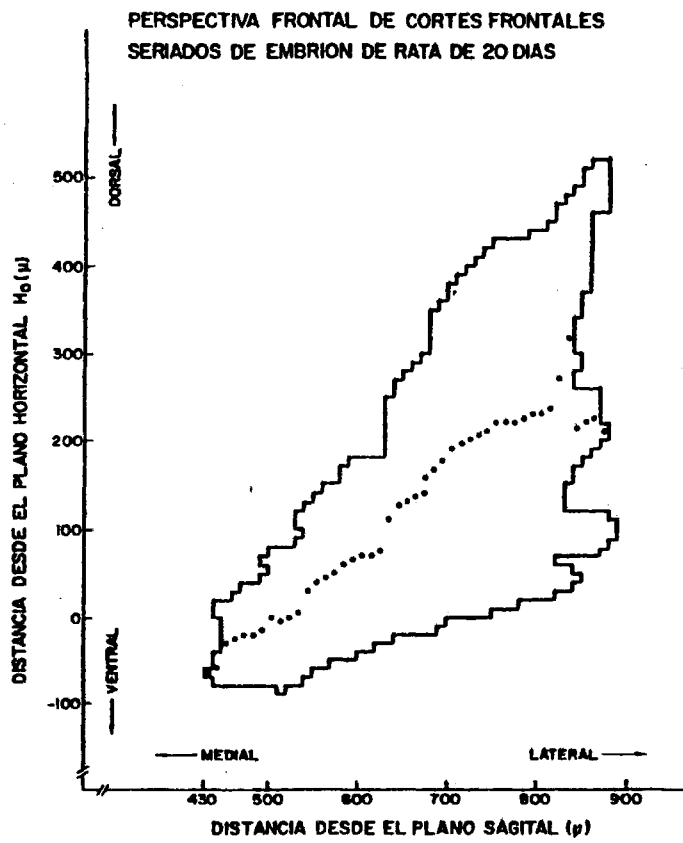


Fig. 19

PERSPECTIVA FRONTAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS DE EMBRION DE RATA DE 22 DIAS

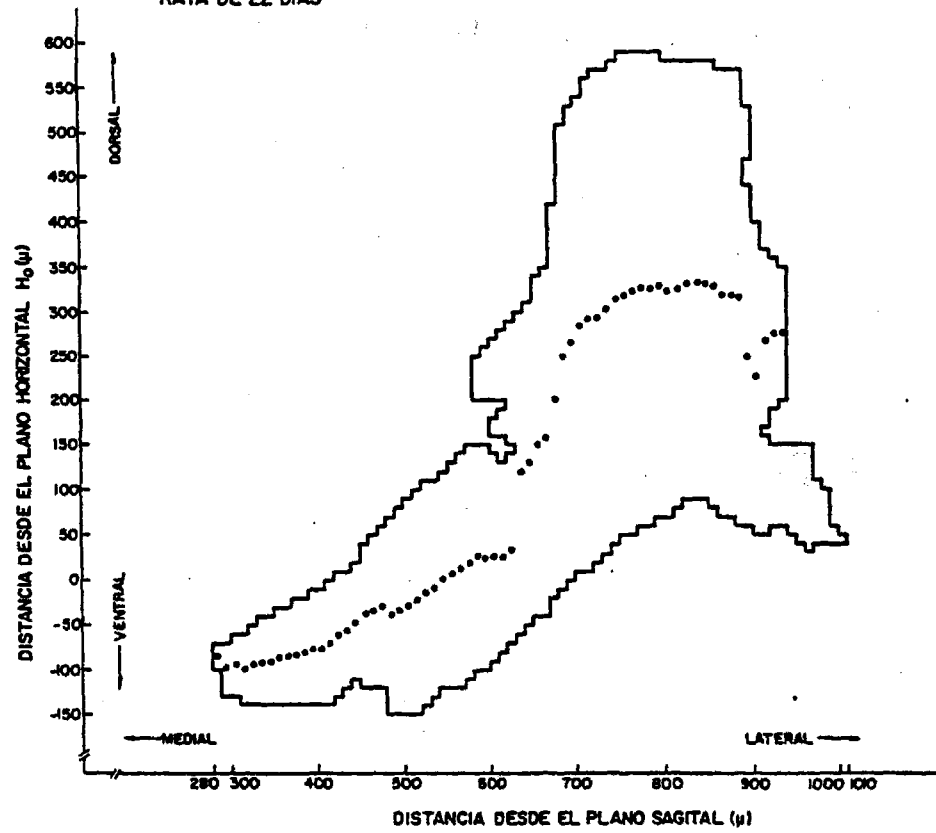


Fig. 20

PERSPECTIVA FRONTAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS DE
EMBRION DE RATA DE 23 DIAS

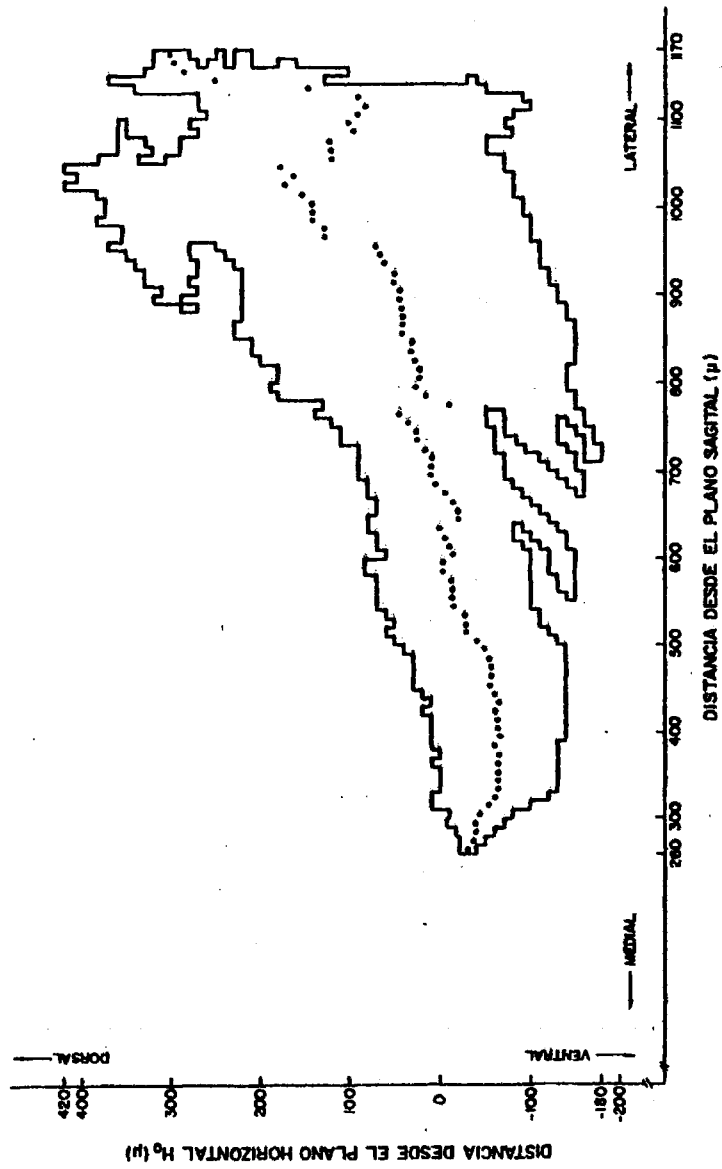
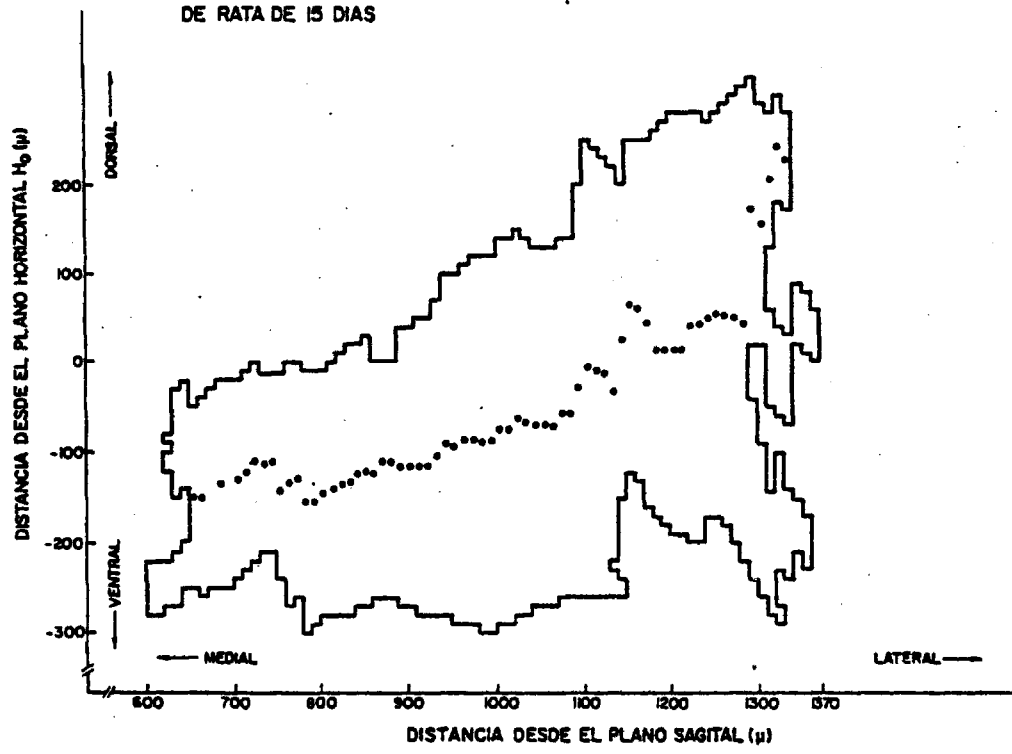


Fig. 21

PERSPECTIVA FRONTAL DE LOS CORTES FRONTALES SERIADOS
DE RATA DE 15 DIAS



67

Fig. 22

con extinciones lumínicas elevadas, correspondiendo a los cromocentros, los cuales se distribuyen sin orden alguno y ocupan áreas de extensión variable. A veces, las áreas son tan pequeñas como $0.25 \mu^2$, son numerosas y están dispersas. Otras veces ocupan áreas más extensas pero en menor número.

El nucleolo alcanza extinciones lumínicas muy elevadas. No hay duda en determinar con absoluta nitidez su posición y dimensiones. Para considerar la presencia de un nucleolo valorado citofotométricamente se han prefijado dos parámetros: extinción mínima de 100 y área mínima de $2 \mu^2$. Estos parámetros no han sido elegidos aleatoriamente, sino que se han comprobado con los estudios de microscopía clásica convencional.

Las densidades ópticas mejor representadas en el núcleo, son las comprendidas entre 40 y 80.

La característica citofotométrica más destacable en estas células nerviosas, es la extensa gama de extinciones, pues en algunos casos abarcan todos los valores posibles. También es característica la disposición estocástica de los mismos (Fig. 23).

Para el estudio citofotométrico neuronal realizado, se han medido las áreas nucleares y nucleolares, diámetros nucleares y nucleolares, relación núcleo/nucleolo e intensidades medias de los núcleos, sobre un número superior a 100 neuronas elegidas al azar, con el fin de determinar sus valores medios en los distin-

CARL ZEISS RATA 22E 58-4 P.D.
CELLNAME 45 WAVE

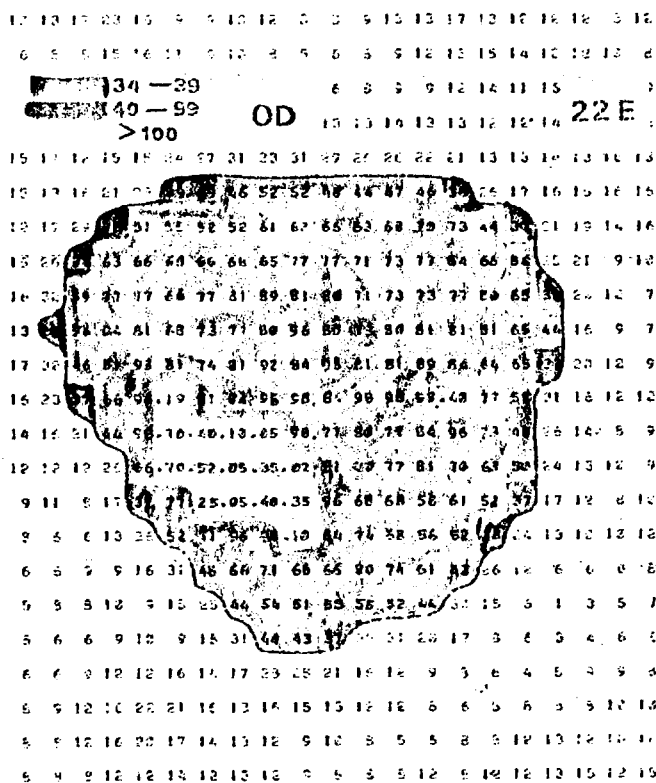


Fig. 23. Representación cuantitativa de la distribución del contenido nuclear de una neurona de rata de 22 i.u. Se puede apreciar la extensa gama de densidades ópticas presentes en el núcleo y citoplasma, así como la disposición desordenada de las mismas.

tos estadios evolutivos.

Para determinar si la población neuronal era uniforme a lo largo de toda la proyección del N.so, se eligieron neuronas de las partes anterior, media y posterior de dicho núcleo en cada uno de los ejemplares - analizados (Figs. 24-26).

5.4.1.1. Areas nucleares. Al estudiar las neuronas de la parte anterior del núcleo, se comprobó la existencia de una cierta dispersión en cuanto a los valores - del área nuclear. Para saber si se trataba de una o varias poblaciones celulares, se aplicaron métodos estadísticos discriminativos de distribución (curva de --- Gauss, medias y desviación estandar). Con los resultados obtenidos, se comprobó la existencia de una única población celular en la parte anterior del N.so. tanto en ejemplares pre como postnatales de la rata.

El mismo tratamiento estadístico fué aplicado a las partes intermedia y posterior de todos los -- ejemplares estudiados, observando igualmente la presencia de una única población celular dentro de cada zona.

Los resultados obtenidos, se ordenaron de menor a mayor, con relación al tamaño del área nuclear - de cada célula. En los cuadros 5 y 6, se encuentran los valores correspondientes a las medias aritméticas, desviación estandar de la muestra y de la población, suma de valores, suma de sus cuadrados y el valor de la media aritmética mas menos dos veces la desviación estan

CANAL ZE195 E.RATA23 ANT.50
CELLNAME 23 WAVE

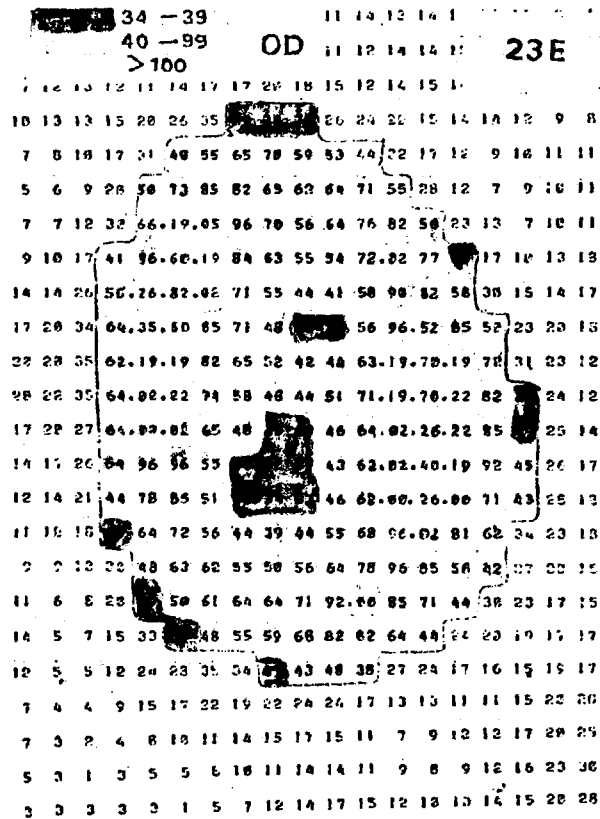


Fig. 24. Representación cuantitativa de la distribución del contenido nuclear de una neurona correspondiente a la zona anterior del N.so. de rata de 23 i.u.. Presenta un área nuclear de 46 u² y dos nucleolos con áreas de 3,75 u² y 4,25 u² respectivamente.

CARD 2317 RATA 235 1007 30

CARD 2317 72 00 00

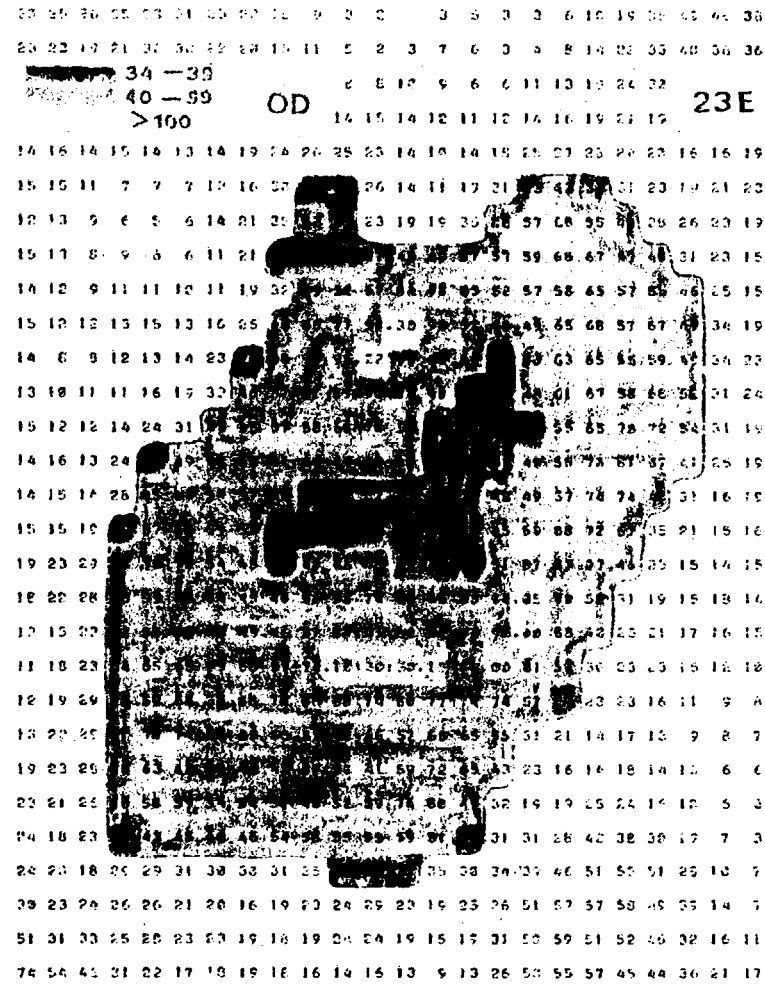


Fig. 26. Representación cuantitativa de la distribución del contenido nuclear de una neurona correspondiente a la zona posterior del N.so. de rata de 23 i.u.. El área nuclear es de 70,5 u² y el nucleolar de 2,5 u².

dar de la población, para determinar si todos los valores entran dentro de la misma población normal.

En el embrión de 20 días, la parte intermedia, posee un área nuclear media ($54,51 \mu^2$) superior a las partes anterior ($49,44 \mu^2$) y posterior ($48,42 \mu^2$). La desviación estandar es bastante uniforme en las tres zonas, indicando que la dispersión de los datos es similar en todas ellas.

El embrión de 22 días, posee áreas nucleares medias superiores a las encontradas en el de 20 días. Aquí se invierten los tamaños nucleares, siendo mayores las partes anterior ($56,36 \mu^2$) y posterior ($56,15 \mu^2$) que la intermedia ($52,44 \mu^2$). La dispersión de los valores, es menor en esta última zona respecto a las otras dos, mostrando por tanto una mayor uniformidad en cuanto a la superficie nuclear.

En el embrión de 23 días, aumenta el tamaño medio de las áreas nucleares con respecto a los ejemplares más jóvenes. La zona posterior ($62,46 \mu^2$) alcanza valores mayores que la intermedia ($61,02 \mu^2$) y esta a su vez, mayor es que la anterior ($53,03 \mu^2$). La dispersión de las áreas, es menor en la parte anterior.

En los ejemplares post-partum de 15 días, el área media nuclear es notablemente mayor a la que posee en los diferentes estadios embrionarios. Similarmente a lo sucedido en el embrión de 23 días, la zona posterior ($87,00 \mu^2$) presenta un área mayor que la zona intermedia ($80,79 \mu^2$) y esta, mayor que la anterior (75,

AREAS NUCLEARES RATAS 20 i.u.			AREAS NUCLEARES RATAS 22 i.u.		
ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR	ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR
37,50	42,75	35,00	42,00	41,00	43,00
37,50	43,50	35,50	44,20	43,00	45,25
38,00	44,00	36,25	45,00	44,00	46,00
40,00	46,00	37,53	45,25	45,00	46,25
40,75	47,00	39,75	46,00	46,00	46,75
42,00	47,25	40,50	46,00	46,00	47,00
43,00	47,75	40,50	47,00	47,00	49,00
44,25	49,00	42,50	50,00	47,00	51,25
45,25	49,00	43,00	50,30	47,00	51,52
45,50	49,25	44,75	51,00	48,00	52,00
45,50	50,25	45,50	51,00	50,00	53,00
46,25	51,75	46,00	51,50	50,00	53,25
47,75	53,00	46,44	51,50	50,00	55,00
47,75	53,25	47,00	52,80	52,23	56,00
49,25	53,50	48,30	53,00	52,25	56,00
50,75	54,25	49,37	56,50	53,00	56,00
51,00	55,25	50,75	57,50	53,00	56,50
51,00	55,50	51,00	58,50	53,41	57,00
51,25	56,75	51,25	60,00	55,50	57,00
51,50	57,50	51,25	60,40	56,50	57,00
53,25	58,00	52,25	63,00	57,00	57,00
54,00	58,00	52,35	63,60	57,00	58,00
54,75	59,75	53,00	64,50	57,50	60,00
54,75	62,50	54,25	67,00	58,00	65,00
55,50	63,75	55,42	67,00	58,50	66,00
56,75	64,50	57,00	68,00	59,00	67,00
61,00	64,75	57,65	68,50	59,75	68,00
61,75	65,00	58,00	69,00	60,00	69,00
62,00	66,25	59,50	70,50	62,75	71,00
63,75	66,50	60,00	70,50	64,00	73,00
49,44	54,51	48,42	56,36	52,44	56,15
7,456	7,25	7,84	9,06	6,19	8,68
7,33	7,13	7,71	8,91	6,08	8,54
1483,25	1.635,50	1.452,81	1.691,05	1573,38	1.684,72
74.946,93	90.691,12	72.138,57	97.704,03	83.629,35	96.798,58
64,34	69,03	64,10	74,48	64,82	73,51
34,54	39,99	32,80	38,24	40,06	38,79
			\bar{x}		
			$\sqrt{n-1}$		
			\sqrt{n}		
			$\sum x$		
			$\sum x^2$		
			$\bar{x} \pm 2\sqrt{v}$		

CUADRO 5. Areas (μ^2) de los núcleos neuronales de los ejemplares intrauterinos de 20 y 22 días de las zonas anterior, intermedia y posterior del núcleo supraóptico, ordenadas de menor a mayor. También se expresan la media aritmética (\bar{x}), desviación estándar de la muestra ($\sqrt{n-1}$) y de la población (\sqrt{n}), suma de valores ($\sum x$), suma de sus cuadrados ($\sum x^2$) e intervalo de confianza ($\bar{x} \pm 2\sqrt{v}$).

AREAS NUCLEARES RATAS 23 i.u.				AREAS NUCLEARES RATAS 15 p.p.		
ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR		ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR
38,00	34,75	38,70		47,25	66,00	57,00
40,00	40,00	39,00		47,25	66,00	69,00
40,00	40,50	41,00		52,25	68,00	69,25
40,50	41,00	41,50		55,50	69,50	70,00
40,70	47,00	46,50		59,25	69,75	70,00
44,00	51,50	47,50		60,80	71,50	72,00
46,00	52,00	50,50		64,75	73,75	74,00
46,00	53,75	53,00		66,00	74,50	74,50
47,00	55,25	53,50		67,00	76,00	75,50
47,00	55,75	55,25		69,00	76,00	80,75
47,25	57,50	57,00		70,50	76,25	81,00
48,25	57,50	58,25		73,75	76,75	81,25
49,50	58,75	58,75		75,00	76,75	81,70
51,00	58,75	60,00		75,00	77,50	82,00
52,00	59,50	62,75		76,80	79,50	82,70
52,27	59,50	63,00		79,75	79,50	84,00
53,00	62,00	65,25		80,25	81,00	84,25
53,25	62,25	65,75		80,50	81,75	91,75
53,66	62,75	66,00		80,50	83,25	93,00
55,00	64,25	67,77		80,50	84,25	94,00
57,00	65,00	70,00		81,00	87,00	95,00
59,69	67,00	70,50		81,00	87,25	96,00
60,00	70,25	75,25		82,00	87,50	98,00
62,50	72,50	76,25		88,50	89,00	99,75
63,00	74,50	77,00		91,25	90,75	103,00
64,00	75,25	77,00		92,25	92,00	105,00
64,25	78,00	80,00		96,50	93,50	108,00
65,50	82,50	83,00		97,50	93,75	110,00
71,00	85,50	86,00		100,25	97,50	114,00
72,00	86,00	88,00		103,25	98,00	115,00
53,03	61,02	62,46	\bar{x}	75,83	80,79	87,00
10,24	13,28	14,16	σ_{n-1}	15,07	9,24	15,15
10,07	13,06	13,92	σ_n	14,818	9,09	14,90
1.591,07	1.830,75	1.873,97	Σx	2.275,10	2.423,75	2.610,40
87.428,74	116.839,19	122.877,96	Σx^2	179.123,63	198.299,44	233.795,56
73,51	87,61	90,78	$\bar{x} \pm 2\sigma$	105,97	99,27	117,30
32,55	34,46	34,14		45,69	62,31	56,70

CUADRO 6. Areas (μ^2) de los núcleos neuronales de los embriones de rata de 23 días y ratas nacidas de 15 días de las zonas anterior, intermedia y posterior del núcleo supraóptico, ordenadas de menor a mayor. También se expresan la media aritmética (\bar{x}), desviación standard de la muestra (σ_{n-1}) y de la población (σ), suma de valores (Σx), suma de sus cuadrados (Σx^2) e intervalo de confianza ($\bar{x} \pm 2\sigma$).

83 μ^2). La dispersión de los datos es menor en la zona intermedia.

Realizado este estudio, se quiso comprobar - mediante un análisis de varianza, si existía alguna diferencia significativa entre las tres zonas descritas - en cada uno de los individuos estudiados.

En el cuadro 7, se encuentran reflejados los resultados obtenidos tras haber aplicado dicho análisis.

Para todos los casos, se comparan las zonas - anterior, intermedia y posterior para determinar si se trata de tres poblaciones iguales o diferentes. Es decir, se quiere saber, si las dimensiones nucleares ordenadas por tamaños, son de la misma o de distinta categoría. Para aplicar el análisis de varianza, se han hallado los valores correspondientes a la dispersión, grados de libertad y varianza de las medias, de los intergrupos, intragrupos, residual y total, para poder - calcular la "F" de Sneider que al ser comprobada con - las tablas de Fisher, permitirá averiguar con un índice de confianza de un 95%, si las poblaciones celulares comparadas son iguales o diferentes.

El embrión de 20 días, presenta una F de Sneider (F_c) de 18,98, valor superior al encontrado en las tablas de 3,23, lo cual significa la existencia de - tres poblaciones nucleares distintas (por columnas). - Con relación a las clases de áreas (por filas), se obtiene una F de Sneider (F_r) de 6,08, superior a 1,51

	S.S.	G.L.	V.	F.	S.S.	G.L.	V.	F.
ANTERIOR INTERMEDIA POSTERIOR	AREAS NUCLEARES RATAS 20 i.u.				AREAS NUCLEARES RATAS 22 i.u.			
	638,67	2	319,13	18,98	339,38	2	169,69	39,55
	3949,50	29	13,6	8,08	5685,71	29	196,05	45,69
	976	58	16,82		249,20	58	4,29	
TOTAL	5563,72	89	62,51		5934,91	89	66,68	
ANTERIOR INTERMEDIA POSTERIOR	AREAS NUCLEARES RATAS 23 i.				AREAS NUCLEARES RATAS 15 p.p.			
	1548,29	2	774,14	6,57	1881,78	2	940,89	37,92
	7155,52	29	246,94	2,09	14.936,24	29	515,04	69,28
	6826,32	58	117,69		787,99	58	13,58	
TOTAL	15.530,33	89	174,49		611.218,6	89	6867,62	

89

CUADRO 7. Análisis de varianza de las áreas nucleares de neuronas pertenecientes a las tres zonas del N.so. en los cuatro periodos evolutivos elegidos. S.S.=suma de la dispersión de los valores; G.L.=grados de libertad; V=varianza; F="F" de Snedecor.

que es el valor hallado en las tablas. Esto quiere decir, que se trata de poblaciones con categorías de tamaño diferentes.

En el embrión de 22 días, se muestra una F_c de 39,55 , superior a la encontrada en las tablas de 3,23 y una F_r de 45,69 también superior a 1,51. Estos valores indican que existen grandes diferencias tanto a nivel de las distintas zonas ocupadas por poblaciones nucleares como entre las categorías de tamaño.

En el embrión de 23 días, se obtiene una F_c de 6,57 y una F_r de 2,09 , superiores ambas a las de las tablas, lo cual significa que a pesar de ser distintas poblaciones y con categorías de tamaños diferentes, no tiene una variación tan grande como los embriones de 20 y 22 días.

El nacido de 15 días, muestra una F_c de 37,92 y una F_r de 69,28 , valores ambos también superiores a los de las tablas, lo que significa que hay grandes diferencias entre las poblaciones y entre las categorías de tamaños.

Así pues, el análisis de varianza aplicado, demuestra que existen tres poblaciones nucleares diferentes (correspondientes a las zonas anterior, intermedia y posterior) en cuanto a tamaños en los distintos periodos evolutivos analizados.

Para determinar estadísticamente si existen diferencias significativas entre las áreas nucleares de una misma zona para los distintos periodos evolutivos

AREAS NUCLEARES RATAS 20, 22, 23 i.u. y 15 p.p.

	SSc	Vc	G.L.	SSt	Vt	G.L.	F
ANTERIOR	12506.99	4168.99	3	25837.85	217.12	119	19.20
INTERMEDIA	15076.12	5025.37	3	25275.42	212.39	119	23.66
POSTERIOR	25051.68	8350.56	3	41499.34	348.73	119	23.94

Cuadro 8. Análisis de varianza de las áreas nucleares de neuronas pertenecientes a las zonas anteriores del N.so. de todos los periodos evolutivos estudiados, a las zonas intermedias y a las zonas posteriores de los mismos periodos evolutivos estudiados. SS_c =dispersión de los datos debida a las medias de las columnas; V_c =varianza debida al efecto de las columnas. G.L.=grados de libertad; SS_t =dispersión total de los datos; V_t =varianza total.

vos de la rata estudiados, se aplicó el análisis de varianza para las zonas anteriores, intermedias y posteriores. Los valores obtenidos quedan reflejados en el cuadro 8. La zona anterior, muestra una F de Sneider - de 19,20 valor significativamente superior al encontrado en las tablas, siendo este de 2,76 lo cual implica, que las áreas nucleares de las zonas anteriores de los embriones de rata de 20, 22 y 23 días y de la rata nacida de 15 días son diferentes, siendo por tanto cuatro poblaciones nucleares de tamaños distintos, una para cada estado evolutivo.

La zona intermedia, tiene una F de Sneider - de 23,66 cifra superior a la hallada en las tablas de 2,76. Estos datos demuestran que las áreas nucleares - de las zonas intermedias de los diferentes periodos -- evolutivos de las ratas estudiadas son también distintas.

La zona posterior, presenta una F de Sneider de 23,94 , cifra significativamente superior al 2,76 - que muestran las tablas de Fisher. Estos resultados indican la existencia de cuatro poblaciones con áreas nucleares distintas, correspondiendo cada una a los estados analizados.

5.4.1.2. Diámetros nucleares. Para determinar si había diferencia en cuanto a la forma nuclear, en las tres - zonas estudiadas para cada periodo, también se utilizó el análisis de varianza. Se midieron los dos diámetros menor y mayor del núcleo de cada célula y se obtuvo la

RAZON DIAMETROS NUCLEARES RATAS 20 i.u.				RAZON DIAMETROS NUCLEARES RATAS 22 i.u.		
ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR		ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR
0,88	0,89	0,75		0,83	0,68	0,83
0,65	0,76	1,00		0,83	1,00	1,00
0,81	0,87	0,73		0,84	0,79	0,74
0,70	1,00	0,92		0,64	0,94	0,84
0,74	1,00	0,81		1,00	0,74	0,84
0,75	0,86	0,81		0,88	0,68	0,84
0,80	0,87	0,93		1,00	0,94	1,00
0,82	0,87	1,00		1,00	0,91	1,00
0,82	0,70	0,87		1,00	0,80	1,00
0,65	0,93	1,00		0,94	0,89	1,00
1,00	0,75	0,89		1,00	0,82	0,94
0,74	0,67	0,76		0,80	0,83	0,94
0,79	0,68	1,00		0,82	0,75	0,93
0,93	0,85	0,83		0,82	0,72	0,93
0,87	0,87	0,88		0,78	1,00	0,88
0,87	0,72	0,79		0,89	0,79	0,70
1,00	0,84	0,90		0,94	0,88	0,66
0,67	0,59	0,93		0,79	0,88	0,70
0,84	0,68	0,78		0,82	0,88	0,66
0,66	0,83	0,87		0,84	0,94	0,71
0,94	1,00	0,96		0,89	0,94	0,69
0,94	0,65	1,00		0,94	0,74	0,89
0,87	0,89	0,93		0,94	0,81	0,83
0,89	0,59	0,90		0,84	0,84	0,76
0,94	0,87	1,00		0,89	0,84	0,88
0,93	0,65	0,79		1,00	0,93	0,88
0,79	1,00	0,88		0,94	0,76	0,87
0,81	0,93	0,86		0,78	0,94	0,76
0,93	0,78	0,95		0,72	1,00	0,76
0,94	0,79	0,93		0,94	1,00	0,89
0,83	0,81	0,88	\bar{x}	0,87	0,85	0,84
0,10	0,12	0,08	σ_{n-1}	0,09	0,097	0,16
0,10	0,12	0,08	σ_n	0,09	0,095	0,10
24,97	24,33	26,65	Σx	26,34	25,66	25,35
21,09	20,19	23,87	Σx^2	26,32	22,22	21,76
1,03	1,05	1,04	$\bar{x} \pm 2\sigma$	1,05	1,04	1,04
0,63	0,57	0,72		0,69	0,56	0,64

CUADRO 9. Muestra la razón de los diámetros menor y mayor de los núcleos neuronales de los embriones de rata de 20 y 22 días de las zonas anterior, intermedia y posterior del núcleo supraóptico ordenadas de menor a mayor. También se expresan la media aritmética (\bar{x}), desviación standard de la muestra (σ_{n-1}) y de la población (σ), suma de valores (Σx), suma de sus cuadrados (Σx^2) e intervalo de confianza ($\bar{x} \pm 2\sigma$).

RAZON DIAMETROS NUCLEARES RATAS 23 i.u.			RAZON DIAMETROS NUCLEARES RATAS 15 p.p.		
ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR	ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR
1,00	0,89	0,65	0,96	0,90	0,92
0,87	0,95	0,85	0,95	1,00	1,00
1,00	0,80	0,75	0,75	1,00	0,81
0,70	0,90	0,90	0,90	1,00	0,80
0,75	0,75	0,75	0,70	0,90	0,92
0,87	1,00	1,00	0,86	0,90	0,86
0,82	0,95	0,70	0,90	0,68	1,00
0,93	0,90	1,00	0,90	1,00	1,00
0,87	0,80	0,70	0,75	0,68	1,00
1,00	0,95	0,90	0,70	1,00	0,90
0,72	0,95	0,75	0,80	0,86	1,00
0,94	0,80	0,80	0,55	1,00	0,92
0,86	0,80	0,80	1,00	0,95	1,00
0,77	0,80	0,90	0,75	1,00	1,00
0,86	0,75	0,70	1,00	0,85	0,80
1,00	0,90	0,80	0,80	1,00	0,80
0,72	0,90	0,74	0,76	1,00	0,83
1,00	0,75	0,60	1,00	0,90	0,90
0,75	1,00	0,90	0,90	0,86	0,87
1,00	1,00	0,75	1,00	0,90	0,90
0,89	1,00	1,00	1,00	0,84	0,90
0,94	1,00	0,80	0,86	0,85	1,00
0,84	1,00	0,90	0,72	1,00	1,00
1,00	0,80	0,75	1,00	0,88	0,90
0,90	0,80	1,00	0,87	0,90	0,80
0,94	0,80	1,00	0,85	0,90	0,90
0,89	1,00	0,70	1,00	1,00	0,90
0,85	0,85	1,00	1,00	0,86	0,90
1,00	0,75	0,70	0,90	0,85	1,00
0,90	0,90	0,80	1,00	1,00	1,00
0,88	0,88	0,81	0,87	0,91	0,91
0,09	0,09	0,11	0,12	0,08	0,07
0,09	0,08	0,11	0,11	0,08	0,07
26,66	26,44	24,59	26,13	27,53	27,53
23,94	23,54	20,56	23,17	25,46	25,42
1,06	1,06	1,03	1,11	1,07	1,05
0,70	0,70	0,59	0,63	0,75	0,77

CUADRO 10. Muestra la razón de los diámetros menor y mayor de los núcleos neuronales de los embriones de rata de 23 días y ratas nacidas de 15 días de las zonas anterior, intermedia y posterior del núcleo supraóptico ordenadas de menor a mayor. También se expresan la media aritmética (\bar{x}), desviación standard de la muestra (σ_{n-1}) y de la población (σ), suma de valores ($\sum x$), suma de sus cuadrados ($\sum x^2$) e intervalo de confianza ($\bar{x} \pm 2\sigma$).

relación entre ambos. Estos valores están expuestos en los cuadros 9 y 10. Sobre ellos, se han efectuado los mismos cálculos estadísticos ya descritos anteriormente (Cuadro 11).

En el embrión de 20 días, la F_c es 39,00 valor superior al encontrado en las tablas de 3,15, lo que significa que los núcleos de las poblaciones neuronales pertenecientes a las zonas anterior, intermedia y posterior presentan formas diferentes.

El embrión de 22 días, tiene una F_c de 1,39 valor inferior al encontrado en las tablas de 3,15, lo que indica que los núcleos de las poblaciones neuronales de las tres zonas presentan formas similares.

El embrión de 23 días, tiene una F_c de 3,89 cifra ligeramente superior a la de las tablas de 3,15 mostrando que los núcleos de las poblaciones neuronales tienen formas diferentes.

Las ratas post-partum de 15 días, muestran una F_c de 1,66, valor inferior al de las tablas de 3,15, expresando que las formas nucleares de las neuronas pertenecientes a las tres zonas son iguales.

Comparando los valores obtenidos para cada día estudiado, se observa que los núcleos de las células correspondientes a las ratas nacidas de 15 días, son los más esféricos y muy similares entre sí en las tres zonas, mientras que los embriones de 20 días presentan mayores diferencias en cuanto a la forma del núcleo al comparar las zonas anterior, intermedia y pos-

RAZON	S.S.	G.L.	V	F	S.S.	G.L.	V	F
DIÁMETROS NUCLEARES	EMBRIONES RATAS 20 DIAS				EMBRIONES RATAS 22 DIAS			
ANTERIOR	0,94	2	0,47	39	0,02	2	0,01	1,39
INTERMEDIA								
POSTERIOR								
TOTAL	1,06	89	0,01		0,88	89	0,009	
	EMBRIONES RATAS 23 DIAS				RATAS NACIDAS 15 DIAS			
ANTERIOR	0,08	2	0,04	3,89	0,03	2	0,015	1,66
INTERMEDIA								
POSTERIOR								
TOTAL	0,98	89	0,01		0,81	89	0,009	

CUADRO 11. Análisis de varianza de las razones de los diámetros menor y mayor de los núcleos neuronales pertenecientes a las zonas anterior, intermedia y posterior del N.so. en los cuatro periodos evolutivos estudiados. S.S.=suma de la dispersión de los valores; G.L.=grados de libertad; V=varianza; F="F" de Sneider.

terior.

Se quiso comprobar matemáticamente si existen diferencias significativas en cuanto a las formas nucleares entre las zonas anteriores de los periodos evolutivos estudiados, entre las zonas intermedias y entre las zonas posteriores. (Cuadro 12). Mediante la utilización del análisis de varianza, se obtiene una F de Sneider para la zona anterior de 4,3 , valor superior al encontrado en las tablas de 2,76. Esto significa que las formas de los nucleos de las zonas anteriores para los embriones de rata de 20, 22 y 23 días y nacidos de 15 días son distintas.

La zona intermedia, tiene una F de Sneider de 5 , cifra superior a la de las tablas de 2,76. Los valores obtenidos implican que las zonas intermedias de cada periodo evolutivo de la rata estudiados, tienen formas nucleares diferentes.

La zona posterior refleja una F de Sneider de 5 , valor más alto que el 2,76 correspondiente a las tablas. Considerando estos resultados, se encuentra la existencia de poblaciones neuronales con formas distintas según se avanza en los diferentes periodos del desarrollo de la rata.

Para realizar el estudio de los nucleolos, se procedió a determinar su área, diámetro y posición ocupada dentro del núcleo. Al procesar los datos hallados, se ha visto que no existen diferencias notables respecto a ninguno de los tres parámetros mencionados.

RAZON DIAMETROS NUCLEARES RATAS 20, 22, 23 i.u. y 15 p.p.

	SSc	Vc	G.L.	SSr	Vt	G.L.	F
ANTERIOR	0.04	0.13	3	4.2	0.03	119	4.3
INTERMEDIA	0.17	0.05	3	1.35	0.01	119	5
POSTERIOR	0.16	0.05	3	1.27	0.01	119	5

Cuadro 12. Análisis de varianza de las razones de los diámetros menor y mayor de los núcleos neuronales pertenecientes a las zonas anteriores del N.so. de todos los periodos evolutivos analizados, a las zonas intermedias y a las posteriores de los mismos periodos evolutivos analizados. SS_c =dispersión de los datos debido a las medias de las columnas; V_c =varianza debida al efecto de las columnas; G.L.=grados de libertad; SS_t =dispersión total de los datos; V_t =varianza total.

en los distintos períodos evolutivos de la rata.

El área media nucleolar es de unas $4 \mu^2$ en todos los casos y el diámetro medio de $2,5 \mu^2$ (Keop, '70). La posición que ocupa el nucleolo en el interior del núcleo es algo excéntrica y por lo general su existencia es única para cada célula. En algunos casos aparecen dos nucleolos siendo esto más frecuente en los embriones que en los nacidos.

5.4.2. Agrupaciones celulares.

5.4.2.1. Histogramas. Mediante la aplicación de los métodos de rastreo automatizado, aplicados al estudio de campos microscópicos, se ha realizado un estudio cuantitativo sobre los cortes seriados de las zonas hipotálamicas en las que se encuentra ubicado el N.so. en los estadios del desarrollo embrionario de 20, 22 y 23 días y de los ejemplares post-partum de 15 días. Con el programa DATPLAN, se obtuvieron los mapas de distribución de densidades celulares del territorio destinado a este estudio (Figs. 27 -30). Los mapas muestran cómo se agrupan las células para formar los núcleos hipotálamicos, destacándose del conjunto el N.so. En dicho núcleo se pueden apreciar las zonas ocupadas por sustancia blanca y sustancia gris ya que como mencionamos anteriormente, los mapas son selectivos y en ellos la sustancia blanca está representada por áreas vacías. Se delimitó el núcleo supraóptico y se hizo un recuento de las cuadrículas llenas y de las vacías obteniéndose así la extensión de las sustancias gris y blanca

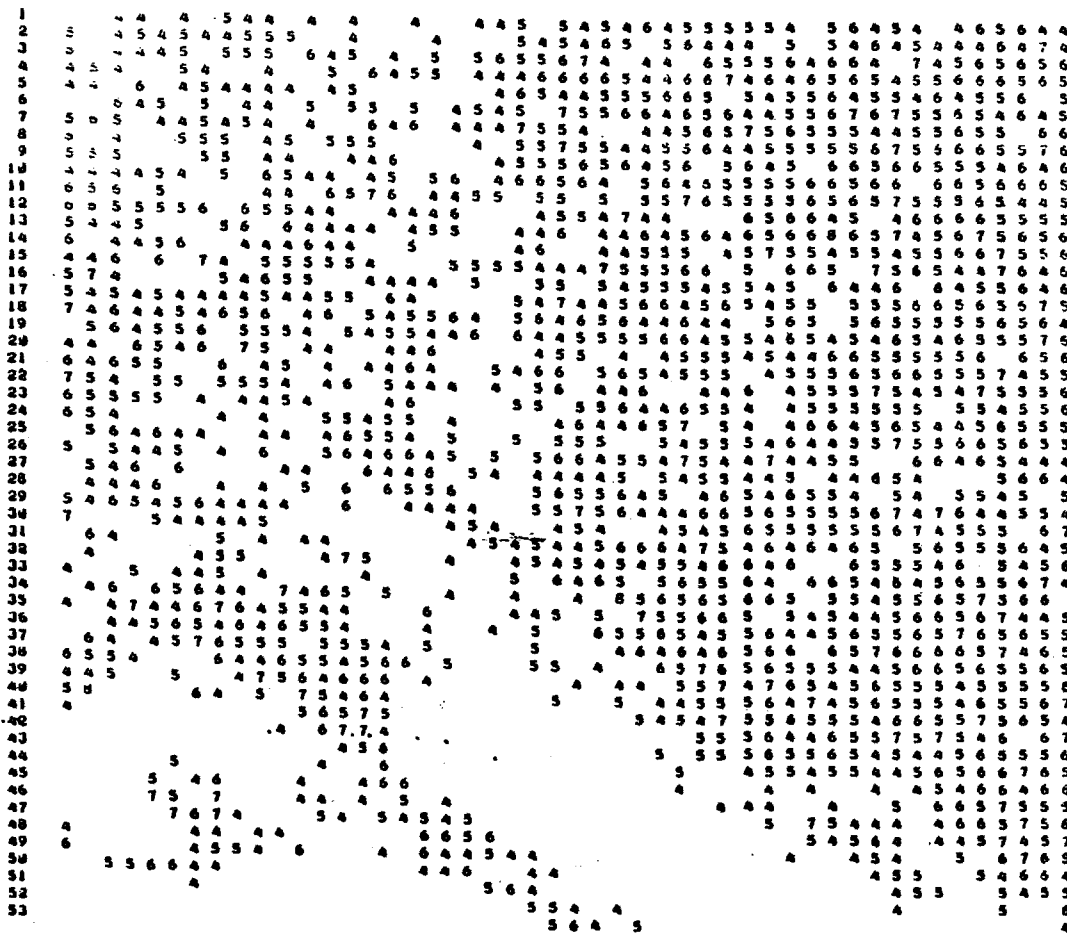


Fig. 28. Mapa de distribución de densidades celulares correspondiente al hipotálamo de rata de 22 i.u.. El corte analizado pertenece a la zona intermedia del M.so..

Fig. 30. Mapa de distribución de densidades celulares correspondientes al hipotálamo de rata nacida de 15 días. El corte analizado pertenece a la zona intermedia del N.º 50.



lo cual nos permitió confeccionar los histogramas correspondientes de todos los ejemplares elegidos. En los histogramas se ha tomado en ordenadas, el número de cuadrículas contadas y en abscisas, la distancia en micras al plano frontal F_0 o vertical (donde la comisura anterior está más desarrollada). Para mayor simplicidad de la representación, no se han dibujado todos los cortes, sino que éstos se han agrupado de cuatro en cuatro, considerando como una única distancia al plano F_0 , la distancia media del grupo de los cuatro cortes. Para cada grupo se ha representado en ordenadas, el número de cuadrículas ocupadas por la sustancia gris, las ocupadas por la sustancia blanca y el total de arbas.

En la parte superior del histograma, se muestran las figuras obtenidas a partir de las microfotografías del N.so., colocadas a intervalos de 40μ con el fin de que el orden secuencial mantenga la relación correspondiente con el histograma. Las columnas rayadas representan cuadrículas totales, las oscuras cuadrículas llenas y las claras cuadrículas vacías.

A través del estudio de los histogramas obtenidos para cada estadio del desarrollo de la rata, se observa que la zona anterior presenta un número de cuadrículas pequeño, aumentando progresivamente a medida que se avanza en sentido rostro-caudal, para sufrir una posterior disminución en la zona posterior, determinando la existencia de tres zonas distintas denomina

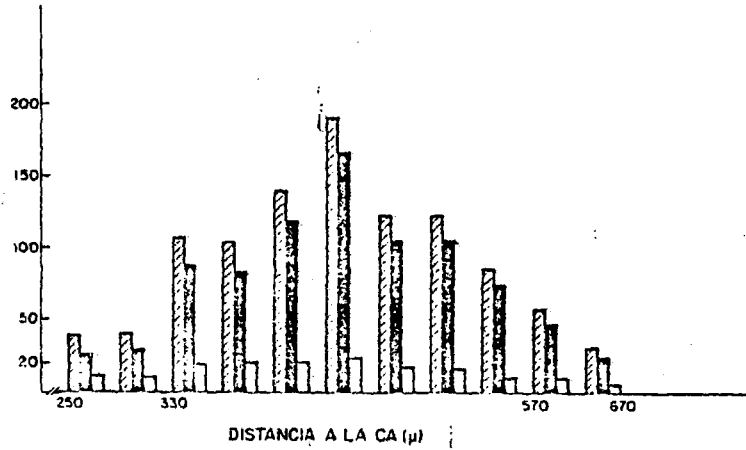
das anterior, intermedia y posterior. En todos los casos el número de cuadrículas llenas supera al de las vacías, existiendo una proporción muy alta de la sustancia gris frente a la sustancia blanca.

Los embriones de 20 días, muestran un histograma (Fig. 31) donde se visualiza la zona anterior -- que comprende una longitud de 80 μ , en las que el número de cuadrículas llenas duplica al de las vacías. La zona intermedia, tiene una extensión de 240 μ , con un número total de cuadrículas muy superior al de la zona anterior, siendo las llenas bastante más numerosas que las vacías. La zona posterior presenta una longitud de 100 μ , siendo el número total de cuadrículas inferior a la zona media pero superior a la anterior. También aquí, las cuadrículas llenas superan a las vacías. La extensión total del núcleo es de 420 μ .

Los embriones de 22 días, presentan un histograma más uniforme en conjunto (Fig. 32). Ocupa una extensión total de 720 μ , de las cuales 160 pertenecen a la zona anterior, 320 a la media y 240 a la posterior. Se observa que el tamaño de las columnas no sufre variaciones bruscas a lo largo de las tres zonas estudiadas. Las cuadrículas llenas superan en mucho a las vacías.

Los embriones de 23 días, muestran un histograma (Fig. 33) donde se registra que la extensión del núcleo es de 720 μ . La zona anterior ocupa 200 μ , la zona intermedia 320 μ y la posterior 200 μ . La parte -

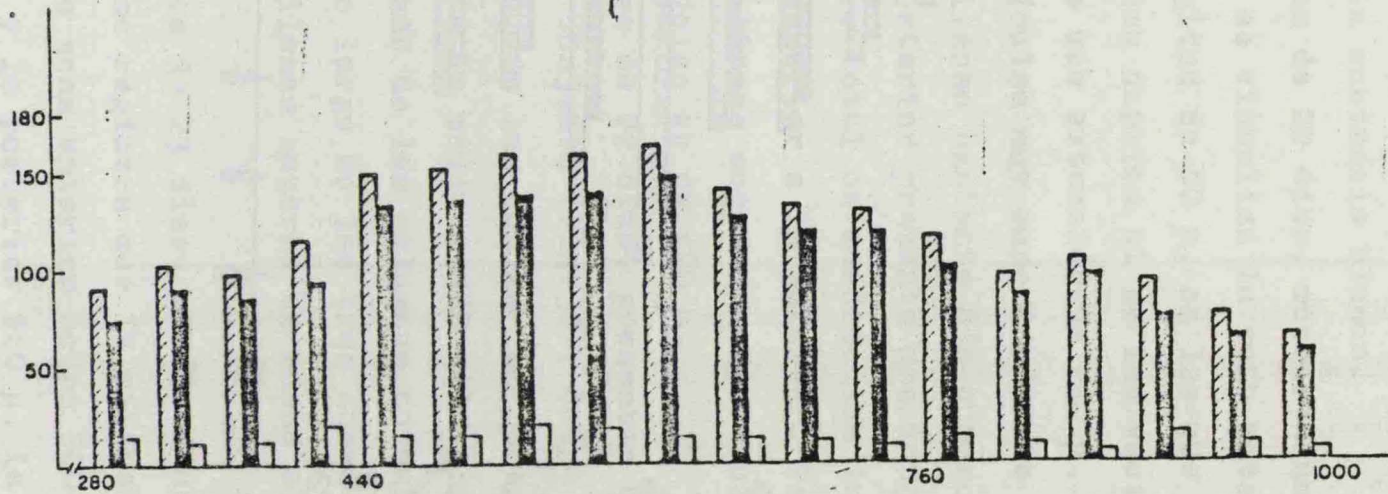
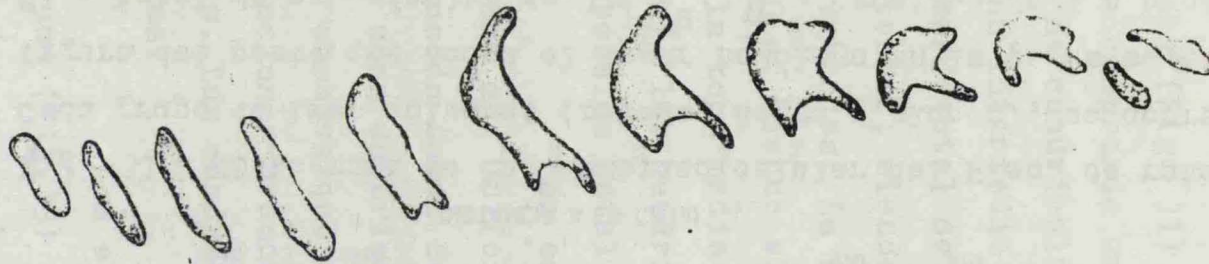
EMBRIÓN RATA 20 DIAS



901

Fig. 31. Histograma de la densidad celular del N.so. de rata de 20 d.u. Cada grupo de tres columnas (rayada, negra y blanca), se corresponde con la figura del corte que ocupa el lugar homólogo en la parte superior del cuadro.
 ▨ = total de canaliculos de $324 \mu^2$; ▩ = densidad de 4 a 6 células/ $324 \mu^2$;
 □ = densidad de 0 a tres células/ $324 \mu^2$.

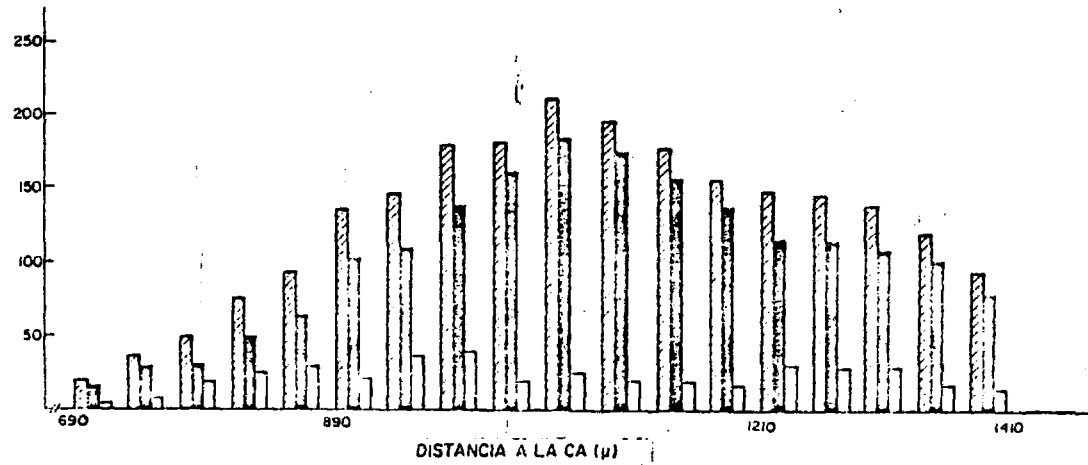
EMBRION RATA 22 DIAS |



101

DISTANCIA A LA CA (μ) |

Fig. 32. Histograma de la densidad celular del N.so. de ratas de 22 i.u. Las ordenadas representan número de cuadrículas. Los números de las abscisas corresponden a distancias seriadas desde la comisura anterior (CA). Para más aclaraciones ver Fig. 31.



108

Fig. 33. Histograma de la densidad celular del N.so. de ratas de 23 i.u.. Los números de las abscisas representan distancias seriadas de cada zona del N.so. a la comisura anterior. Las ordenadas representan número de cuadrículas. Para más aclaraciones ver Fig. 31.

RATA NACIDA 15 DIAS

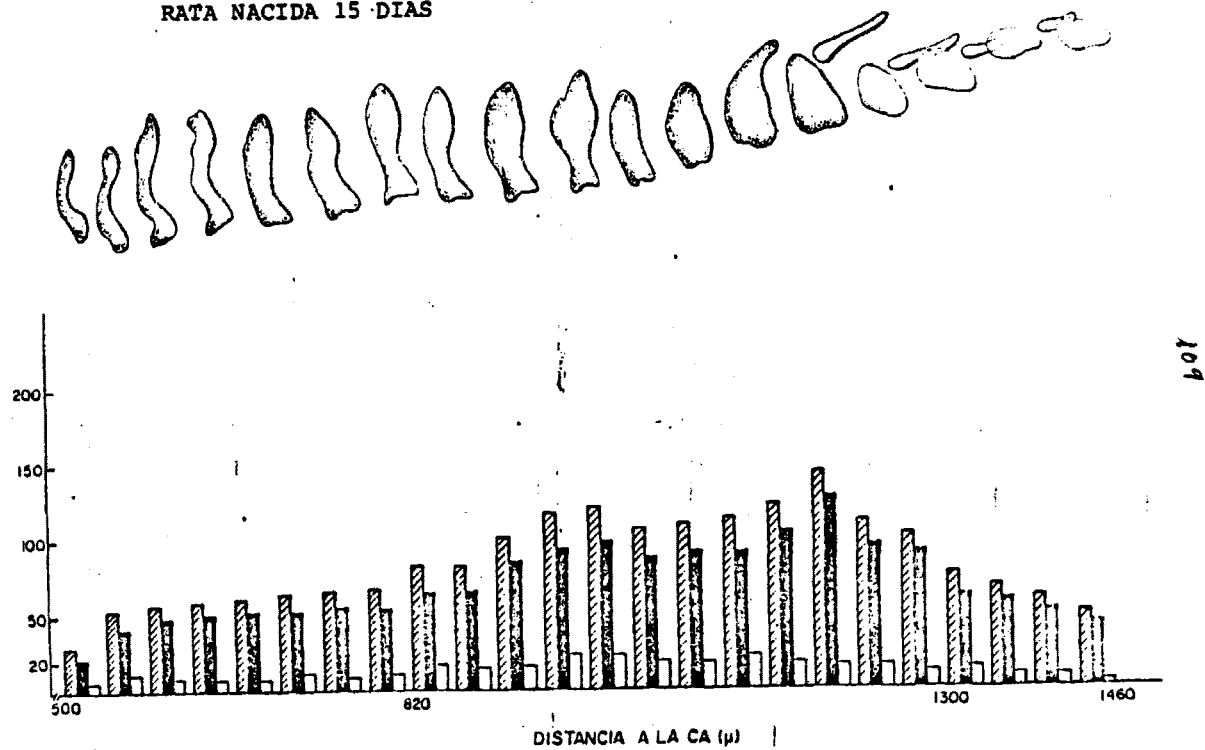


Fig. 34. Histograma de la densidad celular del N.so. de ratas de 15 p.p..
Las ordenadas representan número de cuadrículas. Más detalles en la Fig. 31.

anterior, sufre un aumento considerable y progresivo - del número de cuadrículas para alcanzar el máximo en - la zona intermedia, disminuyendo de forma paulatina en la posterior. Los valores de esta última son superiores a los de la zona anterior.

Los ejemplares p.p. de 15 días, muestran un histograma (Fig.34) de mayor extensión que los descritos para los embriones. Ocupa un total de 960 μ de las cuales 320 μ pertenecen a la zona anterior, 480 μ a la intermedia y 160 μ a la posterior. En cuanto al número de cuadrículas, no hay grandes variaciones en las tres zonas.

5.4.2.2. Valoraciones totales del núcleo supraóptico.- Con los datos obtenidos para cada zona y para cada ejemplar estudiado, se ha valorado el área, volumen, número de células y su distribución (Cuadro 13).

En los embriones de rata de 20 días, existe una gran diferencia entre las zonas anterior, intermedia y posterior. La zona intermedia es mucho mayor que las otras dos zonas, triplicando el número de cortes correspondientes respecto a la zona anterior y duplicando los obtenidos para la zona posterior. Con respecto al volumen, calculado en micras cúbicas, el valor encontrado en la zona intermedia es casi diez veces superior al de la zona anterior y unas cuatro veces mayor al de la zona posterior, teniendo el N.so. un volumen total de 13.374.720 μ^3 . El número de células es pequeño en la zona anterior, siendo este de 990, aumen-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO	ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR	TOTAL	ANTERIOR	INTERMEDIA	POSTERIOR	TOTAL	
20 iu	8	24	10	42	22 iu	16	32	24	72
VOLUMEN (u ³)	1.030.320	10.283.760	2.060.640	13.374.720	5.274.720	15.555.240	7.163.640	27.993.600	
N° CELULAS	990	12.910	2.608	16.508	6.714	21.979	10.217	38.910	
VOLUMEN OCUPADO	7,70	76,90	15,40	100	18,85	55,56	25,59	100	
SUSTANCIA GRIS	5,52	65,02	13,02	83,56	16,11	49,40	22,69	88,20	
SUSTANCIA BLANCA	2,18	11,88	2,38	16,44	2,74	6,16	2,90	11,80	
DENSIDAD CELULAR	4,34	4,80	4,84	4,66	4,82	5,14	5,21	5,05	
23 iu	20	32	20	72	15 pp	32	48	16	96
VOLUMEN (u ³)	3.829.680	18.388.080	7.827.840	30.045.600	5.929.200	13.384.440	3.285.360	22.599.000	
N° CELULAS	3.704	25.248	9.638	38.590	7.463	22.196	4.432	34.091	
VOLUMEN OCUPADO	12,75	61,20	26,05	100	26,24	59,22	14,54	100	
SUSTANCIA GRIS	8,82	51,50	21,18	81,50	21,85	48,93	12,50	83,28	
SUSTANCIA BLANCA	3,92	9,70	4,88	18,50	4,39	10,29	2,04	16,72	
DENSIDAD CELULAR	4,89	5,11	5,00	5,00	4,89	6,50	5,08	5,49	

ta muchísimo en la zona intermedia, pasando a ser de - 12.910 para disminuir de nuevo en la zona posterior a - 2.608, valor superior al encontrado en la zona anterior.

Del volumen total del N.so. se han hallado - los volúmenes ocupados por cada zona y dentro de cada zona se obtiene que tanto por ciento de ese volumen corresponde a áreas ocupadas por células y que tanto por ciento corresponde a áreas ocupadas por sustancia blanca principalmente. Los datos obtenidos de las tres zonas indican que un porcentaje muy elevado del volumen parcial de cada zona, corresponde a la sustancia gris. La zona intermedia es muy superior en estos valores a las zonas anterior y posterior. Otro dato analizado, ha sido la densidad celular, que indica cómo están de agrupadas las células. Se obtiene a través del cociente entre el número de células y el número de cuadrículas llenas. La zona posterior muestra la densidad celular más elevada, seguida de la intermedia y por último de la anterior.

En los embriones de rata de 22 días, existe una clara diferencia entre las zonas anterior, intermedia y posterior. La zona anterior es la más pequeña teniendo una extensión en sentido rostro-caudal de 160 μ . La zona intermedia tiene el doble de este valor y la zona posterior disminuye a 240 μ . La extensión total del núcleo es de 720 μ . El volumen de la zona anterior es más pequeño que el de la zona posterior y a su vez

este más pequeño que el de la zona intermedia, pero -- comparando estos volúmenes con el número de cortes ocupados por cada zona, se obtiene que la zona anterior -- presenta un área mayor que la zona posterior, siendo -- la sección del núcleo en los cortes mayor con respecto al eje dorso-ventral, al latero-medial o a ambos. El -- número de células es menor en la zona anterior, seguido de la posterior y de la intermedia, cuyo valor triplica al de la zona anterior y duplica al de la posterior. En total el N.so. en esta fase tiene 36.910 células.

Del volumen ocupado por cada zona al hallarla proporción de esas cifras que corresponde a sustancia gris y sustancia blanca se observa que en todos -- los casos, la sustancia gris, supera con mucho a la -- blanca habiendo una menor diferencia entre estos dos -- datos en la zona anterior siendo por tanto esta zona -- la más clara, seguida de las zonas intermedia y posterior. La densidad celular es mayor en la zona posterior.

En los embriones de rata de 23 días, al analizar las extensiones ocupadas por las tres zonas del N.so. en sentido rostro-caudal, se comprueba que las -- zonas anterior y posterior son iguales, alcanzando cada una un valor de 200 μ , mientras la zona intermedia se extiende a 320 μ . El volumen de estas zonas, no -- guarda la misma proporción ya que el de la zona posterior es doble que el de la zona anterior; esto indica que el área de los cortes que forman la zona posterior,

es mucho mayor que el área de los cortes de la zona anterior. El volumen de la zona intermedia, es bastante mayor que el de la zona posterior.

El número de células existentes en cada zona arroja un valor total de 38.590, perteneciendo 25.248 a la zona intermedia, valor muy superior al encontrado en la zona posterior de 9.638 y en la zona anterior de 3.704.

La proporción de sustancia gris y sustancia blanca es superior en la zona intermedia, posterior y por último anterior. La densidad celular es superior en la zona intermedia que en las otras dos.

En los ejemplares de rata p.p. de 15 días, la extensión rostro-caudal ocupada por las zonas anterior, intermedia y posterior, es bastante notoria para este periodo de la evolución. La zona intermedia, es la más grande ocupando 480 μ , la zona anterior ocupa 320 μ y la posterior 160 μ . El volumen del núcleo es superior en la zona intermedia respecto a la anterior y a la posterior; así como el número de células existentes en cada zona, siendo el número total de células para este estadio de 34.091. La proporción de sustancia gris, es superior a la de la sustancia blanca en las tres zonas, siendo ambos valores mayores en la zona intermedia que en la anterior y a su vez que la posterior. La densidad celular no mantiene esta misma proporción, obteniéndose valores superiores en la zona intermedia y posterior respecto a la anterior.

El Cuadro 14 muestra los valores encontrados para el N.so. en su globalidad, para los embriones de rata de 20, 22 y 23 días y para los ejemplares p.p. de 15 días. La extensión en sentido rostro-caudal del N.so., es superior en los ejemplares p.p. que en los embriones. El volumen aumenta con la edad del embrión, para disminuir en los ejemplares p.p.. El número de células, aumenta considerablemente del estado embrionario de 20 días al de 22 días para mantenerse constante hasta el nacimiento y volver a disminuir.

La proporción de sustancia gris es muy superior a la de la sustancia blanca para todos los estadios elegidos. La densidad celular, es mayor en los ejemplares p.p. que en los embriones.

	RATAS 20 i.u.	RATAS 22 i.u.	RATAS 23 i.u.	RATAS 15 p.p.
Nº CORTES	42	72	72	96
VOLUMEN (u ³)	13.374.720	27.993.600	30.045.600	25.599.000
Nº CELULAS	16.508	38.910	38.590	34.091 + SD
% SUSTANCIA GRIS	83,56	88,20	81,50	83,28
% SUSTANCIA BLANCA	16,44	11,80	18,50	16,72
DENSIDAD CELULAR	4,66	5,05	5,00	5,49

Cuadro 14. Valores totales obtenidos para el núcleo supraóptico de los embriones de ratas de 20, 22 y 23 días y de las ratas nacidas de 15 días. SD = supraóptico difuso.

6. DISCUSSION

6. DISCUSION.

6.1. TOPOLOGIA DEL NUCLEO SUPRAOPTICO.

El N.so., debido a su privilegiada posición-topográfica y su doble caracter neuronal y hormonoglandular (Falay, '60; Duncan, '61; Peterson, '66; Morris, '74; Kozlowski, '77), ha sido motivo de estudios muy importantes.

En el presente trabajo, ha sido especialmente estudiada su topologia en distintas fases del desarrollo de la rata, midiendo distancias a los planos de referencia seleccionados y dibujando el perfil del contorno nuclear. No conocemos la existencia de un estudio exhaustivo sobre el desarrollo cuantitativo tridimensional de agrupaciones neuronales en el hipotálamo de mamíferos, si bien ha sido evidente el interes que ha despertado este tema (Coggeshall, '64; Ifft, '65; McAllister, '77; Altman, '78) bajo otros aspectos. El N.so. nos ha ofrecido la gran ventaja de ser facilmente reconocible y estar univocamente situado en el hipotálamo.

6.1.1. Embriones de 20 días.

En este periodo evolutivo de la rata, el N.so está perfectamente delimitado puesto que en el día 18 de la gestación ya está definido. La parte anterior es sin duda la zona donde se presentan más dificultades - para el reconocimiento de los límites, al estar formada por un grupo de células algo dispersas. Una vez determinado el comienzo rostral del núcleo, no presentó-

dificultad al establecer su disposición y situación relativa respecto a otras estructuras diencefálicas. La secuencia del núcleo en sentido rostro caudal, ha permitido conprobar que su comienzo rostral está colindante con el quiasma óptico, adquiriendo una mayor densidad neuronal en la parte intermedia del núcleo, mientras descansa sobre la cintilla óptica y se aleja en sentido lateral. También se han controlado las variaciones topológicas que han tenido lugar en sentido dorsi-ventral, sometidas en cada caso a pequeñas fluctuaciones. La parte posterior, se desvía intensamente hacia áreas más dorsales al mismo tiempo que las fibras de la cintilla óptica se interponen entre la masa del núcleo quedando este último dividido en dos ramas, una ventral y otra dorsal a la cintilla óptica, relativamente pequeñas y desiguales, mostrando la parte ventral tamaños superiores a la dorsal.

6.1.2. Embriones de 22 días.

Las características topográficas encontradas para este estadio, son parecidas a las descritas para los embriones de 20 días. La diferencia más relevante, es el aumento muy considerable de tamaño que se observa en los embriones de 22 días.

Con respecto al eje dorsi-ventral, las variaciones ocurridas también son mayores ya que tanto el extremo posterior de la parte intermedia como la parte posterior del núcleo, realizan una elevación muy brus-

ca. El N.so. resulta mejor delimitado por la aparición de una cápsula glial (Fig. 4b) que, según estudios realizados por D'Amelio ('60), corresponde a elementos astricitarios con el cuerpo o prolongaciones ubicados en la sustancia fundamental vecina.

6.1.3. Embriones de 23 días.

En esta fase, no se aprecian cambios bruscos en la topología del núcleo, pero sí en cambio en cuanto a transformaciones celulares que van surgiendo en los cuerpos neuronales. El N.so., ocupa las mismas posiciones que en los dos periodos anteriormente reseñados, aunque se extiende de modo mucho más amplio en -- sentido latero-medial. El núcleo se presenta rodeado -- por elementos gliales a la vez que se observa una gran vascularización pudiendo ser a veces observadas venas que atraviesan el núcleo. Otra característica es la -- fuerte desviación del eje mayor de los cortes del núcleo en su zona intermedia, desplazándose hacia arriba por su extremo lateral hasta formar un ángulo de 45 -- con la horizontal.

6.1.4. Ratas nacidas de 15 días.

Es evidente la aparición de modificaciones estructurales. El lecho de sustancia blanca en el que va incluido el N.so., alcanza un mayor desarrollo (Fig 6). La zona anterior es muy compacta y el conjunto de toda la extensión bien delimitada del núcleo ocupa un espacio más reducido que en los embriones de 23 días, debi

do a la migración dispersa, hacia la sustancia blanca, de neuronas que constituyen, en la parte intermedia y posterior, un verdadero núcleo supraóptico difuso. -- (Fig. 6c).

Así pues, las características topológicas del N.so. en los cuatro estadios evolutivos estudiados pueden resumirse del siguiente modo:

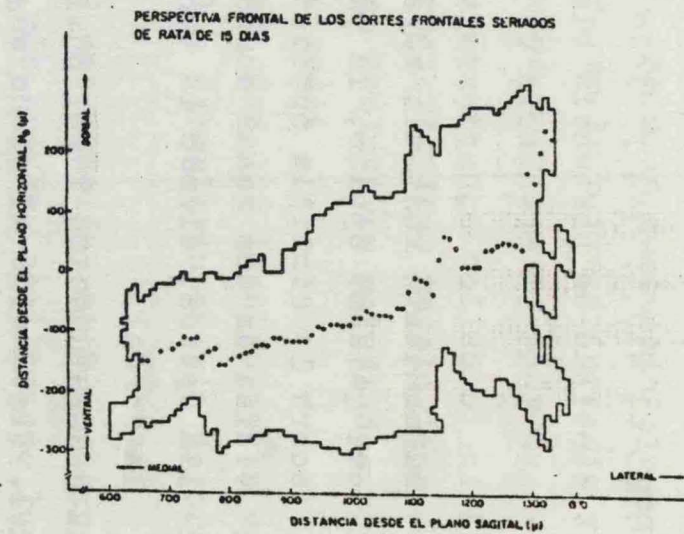
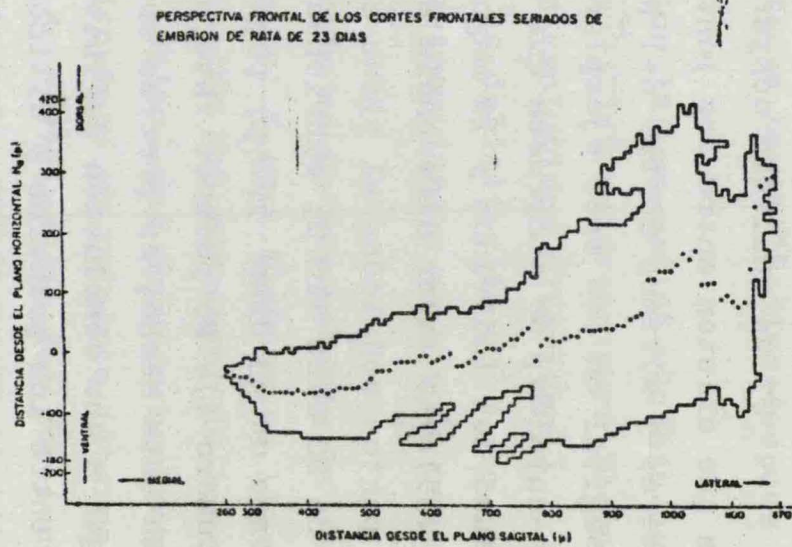
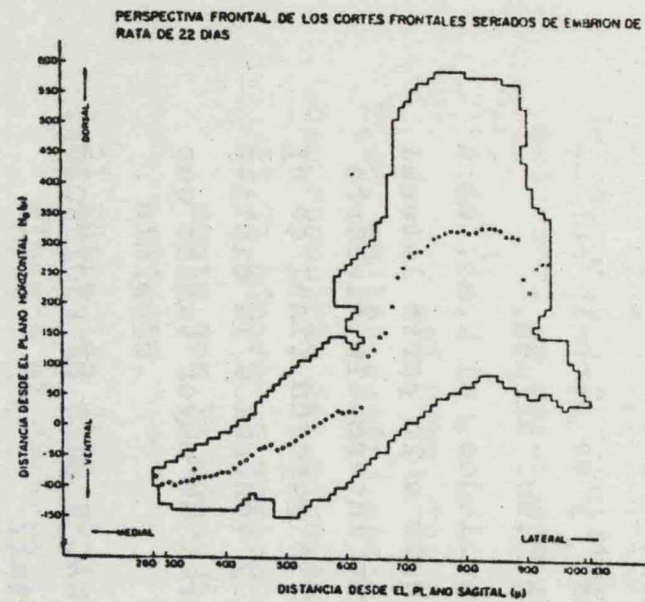
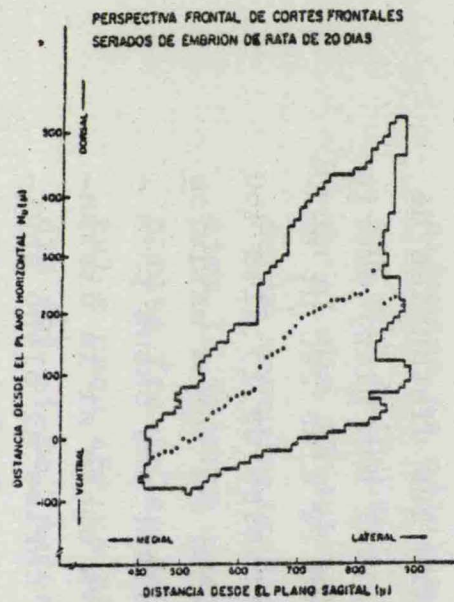
- 1) El número de cortes seriados que lo atraviesan aumenta con la edad de los ejemplares en via de crecimiento.
- 2) Entre los días 20 y 22 del embrión, el N.so. experimenta el desarrollo más brusco, continuando luego de forma menos intensa hasta 15 días después del nacimiento.
- 3) La extensión en sentido latero-medial alcanza un máximo en el día 22 y 23 intrauterino para luego disminuir en periodos evolutivos ulteriores.
- 4) A partir del día 22, la delimitación del N.so. a expensas de células astrocitarias va siendo cada vez más evidente.
- 5) En el día 23 del embrión es ya muy notoria la abundante vascularización del N.so.. También es llamativa la intensa desviación del eje mayor de los cortes frontales del núcleo, que pasa de horizontal a unos 45° de oblicuidad en la parte intermedia del mismo, antes de dividirse en dos porciones supra e infra fascicular con respecto a la cintilla óptica.

- 6) En el día 15 del período post-natal, aumenta la cantidad de sustancia blanca y se aprecia con claridad la presencia de un N.so. difuso.
- 7) En todos los ejemplares estudiados, el N.so. es a su comienzo rostral, adyacente a la parte lateral del quiasma óptico, la parte intermedia discurre sobre la cintilla óptica y la porción final es dividida en dos zonas dorsal y ventral a la cintilla óptica, siendo la ventral de mayor tamaño que la dorsal.

6.2. RECONSTRUCCION TRIDIMENSIONAL Y EJES DE PROYECCION.

6.2.1. Distancias al plano sagital.

Si se analizan comparativamente las distancias que existen entre los puntos más cercanos de los primeros y últimos cortes del N.so. con relación al plano sagital en los tres ejemplares intrauterinos y los post-natales, se comprueba que no hay relación entre la edad del individuo y la magnitud del desplazamiento (Fig.35). La mayor diferencia entre las distancias de los puntos señalados al plano sagital han sido: embriones de 20 días 510μ ; embriones de 22 días 220μ ; embriones de 23 días 520μ ; post-natales de 15 días 460μ (Cuadro 4). No podemos interpretar de forma satisfactoria este hecho, es preciso analizar más casos para llegar a una conclusión definitiva sobre si la distancia entre los primeros y últimos cortes al plano sagital aumenta o disminuye con la edad. A pesar de lo ex-



123

Fig. 35. Perspectivas frontales de los cortes frontales seriados de ratas de 20, 22 y 23 i.u. y 15 p.p..

puesto parece ser probable que la distancia aumente durante el desarrollo embrionario de la rata, para disminuir en los nacidos.

Con respecto a la extensión ocupada por el N.so. en sentido rostro-caudal, los nacidos de 15 días superan en más del doble a los embriones de 20 días por existir entre ambos una diferencia de 540 μ .

Una visualización de gran importancia ha sido la división de la división de la zona posterior en dos partes situadas dorsal y ventral a la cintilla óptica, en todos los ejemplares estudiados.

6.2.2. Distancias al plano horizontal H_0 .

El análisis de la perspectiva lateral, nos muestra la trayectoria seguida por el eje dorsi-ventral del núcleo a lo largo de la serie rostro-caudal de cortes en los diferentes estadios evolutivos considerados. Comparando las incurvaciones de esta perspectiva, se comprueba que los embriones de 20 y 23 días presentan desplazamientos dorsi-ventrales más suaves que los embriones de 22 días y post-nacidos de 15 días. Así, el punto más dorsal del N.so. en el primer corte de la serie está a 30 μ (Cuadro 3) por debajo de la base del tercer ventrículo. Más atrás, este punto desciende hasta -90 μ para elevarse hasta un máximo en el último corte, de 230 μ por encima de la base del tercer ventrículo.

En los embriones de 22 días, el N.so. comienza situado a 100 μ por encima de la base del tercer ventrículo, siendo el único periodo en que el extremo anterior del núcleo presenta valores positivos. En la parte intermedia, el núcleo desciende hacia niveles más profundos, hasta -150 μ , por debajo de la base del tercer ventrículo. Por último, la parte caudal vuelve a ascender hasta que el último corte a 420 μ por encima del ventrículo.

El N.so de los embriones de 23 días, es el que presenta el primer corte en situación más inferior respecto todos los demás ejemplares estudiados, a -60 μ por debajo de la base del tercer ventrículo. En la parte intermedia desciende todavía a -180 μ para elevarse de nuevo a 280 μ , estando el último corte situado a 100 μ por encima de la base del tercer ventrículo (Cuadro 3).

Las ratas nacidas de 15 días, muestran un N.so. cuyo comienzo está situado a -40 μ , por debajo del ventrículo. Entre las zonas anterior e intermedia del núcleo, sufre un descenso muy brusco llegando a -300 μ . En la zona posterior se eleva una distancia equivalente a 400 μ para estar situado a 100 μ por encima de la base del ventrículo.

Comparando los cuatro periodos evolutivos, se comprueba que tanto los embriones de 22 días como los nacidos de 15 días son los que presentan un máximo en

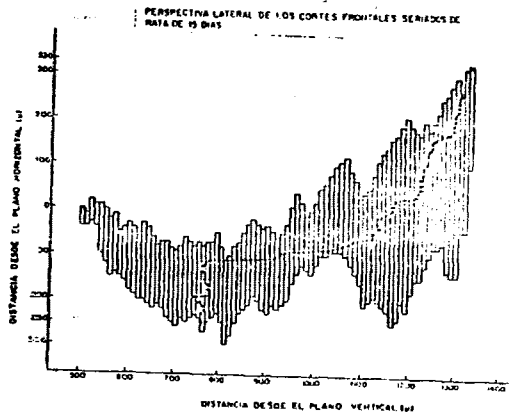
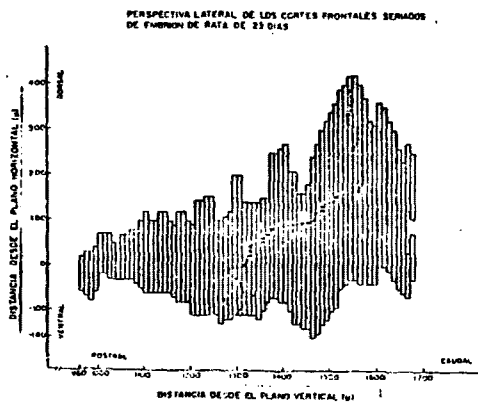
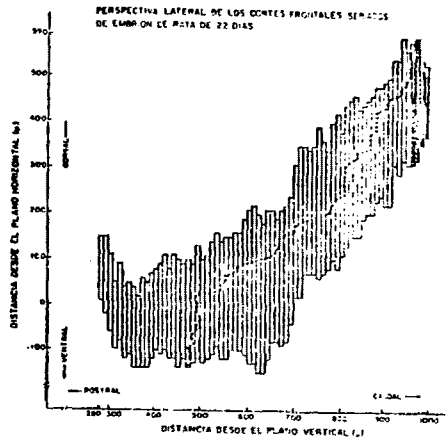
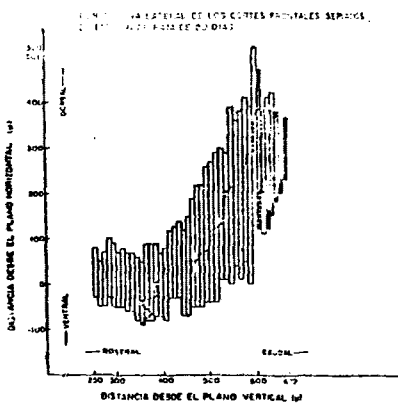


Fig. 36. Perspectivas laterales de los cortes frontales seriados de ratas de 20, 22 y 23 i.u. y 15 p.p..

la intensidad de las inflexiones dorsio-ventrales del N.so. (Fig. 36).

6.2.3. Distancias al plano Frontal F_0 .

Como era de esperar, han sido los embriones de 20 días los que han presentado un N.so. de menor extensión rostro-caudal. El primer corte del núcleo se encuentra a una distancia de $\pm 240 \mu$ al plano frontal de la comisura anterior y el último corte a 660μ teniendo una extensión total de 420μ .

El N.so. de los embriones de 22 días está en su inicio algo más alejado del plano frontal de la comisura anterior que los embriones de 20 días, comenzando a una distancia de 280μ y alcanzando una extensión total de 720μ .

En los embriones de 23 días, el N.so. tiene la misma extensión rostro-caudal de 720μ que los embriones de 22 días pero todo el núcleo queda desplazado hacia atrás ya que el primer corte frontal se encuentra a 690μ del plano frontal de la comisura anterior, es decir, 410μ más caudal que el N.so. de los embriones de 22 días (Cuadro 2).

En las ratas nacidas de 15 días, el N.so. aumenta considerablemente su extensión rostro-caudal, al mismo tiempo que disminuye ligeramente la distancia al plano frontal de la comisura anterior que se establece en 500μ (Fig. 37).

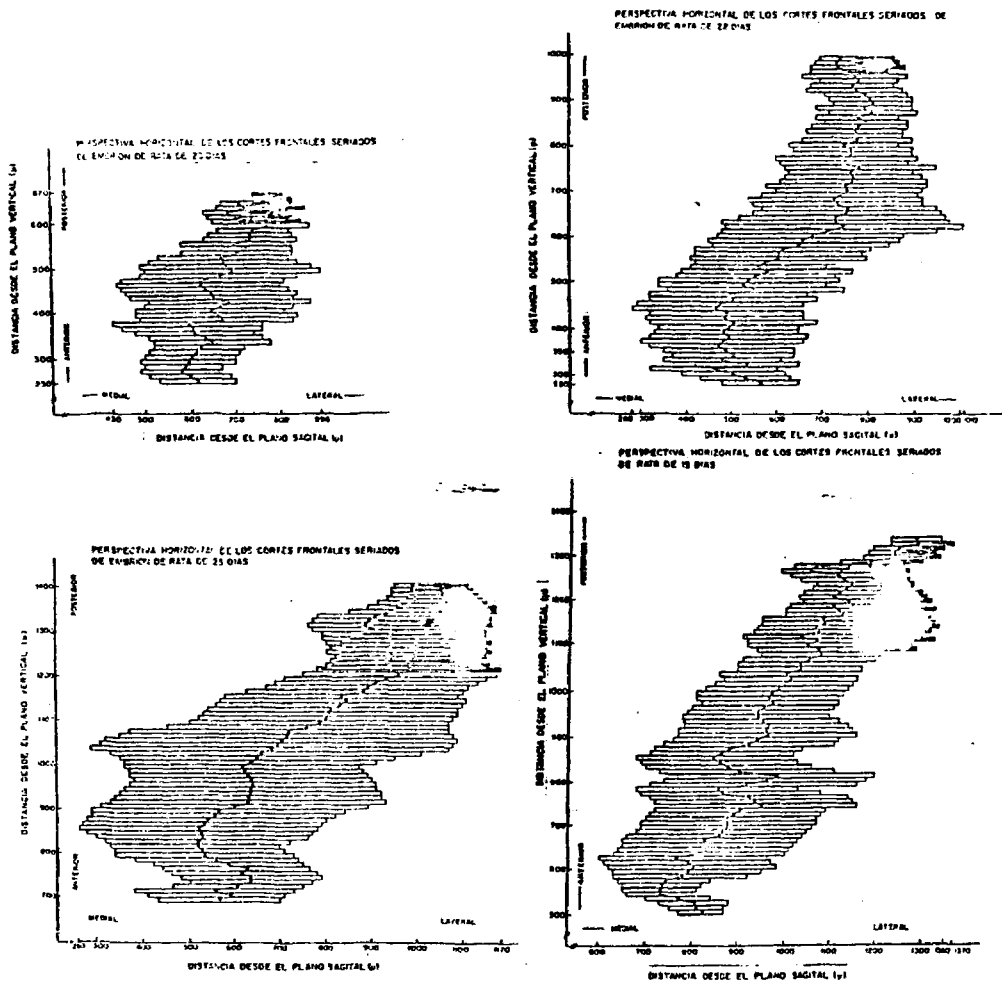


Fig. 37. Perspectivas horizontales de los cortes frontales seriados de ratas de 20, 22 y 23 i.u. y 15 p.p..

6.3. CITOFOTOMETRIA.

6.3.1. Análisis celular.

Mediante la microscopía óptica convencional, se han analizado las poblaciones neuronales del N.so. en diferentes estados evolutivos, detectando algunas de las modificaciones más esenciales en su diferenciación. De aquí en adelante se ha recurrido al procesamiento de todos los datos posibles a través de un equipo automatizado de mediciones incorporado al fotomicroscopio; con ello se ha provocado que los valores conseguidos sean más exactos y la valoración más objetiva.

En primer lugar se ha podido comprobar que los núcleos de las neuronas integrantes del N.so. en los ejemplares intrauterinos de 20 días poseen forma distinta y superficie menor que en los otros ejemplares. Esta forma es en general algo ovalada y el contenido ópticamente denso, sin presencia de grandes zonas claras (Fig.38).

En los núcleos neuronales de los embriones de 22 días, se aprecia un ligero aumento de los diámetros y áreas nucleares. Las zonas oscuras han disminuido en las secciones nucleares y la célula aparece algo más clara. (Fig.39).

En los embriones de 23 días, las secciones de los cuerpos neuronales muestran un aumento discreto del área de sección nuclear, los núcleos son más redondeados, disminuyen ligeramente las zonas correspondien

tes a los bloques ópticamente densos y aumentan los espacios claros. (Fig.40).

En los ejemplares nacidos de 15 días, se con-
prueba que las secciones de los núcleos neuronales au-
mentan en área y zonas claras a la vez que se hacen más
redondeadas (Figs.41-42).

En trabajos realizados por Fernandez-Ruiz -
(1973) en el hamster dorado, ya se evidenció la exis-
tencia en el N.so. de dos clases de neuronas, las de -
tipo I con núcleo claro y numerosos gránulos de neuro-
secreción y las tipo II, con núcleo más oscuro y cito-
plasma con cantidad muy variable de tales gránulos.

Con relación al nucleolo, la mayoría de las
neuronas presentan un único corpúsculo; esporadicamen-
te se han encontrado neuronas binucleoladas pero nunca
con más de dos nucleolos (Irwin '72). En los períodos
tempranos del desarrollo es más frecuente visualizar -
núcleos con dos nucleolos pero su significado estadís-
tico es muy pequeño. Por otra parte debemos tener en -
cuenta que en los periodos tempranos del desarrollo em-
brionario, el material ópticamente denso es muy abundan-
te y al efectuar la determinación citofotométrica, pue-
de haber un cromocentro que muestre características de
extinción y tamaños semejantes a los de un nucleolo. -
Para resolver esta dificultad será preciso aplicar tin-
ciones nucleolares específicas, que permitan distinguir
netamente entre un nucleolo y un cromocentro. La posi-
ción del nucleolo suele ser casi siempre algo excéntri

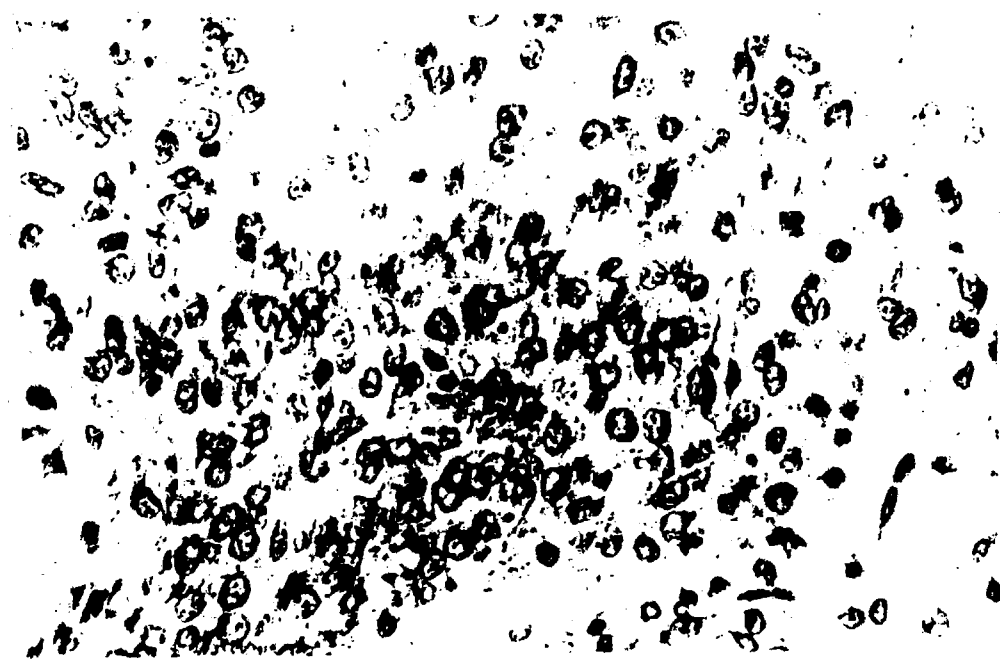
Fig. 38. Imágenes de la zona intermedia del N. so. de un embrión de rata de 20 días.

- a. Es patente la elevada densidad celular de las neuronas que integran este núcleo. (Obj. 40 x).
- b. Vista parcial del N. so; las neuronas de este núcleo muestran una cromofilia mayor que la de las neuronas colindantes. (Obj. 40 x).

112

20 i.u.

a



b

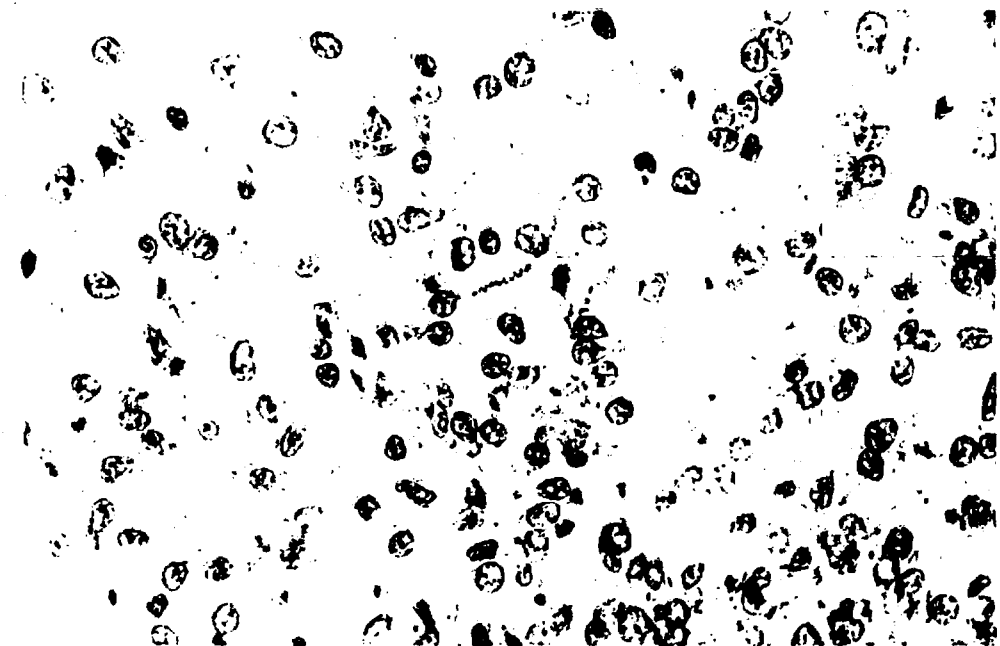
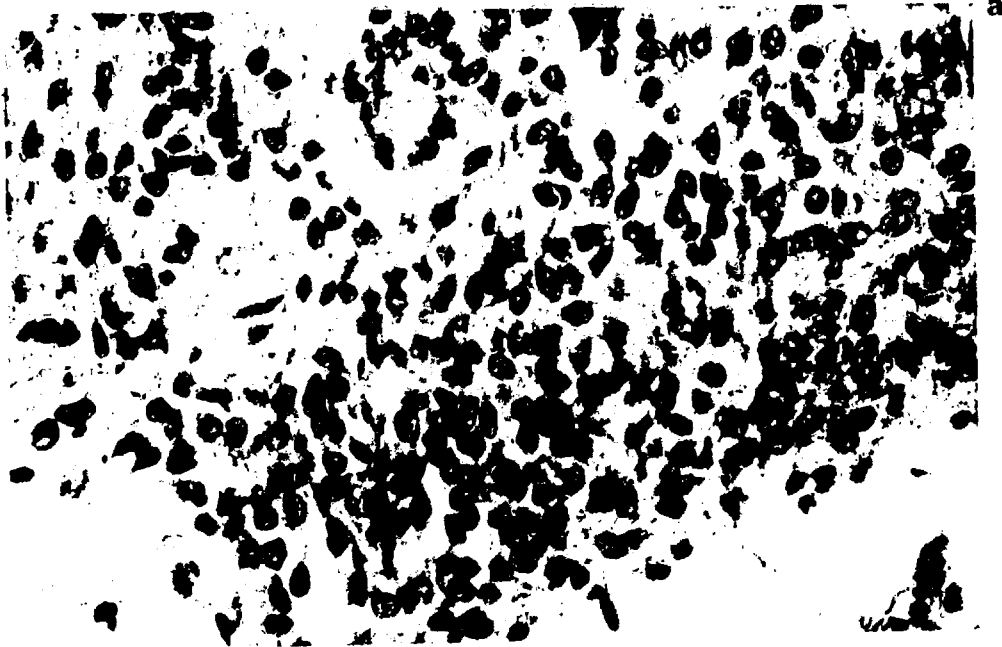


Fig. 39. Zona intermedia de un ejemplar embrionario de 22 días, correspondiente al N. so.

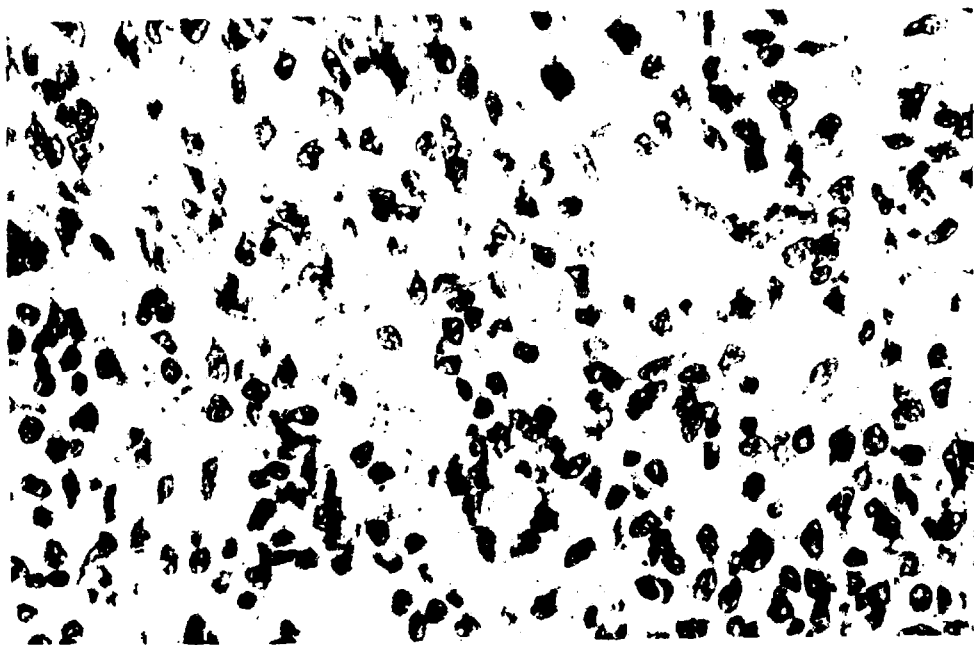
- a. Las fibras de la cintilla óptica resaltan colindantes al conjunto compacto formado por neuronas fuertemente teñidas . (Obj. 40 x).
- b. Los núcleos neuronales dispersos, se señala como característica de este estadio la fuerte densidad del contenido nuclear. (Obj. 40 x).

434

22 i.u.



a



b

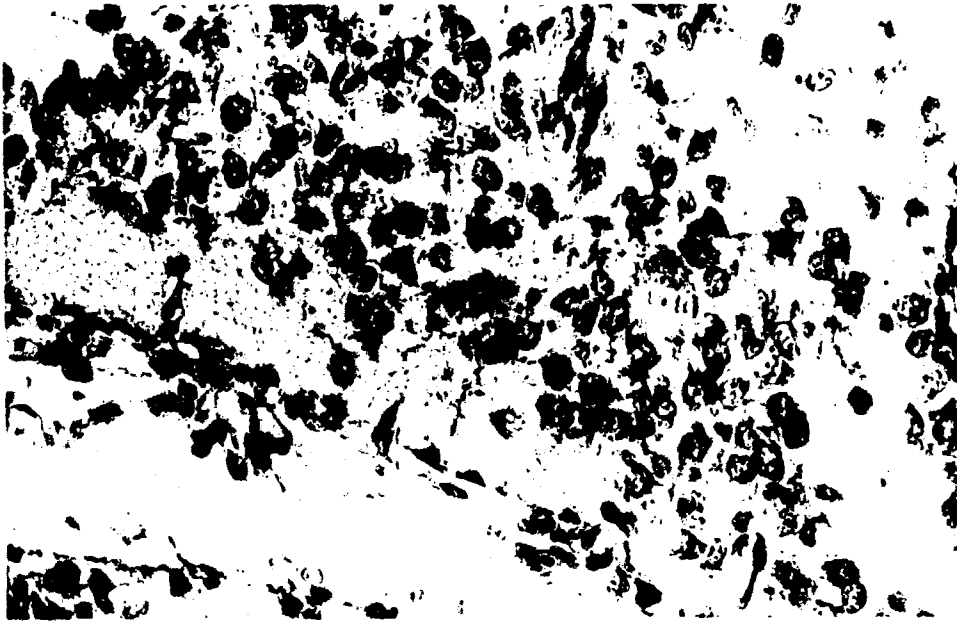
Fig. 4C. Encéfalo del N.so. de embrión de rata de 23 días.

- a. Corte histológico correspondiente a la zona intermedia del N.so., con su máximo desarrollo. (Obj. 40x)
Las neuronas se disponen de forma laminar.
- b. Microfotografía de un grupo neuronal con límites nucleares bien definidos y con material cromatínico de distinta densidad y distribución desordenada. (Obj. 100x).

136

23 i.u.

a



b

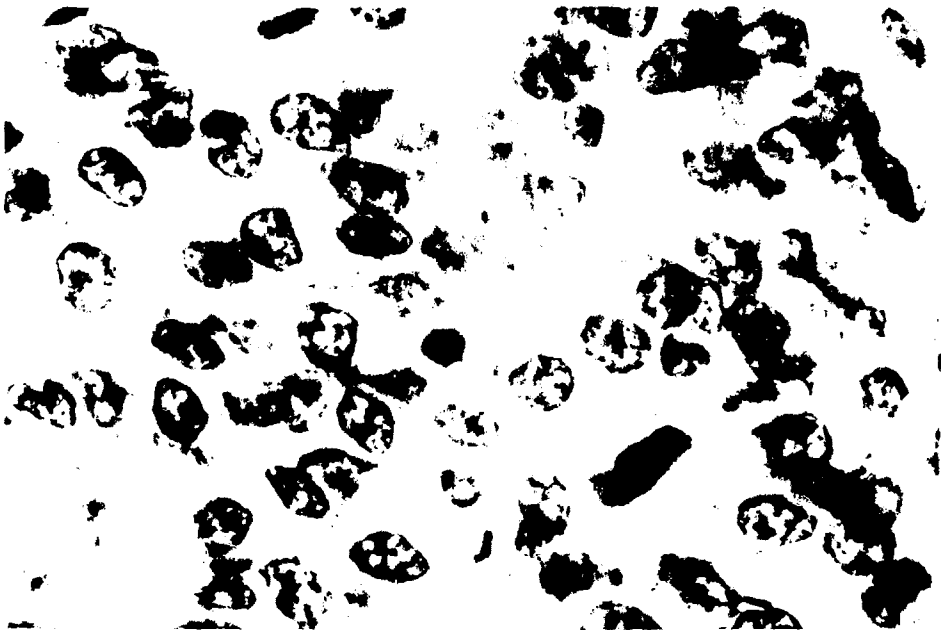
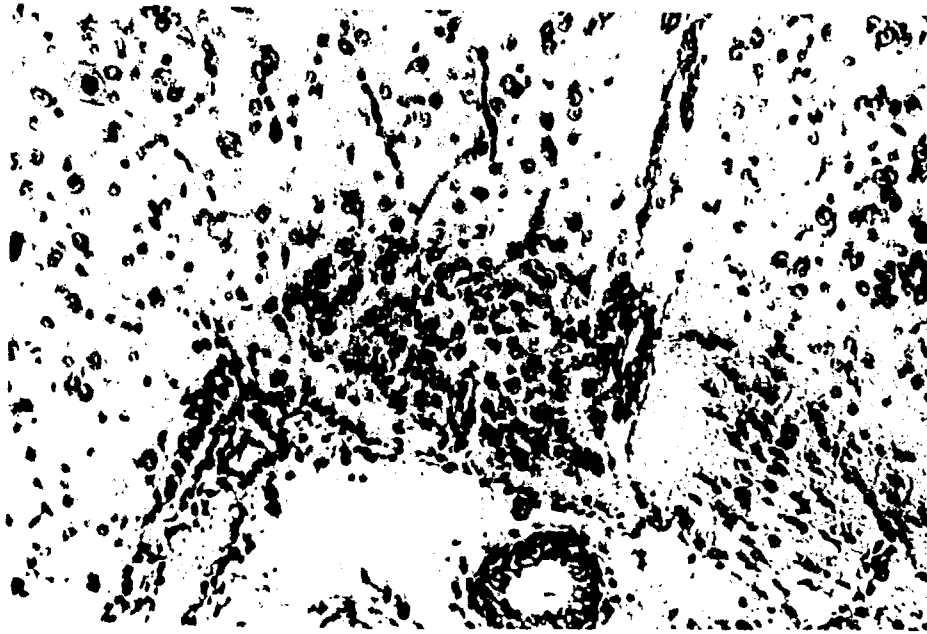
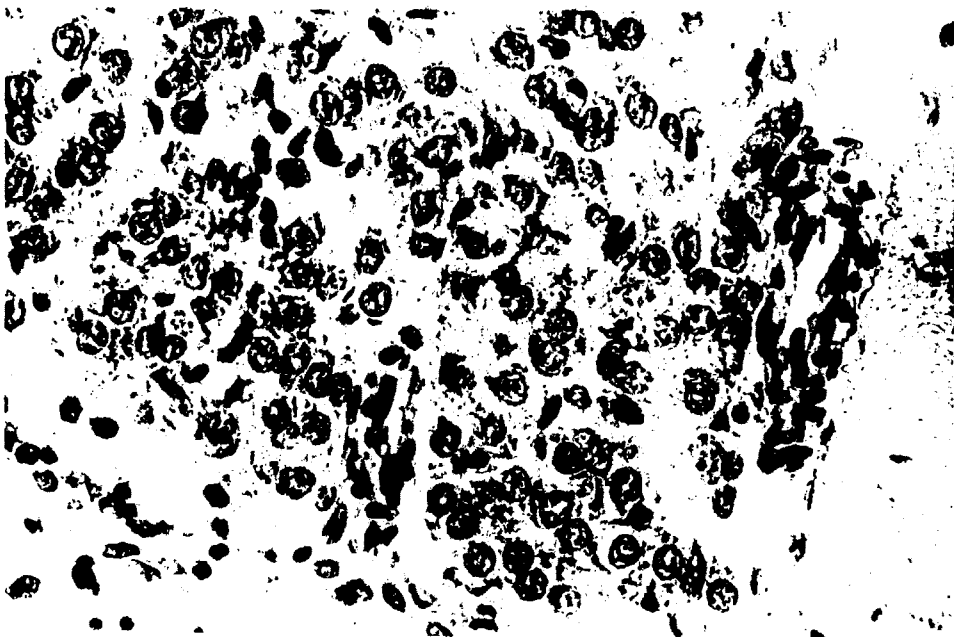


Fig. 41. Panorámica del N.so. de ejemplar nacido de 15 días.

- a. El N.so. presenta una abundante vascularización. Se destacan células gliales y endoteliales próximas al núcleo. Se aprecia el núcleo supraóptico difuso. (Obj. 16x).
- b. La misma panorámica a mayor aumento (Obj. 40x). Se distinguen con claridad los nucleolos en posición excéntrica en el interior del núcleo, y las neuronas con doble nucleolo. Los elementos gliales y sanguíneos son más evidentes que en la imagen superior.



a



b

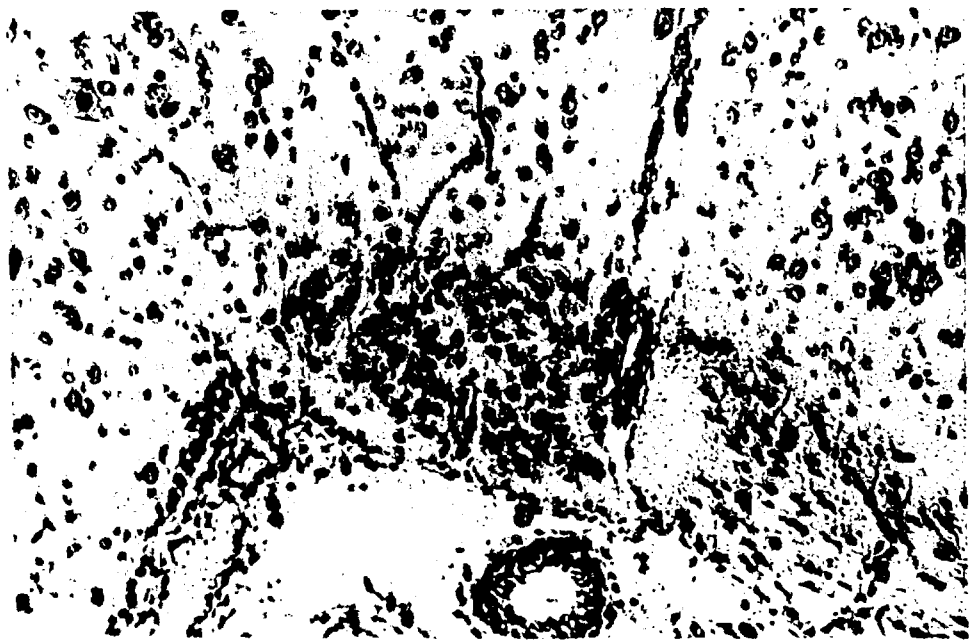
Fig. 41. Panorámica del N.so. de ejemplar nacido de 15 días.

- a. El N.so. presenta una abundante vascularización. Se destacan células gliales y endoteliales próximas al núcleo. Se aprecia el núcleo supraóptico difuso. (Obj. 16x).
- b. La misma panorámica a mayor aumento (Obj. 40x). Se distinguen con claridad los nucleolos en posición excéntrica en el interior del núcleo, y las neuronas con doble nucleolo. Los elementos gliales y sanguíneos son más evidentes que en la imagen superior.

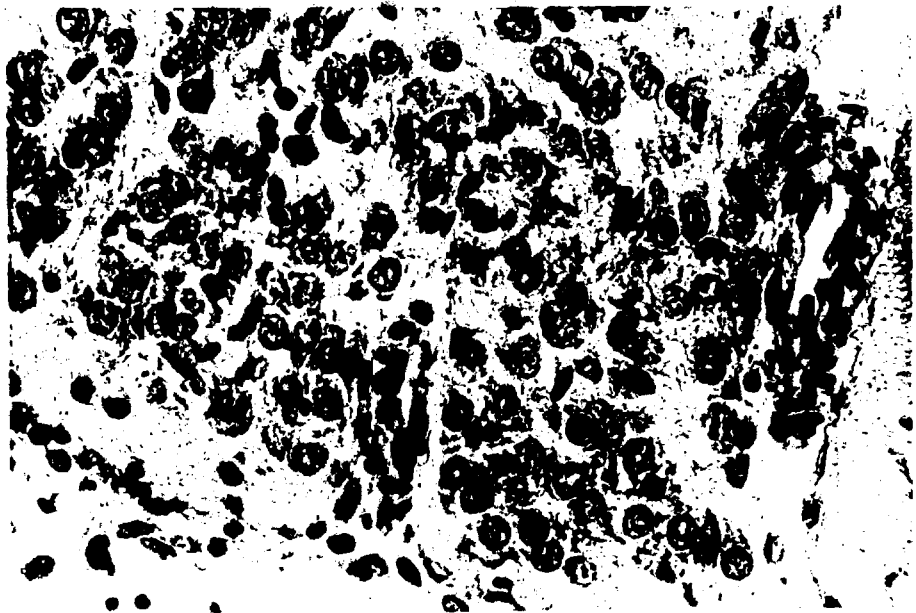
139 h

15 p.p.

a



b



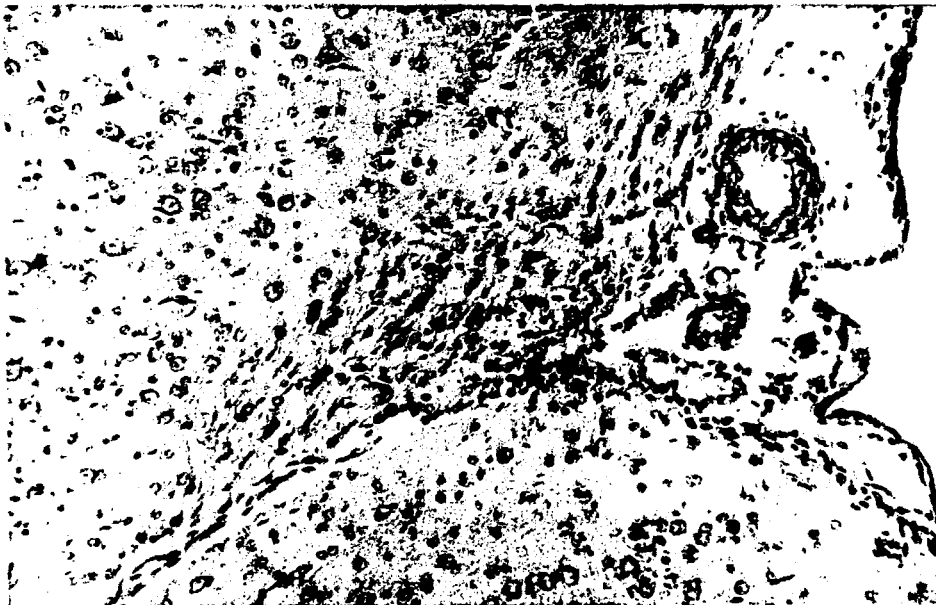
140

Fig. 42. Imagen microscópica del N.so. de un ejemplar nacido de 15 días.

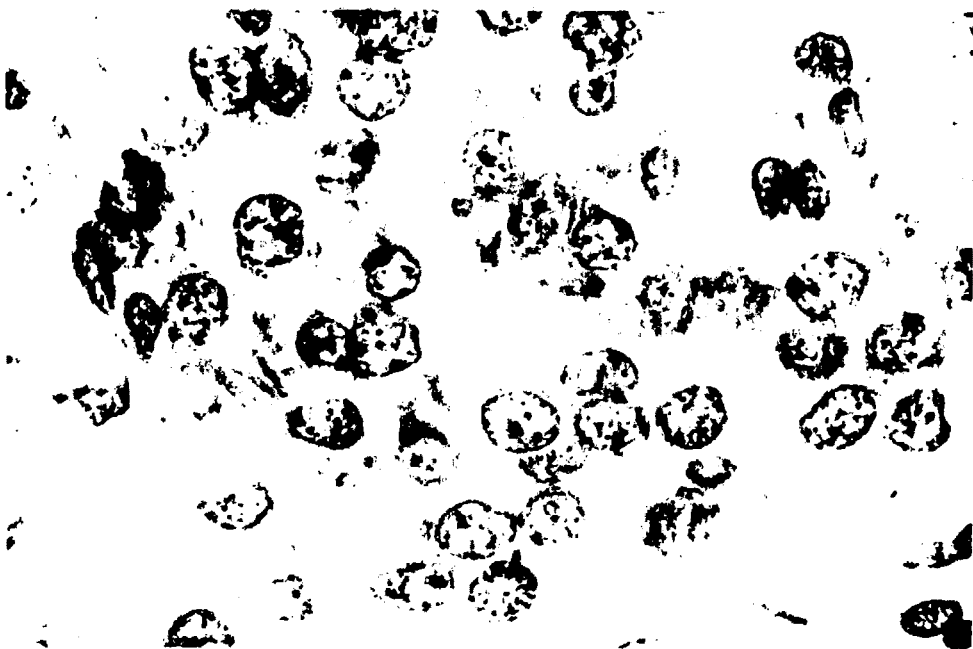
- a. Corte correspondiente a la parte posterior del núcleo supraóptico. Los elementos gliales son muy abundantes. (Obj. 16x).
- b. Microfotografía de núcleos neuronales mostrando las características específicas de este periodo evolutivo. (Obj. 100x).

14061

15 p.p.



a



b

co.

6.3.1.1. Distribución de densidades ópticas y áreas de secciones nucleares.

El estudio de las áreas de secciones nucleares se ha llevado a cabo en las zonas anterior, intermedia y posterior del N.so. de los embriones de rata - de 20, 22 y 23 días y en la rata nacida de 15 días.

La disposición del contenido nuclear es desordenada, aparecen zonas con densidades ópticas muy altas junto con otras con valores muy bajos. Hemos comprobado que los núcleos neuronales de los embriones de 20 días poseen una densidad óptica media más elevada que los de 22 días y estos a su vez, superan a los valores densiométricos obtenidos en los embriones de 23 días. Las ratas nacidas de 15 días son las que consiguen cifras de extinción más bajas. Existe una relación inversa entre evolución y densidad óptica, los individuos más evolucionados presentan un núcleo con menor densidad óptica. Este hecho, es lo suficientemente significativo como para poder afirmar que los núcleos de las neuronas del N.so. al evolucionar, van haciéndose más claros. (Figs.43-46).

Analizando las áreas medias de secciones nucleares (Cuadros 5 y 6), se aprecia un aumento progresivo del tamaño nuclear ya que el área media nuclear - de todas las zonas correspondientes a los embriones de 20 días es de $50,79 \mu^2$, de los embriones de 22 días es de $54,98 \mu^2$, de los embriones de 23 días de $58,83 \mu^2$ y

CARL REISS DATA 22E 58-5 311

1111000 000000

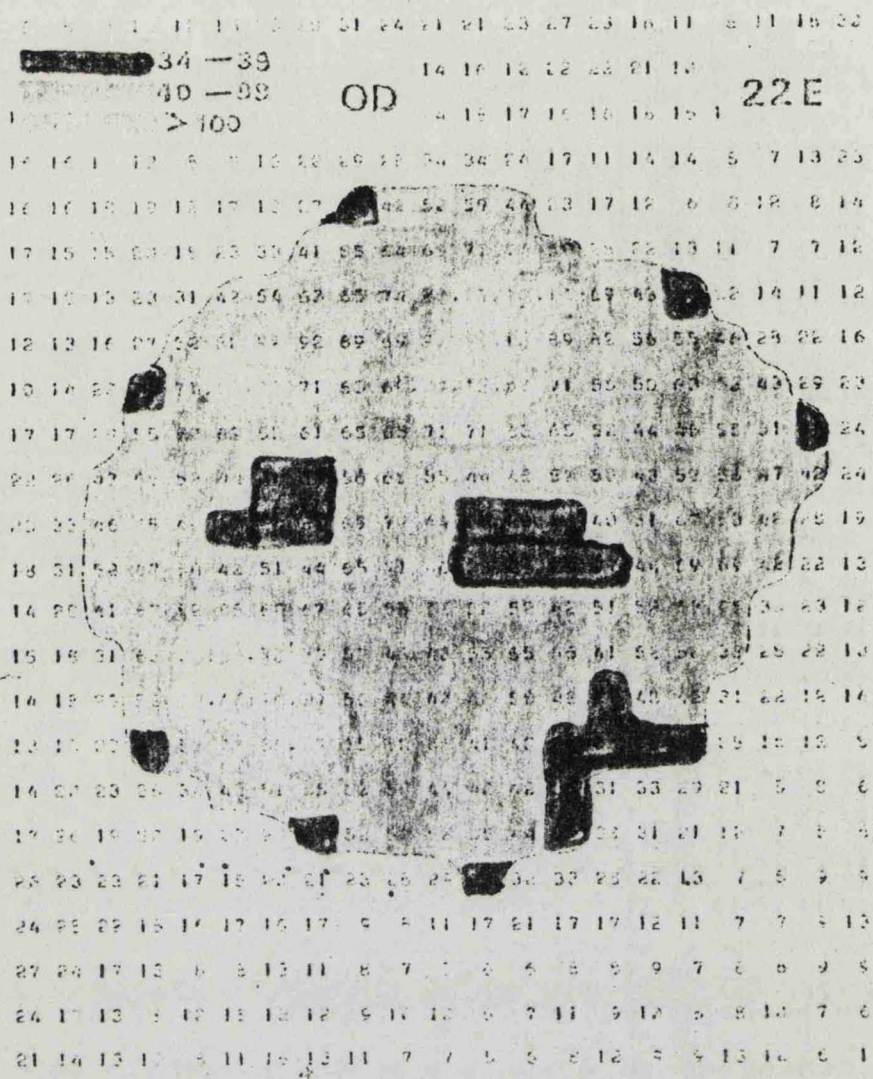


Fig. 44. Representación cuantitativa de la distribución del contenido nuclear de una neurona correspondiente a la zona media del N.so. de rata de 22 i.u.. Las zonas con DO bajas son frecuentes y su distribución es variable. Existen dos nucleolos con posiciones ligeramente excéntricas y un microárea ópticamente densa.

144

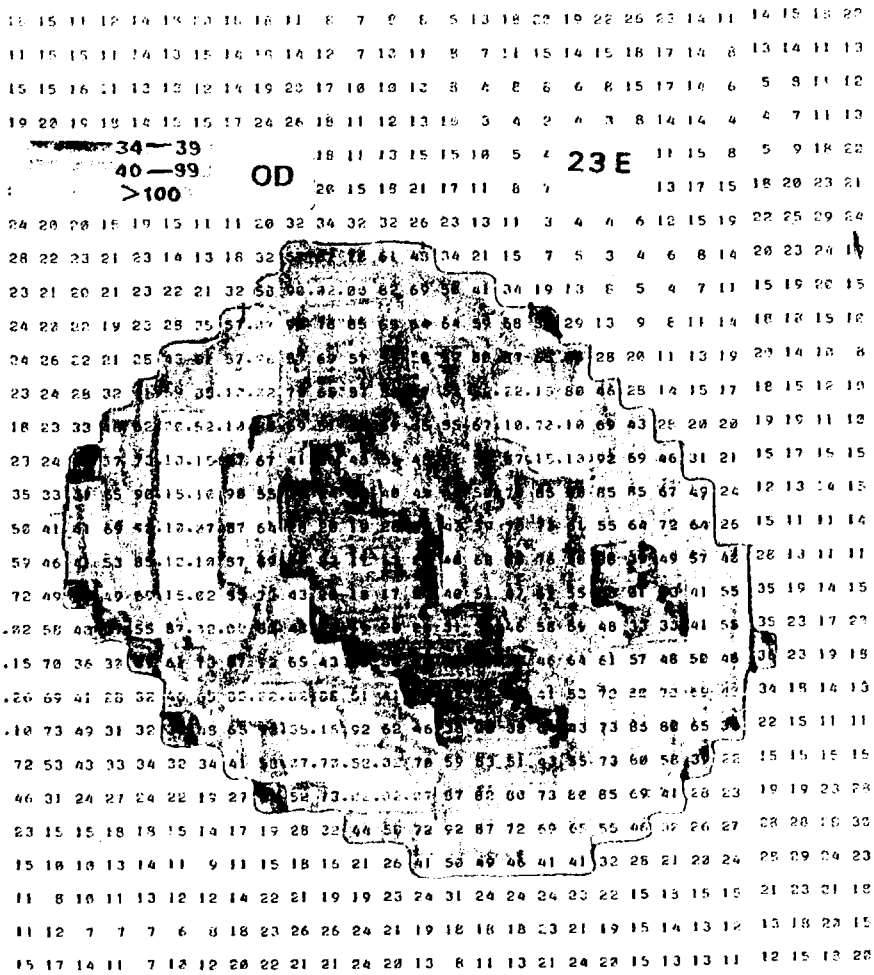


Fig. 45. Representación cuantitativa de la distribución del contenido nuclear de una neurona correspondiente a la zona posterior del N.so. de rata de 23 i.u. Las zonas con DO bajas son extensas y su distribución es variable. Existen dos nucleolos y dos zonas ópticamente densas.

la de las ratas nacidas de 15 días de $81,20 \mu^2$. Si comparamos el área nuclear de las neuronas de los embriones de rata de 20 días con el área nuclear de los postnatales de 15 días, se comprueba que hay un espectacular aumento del 158 %.

Con respecto al tamaño nuclear y nucleolar, en estudios previos (Ifft, '65; Irwin, '72), se han comprobado variaciones en relación con el balance hídrico de los animales. Esto podría admitirse aquí como factor determinante del aumento del tamaño del núcleo neuronal de las ratas nacidas con respecto a los embriones.

En el estadio embrionario de 20 días, los núcleos que alcanzan una mayor magnitud en micras cuadradas de sus secciones son aquellos que ocupan la zona intermedia del N.so., siguen en descenso los que están posicionados en la zona anterior y las menores áreas corresponden a aquellos que integran la zona posterior.

En los embriones de 22 días las áreas nucleares mayores se sitúan en las zonas anterior y posterior quedando áreas menores para los comprendidos en la zona intermedia. Existe por tanto un cambio progresivo - alternante en cuanto al crecimiento nuclear en las zonas anterior, intermedia y posterior del N.so..

En los embriones de 23 días y las ratas nacidas de 15 días existe concordancia del orden establecido para tamaños nucleares en las tres zonas estudiadas. Las áreas mayores de secciones nucleares corresponden

a la zona posterior, siguen en descenso las de la zona intermedia y las áreas menores corresponden a la zona anterior.

6.3.1.2. Aplicación de métodos estadísticos.

Obtenido el valor medio de las áreas nucleares de las muestras analizadas, lo primero que interesa conocer, es si los datos seleccionados están dentro de unos límites correctos ya que el valor aislado de la media no aporta un resultado estadísticamente fiable. En la muestra pueden existir valores muy dispares que se alejen sensiblemente del valor de la media, por lo que antes de aplicar métodos estadísticos más complicados es necesario comprobar si nos encontramos ante una muestra en la que todos los elementos pertenecen a una misma categoría. Para este análisis hemos comprobado que las muestras pertenecientes a las zonas anterior, intermedia y posterior de todos los ejemplares de rata estudiados, se ajustan a una curva de Gauss con un único punto de inflexión. Después de hallar la media aritmética (\bar{x}) y establecer los intervalos de confianza de la media más, menos, dos veces el valor de la desviación de la muestra ($\bar{x} \pm 2\sigma$), se comprobó que todos los valores de las áreas nucleares pertenecientes a cada zona estaban dentro de los límites de confianza establecidos, pudiéndose determinar la existencia de una única población neuronal en cuanto a tamaños nucleares dentro de cada zona estudiada en cada ejemplar analizado.

Con los datos obtenidos, se pudo aplicar un análisis de varianza con el fin de saber si las tres muestras neuronales correspondientes a las zonas anterior, intermedia y posterior del N.so. de cada individuo estudiado eran iguales o pertenecían a poblaciones neuronales diferentes.

Para llevar a cabo el análisis de varianza es necesario hallar el cuadrado de la dispersión de las medias (SS_M) y el cuadrado de la dispersión de los datos (SS_T). Una vez obtenidas estas cifras, se dividen por los grados de libertad ($k-1$) y nos dan los valores de la varianza media (V_M) y la varianza de la dispersión de los datos (V_T). A través de estas varianzas se obtiene la "F de Sneider", valor que al compararlo con el las tablas nos indicará si las muestras son significativamente iguales o diferentes. También se puede constatar la relación que existe entre las columnas, así como entre las filas. Para ello es necesario hallar la dispersión de los datos residual, la total, la debida a las columnas y la debida a las filas, así como sus varianzas correspondientes. Una vez realizado este proceso, se obtiene la F de Sneider para las columnas (F_c) y para las filas (F_r) pudiendo ser comparadas con los valores presentados por las tablas.

Practicado el análisis de varianza (Cuadro 7) para las áreas nucleares de las tres zonas del N.so. - de los embriones de 20, 22 y 23 días y de las ratas nacidas de 15 días, se obtuvieron los valores correspon-

dientes a la "F" de Sneider para poder compararlos con los valores presentados por las tablas de Fisher para un índice de confianza de un 95%.

En todos los casos se comprobó como la F_c y la F_r del cuadro 7, eran superiores a las encontradas en las tablas, determinando la existencia de tres poblaciones neuronales distintas para cada uno de los -- ejemplares analizados.

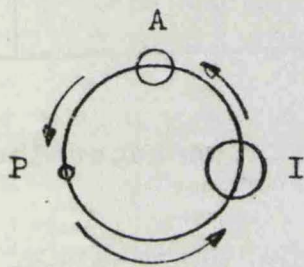
Comparando los cuatro estadios evolutivos estudiados entre sí, reflejan valores muy distintos para la F_c y F_r . Los embriones de 22 días son los que muestran un valor de F_c superior al resto, significando que presentan las mayores diferencias nucleares entre sus tres zonas. Las ratas nacidas de 15 días tienen una F_r superior al resto, lo cual indica que para niveles de áreas nucleares comparables para las zonas anterior, intermedia y posterior, las diferencias entre sus tamaños son superiores a las encontradas en los estados embrionarios.

Los embriones de 23 días muestran variaciones menores entre las tres poblaciones neuronales existentes en el N.so..

Parece ser que existe un gradiente de posicionamiento celular según el tamaño del núcleo neuronal en las tres zonas del N.so., que va variando con la edad de la rata. En los embriones de 20 días las neuronas con núcleos más pequeños, se encuentran situados en la zona posterior. En los embriones de 22 días cambian

su situación para posicionarse en la zona intermedia. En los embriones de 23 días migran a la zona anterior donde parece ser que se establecen definitivamente para no cambiar de lugar en las ratas nacidas. Las neuronas con núcleos de tamaño intermedio, sufren también sucesivos desplazamientos según la edad de la rata. En los embriones de 20 días ocupan gran parte de la zona anterior, migran a la zona posterior en los embriones de 22 días para desplazarse de nuevo a la zona intermedia en los embriones de 23 días donde permanecen definitivamente. Las neuronas con núcleos grandes se sitúan en la zona intermedia en los embriones de 20 días, van a la zona anterior en los embriones de 22 días y por último migran a la zona posterior en los embriones de 23 días quedándose en esta zona de forma permanente.

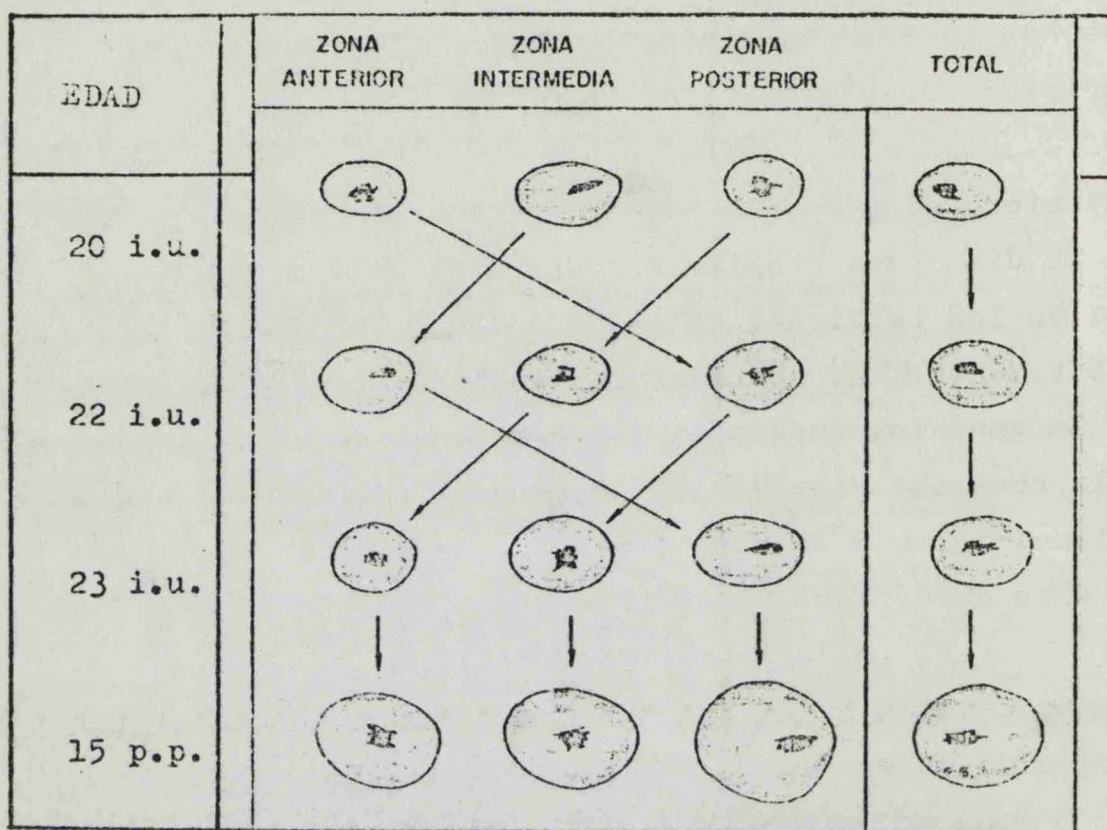
El posicionamiento definitivo de los tres tipos de células según los tamaños del núcleo, queda establecido en el día 23 de la gestación. Las migraciones



celulares no se producen indiscriminadamente sino que siempre siguen una trayectoria en dirección contraria a las agujas del reloj.

Parece ser que estas variaciones de posicionamiento celular, guardan relación con el aumento del número de células que se produce en el N.so. durante la evolución de la rata. Las células que llegan al nú-

cleo para formar parte de él durante el desarrollo de la rta, no se sitúan directamente en su lugar definitivo, por lo que sufren migraciones hasta posicionarse definitivamente.



Cuadro 15.

Todos estos resultados nos permiten hacer las siguientes conclusiones:

- 1) Durante la evolución las células con núcleos pequeños se sitúan primero en la zona posterior, - pasan a la zona intermedia para colocarse definitivamente en la zona anterior.
- 2) Las neuronas con núcleos medianos inicialmente - se sitúan en la zona anterior, alcanzan la zona posterior para finalmente dirigirse hacia la zo-

- na intermedia para establecerse permanentemente.
- 3) Las neuronas con núcleos grandes se colocan en principio en la zona intermedia, pasan a la zona anterior y por último se sitúan en la zona posterior.
 - 4) Ninguna célula se sitúa definitivamente en una zona al integrarse como conjunto neuronal en el N.so..
 - 5) Durante el desarrollo embrionario las células con núcleos pequeños migran siempre en sentido postero-anterior y atraviesan solo una zona del N.so. cada día.
 - 6) Dependiendo del día del desarrollo embrionario, las células con núcleos medianos y grandes cambian el sentido de migración y varía la distancia de desplazamiento.
 - 7) A través del desarrollo embrionario las células con núcleos medianos y grandes, se desplazan a otras zonas del N.so. con mayor velocidad que las células con núcleos pequeños.
 - 8) Durante la evolución, las neuronas supraópticas migran en sentido contrario a las agujas del reloj hasta alcanzar su posición definitiva.
 - 9) En el N.so. las migraciones celulares ocurren hasta el día 23 de la gestación, donde las células se establecen de forma permanente.

Comprobados estos hechos, quisimos saber si las poblaciones neuronales correspondientes a las zonas an-

teriores de los cuatro periodos evolutivos estudiados, a las zonas intermedias de todos los ejemplares analizados y a las zonas posteriores de los mismos, eran estadísticamente iguales o diferentes. Se aplicó de nuevo el análisis de varianza (Cuadro 8). Hallada la F de Snedider para las áreas nucleares de las zonas anteriores, se obtuvo un valor significativamente superior al encontrado en las tablas, implicando que las zonas anteriores de los embriones de ratas de 20, 22 y 23 días y las post-natales de 15 días contienen poblaciones celulares diferentes en cuanto al tamaño de sus núcleos. Haciendo esta misma valoración para las zonas intermedias de todos los ejemplares estudiados, se obtuvieron conclusiones similares a las de las zonas anteriores, es decir, que las zonas intermedias contienen poblaciones celulares diferentes entre si, debido a las diferencias existentes entre las áreas nucleares. Las zonas posteriores mantienen esta misma correspondencia, pudiendo determinar que son cuatro poblaciones neuronales distintas por poseer diferencias significativas entre las áreas nucleares de las células estudiadas. Además se puede demostrar que las diferencias para cada zona son bastante similares puesto que los valores correspondientes a sus F_c son parecidos en los cuatro estadios del desarrollo analizados.

Para comprobar las posibles variaciones en cuanto a formas nucleares, se ha hecho un estudio estadístico de la relación entre los diámetros nucleares -

semojante al realizado para las áreas. Se dividió el -
diámetro menor por el mayor con el fin de determinar -
un factor de forma Cuadros 9 y 10).

Los embriones de rata de 20 días, considerando
el conjunto de las tres zonas del H.sc., poseen un
factor de forma de 0,84 significando que la diferencia
entre los dos diámetros no es muy acusada y por lo tanto
los núcleos neuronales son discretamente ovalados.
Analizando cada zona por separado, se comprueba que la
parte anterior con un factor de forma de 0,83 posee núcleos
discretamente más ovalados; la zona intermedia -
con un factor de forma de 0,81 muestra núcleos algo más
alargados y la zona posterior con un valor de 0,88 es
la que presenta núcleos menos fusiformes, siendo esta
la zona que más se acerca a la esfericidad nuclear.

Los embriones de 22 días muestran un factor
de forma de 0,85 siendo los núcleos neuronales ligeramente
ovalados. La zona anterior con un valor de 0,87
es la que tiene núcleos de mayor esfericidad, seguida
de la zona intermedia con un valor de 0,85 y de la posterior
con 0,84.

Los embriones de 23 días presentan un factor
global de forma de 0,85. Los núcleos de las zonas anterior
e intermedia, poseen un factor de forma de 0,88 -
siendo bastante más esféricos que los de la zona posterior
cuyo valor es de 0,81.

Las ratas nacidas de 15 días reflejan un valor
de 0,89 para el conjunto de las tres zonas del --

N.so., cifra relativamente próxima al valor de 1 representante de la esfera. Las células de la zona anterior tienen los núcleos más ovalados con un valor de 0,87. Las zonas intermedia y posterior, alcanzan una cifra de 0,81 por lo que son los núcleos más esferoidales de todos.

Así pues, existe un gradiente que tiende a - que los núcleos adopten un factor de forma próximo a la esfericidad según avanzan a estados evolutivos más desarrollados, de tal forma que los núcleos neuronales - de los embriones de 20 días son los más ovalados, los de 22 y 23 días son algo más redondeados y los de las ratas nacidas de 15 días son los que más se aproximan a la esfericidad.

Aplicando el análisis de varianza para los - cuatro periodos evolutivos estudiados, se hallan los - valores correspondientes a la F de Sneider y se comparan con las tablas (Cuadro 11).

Para los embriones de 20 días el valor de la F es muy superior al de las tablas y al encontrado en el resto de los ejemplares, significando que además de ser los que tienen los núcleos más ovalados, son los - que presentan una mayor variación en cuanto a la forma nuclear entre las zonas anterior, intermedia y posterior, pudiendo ser consideradas como tres poblaciones celulares distintas en cuanto a formas de los núcleos.

Los embriones de 22 días, por tener una F in

ferior a la hallada en las tablas, muestra una única - población celular en relación a la forma de sus núcleos aunque existen ligeras diferencias, las cuales no son significativas.

Los embriones de 23 días muestran una F muy próxima a la de las tablas, pudiendo considerarse prácticamente como una única población neuronal en cuanto a formas nucleares entre las zonas anterior, intermedia y posterior.

En las ratas nacidas de 15 días la F vuelve a tener valores inferiores a las tablas, indicando la presencia de una única población celular con respecto a formas nucleares para las zonas anterior, intermedia y posterior del N.so..

Esto nos indica que en los embriones jóvenes, las células en las tres zonas, no han adquirido todavía la forma definitiva y tienen que sufrir pequeñas variaciones hasta conseguir la madurez, haciéndose sus núcleos más redondeados.

Comparando las formas nucleares de las zonas - anteriores de todos los ejemplares estudiados, de las zonas intermedias de los mismos ejemplares y de las zonas posteriores, mediante la aplicación del análisis - de varianza (Cuadro 12), se ha comprobado que en las - zonas anteriores, la F de Sneider tiene un valor inferior al de las tablas indicando que no hay variación - significativa en cuanto a las formas nucleares a lo largo de la evolución. Para las zonas intermedias y poste-

ricres, se obtiene una F similar y no muy superior a la de las tablas, lo cual quiere decir que la variación que muestran los núcleos celulares a través de la evolución con relación a la forma, no es muy grande.

En los estudios morfológicos actuales, no se menciona la posible existencia de tres tipos de neuronas diferentes en el N.so. de rata. Fernández Ruiz y cols. ('73) describen en el N.so. del hamster dorado, dos tipos de neuronas claras y oscuras, tal como aparecen en la imagen al microscopio electrónico; posiblemente se trata de dos estados funcionales de la misma estirpe celular.

Por otro lado, existe una gran evidencia de que las aferencias a las células neurosecretoras del N.so. implican la existencia de receptores adrenérgicos, colinérgicos de tipo muscarínico y colinérgicos de tipo nicotínico, los dos primeros inhibidores y el tercero excitador (Barker y cols, '71). Estas aferencias son primariamente ajenas a la regulación osmolar por la vasopresina, la hormona específica del N.so.; provienen tales aferencias de segmentos más caudales del neuroeje, en relación con las vías sensitivas para el dolor, sensibilidad muscular y gustativa, utilizando principalmente el fascículo longitudinal dorsal en el tronco cerebral, como vía polisináptica ascendente. Otras aferencias son en cambio descendentes a partir del bulbo olfatorio, certeza piriforme y tubérculo olfativo, a través del haz prosencefálico medial. Aunque los detalles anatómicos no son todavía conocidos es lo cierto

que la osmólisis influye directamente sobre la regulación osmolar y balance hídrico (Sawyer y Gerhardt, '56) y que la estimulación eléctrica del bulbo olfativo tiene un efecto excitatorio sobre células osmosensitivas del N.so. (Hayward, '72).

Por otra parte, Rechart, ('69), ha deducido de sus observaciones ultraestructurales e histoquímicas que existe una doble población neuronal en el N.so., con terminaciones axo-somáticas, axo-dendríticas y axo-axónicas, que albergan tres tipos de vesículas neurotransmisoras. Lo más interesante en este aspecto es quizás el estudio electrofisiológico de Vincent y Hayward, ('70) y Hayward ('72) sobre células individuales del núcleo supraóptico en el mono rhesus bajo condiciones de vigilia normal perfectamente ajustada. Postulan la existencia de neuronas osmoreceptoras (de tamaño intermedio), ya intuitas por Verney ('47) en contacto directo con paredes capilares y con axón corto cuyas terminaciones sinápticas con efecto excitatorio sobre el soma de las células grandes neurosecretoras, cuyo cilindroeje se integra en el haz supraóptico-hipofisario para descargar la vasopresina en los capilares neurohipofisarios. Admiten también la existencia en el axón de colaterales tempranas que cierran un pequeño circuito inhibitorio a través de unas hipotéticas neuronas del tipo Renshaw medulares, con cuerpo celular pequeño. Si bien, la demostración anatómica de estas interpretaciones está fuera del alcance del tra-

bajo de esta tesis, es ciertamente sugestivo, consideramos como muy probable, que los tres tipos celulares demostrados estadísticamente sobre los parámetros de diámetro nuclear pueden corresponder, en escala descendente de diámetro a:

- 1º) las células neurosecretoras
- 2º) a las células osmorreceptoras de Verney
- 3º) a las células inhibitoras tipo Renshaw.

Recuérdese la riqueza capilar del H.so., precisamente en íntima vecindad con neuronas.

6.3.2. Análisis poblacional

Con los datos proporcionados por los mapas de distribución de densidades celulares, se ha efectuado el estudio del número de células, volumen del núcleo supraóptico, densidad celular y porcentaje de sustancia gris y blanca, en los embriones de 20, 22 y 23 días y nacidos de 15 días (Cuadros 13 y 14). Los hechos más destacables obtenidos son los siguientes: el N.so. en todos los periodos del desarrollo de la rata estudiados presenta una clara separación en tres zonas denominadas anterior, intermedia y posterior, lo cual confirma los resultados obtenidos por Luna, '69 e Irwin, '62, entre otros, quienes dividen al N.so. solamente en dos zonas: anterior (Soa) situada anterodorsal al quiasma óptico que en sección horizontal forma una ancha banda que se curva ligeramente alrededor del quiasma; y tuberal (Sot) formada por una línea de 1 a 3 células de profundidad a lo largo de la parte ventral del hipotálamo, desde el quiasma óptico hasta el borde posterior del núcleo ventromedial hipotalámico.

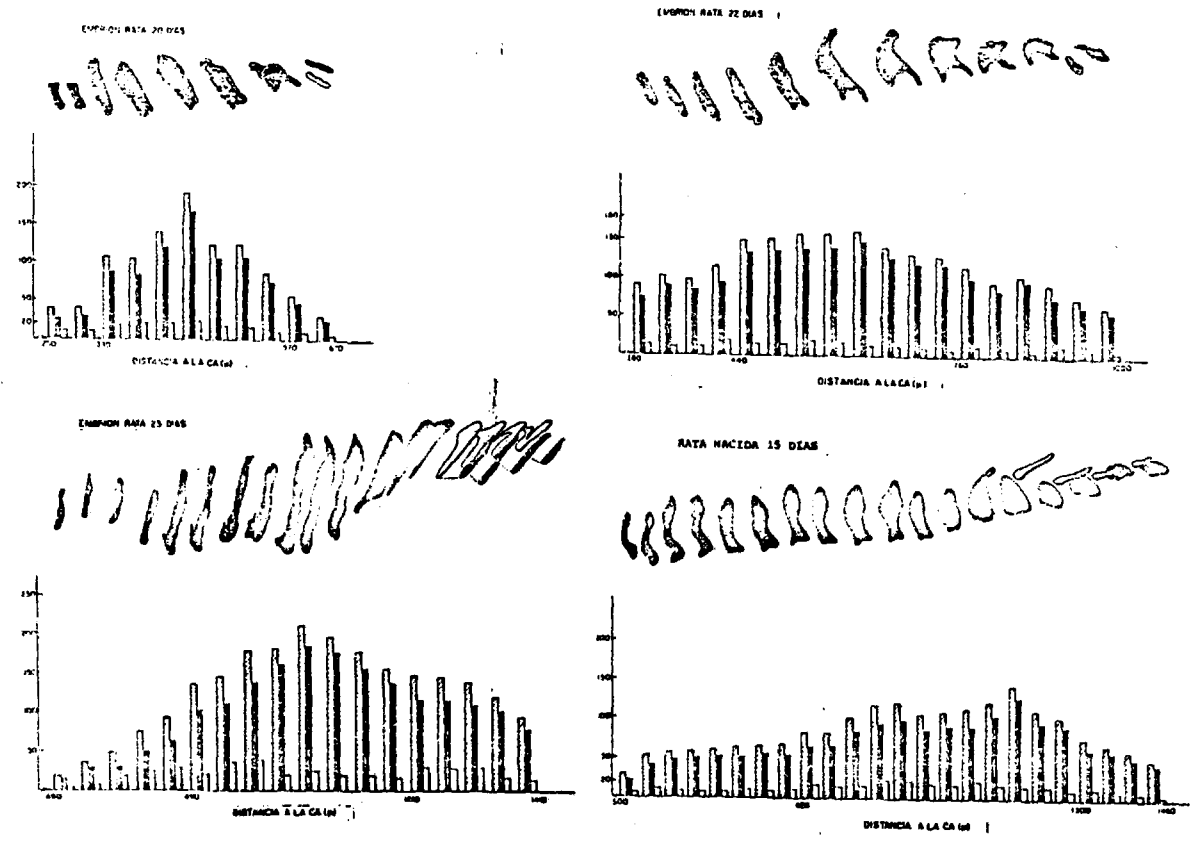
El N.so. de todos los ejemplares estudiados presenta la zona posterior dividida en dos partes asimétricas en cuanto a forma y tamaño denominadas dorsal y ventral, no existiendo una relación directa entre la extensión total rostro-caudal del núcleo y la extensión de la parte dividida en dos ramas (Kreig, '32).

Comparando la extensión antero-posterior ocupada por el N.so. en los cuatro estadios evolutivos es

tudiados, se observa cómo va aumentando desde los embriones de 20 días hasta los nacidos de 15 días, aunque el aumento más brusco (en cuanto a la extensión rostro-caudal), sucede en el paso de los embriones de 20 días a los de 22 días con un aumento de 300 u. Los embriones de 22 y 23 días muestran una misma extensión de 720 u. Los nacidos de 15 días aumentan 240 u respecto a los anteriores. (Fig. 47).

En cuanto al número de células del N.so. encontrado en los distintos periodos evolutivos, varía notablemente con respecto al hallado en los trabajos realizados por Irwin, '72, que obtiene un número total de células para el N.so. de rata de unas 5.824, número muy inferior al obtenido en nuestro trabajo para cada uno de los ejemplares analizados.

El volumen total y el número de células aumentan considerablemente desde los embriones de 20 días a los de 22 días. Los embriones de 23 días poseen un volumen total superior a los de 22 días, pero en cambio el número de células es ligeramente inferior, lo cual hace pensar que al comienzo del desarrollo embrionario, las células tanto gliales como neuronales, tienen las prolongaciones intercaladas con los cuerpos neuronales para irse posicionando, en periodos evolutivos más avanzados del desarrollo, de tal forma que los cuerpos neuronales queden agrupados ocupando un menor volumen, extendiéndose las prolongaciones en la misma dirección. Esto podría explicar también el porqué la densidad ce-



162

Fig. 47. Histogramas de las densidades celulares del N.so. de ratas de 20, 22 y 23 i.u. y 15 p.p.. Más detalles en la Fig. 31.

lular es mayor en los ejemplares nacidos que en los estados embrionarios.

Aunque la formación de las células supraópticas termina en el día 19 de la gestación de la rata, - la constitución celular del N.so. de un modo global, - no tiene lugar hasta el día 22 de la gestación.

El N.so. de las ratas nacidas de 15 días poseen un volumen bastante menor al ocupado por los embriones de 22 y de 23 días, así como un menor número de células. La pérdida celular entre los embriones de 23 días y las ratas nacidas de 15 días es de 4.499 células, cifra bastante considerable, pero más aparente que real ya que en su mayor parte es debida a la migración que sufren las células para formar el núcleo supraóptico difuso. La migración parece ser lineal (Fig. 6c) debido a un fenómeno de tensión de migración. No se ha comprobado cuantitativamente la presencia de estas células en el núcleo supraóptico difuso, por las limitaciones propias del método de trabajo.

Los valores correspondientes al porcentaje de sustancia gris y blanca y densidad celular indican qué proporción de las zonas está ocupada por células y cual es su distribución.

Analizando las diferencias existentes entre las zonas anterior, intermedia y posterior de cada ejemplar estudiado, se observa, como en todos los casos, - que la zona intermedia es la mayor en cuanto a volumen, y número de células. En los embriones, la zona poste-

rior es superior a la anterior, en ambas magnitudes, -
mientras que en las ratas nacidas de 15 días se inviert
te esta relación.

165

7. RESUMEN

7. RESUMEN

Se ha efectuado un estudio sobre el núcleo - supraóptico (N. so.) en diferentes periodos evolutivos de la rata blanca Wistar, utilizando un fotomicroscopio Zeiss conectado a un computador Digital PDP-12. El trabajo consta de dos partes:

a) Estudio a nivel de microscopía óptica convencional. Se fotografiaron secuencialmente los ejemplares - correspondientes a embriones de rata de 20, 22, 23 días y post-natales de 15 días, con el fin de determinar las características topográficas y morfométricas del N. so. no tratadas por otros autores. En base a las microfotografías, se realizaron modelos tridimensionales con sus proyecciones frontal, horizontal y lateral.

b) Estudio mediante citofotometría automatizada - de rastreo. Este sistema proporciona una serie de valores con los que se consiguen determinar características definitorias del N. so. y de sus neuronas integrantes. Se han medido las áreas de sección de núcleos y nucleolos así como diámetros nucleares de las neuronas, aplicando métodos estadísticos para averiguar el grado de - significación de los resultados. Con este equipo instrumental, se han obtenido mapas de distribución de densidades celulares. El estudio de estos mapas ha permitido conocer el volumen total del N. so., número total de células, proporción entre sustancias blanca y gris, densi

dad celular y una clara delimitación del contorno de la agrupación neuronal.

Los resultados obtenidos se discuten ordenadamente; se comparan entre sí los cuatro periodos evolutivos analizados y se hace referencia a otros autores tratando de definir subpoblaciones neuronales y discutir su posible interpretación.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- 1ª) El N.so. muestra un contorno muy irregular pudiendo subdividirse en tres zonas consecutivas: anterior, intermedia y posterior; esta última se bifurca en dos partes, una dorsal y otra ventral a la cintilla óptica.
- 2ª) La extensión del N.so., tanto en sentido rostro-caudal como latero-medial y dorsi-ventral, aumenta notablemente a lo largo del desarrollo embrionario; pero en todo caso permanece prácticamente invariable la forma y posición del conjunto respecto a los tres ejes citados.
- 3ª) La media de las áreas de sección de los núcleos en esta agrupación neuronal aumenta a lo largo del desarrollo ontogénico de la rata (desde $50,79 \mu^2$ - hasta $81 \mu^2$). Las secciones de los núcleos son inicialmente algo elípticas y van haciéndose circulares conforme se alcanzan fases más avanzadas.
- 4ª) En general, las neuronas supraópticas poseen un único nucleolo de posición algo excéntrica y de unos $4 \mu^2$ de área; en periodos embrionarios tempranos (20 días) es frecuente encontrar células binucleoladas. Respecto a los grupos de cromatina, son los embriones de 20 y 22 días los que muestran mayor cantidad de dicho componente nuclear.

- 5ª) La distribución celular, por tamaños nucleares de las neuronas es variable en las diferentes regiones, anterior, intermedia y posterior, durante el desarrollo del N.so. debido a migraciones de las neuronas en diferenciación, hasta su estabilización en una posición topográfica definitiva; esto acontece en el día 23 de la vida intrauterina.
- 6ª) Considerando la frecuencia máxima de distintos tamaños nucleares de las neuronas se demuestra la existencia de tres poblaciones celulares diferentes en el N.so. de todos los periodos evolutivos estudiados: neuronas con núcleo pequeño ($75,83 \mu^2$ para ejemplares nacidos), con núcleo intermedio ($80,79 \mu^2$ para ejemplares nacidos) y con núcleo grande ($87 \mu^2$ para ejemplares nacidos).
- 7ª) La distribución celular definitiva en el núcleo supraóptico es la siguiente: mayor proporción de neuronas con núcleo de tamaño pequeño en la zona anterior; mayor proporción de neuronas con núcleo de tamaño mediano en la zona intermedia; y mayor proporción de neuronas con núcleo de tamaño grande en la zona posterior.
- 8ª) El volumen total del N.so. aumenta considerablemente durante el desarrollo embrionario de la rata. Al comienzo de la evolución (embriones de 20 días) este volumen es mínimo ($13.374.720 \mu^3$) y en cambio es máxima la densidad celular; a los 23

días se alcanza un máximo en volumen (30.045.600 μ^3) y un mínimo en densidad.

- 9ª) El número de células del N.so. aumenta durante el desarrollo embrionario desde los 20 días (16.508) a los 22 días (38.910).
- 10ª) El N.so. de los animales de 15 días, tienen un número menor de neuronas (34,091) que los embriones más avanzados de 23 días (38.590), debido a la emigración que sufren algunas células para formar el núcleo supraóptico difuso.
- 11ª) La al menos aparente emigración celular, siempre sigue una trayectoria determinada respecto a la situación inicial (20 días i.u.) de tal forma que las neuronas situadas en la zona anterior pasan a la zona posterior; las situadas en la zona intermedia pasan a la zona anterior; y las situadas en la zona posterior pasan a la zona intermedia.
- 12ª) Se sugiere que las tres poblaciones neuronales identificadas puedan corresponder funcionalmente a las siguientes estirpes: las de núcleo mayor a las neurosecretoras; las de núcleo intermedio y pequeño, a las neuronas osmo-receptoras de Verney y a las de tipo Renshaw inhibitorias, respectivamente.

9. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- ALLEN J. & DOISY F. (1923)- The oestral cycle of the albino rat. J. Am. Med. Ass. 81: 819.
- ALTMAN J. & BAYER S.A. (1978)- Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. J. Comp. Neur. 182: 945-972.
- ALTMAN J. & BAYER S.A. (1978)- Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. J. Comp. Neur. 182: 973-994.
- BAHR G.F. (1979)- Frontiers of quantitative cytochemistry. A review of recent developments and potentials. Analytical and quantitative cytology. 1: 1-18.
- BARKER J.L., CRAYTON J.W. & NICOLL R.A. (1971)- Supraoptic neurosecretory cells: adrenergic and cholinergic sensitivity. Science, 171:208-209.
- BENGTSSON E. & STENKVIST B. (1976)- Scancans, an interactive scanning cell analysis system. Computer programs in biomedicine. 6: 39-49.
- BERQUIST H., KALLEN B. (1953)- Studies on the topography of the migration areas in the vertebrate brain. Acta Anat. 18: 65-73.
- BIBBO M., BAHR H., BARTELS J. y WIED G.L. (1972)- Análisis automático de imágenes de células por Ticas. Patología Vol. V,3: 221-226.

- CAJAL S.R. (1911)- Histologie du systeme nerveus de l'homme et des vertebres. Editado por Instituto Santiago Ramon y Cajal. C.S.I.C. Madrid, 1955.
- CARRATO A. (1952)- Aportaciones a la citología del sistema hipotálamo-hipofisario. Trab. Inst. Cajal Inv. Cien. XLIV: 159-210.
- CARRATO A., BENTURA M.L. und RODRIGUEZ C. (1979)- Uber die Entwicklung und Abgrenzung der hypothalamischen nuclei bei der weissen ratte. Verch. Anat. Ges. 73: 1111-1116.
- CHRIST J.F. (1969)- Derivation and boundaries of the hypothalamus with atlas of hypothalamic grisea. The hypothalamus. Springfield. Illinois. 13-60.
- COGGESHALL R.E. (1964)- A study of diencephalic development in the albino rat. J. Comp. Neur. 122: 241-270.
- D'AMELIO F.E. (1960)- Glioarquitectura del hipotálamo de la rata blanca. Arch. Histol. Nor. y Patol. 7: 252-272.
- DEKEBAN A. (1954)- Human thalamus. An anatomical developmental and pathological study. II. Development of the human thalamic nuclei. J. Comp. Neur. 100: 63-97.
- DUNCAN D. & ALEXANDER R. (1961)- An electron microscopic study of the nucleus supraopticus in the rat. Anat. Rec. 139:223.
- EICHNER D. (1958)- Topochemische Untersuchungen aus Neurosekretorischen Zwischenhirn. Hypophysensystem der Albino ratte unter normalen und experimentellen bedingungen. Z. Zellforsch. 48: 402-426.

- ENESTROM S. (1967)- Nucleus supraopticus. A morphological and experimental study in the rat. Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. 186: 1-99.
- ERANKO O. (1951)- The cytology of the nucleus supraopticus of the rat. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn XXIX: 158-173.
- FERNANDEZ-RUIZ B., SUAREZ I. & PAZ R. (1973)- The fine structure of the supraoptic neurons of the hamster. Rev. Roumaine Embriol. Cytol. 10,2.
- FINLEY K.H. (1939)- The capillary beds of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. J. Comp. Neur. 71: 1-20.
- FISHER R.A. & YATES F. (1963)- Statistical tables for biological agricultural and medical research. Oliver and Boyd. Edinburgh Tweeddale court.
- GILBERT M. (1935)- The early development of the human diencephalon. J. Comp. Neur. 62: 81-115.
- GURDJIAN E.S. (1927)- The diencephalon of the albino rat. J. Comp. Neur. 43: 1-114.
- HARRIS G.W. (1960)- Central control of pituitary secretion. Handbook Physiology, sect. I, Neurophysiology, 2: 1007-1038.
- HAYWARD J.N. & VINCENT J.D. (1970)- Osmosensitive single neurons in the hypothalamus of unanesthetized monkeys. J. Physiol. (Lond). 210: 947-972.
- HAYWARD J.N. (1972)- Hypothalamic input to supraoptic neu

- rons. Department of anatomy and neurology, School of Medicine, University of California, Los Angeles, Calif, 90024. (U.S.A.).
- HERRICK C.J. (1910)- The morphology of the forebrain in amphibia and reptilia. *J. Comp. Neur.* 20:413-547.
- HIS W. (1893)- Uber das frontale Ende des Gehirnröhres. *Z. Anat. Entw. gesch.* 2: 157-171.
- HIS W. (1904)- Die entwicklung des menschlichen Gehirns Während der ersten Monate. Hirzel, Leipzig.
- HORST-PILLER J. (1977)- Microscope photometry. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York.
- HYPPA M. (1969)- Histochemically demonstrable esterase activity in the hypothalamus of the developing rat. *Histochemie*, 20: 29-39.
- IFFT J.D. & BERKOWITZ W. (1965)- A comparison of selected morphological and chemical methods for measuring neurons activity in the supraoptic nucleus of dehydrated rats.
- IFFT J.D. (1972)- An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J. Comp. Neur.* 144: 193-204.
- IRWIN H.G., IRWIN J.J. & ZANDER C.M. (1972)- Supraoptic nuclei of rodents adapted for mesic and seric environments : number of cells, multiple nucleoli and their distributions. *J. Comp. Neur.* 145: 43-60.
- KEYSER A. (1972)- The development of the diencephalon of

- the chinese hamster. Acta Anat. 83, suppl. 1.
- KOEP L.J. & SPERBER E.E. (1970)- Cellular changes in the human supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei in dehydration. J. Neuropath. Exp. Neur. 29: 254-265.
- KÖNIG J.F.R. & KLIPPEL R.A. (1963)- The rat brain. A stereotaxic atlas. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- KOZLOWSKI G.P. & DULLY G.K. (1973)- Scanning electron microscopy of the third ventricle of sheep. Z. Zellforsch. 136: 169-176.
- KREIG W J.S. (1932)- The hypothalamus of the albino rat. J. Comp. Neur. 55: 19-89.
- KUHLENBECK H (1936)- The ontogenetic development of the diencephalic centers in a bird's brain (chick) and comparison with the reptilian and mammalian diencephalon. J. Comp. Neur. 66:23-75.
- LEDERIS K. (1961)- Vasopressin and oxytocin in the mammalian hypothalamus. Gen. Comp. Endocr. 1: 80-89.
- LINARES R. (1968)- Estudio de la glia astrocitaria del hipotálamo en el gato doméstico. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Madrid.
- LUNA MORE S. (1969)- Estudio microscópico y submicroscópico de los vasos y la strogliá del núcleo supraóptico en el hipotálamo del gato doméstico. Trab. Ist. Cajal Inv. Biol. LXI:215-256.
- MENDELSON M.L. (1968)- Digital transformation and compu-

- ter analysis of microscopic images *Advances in optical and electron microscopy*, 2: 77-150.
- Mc ALLISTER J., JAMES P. & GOPAL D. (1977)- Neurogenesis in the epithalamus, dorsal thalamus and ventral thalamus of the rat: An autoradiographic and cytological study. *J. Comp. Neur.* 172: 647-686.
- MCRRIS J.F. & DYBALL R.E. (1974)- A quantitative study of the ultrastructural system during and after experimentally induced hypersecretion. *Cell. Tiss. Res.* 149: 525-535.
- MUHLEN F. (1966)- The hypothalamus of the guinea-pig. *S. Karger A.G. Ed. (Basel)* 4.
- NAUTA W.J.H. & HAYMAKER W. (1969) Hypothalamic nuclei and fiber connections. *En: The hypothalamus.* Haymaker W., Anderson E. & Nauta, eds. Thomas, Springfield, Illinois, 136-209.
- OLIVECRONA H. (1957)- Paraventricular nucleus and pituitary gland. *Acta Physiol. Scand.* 40 (Supp. 136): 1-178
- PALAY S.L. (1955)- An electron microscope of the neurohypophysis in normal, hydrated and dehydrated rats. *Anat. Rec.* 121: 348.
- PALAY S.L. (1966)- The role of neuroglia in the organization of the C.N.S. Nerve as a tissue. *Kaare Rodahl M. D. Ed.* 3-10.
- PETERSON R.P. (1966)- Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neur.* 128: 181-190.

- PREWITT J.M.S. (1978)- On some applications of pattern recognition and image processing to cytology, cytogenetics and histology. Dpt. Comp. Sc. Uppsala Un.
- RANSON B.V. & CLARK S.L. (1959)- The anatomy of the nervous system, its development and function. Saunders company Philadelphia. Tenth edition. 302.
- RECHARDT L. (1969)- Electron microscopic and histochemical observation on the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. Acta Physiol. Scand. 329: 1-79.
- ROSE J.E. (1942)- The ontogenic development of the rabbit's diencephalon. J. Comp. Neur. 77: 61-129.
- ROTHBALLER A.B. (1966)- Pathways of secretion and regulation of posterior pituitary factors. Publ. Ass. Res. nerv. Ment. bis. 43: 86-131.
- SAWYER C.H. & GERNANDT B.E. (1956)- Effects of intracarotid and intraventricular injections of hypertonic solutions on electrical activity of the rabbit brain. Amer. J. Physiol. 185: 209-216.
- STROER W.F.H. (1956)- Studies on the diencephalon. I. The embryology of the diencephalon of the rat. J. Comp. Neur. 105: 1-24.
- SWAAD D.F. & NIJUELDT F. (1975)- Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamus neurohypophyseal system. J. Neurol. Transm. 36: 195-215.
- VERNEY E.B. (1947)-The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. Phil. Trans. B. 135: 25-106.

- VINCENT J.D. & HAYWARD J.N. (1970)- Activity of single cells in the osmoreceptor-supraoptic nuclear complex in the hypothalamus of the waking rhesus monkey. Brain res. 23: 105-108.
- WEYL-SCHOL H. & VALTIN H. (1967)- Evidence for the synthesis of oxytocin and vasopressin in separate neurons. Nature, 214: 314-316.
- ZEISS C. (1973)- Scanning microscope photometre with computer PDP-12 Program Description Apamos.
- ZIMMER H.G. (1970)- Revista Zeiss 17: 126-131.

