

MORFOLOGIA DE LA EPIDERMIS Y GLANDULAS ANEJAS DE LOS  
ANFIBIOS ANURUS, Bufo calamita Y Rana ridibunda.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Quilón', written in a cursive style with a long, sweeping underline that extends below the text.

Sevilla, Agosto de 1978.

Tomo  
I

TD  
672/1 R. 3646

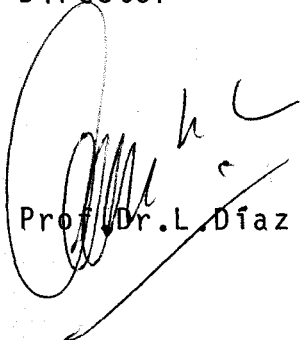


D. JOSE LUIS LOPEZ-CAMPOS, Catedrático Numerario del Departamento de Citología e Histología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA que el trabajo "MORFOLOGIA DE LA EPIDERMIS Y GLANDULAS ANEJAS DE LOS ANFIBIOS ANUROS, Bufo calamita Y Rana ridibunda" que presenta el Licenciado PLACIDO NAVAS LLORET para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección de Biológicas, ha sido realizado bajo nuestra Dirección y la de D. LUCIO DIAZ FLORES, Catedrático Numerario del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Sevilla, Julio de 1978

Director

  
Prof. Dr. L. Díaz Flores

Director y Ponente

  
Prof. Dr. J. L. López-Campos

7-9-78

574

TD  
672/1

A Inma

A mis padres

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. Jose Luis López-Campos que ha sido capaz en todo momento de motivarme y me prestó su apoyo personal y científico.

Al Prof. Dr. Lucio Díaz Flores, sin cuya valiosa ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Cátedra, Joaquín Piñero, Jose Manuel López Muñoz, Carlos Zamorano, Inés Martín, Mariales Rodríguez, Esperanza Conde y Remedios García por su colaboración.

A los profesores de la Cátedra de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Granada por la ayuda que me han prestado.

A Monique Boy, Patro Ortega y Jesús Gordón por su colaboración técnica.

A Josefina Hidalgo, cuya amistad me ha ayudado a seguir adelante.

## INDICE

1. INTRODUCCION	
1.1. Evolución de los vertebrados .....	2
1.2. Tegumento de los vertebrados .....	14
1.3. Epidermis de los anfibios	
1.3.1. Modelo morfológico .....	23
1.3.2. Modelo fisiológico .....	39
1.4. Glándulas tegumentarias de los anfibios ....	49
2. MATERIAL Y METODOS .....	64
3. RESULTADOS	
3.1. Epidermis de <u>B. calamita</u> .....	79
3.2. Glándulas de <u>B. calamita</u> .....	86
3.3. Epidermis de <u>R. ridibunda</u> .....	105
3.4. Glándulas de <u>R. ridibunda</u> .....	116
4. DISCUSION	
4.1. Epidermis .....	131
4.2. Glándulas epidérmicas .....	149

5. CONCLUSIONES ..... 173

6. ICONOGRAFIA ..... 181

7. BIBLIOGRAFIA ..... 182

## 1. INTRODUCCION

## 1.1. Evolución de los vertebrados

Hay un resurgimiento en la historia de la evolución de los vertebrados con el acontecimiento trascendental de la salida del medio acuático y la conquista de la tierra firme.

Este fenómeno, que podemos catalogar como una migración, va a ocurrir de una forma lenta y gradual, ya que a fin de cuentas, el cambio del medio habitual de vida va a implicar profundas modificaciones anatómicas que acompañarán a las transformaciones hacia una nueva fisiología.



Entre ellas, el sistema de respiración por branquias ha de ser reemplazado por otro de respiración pulmonar, aunque es de destacar el aporte que representa la utilización del oxígeno atmosférico a través de la piel en muchos vertebrados.

El mecanismo de locomoción ha de pasar de un sistema de propulsión y equilibrio, representado por las aletas de los peces, a un sistema de apéndices verdaderamente locomotores que permita el desplazamiento en tierra firme.

Pero de todos estos cambios, es el ocurrido en la piel uno de los más trascendentales (ANDREW y HICKMAN, 1974; SPEARMAN, 1973)(3,166) para la conservación del contenido acuoso interno que permite el mantenimiento de las constantes fisiológicas.

De ahora en adelante, en contacto con la atmósfera, será este tegumento la primera línea de defensa contra el ataque de los factores físicos y químicos y habrá de adquirir una estructura especial histológica que evitará la desecación (PATT y PATT, 1969)(134).

A la vista de este fenómeno evolutivo podemos decir que el tegumento de los vertebrados es uno de los órganos más importantes del cuerpo de los anfibios, que, además de evitar la desecación, sirve específicamente de protección mecánica contra factores como el fuego, golpes, invasión de otros animales, etc.

Por medio de la secreción (LEONARD y SUMMERS, 1976; HARRIS y HUNT, 1975 b; SCHUBER, 1974)(94,67,154) puede hacer su cuerpo o repulsivo (para los enemigos) o atractivo (durante la reproducción); se le da, además, importancia como un órgano inmunológico de protección (PATT y PATT, 1969)134).

Pero no todas las funciones del tegumento se relacionan con la protección, sino que, por ejemplo, interviene en la locomoción de algunos vertebrados, como ocurre con las escamas epidérmicas de las serpientes (JACKSON y RENO, 1975)(78).

Puede servir también como almacén de energía (depósito de grasa subcutánea) en muchos vertebrados que incluso puede funcionar como aislante térmico, como es

el ejemplo típico de los mamíferos acuáticos.

Además, se ha comprobado la existencia de un mecanismo de síntesis de vitamina D en algunos vertebrados (PATT y PATT, 1969)(134).

Por otra parte, la piel es un órgano receptor de la información que proviene del medio exterior, interviniendo en los mecanismos de relación del individuo con el ecosistema en que se enclava. Este contacto ocurre a través de los muchos corpúsculos táctiles que en ella se presenta (DIAZ FLORES y colaboradores, 1977; SAXOD, 1968; de IRALDI, 1961; GRANDRY, 1869 ) (36, 62, 74, 76) y otros receptores sensoriales (SZABO, 1963; ANDERSEN y NAFSTAD, 1968; IGGO, 1967; BENNET, 1965) (2, 10, 75, 170), siendo esta función un complemento indispensable para el funcionamiento del animal a través de su sistema nervioso (HALATA, 1970; MUNGER, 1965; RANVIER, 1880; RAMON Y CAJAL, 1919)(63, 121, 140, 141).

De estos órganos receptores de la piel es de destacar, por su especialización, la llamada "línea -

lateral" (FLOCK, 1967)(51) que se encuentra muy desarrollada en los peces (IWAI, 1967; THORNHILL, 1972)(77,171) y en las larvas de los anfibios (MONAGHAN, 1975; FLOCK, 1974)(52, 117).

Por último, la piel interviene en la regulación de la temperatura, ya no sólo en los mamíferos, sino que también lo hace en las aves en algunas especies de reptiles (PATT y PATT, 1969) (134).

Este tegumento, con tal diversidad de funciones, tiene un doble origen durante el desarrollo embrionario. Por un lado, la parte más externa o epidermis se desarrolla directamente del ectodermo, y la porción más interna o dermis se produce a partir del mesenquima.

Pocos animales ponen en contacto directo con el medio la piel propiamente dicha; así, los invertebrados protegen el tegumento por medio de una cutícula, o bien, por caparazones silíceos o calcáreos, quitina ó - por medio de secreciones mucosas.

Los vertebrados, por su parte, recuerdan a sus

predecesores en la escala animal adoptando parecidos - mecanismos de protección.

Así, Amphioxus, que presenta un tegumento muy sencillo, como ejemplo básico del de los restantes cordados, posee una cutícula segregada por la epidermis, hallándose éste, perforada por poros diminutos.

Siguiendo la escala animal, encontramos las escamas óseas de algunos peces y las escamas dérmicas de los teleósteos, cubiertas casi en todas las especies por una cutícula de mucinas segregada por la misma piel (HARRIS y HUNT, 1975 b)(67).

En grupos más evolucionados encontramos la mucosidad que envuelve a los anfibios, las escamas y placas epidérmicas que aparecen en los reptiles y todas las faneras que acompañan a la piel de los mamíferos.

Pero volvamos un poco la mirada hacia la historia de la salida a tierra firme de los vertebrados. Esta salida va a comenzar con la aparición de los primeros - anfibios al final de los tiempos Devónicos; es incomple-

ta, representada sólo por el hecho de que respiran ya aire atmosférico; siguen viviendo casi siempre en las aguas, y por supuesto, sujeto estrechamente su ciclo vital a ese medio, donde pasa obligatoriamente los primeros estadios de su desarrollo.

Un ejemplo de ello lo tenemos en los ICTIOSTEGIDOS (que aparecieron en Groenlandia en el Devónico Superior), los cuales por sus características morfológicas y fisiológicas deben colocarse entre los anfibios.

En tiempos posteriores, los vertebrados, provistos ya de miembros conformados para la vida terrestre, siguieron la historia de los primeros anfibios, y permanecieron atados al medio acuático. Pero, eso sí, estos miembros les permitían, durante las épocas de sequía, arrastrarse por tierra firme en busca de una nueva extensión de agua; aunque, siguiendo los datos de los restos fósiles, no siempre invadían el agua sino que permanecían en las orillas como una nueva conquista que les aumentaba el medio de acción donde desarrollarse.

A la vista de esta tentativa de abandono del -

medio acuático y al observar como se va conquistando el medio terrestre, hemos prestado una especial atención a los anfibios actuales ya que presentan todavía el fenómeno de transición desde una vida en el agua a una vida en el medio aéreo-terrestre, ocurriendo durante este paso muchos cambios básicos en su organismo, siendo algunos, fundamentales, los que involucran a la piel.

Por otra parte hemos seleccionado a los ANUROS, cuyos representantes actuales constituyen un grupo particularmente anómalo, como se puede ver recordando algunos rasgos anatómicos esenciales.

El cráneo es notable por los pocos elementos - que lo constituyen. La bóveda, formada casi exclusivamente por un hueso único, el frontoparietal; siendo, además importante la reducción que se observa en la osificación - de todas las partes del esqueleto cefálico.

La columna vertebral comprende un número muy - reducido de vértebras (nuncas más de nueve) y termina en un hueso alargado, llamado Urostilo, que resulta de la fusión de otras vértebras como lo indica la presencia, en

el adulto, de forámenes que sirven para el paso de los nervios.

Además, en la pelvis, el íleon es muy alargado y estrecho estando fusionados, por su parte, los dos huesos de la pierna, tibia y peroné.

A la vista de estos caracteres y el que algunos anuros fósiles presenten características anatómicas como los actuales, mezcladas con otras que corresponden a formas menos evolucionadas que las actuales, les da un carácter de primacía para el estudio morfológico de los órganos fundamentales.

Por ello, hemos encaminado nuestras investigaciones hacia el tegumento de este grupo taxonómico haciendo referencia especial a la zona de contacto con el medio externo, es decir, la epidermis y las estructuras que complementan el mecanismo de protección de ésta, que en los anfibios vienen representadas por la mucosidad que los envuelve y que es producida por las glándulas cutáneas de origen epidérmico.



Para nuestro estudio hemos seleccionado dos especies características de la zona mediterránea: Bufo calamita y Rana ridibunda.

Dentro de la clase AMPHIBIA se incluyen en la subclase APSIDOSPONDYLI y, dentro de ellas, en el superorden SALIENTIA, "saltadores", en el que encontramos aquellos anfibios modernos que carecen esencialmente de centros vertebrales verdaderos, con la caja craneal no osificada completamente y que carecen generalmente de costillas.

Dentro de este grupo taxonómico hay dos órdenes:

PROANURA y ANURA. Es en este segundo en el que se incluyen nuestras especies en estudio; en resumen, son anfibios que carecen de cola y poseen extremidades posteriores adaptadas para el salto.

Entre ellos distinguimos 18 familias, dos de las cuales son: BUFONIDAE, a la que pertenece B. calamita y RANIDAE, que incluye R. ridibunda.

Las características familiares las podemos resumir como sigue:

#### Familia BUFONIDAE.

Son anuros de cuerpo fornido, variables de tamaño (entre 30 y 200mm.); carecen de costillas osificadas libres y con centros vertebrales procélicos. Presentan -- glándulas parótidas, no tienen dientes y la lengua se presenta libre en su parte posterior. En los ojos aparecen - pupilas horizontales. Generalmente están muy bien adaptados al medio terrestre (D'Ancona, 1975) (31).

#### Familia RANIDAE.

Se incluyen anuros de patas largas, muy variables de tamaño (12-250 mm.) y sin costillas osificadas libres. Los centros de las vértebras primera a séptimas son procélicos y de la octava en adelante, anficélicos; no presentan cartílago intercalar. Aunque la lengua está libre en su parte posterior se presentan dientes maxilares. Las pupilas pueden ser horizontales o verticales. Los pies posteriores están generalmente provistos de membranas.--- (D'Ancona, 1975) (31).

Ambos grupos son de los anuros más característicos de la fauna anfibia, los cuales además de ciertos caracteres anatómicos diferentes, presentan una diferente adaptación al medio seco, siendo los individuos de la Familia RANIDAE los que tienen mayor dependencia del agua, habiéndose desarrollado menos en ellos el tipo de defensa por medio de sustancias tóxicas tegumentarias que en el otro grupo, realizando más una defensa pasiva ocultándose en los fondos cenagosos de su habitat.

## 1.2. Tegumento de los vertebrados

Hay una gradación en el fenómeno adaptativo al medio terrestre entre los anfibios

Así, se observa como todas las fases larvarias - tienen lugar siempre en el agua; también algunas especies de urodelos rara vez salen a tierra firme, habiendo actual<sup>l</sup>mente acuáticas que conservan aún branquias externas.

Dentro del grupo que nos ocupa, orden ANURA, cla<sup>l</sup>se AMPHIBIA, se sigue presentando esa gradación de adaptabilidad al agua; muy pocos de ellos son acuáticos totalmen<sup>l</sup>te, como el género Xenopus o las ranas del lago Titicaca - que nunca abandonan el agua (SPEARMAN, 1973) (166).

Por el contrario, los sapos del desierto sobreviven en condiciones áridas, refugiándose bajo las piedras o en huecos durante el día, favoreciendo su resistencia con el almacén de agua en la vejiga urinaria; aunque, sin embargo, no son capaces de soportar mucho tiempo bajo una radiación solar intensa.

Si se compara estructuralmente la piel de diferentes anfibios se aprecia como, entre los más o menos adaptados al medio seco aéreo-terrestre, hay modificaciones casi inapreciable pero verdaderamente significativas.

En general y como un signo de conexión evolutiva con los peces van a presentar una cubierta de mucosidad - que va a envolver todo el organismo (HARRIS y HUNT, 1975 b; DOWNING y NOVALES, 1971; HARRIS y HUNT, 1973 a) (39, 64, - 67), aunque hay una diferencia esencial entre estos dos -- grandes grupos de animales en la forma de producción de esta secreción; así, en los peces se forma gracias a unas - células mucosas especializadas (HARRIS y HUNT, 1973 b, - - 1975 a) (65, 66), mientras que en los anfibios adultos se va a producir a expensas de glándulas multicelulares alveolares de origen epidérmico y localizadas en el estrato

esponjoso de la dermis (DAPSON, 1970; MUHSE, 1909; WHITEAR, 1974) (32, 119, 188).

Como asociación de este fenómeno evolutivo se encuentra que la envuelta mucosa producida en los renacuajos se debe a unas células ovales o células de Leydig (KELLY, 1966 b) (82), estructuras que nos van a trazar un puente para esta organización epidérmica entre los animales típicamente acuáticos y los que se han abandonado el agua sin poder independizarse totalmente de ellas.

Por regla general y considerando siempre al animal adulto, la capa más superficial de células del tegumento está más o menos queratinizadas; es decir, estas células contienen depósitos de proteínas, la queratina, que es altamente resistente a la desecación a la difusión del agua y a la abrasión.

Pues bién, en los anfibios que estan mejor adaptados a la vida terrestre, como los sapos, los depósitos de queratina son muy considerables llegando incluso a ocupar tidi el interior de las células superficiales.

Partiendo de este punto y siguiendo un camino retropectivo, en las diferentes formas anfibias encontramos una regresión o pérdida gradual de esta queratina, hasta - tal punto, que en los más primitivos (incluyendo a las -- formas larvarias de todos los grupos) la capa celular que queratinizada sólo se va a presentar en el pie de los indivi- duos del género Necturus (SPEARMAN, 1973) (163), permane- ciendo el resto de la piel cubierta de una fina cutícula - del mismo tipo que la presentada en los peces (HARRIS y - HUNT, 1975 b) ( 67) que se puede considerar como una forma primitiva de cubierta queratinizada, al menos en su función, ya que se argumenta en contra el que la queratina es una - secreción intracelular y la cutícula es una secreción ex- tracelular.

Tomando como punto de partida esta capa celular más externa, estudiamos la estratificación de la epidermis. Como hemos dicho, el exterior epidérmico se forma de célu- las muertas, queratinizadas, constituyendo el "estrato córneo", que se encuentra algo desarrollada en la rana y muy bien en el sapo; a continuación se pasa a un conjunto ce- lular más profundo que forma una capa o estrato transicio- nal (integrado por los estratos espinoso y granuloso), y -

una capa basal, más indiferenciada, de células columnares que integran el "estrato germinativo" (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (132).

La actividad de este último estrato es el que facilita la renovación del resto de las células epidérmicas, normalmente a través del fenómeno de la muda (BUDTZ y LARSEN, 1975) (23), que se controla gracias a la acción combinada de las glándulas hipofisis y tiroides.

El estrato germinativo va a dar lugar, no sólo a los estratos más externos de la epidermis, sino que con su actividad se van a producir también las glándulas tegumentarias. Estas últimas, aunque tengan origen epidérmico se van a encontrar en la dermis, son multicelulares, de tipo alveolar, considerándose que existen dos variedades fundamentales: mucosas y serosas o granulosa (DAPSON, 1970; DOCKRAY y HOPKINS, 1975) (32, 38).

Las diferencias básicas entre ellas es el menor tamaño de las mucosas que además presentan un epitelio cúbico (MUHSE, 1909; WHITEAR, 1974) (119, 188), mientras que el epitelio de las serosas es irregular y generalmente - -



constituye una estructura sincitial (DOCKRAY y HOPKINS, - 1975; SJOBERG y FLOCK, 1976) (38, 162), secretando algún tipo de sustancia tóxica o venenosa como la batrachotoxina (PATT y PATT, 1969) (134).

También es característico que en especies totalmente acuáticas, como los géneros Cryptobranchus y Andrias, en los que la piel es el órgano respiratorio principal, la piel está ricamente regada por vasos sanguíneos que derivan de la dermis subyacente.

En contacto con la epidermis y separada de ella por una membrana basal se localiza la dermis, que en los anfibios consta de dos capas diferentes: una externa, formada por un tejido conjuntivo laxo, a la que se llama "estrato esponjoso" y una capa más profunda, integrada por un tejido conjuntivo laxo denso, llamada "estrato compacto" (ANDREW y HICKMAN, 1974) (3).

En el estrato esponjoso se van a presentar las glándulas alveolares, vasos sanguíneos, espacios linfáticos, terminaciones nerviosas y cromatóforos.

Fundamentalmente, estos últimos elementos celulares son de tres clases, dependiendo de la naturaleza del pigmento que contengan (BAGNARA y colaboradores, 1968; - - BREATHNACH y POYNTZ, 1956; NOLTE y POINTNER, 1975)(5, 17, 125).

- Melanóforos, que contienen melanina.

- Xantóforos, que poseen un pigmento amarillento o dorado, lipocromo.

- Iridóforos, integrados por cristales que les da un color plateado o blanco. Su función principal es filtrar los rayos ultravioletas.

La disposición de los cromatóforos es por capas, situándose los grandes melanóforos a mayor profundidad que los demás; por encima de ellos y a veces cubiertos por procesos de los melanóforos se encuentran los guanóforos. Los más superficiales son los xantóforos que actúan como un filtro para la luz (BAGNARA y colaboradores, 1968) (5).

Hay veces que los melanóforos se localizan en la epidermis, llamándose en estos casos "melanocitos" (BAGNARA

y colaboradores, 1968; BREATHNACH y POYNTZ, 1956) (5, 17), siendo estos de menor tamaño que los melanóforos dérmicos aunque tanto unos como otros proceden de la cresta neural (SPEARMAN, 1973) (166).

Estos cromatóforos, como los de los peces (LANZING y WRIGHT, 1974) (87) y otros animales (BREATHNACH y POYNTZ, 1956) (5) son células ramificadas que por la migración del pigmento por el citoplasma pueden regular la coloración de la piel. Esta actividad, en algunos casos, está regulada por la hormona intermedia que es segregada por la "pars intermedia" de la hipófisis.

Por su parte, el estrato compacto de la dermis está constituido principalmente por fibras de colágena - - que corren más o menos paralelamente a la piel. Cada ciertos intervalos se producen cordones verticales de tejido conjuntivo, músculo liso, vasos sanguíneos y nervios que partiendo del estrato compacto, atraviesan el estrato esponjoso y llegan a contactar con la epidermis (WHITEAR, - 1974) (188).

Como casos especiales es de señalar que en el f<sup>o</sup>

nero Labyrinthodontia aparecían escamas óseas en el tegumen-  
to, normalmente en la superficie ventral. Estas escamas -  
son de origen dérmico, constituidas por una capa de hueso  
esponjoso envuelta en dos capas de hueso compacto (PATT y  
PATT, 1969) (134).

De los anfibios actuales sólo los Apoda presen-  
tan escamas que vienen a representar como placas finas de  
hueso dispuestas diagonalmente e incluidas en la dermis.

### 1.3. Epidermis de los anfibios.

#### 1.3.1. Modelo morfológico.

La epidermis de los anfibios viene a estar compuesta de 5 a 7 capas celulares con un grado variable de queratinización dependiendo de la especie.

En general, contiene de 1 a 2 capas externas de células escamosas, parcial o totalmente queratinizadas, que corresponden al estrato córneo; a continuación aparecen de 3 a 4 capas intermedias de células relativamente poliédricas que constituyen los estratos granuloso y espinoso y, por último una capa basal de células columnares o cuboideas que constituyen el estrato germinativo.

En cuanto a las células que constituyen éste estrato germinativo presentan una colección normal de componentes celulares aunque en cantidades relativamente pequeñas; así, habrá poco RER, algunos ribosomas libres, un complejo de Golgi relativamente rudimentario y un número variable de pequeñas vesículas localizadas especialmente cerca de las membranas plasmáticas laterales (FARQUHAR y PALADE, 1965) (49).

Se ha observado cómo en las mitocondrias existen siempre cuerpos densos (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; VOUTE, 1963) (132, 179). Hay además un buen sistema de tonofilamentos agrupados en haces y asociados a desmosomas y hemidesmosomas (FARQUHAR y PALADE, 1965; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; WEISS y FERRIS, 1954) (41, 132, 183). Realmente se ha observado cómo estos tomofilamentos presentan un modelo de asociación especial cuando se acercan a las uniones celulares, quedando en el resto del citoplasma asociados en haces (VOUTE, 1963) (179).

Estas células basales de la epidermis de Rana pipiens penetran profundamente en la dermis por largas prolongaciones citoplásmicas (VOUTE, 1963; PARAKKAL y MATOLTSY,

1964) (179, 132). Todo este contorno descansa sobre una membrana basal continua de unos 500-700 Å de grosor (FARQUHAR y PALADE, 1965) (49) como ha sido demostrada en otros anfibios (OTTONSON y colaboradores, 1953; WEISS y FERRIS, 1954) (130, 183) y otros vertebrados (ODLAND, 1958; SELBY, 1955) (127, 156).

La membrana plasmática próxima a la membrana basal se presenta tachonada con una serie de hemidesmosomas (FARQUHAR y PALADE, 1965) (49) que fueron descritos como "placas densas" en los anfibios (PORTER, 1954) (136) que ya se asociaron con el anclaje de filamentos intraepiteliales, haciéndose posteriormente (WEISS y FERRIS, 1954) - - (183) una descripción ultraestructural de ellos, confirmando una estructura parecida a la descrita para la epidermis humana (ODLAND, 1958; SELBY, 1955) (127, 156).

Las células del estrato germinativo están, además, unidas entre ellas por desmosomas (FARQUHAR y PALADE, 1965; VOUTE, 1963) (49, 179) presentando entre ellas amplios espacios intercelulares, acusándose por la presencia de una membrana plasmática muy convulvada (ODLAND, 1950; OTTONSON y colaboradores, 1953) (126, 130) comparable a la

de la epidermis humana (ODLAND, 1958) (127).

Avanzando hacia la superficie del cuerpo se localiza el estrato espinoso seguido del granuloso que son etapas intermedias entre las células basales y las cornificadas de la superficie epidérmica.

Al aproximarse al estrato córneo las células se aplastan y el RER se hace más voluminoso y el complejo de Golgi más desarrollado, habiendo un aumento del número y tamaño de las cisternas (FARQUHAR y PALADE, 1965) (49) - apareciendo cuerpos densos de tamaño variable y forma irregular con un contenido heterogéneo; parece ser que representan derivados lisosómicos ya que dan positiva la reacción para la fosfatasa ácida (SABATINI y colaboradores, - 1963) (149).

Los husos de tonofilamentos citoplásmicos se hacen más abundantes y más estrechamente empaquetados tal como se avanza hacia las células más cercanas a la capa externa de la epidermis (FARQUHAR y PALADE, 1965; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (49, 132).



En los epitelios en queratinización de los vertebrados superiores se han observado gránulos y una sustancia PAS (+) en el espacio intercelular de las células superiores (MATOLTSY y PARAKKAL, 1965; WISLOCKI, 1951) (106, 190) que han recibido diferentes nombres y funciones.

Así (SELBY, 1957) (157) fué el primero que observó pequeños gránulos en las células epidérmicas en diferenciación. Posteriormente se describieron tanto en la piel humana como en la del ratón (FREI y SHELDON, 1961; ODLAND, 1960) (53, 128).

Se observaron posteriormente gránulos de 0m1 um de diámetro junto a la membrana plasmática de la piel del ratón y hamster (RHODIN Y REITH, 1962) (143) apareciendo también en el epitelio de la boca (ZELICKSON y HARTMAN, 1962) (191).

Concretamente, en el citoplasma de las células que componen los estratos medios de la piel de los anfibios se han descrito dos tipos de gránulos: unos más pequeños (400-1500 A Ø) y otros mayores (1000-5000 A Ø) - (BUDTZ y LARSEN, 1975 ; FAHRMANN, 1971; FARQUHAR y PALADE,

1965; LAVKER, 1972: LODI y BANI; PARAKKAL y MATOLTSY, -  
1964; PARAKKAL y ALEXANDER, 1972) (23, 47, 49, 91, 102,  
132, 133).

Los más pequeños son esféricos u ovoideos, de contenido moderadamente denso; se originan en el aparato de Golgi ( FARQUHAR y PALADE, 1965) (49) y dan positiva la reacción del PAS (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; VOUTE, - 1963) (132, 179). En las células más profundas aparecen distribuidos por todo el citoplasma y tal como se avanza hacia las capas más externas se van acercando a la membrana plasmática, desapareciendo, normalmente, en la capa celular más cercana al estrato córneo.

Se ha observado que en el espacio intercelular existente entre el estrato córneo y el granuloso hay un contenido con la misma apariencia que el del interior de estos gránulos, mientras que el resto de los espacios intercelulares aparecen vacíos (BUDTZ y LARSEN, 1975; FARQUHAR y PALADE, 1965) (23, 49).

Reuniendo el hecho de que los gránulos se acercan al borde celular y la aparición de una sustancia apa

rentemente igual a la granular en el espacio intercelular sugiere que los gránulos descargan su contenido hacia este espacio.

El segundo tipo granular es más variable de forma (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (132) con un contenido más denso, apareciendo primero en el citoplasma perinuclear (FARQUHAR y PALADE, 1965) (49). Estos gránulos se localizan fundamentalmente en las dos capas celulares inmediatamente bajo el estrato córneo y son los más numerosos en la capa celular más externa de esta zona intermedia (FARQUHAR y PALADE, 1965; MATOLTSY y PARAKKAL, 1965) (49, -- 106).

A la existencia de gránulos en los epitelios en queratinización se les ha dado diferentes funciones, dándosele hoy como fundamental una misión de protección contra los agentes externos físicos y químicos (MATOLTSY y MATOLTSY, 1964; ROTHMAN, 1954) ( 105, 146).

Recientemente (LAVKER, 1973) (92) se han descrito unos gránulos en la epidermis de la rana con una estructura ordenada en su interior equivalente a la imagen que presentan los cristales. Al igual que los gránulos mucosos

con estructuras ordenadas en su interior que aparecen en otros epitelios (LAVKER, 1969 b; SOUZA-SANTOS, 1966) (89, 163) parecen representar un almacén de mucoproteínas.

Las células más externas de la epidermis o estrato córneo están repletas de filamentos (70-80 Å) (PARAKKAL y MATOLSTYS, 1964 (132), es decir, presentan un citoplasma fibrilar, que con mitocondrias en degeneración, núcleo (cuando lo hay) picnótico y la interdigitación de los bordes celulares con la presencia de desmosomas son los caracteres más sobresalientes de estas células.

Esta división en estratos de la epidermis está basada en un mecanismo fisiológico, la queratinización que hace pasar por diferentes aspectos morfológicos a las células epidérmicas camino de la formación de células cornificadas que comprenderán el estrato córneo.

Las células epiteliales pasan por dos fases distintas mientras se diferencian hacia células cornificadas la primera es la fase de la síntesis en la que la célula va a adquirir los productos necesarios para la queratinización (LAVKER y colaboradores, 1969 a; MONTAGNA, 1962;

ODLAND y REED, 1967) (88, 118, 129). A continuación, empieza la fase de transformación que consiste principalmente en la producción de una célula formada por un complejo - - amorfo-filamentoso rodeado de una membrana plasmática engrosada (LAVKER y MATOLTSY, 1970; MATOLTSY y PARAKKAL, -- 1967) (90, 107) pudiendo aparecer algunas células intermedias llamadas células T (BRODY, 1959 y 1960) (20, 21).

Llevando este concepto a los anfibios, se ha demostrado por rayos X que la queratina de la piel de la salamandra pertenece a un tipo alfa (RUDALL, 1947) (147) y a pesar de que la queratinización en los anfibios tiene - todavía lagunas importantes, se acepta generalmente que el principal constituyente involucrado en los mecanismos que ocurren en los queratinocitos son los filamentos y - los gránulos (descritos anteriormente), aunque hay controversia respecto a donde y cuando se forman estos orgánulos y su función precisa en la queratinización (BUDTZ y LARSEN, 1975) (23).

Estos filamentos son finos (SPEARMAN, 1968) - - (165) y moderadamente reactivos a técnicas histoquímicas para grupos sulfídrilos, siendo además, birrefringentes

(PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (132). Según LAVKER, (1972) (91) están implicados directamente en la formación de la red estructural de las células cornificadas.

Para diversos autores (FARQUHAR y PALADE, 1965; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; PILLAI, 1962) (49, 132, 135) los filamentos citoplásmicos se hacen más estrechamente empaquetados tal como se avanza hacia el estrato córneo. Los filamentos no parecen aumentar de número durante la diferenciación (LAVKER, 1972) (91) por lo que se ha sugerido que las células basales era el sitio de síntesis de proteínas necesarias para la formación de los filamentos (BUDTZ y LARSEN, 1973) (22).

Este proceso de queratinización va a presentar diferentes aspectos morfológicos en los diversos grupos de vertebrados, aunque llevan todos a los mismos resultados.

Así, en los mamíferos, los filamentos son abundantes en las células basales mientras que el RER es escaso. Durante la diferenciación aumenta el número de las cisternas del Golgi apareciendo los gránulos cubiertos

por membranas (LAVKER y MATOLTSY, 1970) (90) acumulándose más tarde la queratogialina en forma de gránulos. A continuación, la membrana plasmática se hace más gruesa y la mayoría de los constituyentes celulares se desintegran,-- a excepción de los filamentos, quedando el citoplasma formado por ellos y una matriz amorfa.

Por su parte, en las aves, es patente el RER y REL en las células basales, mientras que hay pocos filamentos, gotas de lípido y glucógeno. En las capas superiores hay un aumento de las vesículas del Golgi, aparecen cuerpos multigranulares y gotas de lípidos mayores en la parte central del citoplasma, localizándose los filamentos preferentemente en la periferia celular, lugar donde se deposita la queratohialina.

El contenido de los cuerpos multigranulares fusiona en las últimas capas y se vacía en el citoplasma.- Así, las células del estrato córneo constan de una membrana engrosada, llenas de lípido y una matriz amorfa.

Las características de las células epidérmicas de los reptiles son semejantes a las de las aves, diferen-

ciándose porque aparece, en el citoplasma de las células de los primeros, gránulos mucosos y cuerpos vesiculares. Los gránulos mucosos presentan una estructura interna variable, se desplazan hacia la periferia y descargan su contenido en el espacio intercelular. Por su parte, los cuerpos vesiculares presentan vesículas incluidas en un medio denso y un componente original en forma de disco -- (MATOLTSY y HUSZAR, 1972) (108); al final, presentan las características de las células cornificadas de las aves pero con una matriz translúcida y el moco disperso en el espacio intercelular.

Si comparamos los anfibios con estos grupos anteriores que, al igual que los mamíferos, los filamentos son abundantes y el RER esta poco desarrollado en las células basales. Posteriormente, como en los reptiles, aparecen gránulos mucosos paralelamente al aumento de las vesículas del Golgi.

Al final del proceso, la imagen de las células cornificadas es algo diferente a los anteriores, aparte de la membrana plasmática engrosada y los filamentos, aparecen restos de orgánulos celulares y una mocosidad dis-



persa en el espacio interfilamentoso, además de la existente en el espacio intercelular.

La zona de separación entre la epidermis y der-  
mis del tegumento, de los anfibios está constituida funda-  
mentalmente por una membrana basal de morfología igual a  
la descrita para la piel de los mamíferos (ODLAND, 1950 y  
1958; SELBY, 1955) (126, 127, 156) si se exceptúa que en  
los anfibios se presenta una marcada hilera de hemidesmosoo  
mas (FARQUHAR y PALADE, 1963; GONA, 1970) (48, 59).

La membrana basal se define normalmente como una  
zona fina consistente en una delicada red de fibras reticul  
lares incluídas en una sustancia homogénea (SALPETER y SINl

GER, 1959) (152). Varía en estructura y grosor entre las especies e incluso entre diferentes fases de la vida de la misma especie (CAMATINI y LANZAVECHIA, 1965; KELLY, 1966 a) (25, 81).

La zona dérmica en contacto con la membrana basal se describió al microscopio óptico (ROSIN, 1946) (145) como una estructura de fibras asociadas en ángulo recto, es decir, en disposición ortogonal. Más tarde, usando el microscopio electrónico, diversos autores (PORTER, 1954; WEISS y FERRIS, 1954 y 1956) (136, 183, 184) demostraron que contenía capas de fibras de colágena alternantes, dispuestas en ángulo recto en la piel de las larvas anfibias, demostrándose en el adulto (OTTOSON y colaboradores, 1953) una menor ordenación fibrilar, más parecida a la de los mamíferos (ODLAND, 1958; SELBY, 1955) (127, 156).

Además de estas fibras, se han descrito otras en diversas zonas (NAKAO, 1971) (123) y otras, diferentes a las anteriores, que se presentan polarizadas hacia la membrana basal con un extremo anclado a ella (BRODY, 1960; PALADE y FARQUHAR, 1965) (21, 131).

Por otra parte, se han descrito gránulos en la -  
región que separa a las células del estrato germinativo -  
de la membrana basal ( PROTER, 1954; SALPETER y SINGER, -  
1959; SINGER y SALPETER, 1961)(136, 152, 161) en la piel  
del renacuajo. KELLY (1966a)(81) en la piel de la salaman  
dra, demostrando que contienen un complejo lípido-muco-po  
lisacárido.

Investigaciones más recientes (NAKAO, 1971) -  
(123) han demostrado en esta zona cuerpos laminares de -  
unos 20 A de grosor que se hacen evidentes con ácido fos-  
fotúngstico; como se observan algunas veces dentro de las  
células basales se les asigna on origen epidérmico.

### 1.3.2. Modelo fisiológico.

Este modelo morfológico de la epidermis de los anfibios lleva a paralelo un modelo fisiológico que actúa de una forma mayoritaria y fundamental en la osmoregulación del medio interno del animal.

El agua se mueve libremente por ósmosis a través de la piel de los anfibios, lo que representa que manteniendo al animal en agua fresca se va a producir, a través de ella, una importante entrada neta de agua.

Este flujo varía con el tamaño del animal, con la especie y la temperatura, siendo del orden de  $500 \text{ ml} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$  (SHOEMAKER y NAGY, 1977) (160), aunque las especies mejor adaptadas al medio terrestre tienden a tener una mayor permeabilidad cutánea (BENTLEY, 1971; MULLEN y ALVARADO, 1976) (11, 120), siendo la de los urodelos netamente acuáticos los que presentan el menor flujo ( $100 \text{ ml} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ) (BENTLEY, 1973 a) (12).

Se ha comprobado (DICKER y ELLIOT, 1970) (37) que cuando un individuo de la especie Rana cancrivora se somete a soluciones variables de ClNa, urea y sucrosa, el flujo neto de agua es directamente proporcional al gradiente osmótico, manteniéndose independiente de la naturaleza o concentración del soluto. Así pues, un anfibio que entra en una concentración hiperosmótica puede, inicialmente, perder agua por la piel.

A pesar de ello, hay especies adaptadas a altas concentraciones salinas que mantienen la de sus líquidos corporales ligeramente superior a la del medio, obteniendo así cantidades suficiente de agua por ósmosis (SHOEMA-

KER y NAGY, 1977) (160).

Entre los anuros, la pérdida de agua durante la época de sequía provoca un incremento de la conductividad hidráulica de la piel, lo que les faculta para rehidratarse rápidamente en contacto directo con agua o, simplemente, sobre una superficie húmeda, aunque se va a presentar una gran variabilidad en este fenómeno según las especies (HILLYARD, 1976 b) (73), dándose el caso extremo del sapo Scaphiopus conchi que se rehidrata rápidamente a los dos días de entrar en una zona seca (HILLYARD, 1975) (71).

En estos casos se ha observado cómo en la zona ventral de la pelvis la que responde primero a la rehidratación rápida (BALDWIN, 1974; McCLANAHAN, 1972) (6, 111), alcanzando la misma velocidad tanto si está el animal en contacto con una superficie húmeda como si está totalmente sumergido.

Así, se ha observado que en las especies de -- Bufo el agua se mueve por canales capilares hacia todo el cuerpo a partir de la superficie ventral que se encuentra en contacto con el agua (CHRISTENSEN, 1974; LILLYWHITE y LICHT, 1974) (20,100).

Las diferencias interespecíficas que se producen respecto a este fenómeno pueden deberse a la diferente estructura de la superficie tegumentaria que interviene en el contacto de la piel y el suelo (HILLYARD, 1976 a) (72).

Cuando el suelo se seca puede producirse una pérdida de agua desde el cuerpo hacia el suelo, problema que han solucionado algunas especies con la producción de callosidades constituidas por varias capas de células epiteliales muertas u otros materiales (McCLANAHAN y colaboradores, 1976; RENO y colaboradores, 1972; SEYMOUR y LEE, - 1974) (112, 142, 158) o bien, con el aumento de la concentración de urea en los líquidos tisulares lo que consigue mantener un gradiente favorable entre el suelo y el cuerpo (McCLANAHAN y colaboradores, 1976; McCLANAHAN, 1972) (112, 111).

Por otra parte, existe otro fenómeno de pérdida de agua a través de la piel de los anfibios; es así, puesto que el tegumento de estos animales presenta muy poca resistencia a la pérdida de agua por evaporación, dependiendo ésta de la humedad, temperatura y velocidad del viento.



Se han hecho medidas de este hecho bajo condiciones muy variadas, encontrándose diferencias netas entre los anuros y los urodelos que posiblemente sean el reflejo de diferencias en el tamaño y otras condiciones morfológicas (BENTLEY, 1971; SEYMOUR y LEE, 1974; SPIGHT, 1968) (11, 158, 168).

Para la mayoría de los anfibios es el tamaño el factor intrínseco determinante del grado de pérdida de agua por evaporación. Se ha encontrado que los grandes anfibios pierden menos agua por unidad de superficie que los más pequeños, probablemente porque la estabilidad de la capa externa aumenta con el tamaño corporal, siendo ésta el mayor determinante del flujo de agua cuando la piel es ella misma altamente permeable (SEYMOUR y LEE, 1974; SPIGHT, 1968) (158, 168).

La secreción mucosa no afecta, aparentemente, al grado de pérdida de agua, pero puede prevenir lesiones tegumentarias debidas a la desecación cuando el índice de evaporación es muy alto (LILLYWHITE y LIGHT, 1975) (101).

Hay algunas especies que no dependen de la húmedad del medio para evitar la rápida deshidratación. Es éste el caso del género CHIROMANTIS (LOVERIDGE, 1970) (103) y algunas especies de Phyllomedusa (SHOEMAKER y McCLANA - HAN, 1975) (159), que presentan unos grados de pérdida de agua por evaporación parecidos a los lagartos del desierto, bajo las mismas condiciones ambientales. Este fenómeno se debe, por lo menos en Phyllomedusa, a que posee - - glándulas especializadas en la piel que secretan una sustancia cerca sobre la superficie tegumentaria (BLAYLOCK - y colaboradores, 1976) (14).

Se ha postulado que esta típica baja resistencia a la evaporación cutánea de los anfibios es una consecuencia de la función de este órgano en la entrada de agua y en el intercambio gaseoso (SHOEMAKER y NAGY, 1977) - - - (160).

Por otro lado, paralelo al transporte del agua existe en este tegumento un transporte neto de iones - - - ( $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) (1,2) (PROCOPIO y VIERA, 1977; SHOEMAKER y NAGY, 1977) (138, 160).

El grado neto de entrada de iones  $\text{Na}^+$  en animales sin alimentar es aproximadamente el mismo que el de excreción de este ión por la orina; así, para diversos anuros (GARLAND y HENDERSON, 1975) (54) se han calculado unos valores que oscilan entre 0,1 y 1 meq.  $\text{Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , al igual que para varios urodelos acuáticos (BENTLEY, 1973 a) (12).

Este transporte de iones, que se conoce normalmente como "bomba de sodio" es un proceso activo (USSING, 1949 y 1960) (173, 174) que puede ser inhibido por glucósidos cardíacos (KOEFOED-JOHNSEN, 1957; NAKAJIMA, 1960) (84, 122) y dependiente de la producción de energía por el metabolismo oxidativo (LEAF y RENSHAW, 1957) (93).

El transporte activo del sodio a través de la piel presenta una cinética de saturación y su concentración depende del grado de concentración de este ión en el agua. La disminución del sodio en el medio aumenta su capacidad de paso a través de la piel del género Rana "in vivo" e "in vitro" y se piensa que el primer mecanismo por el que los anuros regulan la cantidad de  $\text{Na}^+$  corporal (BENTLEY, 1971) (11).

Se ha intentado establecer la localización morfológica de este transporte iónico, estableciéndose la teoría clásica (KOEFOED-JOHNSEN y USSING, 1958) (85) de que la piel de los anfibios puede considerarse compuesta de una "barrera de entrada" con permeabilidad selectiva para los iones  $\text{Na}^+$ ; pero es indispensable para los iones  $\text{K}^+$  y dejando pasar de forma no selectiva pequeños iones como el  $\text{Cl}^-$ . Además, tendrá una "barrera de salida" que es permeable para el  $\text{K}^+$  y pequeños aniones, pero impermeable para los cationes  $\text{Na}^+$  libres.

Por un lado, la función de "barrera de entrada" se asigna a la membrana plasmática del estrato germinativo de la epidermis y la "barrera de salida" junto al estrato córneo (FARQUHAR y PALADE, 1966) (50), considérandose más modernamente formada, esta última, tanto por el estrato córneo como por las membranas más externas del estrato granuloso apareciendo esta última superficie como la más selectiva de las dos (MARTINEZ-PALOMO y colaboradores, 1971) (104).

Respecto a estos datos se han aportado hechos que correlacionan el tamaño de los espacios intercelulares

más externos de la epidermis con el grado de transporte iónico (PRATLEY y McQWILLEN, 1973) (137) de forma que cuando éste es inhibido el tamaño de los espacios intercelulares disminuye y viceversa.

Determinando el funcionamiento de la piel de los anfibios se puede decir que por el tejido conjuntivo que forma la dermis se permite un transporte por difusión libre (CONWAY, 1955) (28) mientras que el transporte activo sólo ocurre en la epidermis, comprobándose que la caída fundamental de potencial eléctrico, reflejo del paso iónico, ocurre en la unión dermo-epidérmica (VOUTE y USSING, 1968) (180).

Los anfibios son excepcionales en su habilidad para conservar el sodio a la vez que están produciendo -- grandes cantidades de orina. Las ranas prácticamente no pierden sodio cuando se las mantiene en agua corriente de sionizada durante unos 60 días (McAFEE, 1972) (110) o en agua fija con inhibidores de la bomba de sodio (BENTLEY, 1973 b) (13).

Medidas "in vitro" indican que en los anuros se

conserva una entrada activa de  $\text{Na}^+$  estando, incluso, en medios hipersalinos (GORDON y TUCKER, 1968) (61), pero como, paralelamente, las concentraciones de sodio urinario permanecen muy bajas (GORDON y colaboradores, 1961) (60), se sugiere que esta entrada no ha de ser muy grande.

#### 1.4. Glándulas tegumentarias de los anfibios.

Los clásicos han venido estudiando las glándulas de los anfibios desde diferentes puntos de vista, llegando a diversas conclusiones en cuanto a los tipos existentes; la mayoría considera sólo dos tipos, aunque hay autores - que apuntan tres e incluso cuatro diferentes, basándose, - muchos de ellos en el tamaño y forma glandular para hacer esta clasificación (ASCHERSON, 1841; LEYDIG, 1876) (4,99).

Más recientemente se ha llegado a un acuerdo clasificándolas en dos tipos fundamentales: mucosas u granulares o venenosas, basado, ésta vez, en la diferencia de la estructura de los epitelios y en la secreción producida (BRISTOL y colaboradores, 1908; ENGELMAN, 1872) (19, 43).

A pesar de ello, por esta época, todavía se sigue considerando (CALMELS, 1883) (24) que las glándulas venenosas que aparecen en la piel dorsal de los sapos es el único tipo existente, aunque este autor hace una clasificación en cuatro subtipos basándose en las características del epitelio secretor.

Otros estudios (JUNIUS, 1896) (79) llegan a la conclusión de que los dos tipos glandulares van a corresponder a estados de desarrollo de un solo tipo glandular, aunque no se observen formas intermedias.

Paralelamente, se realizan investigaciones sobre el desarrollo de las glándulas cutáneas de los anfibios - (ANCEL, 1901) (1) estableciéndose que todas las glándulas proceden de la epidermis pero que pronto se establecen diferencias en su evolución, de forma que las grandes glándulas venenosas están mucho más diferenciadas hacia una función especial.

Un grupo de células epidérmicas se divide rápidamente y pronto se establece un botón o primordio glandular que se introduce hacia la dermis aunque mantiene su -



conexión con la epidermis, siendo éste punto donde se va a producir el futuro conducto; éstos autores indican que los primordios van a aparecer cuando el animal está al término de su forma totalmente acuática y ya están apareciendo las estructuras definitivas del adulto.

Según los autores clásicos (ANCEL, 1901; MUHSE, 1909) (1, 119) en la piel dorsal de los anfibios se pueden encontrar toda una serie de glándulas que van desde el estado de primordio hasta el de madurez total, considerando que en la fase más joven ya se encuentran todas las partes glandulares y el único cambio que experimentan es el crecimiento hasta alcanzar el tamaño adecuado, aunque sí - - apuntan cambios en el epitelio y en la producción de la secreción.

Después de estos estudios se puede establecer ya una primera descripción de una glándula madura basada fundamentalmente en la descrita para Bufo americanus (MUHSE, 1909) (119). Así, en esta época se puede decir que "las glándulas constan de un cuerpo en forma de saco y un conducto en el que se diferencia un cuello, localizado en la epidermis y una gran acumulación de células o collar que

marca el punto de transición entre la epidermis y el cuerpo glandular: el cuello va a poner en contacto la luz glandular con la superficie tegumentaria.

El cuerpo glandular consiste en una "matriz" homogénea rodeada de una cubierta constituida por fibras musculares en la parte externa y células epiteliales que tapizan a las anteriores por su parte interna. En algunos casos las fibras musculares forman una envuelta más o menos continua y las células epiteliales se ponen en contacto - directo con ellas; en otros, las fibras se presentan menos unidas entre ellas y se hallan separadas del epitelio por una gran cantidad de "matriz". Algunos autores indican la existencia de una membrana basal sobre la que descansan - las fibras musculares (JUNIUS, 1896; SCHULTZ, 1889; WEISS, 1898) (79, 155, 182).

Estas fibras musculares son de tipo involuntario, de forma alargada o ahusada; en algunos trabajos se ha establecido que estas fibras se dividen en fibrillas en uno o en sus dos extremos (ANCEL, 1901; JUNIUS, 1896) (1, 79) aunque hay quién niega este hecho (MUHSE, 1909) (119). En lo que todos están de acuerdo es que se disponen alrededor

de las glándulas como "meridianos terrestre" adaptándose a la curvatura del cuerpo glandular.

El epitelio de estas glándulas consta en gran parte de "núcleos desnudos" dentro de la "matriz" glandular, adquiriendo, en general, dos formas diferentes: a) - aplastados y con densidad uniforme y b) aquellos de forma arqueada que muestran un área clara en la zona más próxima a la secreción.

Además de éstos núcleos se presentan "Células - epiteliales" definidas como "un núcleo dentro de una masa de citoplasma claramente definida" (MUHSE, 1909) (119), variables de tamaño y en las que el citoplasma tiene un aspecto similar al de la secreción glandular, que va a salir a la superficie tegumentaria en forma de gotas. La secreción se describe como un líquido que se encuentra lleno de cuerpos globulares pequeños y densamente empaquetados.

Posteriormente, ya que se había aceptado la existencia de dos patrones glandulares sin que existiera relación entre ellos y de los que derivaban las demás variantes: como excepción, tenían de común su origen en primor-

dios epidérmicos morfológicamente iguales.

Del año 1941 es el trabajo de HELF y STARK (69) en el que se considera ya una diferencia en la producción de la luz glandular: en las mucosas se produce una cavidad sin degeneración celular sino que al envejecer el epitelio se pierde parte de él con la secreción; por su parte, la luz de las granulares resulta de una degeneración celular progresiva hasta que queda sólo un epitelio sincitial o - continuo.

Estos autores sólo asignan la existencia de una cubierta muscular a las glándulas granulares o serosas.

Al poco tiempo aparece un trabajo que describe exhaustivamente las glándulas tegumentarias de Rana pipiens (NOBLE y NOBLE, 1944) (124). Con este trabajo se puede decir que se asienta las bases de las glándulas típicas o - básicas; así, las glándulas granulares son mayores y menos numerosas que las mucosas. Por otro lado se corrobora que el desarrollo de las glándulas granulares va acompañado - por la formación de células musculares lisas alrededor del epitelio glandular, mientras éste último se transforma en

una fina capa sincitial con unos pocos núcleos en degeneración, a la vez que se establece alrededor de toda la estructura una red de células del tejido conjuntivo dérmico (NOBLE y NOBLE, 1944) (124).

También se ha observado (WILBER y CARROLL, 1940) (189) cómo las glándulas venenosas (granulares) de Bufo -- americanus van seguidas en su desarrollo por melanóforos que quedan rodeándola.

Es indudable que las glándulas envejecen y, ante éste hecho, ciertos investigadores (DAWSON, 1937; HELF y STARK, 1941; NOBLE y NOBLE, 1944) (34, 69, 124) han indicado que las células epiteliales degeneran y muchos de sus núcleos se desintegran, utilizándose parte de éste mate -- rial en la elaboración de productos de secreción.

Modernamente se han extendido los estudios de las glándulas tegumentarias desde el punto de vista tanto técnico como en la diversidad de las especies tratadas; basándonos en estos avances vamos actualizar de forma esquemática los conocimientos actuales.

Las glándulas mucosas presentan un cuerpo en forma de botella constituido por un epitelio secretor simple en el que la altura de las células varía entre bajas y poliédricas, con núcleos basales triangulares o redondeados; este epitelio es muy homogéneo entre las especies (GILLOIS-CHEVALIER, 1960; KRAMER, 1970; LE QUANQ TRONG, 1974) (55, -86, 98), descansando sobre una membrana basal (BRECKENRIDGE y MURUGAPILLAI, 1974) (18).

El moco se elabora en forma de pequeños gránulos, llegando a estar llena de ellos y, por tanto, estrechamente empaquetados; la densidad de los gránulos varía considerablemente dependiendo de su grado de maduración (BLAYLOCK y colaboradores, 1976; ERNST, 1973) (14, 44), pasando luego a la luz como una mezcla de gránulos grandes y pequeños que llegan a formar una gran masa que llena toda la cavidad (BRECKENRIDGE y MURUGAPILLAI, 1974) (18).

No existe el mismo acuerdo respecto a la existencia de una envuelta mioepitelial de las glándulas mucosas. Así, en diferentes especies, como las del género Phyllomedusa, se van a presentar por este tipo celular, mientras que no va a aparecer en las glándulas mucosas de Xenopus

tropicalis (LE QUANQ TRONG, 1974) (98) y sí en las del túberculo dorsal de Mertensiella caucásica (SCHUBERT, 1974) (154).

Luego de varios ciclos secretores las células entran en lisis y han de ser reemplazadas por otras que continuarán la función glandular; esta renovación epitelial - va a tener varias versiones; así, en Xenopus tropicalis - se va a producir a partir de células indiferenciadas del cuello glandular (LE QUANQ TRONG, 1974) (23); estas células jóvenes van a emigrar hacia la parte inferior de la glándula, al igual que ocurre en X. laevis (SPONNHOT, 1954) (164); sin embargo, en Nectophrynoides occidentalis (LE QUANQ TRONG, 1967) (95) se va a reemplazar la glándula completa.

El canal glandular está formado por células - - aplastadas, generalmente constituyendo dos capas, una externa orientada perpendicularmente a la superficie tegumentaria y otra interna de orientación paralela, desapareciendo esta dualidad en la parte más externa del canal (LE QUANQ TRONG, 1971 y 1974) (96, 98).

Este modelo de glándula mucosa puede presentar - variantes con las especies, como ocurre en las del género Rhacophorus (WELSCH y colaboradores, 1974)(186) en las que aparece una luz glandular mucho más amplia que en las glán - dulas típicas; se rodean de células musculares lisas; la - secreción varía entre gránulos grandes y polimórficos y - vesículas electron-transparentes, apareciendo formas inter - medias a las anteriores, por lo que se interpretan los di - ferentes tipos de secreción como diversas fases en la madu - ración del producto secretor.

Por su parte, en el género Phrynobatrachus se - han descrito tres tipos diferentes de glándulas mucosas - (LE QUANG TRONG, 1971)(96):

1) Es un tipo parecido a las glándulas mucosas - descritas para otras especies (GUILLOIS-CHEVALIER, 1960; - KRAMER, 1970)(55, 86), presentando un tipo de secreción me - rocrina.

2) De un tamaño más pequeño que el anterior; se constituye por un epitelio de células altas y los núcleos ocupan la cuarta o tercera parte inferior de las células. La secreción se produce de forma apocrina.

3) Es un tipo intermedio entre los otros dos; - presenta grandes células con núcleos redondeados y densos,



acompañadas por otras más pequeñas con núcleo basal.

A pesar de esta diversidad se puede decir que todas producen una secreción agranular basófila, es decir, - el moco es ácido debido a su contenido en sulfatos y ácidos carboxílicos, no habiéndose demostrado proteínas (DAPSON, 1970)(32).

Las glándulas granulares, serosas o venenosas, - se van a encontrar en la mayoría de las especies de anfibios existentes, aunque hay excepciones como en Rana angolensis (KRAMER, 1970)(86).

En general, estas glándulas van a presentar un epitelio entre columnar y piramidal, pero que se va a ir desintegrando en su parte distal durante la producción de la secreción (LE QUANG TRONG, 1974; KRAMER, 1970)(98, 86) - hasta llegar a constituir un epitelio sincitial (DOCKRAY y HOPKINS, 1975)(38). La posición de los núcleos en estos epitelios varían desde una posición central (KRAMER, 1970)(86) hasta una posición basal (LE QUANG TRONG, 1974)(98) con una morfología muy variable: aplastados, esféricos, pero por lo general de contornos irregulares.

La secreción es típicamente granular, de ahí su nombre, normalmente eosinófila y electrón-densa (BLAYLOCK y colaboradores,1976)(14); la morfología de los gránulos es variable, pudiendo ser espiculares (en Xenopus) o globulares (en Bufo regularis) (KRAMER,1970)(86).

Rodeando a este epitelio se han descrito células mioepiteliales (BANI,1969; BLAYLOCK y colaboradores,1976) (7, 14) o bien, según otros autores, células musculares lisas (LE QUANG TRONG,1974; SJOBERG y FLOCK,1976)(98, 162).

Comúnmente, esta envuelta contráctil se considera formada por células mioepiteliales que se unen entre ellas y con las células secretoras por medio de uniones de tipo desmosómico. En su citoplasma aparecen husos filamentosos y un sistema bien desarrollado de retículo endoplásmico liso que suele aproximarse a la membrana plasmática (BOCK y LERTPRAPAI,1972)(15) además de aparecer entre los filamentos (BANI,1969)(7).

Estas glándulas segragan sólo por medio de estímulos hormonales o nerviosos (ROOFE,1962)(144) y son el origen de las abundantes sustancias tóxicas producidas en la piel de los anfibios (VIALLI,1965)(178), muchas de las

cuales son derivadas de esteroides o indoles, pudiendo aparecer en esta secreción, ATP, zinc, catalasa y proteínas - diversas (QUAY,1972; VIALLI,1965)(139, 178). Concretamente en Xenopus tropicalis se ha comprobado que sólo secretan - proteínas, con abundancia de tirosina, triptófano y 5-hidroxitriptamina (LE QUANG TRONG,1974)(98), demostrándose este último compuesto en el tegumento de Discoglossus pictus - (ERSPAMER,1952)(45) y Xenopus laevis (TURNER,1966; VANABLE, 1964; VEERDONK,1960)(172, 175, 176).

Basándose en las características de la secreción se han descrito dos tipos diferentes de glándulas serosas en Rana pipiens (DAPSON y colaboradores,1973)(33):

1) Glándulas celulares, que producen unos finos gránulos intracelulares ricos en carbohidratos, ácidos carboxílicos, tirosina y sulfurados.

2) Glándulas luminales, con células de escaso citoplasma y núcleos periféricos y una gran luz que contiene grandes gránulos constituidos fundamentalmente de fosfolipoproteínas, catecolaminas y aminoácidos sulfurados.

La asociación entre las acciones de las glándulas mucosas y serosas puede dar lugar al fenómeno que lleva a producir un verdadero caparazón provisional que evita la -

deseccación del animal, como ocurre en Sirem intermedia - (RENO y colaboradores, 1972)(142) en el que ambas glándulas van a experimentar cambios durante la época estival - conduciendo a cubrir totalmente al animal, dejando sólo libre la boca, lo que le permite vivir en zonas donde periódicamente hay una sequedad casi desértica..

Recientemente, se ha descrito en el género Phyllomedusa (BLAYLOCK y colaboradores, 1976)(14) un tercer tipo glandular que produce una secreción lipídica, constituida básicamente por triglicéridos y pequeñas cantidades de esteroides y ésteres de la cera. En la luz de estas glándulas aparecen vesículas de tamaño y forma variables, caracterizándose por la gran resistencia del contenido vesicular a la fijación. Cada vesícula se rodea de una membrana limitante electrón-densa, separándose entre ellas por capas de citoplasma denso.

Iniciamos nuestro trabajo de investigación haciendo, en primer lugar, el estudio morfológico de la epidermis de ambas especies en estudio, cuyos resultados expresaremos por separado.

A continuación, se detallarán los resultados morfológicos correspondientes a las glándulas tegumentarias de las mismas especies citadas.

Posteriormente, haremos un estudio comparativo de estos resultados dentro de la discusión que incluye este trabajo.

## 2. MATERIAL Y METODOS

Los ejemplares de las especies Bufo calamita y Rana ridibunda fueron recolectados en las zonas de regadío de la huerta de la provincia de Granada y en las zonas colindantes de las marismas del Guadalquivir (provincia de Sevilla).

Fueron procesados según el siguientes esquema:

- 1) Obtención de muestras
- 2) Finación
- 3) Inclusión
- 4) Cortes

5) Contraste de cortes finos para la M.E. y tinción de semifinos para la M.O.

#### 1) OBTENCION DE MUESTRAS

Los individuos fueron anestesiados ligeramente en éter etílico y muertos, a continuación, por decapitación.

Se desprendió la piel de las zonas ventral y dorsal del cuerpo y se procedió al troceado de ésta en piezas de  $1 \text{ mm}^3$  aproximadamente.

A partir de éste momento fueron usados indistintamente dos medios de inclusión en plástico, según - - - GLAUERT (1956, 1958)(56,57) y SPURR (1969) (169) siguiendo procesos independientes para cada uno.

Ambos procedimientos dieron resultados aceptables sin producir ningún tipo de modificación significativa sobre el material utilizado por lo que se usaron indiscriminadamente.

Exponemos a continuación y por separado cada -



una de las técnicas:

A) Técnica para inclusión en DURCUPAN ACM Fluka, nombre comercial de la Araldita M o Araldita CY 212 - - - (GLAUERT y colaboradores, 1956; GLAUERT y GLAUERT, 1958 } (56, 57). Es una resina de alta viscosidad y, por lo tanto, de lenta penetración, por lo que no la hace apropiada para grandes piezas.

#### FIJACION.

Reactivos.-

1) Glutaraldehido al 4 % (SABATINI y colaboradores, 1963; GLAUERT, 1974) (149, 58). Como vehículo de este fijador se usó la mezcla de Cacodilato sódico 0,1 M - pH: 7,4 (SABATINI y colaboradores, 1964) (150)  $Cl_2Ca$  (MITCHELL, 1969) (116) y Sacarosa (GLAUERT, 1974) (58).

2) Tetróxido de osmio al 2% (MILLONING y MARINOZI, 1968) (114). Con este fijador se usó de vehículo el tampón S-Colidina (2, 4, 6 trimetil piridina) 0,2 M, pH: 7,4 (BENNETT y LUFT, 1959) (9).

3) Acetato de Uranilo en tampón Acetato Veronal 0,1 M, pH: 5,0 (RYTER y KELLENBERGER, 1958) (148), usado como fijador-contraste en bloque.

#### Procedimiento.-

1) Las piezas fueron metidas en Glutaraldehido, como primer fijador, durante 24 horas a 4°C.

2) Fueron lavadas, a continuación, 3 veces en tampón Cacodilato-sacarosa, permaneciendo en cada lavado un tiempo no inferior a 3 minutos, con agitación.

3) Son introducidas luego en el segundo fijador, Tetróxido de osmio, durante 4 horas a 4°C.

4) Contraste en bloque con Acetato de Uranilo durante 1 hora a temperatura ambiente.

#### INCLUSION.

Materiales.-

La mezcla de Durcupán ACM Fluka se realizó si-

guiendo las proporciones que se indican:

- Araldita CY 212 ..... 10 ml
- Endurecedor 964 (DOSA anhídrido dodecénico succínico) ..... 10 ml
- Acelerador 964 (DMP30, 2, 4, 6, tri-dimetil aminometil fenol) ..... 0,1 ml
- Plastificante (DBP, dibutil ftalato). 0,3 ml

Procedimiento.-

a) Deshidratación por medio de una serie de alcoholes (etanol) de riqueza creciente (30%, 60%, 90%, - - 100%) con pasos de 15 minutos cada uno, haciendo doble pa- so por alcohol absoluto, siempre a 4°C.

b) Sustitución del alcohol de 100% por Oxido de propileno en dos pasos de 15 minutos cada uno.

c) Impregnación en la resina por medio de tres pasos de 1 hora cada uno en mezclas de Oxido de propileno- resina de pureza creciente de la forma: 25%, 50% y 75%; - dejando a continuación las piezas en resina pura durante toda la noche.

d) Realización de los bloques en moldes planos - para orientar las piezas.

e) Polimerización de la resina en estufa a 60°C; se produce en unas 48 horas.

#### REALIZACION DE LOS CORTES.

Materiales.-

1) Ultramicrotomo Ultratome LKB III

2) Rejilla de cobre de 3 mm de diámetro.

Procedimiento.-

Se realizaron cortes de control .de 0,5 um de - grosor que se montaron sobre un portaobjetos de vidrio.

Los cortes finos oscilaron entre 60 y 100 A de - grosor, montándose sobre las parrillas de cobre.

#### CONTRASTE DE LOS CORTES FINOS.

Materiales.

- 1) Acetato de Uranilo ..... 7,5 g  
    Agua destilada ..... 100 ml
  
- 2) Citrato de plomo ..... 20 mg  
    Agua destilada ..... 10 ml  
    NaOH 10N ..... 0,1 ml

Procedimiento.-

1) Se coloca sobre una superficie de parafina o cera dental tantas gotas de Uranilo como rejilla se deban contrastar.

2) Se ponen en contacto las rejillas con el Uranilo durante 20 minutos.

3) Lavar las parrillas con agua destilada.

4) Contrastar seguidamente con Citrato de plomo durante 5 minutos.

5) Lavar con agua alcalina para evitar que precipite como carbonato.

6) Se secan.

TINCION DE CORTES SEMIFINOS.

Materiales.-

Estos cortes de control se tiñen con Azul de Toluidina, colorante que se prepara según la receta:

- Agua destilada .....	500 ml
- Borax .....	5 g
- Azul de Toluidina .....	4 g
- Pironina G .....	1 g

Procedimiento.-

- 1) Cubrir la preparación con el colorante.
- 2) Calentar hasta emisión de vapores.
- 3) Lavar
- 4) Deshidratar y montar.

B) Técnica de inclusión en SPURR-POLARON. Es una resina Epoxi de baja viscosidad (60 cps a 25°C) con gran poder penetrante. Es imprescindible para grandes piezas (SPURR, 1969) (169).

#### FIJACION.

Materiales.-

- Glutaraldehido 2,5%.
- Vehículo; Se usó tampón fosfato según Milloning (MILLONING, 1961) (113).
- Tetróxido de Osmio al 1% en el mismo tampón - fosfato anterior.

El tampón fosfato de Milloning se prepara según la receta siguiente:

- solución A: fosfato monosódico (Pm=137,99) al 2,26%.
- solución B: hidróxido sódico al 2,52%.
- glucosa al 5,4%.
- cloruro cálcico al 1%.

Se prepara mezclando las soluciones A y B en pro

porción de 83 ml y 17 ml respectivamente, A 90 ml de esta mezcla se le añaden 10 ml de la solución de glucosa al 5,4% y 0,5 ml del cloruro cálcico.

Se ajusta el pH entre 7,2 y 7,4.

#### Procedimiento.-

1) Introducción de las piezas en Glutaraldehido al 2,5% entre 2 y 6 horas.

2) Se lavan tres veces en tampón fosfato.

3) Se hace la segunda fijación en Tetróxido de Osmio al 1%.

4) Se hacen tres lavados breves en agua destilada.

#### DESHIDRATAACION e INCLUSION

- Mezcla acetona 70°-Act. Uranilo.



- Resina pura según el método de SPURR.

El acetato de Uranilo a usar se prepara disolviendo 1 g de Uranilo comercial en 30 ml de agua destilada, - añadiendo Acetona absoluta hasta completar los 100 ml.

La resina pura se preparó según las siguientes porciones:

- Resina VCD (ERL 4206) ..... 10 g
- Endurecedor NSA (anhídrido nonecil succinato) ..... 26 g
- Plastificante DER 736 (éter diglicérico de propilén glicol) ..... 7 g
- Acelerador DMAE (dimetil aminoetanol) .. 0,4 g

Procedimiento.-

1) Se introducen las piezas lavadas en la mezcla de Acetona 70% y Acetato de Uranilo durante un tiempo mínimo de 2 horas, pudiéndose dejar toda la noche.

2) Dos pasos seguidos en Acetona de 100% de 15

minutos cada uno.

3) Dos pasos consecutivos en Oxido de Propileno de 15 minutos cada uno.

4) A continuación se introducen las piezas en una mezcla a partes iguales de Oxido de Propileno y resina pura durante un tiempo mínimo de 1 hora.

5) Después se pasan a resina pura permaneciendo aquí durante toda la noche.

6) Realización de los bloques en moldes planos para la orientación de las piezas.

7) Polimerización de la resina en estufa 60°C, produciéndose en unas 16 horas.

#### REALIZACION DE LOS CORTES.

El proceso del corte de los bloques producidos por la técnica anterior, al igual que su contraste y tinción, se realizó de la misma forma que para los bloques de Durcupán descrita anteriormente.

## OBSERVACION Y FOTOGRAFIA.

Este apartado de la experimentación se realizó en el Microscopio Electrónico marca JEOL, modelo 100B de la Cátedra de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, utilizándose como negativos fotográficos placas de vidrio KODAK - de 6x9 cm<sup>2</sup>.

### 3. RESULTADOS

### 3.1 EPIDERMIS Bufo calamita.

Al M.O. la epidermis de Bufo calamita presenta entre 5 y 8 capas celulares que van a corresponder a los estados progresivos que llevan hasta la configuración definitiva de las células cornificadas que componen el estrato córneo (Figs. 1 y 2).

La zona basal presenta unos repliegues que producen entrantes y salientes hacia la dermis (Fig. 2) mientras que el resto de las superficies celulares se encuentran tapizadas por aspectos espinosos que representan, como veremos más adelante, abundantes uniones de tipo desmosómico que aparecen en interdigitaciones entre células vecinas (Figs. 1 y 2).

Las células basales presentan un núcleo central, de forma irregular (Fig. 2), con heterocromatina formando acúmulos periféricos y centrales (Fig. 2). Tal como se - - avanza hacia la superficie externa van desapareciendo en la mayoría de las células, con diferentes estadios de picnosis, no conservándose estos núcleos en las células del estrato córneo.

Al M.E. las células del estrato germinativo aparecen columnares unidas entre ellas por desmosomas (Figs. 3 y 4); la superficie basal se encuentra festoneada y tachonada por abundantes hemidesmosomas (Figs. 4 y 5); en ambas uniones celulares llegan a contactar haces de tonofilamentos (Figs. 5 y 6), mientras que en el resto del citoplasma, donde se encuentran en gran abundancia, aparecen en todas las direcciones, aunque grupos más o menos - grandes corren en curso paralelo (Figs. 4 y 6).

Es notable la abundancia de vesículas intracitoplásmicas que aparecen preferentemente en los bordes celulares, siendo muy variables de tamaño y forma (Figs. 3 y 4), apareciendo también hacia el interior del citoplasma llegando hasta las zonas perinucleares (Figs. 5 y 6).

Los orgánulos citoplásmicos están poco desarrollados: las mitocondrias son pequeñas y de contorno irregular, con las crestas poco desarrolladas. En el citoplasma perinuclear aparecen cisternas del retículo endoplásmico rugoso y liso, aunque en poca cantidad, observándose algunas dispersas por el citoplasma restante; hay además un pequeño aparato de Golgi y abundantes polirribosomas libres (Figs. 5 y 6).

El núcleo es central, de forma más o menos oval (Fig. 3) y con heterocromatina formando acúmulos sobre la membrana interna de la envoltura nuclear. Hay, además, concentraciones de esta heterocromatina en el interior del núcleo, apareciendo también un nucleolo patente (Figs. 3 y 4).

El borde nuclear no es liso sino que presenta grandes escotaduras en las que penetran tanto vesículas como cisternas del retículo endoplásmico (Figs. 3 y 6). Las células de este estrato van a ser las encargadas de reponer la población celular que se va a ir perdiendo en el estrato córneo, por lo que es corriente observar figuras de mitosis (Fig. 4).

Entre las células basales va a aparecer un espacio intercelular de dilatación variable (Figs. 6 y 7), alternándose con los puntos de anclaje representados por los desmosomas, que son homogéneos en cuanto a su estructura aunque de longitud variable (Fig. 6); es junto a estos espacios intercelulares dilatados donde se producirá el elevado número de vesículas intracitoplásmicas que decrece en la membrana plasmática basal de las células germinales (fig. 4).

Es corriente encontrar, entre las células de este estrato, melanocitos, que van a ceder parte de sus gránulos a las células epidérmicas que lo rodean, como se puede observar en la figura 7.

Separando a las células basales de la dermis - - aparece una fina membrana basal de apariencia homogénea (Figs. 4 y 5), presentando mayor electrondensidad en su posición inmediatamente bajo los hemidesmosomas. A esta membrana basal llegan fibrillas que aparecen mezcladas con las fibras de colágena (Fig. 5), estando estas últimas dispuestas en todas direcciones, preferentemente formando acumulos unidireccionales; además llenan los espacios dérmis-



micos producidos por las irregularidades epidérmicas - -  
(Figs. 3 y 5).

En las células superiores a estas se va a producir un empaquetamiento progresivo de los tonofilamentos -  
(Fig. 8) que se concentran en haces; se orientan en todas  
las direcciones celulares, aparece este empaquetamiento -  
más intenso en contacto con los desmosomas (Figs. 8 y 9).

En aquellas células que aún se conserva el núcleo, se observa la existencia de un citoplasma perinuclear - -  
libre de tonofilamentos, en el que aparecen algunas  
mitocondrias de aspecto degenerativo, unas pocas cisternas  
del retículo endoplásmico rugoso y liso y diversos -  
cuerpos granulares electrondensos (Figs. 11 y 12).

Es corriente encontrar en las células de estos -  
estratos intermedios entre las células basales y las del  
estrato córneo, gránulos de melanina, fundamentalmente en  
el citoplasma perinuclear (Figs. 9 y 10) aunque pueden -  
aparecer algunos entre los haces filamentosos (Figs. 8 y  
9); estos gránulos proceden de melanocitos que llegan a -  
localizarse entre los queratinocitos de éste nivel (Fig.  
8).

El espacio intercelular prácticamente es virtual (Figs. 10 y 11) permaneciendo más dilatado entre las células más cercanas al estrato germinativo (Fig. 8); conservándose aún alguna actividad pinocitaria. Al avanzar hacia las células distales, además de reducirse este espacio, se va acentuando la interdigitación celular, haciéndose en algunos puntos de grado extremo (Figs. 9 y 10).

En estas células aparecen unos gránulos de tamaño muy pequeño que se localizan en las cercanías de la membrana plasmática (Figs. 9, 11 y 12), apareciendo algunas veces, sobre todo, en las células más externas en contacto con ella; presentan una forma netamente circular y un contenido moderadamente denso.

Además de estos aparecen otros mayores de tipo vesicular y con un contenido irregular, que están prácticamente ausentes en las células que se localizan inmediatamente bajo las células cornificadas (Figs. 11 y 12), mientras que aún quedan algunos gránulos pequeños en ellas.

Es característico en estas células intermedias cómo va aumentando la densidad citoplásmica, debido a la producción de una matriz que va englobando a los haces de

tonofilamentos (Figs. 10 y 11).

El espacio existente entre el estrato córneo y las últimas células del estrato granuloso presenta una amplia dilatación (Figs. 9 y 10), interrumpida sólo por los desmosomas que unen ambas células (Fig. 11), conservando éstos su estructura con una mayor afluencia de tonofilamentos (Figs. 12).

Este espacio intercelular presenta un contenido que se nos asemeja al que aparecía en el interior de los gránulos pequeños antes descritos, observándose en algunos puntos cómo sale su contenido al exterior e incluso se encuentran algunos de ellos fuera de las células (Fig. 11).

El estrato córneo está constituido por una capa de células muy electrodensas (Figs. 11 y 12) en las que sobre una matriz homogénea se insinúan los haces filamentosos; no suelen presentar ningún otro tipo de organúlos de melanina en su interior (Figs. 9 y 10).

### 3.2. GLANDULAS Bufo calamita

En el tegumento de Bufo calamita se observa la existencia de dos tipos glandulares netamente diferentes en su morfología (Figs. 13 y 23); a continuación, vamos a proceder a la descripción de cada uno de ellos por separado.

La glándula de menor tamaño, constituida por un epitelio simple cilíndrico en su parte inferior o más profunda (Figs. 13 y 14), disminuyendo la altura epitelial - tal como se acerca hacia la epidermis; en este punto la - glándula aparece constituida por dos capas celulares en - las que los núcleos aparecen de diferentes tamaños y un -

citoplasma totalmente exento de gránulos secretorios - -  
(Fig. 14).

El epitelio secretor presenta unas células repletas totalmente de gránulos de secreción, muy empaquetados, y un escaso citoplasma en la parte basal o algunas porciones muy pequeñas entre algunos de los gránulos (Fig. 14).

Los núcleos aparecen por lo general en posición basal, aunque pueden estar en posición media o incluso - más superficial. La luz glandular presenta acúmulos de secreción de la misma densidad y aspecto que el contenido de los gránulos, viéndose además cómo del citoplasma superficial de las células secretoras se desprenden gránulos aislados o grupos de ellos (Fig. 14).

Rodeando a la glándula podemos observar cómo aparecen unas células finas de recorrido limitado y con carácter mioepitelial (Figs. 13 y 14); son células fusiformes, con un núcleo en la zona central más ancha, apareciendo el citoplasma homogéneo.

Al M.E. se observan diferentes estados celulares

del epitelio secretor, apareciendo células bajas, en las que no aparecen gránulos, que pueden presentarse en un doble estrato (Figs. 15 y 16) y otras con los núcleos basales y el resto de la célula cargado de gránulos mucosos densamente empaquetados, los cuales dejan de vez en cuando, algunas porciones pequeñas de citoplasma entre ellos - - (Fig. 17).

Por su parte, las células indiferenciadas se localizan tanto en el cuello glandular como en zonas más profundas del epitelio, donde están comenzando la formación de la secreción (Figs. 14 y 18). El citoplasma de estas células está ricamente surtido de orgánulos. El núcleo es redondeado (Figs. 14 y 18) aunque en algunos casos puede presentar una ligera forma oval (Fig. 15); es de tamaño variable y con una gran riqueza en heterocromatina que se presenta como grandes acúmulos en la membrana interna de la envoltura nuclear, estando la membrana externa tachonada de ribosomas (Fig. 16).

Se suele presentar un aparato de Golgi supranuclear en el que se forman pequeñas pero abundantes vesículas (Fig. 15). Casi todo el citoplasma se presenta lleno de cisternas del retículo endoplásmico liso (Fig. 15 y 18)

disponiéndose por todo el citoplasma con grados muy variables de dilatación de sus cisternas (Fig. 19), entre las que aparecen grandes mitocondrias de abundantes crestas tubulares (Figs. 16 y 19). En las porciones basales de estas células aparecen cisternas dilatadas del retículo endoplásmico rugoso con un contenido granuloso, apareciendo también ribosomas libres; se presentan también algunos gránulos densos de apariencia lisosomal (Figs. 15, 16 y 18).

En algunos puntos aparecen cuerpos multimembranosos concéntricos que parecen estar en relación directa con el retículo endoplásmico liso; estos cuerpos aparecen a veces en la luz glandular junto a la membrana plasmática (Figs. 15 y 18), presentando esta última irregularidades en su porción que da a la luz con evaginaciones dispersas del tipo de microvilli.

Las células presentan muchas interdigitaciones entre sí, sobre todo en la mitad más cercana a la luz glandular, aumentando la superficie de contacto entre ellas (Fig. 16). En algunas de estas células aparecen unas vesículas con un aspecto similar a las cisternas del retículo

endoplásmico pero más dilatadas y más o menos redondeadas, que presentan un contenido granuloso que es semejante, - por un lado, al de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (Fig. 18) y por otro lado al contenido de la luz, apareciendo predominantemente en el citoplasma más cercano a la luz glandular.

Serían las células que presentan mayor número de este tipo vesicular las que nos llevan a las células epiteliales en intensa actividad secretora; en el tipo de célula madura se puede observar cómo el núcleo se sitúa basalmente, con una gran carga de heterocromatina y un nucleolo central muy patente (Fig. 17); la morfología nuclear es muy variable perdiéndose la forma redondeada que habíamos observado en las células anteriores pasando a ser núcleos de contorno irregular, conservando el tapizado externo de su envoltura por ribosomas aunque el espacio perinuclear aparece más dilatado (Fig. 19).

El poco citoplasma no granular se presenta rodeando al núcleo o bien, en pequeños acúmulos entre los gránulos secretorios (Figs. 17 y 19).



El citoplasma perinuclear está constituido fundamentalmente de retículo endoplásmico rugoso en su porción más cercana y retículo endoplásmico liso junto a paquetes mitocondriales en su porción más alejada; las cisternas del retículo endoplásmico rugoso aparecen dilatadas, presentándose además entre los gránulos de secreción, incluso en las partes más externas de las células (Figs. 19 y 20). En menor proporción aparecen las vesículas del retículo endoplásmico liso entre los gránulos, relegándose fundamentalmente el citoplasma basal o perinuclear (Fig. 17).

Los cuerpos multimembranosos siguen observándose tanto en el citoplasma basal como incluidos entre los gránulos, englobando a veces un contenido granuloso de la misma apariencia que el de los gránulos secretorios (Figs. 17 y 22).

Las mitocondrias se observan en el citoplasma libre de gránulos, formando acúmulos de dos o más (Fig. 21), conservando la riqueza en crestas aunque presentan el aspecto de estar en vías de degeneración, si las comparamos con las observadas en las células inmaduras.

El complejo de Golgi aparece en un alto estado de desarrollo con sáculos alargados, presentando los de la porción de maduración o cóncava una importante dilatación, lo que indica un alto grado de funcionalidad (Fig. 19).

Los límites intercelulares han perdido la mayoría de las interdigitaciones apareciendo un límite neto intercelular reforzado por la presencia de los gránulos (Fig. 20); éstos son más o menos redondeados pero con cierta tendencia a la deformación a causa de la presión que ejercen unos sobre otros (Figs. 17 y 20); presentan un límite neto entre ellos representado por una membrana única pero que en algunos momentos parece desaparecer (Figs. 20 y 21), fusionándose el contenido de algunos de ellos en estos puntos (Fig. 22), siendo éste contenido de aspecto granuloso y con poca densidad (Figs. 21 y 22).

En algunos puntos se desprenden uno o varios de estos gránulos, a veces acompañados de parte de citoplasma (Figs. 17 y 20). apareciendo la luz llena de una secreción en la que se han perdido los límites granulares y donde adquiere una menor densidad que cuando se encontraba aún en el interior de la célula.

En ciertas partes de la glándula el epitelio secretor descansa directamente sobre una membrana basal gruesa y homogénea (Fig. 21) que la separa del tejido conjuntivo dérmico, estando reforzada esta separación por una acumulación de fibras de colágena.

Por lo general, entre la membrana basal y las células secretoras aparecen unas finas células mioepiteliales (Figs. 14 y 15) que presentan una zona engrosada donde se localiza un núcleo, de forma oval y posición central (Fig. 22) con abundante heterocromatina periférica y presentando en algunos puntos ribosomas adosados a la membrana externa.

El citoplasma se presenta cargado de filamentos que adquieren una posición central y corren de forma paralela al eje mayor de las células; entre ellos se presenta retículo endoplásmico liso que llega a formar caveolas en las inmediaciones de la membrana plasmática, donde se presenta el escaso citoplasma celular, representado fundamentalmente por pequeñas mitocondrias redondeadas y abundantes vesículas de pinocitosis, sobre todo en la membrana plasmática en contacto con la basal (Fig. 22). Junto a --

ella se presentan en ocasiones fibroblastos o sus prolongaciones que siguen el trayecto más o menos accidentado de la glándula.

Junto a estas glándulas se presentan unas de mayor tamaño, de morfología irregular, con un contorno de entrantes y salientes (Fig. 23), siendo en esos últimos donde se produce una gran acumulación de núcleos que presentan una forma irregular, insinuando una disposición más o menos ordenada en un solo plano (Figs. 24 y 25), aunque se presentan algunos en posición más interna, es decir, hacia la luz glandular.

Alrededor de los núcleos no se reconocen límites celulares sino que aparece todo ocupado por una masa de citoplasma más o menos densa pero que es netamente diferenciable de la gran luz glandular que se encuentra repleta de un material de secreción muy heterogéneo (Figs. 23 y 25).

Junto a los núcleos aparece una abundante cantidad de gránulos densos que al M.O. parecen situarse también como parte de la secreción (Fig. 23); a mayores aumentos se observa cómo el citoplasma perinuclear se continúa insensiblemente con la secreción propiamente dicha (Figs. 24

y 25).

A la altura del cuello glandular desaparecen los núcleos antes mencionados (Figs. 23) apareciendo otros de aspecto más regular, ovales, viéndose, a mayores aumentos, - cómo contienen mayor cantidad de heterocromatina (Fig. 26); en estas células se conservan los límites celulares, sin - que aparezcan los gránulos que se apreciaban en el epitelio inferior (Fig. 26).

La secreción propiamente dicha presenta una gran diversidad de gránulos que varían tanto en la densidad de su contenido como en su morfológica y tamaño (Figs. 23 y - 25).

Rodeando toda la glándula, sobre todo en su porción más basal, aparecen grandes células mioepiteliales - que se ponen en íntimo contacto con el epitelio secretor (Figs. 23 y 24), aunque aparecen pequeñas dilataciones de este espacio intercelular (Fig. 24), observándose en algunos puntos del epitelio la ausencia de estas células por - lo que constituyen una cubierta contráctil discontinúa del cuerpo glandular (Fig. 25).

Presentan un núcleo pequeño de posición más o menos central y un citoplasma denso y homogéneo con los límites citoplasmáticos en contacto con la dermis de forma dentada (Figs. 24 y 25).

Al observar el citoplasma del epitelio secretor con el M.E. lo podemos definir como una mezcla de membranas sin una aparente ordenación, con ausencia casi total de orgánulos celulares si exceptuamos los núcleos (Figs. 27 y 29).

Este acúmulo de membranas puede interpretarse en algunos puntos como cisternas del retículo endoplásmico rugoso (Fig. 28), aunque en otros puntos puede considerarse como una masa heterogénea de aspecto fibrilar, mezclado con otro granular (Figs. 27 y 30). Podemos así decir que el único orgánulo celular verdaderamente reconocible es el retículo endoplásmico que en algunas porciones citoplásmicas puede incluirse en la categoría de rugoso (Figs. 28, -29 y 31).

En estas membranas aparecen estructuras más o menos redondeadas que se presentan con una doble membrana y ~~que nosotros interpretamos como mitocondrias o, mejor dicho,~~

restos de mitocondrias que han perdido su integridad morfológica y, por lo tanto, funcional (Figs. 28 y 30).

En algunas partes del citoplasma se aprecia la existencia de grandes vesículas que están rodeadas de una membrana, que en muchos casos es doble, con un contenido irregular constituido por un material granular, siendo posible encontrar restos de membranas en su interior (Figs. 28 y 29); aparentemente parece como si cisternas del retículo endoplásmico rugoso, aunque en algunos casos recuerde al liso, englobaran parte del citoplasma integrado por ese material heterogéneo. Algunas de estas vesículas presentan algún punto de abertura o discontinuidad y en otras ocasiones aparecen varias en estado de fusión (Figs. 28 y 32).

Una característica sobresaliente de este citoplasma es la existencia de abundantes gránulos electrondensos (Figs. 27, 29 y 30) que presentan una gradación en el tamaño, apareciendo unos más pequeños, de límites poco netos, que pueden aparecer en contacto dos o más de ellos, o bien, ponerse en contacto con otros mayores, presentando estos últimos un contorno definido que aparece con un contenido de diferentes densidades, e incluso en algunos casos, pre-

sentar un centro más claro conservándose la densidad sólo a modo de halo (Figs. 29 y 32); es corriente encontrar también fusión entre ellos o con otros más pequeños, viéndose cómo en muchos casos hay unas membranas que rodean al gránulo formando un halo claro que lo aísla netamente del citoplasma circundante (Fig. 30).

En el límite del citoplasma epitelial con la secreción propiamente dicha, donde no hay un límite celular neto, el material denso de los gránulos parece perder su identidad granular y adquirir formas caprichosas que van a llevar a constituir toda la gama de estructuras que reconocemos en la secreción de este tipo glandular (Fig. 32).

Formando una barrera de posición más o menos basal se localizan los múltiples núcleos del epitelio secretor, los cuales se encuentran compartiendo un gran citoplasma sin que existan membranas de separación, como hemos ya indicado, que mantengan la identidad celular (Figs. 27, 28 y 29).

La característica más sobresaliente de ellos es su polimorfismo; si los observamos al M.E. podemos decir



que existe una polarización en el sentido de que casi todos ellos presentan prolongaciones más o menos finas, a modo de "colas", dirigidas hacia la superficie externa glandular, mientras que la otra porción, redondeada, que podemos denominar "cabeza" se orienta hacia la luz (Fig. 24). En estos casos la "cabeza presenta un borde regular y pocos acúmulos de heterocromatina (Fig. 27), reducidos a una pequeña línea, más o menos irregular, adosada a la membrana interna del núcleo, apareciendo algunas excepciones a modo de protuberancias localizadas (Figs. 27 y 28); al interior de esta zona del núcleo está compuesta fundamentalmente de eucromatina (Fig. 29).

Las prolongaciones que hemos llamado "colas" son muy irregulares, algunas muy finas, formando entre ellas grandes escotaduras; su contenido es fundamentalmente de heterocromatina, que desde la membrana nuclear llega a ocupar todo el interior (Figs. 27 y 31).

La membrana externa de la envoltura nuclear aparece tachonada de ribosomas y el espacio perinuclear es angosto, aunque algunos puntos se presenta algo dilatado, estando en ambos casos en conexión con el retículo endoplásmico.

A nivel del cuello glandular hemos señalado la existencia de unas células planas de apariencia diferente a las del epitelio en estado de secreción, independientes entre ellas, a diferencia de las anteriores con un solo núcleo por célula (Fig. 26); éste es de forma oval, con su eje mayor paralelo al mayor de la célula; presentan un nucleolo evidente y gran abundancia de heterocromatina localizada como una gran banda adosada a la envoltura nuclear, pudiéndose continuar con otros gránulos de posición central; la membrana externa aparece lisa y en espacio perinuclear es estrecho y de grosor constante ( Figs. 33 y 34).

Estas células se unen entre ellas por algunos desmosomas y las más externas están separadas del tejido conjuntivo de la dermis por una fina membrana basal (Fig. 33). La dotación de orgánulos no presenta ningún aspecto llamativo; así, aparecen mitocondrias pequeñas con escasas crestas, cisternas del retículo endoplásmico liso dispersas por el citoplasma y un pobre desarrollo del complejo de Golgi. Pero es de destacar la abundancia de vesículas de contenido claro que se distribuyen por el citoplasma con una importante gama de tamaños (Figs. 33 y 34).

Todas las células descritas hasta ahora rodean - el espacio interno de la glándula que representa la luz, - lugar donde se acumula la secreción antes de salir al exterior; esta secreción es, como se observa en las fotografías 23 y 25, muy eherogénea, produciéndose casi sin solución - de continuidad a partir del epitelio basal de la glándula (Fig. 35).

Como se puede observar, la secreción está compuesta por una mezcla de material electrodensso que viene representado por los gránulos producidos por el epitelio y una gama extensísima de estructuras de densidades diversas, como si los gránulos antes descritos perdieran su integridad morfológica y evolucionaran hacia las demás formas observadas (Figs. 35, 36 y 37).

Es de señalar que a estos gránulos, al producirse la secreción, acompaña parte del citoplasma epitelial - que parece una pérdida progresiva del mismo en favor de la formación de la secreción madura (Figs. 35 y 37); así pués, los gránulos se presentan rodeados de abundantes membranas procedentes de los orgánulos rodeados de membranas que observabamos en el citoplasma del epitelio secretor (Figs. 37 y 38).

Se aprecia cómo estas vesículas se rompen y su contenido aparece disperso por la masa secretoria y cómo en algunos puntos aparecen asociadas a material electrodensito semejante al de los gránulos, sin olvidar que en estas asociaciones no faltan abundantes restos membranosos (Figs. 37 y 38).

Por otro lado, se observan estructuras en las que el material electrodensito aparece asociado a otro material granular, siendo éste heterogéneo en su densidad (Fig. 36); otras veces, aparece asociado al material que se localizaba en las vesículas grandes del epitelio que, por su parte, parecen intervenir en la producción de otras estructuras muy ordenadas de tipo concéntrico (Fig. 36) o cerebriformes (Figs. 35 y 36), e incluso estos dos tipos últimos de estructuras ordenadas pueden verse íntimamente asociadas (Figs. 36 y 38).

Además, es de destacar que observamos cómo al ir madurando la secreción, en el sentido de que son más abundantes las estructuras complejas y menos las estructuras primitivas, como gránulos y vesículas, va disminuyendo también ostensiblemente el número de membranas que aparecían al formarse la secreción original (Figs. 37 y 38).

Resumiendo, podemos clasificar así las estructuras encontradas:

- 1) Gránulos densos aislados.
- 2) Vesículas grandes de material reticular.
- 3) Gránulos densos asociados a material granuloso.
- 4) Gránulos densos asociados a material reticular
- 5) Estructuras concéntricas.
- 6) Estructuras cerebroides.
- 7) Estructuras mixtas de las dos anteriores.
- 8) Material reticular asociado a las estructuras anteriores.

Como hemos descrito antes, existe una cubierta - contráctil alrededor del cuerpo glandular constituida por grandes células mioepiteliales, su núcleo central y que - presentan un borde celular que es liso en su porción interna y dentado en su porción externa (Figs. 24 y 25).

Al M.E. se observa cómo prácticamente todo el citoplasma está integrado por filamentos lo que le da una apariencia más densa que el resto de las células vecinas (Figs. 27 y 39), entre los filamentos aparecen cisternas del retf

culo endoplásmico liso (Fig. 39) y en posición central un núcleo redondeado con escotaduras, abundante heterocromatina y un borde de aspecto vesiculoso (Fig. 40).

En el citoplasma restante, limitando a las porciones perinucleares y bordes celulares, aparecen algunas mitocondrias pequeñas, cisternas del retículo endoplásmico liso y, sobre todo, uniones desmosómicas con el epitelio secretor. Estos desmosomas se presentan sobre prolongaciones de ambas células lo que produce un espacio intercelular de dilatación irregular y vesiculoso (Figs. 39 y 40).

La porción externa de la célula mioepitelial presenta gran abundancia de vesículas de micropinocitosis tapizando toda la membrana plasmática que se separa netamente del conjuntivo circundante por una membrana basal; es de señalar que las células mioepiteliales se unen entre sí también por desmosomas (Figs. 30 y 39).

### 3.3. EPIDERMIS R. rídibunda

Durante el proceso de la metamorfosis de los anfibios anuros, en este caso Rana ridibunda, se va a producir una transformación pausada pero total de la piel que rodea toda el cuerpo del renacuajo. Desde el punto de vista que nos interesa, es decir, el tegumento del animal adulto, es crucial el momento en que se pasa de un epitelio uniestratificado o diestratificado a un epitelio pluriestratificado, como paso previo a la conformación definitiva de una epidermis queratinizada.

Con M.O. se observa en esta etapa de pluriestratificación una epidermis compuesta por 3 o 4 capas de célu

las (Fig. 41); las más inferiores o estrato germinativo - son altas, con un gran núcleo central, presentando prolongaciones que les da una fisonomía irregular a la unión entre la dermis y la epidermis (Fig. 42). Es característico de estas células el gran espacio intercelular que muestran, donde se insinúan finas prolongaciones que llegan a contactar unas con otras (Fig. 42).

En algunos puntos, la ordenación más o menos regular de este estrato germinativo se ve alterado por unos acúmulos celulares, como se ve en la figura 41, que luego veremos con detalle y que representan primordios glandulares, introduciéndose en las dermis a causa de su desarrollo.

Por encima de estas células basales aparecen - - otras de mayor tamaño y con un citoplasma claro que va a representar una variación en su contenido respecto a las - células germinales (Figs. 41 y 42); se observa su tendencia a disponerse de forma aplanada, llegando a constituir una capa de células netamente planas que forman la zona de contacto de la epidermis con el medio externo; estas células, por el aspecto de su citoplasma y su borde externo -



irregular, no representan células cornificadas sino que son los esbozos de un futuro estrato córneo.

El hecho más interesante de este epitelio al M.E. lo constituye el aspecto de las células del estrato basal; son células altas, de contorno irregular, separadas por un gran espacio intercelular que se reduce sólo en aquellos puntos donde se unen por grandes desmosomas a los que llegan pocos filamentos, a pesar de la gran abundancia que existe en el citoplasma (Figs. 44, 47 y 48).

Es pues, ésta última característica, la más llamativa de estas células, la abundancia de tonofilamentos, hasta tal punto que ocupan casi la totalidad del citoplasma (Figs. 43, 44 y 46); los filamentos no se presentan de forma anárquica sino que siguen un patrón paralelo constituyendo grandes masas a modo de grandes haces (Figs. 43, 44 y 47) y recorren el citoplasma siguiendo unos caminos ondulados que terminan en la membrana plasmática que limita a la célula con la dermis, contactando siempre con los abundantes hemidesmosomas que aparecen sobre ella (Figs. 43, 44 y 45); estos hemidesmosomas ocupan casi toda la membrana plasmática basal, siendo éstos y los tonofilamentos las ca

racterísticas definitorias de estas células (Figs. 44 y 48).

Además presentan un gran núcleo central, (Fig.44) de contorno irregular, con alguna heterocromatina periférica y pequeños acúmulos centrales (Figs. 45 y 46); poseen un nucleolo patente rodeado de una cantidad de heterocromatina nucleolar significativa (Figs. 44 y 48). La envoltura nuclear aparece tachonada de ribosomas.

Alrededor del núcleo y en pequeñas porciones de los límites celulares son los únicos lugares donde existe citoplasma libre de filamentos, constituido fundamentalmente por retículo endoplásmico rugoso de cisternas muy dilatadas (Fig. 46), ribosomas libres y escasas mitocondrias pequeñas.

Hacemos también hincapié en la abundancia y disposición de la colágena subepidérmica, que forma capas continuas de fibras de disposición ortogonal (Figs. 43, 44 y 45), es decir, cada capa presenta una disposición perpendicular de sus fibras respecto a las capas que la limita; es de indicar que tal como se alejan de la epidermis aumenta el grosor de cada una de estas capas (Figs. 45 y 46),

La separación entre dermis y epidermis reúne aquí características que nos llevan a indicar que no se puede hablar sólo de membrana basal sino que observamos una compleja unión dermo-epidérmica, constituida por dos capas diferentes (Figs. 44 y 46):

1) Capa granular, en contacto directo con la epidermis que puede estar formada por una capa sencilla de gránulos (Figs. 46 y 48) o, en ciertas zonas papilares, capas de abundantes gránulos, siendo en estos puntos donde parece que forman parte del citoplasma basal de las células epidérmicas, ocupando ciertas porciones que no se encuentra ocupada por los hemidesmosomas (Fig. 47).

2) Una membrana basal en sentido estricto, homogénea, que envuelve a la capa granular y la separa de las fibras de colágena dérmicas (Figs. 44 y 47).

Tal como se avanza hacia el exterior de la epidermis se observa cómo permanece muy dilatado el espacio intercelular y conservándose las uniones desmosómicas entre las células epidérmicas (Fig. 49). Es de destacar que existe una evolución hacia la pérdida de tonofilamentos, permane-

ciendo sólo algunos acúmulos similares a los descritos pero en su mayoría de tamaño muy reducido; adquieren también un citoplasma indiferenciado integrado por una mayor dotación de orgánulos (Figs. 49 y 50); así, aparecen abundantes mitocondrias grandes y de morfología variable, con abundantes crestas rubulares y depósitos de iones (Fig. 51).

Aparecen pequeñas cisternas de retículo endoplásmico liso y un gran retículo endoplásmico rugoso; además un pequeño complejo de Golgi y grandes vesículas de contenido electronclaro. Presentan un núcleo redondeado que puede tener grandes escotaduras lo que le da un aspecto lobulado (Figs. 49 y 50).

Se resalta la existencia de gránulos de melanina de posición supranuclear, aunque pueden aparecer algunos gránulos aislados dispersos en el citoplasma (Figs. 49 y 50).

La última capa celular está formada por células netamente aplastadas. con un citoplasma en el que prevalecen los filamentos pero que los orgánulos celulares sólo se presentan en estado de degradación; la membrana plasmá-

tica, por su parte, presenta un borde lleno de evaginaciones de muy diversa morfología (Fig. 50).

Progresivamente se va a conseguir una maduración de esta epidermis hasta conseguir una cubierta queratinizada que permita al individuo permanecer fuera del agua y conservar su contenido hídrico.

Conseguida ésta, las características más relevantes al M.O. son el ligero aumento en grosor de la epidermis, la presencia de un fino estrato córneo (Fig. 52) y la aparición de glándulas cutáneas totalmente conformadas - (Fig. 51); a la vez, existe una evolución más clara de las células con un progresivo aplastamiento y picnosis de los núcleos, que van a desaparecer en la mayoría de ellas, lo que representa en conjunto el proceso completo de queratinización (Fig. 52).

A veces, hasta la epidermis llegan unas prolongaciones desde el estrato compacto de la dermis constituidas por células musculares acompañadas de tejido conjuntivo y contactan con ella en una estructura de forma papilar (Fig. 54). Se observa en la figura 51 cómo las glándulas tienen un contacto íntimo con la epidermis, a través de la cual -

se produce el conducto de salida de la secreción.

La evolución epidérmica en R. ridibunda lleva a la desaparición de los "haces" filamentosos, apareciendo en las células basales algunos tonofilamentos que constituyen una red anárquica tridimensional muy laxa (Fig. 55), una dotación normal de orgánulos y con la presencia de abundante desmosomas como uniones intercelulares.

Es de destacar la transformación que sufren las fibras de colágena de la dermis subyacente, ya que sí antes observábamos que cada capa está formada por una o dos hileras de fibras, aquí ya se constituyen en netos haces de muchas fibras (Fig. 56) que corren en la misma dirección, disponiéndose cada uno de ellos ortogonalmente respecto a los vecinos.

En los estratos superiores se observa cómo se produce una asociación de los tonofilamentos en haces (Fig. 55), dispuestos éstos en todas las direcciones del espacio, llegando como tales haces a los desmosomas, que siguen siendo abundantes entre los queratinocitos (Fig. 57). Las zonas de contacto entre estas células empieza a ser muy contorneada;

se producen abundantísimas interdigitaciones de los citoplasmas de células vecinas, aumentando así las superficies de contacto (Fig. 55).

Existen en el citoplasma mitocondrias grandes de abundantes crestas, retículo endoplásmico rugoso disperso, ribosomas libres y algunos gránulos de tamaño variable y contenido moderadamente denso (Fig. 55).

Como se puede ver en la figura 55, se observan prolongaciones de los melanocitos entre las células epidérmicas produciéndose una transferencia de melanosomas a las células vecinas; estos gránulos de melanina se conservan en los queratinocitos, incluso cuando llegan al estado de células cornificadas (Fig. 59).

En las células más próximas al estrato córneo va a aparecer un mayor empaquetamiento de los filamentos en haces, a la vez que se observa una mayor abundancia de ellos, constituyendo así un citoplasma netamente fibrilar (Figs. 57 y 58).

En estas células es significativo la presencia de gránulos electrodensos, de los que distinguimos dos

tamaños netamente diferentes:

a) unos grandes, electrodensos, localizados por todo el citoplasma de las células que componen el estrato granuloso, desapareciendo en el paso a estrato córneo - - (Figs. 57 y 59).

b) unos pequeños, de morfología variable, redondeados y alargados o con lobulaciones, que disponen preferentemente en las zonas periféricas (Figs. 57 y 58).

Es de señalar que mientras los primeros se conservan en las últimas células de los estratos intermedios, los segundos desaparecen en la última capa de células del estrato granuloso o casi inexistentes (Fig. 59); se observa, - además, cómo aparecen gránulos de este tipo con una menor - densidad a los electrones a modo de estados previos a su - maduración (Fig. 58).

El espacio intercelular aparece a este nivel (estrato granuloso) dilatado con la presencia de un material de tipo granulado en él y ocupado por prolongaciones de los queratinocitos, siendo algunos de estos puntos donde se - localizan los desmosomas (Figs. 58 y 59).



Los orgánulos celulares escasean; se presentan - ribosomas libres y algunas cisternas de retículo endoplásmico liso ; las mitocondrias, sin embargo, son abundantes y sufren un fenómeno de agrupamiento, conservando sus crestas y presentando iones bivalentes en su interior (Fig.59).

Al acercarnos al estrato córneo, el espacio intercelular se hace más angosto, resultando casi virtual a nivel de la zona de separación entre este estrato y las células que se sitúan bajo él, conservándose en cierta forma - la morfología de los desmosomas que unen dichas células.

Por su parte, las células cornificadas propiamente dichas presentan interdigitaciones entre ellas y un citoplasma compuesto de una matriz densa en la que aparecen algunos gránulos de melanina y restos de diversos orgánulos celulares en diferentes grados de destrucción (Fig. - - 59).

### 3.4. GLANDULAS R. ridibunda

En el tegumento de Rana ridibunda encontramos - glándulas alveolares localizadas en el estrato esponjoso - de la dermis (Figs. 60 y 61); la luz glandular es amplia y se pone en contacto con el exterior a través de un conducto único que atraviesa la epidermis (Fig. 60).

La glándula presenta tres partes:

- Cuerpo glandular (Figs. 62 y 63).
- Cuello glandular (Figs. 64 y 65).
- Conducto de salida (Figs. 66 y 67).

El cuerpo glandular consta de dos tipos de células diferentes: el epitelio secretor y las células mioepiteliales que lo rodean (Fig. 62 y 63). Por un lado, el epitelio secretor está constituido por células altas de núcleo basal y dispuestas en una o dos capas (Fig. 62); las células varían de altura dependiendo de la cantidad de gránulos que contienen en su interior (Fig. 63). Entre las células del epitelio secretor se producen grandes espacios intercelulares que se reflejan también en su relación con las células mioepiteliales (Fig. 63).

La secreción está constituida al M.O. por gránulos pequeños y densos y otros mayores y claros, apareciendo juntos en el citoplasma de la misma célula epitelial - (Figs. 62 y 63). En este epitelio se encuentran células en diferentes estados de maduración, caracterizados por el contenido en granulación que presentan (Fig. 63).

En la luz glandular, tanto en la porción del cuerpo como en la porción del cuello, aparecen gránulos desprendidos que forman acúmulos de ambos tipos de gránulos (Figs. 62 y 65).

El cuero glandular se encuentra rodeado por células mioepiteliales, con un centro celular ancho, donde se localiza el núcleo, y prolongaciones muy finas que recorren el contorno glandular y pueden llegar a contactar con otras células mioepiteliales vecinas (Figs. 63 y 64).

El cuello está constituido por un doble estrato celular; el interno está formado por células altas, semejantes a las del epitelio secretor pero sin contenido granular (Fig. 64) y el externo por células más o menos planas que se continúan con la epidermis por un lado y con las células mioepiteliales por el otro (Figs. 64 y 65). Estos dos estratos se reducen a uno sólo ya dentro de la epidermis y dan consistencia al conducto excretor, cuyas células tapizadoras sufren los procesos de queratinización, hasta tal punto, que en el punto de salida se encuentra recubierto por células cornificadas (Figs. 66 y 67).

Al M.E. se observa cómo las células presentan entre ellas un amplio espacio intercelular (Fig. 68) en el que aparecen numerosas y finas prolongaciones, en su mayoría tubulares (Figs. 69 y 71), aunque existen algunas de carácter ramificado (Fig. 71), pudiéndose establecer entre

ellas uniones de tipo desmosómico (Figs. 69 y 72), si bien, estos son más característicos entre las prolongaciones del epitelio y las similares que presentan las células mioepiteliales (Figs. 68 y 69).

En realidad, todas las prolongaciones constituyen un entramado laxo del espacio intercelular englobando a veces material extracelular a modo de grandes vesículas (Fig. 68); no es extraño observar otras prolongaciones de mayor calibre que son, en realidad, un extremo de una célula epitelial, ya que como se puede ver en las figuras 68 y 69, el epitelio está constituido por células que en su fase secretora son de contorno y morfología muy variables, - presentando imbricaciones entre ellas en todas las direcciones del espacio.

Estas células se pueden situar en una o dos capas, caracterizándose, normalmente las inferiores, por presentar un grado menor de madurez con respecto a las superiores - (Fig. 68), representado por la ausencia casi total de gránulos de secreción (Figs. 71 y 72).

Presentan un abundante retículo endoplásmico rugoso a la vez que se aprecia un incipiente complejo de -

Golgi; algunas de estas células presentan algunos, gránulos que no han alcanzado la densidad propia de los gránulos - maduros (Figs. 70, 71 y 72). En estas células la abundancia de mitocondrias es notable (Fig. 70), disponiéndose por todo el citoplasma, dejando algunos intersticios donde se localizan el resto de los orgánulos (Figs. 70 y 71), e incluso pueden llenar las prolongaciones de las células del epitelio (Figs. 70 y 72); son mitocondrias más o menos regulares, con abundante contenido en crestas y, por lo general, con acúmulos de iones en su matriz.

Cuando la concentración granular se hace netamente evidente y localizados en la parte distal de la célula, se puede considerar que la célula ha alcanzado la madurez - secretora, caracterizándose ahora por la abundancia del - retículo endoplásmico rugoso, un abundante complejo de Golgi (Figs. 73 y 74); se localizan algunos ribosomas libres y abundantes y grandes mitocondrias de crestas muy desarrolladas (Figs. 73 y 75).

Es de destacar que con la maduración se tiende - a una deformación celular representada por roturas del citoplasma que lleva a dar una imagen muy imbricada de los - límites celulares (Figs. 69 y 77).

Tanto en el estado inmaduro como en el maduro, - los núcleos van a presentar un aspecto similar (Figs. 68, - 69 y 73), si bién los más basales aparecen más redondeados, pasando progresivamente hacia una deformación que le lleva a adquirir pliegues e incluso grandes escotaduras (Fig. 77). Generalmente presentan un nucleolo evidente, estando el resto del núcleo ocupado por eucromatina, con algunos acúmulos en la envoltura nuclear (Figs. 73 y 74).

La característica más sobresaliente de estas células es la presencia de gránulos, entre los que distinguimos dos clases:

- a) Gránulos electrodensos de pequeño tamaño.
- b) Gránulos de contenido más claro y de mayor tamaño que los anteriores.

Los gránulos electrodensos son más abundantes - (Fig. 69), de contenido homogéneo y forma irregular (Fig. 75); hay circulares, alargados, rectangulares, etc; también se caracterizan por presentar una gran gama de tamaños - (Figs. 69 y 77). Junto a estos se presenta un segundo tipo, mucho más grande (Fig. 69), con un contenido muy poco densp (Fig. 73) de aspecto granuloso (Fig. 76) que se separa de

la membrana que lo rodea por un nítido halo blanco (Figs. - 75 y 76); se puede apreciar perfectamente cómo el contenido de la luz glandular tiene la misma apariencia que el material incluido dentro de éstos últimos granulos (Figs. - 76 y 77).

Se puede observar como los gránulos densos se desprenden hacia la luz glandular rodeados de una porción del citoplasma (Figs. 75, 76 y 77), mientras que los gránulos más claros se abren en el límite celular pasando su contenido al interior de la luz (Figs. 69 y 73); también se puede ver cómo en ocasiones se desprenden acúmulos granulares densos acompañados de algunos gránulos claros y todos unidos por parte de citoplasma, conteniendo éste último algunos orgánulos celulares enteros (Fig. 77); tanto estas porciones desprendidas como el citoplasma limitante aparecen llenos de prolongaciones digitiformes en todas direcciones (Fig. 75 y 77).

El cuerpo glandular se encuentra rodeado de una cubierta contráctil constituida por células mioepiteliales; las células recorren el límite epitelial adaptándose a él, siendo muy alargadas y con la zona central del cuer-



po más gruesa, donde se localiza un núcleo ovalado de posición central (Fig. 63). Presenta un ligero tapíz de ribosomas en su membrana externa y alguna heterocromatina en su membrana interna (Fig. 78). Si observamos el núcleo en corte transversal es corriente encontrar un borde irregular, causado por escotaduras pequeñas, lo que le da un aspecto festoneado, aunque pueden aparecer algunas más penetrantes (Figs. 71 y 79).

El citoplasma indiferenciado queda reducido a una porción periférica (Figs. 78 y 79) y a una perinuclear - - (Figs. 71 y 78), estando el resto constituido por el citoplasma diferenciado hacia la contracción, los filamentos, con acúmulos densos en algunos puntos, si bien, es de indicar que entre ellos aparecen cisternas del retículo endoplásmico liso de diversos calibres y, como caso especial, alguna que otra mitocondria aislada (Figs. 79 y 80).

Lo normal es que las mitocondrias se asocien, si bien en acúmulos y uxtanucleares (Figs. 71 y 79), bién en acúmulos menores de localización periférica (Fig. 79); tanto unas como otras son grandes, con crestas tubulares desarrolladas y depósitos de iones bivalentes.

El retículo endoplásmico es de tipo liso; sus cisternas presentan diferentes grados de dilatación (Fig. 71) y corren de forma más o menos paralela en la dirección de los tonofilamentos (Fig. 78).

Una característica de las células mioepiteliales es la abundancia de vesículas de pinocitosis que se localizan tanto en la membrana plasmática externa como en la interna, si bien son más abundantes en la primera (Figs. 78 y 80). El borde celular es festoneado en su parte en contacto con la dermis mientras que en contacto con el epitelio secretor es más accidentada, con abundantes prolongaciones con las que normalmente establece uniones desmosómicas con tres de las células secretoras (Figs. 68 y 71). Todo el conjunto glandular está rodeado por una membrana basal continua que es continuación de la epidérmica (Figs. 78 y 80).

Hemos dicho que la cubierta contráctil no es continua y eso es así porque algunos puntos de la glándula, dos de estas células terminan sin llegar a unirse, dejando el epitelio secretor en contacto directo con la membrana basal (Figs. 70 y 71); hay algunos casos en los que se pre

sentan más de una célula mioepitelial superpuestas, una más interna y otra externa, dando una imagen que correspondería a dos células que se cruzan en su trayectoria sobre el epitelio secretor (Fig. 81).

Las células del cuello glandular (Figs. 64 y 65) son pequeñas, de aspecto similar a las descritas como de tipo secretor inmaduro, con el mismo tipo de prolongaciones, con uniones desmosómicas entre ellas y un citoplasma que reúne los mismos caracteres, destacando como en aquel caso la abundancia de mitocondrias dispuestas ocupando la mayor parte del citoplasma (Fig. 82); a este nivel glandular ya no llegan las células mioepiteliales sino que estas células del cuello descansan directamente sobre la membrana basal (Fig. 83).

El cuello se continúa con el conducto de salida de la glándula (Figs. 66 y 67); es único para cada glándula y atraviesa la epidermis en dirección perpendicular a la superficie del cuerpo. En su parte más basal presenta una doble capa celular, que ya al M.O. daban el aspecto de ser, las más internas, semejantes a las células indiferenciadas del cuello y cuerpo glandular y las más externas -

son parecidas a los queratinocitos con los que se continúan (Figs. 65 y 66).

Al M.E. las células más internas presentan núcleos escotados y el borde celular con las prolongaciones características, siendo las que se dirigen hacia la luz de tipo microvilli (Fig. 84). Las más externas tienen características citológicas que se acercan más a las células basales de la epidermis con la presencia de algunos tonofilamentos en su citoplasma (Fig. 84).

Al avanzar en la epidermis se siguen presentando las microvellosidades (Fig. 85) aunque han disminuido en número, a la vez que los núcleos van adquiriendo una forma alargada que discurre de una forma paralela a la luz del conducto excretor (Fig. 85).

Ya en la porción epidérmica el conducto se encuentra tapizado por queratinocitos que van sufriendo los fenómenos propios del resto de la epidermis, adquiriendo en sus porciones más externas el mismo grado de queratinización que la epidermis pero con menor grosor de queratina (Fig. 86).

En la bibliografía consultada por nosotros no encontramos referencias de la existencia de un tipo glandular como el que hemos descrito, por lo que era conveniente buscar el origen y ver el proceso de su formación en el tegumento.

Cuando se ha producido la sustitución del epitelio primitivo del renacuajo por otro pluriestratificado y se van a llevar a cabo los procesos que conformarán la epidermis definitiva, van a ocurrir en el tegumento de R. ridibunda unos procesos proliferativos en su estrato germinativo que se van a reflejar en la formación de primordios - o botones glandulares que harán protuberancia hacia el estrato esponjoso de la dermis (Figs. 41 y 87). Como se puede ver en éstas fotografías, hay unos acúmulos de células más o menos redondeados que destacan claramente de las células epidérmicas vecinas, se van a infiltrar en la dermis a modo de boton (Fig. 88), permaneciendo unidas a la epidermis por un punto celular (Figs. 88 y 89).

La proliferación de estos primordios va a tener como base la actividad mitótica de las células que lo constituyen (Fig. 90) hasta alcanzar el número de células definitivo que dará paso a la madurez secretora; pero antes de

que esto ocurra las células del botón glandular van a diferenciarse en dos tipos fundamentales: las más centrales, - redondeadas, van a diferenciarse hacia el epitelio secretor (Fig. 89), mientras que algunas células periféricas - constituirán la envuelta mioepitelial de la glándula (Fig. 90).

Estructuralmente las células del primordio glandular presentan netas diferencias con las epidérmicas vecinas (Fig. 94); tienen núcleos ovalados aunque muy irregulares, con profundas escotaduras (Fig. 91); por regla general, el núcleo voluminoso y el pequeño tamaño celular representa un escaso citoplasma, apareciendo en él algunas cisternas del retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias grandes, algunos polirribosomas más libres y un incipiente aparato de Golgi (Figs. 91 y 92); en algunas ocasiones se pueden observar verdaderos cilios que salen hacia el espacio intercelular del primordio (Fig. 93).

Una característica citoplásmica que las diferencia del resto de las células epidérmicas es la escasez en tonofilamentos, presentándose dispersos o bien en pequeños haces, mientras que en la epidermis restante aparecían muy abundantes y constituyendo haces (Figs. 93 y 94).

El borde celular se presenta accidentado por prolongaciones, algunas digitiformes, escasas, y otras más gruesas donde se localizan las uniones intercelulares de tipo desmosómico (Figs. 91 y 93). Por el borde limitante con la dermis, la membrana plasmática presenta, a diferencia del resto de la epidermis, muy pocos hemidesmosomas (Fig. 91), localizados esporádicamente y sobre todo en los primeros estadios de desarrollo glandular (Fig. 95); el avance del primordio en la dermis va acompañado por la membrana basal que recubre la epidermis, a la vez que se acompaña también de fibras de colágena y células pigmentarias (Figs. 92 y 95).

Es de destacar que los primordios glandulares de Rana ridibunda presentan una importante relación con melanocitos, reflejada por la abundancia de ellos entre las células primordiales (Fig. 95) o bien sus prolongaciones (Fig. 91), aunque no es corriente encontrar gránulos de melanina en estas células indiferenciadas.

#### 4. DISCUSSION



#### 4.1. Epidermis

Las epidermis de los anuros estudiados, Bufo calamita y Rana ridibunda, presentan unas características similares cuando se observan al M.O.; así, ambas están constituidas por 5 u 8 capas de células que engloban a los tres estratos clásicos descritos por los diversos autores (BUDTZ y LARSEN, 1975; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; VOUTE, 1963)(23, 132, 179); estos son:

- Estrato basal o germinativo, formado por una capa de células columnares, de caracteres indiferenciados y que representan la zona de renovación de la epidermis.

- Estrato intermedio, que se acepta está constituido por otros dos: el espinoso, más basal y el granuloso,

que incluyen todas las etapas intermedias del proceso de la queratinización (FARQUHAR y PALADE, 1965) (49).

- Estrato córneo, constituido por una sola capa de células que van a representar el estado final de la queratinización (MATOLTSY y HUSZAR, 1972) (108).

En estos animales, las células altas del estrato basal presentan un núcleo central, más o menos ovalado, orientado según el eje mayor de las células.

Se ha observado que en ambas especies los orgánulos celulares aparecen en poca cantidad aunque recoge toda la gama normal en las células, como se ha hecho referencia para otras especies de anfibios (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; BUDTZ y LARSEN, 1975) (132, 23) y otros vertebrados (LAVKER y MATOLTSY, 1970; MATOLTSY y HUSZAR, 1972) (90, 108).

Un aspecto fundamental de las células basales es la presencia de filamentos en su citoplasma, que nosotros encontramos más abundantes en B. calamita, donde se presentan en todas direcciones e incluso formando grandes haces que recorren una porción larga de la célula, mientras que

no se encuentra tan desarrollado en R. ridibunda adulta, que a su vez, se diferencia netamente de la disposición de éstos filamentos en las etapas más jóvenes de estos animales (WEISS y FERRIS, 1954) (183) y que veremos con detenimiento; así pues, encontramos que el aspecto de los tonofilamentos de las células basales sigue los modelos descritos para otros anuros (FARQUHAR y PALADE, 1965; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (49, 132) diferenciándose de ellos, en cierta proporción, R. ridibunda por su menor contenido en ellos.

La membrana plasmática basal, es decir la que se encuentra en contacto con la dermis, presenta abundantes hemidesmosomas en las dos especies descritas, aunque son más abundantes en las células basales de R. ridibunda joven, donde constituyen una cubierta casi continua; estas estructuras hemidesmosómicas corresponden a las llamadas "placas densas" descritas por Porter en 1954 (136) de las que posteriormente se hizo una descripción ultraestructural (WEISS y FERRIS, 1954) (183) y que va a coincidir con la observada por nosotros en estos anuros y por SELBY (1955) (156) en la epidermis humana.

Los restantes límites celulares presentan uniones de tipo desmosómico entre las células vecinas, con una -- morfología similar a los encontrados en otras especies -- (FARQUHAR y PALADE,1965; KELLY,1966a)(49, 81) a la vez que se empieza a insinuar un mecanismo de ondulación de los - bordes celulares aunque claramente menos intensos que los descritos anteriormente (ODLAND,1950, 1958; OTTOSON y colaboradores,1953)(126, 127, 130).

Un aspecto importante en las células integrantes de este estrato, sobre todo en Bufo, es la presencia de - abundantes vesículas localizadas fundamentalmente junto a la membrana plasmática lateral, aunque se encuentran también por todo el citoplasma y en ciertos acúmulos yuxtancleares; encontramos que algunas se asocian significativamente a la membrana plasmática, por lo que consideramos - que están involucradas en fenómenos de pinocitosis, como se ha indicado en otros casos (FARQUHAR y PALADE,1965; - VOUTE,1963)(49, 179).

Este tipo de formaciones vesiculares se localiza en la mayoría de las células epiteliales que se relacionan directamente con el transporte de agua y sales, clasificándose como epitelios "transportadores", ya que a través

de ellos ocurre una entrada neta de agua (BENTLEY,1971, - 1973a; MULLEN y ALVARADO,1976)(11, 12, 120) y, paralelo a ella, un transporte de iones (PROCOPIO y VIEIRA,1977; -- SHOEMAKER y NAGY,1977)(138, 160).

Hemos indicado anteriormente que existía una forma especial de disposición de los tonofilamentos en las -- células basales de la epidermis de Rana ridibunda joven; - corresponde a una gran cantidad de ellos, asociados en grandes haces que recorren la célula en todas direcciones y -- que llegan a contactar con la línea de hemidesmosomas que cubren la zona basal de la membrana plasmática.

Al microscopio óptico se describieron en esta localización unas estructuras en forma de hebras (EBERTH, -- 1866)(41) que posteriormente fueron descritas como "hebras mitocondriales" (SAGUCHI,1913; SPEIDEL,1926)(151, 167), -- "figuras de Eberth" (WEED,1934)(181) y "cuerpos de Eberth" (CAMERON,1936)(26), considerándose como cuerpos que atravesando las membranas de las células basales mantenían -- unidas la dermis y la epidermis o bien eran continuidad del tejido conjuntivo dérmico.

Aunque materiales parecidos se han estudiado --

(EAKIN y LEHMAN, 1957; HAY, 1960; SALPETER y SINGER, 1959; - WEISS, 1958)(10, 68, 152, 185) no se ha establecido ninguna identidad entre un material fibroso con las clásicas - figuras de Eberth; más recientemente (CHAPMAN y DAWSON, - 1961; SINGER y SALPETER, 1961)(29, 161) se han asociado esos dos conceptos al estudiar la epidermis de Rana clamitans.

Nosotros aceptamos que las estructuras filamentosas descritas en las células basales de la epidermis del renacuajo de Rana ridibunda corresponde a las clásicas figuras de Eberth, cuyo origen es exclusivamente epidérmico y no pasan en ningún caso a la dermis subyacente.

El estrato germinativo descansa sobre una membrana basal continua, homogénea, de apariencia similar a la - descrita en los mamíferos (ODLAND, 1950)(126), si bien en los anfibios, como hemos descrito ya, aparece cubierta por una hilera de hemidesmosomas; clásicamente se ha definido como una banda fina consistente en una delgada red de fibrillas embebidas en un material homogéneo (SALPETER y SINGER, 1959)(152), pero va a variar en estructura y grosor entre las especies e incluso entre las diferentes fases de la vida en la misma especie (CAMATINI y LANZAVECHIA,

1965; KELLY, 1966a)(25, 81).

Pues bien, hemos encontrado que en Bufo calamita y en adulto de Rana ridibunda aparece una membrana basal como las descritas clásicamente sin que haya alguna diferencia significativa entre estas especies; pero en el renacuajo de R. ridibunda encontramos una estructura compleja que no debe llamarse membrana basal sino unión dermo-epidérmica.

Encontramos que existen dos partes netamente diferentes: una capa granular y una membrana basal propiamente dicha.

La existencia de una capa granular de este tipo -- ya ha sido descrita en los renacuajos de otros anfibios -- (PORTER, 1954; SINGER y SALPETER, 1961)(136, 161), a la vez que se demostraba un contenido lípido-mucopolisacárido en la piel de la salamandra (KELLY, 1966a)(81). Nosotros observamos una neta ordenación en una sola hilera de gránulos, exceptuando ciertas zonas de tipo papilar donde se acumulan en grandes paquetes; además, hemos observado cómo a veces se encuentran al otro lado de la barrera de hemidesmosomas por lo que consideramos que tienen un origen epi-

dérmico.

Al estudiar la zona dérmica colindante a esta -  
unión dermo-epidérmica encontramos una clara diferencia -  
en la disposición de las fibras de colágena entre B. cala-  
mita y R. ridibunda; en el primero, hay una disposición -  
anárquica mientras que en la segunda se disponen formando  
capas en las que las fibras corren un curso paralelo entre  
sí y en disposición ortogonal entre las capas vecinas; hay  
que señalar que estas capas son de mayor grosor en el adul-  
to al aumentar el número de fibras que la componen, que en  
el renacuajo, en el que están constituidas por una sola -  
hilera de fibras.

Así pues, se corrobora esta observación del orde-  
namiento ortogonal de las fibras de colágena en el renacua-  
jo con la realizada por diversos autores (PORTER, 1954; --  
WEISS y FERRIS, 1954, 1956)(136, 183, 184), pero no corres-  
ponden con nuestras observaciones en R. ridibunda las de -  
OTTOSON y colaboradores (1953)(130) que señalan la pérdida  
de ordenación de las fibras de colágena en el adulto, ya -  
que, como hemos señalado, ésta se mantiene de forma ortogo-  
nal en las fibras de colágena de la dermis más superficial  
en esta especie, si bien se puede comprobar la falta de or



denación en nuestras observaciones en B. calamita.

Al avanzar hacia el estrato intermedio, una primera similitud que encontramos en las dos especies de anuros estudiadas es el empaquetamiento progresivo de los tonofilamentos, produciéndose por asociación en haces los cuales recorren el citoplasma en todas direcciones, llegando en gran cantidad hasta los desmosomas que continúan siendo los puntos de unión entre los queratinocitos; estas observaciones corresponden a las realizadas por otros investigadores en diversas especies de anfibios (FARQUHAR y PALADE, 1965; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (49, 132).

Por ello, en las células más cercanas al estrato córneo encontramos tal número y condensación de los haces que podemos decir que el citoplasma de estos queratinocitos es netamente fibrilar.

Debemos indicar que hemos encontrado en los queratinocitos que aún conservan el núcleo una porción de citoplasma perinuclear que se mantiene libre de tonofilamentos y donde sólo aparecen otros orgánulos celulares; como no hemos encontrado descrito este fenómeno en las especies estudiadas en la bibliografía, podemos decir que es un fenó-

meno peculiar de los queratinocitos de B. calamita.

No encontramos tampoco referencias directas sobre la evolución del espacio intercelular del estrato intermedio; nosotros observamos en R. ridibunda que el espacio intercelular de estas células intermedias aparece dilatado y donde se localizan algunas prolongaciones de los queratinocitos, que es donde se producen las uniones desmosómicas.

En las inmediaciones del estrato córneo, el espacio intercelular se hace cada vez más angosto, siendo casi virtual bala las células cornificadas.

Un fenómeno diferente ocurre en B. calamita, en el que el espacio intercelular pronto se reduce casi totalmente, quedando sólo algo dilatado en las células más cercanas al estrato germinativo, produciéndose, sin embargo, una dilatación apreciable junto a las células cornificadas, interrumpida sólo por los desmosomas que unen el estrato córneo con el granuloso.

Paralelamente se observa en las dos especies cómo la superficie de contacto entre las células aumenta con

la producción de interdigitaciones de los citoplasmas de las células vecinas.

Estos dos hechos anteriores se complementan si -- pensamos en la función de transporte que tiene la epidermis de los anfibios; por un lado, existe una pérdida de -- agua cuando el animal se pone en contacto con un medio seco; además, sabemos que el agua pasa por la epidermis a -- través de un camino intracelular y otro extracelular (CHRISTENSEN, 1974)(30) lo que explica la dilatación mayor del -- espacio intercelular de R. ridibunda dado que esta especie permanece siempre junto al agua, mientras que B. calamita sólo se acerca a ella en época de reproducción y necesita evitar en la mayor proporción posible la pérdida de agua, lo que se favorece eliminando el camino extracelular del agua y dejando sólo la vía activa intracelular.

Paralelo al transporte de agua existe otro de iones (SHOEMAKER y NAGY, 1977)(160); éste, va a tener dos localizaciones fundamentales (KOEFOED-JOHNSEN y USSING, 1958) (85) que corresponden a las barreras de entrada y salida selectivas de los iones.

En lo que se refiere a los estratos granuloso y

córneo, los diversos autores han localizado aquí la barrera de salida (FARQUHAR y PALADE,1966; MARTINEZ-PALOMO y colaboradores,1971)(50, 104); ahora bien, si consideramos la necesidad en B. calamita, por vivir fuera del agua, de conservar la concentración de iones en el organismo más que R. ridibunda que tiene un flujo constante por su permanencia en el agua, es lógico comprender el porque de unos espacios intercelulares tan angostos en el primero, apoyándose esta observación en los experimentos de PRATLEY y McQUILLEN (1973)(137) que correlacionan el tamaño de los espacios intercelulares más externos de la epidermis con el grado de transporte iónico, de forma que ellos demuestran que cuando este transporte se inhibe, el tamaño de los espacios intercelulares disminuye y viceversa.

Excepto ciertas pequeñas diferencias los orgánulos celulares en estos estratos intermedios se presentan en una dotación normal pero con poco desarrollo, si exceptuamos las mitocondrias encontradas en R. ridibunda que son de mayor tamaño y desarrollo que en B. calamita, además de encontrarse formando grupos más o menos compactos.

Por otro lado, en el citoplasma de las células intermedias de la epidermis de los anuros estudiados encon-

tramos una dotación de gránulos que aparecen diferentes - entre ellas; así, en B. calamita, vamos a encontrar:

1) Gránulos de tamaño muy pequeño, localizados - en las inmediaciones de la membrana plasmática, estando - incluso en contacto con ella; tienen una morfología claramente circular y un contenido moderadamente denso.

2) Gránulos o vesículas de mayor tamaño que los anteriores, de contenido claro a los electrones, morfología irregular, no apareciendo en la última capa celular - del estrato granuloso.

Por su parte, en Rana ridibunda encontramos también dos clases de gránulos:

1) Un tipo grande, de contenido electróndenso.

2) Un tipo de menor tamaño, de morfología variable, dispuestos preferentemente en el citoplasma periférico y que desaparecen en las células localizadas inmediatamente bajo el estrato córneo.

La existencia de diferentes tipos de gránulos en

los epitelios en queratinización se han venido describiendo desde que los nombró por primera vez SELBY en 1957 -- (157), recibiendo posteriormente diversos nombres y funciones (MATOLTSY y PARAKKAL, 1965; ODLAND, 1960)(106, 128).

En lo que se refiere a las células del estrato granuloso de la piel de los anfibios se han descrito dos tipos diferentes (BUDTZ y LARSEN, 1975; FAHRMAN, 1971; LAVKER, 1972; y otros)(23, 47, 91). Los gránulos más pequeños se describen con un contenido moderadamente denso, que dan positiva la reacción del PAS (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; VOUTE, 1963)(132, 179) y llegan a desaparecer en la última capa de células del estrato granuloso.

Estas características pueden asignarse a los gránulos pequeños descritos por nosotros en R. ridibunda, ya que los más pequeños que aparecen en B. calamita se localizan también en la última capa celular; sin embargo, nosotros vemos en esta última especie cómo el espacio intercelular bajo el estrato córneo presenta un contenido similar al de los gránulos, a la vez que los encontramos asociados directamente a la membrana plasmática, al igual que ocurre con los descritos por diversos autores (BUDTZ y LARSEN, 1975; FARQUHAR y PALADE, 1965)(23, 49).

Así, podemos decir, que además de las diferencias morfológicas de los gránulos pequeños descritos en las dos especies en estudio, no tenemos evidencias de que los existentes en R. ridibunda secreten su contenido al espacio intercelular, por otro lado casi virtual, mientras que los que aparecen en B. calamita sí lo hacen, concluyendo pues que los gránulos más pequeños de R. ridibunda contribuyen a la constitución de la matriz amorfa de las células cornificadas.

El tipo mayor de gránulo encontrado en B. calamita reúne las características similares a las de los pequeños encontrados en R. ridibunda, ya que son aproximadamente del mismo tamaño y desaparecen en la última capa celular del estrato granuloso; por ello, le asignamos la misma función que a los descritos en R. ridibunda, indicando que la diferencia en el aspecto de sus contenidos se debe más a su composición química que a su misión en la epidermis.

Por su parte, los gránulos mayores descritos en R. ridibunda presentan un contenido similar a los pequeños de la misma especie, disminuyendo en número cuando se acercan al estrato córneo, no apareciendo en éste último; pen

samos que debido a no presentarse junto a la membrana plasmática no van a descargarse en el espacio intercelular, - que junto al hecho de desaparecer al pasar al estrato córneo indican que vacían su contenido en el citoplasma; por ello, consideramos que contribuyen de alguna forma a la constitución de la matriz amorfa de las células cornificadas y como desaparecen posteriormente a los más pequeños, representarían ambos dos etapas progresivas de la conformación definitiva de la matriz amorfa de las células del estrato córneo.

En realidad, no hay todavía conocimientos ciertos de la relación de los gránulos en el proceso de la queratinización, sobre todo los de mayor tamaño que no se han observado nunca en contacto con la membrana plasmática; a esto se une el hecho de los pocos conocimientos que existen sobre las características químicas de su contenido.

Se suponen todos ellos de carácter mucoso ya que se han descrito al microscopio óptico unos gránulos PAS(+) en esta misma localización (LAVKER, 1972; LODI y BANI, 1971; PARAKKAL y MATOLTSY, 1964; VOUTE, 1963)(91, 102, 161, 179), aunque se han demostrado gránulos de contenido fosfolipídico en esta misma posición (SPEARMAN, 1968)(165) y con --



otros contenidos. (FARHMAN, 1971) (47).

Así pues, los gránulos pueden presentar diferentes contenidos en las diversas especies y ser aquellos que permanecen en las células finales del estrato granulo so los directamente implicados en la constitución de la matriz del estrato córneo que se forma, como indica SPEAR MAN (1973) (166), durante la fase de diferenciación.

Según esto, concluimos que tanto los gránulos - grandes como los pequeños de R. ridibunda y los mayores de B. calamita intervienen en la constitución de la matriz - intracitoplásmica del estrato córneo.

Este estrato estará constituido así por una capa de células, en ambas especies, llenas de un contenido - electrón denso, formado por una matriz amorfa en la que se embeben los filamentos; las células se disponen unidas íntimamente con muchas interdigitaciones entre ellas, conservándose las uniones desmosómicas aunque han perdido algo de su morfología característica.

En R. ridibunda, como ocurre en R. pipiens (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964) (132), se presentan restos de orgá-

nulos en degeneración, mientras que en B. calamita no encontramos restos de ellos. Esta etapa final en B. calamita, unido a las características de los estratos intermedios - estudiados antes, nos permite decir que el proceso de que ratinización en B. calamita está más perfeccionado, corroborando con ello su modo de vida de mayor independencia - del agua.

Hemos observado en la epidermis de R. ridibunda como en la de B. calamita la existencia entre los queratinocitos de células pigmentarias del tipo melanocito, que ya han descrito diversos autores en varias especies de - vertebrados (BAGNARA y colaboradores, 1968; BREATHNACH y POYNTZ, 1956) (5, 17).

Nosotros los localizamos o sus prolongaciones, - tanto en el estrato basal como en el intermedio, con la - particularidad de que se produce una cesión de melanosomas hacia los queratinocitos, localizándose estos gránulos en el citoplasma perinuclear, en B. calamita y en el renacuajo de R. ridibunda, mientras que en el estudio de ésta - última especie se distribuyen por todo el citoplasma, con servándose, además, hasta en las células del estrato córneo.

#### 4.2. Glándulas epidérmicas.

Las glándulas tegumentarias de los anfibios son epidérmicas y contribuyen, con su secreción, en parte a -- conservar la integridad morfológica y funcional de la epidermis y en parte a la defensa de todo el organismo contra los predadores y el medio externo.

En las especies estudiadas por nosotros hemos encontrado netas diferencias respecto a las glándulas que -- aparecen en ellas; hemos descrito dos tipos diferentes en B. calamita, diferencias que nos llevan a asociarlas con -- los dos tipos descritos clásicamente: glándulas mucosas y serosas (HELF y STARK, 1941; NOBLE y NOBLE, 1944)(69, 124).

Por otra parte, en R. ridibunda sólo hemos encontrado un tipo glandular. que, recordando las descripciones antes señaladas, no encaja con ninguno de los dos tipos - sino que en realidad recoge características mixtas de ellos.

Así pues, teniendo en cuenta estas diferencias - vamos a estudiar por separado cada una de ellas.

Las glándulas más pequeñas que aparecen en el tegumento de B. calamita presentan un epitelio simple de altura variable que depende del contenido granular y reúne las características morfológicas de las glándulas mucosas descritas con microscopía óptica en R. pipiens por NOBLE y NOBLE en 1944 (124), que como indica LE QUANG TRONG - (1974)(98) para Xenopus tropicalis, este epitelio está formado por una sola capa de células en diferentes estados de secreción por lo que representa una maduración celular asincrónica.

Nosotros hemos encontrado que en algunos momentos aparecen de forma discontinua dos capas celulares lo que nos apoya para decir que las células inferiores están encaminadas a reemplazar a las superiores.

Al estudiar al microscopio electrónico las células integrantes del epitelio secretor encontramos diferentes tipos celulares que al comprobar el contenido en orgánulos y la progresiva evolución de éstos, nos induce a indicar que representan los diferentes estados de maduración del epitelio.

Las células más bajas se localizan a nivel del cuello glandular y porciones cercanas a él; el contenido en orgánulos es alto e indican un alto grado de actividad sintetizadora; tal como nos alejamos del cuello glandular empiezan a producirse una serie de vesículas de contenido granuloso que representarán los primeros productos de secreción formados.

A la vez, se va produciendo un crecimiento en altura de las células y un empuje del citoplasma hacia su parte basal, apareciendo ya los núcleos en esta posición mientras que el resto del citoplasma aparece cada vez más lleno de grandes gránulos mucosos densamente empaquetados, lo que les obliga de alguna forma a adquirir morfología irregular.

Este aspecto de los gránulos secretorios es el -

que generalmente ocurre en las glándulas mucosas de otras especies (SJOBERG y FLOCK,1976; LE QUANG TRONG,1974; BLAYLOCK y colaboradores,1976)(14, 98, 162), observándose además cómo este empaquetamiento lleva a la fusión de varios de ellos en algunos más grandes (LE QUANG TRONG,1974)(98) o a perder los límites granulares (NOBLE y NOBLE,1944; - SJOBERG y FLOCK,1976)(124, 162).

En nuestro caso encontramos que los gránulos se rompen debido al empuje que ejercen unos contra otros, - con lo que desaparecen los límites entre ellos formando en las zonas más altas una masa de secreción entre la que pug de verse restos de membranas o algunos gránulos enteros.

El mecanismo de extrusión de la secreción en las diferentes glándulas mucosas han presentado diferencias - que ha llevado a clasificarlas en diferentes tipos (LE - QUANG TRONG,1971)(96), sin embargo, la mayoría de los autores les asignan un mecanismo por desprendimiento del - material almacenado en la zona apical de la célula, acompañado por pequeñas porciones de citoplasma que aparece - dentro de él; es decir, un mecanismo apocrino (SCHUBERT,- 1974; BLAYLOCK y colaboradores, 1976)(14, 154).

Nosotros, al seguir la evolución del epitelio se cretor hemos encontrado que junto a los gránulos secreto- rios que se empaquetan en el extremo de la célula aparecen mitocondrias, porciones de retículo endoplásmico y cuerpos multilaminares, no descritos hasta ahora, que nosotros se pamos, en otras glándulas mucosas; éstos se van a despren- der hacia la luz glandular con la secreción, por lo que encontramos en B. calamita, como en otras especies, una se creción apocrina en sus glándulas mucosas.

Posteriormente, la secreción pierde toda su apa- riencia granular que pudiera conservar al salir a la luz, como es característico en otras especies (NOBLE y NOBLE, 1944; LE QUANG TRONG, 1971, 1974)(96, 98, 124).

En especies que dependen estrechamente del agua - como los anfibios, (BENTLEY, 1971; SEYMOUR y LEE, 1974; -- SPIGHT, 1968)(11, 158, 168) la secreción mucosa puede actuar como un agente hidratante en el sentido de modificar la - pérdida de agua por evaporación cuando se expone el tegu- mento al aire, ayudando a mantener fresca la piel (BLAYLOCK y colaboradores, 1976)(14); para otros autores, la secre- ción mucosa es idónea para el funcionamiento de la respi- ración cutánea (PARAKKAL y MATOLTSY, 1964)(132), aceptán-

dose desde los autores clásicos que el moco es un lubricante de la piel mientras el animal se encuentra sumergido - (NOBLE y NOBLE, 1944)(124).

Alrededor del epitelio secretor de las glándulas mucosas de B. calamita hemos descrito una envuelta de células finas de carácter mioepitelial, aunque no es continua, ya que a veces se observa cómo las células mioepiteliales descansan directamente sobre la membrana basal.

La existencia de estas células alrededor del epitelio mucoso no ha sido aceptada siempre (QUAY, 1972)(139), habiendo discrepancias en el sentido de que autores antiguos solo le daban carácter de "envuelta conjuntiva" - (HELF y STARK, 1941, en R. sylvática)(69), envuelta a la que NOBLE y NOBLE(1944)(124) les dio un carácter contráctil.

Aún hoy, autores actuales describen glándulas mucosas sin que presenten una envuelta de células mioepiteliales, como en Xenopus tropicalis (LE QUANG TRONG, 1974)(98) aunque sí en otras especies (BLAYLOCK y colaboradores, 1976; SCHUBERT, 1974)(14, 154); en 1976, SJOBERG y FLOCK - (162), aceptan como una generalidad la existencia de esta



envuelta mioepitelial de las glándulas mucosas, basándose fundamentalmente en sus estudios en R. temporaria y R. esculenta. Nosotros aceptamos la existencia de este tipo de envuelta en las glándulas mucosas de B. calamita.

Luego de que cada célula secretora pase uno o varios ciclos secretores, van a ser reemplazadas por otras que ocupen su lugar. Nosotros opinamos que son las células más indiferenciadas que se localizan a nivel del cuello glandular las encargadas de renovar el epitelio maduro del fondo, trasladándose progresivamente hacia él; este tipo de renovación se presenta en diversas especies como Xenopus tropicalis (LE QUANG TRONG, 1974)(98) y Xenopus laevis (SPANNHOF, 1954)(164), aunque hay casos en los que la -- glándula mucosa es reemplazada completamente (LE QUANG - TRONG, 1967)(95).

El segundo tipo glandular encontrado en la piel de B. calamita presenta las características que diversos autores han dado para las glándulas serosas o granulares (NOBLE y NOBLE, 1944; LE QUANG TRONG, 1974; QUAY, 1972: - DELFINO, 1975)(35, 98, 124, 139); es decir, son de mayor tamaño que las mucosas, se presentan en menor número y su luz se encuentra llena de una secreción de tipo granular.

Nosotros observamos una glándula alveolar en cuyo interior aparece un epitelio que no presenta separación entre las células, o sea, constituye una estructura sincitial en la que los núcleos se presentan en una posición basal y son de forma irregular. El epitelio se caracteriza -

por la ausencia casi total de orgánulos, destacando sólo -  
cisternas de retículo endoplásmico que en algunos puntos -  
es de tipo rugoso.

La existencia de este tipo de epitelio sincitial  
ya ha sido descrito para diversas especies, como R. pipiens  
(NOBLE y NOBLE, 1944)(124), Xenopus laevis (DOCKRAY y HOP-  
KINS, 1975)(38) y otras; si bien, hay diferencias en la mor-  
fología y apariencia nuclear, aunque siempre se sitúan en  
una posición basal (SJOBERG y FLOCK, 1976; BLAYLOCK y cola-  
boradores, 1976)(14, 162).

En B. calamita los núcleos presentan una morfolo-  
gía diferente a las descritas hasta ahora; presentan una  
cierta polarización respecto a la luz glandular, con una  
"cabeza" hacia ella y una "cola" hacia la zona basal, pre-  
sentándose laeucromatina casi totalmente en la "cabeza"; -  
en algunos casos se hace alusión a cierta irregularidad de  
los núcleos en algunas especies, como en Xenopus tropica-  
lis (LE QUANG TRONG, 1974)(98) aunque en otros casos apare-  
cen generalmente de forma más o menos ovalada y de contor-  
nos regulares (LE QUANG TRONG, 1971; BLAYLOCK y colaborado-  
res, 1976)(14, 96).

Este tipo de glándula se llama así, granular, por el contenido de su secreción, constituida por gránulos normalmente eosinófilos y electróndensos (BLAYLOCK y colaboradores, 1976)(14); en las especies del género Phyllomedusa son de tipo redondeado y mantienen la misma forma tanto en el interior del epitelio como en la secreción propiamente dicha. En Xenopus laevis (DOCKRAY y HOPKINS, 1975)(38) los gránulos de la secreción son de tipos espicular y en Bombinator pachypus, dependiendo del tamaño y contenido de los gránulos, DELFINO (1975)(35) ha distinguido dos tipos glandulares, pero en ambas los gránulos se mantienen íntactos en la secreción.

Sin embargo, estos autores han descrito la secreción formada exclusivamente por gránulos; nosotros y diversos autores hemos observado que la secreción va integrada también por parte del citoplasma del epitelio. Así, ya DAWSON (1937)(34) sugirió que cierto material pasa de los núcleos hasta la secreción ( en Triturus) y posteriormente HELF y STARK (1941)(69) y NOBLE y NOBLE (1944)(124) indicaron que algún material celular podría tomar parte en la formación del producto de secreción, siendo observado recientemente en R. temporaria y R. esculenta (SJOBERG y FLOCK, 1976)(162).

Nuestras observaciones de este hecho nos lleva a decir que la secreción granular de la glándula venenosa de B. calamita se produce por el desprendimiento progresivo de la parte distal del sincitio secretor con lo que se separan tanto los gránulos como parte del citoplasma.

Aparentemente representa un mecanismo apocrino de secreción, aunque si nos fijamos detalladamente, se esta produciendo una degradación epitelial que puede llevar a su desprendimiento total, con lo que realmente representa un mecanismo holocrino de secreción, semejante al descrito para las glándulas venenosas de R. temporaria y R. esculenta (SJOBERG y FLOCK,1976)(162) y Bombinator pachypus (DELFINO,1975)(35).

Hemos comentado los diferentes tipos de gránulos y advertimos que la glándula descrita por nosotros es de tipo seroso, pero hay que decir que el tipo de secreción que aquí describimos no la hemos encontrado en ningún trabajo consultado a pesar de tener características muy peculiares.

En el epitelio secretor aparecen abundantes gránulos electrondensos, de muy variable tamaño, caracterizándo

se porque los bordes se hacen más netos en los mayores, si bien los menores se pueden presentar en fase de fusión de dos o más, o bien, unirse con alguno de los de mayor tamaño. Esto nos lleva a pensar que el tamaño de los gránulos es una consecuencia del aporte de material de varios de ellos que fusionan entre sí,

A veces se observa cómo entre los más grandes hay una variación de la densidad de su contenido, limitándose en algunas ocasiones el contenido denso a un halo periférico, quedando el centro totalmente claro.

En ciertos puntos del epitelio aparecen grandes vesículas rodeadas de una o dos membranas que presentan en su interior un material granuloso e irregularmente distribuido, pudiendo verse en fase de fusión o incluso rotas.

Este es el aspecto que presentan tanto los gránulos como las vesículas en el sincitio secretor; a continuación, estos elementos van a salir hacia la luz glandular acompañados de parte del citoplasma sincitial, fundamentalmente de membranas procedentes de orgánulos celulares.

A la vista de esto y de las diversas estructuras

descritas previamente, podemos decir que la secreción serosa de B. calamita está integrada por una serie de gránulos de estructura muy ordenada, constituidos por material procedente de los gránulos electróndensos y de las vesículas rodeadas de membrana y de material granuloso en el interior. Existe una evolución hacia la consecución de unas estructuras cerebriformes y concéntricas, apareciendo además más toda una gama de formas intermedias entre éstas y la secreción original.

Es difícil comprender cómo un material amorfo puede llegar a constituir estructuras tan complejas y ordenadas; nosotros llegamos a la conclusión de que esto es posible gracias al aporte de membranas que se produce a partir del citoplasma epitelial; hemos indicado que cuando la secreción va madurando, prácticamente la totalidad de las membranas que aparecían al principio han desaparecido, por lo que pensamos que son estas membranas las que realmente intervienen en el ordenamiento de los materiales amorfos hasta conseguir las estructuras definitivas.

NOBLE y NOBLE (1944)(124) hacen referencia a la presencia de una cubierta contráctil alrededor de las glándulas granulares de R. pipiens, a la que le dan un carac-

Es difícil comprender cómo un material amorfo puede llegar a constituir estructuras tan complejas y ordenadas; nosotros llegamos a la conclusión de que esto es posible gracias al aporte de membranas que se produce a partir del citoplasma epitelial: hemos indicado que cuando la secreción va madurando, prácticamente la totalidad de las membranas que aparecían al principio han desaparecido, por lo que pensamos que son estas membranas las que realmente intervienen en el ordenamiento de los materiales amorfos hasta conseguir las estructuras definitivas.

NOBLE y NOBLE (1944) (124) hacen referencia a la presencia de una cubierta de tipo contráctil alrededor de las glándulas granulares de Rana pipiens, a la que le dan un carácter "muscular"; ya en 1969, BANI (7) hace referencia a la existencia alrededor de las glándulas de los anfibios de dos tipos de células mioepiteliales.

Basándonos en las descripciones posteriores podemos agrupar las células de la cubierta contráctil de las glándulas serosas en dos tipos: células mioepiteliales (DOCKRAY y HOPKINS, 1975; DELFINO, 1975; BLAYLOCK y colaboradores, 1976) (38, 35, 14) y células musculares lisas (LE



QUANG TRONG, 1971, 1974; SJOBERG y FLOCK, 1976) (96, 98, - 162).

Las células contráctiles que hemos encontrado en las glándulas serosas de Bufo calamita las incluimos por sus características citológicas dentro del tipo mioepitelial, aunque a diferencia de diversas especies (DOCKRAY y HOPKINS, 1975; DELFINO, 1975) (28, 35) no constituyen una cubierta continua sino que hay puntos en los que el epitelio se apoya directamente sobre la membrana basal.

En la otra especie estudiada, Rana ridibunda, sólo hemos encontrado un tipo glandular en el tegumento, si bien encontramos en ella caracteres intermedios de los tipos clásicos; en la bibliografía hay una referencia (KRAMER 1970) (86) de la falta de glándulas serosas en el tegumento de Rana angolensis, aunque el único tipo existente en esta especie tiene carácter típicamente mucoso.

La glándula descrita por nosotros presenta una forma alveolar típica y al M.O. el epitelio secretor es básicamente igual al de las glándulas mucosas clásicas (NOBLE y NOBLE, 1944; QUAY, 1972) (124, 139); también, bajo el M.O. podemos diferenciar en este epitelio dos tipos de gránulos en el interior de sus células, unos densos y - -

otros claros, siendo los primeros los más abundantes; al M.E. se confirma la existencia de estos gránulos comparando el citoplasma de las células epiteliales, no encontrando formas intermedias entre ellos por lo que concluimos que corresponden a secreciones diferentes; sólo tenemos, a este respecto, referencias de una glándula de tipo mucoso con dos tipos de gránulos (WELSCH y colaboradores, 1974) (186) si bien en este caso los gránulos aparecen por separados y hacen alusión a formas intermedias o bien, de que algunas glándulas alveolares de anfibios pueden tener células serosas en la base y mucosa en el cuello - - (ESTERLY, 1904; LE QUANG TRONG, 1967) (46, 95). Teniendo en cuenta estos datos podemos decir que es la nuestra la única descripción de una glándula tegumentaria de anfibio con dos tipos diferentes de secreción en las células epiteliales.

Los gránulos los podemos denominar como de tipo seroso, los densos y de tipo mucoso, los claros a los electrones; en las células más indiferenciadas, cuando aparece algún tipo de gránulo aislado es siempre el electrondenso, no apareciendo los mucosos nunca solos, por lo que concluimos que su producción está separada en el tiempo ya que no existen evidencias de dotaciones de orgánulos especiales

para la síntesis de cada uno de ellos.

Hemos observado cómo grupos de gránulos serosos - (a veces acompañados de alguno mucoso) se separan del epitelio secretor rodeados por una porción de citoplasma constituyendo acúmulos que son distinguibles perfectamente al M.O.; por ello, pensamos que la secreción de este tipo granular se realiza por un mecanismo apocrino. Por otro lado, observamos cómo los gránulos mucosos se abren al exterior de forma que el contenido de la luz glandular tiene el mismo aspecto y se continúa con el contenido de ellos, por lo que pensamos que la secreción de los gránulos mucosos es de tipo merocrino, explicando la presencia de ellos en los acúmulos desprendidos de serosos como un accidente en el arrastre de citoplasma.

Según esto, la secreción de este epitelio se realiza de igual modo que las características glándulas mucosas (LE QUANG TRONG, 1974; SCHUBERT, 1974; BLAYLOCK y colaboradores, 1976) (98, 154, 14) no siendo descrito ningún tipo de secreción merocrina como el observado en los gránulos mucosos.

Las características del epitelio: células independientes entre ellas, acumulación de gránulos en el citoplasma distal y el desplazamiento del citoplasma restante hacia la parte basal corresponden a las glándulas que hemos venido llamando mucosas (SCHUBERT, 1974; LE QUANG TRONG, 1974) (154, 98), no apareciendo el característico sincitio de -- las serosas ( SJOBERG y FLOCK, 1976) (162), por lo que nosotros las consideramos como glándulas mucosas de secreción mixta, corroborando en cierto sentido la ausencia de glándulas serosas en algunos anfibios, como se ha descrito en Rana angolensis (KRAMER, 1970) (86).

Tanto en el epitelio que tapiza el cuello glandular como a veces junto a las células maduras aparecen otras de caracter inmaduro o estados intermedios entre ellas; esto nos hace pensar que la renovación del epitelio secretor va a ocurrir por desplazamiento de estas células inmaduras desde el cuello hasta el fondo de las glándulas por un mecanismo semejante al que ocurre en las glándulas mucosas -- de Xenopus laevis y X. tropicalis (LE QUANG TRONG, 1974; SPANNHOF, 1954) (98,164).

Estas glándulas mixtas se encuentran rodeadas por

unas células alargadas de tipo mioepitelial que reúne las características que se han dado para las glándulas mucosas descritas en Mertensiella caucasica, Phyllomedusa, Rana temporaria y Rana esculenta (SCHUBERT, 1974; BLAYLOCK y colaboradores, 1976; SJOBERG y FLOCK, 1976) (154, 14, 162) aunque, en nuestro caso, encontramos puntos en los que el epitelio secretor se pone en contacto directo con la membrana basal lo que nos indica que la cubierta contráctil no es continua. Como, además, en otros puntos aparecen dos células mioepiteliales a distinto nivel y dirección, suponemos que forman una malla cuyas células se cruzan en algunos puntos. Dado el carácter especial de esta glándula mixta, hemos estudiado su desarrollo en el tegumento del renacuajo de Rana ridibunda.

Ya principios de siglo, se comunicó que las glándulas cutáneas de los anfibios procedían de primordios epidérmicos (ANCEL, 1901) (1); más modernamente HELF y STARK (1941) (69) y NOBLE y NOBLE (1944) (124) llegan a las mismas conclusiones para Rana sylvatica y Rana pipiens.

Hemos encontrado en Rana ridibunda la aparición de primordios celulares que al M.O. presentaban caracteres de

indiferenciación respecto a las células epidérmicas vecinas. Los primordios van creciendo por aumento en el número de células, lo que se ve corroborado por la existencia de figuras de mitosis en sus células, fenómeno observado por diversos autores en diferentes especies (VERMA, 1965; BOVBJERG, 1963; en Rana pipiens; VANABLE, 1964, en Xenopus laevis; LE QUANG TRONG, 1973 en Bufo regularis; KIM y colaboradores, 1975 en Rana nigromaculata) (177, 16, 175, 97, 83).

En los primordios glandulares las células centrales aparecen redondeadas, mientras que las superficiales tienden a adquirir una morfología alargada, lo que nos induce a considerar que éstas externas van a dar lugar a la envuelta mioepitelial como se ha descrito para otras especies (NOBLE y NOVLE, 1944; ZORZOLI, 1948) (124, 190); por su parte, el cuello glandular va a proceder de las células que unen el primordic con la epidermis; son células aplastadas que reúnen unas características similares a las restantes del primordio. Recientemente, LE QUANG TRONG (1973) (97) ha comunicado un fenómeno igual en Bufo regularis.

A pesar de la modernidad de los trabajos consulta

dos no hemos encontrado referencias ultraestructurales que nos informen de la citología de las células primordiales.

En nuestro estudio encontramos que estas células presentan un gran núcleo y poco citoplasma, observaciones hechas al M.O. por LE QUANG TRONG (1973) (97) en Bufo regularis. Por otro lado, las células presentan muy pocos hemidesmosomas en la membrana plasmática basal y pocos tonofilamentos, sobre todo si las comparamos con las células basales de la epidermis de que proceden. En ocasiones hemos podido observar la existencia de cilios en las células del primordio glandular, de los que desconocemos su posible función.

Hemos observado que al crecer el primordio glandular se produce un acompañamiento tanto de la membrana basal como de las fibras de colágena y células pigmentarias de la dermis, como se ha observado en Bufo regularis (LE QUANG TRONG, 1973) (97); además, hemos observado una alta relación de los primordios glandulares con los melanocitos epidérmicos ya que aparecen somas o bien sus prolongaciones entre dichas células, pero, a diferencia de lo que ocurre en la epidermis, no encontramos melanosomastransferi-



dos a las células primordiales.

Por último, vamos a resumir las características de las envueltas mioepiteliales que rodean a los tres tipos glandulares descritos. En todos ellos encontramos puntos de discontinuidad por lo que es igual que la envuelta mioepitelial de diversas glándulas de mamíferos (ELLIS, - 1965; KAWABATA y KUROSUMI, 1976) (42, 80), si bien, algunos autores, les dan carácter de continuas en algunas especies de anfibios (DELFINO, 1975; BANI, 1976) (35, 8).

La característica común de estas células es la abundancia de filamentos contráctiles que se sitúan ocupando el centro de la célula, fenómeno muy común en las glándulas alveolares de los vertebrados (KAWABATA y KUROSUMI, 1976; BANI, 1969, 1976)(80, 7, 8).

Además, otras características comunes sobresalientes de éstas células son la existencia de retículo endoplásmico liso, tanto entre los filamentos como en el citoplasma periférico y la abundancia de vesículas de pinocitosis y la unión entre ellas y con el epitelio secretor por desmosomas. Estos caracteres son comunes también a las des

critas en otras especies como Bombina variegata variegata L. (BOCK y LERTPRAPAI, 1972); Bombina bombina (MISCALENCU y colaboradores, 1973) (115) y Bufo marinus (HOSTETLER y CANNON, 1974) (74).

La existencia de un retículo endoplásmico liso se puede explicar por la necesidad de una contracción simultánea de los filamentos, siendo este orgánulo el encargado de llevar la orden de contracción a toda la célula, como todos sabemos que ocurre en el músculo liso y esquelético. Por otro lado, la presencia de abundantes vesículas de pinocitosis lleva a pensar que sean estas células también un paso de material hacia el epitelio secretor a partir del torrente sanguíneo, habiéndose sugerido como una verdadera barrera de intercambio entre la dermis y el epitelio (BANI, 1976) (8).

Los caracteres que hemos indicado nos hace comparar estas células con las típicas de los mamíferos (ELLIS, 1965; KAWABATA y KUROSUMI, 1976) (42; 80), si bien hemos encontrado que las células mioepiteliales que rodean a la glándula mixta de Rana ridibunda existen abundantes mitocondrias bien desarrolladas, lo que nos llevaría a incluir las dentro de un tipo especial especificado por BANI (1976) (8)

## 5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos y de los datos aportados en la bibliografía podemos concluir que:

1. Las epidermis de las dos especies estudiadas presentan los mismos estratos celulares que ya se describieron para otras especies.

2. Los filamentos del estrato basal son más abundantes en Bufo calamita, donde pueden formar haces que recorren grandes porciones de la célula.

3. Los grandes haces filamentosos de las células basales del renacuajo de R. ridibunda corresponden a las clásicas figuras de Eberth, que son pues de origen epi

dermico.

4. La membrana plasmática más basal se encuentra cubierta por hemidesmosomas en ambas especies.

5. A estos hemidesmosomas llegan haces filamentosos, sobre todo y de forma característica en el renacuajo de R. ridibunda.

6. El resto de las membranas plasmáticas de los queratinocitos aparecen unidas por desmosomas de tamaños variables.

7. Las vesículas intracitoplásmicas encontradas en los estratos basales son de carácter pinocitario como corresponde a los epitelios llamados "transportadores".

8. La unión dermoepidérmica en el renacuajo de Rana ridibunda está formada por una capa granular y una membrana basal propiamente dicha, teniendo la capa granular un origen epidérmico.

9. Las fibras de colágena juxtaepidérmicas pre-

sentan una ordenación ortogonal en Rana ridibunda (en cualquier fase de su vida) mientras que hay una disposición - anárquica en Bufo calamita.

10. Los filamentos van siendo cada vez más empaquetados tal como avanzan los queratinocitos hacia el estrato córneo.

11. En los queratinocitos de Bufo calamita este empaquetamiento deja libre un espacio perinuclear que es peculiar en esta especie.

12. El espacio intercelular aparece más angosto en Bufo calamita que en R. ridibunda como corresponde a una especie que se encuentra muy independizada del agua y ha de evitar la pérdida de ella a través de la piel.

13. Encontramos dos tipos de gránulos en el citoplasma de ambas especies diferentes en tamaño y densidad.

14. Los gránulos más pequeños de Bufo calamita - vierten su contenido al espacio intercelular.

15. Los restantes gránulos encontrados tanto en B. calamita como en R. ridibunda contribuyen a la constitución de la matriz intracitoplásmica amorfa de las células del estrato córneo.

16. El estrato córneo está formado por una sola capa de células, apareciendo en las de R. ridibunda restos de orgánulos celulares que no aparecen en B. calamita lo que nos indica una mayor perfección en el fenómeno de queratinización de este último.

17. En el tegumento de B. calamita aparecen dos tipos glandulares diferentes: glándulas mucosas y glándulas serosas, mientras que en Rana ridibunda aparece un sólo tipo de carácter mixto.

18. Las glándulas mucosas están constituidas por un epitelio en el que las células aparecen en diferentes estados de madurez secretoria. debido al contenido en gránulos que se empaquetan en el ápice celular.

19. El mecanismo de secreción es de tipo aponino.

20. La renovación del epitelio ocurre a partir de las células indiferenciadas del cuello glandular.

21. El epitelio de las glándulas serosas de B. calamita tiene un carácter sincitial con abundantes núcleos polarizados hacia el fenómeno de la secreción.

22. El mecanismo de secreción es de tipo holario, con lo que la renovación de la glándula será completa.

23. La secreción original está integrada por gránulos electrondensos y grandes vesículas de contenido irregularmente distribuido.

24. Esta secreción evoluciona, junto con material celular, hacia la consecución de estructuras muy ordenadas que constituyen la secreción definitiva.

25. En el tegumento de R. ridibunda aparece un único tipo de glándula cuyas células epiteliales presentan dos tipos de gránulos que corresponden a dos tipos de secreción diferentes: mucosa y serosa.



26. Los gránulos serosos, electrondensos, se desprenden hacia la luz por un mecanismo de secreción apocrino, mientras que los gránulos mucosos lo hacen mediante un tipo merocrino.

27. El epitelio es renovado por células indiferenciadas que se localizan en el cuello glandular y, a veces, entre las células epiteliales activas.

28. Las tres glándulas descritas presentan una cubierta contráctil discontinua de tipo mioepitelial que se encuentra a su vez rodeada de una membrana basal continua que es continuación de la epidérmica.

29. Estas glándulas mixtas se producen a partir de primordios epidérmicos que tienen su origen en las células basales y que crecen por mitosis de sus componentes.

30. Durante la diferenciación de estos primordios, las células externas van a dar lugar a las células mioepiteliales y las internas a las células del epitelio secretor.

31. En su crecimiento va a ser acompañado este primordio por células y fibras dérmicas de la dermis subyacente.