

**ASPECTOS HISTOLOGICOS DE LA LENGUA
DE *GASTROTHECA MARSUPIATA* (DUMERIL Y BRIBON)
(ANURA, HYLIDAE)***

por

S. MANGIONE DE MOPTY**, M. ALCAIDE DE PUCCI**, H. R. TERAN***, E. TEISAIRE** y
E. RIVAS DE PANTORRILLA**

SUMMARY

Histological aspects of the tongue of *Gastrotheca marsupiata* (Duméril y Bibron) (Anura, Hylidae). A study of the tongue of *Gastrotheca marsupiata* (D & B) is made from the morphologic and histochemical aspects. The histomorphology is determined by means of routine techniques, and the histochemical aspects by applying techniques suitable for carbohydrates. The results obtained are compared to other of Anura.

Introducción

El género *Gastrotheca* es de gran interés por sus características reproductivas, sin embargo, los otros aspectos no pueden ser ignorados y consideramos que el estudio de la lengua es una contribución desde un punto de vista diferente para el conocimiento de este género. Además, se aportan nuevos datos que se agregan a los ya conocidos sobre la lengua de Anuros y su funcionamiento tan característico.

Los anuros del NOA estudiados hasta ahora desde nuestro enfoque son escasos y sólo podemos citar los trabajos de Gordillo de Albornoz (1977) en *Bufo arenarum* Hensen y Mangione (1980) en *Leptodactylus chaquensis* Cei.

En el presente trabajo se analiza desde el punto de vista histomorfológico e histoquímico la lengua de *G. marsupiata* (D & B) y se arriesgan algunas especulaciones e hipótesis acerca del funcionamiento fino de sus estructuras.

Material y métodos

Se procesaron lenguas de 2 ejemplares de *G. marsupiata* (D & B) capturados en el mes de octubre en Río Vinto (2.100 m de altura) entre Cochabamba y Villa Tunari (Bolivia).

Previa desmedulación de los animales, se extirparon las mandíbulas inferiores completas, a fin de observar la implantación de la lengua y sus relaciones topográficas.

Se fijó el material en Bouin, aprovechando sus propiedades de descalcificador débil, y en Stieve por ser un excelente fijador de mucinas.

Se incluyó en bloque en una mezcla de cera y parafina a 59° C. Los cortes se realizaron seriados, con un espesor de 5 µm, con orientación transversal desde el extremo anterior de la mandíbula. Para determinar aspectos morfológicos se coloreó con técnicas de rutina: Hematoxilina-Eosina; Tricómico de Mallory; Fucsina Aldehído, para la determinación de fibras elásticas; Hematoxilina Fosfotúngtica para terminaciones nerviosas.

Para la identificación de mucinas se utilizaron las siguientes técnicas: PA-Schiff, (en adelante PAS) para determinar la presencia de grupos 1,2 glicol en mucopolisacáridos, mucopro-

* Presentado en las VII Jornadas Argentinas de Zoología y en las 1ª Jornadas de la Sociedad de Biología de Tucumán.

** Fac. Ciencias Naturales UNT - F.M. Lillo.

*** Fundación Miguel Lillo - CONICET.

teínas, mucinas neutras y ácidas periodato-reactivas de acuerdo a Mc Mannus (1961).

Alcian Blue 8GS a pH 2,5 (en adelante Ab 2,5) para la detección de grupos carboxilos y algunos sulfatos de mucopolisacáridos ácidos.

Alcian Blue 8GS a pH 0,5 (en adelante AB 0,5) según Spicer (1964) para la detección de mucopolisacáridos sulfatados.

Para la confirmación de la técnica anterior, algunas secciones fueron teñidas con Azul de Toluidina a pH 5,6 y 3,5 (en adelante TB) en buffer de Michaelis, que identifica polímeros de carbohidratos sulfatados con radicales altamente ionizables, en forma metacromática y alcohol resistente según Sylven (1961).

Según Michaelis (1947) se determinan variedades de metacromasia de acuerdo al espectro de absorción del complejo colorante-tejido resultante en tres bandas: alfa, beta y gama.

Se emplearon secuencias combinadas a pH 0,5 y 2,5 con PAS según Mowry y Winkler (1956) que permiten la determinación simultánea de mucopolisacáridos y mucoproteínas ácidas (sulfatadas, fosfatadas, acetiladas, sialicadas) y neutras.

Resultados

Como en la mayoría de los Anuros, la lengua está unida al piso de la boca por su extremo anterior. En corte transversal se visualiza el cartílago de Meckel (a ambos lados) o cartílago mandibular de tipo hialino. Este cartílago está revestido por tejido óseo calcificado que tiende a rodearlo totalmente. Dicha osificación dérmica forma en la parte anterior el Dental y posteriormente el Angular. Entre la formación oseocartilaginosa se observa una pequeña franja de tejido conectivo denso, correspondiente a periestio y pericondrio fusionados. Esta estructura ósea tiene independencia de origen con el cartílago ya que surge como alostosis (fig. 1).

Desde el ángulo anterior del cartílago se diferencia un ligamento importante donde se inserta la musculatura esquelética del piso de la boca y la lingual, reforzado por abundantes fibras elásticas, que se ponen en evidencia con la técnica de Aldehído Fucsina (fig. 2).

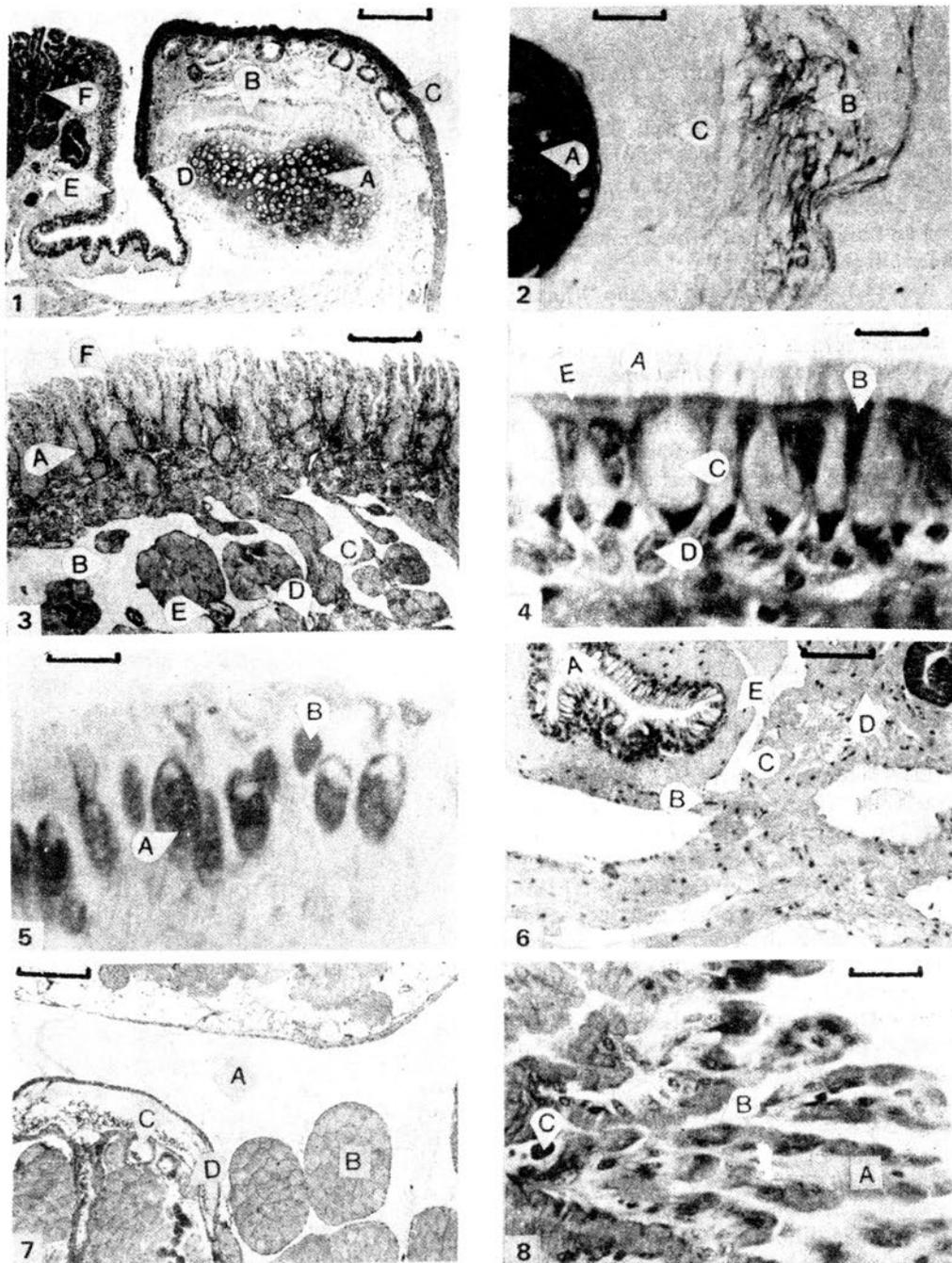
Desde éstos parantes de sostén se extiende una fuerte musculatura perteneciente al piso de la boca; los haces externos están orientados transversalmente y los internos son longitudinales. La musculatura intrínseca de la lengua

está separada de la del piso de la boca por un amplio seno linfático, atravesado por fuertes haces musculares. Además de éstos paquetes de músculos, hay importantes vasos sanguíneos, nervios de gran calibre y algunos ganglios nerviosos; todas estas estructuras están ligadas por tejido conectivo. El amplio seno está revestido por endotelio, debajo del cual hay tejido conectivo denso de tipo fibroso (fig. 3).

El epitelio planoestratificado de la piel se introduce hacia la cavidad bucal modificándose gradualmente en pseudoestratificado, debajo hay una fuerte capa de tejido conectivo denso con abundantes fibras colágenas. Este epitelio pseudoestratificado ciliado tiene 3 tipos celulares diferentes (figs. 1 y 4): 1º células cilíndricas ciliadas, comprimidas totalmente por las células secretoras, ensanchándose en el ápice ya que la presión es menor, donde se encuentra el núcleo ovoide y claro con algunas zonas heterocromáticas; en la región por debajo de la membrana plasmática se pone en evidencia el velo terminal que resalta, posiblemente, por la presencia de los corpúsculos basales correspondientes a los largos y abundantes cilios apicales; 2º intercaladas con las arriba descritas se observan células calciformes de dos tipos según el contenido histoquímico. Con AB a pH 0,5-PAS se distingue un tipo celular voluminoso, con contenido de aspecto espumoso positivo al PAS, con algunos gránulos perfectamente individualizables AB 0,5 positivos. El segundo tipo celular es de menor tamaño, AB 0,5 positivo, presentando además un mosaico tenue de sectores PAS positivos. El contenido de estas últimas células está compactado en granulaciones finas respecto a las anteriores (fig. 5). Estos contenidos de carbohidratos se corroboraron con la técnica de TB a pH 5,6 y 3,5, manifestándose otra vez los 2 tipos celulares donde las zonas AB 0,5 positivas revelaron una fuerte metacromasia; 3º el último tipo corresponde a las células bajas de recambio, con núcleos redondeados eucromáticos y escaso citoplasma (fig. 5).

Este epitelio es el que recubre la cara ventral de la lengua a medida que se separa del piso de la boca, en consecuencia se profundiza la penetración del epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, mientras se estrecha el gran seno linfático inferior. A este nivel el seno y el epitelio antes descrito están separados por una brida conectivomuscular (fig. 6).

Todo el espesor del cuerpo lingual est-



Figs 1 - 8. 1: A, cartílago; B, hueso; C, piel; D, epitelio de transición; E, epitelio pseudoestratificado ciliado con células caliciformes; F, glándulas linguales dorsales. (H. E.), Barra = 210 μ m; 2: A, cartílago; B, fibras elásticas; C, tejido óseo. (Ald. Fucs.), Barra = 53 μ m; 3: A, glándulas dorsales; B, senos linfáticos; C, músculos; D, vasos sanguíneos; E, nervios; F, papila filiforme. (Mallory), Barra = 210 μ m; 4: A, cilios; B, célula cilíndrica; C, célula caliciforme; D, núcleo de la célula de recambio; E, velo terminal. (Mallory), Barra = 12 μ m; 5: A, célula caliciforme voluminosa PAS positiva; B, célula caliciforme pequeña AB 0,5 positiva, Barra = 12 μ m; 6: A, epitelio pseudoestratificado; B, brida conectivo-muscular; C, seno linfático; D, músculo estriado; E, conectivo denso. (H. E.), Barra = 80 μ m; 7: A, seno linfático; B, paquete muscular; C, vasos sanguíneos; D, nervios. (Mallory), Barra = 210 μ m; 8: A, papila filiforme; B, cuellos de glándulas dorsales; C, capilar. (H. E.), Barra = 32 μ m.

ocupado por una musculatura de tipo estriado reunida en grandes paquetes y en su mayoría dispuesta en sentido dorso-ventral. Los grupos musculares no son continuos sino hasta que subyacen a la glandulación dorsal, donde recién forman una masa compacta, la que está formada por las fibras individuales que se entrecruzan en todas direcciones (fig. 3).

Los paquetes de mayor tamaño "flotan" en senos linfáticos, según la zona del corte tienen distintas formas. En relación a la musculatura se observan grandes formaciones vasculo-nerviosas de considerable calibre (figs. 3 y 7).

La cara dorsal propiamente dicha, tiene una rica glandulación de formaciones tubulares simples (fig. 3), y sobre la superficie y entre las desembocaduras de las glándulas se observan dos tipos de papilas: las filiformes abundantes y estrechamente relacionadas con los cuellos glandulares y las fungiformes muy conspicuas en el conjunto de las estructuras dorsales.

Las últimas tienen más relación topográfica y morfológica con el músculo, vasos y nervios acompañados por tejido conectivo denso que hacen en conjunto a la estructura papilar (fig. 3).

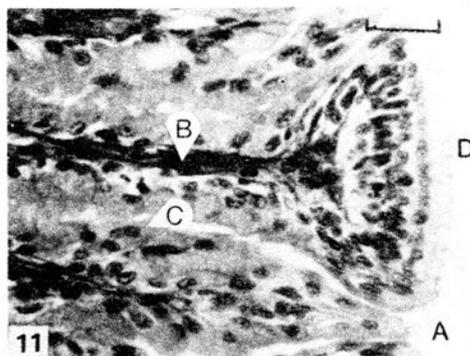
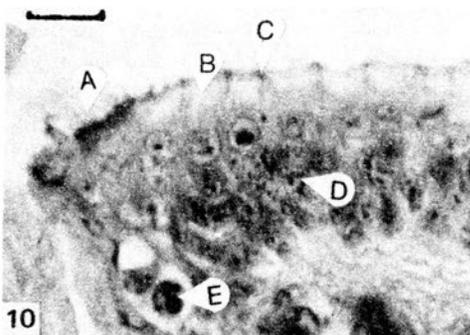
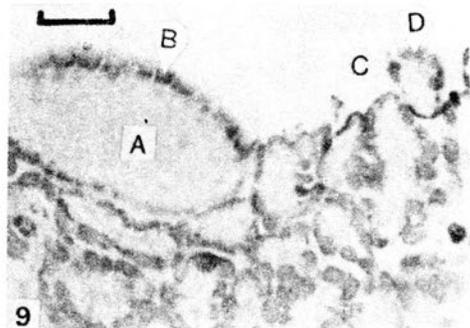
Las glándulas si bien son tubulares simples presentan en algunas zonas un recorrido bastante irregular. Las células que las componen son de morfología uniforme no observándose variaciones según se ubiquen en los fondos glandulares o cercanas a las desembocaduras entre las papilas filiformes (fig. 3). Son células cilíndricas estrechas y altas, con núcleos que a pesar de estar adheridos a la membrana basal no están aplastados contra ella, son redondeados con gránulos heterocromáticos. El citoplasma es basófilo y de textura granulosa muy fina, siendo la secreción de naturaleza serosa (figs. 3 y 8).

Las papilas filiformes (fig. 8) sobresalen ligeramente y en apariencia no tienen una posición estable o permanente ya que aparecen inclinadas en todas direcciones. Las células cúbicas del epitelio simple que revisten la papila son de citoplasma claro y abundante, de aspecto turgente con las coloraciones de rutina. Los núcleos también son voluminosos y con gránulos eucromáticos. Además están provistas de un eje de tejido conectivo denso con capilares.

En el epitelio de revestimiento de las papilas se configura un mosaico con 2 tipos de glándulas unicelulares, según su contenido. Las

más abundantes PAS positivas con granulaciones delimitadas por membranas y en menor proporción, células con contenido AB 2,5 y 0,5 fuertemente positivas (fig. 9).

El otro tipo de papilas, fungiformes (figs. 9, 10 y 11), presentan una gran copa dorsal exterior de superficie convexa, estrechándose hacia la base a medida que se inserta en la mucosa lingual.



Figs. 9-11.- A, papila fungiforme; B, células en empalizada; C, célula AB positiva; D, célula PAS positiva. (AB 0,5 - PAS), Barra = 32 μ m. 10: A, mechón de cilios; B, célula en empalizada; C, terminales nerviosas; D, núcleos de células nerviosas; E, capilar (H.Fosfot), Barra = 12 μ m. 11: A, papila filiforme; B, eje conectivo; C, célula glandular; D, células en empalizada; (Mallory), Barra = 12 μ m.

Las células del dorso papilar están dispuestas en empalizadas, son cilíndricas y con coloraciones morfológicas manifiestan un citoplasma claro, con núcleos redondeados de ubicación constante en el tercio inferior de la célula. Flanqueando a las anteriores y formando el borde de la papila hay unas células diferentes cuyos ápices presentan cilios con los que forman una corona alrededor del plato de la papila; debajo de estas hay unos elementos que morfológicamente se pueden considerar de transición hacia el tipo secretor de las glándulas tubulares (fig. 11). Subyacente a las células en empalizada hay un "colchón" de núcleos ovoides similares entre sí, que corresponden a células nerviosas sensitivas. El eje de la papila a medida que se estrecha se ve ocupado por tejido conectivo denso fibroso que rodea vasos, nervios y haces musculares que provienen del cuerpo lingual subyacente (fig. 11).

Con coloraciones histoquímicas bien contrastadas aparecen en imagen negativa, en forma evidente los espacios intercelulares, correspondientes al paso de las terminales de filetes nerviosos (fig. 9), los que se manifiestan con hematoxilina fosfotúngstica (fig. 10).

Las células ciliadas del borde no presentan reactividad a ninguno de los colorantes histoquímicos ya que evidentemente su función no es secretora.

Discusión y Conclusiones

Histomorfológicamente la lengua de *G. marsupiata* (D & B), está estructurada, en su cara basal, por un revestimiento epitelial de tipo pseudoestratificado ciliado y con células caliciformes. El dorso lingual presenta una glandulación abundante con características secretoras particulares.

Los 2 tipos de papilas dorsales, en especial la complejidad de una de ellas, sumado a la rica inervación del órgano en general, brindan pautas de lo importante que es este órgano como intermediario activo entre el animal y el medio que lo rodea, específicamente la presa.

Creemos que la importancia de los senos linfáticos reafirma lo expuesto por numerosos autores (Gavrilov, 1961; Romer, 1973) de que estos cumplen un importante papel en el meca-

nismo dinámico de proyectar la lengua en el momento de la captura.

Respecto al contenido de las células caliciformes del epitelio ventral, se puede decir que hay 2 tipos de células secretoras de mucinas: unas con contenido de mucinas neutras y polisacáridos, con un agregado escaso de mucinas ácidas fosfatadas y sulfatadas; y el otro tipo con una manifiesta predominancia de mucinas ácidas sulfatadas y sialicadas, presentando un agregado en forma de mosaico de glucoporteínas y mucoproteínas. Con Azul de Toluidina a diferentes pH, se comprobó la presencia de ésteres sulfatos debido a polímeros de absorción gama y se comprobó la secreción de glúcidos altamente polimerizados de tipo de absorción alfa monoméricas según el espectro de absorción.

Las papilas filiformes se comportan también como secretoras de mucinas acetiladas, fosfatadas, sulfatadas y sialicadas.

Las células en empalizada de las papilas fungiformes tienen contenido de mucinas fosfatadas, sulfatadas, acetiladas y sialicadas.

Comparando los resultados obtenidos con los *Leptodactylus chaquensis*, podemos señalar que morfológicamente no se han observado diferencias de importancia, salvo la ausencia en nuestra especie de las abundantes tonsilas presentes en *L. chaquensis* en la cara dorsal y en los fondos glandulares. En cuanto a los resultados histoquímicos, las variaciones en las 2 especies consideradas, no son marcadas en cuanto a contenido de mucinas, sino en la intensidad de la positividad al colorante.

Tanto *G. marsupiata* como *L. chaquensis*, difieren marcadamente de *Bufo arenarum* en los aspectos morfológicos de la configuración lingual: tal es el caso de la ausencia en este último de las papilas filiformes, observándose en el dorso lingual un epitelio simple cúbico de secreción continua de mucinas. Además en las glándulas serosas dorsales, las cuales son muy diferentes en su morfología a las de las otras 2 especies, ya que en *B. arenarum* son túbulo-alveolares muy dilatadas.

Agradecimientos

Agradecemos al Inst. de Herpetología de la Fundación Miguel Lillo y en particular al Sr. Enrique M. Terán, por el material vivo y la bibliografía facilitada para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- GAVRILOV, K. 1961. Curso de Anatomía y Fisiología comparadas. VI. Los órganos digestivos. Univ. Nac. Tucumán ed. 572 p.
- GORDILLO de ALBORNOZ, M. A. 1977. Histoquímica de las mucinas epiteliales glandulares de *Bufo arenarum* Hensel. Bibl. Fac. Odontología UNT, 12 pp. (Inédito).
- MANGIONE, S. 1980. Estudio morfológico e histoquímico de la lengua de *Leptodactylus chaquensis* Cei. Bibl. Fac. Cs. Nat. UNT. Inédito, 55 pp.
- MC. MANNUS, J. F. A. 1961. Periodate oxidation techniques. General Cytochemical Methods, II. J. F. Danielli Ed., New York, Academic Press.
- MICHAELIS, L. En PEARSE, A. G. E. 1960. Histoquímica, Teórica y Aplicada. Aguilar ed, Madrid, 599 pp.
- MOWRY, R. W. y WINKLER, C. H. 1956. The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue section with special reference to capsules of *Cryptococcus*, *Pneumococci* and *Staphylococci*. Amer. J. Path. 32:628.
- ROMER, A. S. 1973. Anatomía comparada. Vertebrados. Interamericana, ed. México, 453 pp.
- SPICER, S. S. y R. LEV. 1964. Specific staining of sulphate groups with Alcian Blue at low pH. Histochem. Cytochem. 12:309.
- SYLVEN, B. 1961. Histochemistry, Theoretical and Applied. Everson Pearse ed. London, 253 pp.