

EFFECTOS DE LA INGESTA CRONICA DE ETANOL SOBRE LOS RECEPTORES
GUSTATIVOS LINGUALES DE LA RATA.

Por

C.D. LUIS ALBERTO GAITAN CEPEDA.

**GAITAN
CEPEDA
LUIS
ALBERTO
1984**

TESIS



K(1) UNAM



Facultad de Odontología
Div. de Est. de Posgrado e Investigación
Biblioteca "Barnet M. Levy"

TESIS

Presentada como requisito para obtener el Grado de
Maestría en Odontología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Noviembre de 1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

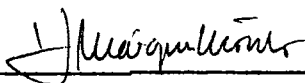
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

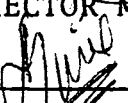
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EFFECTOS DE LA INGESTA CRONICA DE ETANOL SOBRE LOS RECEPTORES
GUSTATIVOS LINGUALES DE LA RATA.

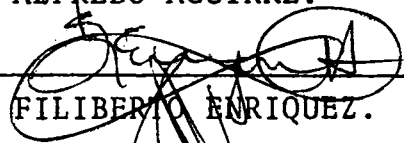
Aprobado por:



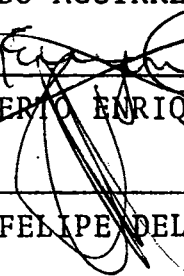
C.D.M.O. HECTOR MARQUEZ.



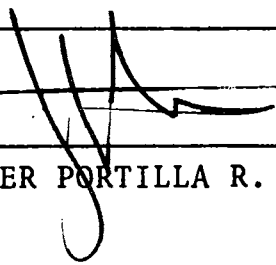
C.D.M.O. ALFREDO AGUIRRE.



C.D.M.O. FILIBERTO ENRIQUEZ.



C.D.M.O. LUIS FELIPE DEL CASTILLO.



C.D.M.O. Director de la tesis. JAVIER PORTILLA R.

R E C O N O C I M I E N T O S

Al Doctor Javier Portilla Robertson mi agradecimiento por la ayuda y dirección de este trabajo de tesis.

Al Doctor Jesús Porfirio Machado-Salas mi agradecimiento por su asesoría y valiosos conocimientos.

Al Doctor Alfredo Aguirre Montes de Oca mi agradecimiento por sus críticas en la redacción del escrito.

Al Doctor Manuel Granados Navarrete, Jefe del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. mi agradecimiento por el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, U.N.A.M. que colaboro en esta tesis mi agradecimiento.

A mi querida Facultad de Odontología, Mil Gracias.

A mi esposa María de los Angeles Salvatella de Gaitán, gracias por su comprensión y apoyo.

A mis padres, Gracias.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSION	48
RESUMEN	57
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	60
APENDICE I	72
APENDICE II	74

INDICE DE TABLAS.

1.- YEMAS GUSTATIVAS CON ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN EL GRU <u>P</u> O EXPERIMENTAL Y CONTROL	38
2.- YEMAS GUSTATIVAS CON FORMA ALTERADA EN EL GRU <u>P</u> O EXPERIM <u>E</u> N <u>T</u> AL Y CONTROL	39
3.- YEMAS GUSTATIVAS CON MICROVELLOSIDADES ALTERADAS EN EL -- GRU <u>P</u> O EXPERIMENTAL Y CONTROL	40
4.- YEMAS GUSTATIVAS CON AXONES ALTERADOS EN EL GRU <u>P</u> O EXPERI <u>M</u> ENTAL Y CONTROL	41
5.- YEMAS GUSTATIVAS CON NUCLEOS ALTERADOS EN EL GRU <u>P</u> O EXPERI <u>M</u> ENTAL Y CONTROL	42
6.- YEMAS GUSTATIVAS CON DESORDEN INTRAGEMULAR EN EL GRU <u>P</u> O EX <u>P</u> ERIMENTAL Y CONTROL	43

INDICE DE CUADROS.

1.- COMPARACION DEL DIAMETRO TRANSVERSAL DEL PAQUETE NEUROVASCULAR	30
2.- COMPARACION DEL NUMERO DE YEMAS GUSTATIVAS EN CADA GRUPO.	45
3.- COMPARACION DEL PROMEDIO DE CELULAS GUSTATIVAS EN YEMAS - GUSTATIVAS	46
4.- COMPARACION DEL PROMEDIO DE CELULAS DE SOSTEN EN YEMAS -- GUSTATIVAS	47

INDICE DE FIGURAS.

1.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS YEMAS GUSTATIVAS DEL-GRUPO CONTROL	18
2.- CUANTIFICACION DE CAMBIOS MORFOLOGICOS DE YEMAS GUSTATIVAS DE GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL	21
3.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS YEMAS GUSTATIVAS DEL-GRUPO EXPERIMENTAL	23
4.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS YEMAS GUSTATIVAS DEL-GRUPO EXPERIMENTAL	26
5.- CAMBIOS MORFOLOGICOS DE LA INERVACION DE LAS YEMAS GUSTATIVAS Y DEL EPITELIO CIRCUNDANTE DEL GRUPO EXPERIMENTAL	31
6.- COMPARACION DE IMAGENES MORFOLOGICAS DE PAPILAS FUNGIFORMES Y YEMAS GUSTATIVAS DEL GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL	34
7.- COMPARACION DE LOS COMPONENTES NEUROVASCULARES [DIAMETRO-TRANSVERSAL]. POR GRUPO EXPERIMENTAL Y CONTROL	36

INTRODUCCION.

Epidemiología:

El alcoholismo es un problema mundial del cual casi ningún país escapa, independientemente de su régimen político, nivel económico, religión, etcétera. Las cifras tanto del número de alcohólicos como de alcohol ingerido per capita por año demuestran la gran importancia que reviste esta enfermedad en el terreno económico, social y de la salud. Por ejemplo en 1975 en Inglaterra y Gales existían 11 sujetos alcohólicos por cada 1000 habitantes. Por otro lado, en Canadá se observó una elevación de 16 a 23 alcohólicos por mil habitantes en un lapso de 7 años (Hore, 1976), mientras que en los Estados Unidos de América se calculaba que en 1981 existían 5.75 millones de alcohólicos (Blume, 1981). Con respecto a la cantidad de alcohol puro ingerido por persona, los datos son también alarmantes: en 1973 se calculaba en 22.4 litros por adulto ingeridos en un año en Francia, de 19 litros en Portugal, 17.1 en España e Italia, 9.1 en Gran Bretaña y de 8.5 en Estados Unidos de América (Laudenbach y Laufer, 1976). En Francia originaron una erogación de 10 mil millones de francos para el gobierno.

En México las cifras también son importantes, ya que se consideraba que nuestro país ocupaba, al menos hasta 1976, el segundo lugar de consumo de alcohol en Latinoamérica. Ese año se calculó que los mexicanos gastaban anualmente 6 829 -- 188 000 pesos en bebidas alcohólicas. Los datos de la Dirección de Salud Mental en relación al año de 1975 establecían que por cada mil habitantes 59.18 sufrían de alcoholismo en cualesquiera de sus formas. El consumo por persona fué de 31 litros al año; consumiéndose aproximadamente 1 200 millones de litros de cerveza, alrededor de 44 millones de litros de derivados de la caña, 44 millones de litros de derivados del

agave, 110 millones de litros de derivados de la uva y 48 millones de litros de pulque; lo que da un total aproximado de 1 530 millones de litros de bebidas alcohólicas ingeridas en un año (Guerra, 1977).

Definición:

Muchos y variados nombres han recibido quienes beben alcohol [alcohólico, adicto al alcohol, bebedor problema, -- persona alcohol-dependiente, etcétera], sin embargo la más utilizada es alcohólico. Para definir cuando se debe considerar a un sujeto como alcohólico los diferentes autores han utilizado varios parámetros: la cantidad-frecuencia de la ingesta, signos de dependencia psicológica, presencia de signos físicos de abstinencia, daño mental o físico, y otros -- más. Sin embargo, podemos mencionar que las definiciones de alcohólico giran alrededor de dos grandes corrientes: 1) el alcohólico es aquella persona que sufre daño por beber; y 2) en donde se define al alcohólico en términos de dependencia [adicción] sea ésta psicológica, física o ambas (Hore, 1976, Schneider, 1976, Schuckit, 1979). La Organización Mundial de la Salud propone la siguiente definición: "un alcohólico es aquel que bebe excesivamente cuya dependencia sobre el alcohol ha llegado a un grado tal que muestra un notable disturbio mental o interferencia con su salud corporal y mental, - con sus relaciones personales o su economía; o quien muestra los signos prodrómicos de semejante desarrollo, ellos por lo tanto requieren tratamiento". Todas las definiciones coinciden en señalar que el sujeto alcohólico presenta alteraciones en su salud física como mental, causadas directamente -- por el alcohol o alguno de sus metabolitos. El alcohólico es un enfermo.

Metabolismo y Efectos Metabólicos:

Del total de etanol absorbido a nivel del tubo diges

tivo, únicamente del 2 al 10% es eliminado a través de riñones o pulmones, el resto es metabolizado principalmente en el hígado (Lieber, 1980, Lamboeuf, et al, 1981). La principal vía del metabolismo del alcohol en el hígado es a través de la deshidrogenasa alcohólica. Esta enzima condiciona la pérdida de hidrógeno del etanol y su subsecuente oxidación hacia acetaldehído. Cada uno de estos dos productos metabólicos, hidrógeno y acetaldehído, son directamente responsables de una variedad de alteraciones metabólicas.

El hidrógeno resultante de la oxidación del etanol se une al dinucleótido adenina nicotinamida [NAD] provocando una elevación en la concentración de dinucleótido adenina nicotinamida hidrogenado [NADH], alterando consecuentemente la relación NAD/NADH. Este desequilibrio, causado en el estado redox causado por el aumento de hidrogeniones, ha sido propuesto como responsable de un número de anormalidades: hiperlactacidemia, hiperuricemia [relacionada con el agravamiento o precipitación de los ataques de gota por etanol], hipoglicemia, y de presión de la oxidación de los ácidos grasos, entre otros. La última alteración metabólica provoca que los ácidos grasos se depositen en el hígado pudiéndose desarrollar un hígado graso alcohólico (Lieber, 1980, Lundquist, 1975).

El otro producto de la oxidación del etanol es el acetaldehído. Este metabolito, vía la deshidrogenasa de aldehído, es oxidado. Este proceso también provoca un aumento de NADH contribuyendo a agravar las alteraciones anteriormente mencionadas. Por otro lado al acetaldehído se le atribuye: a) numerosos efectos neurotóxicos, b) que afecta la síntesis de proteínas del miocardio, c) inhibición de la fosforilación oxidativa (Lundquist, 1975, Lieber, 1980).

Efectos Estructurales, Funcionales y Bioquímicos sobre el sistema nervioso:

Estos metabolitos, producidos a nivel hepático, no solamente alteran este órgano sino que repercuten en toda la economía corporal, destacando por sus alcances, las alteraciones causadas en el sistema nervioso. Estos cambios se observan tanto en el aspecto morfológico, como en el bioquímico y funcional.

En el caso del sistema nervioso central podemos mencionar los siguientes cambios morfológicos: alteraciones en el cuerpo calloso (Ironside, et al, 1967), alteraciones en la corteza cerebelosa (Lynch, 1960), alteraciones en el soma, incremento en la población glial, fragmentación y dilatación de las dendritas (Riley y Walker, 1978, Machado-Salas, et al, -- 1979). En el bioquímico, disminución del flujo sanguíneo cerebral y del consumo de oxígeno (Hemmingsen y Barry, 1979), acidosis del líquido cerebroespinal (Carlen, et al, 1980), disminución en el recambio de proteínas cerebrales y en los niveles de AMP cíclico; y una reducción en los neurotransmisores norepinefrina, dopamina y acetilcolina (Kalant, 1975). Sobre la fisiología neuronal también actúa el etanol provocando cambios en la conductancia iónica, inactivación del canal del sodio, inhibición de la (Na+K)-ATPasa, alteración de las funciones de las neuronas moduladoras inhibitorias y excitatorias, entre otras (Kalant y Woo, 1981). Estas alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales pudieran estar relacionadas con los cambios en el estado de ánimo, hipnosis e hipotermia, que como característica principal presenta un sujeto cuando ingiere bebidas embriagantes (Abel y York, 1979, Persson, et al, 1980, Murphy y Lipton, 1983).

Otra complicación a nivel clínico de la ingesta de alcohol, es la aparición de síndromes neuropsiquiátricos. Estos

síndromes se refieren a una variedad de disfunciones cerebrales que pueden ser observadas tanto durante etanolización aguda [intoxicación aguda, abstinencia, delirium tremens], como en los síndromes cerebrales crónicos: síndrome de Wernicke-Korsakoff, síndrome de Marchiafava-Bignami, mielinólisis central pónica. Signos característicos de estos síndromes incluyen varios grados de pérdida de la memoria, ataxia, neuropatías, deficiencias generalizadas en la función mental y alteraciones en el encefalograma (Ironside, et al, 1961, Zilm, 1980). También el alcohol virtualmente afecta todos los componentes del sistema neuroendócrino (Cicero, 1980).

Con respecto al sistema nervioso periférico, la alteración mas evidente causada por el alcoholismo crónico son las polineuropatías alcohólicas. Estas pueden ser motoras o sensoriales, teniendo un comienzo brusco o gradual. Las manifestaciones sensoriales generalmente preceden a las motoras. Los síntomas sensitivos frecuentemente se acompañan de dolor y se manifiestan por falta de sensibilidad o sensación de quemadura. Algunas veces se observa parálisis, especialmente de las partes distales del miembro inferior. Los cambios patológicos consisten en desmielinización segmentaria de Gombault. Esta degeneración segmentaria se caracteriza por pérdida de la continuidad de la mielina en algunos segmentos de la fibra nerviosa, sin que esta pierda su integridad estructural, aunque exista pérdida pasajera de la función del axón. Los cambios químicos en la vaina de mielina, demostrables por técnicas histológicas especiales, aparecen entre los 8 - 10 días después de la agresión inicial y probablemente estén relacionados con formación de ésteres de colesterol. Estas grasas neutras son removidas lentamente por macrófagos y por las mismas células de Schwann. Al desintegrarse la mielina, es ingerida por macrófagos y si los factores locales son adecuados, ocurre remielinización (Robbins, 1975, Chason, 1977, Dart y Howard, 1981). Por otra parte, el alcoholismo provoca una dis

minución en la velocidad de conducción así como cambios cuantitativos y cualitativos en la acomodación de dichas fibras nerviosas periféricas (Quevedo, et al, 1980).

Las alteraciones causadas por el alcohol no sólo se limitan al sujeto que lo ingiere sino que también puede alcanzar a su descendencia. En la mujer se ha demostrado que el alcoholismo crónico afecta la función sexual a nivel hipotálamo-hipófisis principalmente durante el período reproductivo (Hughes, et al, 1980); por otro lado se reportó que una historia de alcoholismo materno puede disminuir el peso fetal, independientemente del uso del alcohol durante el embarazo (Little, et al, 1980), a parte de la presencia de malformaciones congénitas en la descendencia de madres alcohólicas denominado "Síndrome de Feto Alcoholizado" (Jones, et al, 1973, Stoltenburg-Didinger y Sphor, 1983, Wisniewski, et al, 1983). Este síndrome es causado por un efecto teratogénico directo del etanol (Chernoff, 1980).

Etanol y Cavidad Oral:

Enfocando la enfermedad a nivel odontológico los problemas causados por el alcoholismo también son amplios y desgraciadamente se les da poca importancia a nivel curricular. Las cifras estadísticas demuestran que el estudio de las alteraciones provocadas por el alcoholismo sobre las estructuras bucales, así como las manifestaciones bucales de las alteraciones sistémicas de esta enfermedad, merecen ser de una mayor importancia. En 1978 se calculó que a nivel clínico privado, por lo menos uno de cada cinco pacientes hombres y una de cada diez pacientes mujeres eran alcohólicos (Schuckit, 1979). Por otro lado, tenemos que de cada 1000 nacimientos, 1 a 2 de los productos son afectados por el síndrome del feto alcoholizado (Olegard, et al, 1979). La importancia de este dato para el odontólogo de práctica general, radica en el he-

cho de que los principales signos del síndrome del feto alcoholizado son malformaciones craneofaciales: microcefalia, --- frente angosta, hipo e hipertelorismo, acortamiento horizon_ tal de las fisuras palpebrales, nariz corta, labio superior grande, filtrum ausente, borde vermellon delgado, microdoncia y bóveda palatina alta (Sulik y Johnston, 1983), las que le - permiten identificar y diagnosticar tempranamente a los suje_ tos con este síndrome, e iniciar el tratamiento adecuado.

Los pacientes alcohólicos generalmente consultan al - dentista para efectuarse extracciones de emergencia, razón -- por lo que este tipo de pacientes presenta una pérdida tres - veces mayor de piezas permanentes que los pacientes no-alcohó_ licos con la consiguiente necesidad de elaborar prótesis para rehabilitar al sujeto, lo cual finalmente origina una eroga_ ción económica mayor (Dunkley y Carson, 1968). A parte de que experiencia clínica indirecta establece que estos sujetos pre_ sentan una mayor cantidad de traumatismos en el área maxilofa_ cial debidos a accidentes automovilísticos o de otra índole, y/o riñas, que las personas que no son alcohólicas. Según Sch_ neider, (1976) la mejor manera de ayudar al alcohólico es man_ teniendo su integridad bucodental.

Los sujetos alcohólicos presentan una amplia gama de cambios en estructuras orales. Se han descrito la presencia - de depósitos de cálculos sobre la superficie dental, periodon_ titis crónica avanzada y generalizada, con tejidos gingivales inflamados, y pérdida del puntilleo, papilas achatadas y bol_ sas periodontales profundas. Aunque se discute que estas alte_ raciones sean causadas por la mala higiene oral que caracteri_ za al alcohólica, que por un efecto directo del alcohol (Lara_ to, 1972, Schuckit, 1979). La mucosa del paladar y de la zona yugal presenta un color rojizo a café amarillenta debido al - depósito de pigmentos biliares, típico de una fase alcohólica

avanzada (Larato, 1972).

Las glándulas salivales, especialmente la parótida, presentan un aumento de volúmen bilateral, simétrico, generalmente asintomático. El cuadro histopatológico consiste en una disminución de los gránulos de secreción, asociado probablemente a una disminución del RNA, con un consiguiente aumento de los mucopolisacáridos. Los núcleos son desplazados hacia la porción basal de la célula, teniendo como consecuencia que la imagen histológica de la parótida [glándula serosa], cambie a glándula mucosa. Por otro lado, el pH salival de estos sujetos es ácido [5.5 a 6], relacionándose esta disminución de pH con un aumento de caries cervical (Laudenbach, 1976, Schuckit, 1979).

La relación existente entre cáncer del tracto alimentario y alcohol ha sido bien establecida (Szipirglas, 1976, Lieber, 1980). El riesgo de que se instale un cáncer bucal en un sujeto cuando éste bebe pero no fuma es de 1.25; cuando fuma pero no toma es de 1.5; pero cuando es alcohólico y además fuma es 6 veces mayor que cuando este sujeto no toma ni fuma (Szipirglas, 1976). Esta relación sinergista alcohol-tabaco con respecto a la carcinogénesis de la orofaringe, laringe y esófago se basa, probablemente, en el incremento de la activación pulmonar de procarcinogénicos contenidos en el humo del tabaco por parte del alcohol, los cuales al ser activados por los microsomas adquieren características mutagénicas (Sato, et al, 1977, Wynder, et al, 1977, Tuyns, 1979).

Otras alteraciones orofaciales relacionadas con el etilismo son: rinofima, padecimiento caracterizado por una deformación cutánea de la nariz causada por hipertrofia de las glándulas sebáceas (Soubiran y Guilbert, 1976) y adenolipomatosis, que se caracteriza por la presencia de tumefacciones

lipomatosas difusas, diseminadas particularmente en la región cervical, que exclusivamente afecta a los hombres entre los treinta y cuarenta años de edad (Vaillant y Couly, 1976).

Los sujetos que presentan cualesquiera de estas alteraciones requieren de un tratamiento obviamente multidisciplinario. El tratamiento de las alteraciones orofaciales muchas veces requerirá de cirugía, por lo que debemos tener en mente que el alcohólico presenta alteraciones hemostáticas causadas por el daño hepático. De tal manera, que ante un paciente alcohólico que requiera un tratamiento de este tipo se recomienda que el cirujano maxilofacial se apoye en las siguientes -- pruebas de laboratorio de una manera rutinaria: número de plaquetas, tiempo de sangrado, tiempo de Quick, exploración del complejo protrombínico, medida de la tasa de fibrinógeno, estudios de fibrinolisis y la producción de degradación del fibrinógeno, como lo sugirieron Wautier y Caen, en 1976.

La lengua del alcohólico no esta exenta de presentar cambios tanto estructurales como funcionales. A nivel clínico puede presentar atrofia del dorso, color rojo y fisuras (Larato, 1972, Schuckit, 1979). A nivel fisiológico algunos experimentos realizados en gatos y ratas han demostrado que las fibras nerviosas linguales trigeminales presentan alteraciones en la conducción, secundaria a la aplicación local de alcohol. Sin embargo un dato interesante de mencionar es el hecho de que las fibras gustativas de la cuerda del tímpano respondieron de una manera menor que las trigeminales (Hellekant, 1965a, 1965b, 1965c).

La lengua es indudablemente una de las primeras estructuras en ponerse en contacto con el etanol, cuando éste es ingerido. Mistretta, en 1971, demostró que el etanol es una de las pocas sustancias químicas que puede penetrar el e-

pitelio lingual. A pesar de que el epitelio lingual presenta esta característica de permeabilidad, no existen fundamentos morfológicos ni fisiológicos para asegurar que el etanol provoca un impulso gustativo propio, que estuviera de alguna manera relacionado con la preferencia que presentan algunos sujetos por bebidas alcohólicas. Aún más, se ha reportado que los sujetos no son capaces de discriminar entre bebidas alcohólicas y no-alcohólicas (Connors, et al, 1978). A pesar de este hecho se ha reportado una disminución en la agudeza gustativa tanto en pacientes con alteraciones provocadas por alcoholismo crónico [síndrome de Wernicke-Korsakoff, cirrosis hepática alcohólica, hepatitis alcohólica] (Burch, et al, --- 1978, Jones, et al, 1978), como en pacientes alcohólicos crónicos (Smith, 1972, Swinson, 1973). En el caso de los pacientes con síndrome de Wernicke-Korsakoff se propone que la hipogeusia es causada por el daño talámico que presentan estos sujetos, mientras que en el caso de los pacientes con cirrosis hepática alcohólica, no se pudo explicar este fenómeno. Sin embargo en ninguno de los estudios citados se mencionan las características morfológicas que guardan las yemas gustativas linguales de estos sujetos.

Justificación y Objetivo:

En base a lo anteriormente expuesto, 1º) Considerando el alto índice de alcoholismo que existe en nuestro país; 2º) Alentados por la falta de datos acerca de la imagen morfológica de las yemas gustativas de sujetos alcohólicos; y 3º) Tratando de contribuir a aumentar el interés por el estudio de las lesiones orofaciales del alcohólico; hemos considerado importante el estudiar el aspecto que guardan los receptores gustativos linguales de ratas alcoholizadas crónicamente en forma experimental, para tratar de dilucidar si el aumento de umbral gustativo está asociado a alteraciones morfológicas en el receptor; ya que de la reunión de datos que aumenten el co

nocimiento de los efectos del alcohol sobre los diferentes órganos, podremos comprender mejor el fenómeno de alcoholismo y eventualmente llegar a establecer un adecuado tratamiento y - tratar de prevenir o en su defecto rehabilitar sus efectos no civos.

MATERIAL Y METODOS.

Para el presente estudio se examinaron muestras de la punta de la lengua provenientes de 17 ratas hembras de la cepa Wistar. Dichos animales fueron obtenidos a los 64 días de nacidos a través del bioterio de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. Se formaron dos grupos:

Grupo A: Grupo Experimental. Compuesto por 12 ratas. Estos animales fueron sometidos a un período de alcoholización, con una duración de 30 días. En este período la ingesta de líquidos con etanol a diferentes concentraciones se incremento gradualmente de la siguiente manera:

Día 1 al día 8: período de ambientación del bioterio.

Día 9 al 15: alcoholización al 2.5%.

Día 16 al 22: alcoholización al 5%.

Día 23 al 30: alcoholización al 7.5%.

Posterior a este período de alcoholización se les dió como única fuente de ingesta de líquidos etanol al 10% durante un período de 11 a 13 meses, la ingesta de etanol fue sin restricciones. Tales animales estuvieron sometidos a las condiciones estandar de bioterio; temperatura ambiente, con un ciclo luz-obscuridad 12-12 horas, y alimentadas con purina "chow" para laboratorio ad libitum.

Grupo B: Grupo Control. Formado por 5 ratas. A este grupo se les dió de beber agua corriente sin restricciones, alimentándose con purina "chow" para laboratorio y sometidas a las mismas condiciones de bioterio que el grupo experimental.

La cantidad de líquido ingerido se determinó diariamente en ambos grupos y los animales fueron pesados cada tercer día.

Después del tiempo previsto [11-13 meses], los animales de los dos grupos fueron sacrificados. Previa administración, por vía intraperitoneal, de pentobarbital sódico [Anestésico], en una dosis de 35 mg. por kg. de peso, los animales fueron perfundidos intraventricularmente con solución salinal al 0.9% y posteriormente con formol buffer. Después se procedió a realizar la autopsia del animal, extrayéndole la lengua en su totalidad y sumergiéndola inmediatamente en la misma solución fijadora [formol buffer]. Después de este período de postfijación [7 días como mínimo] se tomó una muestra de aproximadamente un centímetro de longitud de la punta de la lengua, que abarcó todo el espesor y anchura de la misma. Tal muestra se dividió en dos partes: una mitad se incluyó en parafina para ser cortada en un microtomo de deslizamiento y teñirse con las técnicas histológicas: tricrómica de Gallego y Bielschowsky (Luna, 1973). La otra mitad fué cortada en un microtomo de congelación, para ser teñida con la técnica de Nauta-Gygax (Nauta y Gygax, 1954) [Ver apéndice I].

Los dos tipos de muestras [parafina y congelación] se orientaron para ser cortadas en una forma paralela al eje longitudinal de las papilas fungiformes conservando la perpendicularidad de estas papilas con respecto a la superficie oral. Las muestras se cortaron con un espesor de 6 micras.

Análisis Morfológico:

El análisis morfológico de la citoarquitectura de las yemas gustativas linguales de la rata se efectuó bajo el microscopio de luz, tomándose en cuenta el criterio clásico de diferenciar a este nivel, dos tipos de células en el receptor gustativo: células sustentaculares [fusiformes, de núcleo redondo u ovoide, hipocrómico] y células gustativas las cuales son fusiformes, con una prolongación citoplásmica hacia la región del poro gustativo, dando lugar a microvellosidades. Es-

te tipo de células [gustativas] presentan un núcleo fusiforme e hipercromático (Ham, 1975, Provenza, 1964, Beidler y Samlman, 1965).

Las yemas gustativas examinadas con el microscopio de luz fueron seleccionadas de acuerdo al siguiente criterio: debían observarse íntegramente desde la región basal hasta la región del poro gustativo. En caso de no cumplir con este criterio, los receptores gustativos se excluyeron del análisis morfológico con el fin de evitar que la orientación del corte pudiera influir en la interpretación de los hallazgos.

Los parámetros que se estudiaron fueron los siguientes: forma e integridad de la yema gustativa; morfología de las células sustentaculares y gustativas; forma del núcleo de las mismas células; características morfológicas y presencia o ausencia de las prolongaciones citoplasmáticas en la región del poro gustativo; integridad y aspecto de las fibras nerviosas tanto perigemulares como intragemulares; aspecto del epitelio circundante al complejo neurosensorial y dimensión, forma y aspecto de la papila que contenía la yema estudiada.

Estas observaciones fueron realizadas en un fotomicroscopio Reichert y en un fotomicroscopio Zeiss, fotografiándose los campos más representativos en película ektachrome asa 64 para diapositivas en color, y en película para impresiones en blanco y negro tri x pan film asa 125.

El estudio cualitativo fué complementado con un análisis estadístico de las observaciones realizadas. Para tal fin en los dos grupos de animales se cuantificaron las veces de aparición de cualquier cambio en los parámetros morfológicos anteriormente mencionados para obtener, de tal manera, el porcentaje de yemas gustativas con algún cambio morfológico

y el porcentaje de aparición de cada uno de los parámetros. - Los datos así obtenidos fueron comparados estadísticamente -- por la prueba " x^2 " (Downie y Heath, 1973) [Ver apéndice II].

Análisis Cuantitativo:

En los dos grupos se realizaron conteos del número de yemas gustativas, así como del número de células sustentaculares y gustativas en cada una de las yemas gustativas. Estos - datos se obtuvieron a través de un contador manual de célu_-- las. De los datos así recopilados se obtuvieron las medias a_-- ritméticas de células gustativas por animal, de células sus_-- tentaculares por animal; media aritmética del número de célu_-- las gustativas por yema gustativa, células sustentaculares -- por yema gustativa; y media aritmética de yemas gustativas en cada animal. Se obtuvo la desviación estandar y el error es_-- tandar de cada uno de los datos evaluados, tanto en el grupo experimental como en el grupo control. Para el análisis esta_-- dístico de los resultados, se utilizó la prueba "t" de stu_-- dent (Downie y Heath, 1973) [Ver apéndice II].

El manejo de los animales, sacrificio de los mismos; - obtención y tinción de las muestras; y observación de lamini_-- llas, fue realizado en las instalaciones, con el equipo y con la colaboración de los integrantes del Laboratorio de Neuro_-- morfología [fundado y dirigido por el Dr. Jesús P. Machado-Sa_-- las] del Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, U.N. A.M. El análisis estadístico de los resultados cuantitativos - y cualitativos, fue realizado bajo la asesoría del Dr. José - Sosa Martínez, profesor de Postgrado, Facultad de Odontología y en colaboración con el Departamento de Cómputo de la Facul_-- tad de Medicina, U.N.A.M.

RESULTADOS.

Observaciones Morfológicas. Grupo Control:

En el grupo control las yemas gustativas se encontraron en su localización normal, dentro de las papilas fungiformes [porción cupular de la papila], ocupando la totalidad del espesor del epitelio [figura 1-A, 1-B, 1-D]. Nunca se identificaron en la porción columnar. El número de estructuras gustativas por papila generalmente fue de uno; ocasionalmente se identificaron dos receptores gustativos en la misma papila. - La forma de la estructura gemular fue también la habitual: en forma de barril con dos constricciones, una a nivel apical y otra a nivel basal, siendo la apical la más acentuada. Estas constricciones se unían por un perfil uniforme y convexo, como se demuestra en la figura 1-A, 1-B, 1-C, 1-D. La región -- del poro gustativo fué reconocida a nivel del estrato queratinizado del epitelio [figuras 1-B, 1-C].

Celularidad:

En este estudio, realizado a nivel de microscopía de luz, se identificaron dos tipos de células: sustentaculares y gustativas. Estos dos tipos de células intragemulares presentan una disposición perpendicular con respecto a la superficie oral.

En la figura 1-C se observa que las células sustentaculares son de forma redondeada u oval, con citoplasma claro. En su porción apical emiten una prolongación citoplásmica que se dirige, con una trayectoria uniforme, hacia la región del poro gustativo donde protruyen [figura 1-C]. La porción basal de la célula esta separada del tejido subyacente por medio de una membrana basal. Su núcleo es redondo u oval, hipocrómico, y se localiza generalmente a nivel del tercio basal de la yema. Estas células fueron más numerosas que las células senso-

riales y se ubicaron en el centro de la yema.

Las células gustativas ocuparon principalmente la región periférica de la yema. Este tipo celular es fusiforme -- con un citoplasma oscuro y un núcleo también fusiforme e hipercromático que se localiza a nivel del tercio medio de la yema. Al igual que las células sustentaculares, las sensoriales muestran una prolongación citoplasmática que converge sin distorsión hacia la región del poro gustativo, donde protruye [figura 1-C].

Inervación:

Se analizaron también las características morfológicas de la inervación de las yemas gustativas. Por la base de la papila fungiforme ingresan elementos neurovasculares [figuras 1-A, 1-B, 1-D, 6-A] que ocupan generalmente la totalidad del espesor del corion de la papila primaria, midiendo este paquete 24.52 ± 6.9 micras como promedio de diámetro transversal a nivel de la base de la papila primaria [figura 7-A]. Las fibras nerviosas durante su trayectoria hacia la región cupular de la papila fungiforme, proporciona pequeños ramos que se dirigen hacia las capas basales del epitelio. En la zona cercana a la base de la yema gustativa, el haz nervioso se abre para rodear al complejo neurosensorial penetrando en él -- algunas fibras [fibras nerviosas intragemulares], mientras -- que otras se distribuyen en su alrededor [fibras perigemulares] [figura 6-A]. Las técnicas de impregnación argéntica nos permitieron conocer que estas fibras nerviosas, tanto del tronco principal como las perigemulares e intragemulares, presentan una silueta regular y simétrica.

Epitelio Circundante:

El epitelio circundante de la yema gustativa mostró una disposición normal, con una estratificación celular deli-

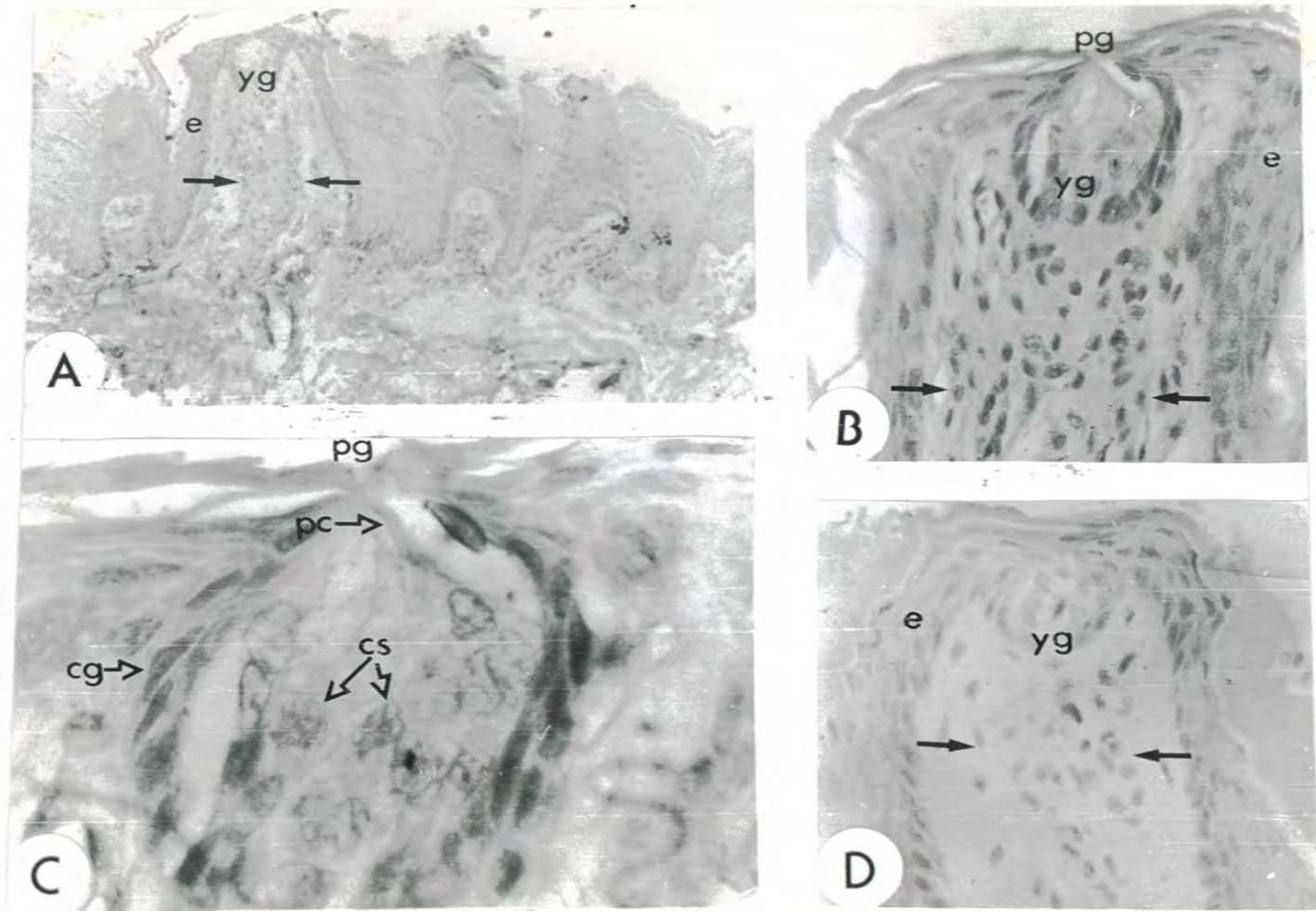


Figura 1.- Características morfológicas de las yemas gustativas del grupo control.
Para la explicación de la figura ver la siguiente hoja.

Figura 1.- Características morfológicas de las yemas gustativas del grupo control.

A)- Se observa que las yemas gustativas (yg) se encuentran localizadas en la porción cupular de la papila fungiforme. Las flechas limitan los elementos neurovasculares en la papila primaria. (e) epitelio.

Técnica de Gallego, $\times 100$.

B)- Se muestra una yema gustativa (yg) con su forma de barril clásica. El poro gustativo (pg) se ubica a nivel del estrato queratinizado del epitelio (e).- Las flechas limitan los elementos neurovasculares de la papila primaria.

Técnica de Gallego, $\times 400$.

C)- Un acercamiento de la yema gustativa de la figura B, donde se puede identificar a las células sustentaculares (cs); células gustativas (cg). Obsérvese que las prolongaciones citoplásmicas (pc) de las células gemulares no presentan distorsiones. La región del poro gustativo (pg) se puede observar claramente.

Técnica de Gallego, $\times 1000$.

D)- Esta figura ejemplifica que las yemas gustativas (yg) de este grupo control se ubicaron en la porción cupular de la papila. (e) indica el epitelio que muestra una buena estratificación. Las flechas limitan los elementos neurovasculares de la papila primaria.

Técnica de Gallego, $\times 400$.

mitada. El estrato queratinizado de este epitelio no presentó signos de hiperqueratosis. Estas imágenes estuvieron presentes en el total de las muestras.

Estas características de normalidad en la citoarquitectura e inervación de las yemas gustativas, estuvieron presentes en el 93% de las yemas observadas; el resto presentó algunas variantes morfológicas de estas imágenes [figura 2].

Grupo Experimental:

La ubicación de las yemas gustativas del grupo experimental dentro de la papila fungiforme fué similar a la del grupo control [porción cupular de la papila], tal y como se observa en las figuras 3-A, 3-B, 3-C. Pero a diferencia del grupo control, un alto porcentaje [74.8%] de estos receptores gustativos provenientes de ratas alcoholizadas, mostraron cambios morfológicos. La silueta de la yema gustativa [en forma de barril] en la mayoría de los casos [89.77%] estuvo conservada, sin embargo ocasionalmente se identificaron alteraciones de este perfil, apreciándose yemas gustativas con constricciones a nivel del tercio medio [figura 3-D] y en otras ocasiones la distorsión hizo perder la convexidad apareciendo entonces yemas gustativas en forma piramidal [figura 3-E].

Celularidad:

La celularidad también mostró cambios en las lenguas de ratas etanolizadas. En el 71.65% de las yemas gustativas del grupo experimental se observó una pérdida del ordenamiento citoarquitectónico intragemular, caracterizado por una imagen en donde se observan células sustentaculares y gustativas a cualesquier nivel de la yema, y con los núcleos en ubicación variada a nivel intracelular [figura 4-A].

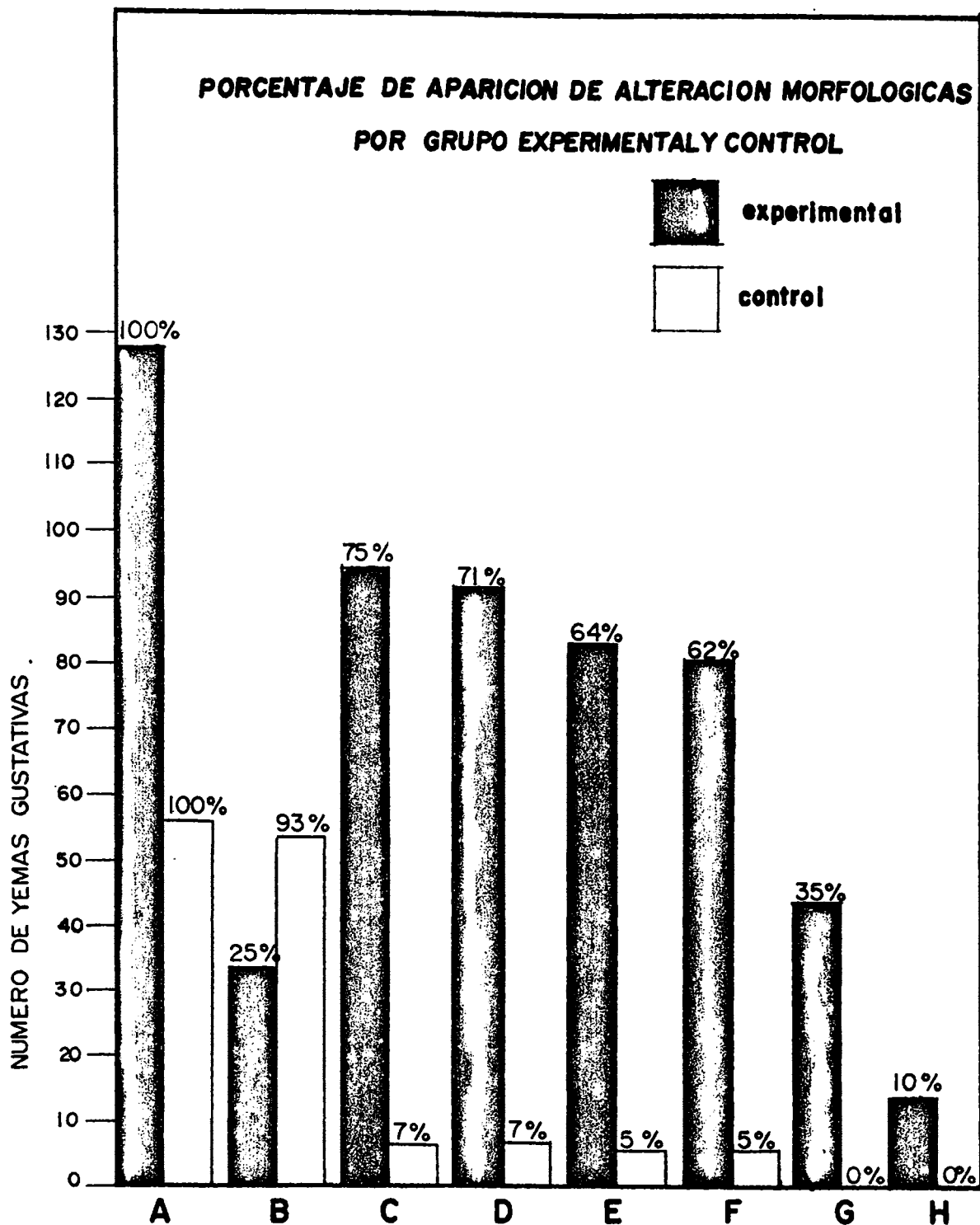


Figura 2.- Cuantificación de cambios morfológicos en yemas gustativas de grupo control y experimental.

A= Totales. B= Yemas gustativas normales. C= Yemas anormales.
D= Con desorden intragemular. E= Con núcleos alterados. F= --

Continuación de la figura 2.

Con microvellosidades alteradas. G= Con axones alterados. H= -
Con forma alterada.

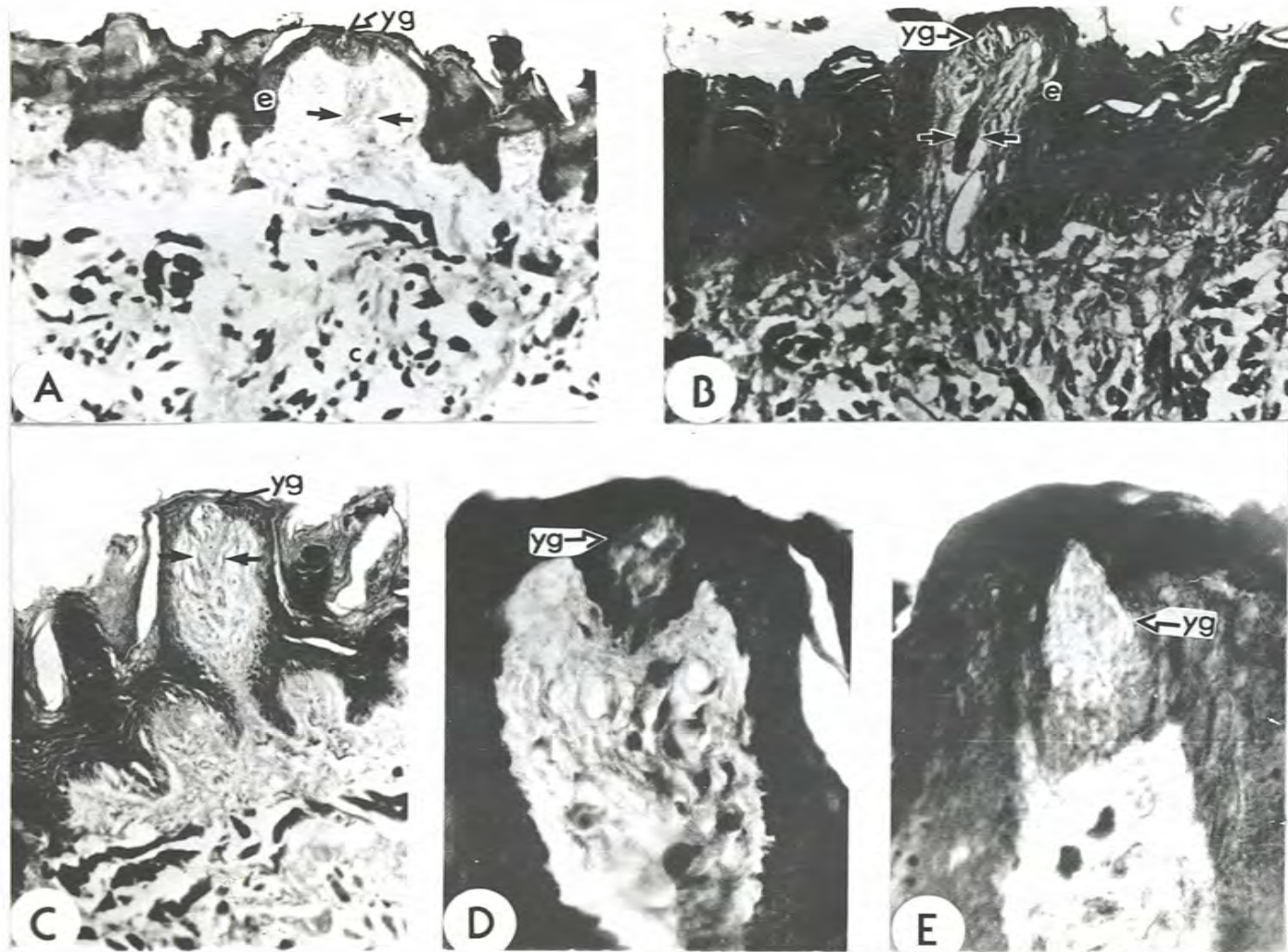


Figura 3.- Características morfológicas de las yemas gustativas del grupo experimental. Para la explicación de la figura ver la siguiente hoja.

Figura 3.- Características morfológicas de las yemas gustativas del grupo experimental.

- A)- Esta micrografía muestra que las yemas gustativas (yg) de este grupo también se localizan a nivel de la porción cupular de la papila. Las flechas señalan los componentes neurovasculares de la papila primaria. (e) epitelio.
Técnica de Nauta-Gygax, x100.
- B)- La yema gustativa (yg) de este caso también se ubicó en la región cupular de la papila. Obsérvese -- que los elementos neurovasculares (limitados por flechas) presentan una disposición compacta. (e) epitelio.
Técnica de Bielschowsky, x100.
- C)- (yg) yema gustativa en la porción cupular de la papila. Las flechas limitan los elementos neurovasculares de la papila primaria.
Técnica de Bielschowsky, x100.
- D)- Esta figura ejemplifica una yema gustativa (yg) -- del grupo experimental con alteración en su forma. Nótese que ha perdido su perfil uniforme.
Técnica de Nauta-Gygax, x400.
- E)- Otro ejemplo de pérdida de la forma normal del receptor gustativo del grupo experimental. (yg) señala una yema gustativa que perdió sus convexidades normales. Se observa una yema gustativa en forma piramidal.
Técnica de Nauta-Gygax, x640.

Los núcleos de las células sustentaculares muestran un aumento de volúmen variable, perdiendo su posición basal intracelular algunas veces, y ubicándose entonces en diversos niveles de la yema gustativa [figuras 4-B, 4-E]. Su prolongación citoplásmica presenta sinuosidades durante su trayectoria hacia la región del poro gustativo. En numerosas ocasiones se observó que estas prolongaciones no alcanzaron el poro gustativo [figura 4-C]. En general, la célula sustentacular perdió su disposición central en la yema.

Las células sensoriales mostraron un núcleo hipercromático con inclusiones picnóticas [figura 4-E]. Estos núcleos normalmente fusiformes, mostraron una silueta alterada, presentando un contorno no uniforme, como los mostrados en las figuras 4-C, 4-D, 4-E. Los núcleos de las células sensoriales se ubicaron en diversas posiciones dentro de la yema. Su prolongación citoplasmática muestra distorsiones en su trayectoria hacia la región apical del receptor gustativo. Como se observó en las células de sostén, en varias ocasiones estas microvellosidades no protruyeron en el poro gustativo [figura 4-D].

Inervación:

El aspecto morfológico de las fibras nerviosas del grupo experimental presenta de igual manera cambios. El paquete neurovascular que ingresa en el tejido de la base de la papila está también alterado en el grupo experimental. La mayoría de las veces, ya no ocupa la totalidad de ésta. Los elementos constituyentes de este paquete muestran una disposición compacta, dando una imagen de pérdida de volúmen del mismo, como se observa en las figuras 6-B y 6-C. Esta imagen morfológica es corroborada por las mediciones hechas a nivel basal de la papila, del diámetro transversal de los elementos neurovasculares. El promedio en este grupo fue 20.48 [\pm 6.9] -

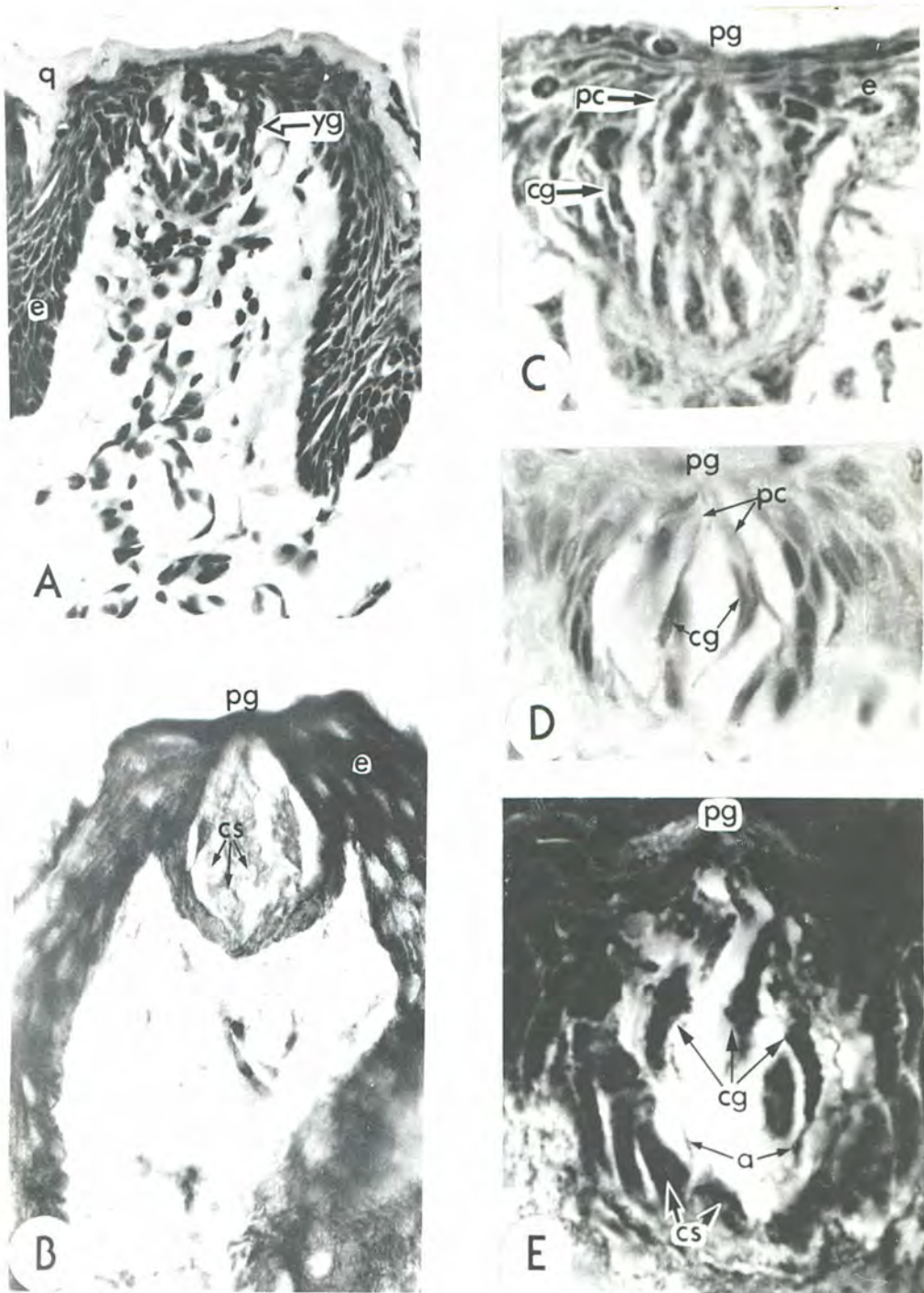


Figura 4.- Características morfológicas de las yemas gustativas del grupo experimental. Para la explicación de la figura ver la siguiente hoja.

Figura 4.- Características morfológicas de las yemas gustativas del grupo experimental.

- A)- Esta figura muestra una yema gustativa (yg) que ha perdido su ordenamiento citoarquitectónico intragular. (e) epitelio. (q) queratina.
Técnica de Gallego, x400.
- B)- Esta imagen sirve para ilustrar que los núcleos de las células sustentaculares (cs) de este grupo etanolizado presentan un aumento de volumen. (pg) poro gustativo, (e) epitelio.
Técnica de Nauta-Gygax, x640.
- C)- Yema gustativa del grupo experimental a mayor aumento en donde se puede observar que los núcleos de las células gustativas (cg) presentan un perfil alterado e inclusiones picnóticas. pc señala una prolongación citoplásmica que muestra una trayectoria sinuosa hacia la región del poro gustativo --- (pg). (e) epitelio.
Técnica de Bielschowsky, x1000.
- D)- Micrografía que muestra una yema gustativa del grupo experimental en donde se puede identificar prolongaciones citoplásmicas (pc) sinuosas. cg señala núcleos de células gustativas picnóticos. (pg) poro gustativo.
Técnica de Gallego, x1000.
- E)- En esta yema gustativa del grupo experimental podemos observar cambios nucleares en las células gustativas (cg), estos núcleos se observan picnóticos y han perdido su perfil uniforme. Los núcleos de las células de sostén (cs) están aumentados de vo-

Continuación de la figura 4-E.

lúmen, (a) señala axones intragemulares con dilataciones. (pg) región del poro gustativo.
Técnica de Bielschowsky, x1000.

micras, sensiblemente menor al grupo control. Esta diferencia de diámetros fue estadísticamente significativa [cuadro I]. A pesar de que la tendencia general en este grupo fué de una -- disminución en el diámetro transversal [figura 7-B], se pudieron identificar de igual manera estructuras con un diámetro - mayor que la mayoría de ellos. En general no hubo una medida-prevalente en este grupo, por el contrario se observó una --- gran disparidad en las mediciones [rango 5-40 micras].

En algunas muestras fue posible identificar signos - de degeneración axónica, tanto en las fibras nerviosas de la papila primaria como en las fibras perigemulares. Estas fi-- bras presentaron dilataciones y constricciones de tamaño y localización variable, señaladas en las figuras 5-A, 5-C. De igual manera las figuras 5-B, 5-C muestran fibras nerviosas intragemulares con alteraciones morfológicas, identificándose - constricciones y dilataciones en su trayectoria.

Epitelio Circundante:

Con respecto al epitelio circundante perigemular, se observaron diferentes grados de atrofia de éste en 9 de los - 12 animales alcoholizados [75%]. La imágen más común fué la - disminución del espesor total del epitelio [figuras 3-A, 3-B, 4-B, 4-C]. En un caso se identificaron alteraciones epiteliales más acentuadas y en este caso se observó pérdida de la estratificación, edema intracelular y desorden de la capa basal [figura 4-D]. Aunque en este caso en particular se identificaron figuras mitóticas, éstas en ninguna instancia fueron anormales.

Análisis Estadístico de los Resultados Morfológicos:

Los cambios morfológicos anteriormente descritos, -- tanto del grupo control como del experimental, se cuantificaron

CUADRO I.

COMPARACION DEL DIAMETRO TRANSVERSAL DEL PAQUETE NEUROVASCULAR.
ALCOHOLIZADAS vs. CONTROLES.

GRUPO.	TOTAL DE MEDICIONES.	\bar{x} DEL DIAMETRO EN MICRAS.	RANGO.	E.E. \bar{x}
CONTROL. n=5.	55	24.52 [d.e. \pm 6.985]	10-40	0.94
EXPERIMENTAL. n= 12.	134	20.48 [d.e. \pm 6.945]	5-40	0.59

$p < 0.5$

n= NUMERO DE ANIMALES. \bar{x} = PROMEDIO. d.e.= DESVIACION ESTANDAR. E.E. \bar{x} = ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO.

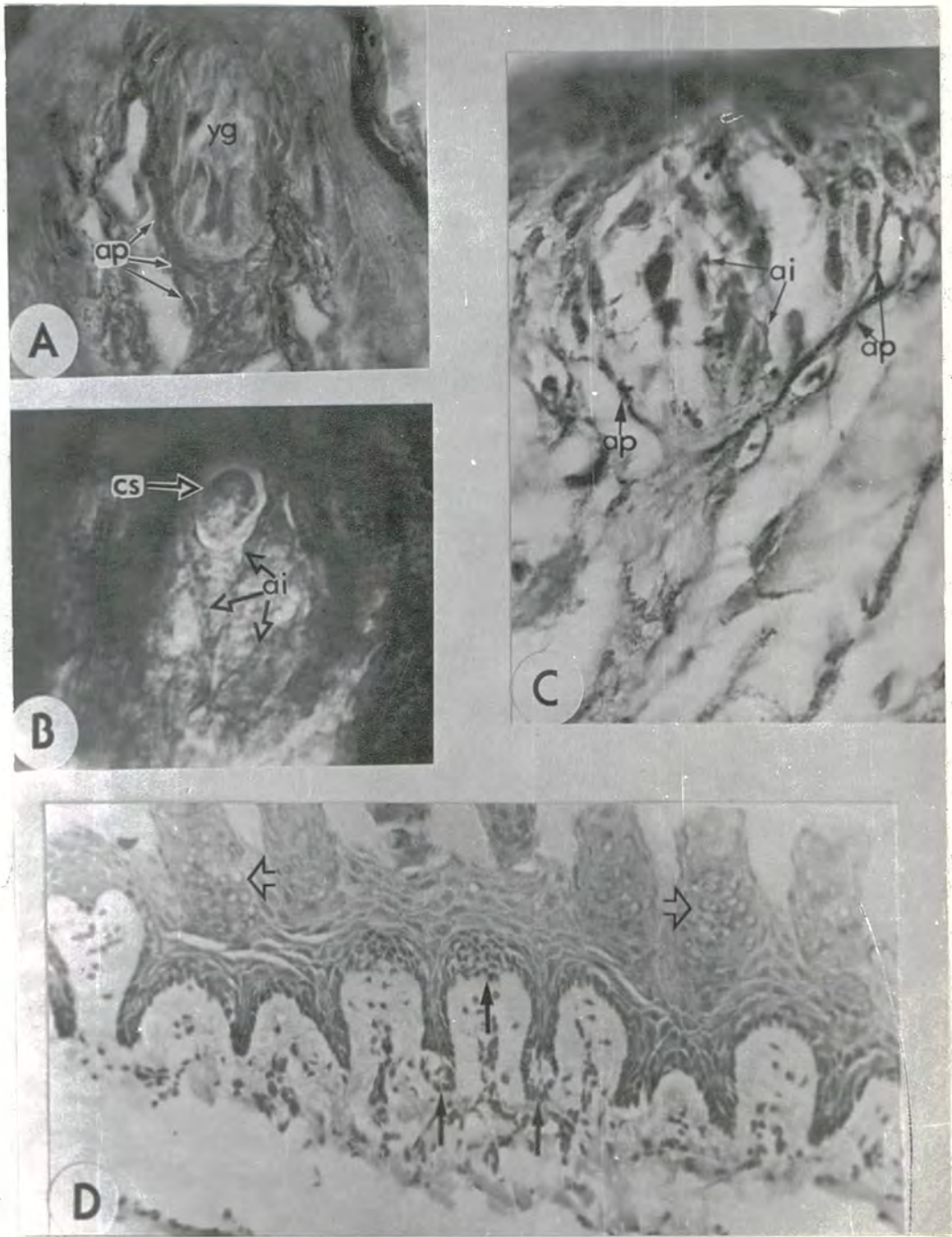


Figura 5.- Cambios morfológicos de la inervación de las yemas gustativas y del epitelio circundante del grupo experimental. Para la explicación de la figura ver la siguiente hoja.

Figura 5.- Características morfológicas de la innervación de las yemas gustativas y del epitelio circundante -- del grupo experimental.

- A)- ap señala axones perigemulares con trayectoria sinuosa y dilataciones. (yg) yema gustativa. Técnica de Nauta-Gygax, x400.
- B)- Otro ejemplo de alteraciones en la innervación de las yemas gustativas del grupo experimental. ai se señala axones intragemulares que presentan dilataciones, mientras que rodean a un núcleo de célula sustentacular (cs) que presenta un gran aumento de volumen y ha perdido su posición basal intragemular. Técnica de Nauta-Gygax, x1000.
- C)- Esta micrografía sirve para ejemplificar que tanto los axones perigemulares (ap) como intragemulares (ai) muestran alteraciones. Obsérvese que las puntas de las flechas señalan dilataciones que presentan estas fibras nerviosas. Técnica de Bielschowsky, x1000.
- D)- Muestra de epitelio de una lengua proveniente del grupo experimental, donde las flechas oscuras indican zonas con pérdida de la cohesividad y desorden del estrato basal. Las flechas claras señalan zonas en donde se observa edema intracelular del estrato espinoso. Técnica de Gallego, x100.

ron y analizaron estadísticamente. Los resultados obtenidos - del conteo se muestran en la figura 2, donde se observa que - en el grupo experimental la alteración morfológica de mayor - frecuencia es la pérdida del orden celular [71.65%]. En orden decreciente, en este mismo grupo alcoholizado encontramos que los cambios nucleares ocupan el segundo lugar en incidencia - [63.77%], seguidos de modificaciones en las trayectorias de - las prolongaciones citoplásmicas encontradas en el 62.20% de - las yemas gustativas del grupo experimental. Las alteraciones en la inervación de las yemas gustativas se observaron en el - 35.43% del total de yemas analizadas, sin embargo este número no representa el total de las laminillas, ya que por las ca - racterísticas de las fibras nerviosas sólo es posible obser - varlas en tinciones argénticas. El porcentaje de aparición de las variantes morfológicas del grupo control también se mues - tran en la figura 2.

Se compararon las diferencias existentes entre los -- porcentajes del grupo control y del grupo experimental, para - cada uno de los parámetros morfológicos establecidos por me - dio de pruebas de significancia estadística [x^2], encontrándo se los siguientes resultados:

1) En el grupo experimental de las 127 yemas gustati - vas analizadas, 95 mostraron alteraciones morfológicas [74.8%] mientras que en el grupo control de las 55 observadas, única - mente 4 mostraron variaciones morfológicas [7%]. El resultado estadístico mostró diferencias significativas [$p < 0.0001$] [ta - bla I].

2) En el caso de las variaciones en la forma, el 10.2% de las yemas gustativas de los animales etanolizados mostra - ron alguna variante, en cambio ninguna [0%] de las yemas gus - tativas del grupo control mostró cambios. Siendo estadísticas

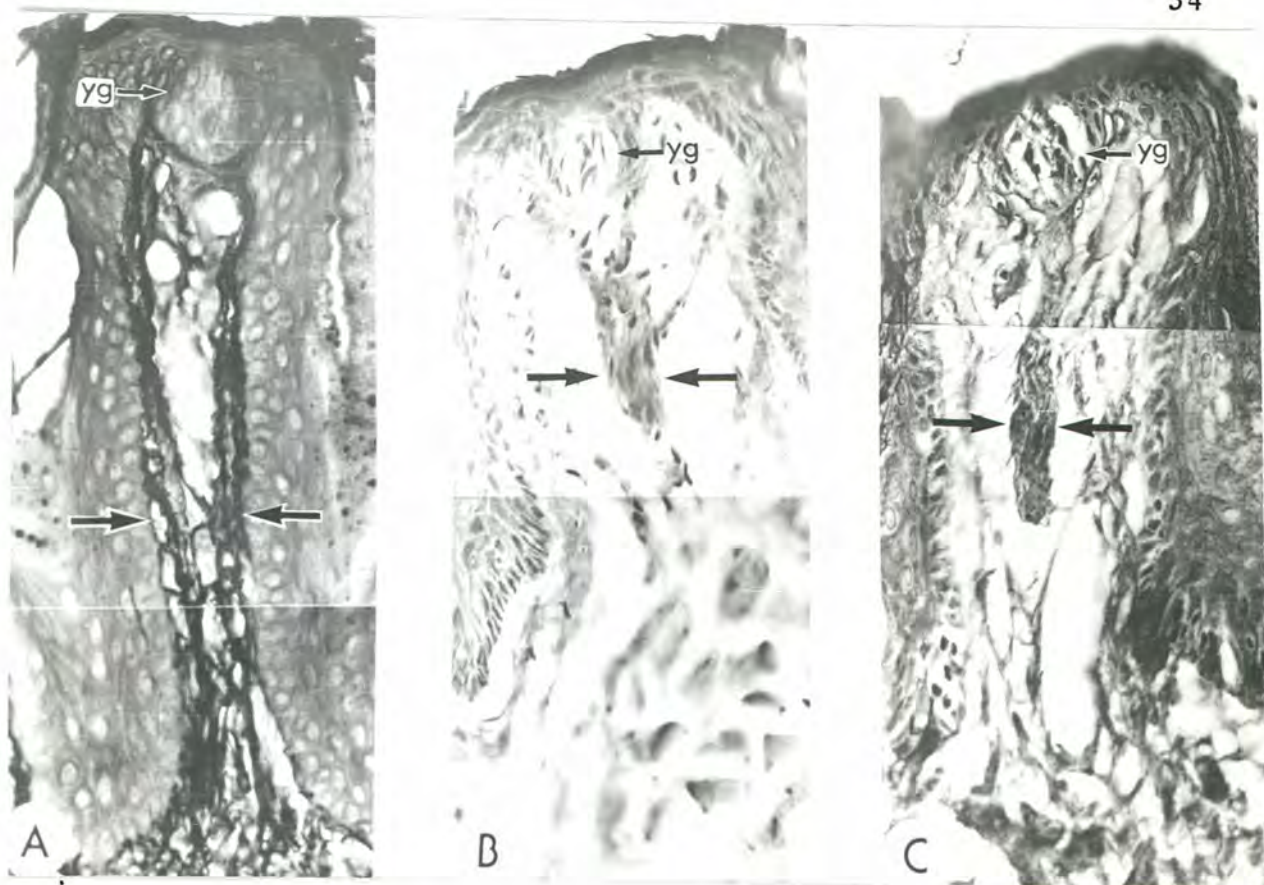


Figura 6.- Comparación de imágenes morfológicas de papilas -- fungiformes y yemas gustativas del grupo control y experimental.

A)- Imagen de una papila fungiforme del grupo control. Se puede observar que los elementos neurovasculares de la papila primaria [limitada por las flechas] ocupan casi la totalidad del corion de la papila, siguiendo una trayectoria hacia la porción cupular de la papila, para alcanzar la yema gustativa (yg) que se observa normal en forma y citoarquitectura.

Técnica de Nauta-Gygax, x400 .

B)- Obsérvese que en esta micrografía de una papila -- fungiforme del grupo experimental, los elementos neurovasculares (limitados por las flechas) ofrecen una imagen compacta. La yema gustativa (yg) --

Continuación de la figura 6-B.

presenta desorden de sus elementos celulares.
Técnica de Gallego, x400.

- C)- Papila fungiforme del grupo experimental. Se puede observar que los elementos neurovasculares (limitados por flechas) de la papila están disminuidos en su diámetro, además de presentar una trayectoria - sinuosa hacia la región cupular. La capa basal del epitelio de la papila se muestra desorganizado. La yema gustativa (yg) de esta papila del grupo experimental presenta una pérdida total del orden citoarquitectónico intragemular. Sí se compara esta figura del grupo alcoholizado, con la figura A) proveniente del grupo control se hacen evidentes los cambios morfológicos presentes en las papilas fungiformes del grupo experimental.
Técnica de Bielschowsky, x400.

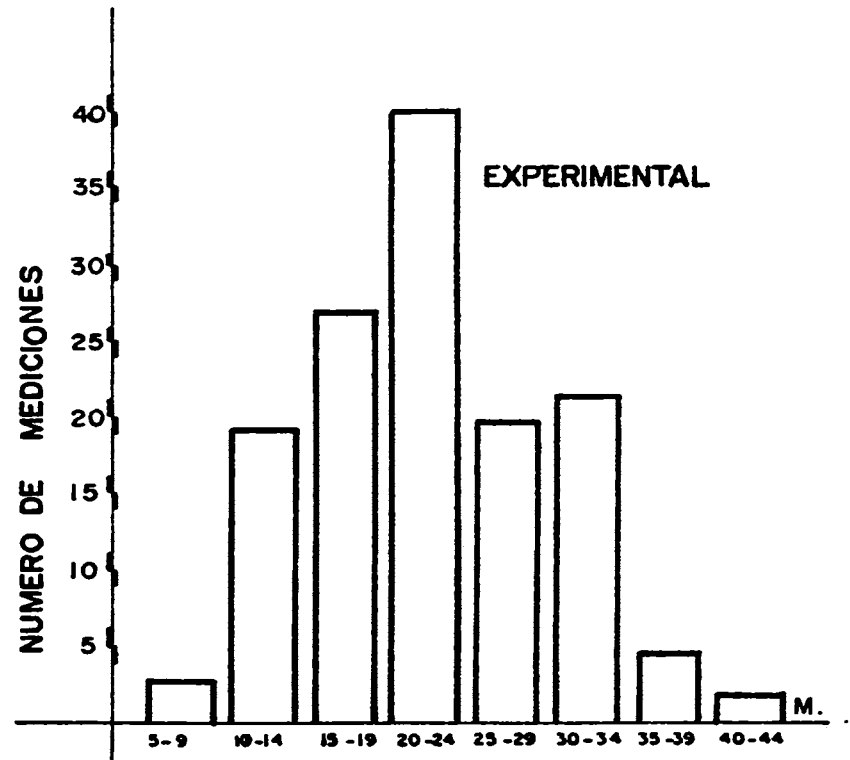
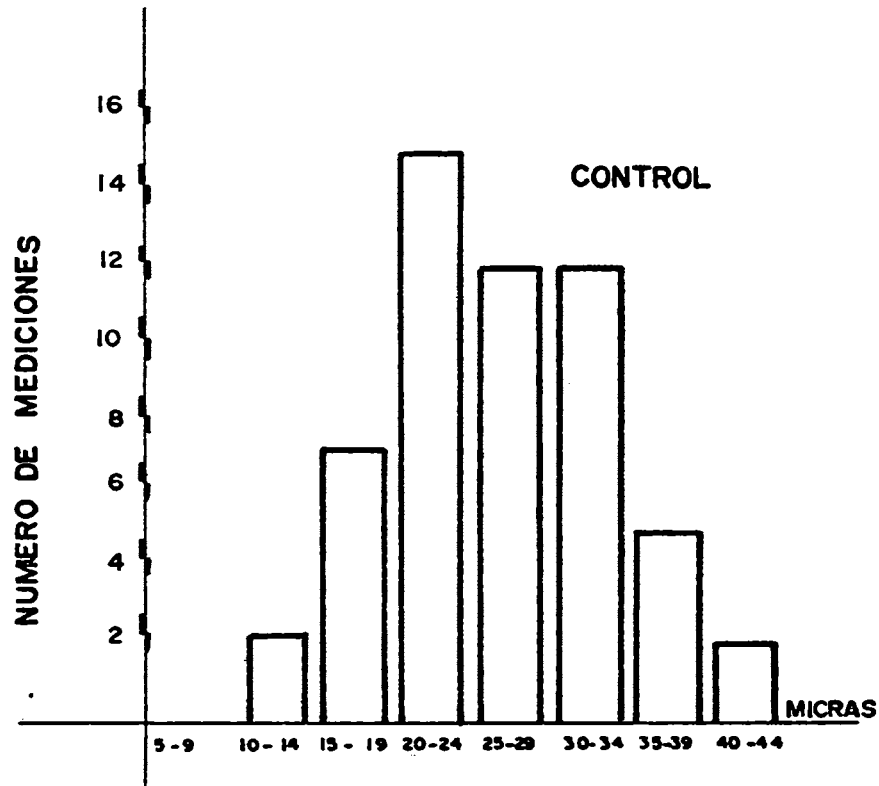


Figura 7.- Comparación de los componentes neurovasculares [diámetro transversal].
Por grupo experimental y control.

Se demuestra que en el grupo control la mayoría de los diámetros midieron entre 20-34 micras. En cambio el grupo experimental muestra una tendencia de disminución de este diámetro, la mayoría de los diámetros midieron entre 10-24 micras.

mente significativa la diferencia entre estos dos porcentajes [$p < 0.01$] [tabla II.]

3) El porcentaje de yemas gustativas con alteraciones en las prolongaciones citoplasmáticas es de 62.20% en el grupo experimental. En el grupo control, únicamente tres yemas [5.45%] presentaron modificaciones. El análisis estadístico también fue significativo: $p < 0.001$ [tabla III].

4) En la tabla IV se muestran las diferencias existentes entre los dos grupos en el parámetro de alteraciones en las fibras nerviosas. En el grupo alcoholizado, del total de yemas cuantificadas el 35.43% mostró cambios en este rubro. Por otra parte, nunca se identificaron cambios en los axones del grupo control. De tal manera el resultado estadístico fue de $p < 0.001$.

5) Con respecto a los cambios nucleares el porcentaje de incidencia en el grupo experimental fué de 63.77%, y en el grupo control de 5.45%. Con una significancia estadística de $p < 0.001$ [tabla V].

6) La pérdida del orden celular [tabla VI] se identificó en 91 de las 127 yemas gustativas del grupo experimental [71.65%] y en 4 de las 55 del grupo control [7%] [$p < 0.001$].

Observaciones Cuantitativas:

Las cuantificaciones realizadas en el grupo control y en el experimental, tanto de yemas gustativas como de células intragemulares [sustentaculares y gustativas], arrojaron los siguientes resultados:

Yemas gustativas: El número de yemas gustativas cuantificadas en el grupo experimental fué de 154, con un prome_

TABLA I.

YEMAS GUSTATIVAS CON ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN EL GRUPO
EXPERIMENTAL Y CONTROL.

GRUPO.	NORMALES.	CON ALTERACIONES MORFOLOGICAS.	TOTALES
EXPERI- MENTAL.	32	95	127
CONTROL.	51	4	55
TOTALES.	83	99	182

GRADOS DE LIBERTAD: 1.

$x^2 = 60$ $p < 0.001$.

TABLA II.

YEMAS GUSTATIVAS CON FORMA ALTERADA EN EL GRUPO EXPERIMENTAL Y CONTROL.

GRUPO.	NORMALES.	CON FORMA ALTERADA.	TOTALES.
EXPERIMENTAL.	114	13	127
CONTROL.	55	0	55
TOTALES.	169	13	182

GRADOS DE LIBERTAD: 1.

$$x^2 = 6.089 \quad p < 0.01.$$

TABLA III.

YEMAS GUSTATIVAS CON MICROVELLOSIDADES ALTERADAS EN EL GRUPO EXPERIMENTAL Y CONTROL.

GRUPO.	NORMALES.	CON MICROVELLOSIDADES ALTERADAS.	TOTALES.
EXPERIMENTAL.	48	79	127
CONTROL.	52	3	55
TOTALES.	100	82	182

GRADOS DE LIBERTAD: 1

$\chi^2 = 50.01$ $p < 0.001$

TABLA IV.

YEMAS GUSTATIVAS CON AXONES ALTERADOS EN EL GRUPO EXPERI -
 MENTAL Y CONTROL

GRUPO.	NORMALES.	CON AXONES ALTERADOS.	TOTALES.
EXPERI - MENTAL.	82	45	127
CONTROL.	55	0	55
TOTALES.	137	45	182

GRADOS DE LIBERTAD: 1

$\chi^2 = 25.94$ $p < 0.001$

TABLA V.

YEMAS GUSTATIVAS CON NUCLEOS ALTERADOS EN EL GRUPO EXPERI-
MENTAL Y CONTROL.

GRUPO.	NORMALES.	CON NUCLEOS ALTERADOS.	TOTALES.
EXPERI- MENTAL.	46	81	127
CONTROL.	52	3	55
TOTALES.	98	84	182

GRADOS DE LIBERTAD: 1

$\chi^2 = 52.55$ $p < 0.001$

TABLA VI.

YEMAS GUSTATIVAS CON DESORDEN INTRAGEMULAR EN EL GRUPO EXPERIMENTAL Y CONTROL.

GRUPO.	NORMALES.	CON DESORDEN INTRAGEMULAR.	TOTALES.
EXPERIMENTAL.	36	91	127
CONTROL.	51	4	55
TOTALES.	87	95	182

GRADOS DE LIBERTAD: 1

$\chi^2 = 56.95$ $p < 0.001$

dio de 12.8 ± 10.615 yemas gustativas por fragmento, considerando que el promedio de cortes realizados en dichos fragmentos fué de 75. En tanto que en el grupo control se identificaron 79. El promedio de este grupo control fué 15.8 ± 8.927 , existiendo una diferencia mínima entre los dos promedios, la cual cuando es analizada con pruebas de estadística se demuestra que no es significativa [$p > 0.5$] [cuadro II].

Células gustativas: Se cuantificaron 592 células gustativas en el grupo experimental, de tal manera que el promedio de células gustativas en cada receptor del grupo experimental es de 3.844 ± 2.244 . En el grupo control se identificaron 302 células de este tipo, dando un promedio de 3.882 ± 1.189 , por lo que se observa en el cuadro III no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellas [$p > 0.5$].

Células sustentaculares: [Cuadro IV] El promedio de células sustentaculares en yemas gustativas del grupo experimental es de 5.064, con una desviación estandar de ± 3.056 , mientras que el promedio del grupo control es de 5.886 con una desviación estandar de ± 2.511 . El resultado de la comparación estadística fue de $p > 0.1$. Lo que quiere decir que la diferencia entre los dos promedios no es estadísticamente significativa.

CUADRO II

COMPARACION DEL NUMERO DE YEMAS GUSTATIVAS EN CADA GRUPO
ALCOHOLIZADAS vs. CONTROLES.

GRUPO.	TOTAL DE YEMAS GUSTATIVAS.	\bar{x} DE YEMAS GUSTATIVAS.	RANGO.	E.E. \bar{x} .
EXPERI- MENTAL. n= 12	154	12.8 [d.e. ⁺ 10.6]	2-39	3.064
CONTROL. n= 5	79	15.8 [d.e. ⁺ 8.9]	3-26	3.992

$p > 0.5$

n= NUMERO DE ANIMALES. \bar{x} = PROMEDIO. d.e.= DESVIACION ESTAN-
DAR. E.E. \bar{x} = ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO.

CUADRO III.

COMPARACION DEL PROMEDIO DE CELULAS GUSTATIVAS EN YEMAS GUSTATIVAS. ALCOHOLIZADAS VS. CONTROLES.

GRUPO.	TOTAL DE CELULAS GUSTATIVAS.	\bar{x} CELULAS GUSTATIVAS.	RANGO	E.E. \bar{x} .
EXPERIMENTAL. n= 154.	592	3.84 [d.e. \pm 2.2]	0-9	0.179
CONTROL. n= 79	302	3.88 [d.e. \pm 1.1]	1-10	0.204

$p > 0.5$

n= NUMERO DE YEMAS GUSTATIVAS PARA ESTA CUANTIFICACION. \bar{x} = PROMEDIO. d.e.= DESVIACION ESTANDAR. E.E. \bar{x} .= ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO.

CUADRO IV.

COMPARACION DEL PROMEDIO DE CELULAS DE SOSTEN EN YEMAS GUSTATIVAS.
ALCOHOLIZADAS vs. CONTROLES.

GRUPO	TOTAL CELULAS SUSTENTACULARES.	\bar{x} CELULAS SUSTENTACULARES.	RANGO	E.E. \bar{x} .
EXPERI- MENTAL. n= 154	780	5.064 [d.e. \pm 3.0]	0-18	0.246
CONTROL. n= 79	465	5.886 [d.e. \pm 2.5]	1-11	0.282

$p > 0.5$

n= NUMERO DE YEMAS GUSTATIVAS TOMADAS PARA ESTA CUANTIFICACION. \bar{x} = PROMEDIO. d.e.= DESVIACION ESTANDAR. E.E. \bar{x} = ERROR ESTANDAR DEL PROMEDIO.

DISCUSION...

En este estudio se identificaron cambios morfológicos en las yemas gustativas de las papilas fungiformes de la lengua de la rata, experimental y crónicamente etanolizada. Los principales cambios observados fueron: pérdida del ordenamiento celular intragemular, cambios nucleares [aumento de volumen de los núcleos de las células sustentaculares, pérdida de la silueta de los núcleos de las células gustativas con inclusiones picnóticas], dilataciones y constricciones de los axones perigemulares e intragemulares, disminución del diámetro transversal de los elementos neurovasculares de la papila, y atrofia del epitelio circundante del complejo neurosensorial.

Las yemas gustativas son estructuras neuroepiteliales ampliamente distribuidas dentro de la mucosa de la cavidad oral. Estos receptores se han identificado en las papilas linguales [fungiformes, foliadas, valladas], paladar duro y blando, pilares del istmo de las fauces, carúncula sublingual y zona retromolar (Provenza, 1964, Ham, 1975, Padykula, 1975, - González, 1979, Iida, et al, 1983). En este trabajo nosotros estudiamos la morfología de las yemas gustativas de las papilas fungiformes de la punta de la lengua de la rata, encontrándolas ubicadas en esta papila en particular, en la porción cupular de ella, no importando el grupo [experimental o control]. Este dato concuerda con la localización previamente reportada por Provenza (1964), Ham (1975), Padykula (1975), - Arvidson (1979).

El número de yemas gustativas en este tipo de animales de experimentación [ratas] no ha sido reportado, no teniendo punto de referencia para comparar nuestros resultados con otros autores. Sin embargo si se ha reportado en humanos quienes presentan un promedio de 1.8 yemas gustativas por pa-

pila fungiforme, variando el número de yemas por papila de 1-15 (Arvidson, 1979, Arvidson y Friberg, 1980). En primates -- del viejo mundo [mono cynomalgus]: se encontró un número mayor de yemas por papila en este tipo de mamíferos: promedio de -- 7.2 yemas (Arvidson, et al, 1981). En nuestro estudio nunca - se encontraron más de dos yemas en una sola papila.

El presente reporte fue realizado a nivel de microscopía de luz, donde se identificaron como componentes de la yema gustativa dos tipos de células: sustentaculares y gustativas; tal y como hacen Provenza (1964), Reidler y Smallman (1965), Ham (1975) y Padykula (1975). Sin embargo a nivel ultraestructural Takeda y Hoshino (1975), describen tres tipos de células gemulares: tipo I, células oscuras, caracterizadas por ser fusiformes, con un núcleo hipercromático y por la presencia de gránulos redondos densos; tipo II, célula clara que contiene numerosas vesículas, retículo endoplásmico liso, así como un núcleo ovoide; y tipo III de núcleo de forma intermedia, conteniendo en su citoplasma basal vesículas de núcleo denso y masas de vesículas claras, presentando en esta zona contactos con fibras nerviosas muy semejantes a sinapsis. Estos autores concluyeron que las células oscuras y las células claras son secretoras, y las células intermedias son sensoriales debido a la presencia de sinapsis. Como se puede observar estas imágenes no concuerdan con las reportadas aquí, ya que nosotros consideramos a la célula clara como de sostén y las oscuras como sensoriales. Sin embargo hay que recordar que a pesar de que la morfología de las yemas gustativas y su celularidad han sido ampliamente estudiadas (Murray y Murray, 1960, Murray y Murray, 1967, Sangiacomo, 1970, Storch y Welsch, 1970, Paran, 1975, Takeda, 1976, Arvidson, et al, 1981) no existe un consenso general respecto a los diferentes tipos celulares de la yema y su función dentro de ella. Este problema se hace más complejo a partir del reporte realizado

por Beidler y Smallman en 1965, quienes demuestran que los diferentes tipos celulares de la yema gustativa corresponden a una misma célula en diferentes estadios de vida, que dependiendo de la inducción nerviosa experimentan una morfodiferenciación. Los estudios previamente mencionados fueron realizados en diferentes especies y tal vez a ello se deban las diferencias existentes en celularidad.

En nuestro estudio a pesar de que se observaron células muy alteradas, nunca estas modificaciones morfológicas fueron tan marcadas como para impedir su ubicación dentro de los dos tipos celulares mencionados con anterioridad. De esta manera se pudieron cuantificar las células de los dos grupos de animales y comparar sus diferencias cuantitativas por medio del análisis estadístico presentado. Estos resultados cuantitativos no mostraron diferencias estadísticamente significativas [$p < 0.5$] entre el promedio de yemas gustativas del grupo experimental y del grupo control; como tampoco hubo diferencias entre los dos grupos cuando se compararon los promedios por yema gustativa de células sensoriales y de sostén. Uno de los factores que provoca disminución del número de yemas gustativas es el envejecimiento, esto en humanos y ratas (Arey, et al, 1935, Mochizuki, 1937, Conger y Wells, 1969). La edad de nuestros animales al momento del sacrificio fué de 14 a 17 meses, que representa una edad adulta en las ratas. Por lo tanto la edad de las ratas no influyó en el número de yemas gustativas linguales. Esto sugiere que el etanol administrado crónicamente no provoca disminución del número de yemas gustativas y células gemulares en la rata, por lo menos hasta las edades estipuladas.

La disminución de la agudeza gustativa [hipogeusia], así como la aparición de aberraciones gustativas [disgeusias] son alteraciones que se han relacionado con varias enfermeda-

des sistémicas como son: hepatitis viral, cirrosis hepática, hepatitis alcohólica, pseudohipoparatiroidismo, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus, insuficiencia adrenal cortical, síndrome de Wernicke-Korsakoff, alcoholismo crónico (Henkin y Bartter, 1966, Henkin, 1968, Henkin, et al, 1972, Smith, 1972, Swinson, 1973, Smith, et al, 1976, Bursch, et al, 1978, Jones, et al, 1978, Hardy, et al, 1981). Aún más se ha reportado un síndrome caracterizado por hipogeusia, disgeusia, hiposmia y disosmia, idiopáticas (Henkin, et al, 1971). Este aumento de umbral gustativo ha sido abordado desde varios puntos de vista. A nivel sistémico el hecho de estar presente en padecimientos hepáticos [hepatitis alcohólica, hepatitis viral, cirrosis hepática], la hipogeusia se ha asociado a niveles bajos de zinc circulante, ya que este elemento es indispensable para una buena percepción gustativa (Henkin, et al, 1975, Gelliebter, et al, 1981). Postulándose que la alteración en el metabolismo del zinc sea producto de una falla hepática *per se*.

También se ha tratado de asociar estas variaciones en la agudeza gustativa con cambios a nivel del sistema nervioso central. En los pacientes con síndrome de Wernicke-Korsakoff se ha involucrado a la percepción gustativa deficiente con el daño del núcleo ventral medial del tálamo que presentan el 60% de estos pacientes (Jones, et al, 1978). Este núcleo se ha visto, en diferentes especies, que es el centro de la percepción gustativa en el tálamo (Norgren, 1974, Finger, 1978, Loullis, et al, 1978, Brozek, et al, 1979, Buresova, et al, 1979).

Nuestro estudio lo enfocamos a la observación de la morfología de las yemas gustativas en ratas alcoholizadas crónicamente. Este aspecto no había sido abordado con profundidad por los investigadores previamente citados, a pesar de

que el órgano donde se encuentran la mayoría de estos receptores gustativos es uno de los primeros en entrar en contacto con el alcohol cuando se ingiere éste. Los resultados de nuestro estudio muestran alteraciones importantes en la citoarquitectura e inervación del receptor gustativo. Estas alteraciones son indicativas de que la primera interacción entre receptor-sustancia sávida no es efectiva, ya que los cilios de las yemas gustativas de las ratas alcoholizadas no alcanzaron el poro gustativo, con el consiguiente mal acoplamiento y evasión del impulso, tal y como lo sugiere Scalera y colaboradores (1979). Los cambios nucleares morfológicos son indicadores de un metabolismo intracelular probablemente alterado. Estos hallazgos morfológicos concuerdan con los pocos reportes donde se describen cambios morfológicos en relación a la disminución de la agudeza gustativa. Uno fue realizado por Henkin y colaboradores en 1971, en donde se describen a nivel ultraestructural el aspecto que guardan las yemas gustativas de pacientes con síndrome de hipogeusia y disgeusia idiopáticas. Se reportan cambios en la organización celular de la yema, vesiculización y vacuolización de los dos tipos celulares, y pérdida general de la organización de la región del poro gustativo con pérdida de las proyecciones celulares. Estos autores no establecieron el significado específico de estas alteraciones en relación con la agudeza gustativa. Por otro lado, hallazgos previamente reportados por nuestro laboratorio (Gaitán, et al, 1983) describen cambios muy semejantes [desorden celular, cambios nucleares, prolongaciones citoplasmáticas cortas, desarreglo de la región del poro gustativo y profundización del mismo] en yemas provenientes de sujetos seniles. Como se mencionó en párrafos anteriores, el envejecimiento también se ha asociado con disminución de la agudeza gustativa (Hermel, et al, 1970, Massler, 1971, Grzegorzky, et al, 1979).

Existen pocos reportes que describan neuropatías alcohólicas que afecten los nervios craneales. En un caso de neuropatía alcohólica del VIII par, Ylikoski, y colaboradores, (1981) reportan cambios degenerativos de la vaina de mielina, degradación e irregularidad de sus estratos, desaparición del axón en estas fibras y siendo ocupado su lugar por material mielínico desorganizado. En los axones describe disminución de neurofilamentos y microtúbulos. Estas alteraciones se manifestaron clínicamente por pérdida de la audición y del equilibrio. En el presente reporte describimos cambios morfológicos en la inervación [VII par craneal] de las yemas gustativas de las ratas sometidas a la ingesta crónica de etanol. Estas fibras nerviosas [intragemulares] se aprecian con tortuosidades en su trayectoria y signos de degeneración axónica como son: dilataciones y constricciones de tamaño y localización variable. Sin embargo nosotros no observamos cambios degenerativos en la vaina de mielina de estos nervios, por lo que se sugiere que estos cambios sean producto de una reacción axónica -- primaria, como ha sido sugerido por Dart y Howard (Dart y Howard, 1981).

La descripción de elementos neurovasculares en el corion de la papila primaria realizada en el presente reporte, concuerda en forma general con las descripciones realizadas en varios mamíferos por Beckers (Beckers, 1975) y Eisenacher (Eisenacher, 1975). En el presente trabajo el grupo experimental mostró una disminución del diámetro transversal de los elementos neurovasculares que penetran por la papila primaria. Esta imagen sugiere que el flujo axoplásmico de las fibras nerviosas pudiera estar alterado. Esta suposición adquiere importancia por las características que el flujo axónico representa en relación a la fisiología sensorial y motriz. La afirmación anterior se basa en varios hechos:

1) La presencia del flujo axoplásmico es necesaria para mantener: excitabilidad y conducción del impulso nervioso, neurotransmisión, neurotransducción, y liberación de sustancias neurotróficas a músculos, órganos sensoriales y otras células (Ochs, 1974, Ochs, 1981, Stromska y Ochs, 1981, Ochs e-Iqbal, 1982).

2) Se ha reportado que el mantenimiento de este flujo axoplásmico es indispensable para la conducción del impulso gustativo, cualquier alteración en este flujo axónico traerá como consecuencia una alteración en las respuestas de las fibras gustativas (Hellekant, et al, 1979, Oakley, et al, 1979, Oakley, et al, 1980, Oakley, et al, 1981).

3) Existe además el bien conocido fenómeno de neurotrofismo que presentan las yemas gustativas. Esto es, si a la yema se le suprime de su inervación el complejo neurosensorial se atrofiará y eventualmente desaparecerá; y viceversa cuando se reintegra la inervación aparecen nuevamente yemas gustativas (Torrey, 1934, Torrey, 1937, Zalewski, 1970, Cheal y Oakley, 1977).

La interferencia no pareciera ser tan grande como para llegar a bloquear completamente el flujo axónico y lógicamente impedir la llegada de la sustancia trófica a la yema, si esto hubiera ocurrido, probablemente se hubiese encontrado una disminución del número de yemas gustativas en el grupo etanolizado, ya que como se mencionó anteriormente la influencia trófica es vital para mantener la integridad de las yemas gustativas.

La presencia de cambios epiteliales en el grupo sometido a alcoholización crónica, abre nuevas interrogantes acerca del origen de los cambios morfológicos de la citoarquitect-

tura de las yemas gustativas del grupo experimental, ya que - Beidler y Smallman (1965) demuestran que el origen de las células de las yemas gustativas son las epiteliales que rodean al receptor gustativo. Este hallazgo hace que surja inmediatamente la pregunta si es que la atrofia existente en estas células epiteliales pudieran originar a células gemulares con un genoma alterado que condicionase variaciones morfológicas. Sin embargo el hecho de encontrar animales experimentales con epitelio normal y sin embargo presentar yemas gustativas con cambios morfológicos (25%), hacen que esta suposición no sea atractiva.

Nosotros pensamos que la atrofia epitelial sea resultado de la acción irritante directa del etanol, y aunque probablemente esta atrofia este relacionada con los cambios morfológicos de la citoarquitectura gemular, no sea este fenómeno uno de los principales factores en favorecer e iniciar dichos cambios.

En el presente trabajo se aportan evidencias para afirmar que la ingesta crónica de etanol a dosis bajas, se asocia a evidentes cambios morfológicos en la citoarquitectura e inervación de las yemas gustativas linguales de la rata. Esta afirmación es sustentada por las observaciones morfológicas descritas previamente, y por el análisis estadístico de los cambios morfológicos reportados aquí. El control de variables realizadas en ambos grupos de animales reduce al mínimo las posibilidades de que los hallazgos aquí descritos sean producto de otros factores.

Este trabajo, realizado en un modelo de experimentación animal, ofrece una base morfológica para la hipogeusia observada en pacientes alcohólicos (Smith, 1972, Swinson, 1973). Además, sugiere tener como uno de los principales facto-

res cambios morfológicos en el receptor como en la fibra nerviosa [membrana pre y postsináptica]. Estas alteraciones periféricas no excluyen que aparte existan factores centrales que conlleven a la hipogeusia y/o disgeusia. De tal manera podemos pensar que la disminución de la agudeza gustativa del alcohólico probablemente sea un problema de etiopatogenia multifactorial.

RESUMEN.

Se ha reportado previamente que los pacientes con padecimientos hepáticos virales, hepatitis alcohólica, cirrosis hepática, síndrome de Wernicke-Korsakoff y alcoholismo crónico, presentan hipogeusias y/o disgeusias. Estas alteraciones de la agudeza gustativa se han relacionado con un mal funcionamiento hepático per se; a daño existente en el sistema nervioso central; o bien no pudiéndose explicar la relación existente entre alcoholismo crónico y gusto. Por otro lado, en ninguno de estos reportes se menciona el aspecto morfológico de los receptores gustativos a pesar de que éstos son una de las primeras estructuras en ponerse en contacto con el alcohol cuando éste es ingerido, y conociendo además que esta sustancia química es capaz de penetrar al epitelio lingual.

Por lo anterior el principal objetivo de este estudio es describir los cambios morfológicos producidos por alcoholismo crónico en las yemas gustativas linguales de la rata.

Para tal fin, se tomaron 12 ratas Wistar hembras de 64 días de nacidas [grupo experimental], a las cuales se les dió como única fuente de líquidos etanol al 10% por un período de 11 a 13 meses, la ingesta fue sin restricciones; y 5 ratas Wistar hembras de la misma edad [grupo control], a las cuales se les dió de beber agua corriente. Los dos grupos estuvieron sometidos a las mismas condiciones de bioterio, alimentándose con purina para laboratorio "chow". Después del tiempo previsto, los animales fueron sacrificados perfundiéndose con formol buffer extrayéndose inmediatamente después la lengua en su totalidad. Se tomó una muestra de la punta de la lengua para ser cortada a 6 micras. Las técnicas histológicas utilizadas fueron: tricrómica de Gallego, Nauta-Gygax y Bielschowsky.

Resumen de resultados:

a) Yemas gustativas con desorden celular intragemu--
lar; b) núcleos de células sustentaculares aumentados de volú-
men; c) núcleos de células gustativas con alteraciones en su-
forma e inclusiones picnóticas; d) prolongaciones citoplásmi-
cas sinuosas no alcanzando el poro gustativo; e) fibras ner-
viosas intra y perigemulares con dilataciones y constriccio-
nes, signos de degeneración axónica; y f) atrofia del epite-
lio circundante.

CONCLUSIONES.

1).- Dosis bajas de etanol, administrado crónicamente, produce cambios morfológicos en las yemas gustativas linguales de la rata.

2).- Estos cambios pudieran estar relacionados con mecanismos de hipogeusia y/o disgeusia.

3).- Probablemente las alteraciones de la agudeza gustativa que presenta el alcohólico crónico sean causadas por varios factores [periféricos, centrales, sistémicos].

4).- Es necesario implementar estudios y/o proyectos de investigación que contemplen el análisis de los efectos -- del alcoholismo crónico sobre estructuras orofaciales. Así como también, dar mayor importancia a nivel curricular a las -- descripciones y probables tratamientos de estas alteraciones -- producidas por alcoholismo crónico.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ABEL, E.L. and YORK, J.L.: Age-Related Differences in Response to Etanol in the Rats. Physiological Psychology. - 1979, 7(4):391-195
- 2.- AREY, L.B., TREMAINE, M.J. and MONZINGO, F.L.: The Numerical and Topographical Relations of Taste Buds to Human -- Circumvallate Papillae Throughout the Life Span. Anatomical Record. 1935, 64(1)supl 1:9-25.
- 3.- ARVIDSON, K.: Location and Variation in Number of Taste Buds in Human Fungiform Papillae. Scand J Dent Res. 1979, 87:435-442.
- 4.- ARVIDSON, K., COTTLER-FOX, M. and FRIBERG, U.: Taste Buds of the Fungiform Papillae in Cynomolgus Monkey. J Anat. - 1981, 133(2):271-280.
- 5.- ARVIDSON, K. and FRIBERG, U.: Human Taste: Response and Taste Bud Number in Fungiform Papillae. Science. 1980, -- 209:807-808.
- 6.- BECKERS, H.W.: 1.- Zur Morphologie Der Papilla Fungiformis einiger Primaten und des Menschen. Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology. 1975, 50(fasc 6):7-56.
- 7.- BEIDLER, L.M. and SMALLMAN, R.L.: Renewal of Cells within Taste Buds. J Cell Biology. 1965, 27:263-272.
- 8.- BLUME, S.: National Patterns of Alcohol Use and Abuse. -- In: Research Developments in Drug and Alcohol Use. Part I Epidemiology and Characteristics of Drug and Alcohol Abuse. Ann N.Y. Acad Sci. 1981, 362:4-15.
- 9.- BRAUN, J.J., LASITER, P.S. and KIEFER, S.W.: The Gustatory Neocortex of the Rat. Physiological Psychology. 1982,-

10(1):13-45.

- 10.- BROZEK, G. BURESOVA, O., BURES, J.: Elektrophysiological Analysis of Retrieval of Conditioned Taste Aversion. Physiological Techniques and Data Processing. *Physiologia Bohemoslovaca*. 1979, 28:537-544.
- 11.- BURCH, R.E., SACKIN, D.A., URSICK, J.A., JETTON, M.M., - SULLIVAN, J.F.: Decreased Taste and Smell Acuity in Ci - rrhosis. *Arch Intern Med*. 1978, 138:743-746.
- 12.- BURESOVA, O., ALEKSANYAN, Z.A., BURES, J.: Elektrophysio logical Analysis of Retrieval of Conditioned Taste Aver - sion in Rast. Unit Activity Changes in Critical Brain Re - gions. *Physiologia Bohemoslovaca*. 1979, 28:525-536.
- 13.- CARLES, P.L., KAPUR, B., HUSZAR, L.A., MODDEL, G., SINGH , R. and WILKINSON, D.A.: Prolonged Cerebrospinal Fluid A - cidosis in Recently Abstinent Chronic Alcoholics. *Neuro - logy*. 1980, 30:956-962.
- 14.- CHASON, J.L.: Nervous System. pp2074-2148. In: *Patholo - gy*. Ed. by Anderson, W.A.D., and Kissane, J.M. Seventh - Edition, The C.V. Mosby Company, St. Louis. 1977.
- 15.- CHEAL, M. and OAKLEY, B.: Regeneration of Fungiform Tas - te Buds: Temporal and Spatial Characteristics. *J Comp -- Neur*. 1977, 172(4):609-625.
- 16.- CHERNOFF, G.F.: The Fetal Alcohol Syndrome in Mice: Ma - ternal Variables. *Teratology*. 1980, 22:71-75.
- 17.- CICERO, T.J.: Neuroendocrinological Effects of Alcohol. *Ann Rev Med*. 1981, 32:123-142.
- 18.- CONGER, A.D. and WELLS, M.A.: Radiation and Aging Effect on Taste Structure and Function. *Radiation Res*. 1969, --

37:31-49.

- 19.- CONNORS, G.S., MAISTO, S.A. and SOBELL, M.B.: Extension-
of the Taste-Test Analogue as an Unobtrusive Measure of-
Preference for Alcohol. Behav Res & Therapy. 1978, 16:--
289-291.
- 20.- DART, R. and HOWARD, L.: Alcoholic Peripheral Neuropathy.
Nutrition Reviews. 1981, 39(6):237-239.
- 21.- DOWNIE, N.M. y HEATH, R.W.: Métodos Estadísticos Aplica-
dos. Harper & Row Lationamericana, México. 1973.
- 22.- DUNKLEY, R.P. and CARSON, R.M.: Dental Requirements of -
the Hospitalized Alcoholic Patient. J Am Dent Assoc. ---
1978, 76:800-803.
- 23.- EISENACHER, W.: II.- Zur Morphologie Der Papilla Fungi -
formis Einiger Nagetiere. Advances in Anatomy, Embriolo-
gy and Cell Biology. 1975, 50(fasc 6):57-145.
- 24.- FINGER, T.E.: Gustatory Pathways in the Bullhead Catfish
II. Facial Lobe Connections. J Comp Neur. 1978, 180:691-
706.
- 25.- GAITAN, L., ESPINOSA, G., ESPINOSA, J., and MACHADO-SA_
LAS, J.P.: Morphological Changes in the Taste Buds of --
the Elderly. Neurosc Soc Abst. 1983. 9(part 2):271.
- 26.- GELIEBTER, A.A., HASHIM, S.A. and VAN ITALLIE, T.B.: O_
ral L-Histidine Fail to Reduce Taste and Smell acuity --
but Induces Anorexia and Urinary Zinc Excretion. Ameri -
can J Clinical Nutrition. 1981, 34(1):119-120.
- 27.- GRZEGORCZYK, P.B., JONES, S.W. and MISTRETTA, C.M.: Age-
Related Differences in Salt Taste Acuity. J Gerontology.
1979, 34(6):834-840.

- 28.- GUERRA, A.J.: El Alcoholismo en México. Archivo del Fondo. Fondo de Cultura Económica. México. 1977.
- 29.- GONZALEZ, M.: Physiologie Générale du Gout. Acta Otolaryngol. 1979, 87:223-227.
- 30.- HAM, A.W.: Tratado de Histología. Séptima Edición, Nueva Editorial Interamericana. México. 1975.
- 31.- HARDY, S.L., BRENNAND, C.P. and WYSE, B.W.: Taste Thresholds of Individuals with Diabetes Mellitus and of Control Subjects. J American Dietetic Assoc. 1981, 79(3);8-11.
- 32.- HELLEKANT, G.: Electrophysiological Investigation of the Gustatory Effect of Ethyl Alcohol. I: The Summated Response of the Chorda Tympani in the Cat, Dog and Rat. Acta Physiol Scand. 1965a, 64:392-397.
- 33.- HELLEKANT, G.: Electrophysiological Investigation of the Gustatory Effect of Ethyl Alcohol. II: A Single Fibre Analysis in the Cat. Acta Physiol Scand. 1965b, 64:398-406.
- 34.- HELLEKANT, G.: The Effect of Ethyl Alcohol on Non-Gustatory Receptors of the Tongue of the Cat. Acta Physiol Scand. 1965c, 65:243-250.
- 35.- HELLEKANT, G., GOPAL, V. and NINOMIYA, Y.: Decline and Disappearance of Taste Response after Interruption of Chorda Tympani Proper Nerve of the Rat. Acta Physiol Scand. 1979, 105:52-57.
- 36.- HEMMINGSEN, R. and BARRY, D.I.: Adaptive Changes in Cerebral Blood Flow and Oxygen Consumption During Ethanol Intoxication in the Rat. Acta Physiol Scand. 1979, 106:249-255.

- 37.- HENKIN, R.I.: Improvement of Olfaction and of Tastes of Sour and Bitter in Pseudohypoparathyroidism. J Clin Endoc 1968, 28:624-628.
- 38.- HENKIN, R.I. and BARTERR, F.C.: Studies on Olfactory --- Thresholds in Normal Man and in Patients with Adrenal -- Cortical Insufficiency: the Role of Adrenal Cortical Ste roids and of Serum Sodium Concentration. J Clin Invest. 1966, 45:1631-1639.
- 39.- HENKIN, R.I., LIPPOLDT, R.E., BILSTAD, J. and EDELHOCH, H A Zinc Protein Isolated from Human Parotid Saliva. Proc Natn Acad Sci U.S.A. 1975, 72:488-492.
- 40.- HENKIN, R.I., SCHECHTER, P.J., HOYE, R. and MATTERN, C.- F.T.: Idiopathic Hypogeusia with Dysgeusia, Hyposmia, -- and Dysosmia. A new Syndrome. J Am Medical Assoc. 1971, 217(4):434-440.
- 41.- HENKIN, R.I., TALAL, N., LARSON, A.L. and MATTERN, C.F.- T.: Abnormalities of Taste and Smell in Sjögren's Syndro me. Ann Internal Med. 1972, 76:375-383.
- 42.- HERMEL, J., SCHÖNWETTER, S. and SAMUELOFF, S.: Taste Sen sation and Age in Man. J Oral Med. 1970, 25(2):39-42.
- 43.- HORE, B.D.: Alcohol Dependence. Ed. Billing & Sons Guild ford. London. 1976.
- 44.- HUGHES, J.N., COSTE, T., PERRET, G., JAYLE, M.F., SEBAOUN J. and MODIGLIANI, E.: Hypothalamo-Pituitary Ovarian Fun ction in Thirty-one Women with Chronic Alcoholism. Clin- Endocrinology. 1980, 12:543-551.
- 45.- IIDA, M., YOSHIOKA, I. and MUTO, H.: Taste Bud Papillae on the Retromolar Mucosa of the Rat, Mouse and Golden -- Hamster. Acta Anatomica. 1983, 117(4):374-381.

- 46.- IRONSIDE, R., BOSANQUET, F.D. and Mc NEMENEY, W.H.: Central Demyelination of the Corpus Callosum (Marchaifava-Bignami Syndrome) with Report of a Second Case in Great Britain. Brain. 1961, 84:212-230.
- 47.- JONES, B.P., BUTTERS, N., MOSKOWITZ, H.R. and MONTGOMERY K.: Olfactory and Gustatory Capacities of Alcoholic Korsakoff Patients. Neuropsychologia. 1978, 16:323-337.
- 48.- JONES, K.L., SMITH, D.W., ULLELAND, C. and STREISSGUTH, A.P.: Pattern of Malformation in Offsprings of Chronic Alcoholic Mothers. Lancet. 1973, I: 1267-1271.
- 49.- KALANT, H.: Direct Effects of Ethanol on the Nervous System. Federation Proceedings. 1975, 34(10):1930-1941.
- 50.- KALANT, H. and WOO, N.: Electrophysiological Effects of Ethanol on the Nervous System. Pharmac Ther. 1981, 14: 431-457.
- 51.- LAMBOEUF, Y., De SAINT BLANQUAD, G. and DERACHE, R.: Mucosal Alcohol Dehydrogenase- and Aldehyde Dehydrogenase-Mediated Ethanol Oxidation in the Digestive Tract of the Rat. Biochem Pharmacol. 1981, 30:542-545.
- 52.- LARATO, D.C.: Oral Tissue Changes in the Chronic Alcoholic. J Periodontol. 1972, 43(12):772-773.
- 53.- LAUDENBACH, P.: Les Glandes Salivaires et le Milieu Buccal de L'éthylique. Actualités Odonto Stomatologiques. 1976, 115:443-447.
- 54.- LAUDENBACH, P., LAUFER, J.: Le Record Mondial de L'éthylisme. Actualités Odonto Stomatologiques. 1976, 115:435-438.
- 55.- LIEBER, C.S.: Metabolism and Metabolic Effects of Alco-

- hol. Seminar in Hematology. 1980, 17(2):85-99.
- 56.- LITTLE, R.E., PYTKOWICZ-STREISSGUTH, A., BARR, H.M. and HERMAN, C.S.: Decreased Birth Weight in Intants of Alcoholic Women who Abstained During Pregnancy. J Pediatrics. 1980, 96(6):974-977
- 57.- LOULLIS, C.C., WAYNER, M.J. and JOLICOEUR, F.B.: Thalamic Taste Nuclei Lesions and Taste Aversion. Physiology & Behavior. 1978, 20:653-655.
- 58.- LUNA, L.G. (Ed): Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. The Blakiston Division Mc Graw Hill, Book Company. 1973.
- 59.- LUNDQUIST, F.: Interference of Ethanol in Cellular Metabolism. Ann N.Y. Acad Sci. 1975, 252:10-20.
- 60.- LYNCH, M.J.G.: Brain Lesions in Chronic Alcoholism. Am Med Ass. Arch Pathol. 1960, 69:342-353.
- 61.- MACHADO-SALAS, J.P., ESPINOSA, E. and TRUJILLO, J.: Morphological Alterations in the Hippocampus of Chronic Alcoholic Rats. Neurosc Soc Abst. 1979, 5:515.
- 62.- MASSLER, M.: Oral Aspects of Aging. Postgraduate Medicine. 1971, 49:179-183.
- 63.- MISTRETTA, C.M.: Permeability of Tongue Epithelium and its Relation to Taste. Am J Physiol. 1971, 220(5):1162-1167
- 64.- MOCHIZUKI, Y.: An Observation of the Numerical and Topographical Relations of Taste Buds to Circumvallate Papillae of Japanese. Okajimas Folia Anatomical Japonica. -- 1937, 15:595-608.
- 65.- MURPHY, M.T. and LIPTON, J.M.: Effects of Alcohol on ---

- Thermoregulation in Aged Monkeys. Exp Gerontol. 1983, 18: 19-17.
- 66.- MURRAY, R.G. and MURRAY, A.: The Fine Structure of the -- Taste Buds of Rhesus and Cynomaligus Monkeys. Anat Record 1960, 138:211-233.
- 67.- MURRAY, R.G. and MURRAY, A.: Fine Structure of Taste --- Buds of Rabbit Foliate Papillae. J Ultrastructure Res. - 1967, 19:327-353.
- 68.- NAUTA, W.J.H. and GYGAX, P.A.: Silver Impregnation of De generating Axons in The Central Nervous System: A Modi - fied Technic. Stain Tech. 1954, 29(2): 91-93.
- 69.- NORGREN, R.: Gustatory Afferents to Ventral Forebrain. - Brain Res. 1974, 81:285-295.
- 70.- OAKLEY, B., CHU, J.S. and JONES, L.B.: Axonal Transport- Maintains Taste Responses. Brain Res. 1981, 221:289-298.
- 71.- OAKLEY, B., JONES, L.B. and HOSLEY, M.A.: Decline of --- IXth Nerve Taste Responses Following Nerve Transection.- Chemical Senses and Flavor. 1979, 4(4):287-299.
- 72.- OAKLEY, B., JONES, L.B. and HOSLEY, M.A.: Deffect of Ner ve Stump Length upon Mammalian Taste Responses. Brain -- Res. 1980, 194:213-218.
- 73.- OCHS, S.: Systems of Material Transport in Nerve Fibers- (Axoplasmic Transport) Related to Nerve Function and Tro phic Control. Ann N.Y. Acad Sci. 1974, 228:202-223.
- 74.- OCHS, S.: Fast Axoplasmic Transport in Mammalian Nerve.- Introductory Remarks. In Neurobiology and Behavior Thema tics Symposium. 65th Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Atlanta, --

Georgia, April 15, 1981, pp2300.

- 75.- OCHS, S., IQBAL, Z.: The Role of Calcium in Axoplasmic - Transport in Nerve. pp325-354. In: Calcium and Cell Function. Vol III. Academic Press, Inc. 1982.
- 76.- OLEGARD, R., SABEL, K.G., ARONSSON, M., SAUDIN, B.J., JOHANSON, P.R., CARLSSON, C., KYLLERMAN, M., IBERSEN, K., - and HRBEK, A.: Effects on the Child of Alcohol Abuse During Pregnancy. Acta Pediatr Scand Suppl. 1979, 275:111-121.
- 77.- PADYKULA, H.A.: Aparato Digestivo. pp459-507. En: Histología. Editado por Greep, R.O. y Weiss, L. Tercera Edición, Editorial El Ateneo, Barcelona. 1975.
- 78.- PARAN, L., MATTERN, C.F.T. and HENKIN, R.I.: Ultrastructure of the Taste Bud of the Human Fungiform Papilla. -- Cell Tiss Res. 1975, 161:1-10.
- 79.- PERSSON, L.O., SJOBERG, L. and SVENSSON, E.: Mood Effects of Alcohol. Psicopharmacology. 1980, 68:295-299.
- 80.- PROVENZA, D.U.: Oral Histology. Lippincott, Co. 1964.
- 81.- QUEVEDO, L., CONCHA, J., MARCHANT, Z., ESKUCHE, W. and MADARIAGA, J.: Nerve Accomodation in Chronic Alcoholic - Subjects. Parmachology. 1980, 21:229-232.
- 82.- RILEY, J.N., WALKER, D.W.: Morphological Alterations in Hippocampus after Long-Term Alcohol Consumption in Mice. Science. 1978, 201:646-648.
- 83.- ROBBINS, S.L.: Patología Estructural y Funcional. Nueva-Editorial Interamericana, México. 1975.
- 84.- SATO, G., SEINO, Y., TOMOHO, O.: Mutagenicity of Smoke -

- Condensates from Cigarettes, Cigars and Pipe Tobacco. --
Cancer Lett. 1977, 3:1-8.
- 85.- SANGIACOMO, C.O.: Neurosecretory Cell Types in Normal --
Taste Bud. Experientia. 1970, 26(3):289-290.
- 86.- SCALERA, G., ROSSI, M.T., DI BELLA, L.: Fattori Periferi
ci e Centrali atti a Modificare la Soglia Gustativa. ---
Boll Soc It Biol Sper. 1979, LV (75):398-403.
- 87.- SCHNEIDER, J.J.: La Personnalité de L'Alcoolique. Actua-
lités Odonto Stomatologiques. 1976, 115:439-442.
- 88.- SCHUCKIT, M.A.: Overview of Alcoholism. J Am Dental Assoc
1979, 99:489-493.
- 89.- SMITH, S.E.: Taste Tresholds in Drug Addicts and Alchoh_
lic. Br J Addict. 1972, 67(4):317.
- 90.- SMITH, F.R., HENKIN, R.I. and DELL, R.B.: Disordered Gus
tatory Acuity in Liver Disease. Gastroenterology. 1976,-
70:568-571.
- 91.- SOUBIRAN, J.M., GUILBERT, F.: Rhinophyma. Actualités O -
donto Stomatologiques. 1976, 115:462-463.
- 92.- STOLTENBURG-DIDINGER, G., SPOHR, H.L.: Fetal Alcohol Syn
drome and Mental Retardation: Spine Distribution of Pyra
midal Cells in Prenatal Alcohol Exposed Rat Cerebral Cor
tex; a Golgi Study. Developmental Brain Res. 1983, 11:--
119-123.
- 93.- STORCH, V.N., and WELCH, U.N.: Electron Microscopic Ob_
servetions on the Taste-Buds of Some Bony Fishes. Arch -
Histol Jap. 1970, 32(2):145-153.
- 94.- STROMSKA, D.P. and OCHS, S.: Patterns of Slow Transport-

- in Sensory Nerves. J Neurobiology. 1981, 12(5):441-453.
- 95.- SULIK, K.K. and JOHNSTON, M.C.: Sequence of Developmental Alteration Following Acute Ethanol Exposure in Mice: Craneofacial Features of the Fetal Alcohol Syndrome. Am J Anatomy. 1983, 166:257-269.
- 96.- SWINSON, R.P.: Phenylthiocarbamide Taste Sensitive in - Alcoholism. Br J Addict. 1973, 68(1):33-36.
- 97.- SZPIRGLAS, H.: Alcool et Cancers Buccaux. Actualités Odonto Stomatologiques. 1976, 115:448-454.
- 98.- TAKEDA, M.: An Electron Microscopic Study on the Innervation in the Taste Buds of the Mouse Circumvallate Papillae. Arch Histol Jap. 1976, 39(4):257-269.
- 99.- TAKEDA, M. and HOSHINO, T.: Fine Structure of Taste Buds in the Rat. Arch Histol Jap. 1975, 37(5):395-413.
- 100.- TORREY, T.W.: The Relation of Taste Buds to their Nerve Fiber. J Comp Neur. 1934, 59:203-22.
- 101.- TORREY, T.W.: The Relation of Nerves to Degenerating -- Taste Buds. J Comp Neur. 1936, 64(2):325-335.
- 102.- TUYNS, A.J.: Epidemiology of Alcohol and Cancer. Cancer Res. 1979, 39:2840-2843.
- 103.- VAILLANT, J.M., COULY, G.: Le Traitement Chirurgical de L'Adenolipomatose de Launois et Bensaude. Actualités Odonto Stomatologiques. 1976, 115:464-466.
- 104.- WAUTIER, J.L., CAEN, J.P.: Les Troubles de L'Hemostase - chez L'Ethylique. Actualités Odonto Stomatologiques. -- 1976, 115:455-461.
- 105.- WISNIEWSKI, K., DAMBSKA, M., SHER, Q., QAZI, J.H.: A Cli

- nical Neurophatological Study of the Fetal Alcohol Syndrome. Neuropediatrics. 1983, 14:197-201.
- 106.- WYNDER, E.L., MUSHINSKI, M.H., SPIVAK, J.C.: Tobacco and Alcohol Consumption in Relation to the Development of Multiple Primary Cancers. Cancer. 1977, 40:1872-1878.
- 107.- YLIKOSKI, J.S., HOUSE, J.W., HERNANDEZ, I.: Eighth Nerve Alcoholic Neuropathy. A Case Report with Light and Electron Microscopic Findings. J Laryngology and Otology. - 1981, 95:631-642.
- 108.- ZALEWSKI, A.A.: Continuous Trophic Influence of Chromatololised Gustatory Neurons on Taste Buds. Anat Record. 1970, 167:165-174.
- 109.- ZILM, D.H., HUSKAR, L., CARLEN, T.L., KAPLAN, H.L. and WILKINSON, D.A.: EEG Correlates of the Alcohol-Induced-Organic Brain Syndrome in Man. Clin Toxicology. 1980, - 16(3): 345-358.

APENDICE I.

A) Técnica Trocrómica de Gallego:

Cortes en parafina a 7 micras.

- 1).- Desparafinar hasta agua destilada.
- 2).- Fucsina por 10 minutos.
- 3).- Formol al 1% por 5 minutos.
- 4).- Lavar en agua destilada. Rápido.
- 5).- Picrocarmín, unos segundos hasta medio minuto.
- 6).- Lavar en agua destilada.
- 7).- Alcohol de 96%, dos cambios.
- 8).- Alcohol absoluto, dos cambios.
- 9).- Xyleno, dos cambios.
- 10).- Montar con resina o bálsamo.

B) Técnica de Nauta-Gygax:

Cortes congelados entre 15 a 25 micras. Recoger los cortes en formol al 10%.

- 1).- Solución de alcohol 15% por 15 minutos.
- 2).- Lavar en agua destilada.
- 3).- Solución de ácido fosfomolibdico al 0.5% por una hora.
- 4).- Sin lavar colocar los cortes en una solución de permanganato de potasio al 0.05% por 4 a 10 minutos.
- 5).- Lavar en agua destilada.
- 6).- Decolorar en una solución de ácido oxálico-hidroquinona al 1% por 2 minutos.
- 7).- Lavar bien en agua destilada, 2 a 4 cambios.
- 8).- Solución de nitrato de plata al 1.5% por treinta minutos. Para este punto transferir los cortes individualmente,

- 9).- Lavar en agua destilada.
- 10).- Solución de nitrato de plata amoniacal por un minuto.
- 11).- Solución reductora. Los cortes flotarán en la superficie de esta solución y aparecerán de un color café dentro de un minuto.
- 12).- Lavar en agua destilada.
- 13).- Solución de tiosulfato de sodio al 1% por un minuto.
- 14).- Lavar en agua destilada, 3 cambios.
- 15).- Deshidratar en alcohol de 95%, alcohol absoluto y xylene, 3 cambios en cada uno.
- 16).- Montar con bálsamo o resina.

C) Técnica de Bielschowsky.

Cortes en parafina a 6 micras.

- 1).- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 2).- Nitrato de plata al 2%, durante 48 horas.
- 3).- Nitrato de plata amoniacal, por una hora.
- 4).- Lavar en agua bidestilada.
- 5).- Reducir en formol al 10%.
- 6).- Lavar en agua bidestilada.
- 7).- Virar en cloruro de oro al 1:500, por una hora.
- 8).- Tiosulfato de sodio, durante 5 minutos.
- 9).- Lavar en agua bidestilada.
- 10).- Deshidratar en alcoholes graduales, hasta xylene. 2 cambios cada uno.
- 11).- Montar en resina o bálsamo.

APENDICE II.

A) Obtención de p:

Fórmula para la desviación estandar:

$$\text{d.e.} = \frac{\sum x^2}{n}$$

d.e. = desviación estandar.

$$x^2 = (x - \bar{x})^2$$

n = número de datos.

Fórmula de error estandar del promedio aritmético:

$$\text{E.E.}_{\bar{x}} = \frac{\text{d.e.}}{n}$$

E.E. _{\bar{x}} = error estandar del promedio aritmético.

d.e. = desviación estandar.

n = número de datos.

Fórmula del error estandar de la diferencia entre dos promedios aritméticos:

$$\text{E.E.}_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \frac{(\text{d.e.}_1)^2}{n_1} + \frac{(\text{d.e.}_2)^2}{n_2}$$

E.E. _{$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$} = error estandar de la diferencia entre --
dos promedios.

d.e. = desviación estandar.

n = número de datos.

Fórmula para z (área relativa)

$$\frac{\text{diferencia entre promedios}}{\text{E.E.}_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\text{E.E.}_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}} = z$$

z = puntuación tipificada a la que corresponde un área (A) por lo tanto $p = 2 \times (0.5 - A)$.

B) Obtención de χ^2 :

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - C)^2}{C}$$

O = Datos observados.

C = Datos calculados.

Fórmula para datos calculados:

$$\text{Datos calculados} = \frac{\text{Total datos observados.}}{\text{Total de datos.}}$$

Fórmula para grados de libertad:

$$\text{Grados de libertad} = (F - 1) (C - 1).$$

F = Número de filas.

C = Número de columnas.