

## ESTUDIO ESTRUCTURAL Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA PORCIÓN INTRACRANEAL DEL NERVIO TROCLEAR DEL PERRO

Structural and ultrastructural study the intracranial portion of the trochlear nerve in the dog.

**Vivo J.\*, Morales J. L., Diz A., Blanco A., Monterde J. G., Miró F.**

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Campus Rabanales. Universidad de Córdoba. Ctra Madrid-Cádiz Km 396. 14014 Córdoba. España.

\* Autor de referencia: anlivoj@uco.es

### RESUMEN

En el presente trabajo se han extraído, de seis perros adultos, de 40-50 kilogramos de peso, los nervios trocleares derechos en su porción intracraneal. Los nervios fueron analizados con microscopia óptica y microscopia electrónica. Hay que destacar la presencia de fibras no mielinizadas en todos los nervios analizados. De las fibras mielinizadas hemos determinado su número, diámetro, área y densidad, así como el área y el diámetro del axón correspondiente y el grosor de la vaina de mielina. El número medio de fibras mielínicas contabilizadas fue de 1482,25. El histograma de frecuencias relativo al grosor de la vaina de mielina y al tamaño fibrilar muestran una distribución bimodal, siendo 10,8  $\mu\text{m}$  el valor medio de discriminación de las dos poblaciones fibrilares. Se aprecia una proporción similar de fibras grandes (47,45%) y pequeñas (52,55%). La población de fibras pequeñas presentan un tamaño medio de 6,44  $\mu\text{m}$  y ocupan un 12,10% de la superficie total del nervio, por el contrario las fibras grandes, con un tamaño medio de 15,34  $\mu\text{m}$  ocupan el 60,20% del nervio.

**Palabras clave:** fibras mielinizadas; fibras amielinizadas; nervio troclear; perro.

### ABSTRACT

In the present investigation, the right intracranial portion of the trochlear nerves was removed from six adult dogs weighing 40-50 kg and analyzed by light and electron microscopy. A significant number of unmyelinated fibers were observed in the analyzed nerves. Number, diameter, area and density of myelinated fibers were determined as were corresponding axon area and diameter and myelin sheath thickness. Myelinated fibers count produced a mean of 1482,25. Frequency histograms of myelin sheath thickness and fiber size show a bimodal distribution being 10,8  $\mu\text{m}$  the mean value of discrimination of the two populations. A similar proportion of large (47,45%) and small fibers (52,55%) is appraised. The small fibers population was present

in a size mean of 6,44  $\mu\text{m}$  and occupies a 12,10% of the total surface of the nerve, on the contrary the large fibers, with size mean of 15,34  $\mu\text{m}$  occupy a 60,20% of the nerve.

**Key words:** trochlear nerve; myelinated fibers; unmyelinated fibers; dog.

## INTRODUCCIÓN

Los músculos extraoculares están activados por el III (nervio oculomotor), IV (nervio troclear) y VI (nervio abducente) par craneal. En estos nervios se han encontrado diferentes tipos de fibras, tanto en base a sus características morfológicas –mielínicas y amielínicas– como a su velocidad de conducción (Manni et al. 1987, 1989). El hallazgo de fibras amielínicas en estos nervios somatomotores, y en algunas especies, está siendo últimamente objeto de profusa discusión científica (Batini et al. 1979; Fraher 1989; Berardinelli et al. 2000).

El nervio troclear que se integra, en su origen, únicamente por fibras motoras somáticas destinadas al músculo oblicuo dorsal, tiene su origen real en el núcleo troclear heterolateral y emerge por la superficie dorsal del mesencéfalo (origen aparente) inmediatamente caudal al colículo caudal; se cruza con el del lado opuesto sobre el velo medular rostral del techo del 4<sup>o</sup> ventrículo, determinando así la decusación de los nervios trocleares. A partir de aquí se introduce en la duramadre del tentorio del cerebelo, hasta que alcanza la órbita a través de la cisura orbitaria. El nervio troclear ha sido estudiado en una gran variedad de especies: reptiles (Barba et al. 1988), rata (Kerns 1980; Nojyo et al. 1988; Fraher 1989), oveja (Berardinelli et al. 2000), oveja y hombre (Abo-el-Enene 1978) y gato (Batini et al. 1979; Hildebrand et al. 1988; Hayakawa et al. 2000). En el perro la única referencia encontrada en la literatura respecto a los nervios de los músculos extraoculares se refiere al nervio oculomotor (Bortolami et al. 1977). Por lo tanto, no existe ningún estudio mencionado en la literatura que haya realizado un análisis en detalle de las características morfológi-

cas y morfométricas del nervio troclear del perro.

El objetivo de este trabajo es determinar, en el perro, la presencia de las fibras amielínicas en la porción intracraneal del nervio troclear junto con un análisis, del mismo nervio, del número, diámetro, área y densidad de las fibras mielínicas, así como el área y el diámetro del axón correspondiente y el grosor de la vaina de mielina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado en este estudio seis perros sanos adultos de raza pastor alemán de entre 40-50 kgr de peso, obtenidos del lazareto municipal donde fueron eutanasiados por sobredosis anestésica con tiopental (Tiobarbital<sup>®</sup>) y que posteriormente utilizamos para nuestra experiencia. Tras su sacrificio se ha levantado la bóveda del cráneo y obtenido el nervio troclear derecho en su recorrido intracraneal.

Los nervios fueron en primer lugar fijados en una solución al 2% de glutaraldehído preparado en un buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4), durante la noche se mantienen a 4°C y son nuevamente fijados durante 30 minutos en una solución de tetróxido de osmio al 1% preparado en un buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4). Tras deshidratar, en gradientes de etanol, son incluidos en araldita y cortados con un ultramicrotomo LKB en secciones transversales semifinas y ultrafinas. Las secciones semifinas fueron teñidas con azul de toluidina y utilizadas para su examen con microscopio óptico, mientras que las secciones ultrafinas fueron doblemente teñidas con acetato de uracilo y citrato de plomo. Las secciones ultrafinas se estudiaron y fueron fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10.

Las secciones semifinas transversas de los nervios enteros fueron digitalizadas en sucesivas imágenes a 40x, con las que se reconstruyó completamente la sección nerviosa obtenida. Con el software Sci Image (1998 Scion corporation 82 Worman's Mill Court Suite H Frederick, Maryland 21703) se ha evaluado, en las imágenes digitalizadas el área, diámetro mayor y diámetro menor de todas las fibras nerviosas mielínicas y de sus axones correspondientes, mientras que sobre la reconstrucción completa del nervio se ha medido su área y se ha contado el número de todas las fibras nerviosas mielínicas. Los datos se trataron con el programa Microsoft Excel® con el que se obtuvo, de cada nervio, el diámetro medio de la fibra nerviosa, su densidad (número de fibras por mm<sup>2</sup>), área media, área total (suma del área de todas las fibras) y relativa (expresada en porcentaje del área del nervio), así como, el área media del axón y su diámetro medio, el grosor de la vaina de mielina ((diámetro fibrilar menos diámetro del axón)/2) y la razón diámetro axón /diámetro fibrilar. Para cada nervio y para las variables que procediera se obtuvo la desviación standar (std intra.). Fueron calculadas la media global (obtenida a partir de la media de cada nervio) y su correspondiente desviación standar (std inter) y la media de la std intra.

Las secciones ultrafinas fueron utilizadas para detectar la presencia de las fibras amielínicas, si bien no fueron cuantificadas por escapar de los objetivos del presente estudio.

## RESULTADOS

En el estudio electrónico, hay que destacar, junto a fibras nerviosas con distinto grado de mielinización, pequeños cúmulos de axones, con morfología redondeada o elíptica, en el interior del citoplasma de las células de Schwann que no muestran ningún tipo de mielinización (fibras amielínicas) (Figura 1).

Las fibras nerviosas mielinizadas han sido identificadas al microscopio óptico en todos los

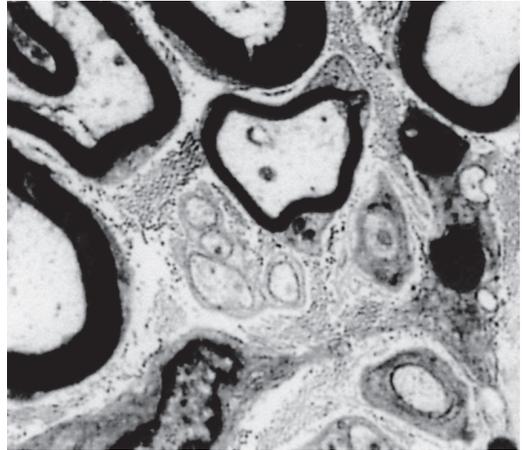


Figura 1. Microscopía electrónica de un corte transversal del nervio troclear, observándose fibras mielinizadas y no mielinizadas.

nervios examinados gracias a las características de sus vainas de mielina. En la sección transversal de los nervios se observó, una gran variedad en los tamaños de las fibras mielínicas (Figura 2). El estudio previo de frecuencias mediante histogramas mostró que las variables fibrilares (área y diámetro) de los seis nervios presentaban una distribución bimodal, permitiéndonos distinguir claramente dos poblaciones: fibras pequeñas y grandes. La separación de ambas poblaciones se estableció por el diámetro fibrilar, siendo 10,8  $\mu\text{m}$  (rango 10,3-11,2) el valor medio de discriminación. Sobre cada una de estas poblaciones hallamos los valores para las mismas variables que para el nervio en conjunto. No se encontró distribución bimodal para el área y diámetro del axón, y sí para el grosor de la vaina de mielina (Figura 3). En cualquier caso, las fibras pequeñas y grandes se distribuían en el nervio de forma homogénea, no detectándose zonas donde predominaran alguna de ellas.

El área media de los nervios trocleares fue de 216776,78  $\mu\text{m}^2$ , con una variabilidad expresada como CV100 del 14%. El número medio de fibras mielinizadas presentes en los

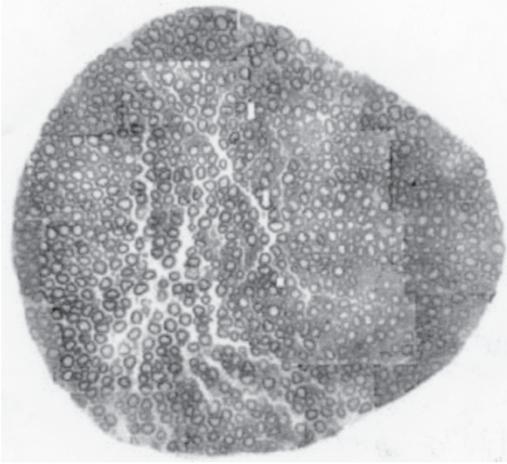


Figura 2. Sección transversal del nervio troclear, vista al microscopio óptico.

nervios fue de 1485,25, de las que alrededor del 52% fueron del tipo pequeño, aunque en uno de los nervios analizados hubo un predominio de fibras grandes (58%). Dado su pequeño tamaño, estas fibras ocupaban exclusi-

vamente el 10-15% del área del nervio, mientras que las fibras grandes ocupan el 52-70% del nervio.

El diámetro fibrilar de cada una de las poblaciones osciló entre 2,4 y 11,2  $\mu\text{m}$  para las fibras pequeñas y entre 10,5 y 21,7  $\mu\text{m}$  para las fibras grandes, con uno valores medios para cada uno de ellos de 5,8-6,9  $\mu\text{m}$  y 14,7-16,5  $\mu\text{m}$  respectivamente. Los intervalos de mayor concentración fibrilar fueron entre 4,5-6  $\mu\text{m}$  para las fibras pequeñas y entre 13,5-15  $\mu\text{m}$  para las fibras de gran tamaño. El diámetro del axón para cada una de estas poblaciones osciló entre 1,2 y 7,6  $\mu\text{m}$  para las fibras pequeñas y 4,4 y 14,1  $\mu\text{m}$  para las grandes, con valores medios de 3,3-4,0  $\mu\text{m}$  y 7,9-8,8  $\mu\text{m}$  respectivamente, con una mayor proporción fibrilar en el intervalo 3-4  $\mu\text{m}$ . En cuanto al grosor de mielina, el valor de separación de las dos poblaciones que se detecta en la distribución de frecuencias es de 2,2  $\mu\text{m}$ , correspondiendo una valor medio de 1,2-1,5  $\mu\text{m}$  para las fibras pequeñas y 3,3-3,8  $\mu\text{m}$  para las grandes, siendo el rango de mayor densidad fibrilar de 1-1,25  $\mu\text{m}$  para las fibras

Cuadro 1. Medias y desviaciones típicas de las fibras mielínicas, en cada una de las variables analizadas para el total del nervio y para cada una de las dos poblaciones diferenciadas.

	Total	std-inter	std-intra	Pequeñas	std-inter	std-intra	Grandes	std-inter	std-intra
Número fibras	1485,25	213,67		780,52	186,28		704,73	114,98	
Porcentaje fibras				52,55			47,45		
Densidad fibras ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	6860,00	379,43		3559,45	421,71		3300,55	699,89	
Área fibrilar ( $\text{mm}^2$ )	105,36	6,21	85,50	34,09	4,56	20,05	185,44	21,39	55,88
Área total fibras ( $\text{mm}^2$ )	155493,42	13278,76		26363,54	6534,81		129248,15	12088,60	
Área relativa. fibras (%)	72,25	5,43		12,10	2,12		60,20	6,91	
Diámetro fibrilar (mm)	10,66	0,49	4,96	6,44	0,47	1,89	15,34	0,78	2,34
Área axón ( $\text{mm}^2$ )	31,37	2,26	27,04	11,01	1,51	7,09	54,27	6,78	22,72
Diámetro axón (mm)	5,93	0,29	2,72	3,73	0,30	1,18	8,36	0,42	1,72
Diam. axón/ Diam. Fibra (mm)	0,56	0,02	0,07	0,58	0,02	0,07	0,54	0,01	0,06
Grosor mielina (mm)	2,29	0,15	1,21	1,35	0,11	0,47	3,49	0,23	0,67

pequeñas y el de 3-3,5  $\mu\text{m}$  para de fibras de gran tamaño.

Los valores medios y la variabilidad (std intra medio y std inter) de cada una de las variables, tanto para el conjunto de las fibras como para sus dos poblaciones se exponen en el Cuadro 1.

## DISCUSIÓN

Si es cierto que existe una extensa literatura sobre el nervio oculomotor (III) y abducente (VI), se ha prestado una menor atención al nervio troclear (IV) y especialmente a la presencia de fibras amielínicas. En la rata, Kerns (1980), hace un análisis morfométrico de la diferenciación postnatal del nervio troclear y valora el número y tamaño de las fibras mielínicas y amielínicas; Nojyo et al. (1988), confirman la presencia de fibras amielínicas en el IV y VI nervio por microscopía electrónica, y Fraher (1989), estudiando los tres nervios en el adulto observa que las fibras no mielinizadas son más frecuentes en el nervio abducente y menos en el troclear. En la oveja, Berardinelli et al. (2000), estudian la composición de la porción intracranial de los nervios III, IV y VI, determinando el número, tamaño y porcentaje de las fibras mielínicas y amielínicas, al igual que Hildebrand et al. (1988), para los nervios IV y VI del gato.

En el presente estudio se ha pretendido determinar, en el perro, la presencia de las fibras amielínicas del nervio troclear, junto con un análisis, del mismo nervio, del número, diámetro, área y densidad de las fibras mielínicas, así como el área y el diámetro del axón correspondiente y el grosor de la vaina de mielina. En todos los nervios analizados hemos detectado la presencia de fibras amielínicas, si bien no han sido cuantificadas. Previsiblemente estas fibras, como las fibras amielínicas del nervio oculomotor del perro (Bortolami et al. 1977), tengan su cuerpo neuronal en el ganglio semilunar y recojan sensibilidad de los territorios oculares por la rama oftálmica del trigémino. Estas aferencias

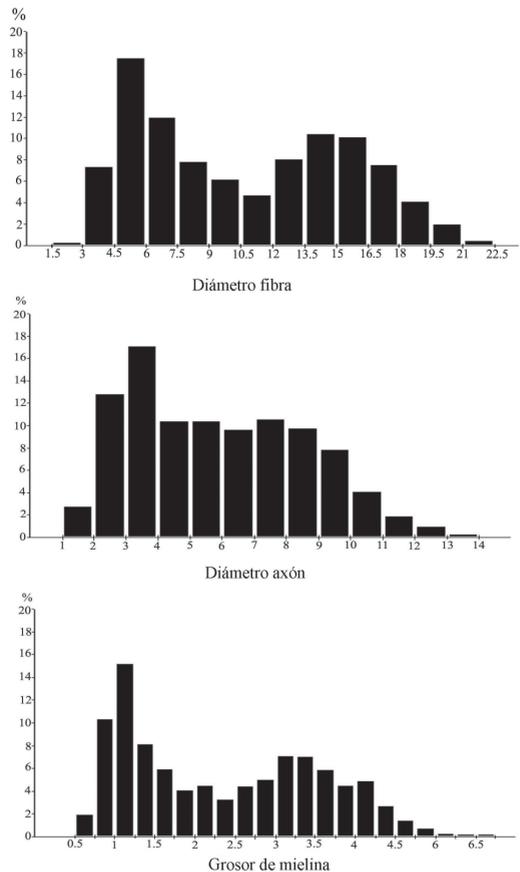


Figura 3. Histogramas del nervio troclear.

terminarían mayormente en el subnúcleo gelatinoso del núcleo caudal del trigémino, consideraciones estas que deberán ser objeto de estudio para el nervio troclear del perro.

Las fibras mielínicas representan el 72,25% del área total del nervio, que es ligeramente superior al encontrado por Kerns (1980), en la rata. El espectro de tamaño de las fibras nerviosas del perro, es similar al determinado Batini et al. (1979), en el gato y por Berardinelli et al. (2000), en la oveja, siendo mucho más amplio al señalado por Kerns (1980), en la rata. Este espectro de tamaño presenta una distribución

bimodal, al igual que señalan otros autores en otras especies: Batini et al. (1979), en la rata; Hildebrand et al. (1988), en el gato y Berardinelli et al. (2000), en la oveja, siendo el valor de separación de las dos poblaciones, determinado por nosotros en el perro, sensiblemente más alto que el señalado por Batini et al. (1979), en el gato y Berardinelli et al. (2000), en la oveja. Esta distribución bimodal de las fibras nerviosas del perro, hemos constatado con el presente estudio, que se la confiere el grosor de la vaina de mielina, ya que el tamaño del axón presenta una distribución unimodal.

Las dos poblaciones determinadas por nosotros presentan una proporción similar entre fibras de gran tamaño y fibras de pequeño tamaño. Esta proporción no coincide con los valores aportados, para el nervio troclear en la rata, por Fraher (1989), que señala valores muchos más altos para las fibras de gran tamaño y muchos más bajos para las fibras de pequeño tamaño; Hildebrand et al. (1988), en el gato, determina un claro predominio del número de fibras de pequeño tamaño sobre las de gran tamaño.

El número total de fibras mielínicas del nervio, para Batini et al. (1979) y Berardinelli et al. (2000), es proporcional al número de músculos a los que inerva. Nosotros pensamos que es proporcional al número de fibras musculares a las que inerva, si bien es verdad que en nuestro estudio no hemos encontrado una proporción directa entre las fibras musculares y las fibras nerviosas. El número de fibras mielínicas del nervio troclear del perro halladas en nuestro estudio, es menor que en la oveja (Berardinelli et al. 2000), y mayor que en la rata (Fraher 1989), y el gato (Batini et al. 1979; Hildebrand et al. 1988). La baja relación, número fibras musculares/número de fibras nerviosas de estos músculos extraoculares se ha relacionado clásicamente con el alto grado de control motor al que están sometidos. En nuestro estudio esta relación ha sido 7,5; sin embargo posiblemente sea más alta, pues los estudios realizados por Abo-El-Enene (1978), en la oveja señalan que las

fibras mielínicas del nervio troclear no son exclusivamente motoras, ya que un importante número son fibras aferentes propioceptivas de grande y de pequeño tamaño.

Además, la relación diámetro axón/diámetro fibra que hemos determinado en el nervio troclear del perro, es mayor para las fibras de pequeño tamaño que para las fibras de gran tamaño, lo que nos señala que el espesor de las vainas de mielina es proporcionalmente mayor en aquellas fibras que tienen un tamaño menor de sus axones.

En conclusión, nuestro estudio sobre el nervio troclear muestra que este nervio, en el perro, presenta características estructurales y ultraestructurales semejantes a la de otros nervios y otras especies. Su pequeño número de fibras mielínicas y su único músculo diana lo hacen idóneo para realizar futuras investigaciones sobre el mismo que indaguen en la diferente funcionalidad que puedan poseer tanto sus fibras mielínicas como amielínicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abo-El-Enene MA. 1978. Proprioceptive afferent fibers in the cranial nerves III, IV and VI. *Acta Anat.* 101:62-65.
- Barbas-Henry HA., Lohman AH. 1988. The motor nuclei and sensory neurons of the IIIrd, IVth, and VIth cranial nerves in the monitor lizard, *Varanus exanthematicus*. *J. Comp. Neurol.* 267:387-397.
- Batini C., Buisseret-Delmas C., Kado RT. 1979. On the fibers of the III, IV and VI cranial nerves of the cat. *Arch. Ital. Biol.* 117:111-122.
- Berardinelli P., Scapolo PA., Barazzoni AM., Russo V., Bortolami R. 2000. Nerve fiber composition of the intracranial portion of the oculomotor, trochlear, and abducens nerves in the sheep. *Anat. Rec.* 260:294-298.
- Bortolami R., Veggetti A., Callegari E., Lucchi ML., Palmieri G. 1977. Afferent fibers and sensory ganglion cells within the oculomotor nerve in some mammals and man. I. Ana-

- tomical investigations. *Arch. Ital. Biol.* 115:355-386.
- Fraher JP. 1989. Axon numbers in rat oculomotor, trochlear and abducent nerves. *J. Anat.* 166:151-155.
- Hayakawa T., Itoh M., Miki T., Kaneto T., Tomiyama H., Takeuchi Y. 2000. Sympathetic fiber innervating the extraocular muscles: cells of origin in the cat superior cervical ganglion. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 77: 119-124.
- Hildebrand C., Oscarsson A., Risling M. 1988. Fibre composition of the feline trochlear and abducens nerves. *Brain Res.* 453:401-407.
- Kerns JM. 1980. Postnatal differentiation of the rat trochlear nerve. *J. Comp. Neurol.* 189:291-306.
- Manni E., Bortolami R., Pettorossi VE., Lucchi ML., Callegari E., Draicchio F. 1987. Influence of oculomotor nerve afferents on central endings of primary trigeminal fibers. *Arch. Ital. Biol.* 126:29-39.
- Manni E., Draicchio F., Pettorossi VE., Carobi C., Grassi S., Bortolami R., Lucchi ML. 1989. On the nature of the afferent fibers of oculomotor nerve. *Arch. Ital. Biol.* 127:99-108.
- Nojyo Y., Tamamaki N., Matsuura T., Sano Y. 1988. Histochemical and electron microscopical demonstration of the sympathetic nerve fibers joining to the fourth and sixth cranial nerves in rats. *Histochem.* 88:557-561.

