Rev. Biol. Trop. 34 (1): 115-121, 1986

Ultraestructura de los Nudos de Ranvier en fibras nerviosas mielinizadas del camarón *Penaeus*

Jorge Günther Nonell y Ana Lorena Howell Aguilar
Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

(Recibido: 18 de junio de 1985)

Abstract: From a comparative point of view the axonal cytology and the ultraestructure of Ranvier nodes in non-giant myelinated fibers of the shrimp *Penaeus* are described.

La velocidad de conducción es un factor crucial en cualquier sistema de comunicaciones y los sistemas nerviosos no constituyen ninguna excepción al respecto. Uno de los mecanismos desarrollados por la evolución para aumentar la velocidad de conducción nerviosa es el aislamiento eléctrico de los axones mediante una envoltura de numerosas membranas de células auxiliares (glia) dispuestas concéntricamente, envoltura que se ha designado con el nombre de mielina. En los vertebrados, esta envoltura se interrumpe a intervalos de 1 a varios milímetros descubriendo cortos segmentos de la membrana axonal en los que ésta se comunica directamente con el espacio extracelular. Estas zonas de membrana axonal desnuda se denominan nudos de Ranvier. Es en los nudos de Ranvier por donde entran y salen de la fibra nerviosa las corrientes eléctricas que producen los potenciales de acción conducidos a lo largo de la fibra. De esta forma, los potenciales de acción se generan de forma discontinua únicamente en los nudos de Ranvier lográndose con esta conducción de tipo discontinuo o saltatorio un notable incremento en la velocidad de conducción comparado con las fibras nerviosas que no disponen de mielina.

Fibras mielinizadas y conducción saltatoria han sido consideradas tradicionalmente como un rasgo distintivo de los sistemas nerviosos de los vertebrados. Sin embargo, en los últimos años ha merecido más atención el hecho de que en algunos pocos invertebrados también se encuentren fibras nerviosas mielinizadas. El estudio comparativo de estos casos ha permitido descubrir una serie de variantes interesantes con respecto a las fibras de los vertebrados (Coggeshall 1965, Günther 1973, 1976, Hama 1959, 1966, Holmes 1942, Kusano 1966, 1971).

En los crustáceos peneidos la estructura de las fibras nerviosas merece un interés especial, tanto por estar fuertemente mielinizadas, como por el hecho de que el espacio intramielínico se componga en gran parte de líquido extracelular, una situación única en el reino animal (Hama 1966). A ello hay que añadir el hecho de que se han demostrado velocidades de conducción excepcionalmente altas en las fibras gigantes abdominales de peneidos (Kusano 1966, 1971, Howell 1982). En las 2 fibras gigantes mielinizadas las únicas aperturas mielínicas distinguibles son las que corresponden a las colaterales axónicas (Kusano 1971). En las fibras mielinizadas pequeñas no pudieron encontrarse primero aperturas mielínicas (Hama 1966) pero un estudio sistemático de cortes consecutivos ha permitido localizarlas ahora.

La finalidad de este trabajo es la de dar una descripción preliminar de la morfología ultraestructural de los nudos de Ranvier en las fibras mielinizadas no gigantes del camarón *Penaeus*.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron camarones de las especies *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris*, entre 5 y 10 centímetros de longitud, procedentes de la empresa Maricultura S.A. (Chomes, Puntarenas) o criados a partir de juveniles obtenidos en el estero de Corralillo, Caldera. Para la fijación se decapita el animal y se le fija en posición supina en un recipiente, cubriéndolo inmediatamente con el fijador 1. Se le extraen rápidamente los esternitos del abdomen para facilitar el acceso del fijador al cordón nervioso ventral. Transcurrida una hora de fijación aproximadamente se procede a extraer segmentos adecuados del cordón nervioso, que se mantienen todavía una hora más en fijador 1 antes de pasarlos al fijador 2.

Los mejores resultados se obtuvieron trabajando a temperatura ambiente con un fijador 1 a base de formaldehído al 0,5% y glutaraldehído al 2% , con pH ajustado a 7,4 con cacodilato de sodio y una osmolaridad total de 850 miliosmoles ajustada con NaCl (Castille y Lawrence 1981). En algunos casos se incluyeron iones de calcio en concentraciones de 1 o 2 milimoles. El fijador 2 consistió en tetróxido de osmio al 2%, ajustado en su pH y osmolaridad de la manera indicada para el fijador 1. Las últimas preparaciones se hicieron utilizando únicamente el fijador 2, con buenos resultados.

Después de la inclusión en resina se realizaron cortes finos en un ultramicrótomo LKB que se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo y citrato de plomo para examinarlo con microscopios electrónicos de transmisión Hitachi HU-200 y 12-A.

RESULTADOS

En el cordón nervioso ventral de camarones adultos una gran cantidad de las fibras nerviosas de más de 1 micrómetro de diámetro aparecen rodeadas de mielina. Esta está compuesta por membranas dispuestas concéntricamente alrededor de la fibra de manera muy compacta, de forma que no queda espacio libre entre ellas. El número de membranas en las envolturas mielínicas puede ser muy alto. Se han llegado a contar más de 300 membranas superpuestas en la mielina de las fibras gigantes. Núcleos fusiformes de tipo glial (6 a 10 micrómetros de largo por 2 a 5 micrómetros de ancho) se encuentran a menudo tanto dentro de la mielina como en sus bordes interno o externo. En los cortes transversales la vaina mielínica aparece a menudo atravesada de forma oblicuo-espiral por una o dos estructuras análogas a las incisuras de Schmidt-Lanterman descritas en las fibras mielinizadas de los vertebrados. Se trata de diferenciaciones desmosómicas de las membranas mielínicas superpuestas parcialmente unas sobre otras de forma que esta pila de desmosomas se prolonga de forma oblicuo-espiral a través de toda la vaina mielínica. A menudo pueden distinguirse algunos microtúbulos en los espacios intracelulares mielínicos adjacentes a los desmosomas (Fig. 1).

A diferencia de las demás fibras mielinizadas conocidas en el reino animal, en las fibras de los peneidos el axón no ocupa todo el espacio disponible dentro de la vaina mielínica sino solamente una pequeña parte. El diámetro total de las fibras mielinizadas oscila entre aproximadamente 1 micrómetro en las más pequeñas hasta alrededor de 100 micrómetros o más en el caso de las 2 fibras gigantes. El diámetro correspondiente de los axones oscila generalmente entre 0,5 y un máximo de 10 micrómetros en las fibras más grandes. De esta forma puede calcularse que el axón ocupa solamente entre 1/2 y 1/200 del volumen intramielínico, correspondiendo la proporción menor a las fibras más grandes. En los cortes transversales es posible localizar al axón en cualquier parte del espacio intramielínico, pero lo más común es encontrarlo al borde de este espacio, a menudo haciendo contacto con la incisura de Schmidt-Lanterman correspondiente (Fig. 1).

Aparte del axón, el resto del espacio intramielínico se compone de abundante espacio o líquido extracelular así como de 2 elementos celulares diferentes de origen glial. El primero de ellos consta de procesos longitudinales de aproximadamente 0,2 a 1 micrómetro de diámetro, que colocados íntimamente a lo largo del axón lo acompañan longitudinalmente. Núcleos pequeños de tipo glial que se encuentran a menudo entre estos procesos y les dan origen los identifican claramente como estructuras gliales que llamamos la *glia axonal*. En el resto del espacio intramielínico se observan finas estructuras tubulares dispuestas longitudinalmente, de aproximadamente 0, 1 a 0,2 micrómetros de diámetro, y distribuidas uniformemente en el espacio intramielínico con distancias promedio entre ellas de aproximadamente 0,5 a 1 micrómetro (Figs. 1,3 y 5). Estos túbulos con-

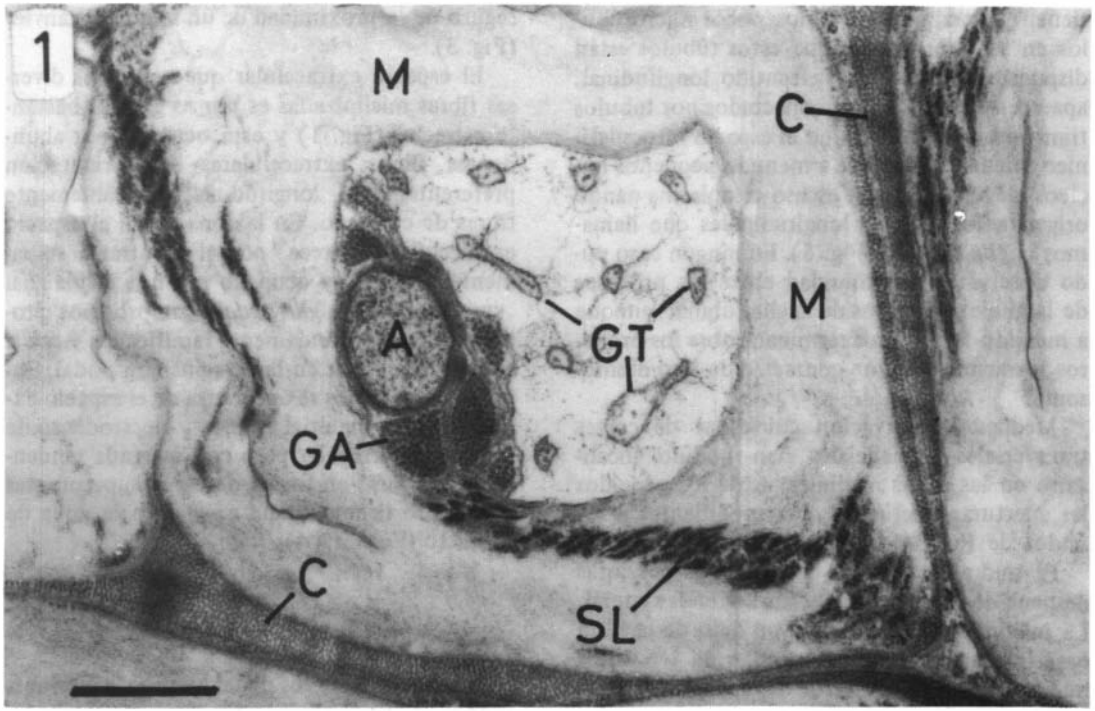

Fig. 1: Corte transversal de una fibra mielinizada pequeña, mostrando la citología axonal. A axón, M mielina, SL incisura de Schmidt-Lanterman, C fibras extracelulares de tejido conectivo, GA glia axonal, GT glia tubular. Escala 1 micrómetro.

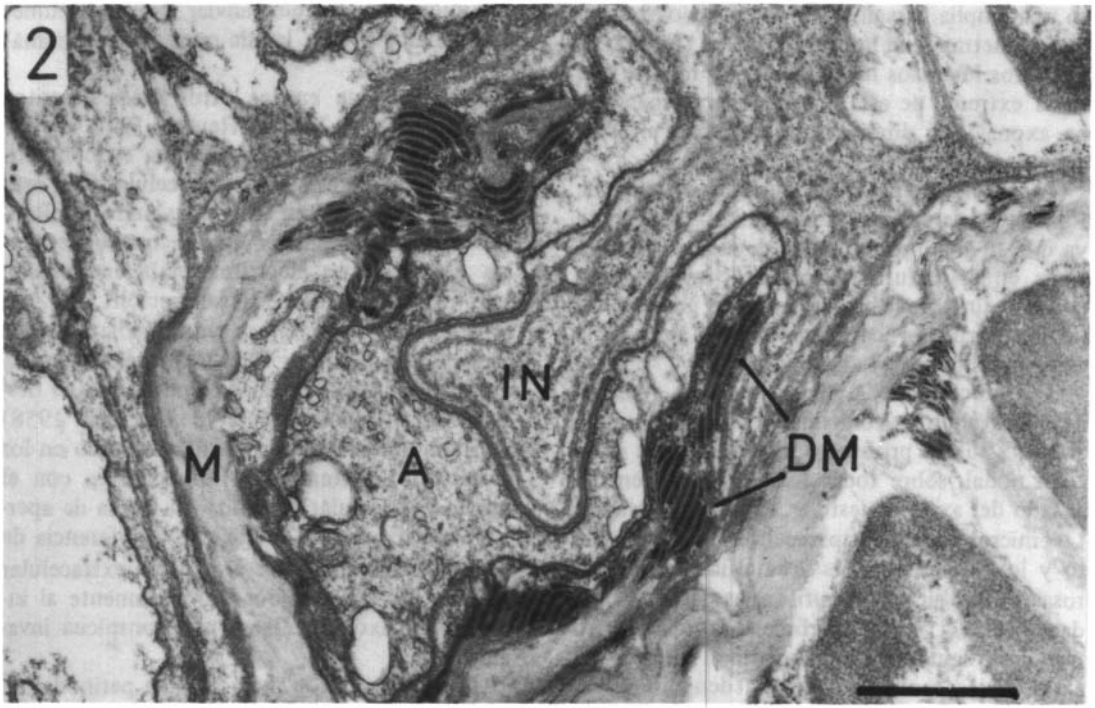

Fig.2: Nudo de Ranvier en una fibra mielinizada pequeña. Puede observarse una profunda invaginación de material extracelular (IN) penetrando al interior del axón (A). Obsérvese la diferenciación de la mielina (M) en desmosomas (DM) en la zona perinodal. Escala 1 micrómetro.

tienen generalmente algunos pocos microtúbulos en su interior. Aunque estos túbulos están dispuestos sobre todo en sentido longitudinal, aparecen a menudo interconectados por túbulos transversales. Flotando en el espacio intramielínico pueden observarse a menudo pequeños núcleos de tipo glial con escaso citoplasma dando origen a los túbulos longitudinales que llamamos la *glia tubular* (Fig. 5). En ningún caso pudo observarse continuidad entre los procesos de la glia axonal y los de la glia tubular, aunque a menudo los últimos terminan sobre los primeros formando siempre contactos de tipo desmosoma.

Mediante observación cuidadosa de cortes transversales secuenciales han podido localizarse en las fibras mielinizadas de los peneidos las aperturas mielínicas correspondientes a los nudos de Ranvier de los vertebrados.

El nudo de Ranvier en las fibras nerviosas de peneidos es de tipo apertura circular lateral. La mielina se interrumpe a un lado de la fibra para formar una apertura circular de 1 a varios micrómetros de diámetro, dependiendo del tamaño de la fibra nerviosa. El espacio extracelular penetra por esta apertura hasta hacer contacto con el axón, a menudo produciéndose incluso una amplia invaginación del espacio extracelular penetrando al interior del axón (Figs. 2,3). En todos los casos ha podido comprobarse que en el extremo de esta invaginación la membrana axonal está directamente expuesta al espacio extracelular (Fig. 2).

La mielina perinodal, que rodea el nudo de Ranvier, aparece profundamente modificada ya que en gran proporción se encuentra diferenciada en estructuras desmosómicas. Esto trae consigo un apreciable aumento del grosor de la mielina perinodal, comparado con el resto de la vaina mielínica (Figs. 2, 3 y 4).

Los procesos de la glia axonal, que, repletos de microtúbulos, acompañan longitudinalmente al axón, sufren profundas modificaciones en la zona nodal, sobre todos los que se encuentran al lado del axón opuesto a la zona de contacto. Los microtúbulos desaparecen casi por completo y los procesos gliales se ramifican en numerosas prolongaciones digitiformes de aproximadamente 0,2 a 0,3 micrómetros de diámetro que se invaginan profundamente al interior del axon. Estas modificaciones pueden observarse ya varios micrómetros antes y después de la zona nodal en sentido longitudinal, por lo que en cortes transversales consecutivos son un indicio seguro de la proximidad de un nudo de Ranvier (Fig. 3).

El espacio extracelular que separa las diversas fibras mielinizadas es por lo general bastante estrecho (Fig. 1) y está ocupado por abundantes fibras extracelulares con orientación preferentemente longitudinal, probablemente fibras de colágeno. En la zona nodal el espacio extracelular aparece por el contrario sumamente ampliado y ocupado por una célula glial que llamamos la *glia nodal* - con procesos citoplasmáticos profundamente ramificados y que a menudo penetran en la invaginación nodal. Entre estos procesos se encuentra en el espacio extracelular un material amorfo y electrodenso de disposición irregular pero con marcada tendencia a colocarse en forma de capas superpuestas bordeando la membrana axonal en la zona de contacto (Figs. 2 y 4).

DISCUSION

A pesar de que los peneidos, por la citología axonal de sus fibras mielinizadas, ocupen un lugar único en el reino animal, podemos concluir que los elementos estructurales de sus aperturas mielínicas o nudos de Ranvier muestran numerosas analogías con las de otros grupos animales.

Al igual que en los otros casos descritos (Günther 1973, 1976, Heuser 1966, Peters 1976) la membrana axonal entra en contacto directo con el espacio extracelular. De esta forma al igual que en los demás nudos de Ranvier, estas zonas pueden actuar como generadores de corrientes eléctricas en la conducción saltatoria de los potenciales de acción.

Tal como en la fibra gigante mediana de los oligoquetos (Günther 1976), pero a diferencia de los nudos de Ranvier de tipo cilíndrico descritos en crustáceos cáncridos (McAlear 1958) y palemónidos (Heuser 1966), así como en los vertebrados (Peters 1976) el contacto con el medio extracelular se realiza en forma de apertura circular lateral o agujero. A diferencia de todos los demás nudos el espacio extracelular penetra en los peneidos profundamente al interior del axón mediante una conspicua invaginación.

La diferenciación de la mielina perinodal en contactos desmosómicos la comparten los peneidos con oligoquetos y crustáceos palemónidos, en menor grado con los vertebrados, en

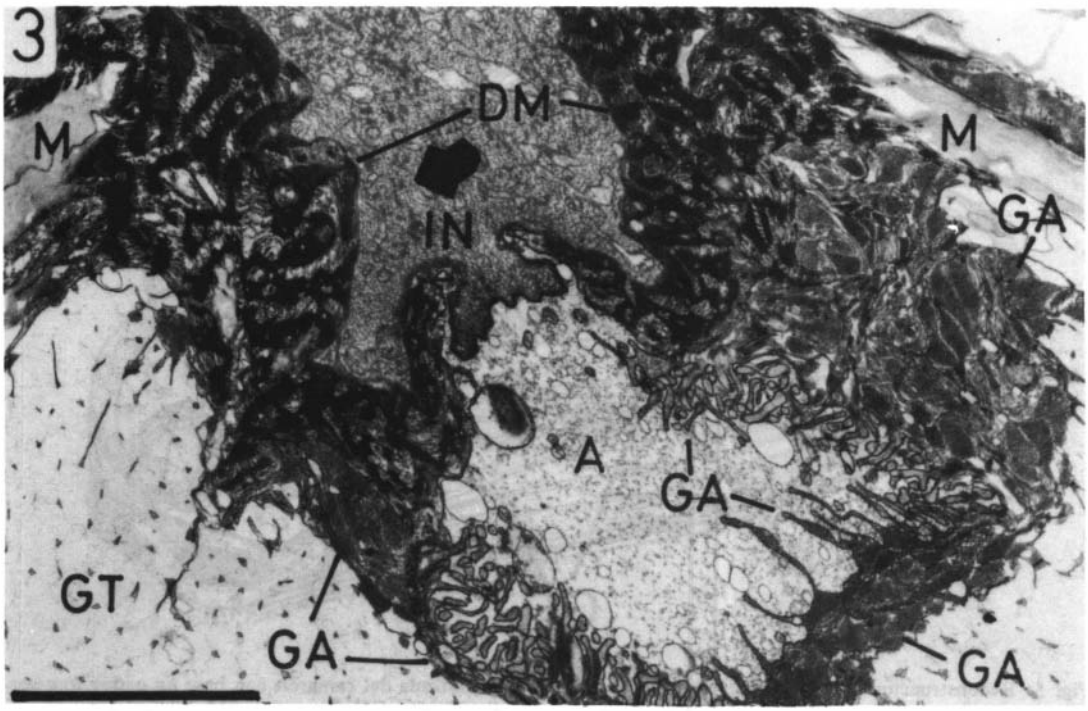

Fig. 3: Nudo de Ranvier en una fibra grande no gigante. Obsérvese la invaginación de material extracelular (IN), la diferenciación desmosómica de la mielina perinodal (DM), así como las profusas invaginaciones digitiformes de la glia axonal (GA). La mancha negra en la zona nodal es un artefacto. Escala 5 micrómetros.

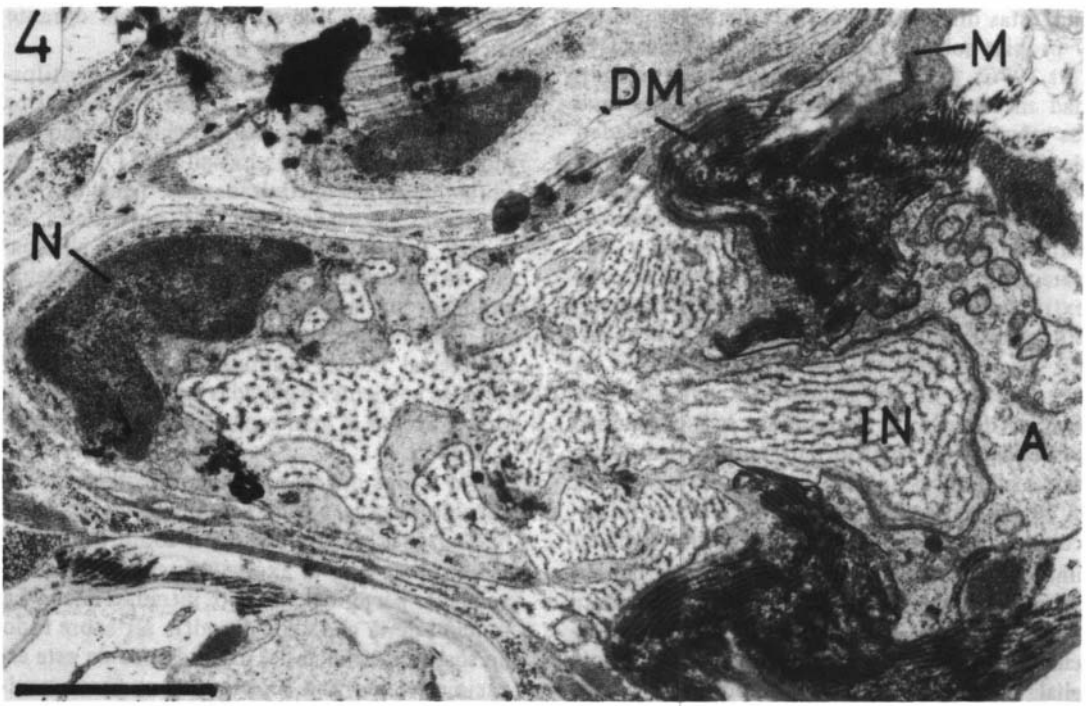

Fig. 4: Glia nodal en nudo de Ranvier. Obsérvese el núcleo (N) de la célula glial dando origen a ramificaciones citoplasmáticas, así como el material extracelular que se extiende entre estas ramificaciones así como al interior de la invaginación nodal (N). Escala 2 micrómetros.

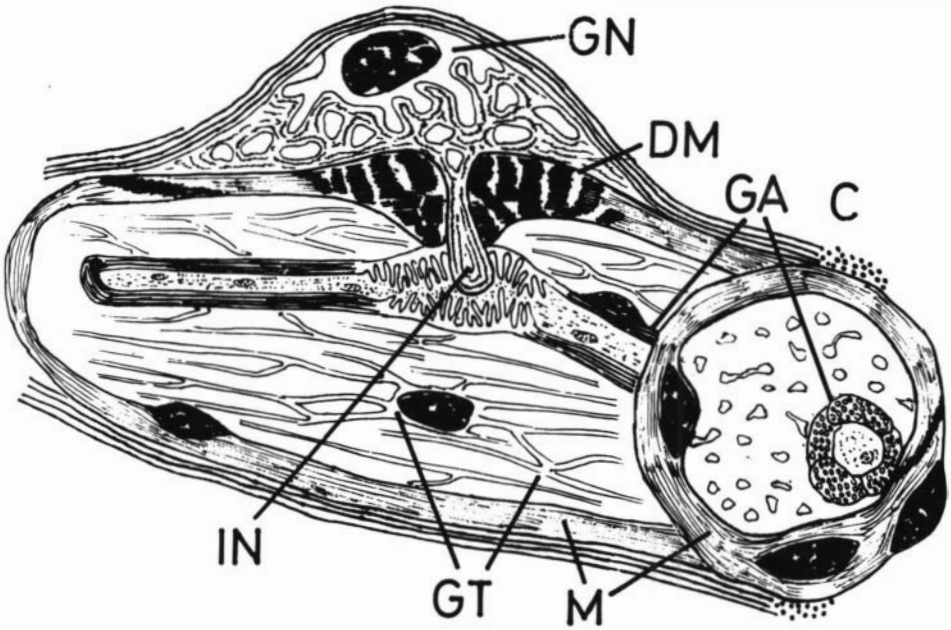

Fig. 5: Reconstrucción de un nudo de Ranvier en una fibra mielinizada del camarón con base en cortes transversales secuenciales. A axón, GA glia axonal, M mielina, GT glia tubular, GN glia nodal, DM mielina desmosomal, C fibras colágeno, IN invaginación nodal.

que éstas diferenciaciones son poco abundantes y propias sobre todo de fibras periféricas (Peters 1976). Es razonable suponer que la estabilidad mecánica del nudo de Ranvier exige que las membranas mielínicas adjacentes no pueden deslizarse entre sí, lo cual se impide mediante los ligamentos desmosómicos de esta región.

La glia nodal con procesos citoplasmáticos ramificados que cubren el área nodal y que parecieran secretar el peculiar material amorfo extracelular que se encuentre en esta zona, corresponde estrechamente a estructuras análogas en vertebrados y palemónidos, no así en oligoquetos. En los nudos de Ranvier de nervios periféricos de vertebrados se han descrito prolongaciones digitiformes ramificadas de las capas mielínicas adjacentes, que recubren desde el exterior el área nodal. En los nudos cilíndricos de los palemónidos se ha descrito también una célula nodal cuyas ramificaciones cubren el área nodal y engloban también abundante material amorfo extracelular. Es tentador especular sobre las posibles funciones de la célula glial nodal. Una función importante podría ser el restablecimiento y mantenimiento del equilibrio iónico en esta zona, equilibrio que tiende a ser alterado por las intensas corrientes iónicas que fluyen en esta zona durante la conducción saltatoria.

Finalmente, las invaginaciones digitiformes de la glia axonal en el área nodal son por lo visto exclusivas de los peneidos. Como demostraron Kusano y LaVail 1971 para las fibras gigantes mielinizadas de peneidos, las corrientes asociadas con los potenciales de acción fluyen longitudinalmente por el espacio extracelular intramielínico. Es razonable suponer que las invaginaciones de la glia axonal disminuyen sustancialmente la resistencia transversal de la membrana axonal facilitando a las corrientes generadas en el nudo de Ranvier el acceso al gran espacio extracelular intramielínico.

No se nos ocurre todavía una explicación razonable para la peculiar citología de las fibras mielinizadas de los peneidos, sobre todo para el hecho de que el axón solamente ocupe una pequeña parte del espacio intramielínico. La función de la glia axonal podría ser sobre todo de sostén mecánico del axón dentro de este espacio, función que sugieren los numerosos microtúbulos que llenan sus procesos. La función de la glia tubular es menos aparente. Podría estar involucrada en una regulación iónica espe-

cial del líquido extracelular intramielínico que facilitara la conducción en las fibras gigantes de los peneidos ya demostrado que, con unos 300 metros por segundo y más, estas fibras alcanzan records absolutos de velocidad de conducción en el reino animal (Kusano 1966, 1971, Howell 1982). Si hacemos las correcciones pertinentes para las diferencias en temperatura y en el diámetro de las fibras, podemos concluir que la eficiencia de la conducción nerviosa en los peneidos es cuanto menos la misma que en los mamíferos.

No cabe duda de que las fibras mielinizadas y sus correspondientes nudos de Ranvier en grupos animales tan dispares como vertebrados, oligoquetos y crustáceos se han originado de forma polifilética y representan una notable convergencia estructural para lograr la misma finalidad funcional de una alta velocidad de conducción. En las fibras gigantes mielinizadas de crustáceos y oligoquetos es bastante obvia la presión selectiva que ha llevado al desarrollo evolutivo de estas fibras, puesto que se ha demostrado que estos animales utilizan sus fibras gigantes en reacciones de emergencia de escape rápido. Por otra parte es muy notable el hecho de que en palemónidos y sobre todo en peneidos no solamente las fibras gigantes sino casi todas las fibras del sistema nervioso central estén fuertemente mielinizadas, una situación parecida a la de los vertebrados. Tiene que quedar sin respuesta por ahora la cuestión de por qué estos dos grupos de crustáceos han desarrollado sistemas nerviosos con características de velocidad tan parecidas al de los vertebrados.

RESUMEN

Se describe la citología axonal y la ultraestructura de las aperturas mielínicas (nudos de Ranvier) de las fibras mielinizadas no gigantes del camarón *Penaeus,* comparándolas con las características morfológicas de otros nudos de Ranvier en invertebrados y vertebrados.

REFERENCIAS

Castille, F.L. y Lawrence, A.L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus.* Comp. Biochem. Physiol. 68A: 75-81.

Coggeshall, R.E. 1965. A fine structural analysis of the ventral nerve cord and associated sheath of *Lumbricus terrestris L.* J. comp. Neurol., 125: 393-438.

Günther, J. 1973. A new type of "node" in the myelin sheath of an invertebrate nerve fiber. Experientia 29: 1763-1765.

Günther, J. 1976. Impulse conduction in the myelinated giant fibers of the earthworm. Structure and Function of the dorsal nodes in the median giant fiber. J. comp. Neurol., 168: 505-532.

Hama, K. 1959. Some observations on the fine structure of the giant nerve fibers of the earthworm, *Eisenia foetida.* J. Biophys. Biochem, Cytol., 6: 61-66.

Hama, K. 1966. The fine structure of the Schwann cell sheath of the nerve fiber in the shrimp *Penaeus japonicus.* J. Cell Biol., 31: 624-632.

Heuser, J.E. y Doggenweiler, C.F. 1966. The fine structural organization of nerve fibers, sheaths and glial cells in the prawn, *Palaemonetes vulgaris.* J. Cell Biol., 30: 381-403.

Holmes, W. 1942. The giant myelinated nerve fibers of the prawn. Phil. Trans. Roy. Soc. London B 231: 293-313.

Howell, A.L. 1982. Velocidad de conducción nerviosa de las fibras gigantes meduladas del cordón nervioso ventral de *Penaeus.* Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica.

Kusano, L. 1966. Electrical activity and structural correlates of giant nerve fibers in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) J. Cell. Physiol., 68: 361-384.

Kusano, K. y LaVail, M.M. 1971. Impulse conduction in the shrimp medullated giant fiber with special reference to the structure of functionally excitable areas. J. Comp. Neurol., 142: 481-494.

McAlear, J.H., Milburn, S. y Chapman, G.B. 1958. The fine structure of Schwann cells, nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in the central nervous system of the crab. *Cancer irroratus.* J. ultrastructure Res., 2: 171-176.

Peters, A., Palay, S.L. y Webster, H.F. 1976. The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. W.B. Saunders, Co., Philadelphia, 405 pp.