

Estudi comparat de l'estructura histològica i ultraestructural de l'òrgan de la visió de diferents espècies d'insectívors i rosegadors

1. INTRODUCCIÓ

L'òrgan de la visió de moltes espècies de vertebrats, i particularment la retina i les seves cèl·lules fotoreceptores, ha estat estudiat tant des del punt de vista morfològic com fisiològic (Ramón y Cajal, 1893; Rochon-Duvigneaud, 1943; Duke-Elder, 1958; Walls, 1963; Polyak, 1968; Duvin, 1974; Ali & Klyne, 1985b; Wässle & Boycott, 1991; Park *et al.*, 1994). Específicament entre els mamífers, els rosegadors i els primats són els que han atret més l'atenció i, per tant, són dels més coneguts. No obstant, si bé la bibliografia sobre l'ull dels rosegadors és prou àmplia, els estudis s'han fet en relativament poques espècies, sobretot en aquelles que comunament s'utilitzen en experimentació, com el ratolí, *Mus (musculus) domesticus*, (veure entre d'altres Cohen, 1960; Carter-Dawson & Lavail, 1979; Shoji *et al.*, 1998), la rata, *Rattus norvegicus*, (veure entre d'altres DiLoreto *et al.*, 1994; Mayhew & Astle, 1997; Hayashi *et al.*, 2002) i el hámster, *Mesocricetus auratus* (Calderone & Jacobs, 1999). També hi ha força estudis de la retina de diverses espècies d'esquirols (veure entre d'altres Anderson & Fisher, 1976; Jacobs *et al.*, 1980; Long & Fisher, 1983; Szel & Röhlich, 1988; McBrien *et al.*, 1993; Kryger *et al.*, 1998) degut a la predominança de cons que hi presenten, fet poc comú entre els rosegadors. Respecte als insectívors, només s'ha realitzat estudis ultraestructurals en còrnia (Branis, 1989) i retina (Grün & Schwamberger, 1980; Sigmund *et al.*, 1987) d'algunes espècies de sorícids. En aquest capítol es pretén dur a terme un estudi comparat de l'estructura histològica de l'ull de diferents espècies d'insectívors i de rosegadors per tal d'aportar noves dades que permetin determinar possibles patrons evolutius i/o mecanismes adaptatius en relació a l'ecologia de cada espècie estudiada.

2. MATERIAL I MÈTODES

Un cop enucleats i mesurats, els globus oculars de tots els individus estudiats han estat sotmesos a una sèrie de processos per tal de poder-los observar en el microscopi, tant òptic com electrònic de transmissió. En aquest apartat s'explicaran tots aquest processos, començant per la fixació.

Fixació

Com ja s'ha comentat anteriorment (veure Capítol Materials i mètodes), la fixació de qualsevol mostra histològica serveix, en primer lloc, per preservar l'estructura de les cèl·lules mantenint el seu estat el més semblant possible al que tenien en vida. A més, amb la fixació s'aconsegueixen altres beneficis com protegir els teixits del trencament que es pot provocar durant la inclusió i l'obtenció dels talls, així com preparar-los per la tinció o per l'exposició al feix d'electrons si s'observen amb el microscopi electrònic.

La fixació pot dur-se a terme per immersió de l'ull en el líquid fixador o per perfusió intracardíaca del fixador. Aquest últim procediment comporta una penetració del fixador més ràpida i uniforme que la immersió, però és un procés realment delicat en el que s'ha d'anar regulant diferents paràmetres com la temperatura, la pressió arterial de l'animal o la pressió en que s'introdueix el fixador (Hayat, 1981; Fisher *et al.*, 1993). En el cas dels ulls estudiats, degut a la seva mida reduïda, no s'ha detectat massa diferències en ambdós mètodes i per això totes les mostres han estat fixades per immersió directe en el fixador, ja que en la majoria de casos, aquest procés s'ha realitzat en el mateix lloc de la captura.

En quant al fixador, es considera que l'ideal és aquell que "mata" al teixit de forma ràpida causant la mínima retracció o dilatació de la mostra i per això és imprescindible que la velocitat de penetració sigui també ràpida, per assegurar una bona qualitat de la fixació (Kushida, 1962; Hayat, 1988). Alguns autors (Mayers, 1970; Leong *et al.*, 1985; Boon & Kok, 1992), han proposat que l'exposició de les mostres a fixar a l'acció de microones, escurça el temps de difusió dels fixadors

químics dins dels teixits, si bé s'ha de tenir molta cura en evitar l'augment excessiu de la temperatura que pugui conduir a una desnaturalització de les proteïnes. En aquest sentit, els estudis de Margo *et al.* (1992) realitzats en ulls humans han posat de manifest que les microones acceleren la penetració del formaldehid al 10% al menys 48 hores. Aquesta reducció de temps és important, ja que la retina es malmet molt ràpidament. No obstant, i degut a la mida tant petita dels ulls utilitzats, s'ha descartat la utilització d'aquest mètode, ja que la fixació s'aconsegueix en molt poc temps.

Els fixadors més utilitzats en estudis sobre l'òrgan de la visió han estat els convencionals com formaldehid (Sato 1977; Branis, 1981; Emanuele, 1994), Bouin (Bozzano *et al.*, 2001) o Carnoy (Sanyal *et al.*, 1990), si la inclusió es fa amb ceres com la parafina (Sakai, 1989) o la cel·loidina (Sato, 1977). Per la inclusió en reïnes, els fixadors més citats, encara que en diferents concentracions, són el glutaraldehid (Anderson & Fisher 1976; Grün & Schwammberger, 1980; Grim, 1990; Buttery *et al.*, 1991; Diloreto *et al.*, 1994), el paraformaldehid (Peichl & González-Soriano, 1994; Szèl *et al.*, 1994; Hack *et al.*, 1999) o la combinació dels dos aldehids (Carter-Dawson & LaVail, 1979; Fisher *et al.*, 1993; Nir *et al.*, 1995; Knabe & Kuhn, 1996; Jansen *et al.*, 1997).

Seguint les indicacions dades per tots aquests autors s'ha realitzat diverses proves amb diferents fixadors, modificant la seva concentració, el pH, l'osmolaritat i, fins i tot, la temperatura de fixació. S'ha arribat a la conclusió que els fixadors que donen millors resultats pel tipus d'estudi que es pretén realitzar són el formaldehid tamponat al 6% per a l'obtenció de talls histològics fins (entre 8 i 10 μm) i la combinació de glutaraldehid al 2.5% i paraformaldehid al 2% en tampó cacodilat sòdic 0.1 M i CaCl_2 al 0.05% per aconseguir talls semifins (1-2 μm) o ultrafins (60-80 nm).

Obtenció de talls fins

Per a l'obtenció de talls fins, entre 8 i 10 μm de gruix, s'ha utilitzat un criostat Reichert-Jung 2800 Frigocut E, del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat

de Biologia de la Universitat de Barcelona i, posteriorment, un criostat Leica CM3050 del Departament d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya (Fig. 1). S'ha optat per aquest tipus d'instrument, ja que comporta la simplificació de tots els passos previs a la microtomia convencional (deshidratació, inclusió, confecció dels blocs), així com posteriorment en el procés de tinció (no cal tornar a hidratar la mostra perquè no s'ha deshidratat mai), fets que comporten un estalvi de temps considerable i uns resultats idonis.

El criostat consta bàsicament d'un micròtom de rotació situat en una cambra



Figura 1. Criostat Leica CM3050.

refrigerada, que pot arribar a una temperatura de -43°C . El criostat utilitzat pot congelar la mostra, independentment, fins a -50°C .

Cada tipus de teixit té una temperatura de tall òptima i, després de realitzar diferents temptatives, s'ha trobat una temperatura de compromís (al

voltant de -20°C) que permet aconseguir les millors seccions del globus ocular, tot i la diferent consistència dels teixits que formen el globus ocular.

Les seccions s'han realitzat amb ganivetes d'un sol ús i tenen un gruix que pot oscil·lar entre 0.5 i $60\ \mu\text{m}$. El millor gruix per observar l'estructura dels teixits oculars ha estat entre 8 i $10\ \mu\text{m}$; a les seccions més gruixudes es produeix la superposició de les estructures situades a diferents nivells de la mostra, mentre que les més primes surten massa arrugades i no es poden aprofitar. En el cas de l'ull també hi juga en contra el fet que el cristal·lí és massa dur i es separa fàcilment de la secció, provocant que l'interior de l'ull quedi buit i es plegui amb més facilitat, o bé que arrossegui la resta de teixits, especialment la retina.

El mètode per l'obtenció de talls fins ha estat, doncs, el següent: s'ha inclòs els ulls, prèviament fixats en formaldehid al 6%, en una solució de sacarosa al 30 % per tal d'aconseguir que al seu interior hi hagi un medi molt semblant a l'utilitzat per fer el bloc (reïna d'inclusió per a baixes temperatures, Tissue Freezing Medium, TBS). Després d'un temps que ha oscil·lat entre 6 i 24 hores, s'ha col·locat els ulls a sobre d'una platina portamostres del criostat. Per a la correcta orientació d'aquests ulls, s'ha utilitzat un estereomicroscopi NIKON SMZ-2T que ha permès la visualització de la marca feta abans de l'enucleació (veure Capítol Materials i mètodes) assegurant, així, l'obtenció de seccions meridionals verticals. Tot seguit, s'ha cobert totalment els ulls amb la reïna d'inclusió anteriorment esmentada i s'ha congelat la mostra amb neu carbònica o dins del mateix criostat.

S'ha adherit les seccions obtingudes a un portaobjectes que prèviament ha estat impregnat amb una solució composta per 0.3 g de gelatina i 0.05 g de sulfat de crom i potassi, dissolts en 100 ml d'aigua, per tal de facilitar l'adhesió de la mostra. S'ha tenyit les seccions amb hematoxilina i eosina, i s'ha muntat la preparació amb un medi de muntatge transparent i permanent com el DPX.

Obtenció de talls semifins i ultrafins

Després de la fixació amb glutaraldehid i paraformaldehid, i per optimitzar la posterior deshidratació i la inclusió en reïnes, s'ha tallat per la meitat o, fins i tot en quatre trossos els ulls amb un diàmetre superior a 2.5 mm. Atès que els ulls dels diferents insectívors estudiats no superen aquest diàmetre, només s'ha tallat meridionalment els globus oculars de les diferents espècies de rosegadors.

A continuació, i seguint el procés habitual utilitzat en tècniques de microscòpia electrònica de transmissió, s'ha rentat les mostres amb cacodilat sòdic al 0.1M, per tal d'eliminar l'excés de fixador. Tot seguit s'ha procedit a realitzar una postfixació amb tetraòxid d'osmi (OsO_4) al 2% per estabilitzar i alhora augmentar la densitat als electrons de les membranes cel·lulars. Amb la postfixació, l'ull s'endureix i es torna de color negre, fet que dificulta la seva posterior orientació a l'hora de fer els blocs.

Seguidament, s'ha procedit a la deshidratació de les mostres, sotmetent-les a diferents banys de concentració creixent d'un dissolvent orgànic com l'etanol. Aquest és un pas essencial si l'ull ha de ser inclòs en reïnes insolubles en aigua. Abans de la inclusió, s'ha passat la mostra per dos banys d'uns 10 minuts cadascun amb òxid de propilè, un solvent transitori entre l'etanol i la reïna, ja que la reïna utilitzada és insoluble en etanol. Mitjançant la inclusió, l'òxid de propilè ha estat substituït per Spurr, una reïna de baixa viscositat i ràpida penetració dins dels teixits (Spurr, 1969; Fisher *et al.*, 1993). Més tard, s'ha orientat la mostra dins d'uns motlles amb una etiqueta numerada que la identifiqui, s'ha cobert amb reïna i s'ha posat a l'estufa entre 60 i 80°C fins que la reïna s'ha polimeritzat, formant els blocs.

A continuació, s'ha desbastat els blocs per un dels seus extrems (tallador de piràmides, Reicher MT 60) per obtenir una superfície de tall de forma trapezoidal. Per les seccions semifines aquesta superfície ha de ser el més petita possible, 1 o 2 mm com a màxim, ja que com indica Hayat (1981), la mida de la superfície de tall és inversament proporcional a la qualitat de les seccions. S'ha de tenir en compte, però, que la majoria dels rosegadors tenen ulls de diàmetre superior a 2 mm i per tant, per tal d'aconseguir seccions que compreguin tot el pla meridional de l'ull, la superfície del bloc ha estat més gran del que és aconsellable, amb els inconvenients que això suposa. Un cop localitzada la zona a estudiar a les seccions semifines, s'ha procedit a obtenir les seccions ultrafines, amb una superfície de tall molt més petita.

L'ultramicrotòtom que s'ha utilitzat (Reichert Ultracut, d'avanç automàtic) permet l'obtenció dels dos tipus de seccions, segons s'utilitzin ganivetes de vidre o de diamant. En el primer cas, s'ha obtingut seccions semifines que han estat tenyides, amb blau de metilè a l'1% en calent, i observades al microscopi òptic. En el segon cas s'ha obtingut seccions ultrafines, d'entre 60 i 80 nm que han estat adherides sobre gradetes de coure amb membrana (o pel·lícula de Forwar) per facilitar l'adhesió dels talls i dificultant el trencament de la mostra quan el feix d'electrons incideix sobre d'ella.

L'últim pas a realitzar abans de l'observació pel microscòpic electrònic de transmissió ha estat el contrastat de les mostres amb acetat d'uranil (2% aquós), durant 30 minuts, i citrat de plom, durant 10 minuts, per augmentar el contrast i la resolució de la imatge.

Observació microscòpica de les mostres

Amb les preparacions obtingudes s'ha estudiat les característiques histològiques i ultraestructurals pròpies de cadascun dels ulls analitzats. Per les observacions dels talls fins i semifins s'ha utilitzat els microscopis òptics NIKON Optiphot-2 i OLYMPUS CX40 del Laboratori d'Anatomia i Histologia Ocular del Departament d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya, tots dos acoblats a diferents càmeres fotogràfiques, Microflex UFX-DX i Olympus digital C-3030 ZOOM, respectivament. S'ha pres fotomicrografies que, un cop digitalitzades, s'ha utilitzat pels posteriors estudis anatòmics, histològics i morfomètrics de les mostres.

Els talls ultrafins han estat observats amb els microscopis electrònics de transmissió Hitachi H600-AB (**Fig. 2**) i H800-MT dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, que proporcionen una resolució de 0.20 nm i 0.28 nm



Fig. 2. Microscopi electrònic de transmissió Hitachi H600-AB dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

respectivament, i uns augments que oscil·len entre 100 i 300000, el primer, i entre 100 i 700000, el segon. Totes les imatges obtingudes han estat gravades en suport informàtic pel seu posterior estudi.

TÚNICA EXTERNA

Còrnia

En secció, a la còrnia de les espècies analitzades poden distingir-se clarament quatre capes, que de l'exterior a l'interior són l'epiteli anterior, l'estroma corneal, la membrana de Descemet i l'endoteli corneal (Fig. 4). En tots els casos s'ha fet difícil observar la capa de Bowman.

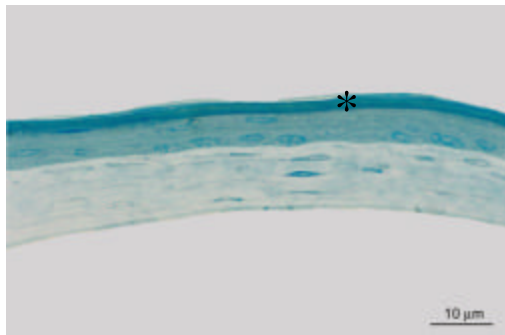
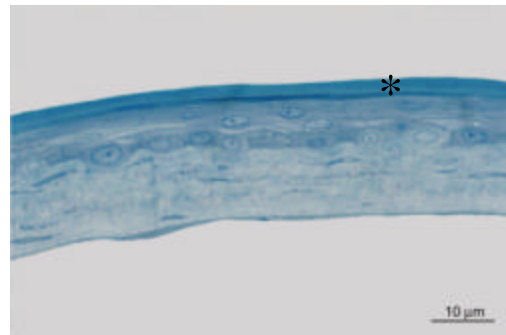
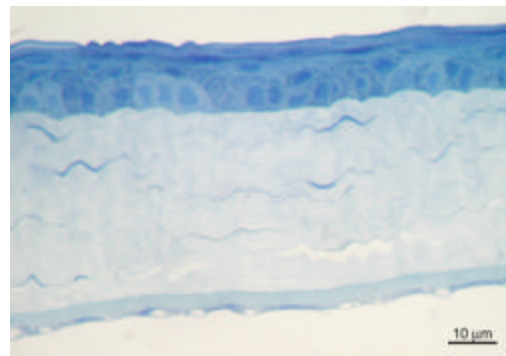
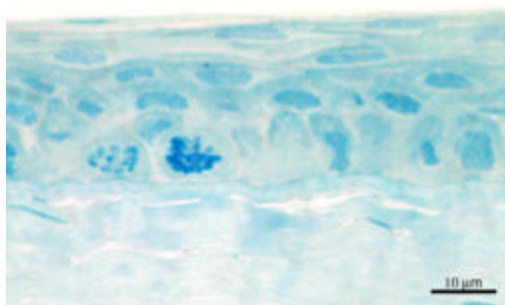
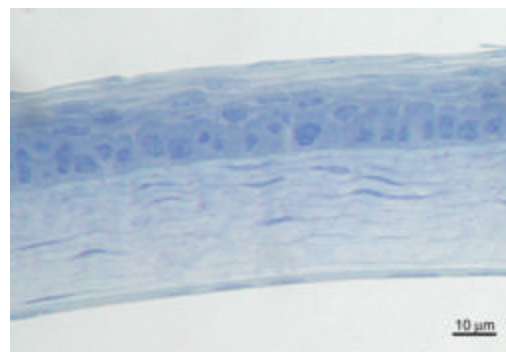
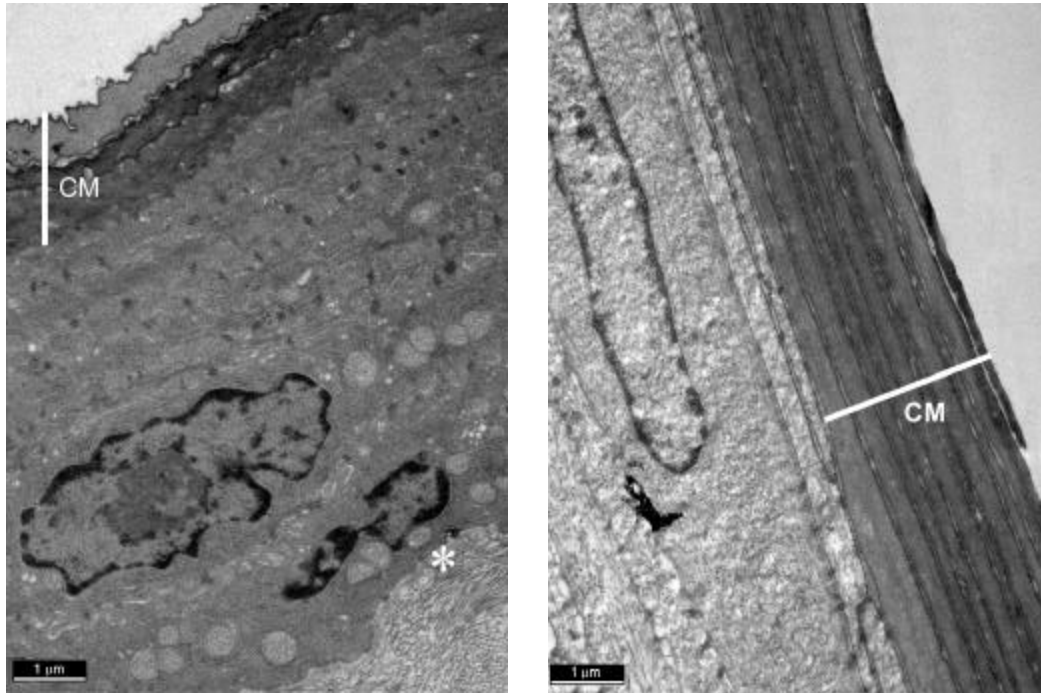
**A:** *S. minutus***B:** *S. coronatus***C:** *T. europaea***D:** *C. glareolus***E:** *A. sylvaticus***F:** *M. spretus*

Figura 4. Talls sagitals de còrnies de diferents espècies d'insectívors i de rosegadors.
* zona anterior de l'epiteli corneal dels sorícids.

Epiteli corneal

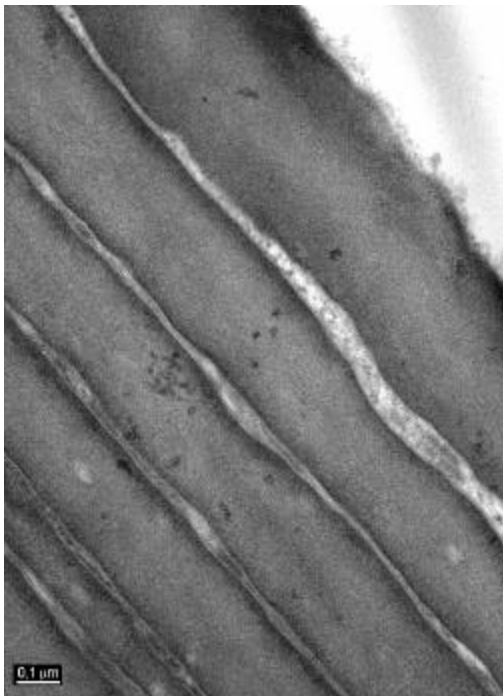
A l'epiteli anterior corneal dels insectívors estudiats, excepte a *T. europaea* (Fig. 4C) es poden distingir dues zones ben diferenciades: una zona anterior, coberta per la pel·lícula lacrimal i una de posterior, en contacte amb l'estroma corneal. La zona anterior, vista amb microscopi òptic, presenta una aparença molt lluent i contrastada, sent difícil d'identificar cap estructura cel·lular (Figs. 4-A i 4B). És birefringent en ser il·luminada amb llum polaritzada. El microscopi electrònic permet observar que es tracta d'una coberta multilaminar formada per cèl·lules mortes, distribuïdes en diverses làmines, i amb el citoplasma summament dens als electrons. Mentre que en les còrnies d'individus joves, la membrana plasmàtica és irregular i en el citoplasma encara pot distingir-se alguna resta d'òrgànuls (Fig. 5-A), en les d'adults, la membrana plasmàtica és ben llisa, el citoplasma és molt homogeni i sense òrgànuls, i les làmines són més nombroses (Figs. 5-B i 5-C). En tots els casos, les làmines estan separades entre si per espais intercel·lulars relativament grans, comparats amb els que separen les cèl·lules de la zona posterior de l'epiteli corneal (Fig. 5-C i 5-D).

La zona posterior de l'epiteli dels insectívors considerats està formada per cèl·lules epitelials que es distribueixen en 1-4 fileres. Com pot observar-se a les Figures 4-A i 4-B, aquest epitel corneal mostra una densitat cel·lular baixa, en comparació, per exemple, amb els epitelis cornials dels rosegadors (Figs. 4D, 4E, i 4F). A més, gairebé totes les cèl·lules, fins i tot les de l'estrat basal o germinatiu, adopten una disposició molt aplanada, amb un nucli el·líptic i un citoplasma cel·lular que ocupa una gran superfície (Figs. 4A i 4B; Figs. 5A, 5B i 5D). Les cèl·lules estan molt unides entre si mitjançant gran quantitat d'unions cel·lulars tipus desmosomes (Figs. 5-A i 5-D).

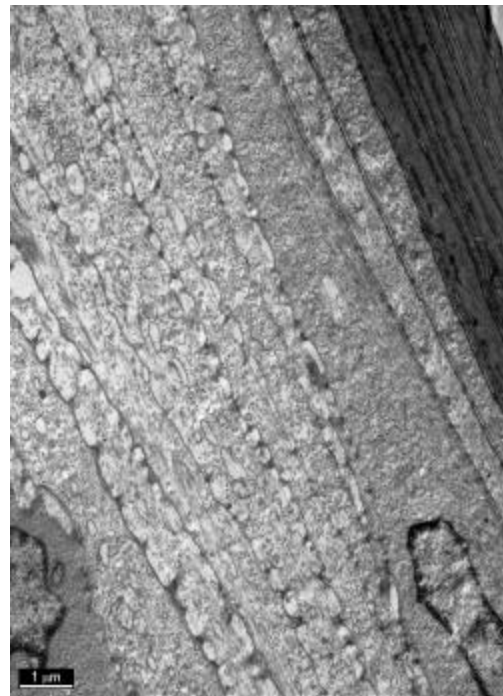


A: *S. minutus*

B: *S. araneus*



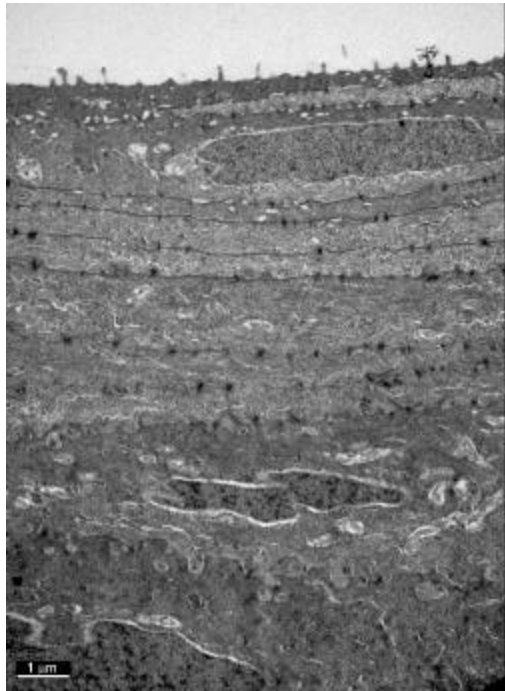
C: *S. coronatus*



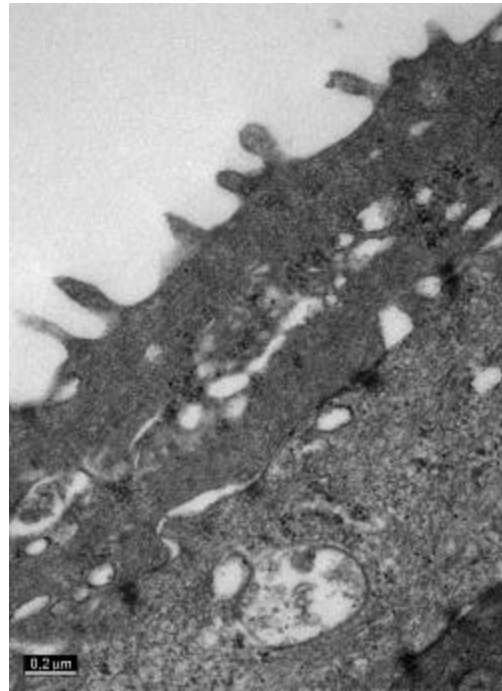
D: *S. araneus*

Figura 5. Fotomicrografies de l'epiteli corneal d'alguns sorícids estudiats. **A:** Zona anterior multilaminar d'individu jove. **B:** Zona anterior multilaminar d'individu adult. **C:** Detall de la coberta multilaminar d'un individu adult. **D:** Zona posterior de l'epiteli corneal. CM, coberta multilaminar. *, lleugera condensació de les fibril·les col·làgenes, que podria representar una capa de Bowman poc desenvolupada.

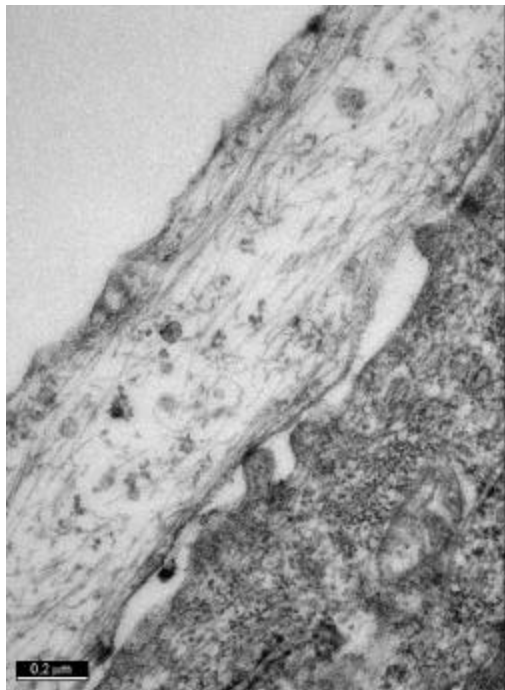
A la còrnia dels rosegadors considerats no es pot distingir la capa multilaminar anterior descrita en els insectívors. L'epiteli corneal està constituït, en general, per 4-5 fileres de cèl·lules a la zona central o pupil·lar (Figs. 4D, 4E, 4F), agrupades en tres estrats (apical, intermedi i basal), que poden distingir-se no tant per diferència de contrast, sinó per la forma i mida de les cèl·lules que els formen, especialment en la còrnia dels murins. L'estrat apical està format per 2-3 fileres de cèl·lules planes, amb el nucli paral·lel a la superfície corneal (Fig. 6-A). Les cèl·lules més superficials solen presentar microvellositats, curtes i nombroses (Figs. 6-A i 6-B), però algunes tenen la membrana apical ben llisa (Fig. 6-C), senyal inequívoca d'envelliment. Aquestes cèl·lules envellides tampoc tenen unions cel·lulars que les uneixin a les cèl·lules veïnes, el que indica que estan a punt de ser exfoliades. Les cèl·lules que estan just per sota d'aquestes cèl·lules envellides van "desplegant" les seves microvellositats per tenir-les ja formades quan es produeixi l'exfoliació de les cèl·lules més superficials (Fig. 6-C). L'estrat intermedi està constituït per 1-2 fileres de cèl·lules de nucli ovalat o lleugerament cúbic, una mica més gran que el de les cèl·lules apicals. Les seves membranes plasmàtiques, a més de desmosomes, presenten profundes interdigitacions per aconseguir una major unió entre les cèl·lules d'aquest estrat i les de l'estrat basal (Fig. 6-D). L'estrat basal està format per una sola capa de cèl·lules cúbiques o lleugerament prismàtiques, essent les més voluminoses de tot l'epiteli (Fig. 6-D). En aquest estrat poden observar-se diferents figures mitòtiques (Fig. 4-E), el que indica que són les encarregades d'anar regenerant l'epiteli per tal de contrarestar la pèrdua de les cèl·lules apicals. En algunes zones de la còrnia dels arvicols, aquesta estratificació comentada no és tan clara, ja que les cèl·lules intermèdies poden assemblar-se a les apicals o a les basals (Fig. 4D).



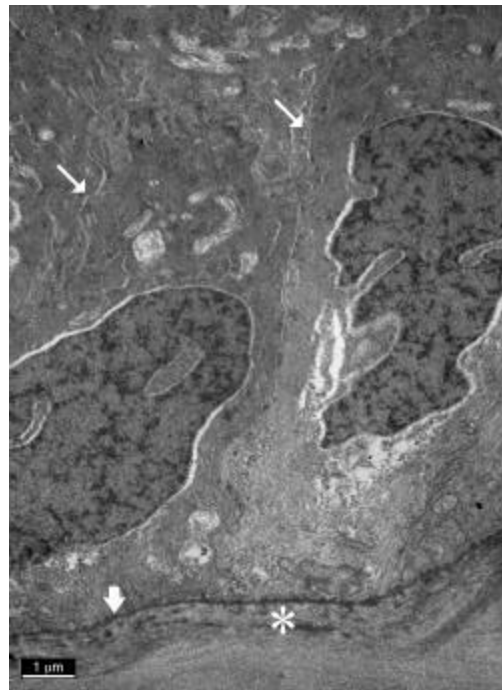
4. A



5. B



6. C



7. D

Figura 6. Fotomicrografies de l'epiteli corneal d'*A. sylvaticus*. **A:** Vista general. **B:** Cèl·lules més superficials de l'estrat apical amb microvellositats. **C:** Inici de la fase d'exfoliació d'una cèl·lula superficial. **D:** Cèl·lules de l'estrat basal, amb la membrana basal (♣) i una lleugera condensació de les fibril·les col·làgenes (*), que podria representar una capa de Bowman poc desenvolupada. ↘, interdigitacions de la membrana plasmàtica per augmentar la unió intercel·lular.

Capa de Bowman

En totes les espècies estudiades, l'epiteli corneal i la seva làmina basal descansen directament sobre l'estroma corneal ja que no s'ha pogut observar una capa de Bowman similar a la dels humans. No obstant, amb microscòpia electrònica s'observa una certa condensació de les fibril·les col·làgenes just per sota de la làmina basal de l'epiteli anterior de la còrnia que podria representar una capa de Bowman molt poc desenvolupada (Figs. 5-A i 6-D).

Estroma corneal

L'estroma de la còrnia dels insectívors i rosegadors considerats està format per un teixit conjuntiu dens, que presenta gran quantitat de fibril·les col·làgens envoltades per substància fonamental amorfa i un nombre reduït de queratòcits, que són els fibroblasts propis de la còrnia. Les fibril·les, que adopten una orientació paral·lela entre si, s'agrupen formant lamel·les i les lamel·les subjacents es disposen perpendicularment unes a les altres. Mentre que el diàmetre de les fibril·les és pràcticament constant, no passa el mateix amb el diàmetre de les lamel·les (Fig. 7-A). Sovint, en les espècies considerades, algunes fibril·les formen petits feixos que envolten als queratòcits (Fig. 7-B). Les fibril·les de les lamel·les més internes aparentment es "fonen" amb la zona anterior de la membrana de Descemet que separa l'estroma de l'endoteli corneal (Fig. 7-C).

Membrana de Descemet

La membrana de Descemet, visible en totes les espècies, pot tenir un gruix variable, depenent de l'edat de l'individu; així, és prima en els individus joves (Fig. 7-C) i més gruixuda en els individus més adults (Fig. 7-D). Al microscopi òptic mostra un aspecte homogeni (Figs. 4-D i 4F), però a l'electrònic pot distingir-se la seva doble constitució. La zona anterior té un aspecte més dens i estratificat, mentre que la zona posterior és més homogènia ja que és la membrana basal, especialment gruixuda, de l'endoteli corneal (Figs. 7-C i 7-D).

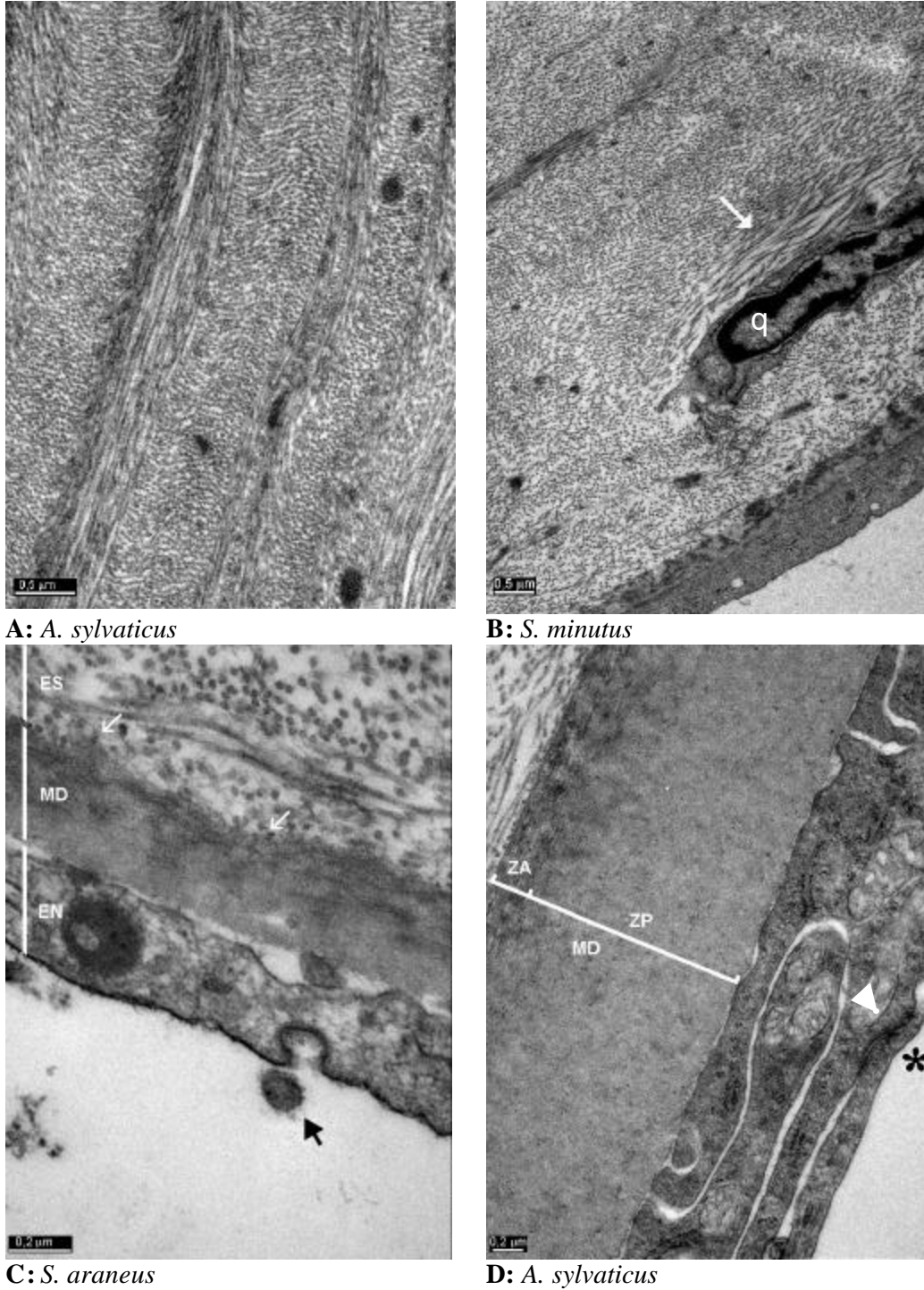


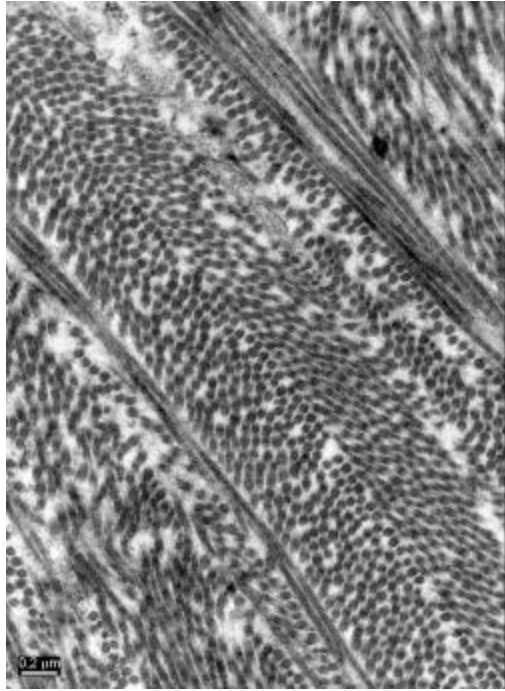
Figura 7. Fotomicrografies de la còrnia de diverses espècies estudiades. **A:** Estroma corneal. **B:** Petits feixos de col·lagen (↘) al voltant d'un queratòcit (q). **C:** Fibril·les de col·lagen (↙) de l'estroma corneal (ES) unint-se a la membrana de Descemet (MD) i intercanvi de substàncies (↗) a través de l'endoteli corneal (EN). **D:** Zona anterior (ZA) i posterior (ZP) de la membrana de Descemet (MD) i interdigitacions de les cèl·lules de l'endoteli corneal amb una expansió marginal que cobreix l'espai intercel·lular (*) mitjançant desmosomes (▼).

Endoteli corneal

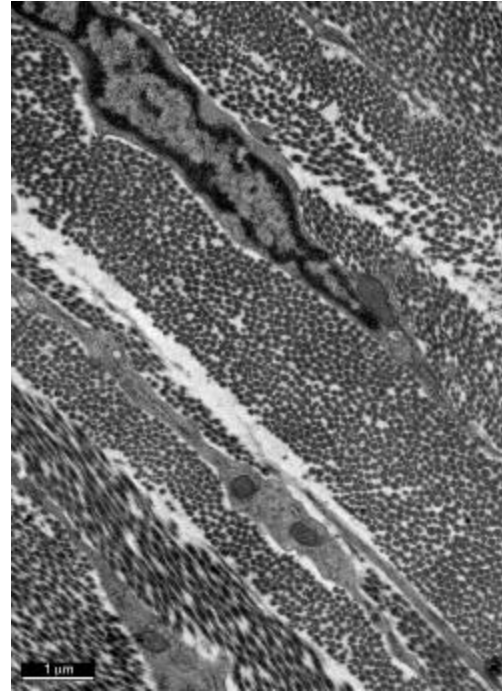
La capa més interna de la còrnia dels insectívors i rosegadors és un endoteli corneal típic. Consisteix en una única capa de cèl·lules molt planes, amb un nucli llarg i ovalat (Figs. 4-A, 4-B, 4-C, 4-F, 7-B, 7-C i 7-D). Les cèl·lules endotelials estan íntimament associades entre sí gràcies a les interdigitacions de les membranes laterals i a la gran quantitat d'unions cel·lulars (Fig. 7-D). També s'observa com les cèl·lules endotelials emeten una expansió marginal que envaeix la cambra anterior i, mitjançant desmosomes, cobreix l'espai intercel·lular, dificultant l'entrada de substàncies cap a l'interior de la còrnia. (Fig. 7-D). A més, la superfície apical, en contacte amb l'humor aquós de la cambra anterior mostra sovint la formació de vesícules pinocítiques i figures fagocítiques (Fig. 7-C) que indiquen la seva participació en l'intercanvi de substàncies entre la còrnia i l'humor aquós.

Esclera

L'esclera de totes les espècies considerades es una coberta transparent que envolta la zona posterior del globus ocular. Les característiques histològiques de l'esclera, observades en el microscopi electrònic, són pràcticament iguals en totes les espècies estudiades. Està formada quasi exclusivament per feixos de col·lagen, molt abundants, i fibroblasts (Figs. 8A i 8-B). Cada feix està constituït per un nombre variable de fibril·les col·làgenes paral·leles entre si i de diàmetre i longitud variable (Fig. 8A). Les fibril·les i els feixos de col·lagen estan densament empaquetats i separats per poca substància fonamental amorfa (Fig. 8A). Situats entre els feixos i, fins i tot, en mig de les fibril·les d'un mateix feix, s'hi troben els fibroblasts. Són cèl·lules més aviat escasses, molt primes i amb un nucli ovalat envoltat per un estret anell de citoplasma que emet unes prolongacions llargues i primes (Fig. 8B). Com que són les cèl·lules encarregades de sintetitzar el col·lagen de les fibril·les, el seu citoplasma és ple de reticle endoplasmàtic rugós i aparell de Golgi (Fig. 8C). Entre els feixos també poden trobar-se cèl·lules d'Schwann envoltant diferents àxons (Fig. 8-D).



A: *N. fodiens*



B: *C. nivalis*



C: *M. duodecimcostatus*



D: *A. sylvaticus*

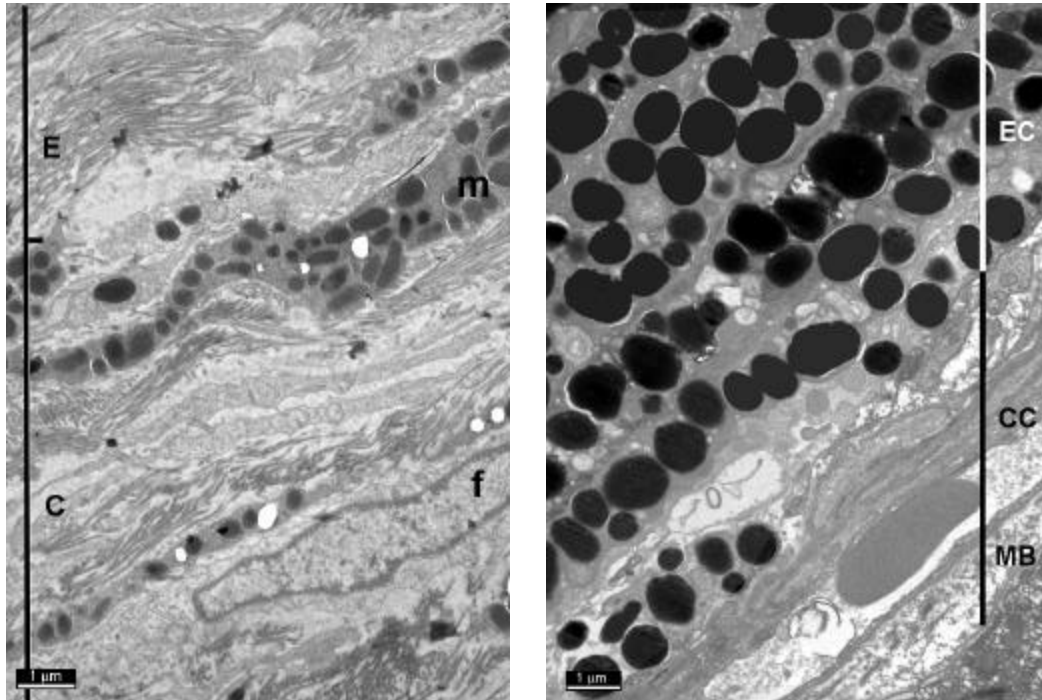
Figura 8. Fotomicrografies de l'esclera de diverses espècies estudiades. **A:** Fibril·les de col·lagen agrupades en feixos **B:** Fibroblasts envoltats per feixos de col·lagen. **C:** Detall d'un fibroblast amb el reticle endoplasmàtic rugós i aparell de Golgi ben desenvolupat, i fibril·les col·làgenes acabades de sintetitzar. **D:** Cèl·lula d'Schwann envoltant diferents àxons, en mig de feixos de col·lagen.

TÚNICA MITJANA

Coroide

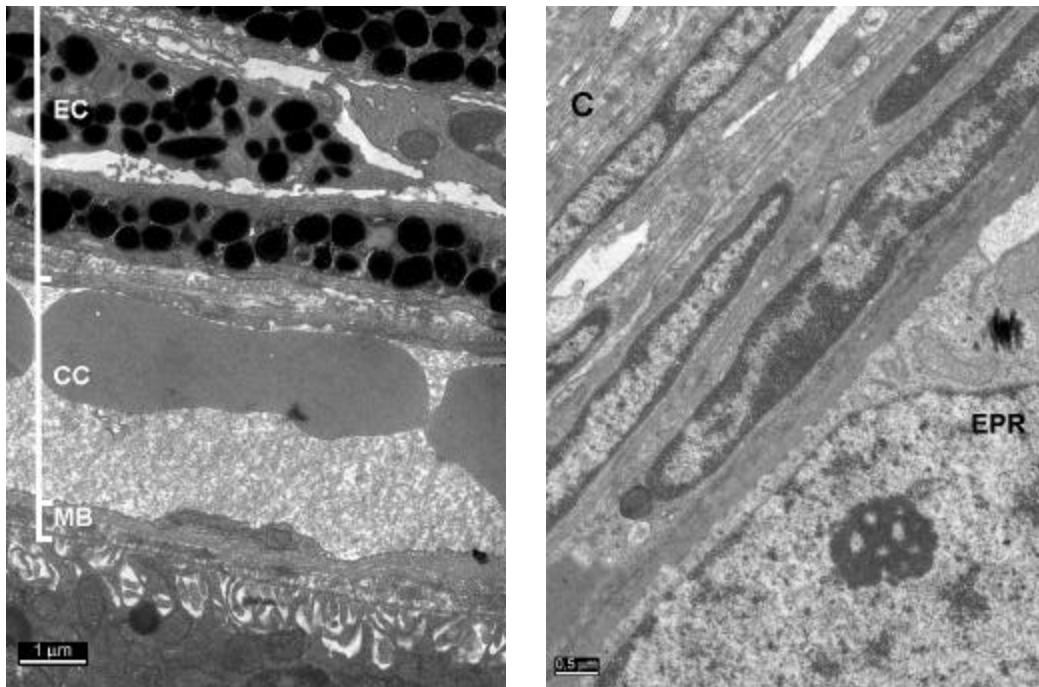
En general, la coroide dels insectívors i rosegadors analitzats està formada per un teixit conjuntiu lax, fortament pigmentat i vascularitzat. Les fibril·les de col·lagen de l'estroma es disposen formant feixos poc densos (Fig. 9-A) separats per cèl·lules, vasos i nervis. A la regió més interna de l'estroma coroïdal hi ha una gran quantitat de cèl·lules pigmentades, majoritàriament melanòcits (Figs. 9-B i 9-C). Aquesta pigmentació és la responsable de la coloració fosca característica de l'ull d'aquestes espècies, ja que l'esclera és transparent. També s'observen altres cèl·lules com ara fibroblasts (Fig. 9A). L'altre característica de la coroide és que conté gran quantitat de vasos sanguinis de gran calibre a l'estroma i multitud de capil·lars a la coriocapil·lar, a tocar amb l'epiteli de la retina. Aquests capil·lars, que es disposen en un únic pla paral·lel a la superfície externa ocular, presenten una llum àmplia, el que permet que les cèl·lules sanguínies no hagin de circular d'una en una com a la resta de capil·lars (Figs 9-B i 9-C). L'endoteli que cobreix la zona interna d'aquests capil·lars presenta gran quantitat de fenestracions per facilitar la transferència de nutrients des de la coroide a la retina. La membrana de Bruch presenta la mateixa constitució que a la resta de mamífers (Figs 9B i 9-C). No s'ha pogut distingir *tapetum lucidum* en cap espècie analitzada.

La coroide de *T. europaea* és clarament diferent a la resta ja que és molt prima i no té cap cèl·lula pigmentada. Així, la coroide en aquesta espècie està constituïda, majoritàriament, per cèl·lules allargades, semblants als fibroblasts, i vasos sanguinis distribuïts de forma disseminada externament a l'epiteli pigmentat de la retina (Fig. 9-D). Fins i tot en algunes zones, aquest epiteli sembla establir contacte directe amb l'esclera. Com que aquest epiteli és molt gruixut i està ple de pigment, l'ull del talp també és de color negre com la resta d'espècies estudiades.



A: *C. nivalis*

B: *S. araneus*



C: *C. glareolus*

D: *T. europaea*

Figura 9. Fotomicrografies de la coroides de diverses espècies estudiades. **A:** Zona externa de l'estroma de la coroides (C) en contacte amb l'esclera (E), amb melanòcits escassos (m) i fibroblasts (f). **B i C:** Zona interna de l'estroma coroidal (EC) fortament pigmentada, en contacte amb la coriocapil·lar (CC) i la membrana de Bruch (MB). **D:** Coroides, no pigmentada, i epitel·li pigmentat de la retina (EPR) de *T. europaea*.

Cos ciliar

El cos ciliar de les espècies estudiats és, en general, molt reduït, representant una part molt petita de la túnica mitjana. La porció posterior o pars plana acostuma a ser molt prima. Mostra una llargada diferent segons l'espècie, però en tots els casos és bastant curta (Figs. 10-A i 10-G) i, fins i tot, sembla no haver-n'hi en algunes seccions examinades (Fig. 10-E). La porció anterior o pars plicata és més gruixuda, observant-se diferències en quant a la mida i disposició dels processos ciliars segons les espècies. Així, en els insectívors, i concretament en els representants de la subfamília dels sorícins, hi ha petits processos de superfície rugosa que en secció apareixen com curtes prolongacions que sobresurten lleugerament cap a la cambra posterior (Fig. 10-A). En canvi, *C. russula* mostra un cos ciliar pràcticament uniforme a on es fa difícil distingir la pars plana de la plicata, ja que la superfície interna és ben llisa en tota la seva longitud (Fig. 10-B). Els processos ciliars de *T. europaea* són arrodonits i sobresurten molt poc cap a l'interior (Fig. 10-C). En el cas dels rosegadors, els processos ciliars estan ben desenvolupats i presenten una sèrie de prolongacions a la superfície interna que es dirigeixen cap el cristal·lí però sense arribar-hi. L'aspecte i nombre d'aquestes prolongacions varia en funció de la zona i direcció del tall més que no pas de l'espècie, podent ser curtes i primes (Fig. 10-G) o llargues, primes i ben separades unes de les altres (Figs. 10-D i 10-F), més aviat gruixudes i agrupades (Fig. 10-E) o formant només una gran prolongació (Fig. 10-E).

Estroma ciliar

L'estroma del cos ciliar dels insectívors i dels rosegadors estudiats està constituït per fibril·les col·làgenes, fibroblasts i alguna cèl·lula pigmentada, a més de nervis i vasos sanguinis, especialment a la zona dels processos (Fig. 10-H). Les fibril·les col·làgenes són molt primes i s'agrupen en petits feixos dispersos al voltant dels fibroblasts i de les cèl·lules pigmentades, menys nombroses que en l'estroma de la coroide. Immers en aquesta xarxa de teixit conjuntiu lax s'hi troba un nombre molt reduït de fines fibres de teixit muscular llis que conformen un múscul ciliar molt poc desenvolupat. Es disposen només a la pars plana i a la zona més posterior de la pars plicata ja que, en totes les espècies d'insectívors i rosegadors considerades,

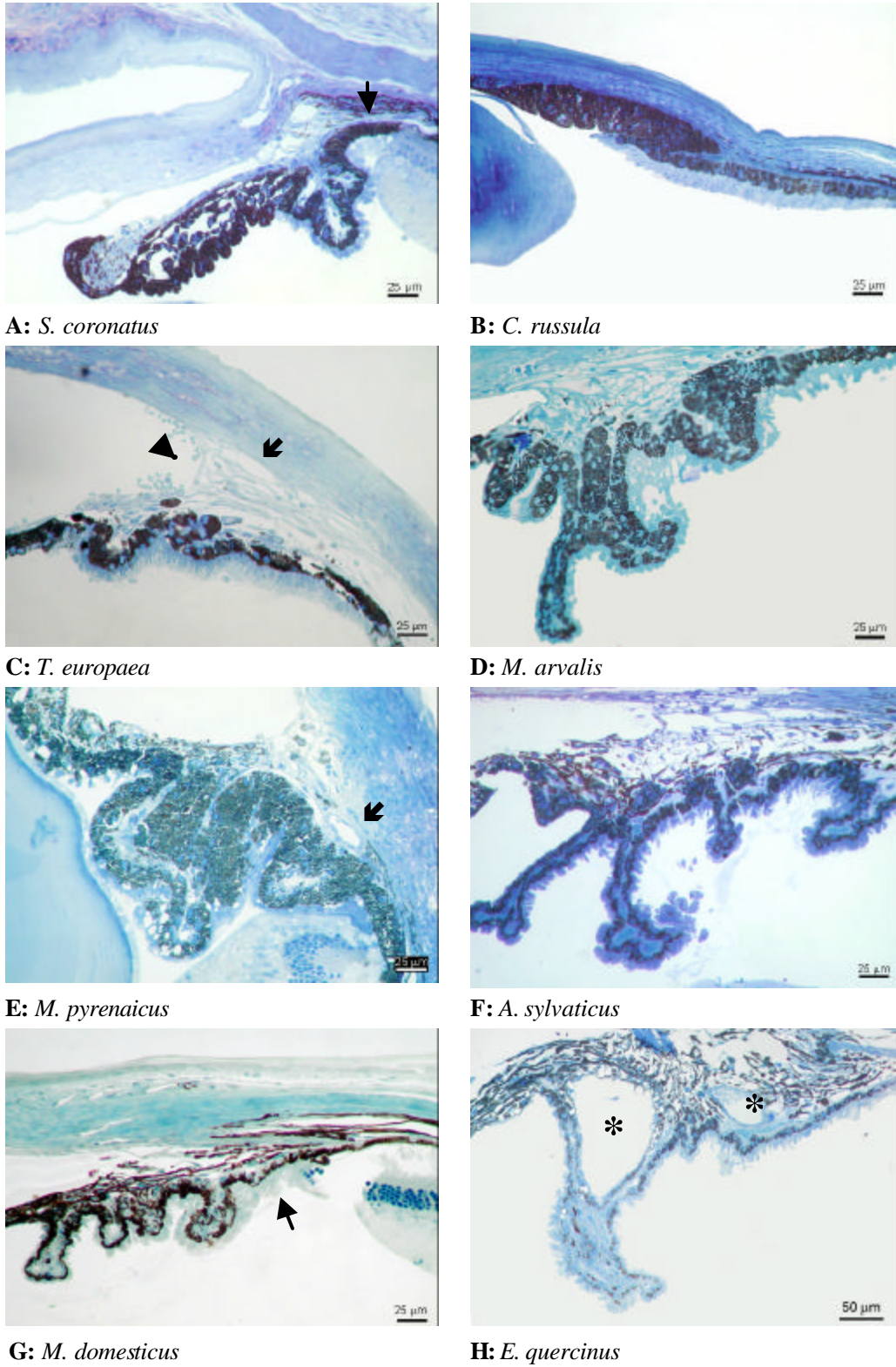


Figura 10. Talls sagitals del cos ciliar de diferents espècies d'insectívors i de rosegadors. ↓, pars plana. *, vasos sanguinis a l'estroma ciliar; ↘ canal d'Schlemm, ▼, xarxa trabecular.

l'angle de la cambra anterior es situa molt enrera originant l'espai cilio-escleral. Aquest espai està ocupat pel canal d'Shlemm (Figs. 10-C i 10-E) i per la xarxa trabecular (Figs. 10-C i 11-A), per on es drena l'humor aquós que omple la cambra anterior i posterior del globus.

En totes les espècies estudiades, la superfície interna del cos ciliar està coberta per dos epitelis, el pigmentat i el no pigmentat, que representen la retina cega ciliar. Ambdós epitelis estan formats per una única capa de cèl·lules encarades pels seus pols apicals.

Epiteli pigmentat del cos ciliar

Les cèl·lules de l'epiteli pigmentat estan tan plenes de grànuls de melanina que, amb el microscopi òptic, només poden distingir-se els nuclis, majoritàriament esfèrics (Fig. 10). Amb el microscopi electrònic s'observa una gran quantitat de grànuls de melanina, en diferents estadis de maduració, que adopten una forma rodona o ovalada, i que es situen preferentment al pol apical de les cèl·lules (Fig. 11-B). El pol basal presenta nombroses invaginacions, si bé no són tan profundes com en l'epiteli no pigmentat. Està separat de l'estroma per una membrana basal llisa, que no resegueix les invaginacions (Fig. 11-C).

Epiteli no pigmentat del cos ciliar

L'epiteli no pigmentat del cos ciliar de totes les espècies està format per cèl·lules amb nuclis de forma diferent, segons la zona observada. Mentre que a la pars plana acostumen a ser planes amb el nucli ovalat, a la pars plicata solen ser planes, cúbiques o, fins i tot, prismàtiques. A les figures 11-B i 11-D pot observar-se diferents morfologies de les cèl·lules de l'epiteli no pigmentat a la pars plicata del cos ciliar del mateix individu d'*A. sylvaticus*. En totes les espècies, el citoplasma és ple de mitocondris. A la membrana del pol basal apareixen unes llargues invaginacions que quasi bé arriben fins a la zona nuclear (Figs. 11-B i 11-D). Com a l'epiteli pigmentat, la membrana basal, adjacent a la superfície basal de l'epiteli, es presenta com una làmina contínua sense entrar dins de les invaginacions (Figs. 11-

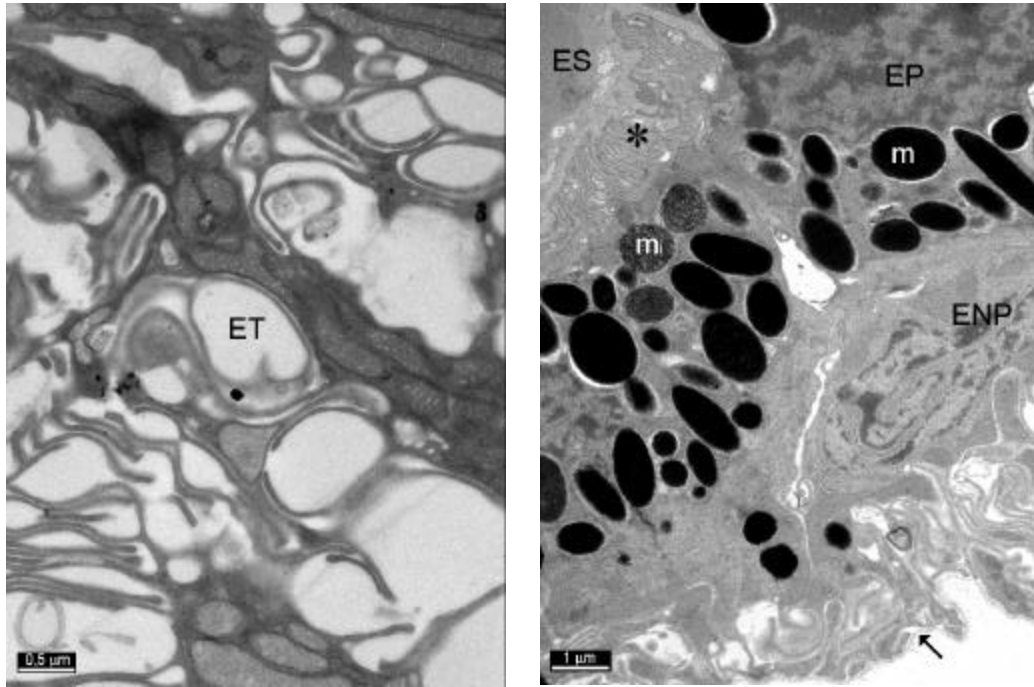
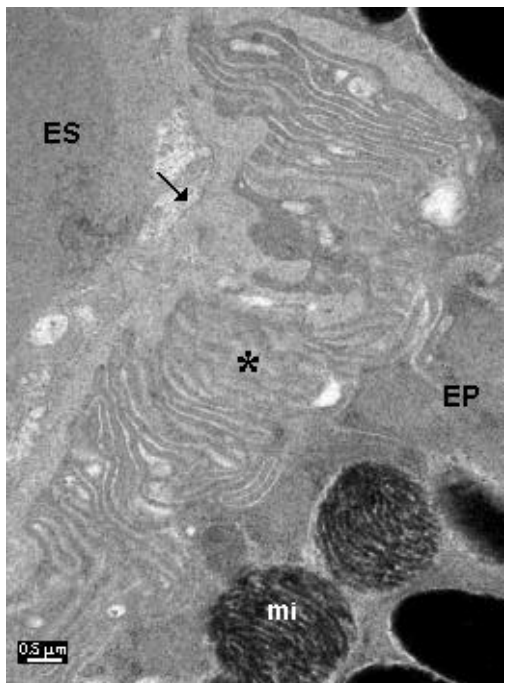
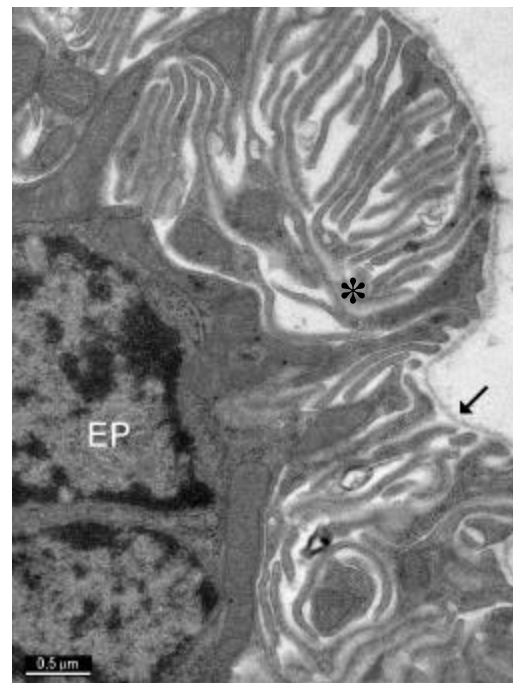
A: *M. arvalis*B: *A. sylvaticus*C: *A. sylvaticus*D: *A. sylvaticus*

Figura 11. A: Microfotografia de la xarxa trabecular amb espais trabeculars (ET) de diferent grandària. B, C i D: Microfotografies dels epitelis del cos ciliar d'*A. sylvaticus*. EP, epiteli pigmentat; ENP, epiteli no pigmentat; ES, estroma ciliar; m, grànul de melanina; m_i, grànul de melanina inmadur; *, invaginacions de la membrana del pol basal de les cèl·lules epitelials; ↙, membrana basal de les cèl·lules epitelials.

-B i 11-C). En individus adults, la superfície basal d'aquest epitelí es torna més irregular mentre que els espais intercel·lulars augmenten, assolint un aspecte dentat característic (Figs. 10-D, 10-F i 10-H).

Iris

De la zona anterior del cos ciliar de tots els ulls estudiats sobresurt l'iris, que es situa per damunt de la cara anterior del cristal·lí delimitant, d'aquesta manera, les dues cambres d'humor aquós: la cambra anterior, més àmplia, i la posterior, una franja estreta per davant de la zona equatorial i anterior del cristal·lí (veure Figs. 5 i 6 del Capítol 2). Les observacions microscòpiques de l'iris han permès distingir l'estroma, els dos epitelis pigmentats de l'iris (l'epitelí pigmentat anterior o mioepitelí i l'epitelí posterior) i els músculs de l'iris (el múscul constrictor i el múscul dilatador de la pupil·la).

Estroma de l'iris

Observat en microscòpia òptica, l'estroma de l'iris està format per un teixit conjuntiu lax, generalment molt prim, no massa pigmentat i bastant vascularitzat (Fig. 12). Entre les fibres col·làgenes s'ha pogut apreciar diferents tipus de cèl·lules, algunes de pigmentades (majoritàriament melanòcits) i altres de no pigmentades (majoritàriament fibroblasts) i un gran nombre de vasos sanguinis (Fig. 12-C). A l'arrel de l'iris, els petits feixos de col·lagen es continuen amb els de l'estroma del cos ciliar i la xarxa trabecular contribuint a delimitar l'espai cilio-escleral (Fig. 10-C, fins 10-F). A l'altre extrem, a la vora pupil·lar, s'hi troba el múscul constrictor de la pupil·la o esfínter pupil·lar.

Epitelis de l'iris

Els dos epitelis pigmentats posteriors són monoestratificats i es continuen amb els dos epitelis de la retina cega ciliar. Ocupen la major part de l'iris, especialment l'epitelí anterior o mioepitelí, molt més gruixut que el posterior (Figs. 12-B i 12-F). Tant la pigmentació de l'estroma com la dels dos epitelis posteriors contribueixen a

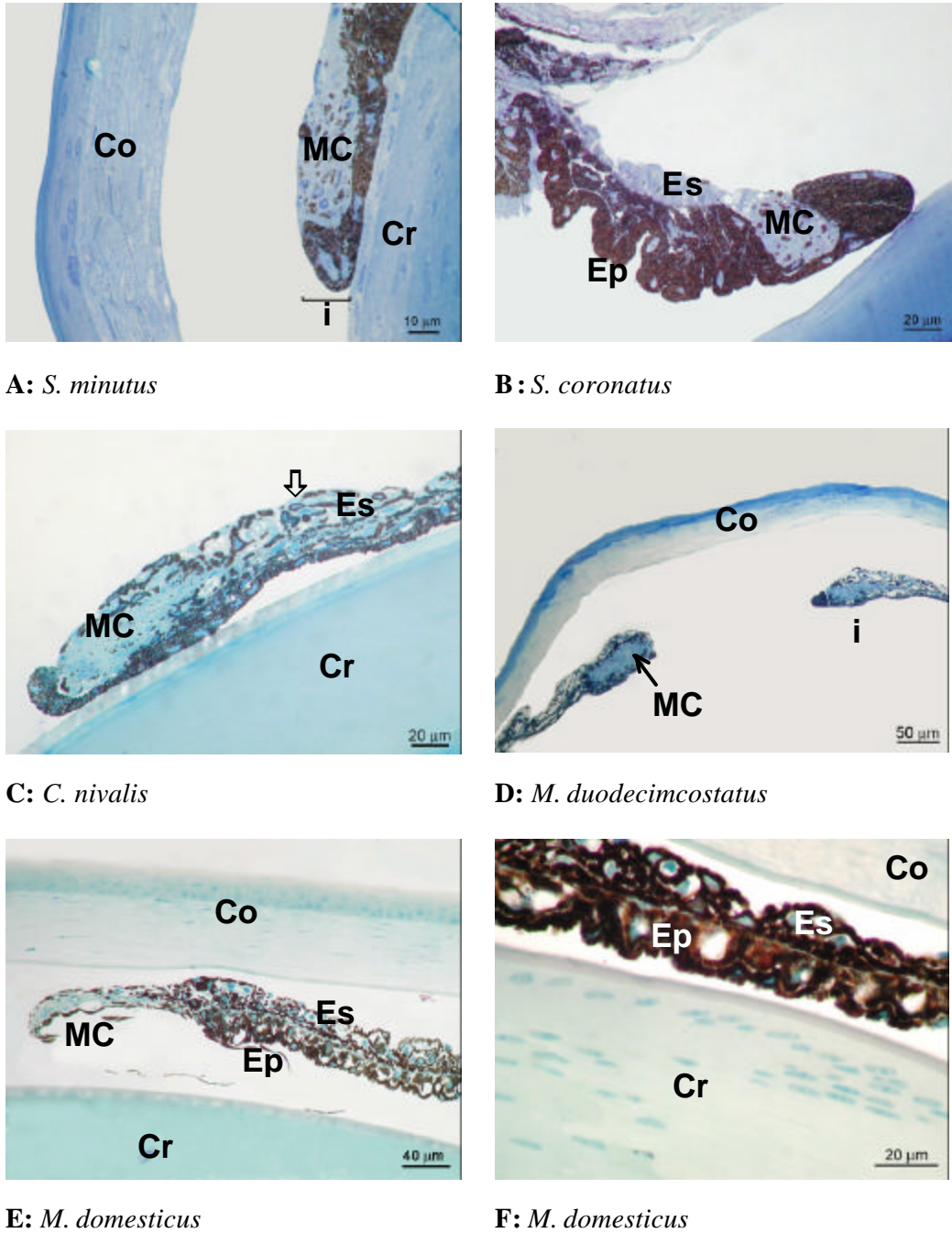


Figura 12. Talls sagitals d'iris (i) de diferents espècies d'insectívors i de rosegadors. MC, múscul constrictor de la pupil·la; Ep, epitelis pigmentats de l'iris; Es, estroma de l'iris; Co, còrnia; Cr, cristal·lí; ↓, vasos de l'estroma.

la coloració fosca que presenta l'iris de totes les espècies estudiades, imprescindible per absorbir els raigs de llum laterals que d'altra manera podrien crear aberracions òptiques i enlluernament.

Músculs de l'iris

El múscul constrictor de la pupil·la o esfínter pupil·lar presenta diferents graus de desenvolupament segons les espècies. A *C. russula* (Fig. 10-A) i *T. europaea* està poc desenvolupat, mentre que als soricins ocupa una bona part de la zona pupil·lar (Figs. 12-A i 12-B). En els arvicolins (Figs. 12-C i 12-D), la disposició de l'esfínter atorga una forma arrodonida a la vora pupil·lar a diferència dels murins que, amb un múscul menys voluminós, presenten aquesta zona llarga i molt prima (Fig. 12-E). En totes les espècies, les cèl·lules musculars formen petits feixos, que es disposen de forma concèntrica al voltant de la pupil·la, entre els quals poden observar-se petites inclusions de melanina (Figs. 12-A, 12-B, 12-C, 12-D).

El múscul dilatador és difícil de distingir en microscòpia òptica ja que en realitat són prolongacions petites i curtes que sobresurten dels pols basals de les cèl·lules de l'epiteli anterior o mioepiteli i s'endinsen cap a l'estroma.

Tant en els insectívors com en els rosegadors estudiats, l'iris és una membrana discoïdal de color fosc que delimita una pupil·la de forma circular. La vora pupil·lar mostra unes ondulacions que li confereixen un aspecte dentat, tal i com es pot apreciar a les Figures 13-A i 13-B. El grau de contracció pupil·lar ha estat variable, podent-se observar individus amb un alt grau de dilatació pupil·lar (midriasi) (Fig. 13-A) i altres amb una forta contracció pupil·lar (miosi) (Fig. 13-B). Les diferències entre aquests dos estats ha estat evident; en l'ull midriàtic, la superfície de l'iris adopta una forma abrupta, amb unes protuberàncies arrodonides que sobresurten de la cara anterior, més prominents a la regió pupil·lar que a la ciliar (Fig. 12-F). En canvi, en estat miòtic els plecs circulars són menys conspicus i queden limitats a la regió pupil·lar, sent la regió ciliar més llisa i uniforme. (Fig. 12-A).

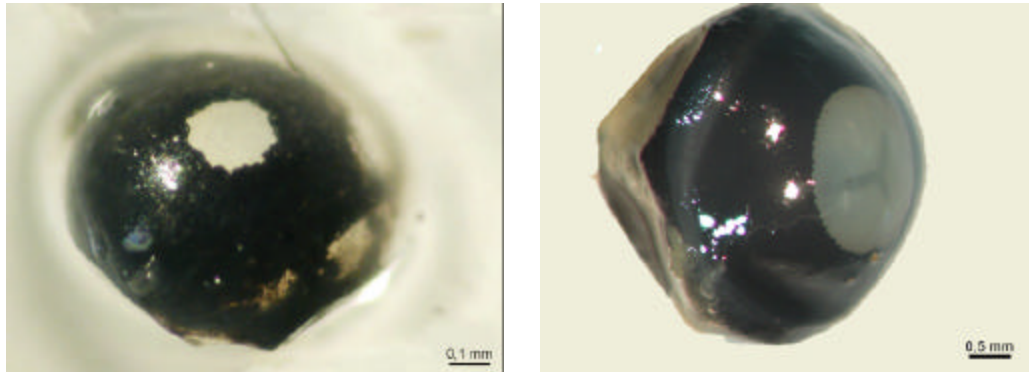
**A:** *S. coronatus***B:** *A. sylvaticus*

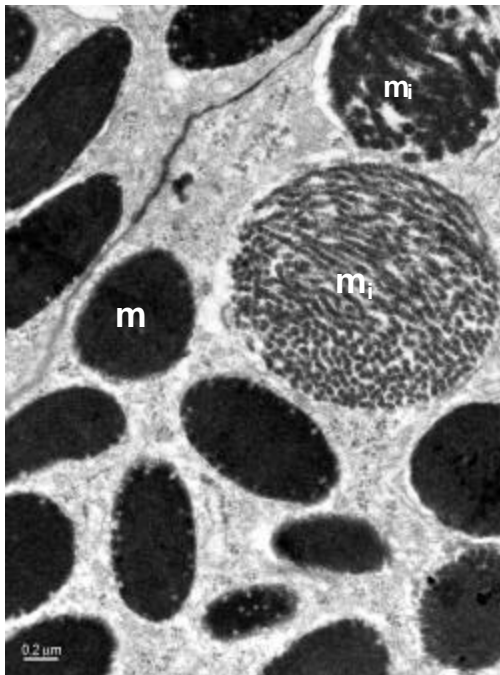
Figura 13. Aspecte dentat de la vora pupil·lar de dues espècies estudiades, en miòsi (**A**) i midriasi (**B**).

TÚNICA INTERNA

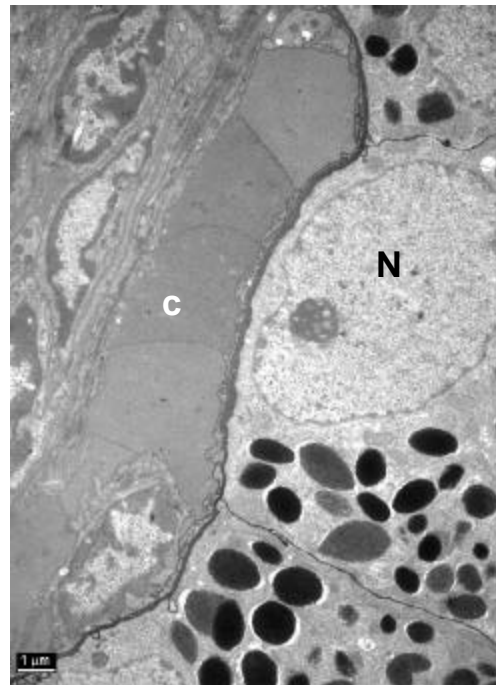
La túnica interna segueix el mateix patró descrit per a tots els mamífers. Es pot dividir en la retina cega i la retina visual. La retina cega es correspon amb els dos epitelis ciliars i de l'iris, ja descrits anteriorment. La retina visual de totes les espècies estudiades es troba delimitant internament al segment posterior de l'ull, des de la papil·la òptica fins l'ora serrata. En cap cas s'ha pogut observar la presència de fòvea o retina central. Com en tots els mamífers, la retina visual d'insectívors i rosegadors està formada per un epiteli pigmentat i la neuroretina.

Epiteli pigmentat de la retina

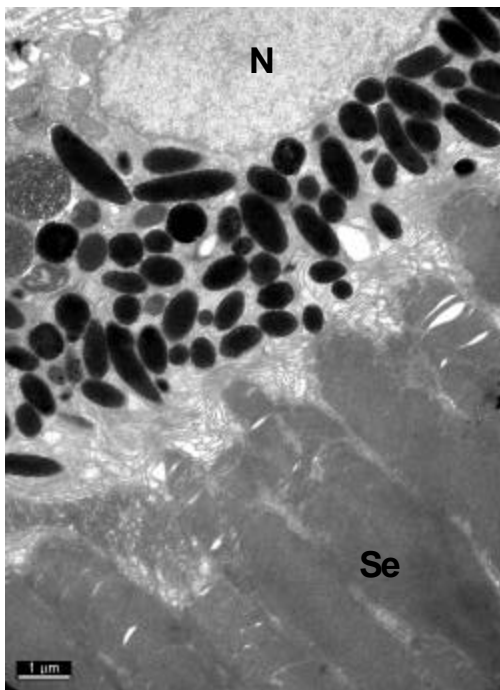
La capa més externa de la retina és un epiteli pigmentat format per una única capa de cèl·lules planes o cúbiques que, en seccions tangencials, es disposen formant un mosaic bastant regular de "peces" poligonals. En el citoplasma d'aquestes cèl·lules epitelials, a més dels orgànuls habituals, hi predominen mitocondris i sobretot grànuls de melanina. En totes les cèl·lules s'ha observat grànuls de melanina en diferents estadis de maduració. Els grànuls més immadurs presenten un aspecte puntejat o bandejat degut a la encara poca quantitat de pigment, assolint un aspecte homogeni i completament fosc en estar plens de melanina quan ja estan formats (Fig. 14-A). En totes les espècies de sorícids, la quantitat de grànuls de pigment és bastant



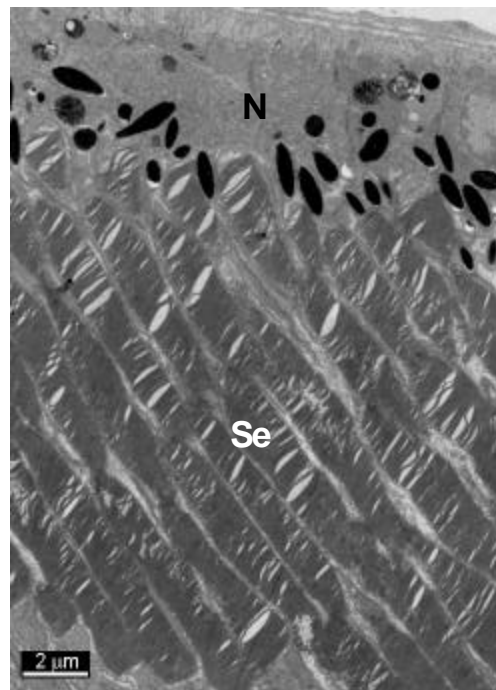
A: *N. fodiens*



B: *T. europaea*



C: *C. glareolus*

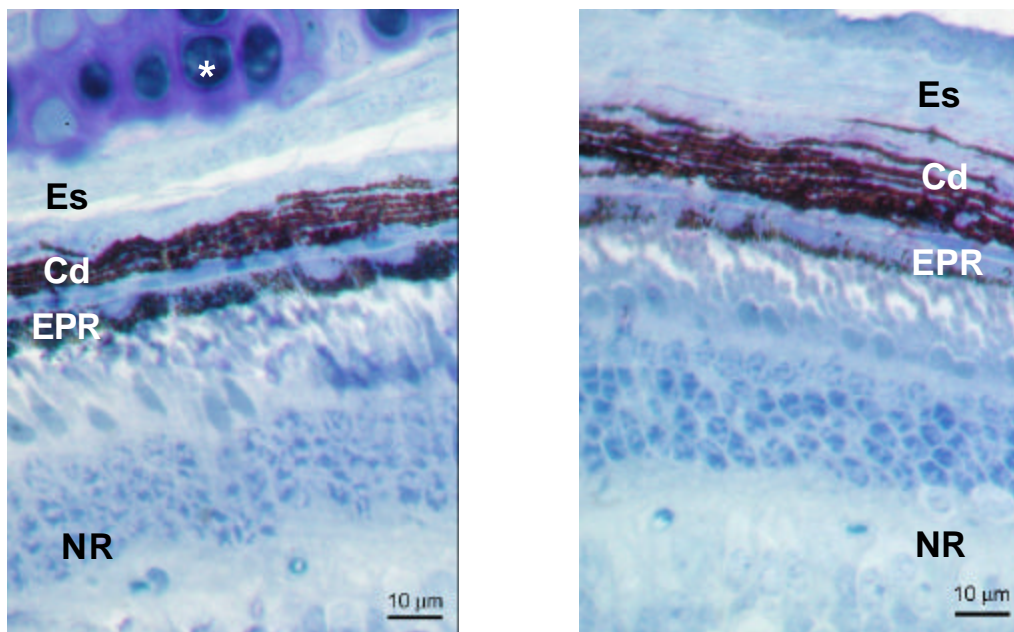


D: *M. domestica*

Figura 14. Fotomicrografies de l'epiteli pigmentat de diverses espècies d'insectívors i rosegadors estudiades. m, grànul de melanina; m_i, grànul de melanina immadur; c, capil·lar de la coriocapil·lar; N, nuclis de les cèl·lules epitelials; Se, segment extern dels fotoreceptors.

similar, mentre que *T. europaea* presenta un epitelí molt pigmentat (Figs. 14-A i 14-B). En els rosegadors, en canvi, els grànuls de melanina són molt més abundants en les retines dels arvicolins que no pas en els murins (Figs. 14-C i 14-D). L'epitelí d'*E. quercinus* mostra una quantitat de pigment intermèdia entre les dues subfamílies.

En general, s'ha apreciat diferències en quant a la distribució dels grànuls de melanina pel citoplasma segons la zona de retina observada. Així, s'aprecia més dispersió de pigment a les cèl·lules properes a l'ora serrata (Fig. 15-A), mentre que el pigment es troba concentrat a la zona apical, a les cèl·lules de la zona posterior (Fig. 15-B). Només a *T. europaea*, *A. terrestris*, *M. arvalis* i *M. duodecimcostatus*, els grànuls de pigment mostren un grau de dispersió similar, independentment de la zona.



A:

B:

Figura 15. Distribució dels grànuls de melanina a l'interior de les cèl·lules de l'epitelí pigmentat d'una mateixa secció de retina de *S. coronatus*. **A:** grànuls dispersos per l'interior de tot el citoplasma a la zona propera a l'ora serrata. **B:** grànuls concentrats al pol apical de la cèl·lula a la zona posterior de l'ull. Es, esclera; Cd, coroide; EPR, epitelí pigmentat de la retina; NR, neuroretina; *, cèl·lules cartilaginoses de la membrana nictitant.

En secció longitudinal s'aprecia que en el pol basal, les cèl·lules epitelials presenten una membrana altament invaginada i una gran acumulació de mitocondris, indicadors de la relació d'intercanvi que exerceixen aquestes cèl·lules amb la coriocapil·lar. La làmina basal de l'epiteli no resegueix les invaginacions (Fig. 16-A) i forma part de la membrana de Bruch. Del pol apical també emergeixen gran quantitat de prolongacions o microvellositats, de longitud variable, que envolten als extrems apicals dels fotoreceptors, intervenint en la seva renovació (Fig. 16-B).

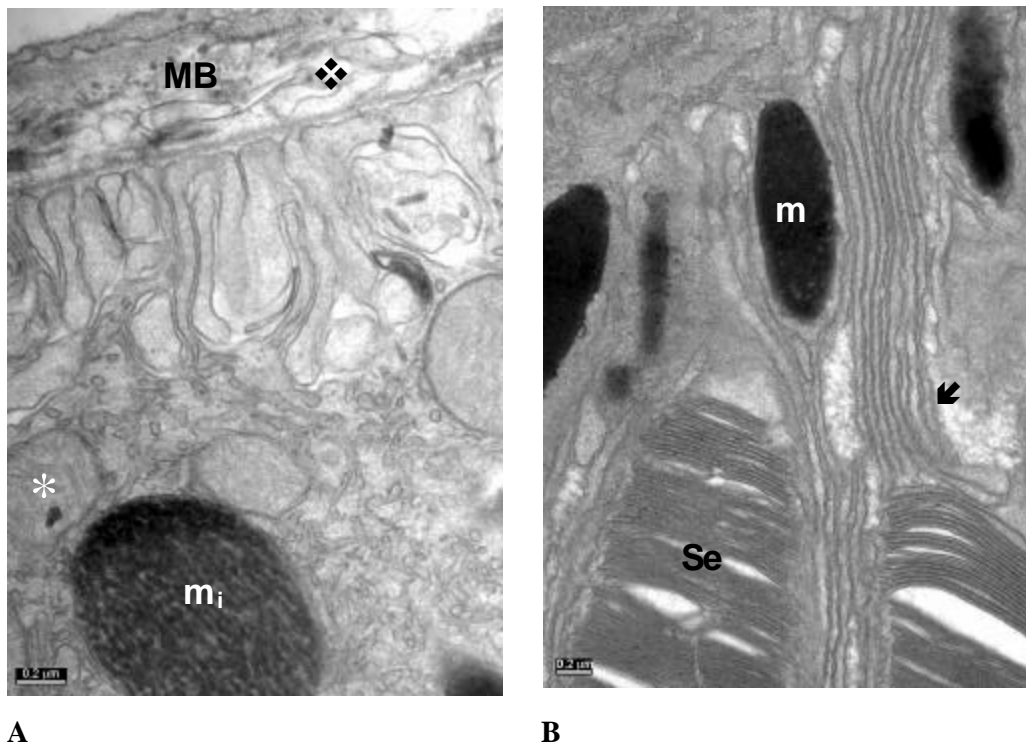


Figura 16. Fotomicrografia de l'epiteli pigmentat de la retina de *M. spretus*. **A:** invaginacions de la membrana del pol basal (◊), en contacte amb la membrana de Bruch (MB). **B:** prolongacions de la membrana citoplasmàtica del pol apical de les cèl·lules de l'epiteli pigmentat de la retina (↙).m, grànul de melanina; m_i, grànul de melanina inmadur; *, mitocondri; Se, segment extern de fotoreceptor.

Neuroretina

Com a la resta de mamífers, la neuroretina dels insectívors i rosegadors estudiats mostra l'aspecte estratificat típic, distingint-se 10 capes: la capa de fotoreceptors, la membrana limitant externa, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, la capa nuclear intern, la capa plexiforme interna, la capa de les cèl·lules ganglionars, la capa de les fibres del nervi òptic i la membrana limitant interna (Fig. 17). Malgrat aquesta similitud, cada subfamília o, fins i tot cada gènere analitzat té unes característiques pròpies que permeten distingir-los entre si.

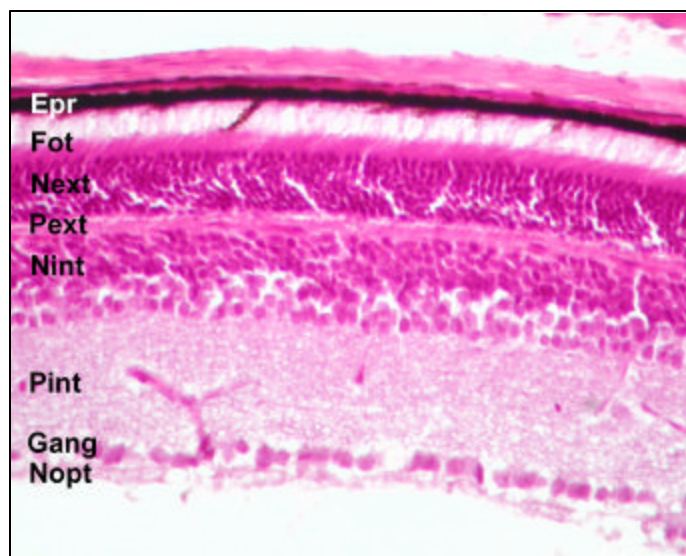


Figura 17. Capes de la retina de *M. arvalis*. Epiteli pigmentat de la retina (Epr); capa de fotoreceptors (Fot); capa nuclear externa (Next); capa plexiforme externa (Pext); capa nuclear interna (Nint); capa plexiforme interna (Pint); capa de les cèl·lules ganglionars (Gang); capa de les fibres del nervi òptic (Nopt).

Capa de fotoreceptors

Totes les espècies, excepte *T. europaea*, tenen cons i bastonets en les seves retines, encara que en proporcions diferents (Veure Capítol neuroretina). Les expansions externes d'aquestes cèl·lules es localitzen a la capa de fotoreceptors (Figs. 17 i 18).

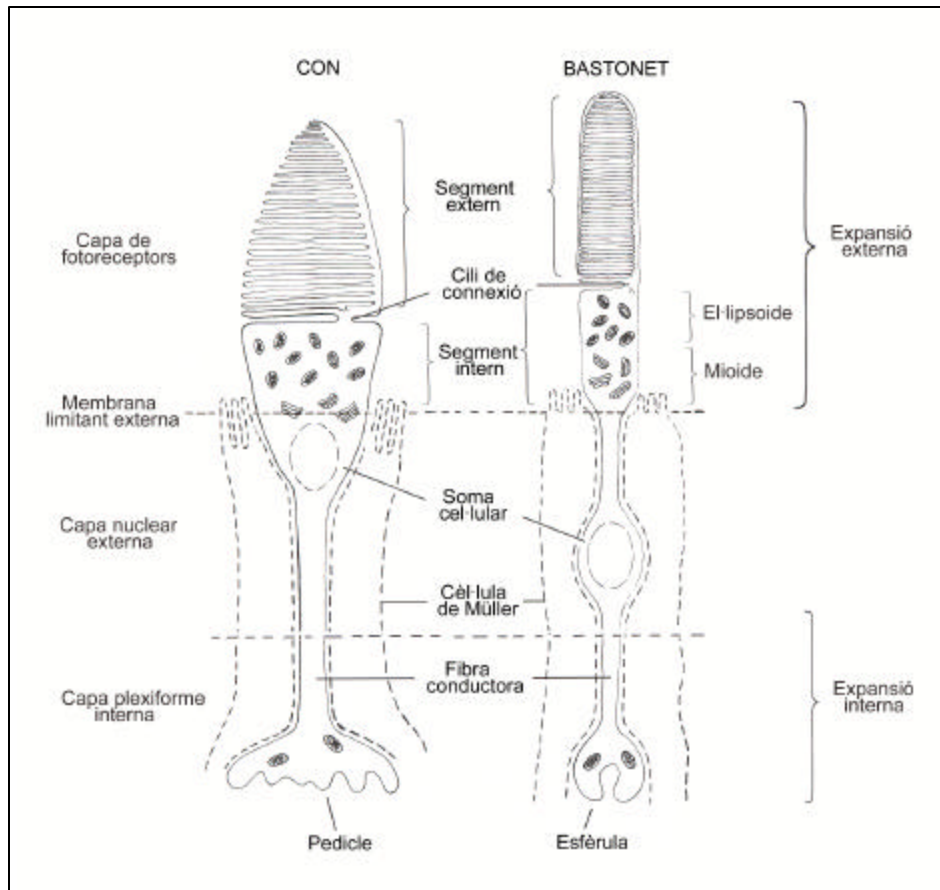
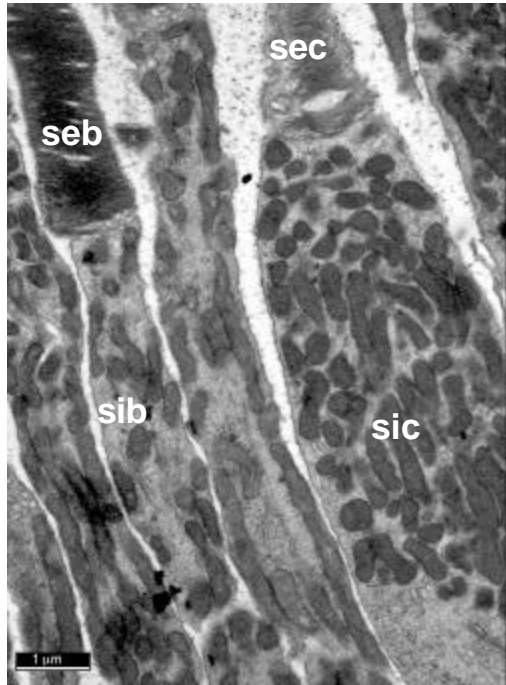
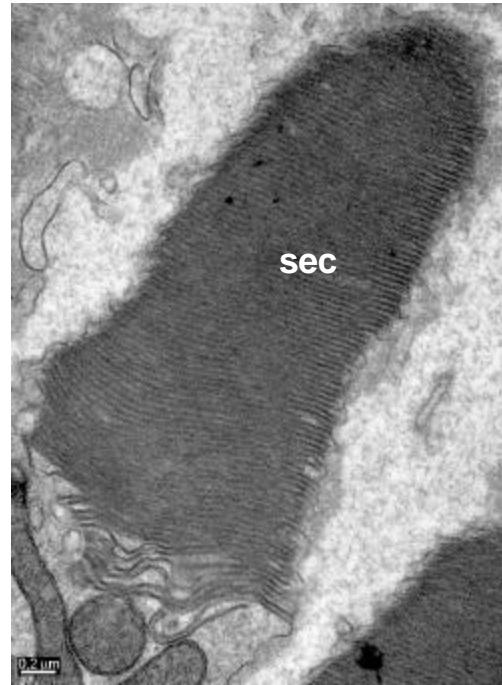


Fig. 18.- Esquema de les diferents parts d'un con i d'un bastonet i les capes de la neuroretina que ocupen. Segons Remington (1998).

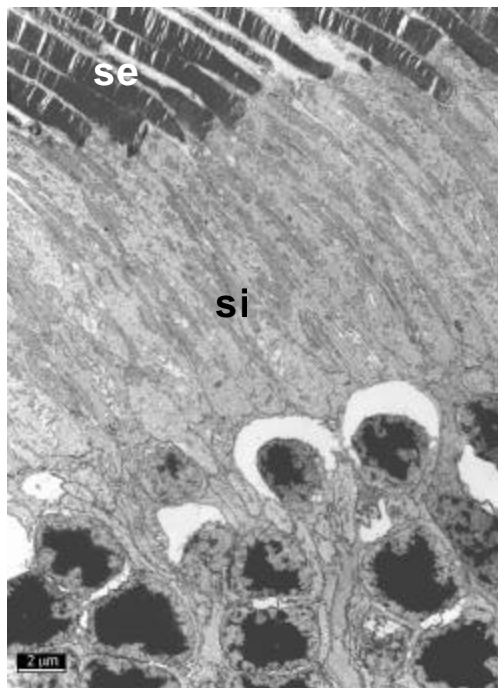
En termes generals, tant els segments externs com els segments interns que constitueixen les expansions externes mostren característiques similars a la resta de mamífers. Així, els segments interns dels bastonets són cilíndrics, i quasi bé de la mateixa amplada que els segments externs, el que els hi proporciona l'aspecte típic de qualsevol bastonet (Fig.19-A). Els segments interns dels cons són molt més voluminosos i més curts que els dels bastonets. Són gairebé fusiformes i més amples que els segments externs, que alhora, també s'aprimen apicalment, pel que, en conjunt, assoleixen una aparença típicament cònica (Figs. 19-A i 19-B).



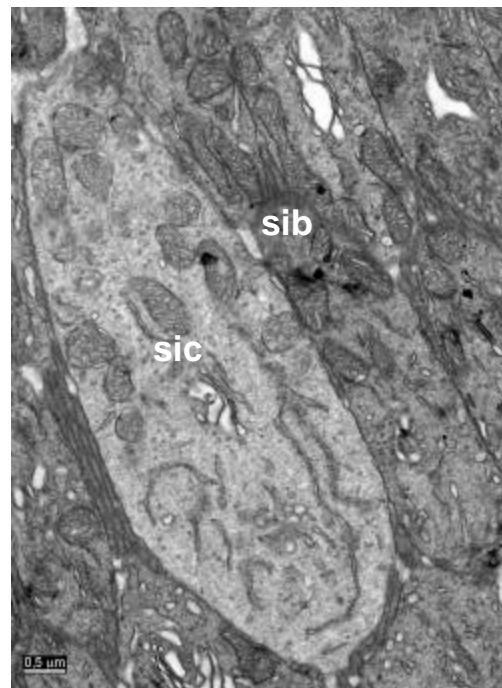
A: *N. fodiens*



B: *S. araneus*



C: *M. spretus*



D: *A. terrestris*

Figura 19. Seccions sagitals de les expansions externes dels fotoreceptors d'algunes de les espècies d'insectívors i rosegadors estudiades. se, segments externs; seb, segment extern de bastonet; sec, segment extern de con. si, segments interns; sib, segment intern de bastonet; sic, segment intern de con.

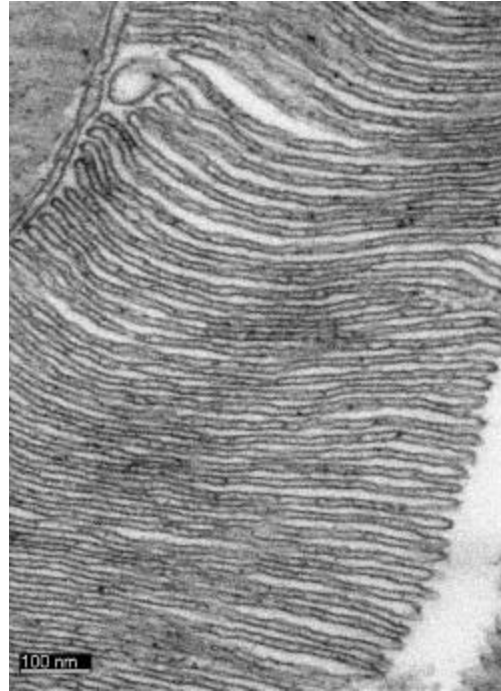
No obstant, amb el microscopi òptic i particularment amb l'electrònic, és possible detectar certes particularitats que fan possible diferenciar les retines de les espècies estudiades. En primer lloc, els dos segments de l'expansió externa dels fotoreceptors són, en general, molt més llargs i prims en els rosegadors que en els insectívors (Fig. 19). En segon lloc, els el·lipsoides dels segments interns dels cons dels soricins, a més de tenir-se més intensament, són molt més amples que no pas els dels bastonets. Això provoca que els segments externs no estiguin tan densament empaquetats com a la resta d'insectívors ni, sobretot, com en els rosegadors (Figs 19-A i 19-D). En aquests últims, la capa de fotoreceptors presenta un aspecte molt homogeni i compacte sense deixar espais entre les diferents expansions externes (Figs. 19-C i 19-D).

Pel que fa a la ultraestructura, els segments externs engloben els discs membranosos a on es troben els pigments visuals i que es disposen formant piles dins del segment extern (Figs 20-A, 20-B i 20-C). Els discs delimiten un espai intern més prim a la zona central que a la perifèria, on acostuma a eixamplar-se. Els discs dels bastonets solen a estar molt més densament empaquetats que en els cons i, alhora, l'espai intern també és més prim (Figs 20-A, 20-B i 20-C). En tots els casos, els discs es formen per l'evaginació de la membrana plasmàtica a la zona ciliar que, presenta gran quantitat de mitocondris (Figs 19-B i 20-D), ja que aquest procés comporta una elevada despesa energètica. En totes les espècies, els discs dels bastonets després de formar-se es desprenen i perden la continuïtat amb la membrana plasmàtica. En els cons, en canvi, alguns discs mantenen la continuïtat amb la membrana externa.

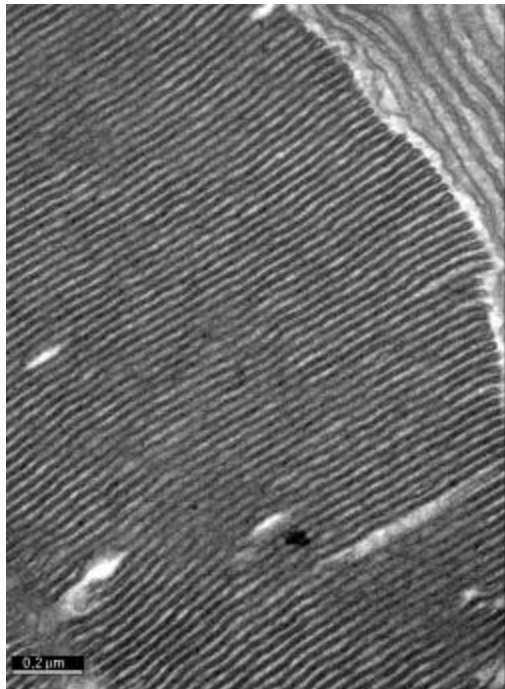
Els fotoreceptors que s'allunyen del patró descrit fins ara són els de *T. europaea*, sent molt difícil d'establir si es tracta de cons o de bastonets (Fig. 21). Els segments externs són bastant curts i els discs membranosos no estan tan ben organitzats com a la resta d'espècies estudiades (Figs. 21-A i 21-B). Per altra banda, els segments interns són voluminosos i adopten formes similars a la dels cons d'altres insectívors.



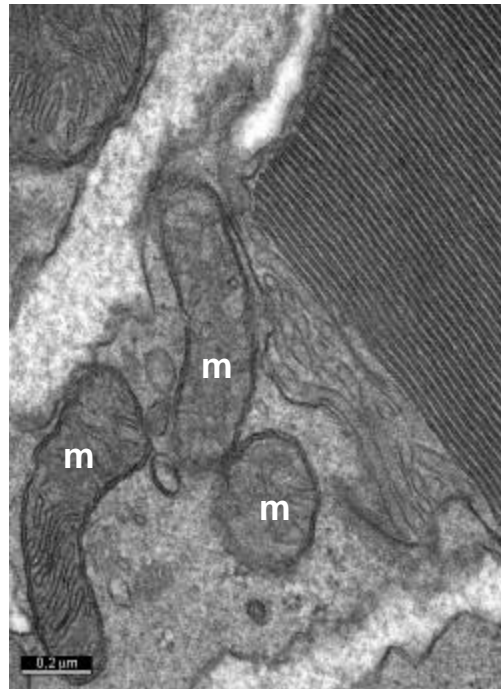
A: *M. gerbei*



B: *M. domesticus*



C: *M. duodecimcostatus*



D: *S. coronatus*

Figura 20. Fotomicrografies a gran augment dels segments externs dels fotoreceptors de diverses espècies analitzades. **A i B:** Discs membranosos de con. **C:** Discs membranosos de bastonets. **D:** Síntesi dels discs membranosos a la regió ciliar d'un fotoreceptor. m, mitocondri.

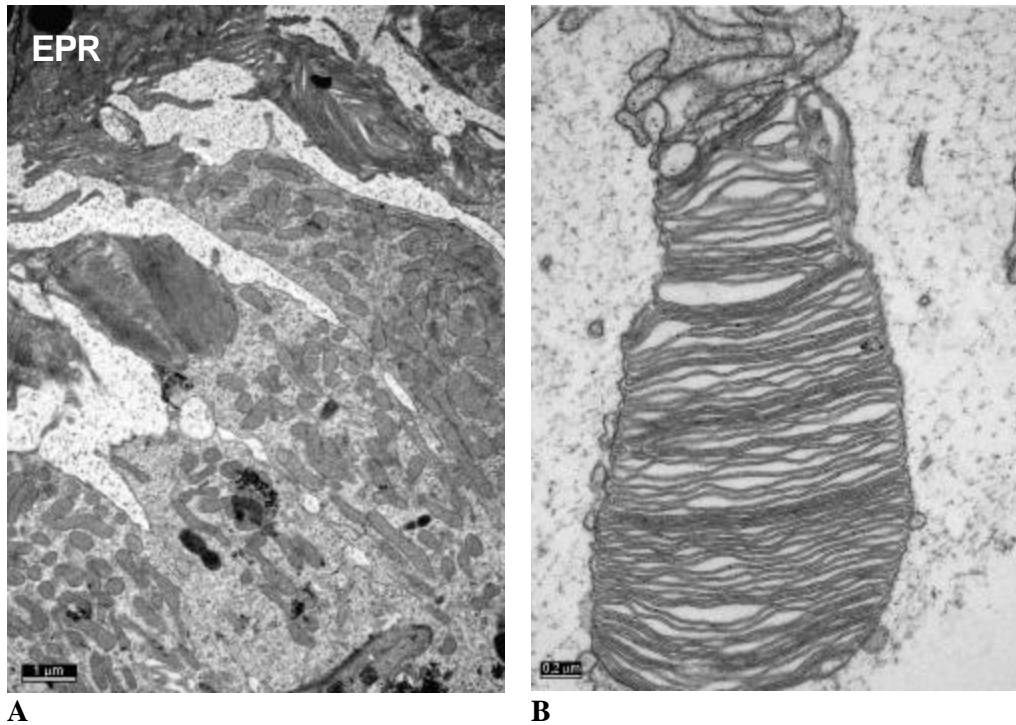


Figura 21. Fotoreceptors de *T. europaea*. **A:** Expansions externes de diferents fotoreceptors. EPR, epiteli pigmentat de la retina.

A més dels processos de formació dels discs, també s'ha pogut observar com aquests discs es van degradant. En aquest cas, la membrana plasmàtica de l'extrem apical dels segments externs dels fotoreceptors té tendència a invaginar-se de forma concèntrica (Figs. 22-A i 22-B). A mesura que el procés d'invaginació va progressant, l'àpex del segment extern amb els discs que hi conté, acaba separant-se de la resta del fotoreceptor (Fig. 22-C). Sovint, però, és possible observar com els discs de l'extrem apical dels fotoreceptors comencen a corbar-se i a separar-se dels discs subjacents abans que es produeixi cap modificació de la membrana externa (Figs. 22-D i 23-A). El fragment separat és envoltat per les microvellositats de l'epiteli pigmentat, i és englobat per la membrana de la cèl·lula epitelial, convertint-se en un fagosoma (Fig. 23). Els fagosomes tenen diferent morfologia en funció del grau de degradació en que es trobin els discs del seu interior, passant d'un aspecte lamel·lar a un altre completament homogeni (Figs 23-A fins 23-D).

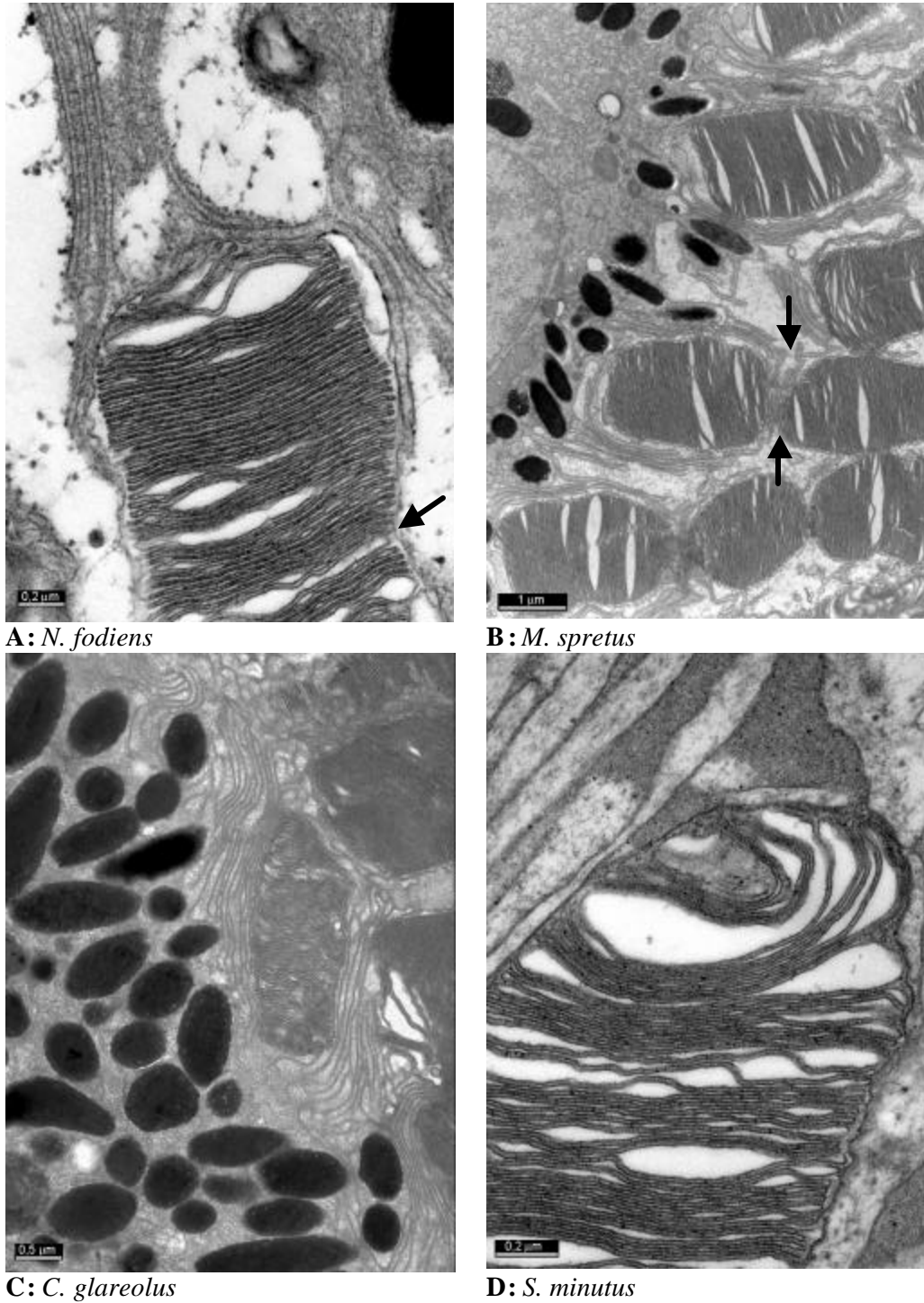
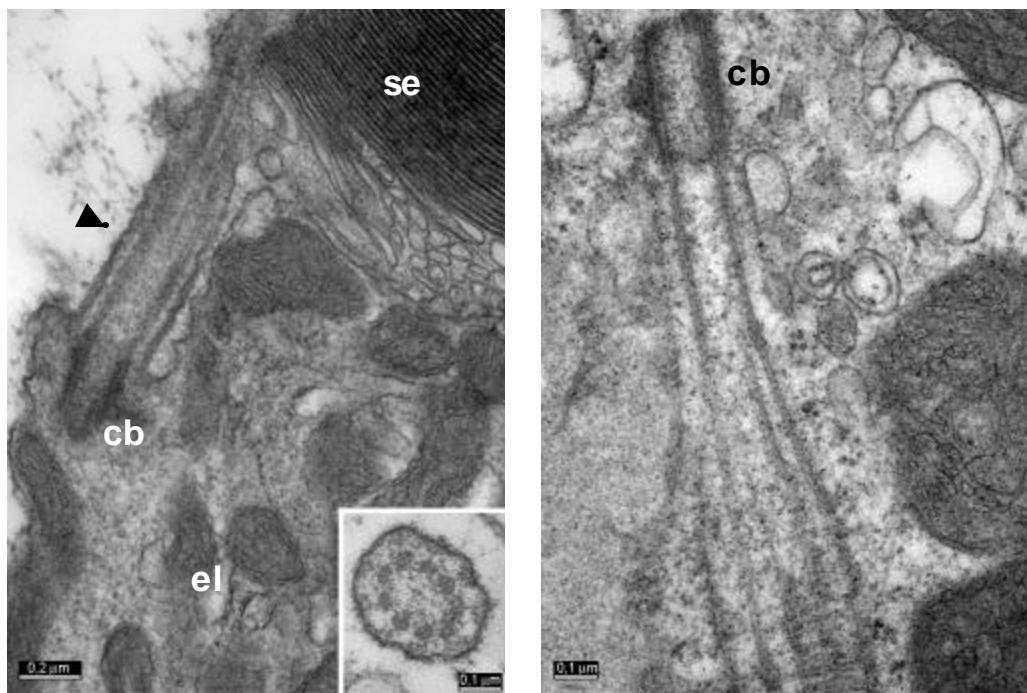


Figura 22. Procés de separació de l'extrem apical del segment extern dels fotoreceptors de diferents espècies analitzades. **A i B:** Invaginació de la membrana plasmàtica dels fotoreceptors (↓). **C:** Fragmentació de l'extrem apical. **D:** Encorbament dels discs apicals abans de l'invaginació de la membrana plasmàtica del fotoreceptor.

Els únics individus a on no s'ha pogut observar cap procés de renovació dels discs dels fotoreceptors són els que han estat capturats a partir del mig dia com en alguns *T. europaea*, en el cas dels insectívors, i en alguns *A. terrestris*, *M. duodecimcostatus* i *M. arvalis*, en els rosegadors.

En tots els casos, la unió entre el segment intern i l'extern es realitza mitjançant el cili de connexió (Fig. 24) que s'origina a partir d'un corpuscle basal situat a l'el·lipsoide. Presenta la mateixa estructura que a la resta de mamífers, amb nou doblets de microtúbuls disposats circularment, sense el parell de la zona central (Fig. 24-A). Els microtúbuls es van atenuant a mesura que s'allunyen del corpuscle basal fins a desaparèixer dins dels segment extern. De l'extrem oposat del corpuscle basal s'originen les arrels ciliars que s'endinsen en el segment intern (Fig. 24-B). Al costat del corpuscle basal sovint pot observar-se l'altre centríol.



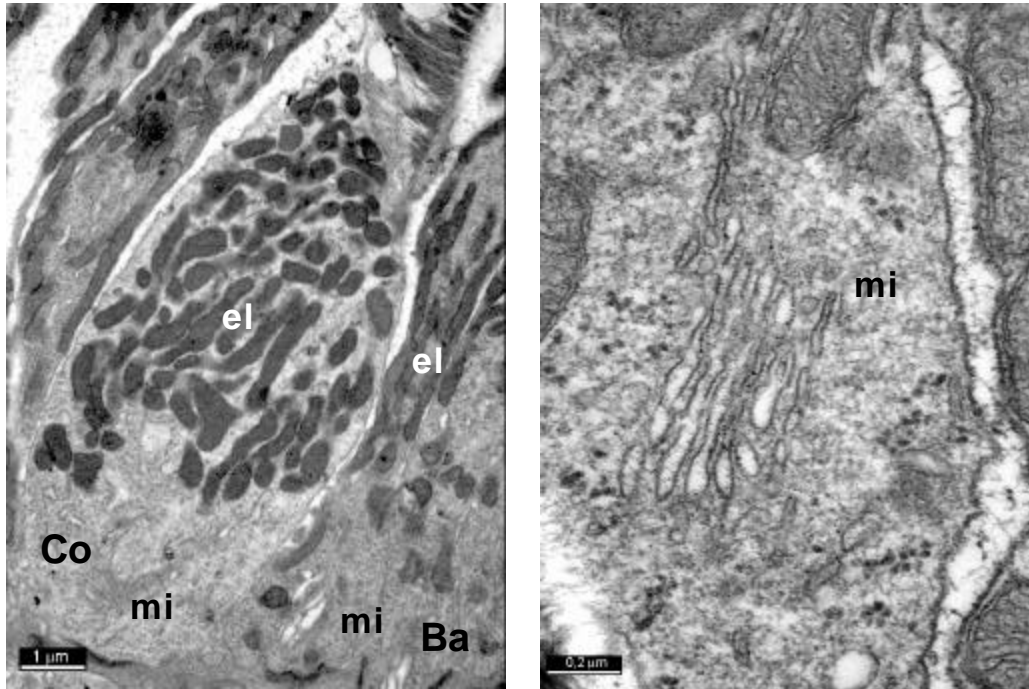
A: *N. fodiens*

B: *C. russula*

Figura 24. Fotomicrografies del cili de connexió dels fotoreceptors retinians. **A:** Cili de connexió (▼) situat entre el segment extern (se) i l'el·lipsoide (el). Al requadre, ultraestructura de l cili de connexió. **B:** Arrels ciliars. cb, corpuscle basal.

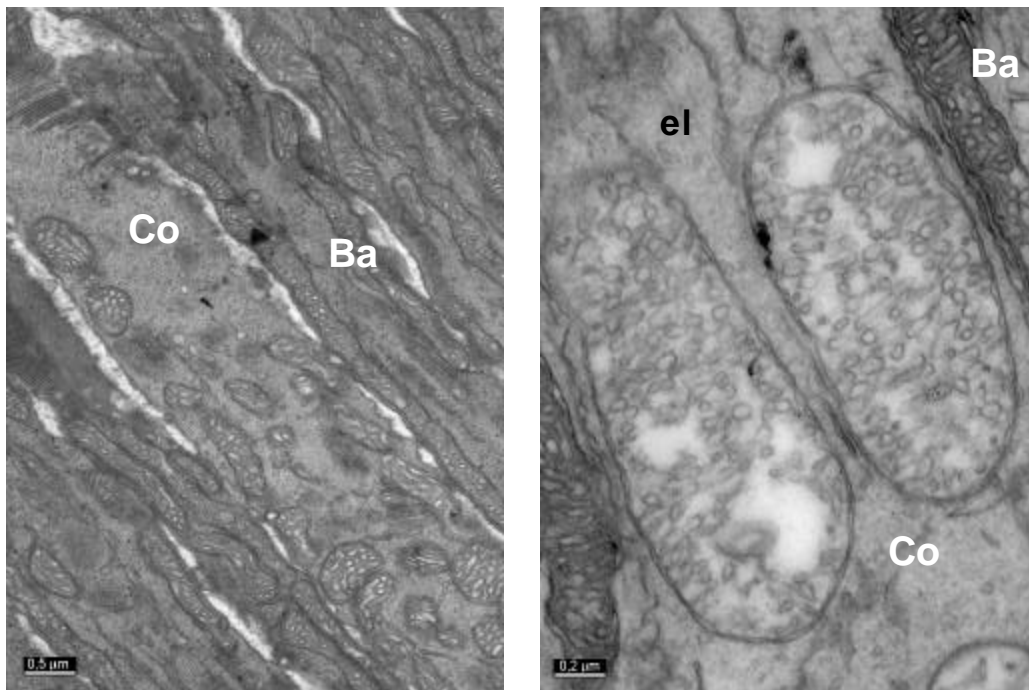
En totes les espècies considerades el segment intern es pot dividir en l'el·lipsoide i el mioide (Figs. 18 i 25-A) Mentre que a l'el·lipsoide es troben la major part dels mitocondris de la cèl·lula fotoreceptora, el mioide conté la resta dels orgànuls cel·lulars com el reticle endoplasmàtic, nombroses vesícules de l'aparell de Golgi, ribosomes lliures que normalment s'agrupen formant polisomes, i neurotúbuls (Fig. 25). Les característiques dels mitocondris de l'el·lipsoide, en general, representen un tret distintiu entre els cons i els bastonets; així, els mitocondris dels cons solen ser més nombrosos, relativament més voluminosos que els dels bastonets, que solen ser allargats i es disposen paral·lels a l'eix longitudinal del fotoreceptor. (Figs. 25-A, 25-B i 25-D).

En el cas dels insectívors, l'el·lipsoide també facilita la identificació de les retines de les diferents subfamílies i, fins i tot, entre les espècies d'una mateixa subfamília. Així, els el·lipsoïdes dels cons de *Sorex* contenen uns mitocondris gegants o megamitocondris, amb tendència a agrupar-se i formar una “massa sòlida” envoltada per altres mitocondris més petits (veure Capítol 3 i Fig. 26-A i 26-B). Tot i pertànyer a la mateixa subfamília, els el·lipsoïdes de *N. fodiens* no contenen megamitocondris, sinó gran quantitat de mitocondris lleugerament més voluminosos i electrodensos que els dels bastonets i dispersos per tot l'interior de l'el·lipsoide (Fig. 25-A). A *C. russula*, els cons són tan escassos que es fa realment difícil trobar-los. Pel que s'ha pogut observar, els mitocondris dels cons d'aquesta espècie són semblants als dels bastonets, però no són tan nombrosos ni tan llargs i es situen de forma molt més esparsa per l'el·lipsoide (Fig. 26-C). Una menció a part és necessària per a *T. europaea*. Els seus segments interns tenen forma gairebé cònica (Fig. 21-A), amb una petita zona desproveïda de mitocondris que es correspondria al mioide i un el·lipsoide que presenta nombrosos mitocondris similars als descrits per *N. fodiens*. No obstant, també s'ha pogut observar alguns mitocondris, que malgrat no ser excessivament grans i tenir les crestes molt irregulars, tant en distribució com de forma, tenen tendència a agrupar-se i encaixar íntimament entre ells com fan els megamitocondris a *Sorex* (Fig. 26-C).



A: *N. fodiens*

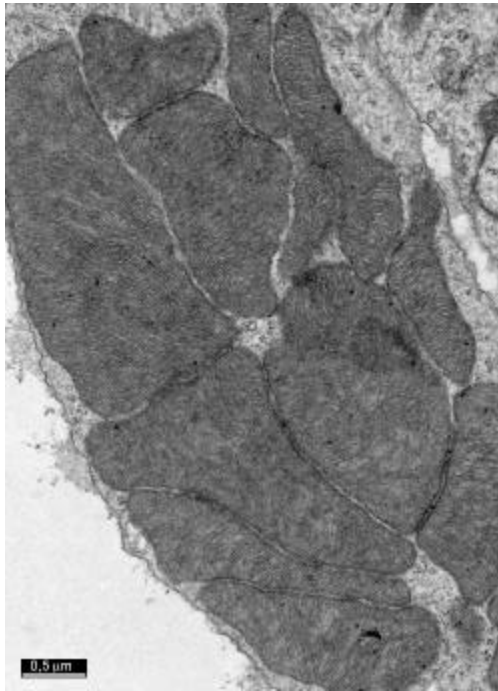
B: *C. russula*



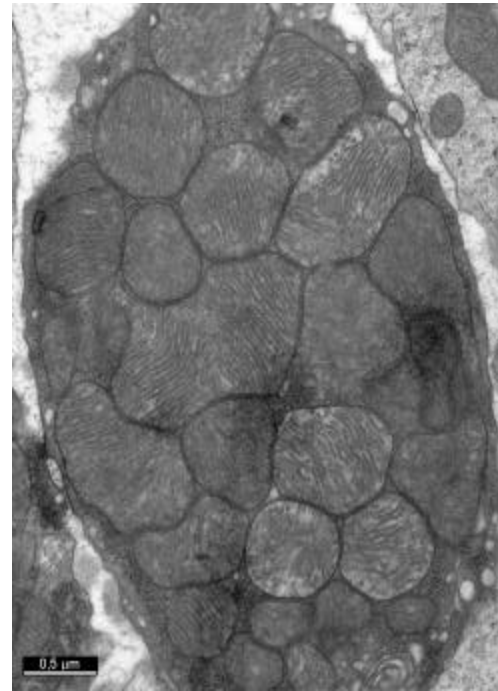
C: *M. duodecimcostatus*

D: *C. glareolus*

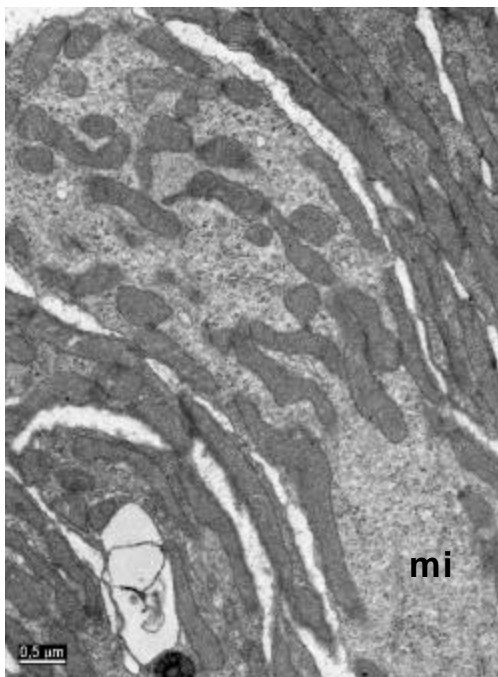
Figura 25. Seccions sagitals dels segments interns dels fotoreceptors de diverses espècies estudiades. Co, con; Ba, bastonet; mi, mioide amb diferents orgànuls citoplasmàtics; el, el-lipsoide amb els mitocondris.



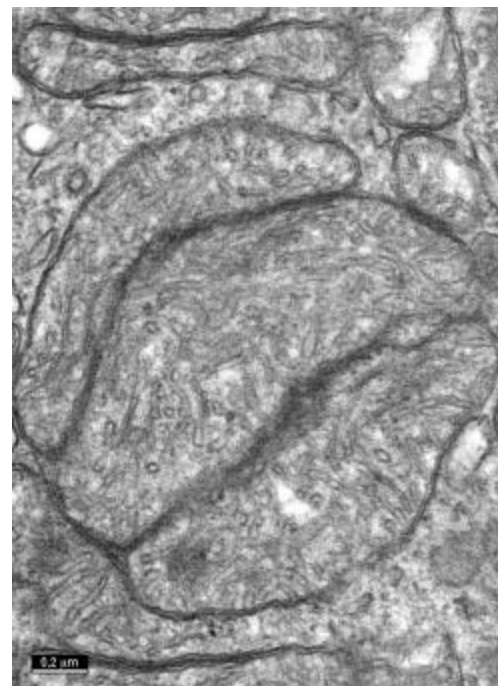
A: *S. araneus*



B: *S. minutus*



C: *C. russula*

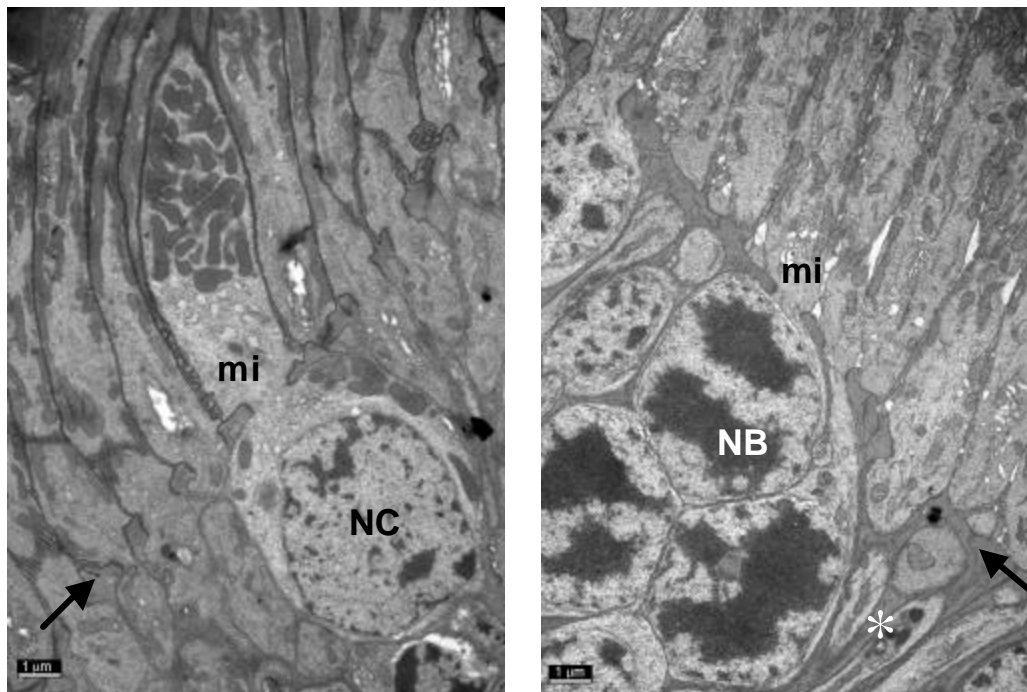


D: *T. europaea*

Figura 26. Fotomicrografies dels el·lipsoides dels cons d'algunes espècies d'insectívors analitzades. **A:** Megamitochondris. **B:** Secció longitudinal de l'extrem d'un el·lipsoide. **C:** Mitochondris de *C. russula*. mi, mioide. **C:** Mitochondris de *T. europaea*.

Membrana limitant externa

Com en tots els mamífers, la membrana limitant externa està situada entre la capa de fotoreceptors i la capa nuclear externa (Fig. 18). Es forma per les unions cel·lulars existent entre els mioïdes dels fotoreceptors i els processos terminals de les cèl·lules de Müller (Fig. 27), fet que només pot observar-se amb el microscopi electrònic, ja que amb el microscopi òptic apareix com una línia molt prima, fortament tenyida i sense cap característica destacable (Fig. 28). La membrana limitant externa manté en posició perpendicular a les cèl·lules visuals.



A: *N. fodiens*

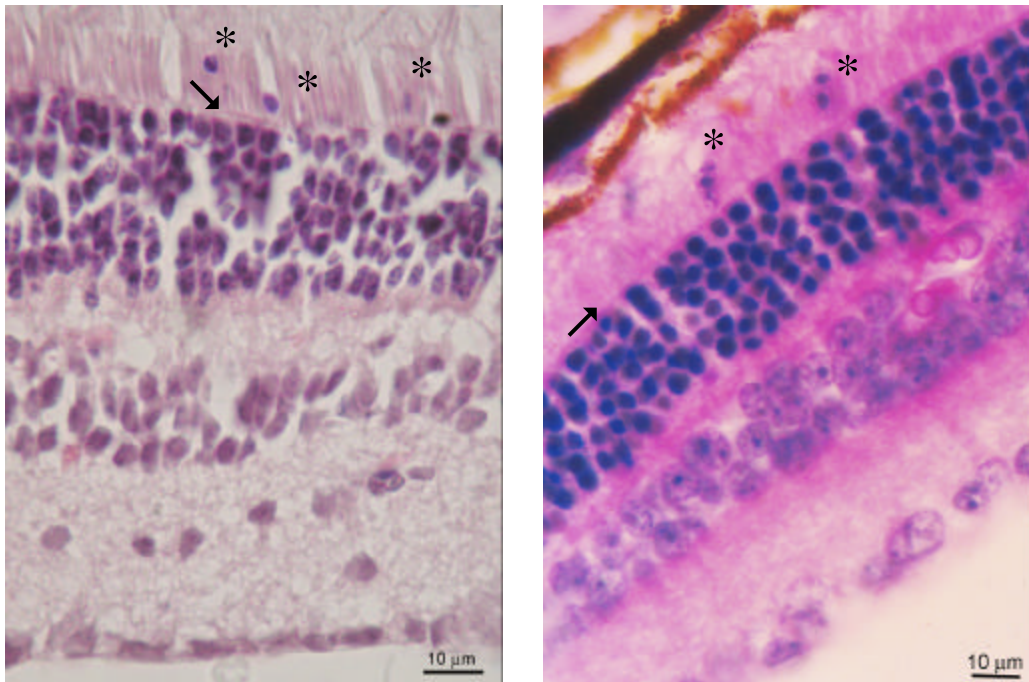
B: *M. duodecimcostatus*

Figura 27. Fotomicrografies de la membrana limitant externa (→) situada entre els mioïdes (mi) de la capa dels fotoreceptors i els nuclis de la capa nuclear externa. NC, nucli de con; NB, nucli de bastonet, *, procés terminal d'una cèl·lula de Müller.

Capa nuclear externa

Els somes de totes les cèl·lules fotoreptores es localitzen a la capa nuclear externa, excepte algun soma dislocat situat entre les expansions externes dels fotoreceptors

(Fig. 28). Els dos tipus de fotoreceptors, els cons i els bastonets, són fàcilment distingibles, basant-se principalment en característiques nuclears, com ara la situació, la mida i, especialment, la distribució de l'heterocromatina.

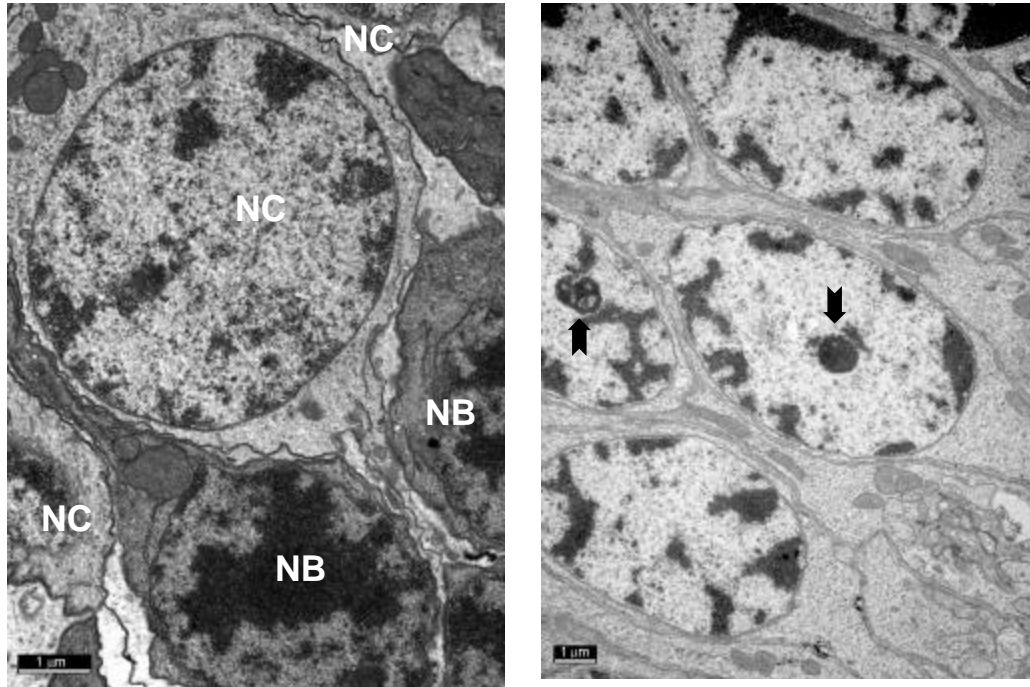


A: *C. russula*

B: *M. musculus*

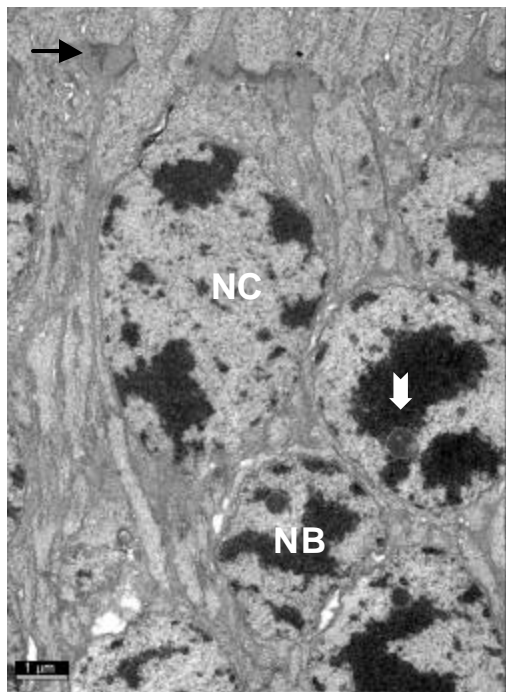
Figura 28. Nuclis de fotoreceptors dislocats (*), situats a la capa de fotoreceptors, membrana limitant externa (→).

En totes les espècies estudiades, els cons, generalment poc nombrosos, solen tenir un nucli més gran i ovalat que els bastonets (veure Capítol 5). Es situen a la porció més externa de la capa, just per sota de la membrana limitant externa. En els soricins, els nuclis dels cons es troben un al costat de l'altre externament als nuclis dels bastonets (Fig. 29-A), mentre que a *C. russula* els cons són tant escassos que es troben molt dispersos al llarg de tota la capa. Per altra banda, a *T. europaea* tots els nuclis tenen la mateixa aparença i es fa difícil de distingir de quin tipus de fotoreceptor es tracta (Fig. 29-B). En el cas dels rosegadors, els nuclis dels cons es situen entre els nuclis dels bastonets (Fig. 29-C i 29-D). Aquests últims són molt més nombrosos i més petits que els nuclis dels cons, tenen forma arrodonida o lleugerament ovalada (veure Capítol 5), i ocupen la major part de la capa nuclear externa (Fig. 29-D).

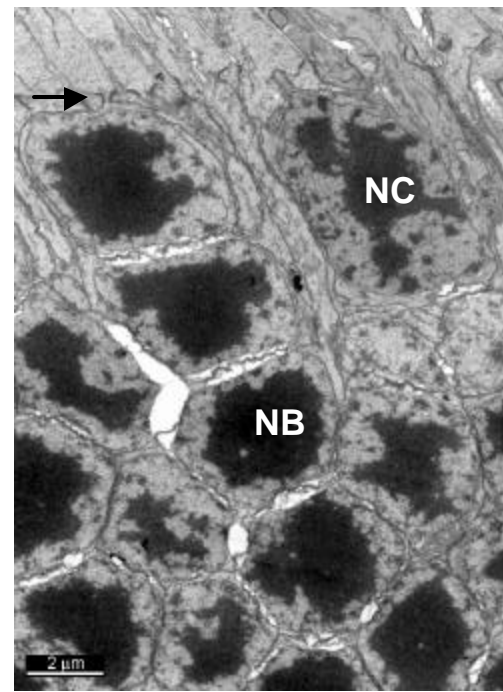


A: *S. coronatus*

B: *T. europaea*



C: *C. nivalis*



D: *M. spretus*

Figura 29. Fotomicrografies de la capa nuclear externa on s'observen les diferències entre els nuclis dels cons i bastonets, així com entre les diferents subfamílies d'insectívors i rosegadors estudiades. NC, nuclis de con; NB, nuclis de bastonet; → , membrana limitant externa; ➡ , nuclèol.

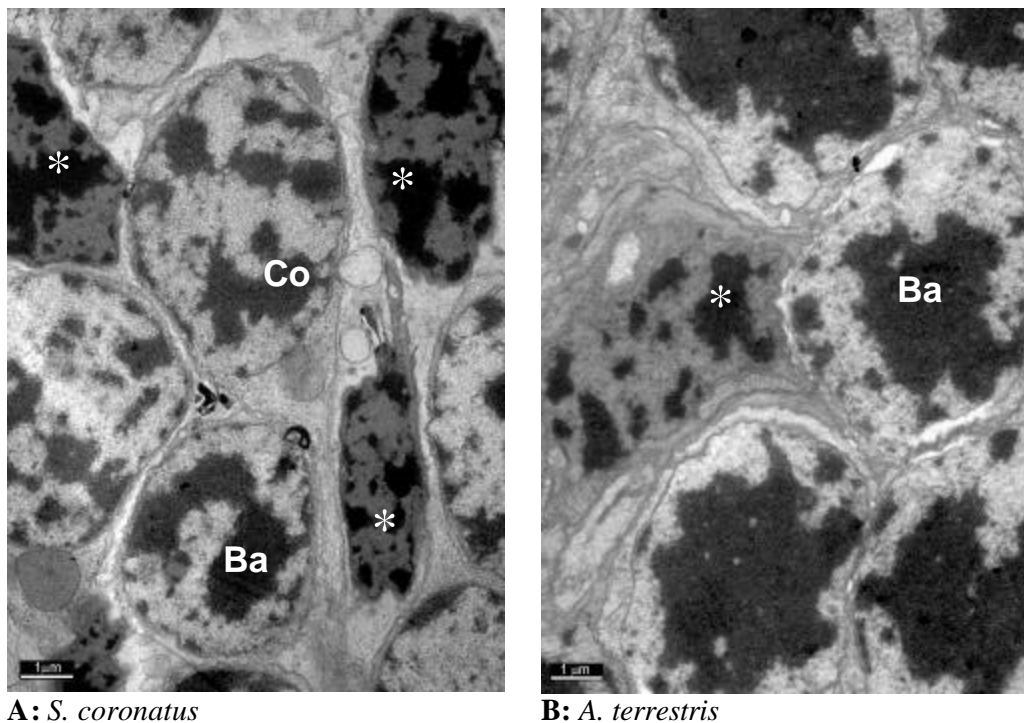
Generalment, tenen tendència a disposar-se formant columnes verticals, especialment en la retina dels murins (Fig. 29-D). A vegades, el nucli d'alguns pot incorporar-se a les columnes, però normalment es situen entre elles.

El que realment permet distingir els fotoreceptors entre si i, aleshores a les diferents subfamílies d'insectívors i rosegadors considerades, és la proporció i distribució de la cromatina dins dels nuclis. La microscòpia òptica i electrònica han posat de manifest que, en general, en els cons predomina l'eucromatina sobre l'heterocromatina, mentre que en els bastonets, especialment en els murins, passa el contrari. Això provoca que, en general, els somes dels bastonets siguin més contrastats que els dels cons. En els insectívors, l'heterocromatina es distribueix de forma molt més dispersa que en els rosegadors. En els cons, forma petits agregats que es situen preferentment a la perifèria, en contacte amb l'embolcall nuclear, mentre que en els bastonets, els agregats d'heterocromatina són més grans i no tant perifèrics (Figs. 29-A). En canvi, a *T. europaea* és realment difícil distingir els dos tipus de fotoreceptors basant-se exclusivament en les característiques nuclears, ja que a primer cop d'ull tots els nuclis semblen iguals, amb més característiques de cons que no pas de bastonets. Són molt grans i ovalats amb l'heterocromatina agrupada en petits agregats que es disposen de forma molt dispersa preferentment per la perifèria però també per la zona central del nucleoplasma i presenten un nuclèol molt gran i electrodens (Fig. 29-B).

En els rosegadors, la distribució de la cromatina en els nuclis dels fotoreceptors és diferent segons es tracti de la retina d'arvicols o de murins. En el primer cas, les condensacions d'heterocromatina en els cons adopten forma, mida i distribució irregular, però sempre molt propera a la membrana nuclear (Fig. 29-C). En canvi, l'heterocromatina dels bastonets s'agrupa majoritàriament en la zona central del nucleoplasma dibuixant una massa polimorfa de contorns irregulars (Figs. 27-B i 29-C). Sovint dona la sensació que els agregats d'heterocromatina deixen una cavitat més o menys central a on es situa el nuclèol. En els murins, els nuclis dels cons mostren l'heterocromatina multilobulada, envoltada per gran quantitat d'eucromatina molt menys tenyida (Fig. 29-D). Aquesta distribució de l'heterocromatina dels cons

els hi dóna un aspecte similar als leucòcits polimorfonuclears. En canvi, els nuclis dels bastonets contenen un únic agregat central d'heterocromatina, molt electrodens, que ocupa la major part del soma cel·lular (Fig. 29-D). L'heterocromatina està envoltada per un estret anell d'eucromatina més pàl·lida. Sovint, i degut a la pressió que exerceixen entre sí els nuclis veïns, l'heterocromatina adopta una forma més aviat poligonal.

A vegades, a la capa nuclear externa d'algunes espècies com *S. minutus*, *S. araneus*, *S. coronatus*, *N. fodiens* i *A. terrestris*, s'ha pogut observar un tercer tipus de cèl·lules de diferent morfologia nuclear que la descrita pels cons i bastonets (Fig. 30). Els seus somes són més petits i allargassats, i es disposen en mig dels somes dels fotoreceptors. Tant el citoplasma com l'eucromatina són molt més densos als electrons que la resta de cèl·lules, mentre que l'heterocromatina es disposa de manera similar a la dels cons. No obstant, no s'ha pogut determinar si pertanyen a fotoreceptors o a algun nucli dislocat d'altres cèl·lules retinianes.



A: *S. coronatus*

B: *A. terrestris*

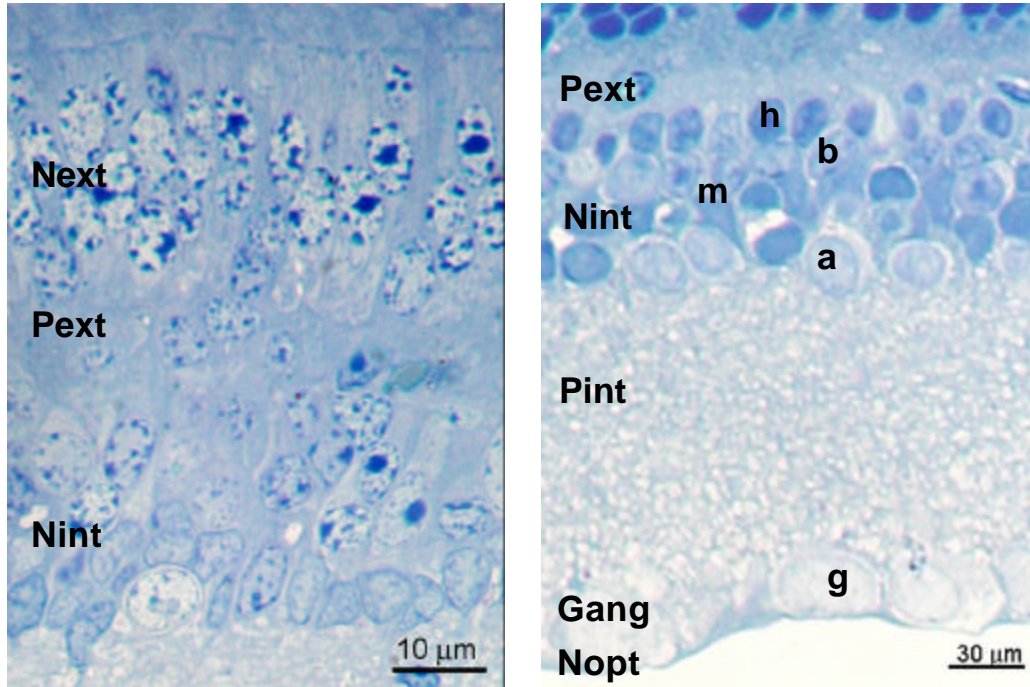
Figura 30. Fotomicrografies d'un tercer tipus de soma cel·lular (*) amb característiques morfològiques diferents als somes de bastonets (Ba) i de cons (Co) més abundants.

Capa plexiforme externa

Com a la resta de mamífers, les expansions internes de tots els fotoreceptors se situen a la capa plexiforme externa a on sinapten amb les cèl·lules bipolars i horitzontals (Fig. 31). Amb microscòpia òptica s'aprecia que és una zona d'aspecte fibrós i relativament prima, que conté una xarxa dispersa de petits capil·lars i, a vegades, pericaris dislocats, probablement de cèl·lules horitzontals. Sovint, la zona més externa d'aquesta capa es veu més tenyida que la zona més interna. En general, la capa plexiforme externa no mostra cap tret distintiu que faci possible associar-la amb alguna subfamília en concret, excepte a *T. europaea*, ja que aquesta capa acostuma a estar envaïda per somes de cèl·lules de les capes veïnes (Fig. 31-A).

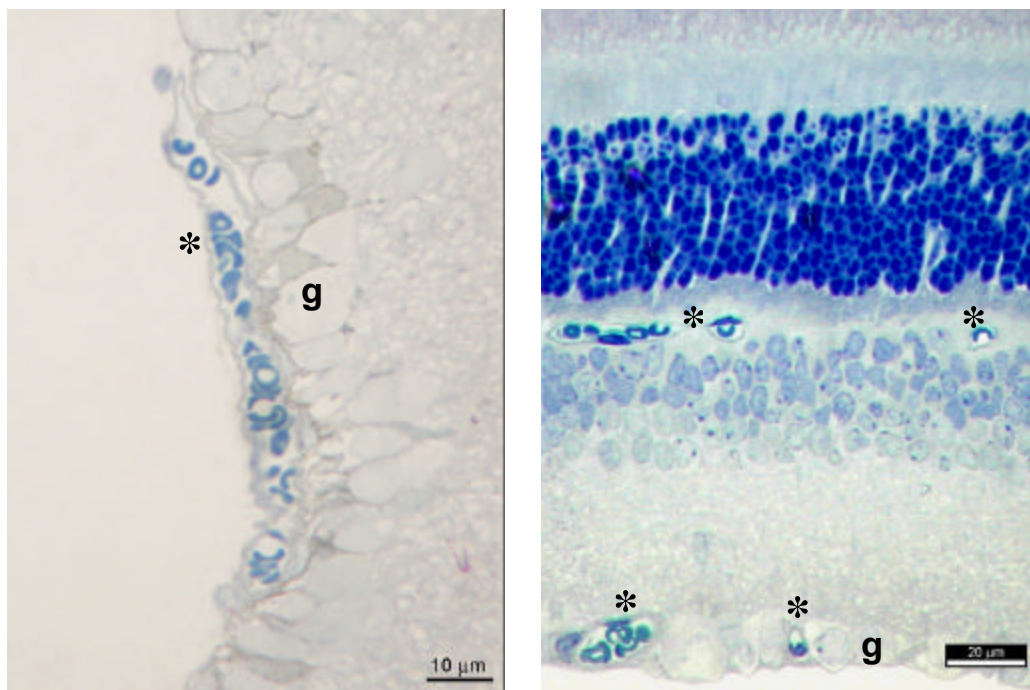
Capa nuclear interna

Si bé amb dificultat i, tenint en compte només les seccions semifines, a la capa nuclear interna dels exemplars estudiats poden distingir-se quatre tipologies cel·lulars diferents (Fig. 31-B). Les cèl·lules estan distribuïdes en capes, però sovint poden aparèixer en una capa que no els li pertoca, fet que dificulta la seva identificació. Així, a la subcapa més externa hi ha uns nuclis petits i lleugerament foscos, escassament envoltats per un anell citoplasmàtic, que probablement es corresponen amb els nuclis de les cèl·lules horitzontals. A la subcapa intermèdia, però també a l'externa, es situen els nuclis de les cèl·lules bipolars, més grossos i nombrosos que els anteriors, i envoltats per una anell citoplasmàtic més o menys ampli. Els nuclis de les cèl·lules de Müller es troben a les subcapes intermèdia i interna. Tenen forma irregular i són molt foscos, comparats amb els nuclis veïns; el citoplasma, també fosc, emet uns llargs processos que es dirigeixen cap a les dues membranes limitants. Per últim, a la subcapa més interna, els nuclis de les cèl·lules amacrines mostren característiques similars a les bipolars, però amb un citoplasma molt més expandit. No obstant, hi ha retines que s'aparten lleugerament d'aquest patró, com poden ser les de *C. russula* i *T. europaea*. (Figs. 28-A i 31-A) En ambdós casos, s'observen poques fileres de nuclis i es fa difícil d'identificar als quatre tipus de cèl·lules. En el cas extrem de *T. europaea*, totes elles són morfològicament molt similars, sent la mida l'única diferència apreciable.



A: *T. europaea*

B:



C: *N. fodiens*

D: *M. spretus*

Figura 31. Fotomicrografies de la retina de diverses espècies d'insectívors i rosegadors considerades. Next, capa nuclear externa; Pext, capa plexiforme externa; Nint, capa nuclear interna; Pint, capa plexiforme interna; Gang, capa de cèl·lules ganglionars; Nopt, capa de les fibres del nervi òptic; h, cèl·lules horitzontals; b, cèl·lules bipolars; m, cèl·lules de Müller; a, cèl·lules amacrines; g, cèl·lules ganglionars; *, vasos sanguinis.

Capa plexiforme interna

Tant en les retines d'insectívors com de rosegadors, la capa plexiforme interna, conté les prolongacions axòniques i dendrítiques de les neurones de la capa nuclear interna i de les cèl·lules ganglionars que li confereixen una aparença fibril·lar. A més, s'hi troben capil·lars sanguinis i nuclis dislocats d'alguna cèl·lula amacrina o ganglionar. Sovint, a les retines de *C. russula*, aquesta capa està dividida per una pseudocapa cel·lular, formada probablement per somes dislocats de cèl·lules amacrines (Fig. 28-A).

Capa de les cèl·lules ganglionars

A la retina de totes les espècies estudiades, les cèl·lules ganglionars es disposen en una sola filera a la capa que du el seu nom. El cos cel·lular és normalment esfèric i de mida molt variada, podent ser més grans que els somes dels fotoreceptors (veure Capítol 5), encara que també n'hi ha de molt més petits (Figs. 31-B, 31-C i 31-D). Les cèl·lules més grans acostumen a tenir un nucli gran i pàl·lid amb un nuclèol molt fosc. Les cèl·lules més petites solen tenir el nucli més fosc i el nuclèol no es tan evident. No obstant, aquestes cèl·lules més petites podrien correspondre's a cèl·lules amacrines dislocades o bé a cèl·lules glijals interposades entre les ganglionars.

Capa de les fibres del nervi òptic

Els àxons de les cèl·lules ganglionars formen la capa de les fibres del nervi òptic, separada de l'humor vitri per la membrana limitant interna, només visible a màxim augment amb el microscopi òptic. De fet, el que s'observa són els processos terminals de les prolongacions radials de les cèl·lules de Müller que, un cop sobrepassats els cossos cel·lulars de les cèl·lules ganglionars s'expandeixen per envoltar a les fibres del nervi òptic i alhora formar la membrana limitant interna (Figs. 31-B i 31-D).

Tots els exemplars estudiats presenten la retina vascularitzada. L'artèria central de la retina, després d'emergir per la papil·la òptica, es ramifica donant lloc a una sèrie de branques que es dirigeixen anteriorment fins arribar a l'ora serrata. Alhora, la

ramificació d'aquestes branques provoca l'aparició d'una àmplia xarxa de capil·lars situada entre la capa plexiforme externa i la membrana limitant interna (Figs. 31-C i 31-D). En els insectívors es freqüent observar la secció de capil·lars, més o menys amplis, que sobresurten de la capa de les fibres del nervi òptic, envaint la cambra vítria, fet que no s'ha observat en els rosegadors (Figs 31-C i 31-D).

CRISTAL·LÍ

El cristal·lí de les espècies estudiades presenta la mateixa estructura histològica que la resta de mamífers. Com ja s'ha comentat al Capítol 1, és una lent biconvexa, més o menys voluminosa (Figs 5 i 6 del Capítol 1) formada per cèl·lules epitelials i per fibres. Anteriorment, les cèl·lules es disposen formant un epiteli monoestratificat que, en arribar a l'equador, i degut a la seva transformació en fibres, formen l'arc nuclear del cristal·lí, ben visible en totes les espècies. (Fig. 32-A). Les fibres mostren la secció hexagonal típica, conseqüència de la pressió que exerceixen entre si les fibres veïnes (Fig. 32-B).

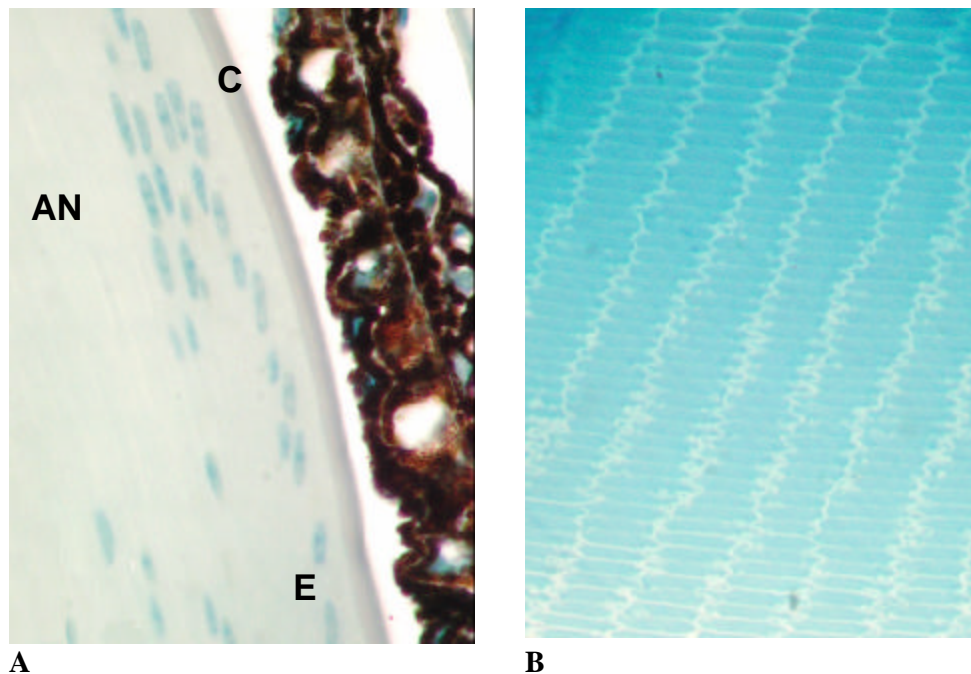
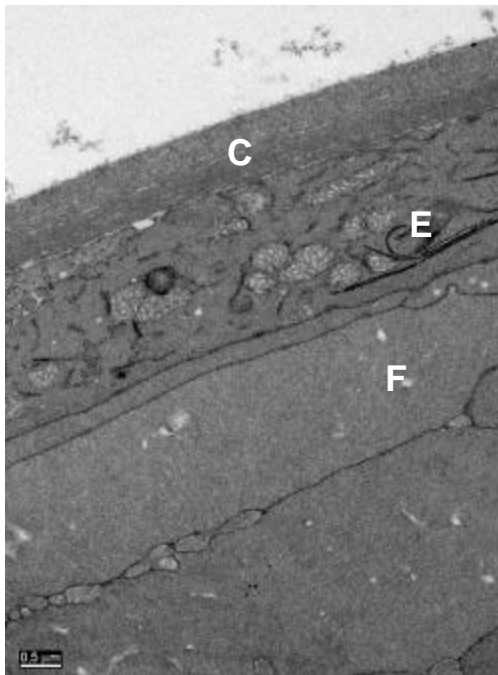
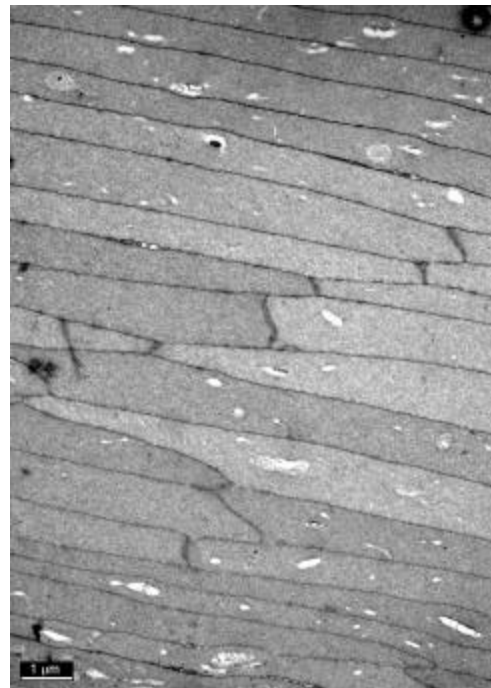


Figura 32. Fotomicrografia al microscopi òptic del cristal·lí de *M. domesticus*. **A:** Zona equatorial mostrant l'arc nuclear del cristal·lí (AN), l'epiteli anterior (E) i la càpsula (C). **B:** Secció hexagonal de les fibres del cristal·lí.

Al microscopi electrònic mostra característiques ultraestructurals similars a les de qualsevol cèl·lula epitelial, amb abundància de mitocondris (Fig. 33-A). Les fibres del cristal·lí ocupen tot l'interior de la lent, un aspecte molt homogeni particularment les més internes (Figs. 33-A i 33-B) ja que no tenen orgànuls ni nuclis. Les membranes plasmàtiques de les fibres veïnes estan íntimament unides, deixant molt poc espai entre elles. De fet, l'espai interfibril·lar és molt més prim que el que separa a les cèl·lules de l'epiteli anterior, afavorint la comunicació i intercanvis entre les fibres adjacents. Totes les fibres es disposen concèntricament al voltant del nucli embrionari. Els processos terminals de les fibres s'uneixen per formar les línies de sutura que en totes les espècies estudiades, excepte en *T. europaea*, adopta una forma d'estrella triradiada, com pot veure's a la Figura 13-B. Tot el cristal·lí queda inclòs dins de la càpsula, transparent i homogènia amb el microscopi òptic (Fig. 32-A), però d'aspecte fibril·lar amb l'electrònic (Fig. 33-A).



A: *S. araneus*



B: *M. gerbei*

Figura 33. Fotomicrografies al microscopi electrònic del cristal·lí. **A:** Zona anterior del cristal·lí, amb la càpsula (C), l'epiteli anterior (E) i les fibres del cristal·lí (F). **B:** Zona interna del cristal·lí.

De totes les espècies considerades, *T. europaea* és la que ha mostrat més diferències morfològiques pel que fa a aquesta lent. Malgrat a tenir forma biconvexa, sovint presenta una protuberància, més o menys accentuada, a la zona pupil·lar que recorda a la forma cònica de la còrnia (Fig. 5D del Capítol 1). Mostra una fina càpsula exterior i un epiteli monoestratificat de cèl·lules gairebé planes que en la zona equatorial insinuen un discret arc nuclear. La gran diferència apareix a l'interior de la lent, ja que sembla estar tot ocupat per cèl·lules que no s'han acabat de diferenciar en fibres i que no adopten una forma concèntrica, sinó més aviat anteroposterior. Els nuclis d'aquestes cèl·lules no estan alineats, situant-se a diferents alçades.

8. DISCUSSIÓ

En totes les espècies estudiades, l'estructura histològica del globus ocular és molt similar a la descrita per altres mamífers. No obstant, s'ha detectat certes diferències entre ordres i entre espècies que val la pena remarcar.

Còrnia

Una característica destacable de la còrnia de la majoria dels insectívors analitzats és la coberta multilaminar que conforma la zona anterior de l'epiteli corneal, comparable a la descrita per Schwartz (1935) a *Crocidura leucodon*, per Branis (1981), i per Branis & Burda (1994) a diferents espècies de sorícids. Per aquests autors es tracta d'una estructura "anhista" (no organitzada en forma de teixit), sense cap orgànel cel·lular perceptible, que probablement deriva del propi epiteli (Branis & Burda, 1994). Els estudis relacionats amb el desenvolupament de l'ull dels insectívors confirmen que aquesta capa no apareix en el moment del naixement en *S. araneus* (Branis, 1985b) ni tampoc en *Suncus murinus* (Sprando *et al.*, 1989). Quan les cries obren les parpelles, 18 o 19 dies després del naixement, l'epiteli està format per 2-3 capes de cèl·lules, i no és fins cinc dies més tard que apareix una altra capa però ja sense nuclis. El fet que en aquest estudi s'hagi constatat que en els individus joves hi ha menys làmines que en els adults i en un estat aparentment menys modificat respecte les cèl·lules epitelials subjacents, vindria a reforçar l'origen

epitelial d'aquestes làmines. Una possible explicació seria que, a diferència del que succeeix en altres epitelis cornials, les cèl·lules més externes no s'exfoliarien en envellir-se i s'anirien acumulant a la superfície anterior. Respecte a la significació fisiològica d'aquesta capa multilaminar, Branis (1989) i Branis & Burda (1994) indiquen que probablement apareix per a protegir l'ull durant l'excavació dels caus o els desplaçaments subterranis ja que assegura que les làmines estan ceratinitzades. No obstant, només Sato (1977) parla d'un epiteli parcialment ceratinitzat a *Sorex shinto*, però no a la resta d'espècies que descriu, i tampoc s'ha trobat cap altre referència a la ceratinització de l'epiteli corneal dels insectívors ni tan sols a *T. europaea*, el més subterrani de tots (Burda *et al.*, 1990). De fet, les còrnies d'aquesta espècie no presenten aquesta coberta multilaminar, com ja va ressenyar Rochon-Duvigneaud (1943). La birefringència que mostra aquesta capa en ser il·luminada amb llum polaritzada podria indicar una elevada concentració proteica amb una disposició molt ordenada a l'interior de les làmines, ja sigui de ceratina o de qualsevol altra proteïna. Si realment fos així, aquesta coberta multilaminar podria actuar augmentant l'índex de refracció de la còrnia, tal i com fan les proteïnes (α -cristal·lines) dins de les fibres del cristal·lí, contribuint en definitiva a incrementar el poder diòptric de l'ull (Sivak *et al.*, 1999). No obstant aquest punt haurà de ser confirmat experimentalment en treballs posteriors.

Coincidint amb el que indica Branis (1981), totes les cèl·lules epitelials cornials situades internament a la coberta multilaminar dels insectívors estudiats són planes. Per tant, l'epiteli corneal d'aquestes espècies no està dividit en estrats diferenciats segons la morfologia cel·lular com en altres mamífers. A més de planes, les cèl·lules epitelials ocupen una gran superfície i, per aquesta raó, la densitat cel·lular és relativament baixa. Potser, la forma aplanada és l'única possible si es té en compte el poc gruix que pot assolir la còrnia en general i el seu epiteli en particular, en funció de les reduïdes dimensions de l'ull (veure Capítols 1 i 4). Les cèl·lules prismàtiques, i fins i tot les cúbiques, amb una altura més gran que les planes, farien que la còrnia fos proporcionalment massa gruixuda o tingués un nombre de fileres cel·lulars molt reduït. En ambdós casos es comprometria el funcionament de la còrnia, tant des del

punt de vista òptic (variació de la potència de la còrnia) com metabòlic (les cèl·lules epitelials realitzen una part important de les funcions metabòliques de la còrnia).

A l'epiteli corneal dels rosegadors, hi manca la coberta multilaminar descrita als insectívors i les cèl·lules epitelials es disposen formant estrats, més o menys diferenciats. Les cèl·lules de l'estrat apical, molt planes, es distingeixen clarament de les de l'estrat basal, lleugerament prismàtiques, mentre que les de la zona mitjana adopten forma i mida intermèdia, essent aproximadament cúbiques. Segons indiquen Calmettes *et al.* (1956) i confirma Merindano (1994), la divisió en tres estrats de l'epiteli corneal és vàlida per les espècies que presenten epitelis gruixuts i poc fiable per aquelles espècies amb epitelis més primers. Com es veurà en el Capítol 4, tot i que l'epiteli corneal dels murins no és massa gruixut en valors absoluts, ho és més que l'epiteli dels arvicòlins i, encara més que el dels insectívors, fet que explicaria les diferències observades respecte a l'estratificació d'aquest epiteli.

Cap de les còrnies observades presenta una capa de Bowman realment apreciable amb microscòpia òptica, fet també destacat per autors com Walls (1963) i Branis (1981, 1989), entre d'altres. Calmettes *et al.* (1956) indiquen que en les espècies en les que no apareix aquesta membrana, en el seu lloc pot observar-se una simple condensació de les fibril·les de l'estroma, que podria considerar-se una capa de Bowman rudimentària. En aquest sentit cal destacar que, les còrnies dels rosegadors i, en menys extensió, les dels insectívors estudiats mostren una certa condensació de les fibril·les col·làgenes més properes a l'epiteli, quan s'observen amb el microscopi electrònic. Hayashi *et al.* (2002) confirmen l'existència d'una capa de Bowman molt prima en mamífers inferiors tals com *Mus* (0.7-0.8 μm de gruix) i *Rattus* (1 μm). Ara bé, els mateixos autors incideixen en que el límit entre la capa de Bowman i l'estroma corneal no està massa ben definit en aquestes espècies i d'aquí la dificultat a l'hora de distingir aquesta membrana fins i tot amb el microscopi electrònic. S'ha de tenir en compte que, com a mínim en humans, a la capa de Bowman s'hi troben una sèrie de fibril·les de col·lagen (de tipus VII) que tenen com a missió la de formar una xarxa tridimensional que relaciona els hemidesmosomes de les cèl·lules basals de l'epiteli amb les fibril·les de col·lagen (de tipus I) de l'estroma corneal (Forrester

et al., 1996; Oyster, 1999). D'aquesta manera, es redueix al màxim la interfase entre l'epiteli i la capa de Bowman, per no afectar la transmissió de la llum que travessa la còrnia, contribuint així a mantenir la transparència corneal. Per aquest motiu sembla que aquesta membrana hauria de ser present en totes les còrnies de mamífers, encara que siguin de poc gruix, tal i com indiquen Calmetes *et al.* (1956) i Hayashi *et al.* (2002). Una altra funció atribuïda a la capa de Bowman és la de jugar un paper important en el manteniment de la curvatura de la còrnia. Per aquest motiu, l'absència o disminució del gruix d'aquesta membrana ha de ser compensada amb membranes de Descemet i epitelis més gruixuts (Merindano, 1994). No obstant, aquest extrem no s'ha pogut comprovar en les espècies estudiades, ja que totes elles tenen una còrnia i, per tant, una membrana de Descemet realment primes. Aquesta membrana i l'endoteli corneal mostren les mateixes característiques que a la majoria de mamífers, el que indica que realitzen les mateixes funcions que a altres còrnies, com per exemple l'intercanvi de substàncies entre l'estroma corneal i l'humor aquós.

Esclera

Totes les espècies estudiades disposen d'una esclera totalment transparent. Segons Walls (1963), l'esclera és quasi bé tan transparent com la còrnia en molts vertebrats inferiors. De fet, el "blanc de l'ull" de l'ull humà està diferenciat de la còrnia no perquè aquesta última s'hagi tornat transparent secundàriament, sinó perquè l'esclera, tot i ser transparent en els primers estadis del desenvolupament embrionari, s'ha tornat opaca. Malgrat aquesta evidència, s'ha fet moltes especulacions respecte quines són les raons per les quals la còrnia i el cristal·lí són transparents, mentre que la qüestió més interessant és dilucidar per què altres teixits oculars, com l'esclera, es tornen blancs i opacs (Walls, 1963). Des del punt de vista histològic, l'esclera humana és una coberta blanca i opaca degut, entre d'altres motius, a la disposició irregular i al diàmetre variable de les fibres col·làgenes i de les fibril·les que les formen (Hogan *et al.*, 1971; Forrester *et al.*, 1996; Oyster, 1999). Però durant la infantesa, o en certes patologies, quan l'estroma escleral és més prim, l'esclera pot adoptar una tonalitat blavosa degut a la pigmentació de la túnica uveal subjacent.

Com que la disposició de les fibres col·làgenes a l'estroma escleral dels insectívors i rosegadors examinats és similar a la descrita en humans, podria pensar-se que la transparència de l'esclera en aquestes espècies estudiades es deu principalment al poc gruix que mostra aquesta capa en totes elles (Veure Capítol 4). A més, si la motilitat ocular és reduïda o nul·la en la majoria d'aquestes espècies (veure Capítol 1), no els hi serà necessari tenir una esclera massa gruixuda, ja que no hauran de suportar les tensions degudes a les contraccions dels músculs oculomotors. Per altra banda, en humans, l'esclera és opaca per evitar que els raigs de llum que incideixen sobre d'ella puguin penetrar dins l'ull, provocant enlluernaments que, en definitiva, empitjorarien la qualitat de la imatge (Kronfeld-Schor *et al.*, 2001). En aquest sentit cal tenir en compte que l'obertura palpebral d'insectívors i rosegadors només deixa al descobert la còrnia, quedant l'esclera totalment coberta pels teixits palpebrals, fet que farà innecessària la seva opacitat.

Coroide

La coroide de la major part dels exemplars analitzats té una estructura similar a la de la resta de mamífers. Només *T. europaea* s'allunya d'aquest patró en presentar una coroide molt prima i no pigmentada. Possiblement, la manca de pigmentació coroidal es veu compensada per la de l'epiteli de la retina, extremadament gruixut i fosc en aquesta espècie (Veure Capítol 4). Segons Rochon-Duvigneaud (1943) la reducció d'aquesta capa respondria a una simplificació morfològica relacionada amb la mida reduïda de l'ull. De fet, els ulls encara més reduïts de la rata talpa (*Spalax ehrenbergi*) no semblen tenir tampoc una coroide massa desenvolupada, segons es desprèn dels treballs realitzats sobre aquesta espècie (de Jong *et al.*, 1990; Sanyal *et al.*, 1990). No obstant, no s'ha trobat a la bibliografia cap referència relacionada amb la manca de pigmentació, que podria estar provocada per l'alentiment general de tot el desenvolupament prenatal del globus ocular.

Cos ciliar

El cos ciliar de les espècies considerades és extremadament reduït i ocupa una zona relativament petita de la túnica mitjana, particularment en els insectívors. L'espècie

que mostra un cos ciliar menys desenvolupat, particularment els processos ciliars ha estat *C. russula*, mentre que a la resta d'insectívors els processos tenen una forma arrodonida amb la superfície interna lleugerament rugosa. En els rosegadors, la pars plicata és lleugerament més llarga amb rugositats més abundants i allargassades, però que en cap cas estableixen contacte amb el cristal·lí. Aquestes observacions coincideixen amb les fetes per Verrier (1935) a *Crocidura (mimula) suaveolens* i Rochon-Duvigneaud (1943) a *T. europaea* i als petits rosegadors en general. Walls (1963) compara la forma d'anell arrodonit i llis del cos ciliar dels insectívors amb el de les serps, mentre que descriu els processos ciliars dels mamífers dels ordres inferiors, entre els que inclou insectívors i rosegadors, com els més primitius. Branis (1981) i Branis & Burda (1994) parlen d'una zona ciliar quasi bé rudimentària en tots els sorícids, fins i tot més primitiva que la que presenten marsupials i monotremes, tal i com afirmava Schwartz (1935) per *Crocidura leucodon* i *Crocidura aranea*. Possiblement, el poc desenvolupament dels processos ciliars en els insectívors podria considerar-se com un cas de simplificació morfològica en relació a les reduïdes dimensions dels globus oculars, que no permeten encabir una pars plicata més gran. A més, cal tenir en compte, que tots els vertebrats estan constituïts per cèl·lules de la mateixa mida i, per tant, els animals més petits tenen menys cèl·lules per formar els mateixos òrgans i estructures. En el cas del cos ciliar dels insectívors, les cèl·lules epitelials seran massa grans per formar plecs fins i profunds com en els processos ciliars d'altres espècies amb ulls més grans, que tenen més cèl·lules i més espai. En el cas dels rosegadors, els processos ciliars són més llargs i expandits dins la cambra posterior ja que tenen més espai i alhora més cèl·lules epitelials per formar-los.

Com s'ha constatat en aquest estudi, la rudimentarietat del cos ciliar ve acompanyada per un múscul ciliar quasi imperceptible en insectívors i molt reduït en rosegadors, tal i com també indiquen Rochon-Duvigneaud (1943), Duke-Elder (1958), Walls (1963), Hughes (1979), Ballard *et al.* (1989), McBrien *et al.* (1993) i Branis & Burda (1994). Per McBrien *et al.* (1993) la majoria de rosegadors no presenten habilitat acomodativa, ja que el múscul ciliar, relativament poc desenvolupat, és incapaç de causar cap deformació al cristal·lí que, per altra banda, és massa gran i amb una càpsula molt dèbil (Walls, 1963). Així, segons aquest darrer autor, els processos

ciliars dels mamífers d'ordres inferiors, comparats amb els dels rèptils i les aus, són vestigis afuncionals des del punt de vista "mecànic", però que han persistit per tal de mantenir la superfície de secreció de l'humor aquós, contribuint d'aquesta manera a regular la pressió intraocular. Possiblement, la manca d'acomodació en aquestes espècies es pugui compensar modificant la profunditat de focus del sistema òptic, mitjançant la contracció o dilatació dels músculs de l'iris (Hughes, 1977; McBrien *et al.*, 1993; Martin, 1999) tal i com es veurà més endavant. No obstant cal remarcar que, segons West *et al.* (1991) no es pot predir l'absència d'acomodació en funció de que el múscul ciliar sigui diminut alhora que Murphy *et al.* (1983) indiquen que el ratpenat *Pterophus giganteus* és capaç d'acomodar malgrat que el seu múscul ciliar és petit.

Iris

La descripció de l'iris de diverses espècies d'insectívors per part de Branis (1981) i els estudis realitzats a l'iris de *Castor canadensis* (Ballard *et al.*, 1989) i de *Rattus* (Kelly & Arnold, 1972; Murata *et al.*, 1998) s'adiuen amb els resultats descrits en el present treball. Per una banda, el múscul constrictor de la pupil·la està, en general, ben desenvolupat, en totes les espècies considerades, situant-se a prop de la vora pupil·lar. Per altra banda, el múscul dilatador de la pupil·la està poc diferenciat, formant prolongacions de la superfície basal de l'epiteli pigmentat anterior de l'iris, sent difícil d'observar amb microscopi òptic. De fet, autors com Walls (1963) advoquen per l'absència d'aquest múscul en els placentats nocturns d'ordres inferiors, el que inclouria els insectívors i rosegadors. Segons aquest autor, l'acció antagonista de l'esfínter pupil·lar es produiria gràcies a l'elasticitat de l'estroma de l'iris, deguda a la presència de fibres elàstiques, i a la disposició radial i ondulant dels vasos sanguinis, que s'estiren quan l'esfínter es contrau i tornen a la seva posició inicial quan es relaxa. No obstant, les protuberàncies esfèriques que apareixen a la superfície de l'iris en condicions midriàtiques confirmen la contracció de les cèl·lules mioepitelials ja que, en rebregar el seu propi citoplasma cap a la superfície anterior, indueixen l'aparició de les esmentades protuberàncies (Murata *et al.*, 1998).

L'iris és una estructura ocular de gran importància en el procés de la visió, ja que modificant les dimensions de la pupil·la, influeix sobre la il·luminació i qualitat de la imatge. En general, l'iris regula la intensitat de llum que arriba a la retina per tal que sigui suficient per estimular als fotoreceptors però sense arribar a l'enlluernament. A més, evita que la llum que ha travessat la zona perifèrica de la còrnia arribi a les zones equatorials del cristal·lí i es projecti sobre la retina, ja que només la zona central del cristal·lí és òpticament bona, degut a les aberracions òptiques de la zona perifèrica de la lent. Per això, i dins d'uns certs límits, la imatge de la retina serà més nítida i definida, quant més petita sigui l'obertura pupil·lar. Però, quan més petita és l'obertura pupil·lar, més fosca serà la imatge, al menys que la pupil·la s'obri una mica més. Així doncs, s'ha d'arribar a un compromís perquè l'augment en la il·luminació de la imatge comporta un sacrifici en la qualitat d'aquesta imatge i viceversa. Els animals diürns i, sobretot, els arrítmics són als que més els interessa tenir una pupil·la d'obertura variable segons sigui de dia o de nit i, per tant, seran els que hauran de tenir uns músculs irídics més desenvolupats. En aquest sentit cal remarcar que són els soricins en el cas dels insectívors, i els arvicolins, en el cas dels rosegadors, els que presenten un múscul constrictor més voluminós. Aquest fet indicaria que els integrants d'aquestes subfamílies són els més arrítmics de tots els analitzats, el que coincideix amb l'exposat al capítol Material i mètodes. No obstant, dins dels arvicolins poden trobar-se espècies d'hàbits subterranis, el que podria indicar que el desenvolupament d'aquest múscul també respon a un component genètic propi de la subfamília. En canvi, *C. russula*, d'hàbits majoritàriament nocturns, i *T. europaea*, d'hàbits subterranis, així com els murins, nocturns o crepusculars, tenen el múscul constrictor menys desenvolupat. Encara que, aparentment, l'esfínter pupil·lar dels murins sigui més petit, el seu grau de contracció és notable (Block, 1969).

Al mateix temps, l'obertura pupil·lar també condiciona la profunditat de camp del sistema visual (Martin, 1999), que podria definir-se com la distància en que un objecte pot apropar-se o allunyar-se del sistema òptic, sense que es produeixi el desenfocament de la imatge (Campbell, 1957). Cal remarcar que a mesura que disminueix l'obertura pupil·lar més ràpidament augmenta la profunditat de camp, especialment en els ulls petits i que, quant més petit és l'ull més àmplia serà la

profunditat de camp (Martin, 1999). Segons Block (1969), la pupil·la de l'ull dels murins, com per exemple la rata, pot fer-se tan petita que pot dotar a l'animal d'una gran profunditat de camp en condicions fotòpiques, tal i com va demostrar Hughes (1977). Així doncs, els músculs de l'iris podrien compensar la falta de poder acomodatiu en insectívors i rosegadors, encara que d'una manera no massa efectiva, ja que la profunditat de camp és més petita en objectes propers que en llunyans (Martin, 1999), i possiblement són aquests objectes els que han d'enfocar els petits mamífers que viuen a prop del sòl.

Retina

Les observacions realitzades a la retina han demostrat que és la part de l'ull que mostra més diferències morfològiques tant des del punt de vista taxonòmic com adaptatiu o ecològic. En totes les espècies estudiades, excepte en *T. europaea*, la retina està ben desenvolupada i no mostra cap senyal de regressió, malgrat la mida reduïda dels ulls. Totes les capes de la retina estan ben disposades i són fàcils de reconèixer, fins i tot, en microscòpia òptica. Rochon-Duvigneaud (1943), Duke-Elder (1958) i Walls (1963) troben aquests mateixos resultats per insectívors i rosegadors en general, a l'igual que Schwartz (1935), Kolmer & Lauber (1936), Sato (1977), Grün & Schwammberger (1980), Sigmund (1985), Sigmund *et al.* (1987), Branis (1981) i Branis & Burda (1994) per insectívors i Cohen (1960), Carter-Dawson & Lavail (1979), Long & Fisher (1983), Feldman & Phillips (1984) i Kaufman (1992) per rosegadors. En canvi, la retina dels talps mostra un cert grau d'immaduresa ja que durant el seu desenvolupament embrionari pateix un cert endarreriment (Míšek, 1988) del qual no sembla que s'arribi a recuperar després del naixement. A les altres espècies, la retina continua desenvolupant-se i quan les cries abandonen el niu ja és completament madura (Branis, 1985b; Sprando *et al.*, 1989, per insectívors; Braekevelt & Hollenberg, 1970; Pei & Rhodin, 1970; Caley *et al.*, 1972; Kaufman, 1992, per rosegadors).

En cap de les espècies estudiades s'ha pogut distingir una retina central o fòvea, tal i com també ho indiquen Rochon-Duvigneaud (1942); Walls (1963); Grün &

Schwammberger (1979); Branis (1981, 1985a, 1988), Branis & Burda (1994), Kronfeld-Schor *et al.* (2001), entre d'altres. Com ja s'ha comentat anteriorment (veure Capítol 1), les espècies sense fòvea i amb el cristal·lí esfèric tindran l'avantatge que la imatge estarà igual d'enfocada sigui quina sigui la direcció dels raigs de llum. Ara bé, segons Hughes (1977), a la retina de *Rattus* i *Mus* és possible distingir una àrea horitzontal just per sobre del disc òptic i desplaçada cap a la regió temporal de la retina, a on la densitat de cèl·lules ganglionars és lleugerament superior a la resta de zones. Aquesta “franja visual” al voltant de l'eix de fixació és freqüent en els petits habitants nocturns del sotabosc i a *Rattus*, està acompanyada per un increment en la densitat de cons en les capes més externes. No s'ha trobat cap estudi que indiqui l'existència de “franges visuals” a les retines de la resta d'espècies estudiades, aspecte que seria interessant ja que la forma d'aquestes franges, que depèn de la distribució de les cèl·lules ganglionars a través de la retina, està relacionada amb la simetria en que cada espècie percep el món (Hughes, 1977) .

Epiteli pigmentat

L'epiteli pigmentat de la retina de les espècies considerades està format per una capa de cèl·lules epitelials amb un nombre variable de grànuls de melanina, més o menys dispersos pel seu citoplasma. Estudis realitzats per Walls (1963), Feldman & Phillips (1984) i Kronfeld-Schor *et al.* (2001) entre d'altres, suggereixen que el grau de melanització de l'epiteli retinià pot estar relacionat amb diferents patrons d'activitat temporal. En aquest sentit, els grànuls de pigment representen una barrera per prevenir l'excés de llum que pugui travessar l'esclera transparent, fet que disminuiria la resolució de la imatge; alhora, absorbeixen la llum que no ha incidit sobre cap fotoreceptor impedit la seva dispersió (Kronfeld-Schor *et al.*, 2001). A més, l'exposició dels teixits pigmentats de l'ull a llum intensa i a raigs ultraviolats de tipus B estimula la pigmentació i augmenta el nombre de melanòcits (Schraermeyer, 1993; Bessou *et al.*, 1995). Per aquests motius, els grànuls de melanina dins de l'epiteli retinià seran més nombrosos en els animals d'hàbits més diürns, ja que han de suportar radiacions solars més intenses. Cal remarcar que tots els insectívors estudiats en el present treball presenten una quantitat molt similar de grànuls de melanina, excepte *T. europaea*, que té unes cèl·lules epitelials més voluminoses que

a la resta d'insectívors i totes elles estan plenes de grànuls. Aquest fet no respon a cap adaptació al ritme d'activitat diari que realitza sinó a un endarreriment en el desenvolupament embrionari de la retina, com es veurà al **Capítol 4**. Entre els rosegadors, els arvicolins tenen l'epiteli retinià molt més pigmentat que els murins. El fet que *A. terrestris* i *M. duodecimcostatus*, amb activitat subterrània, i *C. glareolus* i *M. arvalis*, de preferències més crepusculars o diürnes, tinguin quantitats de pigment similars podria indicar que la pigmentació de l'epiteli retinià és una característica pròpia de la subfamília més que no pas una adaptació a les condicions lluminoses de l'ambient. També podria ser un indicador que l'antecessor comú tenia un comportament més aviat diürn.

En quant a la distribució dels grànuls de pigments dins del citoplasma cel·lular, autors com Pang & Yew (1979) en cobais (*Cavia porcellus*) i més recentment Calderón *et al.* (2002) amb viscatxes (*Lagostomus. maximus*) han demostrat que la distribució del pigment varia durant el cicle llum-foscor, en funció dels canvis rítmics circadians en la síntesi de melatonina retiniana. Així, els grànuls de pigment estan dispersos pel citoplasma durant el dia, amb el màxim de dispersió al voltant de les 16h, i agregats al pol apical durant la nit, amb el màxim d'agregació a les 24h. Aquests canvis coincideixen respectivament amb la producció mínima i màxim de melatonina (Calderón *et al.*, 2002). D'acord amb els resultats d'aquests autors, les espècies analitzades en el present treball, capturats a partir del migdia, preferentment *T. europaea*, *A. terrestris*, *M. duodecimcostatus* i *M. arvalis*, manifesten una distribució del pigment molt dispersa, ocupant la major part del citoplasma. En canvi, a la resta d'individus sacrificats a primeres hores del matí (8 i 9 h), els grànuls de pigments només estan dispersos en les cèl·lules de la regió més anterior, propera a l'ora serrata, mentre que a les cèl·lules pròximes a la papil·la òptica estan distribuïts exclusivament al pol apical. Aquest fet podria indicar que després d'assolir el màxim d'agregació apical a mitja nit, quan els raigs de llum que incideixen sobre l'epiteli són realment escassos, el pigment comença a dispersar-se per la regió anterior i progressa posteriorment fins assolir el grau màxim de dispersió a la tarda, quan la retina està exposada a les radiacions solars són més intenses. Així, la distribució dels grànuls de melanina podria estar també relacionada la intensitat de llum de l'ambient.

Aquest punt, però, hauria de ser confirmat en estudis més exhaustius. Possiblement, les diferències observades per Sigmund *et al.* (1987), entre l'epiteli de *C. suaveolens* (molts grànuls de pigment dispersos per tot el citoplasma) i el de *S. araneus* (només al pol apical i en menor quantitat), siguin fruit d'aquestes variacions cícliques i zonals en la distribució dels grànuls de melanina, ja que en el present treball, l'epiteli retinià d'ambdues espècies mostren patrons de pigmentació molt similars.

Neuroretina

Excepte a *T. europaea*, s'ha trobat els dos tipus de fotoreceptors en totes les retines observades, si bé en proporcions diferents segons l'espècie considerada (veure Capítol 5). Els cons i els bastonets són neurones altament especialitzades i polaritzades, que mostren una estructura similar i una disposició dins de l'ull molt uniforme entre els vertebrats. Aquesta uniformitat reflecteix la seva diferenciació embrionària comuna (Locket, 1999). Malgrat aquests trets coincidents, els fotoreceptors de les retines de les diferents espècies estudiades han mostrat certes variacions respecte a la mida i ordenació, relacionades tant amb la taxonomia com amb adaptacions a factors ambientals.

Com en tots els mamífers, la mida, posició i la distribució de la cromatina en el nucli fan possible distingir la presència de cons i bastonets (Locket, 1999). En el cas dels insectívors, i concretament en els sorícids, també s'ha descrit els dos tipus de fotoreceptors a *Crocidura leucodon* i *Crocidura aranea* (Schwartz, 1935), a *S. araneus* (Rochon-Duvigneaud, 1943) i a totes les espècies de sorícids de l'antiga Txecoslovàquia (Branis, 1981). No obstant, hi ha certs autors com Verrier (1935) a *Crocidura (mimula) suaveolens*; Rochon-Duvigneaud, (1943) a *Crocidura* sp; Cei (1946) a *Blarina brevicauda*, *Chimarrogale himalayca* i *Anourosorex assamensis* i Sharma (1957) a *Suncus murinus*, que indiquen que els fotoreceptors dels ulls dels sorícids no són homòlegs ni als bastonets ni als cons presents en altres mamífers, i semblen tenir una forma intermèdia entre ambdós tipus. Per Walls (1963) les musaranyes, en general, no tenen cons o en tenen molt pocs, i Sato (1977) indica que a *Sorex shinto*, una musaranya japonesa, les cèl·lules visuals semblen ser uniformes i no es possible distingir si són cons o bastonets. La prova definitiva de l'existència

dels dos tipus de fotoreceptors a les retines dels sorícids l'aporta Grün & Schwammbberger (1980) i Sigmund *et al.* (1987) en el seus estudis ultraestructurals de la retina de diverses espècies d'insectívors.

En general, els resultats obtinguts per Grün i Schwammbberger (1980) coincideixen amb els descrits en el present treball. Així, per aquests autors, les retines de *S. coronatus*, *N. fodiens* i *C. russula* semblen tenir els dos tipus de fotoreceptors, malgrat que a *C. russula* és més difícil d'assegurar-ho, degut a la baixa densitat d'aquestes cèl·lules. Només l'existència de dues classes de nuclis diferents, de segments externs més curts i de citoplasmes amb mitocondris més densos als electrons els permet parlar a favor de la presència de cons a la retina de *C. russula*. Per aquests autors, els nuclis dels bastonets són generalment esfèrics, foscos i més petits que els dels cons. Els segments externs dels dos tipus de fotoreceptors no difereixen de la resta de mamífers, encara que els cons difícilment tenen forma cònica, assemblant-se a bastonets més curts. Els segments interns dels bastonets de les tres espècies estan formats per l'el·lipsoide i el mioide, mentre que en els cons de *N. fodiens* i *C. russula* no distingeixen mioide. Aquest últim punt discrepa amb els resultats trobats en aquest estudi ja que, com pot observar-se a les **Figures 19-A, 25-A, 25-B, 26-C i 27-A**, ambdues espècies mostren una zona entre l'el·lipsoide i el nucli desproveïda de mitocondris i plena d'òrgans citoplasmàtics, que es correspondria amb el mioide. Tampoc coincideix la forma de l'el·lipsoide que descriuen pels sorícids ni la distribució de mitocondris en el seu interior.

Sigmund *et al.* (1987) també distingeixen dos tipus de fotoreceptors a *S. araneus* i a *C. suaveolens*, introduint la situació i quantitat de cromatina nuclear com un nou caràcter distintiu entre els dos. Per aquests autors, els nuclis dels cons es situen en una sola línia per sota de la membrana nuclear externa alhora que són més pobres en cromatina que els bastonets. A més, en comparar les retines d'aquestes dues espècies assenyalen que la diferència més gran entre elles radica en la forma i mida dels mitocondris dels segments interns dels cons. Aquesta afirmació coincideix, en part, amb els resultats obtinguts en el present treball, com es veurà a Capítol 3.

En el cas dels rosegadors, l'única referència bibliogràfica que s'ha trobat sobre la retina dels arvicolins és la de Rochon-Duvigneaud (1943), que especifica que en la retina de *Pitymys (Arvicola) subterraneus* no es distingeixen cons. En canvi, s'hi que s'ha fet estudis de la retina dels murins, particularment en espècies utilitzades en experimentació (Cohen, 1960; Carter-Dawson & Lavail, 1979; Mayhew & Astle, 1997) i concretament en aquelles soques mutants que permeten aportar dades sobre determinades patologies de la retina humana (Cicerone, 1976; DiLoreto *et al.*, 1994; Shoji *et al.*, 1998). Potser degut als seus hàbits nocturns, es va considerar que les retines de rates i ratolins només estaven formades per bastonets, encara que estudis llargament ignorats i citats per Carter-Dawson & Lavail (1979), com ara Krause (1895), Menner (1928) i Sidman (1958), suggerien la presència de cons a la retina del ratolí. Walls (1963) també constata aquest fet, si bé indica que són tan poc nombrosos que no poden jugar cap paper important en la visió d'aquests mamífers. És l'estudi de Carter-Dawson & Lavail (1979), mitjançant el microscopi electrònic, el que aporta la prova definitiva de la presència de cons i bastonets a les retines de ratolins. Els resultats d'aquests autors, així com els de Cohen (1960) en el seu estudi sobre els bastonets de *Mus*, coincideixen amb les descripcions fetes en aquest treball, no només per *Mus*, sinó també per *A. sylvaticus*. Aquest fet, recolzat amb els resultats obtinguts per les altres espècies de rosegador estudiades, indicaria que les característiques de les cèl·lules visuals són pròpies de cada subfamília.

En aquest sentit, caldria destacar la uniformitat en quant al patró de cromatina que diferencia els cons i els bastonets dels diferents grups taxonòmics. Així, els cons dels insectívors tenen menys quantitat d'heterocromatina que els dels rosegadors i està situada preferentment a la perifèria del nucli. En canvi, en els rosegadors ocupa quasi bé tot l'interior del nucli, adoptant una forma molt més lobulada en els murins que en els arvicolins. Pel que fa als bastonets, en tots els casos l'heterocromatina mostra una situació més central, sent els murins els que presenten el grau màxim de condensació. Malgrat que es desconeix el significat de les diferències en quant a la quantitat i distribució de la cromatina en els nuclis dels fotoreceptors, aquestes són un bon criteri per diferenciar les retines dels diferents taxa.

En algunes retines, principalment d'insectívors (*S. minutus*, *S. araneus* i *S. coronatus*) però també de rosegadors (*A. terrestris*), s'ha pogut distingir un tercer tipus de soma cel·lular diferent als de cons i bastonets. El fet que aquests somes siguin poc nombrosos podria indicar que possiblement també se'ls podria localitzar en altres espècies. Malgrat que no s'ha pogut determinar de quin tipus de cèl·lula es tracta, no es pot descartar que sigui un tipus de con minoritari. Segons Szel *et al.* (1996) la discriminació entre les subpoblacions de cons és més difícil que la identificació de cons i bastonets i, encara que hi ha subtils característiques morfològiques típiques de certes subpoblacions de cons, només estan confinades a certes espècies i no serveixen en altres. Long & Fisher (1983), a la retina de l'esquirol americà *Spermophilus beecheyi*, i Foelix *et al.* (1987) a la de *Tupaia belangeri*, indiquen la presència de dos tipus de cons atenent a diferències d'electrodensitat dels nuclis i també dels el·lipsoides. No s'ha trobat, però, cap referència que indiqui la possibilitat de reconèixer aquestes subpoblacions ni en insectívors ni en rosegadors estudiats. Serien necessaris nous estudis per tal d'assegurar o descartar que aquests somes pertanyen realment a cons.

En quant a la presència de somes de fotoreceptors situats entre les expansions externes dels fotoreceptors, sembla ser un fet normal tant en les retines joves com en les adultes. Segons Lai (1980), aquests somes són més freqüents a la retina perifèrica i a prop del disc òptic. Es desconeix el mecanisme i significat d'aquest moviment de nuclis cap a l'espai subretinal, però probablement està relacionat amb la pèrdua gradual de fotoreceptors que es produeix normalment amb l'edat (Lai, 1980).

La morfologia de l'expansió externa dels fotoreceptors també constitueix un bon criteri per la diferenciació de les retines dels insectívors i dels rosegadors estudiats. La diferent longitud d'aquestes expansions pot explicar-se pel fet que la retina dels insectívors no pot ser tan gruixuda com la dels rosegadors, simplement per les reduïdes dimensions oculars dels primers. Però també pot respondre a la diferent estratègia vers la llum que segueixen aquestes espècies. En aquest sentit, els murins, els més nocturns de tots els exemplars analitzats, són els que tenen el segment extern més llarg i prim per poder captar més quantitat de llum (veure Capítol 5), mentre que

els soricins, els més diürns, tenen aquest segment més curt ja que la captura dels fotons no els hi és tan difícil. Per la mateixa raó, el segment intern dels fotoreceptors dels rosegadors no són mai tan voluminosos com els dels insectívors per tal d'aconseguir un grau d'empaquetament de les cèl·lules visuals molt més elevat, evitant que quedin espais per on es puguin perdre els pocs fotons que entren dins de l'ull.

Malgrat aquestes diferències en la longitud i volum, les expansions externes dels fotoreceptors de les espècies estudiades responen al mateix patró que la majoria de mamífers. L'única excepció es troba a *T. europaea*. Per Grim (1990), la organització típicament paral·lela dels discs membranosos no és necessària pels animals que passen quasi bé tota la seva vida sota terra i que, per tant, la poca informació visual que poden rebre no els hi suposa cap avantatge per la seva supervivència. Per aquest motiu, apunta que la disposició irregular dels discs dels segments externs dels fotoreceptors es deguda a l'aturada que pateix la retina durant la seva morfogènesi o a una degeneració posterior.

Com a la resta de mamífers, a les retines estudiades s'ha pogut observar la renovació dels discs membranosos del segment extern de les cèl·lules fotoreceptores. Aquest procés comporta la síntesi de nous discs a la base del segment extern, el desplaçament d'aquests discs cap a l'extrem apical a mesura que se'n van formant de nous, i la separació dels discs més externs per a ser fagocitats i degradats dins de l'epiteli pigmentat (Lavail, 1976a i b; Forrester *et al.*, 1996; Oyster, 1999; Locket, 1999). No obstant, no queda massa clar el paper de les microvellositats epitelials en l'última part del procés (Oyster, 1999). Per autors com Hogan *et al.* (1971), aquestes microvellositats empenyen la membrana plasmàtica dels fotoreceptors provocant la seva invaginació, mentre que per altres, com Anderson & Fisher (1976), només actuen en el transport del fragment del segment extern separat cap a l'epiteli on serà fagocitat. Segons aquests darrers autors, el fet que els discs de l'extrem terminal del segment extern es corbin abans que es produeixi la invaginació de la membrana plasmàtica, adoptant formes similars a les observades a les Figures 22-D i 23-A, podria indicar que el detonant de la darrera fase de la renovació dels discs

membranosos es troba en la pròpia cèl·lula fotoreceptora. Cal dir, però, que en les retines estudiades s'ha detectat processos fagocítics dels dos tipus, pel què no es pot descartar que puguin produir-se alhora, encara que el significat d'aquest fet hauria de ser estudiat més profundament en futurs treballs.

En general s'accepta que la finalitat del procés de renovació dels discs dels bastonets és simplement un manteniment preventiu, reemplaçant els pigments visuals que contenen abans que deixin de ser funcionals amb el pas del temps (Young, 1971a, 1971b, 1976; Anderson & Fisher, 1976). No obstant, no hi ha proves que demostrin que les molècules de rodopsina pateixin cap tipus de degradació funcional que faci necessària la seva renovació (Bassi & Power, 1990; Schremser & Williams, 1995). Per això, certs autors (revisar Penn & Anderson, 1991; Schremser & Williams, 1995) han proposat que aquest procés té com a finalitat proporcionar plasticitat a la retina, preparant al bastonet per un potencial canvi adaptatiu a noves condicions d'il·luminació. Així, els bastonets de rates adaptades a noves intensitats lumíniques modifiquen el patró de la renovació del segment extern, tant pel que fa a la seva longitud com a la quantitat de rodopsina que conté (Battelle i Lavail, 1978; Schremser i Williams, 1995), apareixent segments molt més llargs i amb més discs al seu interior quan s'esposen als animals a condicions de foscor continuada.

En el present estudi, s'ha pogut observar la separació dels discs apicals dels bastonets i la presència de fagosomes en els primers estadis de digestió dins de l'epiteli retinià només en els exemplars d'aquelles espècies que han estat sacrificats a primeres hores del matí. En canvi, en els exemplars capturats a últimes hores del matí o durant la tarda, pertanyents principalment a *T. europaea*, *A. terrestris*, *M. arvalis* i *M. duodecimcostatus*, no ha estat possible ni tan sol observar fagosomes. La manca de fagosomes en aquests individus podria estar relacionada amb que la seva degradació es produeix molt ràpidament, en un període no superior a les 2 hores (Lavail, 1976a i b). Aquests resultats corroboren que, també en les espècies estudiades, el procés de separació i fagocitosi dels segments externs dels fotoreceptors es realitza cíclicament, just després de la sortida del sol en el cas dels bastonets (Young, 1976; Lavail, 1976; Carter-Dawson i Lavail, 1979; Morell, 1995; Oyster, 1999; Calderon *et al.*, 2002), i

just després de fer-se fosc en els cons (Morell, 1995; Oyster, 1999), encara que en aquestes cèl·lules el moment de renovació pot variar considerablement segons les espècies (Long *et al.*, 1986).

La resta de capes de la neuroretina segueix, en general, una estratificació similar a la d'altres mamífers. Tan sols *C. russula* i *T. europaea* s'aparten lleugerament d'aquest patró d'organització. En el primer cas, la capa nuclear interna presenta un nombre reduït de fileres de nuclis, mentre que la capa plexiforme interna està dividida per una filera de cèl·lules que podrien ser les cèl·lules amacrines desplaçades de la seva capa original, la nuclear interna (Branis, 1981). Segons Grün & Schwammberger (1980), el nombre reduït d'aquestes cèl·lules es traduirà en una transmissió més directe entre cèl·lules bipolars i ganglionars, el que reduirà considerablement el processat de la informació. Per això, no dubte en descriure la retina de *C. russula* com menys desenvolupada que la de *S. coronatus* i *N. fodiens*. Per altra banda, no totes les retines de *T. europaea* mostren un mateix grau de diferenciació estratigràfica. Mentre que en algunes retines tots els estrats estan ben definits, en altres les cèl·lules es troben molt disperses envaint, fins i tot, les capes plexiformes. A més, els somes cel·lulars de totes les cèl·lules retinianes tenen un aspecte molt similar. Aquest fet està relacionat amb que la retina d'aquesta espècie manté una estructura embrionària durant un període de temps relativament llarg després del naixement (Míšek, 1988) i, per tant, el seu aspecte i, possiblement, la seva funcionalitat dependran de l'edat de l'animal.

La vascularització de la retina, tant dels insectívors com dels rosegadors, s'estén des de la membrana limitant interna fins la capa plexiforme externa, no irrigant mai la capa nuclear externa ni la de fotoreceptors. Segons Duke-Elder (1958) i Chase (1982), la retina d'aquests petits mamífers és del tipus holangiòtic, igual que la d'alguns carnívors, ungulats i primats. Es tracta doncs d'una retina ben vascularitzada, tal i com indiquen Schwartz (1935), Sato (1977), Branis (1981), Chase, (1982) i Buttery *et al.* (1991). El fet que en els insectívors els capil·lars més interns sobresurtin de la capa de les fibres del nervi òptic, envaint la cambra vítria podria anar encaminat a deixar el màxim espai possible als elements neuronals.

Cristal·lí

El cristal·lí de totes les espècies considerades, excepte el de *T. europaea*, està ben desenvolupat, mostrant una estructura similar a la d'altres mamífers (Rochon-Duvigneaud, 1943; Duke-Elder, 1958; Walls, 1963; Branis, 1981, 1985b; Branis & Burda, 1994; Siva k *et al.*, 1994; Rafferty & Esson, 1974; Kuszak *et al.*, 1994). En el cas de *T. europaea* i segons Rochon-Duvigneaud (1943), el fet que la zona central de la cara anterior sobresurti per l'obertura pupil·lar revela que la massa cristal·lina és molt tova. A més, indica que sembla faltar un "principi director" que determini la disposició de les fibres dins de la lent. Així, les fibres són més o menys allargades en sentit anteroposterior però no dibuixen l'aspecte concèntric típic, fet que coincideix amb els cristal·lins de talps analitzats en aquest treball (Fig. 5E del Capítol 1). Conclou que el cristal·lí del talp és fruit d'una regressió després d'una aturada en el desenvolupament. Per Míšek (1988) aquesta aturada té lloc a partir dels primers estadis del desenvolupament embrionari. Pràcticament des llavors, el cristal·lí manté una estructura cel·lular i, malgrat que es produeix una lleugera elongació de les cèl·lules, aquestes mai es "cristalitzen", es a dir, no es transformen en fibres. Aquesta estructura prenatal persisteix en l'ull adult i pot ser la causa del seu funcionament imperfecte. La manca de desenvolupament del cristal·lí és un tret comú en altres mamífers subterranis com a les rates talps de la família Spalacidae (de Jong *et al.*, 1990; Sanyal *et al.*, 1990; Herbin *et al.*, 1993). En un estudi embriològic i ultrastructural de l'ull d'*Spalax ehrenbergi*, Sanyal *et al.* (1990) indiquen que inicialment, el desenvolupament del cristal·lí és normal però que en estadis posteriors augmenta la desorganització cel·lular, apareixen espais vacuolats i la lent assoleix una forma irregular típica de l'espècie.

Pot concloure's que totes les espècies analitzades responen al mateix model histològic i ultrastructural del globus ocular que la resta de mamífers. És cert que algunes d'elles mostren certes característiques relacionades amb els patrons d'activitat diaris propis (com el diferent grau de pigmentació de l'epiteli retinià, per exemple). Però també ho és que aquestes característiques no són exclusives de l'espècie, sinó més aviat del gènere, de la subfamília i, fins i tot de la família. Per

exemple, tots els sorícids tenen una capa multilaminar que cobreix l'epiteli corneal; tots els arvicolins tenen un múscul constrictor de la pupil·la més voluminós i l'epiteli retinià més pigmentat que els murins; les retines de cada subfamília, tant d'insectívors com de rosegadors, es poden diferenciar entre si per la distribució d'heterocromatina dins dels nuclis dels seus fotoreceptors. Possiblement, cada grup taxonòmic conserva les característiques estructurals bàsiques, heretades de l'avantpassat comú, que posteriorment es van anar modificant per adaptar-se als nous hàbits i hàbitats que cada espècie ha anat conquerint. Així doncs, les diferències histològiques que s'observen en els ulls de les espècies estudiades semblen estar tant relacionades amb aspectes taxonòmics com ecològics, sent difícil decidir quin dels dos és el que més ha contribuït per arribar al grau de diferenciació actual.

