

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Microscopía electrónica de barrido como herramienta para el estudio anatómico de las bolsas gutrales del equino (*Equus ferus caballus*)

Por:

PERLA VANESSA TORRES HERRERA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Microscopía Electrónica de Barrido como herramienta para el estudio
anatómico de las Bolsas guturales del equino (*Equus ferus caballus*)

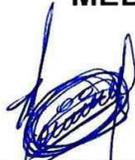
Por:

PERLA VANESSA TORRES HERRERA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



Dr. Jair Millán Orozco
Presidente

Aprobada por:



PhD. William Pérez González
Vocal (externo)



M.C. Jersson Millán Orozco
Vocal (externo)



M.E. Edmundo Guzmán Ramos
Vocal Suplente

MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Febrero 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Microscopía Electrónica de Barrido como herramienta para el estudio
anatómico de las Bolsas gutrales del equino (*Equus ferus caballus*)

Por:

PERLA VANESSA TORRES HERRERA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Jair Millán Orozco
Asesor principal



PhD. William Pérez González
Coasesor (externo)



M.C. Jersson Millán Orozco
Coasesor (externo)



MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Febrero 2022



AGRADECIMIENTOS

A Dios, Gracias a ti mi Dios, que con tu amor y bondad siempre me has dado la fortaleza para seguir adelante, por darme la bendición de nacer en una familia llena de amor y de poner en mi camino personas maravillosas que siempre me dejan alguna enseñanza.

A mis padres, Sr. Heber Rolando Torres Rojas, que Dios lo tenga en su gloria, gracias Papá por ahora ser un ángel en mi vida, por ser promotor de mis sueños. A mi madre, la Lic. Araceli Verónica Herrera García, por el apoyo incondicional en cada paso que doy, por sus consejos, por confiar y creer en mí, y sobre todo por ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi hermano, Heber Abdiel Torres Herrera, por estar en los momentos más importantes de mi vida, por su apoyo y cariño siempre incondicional.

A mi asesor principal, Dr. Jair Millán Orozco, por su confianza al compartir conocimientos, dedicar tiempo y paciencia al apoyar y asesorar esta tesis.

Al PhD. William Pérez González (catedrático uruguayo), por facilitar la información base requerida para la realización del presente estudio.

Al M. en C. Jersson Millán Orozco, por las valiosas observaciones y enriquecer el presente documento; así como la edición del mismo.

Al M.V.Z. Edmundo Guzmán Ramos, por su confianza a lo largo de este camino, por compartir sus conocimientos, y sobre todo por permitirme formar parte de su

equipo de trabajo en el hospital de grandes especies y por apoyar e impulsar el desarrollo en el área de equinos.

A mis compañeros, ya que, gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral, fueron mi familia en una ciudad donde no conocía antes a nadie y así, aportaron en mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

A toda mi familia, por siempre apoyarme y contribuir a la persona que soy hoy en día.

A mi Alma Mater, por ser mi segundo hogar, permitirme formarme en ella, y por brindarme tanto apoyo y cariño.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo con todo mi corazón a mis padres.

Sin ti Madre, no lo hubiera logrado, sin tus sacrificios y esfuerzos no sería lo que hoy soy, tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien, acompañada de todos los valores que me has inculcado.

A mi padre, que sin él nunca hubiera pasado por mi mente estudiar esta profesión que tanto amo.

Por esto les doy este trabajo en ofrenda, porque gracias a Dios, con su paciencia, amor, apoyo y esfuerzo, logre terminar la carrera y cumplir uno de mis sueños. Los amo.

RESUMEN

Las bolsas guturales (BG) equinas son divertículos pares de la tuba auditiva y fueron descritas originalmente en 1764 por el anatomista francés Claude Bourgelat. Se han postulado muchas hipótesis sobre la función de las bolsas guturales, pero hasta ahora su función exacta es un misterio. Los pliegues y las ranuras son características de las bolsas guturales. El objetivo de este estudio fue analizar la ultra estructura de las bolsas guturales mediante microscopía electrónica de barrido para contribuir al conocimiento de un órgano que provoca varios problemas de salud en equinos. En este estudio se utilizaron las cabezas de cuatro caballos sacrificados y las bolsas guturales se procesaron para microscopía electrónica de barrido. La mucosa de las Bolsas guturales estaba profundamente plegada y encontramos diferencias en la profundidad de los pliegues entre las tres regiones analizadas. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los surcos entre la *plica accesoria neuralis* y las otras dos regiones, lo que sugiere que los pliegues son más profundos en este sitio. En relación a la foldsasa, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la *plica neurovasculosa carotis interna* y las otras dos regiones, lo que sugiere que los pliegues eran más anchos que en los otros sitios.

Palabras clave: Bolsas guturales, Equinos, Microscopía electrónica de barrido, Anatomía, Fisiología

ABSTRACT

The equine guttural pouches (GP) are paired diverticulum of the tuba auditiva and were originally described in 1764 by the French anatomist Claude Bourgelat. Many hypotheses have been postulated on the function of guttural pouches, but so far, its exact function is a mystery. Folds and grooves are characteristics of guttural pouches. The objective of this study was to analyze the ultrastructure of the guttural pouches by scanning electron microscopy to contribute in the knowledge of an organ which provokes several health problems in equines. The heads of four slaughtered horses were used in this study and the guttural pouches were processed for scanning electron microscopy. The mucosa of the GP was deeply folded and we found differences in the folds depth between the three regions analyzed. Significant differences ($P < 0.05$) in the grooves were found among *plica accesoria neuralis* and the other two regions, suggesting that folds are deeper in this site. In relation to foldsase, significant differences ($P < 0.05$) were observed among *plica neurovasculosa carotis interna* and the other two regions, suggesting that folds were wider than in the other sites.

Keywords: Guttural pouches, Equine, Scanning electron microscopy, Anatomy, Physiology

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Anatomía	4
2.2. Histología	11
2.3. Función	13
2.3. Exploración	15
2.3.1. Endoscopia	15
2.3.2. Radiografía	17
2.3.4. Tomografía Computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM).	18
2.3.5. Pruebas histopatológicas	19
2.4. Principales patologías	19
2.4.1. Empiema	20
2.4.2. Micosis	21
2.4.3. Timpanismo	22
2.5. Microscopio	24
2.5.1. Historia Del Microscopio	24
2.6. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	29
2.6.1. Ventajas Del Microscopio Electrónico De Barrido	30
2.6.3. Principales Componentes Del MEB	33

2.6.4. Formación de la Imagen.....	47
2.7. Análisis de rayos-X.....	50
2.9. Análisis cualitativo.....	51
2.9.1. Preparación de muestras.....	52
3. OBJETIVO GENERAL.....	53
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
6. RESULTADOS.....	56
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES.....	61
9. LITERATURA CITADA.....	62

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Límites de resolución y aumentos de L MEB convencional, MET y MO.	30
Tabla 2. Características generales de fuentes de electrones más comúnmente utilizadas en MEB	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista caudodorsal de yesos de bolsa gutural izquierda y derecha realizados con la cabeza del caballo en posición flexionada	6
Figura 2. Estudio anatómico post mortem de pares craneales (A, B)	7
Figura 3. Dibujo de la bolsa gutural equina con estructuras asociadas relevantes y vasculatura	10
Figura 4. Localización de la bolsa gutural y estructuras anatómicas asociadas...	17
Figura 5. Reconstrucción por TC de la bolsa gutural en un potro árabe sano de seis meses	18
Figura 6. Límite de resolución de los microscopios de luz y electrónicos	31
Figura 7. Componentes de la columna electrón-óptica del MEB convencional	33
Figura 8. Diagrama del cañón, constituido por el filamento, cilindro de Wehnelt y el ánodo.....	35
Figura 9. Esquema del filamento de hexaboruro de lantano (LaB6)	36
Figura 10. Esquema de la estructura del cátodo de emisión de campo	37
Figura 11. (A) La muestra no rebasa la parte superior del porta-muestra, por lo tanto $Z=WD$	41
Figura 12. Detector de Everhart y Thornley (1960) o scintillador para la colección de la señal de electrones secundarios	42
Figura 13. Detector semiconductor para la colección de electrones retrodispersados (BSE)	43
Figura 14. Esquema del detector de rayos X.....	45
Figura 15. Diagramas de los diferentes tipos de bombas de vacío usualmente utilizadas en el MEB.....	47
Figura 16. Formación de la imagen del espécimen en el MEB.....	48
Figura 17. Dos pares de bobinas de barrido mueven el haz de electrones primario sobre el espécimen	49
Figura 18. Ultraestructura de las GP correspondiente a plica neurovasculosa carotis externa mostrando que estaba muy plegada	55

Figura 19. Ultraestructura de la GP correspondiente a la *plica neurovasculosa carotis interna* 56

Figura 20. Ultraestructura del GP correspondiente a la *plica accessoria neuralis* mostrando que estaba plegada y desprovista de cilios 56

Figura 21. Comparación entre valores medios de la profundidad de los pliegues para las tres regiones estudiadas..... 57

Figura 22. Comparación entre valores medios del ancho de pliegues para las tres regiones estudiadas 57

I. INTRODUCCIÓN

Las bolsas guturales equinas (BG) son divertículos emparejados de la tuba auditiva (*Diverticulum tubae auditivae*), cada uno de los cuales contiene normalmente aproximadamente de 300 a 500 mililitros de aire (König, 1984). Las BG fueron descritas originalmente en 1764 por el anatomista Francés Claude Bourgelat, fundador de la primera escuela de veterinaria en Francia. Están presentes en miembros del orden *Perissodactyla* (ungulados no rumiantes: caballos, tapires, rinocerontes, con la excepción del rinoceronte blanco) y otra pequeña banda de pequeños mamíferos como *Hyraxes*, ciertos murciélagos y un ratón sudamericano (Endo *et al.*, 1998; Arias y Zuluaga, 2010).

Cada BG se coloca sobre el hueso estilohioideo, formando bolsas medial y lateral, y la bolsa medial tiene el doble de capacidad que la bolsa lateral. Se sabe que las bolsas emparejadas (derecha e izquierda) se extienden desde la base del cráneo y el atlas hasta la nasofaringe (Borges y Watanabe, 2011) y tienen un espacio considerable en la región caudoventral de la cabeza equina. Las bolsas guturales se dividen individualmente en compartimentos medial y lateral por el hueso estilohioideo respectivo y se unen a lo largo de su cara rostromedial formando un tabique medial (Babptiste *et al.*, 1996). El epitelio de las BG es pseudoestratificado y ciliado y contiene células caliciformes, glándulas mucosas y nódulos linfáticos (Manglai *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2003).

Muchas estructuras importantes están anatómicamente relacionadas con la bolsa gutural y tienen un gran significado clínico (Grabner, 1984; Dietz y Huskamp, 2006) como la arteria carótida interna (*plica neurovasculosa cartoís interna*), el ganglio cervical craneal, el nervio vago (es decir, el nervio craneal X), nervio glossofaríngeo (es decir, nervio

craneal IX), nervio hipogloso (es decir, par craneal XII, *plica accessoria neuralis*), nervio accesorio (es decir, nervio craneal XI) y nervios simpáticos en su totalidad a través de la pared lateral caudal del compartimento medial. La pared ventral del compartimento medial contiene la rama faríngea del nervio vago, el nervio laríngeo craneal y los ganglios linfáticos retrofaríngeos. La cara ventral del compartimento lateral contiene la arteria carótida externa (*plica neurovasculosa carotis externa*) (que se convierte en la arteria maxilar), la vena maxilar, la cuerda del tímpano y el nervio facial (es decir, el VII par craneal) (Perkins et al., 2003). Los pliegues y las ranuras son características de las bolsas guturales (König et al., 2010).

El drenaje natural de la bolsa se realiza a través de las aberturas en forma de hendidura (faríngeas) de la trompa de Eustaquio en la pared lateral de la nasofaringe. La conexión se abre cuando el caballo traga y el pastoreo normalmente proporciona drenaje. Sin embargo, la mayor parte de la bolsa está ventral a su hendidura y, por lo tanto, el drenaje puede ser bastante ineficaz. Si se bloquea, las secreciones se acumulan y la bolsa se distiende produciendo una hinchazón palpable (Dyce et al., 2002).

Se han postulado muchas hipótesis sobre la función de las BG (Briggs, 2000), pero hasta el momento se desconoce su función exacta. Babptiste (1998) y Babptiste et al., (2000) postularon que las BG participan en la termorregulación. Considerando que la ultra estructura de un órgano puede determinar su funcionamiento y que las células de la mucosa producen glicocomponentes que podrían retener agua, formando una capa hidrofóbica sobre la mucosa (Arias y Zuluaga, 2010); probablemente una de las funciones de las BG sea participar en la termorregulación, enfriando la sangre de la

arteria carótida interna que va al cerebro, especialmente durante el ejercicio (Lepage *et al.*, 2004).

Parece que el caballo requiere un mecanismo para enfriar el cerebro, ya que los caballos alcanzan constantemente temperaturas sanguíneas centrales superiores a 40° C (promedio de 43° C) durante el ejercicio intenso (Hodgson, 1990).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anatomía

El gran número de estructuras unidas físicamente a la bolsa gutural ha dificultado la visualización y la descripción anatómica coherente de esta región clínicamente importante (Babptiste *et al.*, 1996).

Getty (1975) afirma que las bolsas guturales a menudo son de tamaño desigual, incluidas las variaciones con respecto a la distancia que se extienden caudalmente. Skoda (1911) describió las bolsas guturales como formaciones que cambian de tamaño en diferentes circunstancias de la posición de la cabeza.

Las bolsas guturales son espacios emparejados llenos de aire que se extienden desde la base del cráneo y el atlas hasta la nasofaringe (Budras *et al.*, 2010). Cada bolsa se comunica con la faringe a través de la porción rostral del respectivo tubo auditivo de 2 a 3 cm de largo y en forma de embudo, que se abre en el orificio faríngeo (aproximadamente 3 cm), ubicado en la cara dorsolateral de la pared lateral nasofaríngea, conocida como la ostia (De Lahunta *et al.*, 1986). Estas aberturas faríngeas se identifican como hendiduras oblicuas que se encuentran rostral y ventral al receso faríngeo. La pared medial de cada abertura está compuesta por un colgajo de fibrocartílago orientado en una dirección rostródorsal a caudoventral (Pleasant y Berry, 2009). Cada techo de la bolsa gutural tiene contacto directo con el hueso esfenoides, los músculos *longus capitis* y *longus colli*, la bulla timpánica, la articulación temporohioidea, y la fosa condilar ventral. Lateralmente, las bolsas se encuentran contra el músculo pterigoideo medial, el digástrico y las glándulas salivales parótidas y mandibulares. Los

ganglios linfáticos retrofaríngeos mediales se encuentran entre la faringe y la pared ventral de la bolsa, y se pueden identificar debajo de la membrana de la bolsa gutural en el piso del compartimento medial (De Lahunta *et al.*, 1986; Holcombe y Ducharme, 2004). El piso de la bolsa está adyacente a la cara dorsal de la nasofaringe y la extensión caudal de la bolsa gutural está al nivel de la glándula salival parótida (Borges y Watanabe, 2011). Esta porción caudal se pliega y cubre el hueso estilohioideo, atravesando su cara caudolateral y creando una división incompleta que da como resultado un compartimento medial más grande y un compartimento lateral más pequeño (Dyce *et al.*, 2009; Holcombe y Ducharme, 2004; Edwards *et al.*, 2007). La porción caudal del hueso estilohioideo se articula con el hueso timpanohioideo corto, que a su vez se articula con la porción petrosa del hueso temporal en la base del cráneo. Los nervios craneales VII (facial) y VIII (vestibulococlear) se encuentran en esta parte del hueso temporal donde están expuestos a fracturas asociadas con la osteoartropatía temporohioidea (Holcombe y Ducharme, 2004; Freeman *et al.*, 2006). Las bolsas guturales izquierda y derecha tienen casi la misma capacidad (Manglai *et al.*, 2000). El compartimento medial es de 2 a 3 veces el tamaño del compartimento lateral y se extiende más caudal y ventralmente (Edwards *et al.*, 2007; Barber, 1999). Las bolsas derecha e izquierda no se comunican entre sí y están separadas simétricamente rostralmente por un tabique delgado y caudalmente por los músculos *longus capitis* y *recto capitis ventralis* (Pleasant y Berry, 2009; Manglai *et al.*, 2000; Oto y Hazirolu, 2011).

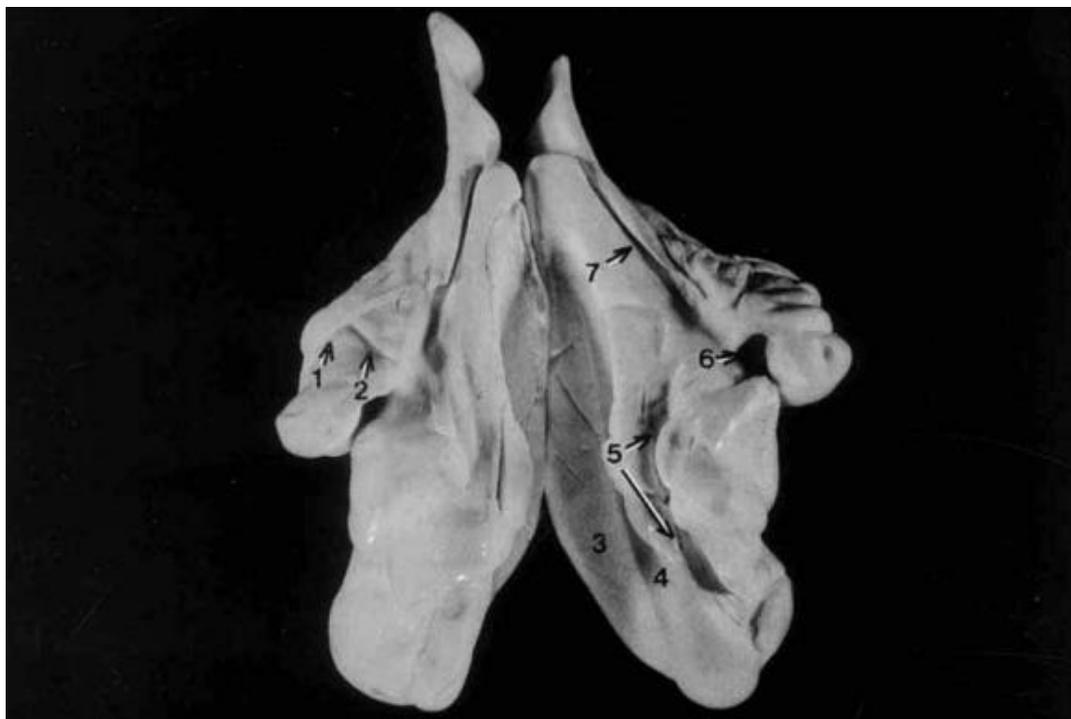


Figura 1. Vista caudodorsal de yesos de bolsa gutural izquierda y derecha realizados con la cabeza del caballo en posición flexionada. 1) Impresión y arteria maxilar om; 2) Impresión de la arteria meníngea media; 3) Impresión del músculo recto del *capitus ventralis*; 4) Impresión de mula del recto *capitia ventralis major (longus capitus)*; 5) Surco para nervios mnial IX-XII; 6) Abertura caudal del surco para el hueso estilohioideo; 7) Surco para el músculo tensor del velo palatino (Babptiste et al., 1996).

Por debajo del largo de la cabeza, las bolsas guturales están en contacto directo entre sí, separadas solo por un delgado tabique medial. Se han descrito estructuras linfáticas tipo *lymphonoduli solitarii* principalmente en el tabique medio entre ambas bolsas guturales (König, 1984). Cada bolsa gutural se comunica con la faringe a través del orificio faríngeo de la trompa de Eustaquio, cubierto por una placa delgada de fibrocartílago. El orificio faríngeo de la trompa de Eustaquio se comunica con la bolsa gutural a través de un vestíbulo en forma de embudo, que es más ancho rostral que caudalmente (Perkins *et al.*, 2003).

Se encuentran varias estructuras adyacentes a las bolsas guturales equinas, incluidos los nervios craneales IX (glossofaríngeo), X (vago), XI (accesorio) y XII (hipogloso); el

hueso estilohioideo; y la articulación temporohioidea. También muy próximos se encuentran los nervios craneales V y VII, el ganglio cervical craneal, el tronco simpático cervical, la arteria carótida interna y la arteria carótida externa y sus ramas (la arteria auricular caudal, la arteria temporal superficial y la arteria maxilar) (Polloch, 2007). Cuando se ven afectadas por la enfermedad de la bolsa gutural, estas estructuras nerviosas pueden causar una diversidad de signos neurológicos además de epistaxis o secreciones nasales anormales (Borges y Watanabe, 2011).

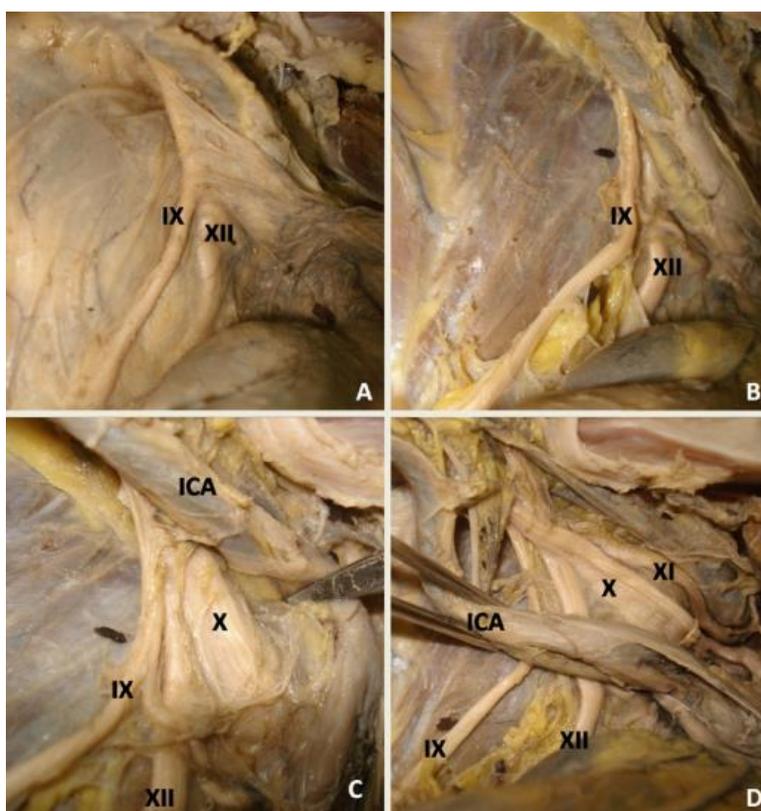


Figura 2. Estudio anatómico post mortem de pares craneales (A, B). Es posible observar los pares craneales IX, X, XI y XII y la arteria carótida interna (ICA). (C, D) Los nervios craneales IX, X, XI y XII discurren ventralmente a lo largo del compartimento medial de la bolsa gutural y están envueltos en un pliegue delgado de mucosa. Estos nervios están íntimamente asociados con la ICA (Borges y Watanabe, 2011).

Las siguientes estructuras importantes se localizan asociadas con el compartimento lateral: la carótida externa, las arterias temporal superficial y maxilar; la vena maxilar facial; El nervio facial y la cuerda del tímpano (Freeman, 1980; Perkins *et al.*, 2003). La arteria carótida externa viaja al lado del compartimento medial ventral al hueso estilohioideo, a lo largo del compartimento lateral, donde emite las arterias auriculares caudal y temporal superficial y continúa como la arteria maxilar a lo largo la pared lateral dorsal del compartimento lateral (Pleasant y Berry, 2009). La vena maxilar puede verse lateral y ligeramente profunda a la arteria carótida externa (Holcombe y Ducharme, 2004). La arteria carótida interna (ICA) corre de ventral a dorsal a lo largo de la porción media del compartimento medial y forma un ángulo sigmoide justo antes de alcanzar el límite dorsal de la bolsa. Los nervios craneales IX, X, XI y XII discurren ventralmente a lo largo del compartimento medial de la bolsa gutural y están envueltos en un pliegue delgado de mucosa. Estos nervios y el tronco simpático están íntimamente asociados con la ICA durante gran parte de su curso dentro de la bolsa. La rama faríngea del nervio vago (X) recorre el suelo del compartimento medial antes de unirse al plexo faríngeo (Barakzai, 2007).

El nervio facial y sus ramas, así como el nervio mandibular, pasan adyacentes al techo de la bolsa gutural (König *et al.*, 2010). El nervio facial discurre dorsalmente a lo largo del receso lateral durante aproximadamente 3 a 4 cm y luego corre entre las glándulas mandibulares y parótida. El nervio mandibular corre a lo largo del techo del receso lateral y luego continúa en el lado rostral de la bolsa gutural (Manglai *et al.*, 2000). El par craneal XII discurre caudalmente entre la bolsa gutural y la cápsula de la articulación atlantooccipital a una distancia de aproximadamente 2 cm, pasa entre los nervios vago

y accesorio, gira ventrorostralmente y continúa por encima de la faringe, paralelo al hueso estilohioideo y caudal al linguofacial maletero. El IX nervio craneal gira ventrorostralmente sobre la bolsa gutural caudal al hueso tirohioideo; en ese punto es más profundo que la arteria carótida externa y emite las ramas faríngea y lingual. El nervio craneal X pasa caudal y ventralmente, junto con el nervio accesorio, a través de un pliegue de la bolsa gutural. Estos nervios luego se separan, lo que permite que el nervio hipogloso pase entre ellos. El nervio vago pasa ventralmente adyacente a la arteria carótida interna y cruza la cara medial del origen de la arteria occipital; su rama faríngea atraviesa la arteria carótida interna y discurre ventrocranealmente desde la bolsa gutural hasta la pared dorsal de la faringe (Godinho y Getty, 1986). La rama faríngea del par craneal X se desprende cerca del ganglio cervical craneal y se puede ver mientras corre rostroventralmente a lo largo de la bolsa gutural hacia la pared de la faringe dorsal, donde se ramifica con la rama faríngea de IX en el plexo faríngeo. La rama faríngea de IX puede identificarse ya que discurre rostralmente a través de la cara ventral del hueso estilohioideo (Holcombe y Ducharme, 2004).

Skoda (1911) encontró que el drenaje del compartimento lateral en las cabezas flexionadas era muy difícil, un efecto que atribuyó al movimiento dorsal del hueso estilohioideo hacia la base del cráneo durante la flexión. El hueso estilohioideo produjo así una hendidura más pronunciada de la bolsa gutural, cerrando efectivamente el compartimento lateral. Skoda (1911) también informó que, cuando la cabeza y el cuello del caballo se extendían, el extremo oral del hueso estilohioideo estaba más alejado de la base del cráneo, la hendidura en la bolsa gutural no era tan profunda y el estilohioideo se cubría menos por el compartimento lateral de la bolsa.

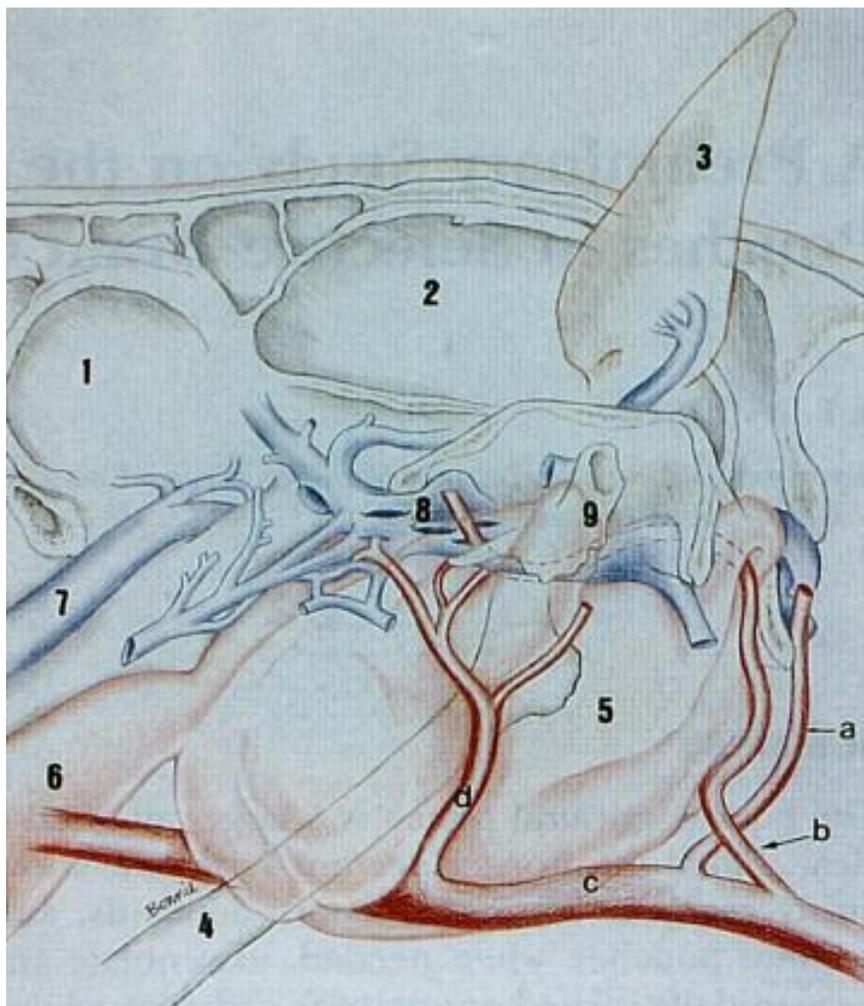


Figura 3. Dibujo de la bolsa gutural equina con estructuras asociadas relevantes y vasculatura. Observe cómo la arteria carótida interna toma un curso en forma de arco sobre la bolsa gutural y, por lo tanto, entra en contacto con la bolsa durante una longitud significativa. 1) Órbita; 2) Bóveda craneal; 3) Pabellón auricular; 4) Hueso estilohioideo; 5) Bolsa gutural; 6) Vestíbulo del orificio faríngeo; 7) Vena facial profunda; 8) Sistema de seno venoso craneal (plexo venoso subtemporal); 9) Meato acústico externo; a) Arteria occipital; b) Arteria carótida interna; c) Carótida externa; d) Arteria maxilar (Babptiste, 1998).

2.2. Histología

Histológicamente, las BG están cubiertas por una mucosa compuesta por un epitelio columnar pseudoestratificado ciliado con abundantes células caliciformes localizadas principalmente por los pliegues; son evidentes las micro vellosidades de la mucosa (McGorum *et al.*, 2007). El grosor de la lámina propia es variable, y allí se encuentran numerosas glándulas mucosas, serosas y mixtas. Las glándulas tubuloacinares agrupadas en la lámina propia-submucosa y sus conductos excretores están delineados por un epitelio cubico simple o columnar característico de las vías respiratorias superiores (Lepage, 1994).

La caracterización de los glicanos de la mucosa de las bolsas guturales podría arrojar indicios que ayuden a apoyar alguna de las teorías existentes en cuanto al papel de las bolsas guturales, pues es reconocida la importancia que tienen las glicoproteínas y en particular, los glucosaminoglucanos en la determinación de la función de diversos órganos (Accili, 2008). La superficie del epitelio respiratorio en equinos está tapizada por una capa de moco que se renueva constantemente formando un moco visco elástico (Babptiste y Cake, 1994; Karlsson, 1998). Las propiedades visco elásticas del moco protegen las células epiteliales de la mucosa. Las glicoproteínas y los glucocomponentes forman las mucinas que son abundantes componentes de las secreciones del tracto respiratorio (Kumar y Timoney, 2006).

Los glucocomponentes interactúan con gran variedad de péptidos y hormonas, y se ha postulado que pueden estar involucrados en mecanismos inmunes, formando una barrera que atrapa agentes patógenos y partículas oxidativas (Brooks, 2008; Nieuw *et al.*, 1995). Aunque parece contrario a lo anterior, múltiples estudios han descrito una

interacción entre los glucocomponentes de la mucosa con microorganismos, principalmente bacterias, que las utilizan como receptores para colonizar los tejidos (Karlsson, 1998). La diversidad de los glucocomponentes de la mucosa de las BG sugiere que estas moléculas están involucradas en diversas funciones, como participar en la respuesta inmunológica y de señalización intracelular. Baptiste (2000), sugiere que las BG participan en la termorregulación.

La gran cantidad de ácido siálico amerita considerar su papel como micro molécula en la mucosa. Se sabe por su naturaleza química, el ácido siálico se rodea de moléculas de agua en medios solubles, ejerciendo un efecto higroscópico en la mucosa (Nieuw *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 2007), lo cual permite pensar que este componente es esencial para mantener hidratada la superficie de las BG, las cuales están sometidas a deshidratación por la entrada continua de aire a las BG.

Adicionalmente, es probable que la presencia de componentes sulfatados, ayuden al ácido siálico a mantener el estado de hidratación en la mucosa, dado que la afinidad química de estos glicanos por las moléculas de agua es bien conocida (Bernfield *et al.*, 1999), de tal manera que todos estos componentes encontrados en la mucosa constituyan un posible mecanismo de defensa para disipar calor, especialmente durante la actividad física, cuando aumenta la ventilación y el movimiento de aire hacia las BG.

Por otra parte, se ha descrito que los glicanos de la mucosa de diversos órganos participan en la respuesta inmune (Andres, 1998). Se ha reportado que el ácido siálico es un receptor importante para microorganismos, en particular, bacterias de la especie *Streptococcus* tienen una afinidad por los glicocomponentes de la mucosa respiratoria (Bernfield *et al.*, 1999). En humanos se han realizado estudios sobre la adherencia de

Streptococcus pyogenes a los glicosaminoglicanos de la mucosa de las trompas de Eustaquio (Liu *et al.*, 1997), también en suinos se ha descrito la colonización temprana de *Streptococcus suis* a la mucosa del tracto respiratorio, específicamente de la orofaringe mediante adherencias a los glicanos (Hasty *et al.*, 1992). Es posible que en equinos suceda un fenómeno similar con bacterias de la especie *Streptococcus*, las cuales tienen preferencia por colonizar la mucosa de las BG, sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta interacción (Arias y Zuluaga, 2010).

2.3. Función

Calentar el cerebro o cualquier otro tejido tendrá en última instancia un efecto destructivo directo sobre las células. Aunque existe evidencia de lo contrario, a menudo se considera que el tejido cerebral es más vulnerable a los efectos de las altas temperaturas que otros tejidos. Por tanto, la prevención del daño por calor en las células cerebrales es la explicación habitual que se da para la ventaja de supervivencia de la SBC. SBC se define como "la disminución de la temperatura del cerebro, ya sea localmente o en su conjunto, por debajo de la temperatura de la sangre arterial" (IUPS THERMAL COMMISSION, 2001). La SBC se logra mejor en artiodáctilos, que tienen una rete carotídea. La rete carotídea funciona como un intercambiador de calor y enfría la sangre arterial carotídea poco antes de que ingrese al cerebro. Los caballos no tienen rete carotídeo, desarrollan temperaturas corporales elevadas durante el ejercicio y, sin embargo, no muestran consecuencias clínicas o neurológicas apreciables (Mitchell *et al.*, 2006). Aunque los caballos no tienen rete carotídeo, Babptiste *et al.*, (2000) y McConaghy *et al.*, (1995) han concluido que existe otro mecanismo para producir SBC.

Se desconoce la función fisiológica, si la hay, de las bolsas guturales, pero recientemente se ha propuesto que podrían funcionar durante el enfriamiento cerebral selectivo (SBC) para mantener la sangre transportada por la arteria carótida interna (ICA) a una temperatura por debajo del núcleo de temperatura durante la hipertermia” (Babptiste *et al.*, 2000). Utilizando trazadores de microesferas radiactivas, Orr *et al.*, (1983) encontraron que el principal suministro de sangre (95%) al cerebro del caballo es a través del ICA. Otras contribuciones menores provienen de las arterias occipital y vertebral. La bolsa gutural está en la mejor ubicación anatómica potencialmente para realizar una función de enfriamiento en la ICA.

La función de las BG en equinos no es clara todavía, pero la dificultad de crear un modelo experimental que permita explicar su función en animales vivos no ha permitido que se explique satisfactoriamente su función (Cunningham, 2009; Frandson *et al.*, 2009). La primera función que se le atribuyo a estos órganos es que actuarían como una caja de resonancia, sin embargo, hoy se sabe que si la entrada a las BG está obstruida los sonidos emitidos por el animal se replican de la misma manera (Kumar y Timoney, 2006). Carter *et al.*, (1978), propusieron que las BG ayudan a equilibrar presiones entre el oído medio y la faringe, pero esta función no explica su gran tamaño (Cunningham, 2009). Rooney *et al.*, (1997), proponen que las BG facilitan la fisiología de la deglución, debido a su flexibilidad y posición estratégica, expandiéndose y aumentando la capacidad de la faringe especialmente cuando el animal come pasto, pero esta teoría no ha sido experimentalmente comprobada aún (McGorum *et al.*, 2007).

Baptiste (1998) propone que las BG participan en la termorregulación, y mediante un modelo experimental en cadáveres y posteriormente en caballos anestesiados demostró

que la ventilación de las BG permite enfriar la sangre que pasa por la arteria carótida interna por debajo de la temperatura central.

Según esta teoría, el intercambio normal de aire durante la respiración puede ser un mecanismo de enfriamiento cerebral para disipar el calor generado por el metabolismo, especialmente durante el ejercicio, permitiendo que el aire que entra a las BG enfríe la sangre que pasa por la arteria carótida interna, que en su recorrido pasa por la delgada pared de las BG (Kumar y Timoney, 2006; Frandson *et al.*, 2009), sin embargo, las conclusiones de sus estudios son discutidas aún.

2.3. Exploración

La evaluación clínica de la bolsa gular comienza con la historia clínica, la identificación del paciente y la inspección, seguida de una palpación externa de la estructura (Borges y Watanabe, 2011). Taylor y Hillyer (1999), mencionan que se pueden utilizar métodos directos como la palpación, la auscultación y la percusión, pero estos no son muy útiles al momento de llegar a un diagnóstico preciso. Las bolsas gulares pueden evaluarse mediante exámenes complementarios como radiografía, ecografía y endoscopia (Hardy y Léveillé, 2003).

2.3.1. Endoscopía

La endoscopia es el examen que facilita de manera más eficaz la recopilación de datos en casos de enfermedad de la bolsa gular porque permite la visualización directa de las estructuras de interés (Chiesa *et al.*, 2000). Varios autores han proporcionado

métodos detallados para la endoscopia de la bolsa gutural, centrándose específicamente en la introducción del endoscopio en la bolsa y fotografías para ayudar en la identificación anatómica (Holcombe y Ducharme, 2004; Hardy y Léveillé, 2003). Tenga en cuenta que el examen endoscópico de pacientes con epistaxis y sospechosos de micosis de la bolsa gutural debe realizarse con cuidado; El desplazamiento del coágulo puede producirse y, en última instancia, provocar una hemorragia mortal (Ainsworth y Hackett, 2004). Antes de la endoscopia, se deben preparar las instalaciones quirúrgicas ya que un coágulo puede desprenderse durante la inspección, precipitando una hemorragia potencialmente mortal. Antes de entrar en una bolsa gutural, el médico debe buscar signos de paresia faríngea o aritenoidea. Se debe realizar una endoscopia de ambas bolsas y examinar primero la bolsa que se sospecha que es normal para evitar una posible contaminación por el endoscopio. En los casos que se presentan con epistaxis, la endoscopia revela una hemorragia con origen en la bolsa (Lepage *et al.*, 2004). Aunque en los caballos de deporte es habitual realizar endoscopias con fines preventivos, en caballos de trabajo la situación no es la misma, ya que este procedimiento implica sedación e inmovilización de los animales durante un día (Arias *et al.*, 2013).



Figura 4. Localización de la bolsa gutural y estructuras anatómicas asociadas. Representación esquemática de la bolsa gutural que se extiende desde la base del cráneo y el atlas hasta la nasofaringe y las estructuras anatómicas asociadas. Se representa el orificio faríngeo izquierdo asociado al endoscopio, para la evaluación de la bolsa gutural izquierda. La bolsa derecha e izquierda no se comunican entre sí. Aquí, el tabique delgado en el lado rostral es artificialmente transparente para permitir la visualización del endoscopio dentro de la bolsa izquierda vista desde el lado derecho del caballo (Borges y Watanabe, 2011).

2.3.2. Radiografía

Adrados de Llano (2011), indica que la radiografía es otro de los métodos indirectos más utilizados que permite observar el contenido interno de las bolsas y así obtener el diagnóstico correcto. Las radiografías también pueden revelar información relevante porque las bolsas guturales llenas de aire proporcionan un medio de contraste ideal para la obtención de imágenes radiográficas. Las proyecciones laterales proporcionan información sobre las dimensiones y el contenido de las bolsas guturales (Perkins *et al.*, 2003). Las vistas dorsoventral y ventrodorsal se utilizan para evaluar el hueso estilohioideo. Las radiografías también permiten la evaluación prequirúrgica y permiten localizar con precisión las estructuras vasculares (Macdonald *et al.*, 1999).

2.3.4. Tomografía Computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM)

Más recientemente, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) de las bolsas guturales han permitido una mejor comprensión de su anatomía y se han vuelto importantes en el diagnóstico de tumores o morfología anormal (Oto y Hazioglu, 2011; Sasaki *et al.*, 1999). La TC puede ser más beneficiosa para obtener imágenes del hueso estilohioideo, el oído interno y la porción petrosa del hueso temporal en casos de osteoartropatía estilohioidea (Hardy y Léveillé, 2003; Hilton *et al.*, 2009).

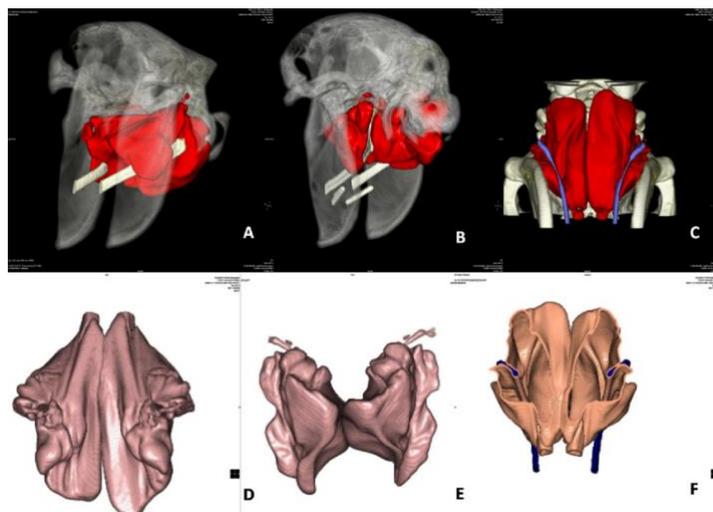


Figura 5. Reconstrucción por TC de la bolsa gutural en un potro árabe sano de 6 meses. Las imágenes se obtuvieron durante el protocolo de anestesia general con secciones de 1 mm y reconstrucción de software tridimensional. A – C, anatomía normal y posición de la bolsa gutural asociada con la cabeza del potro y las estructuras óseas. (A) observe la porción rostral del tubo auditivo. (B), la parte caudal del tubo auditivo entra en el orificio timpánico. (C), parte ventral (piso) de las 2 bolsas que muestran los compartimentos medial y lateral y el hueso estilohioideo (azul). D – F: anatomía normal de una bolsa gutural aislada. (D), vista dorsal. (E), vista caudal. Obsérvese el surco estilohioideo moldeado y la porción rostral del tubo auditivo. Nótese el espacio entre el puño gutural y el cráneo que está ocupado por los músculos *longus capitis* y *rectus capitis ventralis*. (F), vista dorsal de una bolsa gutural normal sin parte del techo que muestra las estructuras izquierda y derecha y los compartimentos lateral y medial separados por un tabique delgado en el lado rostral (Borges y Watanabe, 2011).

2.3.5. Pruebas histopatológicas

Por otro lado, Pérez y Carrasco (2000), proponen la utilización de pruebas histopatológicas al momento del diagnóstico, debido a que la presencia de hongos en una patología no implica que este sea el directo responsable, es por esto que además tomar una serie de muestras para la realización de cultivos y posterior observación del proceso micótico; también se debe efectuar la toma de cortes histológicos el cual permite evaluar la morfología de los hongos y su relación con las lesiones tisulares.

2.4. Principales patologías

La forma de la bolsa gutural está determinada en gran medida por las muchas estructuras con las que está relacionada físicamente, incluidos músculos, huesos, vasos, nervios y ganglios linfáticos. Las estructuras de interés veterinario que están íntimamente asociadas con la bolsa gutural incluyen los nervios craneales V, VII, IX, X, XI y XII, así como las arterias carótidas maxilar e interna y externa que proporcionan el principal suministro de sangre arterial a la cabeza (Getty, 1975). Cualquiera o todas estas estructuras pueden verse afectadas por enfermedades de la bolsa gutural, incluidas infecciones micóticas, empiema, timpanismo y tumores (Babptiste *et al.*, 1996). La presencia de problemas en las bolsas guturales, dependiendo el grado de afectación puede comprometer de manera seria la vida del animal puesto que se ubican muy cerca a los nervios que se encuentran en la base del cráneo, donde pueden causar parálisis

faríngea y otros efectos secundarios, así mismo por la cercanía con la arteria carótida la puede erosionar, produciendo epistaxis (Cabañes *et al.*, 2002).

Las enfermedades de las bolsas guturales no son comunes, pero se requiere un acceso quirúrgico para tratar algunos casos complicados de empiema, timpanismo y micosis y para la ostectomía estilohioidea (Lepage, 2002). Actualmente, los métodos quirúrgicos utilizados para abordar a las bolsas guturales incluyen la hiovertebrotomía, el triángulo de Viborg y los dos métodos de Whitehouse (Freeman, 1999).

2.4.1. Empiema

El empiema de las bolsas guturales en equinos es una enfermedad de alta incidencia asociada a problemas infecciosos del sistema respiratorio; el principal agente etiológico asociado a esta enfermedad es *Streptococcus equi* subsp. *equi* (Pusterla *et al.*, 2011). El inicio de los signos clínicos se presenta entre 3 y 14 días post-infección (Nachon y Bosisio, 2005; Beps, 2015) y se caracterizan por descarga nasal serosa en su fase aguda y mucopurulenta en su fase crónica, fiebre que puede exceder los 42°C (Waller, 2014), depresión, disfagia, anorexia, linfadenopatía submandibular y retrofaríngea, edema, y estridores respiratorios (Nachon y Bosisio, 2005; HILL *et al.*, 2007). Los casos de empiema grave de GP, la disfagia es una manifestación de neuropatía craneal (Freeman y Hardy, 2012). El empiema en los potros puede ser secundario al timpanismo GP (Freeman, 1980).

Los condroides son la principal complicación del empiema de las bolsas guturales que se origina como consecuencia del acúmulo de exudado purulento deshidratado (Nachon

y Bosisio, 2005; Mallicote, 2015) y que se asocia al mal drenaje de las mismas. También es frecuente encontrarlos en caballos que padecieron Gurma Equina (Arias *et al.*, 2013).

2.4.2. Micosis

Aunque las enfermedades de las bolsas guturales son relativamente raras, es importante diagnosticarlas con precisión y tratarlas para evitar secuelas, tales como disfagia o incluso hemorragia fatal, como puede ocurrir ante infecciones micóticas (PERKINS *et al.*, 2003). Se suele asociar este proceso a ciertas fases de inmunosupresión del caballo por otras razones y no está muy claro, pero podría existir cierta disminución de la cantidad de inmunoglobulinas del tipo A secretadas localmente por el epitelio, o también estar asociada a la menor aireación de la porción dorsal del compartimiento medial de la bolsa gutural, lo que favorecería el crecimiento de hongos por el ambiente microaerófilo existente en esa zona (Ruiz de León Robledo, 2002).

Si no se trata, la micosis de la bolsa gutural puede provocar una hemorragia mortal o signos neurológicos irreversibles. Las secuelas atribuibles a la micosis del reservorio gutural varían desde el daño a largo plazo de los nervios craneales V, VII, IX, X, XI o el tronco simpático craneal. La infección de estructuras adyacentes puede causar una fístula faríngea, erosionar la pared divisoria entre ambas bolsas, infección del oído medio, osteítis del hueso subyacente o infección atlantooccipital (Dixon y Rowlands, 1981) y artropatía (Walmsley, 1988).

Quinn *et al.*, (2002) argumentan que los hongos con frecuencia presentados en este tipo de problemas es el *Aspergillus fumigatus*, cuando las hifas del mismo penetran profundamente causan necrosis tisular, trombosis, erosión de los vasos sanguíneos y

lesiones nerviosas; es por esto que se recomienda instaurar tratamiento lo más rápido posible. Nachon y Bosisio (2005), expresan que la etiología de esta patología es el hongo *Aspergillus nidulans*, y para el tratamiento de éste recomiendan utilizar infusiones en la cavidad con solución de iodopovidona al 1%, teniendo cuidado de no provocar neumonía por aspiración y a su vez proponen realizar nebulizaciones con la misma solución; cuando la infección es avanzada la intervención quirúrgica se orienta a prevenir hemorragias severas. Aunque se utilizan diferentes agentes antifúngicos (derivados iodados, anfotericina B, tiabendazol, miconazol, enilconazol, itraconazol, nistatina, natamicina) en el tratamiento médico de esta micosis su eficacia es variable (Nieuwstadt *et al.*, 1994; Church *et al.*, 1986; Davis y Legendre, 1994) o según algunos autores cuestionable (Speirs *et al.*, 1995). El tratamiento de elección, con o sin administración de antifúngicos, suele ser quirúrgico, eliminando la placa micótica mediante resección, ligadura o cateterización con balón de la zona de arteria afectada, en aquellos casos en los que los síntomas de origen neurológico no comportan un riesgo para la vida del animal (Barber, 1991).

El diagnóstico de la micosis de las bolsas guturales se basa en la historia, los signos clínicos y la endoscopia de la faringe y las bolsas guturales (Lepage *et al.*, 2004).

2.4.3. Timpanismo

Entre las afecciones de la bolsa gutural, el timpanismo es el menos frecuente (Walsh y Weinberg, 1979; McCue *et al.*, 1989). El timpanismo unilateral y, más raramente, bilateral parece ser más común en las hembras que en los machos y en los animales jóvenes (McCue *et al.*, 1989; Freeman, 1992). Se desconoce la etiología del timpanismo del

reservorio gutural bilateral y puede deberse a un defecto en el orificio guturofaríngeo, plegamiento de la mucosa, engrosamiento del borde lateral del orificio guturofaríngeo, inflamación o disfunción muscular. En estos casos, el orificio gutural faríngeo actuaría como una válvula unidireccional, permitiendo que el aire entre en la bolsa gutural, pero impidiendo que salga (Forbes y Bennell, 1975; Freeman, 1992). En el caso de malformaciones congénitas, existe un engrosamiento u otro tipo de cambio en el borde lateral del orificio guturofaríngeo, atrapando aire y líquidos en la bolsa gutural (Forbes y Bennell, 1975; McCue *et al.*, 1989). El timpanismo de la bolsa gutural puede no interferir con el desarrollo y crecimiento del animal, pero hay casos en los que se presentan disnea, disfagia, neumonía por aspiración y, no raramente, empiema secundario de la bolsa gutural (Freeman, 1992; Edwards y Santschi, 2002). El diagnóstico se confirma mediante exploración física, endoscopia y radiografía (Edwards y Santschi, 2002). La fenestración del septo medial de las bolsas guturales es el método más recomendado para corregir el timpanismo unilateral (McCue *et al.*, 1989), siendo menos eficaz en el caso de afección bilateral (Forbes y Bennell, 1975).

El pronóstico de los animales con timpanismo de la bolsa gutural es bueno, especialmente si la afección es unilateral y si se trata en las primeras etapas (Freeman, 1992; Edwards y Santschi, 2002).

2.5. Microscopio

2.5.1. Historia Del Microscopio

Inicialmente el hombre se vio en la urgencia de resolver las necesidades más primarias, fue creando las herramientas que le permitieron transformar la realidad y comenzar un proceso civilizador que no ha cesado en su evolución. Desde el descubrimiento del fuego, invención de herramientas y desarrollo del lenguaje, hasta los más recientes desarrollos que han permitido la desintegración del átomo y el uso de energía atómica, la exploración del cosmos y el desarrollo de múltiples disciplinas o campos del saber, como la biotecnología, nanotecnología e infotecnología, el ser humano, sujeto pensante, dotado de inteligencia, memoria y voluntad, ha realizado numerosos aportes (Vega, 2012).

En el año 3000 a.C. aproximadamente se considera que, por vez primera, se produjo el vidrio. Existen cuentas egipcias de cristal del 2500 a.C. El lente conocido más antiguo estaba hecho de cristal de roca pulido de 4 centímetros de ancho y fue encontrado en la antigua Nínive, en la legendaria Mesopotamia. Se han hallado en Creta lentes biconvexos que datan de entre 3000 y 1200 antes de Cristo. Entre los años 965 y 1020, Ibn-al-Haitham (también conocido como Alhazen) utilizó para sus investigaciones espejos esféricos y parabólicos. En el año 1000, un inventor desconocido realiza el primer objeto para ayuda visual, llamado la piedra de leer, era un segmento de una esfera de cristal que al ser colocada sobre el material de lectura amplificaba las letras (Ávalos, 2005).

En 1590 dos constructores holandeses de gafas, Hans Janssen y su hijo Zacharias (finales del siglo XVI y principios del XVII), construyeron un aparato con lentes de aumento que permitía ver los objetos más pequeños. Combinaron dos lentes convexas en un tubo opaco y obtuvieron de esta manera una mayor perfección en la observación de pequeños objetos con lo cual se fundan los principios del microscopio compuesto y el telescopio (Parraga y Fernández, 1994; Delgado y Delgado, 2001). El microscopio de Zacharias es utilizado y perfeccionado por varios experimentadores y conocido en todos los países, se empleó su sistema óptico en astronomía por Galileo Galilei quien publicó sus observaciones al igual que Kepler. En 1609 Galileo Galilei construyó el primer microscopio simple. De 1617 a 1619, apareció ya un microscopio de dos lentes con un solo objetivo convexo y un ocular, cuyo autor, según se supone, fue el físico Cornelius Drebbel (Sánchez y Oliva, 2015).

Pese a los progresos, aún en estas épocas, la imperfección de los microscopios unido a la concepción metafísica del mundo no permitió dar pasos esenciales con respecto al conocimiento de las regularidades de la estructura microscópica de los animales y las plantas (Sánchez y Oliva, 20152015).

El físico inglés Robert Hooke se interesó por todas las ciencias: astronomía, microscopía, mecánica, óptica, geología, fisiología. Inventó multitud de aparatos para observar, medir y registrar fenómenos de la naturaleza. Hooke se esforzó en aumentar el alcance de los sentidos, para observar, medir, registrar, analizar y entender lo percibido. Micrografía (Pequeños dibujos) es de 1665, cuando Hooke tenía treinta años. La escribió en inglés y la dedicó a Carlos II. Hooke registra e ilustra con su propia mano cincuenta y siete observaciones microscópicas de minerales, vegetales (entre ellas la observación de la

estructura del corcho) y animales. Micrografía se trata en realidad de un tratado sobre los descubrimientos físicos y biológicos que hizo, con la aplicación de un microscopio que él mismo había construido (Barcat y Hooke, 2003; Cortés, 2008).

El médico y fisiólogo italiano Marcello Malpighi sería de los primeros en ver tejidos vivos bajo el lente. A Malpighi se le considera el fundador de la Anatomía Microscópica y uno de los más importantes biólogos de todos los tiempos. Nacido en Crevalcore, provincia de Bolonia, Italia, cursó sus estudios en la Universidad de Bolonia donde consiguió el doctorado en Medicina y Filosofía (1653). En Bolonia laboró en la cátedra de Medicina Teórica y realizó sus primeros trabajos microscópicos, luego en Messina extendió sus estudios anatómicos, limitados a la especie humana, a todos los seres vivos (Ledermann, 2012; Caballero, 2012; Strasburger, 2011).

Entre 1623 y 1723 vivió el hombre considerado padre del microscopio, el holandés Anton van Leeuwenhoek. Fue el primero que vio y describió las bacterias, la levadura, la vida existente dentro de una gota de agua y la circulación de corpúsculos sanguíneos en los vasos capilares pues inventó el microscopio en las Provincias Unidas (Ávalos, 2005; Rosler y Young, 2011; Góngora, 2005). En 1668 Anton van Leeuwenhoek tomando como referencia el invento de Hooke, fabricó un microscopio al cual dotó de poderosos lentes de aumentos y empleando técnicas más efectivas, logró observar todo lo visto por Hooke. Así con la aparición del microscopio óptico, observó microbios, sangre, plumas, pólvora, pelos, insectos, minerales, fibras musculares, peces, espermios, semillas, árboles y plantas. Observó también la placa dental compuesta por depósitos blandos con microbios y restos de comida (Ledermann, 2012; González *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2011).

De esta manera se tiene que al principio existieron solo dos modelos de microscopios, el sencillo que era simplemente un solo lente montado en un dispositivo y el compuesto que combinaba dos o más lentes en un mismo dispositivo (Sánchez y Oliva, 2015; Ford, 2002).

2.5.2. Historia De La Microscopia Electrónica

Después de la invención del Microscopio electrónico de transmisión (TEM) surgió la propuesta de un microscopio electrónico de barrido (SEM) por el propio Knoll en 1935, pero fue necesario esperar más de 30 años para que el primer SEM saliera al mercado debido a problemas tecnológicos, pues era necesario comprender y solucionar los efectos causados por las aberraciones y lograr un sistema de barrido con suficiente rapidez de respuesta (Goldstein, 1992).

En 1938, Manfred von Ardenne introduce un sistema de barrido dentro del diseño de un TEM, lo cual significó la obtención de un nuevo tipo de microscopio: el microscopio electrónico de barrido-transmisión (STEM, por sus siglas en inglés). Un año después, Boersch logra haces electrónicos con longitudes de onda del orden de los 2.5 nm, lo que implicó una mejoría considerable en el diseño del SEM (Scott, 1983). En plena segunda guerra mundial, en 1942, se produce un salto considerable en el desarrollo del SEM con los trabajos de Vladimir K. Zworykin, Charles William Oatley y colaboradores de donde se obtiene un prototipo del detector de electrones secundarios. Para su obtención se aplicó una carga de recolección de +50V a una caja de Faraday y se acopló a un tubo fotomultiplicador (Scott, 1983). A pesar de estos aportes, la resolución del microscopio SEM solo llegó a los 50 nm y a 8,000x de aumento (Reyes, 2020).

En 1944, Manfred von Ardenne logra una resolución de 1.5 nm en el microscopio STEM, pero se presentan importantes problemas de mantenimiento, reparación y, principalmente, de interpretación de las imágenes observadas con el TEM (Hirsch *et al.*, 1977). En 1946, James Hiller obtiene una resolución de 1 nm. En 1947, James Hiller y Edward G. Ramberg desarrollan una lente objetiva con corrección de astigmatismo. En 1948, bajo la dirección de Charles Williams Oatley, Dennis McMullan desarrolla una fuente estable de alto voltaje para alimentar el filamento de electrones y se introduce en el tubo de rayos catódicos (TRC) como sistema de observación de las imágenes del SEM. Estas nuevas adiciones representaron un importante avance en el desarrollo de la microscopía electrónica (Nixon, 1998).

En 1951, Raimond Castaing inicia el desarrollo de la espectroscopía por rayos X característicos (EDS, por sus siglas en inglés) (Scott, 1983), que al incorporarla al sistema óptico del SEM lo convertía en un instrumento analítico. También, en 1951, James M. Lafferty descubre que los cristales de LaB_6 emiten una mayor densidad de electrones que los alambres de W, con un área de emisión correspondiente a un solo átomo, pero requieren de un sistema de vacío que produzca un vacío de 10^{-7} torrs como mínimo (Kimoto, 1985). A la par, Erwin Wilhem Muller y Kanwar Bahadur inventan el microscopio de campo iónico (FIM) y observan posiciones atómicas por primera vez (Breton, 2004). En 1956, ocurre otro avance importante en la microscopía electrónica cuando K. C. A. Smith introduce el procesamiento no lineal de las señales, el barrido con doble deflexión del haz, la corrección electromagnética del astigmatismo y un sistema eficaz de centrado de las aperturas. Dando continuidad a los trabajos de Dennis

McMullan, Thomas E. Everhart y Richard F. M. Thornley desarrollan, en 1960, un detector basado en el empleo de un dispositivo centellador (Breton, 2004).

En la actualidad, la evolución de la microscopía electrónica no se ha detenido. Aunque han surgido otros microscopios como los de fuerza atómica con resoluciones en el rango atómico, el SEM y el TEM conservan aún un importante sector en los requerimientos de una gran cantidad de ramas del conocimiento humano (Reyes, 2020).

2.6. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El área de la Microscopía electrónica incluye básicamente dos tipos de microscopios electrónicos:

- Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).
- Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

El Microscopio Electrónico de Barrido convencional (MEB) es un instrumento cuyo funcionamiento se basa en el barrido de la superficie de un espécimen, por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido (entre 4 nm y 200 nm), por lentes electromagnéticas formadas por el paso de corriente a través de solenoides (bobinas). Después de que el haz de electrones interacciona con la muestra, se generan varios tipos de señales, las cuales son colectadas por un detector específico para cada una de ellas. Finalmente, se produce una imagen en el monitor de TV que puede ser almacenada en una placa fotográfica o digitalmente (González y Noguez, 2006).

2.6.1. Ventajas Del Microscopio Electrónico De Barrido

Aumentos

El MEB puede proporcionar aumentos bajos de la superficie de un material, similares a los que podrían ser observados en un Microscopio de luz (MO), lo cual ayuda a simplificar la interpretación de imágenes (González y Noguez, 2006).

Tabla 1. Límites de resolución y aumentos del MEB convencional, el MET y MO
(Recopilado de González y Noguez, 2006).

Microscopio	Resolución (nm)	Aumento mínimo y máximo
Microscopio electrónico de barrido (MEB)	3-4	10X – 300,000 X
Microscopio electrónico de transmisión (MET)	0.15-0.4	50X – 4X10 ⁶ X
Microscopio de luz (MO)	100-200	10X – 2000X

Resolución

La resolución o límite de resolución se define como la distancia mínima que separa dos puntos en un objeto y que pueden observarse en la imagen como dos puntos separados (González y Noguez, 2006).

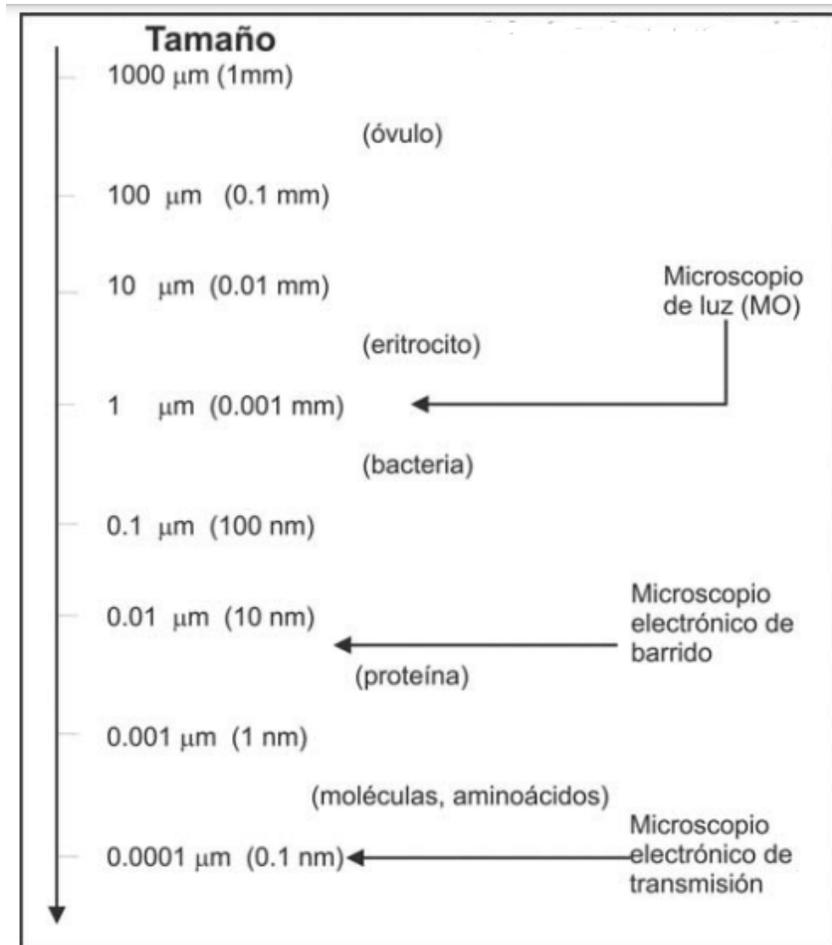


Figura 6. Límite de resolución de los microscopios de luz y electrónicos (González y Noguez, 2006).

Parámetros para el límite de resolución

La longitud de onda (λ). La relación entre la longitud de onda promedio del haz de electrones y la resolución del MEB se explica mejor con base en la ecuación de Abbe (Ec.1); mientras, el valor en el numerador (λ) sea más pequeño, el valor de la resolución (R) será menor; es decir, el MEB tendrá una mayor resolución e indicará que el instrumento óptico tendrá una mayor capacidad para revelar estructuras más pequeñas en la superficie del espécimen (González y Noguez, 2006).

Ec. de Abbe (Ec.1)

$$R = K \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

R= Resolución.

λ = Longitud de onda de la radiación utilizada.

K= cte. (MO= 0.96).

n= Índice de refracción del medio.

α = apertura numérica.

Voltaje de aceleración. Por medio de la ecuación de De Broglie (Ec.2), se puede inferir que longitudes de onda menores se obtienen al incrementar la velocidad con que son acelerados los electrones (voltaje de aceleración) dentro de la columna electrón-óptica (González y Noguez, 2006).

**Ec. De Broglie (Ec. 2)**

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

λ = Longitud de onda de la radiación (e^-).

h= cte. De Planck (6.66×10^{-24} Js).

m= Masa del electrón (9.11×10^{-31} Kg).

v= Velocidad del haz de electrones.

Spot size. El diámetro de la punta del haz o spot size influye en la resolución y depende de la capacidad que tenga el sistema óptico-electromagnético (lentes) para disminuir el diámetro del haz. Entre más pequeño sea el diámetro de la punta del haz con la que se

barre la superficie de la muestra, éste tendrá mayor sensibilidad para detectar todos sus rasgos topográficos (González y Noguez, 2006).

2.6.2. Profundidad de campo

La profundidad de campo es la distancia entre dos planos en relación con el objeto que pueden observarse en foco en el plano imagen; define la capacidad que tiene el microscopio para mostrar imágenes en foco de estructuras en un objeto a diferentes niveles de profundidad. Esta característica es la que les da aspecto tridimensional a las imágenes obtenidas con el MEB (González y Noguez, 2006).

2.6.3. Principales Componentes Del MEB

La columna electrón-óptica está compuesta por:

- 1) El cañón
- 2) Las lentes electromagnéticas
- 3) La cámara del espécimen.

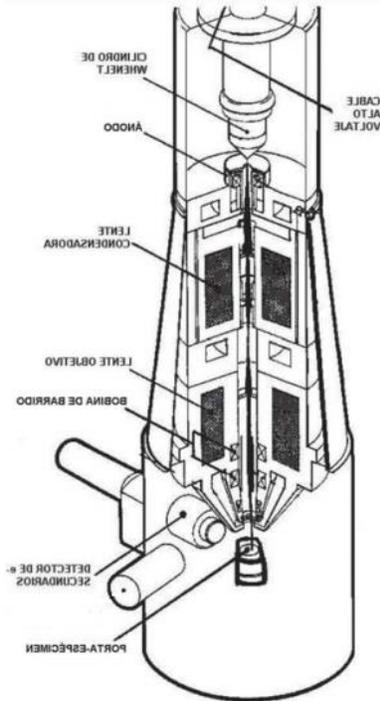


Figura 7. Componentes de la columna electrón-óptica del MEB convencional (González y Noguez, 2006).

Cañón

El cañón está constituido por tres partes: El cátodo (–) o fuente de electrones del haz primario, el cilindro de Wehnelt, y el ánodo (+). Estos dos últimos son cilindros con un pequeño orificio por donde pasa el haz de electrones emitido por el filamento hacia las lentes electromagnéticas (González y Noguez, 2006).

Tipos de cátodo

Fuentes de electrones que se utilizan actualmente en microscopía electrónica de barrido son:

- El filamento de tungsteno (W).
- El filamento de hexaboruro de lantano (LaB_6).

- El cátodo de emisión de campo.

Tabla 2. Características generales de fuentes de electrones más comúnmente utilizadas en MEB.
(Recopilado de Goldstein *et al.*, 1992).

Filamento	Diámetro de la fuente (Crossover)	Corriente – del haz	Duración	Vacío requerido
Tungsteno (W)	50 μm	1.75 A/cm ²	40 a 80 h	10 ⁻⁶ Torr
Hexaboruro de lantano (LaB ₆)	10 μm	65 A/cm ²	>1000 h	10 ⁻¹⁰ Torr
Emisión de campo (W)	10 nm	1000 a 10 ⁶ A/cm ²	>3 años	10 ⁻¹¹ Torr

Filamento de tungsteno (W)

El cátodo de este cañón es de tungsteno (filamento), es el más común. El cátodo de tungsteno es calentado cuando se aplica una corriente eléctrica de 2.5 A a 1 V a través de las terminales del filamento. Al flujo de corriente a través del filamento se le llama corriente del filamento. A través del proceso de emisión termoiónica, se produce una nube de electrones. Como el filamento se calienta, a este cañón se le llama cañón de cátodo caliente. Entre más corriente pasa a través del filamento, este más caliente estará. El cátodo de tungsteno opera a temperaturas de 2700 K (2427 oC), lo cual resulta en una emisión de electrones de 1.75 A/cm² (Ávalos, 2006).

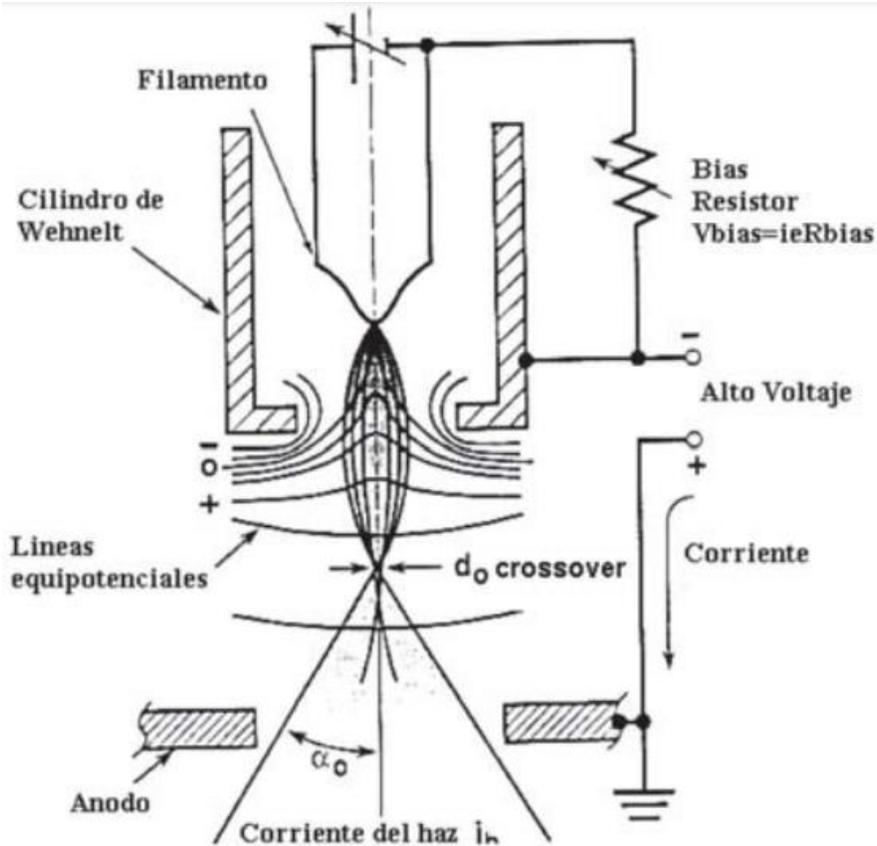


Figura 8. Diagrama del cañón, constituido por el filamento, cilindro de Wehnelt y el ánodo. Entre el cilindro de Wehnelt y el ánodo se observan líneas equipotenciales correspondientes a la lente electrostática (Goldstein *et al.*, 1992).

Filamento de LaB_6

Se coloca un cristal de LaB_6 sobre un filamento de tungsteno, al aplicar un voltaje entre las dos terminales del filamento, se ocasiona el calentamiento del cristal y por ende la emisión de electrones. Este filamento ofrece algunas ventajas sobre el de tungsteno: a) Larga vida. b) Produce un haz de electrones con un brillo 510 veces más que el de tungsteno. c) Se produce un haz de menor diámetro (Ávalos, 2006)

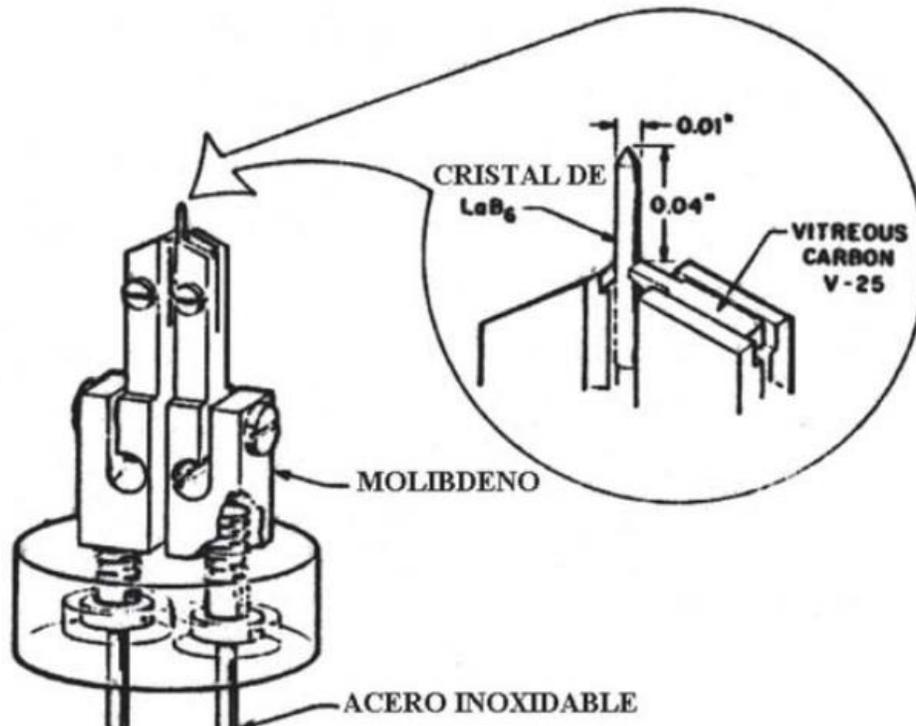


Figura 9. Esquema del filamento de hexaboruro de lantano (LaB₆) (Goldstein *et al.*, 1992).

Cátodo de emisión de campo

Mientras en los dos primeros los electrones son expelidos por calentamiento, en el de efecto de campo son extraídos por un intenso campo eléctrico. Una vez libres, los electrones son acelerados sometiéndolos a una gran diferencia de potencial eléctrico. Es posible obtener emisión de un material aplicando una diferencia de potencial (voltaje extractor) a una punta muy fina (por ejemplo, un cristal de W); de tal manera que aparezca un campo eléctrico suficientemente alto que permita la tunelización de los electrones, los cuales son luego acelerados por la aplicación de un voltaje acelerador (Ávalos, 2006).

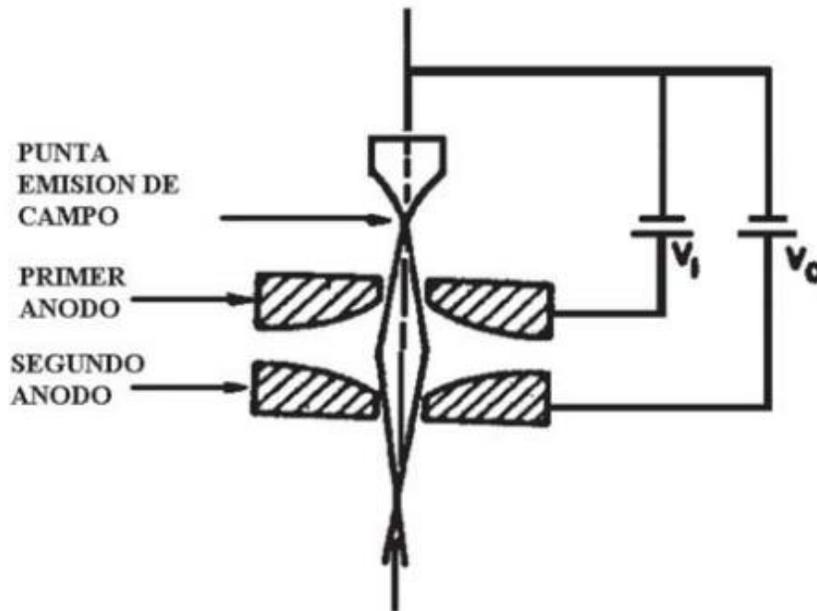


Figura 10. Esquema de la estructura del cátodo de emisión de campo (Goldstein *et al.*, 1992).

Lentes electrostáticas y electromagnéticas

En la columna electrón-óptica del MEB existen dos tipos de lentes:

- A. La lente electrostática generada en el cañón.
- B. Las lentes electromagnéticas en la columna electrón óptica.

Lente electrostática y el crossover

La lente electrostática se forma por efecto de diferencias de potencial entre el filamento, cilindro de Wehnelt y el ánodo. El haz de electrones al pasar a través de las líneas equipotenciales de este campo electrostático se comporta como la luz al pasar por un medio de menor a uno de mayor índice de refracción, convergiendo en un punto

denominado crossover, definido como la primera imagen de la nube de electrones formada en la punta del filamento (González y Noguez, 2006).

El diámetro de este crossover d_0 depende principalmente del material del que esté hecho el filamento; por ejemplo, el filamento de tungsteno produce el crossover con diámetro más grande (50 μm), comparado con los producidos por el filamento de LaB6 o de emisión de campo. Entre más pequeño sea el diámetro del crossover más pequeña será la “punta” del haz (spot size) con la que se barrerá al espécimen, y mayor será la resolución del equipo, debido a que el diámetro final del spot size será el que se obtenga después de la reducción del diámetro del crossover por la lente condensadora y objetivo (González y Noguez, 2006).

Lentes electromagnéticas

Sistemas capaces de formar imágenes con una radiación: Un punto real a un punto imagen. Las lentes condensadoras constan de cables de cobre, y en estas los electrones describen trayectorias helicoidales, ya que la partícula cargada pasa por un campo magnético. Se utiliza para disminuir el tamaño del haz de electrones proveniente del cañón con la finalidad de aumentar la resolución. Si se aumenta la corriente en las lentes condensadoras, la distancia focal será menor, el punto será más pequeño y por lo tanto se tendrá una mejor resolución. Las lentes objetivas se utilizan para enfocar el haz de electrones sobre la muestra, por medio de ella se obtendrá la imagen de la muestra (Ávalos, 2006).

Principales aberraciones en las lentes:

- a) Aberración esférica: Es causada cuando la radiación electromagnética está enfocada en un punto focal diferente, dependiendo de la parte de la lente que transmite la radiación. Los electrones cercanos al eje óptico son enfocados en un punto focal que está más lejos (AVALOS, 2006).
- b) Aberración cromática: Resulta en el enfoque de la radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda (y de velocidad) en un punto focal diferente. A menor longitud de onda los electrones son enfocados lejos de la lente y a mayor longitud de onda ocurre lo contrario. Lo causa la variación en la velocidad de emisión del haz de electrones, cambios en el voltaje de aceleración y cambios en la corriente de las lentes. Se corrige con la producción de un haz de electrones monocromático, donde todos los electrones tienen la misma velocidad (AVALOS, 2006).
- c) Astigmatismo: La incapacidad de las lentes de traer rayos de luz o electrones a un punto, por la diferencia en la fuerza de las lentes en la dirección X y Y. esta aberración limita la resolución (Ávalos, 2006).

Cámara del espécimen

Comprende la plataforma donde se coloca la porta-espécimen y su tamaño varía de acuerdo con el microscopio. El tamaño de la muestra que puede introducirse puede ser tan pequeña como de unos cuantos milímetros hasta de un poco más de 12 cm, dependiendo del microscopio. La plataforma donde se coloca el porta-muestra puede rotar, inclinarse o moverse en los ejes X, Y y Z. El parámetro Z, es la distancia de base

del lente objetivo a la superficie del porta-muestra, término que es importante distinguir del denominado distancia de trabajo, cuyas siglas en inglés son WD, que consiste en la distancia de la base del lente objetivo a la superficie de la muestra (donde el haz de electrones es enfocado por el lente objetivo (González y Noguez, 2006).

A veces $Z=WD$, pero a menudo $Z\neq WD$, esto ocurre porque la muestra es más alta o más baja que el porta-muestra, lo cual es importante tener en cuenta sobre todo si el microscopio trabaja con WD variable, debido a que, en este tipo de equipos, cuando se enfoca la imagen, tanto la punta del haz de electrones primarios como la porta muestra se acercan o alejan del lente objetivo (González y Noguez, 2006).

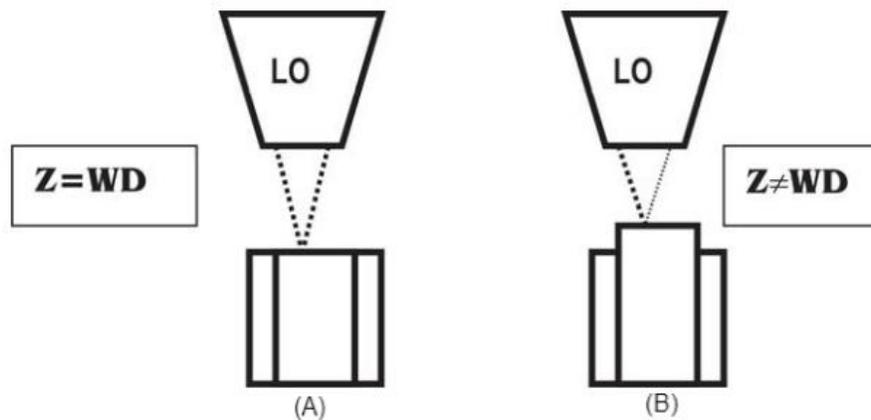


Figura 11. (A) La muestra no rebasa la parte superior del porta-muestra, por lo tanto, $Z=WD$. (B) La muestra es más alta que el porta-muestra, entonces $Z\neq WD$. Z = distancia de la base del lente objetivo a la superficie del porta-espécimen, WD = distancia de la base del lente objetivo a la superficie del espécimen, LO = lente objetivo (González y Noguez, 2006).

Sistema de Detección

Este sistema se encarga de coleccionar distintas señales (ej. electrones secundarios, electrones retrodispersados ó backscattered (BSE), electrones Auger, radiación bremsstrahlung, etc.) que surgen del espécimen debido a la interacción del haz de electrones con los átomos de la muestra. Estas radiaciones proporcionan diferentes clases de información si se coloca un detector específico para cada una de ellas (González y Noguez, 2006).

Principales tipos de detectores que se utilizan:

1. El detector escintilador (conocido como de Everhart y Thornley)
2. El detector de estado sólido.

Detector Escintilador o de Everhart y Thornley

Es usado ampliamente para la detección de electrones secundarios y en menor proporción para electrones retrodispersados. Consiste principalmente en una jaula de Faraday (colector), escintilador, tubo de cristal o cuarzo (light pipe), fotomultiplicador y preamplificador (González y Noguez, 2006).

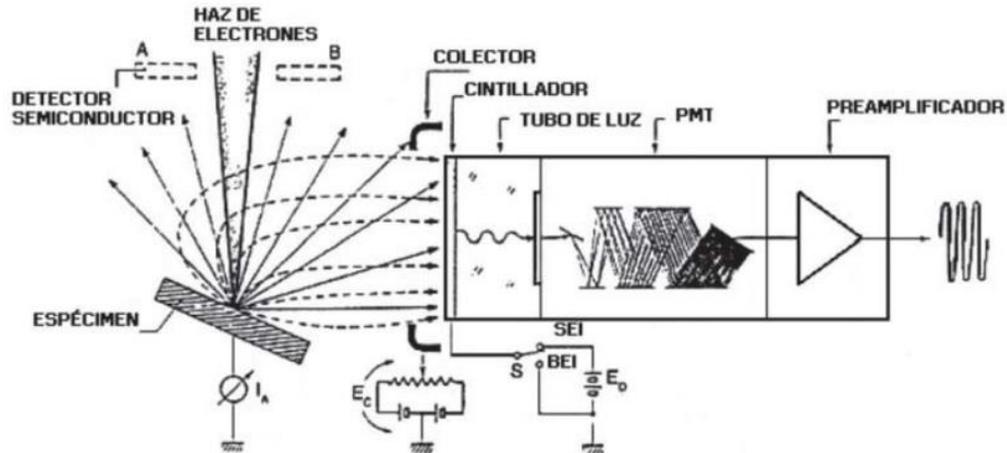


Figura 12. Detector de Everhart y Thornley (1960) o escintilador para la colección de la señal de electrones secundarios. PMT= fotomultiplicador, SEI= imagen de electrones secundarios, BEI= imagen de electrones retrodispersados. (Catálogo JEOL, No.1501A176).

Detector de estado sólido

Es un semiconductor delgado (varios milímetros) y plano. Hay dos: (A) uno es usado para la detección de electrones retrodispersados o backscattered (BSE), y el otro (B) para la colección de la señal característica de rayos X (González y Noguez, 2006).

- *Detector electrones retrodispersados (BSE).* De unos pocos milímetros de grosor, se localiza generalmente en la parte superior del espécimen; comprende un par de semiconductores anulares y uno para imagen shadow. Procesa las señales obtenidas y produce tres tipos de imágenes: topo, shadow y compo, que dan información de la topografía y de las propiedades físicas y químicas del espécimen (González y Noguez, 2006).

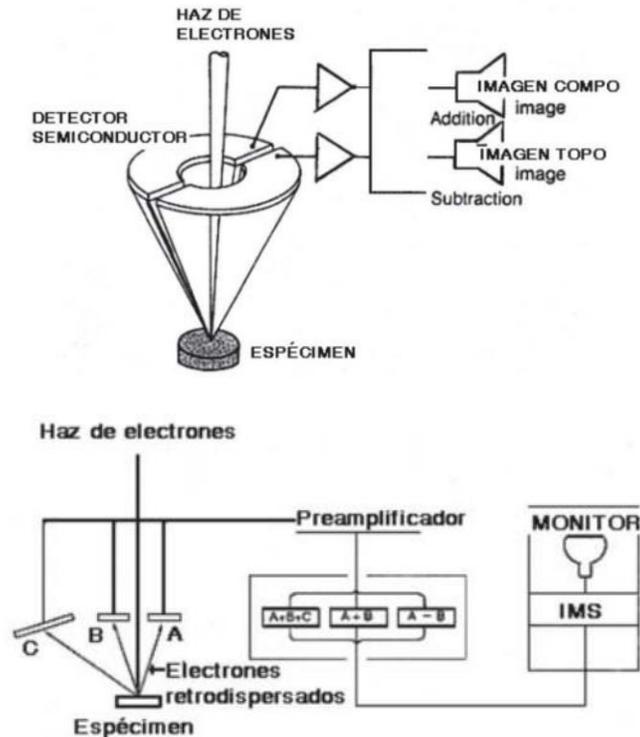


Figura 13. Detector semiconductor para la colección de electrones retrodispersados (BSE). En la parte inferior se muestra un diagrama de las diferentes opciones de procesamiento de la señal. (Catálogo JEOL No.1501A176).

- *Detector del espectrómetro por dispersión de energía de rayos X (EDS).* El detector de estado sólido del EDS es un semiconductor compuesto generalmente por un cristal de silicio-litio, el cual, tiene comúnmente un diámetro de 10 mm y un grosor de 3 mm. Idealmente, se debería usar un cristal de estructura perfecta y alta pureza; sin embargo, mientras más puro sea un cristal, menos corriente conduce, a diferencia de uno con impurezas. Para compensar la falta de impurezas en el cristal de silicio puro, átomos de litio son difundidos en el cristal, lo que da como resultado un detector de Si (Li). Así, las imperfecciones e impurezas en la estructura cristalina del silicio contribuirán a mejorar la conductividad del cristal y disminuir el ruido o background producido por

conductividad residual que causa un incremento en la absorción de rayos X (González y Noguez, 2006). Este detector está aislado del vacío del MEB por medio de una ventana, que anteriormente era de berilio (Goldstein *et al.*, 1992; PHILIPS, 1995). En la actualidad este detector tiene una ventana transparente a los rayos X, la cual puede ser de dos tipos: ultra-thin windows (UTW) o super ultra-thin windows (SUTV). La ventana consiste de una capa evaporada de aluminio o de un polímero delgado, normalmente de alrededor de 0.3 mm de grosor (Philips, 1995); ésta puede permanecer a presiones atmosféricas por lo que la ventilación de la cámara del espécimen no causa problemas.

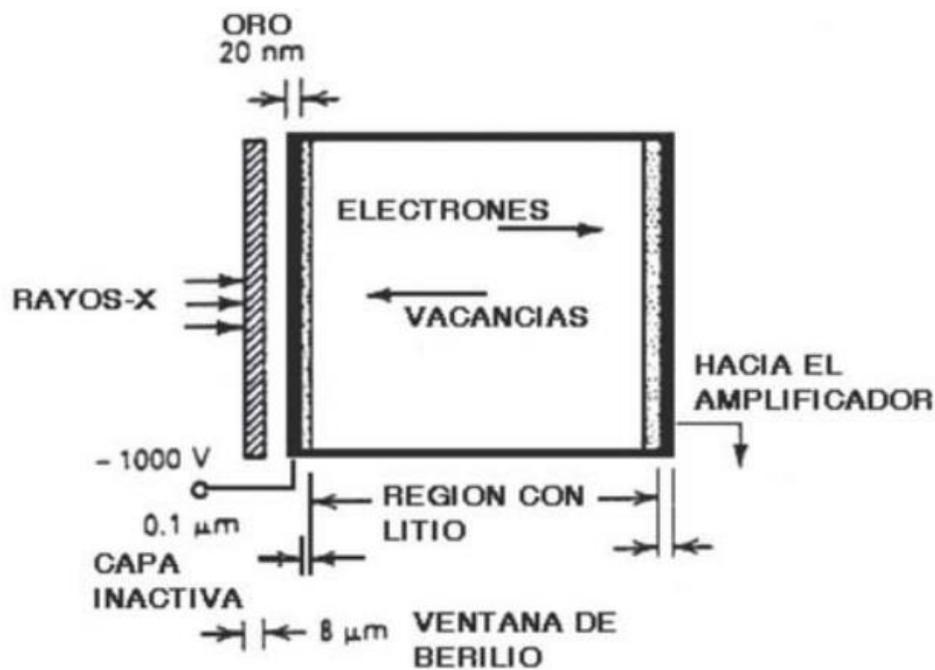


Figura 14. Esquema del detector de rayos X. Los rayos X pasan a través de una delgada ventana y producen pares de huecos dentro del cristal semiconductor (Philips, 1995).

Sistema de Vacío

Las bombas de vacío tienen como función producir el alto vacío necesario para que el haz de electrones no sea desviado por los átomos de gas (González y Noguez, 2006).

Tipos de bombas de vacío:

- La mecánica (RP).
- La difusora (DP).
- La turbomolecular (TP).
- La iónica (IP).

La bomba mecánica o rotatoria efectúa el prevacío y, al trabajar simultáneamente con la bomba difusora, saca las moléculas de gas que extrae ésta última de la columna para obtener el alto vacío.

Sin embargo, la bomba difusora presenta la desventaja de trabajar con aceite, el cual puede contaminar la columna con monocapas de aceite que al interactuar con el haz de electrones contaminan la superficie de la muestra e interfieren en su análisis químico (González y Noguez, 2006).

Las bombas iónicas, a diferencia de las primeras mencionadas, son limpias, libres de vibraciones; se utilizan para obtener un ultra alto vacío (10^{-11} torr) requerido comúnmente cuando se utiliza cátodo de emisión de campo o microscopía electrónica de alta resolución (González y Noguez, 2006).

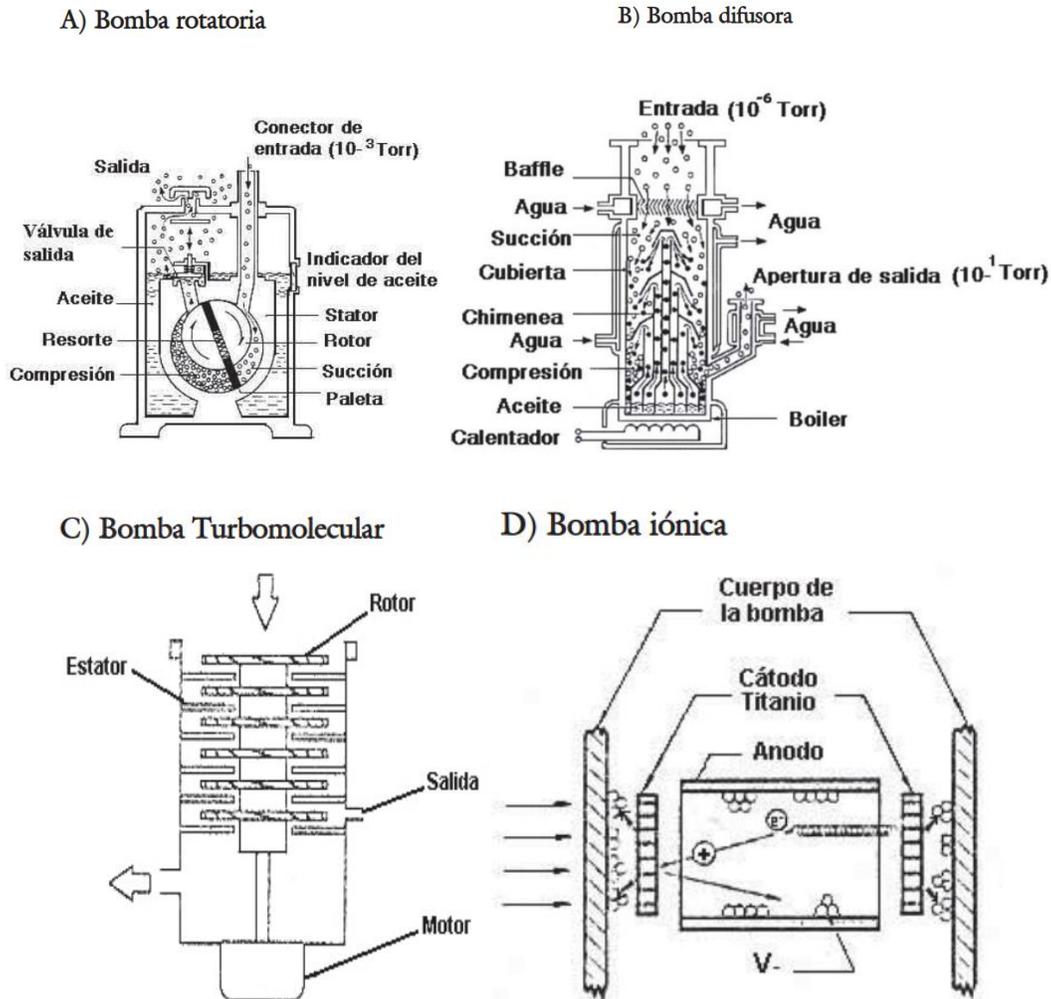


Figura 15. Diagramas de los diferentes tipos de bombas de vacío usualmente utilizadas en el MEB. (A) Bomba rotatoria, (B) Bomba difusora, (C) Bomba turbomolecular, (D) Bomba iónica (González y Noguez, 2006).

2.6.4. Formación de la Imagen

El proceso para generar la imagen del espécimen se inicia en el cañón al calentarse el filamento por corriente alterna y emitir un haz de electrones primario, que es atraído por el ánodo, el cual es mantenido a un voltaje positivo (entre 5 y 30 Kv) con respecto al filamento. Este haz de electrones con diámetro d_0 (sección 5.1.2A), al seguir su camino

a través de la lente condensadora y del lente objetivo, es reducido a un diámetro final, con el que barrerá la superficie del espécimen (González y Noguez, 2006).

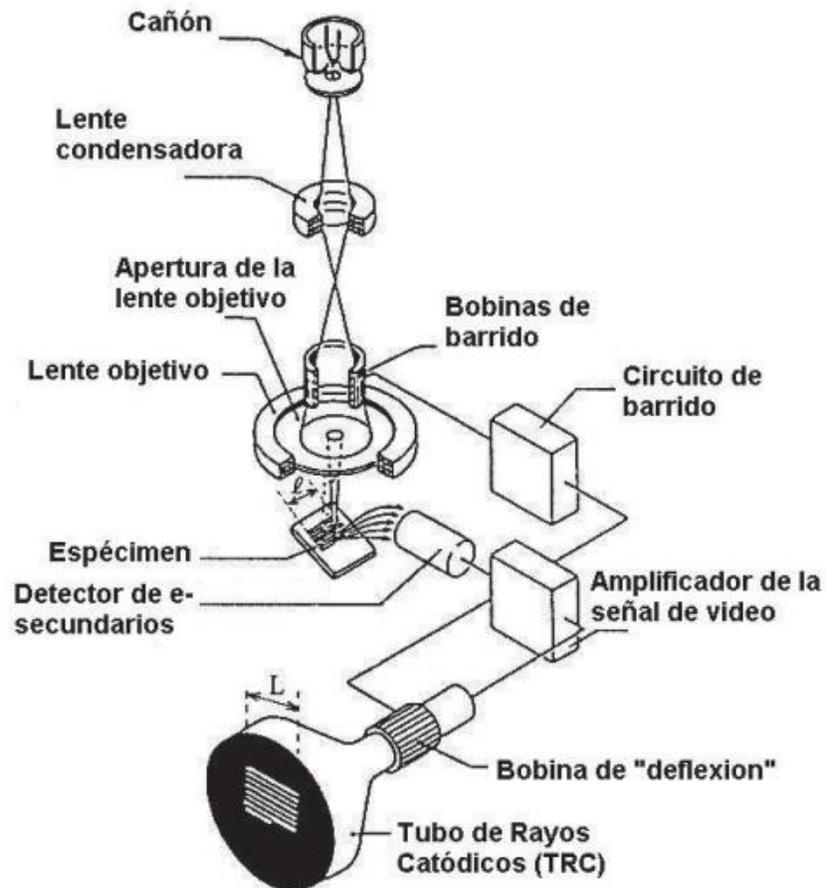


Figura 16. Formación de la imagen del espécimen en el MEB. Los electrones de haz primario, al interactuar con los átomos de la muestra, generan electrones secundarios, los cuales son colectados por el detector de Everhart y Thornley; después éstos, en sincronía con otro haz, barrerán la pantalla del monitor del TRC para modular su contraste y brillantez, lo que producirá la imagen (González y Noguez, 2006).

El barrido del haz sobre la superficie de la muestra se realiza a través de bobinas de barrido, ubicadas cerca del lente objetivo, que lo mueven primero de manera horizontal y luego diagonalmente con un movimiento rápido sin tocar la superficie, es decir “volando”, para regresar justo a un punto debajo de donde inició la primera línea de

barrido. Así continúa su movimiento barriendo renglones muy cercanos, hasta el último punto de la última línea en el área rectangular elegida por el aumento seleccionado (González y Noguez, 2006).

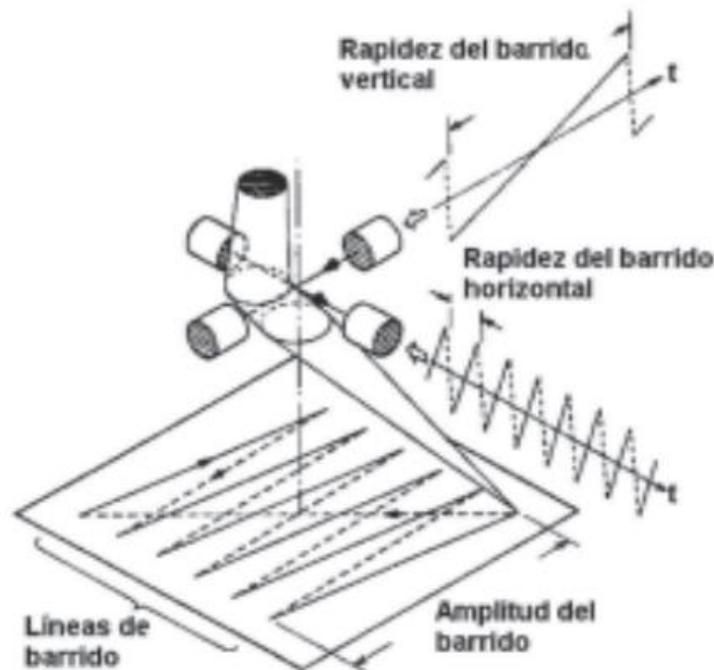


Figura 17. Dos pares de bobinas de barrido mueven el haz de electrones primario sobre el espécimen. Primero, el haz de electrones es movido por las bobinas de barrido horizontal y después, por efecto de ambas bobinas (horizontal y vertical), el haz es movido diagonalmente “sin tocar la muestra”; esto define una línea de barrido (González y Noguez, 2006).

Al interactuar el haz de electrones primario con los átomos de la muestra, se generan electrones secundarios que, en sincronía con otro haz, barrerán el monitor del tubo de rayos catódicos (TRC) para modular su brillantez. Es decir, el movimiento del haz en dirección x-y en el TRC está sincronizado con los voltajes de desviación del haz de electrones primarios, de tal forma que cada punto en el espécimen con que el haz primario interactuó será proyectado directamente como un punto sobre el monitor, lo

que producirá una imagen de la topografía de la superficie del espécimen (González y Noguez, 2006).

Contraste de la imagen

La brillantez de cada punto en la imagen del monitor de TV dependerá de la cantidad de electrones secundarios que salgan del punto correspondiente en la superficie de la muestra. Entonces, electrones producidos de la parte más profunda de un hueco; tendrán menor probabilidad de llegar al detector, que los que están más en la superficie; de esta manera, una superficie con bajo relieve se observará más oscura que una con mayor relieve (González y Noguez, 2006).

2.7. Análisis de rayos-X

Los rayos X se producen en SEM, TEM y STEM, por la interacción muestra-haz, y son característicos del elemento presente en el material. Los rayos x son resultado de una dispersión inelástica. Un hueco en un orbital interno es llenado por un electrón de uno de más alta energía. La diferencia entre los niveles resulta en la emisión de rayos-X. Cada rayo-X producido tiene un nombre basado en el nombre del nivel (K, L, M, N) en el que se produjo, y del que viene el electrón que cubrió el hueco. Si el hueco estaba en el nivel K y fue llenado por un electrón del nivel M, entonces se produce un rayo-X $K\beta$ (Ávalos, 2006).

2.8. EDS y WDS

Los elementos en una muestra pueden ser determinados por la medición de la energía o de la longitud de onda de los rayos que son producidos. La medición de energía es llamada espectroscopia de energía dispersada (EDS) y la medición de la longitud de onda se le conoce como espectroscopia de longitud de onda dispersada (WDS) (AVALOS, 2006).

EDS.

EDS es una técnica de identificación y cuantificación elemental de la composición de una muestra. Esta técnica usa rayos x que son emitidos de la muestra durante el bombardeo con un haz de electrones. La columna de microscopia electrónica debe tener un detector de EDS de rayos x, que mide el número de rayos x emitidos (cuentas) vs energía, la energía de rayos x es característica del elemento del cual los rayos x fueron emitidos. Los espectros se obtienen en una pantalla con los picos identificados, para un análisis cualitativo y cuantitativo. Otro tipo de datos obtenidos son los llamados ROI (región de interés), que es un área del espectro que puede ser ubicada alrededor del pico asociado con un cierto elemento. Las áreas con muchos puntos indican alta concentración del elemento (AVALOS, 2006).

2.9. Análisis cualitativo

En el análisis cualitativo se identifican los elementos presentes en la muestra, este análisis se basa en la ley de Moseley:

$$E=C1 (Z-C2)$$

- E= Emisión de línea dada por la serie de rayos x (por ejemplo, la serie k)
- Z= número atómico del elemento
- C1 y C2 son constantes

La ley de Moseley nos dice que las energías de rayos x son proporcionales al número atómico. La determinación de energía de los rayos x involucra la identificación de los picos presentes en el espectro (Ávalos, 2006).

2.9.1. Preparación de muestras.

Para la caracterización de una muestra en SEM, esta debe cumplir lo siguiente:

- 1) Libre de agua, solventes u otros materiales que se puedan vaporizar a vacío y contaminen la columna o causar problemas en el vacío (Ávalos, 2006).
- 2) Ser eléctricamente conductora. Las muestras biológicas no cumplen con lo anterior, por lo cual requieren de preparación. Cuando una muestra no es conductora, tiende a cargarse, lo cual afecta la imagen final, ya que habrá partes más oscuras que otras, o simplemente se producirán líneas anormales. Las muestras biológicas son principalmente no conductoras y se les pone una capa delgada de un metal para hacer la superficie conductora. Las muestras metalúrgicas requieren de pulimento (Ávalos, 2006).

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar la ultraestructura de las bolsas guturales (BG) mediante microscopía electrónica de barrido, para contribuir al conocimiento de un órgano que provoca varios problemas de salud en equinos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Describir la ultraestructura de las BG correspondiente a la *plica neurovasculosa carotis interna*.
- 2.- Describir la ultraestructura de las BG correspondiente a la *plica accessoria neuralis*.
- 3.- Comparar los valores medios de profundidad de los pliegues de tres regiones diferentes.
- 4.- Comparar los valores medios del ancho de los pliegues de tres regiones diferentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron las cabezas de cuatro caballos sacrificados en Canelones, Uruguay. Los especímenes fueron manipulados y tratados de acuerdo con los lineamientos de la Junta de Ética local de la Universidad de la República, Uruguay. En el momento de la disección, estos animales estaban sanos y no presentaban patologías aparentes en sus bolsas gutrales.

Las cabezas se seccionaron en el plano medio y se retiraron pequeñas secciones de las bolsas gutrales y se fijaron inmediatamente en glutaraldehído al 2.5% durante 24 h. Se realizó una fijación secundaria en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora y las muestras se deshidrataron con acetona.

Para la microscopía electrónica de barrido, las muestras se sometieron a un proceso de punto crítico (Denton Vacuum Critical Point Dryer) donde la acetona absoluta se sustituye por dióxido de carbono. Luego de que el dióxido de carbono alcanza el punto crítico se libera y las muestras están listas para ser recubiertas con oro a 10 mA durante 120 segundos en un recubridor Denton Vacuum Desk II. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Jeol 5900 LV a 25 KeV. Las muestras se observaron y fotografiaron con un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-5900LV, Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Análisis estadístico

La profundidad y el ancho de los pliegues se midieron con Imagen JTM, utilizando 10 medidas para cada variable en cada región. Los resultados se compararon mediante estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis) utilizando el software Statistical 6.0.

6. RESULTADOS

Como se muestra la Figura 18, la bolsa gular está dividida en compartimento lateral y compartimento medial por el hueso estilohioideo.

La mucosa de la BG estaba profundamente plegada (Figuras 18, 19, y 20), lo que fue evidente por microscopía electrónica de barrido. En la mayoría de los animales, la superficie presentaba zonas bien ciliadas con numerosas células caliciformes y otras regiones desprovistas de cilios.

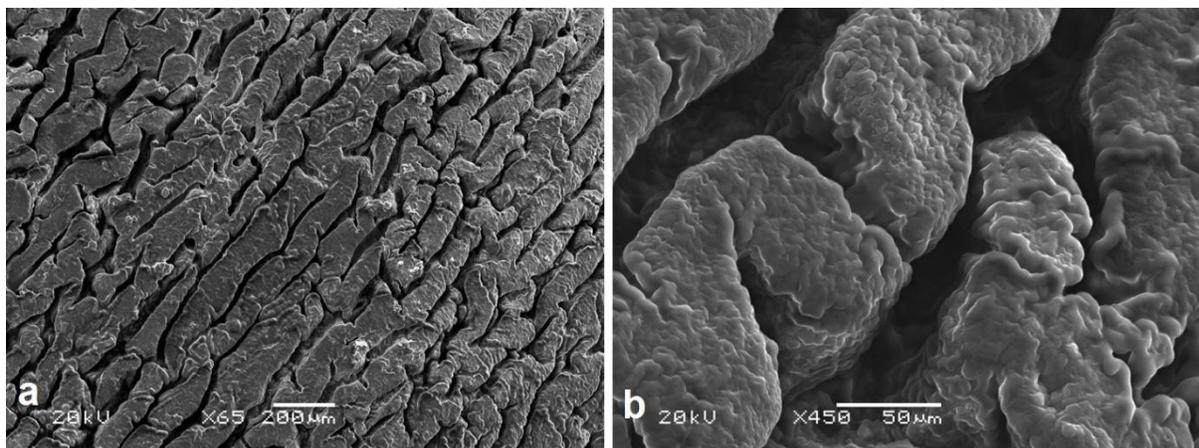


Figura 18. Ultraestructura de las BG correspondiente a *plica neurovasculosa carotis* externa mostrando que estaba muy plegada. A) Región no ciliada, aumento de 65 X. B) aumento (450 X).

En muestras de las BG del área alrededor de la *plica neurovasculosa carotis* externa se observó este patrón mixto de regiones ciliadas y no ciliadas. Sin embargo, las muestras de las BG de *plica neurovasculosa carotis interna* y *plica accessoria neuralis* presentaron alto contenido de mucosa donde no se distinguieron esas regiones (ciliadas y no ciliadas) (Figuras 19, 20).

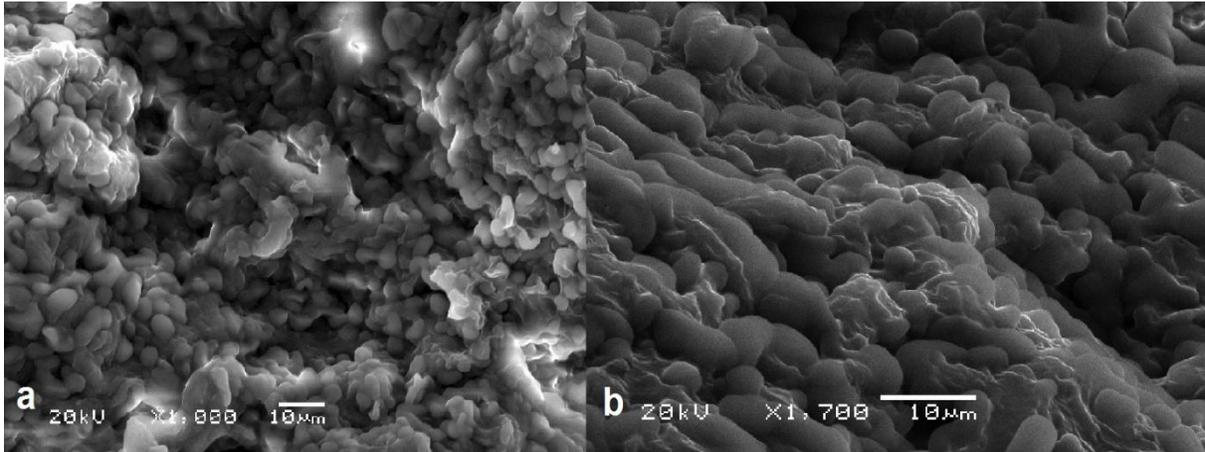


Figura 19. Ultraestructura de las BG correspondiente a la *plica neurovasculosa carotis interna*. A) Ampliación 1000 X. B) Ampliación 1700 X.

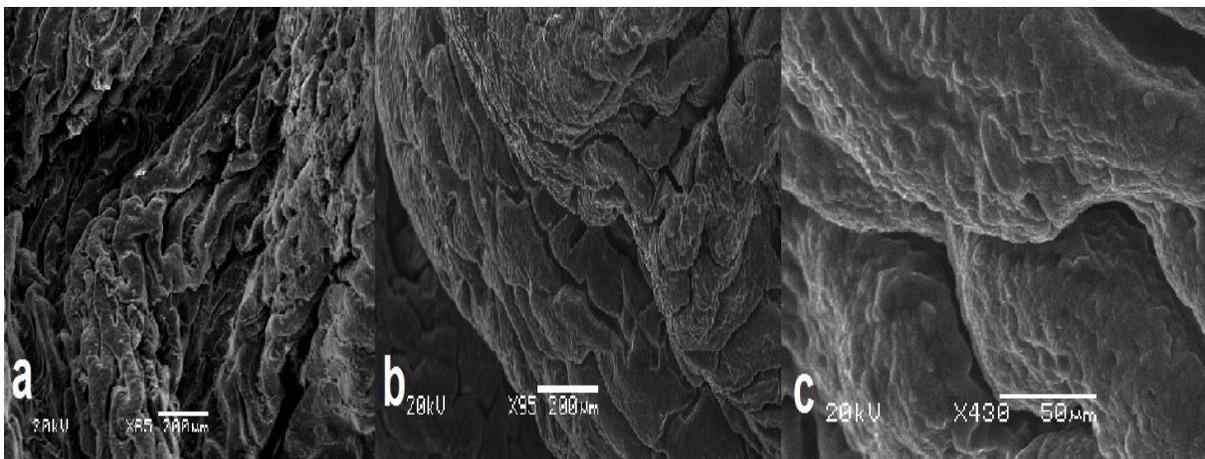


Figura 20. Ultraestructura de las BG correspondiente a la *plica accesoria neuralis* mostrando que estaba plegada y desprovista de cilios. A) Ampliación 85X. B) Aumento 95X. C) Ampliación 430X.

La Figura 21 muestra la comparación de la profundidad de los pliegues entre las tres regiones analizadas. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la *plica accesoria neuralis* y las otras dos regiones, lo que sugiere que los pliegues son más profundos en este sitio de las BG.

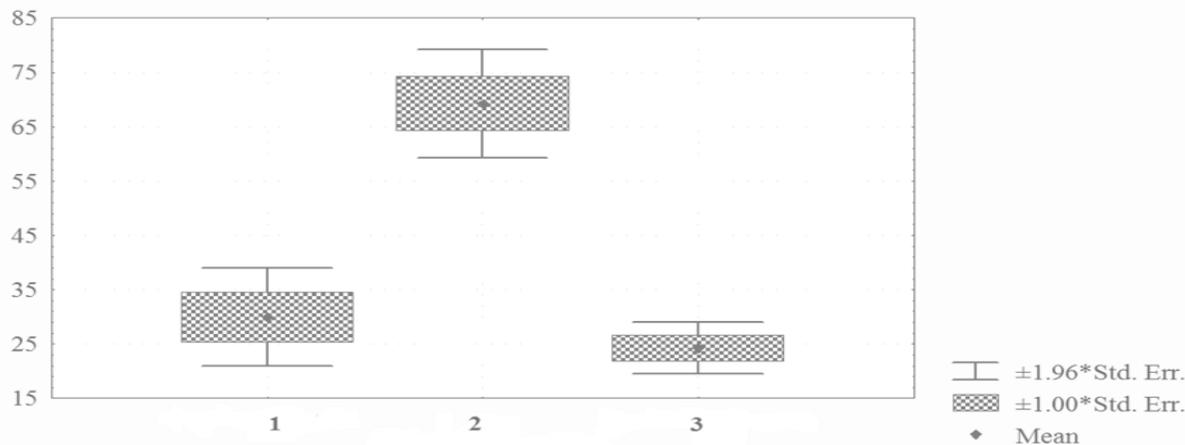


Figura 21. Comparación entre valores medios de la profundidad de los pliegues para las tres regiones estudiadas. Donde: 1 es *plica neurovascular carotis externa*, 2 es *plica accessoria neuralis* y 3 es *plica neurovascular carotis interna*.

La Figura 22 muestra la comparación de ancho de pliegues entre las tres regiones estudiadas. En este caso, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la *plica neurovascular carotis interna* y las otras dos regiones, lo que sugiere que los pliegues son más anchos que en los otros sitios.

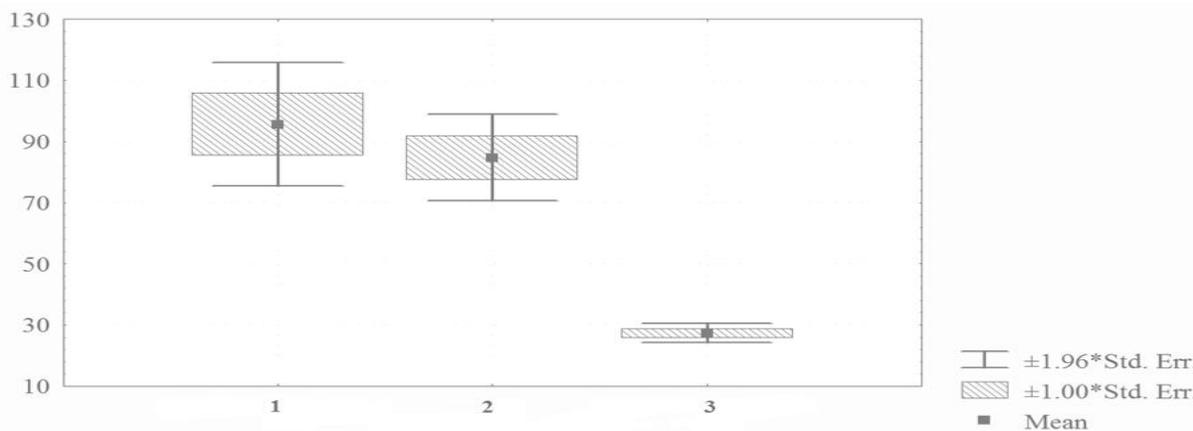


Figura 22. Comparación entre valores medios del ancho de pliegues para las tres regiones estudiadas. Donde: 1 es *plica neurovascular carotis externa*, 2 es *plica accessoria neuralis* y 3 es *plica neurovascular carotis interna*.

7. DISCUSIÓN

Las bolsas guturales son típicas de los equinos, pero también están presentes en rinocerontes (*Dicerorhinus sumatrensis*, *Rhinoceros unicornis* y *Diceros bicornis*), tapir (*Tapirus terrestris*, *Tapirus indicus* y *Tapirus bairidi*) y en Hyracoidea (*Procavia capensis*), siendo taxonómicamente animales pequeños relacionado con los elefantes (Richter, 1923; Lechner, 1932).

La superficie de la mucosa respiratoria ciliada en las GP de los equinos se describe mediante microscopía electrónica de barrido por Manglai *et al.*, (2000). Como se observó en este estudio, estos autores mencionaron la alta presencia de células caliciformes, pero señalaron diferencias significativas entre regiones, lo que sugiere que la capacidad de aclaramiento extraño de la mucosa de las BG varía según la región. Pudimos observar que existen extensas regiones sin cilios y células caliciformes, sin embargo, algunas de ellas pueden estar enmascaradas por mucosas.

El moco cubre la superficie de la mucosa manteniendo la humedad de las bolsas guturales. Aunque la función de las BG aún está en debate, algunos autores afirman que estas estructuras contribuyen a reducir la temperatura sanguínea que circula en la arteria carótida interna para conseguir que el cerebro tenga una temperatura más baja (Babptiste, 1998; Babptiste *et al.*, 2000). Sin embargo, las bolsas guturales están involucradas en algunos aspectos patológicos como descargas purulentas, secreciones mucosas sanguinolentas y muchas otras anormalidades detectadas durante la inspección (Borges y Watanabe, 2011).

Arias y Zuluaga (2010) analizaron los glucocomponentes de la mucosa en las BG sugiriendo que estos componentes son esenciales para mantener hidratada la superficie de las BG, los cuales están sujetos a un secado continuo por la entrada de aire. Doscientos treinta litros de aire deben ingresar en las bolsas guturales cada minuto con una velocidad de 18 km / h con el objetivo de enfriar la sangre destinada al cerebro, proceso crucial para la supervivencia (Mitchell *et al.*, 2006), debido a que la temperatura máxima en el cerebro del caballo doméstico no debe superar los 40,5 ° C (McConaghy *et al.*, 1995). La presencia de estas sustancias en la mucosa, entonces, podría retardar el secado de dicha superficie no solo durante el ejercicio sino también cuando la temperatura corporal aumenta por diferentes causas, contribuyendo a los mecanismos de enfriamiento y evaporación del aire. Pudimos observar que, en caballos sanos, la mucosa está cubriendo extensamente la superficie del epitelio, apoyando los hallazgos de Arias y Zuluaga (2010).

Briggs (2000) describe una experiencia en la que se compara la temperatura en la BG durante el ejercicio y el descanso en varios equinos. Los resultados mostraron que, en reposo, la temperatura del aire en la bolsa gutural era incluso un poco más cálida que la temperatura central del caballo. Pero durante el ejercicio, mantuvo una temperatura agradable y uniforme de aproximadamente 37,5 ° C (99,5 ° Fahrenheit). En los caballos en ejercicio, la sangre definitivamente se enfrió a medida que corría por el espacio de aire de la bolsa gutural, desde aproximadamente 39,5 ° C (103,1 ° F) en el lugar donde la arteria carótida interna ingresa a la bolsa hasta aproximadamente 37,8 ° C (100,04 ° F) en el punto de salida cuando los caballos galopaban.

8. CONCLUSIONES

La mucosa de la BG estaba profundamente plegada y encontramos diferencias en la profundidad de los pliegues entre las tres regiones analizadas. Se encontraron diferencias significativas en los surcos entre la *plica accesoria neuralis* y las otras dos regiones, lo que sugiere que los pliegues son más profundos en este sitio. En relación a la foldsasa, se observaron diferencias significativas entre la *plica neurovasculosa carotis interna* y las otras dos regiones, lo que sugiere que los pliegues son más anchos que en los otros sitios.

9. LITERATURA CITADA

- ACCILI, D., MENGHI, G., GABRIELLI, MG. (2008). Lectin histochemistry for in situ profiling of rat colon sialoglycoconjugates. *Histol Histopathol*, Vol. 23, 863-875.
- AINSWORTH, DM., HACKETT, RP. (2004). Disorders of the respiratory system. In S. Reed , W. Bayly , & D. Sellon, *Equine internal medicine 2nd edition* (pp. 289–354). St Louis (MO): Saunders.
- ANDRES, K. (1998). Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Molecular Microbiology*, Vol. 29, 1-11.
- ARIAS GUTIERREZ, M., & ZULUAGA ARAQUE, D. (2010). Preliminary histochemical evaluation to determine the presence of some glycosaminoglycans of the equine guttural pouches mucosa. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Vol. 5, p. 37-43.
- ARIAS, MP., ZULUAGA, DA., BERRÍO, C., GIRALDO, RA., ESCOBAR, M. (2013). Hallazgos Endoscópicos De Las Vías Respiratorias Altas En Equinos De La Policía Metropolitana De Medellín, Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot*, Vol. 60 (I), 23-31.
- ÁVALOS, CG . (2005). La odisea del hombre para entender la luz y la visión. *Imag ópt*, p. 7-15. Disponible en: <http://www.imagenoptica.com.mx/pdf/revista38/ArtOdisea.pdf>.
- AVALOS, RT. (2006). Scanning Electron Microscopy (SEM). *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- BAPTISTE, KE., HOLLADAY, SD., & FREEMAN, LE. (1996). Alterations in Equine Guttural Pouch Morphology With Head Position: Observations Using a New Technique for Producing Accurate Casts. *The Anatomical Record*, Vol. 584, p. 246-579.
- BAPTISTE, K. (1998). A preliminary study on the role of the equine guttural pouches in selective brain cooling. . *Veterinary Journal*, Vol. 155, p. 139-148.
- BAPTISTE, KE., CAKE, MH. (1994). Lipid analysis of lavage samples from the Equine guttural pouch (auditory tube diverticulum). *Ann Otol Rhinol Laryngol*, Vol. 103, 383-388.

- BAPTISTE, KE., NAYLOR, JM., BAYLLEY, J. (2000). A function for guttural pouches in the horse. *Nature*, Vol. 403, p. 382-383.
- BARAKZAI, S. (2007). Handbook of equine respiratory endoscopy 1st edition. New York: Saunders Elsevier.
- BARBER, S. (1999). Disease of the guttural pouches. In P. Colahan , A. Merritt , & J. Moore , *Equine medicine and surgery* (pp. 501–12). Mosby: St Louis (MO).
- BARBER, SM. (1991). Diseases of the guttural pouches. In P. Colahan, I. Mayhew, A. Merritt, & N. Moore, *Equine Medicine and Surgery I* (pp. 402-411). Goleta, American Veterinary Publications.
- BARCAT, JA., ROBERT, HOOKE (1635-1703). (2003). *Rev Med Buen Air*, Vol. 63 (6), p. 5. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802003000600014&script=sci_arttext .
- BERNFELD, M., GÖTTE, M., PARK, PW., REIZES, O., FITZGERALD, ML., LINCECUM, J., ZAKO, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, Vol. 68, 729-77.
- BORGES, AS., & WATANABE, MJ. (2011). Guttural poche diseases causing neurological dysfunction in the horse. *Veterinary Clinical Equine*, Vol. 27, p. 545-572.
- BRETON, BC. (2004). The early history and development of the scanning electron microscope. *Engineering Department, Cambridge University*, www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/oatley/history.html.
- BRIGGS, K. (2000). Mystery Solved: Guttural Pouches. *The Horse*, Vol. 7, p. 74-76. <http://www.thehorse.com/articles/10198/mystery-solved-guttural-pouches>.
- BROOKS, S. (2008). Human N- and O-linked protein glycosylation – An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology A- Molecular & Integrative Physiology*, Vol. 150 (3), S162-S16.
- BUDRAS, KD., SACK, WO., RÖCK, S. (2010). In Head, *Anatomy of the horse. 5th edition*. (pp. 32–51). Hannover (Germany): Schluetersche.
- CABALLERO, GJ . (2012). Apuntes para la historia de la docencia de la Histología en Cuba. Siglo XVIII al XX. *Rev Medisur*, Vol. 10 (4), p. 5.

- CABAÑES, J., MONREAL, L., MAJO, N. & CASTELLA. (2002). Micosis de las bolsas guturales causada por *Emiricella nidulans* en un caballo. *Revista Iberoam Micol*, p. 4. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/208211.pdf>.
- CHIESA, OA., LOPEZ, C., DOMINGO, M. (2000). A percutaneous technique for guttural pouch lavage. *Equine Pract*, Vol. 22, p. 8-11.
- CHURCH, S., WYN-JONES, G., PARKS, AH., RITCHIE, HE . (1986). Treatment of guttural pouch mycosis. *Equine Vet J*, Vol. 18, 362-365.
- CORTÉS, GF . (2008). Célula: Estudio de una metáfora y de un cambio de significado. *Panace*, Vol. 9 (27), p. 5. Disponible en: http://www.medtrad.org/panacea/IndiceGeneral/n27_entremeses-gabaudan2.pdf.
- CUNNINGHAM, J. (2009). *Manual de Fisiología Medica 4ª ed.* Mexico DF: Interamericana Mc Graw Hill.
- DAVIS, EW., LEGENDRE, AM . (1994). Successful treatment of guttural pouch mycosis with itraconazol and topical enilconazol in a horse. *J Vet Intern Med*, Vol. 8: 304-305.
- DE LAHUNTA, A., HABEL, RE. (1986). Hear, horn. In *Applied veterinary anatomy. 1st edition* (pp. 55–65). Philadelphia: WB Saunders.
- DELGADO, GG., DELGADO, RG . (2001). Breve historia de la microbiología y parasitología médicas. In H. Llop, D. Valdés, & S. Zuazo, *Microbiología y parasitología médicas* (pp. 3-8). La Habana: ECIMED.
- DÍAZ, CA., VIVAS, RR., PUERTA, L., AHUMEDO, MM., ARÉVALO, TL., CABRALES, SR., HERRERA, HA . (2011). Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing. *Avan Period*, Vol. 23 (3), p. 7.
- DIETZ, O., & HUSKAMP, B. (2006). Handbuch der Pferdemedizin. *Auflage, Enke Verlag Stuttgart*, p. 319-323.
- DIXON, PM., ROWLANDS, AC. (1981). Atlanto-occipital joint infection associated with guttural pouch mycosis in a horse. *Equine Veterinary Journal*, Vol. 13, 260-262.
- DYCE, K., SACK, W., & WENSING, C. (2002). *Textbook of Veterinary Anatomy 3rd ed.* Philadelphia: Saunders.

- DYCE, KM., WOLFGANG, WO., WENSING, CJG. (2009). The head and ventral neck of the horse. In *Textbook of veterinary anatomy. 4th edition* (pp. 501-532). St Louis (MO): Saunders Elsevier.
- EDWARDS, GB., GREET, T. (2007). Disorders of the guttural pouches (auditory diverticuli). In D. McGorum , P. Dixon , & N. Robinson , *Equine respiratory medicine and surgery 1st edition*. (pp. 419–36). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- EDWARDS, RB., SANTSCHI, EM . (2002). Diagnosis and treatment of upper airway disorders in the foal. In *ANNUAL VETERINARY SYMPOSIUM ACVS (AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY SURGEONS)*. San Diego, EUA: Proceedings... Betheseda : American College of Veterinary Surgeons.
- ENDO, H., FUJISAWA, M., KUROHMARU, M., & HAYASHI, Y. (1998). The guttural pouch is not present in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*); morphology of the eustachian tube and nasopharynx. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, Vol. 27, 327-330.
- FORBES, JR., BENNELL, DG . (1975). Tympany of the guttural pouch in a foal. *Australian Vet J*, Vol. 51, p.164.
- FORD, B. (2002). El nacimiento del microscopio. *Contactos*, Vol. 45 (1), 29- 38.
- FRANDSON, RD., FAILS, AD., LEE, WW . (2009). Chapter 19. In *Anatomy and Physiology of Farm Animals 6th edition* (pp. 171-89).
- FREEMAN, D. (1999). Guttural pouch. In J. Auer, & J. Stick, *Equine Surgery, second ed* (pp. 480–488). Philadelphia: Saunders.
- FREEMAN, DE . (1992). Guttural pouch. In J. AUER, *Equine surgery* (pp. 481-482). Philadelphia: Saunders.
- FREEMAN, DE. (1980). Diagnosis and treatment of diseases of the guttural pouch (part I). *Compend Contin Educ Pract Vet*, Vol. 1, p. 3-11.
- FREEMAN, DE., HARDY, J. (2006). Guttural pouch. In J. Auer , & J. Stick , *Equine surgery 3rd edition* (pp. 591-607). St Louis (MO): Saunders Elsevier.
- FREEMAN, DE., HARDY, J. (2012). Guttural pouch. In J. AUER, & J. STICK, *Equine surgery* (pp. 623-642). St. Louis: Elsevier Saunders.
- GETTY, R. (1975). In *The Anatomy of the Domestic Animals 5th ed. Vol. 1* (pp. 724-725). Philadelphia: W.B. Saunders.

- GODINHO, HP., GETTY, R. (1986). Nervos cranianos. In R. Getty, *Anatomia dos animais domésticos 5th edition* (pp. 608–20). Rio de Janeiro (Brazil): Guanabara Koogan.
- GOLDSTEIN, JI. (1992). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Nueva York: Plenum Press.
- GOLDSTEIN, JI., NEWBURY, P., ECHLIN, D., JOY, C., FIORI, EL., LIFSHIN. (1992). Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. New York: Plenum Press.
- GÓNGORA-BIACHI RA. (2005). La sangre en la historia de la humanidad. *Rev Biomed*, Vol. 16, p. 7. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2005/bio054h.pdf>.
- GONZÁLEZ, AJ., GONZÁLEZ, GB., BARRIAL, GR. (2004). Laboratorio de microbiología. In *Instrumentación y principios básicos* (pp. 95-96). La Habana: ECIMED.
- GONZÁLEZ, MG., NOGUEZ, AM. (2006). Principios de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X Característicos. *Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química*, p. 20-90.
- GRABNER, A. (1984). Diagnostik und Therapie von Luftsackerkrankungen des Pferdes. *Tierärztliche Praxis*, Vol. 12, p. 329-341.
- HARDY, J & LÉVEILLÉ, R. (2003). Diseases of guttural pouches. *Vet Clin Equine*, Vol. 19, 123–58.
- HASTY, TL., OFEK, I., COURTMEY, HS., DOYLE, RJ. (1992). Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun*, Vol. 60, 2147-2152.
- HILL, AE., DUARTE, PC., MORLEY, PS. (2007). Epidemiology of Equine Infectious Disease. In D. Sellon, & M. Long, *Equine Infectious Diseases*. St. Louis (MI): Saunders/Elsevier.
- HILTON, H., PUCHALSKI, SM., ALEMAN, M. (2009). The computed tomographic appearance of equine temporohyoid osteoarthropathy. *Vet Radiol Ultrasound*, Vol. 50, 151-156.
- HIRSCH, P., HOWIE, A., NICHOLSON, RB., PASHLEY, DW., WHELAN, MJ. (1997). Electron microscopy of thin crystals. Nueva York: Krieger Publishing Company, NY.

- HODGSON, DR. (1990). Thermoregulation in the exercising horse. *Proceedings of the 8th ACVIM Forum*, Vol. 487, p. 9.
- HOLCOMBE, S.J., DUCHARME, NG. (2004). Upper airway function of normal horses during exercise. In K. Hinchcliff, A. Kaneps, & R. Geor, *Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of the equine athlete* (p. 55). Philadelphia: Saunders.
- IUPS THERMAL COMMISSION. (2001). Glossary of terms for thermal physiology: third edition. *Jpn. J. Physiol*, Vol. 51, 245-280.
- JEOL, LT. (1981). Instructions 4-Crystal X-Ray spectrometer. *JEOL*, p. 42.
- KARLSSON, KA . (1998). Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol Microbiol*, Vol. 29, 1-11.
- KIMOTO, S. (1985). The scanning microscope as a system. *JEOL News, Jeol Ltd.*
- KÖNIG, HE. (1984). Zur Topographie des Luftsackes (*Diverticulum tubae auditivae*) beim Pferd. *Tierärztliche Praxis*, Vol. 12, p. 219-227.
- KÖNIG, HE., BUDRAS, KD., SEEGER, J., FERSTERRA, M., & SORA, MC. (2010). Anatomic and histological investigations of the equine guttural pouches (*Diverticulum tubae auditivae*)-clinical advisments. *Agro-Ciencia*, Vol. 26, p. 90-98.
- KUMAR, P., TIMONEY, JF. (2006). Histology, immunohistochemistry and ultrastructure of the tonsil of the soft palate of the horse. *Anatomia, histología, embryologia*, Vol. 35 (1): 1-6.
- LEDERMANN, W. (2012). ¿Quién las vio primero? *Rev chil infectol*, Vol. 29 (3), p. 8.
- LEPAGE, O. (1994). Hemorragie dans les poches gutturales. Anatomie, diagnostic et etiologie. *Pratique Veterinaire Equine*, Vol. 26, 255-261.
- LEPAGE, O. (2002). Disorders of the guttural pouches. *International Veterinary Information Service*, http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/lepage/chapter_frm.asp?LA=1.
- LEPAGE, OM., PERRON, MF., & CADORÉ, JL . (2004). The mystery of fungal infection in the guttural pouches. *The Veterinary Journal*, Vol. 168, p. 60-64.
- LIU, S., SELA, G., COHEN, J., JADOUN, A., CHEUNG, A., OFEK, I. (1997). Insertional inactivation of streptolysin S expression is associated with altered riboflavin metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *Microb Pathog*, Vol. 22, 227-234.

- MACDONALD, DG., FRETZ, PB., BAPTISTE, KE. (1999). Anatomic, radiographic and physiologic comparisons of the internal carotid and maxillary artery in the horse. *Vet J*, Vol. 158, 182-189.
- MANGLAI, D., WADA, R., ENDO, H. (2000). Macroscopic anatomy of the auditory tube diverticulum (guttural pouch) in the Thoroughbred equine: a silicon mold approach. *Okajimas Folia Anat Jpn*, Vol. 76, 335-6.
- MANGLAI, D., WADA, R., KUROMAHRU, M., YOSHIHARA, T., KUWANO, A., OOKUWA, M., & HAYASHI, Y. (2000). Histological and Morphological Studies on the Mucosa of the Equine Guttural Pouch (Auditory Tube Diverticulum). *Okajimas Folia Anat: Japan*, Vol. 77, p. 69-77.
- McCONAGHY, FF., HALES, JRS., ROSE, RJ., & HODGSON, DR. (1995). Selective brain cooling in the horse during exercise and environmental heat stress. *Journal of Applied Physiology*, Vol. 79, p. 1849-1854.
- McCUE, PM., FREEMAN, DE., DONAWICK, WJ. (1989). Guttural pouch tympany: 15 cases (1977-1986). *J Am Vet Med Assoc*, Vol.194 (12), p.1761-1763.
- MCDANIEL, R., WHITEHEAD, B., MANNING, J. (2011). Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. *Vet Rec*, Vol. 169(1), 12–12. Doi: 10.1136/vr.d2157.
- MCGORUM, DB., DIXON, PM., ROBINSON, NE., SHUMACHER, J. (2007). In *Equine Respiratory Medicine and Surgery* (pp. 419-420). Saunders Elsevier.
- MITCHELL, G., FULLER, A., MALONEY, SK., RUMP, N., & MITCHELL, D. (2006). Guttural pouches, brain temperature and exercise in horses. *Biology Letters*, Vol. 2, p. 475-477.
- NIEUW, AV., BOLSCHER, JM., VEERMAN, EC. (1995). Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology*, Vol. 5, 733-740.
- NIEUWSTADT, RA., KALSBECK, HC. (1994). Luchtazakmycose: lokale behandeling via een permanente catheter met enilconazol. *Tijdschr Diergeneeskd*, Vol. 119, 3-5.
- NIXON, W. (1998). History and early developments of the scanning electron microscopy. Proceedings of the 14th-ICEM. *Institute of Physics Publishing, Mexico*.

- ORR, JA., WAGERLE, C., KTORPES, AL., SHIRER, HW & FRIESEN, BS. (1983). Distribution of internal carotid artery blood flow in the pony. *American Journal of Physiology*, Vol. 244, H142-H149.
- OTO, C., HAZIROGLU, RM. (2011). Magnetic resonance imaging of the guttural pouch (diverticulum tubae auditivae) and its related structures in donkey (*Equus asinus*). *Ankara Univ Vet Fak Derg*, Vol. 58, 1-4.
- PARRAGA, A., FERNÁNDEZ, R. (1994). Una mirada retrospectiva sobre la evolución histórica de las formas del microscopio. *Cuad Hosp Clín*, Vol. 40 (1), p. 6.
- PEREZ, J & CARRASCO, L. (2000). Diagnostico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Revista Iberoam Micol*, p. 5. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S18S22.pdf>.
- PERKINS, G., PEASE, A., CROTTY, E., & FUBINI, S. (2003). Diagnosing Guttural Pouch Disorders and Managing Guttural Pouch Empyema in Adult Horses. *Compendium*, Vol. 25, p. 12.
- PHILIPS. (1995). Manual for the course SEM-EDX Microanalysis. Philips Electron Optics. Application Laboratory. *Copyrights Philips Electron Optics, Eindhoven, Netherlands*, 1-50.
- PLEASANT, DB., BERRY, DB . (2009). Disorders of guttural pouch. In N. Robinson , & K. Sprayberry , *Current therapy in equine medicine 6th edition* (pp. 250–4). St Louis (MO): Saunders Elsevier.
- POLLOCH, PJ. (2007). Diagnosis and management of guttural pouch mycosis. *Equine Vet Educ*, Vol. 19, 522-527.
- REYES, GJ. (2020). Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo. *Mundo Nano*, Vol. 13 (25), p. 79-100.
- ROSLER, R & YOUNG, P . (2011). La lección de anatomía del doctor Nicolaes Tulp: el comienzo de una utopía médica. *Rev méd Chile*, Vol. 139 (4), p. 6.
- ROUSSEAU, K., KIRKHAM, S., MCKANE, S., NEWTON, R., CLEGG, P., THORNTON, DJ. (2007). Muc5b and Muc5ac are the major oligomeric mucins in equine airway mucus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 292, L1396-L1404.
- RUIZ DE LEON ROBLEDO, MA . (2014). Enfermedades del aparato respiratorio en el caballo. *Revista Mundo Veterinario*, p. 3. Disponible en:

- http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_mg/mg_2002_148_66_68.
- SÁNCHEZ, LR & OLIVA, GN. (2015). Historia del microscopio y su repercusión en la Microbiología. *Humanidades Médicas*, Vol. 15 (2), p. 355-372.
- SASAKI, M., HAYASHI, Y., KOIE, H . (1999). CT Examinations of the guttural pouch (auditory tube diverticulum) in Prezwalski's horse (*Equus przewalskii*). *J Vet Med Sci*, Vol. 61, 1019-1022.
- SCOTT, VD., LOVE, G. (1983). Quantitative electron–probe microanalysis. *Ellis Horwood Ltd*, ISBN-10:0853125147. ISBN-13: 978-0853125143.
- SKODA, K. (1911). Über die bedeutung der tubendivertikel (Luftsacke) bei den equiden. *Anatomische Hefte, I. Abteilung*, Vol. 42, p. 128.
- SOCIETY, [BEPS] BELGIAN EQUINE PRACTITIONERS. (2015). *Proceeding of the Belgian Equine Practitioners Society Congress 2015*. Bruselas (BL): BEPS.
- SPEIRS, VC., HARRISON, IW., VEENENDAAL, JV., BAUMGARTNER, T., JOSSECK, HH., REUTTER, H. (1995). Is specific antifungal therapy necessary for the treatment of guttural pouch mycosis in horses? *Equine Vet J*, Vol. 27, 151-152.
- STRASBURGER, E. (2011). Homenaje a Marcello Malpighi por Eduard Strasburger. *Bol Soc Argent Bot*, Vol. 46 (3-4), p. 8.
- TAYLOR, FG & HILLYER, MH . (1999). Técnicas diagnósticas de medicina equina. Zaragoza (España): Acribia.
- VEGA, MA . (2012). Aspectos y avances en ciencia, tecnología e innovación. *Polis Rev Latin*, Vol. 11 (33), p. 19 .
- WALMSLEY, JP. (1988). A case of atlanto-occipital arthropathy following guttural pouch mycosis in a horse. The use of radioisotope bone scanning as an aid to diagnosis. *Equine Veterinary Journal*, Vol. 20, 219-220.
- WALSH, JM., WEINBERG, H. (1979). Tympanites of the guttural pouch in a foal. *Vet Med*, Vol. 2, p. 204-205.