TEMA:

FISIOLOGIA.

FISIOCOGIA - NEURONA

FISIOLOGIA GENERAL DE LA NEURONA.

Tesis que presenta al Jurado Calificador el anumno Eliseo Ramírez para obtener el título de Médico Cirujano.

ARCHIVO HISTORICO
60. piso
Ciudad Universitaria
México. D. F.

México, D.F.
MCMXIII
1913

Archivo Histórico
Clasificación Topográfica
LEGAJO
EXPEDIENTE

ADVERTENCIA.

En una ciencia como la fisiología sólo puede escribir algo original quien haya hecho de ella un motivo de especial estudio. Siendo esencialmente esperimental es indispensable un buen laboratorio. Estos dos motivos son más que suficientes para que esta Teis, pensada y escrita en 15 dias por mandato de una ley, sea incompleta.

El conocimiento del funcionamiento del sistema nervioso entraña la idea del conocimiento anatómico, sobre el cual se funda en parte. Debiendo limitarme al funcionamiento, acompaño este trabajo de microfotografias que hablen por mí. La mayor parte las he sacado de preparaciones histológicas del Prof. Sigmud.

Agradezco al Sr. Prof. Herrera el haber puesto a mi disposición su aparato de microfotografía, y a Uds., mis maestros, la benevolencia con que espero juzgarán mi trabajo.

México, diciembre de 1913.

ARCHIVO HISTORICO
60. piso
Ciudad Universitaria
México, D. F.

FISIOLOGIA GENERAL DE LA NEURONA.

El sistema nervioso se encuentra en todos los metazoarios pero no adquiere toda su importante complexidad anátômica y funcional sino en las especies elevadas presidiendo todos los actos del organismos y formando por decirlo así el verdadero substrutum de la vida de relación.

En los celenterados el sistema nervioso está constituido por celdillas diferenciadas pero repartidas uniformemente en todo el cuerpo (Kleinenberg), siendo al mismo tiempo elementos musculares y nerviosos; en los anélidos los elementos nerviosos se reunen en pequeños ganglios colocados adelante del esófago y no es sino en los vertebrados en donde se encuentra el sistema nervioso dividido en periférico y central, representado éste por el eje cerebro espinal.

El sistema nervioso es el que establece el lazo funcional y la unidad de funcionamiento orgánico. Así, el campo que nos ofrece el estudio de la fisiología normal del sistema nervioso es tan amplio que resultaría punto inadecuado para tratarlo enesta tesis si no me limitara á estudiar únicamente la fisiología de la neurona.

El elemento más importante del sistema nervioso, según la teoría formulada por Cajal, en 1888, es la celdilla nerviosa, que fué descubierta por Ehrenberg en 1833. Este elemento es el centro trófico de la neurona, el elemento que preside la sensibilidad y la movilidad y por último es el que elabora los más complidados fenómenos de la función psíquica.

En la celdilla nerviosa se distinguen: el cuerpo celular o rigo-4,5,6,7 citoplasma con su núcleo y nucleolo y sus prolongamientos. En este pequeño estudio trataré de las funciones de esos dos elementos, refirien - do al tratar de das prolongaciones, el papel fisiológico tan importante que les atribuyen Beth, Apathy, Held, etc., opositores a la teoría de la neurona.

FISIOLOGIA DEL CUERPO CELULAR.

FUNCION TROFICA. - El cuerpo celular tiene el importante papel de presidir la nutrición de las prolongaciones. Este hecho fué demostrado por Waller quien seccionando las raices anteriores de la médula vió degenerar el nervio correspondiente y que está formado por
prolongaciones cilindroaxiales; igualmente degeneran las fibras

periféricas de un ganglio espinal, que son prolongaciones protoplasmáticas, cuando se sepran del ganglio. Este hecho, conocido con el nombre de degeneración walleriana, llena con su importancia gran parte de la patología nervice a y sobre ella se funda el método de las degeneraciones secundarias estudiadas con mucho detalle por Louvain y por Dejerine (Revue de Neurologie 1904-1906); pero Waller aifrmaba que el cuerpo celular no sufría ninguna dateración, la falsedad de esta afirmación ha sido puesta en evidencia por los trabajos de Marinesco y de Marie principalmente. Estos autores observaron que el centro celular desprovisto de sus prolongaciones sufría primero la degeneración vacuolar o colicuativa, despuesel proceso de cromatolisis y por último la atrofia. Goldscheider explica este fenómeno por la ley general de biología que el reposo conduce a la atrofia. Pero tambien este centro trófico puede regenerar todas sus prolongaciones como lo ha demostrado His. Despues de la sección de un nervio la parte periférica degenera, pero la extremidad central en conección con el otro cuerpo celular emite prolongaciones por gemación, que introducidas en las vaines de Schwann del cabo periférico regeneran el nervio volviéndole su función aun cuando la separación de los dos extremos de la sección sea de tres centimetros. Beth ha demostrado en 1905 que la regeneración de la porción periférica se efectúa y recobra su función aun sin estar en relación con ninguna celdilla nerviosa; pero esta autoregenaración, provocada por los núcleos de la vaina de Schwann dura muy poco tiempo a no ser que el extremo periférico se ponga en relación con el central. La regeneración nerviosa se puede efectuar con nervios de distinta neuraleza como lo demostraron en 1906 Wertheimer y Dubois suturando el extremo periférico del hipogloso con el central del facial transformando al primero de vaso dilatador en vaso constrictor.

MODIFICACIONES DEL CUERPO CELULAR POR EL FUNCIONAMIENTO.El funcionamiento de las celdillas nerviosas trae como consecuencia
ciertas alteraciones señaladas por Flesch, Hodge, Nissl, etc., pero
Lugano es el que ha definido con toda exactitud este proceso en animales sometios por largo tiempo a un funcionamiento continuo. Al principio las celdillas nerviosas aumentan de volumen y en seguida disminuyen, el núcleo sufre un cambio semejante, despues se desaloja
hacia la periferia celular y termina por hacer hernia.

En 1893 Nissl descubrió en el citoplasma de las celdillas nerviosas un gran número de granulaciones irregulares facilmente teñibles por el azul de toluidina, el azul de metileno, etc. Dichas granulaciones. llamadas cromatófilas, tienen un papel importante en el fun-Monamiento de las celdillas, como lo demuestra el hecho de desaparecer por el funcionamiento sufriendo un proceso de dilución o cromatolisis, como si en estas granulaciones recidiera almacenada la energía nerviosa. Este preceso puede llegar al grado de hacer que la celdilla tome el aspecto de una vesícula clara (Pugnat). El reposo permite regeneral la substancia cromatófila por un proceso vital del propoplasma, o según van Durme, las granulaciones de Nissl son llevadas por los leucocitos que invaden y penetran las celdillas agotadas por el funcionamiento/ o por la inyección de substancias tóxicas para la celdilla nerviosa, como sucede con el nitrito malónico, degenerándose después de dos o tres dias por la invección de hiposulfito de sodio, antidoto de aquella substancia.

El interior del cuerpo celular está recorrido por una grán cantidad de fibrillas, puestas de manifiesto en 1871 por Gerlach por medio del cloruro de oro, estudiadas después brillantemente por Donaggio, y cuya significación fisiológica ha sido el tema de brillantes polémicas sostenidas por Cajal y su escuela en contra de los antineuronistas. Tello, en 1903, demostró la diferencia de esta finísima red según el estado de reposo o de trabajo de la celdilla, observando que en los animales invernamtes, durante el sueño, se reunen en grupos para dar lugar a fibras gruesas (gigantes) separadas por espacios relativamente grandes; durante la vigilia las fibrillas de disocian constituyendo así una fina red de mallas muy pequeñas en todo comparables a la de los animales de funcionamiento constante. Hay que distinguir estos fenómenos debidos al funcionamiento de los que se deben a las alteraciones que fufren los elementos nerviosos con la vejez. Los estudios de Cajal han demostrado que coando las celdillas envejecen se produce en ellas un proceso de cromatolisis y de degeneración colicuativa, fenómenos mucho más acentuados en las celdillas de la médula que en las celdillas cerebrales que presiden los actos superiores de la vida de relación. Con la vejez las neurofibrillas subren

un engrosamiento y la celdillas nerviosa se ve invadida per una legión de fagocitos, fenómeno que observado por Metahnikoff lo ha interpretado en su célebre teoria sobre la vejez.

En estado de reposo la reacción del citoplasma es alcalina y según Howell (Text book of Physiology- pag 129 -1906) durante la actividad presenta reacción ácida, siendo comparable este fenómeno al que pasa durante la actividad de la celdilla muscular.

El funcionamiento trae como consecuencia el consumo de oxígeno y desprendimiento de CO² y de otros productos de desintegración y de oxidación. La experiencia de Stenon demuestra que cuando la corriente sanguinea, que lleva los elementos indespensables para la nutrición celular, se interrumpe, hay primero una face muy corta de exitación para suprimirse en seguida toda clase de funcionamiento.

La celdilla nerviosa puede funciomar fuera del organismo cuando por un medio artificial se le hace llegar la sangre, como lo demostró Brown Secquard. En 1907 Kuliabko, en el laboratorio de Podwitsowsky, pudo despertar reflejos en la cabeza de un perro separada del cuerpo de animal inyectando en las arterias el líquido de Ringer Locke. Se puede hacer que el funcionamiento de las celdillas nerviosas se prolongue mayor tiempo que el ordinario después de la mueste del animal, colocándola en una atmósfera de oxígeno, pudiendo en ese caso durar la exitabilidad de la médula hasta 24 horas (Gley-Traité de Physiclogie, pag 969-1913.) Las sales de calcio obran en sentido opuesto disminuyendo ha exitabilidad de la médula.

El hecho del aumento del consumo de exígeno durante el funcionamiento de las celdillas nerviosas, fué puesto de manifiesto por Hill por medio de la siguiente experiencia: se sabe que los cuerpos reductores decoloran el azul de metileno, si se inyecta éste a un animal en plena actividad los elementos nerviosos permanecen incoloros pero si el animal está anestesiado durante la inyección, los elementos nerviosos cerebrales quedan teñidos en azul vivo, y segúa que se sacrifique al animal en un periodo más o menos lejano de la anestesia, se tendrán todos los intermediarios entre el azul vivo y la decoloración.

De los productos de desecho celular por el funcionamiento

del sistema nervioso el mas cono=cido es el trimetiloxetileno-amonio

OH

Az(CH³)³ OH

sus derivados.

EXITACION CELULAR .- Goetch and Burch - (Journal of Physiology. 1899 pag. 410) han demostrado que cuando un nervio es estimulado tan rápidamente que el segundo estímulo obre antes de que haya pasado el efecto del primero, en lugar de sumarse las dos exitaciones la segunda queda sin efecto. En la celdilla nerviosa para lo contrario, caracterizándose precisamente por peseer la propiedad de sumar las exitaciones rápidamente repetidas y así se ve que cuando no hay reacción a una primera exitación la reacción se produce cuando se aplica una seria de estímulos, lo que se observa frecuentemente tratandose de celdillas sensoriales. Broca y Richet (Journal de Physiologie-1897) y Horsley y Schafer más recientemente, han demostrado por distintos métodos que la celdilla nerviosa responde separadamente a las exitaciones cuando estas no son más rápidas que diez por segundo, en caso contrario la respuesta es única; concluyen también que la memor duración de un acto intelectual es de un décimo de segundo. En todo caso el funcionamiento de la celdilla nerviona no es continuo, sino periódico y rítmico, variando la duración de oscilación funcional de 0.006 a 0.01 de segundo. (Howell-Text book of Physiology, pag 132).

Fisiología de los prolongamientos nerviosos.

Para que el funcionamiento de la celdilla nerviosa se haga aparente necesita de elementos conductores del influjo nervioso por ella desarrolladoy que, trasmitido a otros órganos suscite en ellos el funcionamiento. El papel de conductores del influjo nervioso (Testut) lo desempeñan los prolongamientos de las celdillas. Estos elementos los descubrió Remark en 1838 y Deiters en 1865 los separó en dos grupos: los prolongamientos cilindroamiles o axones y los prolongamientos protoplasmáticos o dendritas (del griego $\delta v \delta e \omega v = 4 r bol$).

El cilindro eje es un prolongamiento de pequeño diámetro y de superficie lisa y regular, mientras que las dendritas tienen erizada su superficie de numerosos asperesas, espinas de Cajal, que han sido muy bien estudiadas por Mlle. Stephanowska y por Manuelien.

El cuerpo celular y sus prolongaciones constituyen una unidad morfológica: la neurona, estando relacionadas entre sí por contigüedad y no por continuidad.

Los prolongamientos estan constituidos por una red fibrilar constituida por neurofibrillas, que parten de la red endo-celular, y cu-

yas mallas están ocupadas por una substancia interfibrilas o exeplasma de Waldeyer. Los prolongamientos cubiertos de mielina y envueltos por la vaina de Schwann se reunen en grupos para constituir los haces neviosos envueltos con la vaina de Henle y que reunidos entre es por tejido con juntivo y vascular, constituyen los cordones nerviosos o simplemente nervios.

Tanto el cilindro eje como la fibra de Remark son elementos de conducción. Para el cilindro eje todos los autores han estado de acuerdo, no así para las dendritas a quienes Golgi les atribuia únicamente el papel de nutridores de la celdilla, tomando los materiales nutritivos de de los vasos con los que, según él, estaban en íntima relación; pero está desechado esto desde los trabajos de Cajal y de van Gehuchten, quienes demostraros el papel conductor de estos elementos.

Pero si las fibras de Deiters y de Remark son ambas conductoras no se efectua la conducción en el mismo sentido. La conducción es
centrípeta para las dendritas y centrífuga para los axomes. Esta ley de
conducción, desarrollada por Cajal, se conoce con el nombre de ley de
la polarización dinámica.

POLARIZACION DINAMICA. Para estudiar de una manera general el mecanismo de la función conductora, nos valdremos de un esquema, que represente un sistema de conducción completo. De un punto de la superficie cutanea parte una exitación por un conductor centrípeto hasta una celdilla colocada en un ganglio espinal, F_{ij} , F_{ij} , F

Este esquema es el del movimiento refleto que nos va a servis para estudiar la conducción centrípeta esensible y la centrífuga o motora y para estudiar la fisiología de la conección o articulación de las neuronas estre sí.

La ley fundamental de la fisiología de la conducción, es la que marca la dirección que sigue el influjo nervioso en sentido centrífugo p para unas fibras y centrípeto para otras y que James llamó de la dirección hacia adelante. Pero si esto se verifica en el funcionamiento nor-

mal, por la experimentación se ha demostrado que los nervios pueden trasmitir el influjo en los dos sentidos, El experimento de Wertheimer y Dubois, intentado con anterioridad por Rosenthal y Bidder, citado más antes , parece demostrarlo, aún cuando en ese caso hay que tener presente la influencia de la cuerda del timpano, que desprendida del fanewir lingual Armold; pero otros experimentos cial wa a terminar en el gang no dejan lugarna duda. Bocci y Du Bois Reymond primero y últimamente Gotch y Horsley, lo han demostrado plenamente colocando en la raiz anterior de un nervio del plexus ciático un galvanómetro, seccionando la raiz y exitándola eléctricamente en un punto anterior al de la colocación del galvanómetro, entonces observaron que el músculo correspondiente se contrafa (conducción centrífuga) y que el galvanômetro indicaba el paso de una corriente (conducción centrípeta). En el músculo delgado de la rana, por ejemplo, (experimento de Kuhne) se separa una porción del músculo de manera que tenga una rama nerviosa, si se exita ésta la contracción muscular se produce en todas las fibras del músculo, lo que demuestra que la exitación que partió en sentido centrípeto, al encontrar las anastomosis con otras fibras volvió por ellas en sentido centrífugo para provocar la contracción del resto del músculo.

El curare, que paraliza la acción de un nervio motor no impide la conducción nerviosa sino que dbra solomente sobre la placa motriz.

Como la doble conducción se verifica de igual modo en las fibras sensitivas y en las motoras, se puede afirmar que no difieren en su constitución íntima. (Luciani - Fisiología. pag.239)

Este fenómeno de la conducción inversa del influjo nervioso ha servido a Muller para explicar el fenómeno de la persistencia de las sensaciones en los miembros amputados y el paradógico síntoma de la anestesia dolorosa.

CAUSAS QUE IMPIDEN LA CONDUCCION. - Para que la conducción tenga lugar es preciso la integridad anátómica del cordón nervicso, la cual se altera no sólamente por la sección sino también por la compresión. En 1797, Fontana se dió cuenta de esto, pero a Ducceschi le corresponde el haber establecido las leyes que presiden el fenómeno. (Archives de Physiologie. 1900) La compresión de un nervio produce primero una rápida face de exitación para disminuir en seguida el

poder donductor, disminución que principia para las exitaciones químicas, siguiendo las medurares, las mecánicas y por último las eléctricas.

Cuando el influjo nervioso es constante, se vuelve inter-mitente por la compresión, pasando el músculo inervado de la contracción
tónica a la clónica. La conducción dejad de efectuarse cuando la mielina ha sido rechazada por la compresión.

ción aistada de las fibras nerviosas no produce sino una acción limitada a la región en donde esos haces se distribuyen. En un nervio mixto se pueden exitar separadamente las fibras motoras o las fibras sensitivas. Esto demuestra que el influjo no pasa de unas fibras a las contiguas, sino que están aisladas entre sí, sin que la mielina sea la substacia aislante, como en un tiempo se pensó, puesto que el aislamiento persiste después de haber expulsado la mielina por la pompresión del nervio y además, en ciertas partes del eje cerebro espinal las fibras pierden su mielina.

VELOCIDAD DE LA CONDUCCION. - A Helmholtz se le debe el conocimiento de la velocidad don que el influjo hervioso recorre su conductor. Exitando al mismo tiempo a un nervio en dos puntos, uno cercano a un músculo y el otro lo más lejano posible, se obtienen dos sacudidas musculares: la primera se debe al estímulo más cercano, y la segunda al más lejano; la diferencia de tiempo entre las dos sacudidas indica el tiempo que tarda el influjo nervioso en recorrer la distancia que separa los dos puntos de exitación. Esta velocidad es de 27 metros 25 centímetros para Helmholtz y de 30 metros para Marey. Este valor sólo es una media, pues la velocidad varía entre límites amplios se - gún el exitante empleado, el nervio y la parte en que se aplique, se-gún la temperatura, etc.

Al hablar de la celdilla dije que su funcionamiento era intermitente y cíclico, lo que indica que el funcionamiento se efectúa
por alternativas del estado de reposo con el de actividad, a pesar de
lo cual rápidamente sobreviene la fatiga. El nervio puede funcionar
mucho tiempo de una manera continua sin demostrar fatiga, lo que está
de acuerdo con su papel de simple conductor y con la lentitud de las fenómenos de metabolismo. (Brodie and Halliburton- Journal of Physiology-

1902- pag 181 y siguientes). Sin embargo, como lo hace observar

Hewell (loc. cit), en todas las experimentaciones se efectúan las

exitaciones por inducción dejando cierto téempo que puede ser suficien
per para el descanso, pero si las exitaciones distan menos de 0.006 de

segundo, la exitación siguiente queda sin efecto.

NATURALEZA DEL INFLUJO NERVIOSO. B Hasta ahora no se sabe nada definitivo y mientras unos ven en el influjo nervioso un fenómeno de conducción eléctrica que tiene su origen en la celdilla, otros, como Beth en su Anatomía general y fisiologia del sistema nervioso (Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems -1903) suponen que en la fibra nerviosa se efectuan reacciones químicas que dejan en libertad "iones" que se propagan de trecho en trecho.

poso posee cierta energía potencial que ha sido puesta de manifiesto por Du Bois Reymond. Si uno de los extremos deun galvanómetro muy sensible, como el de mercurio de Lippman, se coloca en la superficie de un trozo de nervio separado por dos secciones, y el otro extremo en el centro de una de las superficies de sección, se determina una corriente eléctrica que puede alcanzar hasta 0.03 de volt. Esta corriente está determinada por las siguientes leyes:

1a_. Dos puntos de la superficie de un nervio mixto, equidistantes de los extremos, son isoeléctricas.

2a. En dos puntos a desigual distancia de los extremos, se produce una caida de potencial en la que el polo positivo corresponde al punto más lejano.

ga... Uniendo la superficie exterior de un nervio con la superficie de sección se produce una caida de potencial. El poleo negativo
corresponde a la superficie de sección. En un nervio mixto el máximo de
caida corresponde a un punto situado a la mitad de la longitud del nervio. En un nervio sensitivo ese punto está colocado más cerca del extremo
periférico, y en uno motor más cerca del extremo central.

42. La unión de los extremos de un nervio sensitivo o de un nervio motor da lugar a uno caida de potencial en la que el polo positivo corresponde al extremo central en el primer caso y al periférico en el segundo.

La exitación mecánica, física o química de un nervio, altera la corriente de reposo. Este fenómeno se conoce con el mombre de variación

negativa.

La variación de la exitabilidad de los nervios depende del nervio estudiado y del exitante empleado. Cuando éste es la electricidad farádica o galvánica aplicada en los nervies motores produce distintos resultados según que sea el polo positivo o el polo negativo el exitador y según que se abra o que se cierre el circuito. La alteración de lo que pasa normalmente tiene en patología la importancia que todos conocemos (reacción de degeneración).

PI El cuerpo celular y sus prolongamientos periféricos, de cuyo funcionamiento me he ocupado, constituyen la neurona que es una unidad anatómica, pero que para su funcionamiento necesita ponerse en relación con otras neuronas. Esta relación de contacto o articulación se efectúa en la substancia gris del eje cerebro espinal, así por ejemplo, las prolongaciones chlindroaxiles de los ganglios espinales se articulan en la médula con las propongaciones protoplasmáticas de las celdillas de los cuernos anteriores de la médula, constituyendo así el arco del movimiento reflejo; igualmente las ramificaciones del axon de las celdillas piramidales de la corteza cerebral Fig 5. se articulan con las prolongaciones protoplasmáticas de las mismas celdillas de la médula, cuyos axones van a terminar en la placa motriz de una fibra muscular, Fix 8 trazando así el arco del movimiento voluntario. Esta contiguedad sin continuidad constituye el principio de la teoria de la neurona formulada por Cajal.

El funcionamiento, entre ciertos límites, de un órgano, conduce a su desarrollo según lo expresa la tercera ley de Lamark; esta
ley aplicada al sistema nervioso tendría por consecuencia, según Tanzi,
el desarrollo de las arbatizaciones terminales de las neuronas próximas
y por consecuencia una articulación más completa y extensa de donde resulta mayor facilidad para efectuar determinado arte que hecho al principio con dificultad con el ejercicio se vuelve fácil o automático.

Mlle. Stephanowska, Demoor, Querton y Manuelien, produciendo el sueño en los animales por medio de anestésicos o de la fatiga, han demostrado que las espinas de las celdillas cerebrales toman una forma más o menos esférica que aumentando el espesor disminuye su longitud, lo que Trae por consecuencia las desarticulación más o menos completa de

las arborizaciones. Manuelien dice haberlas visto completamente desarticuladas en el bulbo olfativo de un ratón agotado por la fatiga. Este fenómeno se conoce con el nombre de amiboismo de las celdillas nerviosas.

Para matías Duval, el sueño fisiológico "gería la consecuencia de la retracción de los prolongamientos de las neuronas cerebrales", el sueño terminaría cuando recobracen los prolongamientos sus dimensiones normales a consecuencia de una exitación más o menos violenta o por haber recuperado por el reposo los ementos perdidos durante la vigilia y el trabajo.

Todos los fenómenos fisiológicos se explican claramente, como se ve, con la teoria de la neurona; pero últimamente ha sido vivamente atacada por Apathy, Beth, Auerbach, Held y Nissl, cuyas teorias, muy interesantes por cierto, no puedo desarrollar porque pasaría del campo de la fisiología, que me ha asignado la suerte, al amplisimo campo de la histología; sólamente difé las conclusiones que sacan y que afectan a la fisiología:

1-. La fibra nerviosa no procede de una sola celdilla sino de una cadena de celdillas intercaladas en su trayecto.

- 2-. La fibra nerviosa es el ehemento primordial del sistema.
- 3-. Las fibrillas no se articulas sino que se anastamosas, ora dentro, ora fuera de los elementos celulares (red elemental difusa)
- 4-. El arco sensitivo motor es único, teniendo en los animales inferiores una celdilla incluida y en los superiores dos o mas.

5.- La celdilla nerviosa no es indispensable para el acto fisiológico nervioso.

Miguir dici suche de 7918

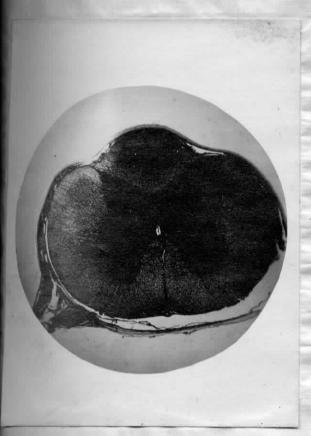


Fig. 1 Médula de gato

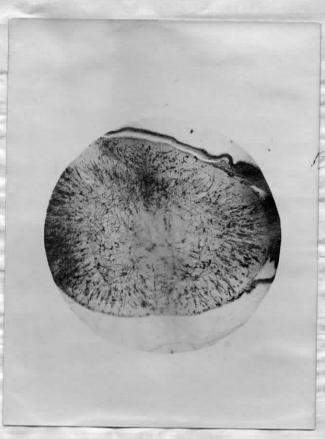


Fig.2 Médula- Impregnación celular.

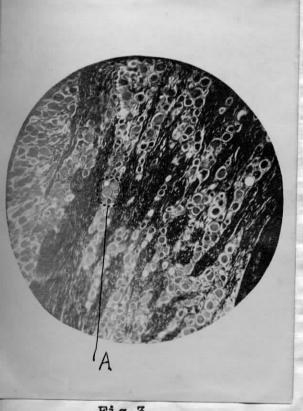


Fig.3 Ganglio espinal

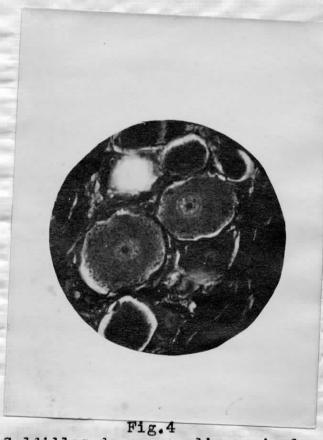


Fig.4 Celdillas de un ganglio espinal Amplificación de (A) fig. 3