

ANAIRES DE ANATOMIA



BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
H. MERTECA
- ZARAGOZA -

ANALES DE ANATOMIA

Fundador:
J. ESCOLAR

Director:
R. SARRAT

Secretario de Redacción:
J.L. NIETO AMADA

Consejo de Redacción:

E. Agüera (Córdoba)
P. Amat (Salamanca)
J. Astruc (Richmond, U.S.A.)
G. Bernal (Córdoba)
A. Carrato (Madrid)
F. Doñate (Bilbao)
E. Ferres Torres (Valencia)
R. Ferres Torres (La Laguna)
L.M. Gonzalo Sanz (Pamplona)
M. Guirao (Granada)
J. Jiménez Castellanos (Sevilla)
R. Krstic (Lausana)
M. Lafarga (Santander)
J.L. Lancho (Córdoba)
I. Lawzewitsch (Argentina)
A. Llamas (Madrid)
F. Marín Girón (Málaga)
L. Martínez Millán (Bilbao)
E. Martínez Moreno (Madrid)
P. Mestres (Homburg, R.F.A.)

A. Mitro (Checoslovaquia)
M. Montesinos (Valencia)
L. Muñoz Barragán (Salamanca)
N. Múrrillo (Zaragoza)
G. Palomero (Oviedo)
Chr. Pilgrim (R.F.A.)
F. Reinoso (Madrid)
J.M. Rivera Pomar (Bilbao)
S. Rodríguez García (Soria)
D. Ruano (Barcelona)
F. Sánchez del Campo (Alicante)
J. Sandoval (León)
J. Sanz Esponera (Madrid)
J.M. Smith-Agredda (Málaga)
V. Smith-Agredda (Valencia)
J. Soler Viñolo (Granada)
R. Vázquez (Salamanca)
J.L. Velayos (Madrid)
A. Vera (Zaragoza)

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

Composición y maquetación de textos: Secretariado de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

Edita y Distribuye: Secretariado de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

Con la colaboración financiera de:

Universidad de Barcelona (Central)

Universidad de Córdoba

Universidad de Oviedo

Universidad de Salamanca

Universidad de Zaragoza

Printed in Spain

ANALES DE ANATOMÍA

Volumen XXXVIII

Diciembre 1992

Núm. 98

14 ENE. 1993



ANALES DE ANATOMÍA

© Universidad de Zaragoza

ISSN: 0569-9894

Depósito legal: Z-2429-89

Composición y maquetación de textos: Servicio de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

Edita y Distribuye: Servicio de Publicaciones. Universidad de Zaragoza

LA VASCULARIZACIÓN ARTERIAL DEL ESÓFAGO MURINO ES SATÉLITE DE LA DISTRIBUCIÓN DEL NERVIU NEUMOGÁSTRICO. ESTUDIO CON MOLDES VASCULARES DE RESINA*

THE MURINE ESOPHAGUS ARTERIAL CIRCULATION. MOULDS OF UNSATURATED POLYESTER RESIN

**J. ARENA, F. BENAVENT, M. MONTESINOS, J.R. BALLESTEROS, A. VICTORIA,
V. SMITH-FERRES, F. GÓMEZ-FERRER y V. SMITH**

Departamento de Ciencias Morfológicas
Servicio de Cirugía Visceral del Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Valencia

RESUMEN

Se han construido moldes de resina de poliéster no saturadas correspondientes a la circulación arterial esofágica de 91 ratas de la cepa Wistar. Se ha practicado simultáneamente la microdissección de los troncos vagales desde la celda carotidea hasta el abdomen. A diferencia de lo mencionado hasta la fecha, la circulación arterial del esófago murino no es metamérica, sino longitudinal y anastomótica entre los territorios de las arterias carótidas externas y de la aorta abdominal. Cada una de las arterias extrínsecas esofágicas va acompañada de un tronco primario derivado del nervio neumogástrico. Estos hallazgos pueden facilitar el uso del esófago murino como modelo experimental para la cirugía de reconstrucción y reemplazamiento de los órganos huecos del tubo digestivo.

PALABRAS CLAVE: Arterias esofágicas murinas. Nervio vago murino. Moldes vasculares de resina. Técnica de transparencia tisular.

SUMMARY

It has been built moulds of unsaturated polyester resin corresponding to the esophageal arterial circulation of ninety-one mice of the wistar kind. It has been done simultaneously the microdissection of vagal trunks from the carotid sinus to the abdomen. In contrast to what has been mentioned until now, the murine esophagus arterial circulation is not metameric, but longitudinal and anastomotic between the spaces of the external carotid arteries and the abdominal aorta. Each of the esophageal extrinsic arteries go worth a primary trunk, derivated from the pneumogastric nerve. These findings can facilitate the use of the murine esophagus, as an experimental model to the reconstitution and restore surgery of the hollow organs of the digestive tube.

KEY WORDS: Murine esophageal arteries. Murine vagus nerve. Vascular moulds of resin. Transparency tissue technique.

* El presente trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (ref. SM88-0008).

Introducción

La irrigación arterial extrínseca del esófago murino posee múltiples orígenes (1-5). Deriva fundamentalmente de las arterias tiroideas superiores (ramas de las carótidas externas), tiroideas inferiores y bronquiales (ramas de las subclavias), coronaria estomáquica y arteria hepática izquierda (ramas de la aorta abdominal). Un patrón similar ha sido descrito para el esófago humano (6-9). Esta distribución de las arterias esofágicas aparentemente dispersa no sigue el patrón del resto del intestino, según el cual las arterias recorren longitudinalmente los diversos segmentos del mismo, penetrando por un mesenterio dorsal, ventral o único junto con las venas de drenaje y la inervación vagal. Sería por tanto de interés conocer si este patrón embriológico bien conocido para el resto del intestino puede aplicarse asimismo al esófago, como derivado intermedio del intestino cefálico. La inyección intravascular de resina y el estudio de los moldes vasculares con microscopía óptica y electrónica de barrido ha permitido definir el patrón microvascular en órganos de vascularización abundante como son el estómago y el riñón murinos (10-13). El objetivo del presente trabajo consiste en la creación de un mapa de la vascularización extrínseca e intrínseca de los esófagos torácico y abdominal murinos utilizando la técnica de creación de moldes vasculares de resina. Se intenta asimismo, que a partir de este estudio se pueda obtener tanto un modelo de vascularización arterial esofágica como una metodología capaz de ser aplicada al estudio ulterior de la vascularización intrínseca del esófago humano.

Animales, materiales y métodos

A. Animales. Se han sacrificado 91 ratas de la cepa Wistar de ambos sexos (26 machos y 65 hembras). Los pesos oscilan entre 100 y 550 g.

B. Materiales. Resina de poliéster para inyección de piezas pequeñas: crystic resin 191 E PA (Trylon CL201 PA, Northants, Wollanston, U.K).

Resina de poliéster para inyección de piezas grandes: crystic resin 406 PA (Trylon CL701 PA).

Monómero C (Trylon Thinner).

Catalizador líquido (Trylon Liquid Catalyst MEKP hardener).

Acelerador E (Trylon Activator).

Pastas de colores rojo y azul (Opaque Colour Paste Post Office Red and Mid Blue).

C. Métodos. *Anestesia.* Inducción: éter vitulia anestésico (ERN S.A., España-E-). Mantenimiento: 0.1 ml/100 g peso vía IM de una mezcla de Ketamina (0.2 ml) [Parke Davis, E], Diazepam (0.2 ml) [Prodes, E] y Atropina (0.04 ml). *Preparación del lecho vascular.* Clorhidrato de papaverina (Lafsa, E) 4.2 mg/100 g peso, por vía intraperitoneal. A los cinco minutos comienza la disección de la aorta infrarrenal y su ligadura distal. Se ligan (excluyen) asimismo la arteria mesentérica, hilio hepático y la cuarta porción duodenal, para evitar el secuestro de la resina en los territorios hepático y esplácnico. Tras ello, se canaliza la aorta con una bránula 16 G (Surflo, Japan) y se practica la venotomía de la cava infrarrenal. Heparinización intraarterial: 1 UI/g de peso de heparina sódica (Rovi, E). Lavado del lecho vascular perfundiendo 500 ml de suero fisiológico con 5.000 UI de heparina sódica y 2/3 DL 50 de papaverina, a 37° C y presión de 90-100 mm de Hg. En las inyecciones combinadas de resinas roja y azul se canula asimismo la aurícula derecha para proceder al relleno del territorio venoso con resina azul. *Inyección de resina:* por cada animal se prepara una mezcla de 40 g de resina de poliéster (Trylon 201), catalizador (4.8 ml), colorante rojo y azul (2 ml), activador (4.8 ml) y monómero C (16 ml). A los 8-16 minutos (dependiendo de la temperatura ambiente) de haberse realizado la mezcla se realiza la inyección a presión sistólica. *Polimerización:* se realiza en suero fisiológico a temperatura ambiente durante siete días. *Corrosión:* sucesiva con NaOH al 40% durante 120 minutos a 60° C y CIH al 38% durante 60 minutos a 25°C. *Transparencia en especímenes murinos:* fijación con alcohol al 95% durante 2 h. Introducción en acetona pura durante 3 h con el fin de disolver la grasa.

Maceración en solución de KOH al 1% durante 2-3 h. Aclaramiento en la solución de Dawson (1 g de KOH en 100 ml de agua destilada más 100 cc de glicerina pura) durante 15 h. Concentraciones crecientes (50, 75 y 100%) de glicerina pura hasta conseguir el aclaramiento total. *Evaluación:* se realiza con microscopia de disección y luz directa mediante disección sin corrosión y/o transparencia (para la observación de las ramas terminales) y disección con corrosión (para la observación de las arterias principales). *Microdisección y microfotografía.* Se realiza con un microscopio de disección (Nikon 44612, Japan) con fuente adicional luminosa (Nikon 17685, Japan). La microfotografía se practica con una cámara Nikon (FE 3610270), objetivo 55mm (micro-Nikkor), anillos de extensión (pk 13 Nikon y juego Kenko de 12, 20 y 36 mm, junto con dos lentes de aproximación Kenko (nº 3, Japan). Película Kodak (Ektachrome 160 asa, Germany).

Resultados

El nervio vago es satélite de la carótida primitiva en las celdas carotideas derecha e izquierda (fig. 1). Desciende y a nivel de la subclavia en el lado derecho y del cayado aórtico en el lado izquierdo se hace satélite de la arteria bronquial homolateral (figs. 2 y 3). Cuando dicha arteria emite la rama tiroidea inferior, el vago emite al mismo nivel los nervios recurrentes laríngeos inferiores derecho e izquierdo (figs. 2-3). El citado nervio sigue a partir de este origen un trayecto paralelo al de la arteria y vena tiroideas inferiores hasta perderse en la laringe (fig. 4).

Una vez la arteria bronquial llega al hilio pulmonar, cuando la misma se divide en rama bronquial propia y rama esofágica descendente, el neumogástrico realiza la misma división (fig. 5). La rama esofágica descendente sigue a la arteria esofágica descendente homolateral rotando al mismo tiempo (fig. 6). De esta manera la arteria descendente esofágica y el vago derechos se hacen posteriores, mientras que el vago y la arteria esofágica descendente izquierdas se hacen anteriores.

Toda la distribución arterial del esófago abdominal es satélite de las ramas terminales de los nervios neumogástricos. La anastomosis de la arteria hepática izquierda con la arteria esofágica descendente izquierda o anterior es satélite de la emisión de la rama hepática del vago izquierdo (fig. 7). La anastomosis de la arteria esofágica descendente izquierda o anterior con la arteria cardiotuberositaria anterior es satélite de la emisión de la rama gástrica del vago anterior (fig. 8). La arteria esofágica descendente posterior es satélite del nervio vago posterior o derecho que emite dos ramas, la rama celiaca satélite de la coronaria estomáquica (fig. 9), y la rama gástrica posterior satélite de la anastomosis de la arteria esofágica con la arteria cardiotuberositaria posterior (fig. 10).

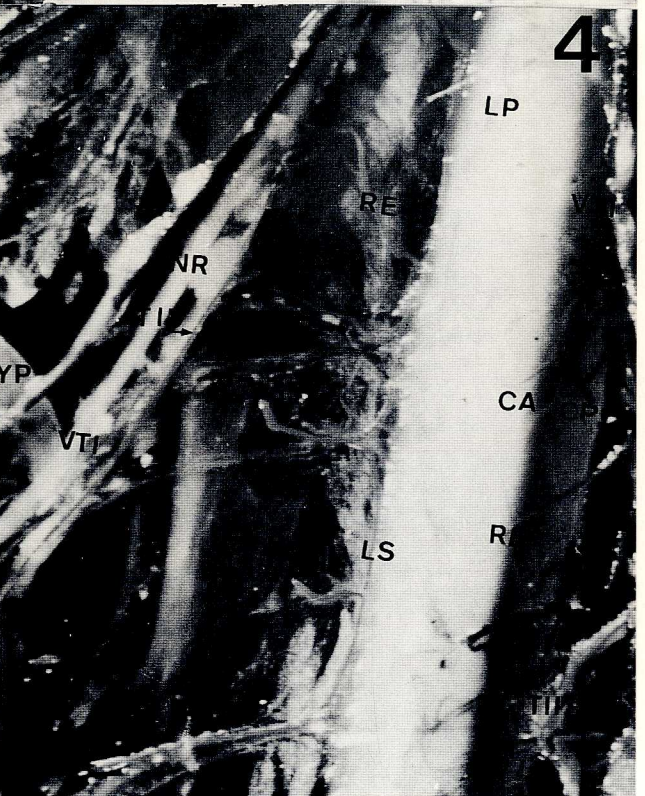
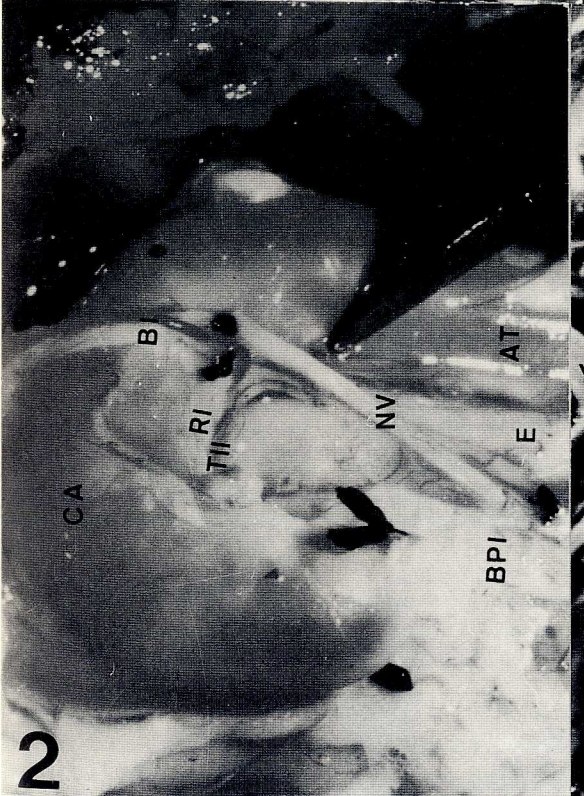
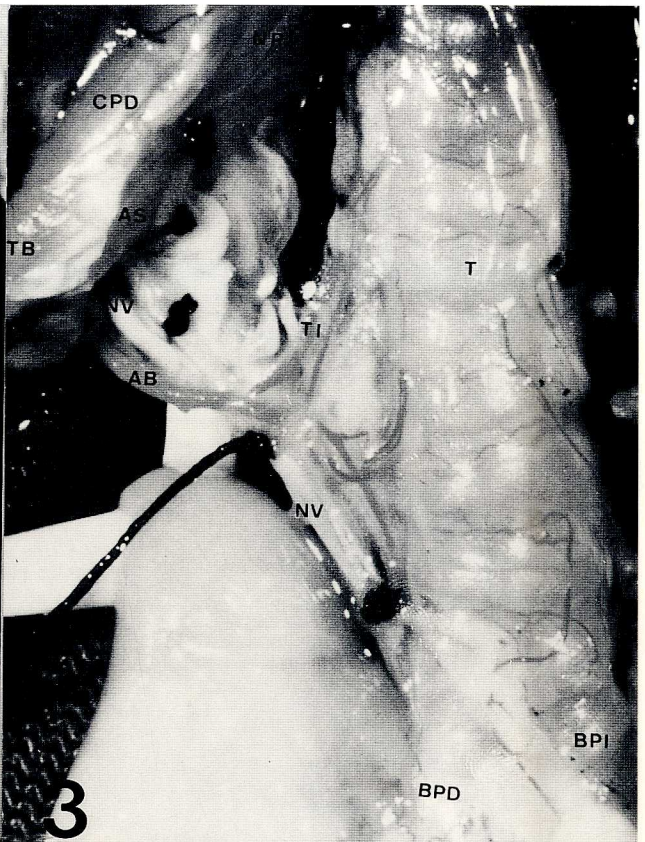
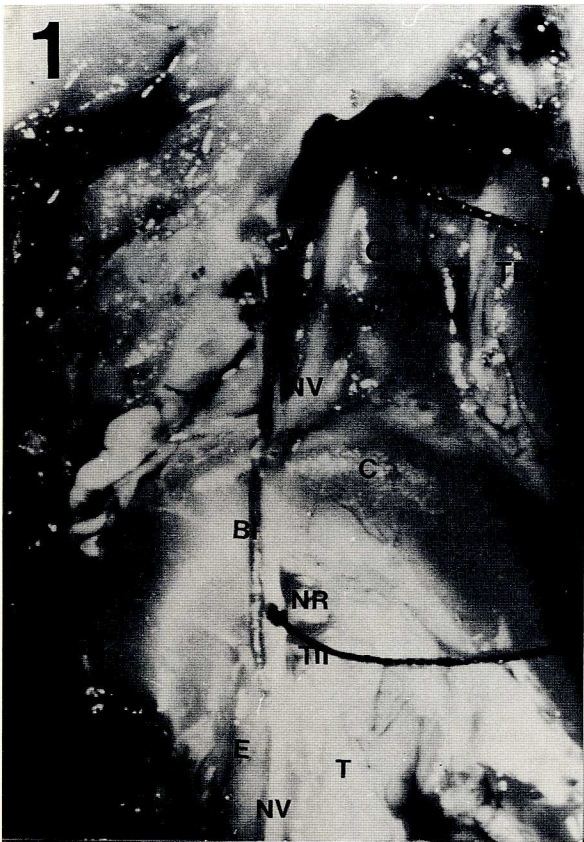
Discusión

Diversos trabajos (1-5) han mostrado evidencia factual de que la vascularización arterial del esófago murino a nivel extrínseco posee diversos orígenes que abarcan desde el territorio de la carótida externa (vía tiroidea superior) e interna (vía tiroidea inferior) hasta el territorio de la aorta abdominal (vía coronaria estomáquica y hepática izquierda) pasando por la aorta torácica (vía arterias bronquiales).

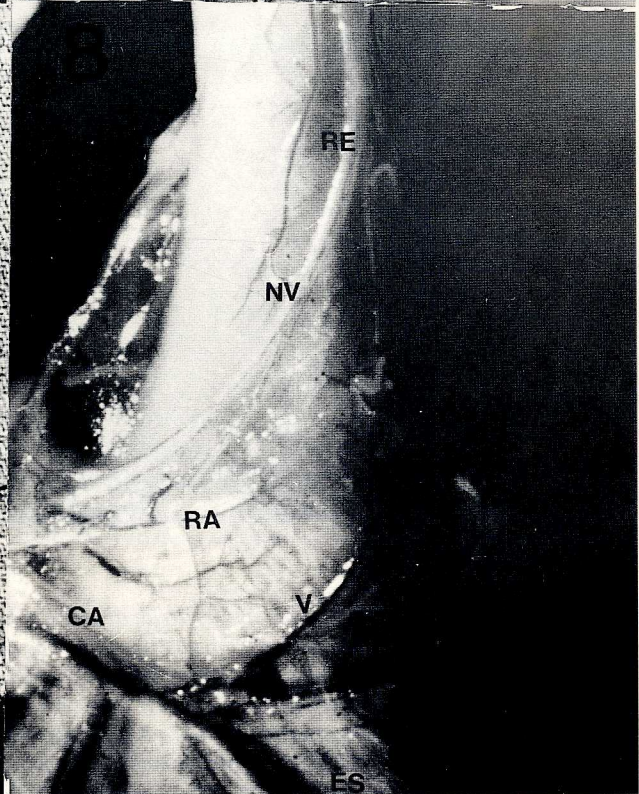
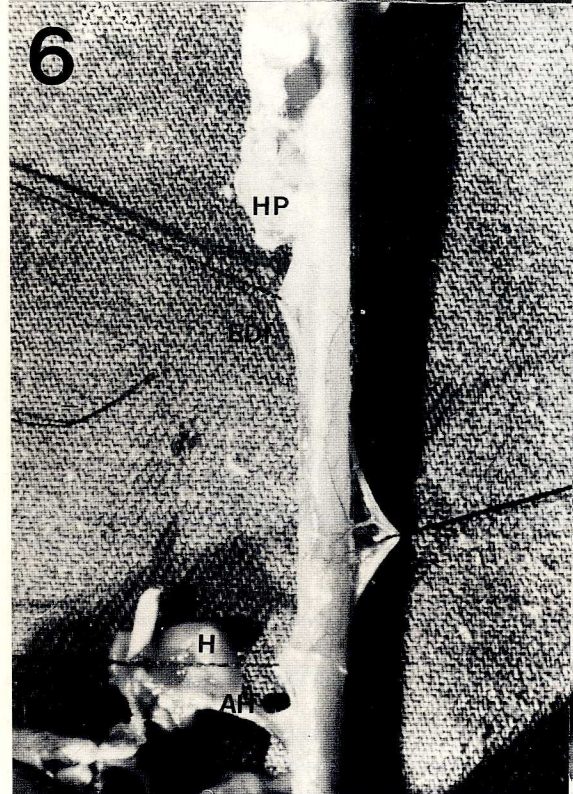
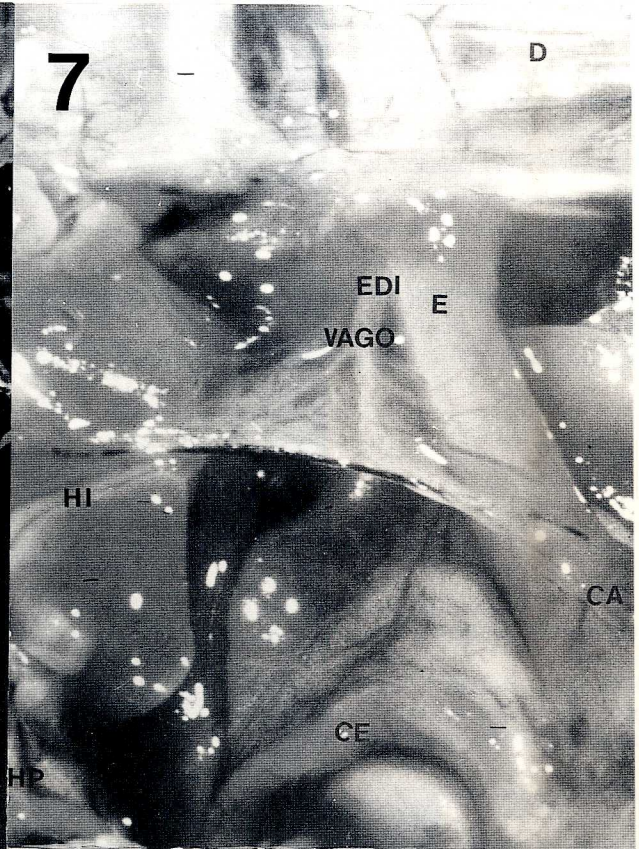
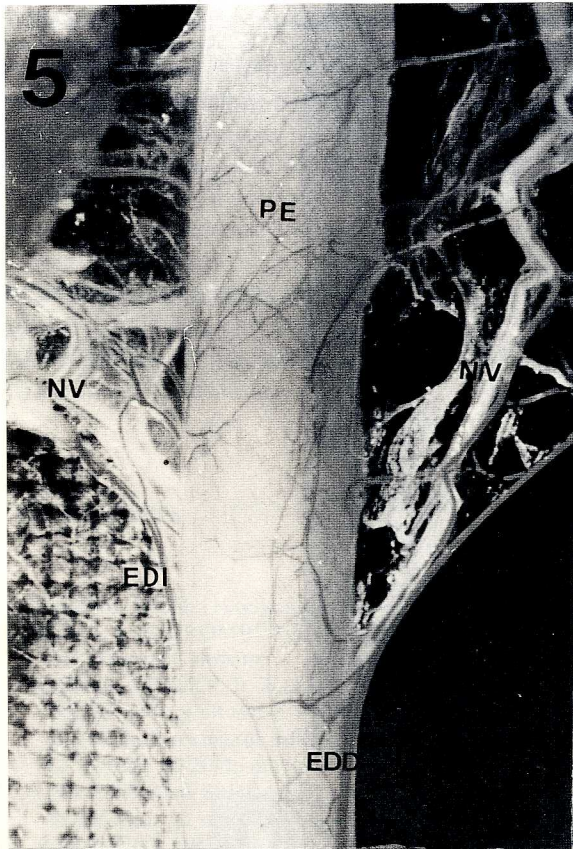
A lo largo del presente estudio, se ha podido ver que a nivel intrínseco (pared esofágica) estas arterias adquieren una disposición longitudinal que interesa toda la longitud del esófago, desde la tiroidea superior (vía rama traqueoesofágica) hasta las arterias coronaria estomáquica y hepática izquierda (vía arteria esofágica descendente). De esta manera, establecen un círculo anastomótico arterial entre los territorios de las carótidas externas y la aorta abdominal.

Las citadas arterias longitudinales van acompañadas a lo largo de su curso por las ramas primarias de distribución del nervio neumogástrico, tanto a nivel de los esófagos cervical y torácico como abdominal. No

- FIGURA 1.** *Vascularización arterial extrínseca del esófago torácico. Arteria bronquial izquierda y nervio vago.*
Se observa el origen a partir de la arteria mamaria interna (MI) de la arteria bronquial izquierda (BI). Se aprecia el nervio vago (NV) discurrendo junto a la carótida primitiva (CP) y pasando por delante del cayado aórtico (C) acompañando a la arteria bronquial. Emite el nervio recurrente laríngeo (NR) al mismo nivel en que nace la arteria tiroidea inferior izquierda ((TII). Finalmente el neumogástrico y la arteria bronquial descienden por la cara posterior del bronquio principal izquierdo. TB: tronco braquiocefálico. E: esófago. T: traquea.
- FIGURA 2.** *Vascularización arterial extrínseca del esófago cervical. Origen de la arteria tiroidea inferior izquierda y del nervio recurrente laríngeo izquierdo.*
Se observa como la arteria bronquial izquierda (BI) se dirige a la cara posterior del bronquio principal izquierdo (BPI) y cuando pasa por debajo del cayado aórtico (CA) emite la arteria tiroidea inferior izquierda (TII). El nervio vago (NV) que acompaña a la arteria bronquial emite el nervio recurrente laríngeo del lado izquierdo (RI) a ese mismo nivel. E: esófago. AT: aorta torácica.
- FIGURA 3.** *Vascularización arterial extrínseca del esófago cervical. Detalle del origen de la arteria tiroidea inferior derecha a partir de la arteria bronquial. Emisión del nervio recurrente laríngeo derecho a partir del nervio neumogástrico.*
En el lado derecho el nervio recurrente laríngeo (NR) nace a partir del nervio vago (NV) inmediatamente después de que éste pase por detrás de la arteria subclavia (AS) y se dirija a la cara anterior derecha del esófago. La arteria bronquial (AB) emite la arteria tiroidea inferior (TI) inmediatamente por delante del cruce con el nervio vago, la cual asciende y discurre satélite del nervio recurrente laríngeo y su vena acompañante (VTI: vena tiroidea inferior). La arteria bronquial desciende con el nervio vago hacia la cara posterior del bronquio principal derecho (BPD). T: traquea. BPI: bronquio principal izquierdo. TB: tronco braquiocefálico, CP: carótida primitiva derecha. YS: vena yugular superficial, TII :tiroidea inferior izquierda.
- FIGURA 4.** *Vascularización arterial extrínseca e intrínseca del esófago cervical. Arteria tiroidea inferior acompañada del nervio recurrente laríngeo y vena satélite. Ramas esofágicas de la arteria tiroidea inferior.*
Observamos la arteria (TID) y vena (VTI) tiroideas inferiores, con el nervio recurrente laríngeo (NR) del lado derecho. Asimismo observamos las arterias longitudinales superficial (LS) y profunda (LP). A esta última convergen tanto ramas de la longitudinal superficial como ramas directas de la arteria tiroidea inferior izquierda. Las ramas esofágicas directas cuando llegan a la pared se dividen en un componente anterior (CA) y otro posterior (CP). Esófago. RE: ramas esofágicas. TII: arteria tiroidea inferior izquierda. YP: vena yugular profunda.



- FIGURA 5.** *Vascularización arterial intrínseca del esófago torácico. Arterias bronquiales y esofágicas descendentes.*
Nacimiento de ambas arterias esofágicas descendentes a partir de las arterias bronquiales homolaterales. La arteria esofágica descendente izquierda (EDI) se va haciendo anterior. La derecha (EDD) se hace posterior. Como el nervio vago (NV) acompaña a las arterias bronquiales y luego continua su trayecto descendente junto con las arterias esofágicas descendentes homolaterales. Observamos también las ramas esofágicas (RE) segmentarias de las arterias bronquiales y el plexo esofágico intramural (PE) con anastomosis longitudinales y transversales.
- FIGURA 6.** *Rotación torácica de las arterias esofágicas descendentes y los nervios vagos.*
Se observa como a partir del hilio pulmonar (HP) la arteria esofágica descendente izquierda (EDI) y el vago van rotando conforme descienden hasta adquirir una localización anterior a nivel del esófago abdominal en donde se anastomosa con la arteria hepática izquierda (AH). H: hígado.
Se aprecia asimismo como la arteria esofágica descendente derecha esta tapada en su origen por el esófago torácico, y conforme desciende aparece en la cara posterior del esófago torácico inferior y abdominal. S: subclavia izquierda. CE: coronaria estomacica. EC: esófago cervical.
- FIGURA 7.** *Arteria hepática izquierda; relación con el nervio vago y la distribución de sus ramas abdominales.*
ES: estómago. HP: arteria hepática principal de la cual nace la arteria hepática izquierda (HI). E: esófago. H: hígado. CE: coronaria estomacica. EDI: esofágica descendente anterior o izquierda. D: diafragma. CA: rama ascendente de la arteria cardiotuberositaria anterior.
- FIGURA 8.** *Arteria cardiotuberositaria anterior y ramo vagal terminal gástrico.*
En esta figura se aprecian las ramas esofágicas (RE) descendentes procedentes de la arteria esofágica descendente izquierda y de la rama hepática. Se acompañan de ramas del nervio vago (NV) para la cara anterior del estómago (ES) y se anastomosan con las ramas ascendentes de la arteria cardiotuberositaria anterior (CA). V: venas de drenaje.



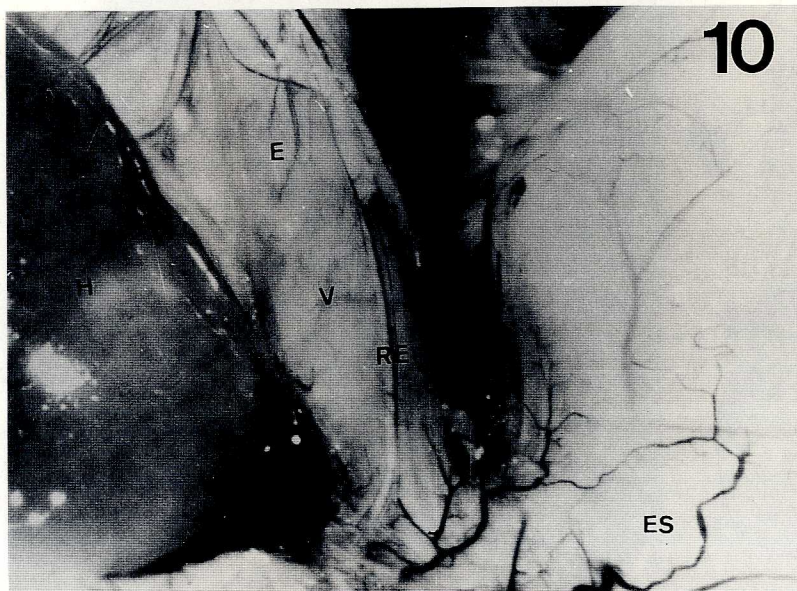
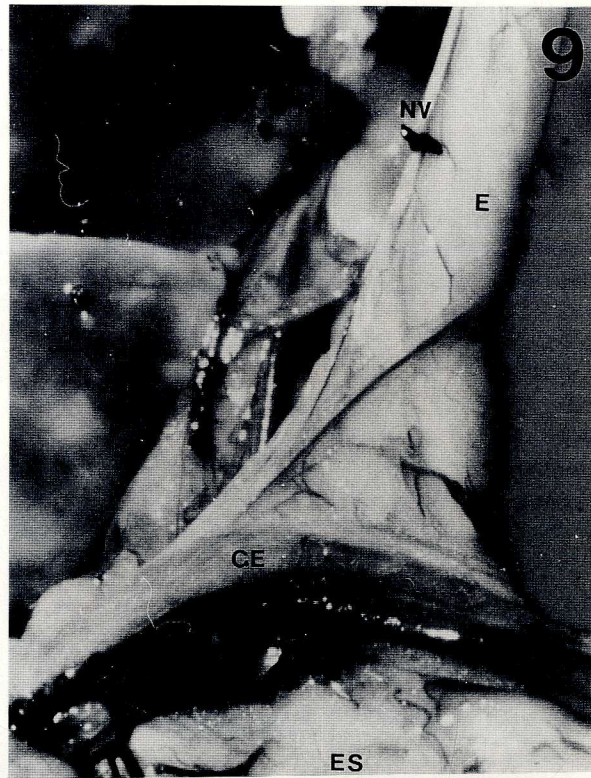


FIGURA 9. *Ramo celiaco del nervio vago posterior o derecho y su arteria y vena satélites (esofágicas descendentes derechas). Se ha practicado una rotación gástrica posterior de 180 grados.*

CE: coronaria estomáquica. ES: estómago. E: esófago. D: duodeno. NV: ramo vagal referenciado con ligadura de seda y acompañado de su arteria y vena satélites. H: hígado.

FIGURA 10. *Vascularización arterial extrínseca del esófago abdominal. Arteria cardiotuberositaria posterior.*

En esta visión de la cara posterior esofago-gástrica, en la que hemos rechazado el hígado (H) hacia la derecha, observamos como la arteria cardiotuberositaria posterior (CP) emite una rama directa para el esófago abdominal que se acompaña de su correspondiente tronco vagal-RE-). ES: estómago. E: esófago. v: venas de drenaje.

existen publicados estudios relacionados con la vascularización intrínseca y su relación con el neumogástrico ni en el esófago murino ni en otras especies. Así pues, el esófago murino no posee una vascularización arterial metamérica, sino longitudinal y además sigue el patrón del resto del intestino, poseyendo la irrigación arterial e inervación vagal a partir de dos territorios («mesenterios») laterales o en su segmento distal, ventrocaudales (debido a la rotación que experimentan a causa del crecimiento diferencial gástrico). Los hallazgos presentados en relación a la disposición anatómica de la vascularización intrínseca e inervación vagal del esófago murino pueden facilitar el uso del esófago murino como modelo experimental de cirugía de reconstrucción y reemplazamiento de los órganos huecos del tubo digestivo. Asimismo el hecho de que la disposición de las arterias extrínsecas de los esófagos murino y humano sea similar (1-9), hace razonable pensar que la descripción de dicha vascularización murina pudiera ser aplicable a la búsqueda de una distribución similar de la vascularización intrínseca del esófago humano, que hasta el momento es desconocida.

BIBLIOGRAFÍA

1. GREENE, E.CH. (1963): *Anatomy of the rat*. New York and London. Hafner Publishing Company.
2. HEBEL, R. y STROMBERG, MW. (1976): *Circulatory systems*. En: *anatomy of the laboratory rat*. Baltimore. The William and Wilkins Company.
3. ARENAS RICART, J.; BALLESTEROS SERRANO, J.R.; BENAVENT ORDIÑANA, F.; ESPÍ MACIAS, A.; SMITH FERRES, V. y GÓMEZ-FERRER BAYO, F. (1988): Estudio de la Vascularización arterial del esófago murino con inyección de resinas de poliéster. V Congreso Nacional I Congreso Hispano-Luso. Asociación Española de Microcirugía. La Coruña 18-20 de mayo.
4. BALLESTEROS SERRANO, J.R. (1988): Estudio de la vascularización esofágica murina mediante inyección de resina de poliéster no saturada. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia.
5. BENAVENT ORDIÑANA, F. (1990): Estudio de la vascularización arterial macroscópica y microscópica del esófago murino con moldes vasculares de resina. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
6. SWIGART, LL.; SIEKERT, RG.; HAMBLEY, WG. y ANSON, BJ. (1950): The esophageal arteries. An anatomic study of 150 specimens. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **90**: 234-243.
7. SHAPIRO, A.L. y ROBILLARD, G.L. (1950): The esophageal arteries. Their configurational anatomy and variations in relation to surgery. *Ann. Surg.*, **131**: 171-185.
8. LIEBERMANN-MEFFERT, D.; LUESCHER, U.; NEFF, U.; RUEDI, TP. y ALLGOWER, M.: Esophagectomy without thoracotomy. Is there a risk of intramediastinal bleeding? *Ann. Surg.*, **206**: 184-192.
9. LIEBERMANN-MEFFERT, D.; NEFF, U.; LUSCHER, U. y ALLGOWER, M. (1988): Blood supply of the esophagus in relation to esophagectomy. En: *Diseases of the esophagus*. Siewert JR y Holscher AH Eds. Springer-Verlag.
10. GANNON, BJ.; BROWNING, J. y O'BRIEN, P. (1982): The microvascular architecture of the glandular mucosa of rat stomach. *J. Anat.*, **135**: 667-683.
11. MURAKAMI, A. (1971): Application of the Scanning Electron Microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch. Histol. Jap.*, **32**: 445-454.
12. TOMPSETT, DH. (1980): *Anatomical Techniques*. 2nd Edition. London and Edinburg. E&S Livingstone.
13. LAMETSCHWANDTNER, A.; LAMETSCHWANDTNER, U. y WEIGER, T. (1984): Scanning electron microscopy II, 663-695.

Correspondencia: Dr. J. Arenas Ricart
c/ Hernán Cortes, 24, 6^a
46004 Valencia. España

ON THE POSSIBLE ROLE OF LIPID DROPLETS IN THE SYNTHESIS AND SECRETION OF MELATONIN BY RAT PINEALOCYTES

SOBRE EL POSIBLE PAPEL DE LAS GOTAS LIPÍDICAS EN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE MELATONINA POR LOS PINEALOCITOS DE RATA

**J.L. BLÁZQUEZ, M.I. MOSQUEIRA, F.E. PASTOR, B. PELÁEZ, E. BLÁZQUEZ
and L. MUÑOZ**

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca

SUMMARY

We investigated the presence of lipid droplets (LD) in the pineal glands of normal adult rats kept since birth on a 12:12 hours light-dark regime, using conventional electron microscopy. We also studied the uptake by the pinealocytes of ^3H -5-hydroxytryptophan injected intravenously (3 mCi/rat) at the end of the light period using autoradiographic methods at ultrastructural level. The distribution of LD in the pinealocytes of the rat was found to be similar to that reported by other authors, although the existence should be noted of very close spatial relationships between the LD and mitochondria, serotonergic granules, synaptic ribbons and other cytoplasmic organelles together with the extrusion of LD into the pericapillary spaces. Fifteen minutes after administration of ^3H -5-hydroxytryptophan the labeling appeared diffusely distributed throughout the cellular cytoplasm, while at two hours it appeared localized preferentially in the serotonergic granules and in the LD. Both the conventional ultrastructural data and the autoradiographic findings suggest an active role of the LD in the mechanisms of synthesis and/or release of monoamines by the pineal gland.

KEY WORDS: Pinealocytes, Pineal gland, Lipid droplets, ^3H -5-hydroxytryptophan, Autoradiography, Ultrastructure, Rat.

RESUMEN

Hemos investigado la presencia de gotas lipídicas en la glándula pineal de ratas adultas normales que fueron mantenidas desde el nacimiento bajo un régimen de iluminación de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, por medio de la microscopía electrónica convencional. También hemos estudiado en otro grupo de ratas la captación de ^3H -5-hidroxi-triptófano por parte de los pinealocitos tras su inyección intravenosa (3 mCi/rata) al final del período de iluminación, utilizando métodos de autorradiografía a nivel ultraestructural. Se observó una distribución de las LD en los pinealocitos similar a la descrita por otros autores, si bien encontramos una relación espacial muy estrecha entre las LD y las mitocondrias, los cuerpos densos serotoninicos, barras sinápticas y otros organitos citoplásmicos, junto con la extrusión de las LD en los espacios pericapilares. A los quince minutos de administrar ^3H -5-hidroxi-triptófano el marcaje se distribuye de manera difusa por todo el citoplasma celular, mientras que a las dos horas de la administración aparece localizado preferentemente en los cuerpos densos serotoninicos y en las LD. Tanto los datos obtenidos de las observaciones ultraestructurales como los hallazgos autorradiográficos sugieren que las gotas lipídicas desempeñan un papel activo en los mecanismos de síntesis y/o liberación de monoaminas por parte de la glándula pineal.

PALABRAS CLAVE: Pinealocito, Glándula pineal, Gotas lipídicas, ^3H -5-hidroxi-triptófano, Autorradiografía, Ultraestructura, Rata.

Introduction

Although the capacity of the mammalian pineal gland to synthesize serotonin and melatonin from their precursor tryptophan has been known for many years (see Alxerod and Weissbach, 1960; Weissbach *et al.*, 1960; Wurtman and Anton-Tay, 1969), the morphological substrate on which the synthesis and release of melatonin is based remains to be elucidated. Some authors have proposed that the rhythmic release of melatonin from the pinealocytes occurs by simple diffusion of the hormone through the cell membrane (see Reiter *et al.*, 1987), whereas others have suggested that lipid droplets (LD) would be involved in the final stages of the synthesis of melatonin or the transport of this hormone to the outside of the cell (González and Blázquez, 1975; Muñoz Barragán *et al.*, 1982, 1986, 1988).

In the present work we carried out an autoradiographic ultrastructural study of the rat pineal gland in order to study the location of tritium labeled 5-hydroxytryptophan (the direct precursor of serotonin) and its metabolite after intravenous administration. We also performed a conventional ultrastructural study of the rat pineal gland, mainly focused on the lipid droplets (LD) present in the pinealocytes.

Materials and Methods

Thirteen adult albino male Sprague-Dawley rats with a body weight of 150-200 g were used. All of them had been subjected to a 12/12 light/darkness cycle since birth in a room with constant temperature (18-20°C) and food and water *ad libitum*. The animals were divided in two groups; one comprised of 8 animals, which did not undergo any kind of experiment prior to sacrifice. They were sacrificed by decapitation, half at midday and the other half at two hours after the beginning of the dark period. The pineal glands were rapidly dissected out, fixed by immersion in 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for two hours and then post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer, dehydrated in an acetone series and embedded in araldite. Ultrathin sections were used for study with conventional electron microscopy. The other group of animals comprised five rats. Under anaesthesia (5 mg sodium thiopental/kg b.w. i.p) each animal received 3 mCi of ³H-5-hydroxytryptophan (Amersham, Bucks, G.B) through the femoral vein at the end of the light period. Two animals were sacrificed by decapitation 15 min after administration and the other three at two hours. The glands were fixed in 2% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for two hours. Later they were post-fixed, dehydrated and embedded in araldite as those of the first group. Ultrathin sections of these glands were processed for ultrastructural autoradiographic study according to the procedure of Bak *et al.* (1970). All sections were studied with a Philips EM-201 electron microscope.

Results

In the conventional ultrastructural study we observed the presence of LD in the cytoplasm of the secretory pinealocytes of the pineal gland of adult rats. These formations were systematically present in these cells both in the animals sacrificed at midday and those sacrificed during the dark period.

As may be seen in figure 1, the LD appear in the form of accumulations located in the cytoplasm, close to the cellular membrane and the pineal canalicular spaces. They were round and were surrounded by free ribosomes, lamellar formations of rough or smooth endoplasmic reticulum. Frequently the LD were located in the immediate vicinity of mitochondria, dense bodies and synaptic ribbons and ribbon fields. The presence was observed of structural complexes formed of one or several LD, serotonergic bodies and mitochondria. LD were also seen to exocytose towards the pericapillary spaces. All the structures were observed in both the pinealocytes of the animals sacrificed at midday and those sacrificed during the dark period, although the above-mentioned structural complexes and extrusion of LD were more frequent in the latter animals.

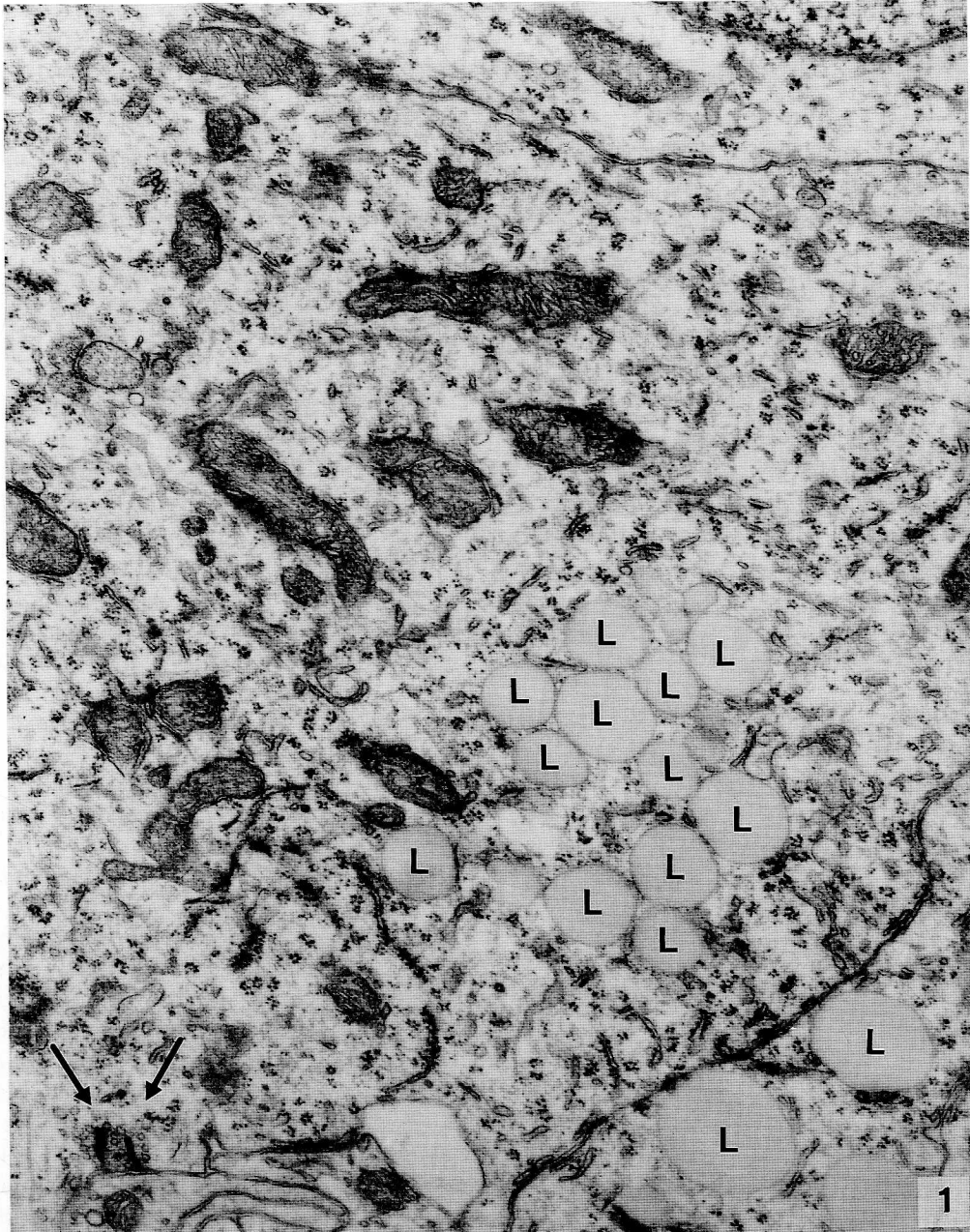


FIGURE 1. Electron micrograph of the pineal gland of a normal adult rat sacrificed at two hours after the onset of the dark period. Note the presence of numerous lipid droplets (L) in the cytoplasm of two neighbouring pinealocytes. Arrows show two synaptic ribbons. (24.000x).

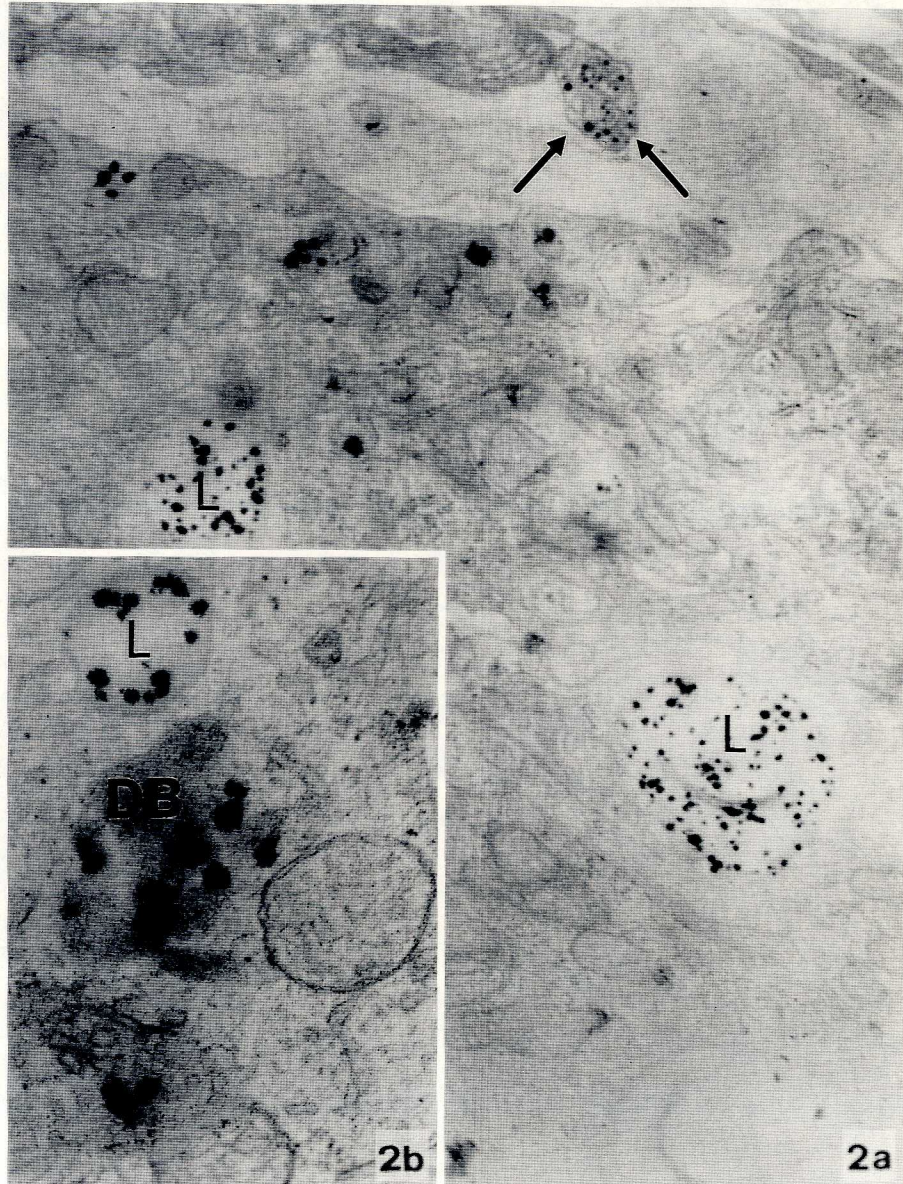


FIGURE 2. Electron microscopic radioautographs of the pineal gland of a rat sacrificed at two hours after the onset of the dark period. **a**) The label is mainly located in lipid droplets (L). Arrows show a sympathetic nerve ending with some dense-cored vesicles. (21,900x). **b**) The label is distributed in lipid droplets (L) and dense bodies (DB). (48,200x).

Study with the transmission electron microscope of the animals administered ^3H -5-hydroxytryptophan showed that this serotonin precursor is taken up by the pinealocytes; our observations can be summarized as follows:

1. At 15 min after administration the label was diffusely distributed throughout the cellular cytoplasm. No regional differences in its location could be established.
2. By contrast, at two hours after sacrifice the label was very selectively distributed in two types of cytoplasmic structure: the LD and the dense bodies (figs 2a and 2b), in such a way that these appeared to be replete of label distributed all over their surface.
- 3.. In the latter animals it was also possible to observe some isolated traces in zones of the Golgi complex of the pinealocytes. We also found traces of label in the erythrocytes present in the pineal capillaries.

Discussion

When Arstila *et al.* (1971) observed «in vitro» that tritium-labeled 5-hydroxytryptophan incorporated in the incubation medium was located in the neighbourhood of LD, some dense bodies and the cisternae of the Golgi complex of pinealocytes after four hours, it appeared that the organelles involved in the synthesis of melatonin by the pineal gland had been discovered and the morphological bases of such synthesis had been definitively established. However, these authors were unable to go beyond the field of hypothesis and their postulates have essentially been overlooked. Accordingly, at present certain morphologists studying the pineal gland are attempting to unravel one of its most tightly guarded secrets; the nature of the morphological substrate that is the seat of melatonin synthesis. For several years our team has been attempting to establish the morphological bases of monoamine synthesis by the pinealocytes; for this we have focused our attention on three main aspects.

The first is related to an essential property of melatonin; the fact that it is liposoluble (see Kappers, 1971). This has led us to repositulate the role of the LD within the functional activity of rat pinealocytes. In this sense, increases in LD have been related to situations of pineal hyperfunction (Miline *et al.*, 1968; Lin *et al.*, 1975; Karasek *et al.*, 1976, 1979; Blázquez and González, 1978; Roux and Richoux, 1981), although, by contrast, the existence has been reported of a circadian rhythm in the lipid content of the pineal gland, with higher values at midday and lower ones at midnight (Quay, 1965, 1974; Blázquez, 1987). Such variations could be due to increases in the exocytosis of LD during the dark period (Blázquez, 1987). These circadian modifications suggest that the LD may have some functional meaning.

A second very important aspect relates to the mutual relationships between the LD and the cytoplasmic organelles. We have obtained morphological evidence at ultrastructural level that the LD are related to structures involved directly or indirectly in the processes of synthesis, such as free ribosomes, polyribosomes, rough and smooth endoplasmic reticulum and Golgi vesicles (Muñoz Barragán *et al.*, 1988). The spatial relationships are very striking with respect to the serotonergic dense bodies that directly contact the LD (Muñoz Barragán *et al.*, 1986) and mitochondria, where the presence of N-acetyl transferase has been demonstrated by cytochemical methods (Kerényi *et al.*, 1975). These latter findings, together with the existence of structural complexes formed of LD, serotonergic dense bodies and mitochondria together with the extrusion of LD by the pinealocytes towards the pericapillary spaces, suggest that the LD might play the role of melatonin carriers (Muñoz Barragán *et al.*, 1988).

The third aspect to be considered is that 5-hydroxytryptophan is the immediate precursor of serotonin and that this monoamine is converted to melatonin through an intermediate step (step from serotonin to N-acetyl serotonin). This implies that the precursor injected by us and taken up by the pinealocytes may be located in the structures that contain serotonin and also by those that contain N-acetyl serotonin, melatonin or other substances derived from the metabolism of 5-hydroxytryptophan (see Ebels and Balemans, 1986). Our results show that within the pinealocytes the traces of label of 5-hydroxytryptophan injected «in vivo» appear localized very selectively in the areas of the serotonergic dense bodies and of the LD, such that it can be assumed that this precursor is taken up by the pinealocytes and used for monoamine synthesis. In view of the capacity of pinealocytes to incorporate labeled 5-hydroxytryptophan it is more advantageous to work with this substance than with tryptophan because the latter

is an amino acid that may be present in different protein molecules, thus hindering the interpretation of the results. It can be assumed that the traces originated by tritiated 5-hydroxytryptophan and located on the contours of the serotonergic granules would indicate the incorporation of the precursor into their matrix, once converted to serotonin, and hence their storage, although it cannot be ruled out that the label might correspond to other pineal indoles apart from serotonin. It should also be noted that the discrepancies between our autoradiographic results and those obtained by other authors (Bak *et al.*, 1970; Romijn *et al.*, 1977; Juillard *et al.*, 1984), essentially regarding the distribution of label in the pinealocytes and synaptic terminals, may be due to methodological differences or to the label employed. Romijn *et al.* (1977) performed an «in vitro» study, like Juillard *et al.* (1984), using ^3H -serotonin as label. Bak *et al.* (1970) observed a diffuse distribution of label in the pinealocytes at two hours after the administration of ^3H -5-hydroxytryptophan, but failed to indicate at which moment of the light/darkness cycle they administered the tracer nor when the animals were sacrificed.

In previous work carried out by us we have reported evidence of the intimate contact between the serotonergic granules and the LD, showing that the matrix of the granules (that is, the material contained in their dense core) passes into them (Muñoz Barragán *et al.*, 1982, 1988). Having ruled out the possibility that these granules might be lysosomes, since they do not have acid phosphatase activity and are positive for the chromaffin and zinc-osmium iodide (ZIO) reactions, we can suggest that the step from serotonin to N-acetyl serotonin or of this to melatonin occurs inside the LD, such that these structures could serve as a method for transporting melatonin to the exterior of the pinealocytes. In this respect, it should be recalled that the extrusion of LD is a frequently observed phenomenon in the rat pineal. We should also underscore the fact that according to Reiter *et al.* (1987) is difficult to account for the secretion of melatonin by simple transmembrane diffusion since this hormone is released in successive peaks and not in a sustained and constant fashion. This peaked release suggests that melatonin may be being stored, even for short periods of time, and would thus require a system for cellular deposition and transport of the hormone; this might well be the LD.

REFERENCES

- ARSTILA, A.U., H.O. KALIMO and M. HYYPPA (1971): Secretory organelles of the rat pineal gland: electron microscopic and histochemical studies in vivo and in vitro. In: The pineal gland. Ciba Foundation Symposium (Wolstenholme and Knight, eds.), pp. 147-175. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- AXELROD, J. and H. WIESSBACH (1960): Enzymatic O-methylation of N-acetyl-serotonin to melatonin. *Science*, **131**: 1.312.
- BAK, I.J., J.H. KIM and R. HASSLER (1970): Electron microscopic autoradiography for demonstration of LD of pineal serotonin in rat. *Z. Zellforsch.*, **105**: 167-175.
- BLÁZQUEZ, J.L. (1987): Estudio morfológico de la glándula pineal de ratas diabéticas en relación con la biosíntesis de monoaminas. Tesis Doctoral. Salamanca.
- BLÁZQUEZ, E. and G. GONZÁLEZ (1978): The effect of ultrasound waves on the hydroxyindole-O-methyl transferase activity and ultrastructure of the rat pineal gland. *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.*, **70**: 15-24.
- EBELS, I. and M.G.M. BALEMANS (1986): Physiological aspects of pineal functions in mammals. *Physiol. Rev.*, **66**: 581-605.
- GONZÁLEZ, G. and E. BLÁZQUEZ (1975): Ultrastructural evidence of a secretory process in the rat pineal gland. *Experientia*, **31**: 969-971.
- JUILLARD, M.T., J.P. COLLIN, M.G.M. BALEMANS and A. QUEAU (1984): In-vitro uptake and metabolism of [^3H]-5-hydroxytryptamine in the pineal glands of the rabbit, rat and hamster. A comparative study with the use of autoradiography, chromatography and liquid-scintillation counting. *Cell Tissue Res.*, **235**: 539-549.
- KAPPERS, J.A. (1971): The pineal organ: An introduction. In: The pineal gland. Ciba Foundation Symposium (Wolstenholme and Knight, eds.), pp. 3-25. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- KARASEK, M., M. PAWLIKOSKI, J. ARIENS KAPPERS and H. STEPIEN (1976): Influence of castration followed by administration of LH-RH on the ultrastructure of rat pinealocytes. *Cell Tissue Res.*, **167**: 325-339.
- KARASEK, M., K. MAREK and E. HYJEK (1979): The ultrastructure of rat pineal organ after administration of human chorionic gonadotropin. *Acta Med. Pol.*, **20**: 27-28.
- KERÉNYI, N.A., P. SOTONYI and E. SOMOGYI (1975): Localizing acetyl-serotonin transferase by electron microscopy. *Histochemistry*, **46**: 77-80.

- LIN, H.S., H.B. HWANG and C.Y. TSENG (1975): Fine structural changes in the hamster pineal gland after blinding and superior cervical ganglionectomy. *Cell Tissue Res.*, **158**: 285-299.
- MILINE, R., R. KRSTIC and V. DEVEČERSKI (1968): Sur le comportement de la glande pinéale dans des conditions de stress. *Acta Anat.*, **71**: 352-402.
- MUÑOZ BARRAGÁN, L., I. MOSQUEIRA, F.E. PASTOR, D. TORANZO and P. AMAT (1982b): Ultrastructural and cytochemical study of the localization of serotonin containing granules and synthesis of melatonin in the pineal gland. *Neurosci. Lett. (Suppl.)* **10**: S342-S343.
- MUÑOZ BARRAGÁN, L., A. LOPEZ GIL, D. TORANZO, J.L. BLÁZQUEZ, M.D.L. PIZARRO, F.E. PASTOR and M.I. MOSQUEIRA (1986): The pineal gland: a neuroendocrine crossroad. En: Proceedings of the workshop on the pineal gland, pp. 57-61. Salamanca.
- MUÑOZ BARRAGÁN, L., F.E. PASTOR, M.D.L. PIZARRO, J.L. VASALLO, R. ARREAZA and A. LÓPEZ GIL (1988): Could lipid droplets be an intracytoplasmatic melatonin carrier?. En: Proceedings of Symposium on melatonin and pineal gland. *Chin. J. Physiol. Sci.*, **4**: 222.
- QUAY, W.B. (1965): Photic relations and experimental dissociation of circadian rhythms and pineal composition and running activity in rat. *Photochem. Photobiol.*, **4**: 425-432.
- QUAY, W.B. (1974): Pineal chemistry. (Thomas, ed.). Springfield, Illinois.
- REITER, R.J., B. COZZI, J.P. RAVAVULT and B. FERRANDI (1987): Melatonin is released episodically from the mammalian pineal gland. In: Fundamentals and clinics in pineal research (Trentini, De Gaetani and Pévet, eds), pp. 215-218. Raven Press, New York.
- ROMIJN, H.J., M.T. MUD and P.S. WOLTERS (1977): A pharmacological and autoradiographic study on the ultrastructural localization of indoleamine synthesis in the rabbit pineal gland. *Cell Tissue Res.*, **185**: 199-214.
- ROUX, M. and J.P. RICHOUX (1981): Effects de l'énucléation oculaire bilatérale sur l'ultrastructure de l'épiphyse chez la femelle du lérot (*Eliomys quercinus*, L.). Correlations avec l'axe hypothalamo-hypophysé-ovarien. *Reprod. Nutr. Develop.*, **21**: 45-57.
- WEISSBACH, H., B.G. REDFIELD and J. AXELROD (1960): Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim. biophys. Acta*, **43**: 352-353.
- WURTMAN R.J. and F. ANTON-TAY (1969): The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Progr. Hormone Res.*, **25**: 493-522.

Correspondence: Prof. L. Muñoz Barragán
Departamento de Anatomía y Histología Humanas
Facultad de Medicina,
Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro s/n
37007 Salamanca. Spain

INCLUSIONES INTRANUCLEARES EN NEURONAS DEL HIPOTÁLAMO DE RATA

INTRANUCLEAR INCLUSIONS IN HYPOTHALAMIC NEURONS OF THE RAT

J. L. BLÁZQUEZ, B. PELÁEZ, F.E. PASTOR, D. TORANZO,
A. SÁNCHEZ, G. AMAT y P. AMAT

Departamento de Anatomía e Histología Humanas y Departamento de Investigación y Microscopía Electrónica
Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

RESUMEN

Una revisión de imágenes ultraestructurales de los núcleos supraóptico y arcuato y área preóptica medial del hipotálamo de ratas sometidas a distintos experimentos (administración de clorpromacina, pinealectomía, castración y tratamiento con glutamato monosódico) nos ha permitido hacer un estudio sobre las diferentes inclusiones intranucleares de las neuronas de aquellos territorios hipotalámicos, así como de diversas modificaciones en ciertos organitos propios del núcleo (núcleolos, cromatina, estructuras paranucleolares y cuerpos accesorios de Cajal). Entre las *inclusiones intranucleares verdaderas* hemos observado unas que están constituidas por haces de microtúbulos y que ocasionalmente están presentes en neuronas del núcleo supraóptico de ratas tratadas con clorpromacina. *Inclusiones membranosas monolaminares* aparecen con mayor frecuencia en el núcleo de neuronas del área preóptica medial de ratas pinealectomizadas. Las *inclusiones falsas* son yemas citoplasmáticas que se introducen en invaginaciones del núcleo celular y son muy llamativas en algunas neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo tras la castración o la castración simulada. Los núcleolos supernumerarios y los cuerpos accesorios de Cajal son frecuentes en neuronas del núcleo arcuato de ratas de once días tratadas con glutamato monosódico el día cuarto de vida. Formaciones idénticas a los cuerpos accesorios de Cajal se encuentran adosadas al nucléolo en estas neuronas. Se discute el posible significado de nuestros hallazgos en relación con los datos existentes en la literatura.

PALABRAS CLAVE: Nucléolo, estructuras paranucleolares, cuerpo accesorio de Cajal, inclusiones intranucleares, pseudoinclusiones, ultraestructura, hipotálamo, rata.

SUMMARY

A review of the ultrastructural images of the supraoptic and arcuate nuclei together with those of the medial preoptic area of the hypothalamus of rats subjected to different treatments (administration of chlorpromazine, pinealectomy, castration and treatment with monosodium glutamate) permitted us to perform a study of the different intranuclear inclusions of the neurons of such hypothalamic territories and of different types of modifications in certain organelles of the nucleus (nucleoli, chromatin, paranucleolar structures and accessory bodies of Cajal). Among the *true intranuclear inclusions* these were formed of sheaves of microtubules that sometimes appeared in the supraoptic nucleus of rats treated with chlorpromazine. The *monolayer membranous inclusions* appeared with the highest frequency in the nucleus of neurons from the medial preoptic area of pinealectomized rats. The *false inclusions* were present in the form of cytoplasmic buds entering invaginations of the nucleus; these were striking in some neurons of the arcuate nucleus following castration or sham castration. Supernumerary nucleoli and the accessory bodies of Cajal were common in neurons of the arcuate nucleus of eleven-day old rats treated with monosodium glutamate on the fourth day of life. Formations identical to the accessory body of Cajal were found in these neurons apposed to the nucleolus. The possible significance of our findings is discussed with respect to the data in the literature.

KEY WORDS: Nucleolus, paranucleolar structures, accessory body of Cajal, intranuclear inclusions, pseudoinclusions, ultrastructure, hypothalamus, rat.

Introducción

Desde finales del siglo pasado varios investigadores han llamado la atención sobre la existencia de inclusiones de morfología diversa en el interior de núcleos celulares, distintas del nucléolo y de los grumos de cromatina (Mann, 1894; Roncoroni, 1895; Lenhossék, 1897; Holmgren, 1899). A principios de siglo, Ramón y Cajal (1903) describió una de estas inclusiones nucleares de forma redondeada y de aproximadamente una micra de diámetro, argirófila, Feulgen-negativa y no basófila, situada entre el nucléolo y la envoltura nuclear. Desde su descripción se conoce a esta estructura como *cuerpo accesorio de Cajal*. Otras inclusiones, relacionadas íntimamente con el nucléolo, puesto que hacen prominencia sobre la superficie del mismo, son las llamadas *estructuras paranucleolares* (Haggar, 1957; Hardin y col., 1969). Se trata de estructuras hemisféricas argirófilas unidas a la superficie nucleolar, que existen fundamentalmente en células nerviosas, al igual que el cuerpo accesorio.

De Thé y col. (1960) fueron los primeros en estudiar con el microscopio electrónico las inclusiones nucleares esféricas en células tumorales de conejo. Popoff y Stewart (1968) las describieron en células del sistema nervioso central de hamsters en condiciones patológicas por inoculación de virus, y Lancho y col. (1978) en las células foliculares del resto tiroideo de gatos parcialmente tiroidectomizados y en células gliales del lóbulo posterior de la hipófisis.

En las células nerviosas, algunas inclusiones, como las *varillas de Roncoroni*, fueron descritas por primera vez con el microscopio electrónico por Siegesmund y col. (1964). Posteriormente, la ultraestructura de las inclusiones intranucleares ha sido descrita en diversas partes del sistema nervioso central: en el núcleo geniculado lateral (Karlsson, 1966), en el núcleo vestibular lateral (Sotelo y Palay, 1968), en el núcleo coclear (Feldman y Peters, 1972) y en el núcleo caudado (Seite y col., 1977) de la rata; en el hipotálamo del conejo (Clattemburg y col., 1976); en el núcleo olfatorio anterior y en la corteza prepiriforme (Willey y Schultz, 1971) y en la sustancia gris periacueductal (Liu y Hamilton, 1976; Liu, 1978) del gato; en ganglios simpáticos de aves (Masurovsky y col. 1970) y en la corteza cerebral humana (Cragg, 1976).

En el presente trabajo describimos nuestras observaciones sobre la ultraestructura de varios tipos de inclusiones intranucleares de células nerviosas del hipotálamo de la rata.

Material y técnicas

Hemos empleado como animal de experimentación la rata albina de la cepa Sprague-Dawley. Para el presente trabajo hemos revisado el material existente en nuestro Departamento correspondiente a diversas situaciones experimentales, utilizadas en varios estudios, tales como castración (Pastor y col., 1990a; Peláez y col., 1991a), administración de L-glutamato monosódico (Pastor y col., 1990b, 1991; Peláez y col., 1991b), pinealectomía quirúrgica (Toranzo y col., 1988) y tratamiento con clorpromacina (Ledesma-Jimeno y col., 1982).

Todos los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con una solución fijadora de glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4 °C, precedida por un ligero lavado del árbol vascular con una solución de cloruro sódico 150 mM. Tras la perfusión se obtuvo el bloque diencefálico, que fue tallado en piezas de 1 mm³ según planos frontales, siguiendo la pauta de Pastor (1983); estas piezas permanecieron en la solución fijadora por un período de 12 horas. A continuación fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% en el tampón antes descrito, durante hora y media a 4 °C. Posteriormente fueron deshidratadas con acetona, contrastadas en bloque con acetato de uranilo al 2% en acetona de 70° e incluidas en Durcupan (Fluka). Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800. Cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina para la localización del territorio objeto de estudio. Los cortes ultrafinos se contrastaron siguiendo el método de Reynolds y se estudiaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM-201.

Resultados

En nuestra descripción haremos referencia, en primer lugar, a algunas observaciones efectuadas sobre la morfología del nucléolo y la cromatina, incluyendo la aparición de las denominadas *estructuras paranucleolares* y los *cuerpos accesorios de Cajal*. A continuación trataremos de las inclusiones intranucleares propiamente dichas y de las conocidas como inclusiones falsas o pseudoinclusiones.

En el material revisado hemos encontrado con frecuencia nucléolos de gran tamaño así como la presencia de varios nucléolos en el mismo núcleo (núcleolos supernumerarios). La existencia de dos nucléolos en el núcleo de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo es frecuente en animales tratados con glutamato monosódico a los cuatro días de edad y sacrificados siete días después (fig. 1). En muchos casos los nucléolos de estas neuronas se localizan en la periferia, en contacto con la membrana nuclear (fig. 1). Hemos de señalar que, habitualmente, el hallazgo de nucléolos de gran tamaño de localización marginal o su incremento numérico, tiene lugar en neuronas que presentan un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi.

En relación con los nucléolos se encuentran, con alguna frecuencia, otros organitos que, por ello, se han denominado *estructuras paranucleolares*. En realidad muchas de estas formaciones se corresponden con la cromatina perinucleolar y aparecen como acúmulos de aspecto granular adosados al nucléolo (fig. 2, asterisco). En otras ocasiones se aplica el término estructura paranucleolar a formaciones estructuralmente diferentes de las anteriores, pero que también se hallan adosadas al nucléolo (figs. 2 y 3, cabezas de flechas). Estas están constituidas por grumos densos, gruesos, inmersos en una matriz menos densa (fig. 2, cabeza de flecha). Según nuestras observaciones el tamaño de estas últimas formaciones oscila entre 0,45 y 0,95 μm de diámetro.

El *cuerpo accesorio de Cajal* es, por su aspecto, idéntico a estos últimos organitos y ha sido observado algunas veces en el mismo núcleo que ellos (fig. 3, flecha). Sin embargo, como es sabido, una de las condiciones que deben cumplir los cuerpos accesorios para ser considerados como tales es su alejamiento del nucléolo, esto es, encontrarse libres en el nucleoplasma, como aparecen en las figs 1 y 3 (flechas). En ambos casos su diámetro es de unos 600 nm.

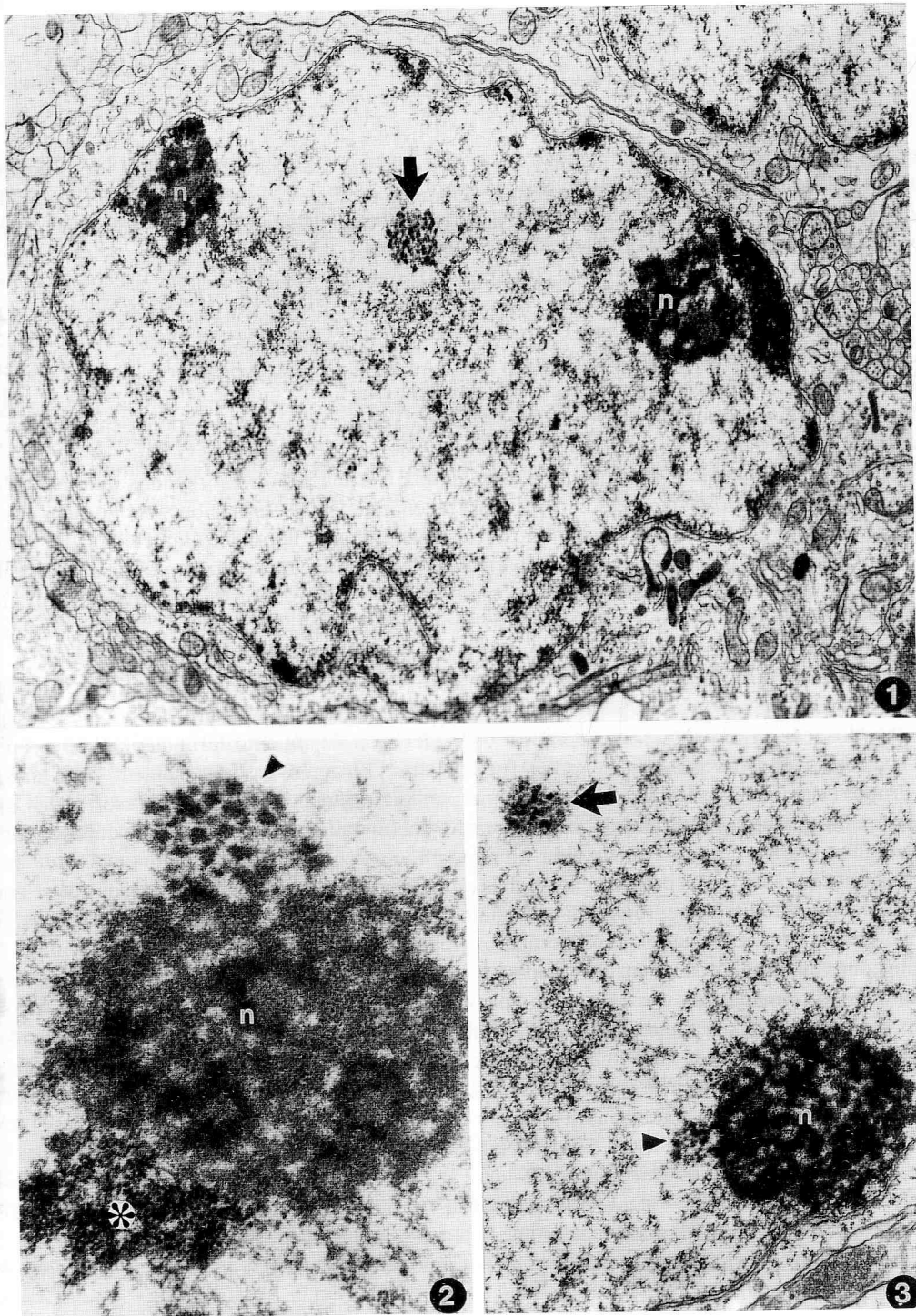
En los grupos de animales estudiados, las estructuras paranucleolares y los cuerpos accesorios de Cajal se han hallado preferentemente en las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo de ratas de once días de edad tratadas con glutamato monosódico el cuarto día de vida.

Las inclusiones intranucleares propiamente dichas están formadas por elementos diversos que se encuentran libres en el nucleoplasma. En las neuronas del hipotálamo hemos encontrado dos tipos de inclusiones, formadas unas por membranas y otras por haces de microtúbulos (inclusiones longitudinales o de tipo varilla).

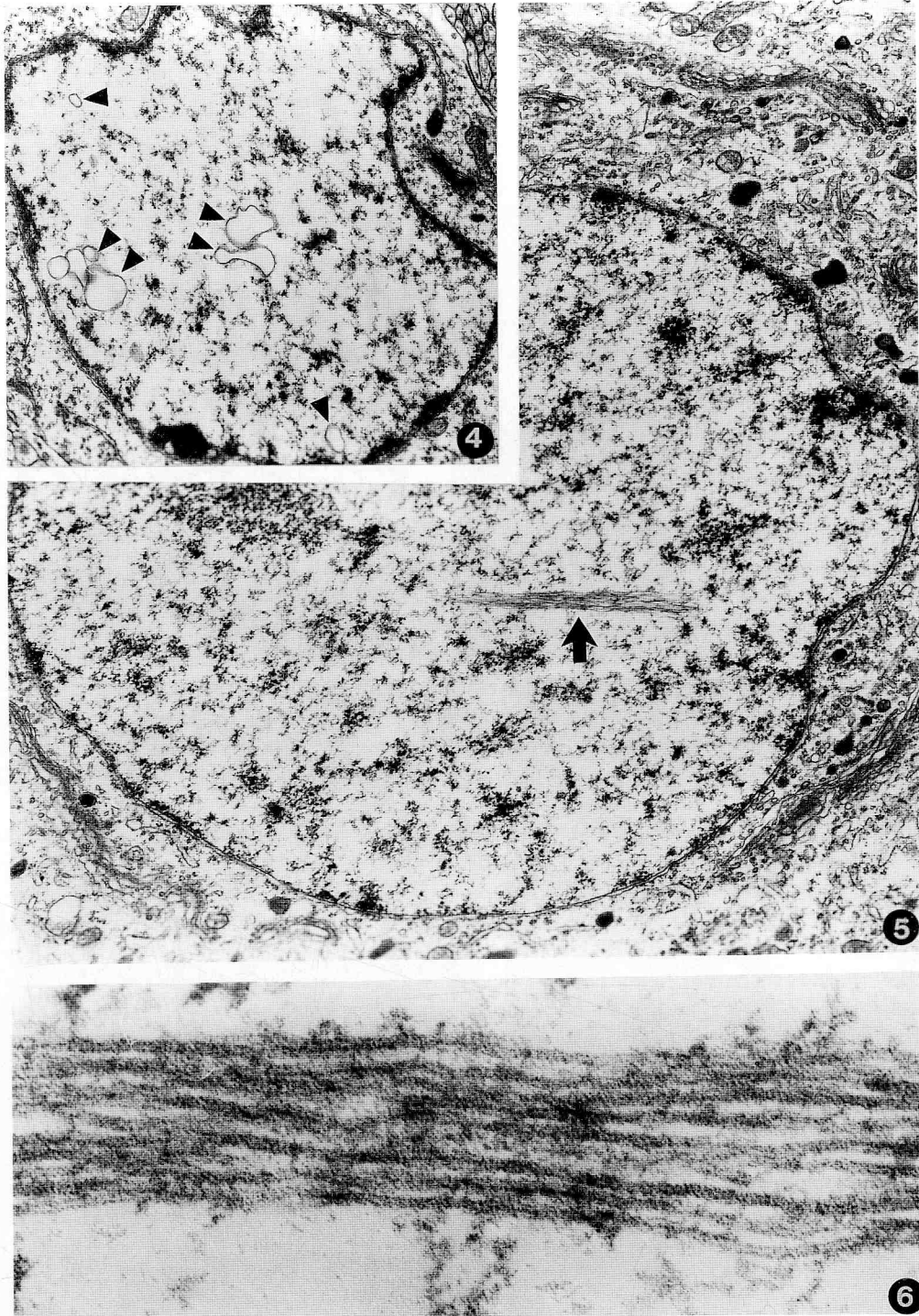
Las inclusiones membranosas se han observado con mayor frecuencia en neuronas del área preóptica medial. Habitualmente están formadas por una sola unidad de membrana (monolaminares) y aparecen en el corte como uno o varios sacos de forma y tamaño variables (0,2-0,8 μm de diámetro) y vacíos de contenido (fig. 4, cabezas de flecha). En las ratas normales de tres y cuatro meses de edad hemos comprobado su existencia, si bien de manera excepcional. Sin embargo, este tipo de inclusión es un hallazgo frecuente en los núcleos de las neuronas del área preóptica medial de ratas pinealectomizadas al mes de vida y que fueron sacrificadas dos y tres meses después de la intervención. Además, en el caso de los animales pinealectomizados el número de estas inclusiones es mayor que el que suele encontrarse en los animales normales.

Las inclusiones longitudinales son un hallazgo casual. La que se observa en la figura 5 (flecha) pertenece a una neurona magnocelular del núcleo supraóptico de una rata tratada con clorpromacina. Como se aprecia en la figura 6 está integrada por un haz de microtúbulos. La longitud de esta inclusión es de 2,6 μm y su espesor de 220 nm.

Como inclusiones falsas o pseudoinclusiones se consideran las invaginaciones nucleares en las que se introduce el citoplasma. En este caso el material aparentemente incluido no se encuentra libre en el nucleoplasma, sino separado de él por la doble membrana derivada de la invaginación de la cubierta nuclear. En ocasiones estas invaginaciones son muy llamativas, bien sea por su tamaño o porque la densidad de sus organitos es superior a la del resto del pericarion (figs. 7 y 9, flechas). Las dos neuronas seleccionadas pertenecen al núcleo arcuato del hipotálamo de rata. A grandes aumentos se aprecia la gran riqueza de organitos que poseen, especialmente retículo endoplásmico rugoso (figs. 8 y 10), que presenta a veces cisternas dilatadas (fig. 10). Abundan además los polirribosomas (fig. 8), cisternas de retículo endoplásmico liso y lisosomas (fig. 10).



FIGURAS 1-3. Núcleo arcuato del hipotálamo de una rata macho de once días de edad sacrificada siete días después de la administración de una dosis de glutamato monosódico de 4 mg/g de peso. Fig. 1. En el núcleo de una neurona se observan dos nucléolos (n) y un cuerpo accesorio de Cajal (flecha) (15.680x). Fig. 2. Junto a un nucléolo (n) se observan un acúmulo de cromatina (asterisco) y una estructura paranucleolar (cabeza de flecha) (36.400x). Fig. 3. Se observa un cuerpo accesorio de Cajal (flecha) y una estructura paranucleolar de idéntico aspecto (cabeza de flecha) situada junto al nucléolo (n) (17.520x).



- FIGURA 4.** Área preóptica medial de una rata macho pinealectomizada al mes de edad y sacrificada dos meses después. En el núcleo de una neurona se observan varias inclusiones membranosas (cabezas de flecha) (12.800x).
- FIGURA 5.** Núcleo supraóptico de una rata hembra tratada con clorpromacina. En el núcleo de una neurona magnocelular destaca la presencia de una inclusión longitudinal (flecha) (15.680x).
- FIGURA 6.** Detalle a mayores aumentos (144.200x) de la inclusión de la figura anterior. Obsérvese que la inclusión está constituida por un haz de microtúbulos.

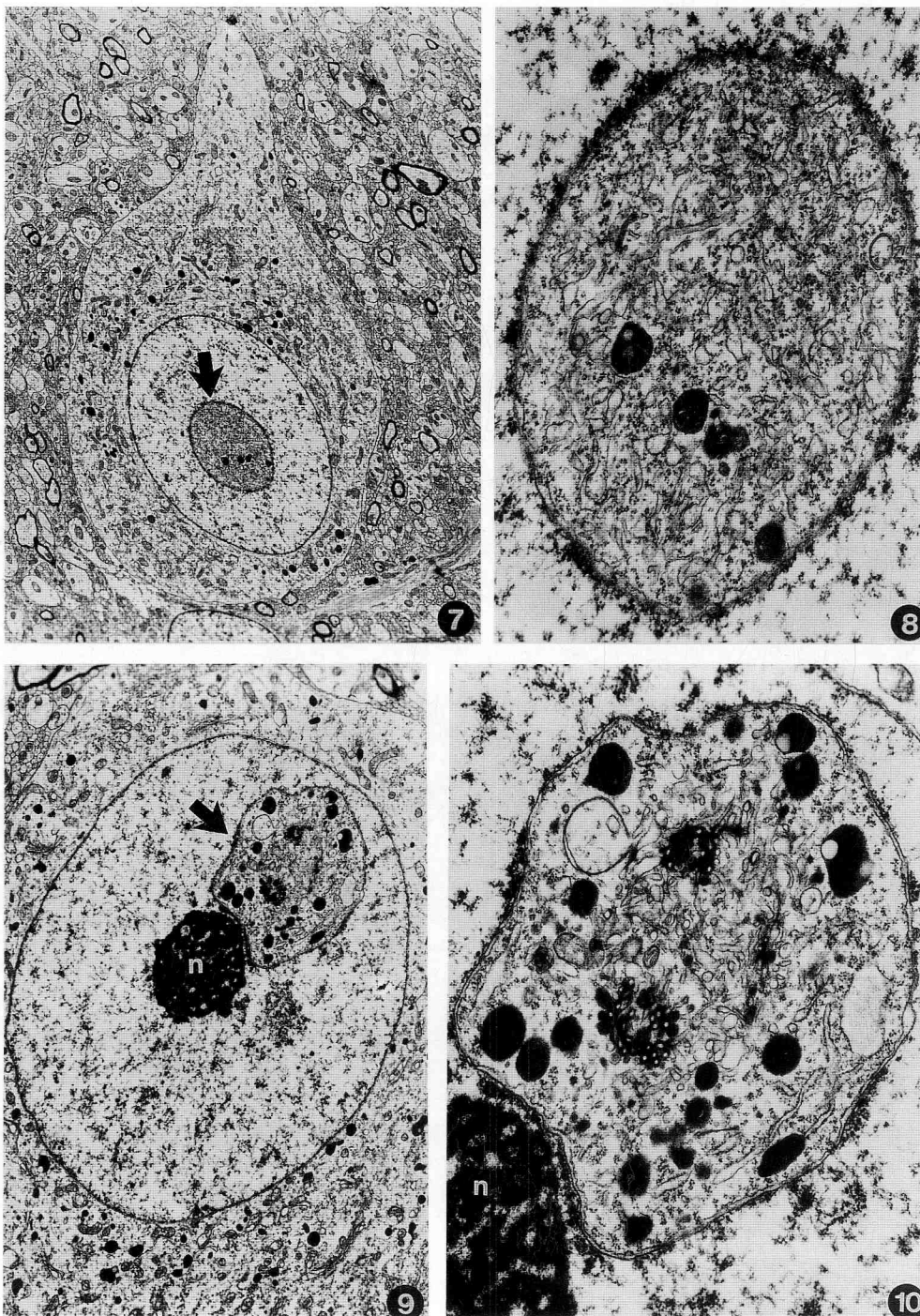


FIGURA 7. Núcleo arcuato del hipotálamo de una rata macho sometida a castración simulada a los tres meses de edad y sacrificada tres meses después. Se observa una neurona cuyo núcleo celular presenta una invaginación citoplasmática (flecha) (3.350x).

FIGURA 8. Detalle a mayores aumentos (17.520x) de la invaginación de la figura anterior.

FIGURA 9. Núcleo arcuato del hipotálamo de una rata macho castrada a los tres meses de edad y sacrificada un mes después. En el interior del núcleo celular se observa una invaginación citoplasmática (flecha) junto al nucléolo (n) (6.650x).

FIGURA 10. Detalle a mayores aumentos (17.520x) de la figura anterior.

Las neuronas donde se encuentran estas pseudoinclusiones suelen ser de gran tamaño (la que aparece cortada en la figura 7 mide 21 μm de diámetro mayor) y es habitual que presenten nucléolos prominentes como el que se observa en la figura 9, que alcanza las 3 μm de diámetro. En este caso vale la pena señalar que si bien el nucléolo parece centrado dentro del núcleo, está en la inmediata vecindad de la invaginación, lo que hace que, en realidad, el nucléolo se sitúe en la periferia nuclear.

Discusión

Al considerar las formaciones existentes en el interior de los núcleos celulares es conveniente distinguir -y nosotros así lo hemos hecho en el apartado de resultados- dos tipos de elementos diferentes: los organitos propios del núcleo y las inclusiones intranucleares. Dentro de los *organitos propios del núcleo* podemos considerar que los hay constantes (núcleolo y cromatina), los muy frecuentes (las estructuras paranucleolares) y los menos frecuentes (cuerpos accesorios de Cajal).

En el material revisado por nosotros, las neuronas con más de un nucléolo -generalmente dispuestos en la periferia nuclear-, las estructuras paranucleolares y los cuerpos accesorios de Cajal son frecuentes en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas de once días de edad, sacrificadas después de haberles administrado una única dosis de glutamato monosódico (4 mg/g peso corporal) por vía subcutánea el cuarto día de vida. En estos animales existen marcados signos ultraestructurales de hiperactividad (Pastor y col., 1990b) así como una hipertrofia celular (Pastor y col., 1991) de las neuronas del núcleo arcuato. Estos datos nos permiten considerar que el incremento numérico y en tamaño de los nucléolos, su situación periférica, así como la mayor frecuencia de aparición de estructuras paranucleolares y cuerpos accesorios de Cajal constituyen signos de hiperactividad.

Clásicamente se define el cuerpo accesorio de Cajal ocupando en el núcleo celular una posición distante del nucléolo. Nuestras observaciones, así como las de otros autores, no permiten sustentar esta opinión, pues hemos encontrado formaciones idénticas al cuerpo accesorio junto al nucléolo (véanse figs. 2 y 3), al igual que lo han hecho otros autores (Lafarga y Hervás, 1983). La similitud estructural entre algunas estructuras situadas junto al nucléolo y el cuerpo accesorio de Cajal es evidente en la figura 3. Para Hardin y col. (1969) el cuerpo accesorio derivaría de una estructura paranucleolar, que se separaría del nucléolo y se situaría centralmente. No obstante, para nosotros los cuerpos accesorios unidos al nucléolo son diferentes de las estructuras paranucleolares, como puede apreciarse en nuestra figura 2. Por tanto, y de acuerdo con Lafarga y Hervás (1983), nosotros también admitimos que no es condición necesaria para que un organito intranuclear pueda ser identificado como cuerpo accesorio de Cajal el hecho de que se encuentre separado del nucléolo. Por otra parte no todas las formaciones situadas junto al nucléolo han de ser consideradas como estructuras paranucleolares, pues algunas son cuerpos accesorios.

Entre las *inclusiones intranucleares* diferenciamos las verdaderas y las falsas. En relación con las inclusiones intranucleares verdaderas hemos de indicar que con la microscopía electrónica se han descrito tres tipos en razón de su textura (fibrilar, tubular o reticular). Las más frecuentes son las varillas (*rodlets*), de aproximadamente 0.2 μm de diámetro (Karlsson, 1966) y consistentes en un haz de filamentos con diámetros aproximados de 6 nm (Willey y Schultz, 1971). Con menor frecuencia se han observado inclusiones en forma de enrejado fibrilar paracrystalino (*fibrillar lattice*) formados por fibras de 10 nm de diámetro. El tercer tipo, observado sólo ocasionalmente, consiste en haces de microtúbulos de 27 nm de diámetro (Jordano-Barea y González-Santander, 1968; Sotelo y Palay, 1968; Seite y col., 1971a, b). Nuestras observaciones se reducen a una inclusión longitudinal de estructura microtubular existente en el núcleo de una neurona del núcleo supraóptico de una rata tratada con clorpromacina.

El significado funcional de las inclusiones intranucleares ha sido un tema muy debatido, sin que hasta el momento haya sido desentrañado. Para muchos autores las inclusiones serían la consecuencia de estados metabólicos especiales de la célula o del desarrollo y diferenciación celular (Masurovsky y col., 1970; David y Nathaniel, 1978; Hervás y col., 1980; Lafarga y col., 1983) o se deberían a condiciones patológicas, tales como infecciones virales o procesos tumorales (Chandler, 1965; Bouteille y col., 1967; Popoff y Stewart, 1968; Henry

y Petts, 1969; Patrizi y Middlekamp, 1969; Dupuy-Coin y Bouteille, 1972; Dupuy-Coin y col., 1972; Bertel y col., 1981), a la edad (Field y Peat, 1971), etc.

Otro tipo de inclusiones intranucleares verdaderas son los llamados cuerpos membranosos nucleares o inclusiones membranosas intranucleares (Tripier y col., 1974), que consisten bien en perfiles membranosos mono o bilaminares (Weber y col., 1964; Hirsch, 1970; Nakayama y Nickerson, 1972; Nickerson, 1975) o bien en estructuras multilaminares concéntricas (Chandler, 1965; Humeau, 1968; Tripier y col., 1974; Azevedo, 1976). Inclusiones membranosas han sido descritas en neuronas del núcleo cuneatus (David y Nathaniel, 1978), en el hipotálamo -tanto en neuronas (Gregory y col., 1980) como en pericitos (Lafarga y Hervás, 1978) de rata- y en la corteza cerebral de pollos en edad perinatal (Calvet y col., 1987).

En un trabajo anterior (Toranzo y col., 1988) hemos descrito los efectos de la pinealectomía sobre el área preóptica medial, concluyendo que esta situación experimental determina cambios en el núcleo celular de las neuronas de este territorio, consistentes principalmente en irregularidades del perfil nuclear, disminución de la heterocromatina, presencia de más de un nucléolo y, sobre todo, frecuente aparición de inclusiones membranosas monolaminares.

Las *inclusiones intranucleares falsas* no son más que invaginaciones del citoplasma en el interior del núcleo, pero en ocasiones se presentan perfectamente aisladas en el corte ultrafino sin que se pueda ver la continuidad de la inclusión con el pericarion. Este tipo de inclusiones es relativamente frecuente en las células adenohipofisarias y han sido relacionadas con cambios de la actividad sexual. Por ejemplo, Cavallero (1947) las ha encontrado en trastornos gonadales y Russfield (1957) en el síndrome de Klinefelter. También fueron descritas por Serber (1954, 1958, 1961) en células basófilas de la adenohipófisis de hamsters castrados. Por otra parte, se ha observado un incremento de estas inclusiones durante el período de gestación, tanto en la especie humana (Erdheim y Stumme, 1909; Cavallero, 1947) como en el ratón (Urasov, 1927) y en el conejo; en esta última especie también se han detectado durante el período de lactancia (Allanson y col. 1966), particularmente en las células de la prolactina (Amat y Vázquez, 1970). Para explicar el incremento numérico de las células que tienen este tipo de inclusiones intranucleares se han invocado otras causas tales como el *stress* (Sommers, 1959), el síndrome de Cushing (Gellerstedt y Lundquist, 1939; Mellgren, 1942, 1945) o el síndrome adrenogenital (Mellgren, 1942, 1945; Cavallero, 1947). Las inclusiones intranucleares falsas que nosotros hemos visto, están presentes en neuronas del núcleo arcuato que muestran una extraordinaria actividad celular, y una de ellas corresponde a una rata castrada (fig. 9). Bien es cierto que otra ha sido hallada en una neurona, también del núcleo arcuato, de una rata sacrificada después de una castración simulada (fig. 7) y otra (no presente en la iconografía) en el núcleo arcuato de una rata tratada con clorpromacina.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín por su asistencia técnica.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 288/84).

BIBLIOGRAFÍA

- AMAT, P. y VAZQUEZ, R. (1970): Inclusiones nucleares en células adenohipofisarias. *An. Anat.*, **19**: 15-25.
 ALLANSON, M.; CAMERON, E. y FOSTER, C.L. (1966): Observations on the acidophil cells of the adenohipophysis in pregnant and lactating rabbits. *J. Reprod. Fert.*, **12**: 319-326.

- AZEVEDO, C. (1976): Intranuclear inclusions in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *J. Cell. Sci.*, **22**: 325-334.
- BERTEL, C.; GOURANTON, J.; MENAULT, F. y CHATEL, M. (1981): The intranuclear filamentous inclusions of a human glioma. Their relation with nuclear bodies. *Eur J. Cell. Biol.*, **25**: 36-45.
- BOUTEILLE, M., KALIFAT, S.R. y DELARUE, J. (1967): Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrastruct. Res.*, **19**: 474-486.
- CALVET I MÁRQUEZ, S., DOMENECH I MATEU, J.M.; MARTÍN PÉREZ, V. y GARCÍA VERDUGO, J.M. (1987): Nuclear inclusions in the neurons of the developing cerebral cortex of *Gallus gallus*. *J. Submicrosc. Cytol.*, **19**: 471-478.
- CAVALLERO, C. (1947): Nucleolar substance in the anterior lobe of the human pituitary gland. *Arch. Path.*, **44**: 639-645.
- CHANDLER, R.L. (1965): Demonstration of a porcine adenovirus by electron microscopy. *Virology*, **25**: 143-145.
- CLATTEMBURG, R.E.; SINGH, R.P. y MONTEMURRO, D.G. (1976): Intranuclear filamentous inclusions in neurons of the rabbit hypothalamus. *J. Ultrastruct. Res.*, **39**: 549-555.
- CRAGG, B.G. (1976): Ultrastructural features of human cerebral cortex. *J. Anat. (Lond.)*, **121**: 331-362.
- DAVID, S. y NATHANIEL, E.J.H. (1978): Intranuclear inclusions in the developing neurons of the rat cuneate nuclei. *Cell Tissue Res.*, **193**: 525-532.
- DE THÉ, RIVIERE, M. y BERNHARD, V. (1960): Examen au microscope électronique de la tumeur VX 2 du lapin domestique dérivée du papillome de Shope. *Bull. Cancer*, **47**: 570-584.
- DUPUY-COIN, A.M. y BOUTEILLE, M. (1972): Developmental pathway of granular and beaded nuclear bodies from nucleoli. *J. Ultrastruct. Res.*, **40**: 55-67.
- DUPUY-COIN, A.M., KALIFAT, S.R. y BOUTEILLE, M. (1972): Nuclear bodies as proteinaceous structures containing ribonucleoproteins. *J. Ultrastruct. Res.*, **38**: 174-187.
- ERDHEIM, J. y STUMME, E. (1909): Über die Schwangerschaftsveränderungen der Hypophyse. *Beitr. Path. Anat.*, **46**: 1-132.
- FELDMAN, M.L. y PETERS, A. (1972): Intranuclear rods and sheets in rat cochlear nucleus. *J. Neurocytol.*, **1**: 109-127.
- FIELD, E.J. y PEAT, A. (1971): Intranuclear inclusions in neurons and glia: a study in the aging mouse. *Gerontologia*, **17**: 129-138.
- GELLERSTEDT, N. y LUNDQUIST, R. (1939): Zur Frage des Morbus Cushing ohne basophile Adenom. Die Bedeutung der sog. hyalinen Veränderung der basophilen Zellen. *Upsala Läkaref. Förh.*, **45**: 233-260.
- GREGORY, W.A.; TWEEDLE, C.D. y HATTON, G.I. (1980): Ultrastructure of neurons in the paraventricular nucleus of normal, dehydrated and rehydrated rats. *Brain Res. Bull.*, **5**: 301-306.
- HAGGAR, R.A. (1957): Behavior of the accessory body of Cajal during axon reaction. *J. Comp. Neurol.*, **108**: 269-283.
- HARDIN, J.H.; SPICER, S.S. y GREENE, W.B. (1969): The paranucleolar structure, accessory body of Cajal, sex chromatin, and related structures in nuclei of rat trigeminal neurons: A cytochemical and ultrastructural study. *Anat. Rec.*, **164**: 403-432.
- HENRY, K. y PETTS, V. (1969): Nuclear bodies in human thymus. *J. Ultrastruct. Res.*, **27**: 330-343.
- HERVAS, J.P., VILLEGAS, J.; CRESPO, D. y LAFARGA, M. (1980): Coiled bodies in supraoptic nuclei of the rat hypothalamus during the postnatal period. *Amer. J. Anat.*, **159**: 447-454.
- HINSCH, G.W. (1970): Possible role of intranuclear membranes in nuclear-cytoplasmic exchange in spider crab oocytes. *J. Cell Biol.*, **47**: 531-535.
- HOLMGREN, E. (1899): Weitere Mitteilungen über den Bau der N. Nervenzellen. *Anat. Anz.*, **16**: 388-397.
- HUMEAU, C. (1968): Formations Membranaires dans le noyau et le cytoplasme périnucléaire d'une jeune ovocyte de *Triturus helveticus* Raz. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **162**: 183-186.
- JORDANO-BAREA, D. y GONZÁLEZ-SANTANDER, R. (1968): Aparato microtubular en el núcleo de una neurona hipotalámica y su posible significación fluidónica. Trabajo del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas, LX, 231-247.
- KARLSSON, U. (1966): Three-dimensional studies of neurons in the lateral geniculate nucleus of the rat. I. Organelle organization in the perikaryon and its proximal branches. *J. Ultrastruct. Res.*, **16**: 429-481.
- LAFARGA, M. y HERVAS, J.P. (1978): Intranuclear inclusions in pericytes of the hypothalamus of the rat. *Cell Tissue Res.*, **193**: 315-322.
- LAFARGA, M. y HERVAS, J.P. (1983): Light electron microscopic characterization of the «accessory body of Cajal» in the neuronal nucleus. En: Ramón y Cajal's contribution to the neurosciences, pp. 91-100. (Grisolía, Guerri, Samson, Vorten y Reinoso Suárez, eds.) Elsevier, Amsterdam.
- LAFARGA, M.; CRESPO, D. y VILLEGAS, J. (1983): Nuclear inclusions in immature glial cells of the rat hypothalamus during the postnatal period. *Anat. Embryol.*, **167**: 263-271.
- LANCHO ALONSO, J.L.; AMAT, P. y DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ, F.J. (1978): Ultraestructura de los cuerpos nucleares. *An. Anat.*, **27**: 171-177.
- LEDESMA-JIMENO, A.; DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ, F.J.; PASTOR, F.E.; LLORCA, G.; BLÁZQUEZ J.M. y AMAT, P. (1982): Comparative effects of castration and chlorpromazine in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the rat. *Actas Luso-Esp. Neurol. Psiquiatr.*, **10**: 351-358.
- LENHOSSÉK, M. (1897): Beiträge zur Kenntniss der Zwischenzellen des Hodens. *Arch. Anat. Entwickl.-Gesch. (Lpz.)*, **65**-85.

- LIU, R.P.C. (1978): Electron and light microscopic correlation of intranuclear bodies of neurons of PAG. *Anat. Rec.*, **190**: 462 (Abstr.).
- LIU, R.P.C. y HAMILTON, B.L. (1976): Intranuclear bodies in neurons of the periaqueductal gray matter in the cat. *Amer. J. Anat.*, **147**: 139-146.
- MANN, G. (1894): Histological changes induced in sympathetic, motor and sensory nerve cells by functional activity. *J. Anat.*, **29**: 100-108.
- MASUROVSKY, E.B.; BENÍTEZ, H.H.; KIM, S.U. y MURRAY, M.R. (1970): Origin, development and nature of intranuclear rodlets and associated bodies in chicken sympathetic neurons. *J. Cell Biol.*, **44**: 172-191.
- MELLGREN, J. (1942): Beitrag zur Pathologie der Hypophyse bei Interrenalismus. *Beitr. Path. Anat.*, **106**: 482-520.
- MELLGREN, J. (1945): The anterior pituitary in hyperfunction of the adrenal cortex. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **22**: 1-177.
- NAKAYAMA, I. y NICKERSON, P.A. (1972): Intranuclear inclusions in mammothrophs of the female Mongolian gerbil. *Amer. J. Anat.*, **135**: 93-104.
- NICKERSON, P.A. (1975): Effect of partial thyroidectomy, propylthiouracil or thyroxine on estrogen-induced intranuclear inclusions in mammothrophs of the Mongolian gerbil. *Tissue & Cell*, **4**: 763-772.
- PASTOR, F.E. (1983): Estudio ultraestructural del sistema hipotálamo-lóbulo posterior de la hipófisis durante el desarrollo postnatal. Tesis doctoral de Medicina. Universidad de Salamanca.
- PASTOR, F.E., PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, G. y HERNÁNDEZ HOLGADO, M. T. (1990a): Dimorfismo sexual del núcleo arcuado del hipotálamo de rata. *An. Anat.*, **36** (núm. extr.): 241-244.
- PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1990b): Estudio ultraestructural del núcleo arcuado del hipotálamo de rata tras la administración de glutamato monosódico. *An. Anat.*, **36**: 187-197.
- PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1991): Efectos del glutamato monosódico sobre las neuronas del núcleo arcuado del hipotálamo de rata. Estudio morfométrico ultraestructural. *An. Anat.* (en prensa).
- PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J.; AMAT, G.; MUÑOZ BARRAGÁN, L. y AMAT, P. (1991a): Cuerpos laminares espirales y castración. Estudio ultraestructural y cuantitativo. *An. Anat.* (en prensa).
- PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1991b): Efectos de la administración neonatal de glutamato monosódico sobre el testículo de rata. *An. Anat.* (en prensa).
- PATRIZI, G. y MIDDLEKAMP, J.N. (1969): In vivo and in vitro demonstration of nuclear bodies in vaccinia infected cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **28**: 275-287.
- POPOFF, N. y STEWART, S. (1968): The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental Golden hamsters. *J. Ultrastruct. Res.*, **23**: 347-361.
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1903): Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplásmico y sus efectos en los distintos órganos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab. Lab. Inv. Biol. Univ. Madrid.*, **8**: 129-221.
- RONCORONI, L. (1895): Su un nuovo reperto nel nucleo delle cellule nervose. *Arch. Psicol. Neurol. Psichiat.*, **16**: 447-450.
- RUSSFIELD, A.B. (1957): The Adenohypophysis. En: *Analytical Pathology*, pp. 293-360. (Mellors, ed.). McGraw-Hill Book Co. Inc.
- SEBER, B.J. (1954): Giant nucleolar-like structures in the anterior lobe of the hypophysis of the gonadectomized hamster. *Anat. Rec.*, **118**: 407-408.
- SEBER, B.J. (1958): A cytological study of the anterior pituitary gland of the normal, gonadectomized and thyroid deficient hamster (*Mesocricetus auratus*). *Anat. Rec.* **131**: 173-192.
- SEBER, B.J. (1961): Large nuclear inclusions in pituitary gland basophils of the golden hamster. *Anat. Rec.*, **139**: 345-355.
- SEITE, R., ESCAIG, J. y COUINEAU, S. (1971a): Microfilamentes et microtubules nucléaires et organisation ultrastructurale des batonnets intranucléaires des neurones sympathiques. *J. Ultrastruct. Res.*, **37**: 449-478.
- SEITE, R.; MEI, N. y COUINEAU, S. (1971b): Modification quantitative des batonnets intranucléaires des neurones sympathiques sous l'influence de la stimulation électrique. *Brain Res.*, **34**: 277-290.
- SEITE, R., LEONETTI, J.; LUCIANI-VAILLET, J. y VIO, M. (1977): Cyclic AMP and ultrastructural organization of the nerve cell nucleus: stimulation of nuclear microtubules and microfilaments assembly in sympathetic neurons. *Brain Res.*, **124**: 41-51.
- SIEGISMUND, K.A.; DUTTA, C.R. y FOX, C.A. (1964): The ultrastructure of the intranuclear rodlet in certain nerve cells. *J. Anat.*, **98**: 93-97.
- SOMMERS, S.C. (1959): Pituitary cell reactions to body states. *Lab. Invest.*, **8**: 588-621.
- SOTELO, C. y PALAY, S.L. (1968): The fine structure of the lateral vestibular nucleus in the rat. I. Neurons and neuroglial cells. *J. Cell Biol.*, **36**: 151-179.
- TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. y AMAT, P. (1988): Estudio ultraestructural del área preóptica medial en ratas normales y pinealectomizadas. *Histología Médica*, **4**: 99-110.
- TRUPIER, M.F., BERARD, M. y TOGA, M. (1974): Membranous nuclear bodies as possible intermediate structures between nuclear bodies and invaginations of the nuclear envelope. *J. Microscopie*, **21**: 21-30.
- URASOV, I. (1927): Die feinere Structure der Zellen im Vordelappen der Hypophysis der weissen Maus im Zusammenhange mit der Sekretion und der Schwangerschaft. *Arch. Russes Anat., Histol. Embryol.*, **6**: 149-170.

- WEBER, A.; WHIPP, M.; USENIK, E. y FROMMES, S. (1964): Structural changes in the nuclear body in the adrenal zona fasciculata of the calf following the administration of ACTH. *J. Ultrastruct. Res.*, **11**: 564-576.
- WILLEY, T.J. y SCHULTZ, R.L. (1971): Intranuclear inclusions in neurons of the cat primary olfactory system. *Brain Res.*, **29**: 31-45.

Correspondencia: Prof. Dr. P. Amat Muñoz
Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. España



VARIACIONES ROSTROCAUDALES EN LA DISTRIBUCIÓN TOPOGRÁFICA DE SOMATOSTATINA EN LA EMINENCIA MEDIA DE LA RATA MACHO

ROSTROCAUDAL VARIATIONS IN THE TOPOGRAPHIC DISTRIBUTION OF SOMATOSTATIN IN THE MEDIAN EMINENCE OF THE MALE RAT

J. CARRETERO, R. GONZÁLEZ, M. RUBIO, F. SÁNCHEZ, J.M. RIESCO, E. BLANCO,
J.A. JUANES y R. VÁZQUEZ

Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca. España

RESUMEN

Se ha realizado un estudio inmunocitoquímico, de la distribución topográfica, considerada rostrocaudalmente, de las fibras inmunorreactivas a somatostatina en la eminencia media de ratas machos que fueron tratadas con colchicina. Se comprueba la existencia de dos bandas reactivas: una en la zona externa, y otra en la zona interna, situadas en la región pretallo de la eminencia media. Caudalmente, cuando el tallo infundibular aparece, no fue posible observar la banda ventral. Por otra parte la dorsal modifica su posición pasando a situarse en la zona externa. La porción caudal del tallo hipofisario presentó una mayor densidad fibrilar que la observada en la porción rostral. A excepción de la parte más rostral de la región post-tallo, esta región, lo mismo que la retroquiasmática, no presenta fibras reactivas al péptido. Estos resultados apuntan hacia la posibilidad que estas diferencias en la distribución de las fibras reactivas a somatostatina en la eminencia media de la rata macho muestre una fuerte relación con los diferentes efectos hipofisiotropos de la somatostatina

PALABRAS CLAVE: Eminencia media. Somatostatina. Inmunocitoquímica. Rata macho.

SUMMARY

An immunocytochemical study of the rostrocaudal distribution of the somatostatin-immunoreactive fibres in the median eminence of the adult male rat following treatment with colchicine was carried out. In the pre-stalk region, two reactive bands were found: one of them was located in the external zone (dorsal) whilst the other was situated in the internal zone (ventral). Caudally, when the infundibular stalk appears, it was no possible to observe the ventral band. On the other hand, the dorsal one change the location being situated in the external zone. In the caudal portion of the infundibular stalk a higher fibrillary density was observed when compared to the rostral portion. With the exception of the rostralmost part of the post-stalk region (as in the retrochiasmatic one), in this region, no immunoreactive fibres were found. These findings point to the possibility that these well defined differences in the distribution of the somatostatin immunoreactive fibres in the median eminence of the male rat show a strong relationship with the different hypophysiotropic effects of the peptide.

KEY WORDS: Median eminence. Somatostatin. Immunocytochemistry. Male rat.

Introducción

La somatostatina (SRIF) es un péptido ampliamente distribuido por el organismo, si bien cabe resaltar su presencia en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal (Brownstein y col., 1975; Hökfelt y col., 1975).

Krulich y col. (1972), al deducir la existencia de un factor inhibidor de la secreción de GH, describieron la mayor concentración de SRIF en la eminencia media hipotalámica. Este hecho sería corroborado posteriormente por otros autores (Pelletier y col., 1974; Arimura y Schally, 1975; Brownstein y col., 1976; Palkovits y col., 1976).

Dentro de la eminencia media, la SRIF clásicamente ha sido descrita localizada preferentemente en la zona externa (Pelletier y col., 1975; 1977), sin que hasta el momento se haya planteado un estudio de su distribución topográfica rostro-caudalmente en dicha estructura.

Por ello, se realiza un estudio inmunocitoquímico de la localización topográfica de las fibras reactivas a somatostatina-28 en la eminencia media de ratas machos y se analizan las variaciones de distribución existentes entre las distintas regiones de la misma.

Material y Métodos

Para el presente trabajo se han empleado 5 ratas machos Sprague-Dawley, adultas (p.c.: 250g) que recibieron 90 µg de colchicina en 15 µl de agua destilada, administrados en el ventrículo lateral mediante estereotaxia de acuerdo con el proceder descrito por Sánchez y col. (1988). A las 24 horas del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajo el cerebro que fue fijado por inmersión en Bouin durante 5 días y posteriormente, tras deshidratación en etanol, incluido en parafina para obtener cortes seriados parasagittales de 5 µm de grosor.

El estudio inmunocitoquímico se desarrolló mediante el método de la PAP (Sternberger y col., 1970), empleando suero anti-SRIF-28, obtenido en conejo, a dilución 1:1.000; suero de cerdo anticonejo (Dako) a dilución 1:100 y complejo soluble PAP, obtenido en conejo (Dako), a dilución 1:100. Las diluciones y lavados se realizaron en tampón Tris-HCl (0.05M, pH 7.4) adicionado con un 0.8 de NaCl. El revelado de la reacción se desarrolló según el método de Graham y Karnovsky (1966) y la peroxidasa endógena fue neutralizada mediante el proceder de Streefkerk (1972). La especificidad del suero fue demostrada mediante RIA (Frailes y col., 1988), resultando ser altamente específico. Los test de preabsorción abolieron completamente la reacción.

Para el estudio rostro-caudal de la eminencia media se realiza un análisis de la porción basal del hipotálamo de la rata, desde el quiasma óptico hasta la región mamilar, diferenciando cuatro regiones que de rostral a caudal son: región retroquiasmática (desde el quiasma óptico hasta 450 µm por detrás del mismo), región pretallo (ocupa el comienzo del infundíbulo, se extiende caudalmente 450 µm por detrás de la región retroquiasmática), región infundibular o del tallo hipofisario (abarca todo el tallo hipofisario, rostral y caudal al receso infundibular del tercer ventrículo, ocupa aproximadamente 500 µm), región post-tallo o post-infundibular (entendiendo por ella la región que desde el tallo hipofisario llega hasta la región mamilar, ocupa en torno a las 400 µm). Una representación de esta sistematización aparece en la figura 1.

Resultados

Las fibras somatostatinérgicas se hacen evidentes en la eminencia media a partir de la región pretallo de la misma, sin que la región retroquiasmática presente fibras inmunorreactivas. Desde aquí, se distribuyen dorso caudalmente y persisten aún al comienzo de la región post-infundibular, para acabar desapareciendo en dicha región antes de llegar a la región premamilar (fig. 1).

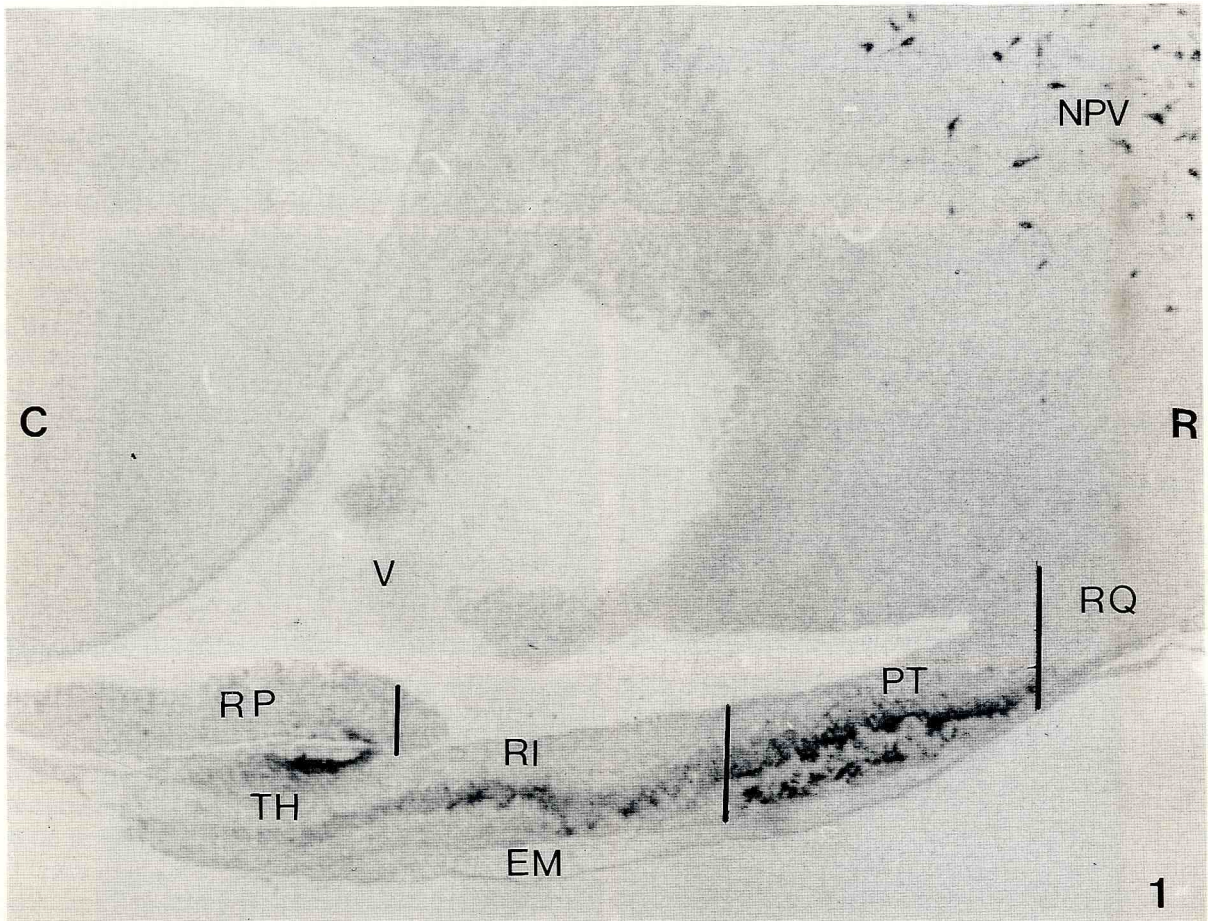
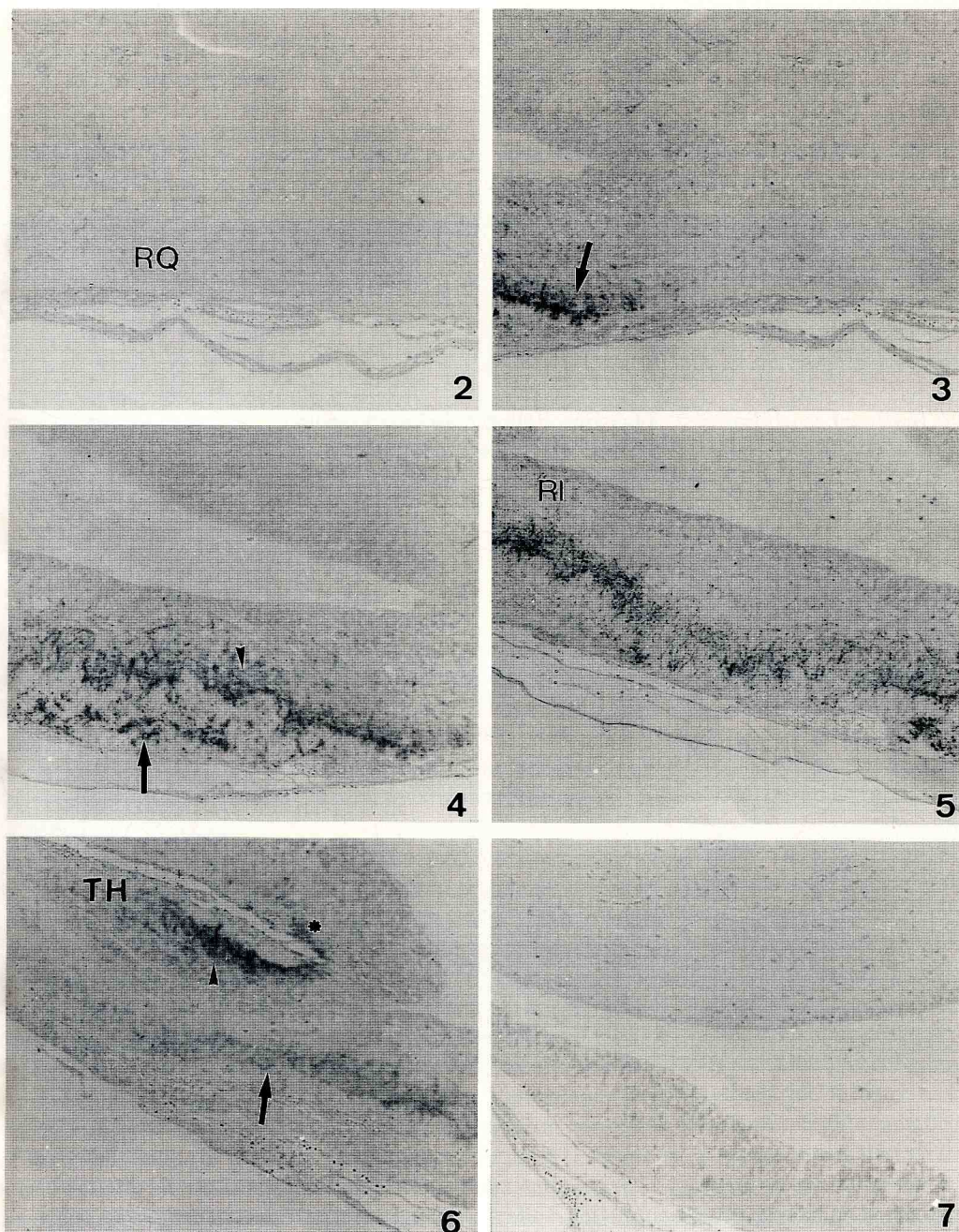


FIGURA 1. Panorámica que muestra la totalidad de la eminencia media rostro (R) caudalmente (C) en un corte parasagital del hipotálamo. NPV: componente periventricular del núcleo paraventricular, V: tercer ventrículo, EM: eminencia media, RQ: región retroquiasmática, PT: región pretallo, RI: región infundibular, RP: región post-infundibular, TH: tallo hipofisario. x60



- FIGURA 2.** Imagen de la porción más rostral de la región retroquiasmática (RQ) de la eminencia media, nótese la ausencia de fibras reactivas. x100
- FIGURA 3.** Imagen de la porción más caudal de la región retroquiasmática e inicio de la región pretallo, en la que se origina la banda fibrilar somatostatínérgica, situada en la zona externa. x100
- FIGURA 4.** Imagen de la región pretallo de la eminencia media en la que se aprecian dos bandas fibrilares, una en la transición de zona interna a zona externa (cabeza de flecha) y otra en la zona externa (flecha). x100
- FIGURA 5.** La región infundibular (RI), en su porción más rostral ya diferencia sólo una banda reactiva (flecha). x100
- FIGURA 6.** El tallo hipofisario muestra dos componentes reactivos, uno rostral (flecha) y otra caudal (cabeza de flecha). Nótese la reacción situada en la porción más rostral de la región post-infundibular (*). x100
- FIGURA 7.** Imagen de la región post-infundibular, en su porción más caudal. Nótese la ausencia de fibras reactivas. x100

La región retroquiasmática, totalmente libre de fibras reactivas (fig. 2) se continúa con la región pretallo en la que en su porción más rostral se evidenciaron algunas fibras reactivas dispuestas en la zona externa (flecha en fig. 3). A lo largo de la región pretallo, estas fibras se hacen más evidentes rostro-caudalmente y se agrupan en una banda irregular que se sitúa en la zona externa próxima a la *pars tuberalis*, para separarse de la misma conforme la eminencia media se hace más caudal situándose más dorsalmente, próxima a la zona interna (cabeza de flecha en fig. 4).

Algo más caudalmente a la aparición de la banda fibrilar descrita, se evidencia una banda fibrilar constituida por conglomerados fibrilares muy reactivos que se dispone ventralmente a la anterior, en la zona externa de la eminencia media, próximos a la *pars tuberalis* y totalmente independizadas de la otra banda (flecha en fig. 4), quedando separadas por una franja no reactiva en la zona externa de la eminencia media, esta banda sólo existe en la región pretallo y desaparece inmediatamente antes de llegar a la región infundibular.

En el tallo hipofisario, la banda reactiva a somatostatina se sitúa en la zona externa de la eminencia media, aunque sin alcanzar el límite basal de la misma en toda su amplitud. Estas fibras son más reactivas ventral que dorsalmente y forman arcadas en torno a los vasos del sistema porta hipofisario (flechas en fig. 5).

La banda es continuación de la banda dorsal de la región pretallo y se continúa por el tallo hipofisario hasta la desaparición del receso infundibular, disminuyendo progresivamente la cantidad de fibras reactivas en la porción rostral del tallo (flecha en fig. 6). No ocurre así en la porción caudal del tallo, en la que persiste una fuerte intensidad de reacción (cabeza de flecha en fig. 6).

La región post-infundibular situada inmediatamente por detrás del tallo hipofisario aún muestra fibras reactivas a somatostatina dispuestas muy basalmente en la zona externa de la eminencia media (asterisco en fig. 6).

La mayor parte de la región post-infundibular no presenta fibras reactivas que desaparecen rostro-caudalmente, de manera que la parte en relación con el receso mamilar aparece libre de reacción (fig. 7).

Discusión

La mayor cantidad de fibras reactivas a somatostatina aparece dispuesta rostralmente al tallo hipofisario lo que coincide con estudios de deafferentación hipotalámica que demostraron que en torno al 80% de las fibras somatostatinérgicas de la eminencia media se originan en regiones rostrales hipotalámicas (Brownstein y col., 1977; Terry y Crowley, 1986).

Esta reacción se hace evidente en el inicio de la región pretallo, justo por detrás del inicio del componente periventricular del núcleo paraventricular, asiento conocido de muchas neuronas productoras de SRIF (Dierickx y Vandesande, 1979; Fisher y col., 1979; Sawchenko y Swanson, 1982; Kawano y Daikoku, 1988; Sawchenko y col., 1988), lo que sugiere que las fibras reactivas observadas en nuestro estudio sean de esta procedencia, principalmente a nivel de la región pretallo, sin que podamos diferenciar por separado el origen de la doble banda reactiva observada en esta región.

Caudalmente, la reacción abarca hasta los límites dorsales del núcleo arcuato, otro núcleo hipotalámico rico en neuronas productoras de SRIF (Brownstein y col., 1975; Kawano y col., 1982; Daikoku y col., 1988).

Esta relación entre la disposición neuronal y la fibrilar corrobora descripciones previas de la proyección hacia la eminencia media y su terminación sobre el sistema porta hipofisario de las fibras somatostatinérgicas (Krisch, 1979; Johansson y col., 1984).

Sin embargo, es comúnmente admitido que las fibras procedentes del componente periventricular siguen una disposición lateral y tras unirse al haz medial del cerebro anterior, siguen un curso rostrocaudal para girar medialmente y, a través del área retroquiasmática lateral, penetran en la eminencia media (Palkovits, 1982) y se sitúan en la zona externa de la misma (Elde y Hökfelt, 1978; Hökfelt y col., 1978; Vale y col., 1980; Makara y col., 1983).

En nuestro estudio hemos comprobado que estas fibras se agrupan por detrás de la región retroquiasmática y que penetran a la eminencia media en la región pretallo.

Además, en dicha región, se agrupan en dos bandas fibrilares distintas, una en la zona externa y otra que desde la porción más basal de la zona externa se aproxima hacia el ventrículo situándose en la encruzijada entre zona

interna y zona externa. Estos hallazgos sugieren una organización más compleja del componente somatostatinérgico de la eminencia media.

La entrada de fibras hacia el tallo hipofisario justifica la aparición de inmunorreacción en el lóbulo neural de la hipófisis (Dierickx y col., 1981), la disposición particular de las fibras sugiere que su origen es común al del resto de las fibras de la eminencia media más rostral.

El componente caudal del tallo hipofisario, podría originarse a partir del núcleo arcuato, situado inmediatamente por fuera del receso infundibular. Aunque Merchenthaler y col. (1989) no fueron capaces de demostrar proyecciones hacia la eminencia media desde las neuronas somatostatinérgicas de dicho núcleo, en su estudio no hacen referencia al tallo hipofisario, ni tampoco a las regiones caudales post-infundibulares, en las que nosotros hemos podido evidenciar la reacción.

La existencia de diferentes niveles de contacto entre las fibras somatostatinérgicas y el sistema porta hipofisario en la eminencia media de la rata macho, podría estar en relación con las distintas funciones hipofisotropas del péptido, regulando la secreción de prolactina (Vale y col., 1974; Saunders y col., 1983), TSH (Harmar y col., 1986; Terry y Crowley, 1986), GH (Millard y col., 1983; Giordano y Giusti, 1987) o ACTH (Richardson y Schonbrunn, 1981; Reisine, 1985).

Agradecimientos

Los autores del trabajo desean agradecer a los Drs. Sánchez-Franco y Cacicedo la cesión gentil del suero anti-Somatostina-28.

BIBLIOGRAFÍA

- ARIMURA, A. y SCHALLY, A.V. (1975): Immunological studies on hypothalamic hormones. En: Hypothalamic hormones: chemistry, physiology, pharmacology and clinical uses. (M. Motta, P.G. Crosignani y L. Martini, eds.) Academic Press, New York, pp.: 27-42.
- BROWNSTEIN, M.; ARIMURA, A.; SATO, H.; SCHALLY, A.V. y KIZER, J.S. (1975): The regional distribution of somatostatin in the rat brain. *Endocrinology*, **96**: 1.456-1.461.
- BROWNSTEIN, M.; PALKOVITS, M.; SAAVEDRA, J.M. y KIZER, J.S. (1976). Distribution of hypothalamic hormones and neurotransmitters within the diencephalon. En: *Frontiers in Neuroendocrinology* (L. Martini y W.F. Ganong, eds.). Raven Press, New York, **4**: 1-23.
- BROWNSTEIN, M.; ARIMURA, A.; FERNÁNDEZ-DURANGO, R.; SCHALLY, A.V.; PALKOVITS, M. y KIZER, J.S. (1977): The effect of hypothalamic deafferentation on somatostatin-like activity in the rat brain. *Endocrinology*, **100**: 246-249.
- DAIKOKU, S.; HISANO, S.; KAWANO, H.; OKAMURA, Y. y TSURUO, Y. (1983). Ontogenic studies on the topographical heterogeneity of somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **233**: 347-354.
- DIERICKX, K. y VANDESANDE, F. (1979): Immunochemical localization of somatostatin neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **201**: 249-259.
- DIERICKX, K.; GOOSSENS, N. y VANDESANDE, F. (1981): The origin of somatostatin fibers in the median eminence and deural lobe of rana remporaria. *Cell Tissue Res.*, **215**: 41-45.
- ELDE, R.P. y HÖKFELT, T. (1978): Distribution of hypothalamic hormones and other peptides in the brain. En: *Frontiers in Neuroendocrinology* (W.F. Ganong y L. Martini, eds.), Raven Press, New York, **5**: 1-33.
- FISHER, A.W.F.; PRICE, P.G.; BUFORD, G.D. y LEDERIS, K. (1979): A three-dimensional reconstruction of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. The neurons projecting to the neuro/intermediate lobe and those containing vasopressin and somatostatin. *Cell Tissue Res.*, **204**: 343-354.
- FRAILES, M.T.; CACICEDO, L.; LORENZO, M.J.; FERNÁNDEZ, G. y SÁNCHEZ-FRANCO, F. (1988): Thyroid hormone action on biosynthesis of somatostatin by fetal rat brain cells in culture. *Endocrinology*, **123**: 898-904.
- GIORDANO, G. y GIUSTI, M. (1987). Participación del sistema nervioso central en la patogénesis de los síndromes de hipo e hipersecreción de la hormona del crecimiento. En: *Neuroendocrinología. Aspectos experimentales y clínicos.* (E.E. Müller, ed.) Asturasa Int, Madrid, pp.: 331-387.

- GRAHAM, G.C. y KARNOVSKY, M.J. (1966): The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 291-302.
- HARMAR, A.J.; PIROTTI, A.R. y LIGHTMAN, S. (1986): Somatostatin. En: *Neuroendocrinology* (Lightman y Everitt, eds.), Blackwell Scientific Pub., Oxford, pp.: 389-408.
- HÖKFELT, T.; EFENDIC, S.; HELLERSTROM, C.; JOHANSON, O.; LUFT, R. y ARIMURA, A. (1975): Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A-cells of the pancreatic islets and the hypothalamus. *Acta Endocrinol.*, **200**: 5-41.
- HÖKFELT, T.; ELDE, R.; JOHANSON, O.; LJUNDGDAHL, A.; SCHULTZBERG, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M.; NILSSON, G.; PERNOW, B.; TERENIUS, L.; GANTEN, D.; JEFFCOATE, S.I.; REHFELD, J. y SAID, S. (1978): Distribution of peptide-containing neurons. En: *Psychopharmacology: A generation of progress*. (M.A. Lipton, A. DiMascio y K.F. Killiam, eds.), Raven Press, New York, pp.: 39-66.
- JOHANSON, O.; HÖKFELT, T. y ELDE, R.P. (1984): Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience*, **13**: 265-339.
- KAWANO, H. y DAIKOKU, S. (1988): Somatostatin-containing neuron systems in the rat hypothalamus: retrograde tracing and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.*, **271**: 293-299.
- KAWANO, H.; DAIKOKU, S. y SAITO, S. (1982): Immunohistochemical studies of intrahypothalamic somatostatin-containing neurons in rat. *Brain Res.*, **242**: 227-232.
- KRISCH, B. (1979): Immunohistochemical results on the distribution of somatostatin-immunoreactive elements in the rat brain. *Cell Tissue Res.*, **195**: 499-513.
- KRULICH, L.; ILLNER, P.; FAWCET, C.P.; QUIJADA, M. y McCANN, S. (1972): Growth and Growth hormone (A. Pelice y E. Muller, eds.). *Exc. Med.*, Amsterdam, pp.: 306-316.
- MAKARA, G.B.; PALKOVITS, M., ANTONI, F. y KISS, J.Z. (1983): Topography of somatostatin-immunoreactive fibers to the stalk-median eminence of the rat. *Neuroendocrinology*, **37**: 1-8.
- MERCHENTHALER, I., SETALO, G.; CSONTOS, C.; PETRUSZ, P.; FLERKO, B. y NEGRO-VILAR, A. (1989): Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*, **125**: 1.812-1.821.
- MILLARD, R.P.; KLAFF, L.J.; BARRON, J.L.; LEVITT, N.S. y LING, N. (1983): Daytime pulsatile growth hormone secretion during childhood and adolescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **55**: 989-994.
- PALKOVITS, M. (1982). Neuropeptides in the median eminence: their sources and destination. *Peptides*, **3**: 299-303.
- PALKOVITS, M.; BROWNSTEIN, M.J.; ARIMURA, A.; SATO, H.; SCHALLY, A.V. y KIZER, J.S. (1976). Somatostatin content of the hypothalamic ventromedial and arcuate nuclei and the circumventricular organs in the rat. *Brain Res.*, **109**: 430-434.
- PELLETIER, G.; LABRIE, F.; PUVIANI, R.; ARIMURA, A. y SACHLLY, A.V. (1974): Electronmicroscopic immunohistochemical localization of growth hormone-release inhibiting hormone (somatostatin) in the rat median eminence. *Ann. J. Anat.*, **140**: 445-450.
- PELLETIER, G.; LECLERC, R.; DUBE, D.; LABRIE, F.; PUVIANI, R.; ARIMURA, A. y SCHALLY, A.V. (1975): Localization of growth hormone-releasing inhibiting hormone (somatostatin) in the rat brain. *Ann. J. Anat.*, **142**: 397-400.
- PELLETIER, G.; DUBE, D. y PUVIANI, R. (1977): Somatostatin: electron microscope immunohistochemical localization in secretory neurons in the rat hypothalamus. *Science*, **196**: 1.469-1.470.
- REISINE, T. (1985): Multiple mechanisms of somatostatin inhibition of adrenocorticotropin release from mouse anterior pituitary tumor cells. *Endocrinology*, **116**: 2259.
- RICHARDSON, S.B. y SCHONBRUNN, A. (1981): Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture. *Endocrinology*, **108**: 281-286.
- SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; RUBIO, M.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VÁZQUEZ, R. (1988): Topographical distribution of vasopressin-producing neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus following adrenalectomy and treatment with colchicine. *Neuroendocrinol. Lett.*, **10**: 165-174.
- SAUNDERS, S.L.; REIFEL, C.W. y SHIN, S.H. (1983): Ultrastructural changes rapidly induced by somatostatin may inhibit prolactin release in estrogen-primed rat adenohypophysis. *Cell Tissue Res.*, **232**: 21-34.
- SAWCHENKO, P.E. y SWANSON, L.W. (1982): Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **205**: 260-272.
- SAWCHENKO, P.E.; BENOIT, R. y BROWN, M.R. (1988): Somatostatin 28-immunoreactive inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei: principal origin from non-aminergic neurons in the nucleus of the solitary tract. *J. Chem. Neuroanat.*, **1**: 81-94.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.Jr.; CUCULIS, J.J. y MEYER, H.G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- STREEFKERK, J.G. (1972): Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 829-831.
- TERRY, L.C. y CROWLEY, W.R. (1986): Regulation of GH and thyrotropin secretion by somatostatin systems in rat brain. *Neuroendocrinology*, **42**: 218.

- VALE, W.; RIVIER, C.; BRAZEAU, P. y GUILLEMIN, R. (1974): Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology*, **95**: 968-977.
- VALE, W.; VAUGHAN, J.; YAMAMOTO, G.; SPIESS, J. y RIVIER, J. (1980): Physiology and pharmacology of hypothalamic regulatory peptides. En : *Handbook of the hypothalamus*. (P.J. Morgane y J. Pankseep, eds.). Academic Press, New York, **2**: 180-190.

Correspondencia: Prof. Dr. J. Carretero
Dpto. Anatomía Humana, Facultad de Medicina
Avda. Campo Charro, s/n.
37007-Salamanca. España

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO-MORFOMÉTRICO DE LA CÉLULA DE PRL TRAS LA ADMINISTRACION CRÓNICA DE TRH Y METIMAZOL

IMMUNOCYTOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC STUDY OF THE PRL-CELL FOLLOWING CHRONIC ADMINISTRATION OF TRH AND METHYMAZOLE

J. CARRETERO, M. RUBIO, F. SÁNCHEZ,, J.J. CABO. J.M. RIESCO,
M. ANGOSO y R. VÁZQUEZ

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca

RESUMEN

Con la finalidad de valorar el comportamiento de la célula de PRL en determinadas circunstancias experimentales relacionadas con la glándula tiroides, se ha realizado un estudio inmunocitoquímico-morfométrico en ratas tratadas crónicamente con TRH o metimazol. El tratamiento con TRH indujo cambios morfológicos más marcados en hembras. En éstas, se observó una clara degranulación indicando una disminución del contenido hormonal. Sin embargo, no se observaron cambios morfométricos ni en machos ni en hembras. En ambos sexos, el tratamineto con Metimazol produjo un aumento de la inmunorreactividad, acompañado por un aumento del área celular ($p < 0.05$), indicando un estado de hipertrofia celular.

PALABRAS CLAVE: PRL, Tiroides, TRH, Metimazol, Rata.

SUMMARY

In order to test the behavior of the PRL-cells in several experimental circumstances involving the thyroid gland, an immunocytochemical-morphometric study was carried out in rats chronically treated with TRH or methymazole. TRH induces morphological changes in PRL-cells, especially in females. In these, a clear degranulation indicating a decrease of the hormonal content was observed. However, no morphometric changes were seen neither in males nor in females. In both sexes, Methymazole lead to an increase of the immunoreactivity accompanied by an increase of the cellular area ($p < 0.05$), indicating a state of cellular hypertrophy.

KEY WORDS: PRL, Thyroid gland, TRH, Methymazole, Rat.

Introducción

Es suficientemente conocido que la TRH (Panerai y col., 1977; Schelinger y col., 1978; Van de Wiel, 1978; Pérez-López y col., 1981; Geras y Gershengorn, 1981; Albert y Tashjian, 1984) y el VIP (Gourdji y col., 1980; Rotsztejn y col., 1980; Enjalbert y col., 1980; Frawley y Neill, 1981), son capaces de estimular la síntesis y liberación de PRL.

Sin embargo, su comportamiento frente a la inmunización pasiva es notablemente diferente. Mientras que no se observan cambios en la inmunización contra TRH en la mayoría de los estados fisiológicos investigados (Fraser y McNeilly, 1983), la inmunización contra VIP induce un marcado descenso en la liberación *in vitro* de PRL (Hagen y col., 1986).

Ambas sustancias presentan receptores para su actuación a nivel de las células lactotropas (McNeilly, 1986) y responden a estímulos de hipotiroidismo.

El descenso de hormonas tiroideas provoca un aumento en los receptores hipofisarios para TRH, específicamente a nivel de las células mamotropas (Peck y Gershengorn, 1980), que descienden tras revertir los niveles hormonales a la normalidad (Hinkle y col., 1981).

Junto a ello, se ha demostrado un origen hipofisario para VIP capaz de estimular PRL (Arnaout y col., 1986; Lam y col., 1990) y que la síntesis de VIP hipofisario se estimula en estados de hipotiroidismo (Segerson y col., 1989; Lam y col., 1990; Lam 1991).

Las técnicas morfométricas, combinadas con las inmunocitoquímicas, se han revelado como un método útil para el estudio de los comportamientos celulares en distintos estados experimentales (Carretero y col., 1991). Por ello, el objeto del presente trabajo es analizar los posibles cambios que acontecen en las células inmunorreactivas a PRL inducidos por el tratamiento crónico de TRH o metimazol.

Material y Métodos

Animales empleados. Para el presente estudio se han empleado 60 ratas Wistar (30 por sexo), sometidos a condiciones estándar de estabulario ($20\pm 2^\circ\text{C}$; h.r.: $50\pm 5\%$; luz: 8.00 a 20.00h; dieta mantenimiento Panlab y acceso libre al agua de bebida) y divididos en 3 lotes ($n=20$, 10 por sexo): 1. Animales no tratados, utilizados como controles, 2. Animales tratados con 15 dosis (1 por día) de $40\ \mu\text{g}$ de TRH administrados por vía intramuscular y 3. Animales tratados con Metimazol, por vía oral, ($0.2\ \text{g}$ por litro, en el agua de bebida), durante 21 días (Stoll y col., 1978). Con el fin de unificar los resultados, mediante frotis se determinó el ciclo estrual de las ratas hembras, utilizándose solamente aquellas que se encontraban en la fase de proestro el primer día del experimento. Transcurrido el periodo de experimentación, los animales fueron sacrificados por decapitación y se les extrajo la hipófisis que fue fijada por inmersión en Bouin-Hollande durante 5 días, posteriormente se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes seriados de $5\ \mu\text{m}$ de grosor para su estudio inmunocitoquímico.

Inmunocitoquímica. El estudio inmunocitoquímico se realizó mediante el proceder de la peroxidasa-antiperoxidasa (Sternberger y col., 1970), de acuerdo con el protocolo y los controles descritos en trabajos previos (Carretero y col., 1988 y 1991), empleando suero de conejo anti-PRL (Dako) a dilución 1:1.000, suero de cerdo anti-Ig G de conejo (Dako), a dilución 1:100, y complejo soluble PAP (Dako), a dilución 1:100.

Morfometría. A partir de micrografías ($\times 5000$) se procedió a calcular las áreas celular, citoplásmica y nuclear de 100 células reactivas por animal (2000 por grupo), elegidas al azar y separadas entre sí al menos por $250\ \mu\text{m}$ mediante un analizador semiautomático de imágenes IBAS-1.

Procesado estadístico. Los valores obtenidos fueron procesados estadísticamente, la tabla 1 muestra las medias aritméticas ($\pm\text{SE}$) y las diferencias observadas entre los distintos grupos de tratamiento fueron analizadas mediante un ANOVA, considerándose significativos valores de $p<0.05$ para el PLSD de Fisher y el Sccheffe-F test, conjuntamente.

Resultados

Hallazgos morfológicos

Las células inmunorreactivas a PRL son muy abundantes en la hembra no tratada y aparecen distribuidas por toda la glándula. Son de forma irregular y muy variable, principalmente ovaladas o poligonales (Fig. 1). Su núcleo,

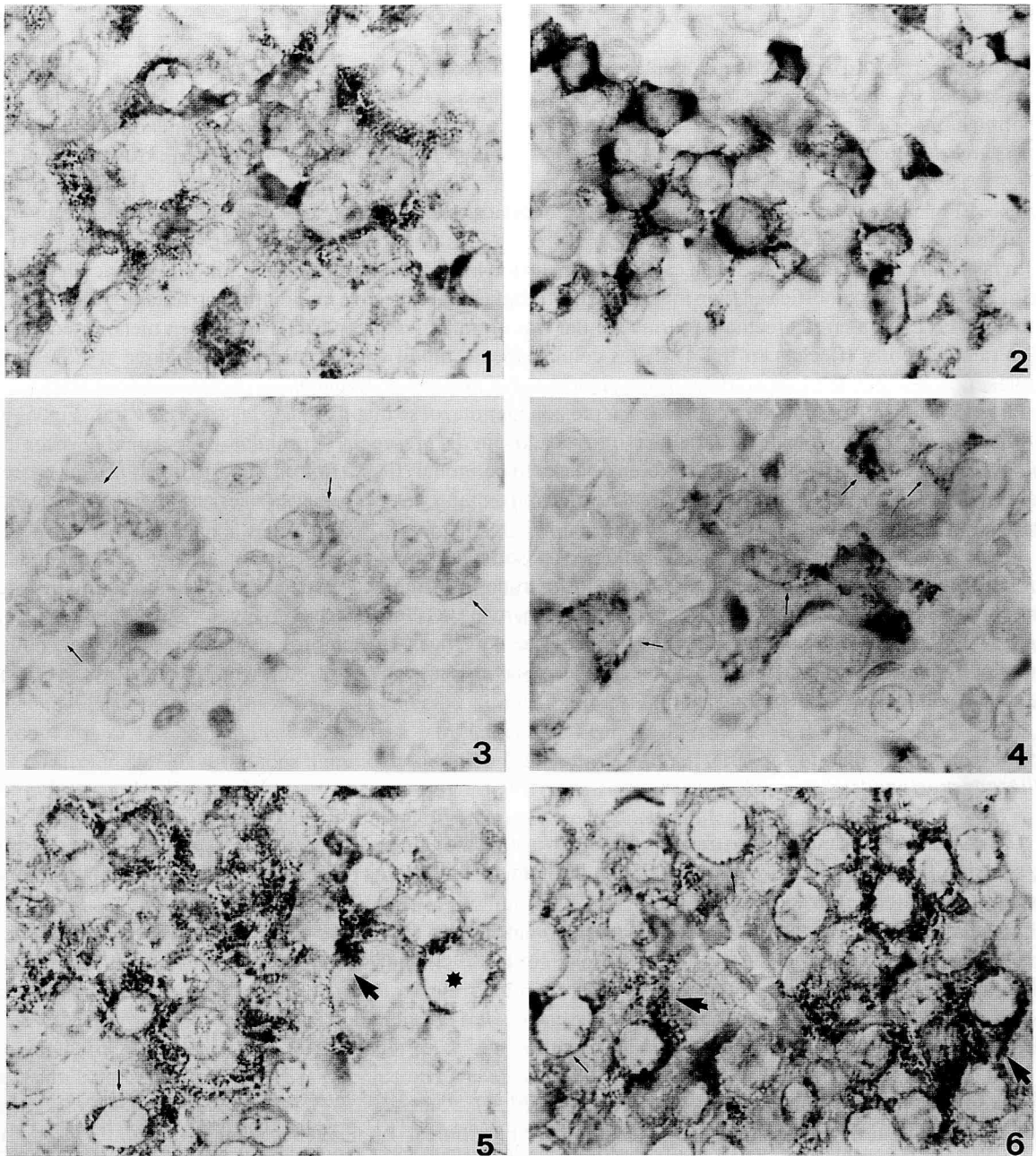


FIGURA 1. Células reactivas a PRL en una hembra normal. (750x).

FIGURA 2. Células reactivas a PRL en un macho normal (750x).

FIGURA 3. Células inmunoreactivas a PRL (flechas) de una hembra tratada con TRH, con un marcado aspecto velado y prácticamente degranuladas (750x)

FIGURA 4. Aspecto de las células inmunoreactivas a PRL (flechas) en los machos después del tratamiento crónico con TRH. Son células de morfología muy variable y con un citoplasma de aspecto granular (750x)

FIGURA 5. Micrografía perteneciente a una hembra tratada con metimazol en la que se observan células muy granulares, de morfología poligonal (flecha fina) o con prolongaciones citoplásmicas gruesas y núcleo polarizado (flecha gruesa). Alguna célula presenta un núcleo gigante (asterisco) (750x).

FIGURA 6. Células reactivas a PRL en un macho tratado con metimazol, algunas con prolongaciones gruesas bien reactivas (flecha gruesa); no es raro observar la presencia de núcleos gigantes (flechas finas). (750x).

relativamente grande, se sitúa en unas células en disposición central y en otras aparece polarizado. El citoplasma es irregularmente reactivo. No es raro observar prolongaciones citoplásmicas de longitud y grosor variable que discurren entre células no reactivas. En los machos (Fig. 2) las células son algo menos numerosas y, al igual que en las hembras, aparecen distribuidas por toda la glándula. Las células reactivas presentan morfología poligonal o en forma de copa con delgadas prolongaciones. La reacción citoplásmica es granular, pero de aspecto compacto y denso. El núcleo es oval o redondeado y suele estar menos polarizado que en las hembras no tratadas.

El tratamiento con TRH produce cambios drásticos en la inmunorreactividad a PRL en la rata hembra (Fig. 3). En las hembras las células aparecen casi sin teñir, siendo muy difícil su diferenciación y delimitación (flechas en fig. 3) si bien no se modifica en gran manera la morfología, con respecto a las hembras no tratadas. En el macho, las células PRL también se afectan de forma similar tras el tratamiento con TRH, aunque en menor medida que en las ratas hembras (flechas en fig. 4). Estas células apenas modifican su morfología, aunque si su reacción citoplásmica, que pierde el aspecto denso observado en los machos no tratados.

El hipotiroidismo provocado por el tratamiento con metimazol se manifiesta en las ratas hembras (Fig. 5) por un aumento de la reacción a nivel celular, provocado por la presencia de células irregulares, a veces con prolongaciones anchas (flecha en fig. 5) o bien de aspecto poligonal (flecha fina en Fig. 5). Su citoplasma aparece total e intensamente reactivo. El núcleo, circular y de gran tamaño, a veces gigante (asterisco en fig. 5), suele estar polarizado y ocupando gran parte de la célula.

En los machos (fig. 6), los cambios morfológicos observados tras el tratamiento con metimazol son parecidos a los descritos para las hembras, desapareciendo los patrones morfológicos existentes en los machos no tratados. Son células con un gran núcleo circular que ocupa gran parte de la célula (flechas en Fig. 6). Su citoplasma es muy reactivo, con un marcado aspecto granular. Al igual que ocurría en las hembras, es frecuente observar, junto a células poligonales, otras con prolongaciones citoplásmicas gruesas con núcleo polarizado (flechas gruesas en Fig. 6) e, incluso, núcleos gigantes (flechas finas en fig. 6).

Hallazgos morfométricos

Las células PRL en animales no tratados presentan un tamaño celular diferente dependiendo del sexo, de forma que son significativamente mayores ($p < 0.05$) en las hembras que en los machos; esta diferencia existe también entre las áreas citoplásmica y nuclear.

En ambos sexos, el tratamiento con TRH no provoca cambios significativos en los parámetros estudiados y, al igual que ocurría en los machos no tratados, todos los parámetros analizados son significativamente menores en los machos que en las hembras ($p < 0.05$).

TABLA 1 Valores morfométricos (μm^2) observados en los distintos grupos de animales estudiados. H: Hembras, M: Machos. *: $p < 0.05$ con respecto a las hembras no tratadas y tratadas con TRH, #: $p < 0.05$ con respecto a las hembras con el mismo tratamiento, °: $p < 0.05$ con respecto a los machos no tratados y a los tratados con TRH, **: $p < 0.01$ con respecto a los machos no tratados y a los tratados con TRH.

	A. CELULAR	A. CITOPLASMICA	A. NUCLEAR
H. No tratadas	90.60 ± 2.27	58.72 ± 2.05	31.88 ± 0.91
H. TRH	92.71 ± 1.98	59.31 ± 1.12	33.40 ± 0.85
H. Metimazol	106.63 ± 1.58*	64.67 ± 1.41	41.96 ± 1.59*
M. No tratados	70.01 ± 2.16#	44.85 ± 1.72#	25.16 ± 0.81#
M. TRH	74.92 ± 2.08#	46.70 ± 1.28#	28.22 ± 0.56#
M. Metimazol	105.94 ± 1.49**	60.24 ± 1.36°	45.70 ± 1.33**

El tratamiento con metimazol induce cambios morfométricos claros, afectando a los tres parámetros estudiados. Así, induce un aumento significativo del tamaño celular en las hembras ($p < 0.05$), siendo aún más llamativo en los machos ($p < 0.01$). Este aumento se debe a un incremento en el área nuclear ($p < 0.05$) en las hembras y a un aumento en las áreas citoplásmica ($p < 0.05$) y nuclear ($p < 0.01$) en los machos. El grado de desarrollo que presentan las células PRL en los machos hipotiroideos provoca que, a diferencia de lo que ocurriría en los animales no tratados o tratados con TSH, no existan diferencias significativas entre machos y hembras.

Discusión

La TRH está considerada como uno de los factores hipotalámicos capaces de estimular la liberación de PRL (Panerai y col., 1977; Schlienger y col., 1978; Van Laedeghem y Van de Wiel, 1978; Pérez-López y col., 1981). Sin embargo, diversos autores cuestionan su actuación, en los machos, tras su administración sistémica (Lu y col., 1972; Stevens y Lawson, 1977; Shin, 1978).

Nuestros resultados demuestran que la TRH, administrada por vía sistémica, es capaz de actuar principalmente en las hembras y, en menor grado, en los machos. La discordancia con los autores anteriormente mencionados puede muy bien deberse a que nuestro estudio analiza la respuesta a un hipertiroidismo inducido por la administración sucesiva de TRH y no la respuesta aguda ante la administración de la hormona.

Desde el punto de vista morfométrico, no se aprecian modificaciones en relación con los animales no tratados, manteniéndose las diferencias sexo dependientes, como lo demuestra la existencia de diferencias significativas observadas entre machos y hembras y concuerda con los hallazgos de otros autores que comprobaron que los estrógenos sensibilizaban a los machos a el efecto estimulador de TRH, lo que podría deberse a distintos niveles de receptor para TRH dependiendo de la tasa estrogénica (De Lean y col., 1977).

En relación con los resultados inmunocitoquímicos obtenidos, éstos sugieren que el tratamiento crónico con TRH induce un descenso del contenido intracelular de PRL, quizás por un descenso del pool hormonal y de la retención de hormona, descrito por otros autores en condiciones de normalidad (Torres y Aoki, 1985; 1987), ya que la degranulación celular parece indicar un aumento en la liberación hormonal.

Está suficientemente documentado que el hipotiroidismo favorece la síntesis adenohipofisaria de VIP (Segerson y col., 1989) y que éste estimula la secreción de PRL (Gourdji y col., 1980; Rotsztein y col., 1980; Enjalbert y col., 1980; Frawley y Neill, 1981). Es posible que éste sea el mecanismo por el que la carencia de hormonas tiroideas, que acontece en el tratamiento con metimazol, provoca una clara hiperactividad en las células mamotropas, como se deduce de los parámetros morfométricos y de los hallazgos inmunocitoquímicos observados por nosotros, al compararlos con los obtenidos en trabajos previos (Carretero y col., 1988; 1989; 1991).

Aunque se ha descrito que los estrógenos refuerzan la síntesis de VIP a nivel hipofisario (Lam y col., 1990), no existen comprobaciones sobre la interacción de éstos y las hormonas tiroideas sobre VIP. En nuestro trabajo hemos observado que el efecto del hipotiroidismo sobre PRL es mucho más marcado en machos que en hembras. Esto podría ser debido a que la actuación de las hormonas tiroideas no sea dependiente de las tasas de estradiol y a que las células mamotropas presenten una mayor actividad en la hembra que en el macho en condiciones de normalidad, por lo que los cambios observados en las primeras sean menos llamativos.

Si bien el descenso de hormonas tiroideas provoca un aumento de receptores hipofisarios para TRH (Hinkle y col., 1981), no parece ser éste el mecanismo de actuación sobre la célula de PRL en el caso del hipotiroidismo inducido por metimazol, ya que la respuesta es muy diferente a la observada tras el tratamiento con TRH, anteriormente comentada y, además, el hipotiroidismo afecta, a machos y a hembras, de forma distinta a como lo hace TRH (Lu y col., 1972; Rivier y Vale 1974; Stevens y Lawson, 1977; Shin, 1978; Piercy y Shin, 1980).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que el hipotiroidismo quizás a través de un efecto paracrino del VIP (probablemente hipofisario), induce una marcada hiperactividad en las células PRL, con un claro aumento de la síntesis hormonal y, probablemente, de su liberación. Este efecto es mucho más evidente en la rata macho que en la hembra. Sin embargo, serán necesarios nuevos trabajos para analizar si el hipotiroidismo inducido por metimazol actúa, sobre las células PRL, exclusivamente a través del VIP hipofisario o si involucra a otros factores reguladores o moduladores de la secreción de PRL.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERT, P.R. y TASHJIAN, A. H. (1984): Relationship of thyrotropin-releasing hormone-induced spike and plateau phases in cytosolic free Ca^{2+} concentrations to hormone secretion. *J. Biol. Chem.*, **259**: 15.350-15.355.
- ARNAOUT, M.A.; GARTHWAITE, T.L.; MARTINSON, D.R. y HAGEN, T.C. (1986): Vasoactive intestinal polypeptide is synthesized in anterior pituitary tissues. *Endocrinol.*, **119**: 2.052-2.057.
- CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VÁZQUEZ, R. (1988): Analysis of immunoreactive PRL-cells following treatment with Met-enkephalin. *Z. mikrok. Anat. Forsch.*, **102**: 711-720.
- CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E.; MAILLO, A.; MONTERO, M. y VÁZQUEZ, R. (1989): Ultrastructural and immunocytochemical modifications of PRL-cells of female rats following chronic and systemic administration of Met-enkephalin. *Anat. Embriol.*, **179**: 243-250.
- CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M.; GONZÁLEZ, R.; y VÁZQUEZ, R. (1991): Estrogenic modulation of met-enkephalin-induced prolactin secretion in rats. *Anat. Embriol.*, **183**: 455-459.
- DE LEAN, A.; FERLAND, L.; DROUIN, J.; KELLY, P.A. y LABRIE, F. (1977): Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinol.*, **100**: 1.496-1.501.
- ENJALBERT, A., ARANCIBIA, S., RUBERG, M., PRIAM, M., BLUET-PAJOT, M.T. ROTSZTEJN, W.H. y KORDON, C. (1980): Stimulation of in vitro prolactin by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinol.*, **31**: 200-204.
- FRASER, H.M. y McNEILLY, A.S. (1983): Inhibition of thyrotropin-releasing hormone by antibodies. In: *Thyrotropin-Releasing hormone*. Eds. GRIFFITHS E.C. and BENNET, G.W. Raven Press, New York. Págs. 179-190.
- FRAWLEY, L.S. y NEILL, J.D. (1981): Stimulation of prolactin secretion in rhesus monkeys by vasoactive intestinal polypeptide. *Neuroendocrinol.*, **33**: 79-83.
- GERAS, E.J. y GERSHENGORN M.D. (1981): Evidence that TSH stimulates secretion of TSH by two calcium-mediated mechanism. *Am. J. Physiol.*, **242**: 109-114.
- GOURDJII, D.; BATAILLE, D.; ROSSELIN, G. y TIXIER-VIDAL, A. (1980): Vasoactive intestinal peptide (VIP) and TRH release PRL by different cellular mechanisms in a rat pituitary cell line (GH 3/B6). En *Central and peripheral regulation of prolactin function*. (McLeod, R.M.; Scapagnini, U.; eds). Raven Press. New York, pp.: 357-360.
- HAGEN, T.C.; ARNAOUT, M.A.; SCHERZER, W.J.; MARTINSON, D.R. y GARTHWAITE, T.L. (1986): Antisera to vasoactive intestinal peptide inhibits basal prolactin release from dispersed anterior pituitary cells. *Neuroendocrinol.*, **43**: 641-645.
- HINCKLE, P.M.; PERRONE, M.H. y SCHONBRUNN, A. (1981): Mechanism of thyroid hormone inhibition of thyrotropin-releasing hormone action. *Endocrinol.*, **108**: 199-203.
- LAM, K.S.L.; SRIVASTAVA, G.; LECHAN, R.M. y REICHLIN, T.L.S. (1990): Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Endocrinol.*, **52**: 417-421.
- LAM, K.S.L. (1991): Vasoactive intestinal peptide in the hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinol.*, **53**: 45-51.
- LU, K.H.; SHAAR, C.J.; KORTRIGHT, K.H. y MEITES, J. (1972): Effects of synthetic TRH on in vitro and in vivo prolactin release in the rat. *Endocrinol.*, **91**: 1540-1545.
- McNEILLY, A.S. (1986): Prolactin. In: *neuroendocrinology*. Eds. LIGHMAN, S.T. and EVERITT, B. Blackwell Scientific Publications. London. Págs. 538-562.
- PANERAI, A.E.; GIL-AD, I.; COCHI, D.; LOCATELLI, V.; ROSSI, G.L. y MULLER, E.E. (1977): Thyrotrophin releasing hormone-induced growth hormone and prolactin release. *Physiological studies in intact rats and in hypophysectomized rats bearing an ectopic pituitary gland*. *J. Endocrinol.*, **72**: 301-311.
- PECK, V. y GERSHENGORN, M. (1980): Differential regulation of thyrotropin releasing hormone receptors in neoplastic rodent mammatropic-adrenocorticotropic and thyrotropic cells in culture. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **50**: 1.144-1.156.
- PÉREZ-LÓPEZ, F.R.; AGUDO, G.G. y ABOS, M.D. (1981): Serum prolactin and thyrotrophin responses to thyrotrophin releasing hormone at different times of the day in normal women. *Acta Endocrinol.*, **97**: 7-11.
- PIERCY, M. y SHIN, A.R. (1980): Comparative studies of prolactin secretion in estradiol primed and normal male rats induced by ether stress, pimoziide and TRH. *Neuroendocrinol.*, **31**: 270-275.
- RIVIER, C. y VALE, W. (1974): In vivo stimulation of prolactin secretion in the rat by thyrotropin releasing factor, related peptides and hypothalamic extracts. *Endocrinol.*, **95**: 978- 983.
- ROTSTEJN, W.H.; BENOIST, L.; BESSON, J.; BERAUD, G.; BLUET-PAJOT, M.T.; KORDON, C.; ROSSELLIN, G. Y DUVAL, J. (1980): Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the release of adenohipophyseal hormones from purified cells obtained by unit gravity sedimentation. Inhibition by dexamethasone of VIP-induced prolactin release. *Neuroendocrinol.*, **31**: 282-286.
- SCHLIENGER, J.L.; JAQUES, C.; DEMANGEAT, C.; SAPIN, R. IMLER, M. (1978): Responses anormales de TSH, PRL et GH après TRH au cours de la cirrhose évoluée. *Ann. Endocrinol.*, **39**: 245-247.
- SEGERSON, T.P.; LAM, K.S.L.; CACICEDO, L.; MINAMITANI, N.; FINK, J.S.; LECHAN, R.M. y REICHLIN, S. (1989): Thyroid hormone regulates vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA levels in the rat anterior pituitary gland. *Endocrinol.*, **125**: 2221-2223.
- SHIN, S.H. (1978): Blockage of the ether-induced surge of prolactin by naloxone in male rats. *J. Endocrinol.*, **79**: 397-398.

- STERNBERGER, L.A.; HARDY Jr, P.H.; CUCULIS, J.J.; y MEYER, H.G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- STEVENS, R.W. y LAWSON, R.D. (1977): The influence of estrogen on plasma prolactin levels induced by thyrotropin releasing hormone (TRH), clonidine and serotonin in ovariectomized rats. *Life Sci.*, **20**: 216-266.
- TORRES, A.I. y AOKI, I. (1985): Subcellular of morphine on serum growth hormone, cortisol, prolactin and thyroid stimulating hormone in man. *J. Endocrinol. Metd.*, **41**: 797-800.
- TORRES, A.I. y AOKI, I. (1987): Isolation of two different pools of pituitary prolactin. *Acta Endocrinol.*, **107**: 25-31.
- VAN LANDEGHEM, A.A.J.; y VAN DE WIEL, D.F.M. (1978): Radioimmunoassay for porcine prolactin plasma levels during lactation suckling and weaning and after TRH administration. *Acta endocrinol.*; **88**: 653-667.

Correspondencia: Prof. Dr. J. Carretero
Dept. Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca
37007. Salamanca. España

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS ARTERIAS INTRACRANEALES HUMANAS*
ULTRAESTRUCTURAL STUDY OF THE INTRACRANIAL HUMAN ARTERIES

P. DÍAZ, A. TORRES, J. WHYTE, J.J. CABRERA, F. LOSTALÉ y R. SARRAT

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza
Departamento de Morfología. Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud. Universidad de Las Palmas

RESUMEN

Se ha estudiado la estructura de las arterias intracraneales de 20 individuos, con edades comprendidas entre el nacimiento y la séptima década, en los que se descartó la existencia de patología vascular, incidiéndose en el papel de los factores tisulares locales como posibles condicionantes de la susceptibilidad de determinados tramos arteriales, para el asentamiento de la placa de ateroma.

A una intensa producción de colágena se añaden, por encima de la tercera década, la proliferación y las alteraciones en la estructura de la lámina limitante elástica interna y la aparición de figuras intracitoplasmáticas, de probable carácter degenerativo, en las fibras musculares lisas.

PALABRAS CLAVE: Arterias intracraneales. Ultraestructura. Humano.

SUMMARY

It has been studied the arterial structure of the intracranial arteries in twenty subjects without pathological changes inside the arterial tree. The tisular local factors and their involvement on the development of atheromatous plaque were revised.

A great production of colagena and some important alterations of the elastic interna lamina were seen inside the arteries that supply blood to the Central Nervous System. Some smooth muscle cells showed degenerative-like figures.

KEY WORDS: Intracranial arteries. Ultrastructure. Human.

Introducción

Es bien conocida la predilección de la placa de ateroma por iniciar su desarrollo, no sólo en determinadas ramas del lecho arterial aorto-craneal sino, mas en concreto, en tramos específicos dentro de las mismas. Destacan en este

* Este trabajo ha sido realizado con la subvención del Proyecto de Investigación de la DGA nº 213-18

sentido las bifurcaciones, las zonas de angulaciones y aquellas que presentan irregularidades en la superficie endotelial. De entre los vasos del lecho carotídeo, el segmento intracraneal de las arterias carótidas internas, el tramo inicial de la arteria cerebral media y los segmentos postcomunicantes de las arterias cerebrales anteriores son las zonas con mayor precocidad en el depósito de ateroma. Más difusa es la ubicación de las lesiones ateromatosas en los vasos del territorio vértebro-basilar, destacando la confluencia de las arterias vertebrales y el origen de las comunicantes posteriores (Toole., 1990).

Los diferentes mecanismos patogénéticos que se han propuesto para explicar el depósito de lípidos y la proliferación de la pared arterial subyacentes a la arterioesclerosis (mutaciones en respuesta al *stress* o infecciones virales crónicas; vasoespasmos que lesionan los *vasa vasorum* induciendo neovascularización, depósito de sustancias circulantes y proliferación), no aclaran la gran variedad en la extensión y la severidad con que la arterioesclerosis se presenta en los diferentes lechos y segmentos arteriales dentro de un mismo individuo. Dos factores se implican en esta variación: sistémicos (hipercolesterolemia) y locales tisulares (morfología y disposición del segmento arterial afecto que determinen la alteración del flujo laminar) (Ross, 1986). Es este último, la organización de los distintos elementos que componen las tres tunicas arteriales y su evolución en el individuo sin patología arterial, el que abordamos en este estudio centrándonos, fundamentalmente, en los grupos de edad con mayor incidencia de lesiones ateromatosas esto es, por encima de la tercera década de vida.

Material y Métodos

Se extrajeron, en 20 necropsias de individuos con edades comprendidas entre el nacimiento y la séptima década, las arterias del Polígono de Willis y segmentos iniciales, medios y distales de los vasos cerebrales anteriores, medios y posteriores así como la arteria basilar y las arterias vertebrales, en su tramo intracraneal. Las piezas se fijaron, por inmersión, en una solución de glutaraldehído al 1% en tampón fosfato 0.1 M. a pH 7,2-7,4. Se procesaron con las técnicas habituales para microscopía electrónica de transmisión: postfijación con tetróxido de osmio al 1%, deshidratación en alcoholes a concentraciones crecientes y óxido de propileno, contraste con acetato de uranilo en solución acuosa al 2%, e inclusión en Epon 812.

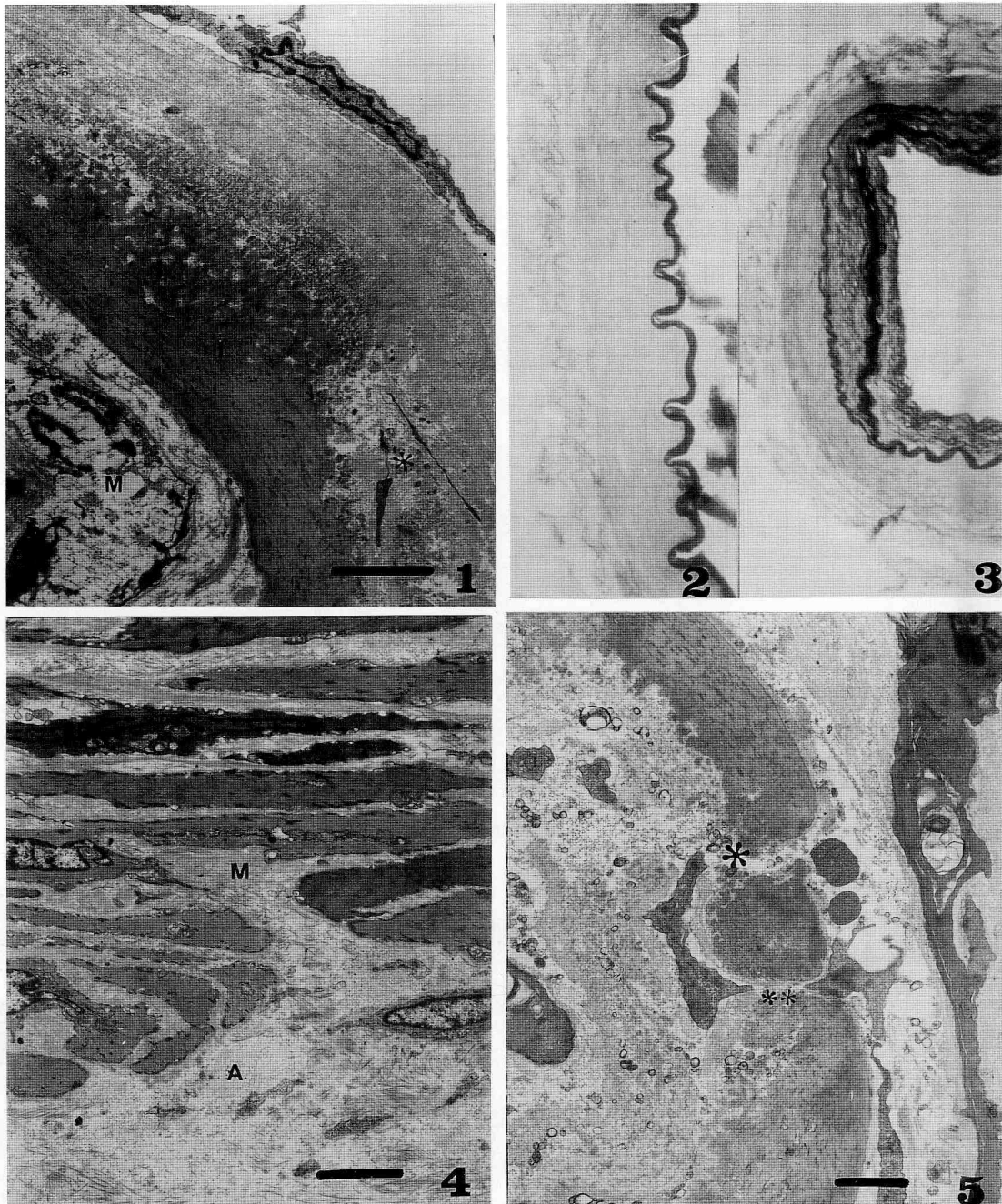
Se obtuvieron secciones semifinas, control, de 1µm. que se contrastaron con azul de toluidina. Las secciones ultrafinas, recogidas en rejillas de cobre, se contrastaron con citrato de plomo y se estudiaron con un M.E. Philips 301.

Paralelamente se tomaron, de las mismas arterias, segmentos adyacentes, de aproximadamente 1 cm., que se fijaron con formaldehído, deshidrataron en alcoholes e incluyeron en parafina. Cortes de 10 µm fueron teñidos con el método de Orceina para fibras elásticas.

Resultados

Las arterias intracraneales estudiadas, tanto las ramas derivadas de la carótida interna como las subsidiarias del territorio vertebral, en las que se distinguen, a pesar del escaso espesor parietal, las tres tunicas arteriales clásicas, íntima, media y adventicia (figs. 1-4) se muestran, antes de la tercera década de la vida y en ausencia de patología, como vasos de pared delgada, en los que la que la túnica media ocupa casi todo el espesor parietal, siendo escasa la adventicia que se continúa sin delimitación, por ausencia de limitante elástica externa, con la túnica central del vaso. La membrana elástica interna, en todos los casos gruesa y compacta, subyace en estrecha proximidad, con el endotelio por la falta de un espacio subintimal aparente (fig. 2).

A partir de los 30 años y, en ocasiones algo antes, con segmentos arteriales que responden a la descripción precedente y, a menudo coexistiendo en la misma sección, es frecuente encontrar un espacio intimal ensanchado que puede estar formado por láminas elásticas paralelas que, en ocasiones, alcanzan un espesor mayor que el de la propia limitante interna (fig. 3). Como se observa en la arteria cerebral anterior de la figura 1, una sustancia de



- FIGURA 1.** Membrana elástica interna que pierde su homogeneidad en su extremo yuxtaluminal. Prolongaciones celulares pertenecientes a fibroblastos (*). Arteria cerebral anterior. 8.600 A. Barra 2 m μ .
- FIGURA 2.** Membrana elástica interna y ausencia de espacio subintimal. Arteria cerebral media. ORCEINA 40x.
- FIGURA 3.** Engrosamiento intimal difuso de la arteria silviana con abundancia de laminillas elásticas. Nótese el espesor de la membrana elástica que divide el engrosamiento en dos subcapas. ORCEINA. 40x.
- FIGURA 4.** Túnica media con alternancia de fibras musculares lisas y espacios intercelulares con fibras de colágena (M). Adventicia constituida casi exclusivamente por fibras de colágena (A). Arteria cerebral anterior. 2.600x. Barra 0.5 m μ .
- FIGURA 5.** Defectos de la membrana limitante interna (*) con la presencia de células musculares lisas en estrecha proximidad. Arteria cerebral anterior. 11.200x. Barra 1 m μ .

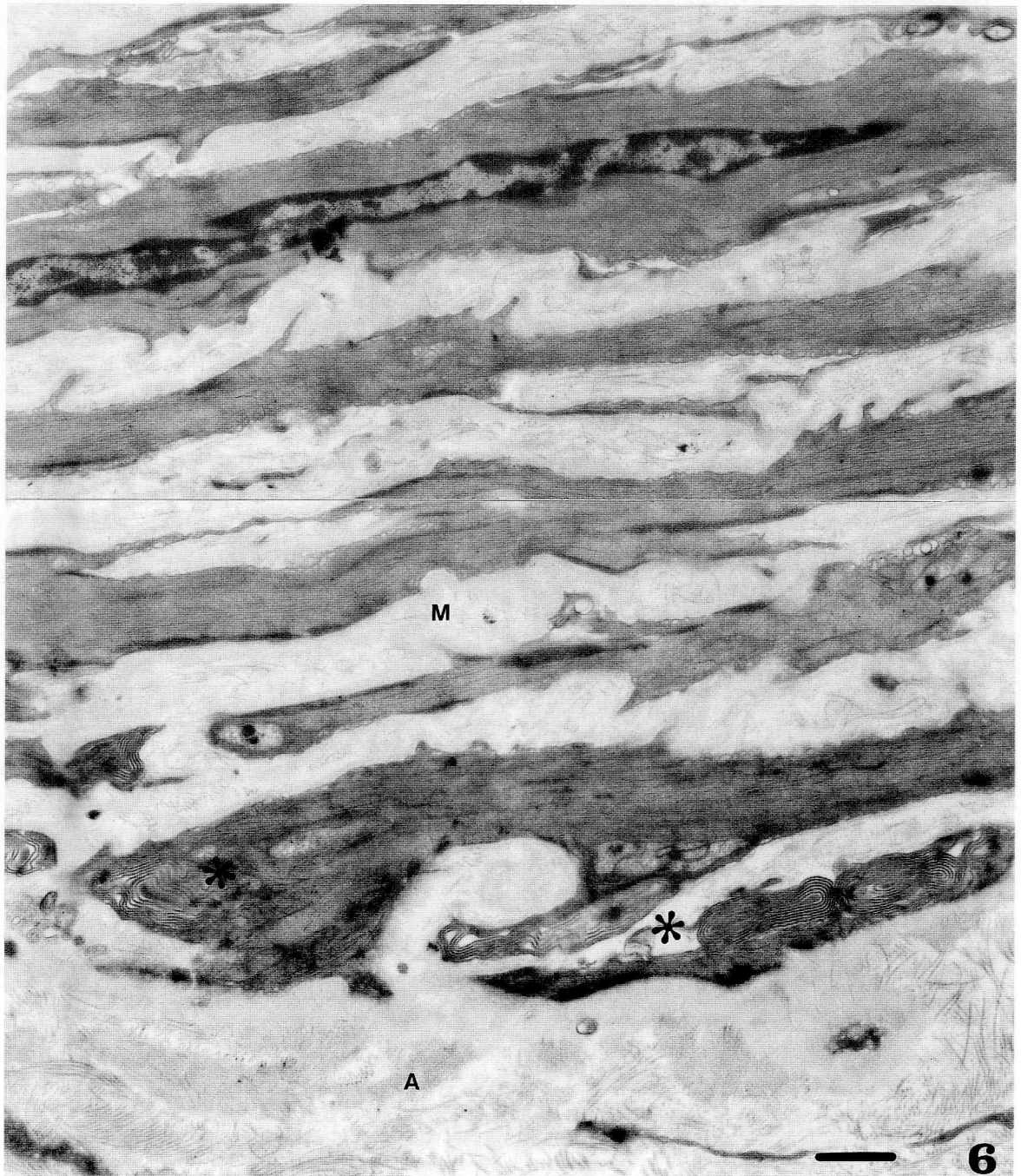


FIGURA 6. Estructuras pseudomielinoides en las células musculares lisas mediales (*). 17.200x. Arteria cerebral anterior. Barra 1 μ .

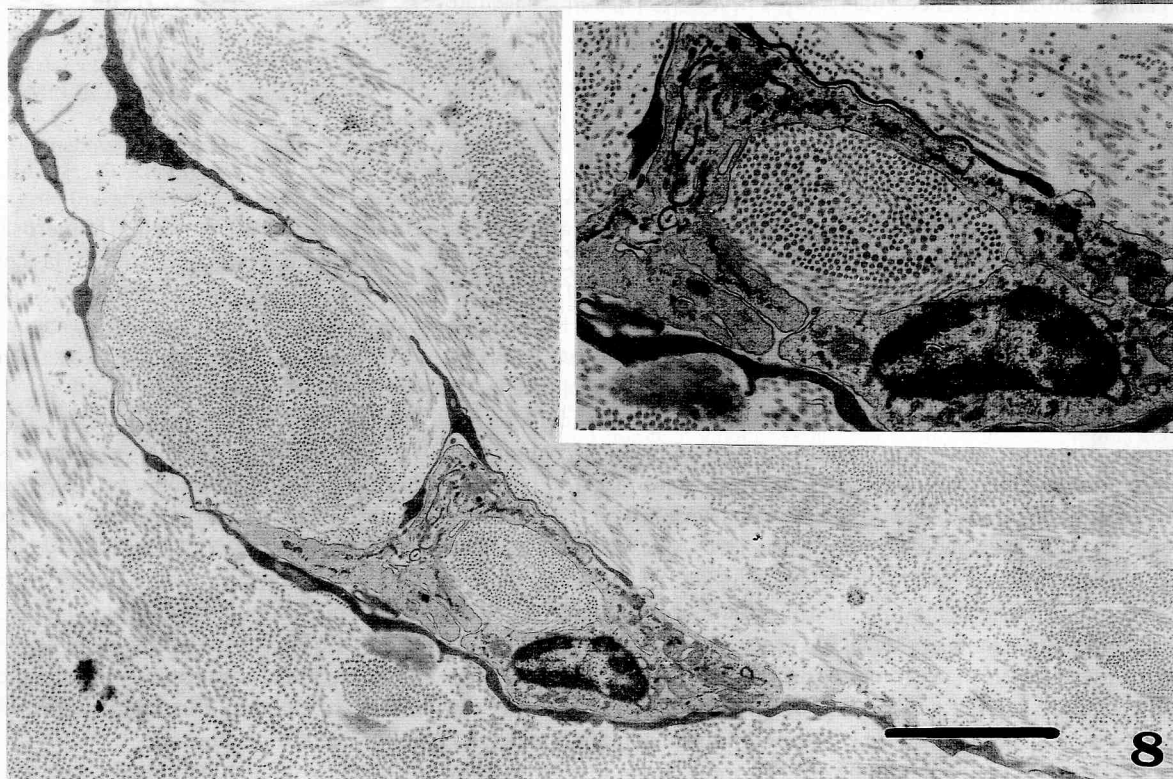
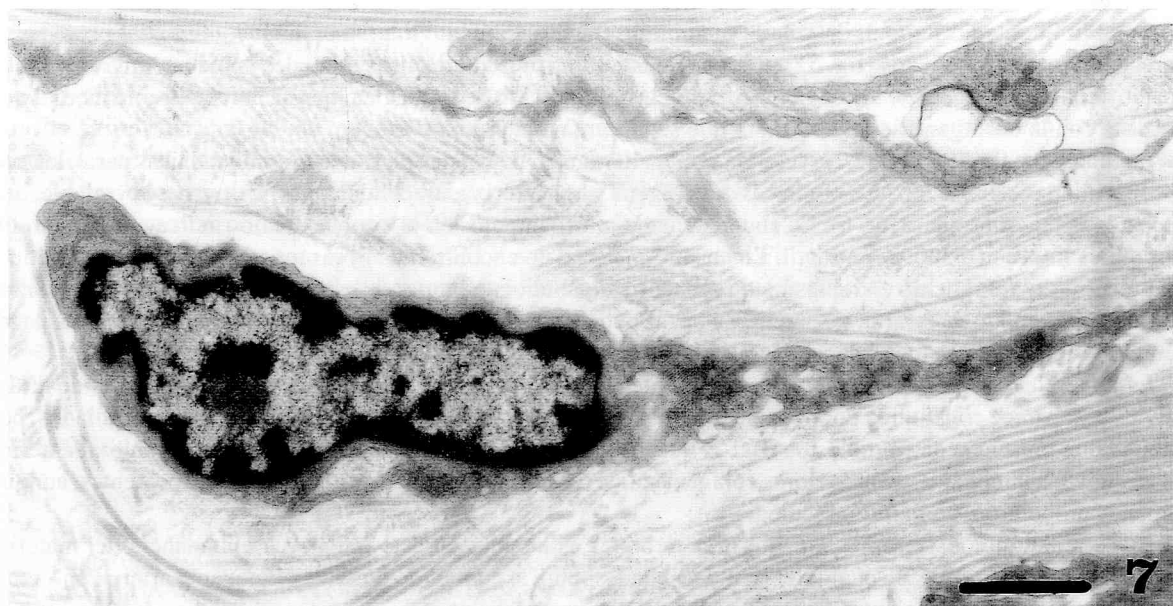


FIGURA 7. Fibroblasto rodeado de haces de fibras colágenas en la adventicia de una arteria cerebral media. 17.200x. Barra 1 μ .

FIGURA 8. Fibroblasto que incluye un paquete de fibras de colágena. Arteria basilar. 23.600x. Barra 1 μ .

aspecto amorfo que, en parte, parece derivar de la degeneración de la limitante interna, puede constituir el elemento predominante de la íntima. Si bien hemos detectado una menor proporción de fibras musculares lisas intimaes, en comparación con vasos de calibre similar, contrariamente a estos, es frecuente encontrar numerosas prolongaciones celulares finas pertenecientes a fibroblastos (fig. 1*).

En el límite medio intimal, destaca la membrana elástica limitante interna en la que, como dato constante, aparecen numerosos defectos (fig. 5*) por los que las fibras musculares lisas mediales parecen emigrar hacia el espacio subintimal (fig. 5**). Es de notar la perfecta delimitación de la elástica interna en su extremo medial que contrasta con la desorganización de la cara que se enfrenta a la íntima (fig. 1).

La túnica media (fig. 4M) se caracteriza por la alternancia de bandas de fibras musculares lisas paralelas con espacios intercelulares ocupados por haces de colágena y una matrix extracelular amorfa, de espesor variable, que rodea a la célula muscular (fig. 6). La abundancia de miofilamentos en el citoplasma nos indica que las células musculares lisas son del tipo contráctil. En nuestro material no encontramos fibras musculares del tipo sintético, con predominio del retículo endoplásmico rugoso. Es de notar, en algunas de estas células (fig. 6*) la presencia de imágenes, a modo de espiral, que recuerdan a las cubiertas mielínicas de los nervios. Estas figuras, de aspecto pseudomieliinoide, parecen ser dependencias del citoplasma y podrían tener un carácter degenerativo.

La adventicia (figs. 7-8), de carácter netamente fibroso, aumenta su espesor conforme avanza la edad del individuo y aparece constituida por paquetes de fibras colágenas. Destaca esta túnica, en los vasos estudiados, por la abundante presencia de fibroblastos (fig. 7) que, en ocasiones, como se observa en la arteria cerebral anterior de la figura 8, aparece sintetizando fibras colágenas. Los fibroblastos se encuentran igualmente presentes, aunque en menor proporción, en la íntima y media.

Es de notar, si consideramos las arterias cerebrales estudiadas en este trabajo, la abundancia del material fibroso de estos vasos que, en cualquier grupo de edad, supera al contenido de este componente arterial en vasos, de calibre similar, pertenecientes a otros niveles del sistema vascular.

Discusión

Las arterias que aportan oxígeno y nutrientes al encéfalo se muestran como estructuras frágiles con numerosas peculiaridades que las diferencian del resto del sistema arterial. Su ausencia de lámina elástica limitante externa (Hassler, 1962a), la frecuente presencia de defectos mediales (Berry, 1973) y la importancia de los trastornos patológicos que sufren, entre los que destacan las hemorragias o las isquemias, bajo las que subyacen los aneurismas y las obstrucciones, generalmente arteriomatosas respectivamente, son prueba de esta debilidad, y justificación sobrada para que se insista en el estudio de los distintos elementos, celulares e intercelulares, que integran las túnicas vasculares.

Es de notar la organización estructural de la región intimal que presenta, con más frecuencia, engrosamientos intimaes difusos (fig. 3) que contornean todo el perímetro luminal. Los engrosamientos intimaes excéntricos, término que propone la *American Heart Association* [AHA] (1991), con criterios de unificación terminológica, para sustituir términos como cojinetes endoarteriales, *pads o polster*, son escasos en el territorio vascular que nos ocupa. La poca frecuencia de estas estructuras, consideradas reguladores del flujo vascular (Takayanagi y col., 1972) y, por tanto, de carácter fisiológico, es una muestra más de la pobreza de mecanismos defensivos de estos vasos contra el *stress* hemodinámico que, indudablemente, ha de sufrir un territorio vascular de caudal tan intenso. Corroboramos este hecho la organización de estos engrosamientos intimaes (fig. 1). En ellos no se distingue la bicapa, externa musculo-elástica e interna o de los proteoglicanos (AHA, 1991), que se sustituye por un tejido amorfo que, en otros estudios (Díaz y col., 1988) hemos identificado como mucosustancias altamente sulfatadas, presentes en tramos vasculares y arterias de especies animales con alta incidencia en el desarrollo de ateroma.

Los defectos de la membrana elástica interna, por otra parte vigorosa, son una imagen habitual de los vasos cerebrales. Estas soluciones de continuidad, por los que parecen emigrar las fibras musculares lisas hacia la íntima, contribuyendo a su engrosamiento (fig. 5), sumadas a la casi ausencia de material elástico, en el resto de la pared, dificultan la capacidad de distensión del vaso (Berry, CL, 1973) y, por tanto, dificultan su acomodación a las variaciones del flujo sanguíneo.

Llama la atención la abundante presencia, en las tres tunicas parietales, de las fibras de colágenas (figs. 4,7 y 8) que se incrementan con la edad en una proporción mayor al de los otros niveles arteriales del sistema vascular. Este colágeno fundamentalmente del tipo I (Gay y col, 1975), relacionado con el incremento de la edad, proporciona a la pared una rigidez, manifiesta en la friabilidad de estos vasos durante la manipulación en el laboratorio y disminuye la capacidad de adaptabilidad de estas arterias frente a las incidencias de la dinámica sanguínea.

Las fibras musculares lisas, del tipo contráctil, presentes en la media y en menor número en la íntima, constituyen el elemento celular mayoritario de la pared vascular y, en el material estudiado presentan, como detalle morfológico más llamativo la formación, en el citoplasma, de estructuras espiralizadas (fig. 6) que podrían tener un carácter degenerativo al igual que los depósitos de lípidos, detritos celulares y la presencia de vesículas autofágicas descritas por Dilley y col. (1987).

Valorando conjuntamente la pared de los vasos constituyentes del Polígono Arterial de Willis y las grandes ramas que emergen de él, cerebrales anteriores, medias y posteriores, hemos de concluir que poseen, a nuestro criterio, una de las organización estructurales más frágiles que justifica, en parte, la importante y frecuente patología que sufren.

BIBLIOGRAFÍA

- AKITA, M.; HO LEE, S. y KANEKO, K. (1992): Electron microscopic observations of elastic fibres in the lung and aorta of tight-skin and beta-aminopropionitrile-fed mice. *Histol. Histopath.*, **7**: 39-45.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION SAC (STEERING COMMITTEE) (1991): A definition of intima of human arteries and its atherosclerosis-Prone Regions. *Arteriosclerosis and thrombosis*, **12(1)**: 120-134.
- BERRY, C.L. (1973): The establishment of the elastic structure of arterial bifurcation and branches. Its relevance to medial defects of cerebral arteries. *Arteriosclerosis*, **18**:117-123.
- CAMPBELL GR. y CHAMLEY-CAMPBELL JH. (1981): The cellular pathobiology of atherosclerosis. *Pathology*, **13**: 423-440.
- DILLEY RJ.; McGEACHIE JK y PREDERGAST, FJ. (1987): A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Artherosclerosis*, **63**: 99-107.
- DÍAZ, P., TORRES, A, y SARRAT, R. (1986): Constitución anatómica de las arterias del sistema nervioso central. *Revista de Investigación. Colegio Universitario de Soria*, **10(2)**: 49-57.
- DÍAZ, P.; TORRES, A. y SARRAT, R. (1988): Organización parietal del territorio vascular vértebro-basilar. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Anatómica Española. Libro de actas 82-83.
- GAY, S.; BALLEISEN, L.; REMBERGER, K.; FIETZEK, P.; ADELMANN, BC. y KÜHN, K. (1975): Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes, incubated with collagen in vitro. *Klin Wochenschr.*, **53**: 899-902.
- GREENLEE TK.; ROSS, R. y HARTMAN JL. (1966): The fine structure of elastin fibers. *J. Ceell Biol.*, **30**: 59-454.
- HASSLER, O. (1962a): The external elastic layer of the cerebral arteries in different age groups. *Acta Ana.*, **48**: 1-4.
- HASSLER, O. (1962b): Medial defects in intracerebral arteries. *Acta Neur Scand.*, **8**: 29-32.
- KLING, D.; LINDNER, V. y BETZ, E. (1989): Intimal Thickenings of yugular veins after application of a stimulus known to be sclerogenic in arteries. *Virchows Archiv A Pathol Anat.*, **415**: 367-375
- ROSS, R. (1986): The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N. Engl. J. Med.*, **314**: 488-500.
- SLOMP, J.; VAN MUNSTEREN, J.C.; POELMANN, R.E.; REEDER; BORGERS, A.J.J.C. y GITTENBERGER-DE GROOT, A.C. (1992): Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Artherosclerosis*, **93**: 25-39.
- STEBBENS, WE. (1965): Intimal proliferation and spontaneous lipid deposition in the cerebral arteries of sheep and steers. *J. Artherosclerosis Res.*, **5**: 556-568.
- TAKAYANAGI, T.; RENNELS, M.L. y ERLAND, N. (1972): An electron microscopic study of intimal cushions in intracranial arteries of the cat. *Am. J. Anat.*, **133**: 415-429.
- TOOLE, J.F.: *Cerebrovascular Disorders*. Fourth edition. Raven Press. New York.

Correspondencia:
P. Díaz Herrera
Dto. Morfología
Universidad de Las Palmas
Las Palmas de Gran Canaria. España

FOTOCONVERSIÓN DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE DEL CEREBELO TRAS LA ADMINISTRACIÓN EN VENTRÍCULO LATERAL DE *PROPIDIUM IODIDE*

PHOTOCONVERSION OF THE PURKINJE CELLS OF THE CEREBELLUM FOLLOWING INTRAVENTRICULAR (LATERAL VENTRICLE) ADMINISTRATION OF *PROPIDIUM IODIDE*

**J.A. JUANES(1), S. CHEN, (2), M. BENTIVOGLIO (3), J.M. RIESCO (1),
F. SÁNCHEZ (1) y R. VÁZQUEZ (1)**

(1) Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca (España).

(2) Department of Human Anatomy. Human Medical University Changsha. People's Republic of China.

(3) Istituto di Anatomia Umana. Facoltà di Medicina. Università di Verona (Italia)

RESUMEN

Se realiza un estudio de las células de Purkinje mediante fotoconversión, tras la administración de *propidium iodide* en ventrículo lateral de la rata.

La inyección de *propidium iodide* provocó en el animal un comportamiento caracterizado por ataxia y nistagmo, además del marcaje, mediante transporte axonal retrógrado, de una hilera de células de color rojo intenso, entre la capa molecular y la capa granular, correspondientes a las neuronas de Purkinje, tras la observación de las secciones al microscopio fluorescente.

Realizamos la fotoconversión de *propidium iodide* en las células de Purkinje, como producto de reacción estable de la diaminobenzidina, mediante la excitación apropiada (550 nm) de emisión fluorescente, siendo positiva tras 80 minutos de exposición, observando en el citoplasma de estas células la presencia de gránulos oscuros por la reacción de la diaminobenzidina; en ocasiones fue visible la porción inicial del axón de estas células, débilmente marcado.

PALABRAS CLAVE: Células de Purkinje, *Propidium iodide*, Fotoconversión, Diaminobenzidina, Rata

SUMMARY

By means of the photoconversion method, a study of the Purkinje cells following intraventricular administration (lateral ventricle) of *propidium iodide* was carried out.

Propidium iodide administration induced in the animal a behaviour characterized by ataxia and nistagmus. Additionally, by means of axonal retrograd transport, an intense red coloured labelling of a row of cells, located between the molecular and granular layers (corresponding to the Purkinje cells), was observed (after the visualization of the slides with the fluorescent microscope).

Photoconversion of the *propidium iodide* in the Purkinje cells was developed as a product of stable reaction of the diaminebenzidine, by means of adequate excitation of fluorescent emission (550 nm), being positive after 80 minutes of exposition. In the cytoplasm of these cells the presence of dark granules due to the diaminebenzidine reaction was noticed; occasionally, the initial part of the axon of these cells slightly labelled was observed.

KEY WORDS: Purkinje cells, *Propidium iodide*, Photoconversion, Diaminebenzidine, Rat.

Introducción

El cerebelo constituye uno de los mejores ejemplos de ordenamiento de las conexiones neuronales en el sistema nervioso. Recibe señales de diversas estructuras sensoriales de los músculos, la piel y las articulaciones, de la corteza visual y auditiva, etc. (Gould, 1979; Anshavsky y col., 1983).

Toda la información la manejan agrupamientos celulares compuestos por un pequeño número de tipos celulares: *células granulosas*, *células en cesta*, *células estrelladas* y *células de Golgi*; y, todas ellas, actuando sobre las *células de Purkinje*.

La citología cerebelosa se viene estudiando desde hace casi un siglo, recibiendo un nuevo impulso en las últimas décadas con el desarrollo de las técnicas de trazado de transporte axonal retrógrado.

El marcador fluorescente *propidium iodide* (PI) ha sido usado, como trazador retrógrado, para el estudio de vías en el sistema nervioso durante los últimos años (Kuypers y col., 1979; Fallon, 1981; Kohler y col., 1982; Woolf y col., 1983; Holtman y col., 1984; Pireau y col., 1984). Utilizando la técnica de la *fotocoversión*, una célula marcada con un trazador fluorescente puede ser convertida en un producto estable mediante la diaminobenzidina, si es expuesta a una irradiación intensa de luz con el microscopio fluorescente (Bentivoglio y Sen-Su, 1990). Sin embargo, desde que Maranto (1982) llevó a cabo la fotocoversión del marcador fluorescente *Lucifer Yellow* (LY), reaccionando con la diaminobenzidina (DAB), hasta la fecha actual, no se han llevado a cabo muchos trabajos utilizando este u otros trazadores fluorescentes, por lo que nuestro propósito ha sido realizar un estudio de las células cerebelosas, que habiéndose marcado con PI, mediante el transporte axonal retrógrado, posteriormente pueden fotoconvertirse por la exposición a una luz fluorescente con la DAB.

Material y Métodos

Se utilizaron ratas albinas, cepa Wistar, de pesos comprendidos entre 230 y 280 g, que fueron anestesiadas mediante inhalación con eter y colocadas en el aparato estereotáxico para la inyección del trazador *propidium iodide* (Sigma Chemical Co. 0.5%, 15µl) en ventrículo lateral, según las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (1986) a nivel de bregma. Tras un período de supervivencia del animal de 3 horas, todos los animales fueron perfundidos, bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico, con 4% de paraformaldehído en tampón fosfato.

Una vez extraído el cerebelo del animal, se postfijó con 30% de sacarosa en PBS durante 12 horas.

El corte del cerebelo se llevó a cabo con un microtomo de congelación (Reichert Jung Mod. 1206). Se practicaron secciones frontales y sagitales, de 40 µm de grosor, que fueron montadas sobre portas con gelatina y secados al aire.

Para la diferenciación de las distintas capas de la corteza cerebelosa, se utilizó la tinción de Nissl.

Con el fin de comparar el número de células fotoconvertidas se realizó, previamente a la fotocoversión, una micrografía de la zona que iba a ser expuesta a la excitación, para poder valorar, de esta forma, el mismo área de reacción.

La fotocoversión de las células marcadas con PI se llevó a cabo según el protocolo de Sandal y Masland (1988), colocando el porta bajo la luz del microscopio con una gota de DAB (1.5 mg DAB/ml TRIS buffer 0.1 M, pH 8.2) y filtrado antes de su utilización.

El área fue expuesta a la iluminación fluorescente con un microscopio Leitz Ploempack 100 W de fuente de luz de mercurio

Se utilizó el objetivo de 16x Leitz Fluotar y el filtro N2 (550 nm de excitación) para la fotocoversión de *propidium iodide*

Durante la exposición, la solución de DAB fue renovada cada 15 minutos y reemplazada por una gota de solución fría. Este procedimiento se llevó a cabo durante 80 minutos de exposición.

Resultados

La administración de PI provocó en el animal una ataxia caracterizada por irregularidades de coordinación de los movimientos musculares sin debilidad o espasmos de estos, aunque sí con un espasmo clónico de los músculos del globo ocular y movimientos involuntarios de los ojos en distintos sentidos, lo que se traduce en un nistagmus.

En las secciones en las que se practicó la coloración de Nissl, observamos en las células gránulos que se tiñen con los colorantes básicos, diferenciándose claramente tres capas o estratos (figs. 1 y 2).

La observación al microscopio fluorescente, de las secciones seriadas del cerebelo de la rata, tanto frontales como sagitales, nos reveló el marcaje específico de las células de Purkinje con PI, quedando el resto de las células que componen los distintos estratos de la corteza cerebelosa libre de marcaje, apareciendo únicamente una hilera de células de color rojo intenso entre la capa granular y la molecular (fig. 3).

Además, a grandes aumentos, se apreció, en algunas de estas células, la presencia de una pequeña prolongación dirigida hacia la capa granular (fig. 4), de color rojo, débilmente marcada, partiendo del soma de la célula correspondiente al inicio del axón de la célula de Purkinje.

Tras la exposición de una parte de la sección a una fuente de luz fluorescente de 550 nm de excitación, con una gota de DAB sobre la zona, el color rojo fluorescente de algunas de las células fue gradualmente remplazado por gránulos oscuros rellenando el citoplasma de la célula como producto de reacción de la DAB (fig. 5), apareciendo una pequeña banda de células fotoconvertidas, entre la capa molecular y la capa granulosa, quedando las células más centrales al haz de luz con mayor marcaje que las células laterales que recibieron menor cantidad de luz (fig. 5).

Al igual que se observó, con la luz fluorescente, el inicio del axón de las células de Purkinje, pudo ser visualizado en las células fotoconvertidas (fig. 6).

Sin embargo, al comparar las células marcadas con PI con las células fotoconvertidas (Figs. 3 y 6), se observó que algunas de las células, que se observaron al principio, mediante la luz fluorescente, al ser fotoconvertidas, o bien desaparecían, o bien se visualizaban muy débilmente marcadas (figs. 3 y 6).

Discusión

El cerebelo está relacionado con la regulación del movimiento. Aunque se conoce su función global y el esquema de la organización, todavía carecemos de información suficiente sobre los diferentes tipos de análisis que lleva a cabo la corteza cerebelosa y su modo de actuación.

Se piensa, que la clave para la función cerebelosa es el control inhibitorio ejercido por las células de Purkinje sobre el nivel de excitabilidad de los núcleos cerebelosos profundos y su eferencia (Gould, 1979; Arshavsky y col., 1983).

Las interacciones de la corteza cerebelosa con los núcleos profundos son esenciales para la coordinación de las actividades motoras, siendo las células de Purkinje, a través de sus axones, la única salida para la información procesada de la corteza cerebelosa (Noback y Demarest, 1986).

Las lesiones o afectaciones de las fibras aferentes o eferentes producen signos referidos a alteraciones del movimiento; así el cerebelo actúa como un servomecanismo en un sistema de retroacción negativa que funciona para prevenir oscilaciones durante el movimiento, conservando la estabilidad del mismo.

Los desórdenes en los movimientos del animal observados por nosotros, tras la administración de PI, ha sido corroborado por otros autores (Borges y col., 1985; Cheng y Sen, 1989); este resultado podría deberse a que PI actúe sobre las células de Purkinje, posiblemente inhibiéndolas, resultando así las anormalidades en los movimientos del animal.

Chen y Sen-Su (1989), señalan que el soma y las dendritas marcadas de las células de Purkinje varían según el tiempo de supervivencia del animal; períodos cortos de supervivencia (6 horas), PI es más prominente en dendritas, mientras que con tiempos de supervivencia largos, el soma celular está más fuertemente marcado, así como las dendritas.

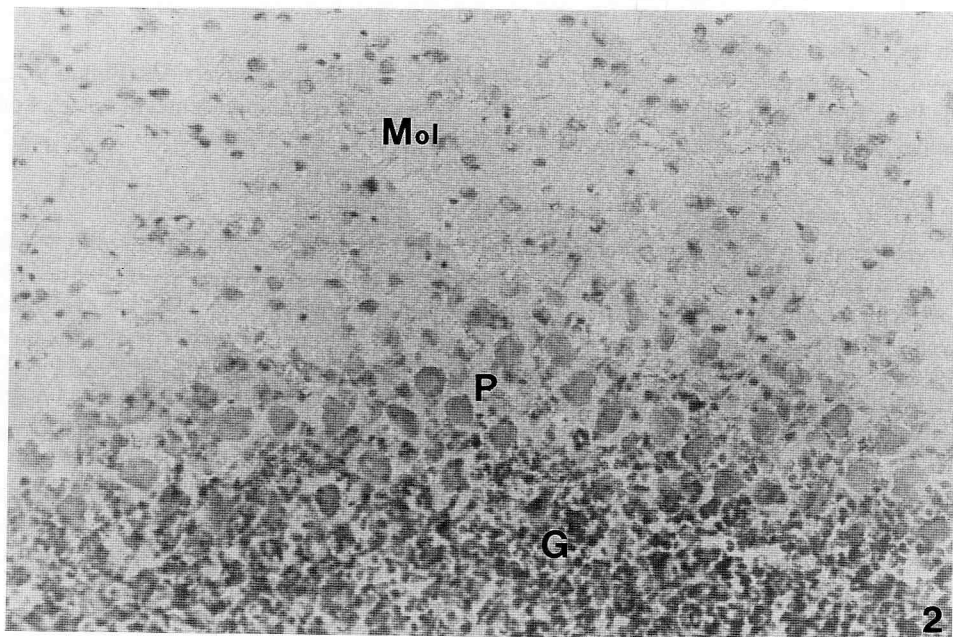
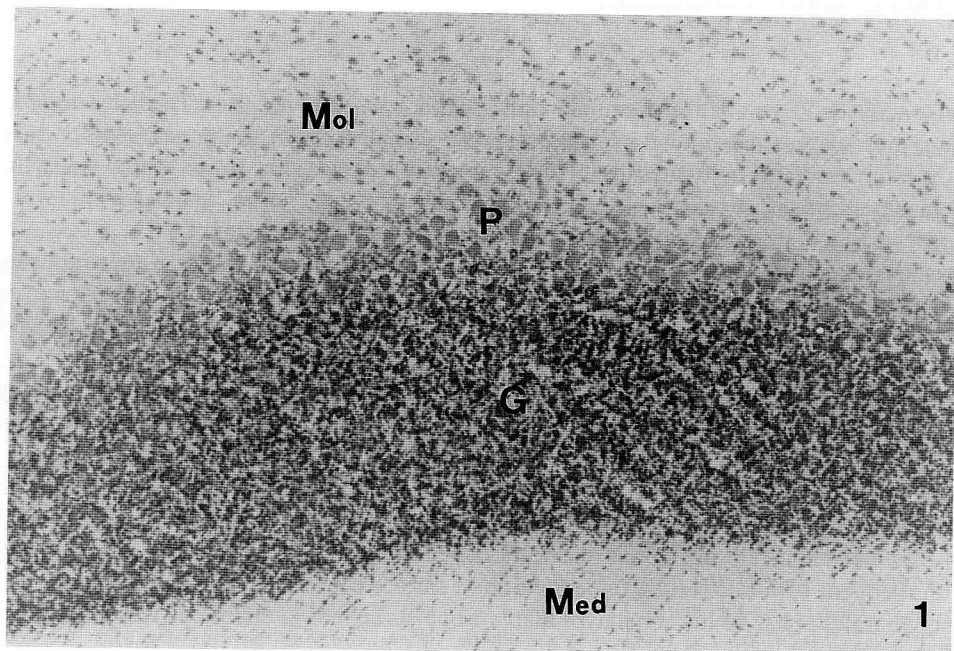
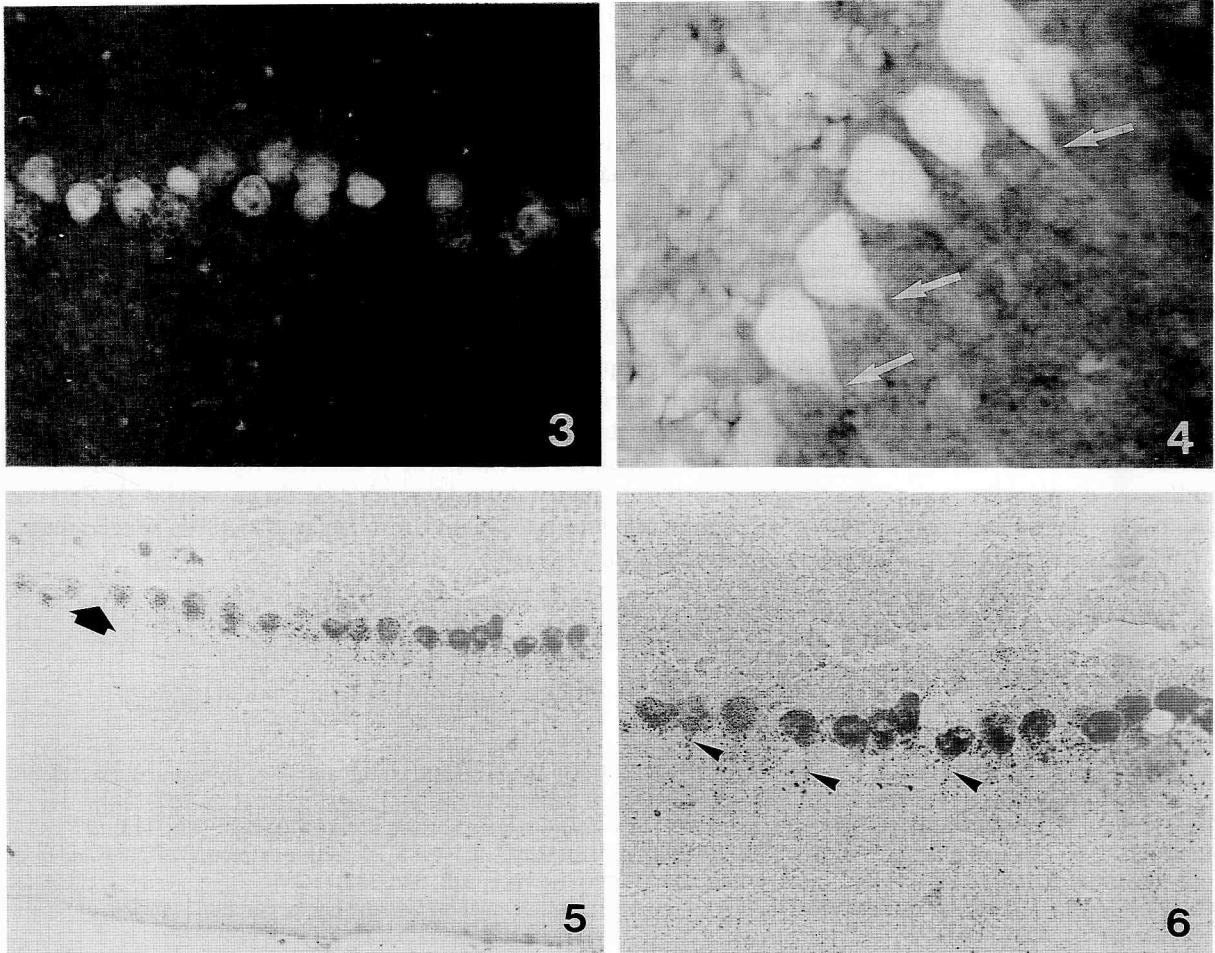


FIGURA 1. Panorámica de los estratos o capas de la corteza cerebelosa de la rata. Tinción de Nissl. Mol: capa molecular; P: capa de las células de Purkinje; G: estrato granular; Med: capa medular. Aumentos: 100 x

FIGURA 2. Visión a mayores aumentos de las capas granular (G), con aspecto de núcleos cromáticos densamente agrupados, con espacios claros intercelulares; células de Purkinje (P), dispuestas en una sola lámina de grandes células con forma redondeada, de distribución relativamente uniforme a lo largo del margen superior de la capa granulosa; y capa molecular (Mol), con células escasas y poco teñidas. Tinción de Nissl. Aumentos: 200 x



- FIGURA 3.** Visión de las células de Purkinje del cerebelo bajo la luz fluorescente marcadas con *propidium iodide* de color rojo intenso, visualizadas con el filtro N2 de un microscopio fluorescente con 550 nm de excitación.
Aumentos: 200x
- FIGURA 4.** Con luz fluorescente, a mayores aumentos, se observan las células de Purkinje con axones débilmente marcados (*flechas*) con *propidium iodide*, dirigiéndose hacia la capa granular.
Aumentos: 350x
- FIGURA 5.** Fotoconversión de las células de Purkinje como producto de la reacción a la DAB. Nótese la mayor intensidad de reacción a nivel de la zona central, quedando más débilmente marcadas las células laterales a la luz excitable.
Aumentos: 80x
- FIGURA 6.** Células de Purkinje fotoconvertidas, cuyo citoplasma aparece ocupado por gránulos de color marrón oscuro, así como el inicio del axón (*cabeza de flecha*).
Aumentos: 200x

En nuestro estudio, con un período de supervivencia del animal de 3 horas, observamos el soma fuertemente marcado, así como el inicio de algunos axones; no obstante, la cantidad y el porcentaje de PI administrado por nosotros, difiere del utilizado por estos autores.

El número de células fotoconvertidas después de la exposición a la luz fluorescente con DAB, fue ligeramente menor en relación con la visualización previa a la fotoconversión, dato que, como ya indicaron Bentivoglio y Sen-Su (1990) pudiera ser debido a que los primeros minutos de exposición a la luz sean probablemente críticos para la iniciación de la fotoconversión.

El sustrato físico-químico de la reacción que se produce por la exposición de un fluorocromo y la DAB a una fuente de luz ultravioleta es todavía desconocido, aunque se sugiere que es debido a la oxidación de la diaminobenzidina (DAB) por moléculas fotoestimuladas (Sandell y Masland, 1988). La molécula fotoexcitada reacciona para formar oxígeno o radicales hidroxil, los cuales oxidan la DAB; la reacción no ocurre cuando el tejido había sido cubierto con el cubreobjetos, evitando, de esta forma, que el oxígeno alcance el tejido durante la reacción.

La fotoconversión tiene ventajas sustanciales sobre la visualización exclusiva con el marcador fluorescente, debido a que es más permanente en el tiempo, el tejido puede ser deshidratado, presenta una mejora en la visualización óptica de la célula fotoconvertida, al mostrar un mejor contraste que con la luz fluorescente; además, el tejido puede ser utilizado para su estudio a microscopía electrónica.

Sin embargo, como limitación de este método, señalaremos el pequeño campo que puede ser reaccionado mediante la DAB por parte de la fuente de luz; en nuestro estudio, utilizando un microscopio con una fuente de luz de mercurio de 100W y un filtro de 16x, conseguimos un campo de irradiación ligeramente superior al milímetro de diámetro, campo que creemos suficiente para valorar la morfología de las células de Purkinje analizadas; sin embargo, para estudiar grandes áreas de tejido, estos campos resultan insuficientes y se necesitarían grandes equipos, superiores a un simple microscopio fluorescente.

BIBLIOGRAFÍA

- ARSHAVSKY, Y.I.; GELFAND, I.M. y OLOVSKY, G.N. (1983): The cerebellum and control of rhythmical movements. *Trends NeuroSci.*, **6**: 417-422.
- BENTIVOGLIO, M. y SEN-SU, H. (1990): Photoconversion of fluorescent retrograde tracers. *Neurosci. Lett.*, **113**: 127-133.
- BORGES, L.F.; ELLIOTT, P.J.; GILL, R.; IVERSEN, S.D. y IVERSEN, L.L. (1985): Selective extraction of small and large molecules from the cerebrospinal fluid by Purkinje neurons. *Science*, **228**: 346-348.
- CHEN, S. y SEN SU, H. (1989): Selective labeling by propidium iodide injected into the lateral cerebral ventricle of the rat. *Brain Res.*, **483**: 379-383.
- FALLON, J.H. (1981): Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum and frontal cortex. *J. Neurosci.*, **1**: 1361-1368.
- GOULD, B.B. (1979): The organization of afferents to the cerebellar cortex in the cat. Projections from the deep cerebellar nuclei. *J. Comp. Neurol.*, **184**: 27-42.
- HOLTMAN, J.R.; NORMAN, W.P. y GILLIS, R.A. (1984): Projections from the raphe nuclei to the phrenic motor nucleus in the cat. *Neurosci. Lett.*, **44**: 105-111.
- KOHLER, C.; CHAN-PALAY, V. y STEINBUSCH, H. (1982): The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **209**: 91-111.
- KUYPERS, H.G.J.M.; BENTIVOGLIO, M.; van der KOOY, D. y CATSMAN-BERREVOETS, C.E. (1979): Retrograde transport of bisbenzimidazole and propidium iodide through axons to their parent cell bodies. *Neurosci. Lett.*, **12**: 1-17.
- MARANTO, A.R. (1982): Neuronal mapping: a photooxidation reaction makes Lucifer Yellow useful for electron microscopy. *Science*, **217**: 953-955.
- NOBACK, C.R. y DEMAREST, R.J. (1986): El sistema nervioso. El cerebelo. 3 ed. pp: 205-217.
- PAXINOS, G. y WATSON, Ch. (1986): The rat brain in stereotaxic coordinates. Second Edition. Academic Press. Australia.
- PIREAU, F.K.; FELLMER, G. y TAYLOR, D.C.M. (1984): Somatovisceral convergence in cat ganglion neurons demonstrated by double-labeling with fluorescent tracers. *Brain Research.*, **321**: 63-70.
- SANDELL, J.H. y MASLAND, R.H. (1988): Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *J. Histochem. Cytochem.*, **36**: 555-559.

- SOBEL, E. y CORBETT, D. (1984): Axonal branching of ventral tegmental and raphe projections to the frontal cortex in the rat. *Neurosci. Lett.*, **48**: 121-125.
- WOOLF, N.J.; ECKENSTEIN, F. y BUTCHER, L.L. (1983): Cholinergic projections from the basal forebrain to the frontal cortex: a combined fluorescent tracer and immunohistochemical analysis in the rat. *Neurosci. Lett.*, **40**: 93-98.

Correspondencia: Dr. Juan A. Juanes Méndez
Dpto. de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Avda. Campo Charro s/n
37007 Salamanca. España

ARTERIAS RENALES ACCESORIAS Y ESPERMÁTICAS ECTÓPICAS BILATERALES

BILATERAL ACCESSORY RENAL AND ECTOPIC SPERMATIC ARTERIES

A. MARTÍNEZ-ALMAGRO, V. ALMENAR, M.A. PALOMINO

Unidad de Anatomía Clínica. Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Universidad de Valencia

RESUMEN

Se describe un caso de un varón de 70 años que presenta una duplicación bilateral de arterias renales y un origen ectópico, también bilateral, de arterias espermáticas.

Las arterias renales accesorias están situadas inmediatamente por debajo de las renales principales y son el punto de origen de las arterias espermáticas en ambos lados.

Se trata de una variación anatómica muy poco frecuente que discutimos con los autores consultados, destacándose asimismo, la importancia que puede suponer desde un punto de vista clínico y quirúrgico.

PALABRAS CLAVE: Arterias espermáticas ectópicas. Duplicación arterias renales. Arterias renales accesorias. Arterias espermáticas ectópicas bilaterales.

SUMMARY

A case is described of a 70 year-old male who shows a bilateral duplication of the renal arteries and an ectopic origin, also bilateral, of the spermatic arteries.

The accessory renal arteries are situated immediately under the main ones and they are the starting point of the spermatic arteries in both sides.

It is a very unusual anatomic variation we discussed with the authors we consulted about this case; the importance that it might involve from a clinical and surgical point of view, was also emphasized.

KEY WORDS: Ectopic spermatic arteries. Renal arteries duplication. Accessory renal arteries. Bilateral ectopic spermatic arteries

Introducción

El aparato urinario comienza su desarrollo a lo largo de la 3ª semana de vida intrauterina, involucionando las formas más primitivas conforme se va configurando el riñón definitivo en la 5ª semana (25). Su situación es pélvica inicialmente, aunque se produce un ascenso renal por el crecimiento lumbo-sacro y la disminución de la curvatura corporal, quedando el riñón en su posición lumbar definitiva (18).

Las arterias renales tienen su origen normalmente en la aorta abdominal, siendo la izquierda más corta y unos mm más alta que la derecha (29). Ambas se amoldan a los cuerpos vertebrales y cruzan por delante del psoas antes de penetrar en el riñón. Su calibre es variable, entre 5 y 7 mm (21, 34).

El nivel en el que se originan las arterias renales únicas suele ser bastante constante y se establece sobre el disco intervertebral L1-L2 (5). Sin embargo, habrá de tenerse en cuenta que las arterias renales principales pueden también desprenderse de forma ectópica o como vasos aberrantes (11, 13, 16). Asimismo habrá de recordarse la presencia del amplio círculo arterial perirrenal (9).

Las variaciones anatómicas en la vascularización renal son frecuentes, aunque esta frecuencia difiera entre los autores consultados. Por medio de disecciones, Gosling y Testut 20%; Merklin y Williams 30%. Por métodos angiográficos, Edsman 21%, Olson 23,8% y Meschan 25%. Pansky por el contrario, afirma que solo el 3% de la población presenta variaciones en el número y en la posición de las arterias renales en los casos estudiados.

En cuanto a su origen, la mayor frecuencia la presentan las arterias renales accesorias que se desprenden directamente de la aorta, aunque ese origen puede ser sensiblemente distinto (3, 7, 15) y estar relacionado con riñones isquémicos y/o hipertensos.

El aparato genital, por lo que hace referencia a las gónadas, se configura morfológicamente como femenino o masculino, en la 7ª semana del desarrollo en forma de crestas gonadales en el epitelio celómico lumbar. A finales del segundo mes, la aparición del *gubernaculum testis* tiene una importancia decisiva en el descenso testicular, que no se produce de forma activa sino como consecuencia del rápido crecimiento corporal y de la falta de elongación del *gubernaculum*. Sin embargo, la vascularización se mantiene desde la aorta y los vasos espermáticos descienden hasta la región inguino-escrotal (18).

Las arterias espermáticas se originan de la aorta abdominal a nivel de la vertebra L2, entre las renales y la mesentérica inferior. A lo largo de su recorrido, tienen primero un segmento lumbar completamente retroperitoneal; un segundo tramo ilíaco o pelvi-subperitoneal en el que la arteria se ve envuelta en la fascia ilíaca junto al nervio genitocrural; un segmento inguinal que comprende todo el trayecto del conducto inguinal y en el que se integra al cordón espermático; por último, un segmento funicular en el que la arteria se pone en contacto con el epididimo y el testículo (31, 34).

Al igual que ocurre con la vascularización renal, las arterias espermáticas presentan variaciones anatómicas en cuanto a su origen, número, trayecto y situación tipográfica.

En este sentido, Lippert afirma que el 83% de las arterias espermáticas se originan directamente de la aorta. Pueden presentar variaciones en relación a la configuración del pedículo renal (23, 30); ser dobles en uno o ambos lados (17); saltar por encima de la vena renal izquierda (22) o tener un recorrido aberrante (27) entre otros.

Material y métodos

Se han diseccionado 30 cadáveres humanos en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en el periodo 1990-91 y 1991-92. De los cuales 23 eran varones y 7 mujeres, las edades estaban comprendidas entre los 52 y los 85 años.

Estudiamos retroperitoneo haciendo especial hincapié en las estructuras vasculares, identificando e individualizando el pedículo renal y los vasos genitales.

Hemos medido mediante calibrador los vasos de nuestra zona de interés y se han fotografiado las preparaciones.

Resultados

Hemos puesto de manifiesto en un varón de raza blanca, de complexión fuerte, 70 años de edad, 1,65 m de estatura y 65 kg de peso, una duplicación bilateral de arterias renales y un origen ectópico bilateral de arterias espermáticas que se originan de la más inferior de estas arterias renales (figs.1, 2 y 3). Ambos riñones no han presentado patología morfológicamente evidenciable y su estructura y posición han sido totalmente normales.

En el lado derecho, hay una arteria renal principal de 5 mm de calibre y una accesoria, por debajo de la anterior, que se desprende de la aorta a 2,5 mm de distancia y que sigue un trayecto bastante paralelo hasta que sufre una inflexión brusca y se dirige hacia el polo inferior del riñón. El calibre de esta arteria renal accesoria es de 3,5 mm prácticamente en todo su recorrido.

La arteria renal principal está situada por encima de la vena y se ramifica al llegar al polo interno del riñón dando 4 ramas. Ninguna de ellas tiene relación directa con la pelvis renal.

La arteria renal accesoria, después de un recorrido paralelo a la renal principal y por encima de la vena, cruza por delante de esta y penetra en el riñón a nivel de su polo inferior e inmediatamente por delante y en contacto con la pelvis renal. Se ramifica en dos terminales extrarrenales, ambas prepriélicas.

La arteria espermática derecha, se origina de la renal accesoria a 46 mm del seno renal y es primero retrocava, salta por delante de la vena renal derecha y se sitúa laterocava en la mayor parte de su recorrido lumbar. El calibre, siempre externo, de este vaso ha sido de 1,2 mm en la mayor parte de su trayecto.

Es de señalar la impronta que ocasiona justo en el ángulo renocavo superior, en el que se aplica directamente, para relacionarse íntimamente después con la cara derecha de la vena cava inferior.

Observamos asimismo, como la desembocadura de la vena espermática, tiene lugar en la vena cava pero en inmediata proximidad al ángulo renocavo inferior.

En el lado izquierdo la disposición vascular es semejante, con una arteria renal principal, de 4 mm de calibre y una accesoria, de 3 mm que se originan de la aorta a un nivel superior que las del lado derecho. Como ocurre con su homónima, la arteria accesoria izquierda presenta también una inflexión brusca antes de penetrar en el riñón.

La arteria renal principal penetra en el riñón tras un trayecto ligeramente oblicuo situándose por arriba y por delante de la pelvis renal. Hemos identificado, al igual que en el lado derecho, cuatro ramas extrarrenales.

La renal accesoria, se origina en la aorta a 10 mm por debajo de la anterior, sigue un trayecto oblicuo descendente más acusado que la principal y sufre una inflexión brusca, cambiando su dirección y pasando por delante de la vena renal y pelvis antes de su entrada al riñón. En este caso, no hemos apreciado ramificación extrarenal alguna.

La arteria espermática izquierda presenta un calibre bastante uniforme de 0,8 mm originándose también de la renal accesoria a 24 mm del seno renal y justo en el punto de inflexión del vaso.

La vena espermática izquierda no presenta ninguna variación morfológica significativa, acompaña a la arteria y desemboca en la vena renal por dentro del codo arterial anteriormente descrito.

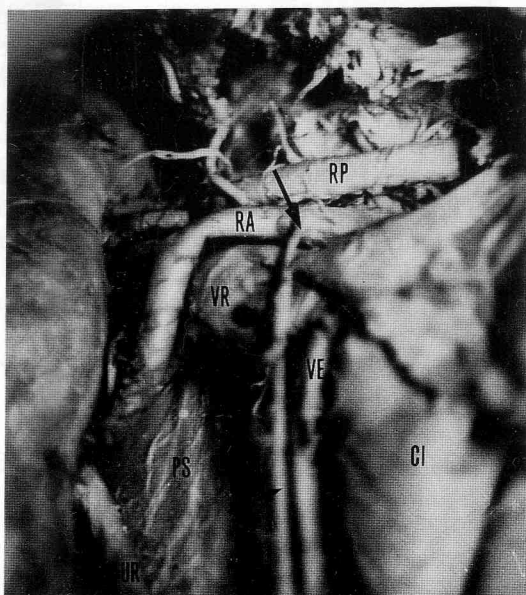
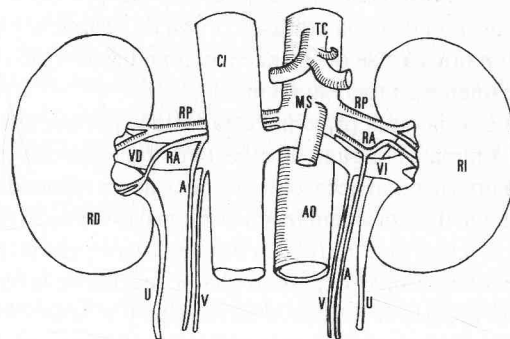
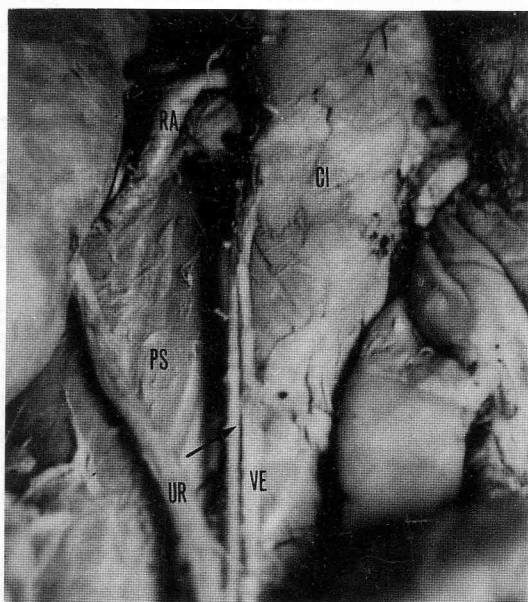
Cabe destacar que el riñón izquierdo recibe una menor vascularización directa de la aorta que el del lado derecho, que no se ha apreciado ningún otro vaso en ambos hiliros aparte de los descritos, que ambos riñones no presentaban variaciones significativas de tamaño y que no eran asiento de patología alguna, dato que se confirmó tras la correspondiente anatomía patológica.

El diámetro que ha presentado la aorta a nivel del origen de las arterias renales ha sido de 39 mm y han sido evidentes numerosas placas de ateroma calcificadas en la zona, aunque ninguna de ellas comprometía aparentemente el aporte hemático.

Consideraciones y discusión

Los casos de duplicación bilateral de arterias renales hallados por nosotros (2) están por debajo de los descritos por otros autores consultados en la bibliografía. En este sentido, Lippert refiere un 22% de arterias renales dobles

ARTERIAS RENALES ACCESORIAS Y ESPERMÁTICAS ECTÓPICAS BILATERALES



- FIGURA 1.** Esquema vascular renal y espermático. CI: Vena cava inferior. AO: Aorta. TC: Tronco celíaco. MS: Arteria mesentérica superior. RD: Riñón derecho. RI: Riñón izquierdo. VD: Vena renal derecha. VI: Vena renal izquierda. RP: Arteria renal principal. RA: Arteria renal accesoria. U: Uréter
- FIGURA 2.** Preparación anatómica lado derecho. CI: Cava inferior. RA: Arteria renal accesoria. PS: Músculo psoas. UR: Uréter. VE: Vena espermática. → Arteria espermática.
- FIGURA 3.** Vasos renales y espermáticos derechos. Preparación anatómica tras la sección de la vena cava inferior. CI: Cava inferior. RP: Arteria renal principal. RA: Arteria renal accesoria. VR: Vena renal. PS: Músculo psoas. UR: Uréter. → Arteria espermática

unilaterales, siendo el 10% de ese total de las características descritas en nuestro trabajo. Por el contrario, los datos aportados por Fourman están en la línea de nuestros resultados.

Abrams afirma que uno de cada 15 riñones presenta duplicación de arterias renales y que se da con igual frecuencia en ambos lados aunque no de forma simultánea. Este dato es de gran interés para nosotros porque refleja resultados de exploraciones angiográficas que buscaban directa o indirectamente patología renal.

No podemos encuadrar las arterias renales accesorias descritas por nosotros como arterias renales aberrantes, que serían arterias esplácnicas laterales persistentes ramas de la aorta (32). En nuestro caso, que coincide con las descripciones de Sykes, las arterias renales accesorias se sitúan por debajo de las renales principales en contra de las observaciones de Wilms y Doppman que las topografían, en la mayor parte de los casos, un máximo de una vertebra por encima del origen de la arteria renal principal.

Por lo que hace referencia a las variaciones anatómicas de la arteria espermática, Bergman describe un 15% que tiene su origen en la arteria renal, rama de la renal o renal supernumeraria, aunque no precisa si este porcentaje es mayoritariamente unilateral o bilateral.

Lippert presenta unos resultados del 4% de arterias espermáticas desprendiéndose de las renales, mientras que para Harrison, el hallazgo de arterias espermáticas de origen y distribución anómalos resulta muy poco frecuente.

En un caso, hemos encontrado en la literatura la descripción de una arteria espermática derecha que se desprendía de la renal y cuyo trayecto seguía por detrás de la vena cava inferior (26). Asimismo, pueden darse de forma rara conexiones y anastomosis entre el sistema arterial renal y el espermático (6).

Hay que destacar que aunque la patología renal que se observa en los cadáveres estudiados es frecuente y diversa, ello no ha significado una variación del árbol arterial, ya que el caso que describimos ha aparecido, precisamente, en un espécimen con ambos riñones normales, coincidiendo con los trabajos de Harrison en el mismo sentido que los nuestros.

Hemos que considerar finalmente, la gran importancia que la variación anatómica descrita puede tener desde un punto de vista clínico y quirúrgico.

La actuación quirúrgica sobre el pedículo renal es hoy en día muy frecuente, entre otras cosas porque el trasplante renal se ha convertido en un más que aceptable tratamiento para la insuficiencia renal crónica terminal; y habrá de tenerse presente esta variación en el mismo momento quirúrgico para proceder a una detallada identificación y disección de la zona.

Por otra parte, podría tener su interés haber podido comprobar la existencia de hipertensión renal y de que forma incidía sobre la morfofisiología testicular y espermática. El examen que hicimos en ambos testículos, no mostraba signo microscópico alguno que reflejase trastornos de vascularización arterial.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABRAMS, K.L. (1971): *Angiography* 2th. ed. Little Brown and Co. Boston.
2. ALMENAR GARCÍA, V.; MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; PALOMINO CORTÉS, M.A. (1991): Duplicación de Arterias Renales. *An. Anat.*, **37**: 3-7
3. ANSON, B.; RICHARDSON, G.; MINEAR, W (1936): Variations in the number and arrangements of the renal vessels. *J. Urol.*, **36**: 211-219
4. BERGMAN, R.A. et al. (1988): *Compendium of Human Anatomic Variation*. Urban & Schwarzenberg. Baltimore.
5. BOIJSEN, E. (1959): Angiographic studies of the anatomy of single and multiple renal arteries. *Acta Radiol.*, **183**: 1-35
6. CRELIN E.S. (1948): An unusual anomalous blood vessel connecting the renal and internal spermatic arteries. *Anat. Rec.* **102**: 205-211
7. DOPPMAN, J. (1967): An ectopic renal artery. *Brit. J. Radiol.* **40**: 312-313
8. EDSMAN, G. (1975): Angiography and suprarrenal angiography. *Acta Radiol. Stockolm* **155**: 1-18
9. FINE, H.; KEEN, E.N. (1966): The arteries of the human kidney. *J. Anat.* **100**: 881-894
10. FOURMAN, J.; MOFFAT, D.B. (1971): *The blood vessels of the kidney*. Blackwell. Oxford.
11. GARTI, I.; MEIRAZ, D. (1980): Ectopic origin of main renal artery. *Urology*, **15**: 627-629
12. GOLSLING, J.A.; DIXON, S.J. (1984): *Atlas fotográfico de anatomía funcional del tracto urinario*. Ed. Doyma. Barcelona.
13. GRAVES, F.T. (1957): The aberrant renal artery. *Proc. Roy. Soc. Med.*, **50**: 368-370

14. HARRISON, R.G.; MCGREGOR G.A. (1957): Anomalous origin and branching of the testicular arteries. *Anat. Rec.*, **129**: 401-405
15. JEFFEREY, R. (1972): Unusual origin of renal arteries. *Radiology*, **102**: 309-310
16. KAMINA, P.; KOUMARE, A.K.; RIDEAU, Y. (1975): contribution a l'étude des variations de l'origine de l'arterie renale (a propos de 800 arteriographies). *Arch. Anat. Pathol.*, **23**: 287-290
17. KURRAT, H.J.; HESSE, M. (1979) Doppelbildung der Arteria testicularis sinistra und Verlaufsvarianten-Eine entwicklungsgeschichtliche Betrachtung. *Anat. Anz.*, **145**: 303-307
18. LANGMAN, J. (1982): *Embriología médica*. 4ª ed. Panamericana. Buenos Aires.
19. LIPPERT, H.; PABST, R. (1985): *Arterial variations in man*. J.F. Bergmann Verlag. München.
20. MERKLIN, R.J.; MICHELS, N.A. (1958): The variant renal and suprarenal blood supply with data on the inferior phrenic, ureteral and gonadal arteries: a statistical analysis based, on 185 dissections and review of literature. *J. Int. Coll. Surg.* **29**: 41-76
21. MESCHAN, I. (1975): *An Atlas of Anatomy basic to radiology*. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
22. NATHAN, H.; TOBIAS, P.V.; WELLSTED, M.D. (1976) An unusual case of right and left testicular arteries arching over the left renal vein. *Br. J. Urol.*, **48**: 135-138
23. NOTKOVICH, H. (1956) Variations of the testicular and ovarian arteries in relation to the renal pedicle. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **103**: 487-495
24. OLSON, L. (1971) Variations in renal blood supply in H.L. Abrams. *Angiography* 2th. ed. Little Brown Co. Boston.
25. O'RAHILLY, R. (1985): *A color atlas of human embryology*. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
26. OTULAKOWSKI, B.; WOZNIAK, W. (1975): A case of origin of the testicular artery from the renal artery, and course of the testicular artery behind the inferior vena cava. *Folia MorPhol.* **34**: 349-351
27. PANEK-MIKULA, J.; GORSKI, K.A. (1977): Developmental and clinical aspects of altered course of the left testicular artery in man. *Folia Morphol* **36**: 323-328
28. PANSKY, B. (1985): *Embriología médica*. Panamericana. Buenos Aires.
29. PICK, J.W.; ANSON, B.J. (1940): Renal vascular pedicle. Anatomical study of 430 body-halves. *J. Urol. Baltimore*, **44**: 411-434
30. RADOJEVIC, S.; STOLIC, E. (1964): Note sur l'arterie spermatique interne. Origine haute en rapport avec le pedicle renale. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)*, **122**: 314-321
31. SHIMADA, Y.; FUKUYAMA, U. (1975): Testicular and ovarian blood vessels. *Acta Anat. Nipponica*, **50**: 147-150
32. SNELL, R.S. (1976): *Embriologia medica*. 2ª ed., Nueva Editorial Interamericana, S.A., Mexico.
33. SYKES, D. (1963): The arterial supply of the human kidney with special reference to accessory renal arteries. *Br. J. Surg.*, **50**: 368-374
34. TESTUT, L.; LатарJET, A (1976): *Tratado de Anatomía Humana*. 8ª ed., Salvat Editores, S.A. Barcelona.
35. WILLIAMS, P.L.; WARWICK, R. (1985): *Anatomia de Gray*. Salvat Editores, S.A. Barcelona.
36. WILMS, G et al. (1987): Une artere renale ectopique. *J. Radiol.*, **68**: 137-138

A. Martínez Almagro
 Dto. Ciencias Morfológicas
 Facultad Medicina
 Valencia. España

ESTUDIO HISTOCOMPARADO DEL TEJIDO CONJUNTIVO DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN DIVERSAS ESPECIES ANIMALES

HISTOCOMPARATIVE STUDY OF THE CONNECTIVE TISSUE OF THE MAMMARY GLAND IN SEVERAL ANIMAL SPECIES

J.L. NIETO, E. GARCÍA-LÓPEZ, y A. TORRES

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina
Zaragoza. España

RESUMEN

Hemos realizado un estudio de Histología Comparada sobre la estructura del tejido conjuntivo de la glándula mamaria de hembras de cuatro especies animales: cerdo y jabalí, cabra, oveja y perro. Para el presente trabajo hemos seleccionado glándulas en reposo funcional y hemos utilizado técnicas de tinción con las que pudiéramos obtener imágenes selectivas del tejido colágeno, elástico y de reticulina, así como de las células propias del tejido conjuntivo. Los resultados obtenidos de nuestro estudio histocomparado, muestran nulas diferencias en la disposición del parénquima en las distintas especies estudiadas, sin embargo, estas aparecen al estudiar la estructura del estroma.

PALABRAS CLAVE: Glándula mamaria. Histología comparada. Mamíferos.

SUMMARY:

We performed a study of Comparative Histology about the structure of the connective tissue of the mammary gland in females of four animal species: pig and wild board, goat, sheep and dog. We selected some glands in functional rest and used colouring techniques in order to obtain selective images of the collagen, elastic and reticuline tissue, as well as the cells of the connective tissue itself. The results obtained in our histocomparative study show no differences in the disposition of the parenchima in the species studied. Nevertheless, some differences appear when studying the structure of the stroma.

KEY WORDS: Mammary gland. Comparative histology. Mammals.

Introducción

Aunque la composición de la secreción láctea varía en los distintos animales, la estructura histológica de la glándula mamaria, mantiene un modelo fundamental en todos ellos, sobre todo en el parénquima, donde los cambios histológicos y ultraestructurales son mínimos (De Brux, 1979). Las variaciones más significativas se aprecian en algunos animales de ciclo corto, como la rata y el ratón, (Myers, 1919; Sutter; 1921; Maeder, 1922), en los que la fase luteínica es muy corta y donde la estructura con la glándula en reposo sólo muestra una proliferación de los sistemas canaliculares (Nasarre, 1986). Por el contrario en animales con largos periodos

luteínicos, como la perra (Sinowatx, 1980), el órgano desarrolla una notable estructura lobuloacinosa, tomando incluso la apariencia de embarazo (Botella, 1976; Nasarre, 1986). Sin embargo, establecido el proceso secretor la estructura del parénquima, apenas se diferencia en ambos grupos de animales. Fuera de estas peculiaridades del parénquima inherentes al modelo hormonal o reproductor del ciclo, las diferencias entre las especies se reducen a la mayor o menor riqueza de células mioepiteliales (Richardson, 1949; Grünfeld, 1964; Radnor, 1972 y Korsmeier, 1976); y a disposiciones muy precisas como las del laberinto basal extracelular, característico de la cerda (Adamiker y Glawisching, 1967).

No ocurre lo mismo en el estroma donde las variaciones pueden considerarse como características, por su parte, el conjuntivo intralobulillar tiene menos fibras colágenas de aspecto más regular y más laxo que los tabiques lobulillares, con lo que permite a aquel, una mejor distensión cuando las porciones epiteliales se hipertrofian (Dieckmann, 1925; Moszkowicz, 1926; Cheatle, 1931; Geshickter, 1943; Ihnen y Pérez Tamayo, 1953). Por otra parte como señala Cowie (1974), el epitelio glandular en reposo, está separado del estroma vascularizado vecino por una fina zona de fibroblastos, desprovista de vasos.

El tejido conjuntivo periductal difiere del ordinario de sostén, interlobular e intersegmental en muchos aspectos. Así, rodeando al conducto, se observa un manguito de estroma, más laxo, algo más celular y más vascular que el conjuntivo ordinario. En el lobulillo, las fibras de colágeno son aun más laxas y de aspecto regular, fácilmente distinguible del conjuntivo periductal (Ozzello, 1970).

En general, los conductos están revestidos por tejido elástico, en tanto que el conjuntivo intralobulillar carece en general de este. Así sucede en la mama madura de la mujer joven. Esta cantidad de fibra elástica, aumenta en las mamas de las mujeres próximas a la menopausia. También hay evidencia del aumento del tejido elástico en los conductos de las mujeres que han parido, al menos en lo que concierne al conducto principal del pezón (Zanella, 1952).

En cuanto a las membranas basales, compuestas de reticulina, aparecen bajo todas las células epiteliales de la glándula con un grosor bastante constante de 400-800 Å.

Material y Métodos

El material de estudio, comprende 34 piezas, de glándula mamaria en reposo funcional, procedentes de hembras de las siguientes especies animales: cerdo (12), jabalí (1), cabra (4), oveja (14) y perro (3). Recogido el material, este fue lavado con suero fisiológico y troceado en fragmentos de un cm.³ Los fragmentos se fijaron en formol al 10 %. Posteriormente, fueron incluidos en parafina sintética de la casa Merck. Los bloques se cortaron a un grosor de 7 µ. Para este trabajo hemos utilizado las tinciones de Van Gieson y Martins para la visualización general del corte y como técnicas específicas se usaron la Orceína para el tejido elástico y la plata amoniacal de Gomori para la reticulina. El examen de las preparaciones se ha realizado a 250, 400 y 1.000 aumentos, en este último caso mediante inmersión en aceite de cedro.

Resultados

Glándula mamaria de cerdo. Con los tricrómicos de Van Gieson y de Martins, vemos unos lobulillos alargados y pequeños. En nuestras series se encuentran pocas agrupaciones parenquimatosas de carácter alveolar, predominando los conductos galactóforos rodeados de conjuntivo intralobulillar, con luces abiertas y con restos de secreción. Se observan células mioepiteliales. Se puede ver una gran cantidad de adipocitos, que comprimen los tabiques interlobulillares, haciéndolos más delgados. El colágeno aparece, rizado y aplastado por los abundantes adipocitos. Alrededor de los conductos, las fibras colágenas, circulares, con fibroblastos y células redondeadas en los tabiques. Con la orceína: se puede observar las fibras elásticas que rodean a los conductos bien circular o paralelamente a ellos. También se ve en el espesor de los tabiques fibras gruesas, onduladas y lisas en su parte más

profunda. Las vemos formando parte de la íntima y la adventicia de los vasos e incluso algo infiltradas en la túnica media. Las membranas basales carecen de este tipo de fibras. Con el método de Gomori: vemos fibras de reticulina que se encuentran sobre todo en las membranas basales, tanto parenquimatosas como separando un adipocito de otro. Los tabiques interlobulillares, presentan una coloración difusa, marrón transparente, con alguna fibra de reticulina.

Glándula mamaria de jabali. Con los tricrómicos de van Gieson y de Martins, vemos lobulillos pequeños, irregulares y separados entre sí por abundante tejido adiposo. El número de alvéolos visibles por lobulillo es aproximadamente de 20. Estos alvéolos o carecen de luz o ésta es muy pequeña, mostrando en algún caso algo de secreción. Los conductos galactóforos aparecen algo más distendidos, con células mioepiteliales periféricas. La citología de ambas filas no difiere de la descrita para los alvéolos. El estroma intralobulillar, demuestra fibras colágenas, laxas, de apariencia mucoides que rodean a los alvéolos, separándolos entre sí. Por su parte, el tejido interlobulillar, muestra tabiques de colágeno, de grosor variable, separando con nitidez un lobulillo de otro o a estos de los abundantes conglomerados de adipocitos. La abundancia de adipocitos, ocupando numerosos campos microscópicos, es una característica de estas series animales. Encontramos así mismo abundantes células del tejido conjuntivo en los tabiques interlobulillares. Con la orceína, se observan abundantes fibras elásticas gruesas y circulares, rodeando a los conductos galactóforos. En los tabiques interlobulillares existe tejido elástico, ondulado, con fibras delgadas, mezcladas con las fibras de colágeno del tabique. En las arterias de la glándula se puede ver tejido elástico formando parte de la íntima y de la adventicia. Con el gomori, vemos fibras de reticulina muy nítidas, delgadas y lisas formando las membranas basales que rodean a los conductos y a los alvéolos. Los tabiques adquieren una coloración marrón-grisácea difusa, con imágenes que parecen superponerse a las obtenidas con el colágeno con las técnicas tricrómicas.

Glándula mamaria de cabra: Con los tricrómicos de van Gieson y de Martins, vemos los lobulillos poligonales, de tamaño variable y en general grandes. El número de alvéolos por lobulillo es muy elevado, contándose en nuestra serie más de 70. La luz alveolar se encuentra abierta, observándose secreción en algunos casos. Los conductos galactóforos, algo aplanados aparecen rodeados de tejido conjuntivo, con luces abiertas. Sus células mantienen la morfología de las células alveolares. El conjuntivo intralobulillar, con abundante colágeno formando círculos y rodeando y separando a los grupos alveolares. Se observa una infiltración linfocitaria muy característica. El conjuntivo interlobulillar está constituido por fibras de colágeno, rizadas, formando tabiques gruesos, más anchos en la unión de dos lobulillos, sobre todo en la confluencia de arteria, vena y conductos. Con la orceína, observamos tejido elástico muy abundante rodeando a los conductos galactóforos y ausencia de estas fibras en el tejido conjuntivo intralobulillar. En los tabiques interlobulillares, encontramos fibras elásticas, gruesas y muy abundantes, de aspecto rizado, totalmente mezcladas con las fibras colágenas. En los vasos, podemos observar fibras elásticas formando parte de la íntima y de la adventicia. Con el gomori, vemos las fibras de reticulina de las membranas basales, rodeando al ácino, ligeramente onduladas. También en las membranas de los conductos galactóforos. En estos animales, igualmente se ven fibras de reticulina en los tabiques interlobulillares en mayor proporción que en otros animales estudiados.

Glándula mamaria de oveja. Con los tricrómicos de van Gieson y de Martins, la morfología de los lobulillos es ovalada y su tamaño mediano, subdivididos por tabiques delgados de colágeno. El número de alvéolos por lobulillo es muy variable. Los alvéolos muestran células cúbicas, de coloración clara y oscura y con núcleos en posiciones diferentes. Las luces aparecen cerradas o abiertas y con restos de secreción. Las células mioepiteliales periféricas, de aspecto irregular son muy evidentes. Los conductos galactóforos los encontramos con mayor frecuencia en los extremos del lobulillo con luz. El conjuntivo intralobulillar, contiene fibras colágenas, formando círculos alrededor de los alvéolos. Se observa infiltración leucocitaria. En el estroma interlobulillar, las fibras colágenas, en su parte media, son gruesas, lisas y paralelas al lobulillo. Más periféricamente las fibras se tornan rizadas. Hay infiltración linfocitaria entre los tabiques del lobulillo. Con frecuencia se encuentran adipocitos al lado de los tabiques interlobulillares, formando incluso parte importante de ellos. Con la orceína, vemos el tejido elástico, muy abundante alrededor de los conductos. La oveja es la única especie animal estudiada en la que hemos encontrado fibras elásticas intralobulillares, aunque en escasa cantidad. En el espesor de los tabiques, las fibras elásticas son más gruesas y onduladas. Con el gomori, las fibras de reticulina, se comprueban alrededor de los ácinos y conductos, formando las membranas basales. También se pueden ver separando a los adipocitos y formando parte de los tabiques interlobulillares.

Glándula mamaria de perro. Con los tricrómicos de van Gieson y de Martins, aparecen lobulillos ovalados, de tamaño mediano y con un número de alvéolos próximo a 50 por término medio, rodeados de colágeno poco rizado. Los lobulillos al igual que en la oveja se encuentran subdivididos por septos delgados de colágeno. Se observa luz alveolar con restos de secreción. Los conductos son de tamaño grande, con luz amplia y secreción en su interior, observándose unos en el interior del lobulillo y otros en el tabique interlobulillar. Las células son aplanadas. Presentan células mioepiteliales. El conjuntivo intralobulillar, muestra haces de colágeno liso, alrededor de los alvéolos. El colágeno interlobulillar, de apariencia más laxa que el anterior, muestra edema e infiltración celular. Con la orceína, las fibras elásticas también se encuentran aquí rodeando a los conductos. No se observan en las membranas basales, ni en el conjuntivo intralobulillar. En el estroma interlobulillar las fibras elásticas son delgadas y muy escasas. Al igual que en las restantes especies animales estudiadas, las arterias y venas glandulares tienen fibras de esta naturaleza formando parte de la íntima y de la adventicia. Con el gomori, las imágenes apenas muestran diferencias con las de otras series animales. La reticulina se concentra en las membranas basales que envuelven a los alvéolos y conductos. También se pueden apreciar algunas fibras de reticulina entre el colágeno de los tabiques.

Discusión

La histología apenas establece diferencias al comparar las unidades galactofóricas de las distintas especies animales, circunstancia ya señalada por De Brux (1979). Las diferencias aparecen en los tramos excretores más notables y sobre todo en el estroma conjuntivo de la glándula, con disposiciones, en muchos casos, que pueden considerarse como características.

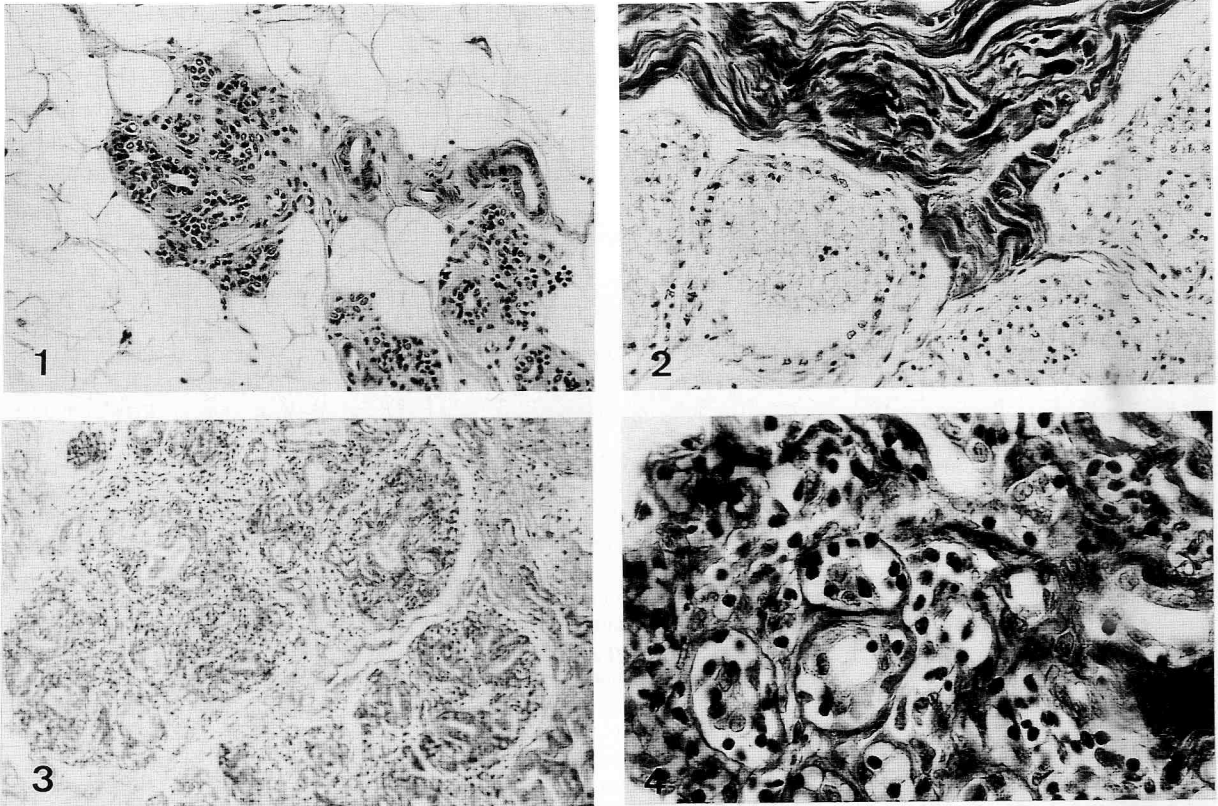
En la cabra, el cuerpo glandular forma lobulaciones poligonales, de tamaño grande, separados por tabiques interlobulillares de grosor medio, formado por conjuntivo denso que resalta especialmente del estroma intralobulillar. En la oveja, los lobulillos son ovalados, lo mismo que en la perra, de tamaño mediano, con tabiques colágenos, de grosor mediano que frecuentemente subdividen al lobulillo en dos o más porciones. En la perra, por otra parte, los tabiques conjuntivos interlobulillares muestran una apariencia más laxa que en otros animales.

La glándula de cerdo y de jabalí se caracteriza por la escasez de parénquima secretor. En ambos casos hemos observado que el tejido glandular parece sustituido por agrupaciones de adipocitos, separadas por tabiques conjuntivos interlobulillares, con imágenes histológicas muy diferentes a las de otros animales estudiados. Comparando las glándulas mamarias de ambos, no aparecen diferencias significativas fundamentales entre los animales salvajes y domésticos. Las únicas detectadas estriban en el número de adipocitos, más abundantes en la glándula del cerdo que en la del jabalí.

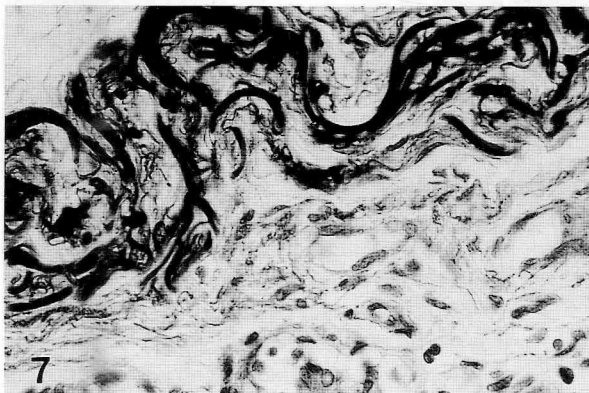
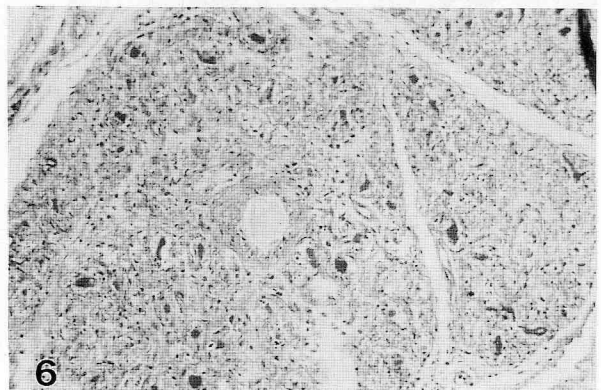
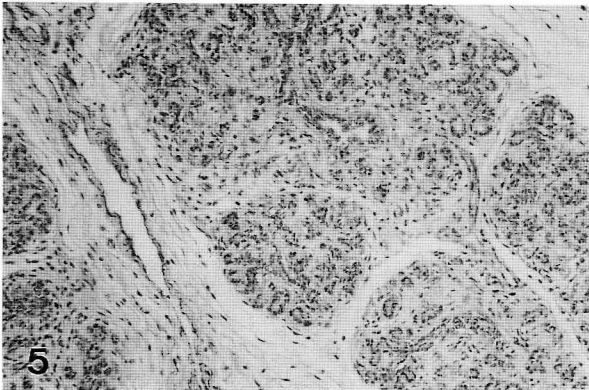
En ambos modelos histológicos las membranas basales están muy bien diferenciadas, tanto alrededor de los alvéolos como de los conductos de pequeño y mediano calibre. La peculiar morfología glandular de cerdos y jabalíes, hace resaltar notoriamente a estas estructuras. Hemos de indicar que en los animales estudiados estas membranas son lisas, sin presentar las ondulaciones características de las glándulas humanas.

La estructuración conjuntiva de los tabiques glandulares, también muestra algunas peculiaridades. En la cabra y en la oveja el conjuntivo de separación muestra fibras conjuntivas, elásticas y de reticulina. Estas últimas parecen más abundantes en la cabra que en los restantes animales estudiados. Las fibras elásticas, por su parte, son muy escasas en la glándula del perro, donde apenas se observan. En la cabra, por el contrario, son muy gruesas y rizadas. Otra característica se observa en la glándula de la oveja, único animal en el que hemos encontrado fibras elásticas intralobulillares, en escasa cantidad pero de manera constante. Reseñemos también la aparición de infiltraciones linfocitarias en la oveja y en la cabra, en esta última tanto dentro como fuera de los lobulillos.

Las variaciones histológicas reseñadas creemos que puede estar relacionada con la duración del ciclo estral. En animales de ciclo corto, como la rata, estudiada por nuestro equipo, (Nasarre 1986) la fase luteínica apenas existente durante el reposo de la glándula, condiciona la proliferación de estructuras, reducida a escasos sistemas canaliculares. En animales con largos periodos luteínicos, como la perra, la glándula desarrolla notables estructuras lobuloacinosas, tomando incluso la apariencia de una glándula gestante, circunstancias ya señaladas por Sinowatz (1980) y Nasarre (1986). En estos casos de desarrollo glandular comprime el conjuntivo de los tabiques interlobulares condicionando su grosor.



- FIGURA 1.** Glándula mamaria de jabalí. Van Gieson. Adipocitos interlobulillares, pequeños e irregulares. Colágeno intralobulillar, formando círculos alrededor de los alvéolos (400x).
- FIGURA 2.** Glándula mamaria de cabra. Van Gieson (400x). Tabiques interlobulillares consistentes. Fibras de colágeno intralobulillares delgadas (400x).
- FIGURA 3.** Glándula mamaria de oveja. Martins. Lobulillo subdividido por tabiques delgados de colágeno (250x).
- FIGURA 4.** Glándula mamaria de oveja. Martins. Detalle del conjuntivo intralobulillar. Se ven células de infiltración (1.000x).



- FIGURA 5.** Glándula mamaria de perra. Orceña. Ausencia de tejido elástico intralobulillar (250x).
- FIGURA 6.** Glándula mamaria de perra. Martins. Tabicaciones de colágeno intralobulillares (250x).
- FIGURA 7.** Glándula mamaria de oveja. Orceña. Fibras elásticas de tabiques conjuntivos a mayor aumento, abundantes y de aspecto rizado (1.000x).
- FIGURA 8.** Glándula mamaria de cabra. Plata amoniacaal de Gomori. Observamos un alvéolo con luz amplia, y su membrana basal perfilada (1.000x).

Establecido el proceso secretor la estructura del parénquima apenas se diferencia en todos los animales estudiados. Los alvéolos aparecen dilatados, separados por delgados tabiques conjuntivos. Los tabiques interlobulares aparecen más densos y casi siempre independientes del conjuntivo yuxtaalveolar. En animales específicamente criados para la producción lechera, como la cabra y la oveja, esta estructura histológica secretora se prolonga más allá de lo estrictamente necesario desde el punto de vista biológico, como ya han señalado Richardson (1949) y Weber (1982).

Fuera de estas características, las diferencias más significativas se encuentran en la estructura de la tetilla y el número de conductos galactóforos que confluyen sobre ella (Frandsen, 1967; Brooker, 1984). Se trata, sin embargo, de estructuras muy específicas de la medicina veterinaria y que no han sido estudiadas por nosotros.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMIKER, D. y GLAWISCHNIG, E. (1967): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Schweinemilchdrüse. Wien. Tierarz. Mschr., **54/9**: 575-583.
- BROOKER, B.E. (1984): An ultrastructural study of the sinus epithelium in the mammary gland of the lactating ewe. J. Anat., **138/2**: 287-296.
- CHEATLE, G.L. y CUTLER, M. (1931): Tumors of the breast: Their pathology, symptoms, diagnosis and treatment. London, Edward Arnold & Co.
- DE BRUX, J. (1979): Histopatologie du sein. Masson. Paris. 1-299.
- DIECKMANN, H. (1925): Über die Histologie der Brustdrüse bei gestortem und ungestortem Menstruationsablauf. Virchows Arch. path. Anat., **256**: 321-356.
- FELDMAN, J.D. (1961): Fine structure of the cow's udder during gestation and lactation. Lab. Invest., **10**: 238-255.
- FRANDSON, R.D. (1967): Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Edit. Interamericana. México.
- GESHICKTER, C. (1943): Diseases of the breast: Diagnosis, pathology, treatment. Philadelphia, JB. Lippincott Company.
- GRÜNFELD, Y. (1964): Die Myoepithelzellen und die phosphatasehaltigen Strukturen der bovinen Milchdrüse. Acta Anat., **58/3**: 317-332.
- IHNEN, M. y PEREZ TAMAYO, R. (1953): Breast stroma. Morphological and histochemical study. A.M.A. Arch. Pat., **56**: (46067).
- KORFSMEIER, K.H. (1976): Mikrodensitometrische messung von enzymaktivitäten in mammaepithel der maus. Acta Histochem.
- MAEDER, L.M.A. (1922): Changes in the mammary gland of the albino rat (*Mus norvegicus albinus*) during lactation and involution. Am. J. Anat., **31**: 1-26.
- MOSZKOWICZ, L. (1926): Sexualzyklus, Mastopathie und Geschwulstwachstum der Mamma. Arch. Klin. Chir., 1927, **144**: 138-161.
- MYERS, J.A. (1919): Studies on the mammary gland. IV The histology of the mammary gland in the male and female albino rat from birth to ten weeks of age. Am. J. Anat., **25**: 395-396.
- NASARRE, M.J. (1986): Aportación al estudio histoquímico y anatomocomparado del parénquima mamario. Tesis Doctoral. Univ. Zaragoza.
- RADNOR, C.J.P. (1972): Myoepithelium in the prelactating and lactating mammary glands of the rat. J. Anat., **112/3**: 337-35.
- RADNOR, C.J.P. (1972): Myoepithelial cell differentiation in rat mammary glands. J. Anant. (London), **111/3**: 381-398.
- RADNOR, C.J.P. (1972): Myoepithelium in involuting mammary glands of the rat. J. Anat., **112/3**: 355-365.
- REID, I.M. y CHANDLER, R.L. (1973): Ultrastructural studies on the bovine mammary gland with particular reference to glycogen distribution. Rev. Vet. Sci., **14/3**: 334-340.
- RICHARDSON, K.C. (1949): Contractile tissues in the mammary gland, with special reference to myoepithelium in the goat. Proc. Roy. Soc. London. Serie B 136, 30-35.
- SINOWATZ, S.; WROBEL, K.H. y col. (1980): On the ultrastructure of the canine mammary gland during pregnancy and lactation. J. Anat., **131/2**: 321-332.
- SUTTER, M. (1921): Cycle changes in the mammary gland of the rat associated with the oestrus cycle. (Abst.) Anat. Rec., **21**: (59).
- WEBER, C.; SINGLA, C.L. y KERFOOF, P.A.H. (1982): Cytoplasmatic organization and quantitation of microtubules in bovine mammary epithelial cells during lactation and involution. Cell. Tissue Res., **223/2**: 305-312.

Correspondencia: Dr. José L. Nieto
Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina de Zaragoza
C/ Domingo Miral, s.n.
50009 Zaragoza. España

ACELERACIÓN SECULAR DEL CRECIMIENTO. OBSERVACIÓN EN POBLACIÓN INFANTIL ESPAÑOLA. HEMBRAS (II)

SECULAR TREND IN SPANISH CHILDREN. FEMALES (II)

J.L. NIETO, N. TAJADA, y A. LATRE

Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se presenta una observación de las tendencias seculares de crecimiento en la población femenina de Aragón (España) durante los últimos noventa años. El estudio complementa a otro similar realizado en la población masculina.

La muestra se compone de 3.985 niñas de 2 a 14 años observadas transversalmente entre 1985 y 1988, y 108 niñas de 0 a 2 años observadas longitudinalmente entre 1987 y 1990, todas ellas nacidas en Aragón. Se han evaluado peso, longitud/talla, perímetros cefálico y torácico, y longitud y anchura máximas de la cabeza.

Los resultados demuestran claramente la aceleración secular positiva de crecimiento en las niñas, secuencialmente similar a la de los varones, si bien con incrementos absolutos algo inferiores a los observados en niños, incrementos que, como en ellos, son máximos durante los primeros años de la vida y el brote puberal, más importantes en niñas de zonas originariamente deprimidas y durante las últimas décadas respecto a épocas previas. Tampoco en niñas se observan cambios seculares en los parámetros cefálicos observados.

PALABRAS CLAVE: Tendencia secular. Crecimiento infantil. Hembras.

SUMMARY

The authors present a secular trend in human growth study in young females born in Aragón (Spain) with ages between birth and 14 years old studied in the period 1985 to 1990. This study complements another one in males. Means for weight, height, head and torax perimeters, length and width of head are observed.

Results show clearly the positive secular trend of growth in girls, similar to de males but with absolute increments less than of theirs. We haven't see secular changes in girls growth in the cephalics parameters we had watched.

KEY WORDS: Secular trend. Infantile Growth. Females.

Introducción

Es un hecho conocido que la talla humana ha experimentado un notable incremento a partir del siglo XIX. Este aumento progresivo, fundamentalmente a expensas del alargamiento de las extremidades inferiores, junto a una pubertad más temprana son conocidos como tendencias seculares del crecimiento y han sido descritos para las más

diversas poblaciones del planeta (Camerón, 1980; Van Wieringen, 1979; Malina, 1981; Meredith, 1983 y Tojo, 1987). Este fenómeno secular del crecimiento se manifiesta en todas las clases sociales y aparece tanto en población urbana como rural, si bien a veces lo hace con diferente intensidad en cada colectivo humano, tal como han demostrado en diversas poblaciones infantiles Roche (1979), Meredith (1983), Falkner (1985) y Tojo (1987) entre otros. Se trata, pues, de un fenómeno de ámbito mundial que ha sido definido por los antropólogos como una aceleración pandémica.

La aceleración secular del crecimiento se inicia en épocas distintas para cada comunidad humana, aunque debemos suponer que en ninguna comienza antes del siglo XIX si nos atenemos a la valoración estatural de los restos medievales, con promedios de talla similares a los descritos para la mitad del siglo pasado. Según algunos autores, la aceleración actual del crecimiento ha venido precedida de un retardo del mismo, e incluso de una involución de la estatura durante los siglos anteriores, atendiendo al hallazgo, durante el Paleolítico Medio, de estaturas excepcionales de 181 cm en hombres y de 169 cm en mujeres.

Muchas teorías han intentado explicar las causas de esta aceleración del crecimiento observada, pero ninguna aporta una explicación totalmente satisfactoria. El fenómeno que más a menudo le precede, y se le asocia, con una relación causa efecto, es la mejora de la calidad de vida cuando se parte de una situación deficitaria previa. Los ambientes de pobreza, guerra, hambre y soledad determinan estacionamientos y aún retrocesos del fenómeno de aceleración del crecimiento.

Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, podemos considerar que el crecimiento de la población infantil de un determinado grupo humano, y las características del mismo, vienen a ser expresión del grado de bienestar de ese colectivo, y de las variaciones del mismo en el tiempo.

El interés del estudio que presentamos, que es complementario de otro similar realizado en varones, estriba en la observación de dichas tendencias seculares en población infantil femenina, y en establecer las similitudes o diferencias, si las hubiera, entre ambos sexos.

Material y Métodos

Los datos de antropometría infantil utilizados correspondientes a 1987-1990 proceden del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de Zaragoza recogidos en las tesis doctorales "Contribución a la cefalometría y somatometría infantil. Estudio transversal de la población aragonesa" (1987), que comprende una muestra de 3.785 niñas de 4 a 14 años nacidas en Aragón, y "Parámetros cefálicos y somáticos en los cuatro primeros años de la vida. Estudio transversal y longitudinal en población aragonesa" (1990), realizado sobre una muestra de 308 niñas desde el nacimiento hasta los cuatro años, asimismo nacidas en Aragón. De ambos estudios se han obtenido promedios por edad para peso corporal, longitud/talla, perímetros cefálico y torácico y longitud y anchura máximas de la cabeza.

Las comparaciones se han establecido con datos procedentes del banco de datos del Seminario Universitario de Antropología de la Universidad de Zaragoza para los años 1940, 1963 y 1980, y con los de otros importantes estudios de crecimiento en niños españoles y aragoneses, concretamente con los de Aranzadi (1903), Suárez y Teixeira (1952), García Almansa (1969) y Palacios (1970) respecto a las mismas variables.

De todos ellos se han obtenido los datos referentes a la muestra de niñas.

Resultados

En las tablas 1 a 7 se exponen los resultados del estudio comparativo de las distintas variables a cada edad, según las fuentes citadas al pie de las mismas. Se evalúan: peso en la tabla 1, longitud/talla en la tabla 2, longitud/talla y peso en la tabla 3, perímetro torácico en la tabla 4 y longitud y anchura máximas y cerco cefálico en las tablas 5, 6 y 7 respectivamente.

TABLA 1.

PESO HEMBRAS

	1903 (1)	1940 (2)	1954 (3)	1963 (2)	1968 (3)	1970 (4)	1972 (4)	1980 (2)	1987 (5)	1990 (5)
EDAD años										
0						3,07				3,17
1						9,34				9,76
2						12,10				12,37
3						14,22				14,41
4		17,85	15,69		18,95	16,03	16,30	18,95	17,78	
		18,50	18,71		21,59	17,90	18,11	21,54	20,19	
6		20,17	21,04	22,95	23,04		18,23	22,82	22,51	
7		21,23	22,91	24,04	25,74		21,70	24,45	25,23	
8	18,03	22,86	25,50	26,57	28,54		24,20	27,06	28,21	
9	22,11	25,28	28,32	29,50	30,85		27,12	27,43	30,91	
10	24,79	27,80	30,50	32,48	35,32		29,80	36,46	34,06	
11	25,93	28,41	34,31	35,99	39,36		33,21	36,31	39,57	
12	27,01	34,73	39,02	41,45	44,64		36,68	42,66	44,62	
13	31,62	39,32	44,03	45,37	49,21		41,32	42,35	49,44	
14		45,22	48,78	50,51	51,20		45,02	41,60	50,03	

(1) Según Aranzadi (1903) "Antropometría". Edit. Soler. Barcelona

(2) Según datos del Seminario Universitario de Antropología. Universidad de Zaragoza

(3) García Almansa, A. (1969). "Patrones de crecimiento de los niños españoles". Rev. Clin. Esp. 113/1 (45-48)

(4) Palacios, J.M. (1970). "El crecimiento de los niños españoles hasta los 5 años". Rev. Clin. Esp. 118/ (419-424). (1972)
"Datos de talla y peso de 128.000 niños españoles". Rev. San. Hig. Pub. 46 (1.107-1.124).

(5) Nieto, J.L. (1978, 1990). Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina de Zaragoza

TABLA 2

LONGITUD / TALLA HEMBRAS (en mm)

	1903 (1)	1940 (2)	1954 (3)	1963 (2)	1968 (3)	1970 (4)	1972 (4)	1980 (2)	1987 (5)	1990 (5)
EDAD años										
0						492				493
1						724				747
2						856				872
3						942				961
4		1.015	1.017		1.071	1.008	1.001	1.060	1.069	
5		1.040	1.095		1.137	1.079	1.067	1.123	1.131	
6		1.129	1.152	1.197	1.184		1.121	1.159	1.189	
7		1.152	1.190	1.227	1.241		1.170	1.210	1.242	
8	1.080	1.196	1.246	1.274	1.286		1.220	1.259	1.290	
9	1.205	1.255	1.293	1.314	1.328		1.275	1.298	1.348	
10	1.258	1.305	1.335	1.359	1.392		1.323	1.399	1.399	
11	1.285	1.324	1.400	1.422	1.454		1.373	1.426	1.466	
12	1.327	1.422	1.445	1.496	1.516		1.427	1.514	1.528	
13	1.394	1.465	1.520	1.535	1.599		1.468	1.531	1.583	
14		1.536	1.541	1.566	1.594		1.511	1.552	1.584	

(1) Según Aranzadi (1903) "Antropometría". Edit. Soler. Barcelona

(2) Según datos del Seminario Universitario de Antropología. Universidad de Zaragoza

(3) García Almansa, A. (1969). "Patrones de crecimiento de los niños españoles". Rev. Clin. Esp. 113/1 (45-48)

(4) Palacios, J.M. (1970). "El crecimiento de los niños españoles hasta los 5 años". Rev. Clin. Esp. 118/5 (419-424). (1972) "Datos de talla y peso de 128.000 niños españoles". Rev. San. Hig. Pub. 46 (1.107-1124)

(5) Nieto, J.L. (1978, 1990). Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina de Zaragoza

TABLA 3

PESO (en kgr) y LONGITUD / TALLA HEMBRA (en mm)

Edad (años)	1952 (1)		1987 (2)	1990 (2)	1952 (1)		1987 (2)	1990 (2)
	v	h	h	h	v	h	h	h
2	11,0			12,4	815			873
3	13,2			14,4	893			961
4	14,6		17,8		968		1.069	
5	16,7		20,2		1.032		1.131	
6	18,8		22,5		1.091		1.189	
7	21,5		25,2		1.114		1.242	
8	23,6		28,2		1.199		1.290	
9	25,8		30,9		1.247		1.348	
10	28,1		34,0		1.295		1.399	
11	30,4		39,6		1.342		1.466	
12	32,7		42,4		1.385		1.528	
13	35,7		49,4		1.432		1.583	
14	39,6		50,1		1.483		1.584	

(1) Según Suárez, M. y Teixeira, J. (1952). VIII Congreso Nacional de Pediatría. Barcelona

(2) Nieto, J.L. (1987, 1990). Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina. Zaragoza

TABLA 4

PERÍMETRO TORÁCICO HMBRAS (en mm)

Edad (años)	1940 (1)	1963 (1)	1980 (1)	1987 (2)
6	544	573	567	609
7	565	582	578	623
8	574	601	591	647
9	596	630	588	665
10	612	646	617	689
11	622	683	656	729
12	652	711	720	764
13	672	760	704	798

(1) Según Suárez, M. y Teixeira, J. (1952). VIII Congreso Nacional de Pediatría. Barcelona

(2) Nieto, J.L. (1987, 1990). Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina. Zaragoza

TABLA 5
LONGITUD MÁXIMA HEMBRAS (en mm)

Edad (años)	1903 (1)		1987 (2)	1988 (2)
	v	h	h	h
1		165		164
4		175	172	173
8		180	176	
11		185	178	

TABLA 6
ANCHURA MÁXIMA HEMBRAS (en mm)

Edad (años)	1903 (1)		1987 (2)	1988 (2)
	v	h	h	h
1		126		128
4		134	133	135
7		138	139	
9		142	142	

TABLA 7
PERÍMETRO CEFÁLICO HEMBRAS (enmm)

Edad (años)	1903 (1)		1987 (2)	1988 (2)
	v	h	h	h
1		471		474
8		516	524	

(1) Según Aranzadi, T. (1903) "Antropometría". Edit. Soler. Barcelona.

(2) Nieto, J.L. (1988). "Cefalometría infantil: Estudio transversal en varones". An. Anat. 34 (75-81). "Cefalometría infantil" Estudio transversal en hembras". An. Anat. 35 (41-48).

Discusión

El análisis de los resultados obtenidos es demostrativo de la existencia de una aceleración secular de crecimiento claramente positiva en las niñas durante el periodo observado, y de que las características de dicha tendencia son similares a las observadas por nosotros en varones, y a las aportadas por otros autores como Eveleth y Tanner (1979), Camerón (1980), Meredith (1983) y Tojo (1987) que asimismo demuestran tendencia secular positiva en hembras y analogía secuencial de la misma en ambos sexos.

En niñas recién nacidas los incrementos de longitud observados durante los últimos 20 años son algo inferiores al 1 ó 2 % estimado por Lentz en 1954, y a los observados en varones por nosotros. Encuanto al peso, los incrementos al nacimiento desde 1970 a 1990 son de 100 g, similares a los de varones durante este mismo periodo y mayores que los aportados por Bieringen en 1985.

La tendencia secular de crecimiento se manifiesta con mayor intensidad después del nacimiento. Durante los periodos de lactancia y preescolar, considerando las tablas de crecimiento infantil publicadas por Suárez y Teixeira en 1952, los incrementos absolutos de longitud en niñas aragonesas durante los últimos 38 años han sido de 63 mm, 68 mm y 101 mm a los 2, 3 y 4 años respectivamente, lo que supone una aceleración de 1,66 mm/año, 1,79 mm/año y 2,65 mm/año a cada una de esas edades, similar a la aportada por de Toni (1968), Eiben (1979) y Camerón (1979), y algo inferior a la estimada por nosotros en varones de la misma edad. Durante el mismo periodo los incrementos absolutos de peso han sido de 1,6 kg a los 2 años, de 1,4 kg a los 3 años y de 2,4 kg a los 4 años.

En la edad escolar tomamos como referencia las tablas patrón de normalidad elaboradas en 1972 por Palacios y Vivanco tras observar a 128.317 escolares españoles entre 1963 y 1964 asistentes a las Escuelas Públicas de todo el país. Según ellas, durante los últimos 25 años las niñas de 4 años han aumentado su talla en 36,3 mm respecto a la media nacional, y en 60,4 mm respecto a las niñas de los pueblos de la montaña del Pirineo oscense y leridano, incrementos que aún con ser tan cuantiosos son inferiores a los observados en niños de la misma edad durante el mismo periodo.

Durante la preadolescencia el incremento de los parámetros corporales aumenta considerablemente en toda la serie, hecho este muy llamativo en las niñas debido a la rapidez de su crecimiento durante este periodo, mayor incluso que el de los varones, consecuencia de su pubertad más temprana. Así la talla ha aumentado en los últimos 15 años 6,7 mm/año a los 12 años 7,6 mm/año a los 13 años y el peso 553 g/año a los 12 años y 554 g/año a los 13 años, ganancias comparativamente superiores a las de los varones a la misma edad.

Posteriormente los incrementos masculinos superarán a los femeninos y al concluir el crecimiento y alcanzar la edad adulta serán más cuantiosos, si bien la escasez de estudios previos en población adulta de mujeres aragonesas dificulta esta evaluación.

En lo referente a los parámetros cefálicos evaluados y en relación a los estudios de medidas cefálicas de Aranzadi en 1903, apenas se observan diferencias, si acaso una ligera tendencia a la braquicefalización. Ello es similar a lo observado en varones, a lo aportado por Hauvast en niños holandeses en 1971 y a lo comprobado por Álvarez y Nieto en 1989 en población adulta aragonesa.

Es, pues, evidente una tendencia secular positiva de crecimiento en niñas aragonesas desde el nacimiento hasta los 14 años para peso, longitud/talla, y perímetros cefálico y torácico. Sus características son similares a las observadas en varones de la misma edad y región, con incrementos máximos durante los primeros años de la vida y en el brote puberal, y asimismo más cuantiosos en niñas de zonas previamente deprimidas y durante las últimas décadas respecto de épocas previas. Los incrementos seculares de crecimiento en niñas, aunque de características similares a los de los varones han sido proporcionalmente menos cuantiosos que los de ellos. Como en los varones, tampoco en las niñas se aprecian cambios seculares significativos en los parámetros cefálicos evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, T. y ARIZCUM, J. (1984): Peso, talla y perímetro cefálico al nacimiento. *Pediatrica*, **4**: 4-45.
ARANZADI, T. (1903): *Antropometría*. Manuales Gallach. Editorial Soler. Barcelona
BERNAD, M. (1983): Edad de la menarquía. Ponencia a Congreso Nacional de Pediatría. Zaragoza.

- BIERING, G. (1985): Birthweights in Iceland 70 years apart. *Acta Paediatr. Scand*, **3/9**: 74-75.
- CAMERON, M. (1980): Conditional standards for growth in eighth for British children from 5 to 15,99 years of age. *Ann. Hum. Biol.*, **7/4**: 331-337.
- DE TONI, E. (1968): Accelerazione dell'acrescimento humano ed incremento secolare del soma. *Auxiología Editorial Minerva Medice. Torino*
- EVELETH, P. B. y TANNER, J. M. (1979): *World wide variation in human growth*. Edit. Cambridge University Press. Cambridge.
- FALKNER, F. (1985): "Some introductory concepts of human growth. An overvie". *Acta Paediatr. Sacand.*, **15, suppl. 1**: 15-32.
- GARCÍA ALMANSA, A.; FERNÁNDEZ, M. D. y PALACIOS, J. M. (1969): Patrones de crecimiento de los niños españoles normales. *Rev. Clin. Esp.*, **113/1**: 45-48
- HOYOS SAINZ, N. (1982): Notas para un estudio antropológico del crecimiento. *Anales Sociedad Española de Historia Natural*
- LATRE, A (1987): Contribución a la cefalometría y somatometría infantil. Estudio transversal de las población aragonesa. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
- MEREDITH, H. V. (1983): Compilation and comparison of overages for standing heigth at late chilhood ages of U.S.A. boys of several ethnic groups studied between 1875-1980). *Am. J. Phys. Anthropol.*, **61/1**: 111-124.
- MURO, A.; ACENA, A. y VIVANCO F. (1954): Patrones de crecimiento de los niños normales españoles. *Rev. Clin. Esp.*, **53**: 360-363.
- NIETO J. L. (1983): Bioantropología de Aragón. *Rev. Aragón*, **316**.
- NIETO, J. L. (1983): Evolución de la cefalometría infantil aragonesa. *Leción Científica de la Real Academia de Medicina de Zaragoza*. Zaragoza.
- OLORIZ, F. (1894): La talla humana en España. *Discurso de la Real Academia de Medicina de Madrid*.
- PALACIOS, J. M. y VIVANCO, F. (1972): Datos de peso y talla de 128.000 niños españoles. *Rev. San. Hig. Púb.*, **46**: 1.107-1.124.
- PALACIOS, J. M.; GARCIA ALMANSA, F.; VIVANCO, F.; FERNANDEZ, M. D.; GARCIA ROBLES, R. y MORENO, B. (1970): El crecimiento de los niños españoles desde el nacimiento hasta los cinco años. *Rev. Clin. Esp.*, **118/5**: 419-424.
- ROCHE, A. F. (1979): *Secular trend in humam growth*. Monograph Serial nº 179. University Chicago Press. Chicago.
- SUÁREZ, M. y TEIXEIRA, J. (1952): Métodos de estudio del crecimiento. Ponencia al VIII Congreso Nacional de Pediatría. Barcelona.
- TANNER, J. M. (1952): The assesment of growth and development in children. *Arch. Disease Child.*, **27**: 10-33.
- TANNER, J. M. (1985): Clinical longitudinal standards for heigth and weigth velocity for North Americam children. *Pediatrics*, **107/3**: 317-329.
- TAJADA N. (1990): Parámetros cefálicos y somáticos infantiles durante los cuatro primeros años de la vida. Estudio longitudinal y transversal en población aragonesa. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
- TAJADA, N.; NIETO, J.L. y LATRE, A. (1991): Aceleración secular del crecimiento. Observación en población infantil española. Varones (I). *An. Anat.* **37/96**: 227-234.
- TOJO, R.; IGLESIAS, C.; CASTRO, I.; ALONSO, B.; SEGADE, R. y NORES, A. (1987): Secular trend en Galicia 1900-1985. Evolución del crecimiento, maduración y desarrollo humano". *Bol. Soc. Cast. Ast. Leon. de Pediatría XXVIII*: 286-300.

Correspondencia:
 J.L. Nieto
 Dto. Ciencias Morfológicas
 Universidad de Zaragoza
 Zaragoza (España)

ESTUDIO DE LAS CÉLULAS PERIPOLARES DE LA OVEJA CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO Y EL DE TRANSMISIÓN

A SCANNING AND TRANSMISSION ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF SHEEP PERIPOLAR CELLS

S. RODRÍGUEZ, J.A. MORO y J.F. PASTOR

Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina. Valladolid.

RESUMEN

Se observa, una gran cantidad de protuberancias en la superficie de las células peripolares de la oveja, con el microscopio electrónico de barrido y el de transmisión. Estas prominencias son consecuencia de la presión en el interior de la célula de los granos citoplasmáticos. Estos granos, envueltos por una membrana, salen al exterior cuando las células peripolares se rompen durante el proceso de microdissección. El gran desarrollo de las células peripolares en la oveja se relaciona con la cantidad y calidad de su secreción salivar.

PALABRAS CLAVE: Células peripolares. Riñón de oveja.

SUMMARY

Sheep peripolar cells have been examined by scanning and transmission electron microscopy, and a distinctive number of bulges has been observed on the surface of these cells. This is due to the internal pressure of the cytoplasmic granules. These granules are membrane-bound and come out when peripolar cells are broken during the microdissection process. The great development of the sheep peripolar cells has been related to the quantity and quality of its salivate secretion.

KEY WORDS: Peripolar cells. Sheep's kidney.

Introducción

En 1979 Ryan y col describieron en la oveja un tipo de células situadas en el polo vascular del glomérulo renal, denominadas por ellos *células peripolares* que son muy ricas en granos secretorios citoplasmáticos. Situadas en la zona de transición entre la hoja parietal y la hoja visceral de la cápsula de Bowman, están, por consiguiente, en situación intraglomerular en estrecho contacto con los vasos aferente y eferente. Su topografía difiere, por tanto, de las estructuras propias del aparato yuxtaglomerular (células mioepitelioides de las arteriolas aferente y eferente del glomérulo, células de Goormaghtigh y mácula densa) que, como es sabido, se sitúan fuera del corpúsculo renal.

Tanto en el trabajo antes mencionado como en otros (Ryan y cols. 1982) se habla de la privilegiada posición de las células peripolares para captar la composición del ultrafiltrado glomerular y para responder activamente

excretando al espacio urinífero los productos sintetizados, en forma de granos, en su citoplasma. De ser esto así, las células peripolares se comportarían, no como una glándula de secreción interna, sino como un órgano de secreción externa cuyo conducto excretor sería el espacio urinífero y su continuación, el túbulo contorneado de la nefrona.

Otros muchos autores han estudiado estas células, entre los que destacan Mitchell y cols. (1982) que en un trabajo embriológico confirmaron su origen epitelial al igual que las células de la mácula densa, mientras que las mioepitelioides y las de Goormaghtigh son de origen mesenquimatoso. Detectaron, así mismo, que en el feto de oveja aparecen los primeros granos citoplasmáticos de las células peripolares a los 53 días de gestación.

Alcorn y cols. (1982) vieron que en el cordero recién nacido los granos de las células peripolares son más abundantes y de mayor tamaño que en el feto o en la oveja adulta, lo que relacionaron con una adaptación funcional del riñón a la vida postnatal.

Dhiab y Bearn (1986) observan en ratas recién nacidas y sometidas a deshidratación que el índice de granulación de las células peripolares es mayor que en los animales controles.

Hanner y Ryan (1980), en un trabajo en anfibios, ven que el ajolote posee abundantes y muy granuladas células peripolares y por el contrario, en el sapo son más escasas y pequeñas. El comportamiento de estos anfibios es inverso con respecto al número y granulación de las células mioepitelioides, escasas en el ajolote y abundantes en el sapo.

Morild y cols. (1982) hacen un estudio en aves y notan un aumento de las células peripolares animales tratados con furosemida.

Gall y col. (1986) investigan en 17 especies de mamíferos, incluido el hombre, encontrando dichas células en todas, siendo la oveja y el canguro las especies que las poseen en mayor cantidad. Así mismo Mbassa (1989) verifica en antílopes y cabras abundancia de células peripolares y Kelly y col. (1990), con el microscopio de barrido, realizan un estudio en la oveja observando con gran claridad las características morfológicas de las células peripolares y de sus granos citoplasmáticos. Previamente Gibson y cols. (1989), con una técnica de microdissección, ven con el microscopio de barrido que en la rata las células peripolares son más abundantes de lo que se había visto en trabajos anteriores.

En humanos, Gardiner y cols. (1986) ven con detalle estas células que, aunque menos abundantes que en la oveja, ofrecen unas características morfológicas parecidas a lo ya dicho.

En prácticamente todos los trabajos reseñados, sus autores coinciden en describir a las células peripolares con muchos granos de secreción en su citoplasma que le proporcionan una superficie llena de protuberancias. Por su superficie libre hacen hernia en el espacio urinífero del corpúsculo renal, mientras que por el lado contrario quedan apoyadas en la membrana basal de la cápsula de Bowman.

Los granos citoplasmáticos están envueltos por una membrana; son de tamaño grande aunque variable; no tienen todos la misma electrodensidad y su contenido es de aspecto granular homogéneo, si bien, a veces, ofrecen una zona central más pálida. Poseen, las células peripolares, un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi bien desarrollados. Existen complejos de unión entre estas células y sus vecinas las parietales y viscerales de la cápsula de Bowman.

En relación con las células mioepitelioides del aparato yuxtglomerular se puede decir que las células peripolares tienen cierto parecido morfológico, aunque los granos secretorios son de mayor tamaño y no contienen renina ni prorenina, desconociéndose en la actualidad la naturaleza de su contenido.

Otra característica morfológica importante es que las células peripolares poseen prolongaciones que rodean al tallo vascular del glomérulo (Gibson y cols. 1989; Kelly y cols. 1990).

Material y Método

Se han utilizado riñones de oveja adulta obtenidos inmediatamente después de su sacrificio en el matadero.

Previamente a la fijación los riñones fueron lavados con suero fisiológico por perfusión a través de la arteria renal. A continuación se procedió a la fijación mediante perfusión de una solución de glutaraldehído al 2,5% en

buffer fosfato 0,1 M y seguidamente se realizaron pequeñas secciones de la corteza renal, que se sumergieron en el mismo fijador.

Las preparaciones destinadas a microscopía electrónica de transmisión fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% en buffer fosfato 0,1 M, deshidratadas en acetona e incluidas en una epoxiresina de baja viscosidad (Spurr, 1969). se realizaron cortes controles semifinos a una micra y se tiñeron siguiendo el método descrito por Richardson y cols. (1960). Una vez obtenida la zona deseada se hicieron secciones ultrafinas a 700 nanómetros con un ultramicrotomo R.C.M.MT6.000-XL y se tiñeron con citrato de plomo según el método de Reynolds (1963). Los cortes fueron observados y fotografiados con un microscopio electrónico de transmisión JEOL-1.200.EX.

Las preparaciones destinadas a microscopia electrónica de barrido, tras su fijación en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato, fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente y desecadas por el método del punto crítico con un CRITICAL POINT DRYER BALZERS CPD-0,20. Una vez desecadas las muestras se procedió a extraer los glomérulos de la corteza renal mediante microdissección bajo lupa (Gibson y cols. 1989) empleando agujas de tungsteno. A continuación las muestras fueron metalizadas con oro-paladio empleando un SPUTTER COATER BALZERS SCD004. Para la visualización y fotografía de las preparaciones hemos empleado un SCANNING MICROSCOPE JEOL JSM-T300 con una aceleración de voltaje de 20 Kv.

Resultados

Según se explica en *Material y Métodos* los trozos de riñón destinados al estudio con el microscopio de barrido, fueron sometidos, después del punto crítico, a un proceso de microdissección. Para esto, ayudándonos con unas agujas de tungsteno, se tracciona del glomérulo que se rompe por el tallo vascular, dejando libre la oquedad corpuscular sólo recubierta por la hoja parietal de la cápsula de Bowman que se puede explorar fácilmente.

En general, se observa que las células epiteliales de la cápsula de Bowman son aplanadas excepto en las proximidades del polo vascular donde son más abultadas. Células peripolares muy prominentes se ven en la figura 1. La superficie celular que da al espacio urinífero tiene protuberancias debido a la gran cantidad de granos secretorios que en algunos casos, al romperse la célula, debido a la tracción sufrida cuando se extrae el glomérulo, salen al exterior. El diámetro medio de dichos granos es de 1,5 micras.

El contacto entre estas células y el polo vascular es íntimo como se puede apreciar en dicha figura, en donde vemos a una célula colocada encima del vaso aferente.

Al microscopio electrónico de transmisión puede verse (fig 2.) el aspecto fuertemente granuloso de una de las dos células peripolares de esta microfotografía. Se observan cisternas de retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi muy desarrollado.

En cuanto a su situación, no sólo las hemos visto en el lugar clásicamente descrito, es decir, en la zona de transición entre las hojas parietal y visceral de la cápsula de Bowman, sino también en el lugar del primer podocito e incluso, en material incluido en parafina, mucho más alejadas del polo vascular del glomérulo.

En la más grande de las células de la figura 2, los granos son muy abundantes, de tamaño diferente aunque, en general, son voluminosos. Están envueltos por una membrana y son de electrodensidad variable. Su contenido es granular y muchos de los que se observan más pálidos se encuentran situados hacia la periferia celular. Algunos empujan tanto a la membrana celular que parece fueran a explotar como si de un folículo ovárico se tratase. En la más pequeña de las células peripolares de la figura 2 se ve, junto al núcleo, un grano de densidad y tamaño intermedios, y en sus proximidades un aparato de Golgi muy desarrollado (fig. 3)

Se puede ver también, con nitidez, que ambas células están ancladas sobre la membrana basal de la cápsula de Bowman, mientras que su superficie libre mira al espacio urinífero, el cual se interpone entre ellas y los podocitos que recubren los capilares del glomérulo. En íntimo contacto con la cápsula de Bowman se observa, en el ángulo superior e izquierdo de dicha figura 2, la pared de la arteriola aferente en la que no se aprecian, en este caso células mioepitelioides.

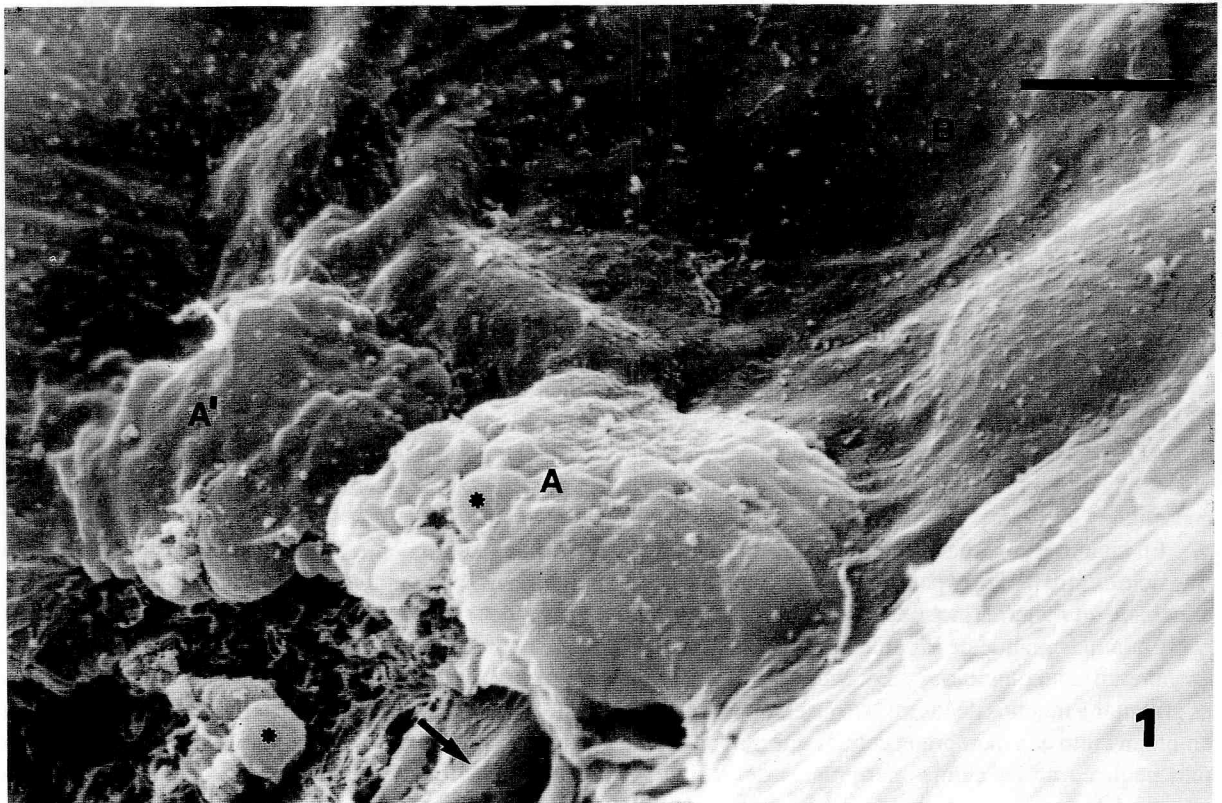


FIGURA 1. Microfotografía electrónica de barrido de la cápsula de Bowman de un corpúsculo renal. Se observan dos células peripolares con su superficie llena de protuberancias por la presión de los granos intracitoplasmáticos. Algunos granos han salido fuera de la célula.
A y A': células peripolares; B: cápsula de Bowman; asteriscos: granos de secreción, uno de los cuales está fuera de la célula; flecha: arteriola glomerulara en estrecho contacto con una de las células peripolares.

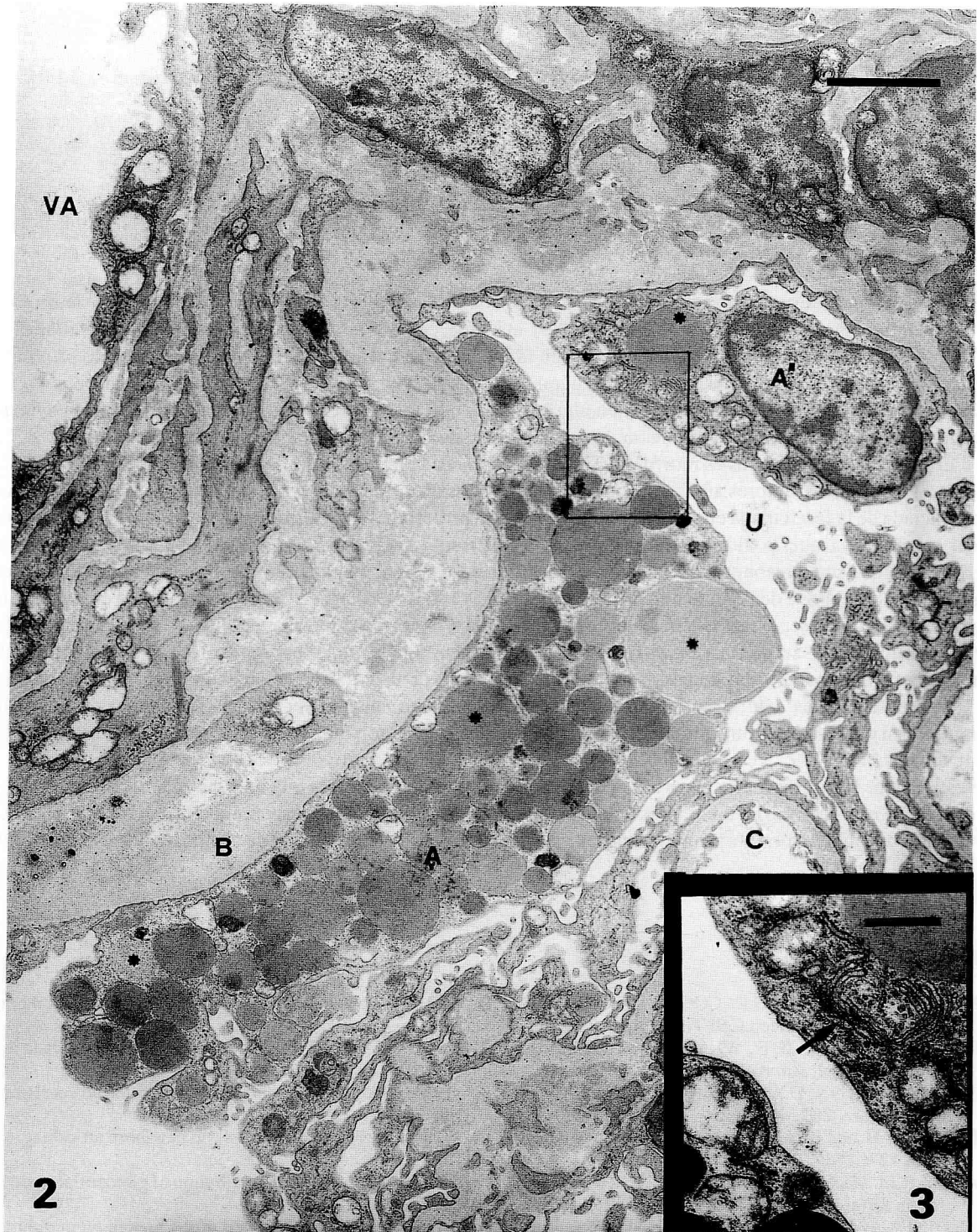


FIGURA 2. Microfotografía electrónica de transmisión de un glomérulo renal en donde se observan dos células peripolares. En la más grande hay almacenados muchos granos de secreción de diferente tamaño y electrodensidad variable. Nótese cómo están envueltos por una membrana. La superficie libre de las células mira al espacio urinífero, mientras que por la cara opuesta están ancladas en la cápsula de Bowman. A y A': células peripolares; B: cápsula de Bowman; C: capilar del glomérulo; VA: vaso aferente; U: espacio urinífero; asteriscos: granos de secreción. Barra = 2 micras.

FIGURA 3. Corresponde al recuadro de la figura 2 para ver el desarrollo del aparato de Golgi (flecha). Barra = 0,5 micras.

Discusión

La existencia de grandes células epiteliales formando parte de la zona de reflexión parietovisceral de la cápsula de Bowman es un hecho conocido hace ya algunos años. Sus descubridores, Ryan y cols. (1979) las consideraron como un elemento más del aparato yuxtglomerular apoyándose en la posibilidad de que intervengan en la regulación del metabolismo hidrosalino.

En relación con esto, existen trabajos como los de Hanner y Ryan (1980), Ryan y cols. (1982), Alcorn y col. (1984), Dhiab y Bearn (1986), Morild y cols. (1988), etc., que, con diferentes modelos experimentales, abogan por un papel activo de la secreción de estas células en la reabsorción del sodio en el túbulo contorneado proximal.

Llama la atención que sea la oveja, y en general los rumiantes, la especie en la que las células peripolares están más desarrolladas. A este propósito, existen algunos datos que merece la pena destacar, ya que pueden ayudar a explicar, aunque sea de manera indirecta, la relación de estas células con el metabolismo del sodio.

El primero de estos datos es morfológico y tiene que ver con las glándulas suprarrenales de la oveja (Bescos y cols. 1991). Estos autores observan que la capa glomerulosa de la adrenal de estos animales, está poco diferenciada de la fasciculada en comparación con otros mamíferos también estudiados por ellos. Todo esto puede tener relación, ya que la aldosterona de la capa glomerulosa regula el metabolismo del sodio y las células peripolares, que son tan abundantes en la oveja, parece ser que también. Otro dato, de tipo funcional, está basado en la cantidad y calidad de la secreción salivar. Bott y cols. (1954) señalan que la cantidad de sodio en la secreción diaria de saliva representa más de cinco veces la cantidad de este ion en el plasma, por lo que la reabsorción sódica debe ser rápida. Esto se agudiza en los rumiantes que en el caso de la oveja segrega de 10 a 15 l diarios de saliva que contiene bicarbonato sódico para tamponar los productos ácidos de la fermentación microbiana del rumen.

Se piensa que las células peripolares pueden intervenir de manera directa en la resolución de la presión sanguínea en general, y del ultrafiltrado glomerular, en particular. Existe, para pensar esto, una base morfotopográfica (Gibson y cols. 1989; Kelly y cols. 1990) que también hemos podido corroborar en nuestro material de investigación. Nos referimos a las prolongaciones de las células peripolares que abrazan el tallo glomerular, que convierten a estas células en un órgano sensor estratégicamente situado para captar e incluso modificar el calibre y, en consecuencia, el torrente sanguíneo de las arteriolas aferente y eferente antes de capilarizarse en el glómulo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALCORN, D., CHESHIRE, G.R., COGHLAN, J.P., RYAN, G.B. (1984): Peripolar cell hypertrophy in the renal juxtglomerular region of newborn sheep. *Cell Tissue Res.*, **236**: 197-202.
- BESCOS, M., LOSTALÉ, F., WHYTE, A., TORRES, A., WHYTE, J. y SARRAT, R. (1991): Estructura comparada de la glándula adrenal. *An. Anat.*, **37**: 145-150.
- BOTT, E., DENTON, D.A., GODING, J.R. and SABINA, J.R. (1954): Sodium deficiency and corticosteroid secretion in cattle. *Nature*, **202**: 461-462.
- DHIAB, A.A.H. and BEARN, J.G. (1986): Effect of dehydration on the glomerular granular cells in new-born rat kidney. *Acta Anat.*, **127**: 176-178.
- GALL, J.A.M., ALCORN, D., BUTKUS, A., COGHLAN, J.P. and RYAN, G.B. (1986): Distribution of glomerular peripolar cells in different mammalian species. *Cell Tissue Res.*, **244**: 203-208.
- GARDINER, D.S., MORE, I.A.R. and LINDOP, G.B.M. (1986): The granular peripolar cell of the human glomerulus: an ultrastructural study. *J. Anat.*, **146**: 31-43.
- GIBSON, I., MORE, I.A.R. and LINDOP, G.B.M. (1989): The glomerular peripolar cell in the rat kidney: a scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res.*, **257**: 201-206.
- HANNER, R.H. and RYAN, G.B. (1980): Ultrastructure of the renal juxtglomerular complex and peripolar cells in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and toad (*Bufo marinus*). *J. Anat.*, **130**: 445-455.
- KELLY, G., DOWNIE, I., GARDINER, D.S., MORE, I.A.R. and LINDOP, G.B.M. (1990): The peripolar cell: a distinctive cell type in the mammalian glomerulus. Morphological evidence from a study of sheep. *J. Anat.*, **168**: 217-227.
- MBASSA, G.K. (1989): Peripolar cells form the majority of granulated cells in the kidneys of antelopes and goats. *Acta Anat.*, **135**: 158-163.

- MITCHELL, G.B., STRATFORD, B.F. and RYAN, G.B. (1982): Morphogenesis of the renal juxtaglomerular apparatus and peripolar cells in the sheep. *Cell Tissue Res.*, **222**: 101-111.
- MORILD, I., CHRISTENSEN, J.A., MIKELER, E. and BOHLE, A. (1988): Peripolar cells in the avian kidney. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol.*, **412**: 471-477.
- REYNOLDS, T.CH. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *T. Cell Biol.*, **17**: 208-212.
- RICHARDSON, K.C., JARETT, L. and FINKE, E.H. (1960): Embedding in epoxyresins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, **35**: 313-323.
- RYAN, G.B., COGHLAN, J.P. and SCOGGINS, B.A. (1979): The granulated peripolar epithelial cell: a potential secretory component of the renal uxtaglomerular complex. *Nature*, **277**: 655-656.
- RYAN, G.B., ALCORN, D., COGHLAN, J.P., HILL, P.A. and JACOBS, R. (1982): Ultrastructural morphology of granule release from juxtaglomerular myoepithelioid and peripolar cells. *Kidney Inter.*, **22**: 53-58.
- SPURR, A.R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, **26**: 31.

Correspondencia: Prof. Dr. Santiago Rodríguez
Dpto. de Anatomía de la Facultad de Medicina
Universidad de Valladolid
Avda. Ramón y Cajal, 7
47005 Valladolid. España

CÉLULAS LH DE LA ADENOHIPÓFISIS DE LA RATA MACHO CASTRADA. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO, MORFOMÉTRICO Y ULTRAESTRUCTURAL

ADENOHYPOPHYSEAL LH CELLS OF CASTRATED MALE RAT. AN INMUNOHISTOCHEMICAL, MORPHOMETRIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDY

A. SÁNCHEZ, F.E. PASTOR, J. L. BLÁZQUEZ, B. PELÁEZ,
G. AMAT y P. AMAT

Departamento de Anatomía e Histología Humanas y Departamento de Investigación y Microscopía Electrónica.
(Director: Prof. P. Amat). Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

RESUMEN

Se ha realizado un estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural de las células LH de la adenohipófisis de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley castradas al mes y a los tres meses de edad y sacrificadas, en ambos casos, uno y tres meses después de la intervención. La castración determina un marcado incremento en el número y tamaño de las células LH, que es independiente de la edad a la que se realiza la intervención y se va acentuando conforme transcurre el tiempo. No hemos observado figuras de mitosis. La hipertrofia de las células LH se debe preferentemente a un incremento del citoplasma, en el que se observa un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del aparato de Golgi. El contenido de las cisternas de RER es escasamente inmunorreactivo, lo que explica la menor intensidad y mayor heterogeneidad de tinción de las células LH de los animales castrados. Las típicas células *en anillo de sello* son escasas al mes de la castración y muy numerosas en las ratas sacrificadas tres meses después de la intervención.

PALABRAS CLAVE: Células LH. Adenohipófisis. Castración. Inmunohistoquímica. Morfometría. Ultraestructura. Rata.

SUMMARY

An immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study was carried on the LH cells of the adenohipophysis of Sprague-Dawley male rats castrated at one month after birth and at three months of age; in both cases, the animals were sacrificed one and three months following the surgical intervention. Castration was found to induce a pronounced increase in the number and size of LH cells that was independent of the age at which castration was performed; this increase also became more marked as time progressed. Mitoses are not found. The hypertrophy of the LH cells is mainly due to an increase in the cytoplasm, in which the rough endoplasmic reticulum (RER) and the Golgi apparatus become much more developed. The content of the cisternae of the RER is scantily immunoreactive, which accounts for the lower intensity and greater heterogeneity of the cellular staining of the LH cells of the castrated animals. The typical *signed ring* cells are scarce at one month following castration and are very numerous in the animals sacrificed at 3 months after the surgical procedure.

KEY WORDS: LH cells. Adenohipophysis. Castration. Immunohistochemistry. Morphometry. Ultrastructure. Rat.

Introducción

Las hormonas gonadotropas (FSH y LH) son producidas por una población celular de la adenohipófisis, los adenocitos (*endocrinocitos*) gonadotropos. En la rata macho esta población está constituida aproximadamente en un 70% por células bihormonales, esto es, que producen tanto FSH como LH, y el resto, en proporción similar, son células monohormonales que producen sólo una hormona gonadotropa (Childs y cols., 1980, 1981, 1982; Childs, 1984). La estimulación de las células gonadotropas, bien mediante la administración de LHRH o tras la castración, lleva consigo un aumento marcado en la proporción de células bihormonales por probable transformación de células monohormonales (Tougaard y cols., 1971, 1980; Tixier-Vidal y cols., 1975; Batten y Hopkins, 1978; Childs y cols., 1981, 1982; Inoue y Kurosumi, 1984; Childs, 1985; Ibrahim y cols., 1986; Lloyd y Childs, 1988).

En el presente trabajo hemos realizado un estudio inmunohistoquímico y morfométrico de las células LH de la adenohipófisis de ratas machos castradas, correlacionándolo con un estudio ultraestructural de los adenocitos gonadotropos.

Material y Técnicas

Como animal de experimentación se ha utilizado la rata albina macho de la cepa Sprague-Dawley. Doce animales fueron castrados quirúrgicamente al mes de edad; seis de ellos fueron sacrificados un mes después de la operación (grupo C1+1) y los seis restantes fueron sacrificados tres meses después de la intervención (grupo C1+3). Otros doce animales fueron castrados a los tres meses de edad, seis de ellos se sacrificaron un mes después de la castración (grupo C3+1) y los otros seis a los tres meses (grupo C3+3). Veinticuatro animales fueron sometidos a una intervención de castración simulada. En doce de ellos se realizó dicha intervención al mes de edad, sacrificándose seis animales un mes después (grupo CS1+1) y otros seis a los tres meses (grupo CS1+3). Los otros doce animales sufrieron la intervención de castración simulada a los tres meses de edad, sacrificándose seis de ellos un mes después (grupo CS3+1) y los otros seis a los tres meses de la operación (grupo CS3+3). La mitad de los animales de cada grupo se destinó al estudio inmunohistoquímico y morfométrico y la otra mitad al estudio ultraestructural. El sacrificio se realizó en todos los casos a las 17 horas.

Estudio inmunohistoquímico. Previa anestesia con tiopental sódico (30 mg/kg peso), los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con Bouin-Hollande sublimado. Finalizada la perfusión se extrajo la hipófisis, que fue dividida en dos mitades sagitales que permanecieron en fijador durante 24 horas. Posteriormente fueron lavadas, deshidratadas con alcohol e incluidas en parafina. Sobre cortes seriados de 10 μm de espesor se realizó la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) según el proceder de Sternberger y col. (1970), utilizando un antisero específico contra LH de rata (UCB) y 3,3'-diaminobencidina como marcador. Los núcleos celulares fueron contrastados con hematoxilina.

Estudio ultraestructural. El sacrificio se realizó por decapitación, seguida de extracción rápida de la hipófisis, tallado e inmersión en glutaraldehído al 5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4°C, durante 24 horas. A continuación se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo tampón, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en Durcupan (Fluka). Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800 y se estudiaron con un microscopio electrónico de barrido Philips EM 201.

Estudio morfométrico. Se realizó sobre las preparaciones inmunohistoquímicas. Se seleccionaron de manera aleatoria 100 células inmunorreactivas para LH de cada grupo de animales, determinando con un analizador semiautomático de imágenes Ibas I Kontron las áreas celular y nuclear, obteniendo por la diferencia entre ambas el área citoplasmática, calculando posteriormente la relación núcleo/citoplasma. Para determinar el número de células inmunorreactivas por unidad de superficie (*densidad celular*) se contaron, en cada grupo de animales, las células LH presentes en 48 campos de 80.500 μm^2 de tejido hipofisario; estos campos fueron elegidos al azar y no estaban superpuestos. Para analizar la significación estadística se utilizó la «t» de Student.

Resultados

La simple observación de las preparaciones en las que se ha realizado la tinción inmunohistoquímica de la PAP para poner de manifiesto las células LH demuestra la existencia de un marcado incremento tanto en el número como en el tamaño de estas células en la adenohipófisis de los animales castrados, en relación con los controles sometidos a una intervención de castración simulada (compárense las figs. 2, 4, 6 y 8 -pertenecientes a ratas castradas de los distintos grupos de nuestra casuística- con las figs. 1, 3, 5 y 7, que corresponden a animales controles). El estudio morfométrico confirma esta apreciación, demostrando la existencia del referido incremento de la densidad celular, esto es, del número de células inmunorreactivas para LH por unidad de superficie, en los distintos grupos de animales castrados (véase tabla 1). Este incremento es porcentualmente del 78% en el grupo C1+1, del 146% en C1+3, del 152% en C3+1 y del 164% en C3+3. Por tanto existe un indudable aumento del número de células LH-inmunorreactivas tras la castración, sin que hayamos observado la presencia de figuras de mitosis en nuestro material.

La hipertrofia de las células LH en los animales controles es confirmada también por el análisis morfométrico (véase tabla 1), que demuestra la existencia de un aumento del área celular, es decir, de la superficie de corte de las células LH, que porcentualmente es del 129% en C1+1, del 120% en C1+3, del 66% en C3+1 y del 195% en C3+3. La referida hipertrofia celular se debe a un aumento del tamaño del núcleo celular y, sobre todo, a un gran incremento del citoplasma, lo que conlleva una marcada disminución de la relación núcleo/citoplasma (véase tabla 1).

El estudio ultraestructural pone de manifiesto que el incremento de tamaño del citoplasma se debe fundamentalmente a un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del aparato de Golgi. En la figura 9 pueden observarse varias células gonadotropas -identificadas como tales por poseer dos poblaciones de gránulos secretores de distinto tamaño- muy llamativas por la gran cantidad de cisternas dilatadas de RER. La figura 10 muestra el detalle de un fragmento de una célula gonadotropa, siendo de destacar el desarrollo del aparato de Golgi, que al corte aparece con una disposición circular, por lo que tridimensionalmente tenderá a ser esférico, ovoide o acampanado, lo que concuerda con la descripción clásica de dicho organito en este tipo celular. También es extraordinariamente llamativo en las figuras 10 y 11 la gran abundancia de cisternas dilatadas de RER, que muestran un contenido de escasa densidad electrónica. La matriz citoplasmática queda reducida a los espacios comprendidos entre las cisternas del RER, y en ella se pueden observar los gránulos de secreción (figs. 10 y 11). La confluencia de las cisternas de RER da lugar a grandes vacuolas intracitoplasmáticas, lo que confiere a las células el clásico aspecto *en anillo de sello* (fig. 12), al rechazar la vacuola al núcleo celular y al resto del citoplasma

TABLA I

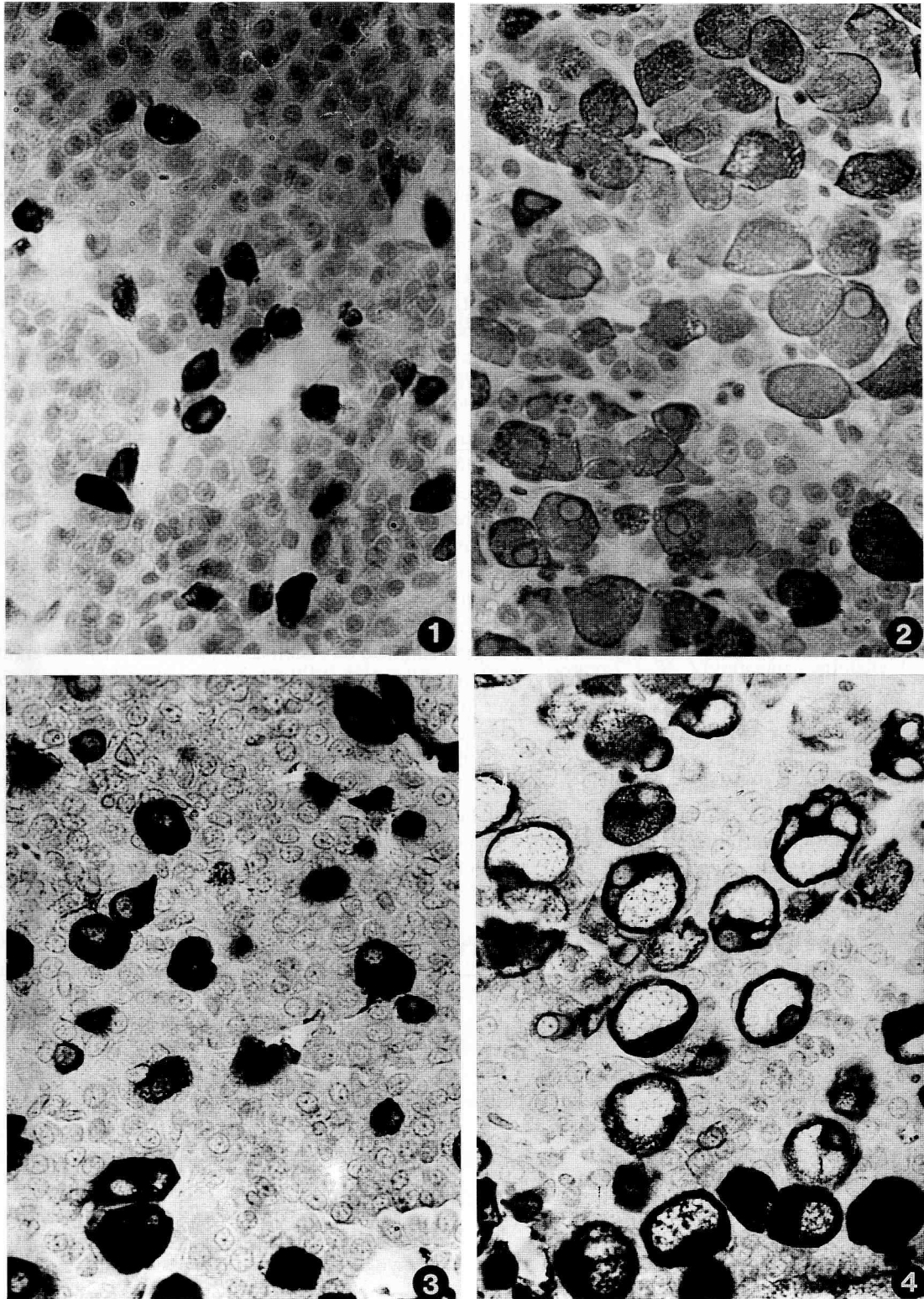
Grupo	Densidad celular	Área celular	Área nuclear	Área citoplasmática	Relación núcleo/citoplasma
CS 1+1	30.44 ± 2.60	140.68 ± 25.82	30.96 ± 6.45	109.72 ± 25.98	0.30 ± 0.14
C 1+1	54.19 ± 5.06 (*)	322.67 ± 59.24 (*)	39.25 ± 9.25 (*)	283.42 ± 57.65 (*)	0.14 ± 0.04 (*)
CS 1+3	30.50 ± 1.79	185.13 ± 35.61	36.27 ± 7.55	148.86 ± 35.51	0.26 ± 0.10
C 1+3	75.00 ± 6.70 (*)	406.98 ± 77.61 (*)	45.26 ± 9.15 (*)	361.72 ± 77.25 (*)	0.13 ± 0.04 (*)
CS 3+1	21.25 ± 2.76	190.28 ± 37.85	33.03 ± 7.77	157.25 ± 38.59	0.23 ± 0.11
C 3+1	53.62 ± 6.34 (*)	316.23 ± 45.49 (*)	36.51 ± 8.08 (**)	279.72 ± 45.83 (*)	0.13 ± 0.04 (*)
CS 3+3	24.75 ± 3.26	128.86 ± 31.44	25.94 ± 7.33	102.92 ± 30.83	0.27 ± 0.13
C 3+3	65.44 ± 3.86 (*)	380.06 ± 70.97 (*)	45.39 ± 9.96 (*)	334.67 ± 72.95 (*)	0.14 ± 0.05 (*)

Todos los valores están expresados por media aritmética ± desviación típica.

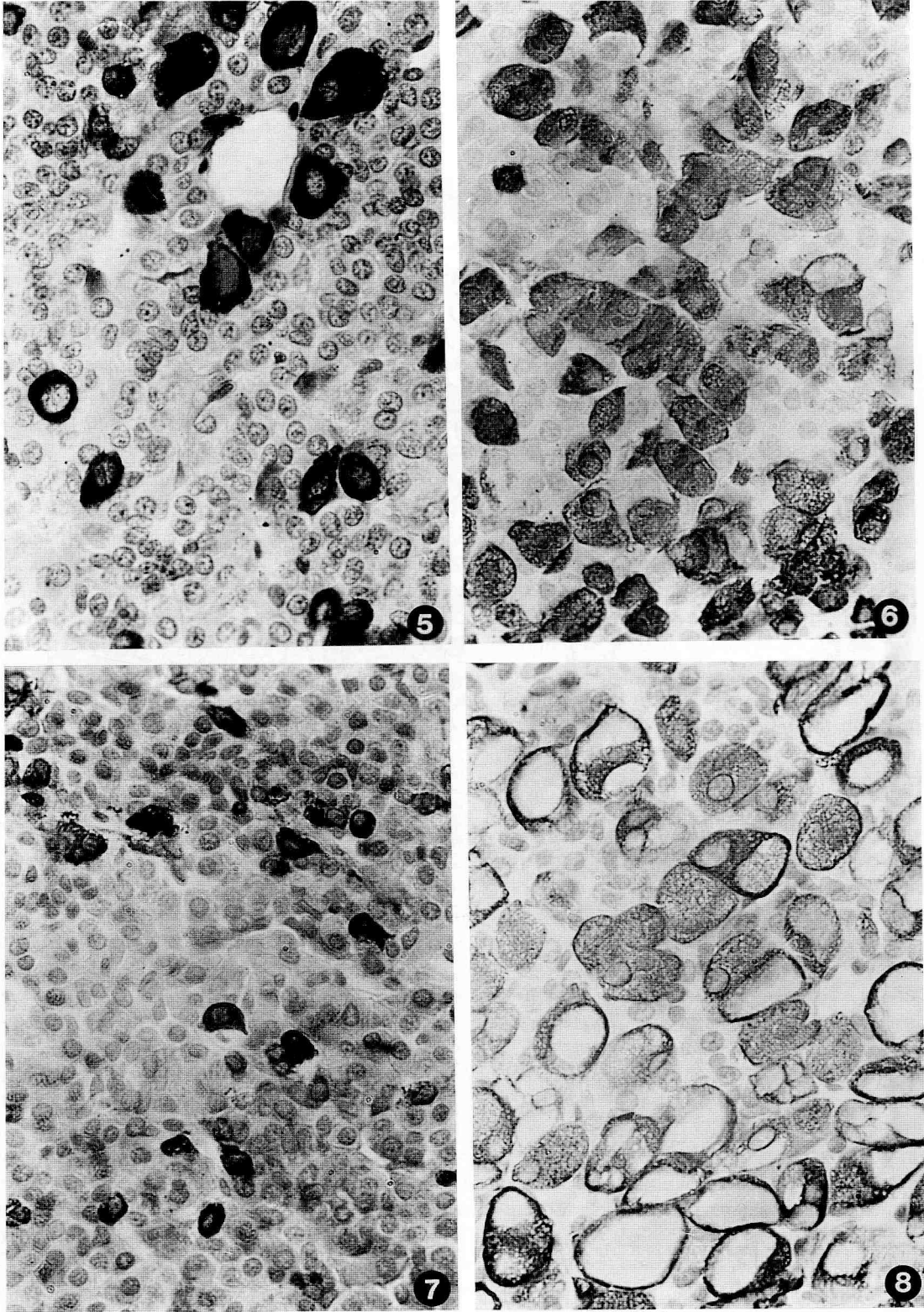
Densidad celular = Número de células LH-inmunorreactivas/80.500 μm² de tejido adenohipofisario.

Las áreas celular, nuclear y citoplasmática están expresadas en μm².

Para la significación estadística se ha utilizado la «t» de Student (* = p<0.001; ** = p<0.005)



FIGURAS 1 a 4. Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para LH. Fig. 1 = rata CS1+1. Fig. 2 = rata C1+1. Fig. 3 = rata CS1+3. Fig. 4 = rata C1+3.



FIGURAS 5 a 8. Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para LH. Fig. 5 = rata CS3+1. Fig. 6 = rata C3+1. Fig. 7 = rata CS3+3. Fig. 8 = rata C3+3. Objetivo: 63x.

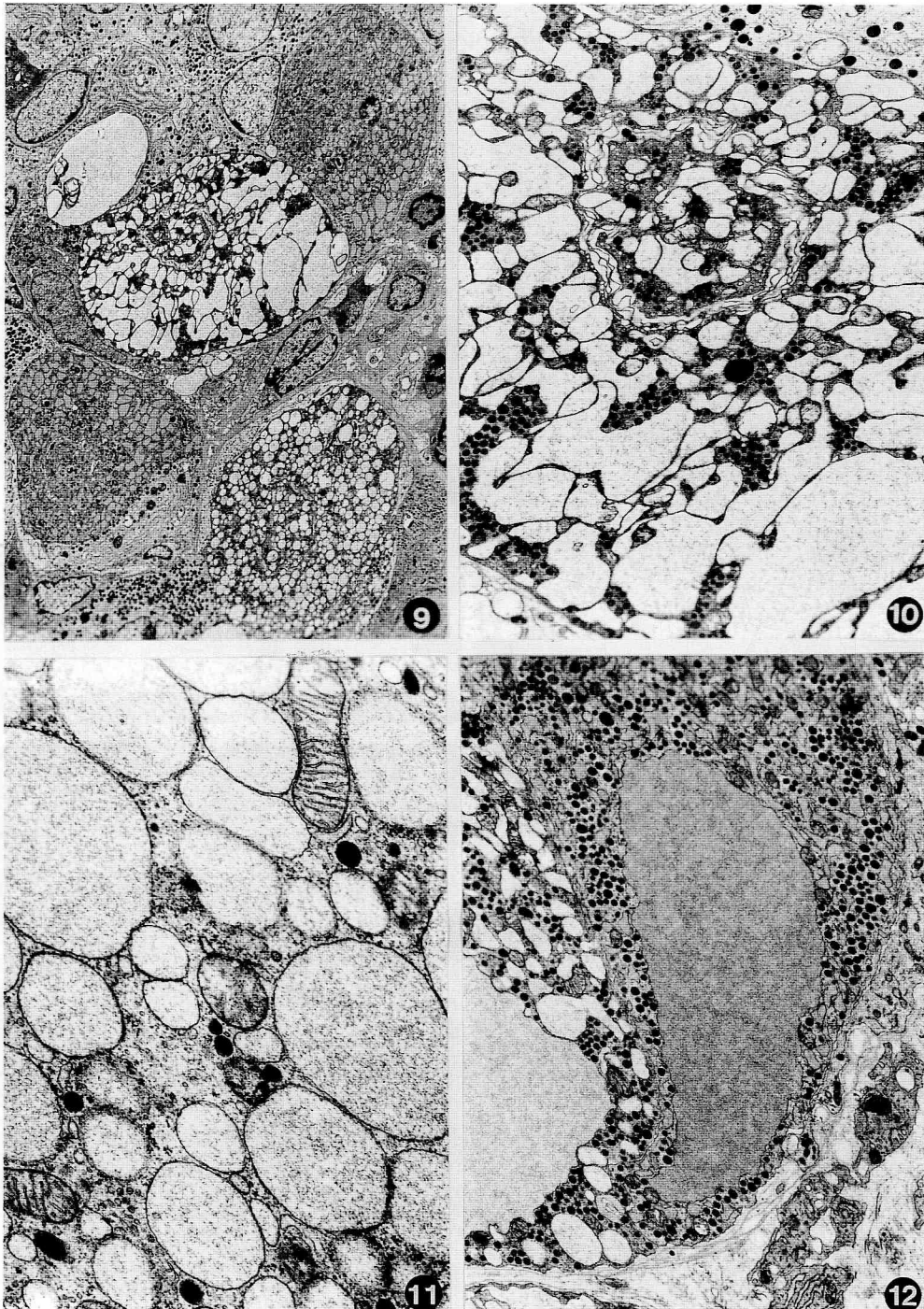


FIGURA 9. Adenohipófisis de una rata C1+1. Se observan varios adenocitos gonadotropos que muestran un RER dilatado (2.350x).

FIGURA 10. Detalle a mayores aumentos (7.450x) de la figura 9. Fragmento de un adenocito gonadotropo que muestra multiples cisternas dilatadas de RER, algunas de ellas de gran tamaño. Obsérvese el Golgi y el escaso citoplasma entre las cisternas, en el que se agrupan los gránulos de secreción.

FIGURA 11. Adenohipófisis de una rata C3+1. Fragmento del citoplasma de una célula gonadotropa. Se observan varias cisternas dilatadas de RER con un contenido de escasa densidad electrónica (2.1900x).

FIGURA 12. Adenohipófisis de una rata C1+3. Se observa una célula *en anillo de sello* y un fragmento de otra (7450x).

hacia la periferia. Estas células de la castración son muy llamativas en las preparaciones inmunohistoquímicas (figs. 4 y 8).

Es de destacar que al mes de la castración son escasas las células *en anillo de sello*, mientras que son muy abundantes a los tres meses de la intervención, independientemente de la edad a la que ésta se haya practicado. Compárense en este sentido las figuras 4 y 8 -correspondientes a los grupos C1+3 y C3+3, respectivamente- con las figuras 2 y 6, que pertenecen a los grupos C1+1 y C3+1. Otro dato resalta en las preparaciones inmunohistoquímicas es la menor intensidad de tinción y mayor heterogeneidad del material inmunoteñido de las células LH de los ratos castrados en relación con las de sus respectivos controles.

Discusión

Es bien conocido que la castración provoca una hiperactividad de los adenocitos gonadotropos debido a la falta del *feedback* negativo ejercido por los esteroides sexuales, la inhibina y otros factores gonadales (véanse Almeida y cols., 1989; Childs y cols., 1990; Kitahara y cols., 1990).

Aunque probablemente el primero en observar grandes células de apariencia anormal en la adenohipófisis de la rata castrada fue Zacherl en 1913 y un año después Schleidt acuñó el término "célula *en anillo de sello*" para describir la típica célula vacuolada de la castración (véase Purves y Griesbach, 1955), fue Addison (1917) quien describió las células de la castración como adenocitos basófilos incrementados de tamaño. A mediados de los años cincuenta Farquhar y Rinehart (1954), mediante el microscopio electrónico, y Purves y Griesbach (1955), utilizando la técnica del PAS, describieron los cambios progresivos que afectaban a los adenocitos gonadotropos tras la castración; ambos estudios estaban enfocados principalmente a la descripción de dos tipos distintos de gonadotropos, uno que produciría FSH y otro LH. Tixier-Vidal y col. (1975) realizaron un estudio inmunocitoquímico de las células de la castración, señalando que todas ellas se teñían tanto para LH como para FSH. Kurosumi y col. (1976) e Inoue y Kurosumi (1981) comprobaron morfológicamente el incremento en volumen de las células gonadotropas tras la castración.

Por todo lo dicho queda claro que son conocidas las repercusiones de la castración sobre la citología adenohipofisaria. No obstante, los estudios morfológicos han prestado particular atención al porcentaje de células gonadotropas y a su tamaño. Nuestro propósito ha sido estudiar ambos parámetros y también el tamaño nuclear y el citoplasmático, así como la relación núcleo/citoplasma, en preparaciones inmunohistoquímicas de ratos macho castrados. Asimismo hemos correlacionado las modificaciones de estos diferentes parámetros con los datos proporcionados por el estudio ultraestructural convencional.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la castración determina un marcado incremento en la población de adenocitos LH en todos los grupos de animales castrados de nuestra casuística, en relación con los respectivos controles. Por tanto, el referido incremento es independiente del estado sexual (impúber o adulto) en que se encuentre el animal cuando se practica la intervención. Ahora bien, nuestros resultados también demuestran que la población de células inmunorreactivas para LH se va incrementando en mayor medida conforme aumenta el tiempo de evolución tras la castración en el período examinado por nosotros. Estos resultados coinciden con los de Ibrahim y col. (1986).

Estas observaciones plantean inmediatamente el interrogante de cuál puede ser el mecanismo responsable de este incremento en la población de adenocitos LH. Un hecho que nos ha llamado la atención es que ni en nuestras preparaciones inmunohistoquímicas ni en los cortes ultrafinos destinados al estudio con el microscopio electrónico hemos podido observar la presencia de mitosis. Esto nos ha sorprendido porque está perfectamente demostrada la existencia de mitosis en la adenohipófisis (véanse Amat y Muñoz Barragán, 1974; Inoue y cols., 1985, 1986; Kurosumi e Inoue, 1986). De hecho, la división de adenocitos maduros se ha invocado como un mecanismo responsable del incremento de la población de células gonadotropas tras la castración (véanse Inoue y Kurosumi, 1981; Smith y Keefer, 1982; Romano y cols., 1984; Sakuma y cols., 1984; Inoue y cols., 1985, 1986; Carbajo-Pérez y cols., 1990).

Como hemos dicho, la observación de mitosis en la adenohipófisis está ampliamente descrita y por tanto no vamos a negar esta evidencia. Ahora bien, lo que sí podemos plantearnos es que si la división celular es el principal responsable del incremento de una determinada población de adenocitos, ¿cómo no existen figuras de mitosis en nuestro material? No podemos dar una explicación a este hecho, aunque hemos de indicar que no hemos realizado tratamiento previo al sacrificio con colchicina, una técnica ampliamente utilizada por diversos investigadores para poner de manifiesto la existencia de divisiones mitóticas en la adenohipófisis.

Nuestros datos nos inclinan a pensar que la división por mitosis no es, no ya el único, sino ni tan siquiera el principal mecanismo para el incremento de un determinado tipo celular en la adenohipófisis. En este sentido coincidimos con diversos autores en que la explicación del incremento de las distintas poblaciones celulares adenohipofisarias es aún un problema controvertido (véase Carbajo-Pérez y cols., 1990). Ya Romeis (1940), en su esquema sobre el ciclo vital de las células adenohipofisarias, planteaba la transformación de adenocitos indiferentes en adenocitos maduros y a la inversa, esto es, la desdiferenciación de los adenocitos maduros. Más recientemente, pero dentro de esta misma línea, Inoue y Kurosumi (1981) propusieron que el incremento en una población de adenocitos podría deberse, además de a la división celular, a la transformación de células inmaduras en adenocitos secretores y a la conversión de unos tipos celulares en otros. En relación con estas dos posibilidades hay que indicar que la existencia de una hipotética estirpe de células hipofisarias inmaduras que se pudiesen diferenciar hacia adenocitos secretores no ha podido ser descartada ni confirmada hasta el momento actual (para revisión véase Carbajo-Pérez y cols., 1990). Por otra parte, y con respecto a la segunda posibilidad antes mencionada, está bien establecido que células gonadotropas monohormonales pueden transformarse en bihormonales en circunstancias de estimulación (Tougaard y cols., 1971, 1980; Tixier-Vidal y cols., 1975; Batten y Hopkins, 1978; Childs y cols., 1981, 1982; Inoue y Kurosumi, 1984; Childs, 1985; Ibrahim y cols., 1986; Lloyd y Childs, 1988). Para nosotros este hecho podría representar el mecanismo principal para explicar el incremento en la población de adenocitos LH observado en nuestro material de animales castrados. Con ello no queremos decir que sea el único, puesto que no descartamos la división celular. Ahora bien, el hecho de no haber observado figuras de mitosis en el abundante material examinado nos inclina a considerar más probable e importante la transformación celular como responsable del incremento de células LH que hemos comprobado.

Además del extraordinario incremento en el número de células inmunorreactivas para LH en la adenohipófisis de los animales castrados, otro efecto muy llamativo de esta situación experimental es el gran incremento del tamaño de dichos adenocitos. La morfometría pone claramente de manifiesto este hecho, que es independiente del estado sexual (impúber o adulto) en que se encuentre el animal en el momento de practicar la castración y va aumentando a medida que transcurre el tiempo tras la intervención quirúrgica.

Este incremento del tamaño de las células LH-inmunorreactivas en los animales castrados se debe en todos los casos a un incremento del área nuclear y, sobre todo, al aumento del tamaño del citoplasma. Lógicamente estas alteraciones se traducen en una marcada disminución de la relación núcleo/citoplasma. Estos datos morfométricos son directamente corroborables con las observaciones realizadas tanto en las preparaciones inmunohistoquímicas como en los cortes ultrafinos estudiados con el microscopio electrónico. En efecto, un dato muy llamativo cuando se estudian las preparaciones inmunohistoquímicas de animales castrados es el incremento tanto en número como en tamaño de las células inmunorreactivas para LH; también resaltan una aparente disminución de la intensidad de tinción y la heterogeneidad del material inmunoteñido.

Estos últimos datos se explican por las modificaciones estructurales que sufren las células gonadotropas. En los animales castrados este tipo celular se caracteriza por el gran desarrollo del RER y del aparato de Golgi. La profusión en el citoplasma de cisternas dilatadas de RER explica, sin duda, el incremento en tamaño del citoplasma, y pensamos que también se debe a este hecho la heterogeneidad y menor intensidad de tinción inmunohistoquímica que muestran estas células, puesto que el material contenido en el interior de las cisternas de RER es escasamente inmunorreactivo, como se comprueba al observar las células *en anillo de sello* (véanse figs. 4 y 8). Una célula que tenga en su citoplasma muchas cisternas dilatadas de RER con material que no reacciona -o lo hace escasamente- con el antisuero utilizado, ha de tener una menor intensidad de tinción y una mayor heterogeneidad del material inmunorreactivo que otra célula que no presente tal cantidad de cisternas de RER.

Otro hecho llamativo, puesto también de manifiesto tanto en las preparaciones inmunohistoquímicas como en los cortes ultrafinos de adenohipófisis, es la cronología en la aparición de las típicas células de la castración, esto es, los adenocitos *en anillo de sello*. Tales células son escasas en los animales sacrificados un mes después de la

castración, independientemente de la edad a la que ésta haya tenido lugar, y son por el contrario muy numerosas en las adenohipófisis de los animales sacrificados a los tres meses de la intervención, tanto si ésta se practicó al mes como a los tres meses de edad. Por tanto, la existencia de abundantes células *en anillo de sello* en la adenohipófisis de los animales castrados requiere un determinado tiempo de evolución tras la intervención y este hecho es independiente del estado sexual en el momento de la extirpación de los testículos. Estas observaciones coinciden con las realizadas, entre otros, por Farquhar y Rinehart (1954), Purves y Griesbach (1955), Garner y Blake (1981) e Ibrahim y col. (1986).

Agradecimiento

Los autores expresan su agradecimiento a la profesora P. Galindo por su inestimable ayuda en el estudio estadístico y a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín por su asistencia técnica.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 288/84).

BIBLIOGRAFÍA

- ADDISON, W. H. F. (1917): The cell-changes in the hypophysis of the albino rat after castration. *J. Comp. Neurol.*, **28**: 441-461.
- ALMEIDA, O. F. X.; HASSAN, A. H. S.; NIKOLARAKIS, K. E. y G. B. MARTINI (1989): Diminished role of LHRH in the control of gonadotroph morphology and function in the long-term castrated male rat. *J. Endocrinol.*, **123**: 263-273.
- AMAT, P. y L. MUÑOZ BARRAGÁN (1974): Mitosis en la adenohipófisis. *An. Anat.*, **23**: 15-27.
- BATTEN, T. F. C. y C. R. HOPKINS (1978): Discrimination of LH, FSH, TSH and ACTH in dissociated porcine anterior pituitary cells by light and electron microscope immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.*, **192**: 107-120.
- CARBAJO PÉREZ, E.; CARBAJO, S.; RUBIO, M. y VÁZQUEZ, R. (1990): Proliferación celular en la hipófisis de rata: especial consideración a las células gonadotropas. *An. Anat.*, **36**: 127-132.
- CHILDS, G. V.; ELLISON, D. G. y GARNER, L. L. (1980): An immunocytochemist's view of gonadotropin storage in the adult male rat: cytochemical and morphological heterogeneity in serially sectioned gonadotropes. *Amer. J. Anat.*, **158**: 397-409.
- CHILDS, G. V.; ELLISON, D. G.; FOSTER, L. P. y RAMALEY, J. A. (1981): Postnatal maturation of gonadotropes in the male. *Endocrinology*, **109**: 1683-1692.
- CHILDS, G. V.; ELLISON, D. G.; LORENZEN, J. R.; COLLINS, T. J. y SCHWARTZ, N. B. (1982): Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. *Endocrinology*, **111**: 1318-1328.
- CHILDS, G. V. (1984): Application of dual pre-embedding stains for gonadotropins to pituitary cell monolayers with avidin-biotin (ABC) and peroxidase-antiperoxidase (PAP) complexes: light microscopic studies. *Stain Technol.*, **58**: 281-289.
- CHILDS, G. V. (1985): Shifts in gonadotropin storage in cultured gonadotropes following GnRH stimulation, in vitro. *Peptides*, **6**: 103-107.
- CHILDS, G. V.; UNABIA, G.; WIERMAN, M. E.; GHARIB, S. D. y CHIN, W. W. (1990): Castration induces time-dependent changes in the follicle-stimulating hormone beta-subunit messenger ribonucleic acid-containing gonadotrope cell population. *Endocrinology*, **126**: 2.205-2.213.
- FARQUHAR, M. G. y RINEHART, J. F. (1954): Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinology*, **54**: 516-541.
- GARNER, L. L. y BLAKE, C. A. (1981): Ultrastructure immunocytochemical study of the LH secreting cell of the rat anterior pituitary gland: changes occurring after ovariectomy. *Biol. Reprod.*, **24**: 461-474.
- IBRAHIM, S. N.; MOUSSA, C. A. y CHILDS, G. V. (1986): Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology*, **119**: 629-637.
- INOUE, K. y KUROSUMI, K. (1981): Mode of proliferation of gonadotrophic cells of the anterior pituitary after castration. Immunocytochemical and autoradiographic studies. *Arch. Histol. Jpn.*, **44**: 71-85.
- INOUE, K. y KUROSUMI, K. (1984): Ultrastructural immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of the untreated male rat. *Cell Tissue Res.*, **235**: 77-83.
- INOUE, K.; TANAKA, S. y KUROSUMI, K. (1985): Mitotic activity of gonadotropes in the anterior pituitary of the castrated male rat. *Cell Tissue Res.*, **240**: 271-276.

- INOUE, K.; ISHIKAWA, K. y TANAKA, S. (1986): Proliferation of gonadotrophs in castrated male rat anterior pituitary. En: Pars distalis of the pituitary gland-structure, function and regulation (Yoshimura y Gorbman, eds.), pp. 125-131. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- KITAHARA, S. S.; WINTERS, J.; ATTARDI, B.; OSHIMA, H. y TROEN, P. (1990): Effects of castration on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by pituitary cells from male rats. *Endocrinology*, **126**: 2.642-2.649.
- KUROSUMI, K. y K. INOUE (1986): Ultrastructure of anterior pituitary cells. En: Morphology of hypothalamus and its connections (Ganten y Pfaff, eds.), pp. 99-134. Springer-Verlag, Berlín.
- KUROSUMI, K.; KAWARAI, Y. YUITAKE, Y. y INOUE, K. (1976): Electron microscopic morphometry of the rat castration cells. *Gunma Symp. Endocrinol.*, **13**: 221-236.
- LLOYD, H. M y CHILDS, G. V. (1988): Differential storage and release of luteinizing hormone and follicle-releasing hormone from individual gonadotropes separated by centrifugal elutriation. *Endocrinology*, **122**: 1.282-1.290.
- PURVES, H. D. y GRIESBACH, W. E. (1955): Changes in the gonadotrophs of the rat pituitary after gonadectomy. *Endocrinology*, **56**: 374-386.
- ROMANO, M. I.; MACHIAVELLI, G. A.; PÉREZ, R. L.; CARRICARTE, V. y BURDMAN, J. A. (1984): Correlation between LH secretion in castrated rats with cellular proliferation and synthesis of DNA in the anterior pituitary gland. *J. Endocrinology*, **102**: 13-18.
- ROMEIS, E. (1940): Innersekretorische Drüsen. II. Hypophyse. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. VI, Blutgefäß- und Lymphgefäßapparat, Innersekretorische Drüsen (Von Hollendorff, ed.), pp. 389-474. Springer-Verlag, Berlín.
- SAKUMA, S.; SHIRASAWA, N. y YOSHIMURA, F. (1984): A histochemical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophysial cells in immature and mature castrated. *J. Endocrinol.*, **100**: 322-328.
- SMITH, P. F. y KEEFER, D. A. (1982): Immunocytochemical and ultrastructural identification of mitotic cells in the pituitary gland of ovariectomized rats. *J. Reprod. Fertil.*, **66**: 383-388.
- STERNBERGER, L. A.; HARDY, P. A.; CUCULIS, J. J. y MEYER, H. J. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- TIXIER-VIDAL, A.; TOUGARD, C.; KERDELHUÉ, B. y JUTISZ, M. (1975): Light and electron microscopic studies on immunocytochemical localización of gonadotropic hormones in the rat pituitary using antisera against ovine FSH, ovine LH and its two subunits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **254**: 433-461.
- TOUGARD, C.; KERDELHUÉ, B.; TIXIER-VIDAL, A. y JUTISZ, M. (1971): Localisation par cyto-immunoemzymologie de la LH de ses sous-unites, alfa et beta, et de la FSH dans l'adenohypophyse de la raté castrée. *C. R. S. Acad. Sci.*, III, **273**: 897-900.
- TOUGARD, C.; PICART, R. y TIXIER-VIDAL, A. (1980): Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary. A light and electron microscope study using antisera against rat b subunits: A comparison between preembedding and postembedding methods. *J. Histochem. Cytochem.*, **28**: 101-114.

Correspondencia: Prof. Dr. P. Amat
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. España

SOBRE LAS RELACIONES MORFOFUNCIONALES ENTRE LOS ADENOCITOS GONADOTROPOS Y MAMOTROPOS EN LA ADENOHIPÓFISIS DE RATA

CONCERNING THE MORPHOFUNCTIONAL RELATIONSHIPS BETWEEN GONADOTROPH AND MAMMOTROPH CELLS IN THE RAT ADENOHYPHYSIS

A. SÁNCHEZ, F.E. PASTOR, J. L. BLÁZQUEZ, B. PELÁEZ, G. AMAT y P. AMAT

Departamento de Anatomía e Histología Humanas y Departamento de Investigación y Microscopía Electrónica.
(Director: Prof. P. Amat). Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

RESUMEN

Se ha realizado un estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural de las células PRL de la adenohipófisis de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley castradas quirúrgicamente al mes y a los tres meses de edad y sacrificadas, en ambos casos, uno y tres meses después de la intervención. En todos los grupos de animales se observa una íntima relación de vecindad entre los adenocitos gonadotropos y mamotropos, muy llamativa en las ratas sacrificadas tres meses después de la castración. Sólo en los animales castrados al mes de edad y sacrificados un mes después existen modificaciones morfométricas resaltables de los adenocitos mamotropos, consistentes en un incremento en número y una disminución del tamaño. No se observan modificaciones ultraestructurales de los adenocitos mamotropos en ningún grupo de animales. Estos resultados se discuten en relación con la posible existencia de interrelaciones paracrinas entre células gonadotropas y mamotropas.

PALABRAS CLAVE: Células PRL. Adenohipófisis. Castración. Inmunohistoquímica. Morfometría. Ultraestructura. Rata.

SUMMARY

An immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study was performed on the PRL cells of the adenohipophysis of male Sprague-Dawley rats castrated at 1 and 3 months of life and sacrificed, in both cases, one and three months after the surgical intervention. In all groups of animals a close neighbouring relationship between the gonadotroph and mammotroph cells was observed. This was very striking in the animals sacrificed at 3 months after castration. Only in the rats castrated at 1 month of life and sacrificed 1 month thereafter were there prominent morphometric modifications in the mammotroph cells; these consisted in an increase in number and a decrease in size. No ultrastructural alterations were observed in the mammotroph cells in any of the groups of animals. The findings are discussed with respect to the possible existence of paracrine interrelationships between gonadotroph and mammotroph cells.

KEY WORDS: Mammotroph cells. Adenohipophysis. Castration. Immunohistochemistry. Morphometry. Ultrastructure. Rat.

Introducción

Además de ser liberadas hacia la circulación sanguínea para actuar sobre estructuras situadas a distancia de su lugar de secreción, las hormonas producidas por las glándulas endocrinas pueden también actuar sobre otras células de la propia glándula (*paracrinia*) e incluso sobre la misma célula que las produce (*autocrinia*) (véanse Denef, 1986; Robberecht y Denef, 1989). Entre las interacciones paracrinas son de particular interés las que tienen lugar en la adenohipófisis (Denef, 1986; Robberecht y Denef, 1989) y, dentro de éstas, las que parecen existir entre los adenocitos gonadotropos (productores de gonadotropinas, LH y FSH) y mamotropos (secretores de prolactina, PRL). Así, se ha descrito que los adenocitos mamotropos pueden inhibir a los gonadotropos (Sato, 1980; Smith, 1980 y Cheung, 1983), mientras que estos últimos producen un factor con actividad liberadora de prolactina (Denef y Andries, 1983; Denef, 1985). La interacción entre ambos tipos celulares estaría facilitada por la existencia de relaciones de inmediata vecindad entre ellos (Nakane, 1970, 1975; Horvath y cols., 1977; Sato, 1980; Nogami y Yoshimura, 1982).

En el presente trabajo hemos realizado un estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural de los adenocitos mamotropos de ratas castradas –situación experimental que determina una gran hiperactividad de los adenocitos gonadotropos– con la finalidad de contribuir a esclarecer las posibles interacciones entre ambos tipos celulares.

Material y Técnicas

Como animal de experimentación se ha utilizado la rata albina macho de la cepa Sprague-Dawley. Doce animales fueron castrados quirúrgicamente al mes de edad; seis de ellos fueron sacrificados un mes después de la operación (grupo C1+1) y los seis restantes fueron sacrificados tres meses después de la intervención (grupo C1+3). Otros doce animales fueron castrados a los tres meses de edad, seis de ellos se sacrificaron un mes después de la castración (grupo C3+1) y los otros seis a los tres meses (grupo C3+3). Veinticuatro animales fueron sometidos a una intervención de castración simulada. En doce de ellos se realizó dicha intervención al mes de edad, sacrificándose seis animales un mes después (grupo CS1+1) y otros seis a los tres meses (grupo CS1+3). Los otros doce animales sufrieron la intervención de castración simulada a los tres meses de edad, sacrificándose seis de ellos un mes después (grupo CS3+1) y los otros seis a los tres meses de la operación (grupo CS3+3). La mitad de los animales de cada grupo se destinó al estudio inmunohistoquímico y morfométrico y la otra mitad al estudio ultraestructural. El sacrificio se realizó en todos los casos a las 17 horas.

Estudio inmunohistoquímico. Previa anestesia con tiopental sódico (30 mg/kg peso), los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con Bouin-Hollande sublimado. Finalizada la perfusión se extrajo la hipófisis, que fue dividida en dos mitades sagitales que permanecieron en fijador durante 24 horas. Posteriormente fueron lavadas, deshidratadas con alcohol e incluidas en parafina. Sobre cortes seriados de 10 μm de espesor se realizó la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) según el proceder de Sternberger y col. (1970), utilizando un antisuero específico contra PRL de rata (UCB) y 3,3'-diaminobencidina como marcador. Los núcleos celulares fueron contrastados con hematoxilina. En algunos casos hemos realizado una doble tinción para poner de manifiesto, sobre los mismos cortes, las células LH y las células PRL. En una primera etapa se realiza la tinción para PRL, quedando las células inmunorreactivas marcadas en marrón. Tras la elución del complejo antisuero primario-antisuero secundario-PAP según el método de Tramu y col. (1978), se tiñen en una segunda etapa las células inmunorreactivas para LH, que quedan marcadas en azul con el 4-cloro-1-naftol.

Estudio ultraestructural. El sacrificio se realizó por decapitación, seguida de extracción rápida de la hipófisis, tallado e inmersión en glutaraldehído al 5 % en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4 °C, durante 24 horas. A continuación se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1 % en el mismo tampón, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en Durcupan (Fluka). Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo LKB Ultratome III 8800 y se estudiaron con un microscopio electrónico de barrido Philips EM 201.

Estudio morfométrico. Se realizó sobre las preparaciones inmunohistoquímicas. Se seleccionaron de manera aleatoria 100 células inmunorreactivas para PRL de cada grupo de animales, determinando con un analizador semiautomático de imágenes Ibas I Kontron las áreas celular y nuclear, obteniendo por la diferencia entre ambas el área citoplasmática, calculando posteriormente la relación núcleo/citoplasma. Para determinar el número de células inmunorreactivas por unidad de superficie (*densidad celular*) se contaron, en cada grupo de animales, las células PRL presentes en 48 campos de 80.500 μm^2 de tejido hipofisario; estos campos fueron elegidos al azar y no estaban superpuestos. Para analizar la significación estadística se utilizó la «t» de Student.

Resultados

En la adenohipófisis de las ratas castradas al mes de edad y sacrificadas un mes después de la intervención (C1+1), el estudio morfométrico indica la existencia de un discreto (19%), aunque altamente significativo, incremento de la densidad celular de los adenocitos mamotropos (esto es, del número de células inmunorreactivas para PRL por unidad de superficie) en este grupo de animales, en relación con los correspondientes controles (Tabla 1). Este incremento ya resulta llamativo con la simple observación de las preparaciones inmunohistoquímicas (compárense las figuras 1 y 2). Asimismo, en este grupo de animales C1+1 existe una disminución del tamaño de las células de prolactina, que en términos porcentuales es de un 20%, debida tanto a la disminución del núcleo como del citoplasma (Tabla 1); como quiera que la disminución del tamaño nuclear es mayor que la del citoplasma, esto se traduce en una disminución de la relación núcleo/citoplasma (Tabla 1).

En las preparaciones inmunohistoquímicas de la adenohipófisis de ratas del grupo C1+3 llama la atención la disposición de los adenocitos inmunorreactivos para PRL alrededor de células inmunonegativas de gran tamaño (fig. 4), que corresponden a adenocitos gonadotropos, como se demuestra en las preparaciones en las que se ha realizado una doble tinción inmunohistoquímica. Por otra parte, la simple observación puede inducirnos a error en cuanto a la apreciación visual de los adenocitos mamotropos en este grupo de animales. En efecto, si comparamos la figura 4 (correspondiente a un animal C1+3) con la figura 3 (que pertenece a un animal control CS 1+3), resaltan más los elementos inmunorreactivos para PRL en el primer caso que en el segundo. Ahora bien, el análisis morfométrico indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células PRL entre ambos grupos de animales (Tabla 1), aunque sí que hay un discreto incremento (11%) del tamaño de las células PRL en los animales castrados en relación con los controles, que se produce exclusivamente por el aumento del citoplasma, lo que motiva una disminución de la relación núcleo/citoplasma (Tabla 1). El incremento del tamaño de las células PRL en los animales castrados, junto a una aparente mayor intensidad de tinción, podrían explicar la diferente apreciación visual de los cortes histológicos de la adenohipófisis de ambos grupos de animales.

En las preparaciones inmunohistoquímicas para poner de manifiesto las células inmunorreactivas para PRL del grupo C3+1 (fig. 6) no se observan diferencias en relación con los animales controles (fig. 5), excepto una aparente mayor intensidad de tinción en los castrados. El análisis morfométrico (Tabla 1) pone de manifiesto la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los parámetros estudiados. Así, en lo referente a la densidad celular, el número de células inmunorreactivas para PRL es prácticamente idéntico en los animales castrados y en los controles. Tampoco existen diferencias entre los animales C3+1 y sus controles [CS3+1] en el área celular, en el área citoplasmática ni en la relación núcleo/citoplasma. Únicamente existe una discreta disminución del área nuclear de las células PRL en los animales C3+1, en relación con su grupo control (Tabla 1).

En las adenohipófisis del grupo C3+3 se puede observar la existencia de células inmunorreactivas para PRL y sus prolongaciones abrazando a elementos inmunonegativos (fig. 8), que hemos identificado como células gonadotropas en los cortes en que se ha realizado una doble tinción inmunohistoquímica. Cuando las preparaciones de los animales castrados C3+3 teñidas para PRL (fig. 8) se comparan con las de sus controles (fig. 7) no se aprecian diferencias, salvo que en los castrados parece existir una mayor intensidad de tinción y ser más manifiestas las prolongaciones de las células PRL. El análisis morfométrico no muestra diferencias estadísticamente significativas

en cuanto al número de células PRL entre los animales de este grupo [C3+3] y sus correspondientes controles [CS3+3] (Tabla 1). Es cierto que existe una discreta disminución (9 %) del área celular en los animales castrados, debida tanto a la disminución del área nuclear como de la citoplasmática, sin que exista alteración de la relación núcleo/citoplasma, lo que indica que la reducción nuclear y citoplasmática son proporcionalmente similares.

El estudio con el microscopio electrónico pone de manifiesto por un lado la no existencia de modificaciones ultraestructurales resaltables de las células PRL en ninguno de los grupos de animales castrados de nuestra casuística y, por otro, confirma la íntima asociación entre adenocitos gonadotropos y mamotropos (fig. 9), puesta ya en evidencia en las preparaciones inmunohistoquímicas.

TABLA I

Grupo	Densidad celular	Area celular	Area nuclear	Area citoplasmática	Relación núcleo/citoplasma
CS 1+1	53.50 ± 3.43	75.06 ± 10.16	27.41 ± 6.95	47.65 ± 12.36	0.73 ± 1.09
C 1+1	63.56 ± 4.04 (*)	59.96 ± 9.02 (*)	19.11 ± 4.04 (*)	40.84 ± 9.58 (*)	0.51 ± 0.22 (†)
CS 1+3	77.25 ± 3.19	61.51 ± 9.80	22.46 ± 3.88	39.05 ± 10.25	0.63 ± 0.24
C 1+3	75.06 ± 4.81 (ns)	68.06 ± 11.07 (*)	22.81 ± 4.18 (ns)	45.25 ± 11.40 (*)	0.54 ± 0.19 (**)
CS 3+1	65.25 ± 4.35	62.77 ± 9.63	23.62 ± 4.40	39.15 ± 10.06	0.66 ± 0.27
C 3+1	65.44 ± 4.48 (ns)	61.95 ± 9.35 (ns)	21.90 ± 3.81 (**)	40.05 ± 10.43 (ns)	0.61 ± 0.28 (ns)
CS 3+3	71.62 ± 5.72	64.85 ± 10.11	23.03 ± 3.63	41.81 ± 10.86	0.60 ± 0.22
C 3+3	73.00 ± 3.85 (ns)	59.30 ± 8.29 (*)	20.99 ± 3.60 (*)	38.32 ± 8.47 (†)	0.58 ± 0.20 (ns)

Todos los valores están expresados por media aritmética ± desviación típica.

Densidad celular = Número de células LH-inmunoactivas/80.500 μm^2 de tejido adenohipofisario.

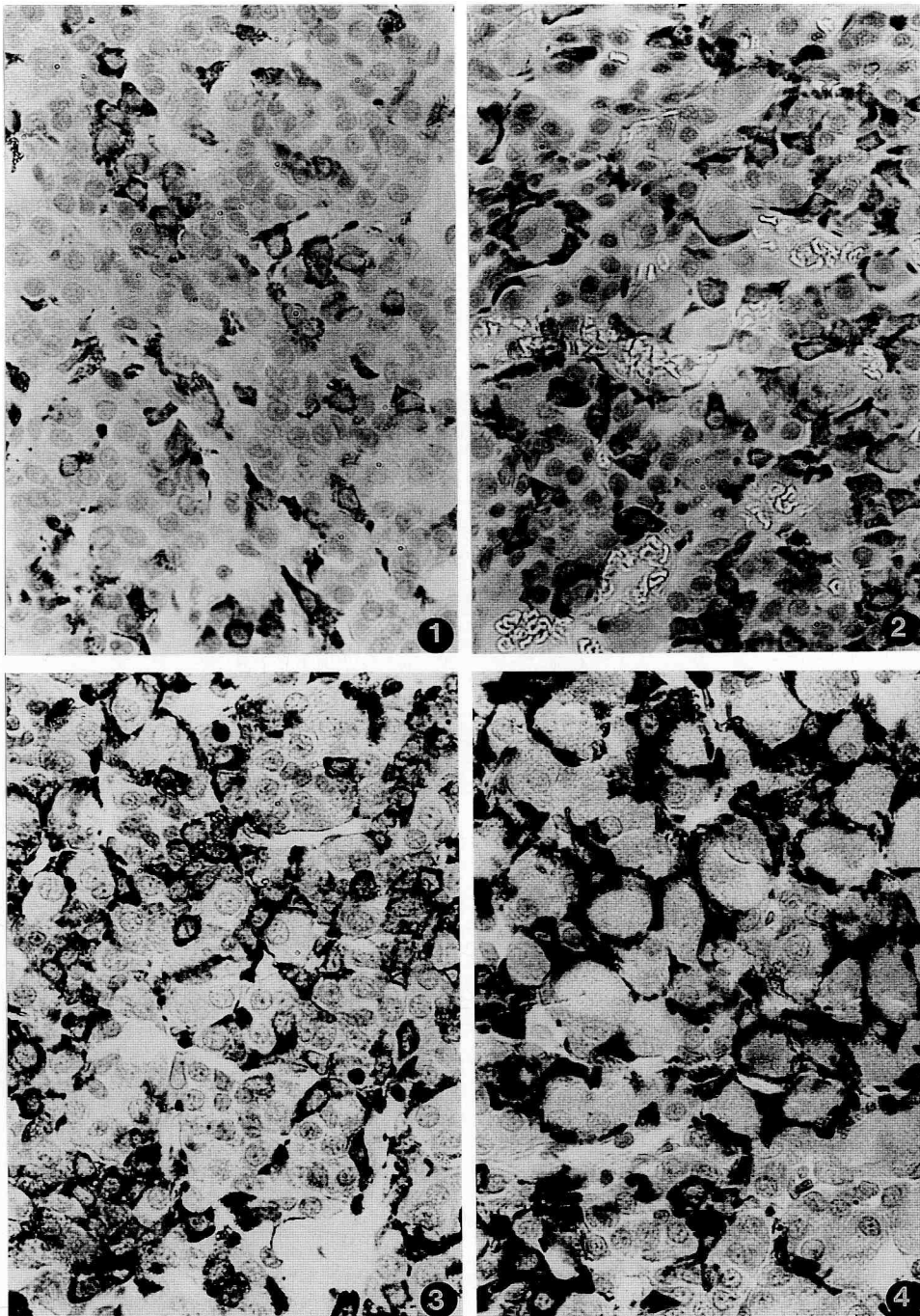
Las áreas celular, nuclear y citoplasmática están expresadas en μm^2 .

Para la significación estadística se ha utilizado la «t» de Student (* = $p < 0.001$; ** = $p < 0.005$; † = $p < 0.05$)

Discusión

Sobre las interrelaciones morfofuncionales entre los adenocitos gonadotropos y mamotropos hay diversas referencias en la literatura (véase apartado de Introducción). El propósito de nuestro trabajo ha sido estudiar estas relaciones en una situación experimental, tal como la castración, que determina una profunda modificación de uno de estos tipos celulares –los adenocitos gonadotropos–, atendiendo a las posibles alteraciones del otro tipo celular –los adenocitos mamotropos–. Hemos elegido esta circunstancia experimental porque es bien conocido que la castración provoca una hiperactividad de los adenocitos gonadotropos debido a la falta del *feedback* negativo ejercido por los esteroides sexuales, la inhibina y otros factores gonadales (véanse Almeida y cols., 1989; Childs y cols., 1990; Kitahara y cols., 1990). Esta hiperactividad se manifiesta morfológicamente por una gran hiperplasia e hipertrofia de los adenocitos gonadotropos, que muestran un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del aparato de Golgi; la confluencia de cisternas dilatadas de RER da lugar a la aparición de las típicas células en anillo de sello, muy evidentes a los tres meses de practicada la castración (véase Sánchez y cols., 1991).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que tras la castración se producen escasas modificaciones de los adenocitos mamotropos. Así, los estudios morfométricos no muestran prácticamente modificaciones significativas en los distintos grupos de animales de nuestra casuística (véase Tabla 1). Sólo en uno de estos grupos, concretamente el de los animales castrados al mes de edad y sacrificados al mes de la castración (C1+1), existen diferencias estadísticamente significativas (porcentualmente de relativa importancia) en relación con los animales



- FIGURA 1.** Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata CS1+1. Objetivo: 63x.
- FIGURA 2.** Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata C1+1. Objetivo: 63x.
- FIGURA 3.** Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata CS1+3. Objetivo: 63x.
- FIGURA 4.** Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata C1+3. Objetivo: 63x.

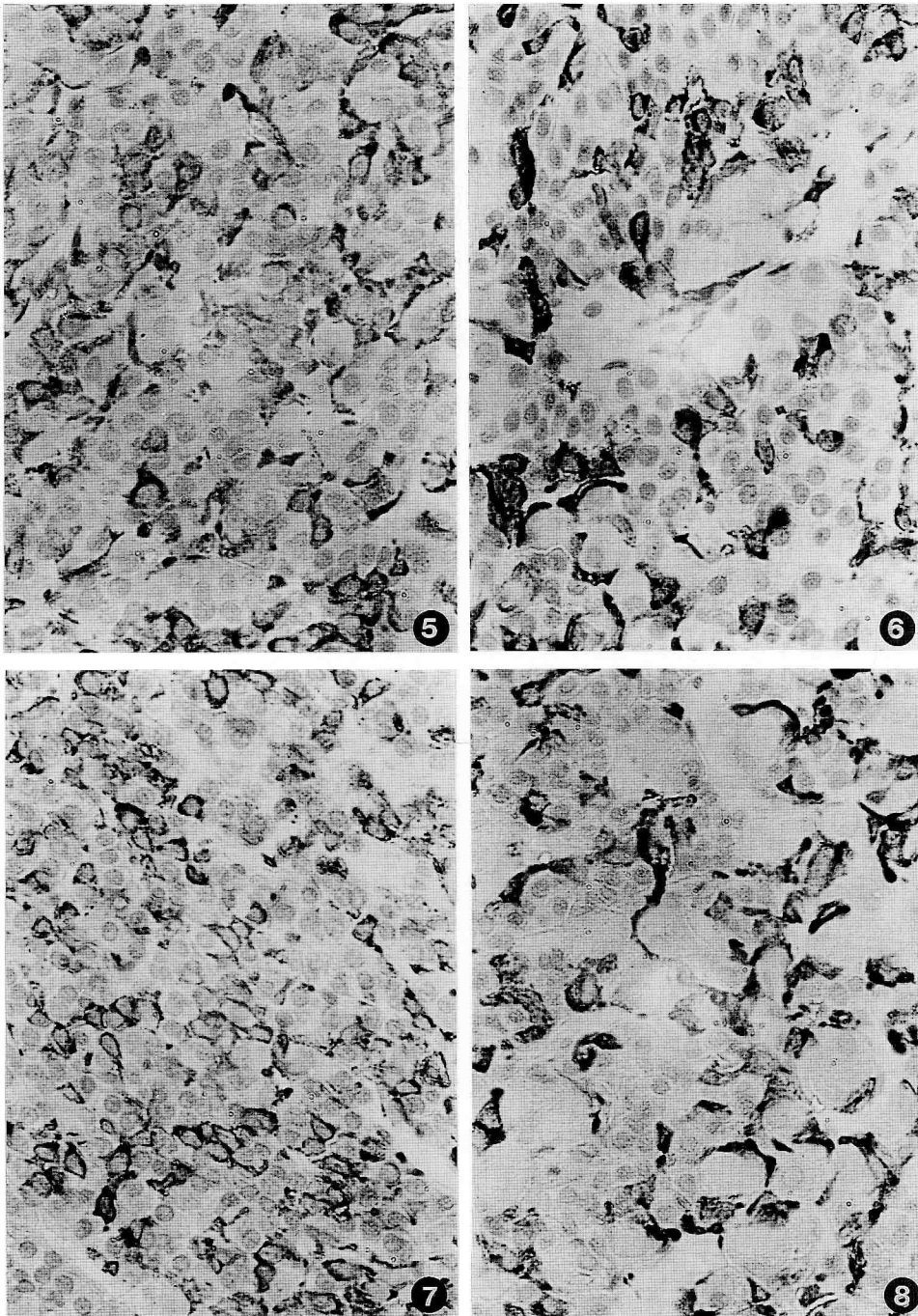


FIGURA 5. Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata CS3+1. Objetivo: 63x.

FIGURA 6. Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata C3+1. Objetivo: 63x.

FIGURA 7. Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata CS3+3. Objetivo: 63x.

FIGURA 8. Adenohipófisis de ratas macho. Tinción inmunohistoquímica para PRL. Adenohipófisis de rata C3+3. Objetivo: 63x.

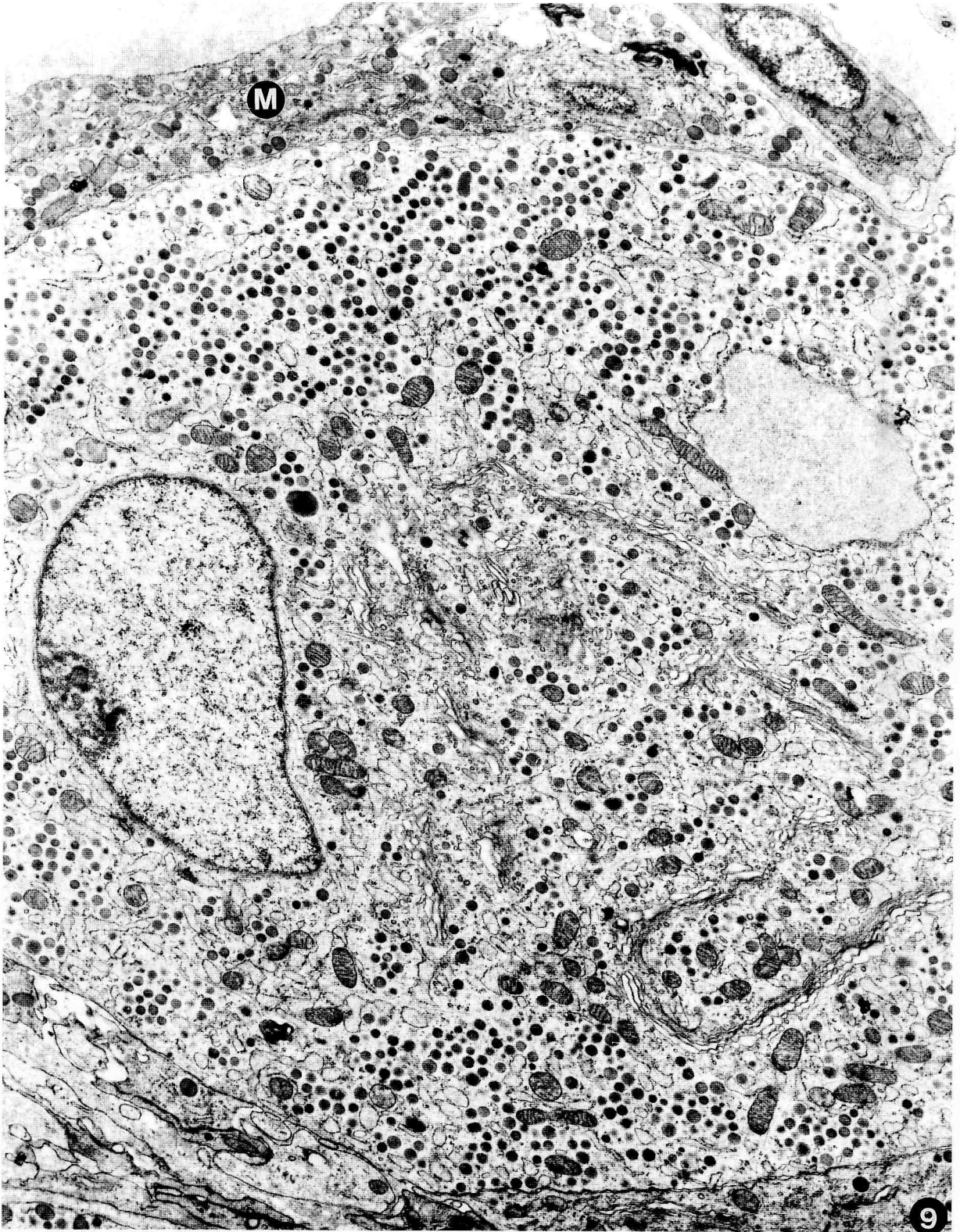


FIGURA 9. Adenohipófisis de una rata C3+3. Se observa el fragmento de un adenocito mamotrope (M) en la inmediata vecindad de un adenocito gonadotrope (10430x).

controles. Se observa en el citado grupo un discreto incremento en la población de células PRL que, no obstante, están disminuidas de tamaño, preferentemente por una disminución del tamaño del núcleo celular, siendo discreta la disminución del área citoplasmática, lo que se traduce en la lógica disminución de la relación núcleo/citoplasma. Estos resultados sólo podemos compararlos, de forma parcial, con los de Ibrahim y col. (1986), quienes describen una disminución no significativa del porcentaje de células PRL en machos castrados sacrificados uno, tres y seis meses después de la intervención. Curiosamente Ibrahim y col. (1986) no refieren la edad a la que practican la castración. Por otra parte, estos autores lo que determinan es el porcentaje de los distintos tipos celulares de la adenohipófisis. En este sentido hemos de indicar que debido al gran incremento en la población de células gonadotropas tras la castración, una disminución del porcentaje de adenocitos PRL puede producirse perfectamente con un incremento efectivo del número de estas últimas células. Tampoco nos sirve como referencia el trabajo de Sano y Sasaki (1971), puesto que estos autores realizaron su estudio en el ratón. No obstante, es de resaltar que describen una marcada disminución en el porcentaje de células PRL de ratones machos castrados al mes de edad y sacrificados un mes después. Sorprendentemente no encuentran un incremento de los adenocitos gonadotropos, lo que nos obliga a considerar con mucha cautela los resultados de estos autores.

En el resto de los grupos de animales castrados de nuestra casuística no existen prácticamente diferencias significativas en los distintos parámetros estudiados entre los animales castrados y sus correspondientes controles; cuando estas diferencias existen son porcentualmente de muy escasa importancia. Ultraestructuralmente tampoco hemos observado modificaciones en los adenocitos PRL de los animales castrados.

Todos estos datos nos llevan a considerar que la castración en animales machos prácticamente no provoca alteraciones morfológicas ni ultraestructurales en los adenocitos mamotropos.

Esto último puede sorprender debido a la íntima relación de vecindad existente en la adenohipófisis de la rata entre células gonadotropas y mamotropas (Nakane, 1970, 1975; Horvath y cols., 1977; Sato, 1980; Nogami y Yoshimura, 1982), relación que nosotros hemos podido confirmar tanto en los cortes ultrafinos estudiados con el microscopio electrónico como en los cortes histológicos en los que hemos realizado tinciones inmunológicas; en ambos se observa con mucha frecuencia la existencia de células PRL del tipo 4 de Nogami y Yoshimura (1982), esto es, células con forma de copa o cáliz, dispuestas alrededor de adenocitos gonadotropos. Esta asociación resulta muy llamativa en los animales sacrificados tres meses después de la castración, cuando son muy abundantes las células *en anillo de sello* (Sánchez y cols., 1991). Deneff y Andries (1983) han sugerido que esta íntima vecindad entre ambos tipos celulares puede estar en relación con mecanismos paracrinos de interacción entre ellos. Si la hipótesis de estos autores es cierta, sorprende que una situación experimental como la castración, que provoca profundas modificaciones en las células gonadotropas, no determine prácticamente alteraciones en la población de adenocitos mamotropos.

Por otra parte, también nos ha llamado la atención el hecho de que en todos los grupos de animales castrados estudiados por nosotros parece existir un aumento de la intensidad de tinción de las células PRL, en relación con los correspondientes controles. Admitiendo de antemano el relativo valor de este dato, debido a que la intensidad de tinción inmunohistoquímica siempre ha de ser considerada con mucha cautela, hemos de indicar que estos resultados en principio están en contradicción con la descripción de la existencia de un posible efecto estimulador de la liberación de prolactina por parte de los adenocitos gonadotropos (Deneff y Andries, 1983; Deneff, 1985 y 1986).

En resumen, nuestros resultados indican que tras la castración—circunstancia en la que se produce una marcada alteración de los adenocitos gonadotropos— no existen alteraciones morfológicas de importancia en los adenocitos mamotropos. Confirmamos la íntima relación de vecindad existente entre ambos tipos celulares. Ambos hechos inducen a plantear nuevos estudios para aclarar las posibles interrelaciones funcionales entre ellos.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Profesora P. Galindo por su inestimable ayuda en el estudio estadístico y a Valentín Alonso, Soledad García, María Manteca y Olvido Martín por su asistencia técnica.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto 288/84).

BIBLIOGRAFÍA

- ALMEIDA, O.F.X.; HASSAN, A.H.S.; NIKOLARAKIS, K.E. y MARTINI, G.B. (1989): Diminished role of LHRH in the control of gonadotroph morphology and function in the long-term castrated male rat. *J. Endocrinol.*, **123**: 263-273.
- CHEUNG, C. Y. (1983): Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by a direct action at the anterior pituitary. *Endocrinology*, **113**: 632-638.
- CHILDS, G.V.; UNABIA, G.; WIERMAN, M.E.; GHARIB, S.D. y CHIN, W. W. (1990): Castration induces time-dependent changes in the follicle-stimulating hormone beta-subunit messenger ribonucleic acid-containing gonadotrope cell population. *Endocrinology*, **126**: 2205-2213.
- DENEFF, C. (1985): Functional interrelationships between pituitary cells. Proc. 3rd. European workshop on pituitary adenomas, 25-35. Free University Press, Amsterdam.
- DENEFF, C. (1986): Paracrine interactions in the anterior pituitary. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **15**: 1-32.
- DENEFF, C. y ANDRIES, M. (1983): Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology*, **112**: 813-822.
- HORVATH, E.; KOVACS, K. y EZRIN, C. (1977): Functional contact between lactotrophs and gonadotrophs in rat pituitary. *I.R.C.S. Med. Sci.*, **5**: 511.
- IBRAHIM, S.N.; MOUSSA, S.M. y CHILDS, G.V. (1986): Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotrophs with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology*, **119**: 629-637.
- KITAHARA, S.S.; WINTERS, J.; ATTARDI, B.; OSHIMA, H. y TROEN, P. (1990): Effects of castration on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by pituitary cells from male rats. *Endocrinology*, **126**: 2.642-2.649.
- NAKANE, P.K. (1970): Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 9-20.
- NAKANE, P.K. (1975): Identification of anterior pituitary cells by immunoelectron microscopy. En: *The anterior pituitary* (Tixier-Vidal y Farquhar, eds.), 45-61. Academic Press, Nueva York.
- NOGAMI, H. y YOSHIMURA, F. (1982): Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat. Rec.*, **202**: 261-274.
- ROBBERECHT, W. y DENEFF, C. (1989): Paracrine interactions in the anterior pituitary. En: *Neuroendocrine perspectives*, 6 (Waas y Scanlon, eds.), 17-25. Springer-Verlag, Nueva York.
- SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G. y AMAT, P. (1992): Células LH de la adenohipófisis de la rata macho castrada. Estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural. *An. Anat.*, **38**: 237-246.
- SANO, M. y SASAKI, F. (1971): Effects of prepubertal orchidectomy on the differentiation of prolactin cells in the mouse adenohipofisis. A quantitative study by electron microscopy. *J. Endocrinol.*, **50**: 705-706.
- SATO, S. (1980): Postnatal development, sexual difference and sexual cyclic variation of prolactin cells in rat: special reference to the topographic affinity to a gonadotroph. *Endocr. Jpn.*, **27**: 573-583.
- SMITH, M. S. (1980): Role of prolactin in regulating gonadotropin secretion and gonad function in female rats. *Fed. Proc.*, **39**: 2571-2576.
- STERNBERGER, L. A.; HARDY, P. A.; CUCULIS, J. J. y MEYER, H. J. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- TRAMU, G.; PILLEZ, A. y LEONARDELLI, J. (1978): An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **26**: 322-324.

Correspondencia: Prof. Dr. P. Amat
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. España

MODIFICACIONES DE LAS CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS INMUNOREACTIVAS A FSH TRAS LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE METOCLOPRAMIDA

CHANGES OF THE FSH-IMMUNOREACTIVE ADENOHYPHYSAL CELLS FOLLOWING CHRONIC ADMINISTRATION OF METHOCLOPRAMIDE

M. RUBIO, F. SÁNCHEZ, J. CARRETERO, M. ANGOSO Y R. VÁZQUEZ

Departamento de Anatomía e Histología Humanas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca
Salamanca. España

RESUMEN

Mediante la técnica inmunocitoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa hemos realizado un estudio morfométrico de la repercusión que la administración crónica de metoclopramida (antagonista dopaminérgico) produce sobre la célula adenohipofisaria reactiva a FSH. Estos datos fueron correlacionados con los valores séricos de la hormona en el momento del sacrificio. En los animales machos tratados se observó una marcada disminución de los niveles séricos de la hormona acompañado de una disminución de las áreas celular citoplásmica y nuclear. Sin embargo, en el grupo de animales hembras no se produjo ningún tipo de modificación. Estos resultados confirman la estrecha relación existente entre el modo de actuación de la dopamina y los esteroides gonadales en la regulación de la secreción de FSH.

PALABRAS CLAVE: FSH. Metoclopramida. Adenohipófisis. Rata.

SUMMARY

By means of the immunocytochemical technique (PAP) a morphometric study of the effect of the chronic administration of methoclopramide (dopaminergic antagonist) on the FSH-adenohypophyseal cells was carried out. These findings were correlated to the FSH-serum levels at the moment of the sacrifice. In the treated males a decrease of the FSH-serum levels accompanied by a decrease of the cellular, cytoplasmic and nuclear areas were observed. However, in the treated females no changes were seen. These results confirm the close relationship between the action of the dopamine and the gonadal steroids in the regulation of the FSH secretion.

KEY WORDS: FSH, Methoclopramide. Adenohypophysis. Rat.

Introducción

La implicación del sistema dopaminérgico sobre la regulación de gonadotropinas fué sugerida al detectarse que, tras la ovariectomía, coincidente con el aumento de secreción de LH, hubo un aumento del turnover de dopamina en la eminencia media así como de los niveles séricos de GnRH.

Adicionalmente, estudios inmunocitoquímicos han demostrado la existencia de contactos axo-axónicos en la eminencia media entre terminales nerviosos que contienen dopamina y GnRH (Ajika, 1979).

Sin embargo, existen controversias en determinar la función que desempeña el sistema dopaminérgico sobre la regulación de GnRH, ya que existen datos experimentales que atribuyen un efecto estimulador (SCHNEIDER y McCann, 1969; Sarkar y Fink, 1981) o inhibidor (Gallo, 1981; Yu y Peter, 1990).

Esta acción dual del sistema dopaminérgico podría ser explicada por el hecho que el tracto túberoinfundibular fuera inhibidor (Craven y McDonald, 1971) y el tracto incertohipotalámico estimulador (McKencie y col., 1984).

La acción de la dopamina sobre la regulación de gonadotropinas parece ser indirecta ya que en estudios in vitro no se ha observado liberación al medio de cultivo de gonadotropinas cuando se incuban hipófisis solas adicionando dopamina (Swartz y Moberg, 1986). Sin embargo, cuando al medio se le añaden extractos de eminencia media se produce un significativo aumento de FSH (Kamberi y cols. 1970).

Basados en estas premisas nuestro propósito es analizar las posibles repercusiones que se producen en las células gonadotropas hipofisarias productoras de FSH, tras la administración crónica de metoclopramida (antagonista dopaminérgico), en ratas adultas de ambos sexos.

Material y Métodos

Para el presente experimento, hemos utilizado 30 ratas adultas de ambos sexos Sprague-Dawley, con peso entre 200 y 250 g que fueron divididas en tres grupos de 10 ratas cada uno (5 por sexo):

1. *Animales normales*: En condiciones estándar del estabulario (régimen de luz-oscuridad entre 8.00 y 20.00 h; temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y humedad relativa de $50 \pm 5\%$ con dieta equilibrada y libre acceso al agua de bebida).
2. *Animales controles*: Los cuales recibieron diariamente (10.00 h) una dosis intramuscular de 100 μl de suero fisiológico durante 15 días.
3. *Animales tratados*: Recibieron diariamente una dosis (20 mg/kg de peso) de metoclopramida intramuscular, a las 10.00 h durante 15 días. Los animales de los grupos 2 y 3 fueron sacrificados 6 horas después de la última administración. Mediante frotis vaginal, se determinó que todas las hembras estuvieran en proestro, el primer día del experimento.

Transcurrido el periodo de experimentación, los animales fueron sacrificados por decapitación, obteniéndose muestras sanguíneas de los vasos del tronco, para la posterior determinación de los niveles séricos. Las hipófisis fueron extraídas y posteriormente fijadas en una solución de Bouin durante 5 días. Posteriormente, fueron incluidas en parafina y se hicieron cortes seriados de 5 μm para el estudio inmunocitoquímico.

Las muestras obtenidas fueron estudiadas con el método de la PAP (Sternberger y cols., 1970) utilizando suero anti-FSH (Dako), obtenido en conejo, a dilución de 1:800, suero de cerdo anti IgG de conejo (Dako, Z-196), diluido a 1:100 y complejo soluble PAP (Dako Z 113), a dilución 1:100.

Para calcular las áreas celular (AC), citoplásmica (ACit) y nuclear (AN), de 500 células reactivas por grupo (100 por animal), así como la densidad numérica (DN) y porcentaje de células reactivas, se utilizó un planímetro digital Apple conectado a un sistema de vídeo RCA y a un microscopio Leitz Dialux EB-20.

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante el test Anova, siendo considerados como significativos los valores de $P < 0.05$.

Los niveles séricos de la hormona fueron detectados mediante radioinmunoensayo de acuerdo con el protocolo del Niamdd (Bethesda, Md), mediante doble anticuerpo usando el NIH kit.

Resultados

Las células reactivas al suero anti-FSH para machos y hembras, en los grupos normales y controles, presentan una débil tinción, uniforme por todo su citoplasma, apreciándose con más frecuencia en los machos células vacuoladas (figs. 1 a 4). El núcleo suele ser de límites bien definidos. Están distribuidas por toda la adenohipófisis con algunos acúmulos más densos en el polo anterior y zonas dorsal y ventral de la misma, su forma es más o menos redondeada, siendo más irregulares aquellas que están situadas en torno a trayectos vasculares.

En cuanto al grupo de animales tratados con metoclopramida, se apreció en los machos, que junto, a células con un nivel de tinción semejante a lo grupos anteriores, existen otras con una tinción mas débil. Por otra parte, se pudo apreciar mayor número de células en anillo de sello, cuyo citoplasma apareció más intensamente reactivo (fig. 5). En las hembras, no se observaron modificaciones llamativas, con respecto a los grupos normales y controles (fig. 6).

Los resultados morfométricos se expresan en las tablas 1 y 2, comprobándose una DN similar en ambos sexos, con un descenso significativo en el grupo de machos tratados, que afectó también al porcentaje de células reactivas.

Los parámetros morfométricos, AC., ACit. y AN., fueron mayores en las células de los machos cuando se comparan con el grupo de las hembras (Tablas 1 y 2). Tras el tratamiento con metoclopramida, se observó, en machos, un descenso significativo ($p < 0.05$) de dichos parámetros (Tabla 2), no existiendo modificaciones en el grupo de las hembras (Tabla 1).

Los niveles séricos de FSH, fueron similares en los tres grupos de hembras (Tabla 1). Sin embargo, en el grupo de animales machos tratados se produjo un descenso de los niveles hormonales cuando se comparó con los grupos de machos normales y controles ($p < 0.05$) (Tabla 2).

TABLA 1. Valores obtenidos en animales hembras (normales, controles y tratadas con metoclopramida)

PARAM.	H. NORM.	H. CONT.	H. TRATADA
DN.	1,07±0,24	1,05±0,36	1,03±0,18
% C.	13,57±2,80	12,21±2,96	13,04±2,67
AC.	123,89±33,39	129,77±34,78	128,56±40,52
ACit.	100,13±29,55	104,00±30,94	99,73±37,8
AN.	23,76±6,09	25,77±7,13	28,84±5,92
NS.	2,58±0,33	2,41±0,10	2,26±0,22

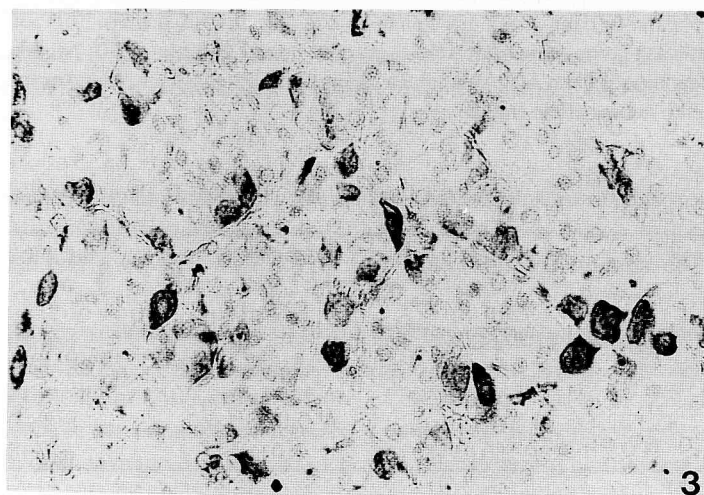
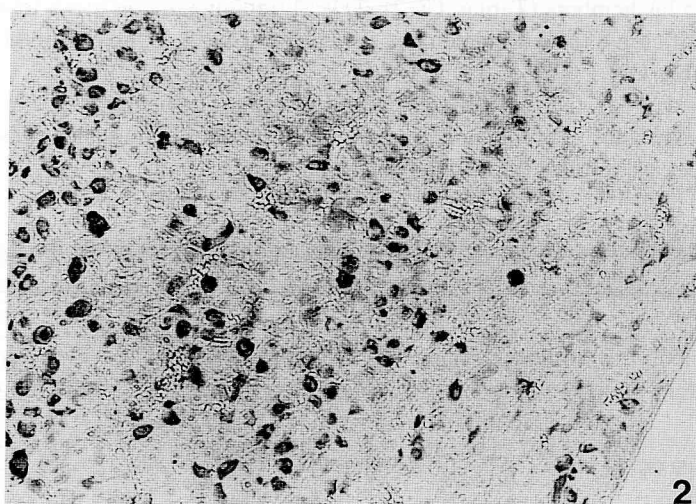
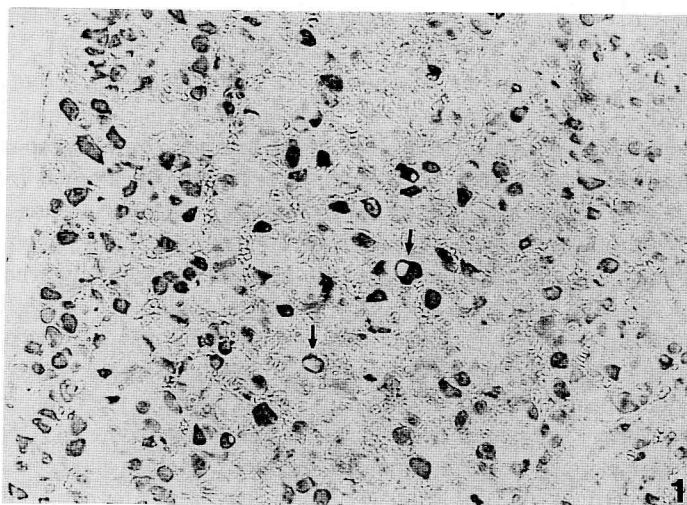
DN: Densidad numérica expresada como número de células reactivas por $1.000 \mu\text{m}^2$, %C: Número de células reactivas con respecto al total de células adenohipofisarias, AC: Área celular, ACit: Área citoplásmica, AN: Área nuclear, NS: Niveles séricos de hormona FSH en el momento del sacrificio (ng/ μl).

TABLA 2. Valores obtenidos en animales machos (normales, controles y tratados con metoclopramida)

PARAM.	M. NORM.	M. CONT.	M. TRATADA
DN.	1,12±0,10	0,95±0,10	0,58±0,06*
% C.	11,42±1,06	11,81±1,52	6,56±0,84*
AC.	182,16±63,18	180,66±68,14	152,87±41,49*
ACit.	151,66±60,52	151,38±65,44	114,19±35,33*
AN.	30,50±2,53	29,28±2,90	25,99±5,79*
NS.	8,23±0,63	8,07±0,45	6,05±0,45*

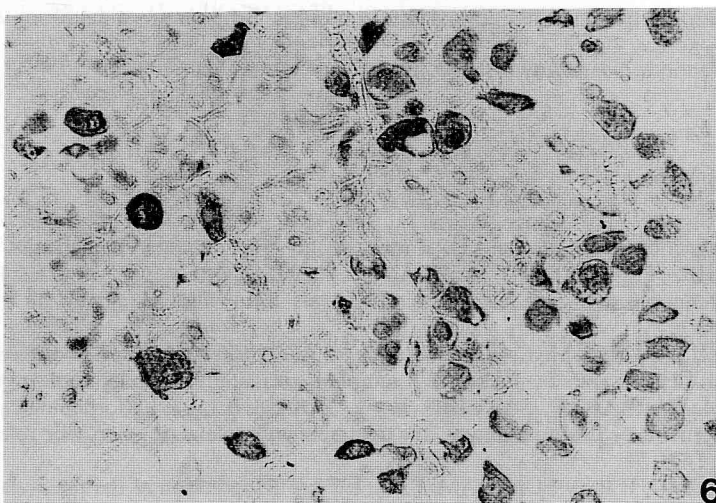
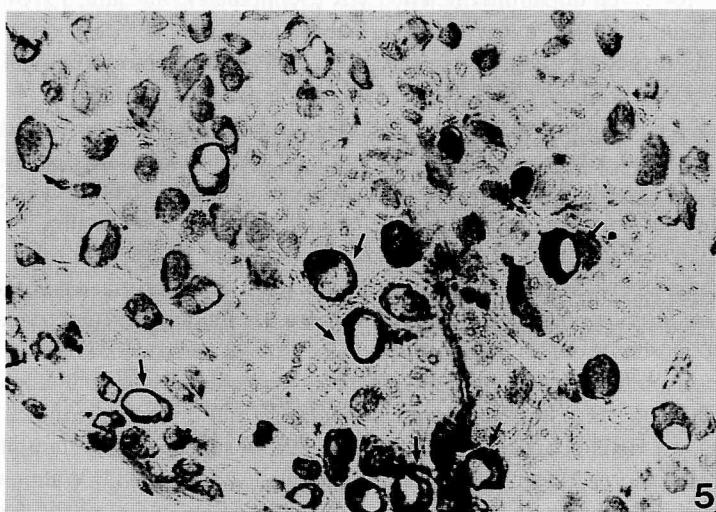
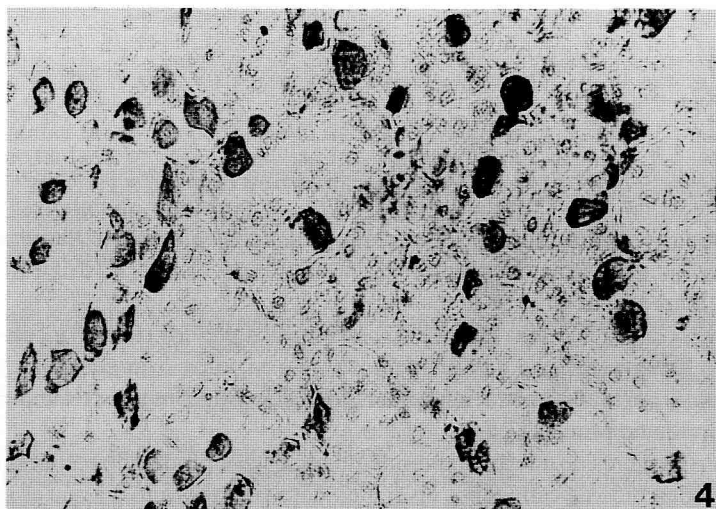
* $P < 0.05$ cuando se compara con los grupos normales y controles.

DN: Densidad numérica expresada como número de células reactivas por $1.000 \mu\text{m}^2$, %C: Número de células reactivas con respecto al total de células adenohipofisarias, AC: Área celular, ACit: Área Citoplásmica, AN: Área nuclear, NS: Niveles séricos de hormona FSH en el momento del sacrificio (ng/ μl).



FIGURAS 1 y 2. Animales normales. Células FSH-inmunoreactivas observadas en animales machos (fig. 1) y hembras (fig. 2). Nótese la presencia de alguna célula en anillo de sello (flechas) (200x).

FIGURAS 3 y 4. Animales controles. Se observan células reactivas con diferentes intensidades de reacción, con similares características morfológicas a las de los grupos normales. (fig. 3. Macho; fig. 4. Hembra) (400x).



FIGURAS. 5 y 6. Animales tratados con metoclopramida. Especialmente en animales machos se observaron gran cantidad de células en anillo de sello intensamente reactivas (flechas). (Fig. 5. Macho; fig. 6. Hembra) (400x).

Discusión

Resultados previos han demostrado que la dopamina tiene un efecto predominantemente estimulador sobre la secreción de LH en la rata hembra (Carretero y cols., 1991, entre otros) y en mujeres (Hyypya y cols., 1978). En el presente experimento y en relación con los grupos de animales hembras, la administración crónica de metoclopramida, no produjo modificaciones significativas de los niveles séricos de FSH ni de los parámetros morfométricos de las células productoras de la misma.

La falta de respuesta en las hembras concuerda con estudios previos (Rinne y cols., 1979; Ropert y cols., 1984). Adicionalmente, Krieg y Sawyer (1976) demostraron en ratas ovariectomizadas, con bloqueo de la liberación de gonadotropinas por la administración de altas dosis de estrógenos y progesterona, que la administración intraventricular de dopamina no producía efecto alguno.

El hecho que en las hembras de nuestro experimento no se haya producido respuesta, podría explicarse por la posibilidad de un alto contenido de estrógenos en el momento del sacrificio, ya que es sabido que niveles altos de estradiol bloquean la liberación dopaminérgica de LHR (Schneider y McCann, 1970).

Por otra parte, si bien, la LHRH interviene en la liberación de LH y FSH, hay situaciones en las que esta última hormona tiene una respuesta distinta ante diferentes estímulos, como lo demuestran diversos estudios (Cheesman y cols., 1977a y b; Wenger y cols., 1986; Hattori y cols., 1986; Handa y cols., 1986).

Así, aunque las dos gonadotropinas están sometidas al control del mismo péptido (LHRH), algún otro factor, posiblemente la inhibina, intervenga específicamente en el control de la regulación de FSH. Este hecho, probablemente explicaría los resultados obtenidos por nosotros mismos (Carretero y cols., 1991), en este caso sobre la célula adenohipofisaria productora de LH, tras aplicar el mismo tratamiento.

Por el contrario, en los animales machos, la metoclopramida, indujo una disminución de la densidad numérica y porcentaje del número de células reactivas productoras de la misma, así como un descenso del área celular, con respecto a los grupos normales y controles. Estos resultados morfométricos indican un estado de hiperactividad celular concordante con la disminución de los niveles séricos de FSH.

La diferente respuesta obtenida entre machos y hembras concuerda con resultados anteriores de nuestro laboratorio, tras analizar la respuesta de las células productoras de LH ante distintos estímulos como, metoclopramida (Carretero y cols., 1991), o LHRH (Carbajo y cols., 1987 y 1989), superponibles, también a diferentes análisis realizados por otros investigadores (Tang y Tang, 1979; Deneff y Andries, 1983; Watanabe, 1986).

Nuestros resultados, confirman los de Krieg y Sawyer (1976), de los que se puede deducir que, la dopamina tiene un efecto estimulador sobre la célula de FSH en la rata macho y que esta acción puede ser dependiente de los esteroides gonadales.

BIBLIOGRAFÍA

- AJIKI, K. (1979): Simultaneous localization of LHRH and catecholamines in rat hypothalamus. *J. Anat.*, **128**: 331-347.
- CARRETERO, J.; SÁNCHEZ, F.; MONTERO, M.; BLANCO, E.; RIESCO, J.M. y VÁZQUEZ, R. (1991): Morphometric study of the LH-immunoreactive gonadotrophic cells of rats following treatment with methoclopramide. *Histol. Histopath.*, **6**: 101-105.
- CARBAJO, E.; CARBAJO, S.; RUBIO, M.; CARVAJAL, J.C. y VÁZQUEZ, R. (1987): Sex differences in pituitary LH cells and the response to an LHRH synthetic analogue. A morphological study. *J. Endocrinol. Invest.*, **10** (suppl.). P55.
- CARBAJO, E.; RUBIO, M.; CARBAJO, S.; SÁNCHEZ, F. y VÁZQUEZ, R. (1989): Morphological study of the rat pituitary follicle stimulating hormone cells after alternate day treatment with luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). *Histol. Histopath.*, **3**: 147-152.
- CHEESMAN, D.W.; OSLAND, R.B.; y FORSHAM, P.H. (1977a): Suppression of the preovulatory surge of luteinizing hormone and subsequent ovulation in the rat arginine vasotocin. *Endocrinology*, **101**: 1194-1202.
- CHEESMAN, D.W.; OSLAND, R.B.; y FORSHAM, P.H. (1977b): Effects of 8-arginine vasotocin on plasma prolactin and follicle-stimulating hormone surges in the proestrus rat. *Proc. Soc. Biol. Med.*, **156**: 369-372.
- CRAVEN, R.P. y McDONALD, P.G. (1971): The effect of intrahypothalamic infusions of dopamine and noradrenaline on ovulation in the adult rat *Life Sci.*, **10**: 1409-1415.

- DENEFF, C. y ANDRIES, M. (1983): Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology*, **103**: 736-747.
- GALLO, R.V. (1981): Further studies on dopamine-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, **32**: 187-192.
- HANDA, R.J.; CONDON, T.P.; WITMOYER, D.I. y GORSKI, R.A. (1986): Gonadotropin secretion following intraventricular norepinephrine infusion into neonatally androgenized female rats. *neuroendocrinology*, **43**: 269-272.
- HATTORI, A.; ISHII, S. y WADA, M. (1986): Different mechanisms controlling FSH and LH release in Japanese quail (*Coturnix Coturnix Japonica*): Evidence for an inherently spontaneous release and production of FSH. *J. Endocrinology*, **108**: 239-245.
- HYYPPIA, M.T. LANGVIK, V. y RINNE, V.K. (1978): Plasma pituitary hormones in patients with Parkinson's disease treated with bromocriptine. *J. Neural. Transm.*, **42**: 151-157.
- KAMBERI, I.A.; SCHNEIDER, H.P.G. y McCANN, S.M. (1970): Action of dopamine to induce release of FSH-Releasing factor (FRF) from hypothalamic tissue in vitro. *Endocrinology*, **86**: 278-284.
- KRIEG, R.J. y SAWYER, CH.H. (1976): Effects of intraventricular catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized-steroid-primed rats. *Endocrinology*, **99**: 411-419.
- McKENZIE, F.J.; HUNTER, A.J.; DALY, CL. y WILSON, C. (1984): Evidence that the dopaminergic incertohypothalamic tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotropin release. *Neuroendocrinology*, **39**: 289-295.
- U.K.; HYYPPIA, M.T.; LANGVIK, V.A.; MARTILLA, R. y SONNIEN, V. (1979): Effects of dopamine receptor stimulation on anterior pituitary hormone secretion and brain turnover in patients with Parkinson's disease. In: A. POLLERI and R.M. McLEOD (Eds), *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects*. Academic Press, London, pp: 313-319.
- ROBERT, J.F.; QUIGLEY, M.E. y YEN, S.S.C. (1984): The dopaminergic inhibition of LH secretion during the menstrual cycle. *Life Sci.*, **34**: 2067-2073.
- SARKAR, D.K. y FINK, G. (1981): Gonadotropin-releasing hormone surge: Possible modulation through postsynaptic alpha-adrenoreceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. *Endocrinology*, **108**: 862-867.
- SCHNEIDER, H.P.G. y McCANN, S.M. (1969): Possible role of dopamine as transmitter to promote discharge of LH-releasing factor. *Endocrinology*, **85**: 121-132.
- SCHNEIDER, H.P.G. y McCANN, S.M. (1970): Release of LH-Releasing factor (LRF) into the peripheral circulation of hypophysectomized rats by dopamine and its blockage by estradiol. *Neuroendocrinology*, **87**: 249-253.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.Jr. ; CUCULIS, J.J. y MEYER, H.G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase, antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333.
- SWARTZ, S.R. y MOBERG, G.P. (1986): Effects of epinephrine, and dopamine on gonadotropin-releasing hormone-induced secretion of luteinizing hormone in vitro. *Endocrinology*, **118**: 2425-2431.
- TANG, L.K. y TANG, F.Y. (1979): Sex differences in LH response to LHRH and DBcAMP and effect of 17 β -estradiol. *Am. J. Physiol.*, **23**: 216-221.
- WATANABE, Y.G. (1986): A comparative in vitro study on LHRH responsiveness of LH cells of the pars tuberalis and pars distalis. *Cell. Tiss. Res.*, **245**: 369-375.
- WENGER, T.; CROIX, D.; TRAMU, G. y WATANABE, K. (1986): Further evidence that delta-9-tetrahydro-cannabinol decrease serum LH but not FSH in adult ovariectomized rats. *Neuroendocrinology Letters*, **8**: 47-51.
- YU, K.L. y PETER, R.E. (1990): Dopaminergic regulation of brain gonadotropin-releasing hormone in male Goldfish during spawning behaviour. *Neuroendocrinology*, **52**: 276-283.

Dr. Manuel Rubio Sánchez
Dpto. Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina.
Avda. Campo Charro s/n
37007. Salamanca. España

MUERTE NEURONAL EN LA REGIÓN HIPOCAMPAL DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

NEURONAL DEATH IN THE HIPPOCAMPAL REGION DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

I. SMITH-FERNÁNDEZ, I. FERNÁNDEZ-ORTEGA, P. SALINAS,
V. SMITH-FERNÁNDEZ y A. VILLALOBOS

Departamento de Morfología Normal y Patológica. Facultad de Medicina.
Universidad de Málaga

RESUMEN

Las áreas del hipocampo: CA1, CA2, CA3, *Subiculum*, y *Gyrus Dentatus* (GD) se estudian en ratas Wistar lactantes. Se procede para cada área y cada edad al recuento neuronal, y a la medición de su superficie relativa, (% de la superficie total del hipocampo en cada edad).

La subida brusca neuronal en GD después de P.14 se debería al alcanzar su posición definitiva las últimas oleadas celulares.

La pérdida porcentual de neuronas en CA2 guardaría relación con su escasa oferta sinóptica (sólo del *septum*).

Existe discordancia entre recuento neuronal que desciende mientras se conserva la superficie en CA1 para el P.14. Podría deberse al aumento del neuropilo.

PALABRAS CLAVE: Muerte neuronal. Hipocampus. CA1. CA2. CA3. Subiculum. Gyrus dentatus. Desarrollo posnatal. Lactancia. Rata Wistar.

SUMMARY

Hippocampal areas CA1, CA2, CA3, *subiculum* and *dentatus gyrus* (GD) were studied in the breeding wistar white rat. Neuron counts and measurement of relative surface (% of total hippocampus surface in each area for each age) were achieved.

Sudden neuronal spurt in (GD) after P.14 is due to the last cellular waves reaching their definite position.

Percentual loss of neurons in CA2 is in relation with their scant synaptic requirements (*septum* only)

There is discordance in CA1 for P.14 between decreasing neuronal counts whilst conservation of its surface.

This could be explained by an increase of neuropile.

KEY WORDS: Neuronal death. Hippocampus. CA1. CA2. CA3. Subiculum. Dentatus gyrus. Postnatal development. Lactation. Wistar (white) rat.

Introducción

El hipocampo ha sido intensamente estudiado desde Cajal en 1911 (16) y Lorente de No en 1934 (10) que empezaron a realizar sus estudios con el método de Golgi. Mas recientemente con otras técnicas de lesión se ha estudiado la citoarquitectura y conexiones de la región hipocampal (3, 4, 7, 8, 17 y 18). También se usaron métodos de transporte (11, 12, 13, 20, 21, 22 y 23) y finalmente Swanson en 1981 (24) perfeccionó técnicas de trazado axonal y métodos de doble clasificación. Estos estudios han contribuido a que la región hipocampal de la rata sea una de las estructuras neuronales mejor conocidas.

La muerte neuronal es una fase del desarrollo del S.N.C. aceptada y demostrada por múltiples trabajos de distintos autores (2, 5, 9 y 14). Ha sido estudiada en casi todos los niveles del S.N. tanto central como periférico. La teoría más aceptada para explicar esta muerte es la basada en la «hipótesis de la competición. Según esta la muerte neuronal ocurre en un grupo de neuronas cuando tienen que competir por una sinapsis en una diana común degenerando quienes no la consiguen (6). En nuestro trabajo pretendemos aportar, desde el punto de vista de muerte neuronal, al estudio en las primeras etapas del desarrollo postnatal del hipocampo así como en las distintas partes que lo componen.

Material y método

Ratas Wistar sacrificadas a los 5, 8, 12, 14, 16 y 21, días postnatales utilizando 5 animales en cada una de las fechas citadas. Fueron perfundidos intravascularmente, utilizando una bomba peristáltica Warton-Marlow y usando formol al 10% como líquido fijador.

Los cerebros incluidos en parafina y teñidos por los métodos de Nissl (N) y Klüver-Barrera (KB) en cortes de 10 μ m.

Se han realizado los recuentos de las poblaciones celulares de las distintas regiones del hipocampo: CA1, CA2, CA3, Subículo y Giro Dentado, comparándolos con la evolución de las superficies de dichas regiones.

El estudio de superficies se realizó sobre los cortes histológicos con la ayuda de un tubo de dibujo ajustado a un microscopio Nikon, dibujando en papel los contornos de las áreas del hipocampo ayudados del Atlas estereotáxico del S.N.C. de la rata en desarrollo de Paxinos and Watson y así poder delimitar las distintas regiones del hipocampo cambiantes a lo largo de su ontogenia postnatal. Para facilitar la identificación posterior de las zonas con el analizador de imágenes, se procedió a identificarlos con colores distintos. Las áreas fueron medidas con un Ibas Kontron 2000.

Los recuentos celulares, realizados todos por el mismo observador incluyeron las neuronas que tenían visibles núcleo, nucleolo y citoplasma.

Se hizo un test de comportamiento basado en las siguientes observaciones: Estado de las hendiduras palpebrales, pelaje, levantamiento del vientre en pronación, marcha, propulsión, recuperación postural tras decúbito supino, suspensión con miembros anteriores, respuesta a suspensión por el rabo, motilidad y respuesta a estímulos sensoriales.

Resultados

Las superficies relativas de las áreas ocupadas por pirámides o granos de cada zonas del hipocampo en relación con la suma de superficies de todas las zonas estudiadas en cada uno de los días de estudio se recogen en la Tabla I.

Los recuentos celulares quedan registradas en la Tabla II.

Los resultados comparativos entre superficies y recuentos de las distintas zonas del hipocampo se indican en las gráficas.

El test de comportamiento da los siguientes resultados: Las hendiduras palpebrales empiezan a abrirlas a los 12 días un 20% de los animales y a los 16 las tienen totalmente abiertas todos. La piel esta cubierta de pelo en el

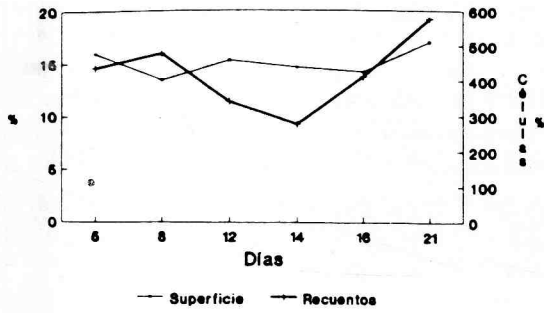
TABLA I. Superficies

	5 DÍAS	8 DÍAS	12 D.	14 D.	16 D.	21 D.
CA1	KB19,83 15,955 N-12,08	KB13,86 13,37 N-12,88	KB18,64 15,28 N-11,92	KB17,61 14,635 N-11,66	KB17,84 14,195 N-10,55	KB21,14 17,045 N-12,95
CA2	KB8,06 5,12 N-2,18	KB-3 2,295 N-2,85	KB1,95 2,045 N-2,14	KB3,04 2,775 N-2,51	KB2,70 2,67 N-2,64	KB2,11 2,355 N-2,60
CA3	KB13,68 15,335 N-16,99	KB20,02 21,305 N-22,54	KB22,47 20,005 N-19,85	KB23,01 21,43 N-19,85	KB20,82 20,789 N-20,74	KB10,57 15,19 N-19,81
SUB.	KB42,12 38,875 N-35,63	KB45,73 42,975 N-49,64	KB33,87 41,755 N-49,64	KB34,16 43,425 N-52,69	KB33,60 43,34 N-53,09	KB37,88 46,665 N-55,45
G.D.	KB16,30 24,7 N-33,10	KB17,37 19,405 N-21,44	KB23,04 20,89 N-18,74	KB22,16 17,715 N-13,27	KB25,01 18,98 N-12,95	KB28,28 18,72 N-9,16

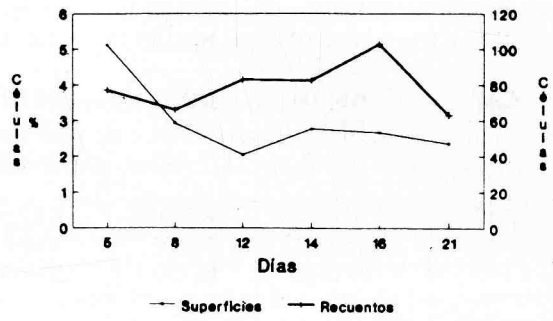
TABLA II. Recuentos

	5 DÍAS	8 DÍAS	12 D.	14 D.	16 D.	21 D.
CA1	KB-316 M-438 N-560	KB-428 M-478 N-529	KB-308 M-342 N-376	KB-149 M-278 N-407	KB-358 M-412 N-466	KB-686 M-577 N-468
CA2	KB-80 M-77 N-74	KB-59 M-66 N-73	KB-72 M-83 N-94	KB-71 M-82,5 N-94	KB-68 M-103 N-138	KB-54 M-63 N-72
CA3	KB-306 M-311 N-316	KB-233 N-262 N-391	KB-235 M-321 N-408	KB-233 M305,5 N-367	KB-216 M328,5 N-441	KB-363 M368,5 N-374
SUB.	KB-384 M499-5 N-615	KB-338 M-406 N-474	KB-257 M402,5 N-548	KB-182 M401,5 N-621	KB-238 M-288 N-338	KB-344 M-379 N-414
G.D.	KB-390 M-457 N-524	KB-460 M459,5 N-459	KB-452 M499,5 N-547	KB-235 M-515 N-795	KB-738 M861,5 N-985	KB1392 1269,5 N-1147

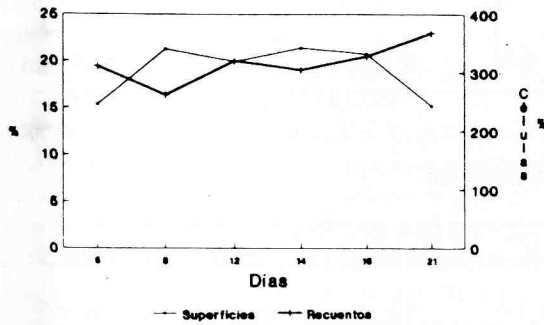
Superficies y Recuentos CA1



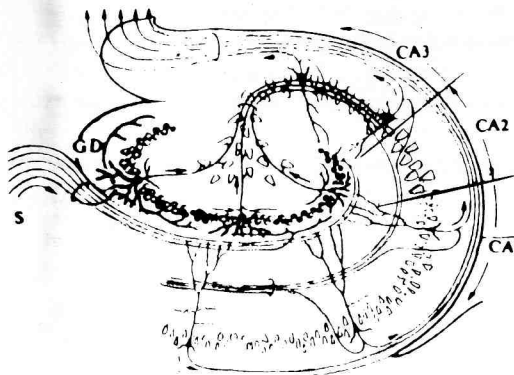
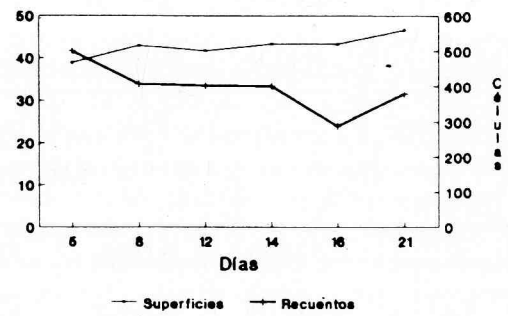
Superficies y Recuentos CA2



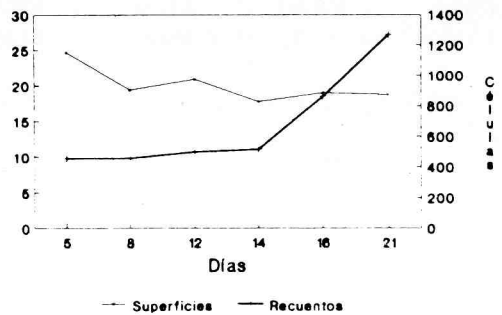
Superficies y Recuentos CA3



Superficies y Recuentos Subiculo



Superficies y Recuentos Giro Dentado



60% a los 12 días y en el 100% a los 14 días; el vientre no arrastra en el 80% a los 12 días y en el 100% a los 14; la marcha se hace coordinada en el 30% a los 12 días y en el 100% a los 14; hay propulsión eficaz en el 50% a los 8 días y en todos a los 12; la recuperación postural tras decúbito se hace sin dificultad a los 5 días en el 100%; se mantienen suspendidos de los miembros anteriores el 80% entre a los 5 y 8 días y el 100% a los 12; la respuesta a suspensión por el rabo es dificultosa en el recién nacido y para el 20% a los 8 días; la motilidad y la respuesta a estímulos es hipocinética hasta los 12 días en un 20%.

Discusión y consideraciones

En nuestros resultados encontramos que todos los campos terminan en un aumento celular a los P.21, salvo el CA2 en el que se produce un decremento. Para el día P.14 y P.16 aparecen contrarias en CA1 y CA2. Mientras en CA1 se produce un aumento celular intenso a partir de P.14 en CA2 se produce un decremento de la población celular a partir de P.16.

Sin embargo, la evolución del Subículo y CA3 es muy parecida en cuanto a que no se producen aumentos o disminuciones bruscas de las poblaciones celulares.

En Giro Dentado (GD) se produce un aumento brusco a partir del P.14 al P.21.

Se producen aumentos celulares bruscos en CA1 y GD; en Subículo y CA3 la población celular permanece estable y en CA2 se produce una disminución brusca.

En CA1 y en CA3 la superficie permanece estable a lo largo del desarrollo, un matiz ascendente en el Subículo, y, se produce una disminución en CA2 y GD.

Los cambios más bruscos en las superficies de las distintas áreas aparecen en el intervalo de P.5 a P.B.

En el CA2 se produce un descenso más fuerte, pues alcanza un 55%.

Según estos resultados hay tres hechos que nos llaman la atención cuando estudiamos la evolución de los animales testigos en los recuentos y superficies de las distintas zonas del hipocampo.

El primero de ellos es la subida brusca celular del GD. Este resultado se explica con el trabajo de Bayer (1980) (1) quien estudiando la neurogénesis del hipocampo de la rata con técnicas de timidina tritiada establece un calendario cronológico de las distintas zonas, siendo el GD quien tiene la neurogénesis más tardía: desde P.O a P.14.

Nosotros estamos de acuerdo con Bayer al obtener un aumento de la población celular después del P.14 en el GD, como consecuencia de las últimas oleadas celulares cuando alcanzan su posición definitiva.

El segundo es la pérdida celular que existe en CA2 porcentualmente y con respecto a las otras zonas del hipocampo.

La muerte celular, aceptado y comprobado como veíamos en la Introducción. La teoría más extendida, que intenta explicar la muerte neuronal en el desarrollo, se basa en la competencia sinóptica por una diana común para varias neuronas. Las perdedoras que no logran sinaptar degeneran y solo sobreviven quienes lo consiguen Openheim (14).

Según esto, si analizamos la revisión de Paxinos (15) sobre histología del hipocampo en la rata, comprobamos existen abundantes ofertas para sinaptar a las distintas zonas del hipocampo, hecho que nos habla de unas pérdidas celulares inexistentes o muy bajas. En nuestros resultados, las distintas zonas, salvo el CA2, presentan curvas estables sin descensos celulares que excedan a las consideradas "pérdidas naturales".

De todas las regiones, el CA2 es quien tiene la menor oferta sináptica (solo el área septal) y tiene que compartirla además con CA3 y CA1. Esta competencia por conseguir una sinapsis con una célula diana del Área Septal puede ser la causa para nosotros, de la muerte celular natural encontrada en el CA2 hecho que no ocurre en las demás regiones que tiene una amplia oferta sináptica.

El tercer hecho que encontramos es la discordancia que existe para CA1 entre recuentos y superficies en el P.14. Existe descenso celular que no afecta a la superficie. Esto nos indica que la conservación de la superficie ha sido gracias al aumento del neuropilo, o dicho de otra manera, debido a las aferencias que recibe y a su propia dendrogénesis. Durante el desarrollo CA1 recibe abundantes aferencias de CA3 y del Subículo Paxinos (15), lo que nos explican este aumento de su superficie sin aumentar su población celular.

Los fundamentales logros en el comportamiento empiezan a alcanzarse en el día 12 y están patentes en todos los animales a los 14 o 16 días. Estos días son clave en el desarrollo, coincidiendo con otros autores que señalan a esa edad como la edad crítica del desarrollo postnatal (19).

BIBLIOGRAFÍA

1. BAYER, S.A. (1980): Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3Hthymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.*, **190**: 87-114.
2. BEAULATON, J., LOCKSHIN, R.A. (1982): The relation of programmed cell death to development and reproduction: Comparative studies and an attempt at classification. *Int. Rev. Cytol.*, **79**: 215-235.
3. BLACKSTAD, T.W. (1956): Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special references to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.*, **105**: 417-537.
4. ACKSTAD, T.W. (1958): On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata. An experimental study in the rat. *Acta Anat.*, **35**: 202-214.
5. CATSICAS, S., THENOS, S., CLARKE, P. (1987): Major role of neuronal death during brain development: Refinement of topographical connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 8165-8168.
6. HAMBURGER, V. and LEVE-MONTALCINI, R. (1949): Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J. Exp. Zool.*, **111**: 457-502.
7. HJORTH-SIMONSEN, A. (1972): Proyección de la lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.*, **146**: 219-232.
8. HJORTH-SIMONSEN, A. (1973): Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: An experimental analysis. *J. Comp. Neurol.*, **147**: 145-162.
9. HURLEY, J.M. (1988): Cell death in developing system. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.*, **13**: 55-86.
10. LORENTE DE NO, R. (1934): Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neur.*, **46**: 113-117.
11. MEIBACH, R.C. and SIEGEL, A. (1975): The origin of fornix fibers which project to the mammillary bodies in the rat: A horseradish peroxidase study. *Brain Res.*, **88**: 508-512.
12. MEIBACH, R.C. and SIEGEL, S. (1977): Efferent connections of the septal area in the rat: An analysis using retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res.*, **119**: 1-20.
13. MEIBACH, R.C. and SIEGEL, S. (1977): Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.* **124**: 197-224.
14. OPPENHEIM, R.W. (1981): Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. V. Evidence on the role of cell death and neuromuscular function in the formation of specific peripheral connections. *J. Neurosci.* **1**: 141-151.
15. PAXINOS, G. (1985): The rat nervous system. Vol. 1. pp. 335-344. Academic Press. San Diego.
16. RAMÓN Y CAJAL, S. (1911): Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres. Vol. 2. Instituto Ramón y Cajal. Madrid.
17. RAISMAN, G., COWAN, W.M. AND POWELL, T.P.S. (1965): The extrinsic afferent, commissural and association fibers of the hippocampus. *Brain.*, **88**: 963-996.
18. RAISMAN, G., COWAN, W.M. AND POWELL, T.P.S. (1966): An experimental analysis of the afferent projection of the hippocampus. *Brain.*, **89**: 83-108.
19. SOLANO, A., MORA, M.J., CILVETI, A., SALINAS, P., CAMPOS, V., FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., SMITH-AGREDA, J.M., (1985): Edad crítica en el crecimiento craneofacial. Un estudio comparativo en roedores. *Histol. Med.* **1**: 89-94.
20. STEWARD, O. (1967): Topographic organization of projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **167**: 285-314.
21. SWANSON, L.W. and COWAN, W.M. (1975): Hippocampo-hypothalamic connections: Origin in subicular cortex, not in Ammon's horn. *Science*, **189**: 303-304.
22. SWANSON, L.W. and COWAN, W.M. (1976): Autoradiographic studies of the development and connections of the septal area in the rat. In J.W. De France (ed.). *The Septal Nuclei*. Plenum, New York. pp. 37-64.
23. SWANSON, L.W. and COWAN, W.M. (1977): An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **172**: 49-84.
24. SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E. and COWAN, W.M. (1981): Evidence for collateral projection by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: A multiple retrograde labeling study in the rat. *J. Neurosci.*, **1**: 548-559.

Correspondencia: Dra. Inés Smith-Fernández
Cátedra de Anatomía. Facultad de Medicina
Universidad de Málaga
29071 Málaga. España

EFFECT OF PINEALECTOMY ON THE RAT TESTIS. A HISTOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDY

EFFECTOS DE LA PINEALECTOMÍA SOBRE EL TESTÍCULO DE RATA. ESTUDIO HISTOLÓGICO, MORFOMÉTRICO Y ULTRAESTRUCTURAL

**D. TORANZO, J.L. BLÁZQUEZ, F.E. PASTOR, G. AMAT, B. PELÁEZ,
A. SÁNCHEZ and P. AMAT**

Departamento de Anatomía e Histología Humanas y Departamento de Investigación y Microscopía Electrónica.
Hospital Clínico Universitario. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

SUMMARY

A histological, morphometric and ultrastructural study was made of the testicle of rats pinealectomized at one, two and three months of age following surgery. No histological or ultrastructural alterations of the seminiferous tubules nor of the interstitial cells were observed in any of the groups of pinealectomized rats. The cross-sectional area of the seminiferous tubules of these animals was found to be increased at three months following surgery as compared with the intact animals and those subjected to sham-pinealectomy of the same age.

KEY WORDS: Pinealectomy. Testicle. Rat

RESUMEN

Hemos realizado un estudio histológico, morfométrico y ultraestructural del testículo de ratas pinealectomizadas al mes de edad y sacrificadas uno, dos y tres meses después de la intervención. No se ha detectado la existencia de alteraciones histológicas o ultraestructurales de los túbulos seminíferos ni de las células intersticiales en ningún grupo de ratas pinealectomizadas. La superficie de sección de los túbulos seminíferos de estos animales está incrementada al mes y a los dos meses de la pinealectomía y disminuida a los tres meses de la intervención, en relación con los animales normales y sometidos a pinealectomía simulada de la misma edad.

PALABRAS CLAVE: Pinealectomía. Testículo. Rata.

Introduction

In recent years, the relationship between the pineal gland and reproductive function has received the attention of many authors (for references, see Reiter, 1980; Brown *et al.*, 1981; Toranzo *et al.*, 1988; Blázquez *et al.*, 1982). It is generally accepted that Heubner (1898) was the first to establish the existence of such a relationship in a report

of a case of precocious puberty in a child with a destructive tumor of the pineal parenchyma. This initial observation was later corroborated by Kitay (1954), who observed that functional tumors of the pineal gland were accompanied by a delay in sexual maturation, whereas destructive tumors of this gland led to the appearance of precocious puberty.

It is currently assumed that melatonin -a hormone produced by the pineal gland- is the substance responsible for the antigonadotropic activity of the epiphysis. In this sense, Wurtman and Axelrod (1965) observed that the administration of small amounts of melatonin prior to the onset of puberty decreased ovarian weight and delayed the puberty. By contrast, removal of the pineal gland, in the rat, accelerated its onset. Later, Rollag (1982) observed that among the different pineal indoles the component with the greatest effect on the decrease in testicular weight was melatonin.

Despite this, there is considerable discrepancy concerning the role of melatonin in reproductive function (for a review, see Brown *et al.*, 1981) since there are other compounds with possible antigonadotropic actions, such as *threonylseryllsine*, a tripeptide isolated from bovine pineal tissue (Orts *et al.*, 1980). The administration of this substance to rats caused a significant decrease in serum LH levels (Benson, 1989). Nevertheless, even though the existence of other active pineal products -be they polypeptides or indolamines- can be considered, there is good evidence to suggest that melatonin is an antigonadotropic factor synthesized by the pineal (see Reiter, 1980 y 1984; Cardinali, 1981). Additionally, there are certain discrepancies regarding the physiological role of the pineal in reproduction in species that are not considered to be photoperiodic, such as the rat (see Blázquez *et al.*, 1992).

Previously, our group has reported that pinealectomy induces cellular hyperactivity both in neurons from the medial preoptic area (Toranzo *et al.*, 1992) and in gonadotroph cells (Blázquez *et al.*, 1992). In the present work we performed a histological, morphometric and ultrastructural study of the testicles of rats pinealectomized at one month of age and sacrificed at one, two or three months after surgery in order to shed further light on the relationships between the pineal gland and the gonads.

Materials and Methods

Ninety albino male Sprague-Dawley rats were used as the experimental animals. All of them had been subjected to a 12/12 light/darkness cycle since birth in a room with constant temperature (18-20°C) and food and water *ad libitum*. In thirty animals the pineal gland was removed surgically under ether anaesthesia at 30 days of age (Pinealectomized rats -Px). Pinealectomy was performed after opening a window in the skull and ligating the *sinus sagittalis superior*. Ten animals were sacrificed one month after the operation (1+1); a further ten at two months (1+2), and another ten at three months (1+3). Thirty rats of one month of age underwent a sham pinealectomy (SPx) and were sacrificed according to the above schedule. A further thirty rats were not subjected to any kind of experimentation (intact rats -IR) and were sacrificed in groups of 10 animals at two, three and four months of age. Under intraperitoneally administered sodium thiopental anaesthesia (45 mg/kg b.w.) all the animals were perfused through the left ventricle with a fixative solution of 5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C, following a wash of the vascular tree with a 150 mM sodium chloride solution. After perfusion, the testes were removed. The right testis was cut in blocks of approximately 1 mm³ that were kept in fixative solution over 12 h. The blocks were then post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer for 90 min at 4°C. Following this, they were then dehydrated in acetone and contrasted with 2% uranyl acetate and embedded in Durcupan (Fluka). Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were taken on an LKB Ultratome III 8800 ultramicrotome and studied with a Philips EM-201 electron microscope. The left testis was washed in phosphate buffer, fixed in Bouin-Hollande sublimate over a period of 48 hours, dehydrated in alcohol, and embedded in paraffin as usual. 7 µm thick sections were stained with hematoxylin-eosin. Using a Kontrom Ibas I semiautomatic image analyzer, randomly-chosen sections were used to determine the cross-sectional area of 500 appreciably rounded seminiferous tubules from each group of the animals.

Results

Light microscopic observation of the testicular sections revealed that spermatogenesis was conserved in the pinealectomized rats of the different age groups studied. Figures 1 and 2, corresponding to an animal sacrificed at one month following pinealectomy, show spermatogonia, spermatocytes and spermatids in different maturation phases, as well as spermatozooids. Sertoli cells and interstitial tissue are also seen. Electron microscopic study revealed the absence of ultrastructural changes in the testicles of these animals. Figure 4 shows that both the Sertoli cells and spermatocytes and spermatids have a normal aspect. The peritubular connective tissue is also normal and is not collagenized.

In the animals sacrificed at three months after pinealectomy spermatogenesis was also found to be conserved. Figure 5, corresponding to one of these animals, shows the intermediate parts of mature spermatids.

Regardless of the time elapsed since pinealectomy, both dark (fig. 3) and light (fig. 6) Leydig cells were found in the interstitial spaces; there was no predominance of one kind over the other with respect to pinealectomy. Only in the rats sacrificed at three months after pinealectomy did there seem to be a discrete hyperplasia of the interstitial islets. The light Leydig cells (fig 6) displayed large numbers of dense lysosomal-like inclusions together with the accumulations of smooth endoplasmic reticulum normally found in steroid-secreting cells. The mitochondria displayed a clear matrix (fig 6). In the dark cells it was possible to observe well developed Golgi bodies and very dense mitochondria (fig 3). In all these cells, the rough endoplasmic reticulum was scanty and organized in short, flat and folded cisternae (figs 3 and 6).

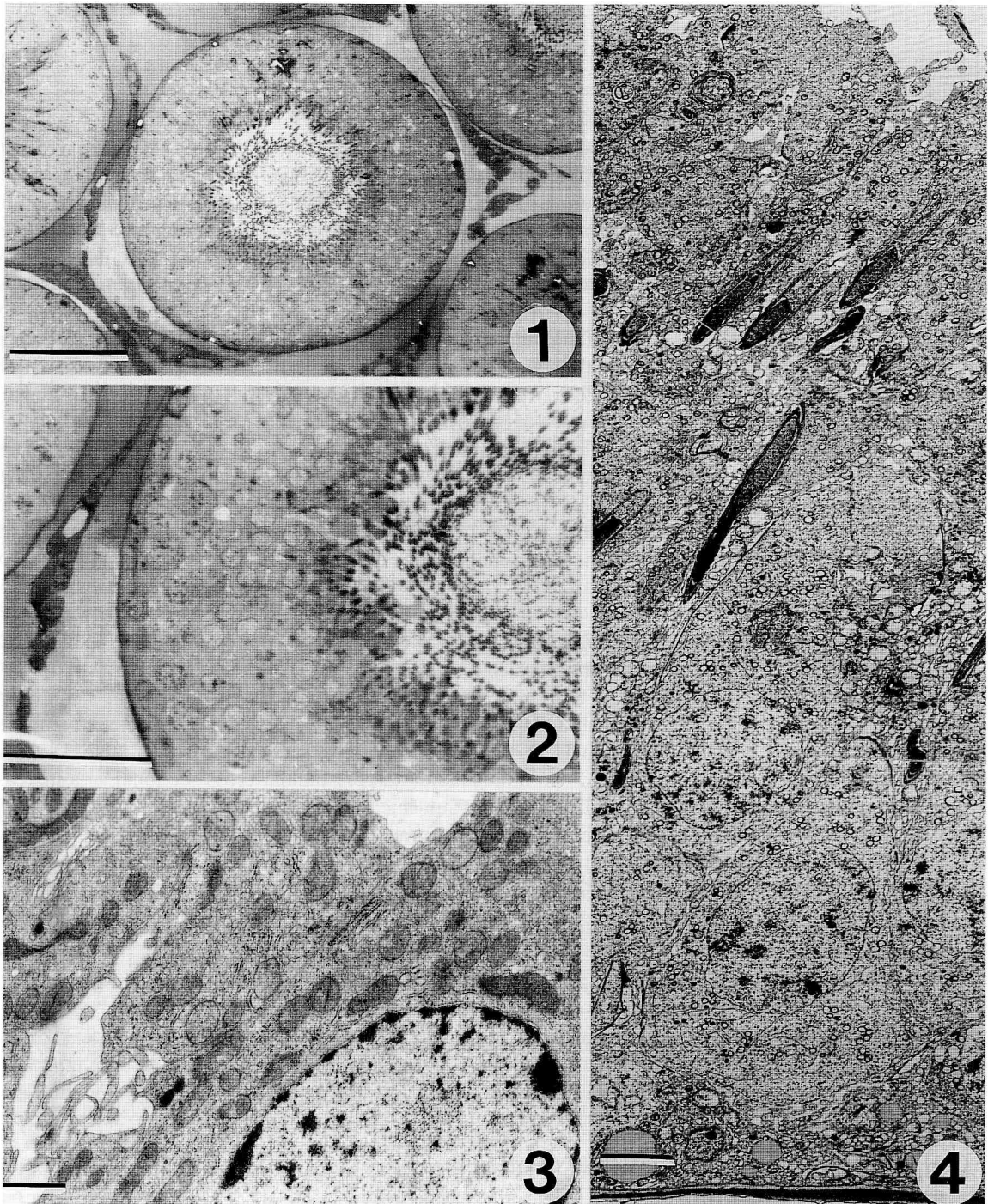
In sum, with the exception of a discrete hyperplasia of the interstitial tissue observed in the rats sacrificed at three months after pinealectomy, no differences in testicular ultrastructure were observed between the pinealectomized animals and the intact or sham pinealectomized rats.

The morphometric study revealed that up to four months of life the cross-sectional area of the seminiferous tubules increases as the age of the intact animals and those subjected to sham pinealectomy advances, there being no significant differences between the animals of these groups of the same age (fig. 7, table 1). In the pinealectomized animals sacrificed at one and two months after surgery tubular cross-sectional area increases significantly as compared with the intact animals and the rats subjected to sham pinealectomy of the same age (fig. 7, table 1). In the animals sacrificed at three months after pinealectomy, tubular cross-sectional area was significantly smaller than that of the intact rats and the controls of the same age, and was also smaller than that of the younger pinealectomized animals (fig. 7, table 1).

TABLE 1. Cross-sectional area of seminiferous tubules

Age of sacrifice	IR	SPx	Px
1+1	40477±5837	40568±7420	45520±8309 (.)
1+2	42205±6385	42446±4943	47063±8627 (.)
1+3	46843±5932	47629±9363	41904±7322 (.)

All the values of the cross-sectional area of the seminiferous tubules are expressed in μm^2 by the arithmetic mean \pm standard deviation ($n=500$ in each group). There are no significant differences between the intact rats and those subjected to sham pinealectomy of the same age. (.)= $p<0,001$, pinealectomized animals compared with intact animals and rats subjected to sham pinealectomy of the same age. IR=intact rats. SPx=Sham pinealectomized_rats, Px=Pinealectomized rats



- FIGURE 1.** Testicle of a rat pinealectomized at the age of one month and sacrificed one month later (Px 1+1). Semithin section stained with toluidine blue. Bar = 100 μ m.
- FIGURE 2.** High magnification of figure 1. Bar = 50 μ m.
- FIGURE 3.** Electron micrograph of the testicle of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed one month later (Px 1+1). Note a dark Leydig cell. Bar = 1 μ m.
- FIGURE 4.** Electron micrograph of the testicle of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed one month later (Px 1+1). It is possible to observe the whole thickness of the wall of a seminiferous tubule with germinal cells in different maturation phases. Bar = 5 μ m.

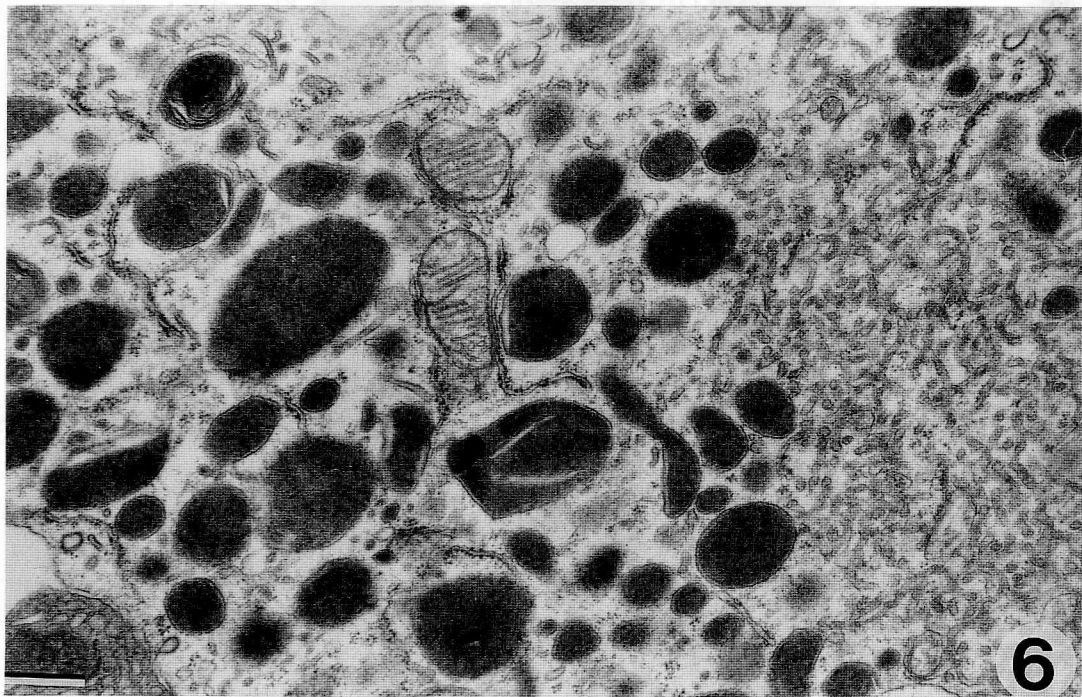
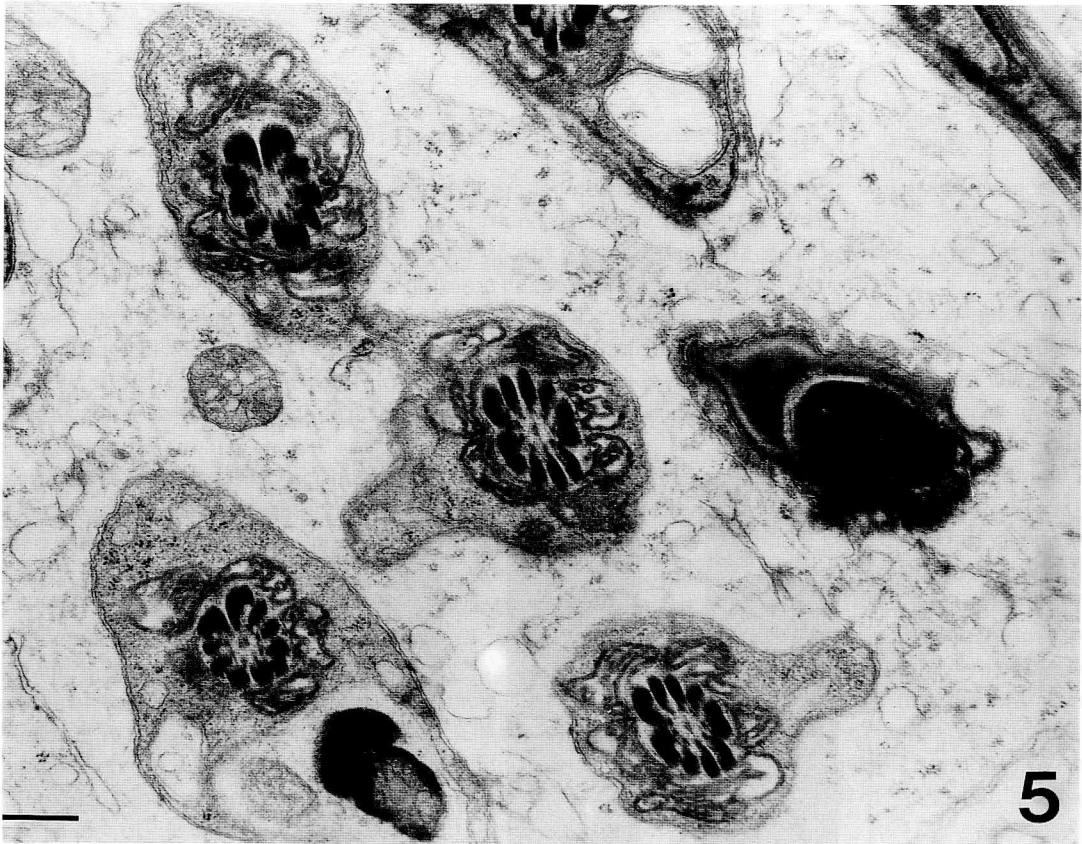


FIGURE 5. Electron micrograph of the testicle of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed three months later (Px 1+3). Note intermediate parts of mature spermatids surrounded by the cytoplasm of a Sertoli cell. Ba r= 500 nm.

FIGURE 6. Electron micrograph of the testicle of a rat pinealectomized at one month of age and sacrificed three months later (Px 1+3). Note fragment of a light Leydig cell. Ba r= 500 nm.

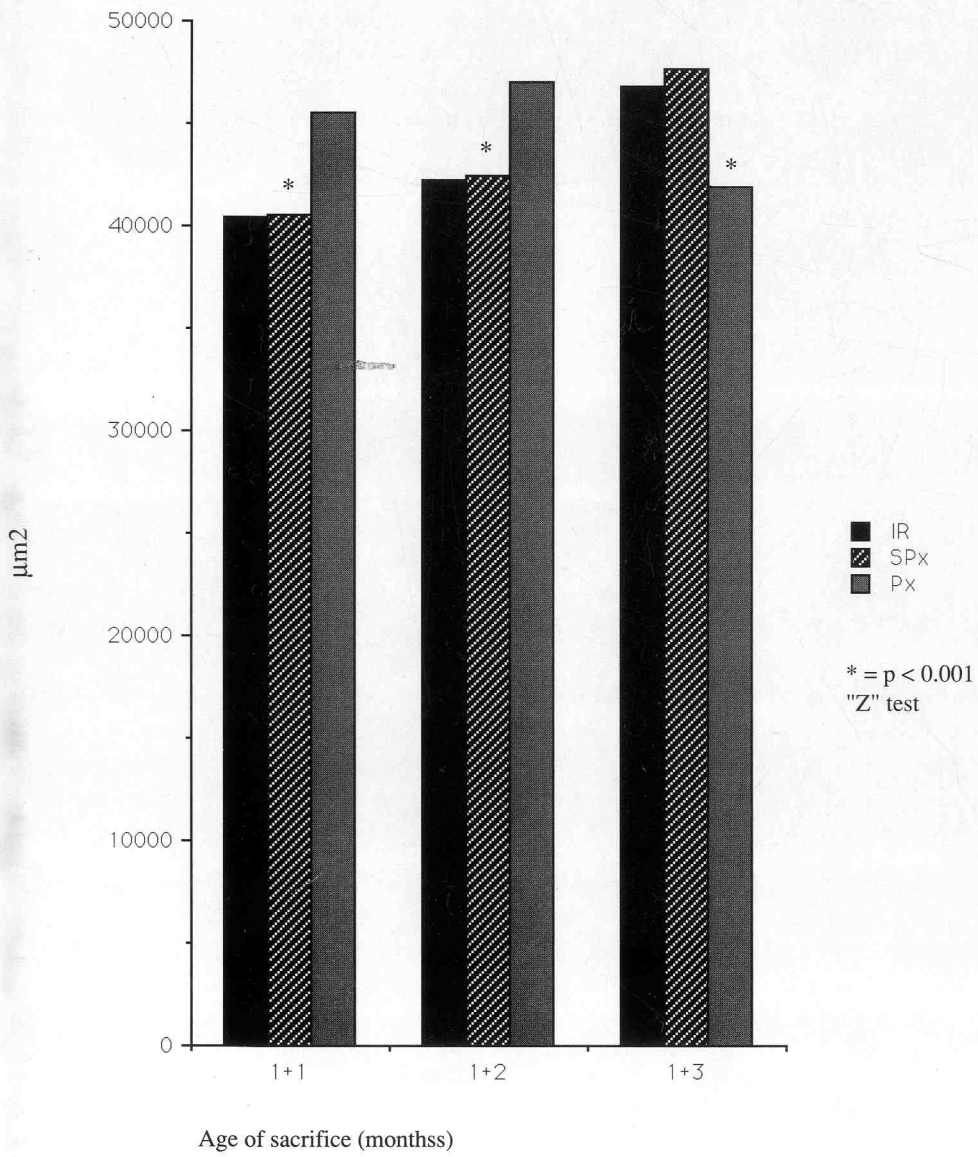


FIGURE 7. Cross-sectional area of seminiferous tubules.

Discussion

Although some authors have proposed that in the albino rat the pineal gland has a limited influence on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis controlling reproduction (Reiter, 1980; Cardinali, 1985; Tamarkin *et al.*, 1985), in pinealectomized rats we observed the existence of striking modifications of the neurons of the medial preoptic area (Toranzo *et al.*, 1988) and of the gonadotropic adenohypophyseal cells (Blázquez *et al.*, 1992). The results of the present work also point to alterations in the cross-sectional area of the seminiferous tubules in pinealectomized rats.

Our histological and ultrastructural observations indicate that in the testicles of pinealectomized rats there are no lesions or alterations of the seminiferous tubules, of the tunica propria or of the interstitium. Neither do the Leydig cells show any striking modifications since the light and dark types appear in similar proportions in the different groups of animals. The only interesting finding was a discrete hyperplasia of the interstitial cells in the rats sacrificed at three months after pinealectomy. However, measurement of the tubular cross-sectional area of the different groups of pinealectomized rats in our study reveals the existence of important modifications as compared with the intact animals and those subjected to sham pinealectomy of the same age. Thus, at one and two months after pinealectomy, the tubular cross-sectional area was highly increased, whereas at three months after surgery it was decreased. These findings are similar to the observations reported by Losada and Sarrat (1976). We are in agreement with these authors concerning their suggestions to account for such results. According to them, a preliminary phase of testicular hypertrophy after pinealectomy is followed by another characterized by exhaustion of the testicle and destruction of the seminiferous tubules. This suggests that the initial gonadal hyperfunction is transient and that the testicle, lacking the regulation of the sexual sphere exerted by the pineal gland, would become exhausted due to overstimulation by adenohypophyseal gonadotropic hormones. We believe that this explanation is reasonable, although in our series of animals no destruction of the testicular tissue was observed in any of the animals.

However, although the influence of the pineal gland on the rat testicle seems to have been demonstrated, controversy remains concerning at what specific level(s) of the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis pineal products -specifically melatonin- would act. It has been proposed that the existence of melatonin receptors in the median eminence could be related to the effects of this hormone on reproductive function (López-González *et al.*, 1991). On the other hand, it has also been suggested that such effects could be mediated by the effect of the pineal gland on serotonin metabolism, mainly in the anterior and medial hypothalamic areas (Míguez, *et al.*, 1991). Additionally, a direct action of melatonin on the adenohypophysis now appears to have been demonstrated (Vanecek, 1991) and neither is it possible to rule out a direct action of this hormone on the testicle (Olivares *et al.*, 1989; Persengiev and Kehajova, 1991). All these data suggest that further work should be carried out to elucidate these aspects.

Acknowledgements

The authors wish to thank V. Alonso, S. García, M. Manteca and O. Martín for their technical assistance. This work was supported by a grant from the Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid (Grant number 288/84).

REFERENCES

- BENSON, B. (1989): Bovine pineal tripeptide Threonylseryllysine retards puberty in female rats. *J. Pineal Res.*, **6**: 351-357.
BLÁZQUEZ, J.L., TORANZO, D.; PASTOR, F.E.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A. and AMAT, P. (1992): Ultrastructural study of the gonadotroph cells of pinealectomized rats. *An. Anat.* (in press).

- BROWN, G.M.; TSUI, H.W.; NILES, L.P. and GROTA, L.J. (1981): Gonadal effects of the pineal gland. In: Pineal function. (Matthews y Seamark, eds.), pp. 235-252. Elsevier, Amsterdam.
- CARDINALI, D. P. (1981): Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr. Rev.*, **2**: 237-250.
- CARDINALI, D.P. (1985): Glándula pineal. In: Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos. (Schiaffini, Martini, Motta, Oriol Bosch and Tresguerres, eds.), pp. 309-330. Salvat, Barcelona.
- HEUBNER, O. (1898): Tumor der glandula pinealis. *Deutsch. Med. Wochenschr.*, **24**: 214.
- KITAY, J.L. (1954): Pineal lesions and precocious puberty: a review. *Clin. Endocr.*, **14**: 622-625.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, M.A.; CALVO, J.R.; RUBIO, A.; GOBERNA, R. and GUERRERO, J.M. (1991): Characterization of melatonin binding sites in the harderian gland and median eminence of the rat. *Life Sci.*, **48**: 1.165-1.171.
- LOSADA, L. and SARRAT, R. (1976): Pinealectomía y gónada masculina. *An. Anat.*, **25** (núm. ext.): 225-228.
- MÍGUEZ, J., MARTÍN, F.; MIGUEZ, I. and ALDEGUNDE, M. (1991): Long-term pinealectomy alters hypothalamic serotonin metabolism in the rat. *J. Pineal Res.*, **11**: 75-79.
- OLIVARES, A.N., VALLADARES, L.E.; BUSTOS-OBREGÓN, E. and NÚÑEZ, S.M. (1989): Testicular function of sexually immature rats chronically treated with melatonin. *Arch. Biol. Med. Exp.*, **22**: 387-393.
- ORTS, R.J., LIAO, T.H.; SARTIN, J.L. and BRUOT, B.C. (1980): Isolation, purification and aminoacid sequence of a tripeptide from bovine pineal tissue displaying antigonadotrophic properties. *Biochem. Biophys. Acta.*, **628**: 201-208.
- PERSENGIEV, S. and KEHAJOVA, J. (1991): Inhibitory action of melatonin and structurally related compounds on testosterone production by mouse Leydig cells *in vitro*. *Cell Biochem. Funct.*, **9**: 281-286.
- REITER, R.J. (1980): The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.*, **1**: 109-131.
- REITER, R.J. (1984): Pineal indoles: production, secretion and actions. In: Neuroendocrine perspectives. Vol. 3. (Muller and MacLeod, eds.), pp. 345-377. Elsevier, Amsterdam.
- REITER, R.J. (1991): Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.*, **12**: 151-180.
- ROLLAG, M.D. (1982): Ability of tryptophan derivatives to mimic melatonin's action upon the hamster reproductive system. *Life Sci.*, **31**: 2.699-2.707.
- TAMARKIN, L., BAIRD, C.J. and ALMEIDA, O.F.X. (1985): Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*, **227**: 714-720.
- TORANZO, D., PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; ÁLVAREZ-MORUJO, A.J. and AMAT, P. (1988): Estudio ultraestructural del área preóptica medial en ratas normales y pinealectomizadas. *Histología médica*, **4**: 99-110.
- VANECEK, J. (1991): Mechanism of melatonin action. *Physiol. Res.*, **40**: 11-23.
- WURTMAN, R. and AXELROD, J. (1965): The formation, metabolism, and physiology effects of melatonin in mammals. *Prog. Brain Res.*, **10**: 520.

Correspondence:

Prof. P. Amat Muñoz
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca
Avda. Campo Charro, s/n
37007 Salamanca. Spain

RASTRO DEGENERATIVO FIBRILAR TRAS LA DIATERMOCOAGULACIÓN DE LA ENCRUCIJADA ESTRIODIAGONAL IZQUIERDA

CHANGES DEGENERATIVE FOLLOWING LESIONS OF THE ENTOPEDUNCULARIS NUCLEUS

A. VICTORIA, S. TORREGROSA y M. MONTESINOS

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina.
Universidad de Valencia

RESUMEN

La diatermocoagulación de la encrucijada estriodiagonal izquierda nos permite observar mediante las técnicas de Fink y Hemir, fibras degeneradas en ínsula, núcleo prepiriforme, cinta diagonal de broca, septum y asa lenticular, lámina reticular talámica, núcleo amigdalino, córtex cerebral, fascículo talámico y lámina affixa del tálamo.

PALABRAS CLAVE: Degeneración. Encrucijada estriodiagonal.

SUMMARY

Changes degenerative: observation in the limen insulae, n. prepiriformis, allocortex diagonal, septum, ansa lenticularis, s. reticularis thalamus, n., amigdalinus, neocortex, fasxiculus thalamici and l. affixa thalamus behind the entopeduncularis nucleus lesion from diathermic-coagulation.

KEY WORDS: Degeneration. Entopeduncularis nucleus.

Introducción

Trabajo experimental consistente en la implantación a cronicidad de un electrodo en la encrucijada estriodiagonal izquierda, con el fin de seguir el rastro degenerativo fibrilar producido tras la diatermocoagulación de esta encrucijada.

Material y Métodos

La experiencia la realizamos en 15 gatos domésticos (de 2,5 a 4,2 Kg). Tras anestesiarlos con Nembutal i.p. (30-49 mg/K) y situarlos en un marco estereotáctico, procedemos a incidir piel, musculatura temporal, fascia y

periostio, y una vez en el plano óseo marcamos el punto de implantación del electrodo, concretamente a una unidad relativa desplazada al lado izquierdo de la octava división retronasiana, a 23 mm de profundidad. El electrodo implantado es de plata virgen clorurada, mide 23 mm de longitud y 0,3 mm de diámetro y está aislado totalmente, salvo un milímetro en su extremo profundo o interior.

Al cabo de 30 días de la intervención quirúrgica, procedemos a la diatermocoagulación de esta zona, previa anestesia del animal. Utilizamos un aparato de electrocauterio, tipo Poluxgin, alimentado por una corriente de 150 V y mA de intensidad. La esférula se consigue al conectar el aparato graduado al nº 5 durante cuatro segundos.

A los once días de la diatermocoagulación, sacrificamos al animal, perfundiéndole un litro de suero fisiológico y posteriormente formol al 10%. Tras disecar el cráneo, introduciremos la masa encefálica en formol al 10% durante cuatro a seis semanas. Posteriormente, lo teñiremos con la técnica de Fink y Heimer.

Resultados

Hemos observado fibras degeneradas en las ínsulas de Calleja, núcleo prepiriforme, cinta diagonal de Broca, septum (figura 2), lámina affixa del tálamo (figura 5, asa lenticular), fascículo talámico (figura 1) lámina reticular talámica (figura 4), núcleo amigdalino y corteza cerebral del hemisferio izquierdo (figura 3).

BIBLIOGRAFÍA

1. ADINOLFI, A.M. (1969): Degenerative changes in the Entopeduncular Nucleus following lesions of the Caudate Nucleus. An electron microscopic study. *Experim. Neurol.*, **25**: 246-254.
2. CHUMAN, C. and NEAFSEY, E. (1983): Propagation of focal cortical epileptiform discharge to the Entopeduncular Nucleus: Effect of Caudate lesions. *Experim. Neurol.*, **79**: 152-159.
3. DRUGA, R. (1984): Reciprocal connections between the Claustrum and the Gyrus Sigmoides posterior in the cat. An experimental study using the antegrade degeneration methods and the HRP retrograde axonal transport. *Anat. Anz.*, **109**: 18.
4. ESCOLAR, J., SMITH-ÁGREDA, V., AMAT, P., SMITH-AGREDA, J.M., SARRAT, R., RODRÍGUEZ, S. (1973): Anatomía humana (funcional y aplicada) Vol. III 3ª ed. Barcelona. Ed. Espax, pp. 213-217.
5. FINK, R.P. y HEIMER (1967): Two methods for selective impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. *Brain Res.*, **4**: 369.
6. GLESS, P. (1946): Terminal degeneration with in the central nervous system as studied by a new silver method. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **5**: 54.
7. POWELL, E.W. (1963): Septal afferents revealed by axonal degeneration in the rat. *Exp. Neurol.*, **8**: 406-422.
8. STEWARD, O. (1976): Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **167**: 285-314.
9. SWANSON, L.W. and COWAN, N.N. (1979): The connections of the septal region in the rat. *J. comp. Neurol.*, **186**: 621-656.

Correspondencia: Dra. Adelina Victoria Fuster
c/ San Agustín, 2º-A
4611 Rocafort (Valencia). España

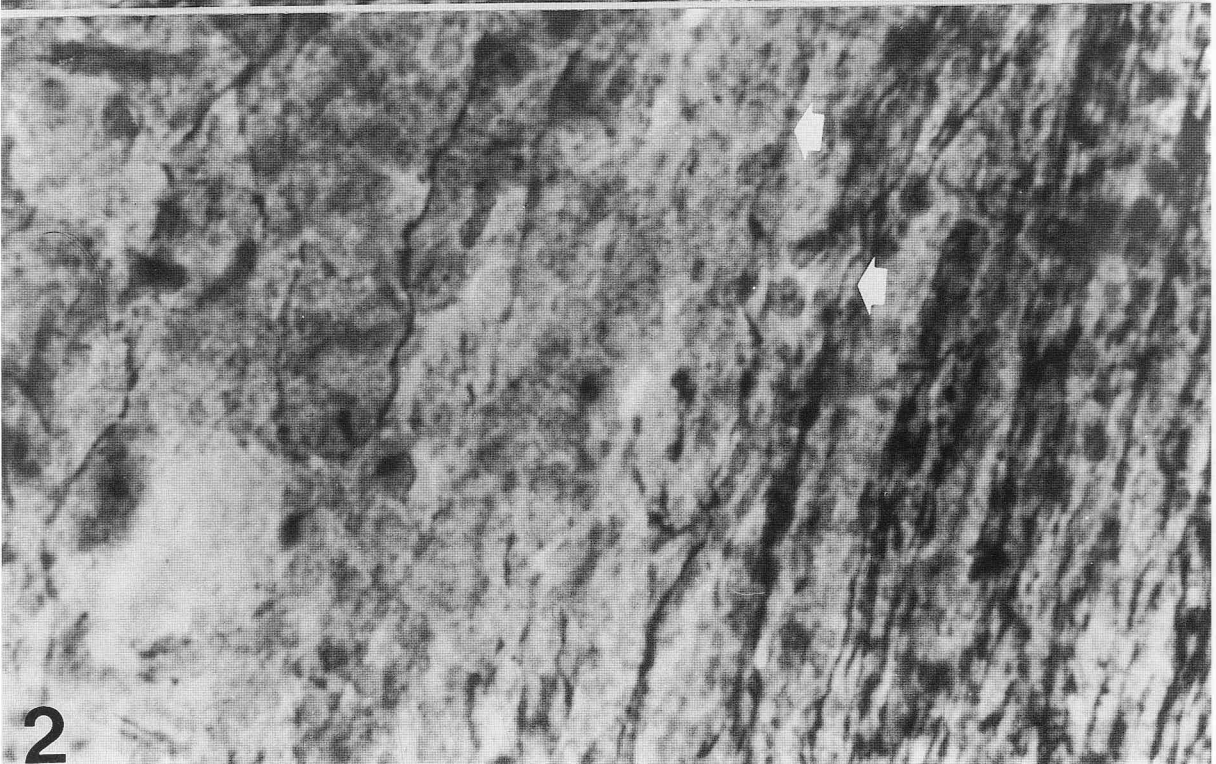
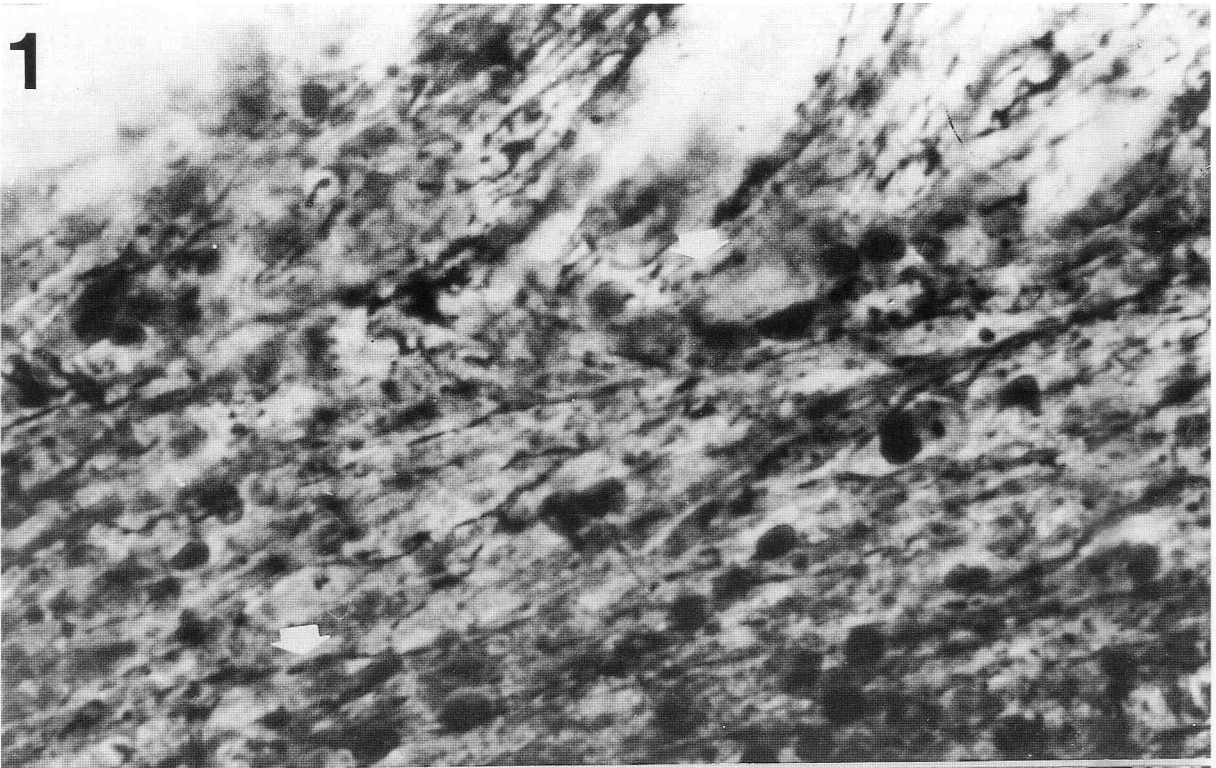


FIGURA 1. Degeneración en fascículo talámico.
FIGURA 2. Degeneración en septum.

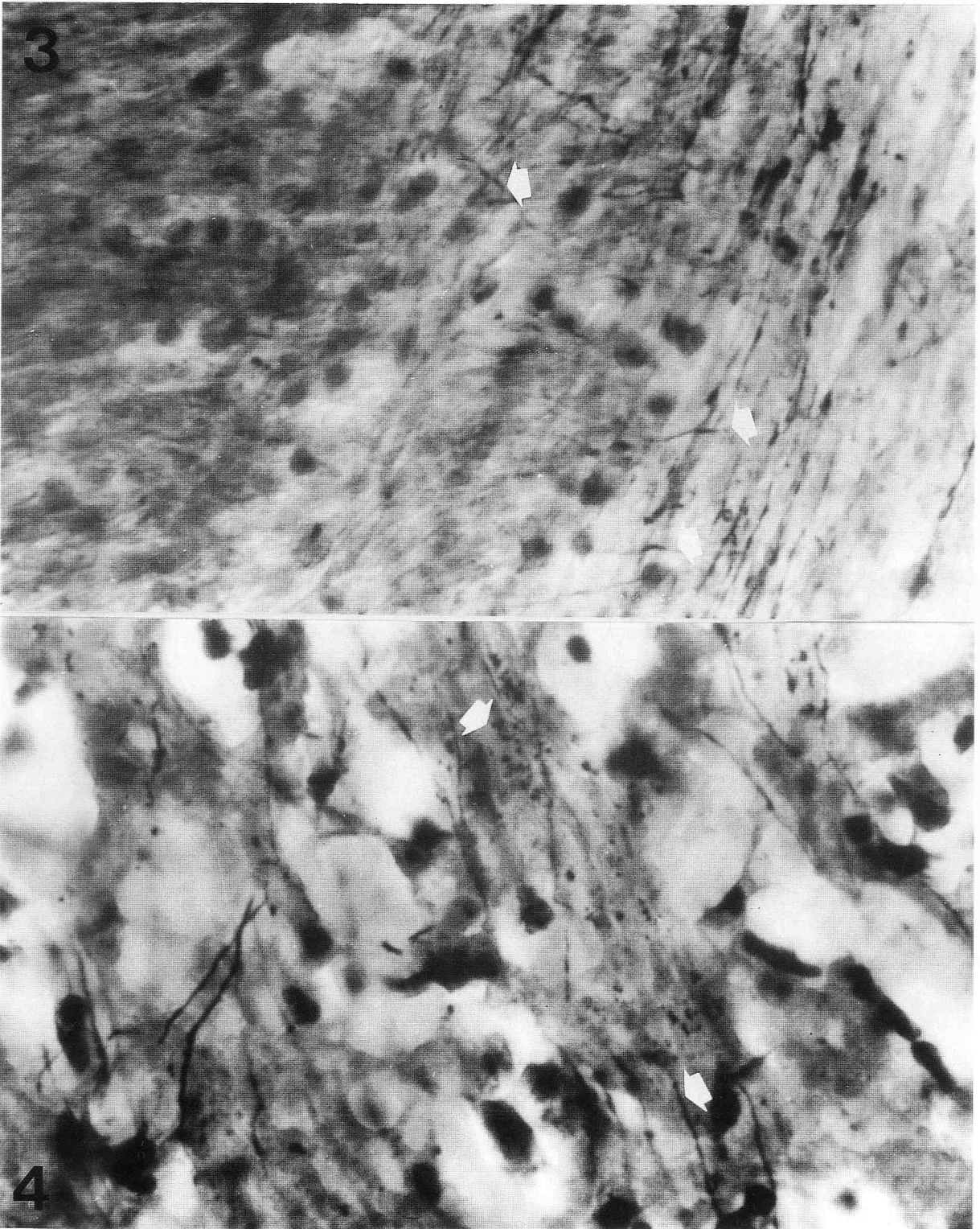


FIGURA 3. Corteza del hemisferio izquierdo.

FIGURA 4. Degeneración en lámina reticular talámica.

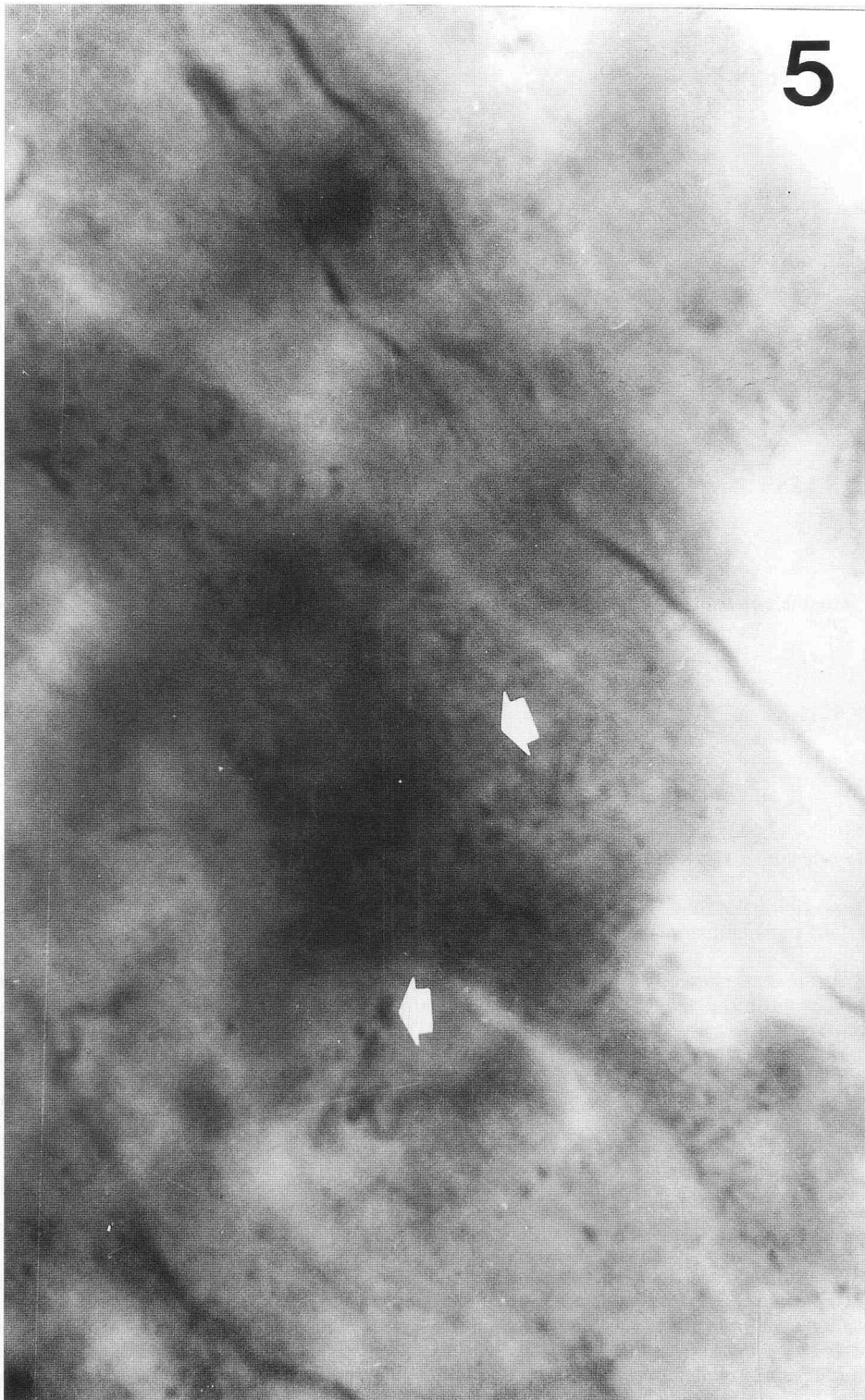


FIGURA 5. Degeneración en lámina affixa del tálamo.

MORFOLOGÍA DE LA ARTERIA RENAL A LOS 360 DÍAS DE LA ANASTOMOSIS VASCULAR POR INTUSUSCEPCIÓN

MORPHOLOGY OF THE RENAL ARTERIE AFTER 360 DAYS OF THE VASCULAR ANASTOMOSIS BY INTUSSUSCEPTION

J. WHYTE, J. RODRÍGUEZ, F. LOSTALÉ, A. WHYTE, M. BESCÓS, S. PELLEJERO,
J.R. PÉREZ, A. TORRES y R. SARRAT

Departamento de Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza
Unidad de Cirugía. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

RESUMEN

Se ha estudiado la morfología de la arteria renal a los 360 días de la realización de microanastomosis vascular mediante intusucepción.

El material lo componen 6 ratas Wistar, machos, de pesos corporales comprendidos entre 250 y 300 gramos. Como medio de magnificación un microscopio quirúrgico Kapp y como material de sutura nylon monofilamento 10/0. Para el estudio histológico hemos empleado la técnica de la orceína.

En la zona donde se realizó la anastomosis la unión entre los segmentos aferente y eferente es completa. El vaso aferente no muestra cambios estructurales. En el vaso eferente hay una desaparición del endotelio, una disminución de la muscular que es sustituido por tejido conjuntivocicatricial.

Los segmentos pre y postanastomótico conservaba la características típicas de la arteria renal

PALABRAS CLAVE: Estructura. Arteria renal. Microanastomosis. Rata.

SUMMARY

The morphology of the renal artery was studied 360 days after the practicee of microanastomosis through intususception.

The material consist of 6 male Whistar rats between 250 and 300 grams in weight; a surgical microscope Kapp used for magnifying and 10/0 monofilament nylon for suture. The technique of Orcein was applied for the histological study.

The union between the afferent and efferent segments is complete where the anastomosis was practised. The afferent vessel does not show structural changes. However, there is a disappearance of the endothelium in the efferent vessel as well as a decrease in the muscular layer which is substituted by connective cicatricial tissue.

The pre- and postanastomotic segments kept those characteristics typical of the renal artery.

KEY WORDS: Structure. Renal arterie. Microanastomosis. Rat.

Introducción

La investigación en el trasplante de órganos exige la puesta a punto de técnicas de anastomosis vascular de sencilla realización, y que cursen con un mínimo porcentaje de complicaciones (1).

Clásicamente las anastomosis en pequeños vasos se han realizado siguiendo técnicas de sutura manual continua o discontinua (2). No obstante y con el fin de simplificar estas técnicas se han descrito métodos de anastomosis vascular empleándose grapas (3), adhesivos (4), anillos (5), prótesis extravasculares (6) y el telescopaje vascular ideado por Lauritzen (7).

Nosotros venimos trabajando en la realización de anastomosis por intususcepción en diversos vasos arteriales: Arteria femoral (8) y arteria renal (9). Así vimos como a los 15 días del postoperatorio la existencia de dos segmentos vasculares aislados, unidos únicamente por escaso tejido conjuntivo. A los 30 días el espacio existente entre los dos segmentos vasculares, aferente y eferente, iba cerrándose debido al crecimiento de tabiques conjuntivos que a modo de puentes, parten desde la adventicia del vaso aferente y se dirigen a buscar la membrana limitante interna del vaso eferente. La unión era completa a los 90 días de la realización de la intususcepción vascular

Material y Métodos

Se han empleado 6 ratas Wistar, machos, de pesos corporales comprendidos entre 250 y 300 g. Como medio de magnificación un microscopio quirúrgico Kapp y como material de sutura nylon monofilamento 10/0.

En estos animales se realizó autotransplante de riñón (10) siendo el riñón derecho anastomosado a los vasos renales izquierdos.

La anastomosis arterial se llevo a cabo mediante intususcepción de la arteria renal izquierda dentro de la derecha. Se anuda un punto sencillo en la superficie de sección de la arteria izquierda, a continuación se introduce el hilo de sutura por la luz de la arteria renal derecha y tras ser exteriorizado aproximadamente a 3 mm de su origen, se tracciona del hilo, lo que produce la introducción de la arteria renal izquierda en la derecha. La anastomosis queda concluida anudando el hilo sobre un borde de él mismo realizado mediante un pequeño punto en la arteria renal derecha.

La anastomosis venosa se llevó a cabo introduciendo la vena renal derecha dentro de la izquierda, quedando ambas fijadas con dos puntos equidistantes, separados entre sí 180 grados (7).

A los 360 días de la realización de la anastomosis los animales fueron sacrificados.

Las arterias renales, una vez sacrificado el animal, eran fijadas en formol al 10%, incluidas en Paraplas, cortadas seriadas en un microtomo Leitz a 7 micras y teñidas mediante la técnica de orceina para fibras de elastina.

Resultados

La arteria renal de la rata a los 360 días de la intervención en los segmentos pre y post anastomóticos conservaba las características típicas de este vaso, con una perfecta delimitación del su endotelio, una membrana elástica interna compacta. En la túnica media la proporción entre las fibras musculares y el material elástico es bastante equilibrada, constituyendo las láminas elásticas auténticos compartimentos para los paquetes de fibras musculares, y separada de la túnica adventicia por una gruesa membrana limitante externa. La adventicia está muy desarrollada, con predominio de fibras conjuntivas de colágeno (fig. 1).

En la zona donde se realizó la anastomosis, la unión entre los segmentos aferentes y eferentes es completa. El segmento aferente no muestra cambios en su estructura con respecto a los segmentos pre y post anastomóticos; en contraposición el segmento eferente si que presenta, con desaparición del endotelio, su membrana limitante interna

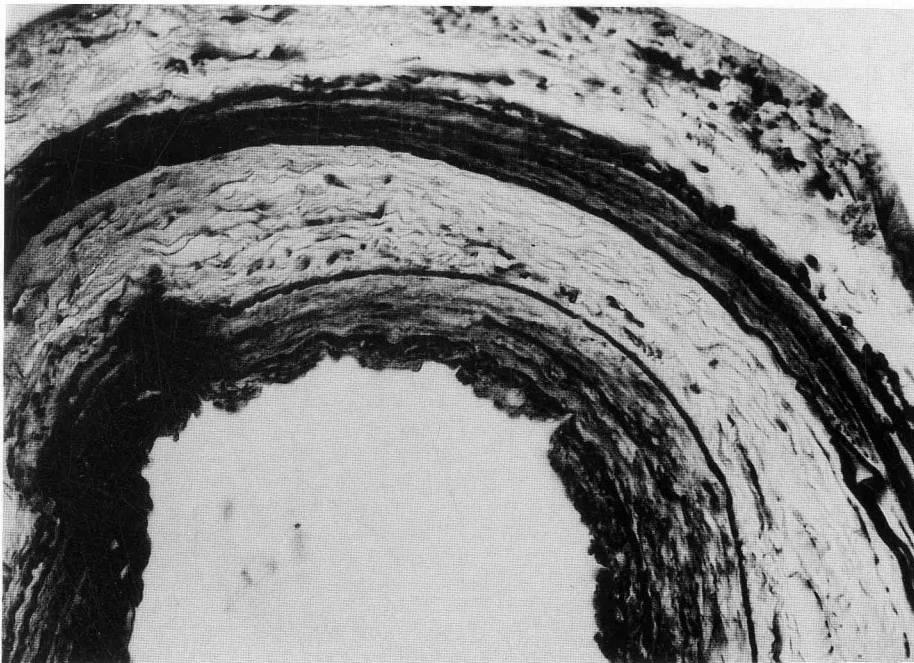
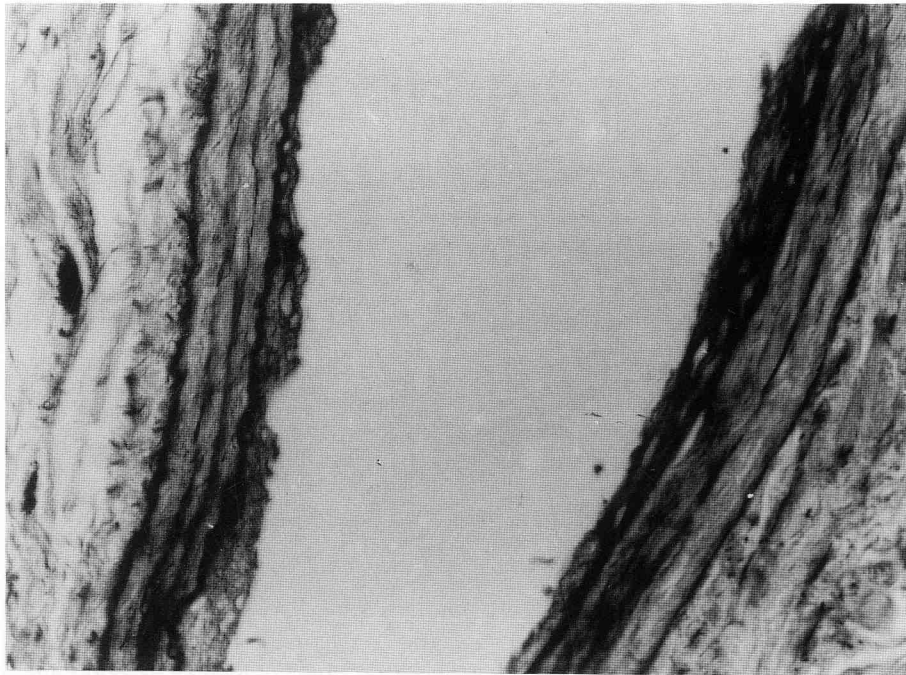


FIGURA 1. Arteria renal, segmento preanastomótico, a los 360 días de la intususcepción. Nótese como se conserva la morfología típica de esta arteria, en la que destaca la distribución del material muscular y elástico de la túnica media. Orceína (20x).

FIGURA 2. Arteria renal, segmento anastomótico, a los 360 días de la intususcepción. Nótese como la unión entre los segmentos aferente y eferente es completa. 2Orceína (20x).

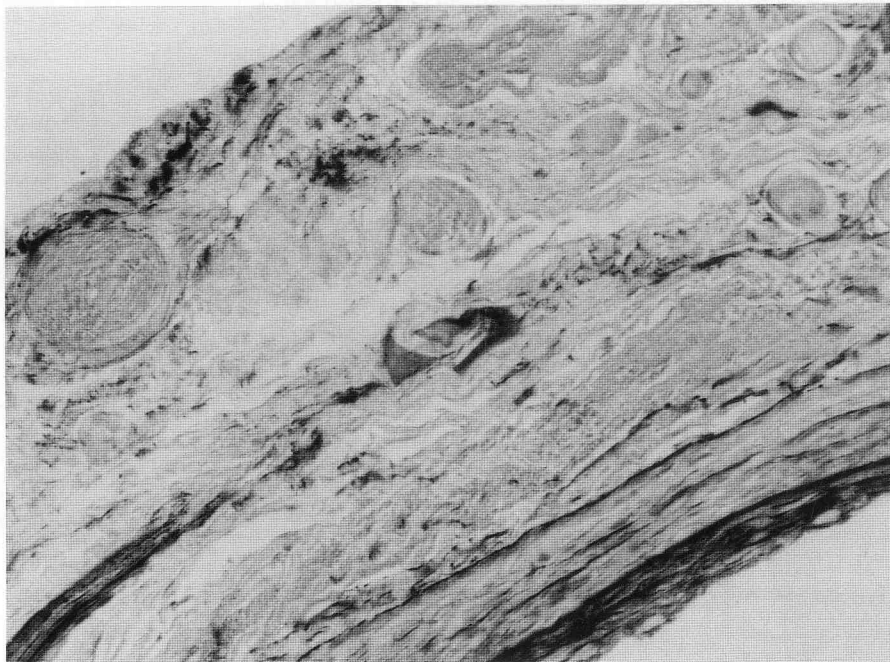
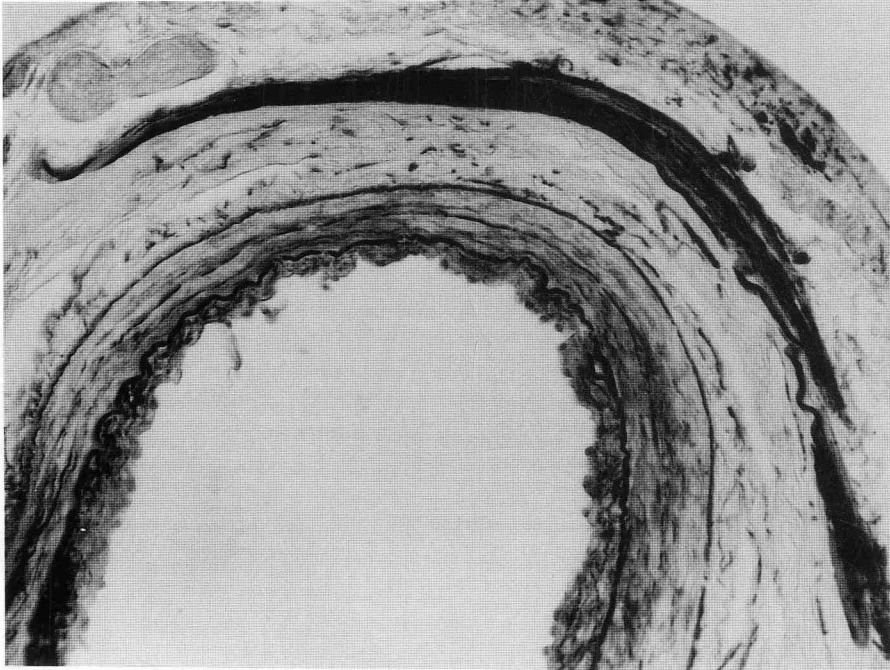


FIGURA 3. Arteria renal, segmento anastomótico, a los 360 días de la intususcepción. Nótese como el segmento eferente a nivel de su capa muscular se está reabsorbiendo. Orceína (20x).

FIGURA 4. Arteria renal, segmento anastomótico, a los 360 días de la intususcepción. Detalle en el que se aprecia el adelgazamiento de la capa muscular y su sustitución en tejido cicatricial. Orceína (40x).

es compacta adoptando con relativa frecuencia un aspecto festoneado, la túnica media esta disminuida de tamaño, siendo menos evidentes los compartimientos musculares. La capa adventicial conserva sus características típicas sin que se observe cambios en la distribución del colágeno (fig. 2).

En las preparaciones seriadas hemos observado como se ha ido produciendo la reabsorción de la capa muscular del vaso eferente y su sustitución por tejido conjuntivo cicatricial. En la parte superior de la imagen observamos a los dos vasos anastomosados, éstos, al principio, conservan su estructuración, mientras que en la parte media la capa muscular se adelgaza y empieza a desaparecer y siendo sustituida por tejido conjuntivo que se mezcla con la adventicia y en la parte inferior la capa muscular ha desaparecido por completo, quedando únicamente la unión de las dos adventicias cuyo resultado es una única adventicia de notable tamaño y en la que no hemos observado cambios estructurales (fig. 3)

En la figura 4 vemos una gran ampliación de la zona donde la capa muscular empieza a desaparecer adelgazando y perdiendo su estructuración siendo sustituida por tejido cicatricial que se dispone alrededor confundándose con la adventicia.

Discusión

Las técnicas de intususcepción vascular empleadas en las anastomosis de pequeñas arterias han demostrado grandes ventajas en microcirugía, por su rapidez de ejecución y reducido porcentaje de complicaciones (7, 8 y 9).

En estudios anteriores se ha podido comprobar, que el tejido de cicatrización, de este tipo de anastomosis, procede de la capa adventicial del vaso interno. Siendo la unión entre ambos vasos completa a los tres meses del postoperatorio (9).

En estadios evolutivos superiores, como se ha podido comprobar en este estudio, la arteria aferente no sufre modificaciones estructurales. No ocurre así en la arteria eferente, en la que se observa la destrucción del endotelio y una disminución notable de su capa muscular, que en ciertas ocasiones llega a desaparecer.

Estas modificaciones se explicarían por un predominio de la nutrición vascular a partir del endotelio del vaso sobre la vía nutricia adventicial. De esta forma se comprende porqué el endotelio del vaso arterial eferente, al no estar en contacto con la sangre se necrosa. Por consiguiente, también se ve alterada la capa muscular, cuyas necesidades metabólicas no pueden ser suplidas por la adventicia que conserva sus características típicas aunque es sustituida progresivamente por un tejido conjuntivo cicatricial, que llega a fundirse con las dos capas adventiciales.

Por tanto parece ser que la hipertrofia que sufre la capa adventicial de la arteria aferente, con el fin de cicatrizar la anastomosis, participa también en la reparación de la necrosis, que experimenta la arteria eferente en la longitud de la intususcepción.

BIBLIOGRAFÍA

1. RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, G.; LORENTE, L.; ARIAS, J.; BRANDAN, D. y DURÁN, J. (1987): Técnicas microquirúrgica de anastomosis vasculares sin sutura en el transplante experimental de órganos. *AVEPA* **7**(1): 12-16.
2. FISCHER, B. y LEE, S. (1965): Microvascular surgical techniques in research, with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery.*, **58** (5): 904-914.
3. MCDONALD, J.C. y KUKUDA, A. (1966): Rabbit renal homograft. I. Technique for grafts to the neck. *Surgery.*, **59** (6): 1.156-1.158.
4. HAFNER, C.D.; FOGARTY, T.J.; y CRANLEY, J.J. (1963): Nonsuture anastomosis of small arteries using a tissue adhesive. *Surg. Gynecol. Obstet.* April 417-419.
5. NAKAYAMA, K.; TAMIYA, T.; YAMAMOTO, K. y AKIMOTA, S. (1962): A simple new apparatus for small vessel anastomosis. *Surgery.*, **52** (6): 918-931.

6. JIMÉNEZ, G.; RODRÍGUEZ, J.; LORENTE, L.; de PEDRO, J.A.; ARIAS, J. y BRANDAN, D. (1988): Técnicas microquirúrgicas de trasplante ortotópico renal en la rata». *Rev. Quir. Esp.*, **15 (3)**: 148-152.
7. LAURITZEN, C. (1978): A new and easier way to anastomose microvessels». *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, **12**: 291-294.
8. RODRÍGUEZ, J.; ARIAS, J.; WHYTE, J.; LORENTE, L.; WHYTE, A. Y LEUZA, A. (1991): Arterial microanastomosis technique by using only one stitch. *Int. Surg.* **76 (2)**: 112-114.
9. LOSTALÉ, F.; RODRÍGUEZ, J.; WHYTE, J. y colaboradores. (1992): Evolución y modificaciones de anastomosis vasculares realizadas por intususcepción. *An. Anat.* **38**, 87-91.
10. VALDIVIA, J.G.; LOPEZ, J.A.; TABERNER, J. y ROMERO, F. (1983): «Transposición renal ortotópica contralateral en la rata. *Arch. Esp. Urol.* **36**: 9-15.

Correspondencia: Dr. J. Whyte Orozco
Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza
Domingo Miral s/n. Teléfono 551242
50009 Zaragoza. España

Index

ARENA, J.; BENAVENT, F.; MONTESINOS, M.; BALLESTEROS, J.R.; VICTORIA, A.; SMITH-FERRES, V.; GÓMEZ-FERRER, F.; SMITH, V.: The murine esophagus arterial circulation. Mould of unsaturated polyester resin	145
BLÁZQUEZ, J.L.; MOSQUEIRA, M.I.; PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, E.; MUÑOZ, L.: Sobre el posible papel de las gotas lipídicas en la síntesis y secreción de melatonina por los pinealocitos de rata	155
BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, G.; AMAT, P.: Intracellular inclusions in hypothalamic neurons of the rat	163
CARRETERO, J.; GONZÁLEZ, R.; RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A.; VÁZQUEZ, R.: Rostrocaudal variations in the topographic distribution of somatostatin in the median eminence of the male rat	175
CARRETERO, J.; RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; CABO, J.J.; RIESCO, J.M.; ANGOSO, M.; VÁZQUEZ, R.: Immunocytochemical and morphometric study of the PRL-cell following chronic administration of TRH and methimazole	183
DÍAZ, P.; TORRES, A.; WHYTE, J.; CABRERA, J.J.; LOSTALÉ, F.; SARRAT, R.: Ultrastructural study of the intracranial human arteries	191
JUANES, J.A.; CHEN, S.; BENTIVOGLIO, M.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; VÁZQUEZ, R.: Photoconversion of the purkinje cells of the cerebellum following intraventricular (lateral ventricle) administration of propidium iodide	199
MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; ALMENAR, V.; PALOMINO, M.A.: Bilateral accessory renal and ectopic spermatic arteries	207
NIETO, J.L.; GARCÍA-LÓPEZ, E.; TORRES, A.: Histocomparative study of the connective tissue of the mammary gland in several animal species	213
NIETO, J.L.; TAJADA, N.; LATRE, A.: Growth spurt in spanish children. Females (II)	221
RODRÍGUEZ, S.; MORO, J.A.; PASTOR, F.: A scanning and transmission electron-microscopic study of sheep peripolar cells	229
SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G.; AMAT, P.: Adenohypophyseal LH cells of castrated male rat. An immunohistochemical, morphometric and ultrastructural study	237
SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G.; AMAT, P.: Concerning the morphofunctional relationships between gonadotroph and mammotroph cells in the rat adenohypophysis ..	247
RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; ANGOSO, M.; VÁZQUEZ, R.: Changes of the FSH-immunoreactive adenohypophyseal cells following chronic administration of methoclopramide	257
SMITH-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SALINAS, P.; SMITH-FERNÁNDEZ, V.; VILLALOBOS, A.: Neuronal death in the hippocampal region during postnatal development	265
TORANZO, D.; BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, P.: Efectos de la pinealectomía sobre el testículo de rata. Estudio histológico, morfométrico y ultraestructural	271
VICTORIA, A.; TORREGROSA, S.; MONTESINOS, M.: Changes degenerative following lesions of the entopeduncularis nucleus	279
WHYTE, J.; RODRÍGUEZ, J.; LOSTALÉ, F.; WHYTE, A.; BESCÓS, M.; PELLEJERO, S.; PÉREZ, J.R.; TORRES, A.; SARRAT, R.: Morphology of the renal artery after 360 days of the vascular anastomosis by intussusception	285



Índice

ARENA, J.; BENAVENT, F.; MONTESINOS, M.; BALLESTEROS, J.R.; VICTORIA, A.; SMITH-FERRES, V.; GÓMEZ-FERRER, F.; SMITH, V.: La vascularización arterial del esófago murino es satélite de la distribución del nervio neumogástrico. Estudio con moldes vasculares de resina	145
BLÁZQUEZ, J.L.; MOSQUEIRA, M.I.; PASTOR, F.E.; PELÁEZ, B.; BLÁZQUEZ, E.; MUÑOZ, L.: On the possible role of lipid droplets in the synthesis and secretion of melatonin by rat pinealocytes	155
BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; PASTOR, F.E.; TORANZO, D.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, G.; AMAT, P.: Inclusiones intranucleares en neuronas del hipotálamo de rata	163
CARRETERO, J.; GONZÁLEZ, R.; RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; RIESCO, J.M.; BLANCO, E.; JUANES, J.A.; VÁZQUEZ, R.: Variaciones rostrocaudales en la distribución topográfica de somatostatina en la eminencia media de la rata macho	175
CARRETERO, J.; RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; CABO, J.J.; RIESCO, J.M.; ANGOSO, M.; VÁZQUEZ, R.: Estudio inmunocitoquímico-morfométrico de la célula de PRL tras la administración crónica de TRH y metimazol	183
DÍAZ, P.; TORRES, A.; WHYTE, J.; CABRERA, J.J.; LOSTALÉ, F.; SARRAT, R.: Estudio ultraestructural de las arterias intracraneales humanas	191
JUANES, J.A.; CHEN, S.; BENTIVOGLIO, M.; RIESCO, J.M.; SÁNCHEZ, F.; VÁZQUEZ, R.: Fotoconversión de las células de Purkinje del cerebelo tras la administración en ventrículo lateral de <i>propidium iodide</i>	199
MARTÍNEZ-ALMAGRO, A.; ALMENAR, V.; PALOMINO, M.A.: Arterias renales accesorias y espermáticas ectópicas bilaterales	207
NIETO, J.L.; GARCÍA-LÓPEZ, E.; TORRES, A.: Estudio histocomparado del tejido conjuntivo de la glándula mamaria en diversas especies animales	213
NIETO, J.L.; TAJADA, N.; LATRE, A.: Aceleración secular del crecimiento. Observación en una población infantil española. Hembras (II)	221
RODRÍGUEZ, S.; MORO, J.A.; PASTOR, J.F.: Estudio, con el microscopio electrónico de barrido y el de transmisión, de las células pelipolares de la oveja	229
SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G.; AMAT, P.: Células LH de la adenohipófisis de la rata macho castrada. Estudio inmunohistoquímico, morfométrico y ultraestructural .	237
SÁNCHEZ, A.; PASTOR, F.E.; BLÁZQUEZ, J.L.; PELÁEZ, B.; AMAT, G.; AMAT, P.: Sobre las relaciones morfofuncionales entre los adenocitos gonadotropos y mamotropos en la adenohipófisis de rata	247
RUBIO, M.; SÁNCHEZ, F.; CARRETERO, J.; ANGOSO, M.; VÁZQUEZ, R.: Modificaciones de las células adenohipofisarias inmunoreactivas a FSH tras la administración crónica de metoclopramida	257
SMITH-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, I.; SALINAS, P.; SMITH-FERNÁNDEZ, V.; VILLALOBOS, A.: Muerte neuronal en la región hipocampal durante el desarrollo postnatal	265
TORANZO, D.; BLÁZQUEZ, J.L.; PASTOR, F.E.; AMAT, G.; PELÁEZ, B.; SÁNCHEZ, A.; AMAT, P.: Effect of pinealectomy on the rat testis. A histological, morphometric and ultrastructural study	271
VICTORIA, A.; TORREGROSA, S.; MONTESINOS, M.: Rastro degenerativo fibrilar tras la diatermocoagulación de la encrucijada estriodiagonal izquierda	279
WHYTE, J.; RODRÍGUEZ, J.; LOSTALÉ, F.; WHYTE, A.; BESCÓS, M.; PELLEJERO, S.; PÉREZ, J.R.; TORRES, A.; SARRAT, R.: Morfología de la arteria renal a los 360 días de la anastomosis vascular por intususcepción	285