

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS DE LA ZONA RETICULAR DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATAS WISTAR MACHO TRATADAS CON ESTRADIOL Y ACETATO DE TRENBOLONA

(Morphological alterations of the reticular zone cells of the adrenal glands of male wistar rats treated with oestradiol an trenbolone acetate)

A. Bernabé*, A. Jover**, A. Fernández** y J. A. Navarro*

* Departamento de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

** Departamento de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

Recibido: 16 abril

RESUMEN

En el presente trabajo hemos estudiado estructural y ultraestructuralmente las modificaciones que se presentan en el parénquima adrenal de ratas tratadas con estradiol y acetato de trenbolona.

Como material de estudio hemos utilizado la corteza adrenal de 35 ratas Wistar macho, distribuidas en dos grupos: uno de 28 animales divididos en siete lotes de cuatro animales cada uno, y otro de 7 animales utilizado como testigo. A cada una de las ratas del primer grupo se le implantó, subcutáneamente detrás de la oreja, una pastilla que contenía 2,5 miligramos de estradiol y 17,5 miligramos de acetato de trenbolona. Ambos grupos se sacrificaron en los días uno, tres, cinco, siete, quince, treinta y sesenta días postimplantación.

Los elementos celulares de la zona reticular de las glándulas adrenales presentan una hipertrofia mitocondrial que en el segundo lote se caracteriza por ser una población desigual en cuanto al tamaño. Entre los lotes tercero al quinto dicha hipertrofia mitocondrial es más manifiesta, con una homogeneidad de su población y en los últimos lotes junto con un aumento del retículo endoplásmico agranular se acentúan los fenómenos de síntesis de esteroides anabolizantes y hormonas sexuales.

Palabras clave: Glándulas adrenales, estradiol, acetato de trenbolona, morfometría.

SUMMARY

Structural and ultrastructural modifications in adrenal parenchyme of rats treated with oestradiol and trenbolone acetate have been studied.

Thirty-five male Wistar rats were used as material of study distributed in two groups: one of 28 animals divided in seven lots of four animals each, and other of seven animals used as witness. In every rat of the first group a tablet containing 2.5 mg of oestradiol and 17.5 mg of trenbolone acetate was implanted subcutaneously behind the ear. Both groups were sacrificed on the first, third, fifth, seventh, fifteenth, thirtieth and sixtieth day postimplantation.

Cellular elements in the reticular zone of the adrenal glands present a mitochondrial hypertrophy characterized in the second lot by a population with size differences. Lots third to fifth show such hypertrophy more evident, with a homogeneity in their population. In the last two lots in addition to an increase in the smooth endoplasmic reticle, anabolizant steroids and sexual hormone synthesis are increased.

Keywords: Adrenal glands, oestradiol, trenbolone acetate, morphometry.

INTRODUCCIÓN

Mediante el implante subcutáneo de sustancias esteroídicas naturales tales como el estradiol y el acetato de trenbolona, clasificadas por FERRANDO (1980) dentro del grupo de anabolizantes, pretendemos establecer en la zona reticular de la corteza adrenal unos patrones histológicos y morfométricos que reflejen la acción de dichos anabolizantes que sirvan de base a posteriores trabajos en animales de abasto y completen los ya iniciados por MOLINA (1982) en corderos.

De este modo seguiremos el proceso evolutivo de las células de la zona reticular en lo que respecta a su estudio morfométrico, estructural y ultraestructural a lo largo de los 60 días que dura la fase experimental, sirviéndonos de referencia entre otros los trabajos de NICKERSON (1980) en monos tratados con dietilestilbestrol y 17α estradiol, los de RHODIN (1971) en ratas inoculadas con ACTH, y los de MOLINA (1982) en corderos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo hemos utilizado como animales de experimentación 35 ratas Wistar macho de 60 días de edad y con un peso aproximado de 200 gramos al comienzo de la experiencia, que se distribuyeron en dos grupos: uno de 28 animales y otro de 7 utilizado como testigo.

A los 28 animales del primer grupo se les implantó subcutáneamente, detrás de la oreja, una pastilla de tipo comercial que contenía 2'5 miligramos de estradiol y 17'5 miligramos de

acetato de trenbolona, mediante una aguja de implantación modelo «Synovex Implanter».

Los animales de experimentación y los testigos se mantuvieron bajo idénticas condiciones ambientales, de alimentación y manejo. El sacrificio se realizó según el cuadro n.º 1.

Estudio estructural

Las muestras de las glándulas adrenales se fijaron en formol y bicromato-formol, incluyéndose en parafina. Los cortes de un grosor de 3 a 5 μm , se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (Hematoxilina de Carazzi). Igualmente, se realizaron cortes semifinos, de 0'5 a 1 μm , de las muestras incluidas en Araldita, que se tiñeron con azul de toluidina.

Estudio ultraestructural

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 5%, según el proceder de SABATTINI y cols. (1963), y se fijaron en tetróxido de osmio al 2% en solución tampón fosfato. Se deshidrataron en una escala ascendente de acetonas, añadiendo a la de 70%, acetato de uranilo al 1% y ácido fosfotúngstico al 0'5%, para conseguir un contraste previo. Posteriormente, las muestras son tratadas con óxido de propileno y Araldita para, finalmente ser incluidas en Araldita (DURCAPAN ACM). De los bloques obtenidos, se realizaron cortes de 40 a 60 nm de espesor que son contrastados con acetato de uranilo en solución saturada y citrato de plomo, según REYNOLDS (1963).

Estudio morfométrico

Los cortes de 40-60 nm de espesor de las muestras de las glándulas adrenales, fueron electronografiadas a 15.500 aumentos, sobre los cuales se realizó el estudio morfométrico. Los datos estadísticos obtenidos en las mitocondrias de las células de la zona reticular fueron: las medias del área, del diámetro y del volumen, la desviación típica, el índice de varianza y el error estándar. Para la comparación estadística entre el grupo experimental y el testigo se ha utilizado el U-Test y el T-Test.

OBSERVACIONES

En las glándulas adrenales de las ratas sacrificadas al día siguiente de la implantación del estradiol y acetato de trenbolona (primer lote),

CUADRO 1
NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS Y
EDAD DE SACRIFICIO

Lotes	N.º de animales experimentación	N.º de animales testigo	Edad	Sacrificio (día p.i.)
1	4	1	61	1
2	4	1	63	3
3	4	1	65	5
4	4	1	67	7
5	4	1	75	15
6	4	1	90	30
7	4	1	120	60

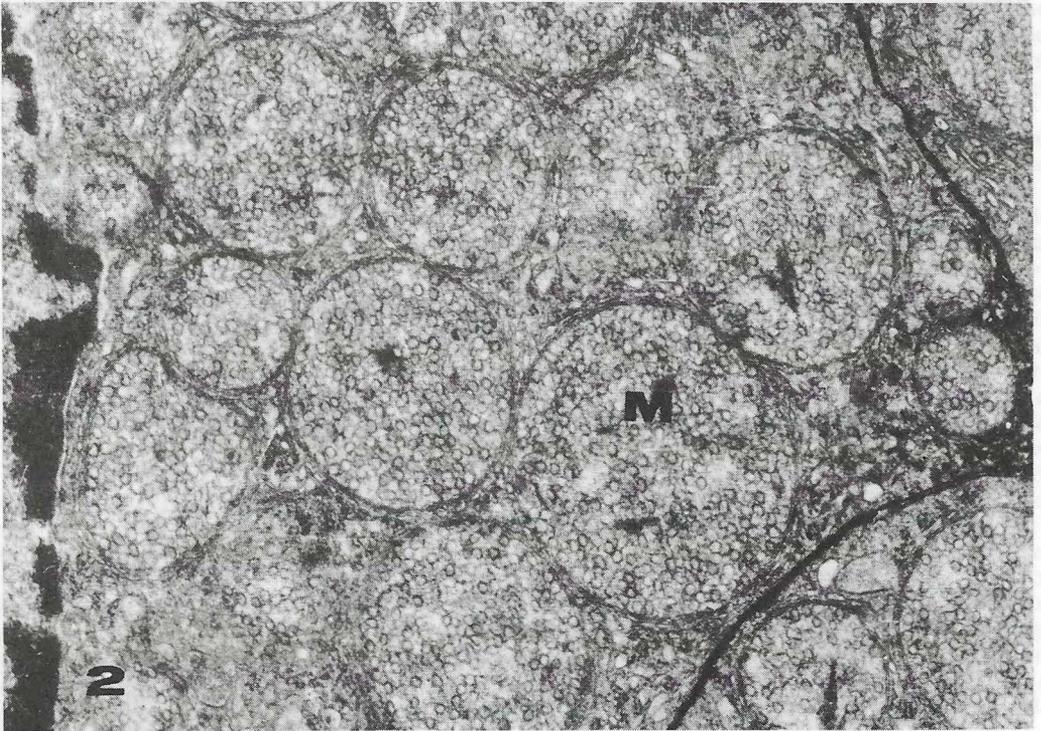
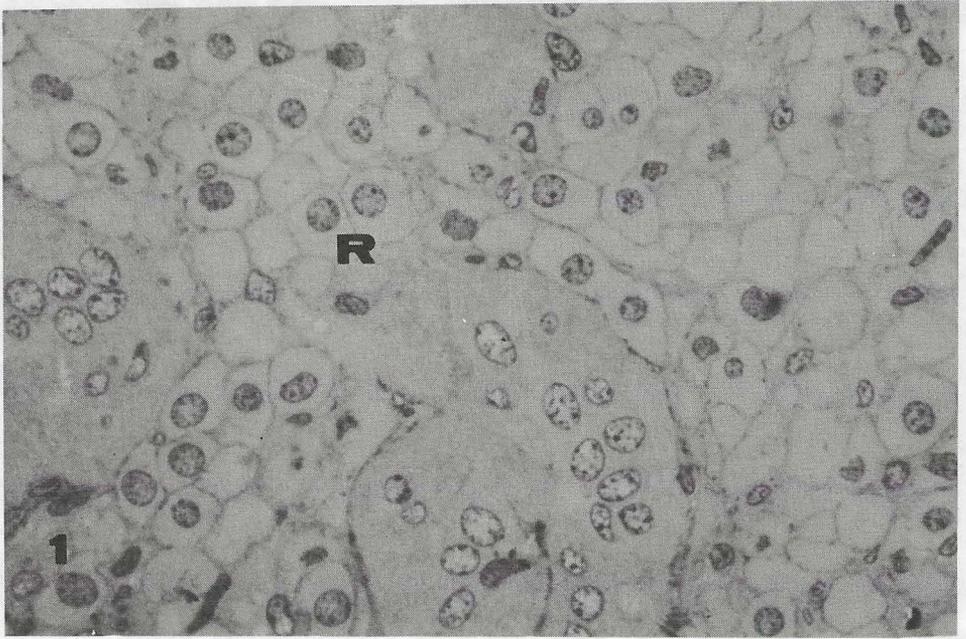


FIGURA 1. Lote primero. Detalle glándula adrenal. Se aprecian las células de la zona reticular (R) de forma nítida y con un aumento en su volumen. Azul de Toluidina. X 420.

FIGURA 2. Lote primero. Detalle célula reticular con abundantes mitocondrias. X 19.500.

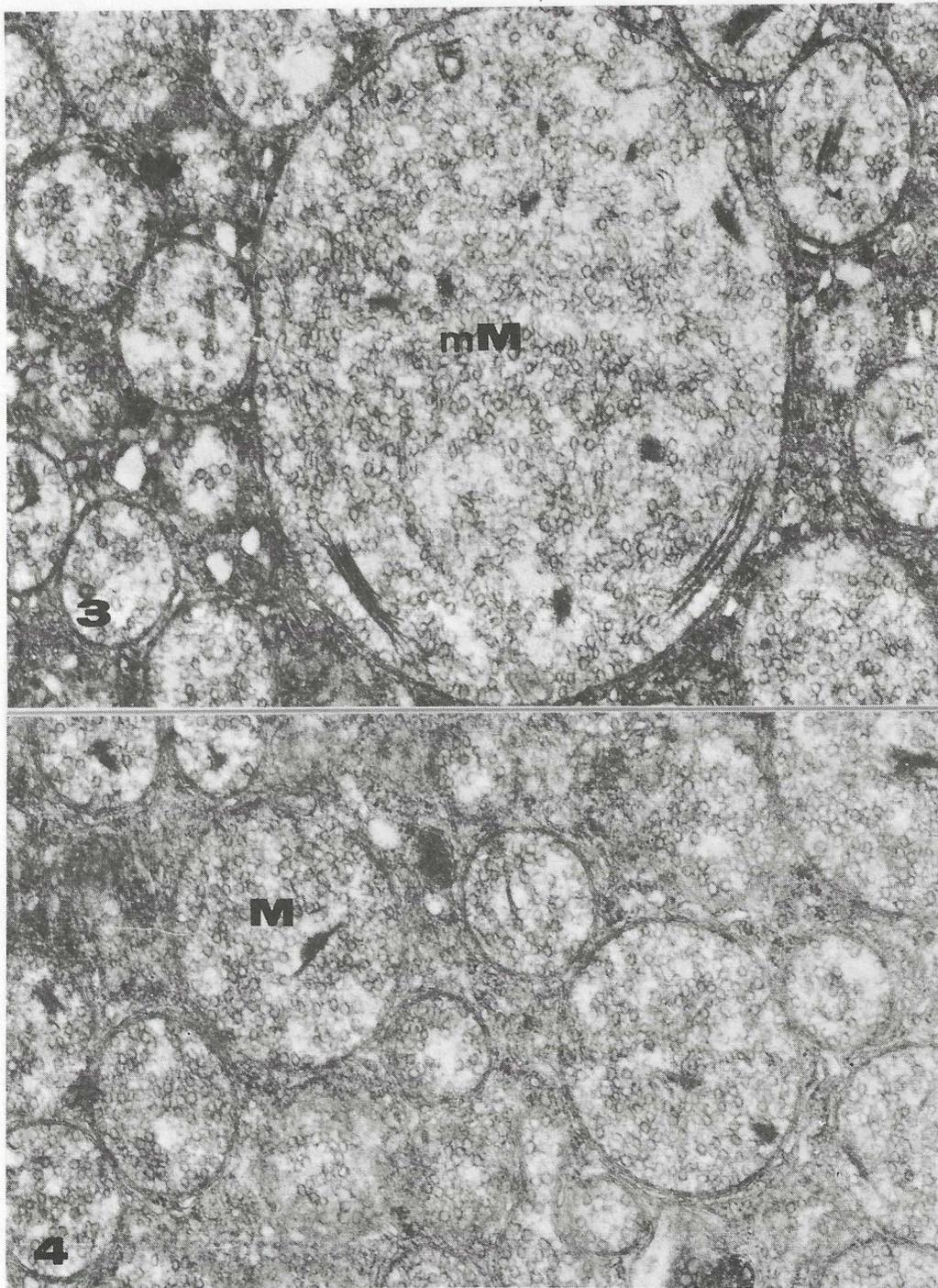


FIGURA 3. Lote segundo. Detalle célula reticular con fuerte pleomorfismo mitocondrial y megamitocondrias (mM). X 14.500.

FIGURA 4. Lote Cuarto. Célula reticular con abundantes mitocondrias (M). X 14.500.

las células reticulares se encuentran distribuidas en cordones irregulares y con un tamaño aproximado de $25 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro (figura 1), lo que viene a significar una discreta hipertrofia comparada con el lote testigo.

Con el microscopio electrónico, y mediante técnicas morfométricas, resalta el gran desarrollo de las mitocondrias con valores medios de hasta $0.5 \mu\text{m}^2$ y un diámetro de $0.802 \mu\text{m}$, muy superiores a las del lote testigo (cuadro 2). Una característica de estas mitocondrias es su uniformidad morfológica en tamaño y volumen (figura 2), presentando en algunos casos estructuras laminares densas en su interior. Los liposomas se encuentran relacionados con escasos túbulos de retículo endoplásmico agranular y con las mitocondrias. El complejo de Golgi está poco desarrollado.

CUADRO 2
MORFOMETRÍA MITOCONDRIAL DE LAS
CÉLULAS DE LA ZONA RETICULAR DE LA
GLÁNDULA ADRENAL

Lotes	Diámetro \bar{X} (μm)	Área \bar{X} (μm^2)	5volumen \bar{X} (μm^3)	Signifi- cación estadis- tica
T	0.550	0.238	0.087	
1	0.802	0.508	0.272	+++
2	0.850	0.567	0.321	+++
3	0.668	0.351	0.156	+++
4	0.682	0.366	0.166	+++
5	0.648	0.330	0.142	+++
6	0.744	0.434	0.215	+++
7	0.704	0.390	0.182	+++

En este primer lote se observan algunas células reticulares en vías de degeneración o «necrosis simple».

A los tres días p.i. (lote segundo), las células reticulares presentan hipertrofia manifiesta llegando a medir $30 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro y mantienen su disposición cordonal-reticular.

Ultraestructural y morfométricamente, lo que más destaca son las mitocondrias que ocupan la mayor parte del citoplasma, las cuales son de gran tamaño pero a diferencia del primer lote, no existe una población uniforme pues pueden llegar algunas a medir $4 \mu\text{m}^2$ (figura 3), constituyendo verdaderas megamitocondrias, con una media de $0.567 \mu\text{m}^2$, la más elevada de toda la experiencia (cuadro 2). El resto de los componentes celulares no presenta variaciones con relación al lote primero.

Los fenómenos de «necrosis simple celular» son más marcados en este lote.

A los cinco días p.i. (tercer lote), las células presentan una disminución de tamaño, midiendo alrededor de los $27 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro.

Ultraestructuralmente, las mitocondrias tienen un área media de $0.351 \mu\text{m}^2$ y un diámetro medio de $0.668 \mu\text{m}$ (cuadro 2), valores menores a los obtenidos anteriormente pero superiores al lote testigo y en las que se observa un regreso a la uniformidad morfológica en relación con el tamaño. Los liposomas se encuentran en aumento con respecto a los lotes anteriores, mientras que el resto de los componentes celulares no presenta variaciones significativas.

A los siete días p.i. (cuarto lote), las células reticulares miden $25 \pm 2 \mu\text{m}$, tamaño muy similar al obtenido en el primer lote.

Con técnicas morfométricas, las mitocondrias presentan un área media de $0.366 \mu\text{m}^2$, un diámetro medio de $0.682 \mu\text{m}$ y morfología variable (cuadro 2, figura 4). Consideramos de interés la mayor densidad de la matriz mitocondrial y la existencia de gran cantidad de liposomas, cuyo aumento se inició en el lote anterior. Los liposomas, que los encontramos próximos a mitocondrias, presentan la mayoría de ellos estructuras laminares concéntricas. El retículo endoplásmico agranular inicia un aumento de su volumen, aunque las mitocondrias siguen siendo el elemento celular predominante.

A los quince días p.i. (quinto lote), las células son de menor tamaño que en los lotes anteriores, alrededor de los $18 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro.

Las mitocondrias, de morfología variable, presentan un área media de $0.33 \mu\text{m}^2$, con un diámetro medio de $0.648 \mu\text{m}$, el menor encontrado a lo largo de toda la experiencia pero superior al obtenido en los animales testigo (cuadro 2). Los liposomas, de gran tamaño y con formaciones laminares concéntricas en su interior, se encuentran rodeados de cisternas de retículo endoplásmico agranular, que está más desarrollado que en el lote anterior, y relacionados con las mitocondrias, que siguen estando en mayor proporción (figura 5). El complejo de Golgi se presenta de pequeño tamaño.

A los treinta días p.i. (lote sexto), se observan claramente dos tipos celulares, uno con hialoplasma claro, escasa cantidad de mitocondrias y poco desarrollo de los restantes orgánulos citoplasmáticos, siendo lo único destacable el aumento de las microvellosidades en las zonas de la membrana que contactan con los capilares.

El segundo tipo celular presenta las mismas características de los lotes anteriores con una recuperación en el tamaño mitocondrial, cuyos valores medios son de $0.434 \mu\text{m}^2$ de superficie, con un diámetro medio de $0.744 \mu\text{m}$ (cuadro 2), pero ocupando menor espacio a expensas de un

aumento del retículo endoplásmico agranular que llega a representar el 20% de la superficie citoplasmática. El complejo de Golgi adquiere mayores dimensiones al igual que los liposomas que presentan con frecuencia estructuras laminares concéntricas (figura 6).

A los sesenta días p.i. (lote séptimo), las células mantienen su morfología presentado mitocondrias de $0.390 \mu\text{m}^2$ de superficie y $0.704 \mu\text{m}$ de diámetro, muy por encima de los valores obtenidos en los animales testigo (cuadro 2, figura 9). En el resto del citoplasma destaca el buen desarrollo del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico agranular que ocupa el 20% de la superficie citoplasmática. Pero lo que más aumenta en este último lote son los lisosomas y los liposomas, en los cuales se mantienen las estructuras laminares concéntricas.

Junto a este tipo de células existen otras que muestran sus núcleos con la cromatina muy densa y bordes dentados, con tumefacción de las mitocondrias, lo que nos indica se trata de una población de células en vías de degeneración o «necrosis simple» (figuras 7 y 8).

DISCUSIÓN

Las únicas células de las glándulas adrenales que reaccionan ante la implantación de estradiol y acetato de trenbolona son las células reticulares, lo que coincide con los estudios realizados por MOLINA (1982) en corderos, en una experiencia similar a la nuestra.

La síntesis de esteroides por las células reticulares tiene lugar, según BLACK y cols. (1979), mediante la asociación del retículo endoplásmico agranular y las mitocondrias conjuntamente con los precursores lipídicos de los liposomas. Bajo este punto de vista, el aumento del volumen mitocondrial y la hipertrofia celular descrita en el primer lote nos hace pensar que estos mecanismos están aumentados. Si bien no encontramos las formaciones laminares concéntricas que BLACK y cols. (1979) observan en el interior de los liposomas y que según FRÜHLING y cols. (1973) indican un aumento en dicha actividad al utilizar su contenido en colesterol y precursores necesarios para la biosíntesis esteroidea. Por otra parte, debido al escaso desarrollo del complejo de Golgi pensamos que la sulfonación de esteroides se encuentran igualmente disminuida, con lo que existe una menor producción de dehidroepiandrosterona sulfato. Estos mismos hechos son descritos por BLACK y RUSSO (1980) en cobayas tratadas con dexametasona.

En el segundo lote, tres días p.i., la falta de uniformidad morfológica de las mitocondrias es

el hecho más destacable con respecto al lote anterior, y continúan presentando valores muy por encima a los obtenidos en los animales testigo, con alta significación estadística y con la aparición de verdaderas megamitocondrias. Este pleomorfismo mitocondrial representa, para PENNEY y AVERILL (1980), una mayor actividad en la secreción de las células de la corteza adrenal de ratas en tratamiento crónico con Fenobarbital, conjuntamente por la interacción de estos elementos con los liposomas y el retículo endoplásmico agranular.

Con respecto al tercer lote, quinto día p.i., se produce una vuelta a la uniformidad morfológica que, con el aumento de volumen mitocondrial, indica que los fenómenos de síntesis hormonal se mantienen.

En los cuatro primeros lotes, al contrario de lo descrito por MOLINA (1982) a los 30 días p.i., no apreciamos un aumento del retículo endoplásmico agranular, sino una estabilización del mismo sin modificaciones cualitativas apreciables o dignas de tener en cuenta, y en donde las mitocondrias y sus relaciones con la mayor cantidad de liposomas son el hecho más característico a partir del séptimo y decimoquinto día (lotes cuarto y quinto).

A los treinta días p.i., lote sexto, el volumen mitocondrial alcanza valores mayores a los observados en los lotes tercero, cuarto y quinto, con diferencias muy significativas al compararse con éstos y con el grupo testigo. Coincidimos con RODHIN (1971) en que existe una reactivación celular en favor de la síntesis de hormonas sexuales anabolizantes. Esta mayor actividad se confirma por el aumento del complejo de Golgi, retículo endoplásmico agranular y las formaciones laminares en el interior de los liposomas, como describen BLACK y cols. (1979) y FRÜHLING y cols. (1973).

En el séptimo lote, sesenta días p.i., se mantienen estos hechos, si bien el aumento de los liposomas nos puede indicar un aumento en los fenómenos de secreción celular, BLACK y RUSSO (1980) encuentran una disminución en este componente cuando se trata de cobayas con ACTH, mientras que LEURE-DUPREE y cols. (1982) describen un aumento en ratas sometidas a dieta deficitaria en yodo.

Si comparamos la superficie mitocondrial obtenida por MOLINA (1982) en corderos a los 30 días p.i. con nuestros resultados, los valores son muy similares. Lo mismo ocurre con los obtenidos para el retículo endoplásmico agranular a los 60 días p.i.

A partir de los treinta días p.i., algunos elementos celulares entran en degeneración, quizás debido a la hiperactividad desarrollada en esta última fase, haciéndose más patente a los

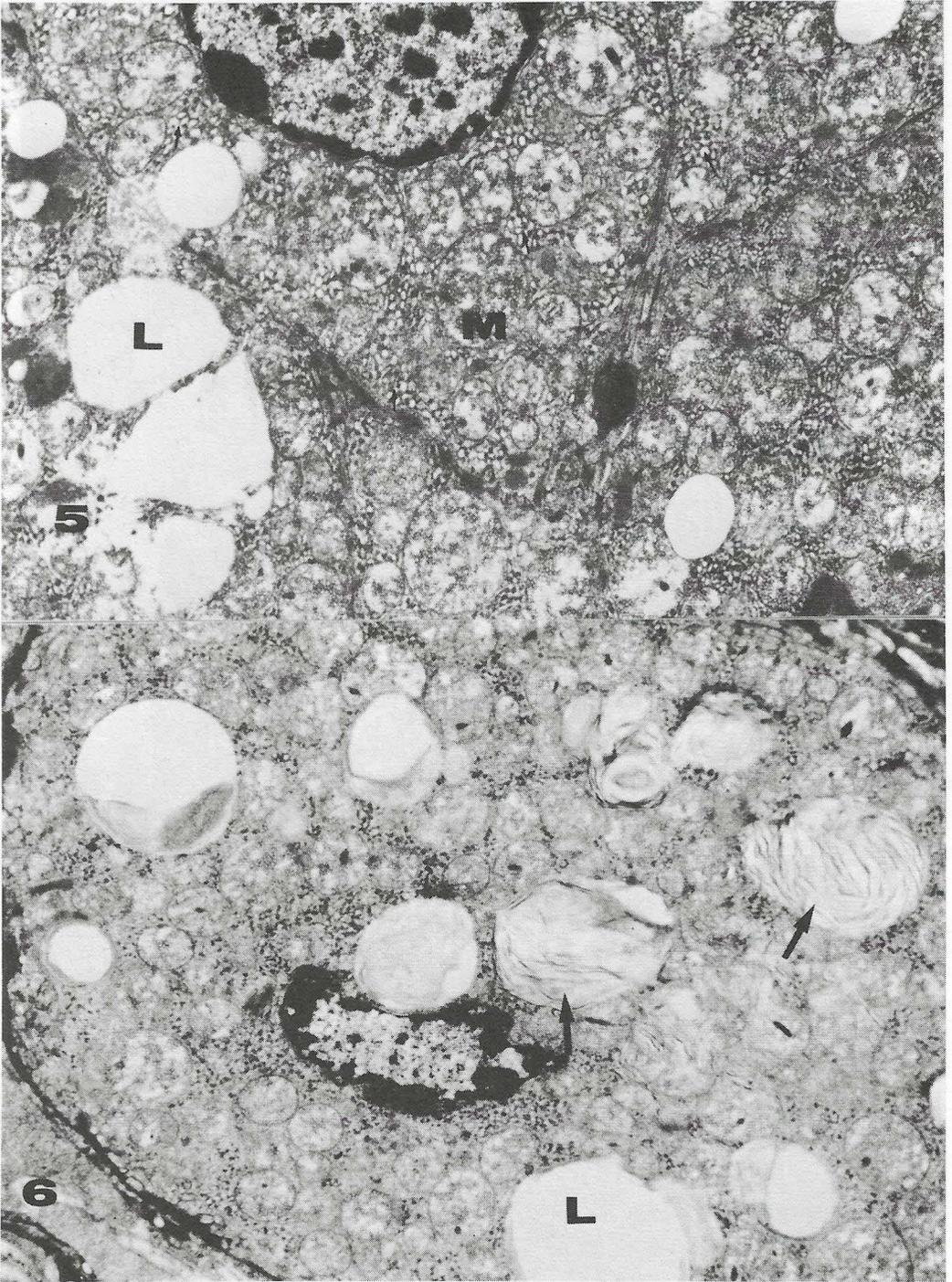


FIGURA 5. Lote quinto. Célula reticular. Rodeando a las mitocondrias se observan cisternas dilatadas de retículo endoplásmico agranulas (flechas) y liposomas (L). X 11.500.

FIGURA 6. Lote sexto. Detalle célula reticular con liposomas (L) de grandes dimensiones conteniendo formaciones laminares concéntricas (flechas). X 8.500.

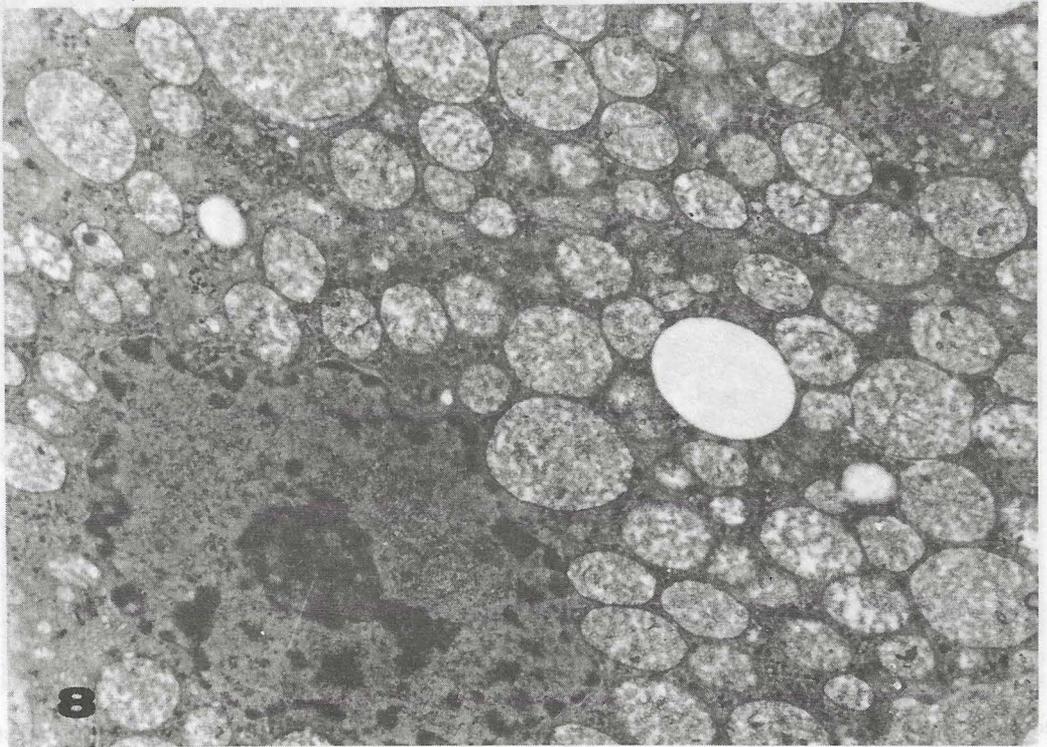
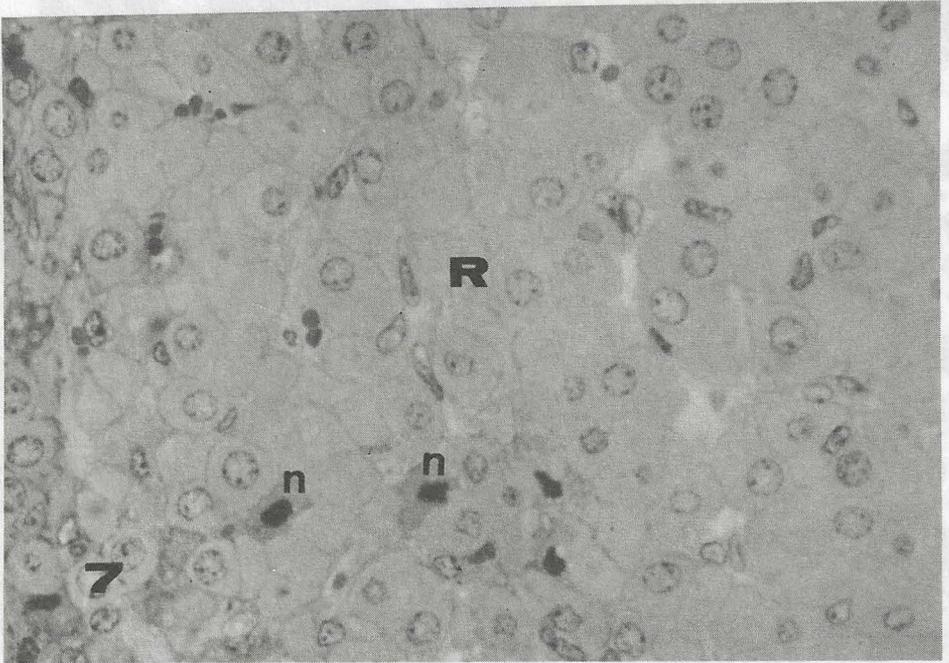


FIGURA 7. Lote séptimo. Zona reticular (R) con células en necrosis (n). Azul de Toluidina. X 420.

FIGURA 8. Lote séptimo. Célula reticular en vías de degeneración. X 12.500.

sesenta días p.i., y dando lugar a una «necrosis celular simple».

En el último lote, el volumen mitocondrial mantiene la hipertrofia encontrada en el lote anterior y siguen presentando diferencias muy significativas con el lote testigo. MOLINA (1982), por el contrario las encuentra con valores muy próximos a la normalidad. Tampoco, coincidimos con este autor en los valores que da para los liposomas, ya que nosotros apreciamos un aumento paulatino a partir del quinto lote, coincidiendo con los trabajos de NICKERSON (1980) en monos (Mongolian Gerbil) tratados con dietilestilbestrol y 17α estradiol.

Finalmente, pensamos que las modificaciones encontradas en los dos últimos lotes podrían paliar en parte la falta de hormonas sexuales testiculares, falta que se debería a la manifiesta atrofia testicular observada y descrita por MOLINA (1982) en corderos implantados con estradiol y acetato de trenbolona sacrificados a los 60 días p.i., y por MUNUERA (1984) en ratas Wistar sacrificadas a los 30 días p.i.

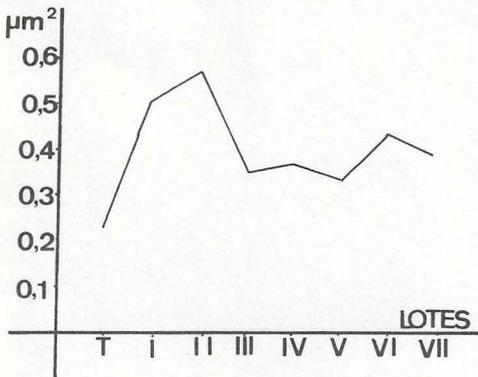


FIGURA 9. Representación gráfica del área mitocondrial de las células de la zona reticular de la glándula adrenal.

BIBLIOGRAFÍA

- BLACK, V. H., E. ROBBINS, N. McNAMARA, T. HUIMA (1979): A correlated thin-section and freeze-fracture and freeze-fracture analysis of guinea pig adrenocortical cells. *Am. J. Anat.* 156: 453-504.
- BLACK, V. H., J. J. RUSSO (1980): Stereological analysis of the guinea pig adrenal: effects of Dexametasone and ACTH treatment with emphasis on the inner cortex. *Am. J. Anat.* 159: 85-120.
- FERRANDO, R. (1980): Los anabolizantes esteroídicos y no esteroídicos y la Ganadería. *Bull. Ac. Ad. Nat. Méd.* 164(6). Publicado en la circular informativa de la revista del Consejo General de Colegios Oficiales Veterinarios en febrero 1981.
- FRÜHLING, J., G. SAND, W. PENASSE, F. PECHEUX y A. CLAUDE (1973): Corrélation entre la morphologie et le contenu lipidique des corticosurrénales de cobaye, durat et de boeuf. *J. Ultrastruct. Res.* 44: 113-133.
- LEURE-DUPREE, A. E., R. J. ROTHMAN, G. J. FOSMIRE (1982): The effect of zinc deficiency on the ultrastructure of rat adrenal cortex. *Am. J. Anat.* 165: 295-303.
- MOLINA, M. (1982): Estudio de las alteraciones morfológicas del sistema endocrino —Hipófisis, Adrenales, Tiroides— de corderos tratados con estradiol acetato de trenbolona. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- MUNUERA, I. (1984): Modificaciones del testículo de ratas Wistar tratadas con estradiol y acetato de trenbolona. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- NICKERSON, P. A. (1980): Effect of estradiol 17-alpha and diethylstilbestrol on adrenal cortex and anterior pituitary gland of the Mongolian Gerbil. *Tiss. Cell.* 12(1): 117-123.
- PENNEY, D. P., K. T. AVERILL (1980): Phenobarbital-induced alterations of the rat adrenal cortex. *Anat. Rec.* 198: 107-112.
- REYNOLDS, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208.
- RHODIN, J. A. G. (1971): The ultrastructural of the adrenal cortex of the under normal and experimental conditions. *J. Ultras. Res.* 23: 71-90.
- SABATINI, D. D., K. BENSCH, R. J. BARNETT (1963): Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structures and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.* 17: 19-58.