

Permeabilidad de la glándula pineal del hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) a la peroxidasa de rábano

LILIANA SALAZAR M.¹ Y MARTHA ISABEL ESCOBAR B.²

Se hace un análisis de la permeabilidad de las porciones superficial y profunda de la glándula pineal, utilizando peroxidasa de rábano (H.R.P.) a través del cuarto ventrículo, con tiempos de circulación del trazador de 2, 3, 5, 7 y 10 minutos; cumplido este período, fueron sacrificados y perfundidos para, finalmente, revelar la presencia de peroxidasa usando una mezcla de diamino bencidina y peróxido de hidrógeno. Se encontró un comportamiento de permeabilidad diferente entre las porciones superficial y profunda. La porción profunda mostró una mayor y más rápida captación que la porción superficial; otras estructuras vecinas como el órgano subcomisural y núcleo habenular medial presentaron un comportamiento similar a la porción profunda. Se plantea la posibilidad de que sustancias presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) puedan interactuar con el tejido glandular y viceversa, lo cual sería de gran importancia en el manejo de señales en el L.C.R.

Palabras claves: permeabilidad, cuerpo pineal, peroxidasa.

Introducción

La glándula pineal pertenece al grupo de órganos circunventriculares (1), se caracteriza por presentar una gran variabilidad anatómica a lo largo de la escala zoológica (2), especialmente evidente en roedores.

En el hamster dorado se reconocen dos porciones, una superficial de aspecto piriforme, próxima a la confluencia de los senos sagital y transversal y

otra profunda, triangular, ubicada entre las comisuras habenular y posterior (3,4) en relación con el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo a través de los recesos pineal y suprapineal. Ambas porciones están unidas a través de un tallo constituido por elementos neurales y vasculares (fig.1).

Tanto la porción superficial como la profunda poseen dos tipos celulares básicos que corresponden a pinealocitos y células gliales, los cuales tienen características similares en ambas porciones, encontrándose solamente diferencias en cuanto a densidad para el componente glial siendo mayor en la porción profunda que en la superficial (4).

Los pinealocitos en general poseen citoplasma irregular con gran cantidad de organelas propias de una célula secretora, cromatina dispersa, núcleo redondo u ovalado de ubicación central y nucleolo

1. Fisiot. M. Sc. Profesor Auxiliar Dpto. de Morfología . Fac. Salud, Universidad del Cauca

2. Biol. M. Sc. Profesor Asistente Dpto. de Morfología . Fac. Salud, Universidad del Valle.

© Universidad del Norte.

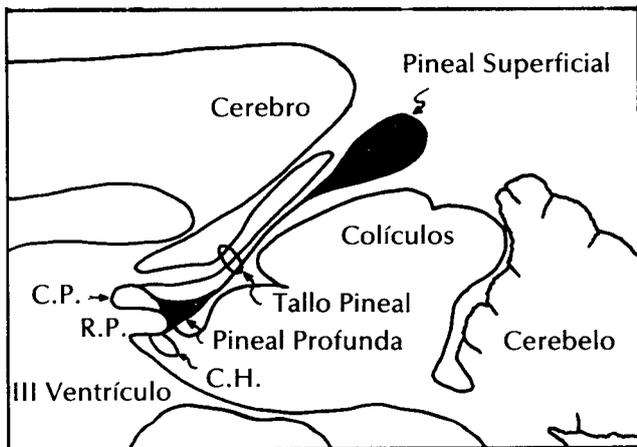


Fig.1. Esquema en corte sagital que representa el complejo pineal y su ubicación anatómica. R.P.: receso pineal; C.P.: comisura posterior; C.H.: comisura habenuar.

prominente. Los pinealocitos entre sí presentan complejos de unión de tipo *macula adherens* (3, 4, 5).

Las células gliales corresponden básicamente a astrocitos fibrosos y protoplasmáticos y son diferenciables a nivel de microscopía electrónica. Los fibrosos poseen núcleo con cromatina muy condensada, retículo endoplasmático, mitocondrias de aspecto alargado y múltiples inclusiones de glucógeno (6). Los protoplasmáticos tienen una mayor cantidad de retículo endoplasmático y de prolongaciones citoplasmáticas las cuales se ramifican en el espacio perivascular (7). Algunos autores (3) describen un tercer tipo de células pequeñas y poco ramificadas que podrían corresponder a pinealocitos en diferente estado funcional o a oligodendrocitos..

La porción superficial está rodeada por una delgada membrana derivada de la piamadre en la cual se aprecian: células piales, macrófagos y elementos extracelulares como fibra colágena (8,9). La pineal profunda está limitada en su superficie por una membrana basal que la separa del tejido adyacente y del líquido cefalorraquídeo (L.C.R.). Sólo una pequeña fracción carece de ella y en su lugar presenta un revestimiento epitelial que queda en contacto con el L.C.R. presente en el tercer ventrículo (fig.2); a esta región se denomina el receso pineal. El epitelio a este nivel está conformado por células de morfología diversa según la región que se recorra; así: la entrada al receso presenta células cúbicas de núcleo central y superficie apical con cilios; en la porción ventral superior, se observan células planas con escasas cilias

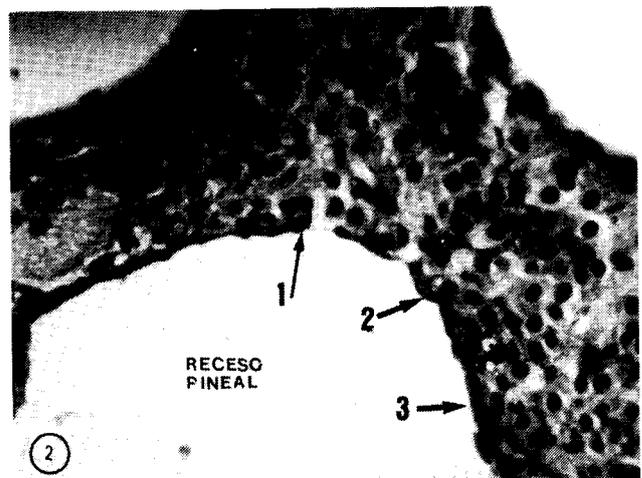


Fig.2. Se observa la constitución del epitelio endodermio que recubre el receso pineal. 1: demarca la parte donde los pinealocitos protruyen al L.C.R.; 2: demarca el epitelio plano; 3: demarca el epitelio cúbico.

y microvellosidades; la salida del receso, ubicada en dirección a la comisura posterior, posee células de aspecto cilíndrico con núcleo basal y borde apical con cilios y algunas microvellosidades y la región del techo propiamente dicha, se presenta desnuda, es decir, carente de epitelio (11,12) (figs, 3 y 3a).

En el presente trabajo se compara la permeabilidad de las porciones superficial y profunda, utilizando H.R.P. inyectada vía ventricular, debido a que en otros estudios se utilizaron diversas sustancias, principalmente melatonina, (10, 13, 14, 15) inyectada por vía sanguínea y observando posteriormente el material en la glándula. Sólo una comunicación (16) describe la penetración de la H.R.P. inyectada por vía sanguínea y ventricular, pero en este trabajo el análisis se restringió a la porción superficial. Teniendo en cuenta que la porción profunda muestra particularidades anatómicas, quisimos verificar si estos factores tenían influencia sobre las características de permeabilidad.

Materiales y Métodos

Para el presente trabajo se utilizaron 25 hamsters dorados (*Mesocricetus auratus*), adultos, de uno y otro sexo, mantenidos en condiciones normales de luz, temperatura y alimentación.

Una vez se anestesió cada animal (Nembutal), se procedió a inyectar la H.R.P. (dosis de 2 a 3 mg por cada 10 g de peso, disuelta en 0.1 ml de agua



Fig.3. Corresponde a una porción del epitelio del receso pineal localizado a su entrada; las células son cilíndricas con núcleo (NUC) basal y abundantes organelas. rer: retículo endoplasmático rugoso; ag: aparato de Golgi; mt: microtúbulos; cb: cuerpos basales; ZA: Zónula adherens; cl: cilios.

destilada) a través del cuarto ventrículo, utilizando como vía de acceso la membrana atlanto-occipital. Los animales se dividieron en cinco grupos, seleccionándose para cada uno un tiempo de circulación del marcador así: 2, 3, 5, 7 y 10 minutos. Transcurrido el tiempo establecido, se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con una inyección de solución fisiológica, seguida de solución fijadora de Karnovsky. Posteriormente, se decapitaron y con la ayuda de equipo odontológico, bajo el microscopio estereoscópico se abrió el cráneo manteniendo intacta la duramadre; todo el bloque fue sumergido en fijador a 4°C. durante tres horas y después en sucrosa al 20% toda la noche. Al día siguiente, se seccionaron sagitalmente en el criostato a 20 micras de espesor; los



Fig.3a. Muestra una parte del epitelio del receso pineal, conformado por células cúbicas, con núcleo (NU) redondeado y escasas organelas. ZA: Zónulas adherens; MIT: Mitocondrias; CB: Cuerpos basales; CL: cilias.

cortes obtenidos se recogieron en buffer TBS (buffer salino Trizma con pH 7.2).

La peroxidasa se reveló usando mezcla de 3-3 diaminobencidina (DAB-Sigma) al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.1% durante veinte minutos, posteriormente se lavaron con buffer salino Trizma.

Las secciones reveladas se montaron en portaobjetos, se pasaron por tetróxido de osmio (0.01%) durante treinta segundos, se deshidrataron, aclararon y cubrieron, procediendo a su observación al microscopio óptico.

Resultados y discusión

En nuestro análisis pudimos determinar que el comportamiento del complejo pineal ante la inyección intraventricular de H.R.P. es diferente en cada porción, entre ellas y al compararlas con otras estructuras epitalámicas.

En períodos cortos de circulación de H.R.P. existe una mayor captura del marcador por parte de la porción profunda, observándose que a los dos y tres minutos de inyección ésta ha penetrado fácilmente, detectándose tinción en las células del área (fig.4), en tanto que en la porción superficial la H.R.P. no trasciende los límites de la cápsula pial (fig.4a). Si bien el acceso a la porción profunda es inmediato, la peroxidasa desaparece rápidamente de esta región, de tal manera que a los cinco minutos es difícil reconocerla por los métodos utilizados por nosotros (fig.5). Es importante destacar que la H.R.P. alcanza a la porción profunda

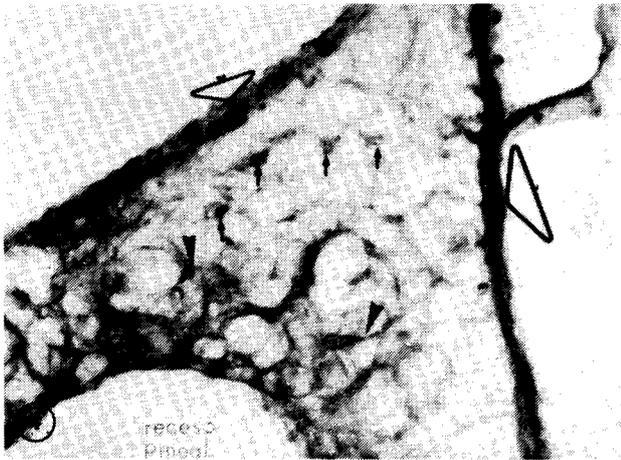


Fig.4. Corresponde a un corte sagital de la porción profunda, luego de dos minutos de circulación del trazador. Se observa la fuerte reacción a nivel de la cápsula pial (flechas huecas) y hacia el parénquima subyacente al receso pineal (cabezas de flechas). Algunas células muestran captura del marcador (flechas pequeñas).

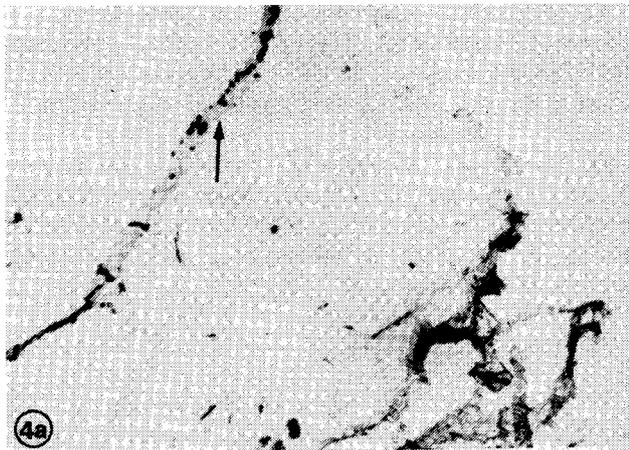


Fig.4a. Corte, sagital de la porción superficial; después de dos minutos de circulación del trazador. El producto de reacción se aprecia hacia la cápsula.

desde el L.C.R. por el receso pineal, particularmente por la zona carente de epitelio, en la cual, como se mencionó, las células están expuestas directamente a las sustancias presentes en el tercer ventrículo.

Con el tiempo de cinco minutos ya se puede reconocer invasión de la pineal superficial por la peroxidasa. Parece ser que la cápsula pial de esta porción, ejerce el papel de una barrera temporal,

impidiendo el paso de sustancias hacia el interior de ella; contrario a lo ocurrido con el epitelio endimario de la porción profunda, que facilita la penetración del marcador.

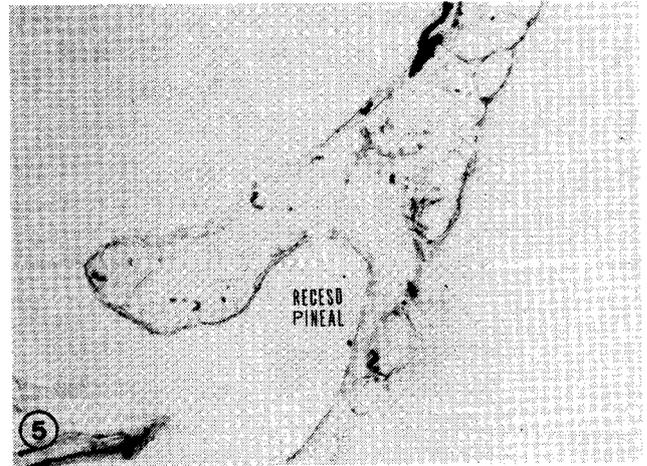


Fig.5. Corte sagital de la porción profunda realizado después de cinco minutos de circulación del trazador. Obsérvese como la H.R.P. ha desaparecido completamente de parénquima.

A los diez minutos después de la inyección se alcanza la máxima intensidad de la reacción en la porción superficial, no apreciándose ningún cambio en la profunda (fig.6).

Estos hallazgos nos permiten sugerir que las dos porciones del complejo pineal actuarían de manera diferente en el manejo de sustancias presentes en el L.C.R.

La porción profunda, dada su estratégica localización y su comportamiento frente al marcador podría tener un papel de sensor rápido de sustancias presentes en el L.C.R, hecho éste que ya ha sido sugerido para otras estructuras circunventriculares (16, 17). Subsiste, un interrogante y es cómo ejerce la porción profunda su acción sobre otras estructuras fuera o dentro del sistema nervioso, y otra, enlazada con ésta, es, cuáles serían las vías para ejercer estas acciones. Se deben considerar al menos tres alternativas, no excluyentes: primero, material sensible en la profunda, podría provocar una respuesta en ella que se transmitiría por vía vascular a otras estructuras; segundo, el material sensible por la porción profunda provocaría una respuesta que se transmitiría vía L.C.R. y, tercero despertaría una respuesta que desencadenaría una actividad de neuronas propias del área y estas, por medio de sus conexiones, activarían centros vecinos. Para que la primera posibilidad

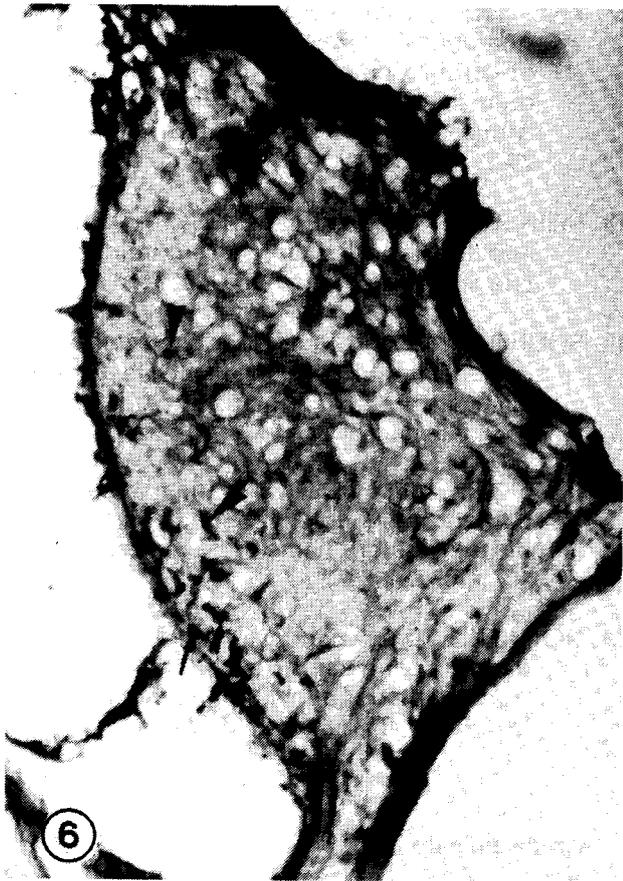


Fig.6. Corresponde a un corte swagital de la porción superficial después de diez minutos de circulación del trazador. se encuentra a nivel del parénquima un alto número de células con reacción positiva a la peroxidasa (flechas cortas y cabezas de flechas).

se diera debía conjugarse un hecho anatómico, el cual sería la presencia en la zona profunda de vasos fenestrados; no podemos asegurar si esta vía es posible, pues aunque Sheridan (4) demostró vasos de tipo continuo para la porción profunda del hamster dorado, no se han hecho estudios de permeabilidad sobre ellos.

La segunda posibilidad sobre el traspaso de sustancias desde la glándula al L.C.R. se sugiere de nuestros resultados, tomando como vía la porción desnuda del receso pineal.

La tercera posibilidad es la menos probable, dada la pobreza de conexiones hasta ahora descritas entre la glándula y zonas vecinas de ella. Sólo se han descrito aferentes a la glándula demostradas por degeneración, luego de lesión de los núcleos habenulares (21) y en la literatura revisada no existe

descripciones de fibras eferentes de la pineal a otras estructuras.

La captura de sustancias (H.R.P.) por ambas porciones glandulares sugiere que el complejo pineal podría ser activado por sustancias liberadas al L.C.R. desde otras estructuras del sistema nervioso, tales como el hipotálamo estableciéndose un sistema de señales hormonales que no utilizaría la circulación general como vía. El uso de péptidos marcados o la inyección de materiales marcados en diversas estructuras del sistema nervioso y su búsqueda posterior en el complejo pineal, serían de gran utilidad para confirmar o negar estas hipótesis.

Referencias

1. WEINDL, A., Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, Ganon, Martini, Oxford University press, 1976.
2. BARDASANO, J.I. La glándula pineal. H. Glume, 1978. p. 100-200.
3. SHERIDAN, C. and REITER, R. The fine structure of the hamster pineal gland. *Am. J. Anat.* 122: 357-376. 1968.
4. SHERIDAN, C. Observations on the Pineal system in the hamster. *Journal of Morphology.* 131: 153-162, 1970.
5. GONZÁLEZ, G. y ALVAREZ-URIA. Incorporación precóz de la HRP aplicada tópicamente a las fibras adrenérgicas de la glándula pineal. *Trab. Inst. Cajal, LXXI-fasc, 3:* 207-211, 1980.
6. DÍAZGRANADOS, J. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica del ratón a la peroxidasa: Estudio comparativo a través de diferentes edades de desarrollo prenatal. Tesis Mag. en Ciencias Morfológicas, 1976.
7. WATENBERG, H: Electron microscopic studies on nerve and glia processes and their relations to cells and vessels of the mammalian pineal. *Anat. Record.* 154-439, 1966.
8. GRAY, H. *Anatomía Gray.* 13 ed. Salvat, 1985. p. 1585-1588.

9. MORSE, D. and LOW, F. The fine structure of the pia mater of the rat. *Am. J. Anat.* 133: 349-368, 1972.
10. SHERIDAN, C. Observations on the Pineal system in the hamster, II: Fine structure of the deep Pineal. *Journal Morphology.* 131: 163-178, 1970.
11. SALAZAR, L. Aspectos histológicos y Permeabilidad de la glándula pineal a la peroxidasa de rábano. Tesis para optar al título de Mag. en Morfología. Univalle, 1986.
12. HEWING, M. A liquor contacting area in the pineal recess of the golden hamster. *Anat. Embryol.* 1978. p. 153, 295-304.
13. AXELROD, J. The Pineal gland: A Neurochemical transducer. *En: Science.* 184: 1341-1348, 1974.
14. WURTMAN, R.J. and AXELROD, J. The Pineal gland. *En: Scientific American.* 213: 50-60, 1965.
15. ANTON-TAY, F. and WURTMAN, R.J. Regional uptake of ³H-melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain; *Nature (Lond).* 221: 474-475, 1969.
16. WELS, M.G. Modes of protein and peptide uptake in the pineal gland of the Mongolian gerbil: An Ultrastructural study. *The Am. J. Anat.* 162: 287-313, 1981.
17. KNIGHT, A.; HAYES, L. and SYMINGTON, C. Anatomical evidence to support the role of cerebrospinal fluid as a transmitter medium in the Pineal-hypothalamic axis. *South African Journal of Medicine Science.* 39: 25-31, 1974.
18. MEINSENBERG, S. and SIMMONS, T. Peptides and the blood brain barrier, minireview. *Life Science.* 32: 2611-2623, 1983.
19. SHERIDAN, C. and ROLLAG, G. Development and melatonin content of the deep pineal gland in the syriam hamster. *Am. J. Anat.* 168: 145-156, 1983.
20. REITER, R.J. and HEDLUND, E. Peripheral sympathetic innervation of the deep pineal gland of the folden hamster. *Experientia.* 32: 1071-1072. 1976.
21. RONNEKLEIV, O.K. and MOLLER. Brain pineal nervous connections in the rat: An Ultrastructure study following habenular lesion. *Exp. Brain.* 37: 551-562, 1979.

Agradecimiento

Expresamos nuestros agradecimientos al Doctor Hernán Pimienta, profesor asociado de la Universidad del Valle, por la revisión hecha al presente artículo.