



UNIVERSIDAD DE LEÓN

RAFAEL ALVAREZ NOGAL

**INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO Y DE LA  
GLANDULA PINEAL SOBRE EL SISTEMA  
INMUNE DE *Rana perezi***

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA NATURAL

REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTORIA NATURAL

VOLUMEN LXXV, N.º 1, 1981

1981

**RAFAEL ALVAREZ NOGAL**

Venta de libros: 100.000.000

PREMIOS DE LA REVISTA

Primer premio: Sr. Fernando Pérez

Segundo premio: Sr. Manuel Sánchez

**INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO Y DE LA  
GLANDULA PINEAL SOBRE EL SISTEMA  
INMUNE DE *Rana perezi***

CALIFICACION: 1000.000.000

REVISOR: Sr. Alfonso Sánchez

© Rafael Álvarez Nogal  
Editado por la Universidad de León  
Deposito legal: LE/1000/1981  
Impreso en el Imprenta de la Universidad de León  
N.º de registro: M. 1000/1981  
ISSN: 0014-1801

RAFAEL ALVAREZ NOGAL

INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO Y DE LA  
GLANDULA PINEAL SOBRE EL SISTEMA  
INMUNE DE RANA PIZCZI

• Rafael Alvarez Nogal  
Edita : Universidad de León  
Servicio de Publicaciones  
Imprime : Servicio de Imprenta  
Universidad de León  
I . S . B . N . : N° 84-7719-087-9  
D . L . : LE-264-1988  
León - España

UNIVERSIDAD DE LEON - FACULTAD DE BIOLOGIA

---

INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO Y DE LA GLANDULA PINEAL  
SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE Rana perezi

Rafael Alvarez Nogal

1987

Fecha de lectura: 18 Diciembre 1987

TRIBUNAL DE LA TESIS:

Presidente: Dr. Fernando Marín Girón

Vocales: Dra. Blanca Agulleiro Díaz

Dr. José Vaquera Orte

Dr. Joaquín Fernández Pérez

Secretario: Dr. Alfredo Salvador Milla

CALIFICACION: Apto "Cum Laude"

DIRECTOR: Dr. Alfredo Escudero Díez

**INDICE.**

- <b><u>INTRODUCCION</u></b> .....	6
- <b><u>PROPOSITO</u></b> .....	8
- <b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b> .....	8
- <b><u>RESULTADOS. LOS ORGANOS Y CELULAS LINFOIDES DE <u>Rana perezi</u>: VARIACIONES ESTACIONALES Y EFECTOS DE LA PINEALECTOMIA.</u></b>	
. <b><u>TIMO</u></b> .....	10
. <b><u>BAZO</u></b> .....	11
. <b><u>MEDULA OSEA</u></b> .....	11
. <b><u>LINFOCITOS CIRCULANTES</u></b> .....	12
. <b><u>RESUMEN</u></b> .....	12
- <b><u>RESULTADOS. LOS ORGANOS ENDOCRINOS DE <u>Rana perezi</u> Y SUS PRODUCTOS DE SECRECION: VARIACIONES ESTACIONALES Y EFECTOS DE LA PINEALECTOMIA.</u></b>	
. <b><u>TEJIDO INTERRENAL</u></b> .....	12
. <b><u>TESTICULO</u></b> .....	13
. <b><u>HORMONAS ESTEROIDES</u></b> .....	13
. <b><u>RESUMEN</u></b> .....	14
- <b><u>DISCUSION GENERAL</u></b> .....	14
- <b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	17
- <b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	17
- <b><u>APENDICE</u></b> (Esquemas, gráficas, figuras) .....	23

## INTRODUCCION.

Los órganos que conforman el sistema inmune de los anfibios anuros de la familia Ranidae, son la médula ósea, el timo, el bazo, el cuerpo yugular y pequeños agregados linfoides asociados al tubo digestivo (MANNING y HORTON, 1983). Algo sumamente característico de los anfibios y, en general, de los vertebrados ectotermos, es que presentan variaciones estacionales en el desarrollo del sistema inmune (HUSSEIN y cols., 1978a, 1978b; LECETA, 1984), siendo por ello estos animales extraordinarios modelos biológicos para el estudio del sistema inmune en general, y en particular, para el estudio de las interacciones de este sistema con otros sistemas o con el medio externo.

Los agentes medioambientales más citados, por la influencia que puedan tener sobre las variaciones del sistema inmune en los vertebrados ectotermos, son la temperatura y el fotoperíodo.

Respecto de la influencia de la temperatura, existe disparidad de criterios. Así los meses fríos del año, en los peces, se asocian con involución linfóide (AVTALION, 1981), sin embargo se han observado variaciones estacionales en el sistema inmune de anfibios, a pesar de mantenerles a temperatura constante (BIGAJ y PLYTYCZ, 1984b). Por otra parte, el estudio del fotoperíodo y sus variaciones, no permite de momento establecer hipótesis respecto de la influencia del mismo sobre el sistema inmune, aunque atendiendo a que diversos indicadores de la actividad inmune, presentan variaciones día/noche, existen según SCHLAGHECKE y KLEY (1986) relación entre el fotoperíodo y dicho sistema.

En cuanto a los factores endógenos que puedan influir sobre el sistema inmune, las hormonas que tienen mayores efectos sobre los órganos linfoides, las células implicadas en la respuesta inmune y la respuesta inmune en sí, son las hormonas esteroides: las hormonas sexuales y los corticosteroides (DOUGHERY, 1952).

COMSA y cols. (1979) describen que un incremento natural o artificial de las hormonas sexuales, conlleva disminución en el tamaño del timo y solamente un ligero descenso en la presencia de las hormonas tímicas. Sin embargo GROSSMAN y cols. (1979), consideran que son precisamente las células epitelio-reticulares del timo (las células supuestamente productoras de hormonas tímicas), las más afectadas por las sexuales, y no los timocitos.

Por otra parte, los corticosteroides producen involución tímica por destrucción de linfocitos corticales (BLAU y cols., 1968), linfopenia

en los órganos linfoides secundarios (LUDIN y SCHOOLEY, 1973) así como linfopenia circulante transitoria (FAUCI y DALE, 1975), interpretándose que los corticosteroides, además de matar linfocitos, los moviliza hacia la médula ósea (GARRIDI, 1986). Frente a esta hipótesis, SAAD y cols. (1984) no observan tras inyectar corticosteroides, que exista un incremento linfocitario en la médula ósea, en desacuerdo con las hipótesis de la movilización linfoide, observando "in vivo" que de todos los linfocitos, los más resistentes a los corticosteroides son los de la médula ósea y los menos resistentes, los del timo.

En conjunto se puede considerar al Sistema Nervioso Central como un modulador del sistema inmune (HALL y GOLDSTEIN, 1981) y recíprocamente, que el sistema inmune puede influir en la función del sistema nervioso (BRAINARD y cols., 1987). Concretamente todo un conjunto de datos, dan relevancia a la interacción entre las hormonas y el sistema nervioso central, respecto de la respuesta inmune (SOLOMON y AMKRAUT, 1981; MAESTRONI y cols., 1986a). En este sentido en el presente trabajo en Rana perezi, se estudia el efecto de la glándula pineal sobre el sistema inmune; glándula pineal que en los anfibios como en los mamíferos (KORF y cols., 1986; ROSE y cols., 1987) está conectada anatómicamente y funcionalmente al sistema nervioso central (VOLLRATH y ORSCHE, 1981).

La glándula pineal de los anfibios consta de la glándula pineal propiamente dicha y del órgano frontal. La primera intracraneal y el segundo extracraneal, unidos ambos por el tracto pineal (Esquema 1). La glándula pineal en conjunto es excitada directamente por el medio (FOSTER y ROBERTS, 1982).

Dicha glándula pineal o epífisis, existe en todas las clases de vertebrados, produciendo durante las horas de oscuridad del día, indoles (el más estudiado es la melatonina) (REITER, 1983), utilizando sustratos (la serotonina y otros) que se han acumulado en la glándula durante las horas de luz, en base a que algunas de las enzimas que intervienen, son activas en la glándula pineal solamente durante la noche (VIVIEN-ROELS y PEVET, 1983; FEVRE-MONTANGE, 1985).

La relación directa entre la glándula pineal y el sistema inmune está poco documentada. Existen datos indirectos, tales como que en invierno coincidiendo no solo con los meses más fríos, sino también con los de fotoperiodo más corto, se produce la máxima involución linfoide de todo el año (HUSSEIN y cols., 1978a, 1978b). Según MAESTRONI y cols. (1986b), la glándula pineal es un inmunomodulador, considerando además que regula

y hace de motor de las respuestas inmunes a través de la emisión circadiana de melatonina, afirmando además que la melatonina contrarresta la inmunodepresión inducida por los corticosteroides.

El estudio de las relaciones entre el sistema inmune y los agentes exógenos y endógenos, ocupa actualmente a gran cantidad de investigadores, encontrándose en ese marco el presente trabajo realizado en Rana perezi, un anfibio anuro.

#### PROPOSITO.

Por todo lo anteriormente expuesto, el presente trabajo en Rana perezi pretende aportar datos nuevos, en la medida de lo posible, en el complejo mundo de las interacciones del sistema inmune con el sistema endocrino y en especial con la glándula pineal, así como entre el sistema inmune y el fotoperíodo. Se pretende estudiar dentro del sistema inmune, el timo, el bazo, el número de linfocitos presentes en la médula ósea y el de linfocitos circulantes. También, y dentro del sistema endocrino, se estudiará el tejido interrenal y el testículo, así como el nivel circulante de hormonas esteroides.

Dichos estudios y mediciones se realizarán sobre los órganos, células y hormonas de animales machos y hembras mantenidos en condiciones constantes de temperatura y de luz, así como sobre animales pinealectomizados. Se pretende analizar de forma concreta la posible influencia de la ausencia de glándula pineal sobre el sistema inmune y además, el papel que dicha glándula puede jugar en el desarrollo inmunológico de Rana perezi.

#### MATERIAL Y METODOS.

En el presente trabajo se han utilizado 186 ejemplares de Rana perezi (Seoane, 1885) de los cuales la mitad eran machos y la otra mitad hembras. El peso medio de todos ellos osciló entre 15 y 18 gramos, siendo su longitud total media de 6-7 centímetros. Los animales fueron capturados en su medio natural en septiembre, manteniéndose posteriormente con fotoperíodo y temperatura constantes (doce horas de luz-doce horas de oscuridad, 20-22 °C) durante todo el tiempo de cautividad (un año).

Para el estudio de la influencia del fotoperíodo, cada mes del año se sacrificaron 4 machos y 4 hembras. Para el estudio de la influencia de la pinealectomía se separaron 90 animales en el mes de febrero en



los que se hicieron dos lotes. En uno, los animales fueron pinealectomizados quirúrgicamente previa anestesia en MS 222 (Sandoz), y en otro, los animales fueron solo anestesiados en MS 222 (Sandoz) siendo considerados como los animales control. No fué posible utilizar como animales control, aquellos en los que se hubiera simulado la operación, porque en el mejor de los casos se rompería el nervio pineal (Esquema 1), siendo en ese caso animales control inadecuados.

A los 2, 4, 7, 14 y 21 días después de la operación, los animales se sacrificaron el grupos de 6 machos y 6 hembras operados y 3 machos y 3 hembras control. De todos los animales sacrificados (previa anestesia en MS 222 (Sandoz)) se tomaron los dos timos, el bazo, la médula ósea de los dos fémures, sangre (y su suero) por sección de la aorta (realizando tres extensiones sanguíneas por cada animal), los dos riñones y, en los machos, los dos testículos.

La pinealectomía se inició con una incisión en el tegumento a nivel de las membranas timpánicas (Esquema 2), cortando después en sentido postero anterior hasta dejar al descubierto el cráneo. Se procedió igual en el hueso frontoparietal hasta dejar a la vista los lóbulos ópticos y, posteriormente a ellos, la glándula pineal que se extirpó, emplazando finalmente hueso y tegumento en su natural estar. La glándula pineal el día de la extracción y el encéfalo de los animales el día del sacrificio se procesaron histológicamente para diagnosticar microscópicamente el éxito de la operación (Figuras 1, 2, 3).

Las técnicas histológicas fueron las convencionales tanto para la microscopía óptica, como para la microscopía electrónica de transmisión. Las mediciones morfométricas se realizaron mediante un analizador de imágenes IBAS, Kontron. En el timo se calculó el índice corteza/médula y en un área de 1500 micras cuadradas de la corteza, el número de linfocitos presentes así como la presencia de linfocitos pequeños, medianos y grandes. En el bazo se calculó la cantidad de pulpa blanca y de pulpa roja, así como el tamaño medio de los acúmulos de pulpa blanca. En la médula ósea, en un área de 7000 micras cuadradas, se realizó el recuento de linfocitos presentes. En las extensiones sanguíneas, se realizó un recuento diferencial de leucocitos. En los positivos fotográficos de las células interrenales, después de su observación al microscopio electrónico de transmisión, se calculó el índice gránulos/mitocondrias al dividir el diámetro menor de los gránulos lipídicos, entre el diámetro menor de las mitocondrias. El suero, se empleó para calcular el nivel circulante de testosterona

y de corticosterona (hormonas esteroideas) mediante una técnica de radio-inmuno-ensayo (R.I.A.).

El análisis estadístico, fué el convencional en trabajos de este tipo por aplicación del test de significación estadística "t de Student", para un nivel de significación del 95% o superior.

#### LOS ORGANOS Y CELULAS LINFOIDES DE Rana perezi: VARIACIONES ESTACIONALES Y EFECTOS DE LA PINEALECTOMIA. RESULTADOS.

##### TIMO.

El timo de Rana perezi es un órgano encapsulado en tejido conjuntivo. De la cápsula parten trabéculas que penetrando en el estroma tímico no determinan la existencia de lóbulos (Figura 4). Se diferencian tanto a microscopía óptica como electrónica, perfectamente, dos porciones: la corteza, que es la más externa y también la más densa, y la médula, que es la más interna y la menos densa. En la corteza destaca la presencia de linfocitos, observándose además las células epitelio-reticulares (Figura 5). Estas células además de presentar un aspecto normal, en determinadas épocas del año y en determinadas condiciones experimentales, se observan con un aspecto degenerado, siendo en ese caso y tanto a microscopía óptica como electrónica, células claras ó pálidas (Figura 6).

Característico del timo de Rana perezi en la corteza, es la presencia de células interdigitantes: células con la heterocromatina nuclear escasa y dispuesta periféricamente, presentando un citoplasma electrolúcido con pocos orgánulos de entre los cuales, destacan unos pequeños y alargados túbulos de retículo endoplásmico liso (Figura 7).

En la médula, se observan de forma característica, quistes tímicos y células mioides (Figura 8), así como células de aspecto secretor. Ultraestructuralmente presenta linfocitos, células epitelio-reticulares similares a las de la corteza y células epitelio-reticulares hipertróficas asociadas a los quistes tímicos (Figura 9).

A lo largo del año, se han podido observar dos estados en el timo. El estado álgido, observado sobre todo en primavera y también en otoño, se caracteriza por presentar un aspecto compacto, un índice corteza/médula elevado y en la médula se observan células mioides y quistes tímicos. (Figura 10). El otro estado, característico sobre todo del invierno

y también del verano, presenta un índice corteza/médula bajo, aspecto laxo y ausencia de células mioides y quistes tímicos en la médula, siendo característico, además, la presencia de abundantes células epitelio-reticulares degeneradas (Figura 11), sobre todo en la corteza.

En cuanto a los efectos que la pinealectomía tiene sobre el timo de Rana perezi, son la disminución en el número de linfocitos corticales (Gráfica 1) y la aparición de células epitelio-reticulares degeneradas (Figura 6).

#### BAZO.

El bazo de Rana perezi, como el timo, está encapsulado en tejido conjuntivo; cápsula ligeramente más engrosada a nivel del hilio, lugar por el que entra y sale la vena y arteria esplénica respectivamente (Figura 12). En el conjunto del órgano, se diferencian los acúmulos linfoides llamados pulpa blanca, del resto, llamado pulpa roja (Figura 12). En la pulpa blanca predominan los linfocitos, observándose también células reticulares (Figura 13). Estas células reticulares, como las de la pulpa roja, en determinadas épocas del año y en ciertas condiciones experimentales, presentan un aspecto degenerado, observándose en ese caso como células claras (Figura 14).

A lo largo del año, el bazo de Rana perezi, como el timo, presenta dos estados: uno, bazo en plenitud, característico de la primavera y también del otoño, presenta acúmulos de pulpa blanca bien definidos y compactos (Figura 15), el otro, bazo en crisis, característico del invierno y del verano, presenta acúmulos de pulpa blanca laxos y mal definidos (Figura 16).

Los efectos más notables de la pinealectomía sobre el bazo de Rana perezi, son la aparición de células reticulares degeneradas (Figura 14) y una disminución general en la presencia de linfocitos.

#### MEDULA ÓSEA.

La médula ósea de Rana perezi, es un órgano de aspecto esponjoso en el que las células linfoides se disponen en cordones (Figura 17).

A lo largo del año se observa que es la primavera y un mes del otoño, los momentos de menor presencia de linfocitos en la médula ósea (Gráfica 2). El efecto de la pinealectomía es un incremento tardío en el número de linfocitos presentes en la médula ósea (Gráfica 3).

### LINFOCITOS CIRCULANTES.

Respecto de los linfocitos circulantes, se observa a lo largo del año, que es el invierno la estación con menor número de linfocitos, siendo la primavera la de mayor presencia linfocitaria (Gráfica 4).

La pinealectomía, por otra parte, determina un decremento de los linfocitos circulantes (Gráfica 5).

### RESUMEN.

Realizando una simplificación gráfica de los resultados referidos al sistema inmune de Rana perezi, atendiendo a los estados álgidos e involutivo del timo, del bazo, etc. (Gráfica 6),<sup>(\*)</sup> que machos y hembras evolucionan similarmente existiendo dos momentos del año más activos: sobre todo la primavera y también el otoño, y dos menos activos: el verano y sobre todo el invierno. Además se ha observado que las variaciones estacionales afectan más al timo y en menor medida al bazo.<sup>(\*)</sup> se observa

Los efectos que la pinealectomía tiene sobre el sistema inmune de Rana perezi son: reducción linfocitaria en timo y bazo, y aparición de células reticulares degeneradas también en timo y bazo, así como un incremento de linfocitos en la médula ósea y un decremento de los linfocitos circulantes.

### LOS ORGANOS ENDOCRINOS DE Rana perezi Y SUS PRODUCTOS DE SECRECION: VARIACIONES ESTACIONALES Y EFECTOS DE LA PINEALECTOMIA. RESULTADOS.

#### TEJIDO INTERRENAL.

Adosado a la superficie ventral de los riñones de Rana perezi, se localiza el llamado órgano adrenal, en el cual se diferencian tres tipos celulares. Dos de ellos, de gránulos conspicuos, conforman el llamado tejido cromafín (células secretoras de adrenalina y células secretoras de noradrenalina), el tercer tipo celular, conforma el llamado tejido interrenal, formado por las células interrenales (Figura 18); células secretoras de corticosteroides.

Las células interrenales presentan ultraestructuralmente, retículo endoplásmico liso abundante, mitocondrias con crestas tubulares y gránulos (inclusiones) lipídicos (Figura 19), como corresponde a células secretoras de hormonas esteroides.

A lo largo del año se han observado dos aspectos extremos de los

gránulos y de la matriz mitocondrial de las células interrenales, siendo utilizados clásicamente estos caracteres como indicativos de la actividad de las células en cuestión (ACCORDI y cols., 1981). En el presente trabajo se han utilizado además otros dos caracteres: el estado de fusión o independencia de los gránulos entre sí y el índice gránulos/mitocondrias, poniendo en juego el tamaño de las inclusiones lipídicas y el de las mitocondrias, en base a los trabajos de LICHT y cols. (1983) y otros autores.

En definitiva el estado activo se caracteriza por presentar gránulos electrodensos e independizados, matriz mitocondrial moderadamente densa a los electrones e índice gránulos/mitocondrias bajo (Figura 20). El estado inactivo se caracteriza por presentar gránulos electrolúcidos y fusionados, matriz mitocondrial densa a los electrones e índice gránulos/mitocondrias elevado (Figura 21).

A lo largo del año se observa una menor actividad durante el verano y el otoño, y mayor durante la primavera y sobre todo el invierno (Gráfica 7). Por otra parte, la pinealectomía determina una activación de las células interrenales (Gráfica 8).

#### TESTÍCULO.

El testículo de Rana perezi consta de los túbulos seminíferos y de los espacios intertubulares (Figura 22) en los que se encuentran las células de Leydig; células sintetizadoras de testosterona. Estas células en su citoplasma presentan mitocondrias con crestas tubulares y gránulos o inclusiones lipídicas, como corresponde a células encargadas de la síntesis de hormonas esteroideas.

A lo largo del año se observan dos estados: uno con pocos gránulos lipídicos y electrodensos (primavera), que corresponde a células activas, y otro, con abundantes y electrolúcidos gránulos lipídicos (resto del año), que corresponde a células inactivas (Figuras 23, 24). Los animales pinealectomizados, como los animales control, presentan una tendencia a la actividad (Gráfica 9).

#### HORMONAS ESTEROIDES.

En Rana perezi la hormona esteroide más abundante a lo largo del año, de las dos cuantificadas, es la testosterona, tanto en machos como en hembras.

La corticosterona, sufre una elevación notable en el verano y en

ambos sexos (Gráfica 10). La testosterona se eleva considerablemente en primavera en los machos y en verano en las hembras, así como ligeramente en el otoño en ambos sexos (Gráfica 10). La pinealectomía determina una elevación temprana de corticosterona y una tendencia, tardía, al alza de testosterona (Gráfica 11).

#### RESUMEN.

Realizando un resumen del presente apartado referido a los órganos endocrinos de Rana perezi y sus productos de secreción, se observa que respecto de las variaciones estacionales, durante la primavera se produce una elevación de testosterona en los machos, observándose además células interrenales activadas.

En el verano se produce una importante elevación de corticosterona en ambos sexos, así como de testosterona en las hembras. En otoño se detecta una ligera elevación de testosterona, siendo la época del año más estable. Y en invierno, se observan las células interrenales en el estado de mayor actividad de todo el año.

Los efectos de la pinealectomía se pueden resumir en una activación de las células interrenales, así como en un incremento en el nivel en sangre de las hormonas esteroides; en definitiva, una activación general que es más notable en las hembras que en los machos porque éstos ya se hallan en una tendencia hacia la actividad característica del mes de febrero.

#### DISCUSION GENERAL.

La estructura y ultraestructura de los órganos y células linfoides aquí estudiados, de Rana perezi, es similar a las descripciones realizadas por diferentes autores en otros anfibios. Así y en lo referido al timo, existe tal similitud con los trabajos de BIGAJ y PLYTYCZ (1981, 1984a, 1984b) realizados en Rana temporaria, o con el de GARRIDO (1986) realizado también en Rana perezi (excepción hecha de la presencia de células interdigitantes).

En cuanto al bazo de Rana perezi, éste sigue, como la mayoría de las especies de la familia Ranidae, el llamado "modelo difuso" (COOPER y WRIGHT, 1976) según el cual los acúmulos linfoides o no existen o son escasos y mal definidos. La descripción del bazo realizada en el presente trabajo coincide en esencia con la de MANNING (1971) en Xenopus

laevis, BARRUTIA y cols. (1985) en Bufo calamita y con la de GARRIDO (1986) en Rana perezi.

Por otra parte, las variaciones estacionales aquí observadas en los órganos y células linfoides, coinciden en esencia con las realizadas por otros autores en otros anfibios, obviando la latitud y altitud en la que se hallan los animales objeto de estudio. Autores como GARAVINI (1970), BALDUZZI (1973), BAZAN-KUBIK y SKRZYPIEC (1980), MANNING y HORTON (1982), BIGAJ y PLYTYCZ (1984a) y HUSSEIN y cols. (1984). En definitiva, se han encontrado variaciones estacionales en el sistema inmune de Rana perezi, a pesar de mantener a los animales en condiciones constantes de temperatura (de acuerdo con BIGAJ y PLYTYCZ (1984b) en Rana temporaria) y de fotoperíodo.

En cuanto al fotoperíodo, todos los autores implican a la glándula pineal y concretamente a su capacidad de síntesis hormonal. Es considerada la glándula pineal como el traductor endocrino de las variaciones del fotoperíodo mediante la secreción cíclica de melatonina y otros indoles pineales (EICHLER y MOORE, 1975; REITER, 1983; MORTON, 1986a, 1986b).

Este resultado observado en el presente trabajo, no descarta los resultados de HUSSEIN y cols. (1978a, 1978b) referidos a que las bajas temperaturas, implican inmunosupresión en general o los de MAESTRONI y cols. (1968a, 1968b) respecto del papel inmunomodulador de la glándula pineal. Este resultado sí permite descartar a la temperatura y a las variaciones de luz, como los agentes que determinan las variaciones estacionales en el sistema inmune de Rana perezi.

Respecto del planteamiento inicial, resta analizar a los factores endocrinos como causantes de las variaciones estacionales en el sistema inmune de Rana perezi.

También en los que se refiere al estudio estructural y ultraestructural de los órganos endocrinos de Rana perezi, existe similitud con los trabajos de otros autores. Respecto del tejido interrenal tal similitud se establece con los trabajos de, entre otros, ACCORDI y CIANFONI (1981) y ACCORDI y cols. (1981) en Rhacophorus leucomystax (anfibio, anuro) y en Xenopus laevis, y con los trabajos en Rana catesbeiana de LOFTS y BERN (1972) y LICHCT y cols. (1983). En cuanto al testículo y en concreto a las células de Leydig, obsérvase la similitud en los trabajos de UNSICKER (1975) en Xenopus laevis, Rana temporaria y Bufo bufo, y en el de LOTS y cols. (1972) en Rana temporaria.

Los resultados observados en el presente trabajo respecto de las

variaciones estacionales en la actividad de las células interrenales y de las células de Leydig así como de las hormonas esteroides circulantes están en concordancia con los descritos por LOFT y cols. (1972), FRITSH y cols. (1977) y LICHT y cols. (1983).

En el presente trabajo se pueden analizar los efectos de los corticosteroides sobre el sistema inmune, en los resultados del invierno, porque si bien en el verano se ha detectado una elevación de corticosterona, esta coincide con otra de testosterona. Los efectos de la testosterona se pueden estudiar en los resultados de primavera y otoño.

Los corticosteroides determinan en el sistema inmune de Rana perezi, una depresión en timo y bazo, aparición de células reticulares degeneradas, y un incremento de linfocitos en la médula ósea y decremento linfocitario circulante, interpretándose, de acuerdo con la teoría de VIKLICKY y POLACKOVA (1980), LECETA (1984) y GARRIDO (1986) que los corticosteroides determinan migración de linfocitos de los órganos linfoides a la médula ósea y degeneración de las células epitelio-reticulares del timo (células responsables de diferentes aspectos de la maduración de células linfoides (SCHULOF y cols., 1981)).

La testosterona determina por su parte, que timo y bazo estén repletos de linfocitos, un decremento linfoide en la médula ósea y un incremento de linfocitos circulantes, interpretándose, de igual forma que para los resultados referidos a los corticosteroides, que la testosterona determina migración linfoide pero de la médula ósea hacia los órganos periféricos, estando en desacuerdo esta interpretación con los datos bibliográficos consultados (COMSA y cols., 1979; LECETA y ZAPATA, 1985; NAKANISHI, 1986) en los que se afirma que las hormonas sexuales determinan depresión del sistema inmune.

Con todo se confirma para Rana perezi la afirmación de FAUCI y DALE (1975) para los mamíferos en cuanto a que las hormonas esteroides movilizan las células linfoides. Concretamente en Rana perezi y en el presente trabajo, se comprueba que respecto de los linfocitos de la médula ósea, la corticosterona tiene un efecto centripeto y la testosterona otro centrífugo.

Atendiendo, por tanto, a las variaciones estacionales en la actividad y síntesis de las células productoras de hormonas esteroides, es posible comprender las variaciones estacionales en los órganos y células linfoides de Rana perezi.

En cuanto a los efectos que la pinealectomía tiene sobre el sistema



inmune de Rana perezi, éstos son: aparición de células reticulares de los órganos linfoides degeneradas, linfopenia en timo y bazo e incremento de linfocitos en la médula ósea y decremento circulante de los linfocitos; siendo exactamente los efectos que sobre el sistema inmune tienen los corticosteroides, interpretándose que la ausencia de glándula pineal activa las células interrenales, como se ha podido comprobar en el presente trabajo y de acuerdo con otros autores (HALDAR y THAPLIYAL, 1979; RALPH, 1984), siendo los corticosteroides por ellas producidos, los que determinan una crisis en el sistema inmune de Rana perezi y no la glándula pineal por sí misma, en desacuerdo con las hipótesis de MAESTRONI y cols. (1986a, 1986b) referidas a que la glándula pineal, modula el sistema inmune mediante la secreción cíclica de los indoles pineales.

Por todo ello, en el presente trabajo en Rana perezi, se asume que la pinealectomía no tiene ningún efecto directo sobre el sistema inmune y si uno indirecto, y negativo, para el sistema, a través de la activación de las células interrenales y la consiguiente producción de corticosteroides.

#### CONCLUSIONES.

1. Rana perezi es una especie igualmente representativa que otras de la familia Ranidae.
2. El timo de Rana perezi presenta células interdigitantes.
3. El sistema inmune de Rana perezi presenta variaciones estacionales, manteniendo a los animales en condiciones constantes de luz y temperatura.
4. Son factores endocrinos los que determinan las variaciones estacionales observadas en el sistema inmune de Rana perezi.
5. Las hormonas esteroides determinan en el sistema inmune, la movilización de los linfocitos, afectándose además las células reticulares de los órganos linfoides.
6. La ausencia de glándula pineal no influye directamente sobre el sistema inmune de Rana perezi.
7. Las hormonas pineales no influyen determinadamente sobre la evolución natural del sistema inmune.

#### BIBLIOGRAFIA.

ACCORDI, F., CIANFONI, P. (1981). Histology and ultrastructure of the adrenal gland of Rhacophorus leucomyctax (Amphibia, Anura). Boll. Zool.,

48: 277.

ACCORDI, F., GALLA, V. P., GRASI MILANO, E. (1981). The adrenal gland of Xenopus laevis (Daudin) (Anura, Pipidae): Histological and ultrastructural observations. *Monitore Zool. Ital. (N.S.)*, 15: 163.

AVTALION, R. R. (1981). Environmental control of the immune response in fish. *Critical Reviews in Environmental Control*, 11 (2): 163.

BALDUZZI, A. (1973). The lymphocyte. Structure and function. Part I. Phylogenetic emergence of lymphoid. *Tissues and Cells*, 1976.

BARRUTIA, M. G., VILLENA, A., RAZQUIN, B., GOMARIZ, R. F., ZAPATA, A. (1985). Presence of presuntive interdigitating cells in the spleen of the natterjack, Bufo calamita. *Experientia*, 41: 1393.

BAZAN-KUBIK, I., SKRZYPIEK, Z. (1980). Involution saisonniere du thymus de Rana ridibunda. *Pañ. Ann. Univ. Marie Curie Skłodowska. Sec. C.*, 35: 207.

BIGAJ, J., PLYTYCZ, B. (1981). Ultrastruktura komerek grasiczych zaby (Ultrastructure of the thymic cells of the frog). *Przegl. Zool.*, 25: 489.

BIGAJ, J., PLYTYCZ, B. (1984a). Cytoarchitecture of the thymus gland of the adult frog (Rana temporaria). *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 22, 1: 63.

BIGAJ, J., PLYTYCZ, B. (1984b). Endogenous rhythms in the thymus gland of Rana temporaria (Morphological study). *Thymus*, 6: 369.

BLAU, J. N., JONES, R. N., KENNEDY, L. A. (1968). Hassall's corpuscles: a measure of the activity in the thymus during involution and reconstitution. *Immunology*, 15: 561.

BRAINARD, G. C., KNOBLER, R. L., PODOLIN, P. L., LAVASA, M., LUBLIN, F. D. (1987). Neuroimmunology: Modulation of the hamster immune system by photoperiod. *Life Sciences*, 40: 1319.

COMSA, J., LEONHARDT, H., OZMINSKI, K. (1979). Hormonal influences on the secretion of the thymus. *Thymus*, 1: 81.

COOPER, E. L., WRIGHT, R. K. (1976). The anuran amphibian spleen. An evolutionary model for terrestrial vertebrates. En: *Immuno-aspects of the spleen*. J. R. Battisto and J. W. Streilin, eds.. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p: 47.

DOUGHERTY, T. F. (1952). Effect of hormones on lymphatic tissue. *Physiol. Rev.*, 32: 379.

EICHLER, V., MOORE, R. (1975). Studies on hydroxiindole-O-metyltransferase in frog brain and retina: Enzymology, regional distribution and environmental control of enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50C: 89.

FAUÇI, A. S., DALE, D. (1975). The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood*, 46: 235.

FEVRE-MONTANGE, M. (1985). La mélatonine. *la presse médicale*, 14, 31: 1659.

FOSTER, R. G., ROBERTS, A. (1982). The pineal eye in Xenopus laevis embryos and larvae: a photoreceptor with a direct excitatory effect on behaviour. *J. Comp. Physiol.*, 145: 413.

FRITSCH, H. A. R., PEHLEMANN, F-W., FALTZ, H. (1977). Effect of partial hepatectomy of the interrenal tissues of Xenopus laevis (Daudin). *Cell. Tiss. Res.*, 179: 197.

GARAVINI, C. (1970). Seasonal variation in the hematic picture in Triturus cristatus. *Riv. Biol.*, 63: 459.

GARRIDO, E. (1986). Cambios morfológicos en los órganos linfoides de Rana perezi tras la inyección de dexametasona en dos épocas distintas del año. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

GROOSMAN, C. J., SHOLITON, L. J., BALHA, G. C., NATHAN, P. (1979). Rat thymic strogen receptor. II. Physiological properties. *J. Steroid Biochem.*, 11: 1241.

HALDAR, C. M., THAPLIYAL, J. P. (1979). Pineal-adrenal relationship in a lizard Calotes versicolor. Gen. Comp. Endocrinol., 39: 414.

HALL, N. R., GOLDSTEIN, A. L. (1981). En: Psychoneuroimmunology. R. Ader, ed.. Academic Press. New York.

HUSSEIN, M. F., BADIR, N., EL RIDI, R., AKEF, M. (1978a). Differential effects of seasonal variation on lymphoid tissue of the lizard, Chalcides ocellatus. Dev. Comp. Immunol., 2:297.

HUSSEIN, M. F., BADIR, N., EL RIDI, R., AKEF, M. (1978b). Effects of seasonal variation on the lymphoid tissues of the lizards, Mabuva quinque-taeniata Licht and Uromastix aegyptia Forsk. Dev. Comp. Immunol., 2: 469.

HUSSEIN, M. F., BADIR, N., ZADA, S., EL RIDI, R., ZAHARAN, W. (1984). Effect of seasonal changes on immune system of the toad Bufo regularis. Bull. Fac. Sci. Cairo Univ., 52: 181.

KORF, H-W., OKSCHE, A., EKSTROM, P., GERY, I., ZIGLER, J. S., KLEIN, D. C. (1986). Pinealocyte projections into the mammalian brain revealed with S-antigen antiserum. Science, 231: 735.

LECETA, J. (1984). Cambios estacionales en el sistema inmune de Mauremys caspica. Papel regulador del sistema neuroendocrino. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

LECETA, J., ZAPATA, A. (1985). Seasonal changes in the thymus and spleen of the turtle Mauremys caspica. A morphometrical, light microscopical study. Dev. Comp. Immunol., 9, Suppl. 4: 653.

LICHT, P., McCREERY, B. R., BARNES, R., PANG, R. (1983). Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids and corticosterone in the bullfrog, Rana catesbeiana. Gen. Comp. Endocrinol., 50: 124.

LOFTS, B., BERN, N. A. (1972). The functional morphology of steroidogenic tissues. En: Steroids in nonmammalian vertebrates. D. R. Idler (ed.). Ac. Press. New York: 37.

LOFTS, B., WELLEN, J. J., BEURAAD, Th. S. (1972). Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, Rana temporaria. III. The gonads and cholesterol cycles. Gen. Comp. Endocrinol., 18: 344.

LUDIN, P., SCHOOLEY, J. C. (1973). The influence of prednisolone and thymectomy on the thoracic duct lymphocyte population of the rat. Lymphology, 6: 90.

MAESTRONI, G., CONTI, A., PIERPAOLI, W. (1986a). Melatonin regulates immunity via an opiate mechanism. Clinical neuropharmacology, 9, 4. Raven Press, New York.

MAESTRONI, J. M., CONTI, A., PIERPAOLI, W. (1986b). Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterona. J. Neuroimmunol., 13: 19.

MANNING, M. J. (1971). The effect of early thymectomy on histogenesis of the lymphoid organs in Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morphol., 26: 219.

MANNING; M. J., HORTON, J. D. (1982). RES structure and function of the amphibia. The reticuloendothelial system. Plenum Press, III: 423.

MANNING, M. J., HORTON, J. D. (1983). Reticuloendothelial system. Structure and function on the amphibia. En: Reticuloendothelial system. A comprehensive treatise, Cohen N. y Sigel M. (eds.). Friedman, p: 423.

MORTON, D. J. (1986a). Mechanism of catalysis of bovine hydroxyindole-O-methyltransferase (EC 2.1.1.4) with various hydroxysubstrates. S. African J. Sciences, 82: 272.

MORTON, D. J. (1986b). Methoxyindole production by the pineal gland appears to be dependent on the concentration of hydroxyprecursors and their affinity for hydroxyindole-O-methyltransferase. J. Endocrinol., 111: 133.

NAKANISCHI, T. (1986). Seasonal changes in the humoral immune response

and the lymphoid tissues of the marine teleost Sebasticus marmoratus. Vet. Immunol. Immunopathol., 12 (1-4): 213.

RALPH, C. L. (1984). Pineal bodies and thermoregulation. En: The pineal gland. Raven Press, New York.

REITER, J. R. (1983). The pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. Psychoneuroendocrinology, 8, 1: 31.

ROSE, J., OLDFIELD, J., STORMSHAK, F. (1987). Apparent role of melatonin and prolactin in initiating winter fur growth in mink. Gen. Comp. Endocrinol., 65: 212.

SAAD, A. H., EL RIDI, R., ZADA, S., BADIR, N. (1984). Effect of hydrocortisone on immune system of the lizard, Chalcidion ocellatus. I. Response of lymphoid tissues and cells to in vivo and in vitro hydrocortisone. Dev. Com. Immunol., 8: 121.

SCHLAGHECKE, R., KLEY, K. (1986). Circadian and seasonal variations of glucocorticoid receptors in normal human lymphocytes. Steroids, 47, 4-5: 287.

SCHULOF, R. S., LOW, T. L. K., THURMAN, G. B., GOLDSTEIN, A. L. (1981). Thymosins and other hormones of the thymus gland. En: The lymphocyte. Alan R. Liss, Inc.: 191. New York.

SOLOMON, G. F., AMKRAUT, A. A. (1981). Psychoneuroendocrinological effects on the immune response. An. Microbiol., 35: 155.

UNSICKER, K. (1975). Fine structure of the male genital tract and kidney in the anuran Xenopus laevis Daudin, Rana temporaria L. and Bufo bufo L. under normal and experimental conditions. I. Testicular interstitial tissue and seminal efferent ducts. Cell. Tiss. Res., 158: 215.

VIKICKY, V.; POLACKOVA, M. (1980). Effects of some hormones on the homing affinity of lymph node cells and monocytes. Fol. Biol. (Phaha), 26: 396.

VIVIEN-ROELS, B.; PEVET, P. (1983). The pineal gland and the synchronization of reproductive cycles with variations of the environmental climatic conditions, with special reference to temperature. *Pineal Research*, 1: 91.

VOLLRATH, L.; OKSCHE, A. (1981). The pineal organ. The pineal complex in amphibians. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.

#### APENDICE:

##### CLAVE:

a: arteria.	n: núcleo.
C: corteza tímica.	P: célula plasmática.
cm: célula mioide.	PB: pulpa blanca esplénica.
cr: célula del tejido cromafín.	PR: pulpa roja esplénica.
g: inclusión lipídica.	q: quiste tímico.
l: retículo endoplásmico liso.	t: trabécula de tejido conjuntivo.
L: linfocito.	ts: túbulo seminífero.
m: mitocondria con crestas tubulares.	v: seno venoso, vénula, vena.
M: médula tímica.	

Marzo-, abril-, etc.	animal sacrificado en marzo, abril, etc..
2C, 4C, etc.	animal control a los 2, 4, etc. días postpinealectomía.
2P, 4P, etc.	animal operado a los 2, 4, etc. días postpinealectomía.
10x, 25x, etc.	aumentos reales del negativo.

MET rejilla.

PAR corte (8 micras) tras inclusión en parafina.

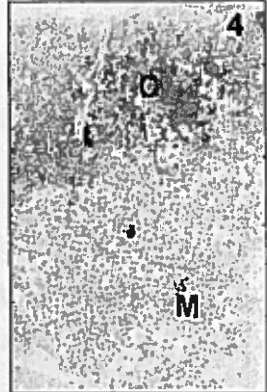
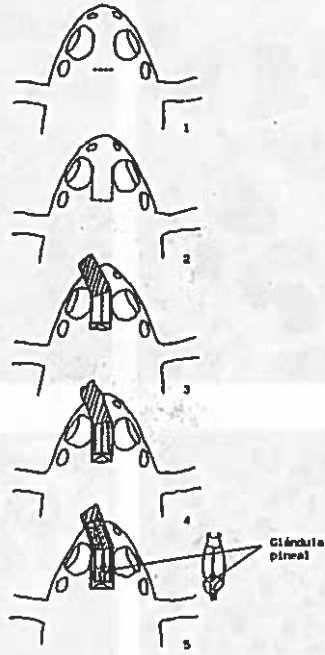
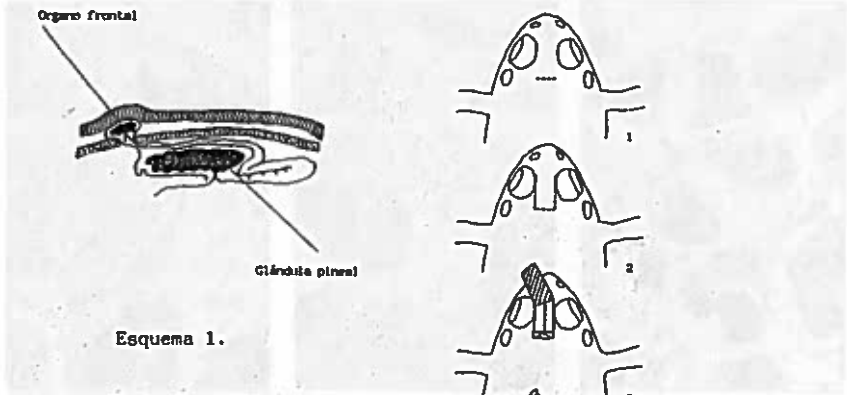
SEMI corte semifino (1 micra).

ESQUEMAS ..... 1 y 2. (Página 24).

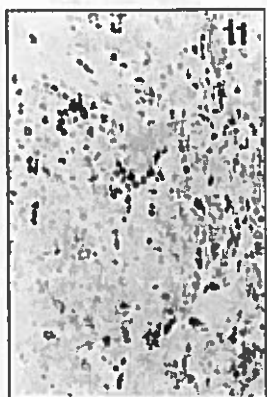
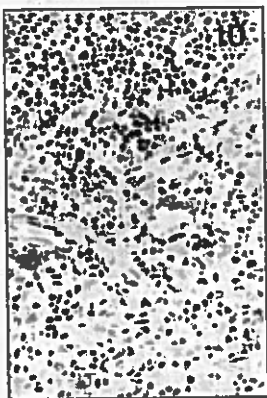
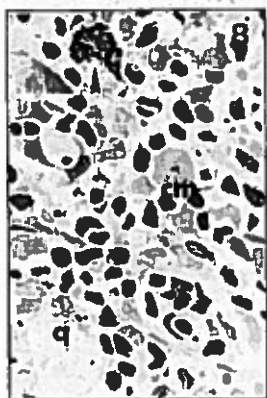
FIGURAS ..... de 1 hasta 24. (Página 25/27).

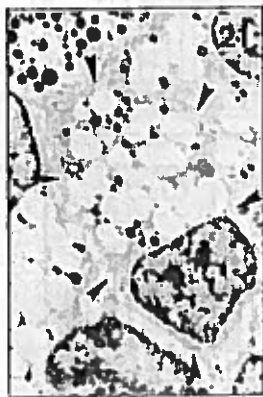
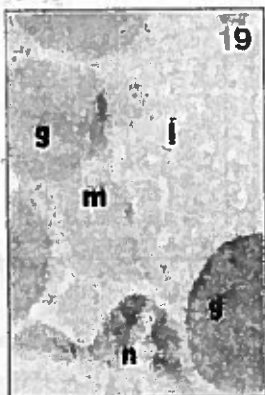
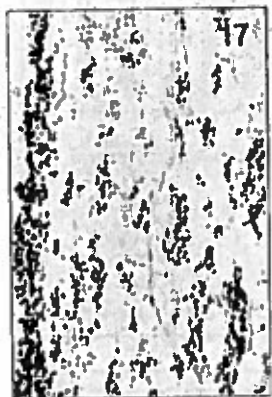
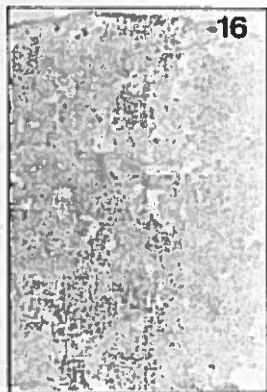
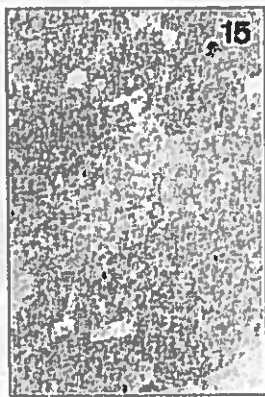
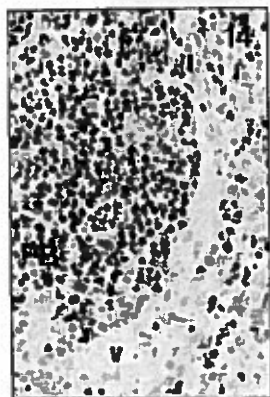
GRAFICAS ..... de 1 hasta 11. (Página 27/29).

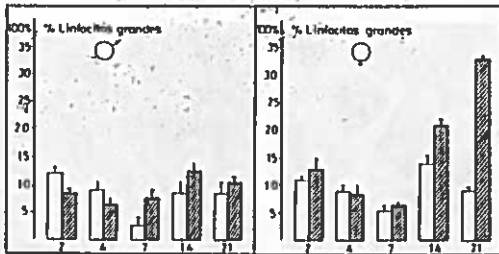
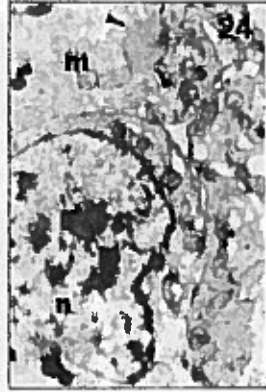
Pie de esquema, figura y gráfica: Página 30/31.



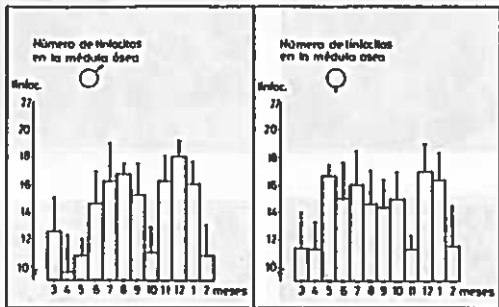




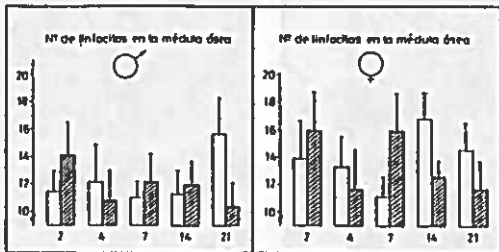




Gráfica 1.

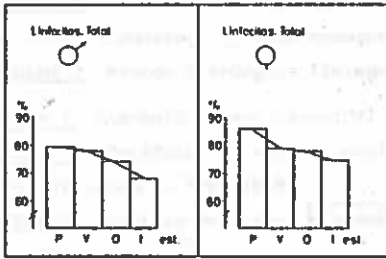


Gráfica 2.

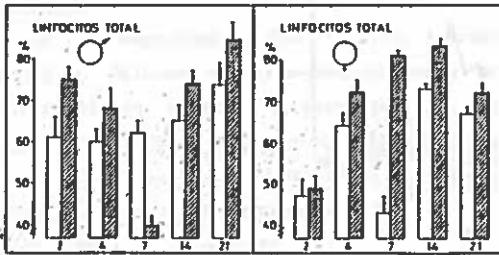


Gráfica 3.

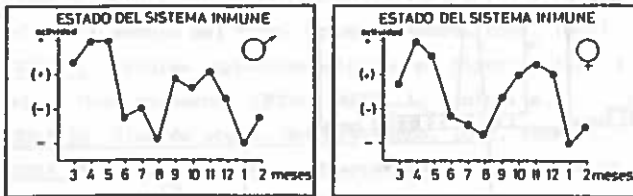
□ PINEALECTOMIA  
 ▨ CONTROL



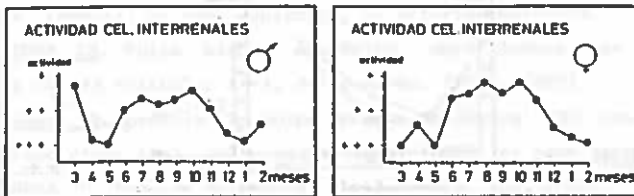
Gráfica 4.



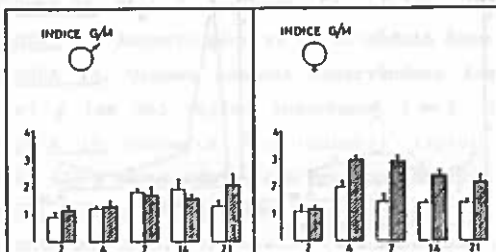
Gráfica 5.



Gráfica 6.

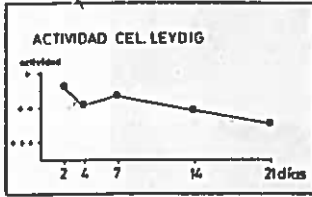


Gráfica 7.

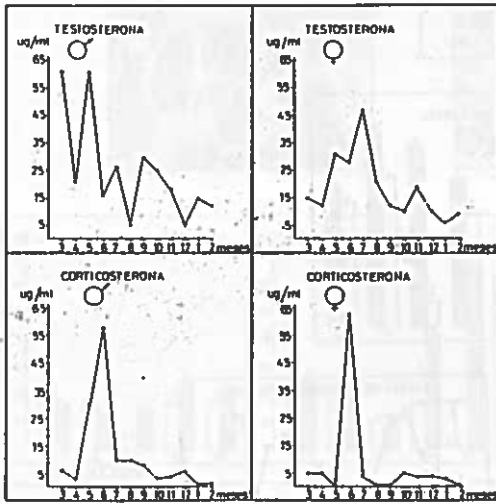


Gráfica 8.

□ PINEALECTOMIA  
▨ CONTROL

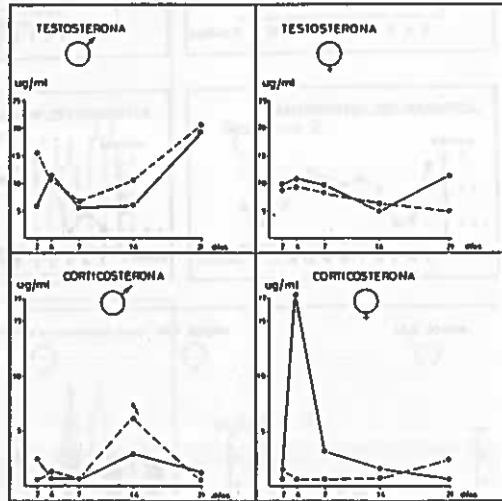


Gráfica 9.



Gráfica 10.

Gráfica 11.



— PINEALECTOMIZADOS  
- - - CONTROLES

**ESQUEMA 1.** Localización del órgano frontal y de la glándula pineal, respecto del cráneo (punteado) y del tegumento (rayado).

**ESQUEMA 2.** Método quirúrgico llevado a cabo para realizar la pinealectomía.

**FIGURA 1.** Glándula pineal extraída. 25x. (PAR).

**FIGURA 2.** Encéfalo de animal control, con la glándula pineal intacta (►). 14C-hembra. 10x. (PAR).

**FIGURA 3.** Encéfalo de animal operado, sin glándula pineal (►). 2P-hembra. 10x. (PAR).

**FIGURA 4.** Aspecto general del timo, apreciándose la corteza (C) y la médula (M). Mayo-hembra. 50x. (SEMIF). t: trabécula.

**FIGURA 5.** Células epitelio-reticulares y sus prolongaciones (►) de la corteza tímica, albergando linfocitos (L). Agosto-macho. 1800x. (MET).

**FIGURA 6.** Células epitelio-reticulares degenerando (►) de la corteza tímica. Octubre-macho. 2100x. (MET). L: linfocito. P: célula plasmática.

**FIGURA 7.** Célula interdigitante (►) en la corteza tímica. Junio-hembra. 3700x. (MET). L: linfocito.

**FIGURA 8.** Célula mioide (cm), quiste tímico (q) y célula de aspecto secretor (►) en la médula del timo. Octubre-hembra. 250x. (MET).

**FIGURA 9.** Células epitelio-reticulares hipertróficas (►) en la médula tímica. Octubre-macho. 1300x. (MET). L: linfocito.

**FIGURA 10.** Timo de otoño. Octubre-macho. 100x. (SEMIF).

**FIGURA 11.** Timo de invierno. Enero-hembra. 100x. (SEMIF).

**FIGURA 12.** Pulpa blanca (PB) y pulpa roja (PR) del bazo. Abril-macho. 50x. (SEMIF). v: vena esplénica, a: arteria esplénica.

**FIGURA 13.** Pulpa blanca esplénica, apreciándose los linfocitos (L) y una célula reticular (►). Julio-macho. 1100x. (MET).

**FIGURA 14.** Acúmulo de pulpa blanca esplénica (PB) con alguna célula de núcleo claro (►). Julio-macho. 100x. (MET). v: seno venoso.

**FIGURA 15.** Bazo de primavera. Abril-hembra. 25x. (PAR).

**FIGURA 16.** Bazo de invierno. Enero-macho. 25x. (PAR).

**FIGURA 17.** Aspecto general de la médula ósea. Abril-macho. 50x. (PAR).

**FIGURA 18.** Órgano adrenal observándose las células del tejido cromafín (cr) y las del tejido interrenal (►). Diciembre-hembra. 510x. (MET).

**FIGURA 19.** Gránulos (inclusiones) lipídicos (g), retículo endoplásmico liso (l) y mitocondrias con crestas tubulares (m), en una célula interrenal. Marzo-hembra. 18000x. (MET). n: núcleo.

**FIGURA 20.** Célula interrenal (►) en estado activo. 4C-macho. 2700x. (MET).

**FIGURA 21.** Célula interrenal (►) en estado inactivo. Marzo-macho. 2100x.

(MET).

FIGURA 22. Espacio intertubular (►) del testículo. Abril-macho. 100x. (SEMIF). ts: túbulo seminífero.

FIGURA 23. Célula de Leydig (►) inactiva. Julio-macho. 3700x. (MET). v: vaso sanguíneo.

FIGURA 24. Célula de Leydig activa, apreciándose una inclusión lipídica electrodensa (►). Abril-macho. 5300x. (MET). m: mitocondrias con crestas tubulares, n: núcleo.

GRAFICA 1. Proporción de la presencia de linfocitos grandes, en 1500 micras cuadradas de la corteza tímica en animales pinealectomizados y en animales control.

GRAFICA 2 y 3. Valor medio del número de linfocitos presentes en la médula ósea (en 7000 micras cuadradas) a lo largo de los 12 meses del año y (Gráfica 2), y en animales pinealectomizados y en animales control (Gráfica 3).

GRAFICA 4 y 5. Proporción de linfocitos circulantes a lo largo de las cuatro estaciones del año (Gráfica 4) y, en animales pinealectomizados y en animales control (Gráfica 5).

GRAFICA 6. Estado del sistema inmune a lo largo de los 12 meses del año.

GRAFICA 7. Actividad de las células interrenales a lo largo de los 12 meses del año.

GRAFICA 8. Cociente entre el tamaño de los gránulos y el de las mitocondrias de las células interrenales, en animales pinealectomizados y en animales control.

GRAFICA 9. Actividad de las células de Leydig a lo largo de los 21 días del experimento.

GRAFICA 10 y 11. Niveles circulantes de testosterona y corticosterona, a lo largo de los doce meses del año (Gráfica 10) y, en animales pinealectomizados y en animales control (Gráfica 11).