



TESIS DOCTORAL

ISABEL TOVAR GARCIA

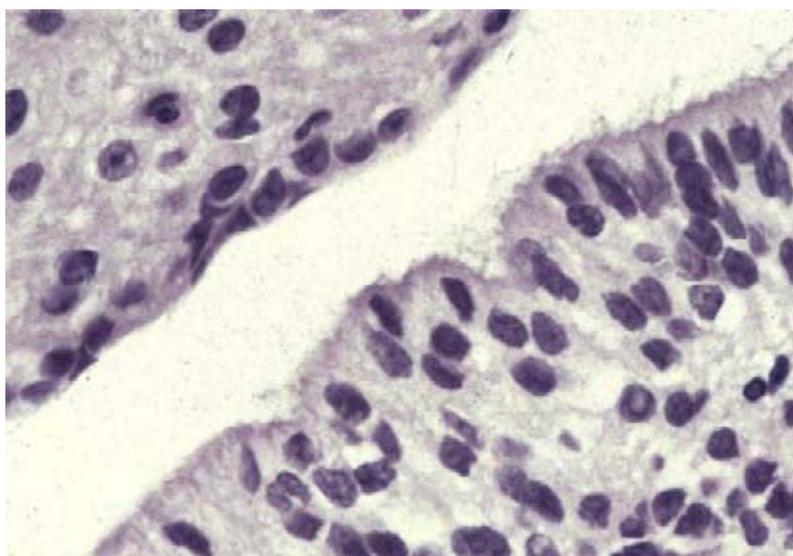
CACERES, 2006

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>



LA INFLUENCIA DEL ESTRES DE MANEJO EN LA HISTOFISIOLOGIA DEL HIPOTALAMO Y LA PINEAL DE LA OVEJA. EFECTO DE LA MELATONINA.



**LA INFLUENCIA DEL ESTRES DE MANEJO
EN LA HISTOFISIOLOGIA DEL HIPOTALAMO Y
LA PINEAL DE LA OVEJA.
EFECTO DE LA MELATONINA**

MEMORIA

Que Presenta La Licenciada En Medicina Y Cirugía

Dña Isabel Tovar García

Para Obtener El Grado De Doctor.

Cáceres, Febrero De 2006.

Fdo.: Isabel Tovar García



ELOY REDONDO GARCIA, ANTONIO FRANCO RUBIO Y ANTONIO JAVIER MASOT GOMEZ-LANDERO, Profesores Titulares del Departamento de Medicina y Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“LA INFLUENCIA DEL ESTRES DE MANEJO EN LA HISTOFISIOLOGIA DEL HIPOTALAMO Y LA PINEAL DE LA OVEJA: EFECTO DE LA MELATONINA”** ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Licenciado en MEDICINA Y Cirugía **Dña. ISABEL TOVAR GARCIA**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos donde proceda firmamos el presente certificado en Cáceres, a 1 de Febrero de 2006.

Fdo. Eloy Redondo

Fdo. Antonio Franco

Fdo. Antonio Javier Masot

A mis hijos, que me regalan tantas horas.

*A Gaspar que, además, me prestó una
paciente e incondicional ayuda, en la
elaboración técnica.*

INDICE

INDICE

GRUPO INVESTIGADOR	19
INTRODUCCION	
La Glándula Pineal En Mamíferos: Recordatorio Histórico	25
Recordatorio Histórico Sobre El Desarrollo De La Glándula Pineal...	25
Recordatorio Histórico Sobre La Luz Y La Glándula Pineal	34
Histofisiología De La Glándula Pineal : Secreción De Melatonina	37
Melatonina: Síntesis, Secrección Y Metabolismo.....	37
Histofisiología De La Glándula Pineal Humana.....	42
Histofisiología de la glándula pineal ovina.....	46
Bienestar,Estrés Animal Y Melatonina.....	49
Finalidad De la Investigación	51
Antecedentes Y Estado Actual Del Tema	52
Originalidad E Innovación Del Tema	64
Grupos De Investigación Que Trabajan En El Tema	65
OBJETIVOS	
Hipótesis De Partida	69
Resultados Previos Del Grupo De Trabajo	70
Desarrollo Prenatal De La Glándula Pineal Ovina.....	70
Desarrollo Postnatal De La Glándula Pineal Ovina.....	74
Objetivos Globales	85
Objetivos Generales.....	85
Objetivos Concretos.....	86
MATERIAL Y METODOS	
Desarrollo de la Experiencia	89
Análisis Macroscópicos	93
Aspecto Macroscópico Y Situación Anatómica De La Pineal.....	93
Peso, Longitud Glandular Y Pigmentación Glandular.....	93

INDICE

Análisis Estructural De La Pineal	94
Inmunodetección Estructural De Marcadores Específicos De:	
Pinealocitos (SYNAP, NNE, NSE).....	95
Células Intersticiales (PTAH,GFAP, VIM).....	96
Fibras Nerviosas (VIP, NPY).....	97
Melatonina.....	97
Análisis Histomorfométrico Y Estadístico De La Glándula Pineal:	
Nº Total De Pinealocitos Y De Células Intersticiales Por Area De Referencia (Células SYNAP + Y Células GFAP+).....	98
Volumen Promediado De Pinealocitos Y Células Intersticiales.....	98
Histoquímica Cuantitativa De La Presencia De Fibras Nerviosas NPY y VIP En Area De Referencia.....	98
Histoquímica Cuantitativa De La Presencia Melatonina En Área De Referencia.....	98
Volumen Glandular.....	99
Análisis Ultraestructural De La Pineal	100
Inmunodetección Ultraestructural De Marcadores Específicos De:	
Pinealocitos (SYNAP).....	101
Células Intersticiales (GFAP).....	101
Análisis Ultraestructural Cuantitativo En Glándula Pineal De:	
REG.....	102
C. Golgi.....	102
Mitocondrias.....	102
Lisosomas.....	102
Gotas Lipídicas.....	102
ISH Para ARN_m De Los B₁ Adrenoreceptores En Pinealocitos	103
Densidad De Inmunomarcaje Del ARN_m De Los B₁ Adrenoreceptores	104
Configuración Estructural De Los NSQ Del Hipotálamo	104
Inmunodetección En Hipotálamo De Neurotrofinas Y Proteínas De Golpe De Calor	104

INDICE

Densidad De Inmunomarcaje De Neurotrofinas Hipotalámicas Y Proteínas De Golpe De Calor.....	105
IHQ Para Los Receptores MT₁ En Los NSQ Del Hipotálamo.....	106
Densidad De Inmunomarcaje De MT₁ En Los NSQ Del Hipotálamo...	106
Determinación Por RIA De Las Concentraciones Séricas De Corticosterona.....	107
Determinación Por RIA De Las Concentraciones De Melatonina.....	107
HPLC Para MT En Glándula Pineal.....	108
Determinación De Niveles De Inmunoglobulinas.....	109
Análisis De Datos.....	110
Análisis De Varianza Multifactorial.....	110
RESULTADOS	
Tablas Resumen de los Resultados Obtenidos	113
Análisis Macroscópico	
Aspecto Macroscópico Y Situación Anatómica De La Pineal.....	116
Peso, Longitud Glandular Y Pigmentación Glandular.....	118
Análisis Estructural De La Pineal.....	123
Inmunodetección Estructural De Marcadores Específicos De:	
Pinealocitos (SYNAP, NNE, NSE).....	133
Células Intersticiales (PTAH,GFAP, VIM).....	139
Fibras Nerviosas (VIP, NPY).....	142
Melatonina.....	144
Análisis Histomorfométrico Y Estadístico De La Glándula Pineal:	
Nº Total De Pinealocitos Y De Células Intersticiales Por Area De Referencia (Células SYNAP + Y Células GFAP+).....	145
Volumen Promediado De Pinealocitos Y Células Intersticiales.....	148
Porcentaje De Fibras VIP Y NPY En Area De Referencia.....	151
Presencia Porcentual De Melatonina En Área De Referencia.....	153
Volumen Glandular.....	154

INDICE

Análisis Ultraestructural De La Pineal	155
Inmunodetección Ultraestructural De Marcadores Específicos De: Pinealocitos (SYNAP).....	164
Células Intersticiales (GFAP).....	166
Análisis Ultraestructural Cuantitativo En Glándula Pineal De:	
Mitocondrias.....	168
C. Golgi y REG.....	169
Lisomas Gotas Lipídicas.....	170
ISH Para ARN_m De Los B₁-Adrenoreceptores En Pinealocitos	172
Densidad De Inmunomarcaje Del ARN_m B₁-Adrenoreceptor	173
Configuración Estructural De Los NSQ Del Hipotálamo	174
Inmunodetección En Hipotálamo De Neurotrofinas Y Proteínas De Golpe De Calor	176
Densidad De Inmunomarcaje De Neurotrofinas Hipotalámicas Y Proteínas De Golpe De Calor	178
IHQ Para MT₁ En Los NSQ Del Hipotálamo	180
Densidad De Inmunomarcaje De MT₁ En Los NSQ Del Hipotálamo	180
Determinación Por RIA De Las Concentraciones De Corticosterona	182
Determinación Por RIA De Las Concentraciones De Melatonina	185
HPLC Para MT En Glándula Pineal	187
Determinación De Niveles De Inmunoglobulinas	189
DISCUSION	
Análisis E Interpretación De Los Resultados	193
CONCLUSIONES	
Contribuciones Científico-Técnicas Del Proyecto	211
Beneficios Y Resultados Transferibles	212
BIBLIOGRAFIA	213
AGRADECIMIENTOS	241

GRUPO INVESTIGADOR

**RELACION DEL PERSONAL INVESTIGADOR PARTICIPANTE EN LA
TESIS DOCTORAL**

GRUPO INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Investigador Responsable:

Apellidos: TOVAR GARCIA	Nombre: ISABEL
DNI: Sexo: H	Año de nacimiento: 1955
Titulación académica: MEDICINA	Grado: Licenciado
Categoría profesional: FEA DEL SES	Situación laboral: Plantilla

Directores de la Tesis Doctoral:

Apellidos: REDONDO GARCIA	Nombre: ELOY
DNI: 6.974.590 R Sexo: V	Año de nacimiento: 1959
Titulación: VETERINARIA	Grado: Doctor
Categoría profesional: TITULAR	Situación laboral: Plantilla
UNIVERSID.	

Apellidos: FRANCO RUBIO	Nombre: ANTONIO
DNI: 6.967.047X Sexo: V	Año de nacimiento: 1965
Titulación: VETERINARIA	Grado: Doctor
Categoría profesional: TITULAR	Situación laboral: Plantilla
UNIVERSID.	

Apellidos: MASOT GOMEZ LANDERO	Nombre: ANTONIO JAVIER
DNI: 8.812.083 R Sexo: V	Año de nacimiento: 1964
Titulación: VETERINARIA	Grado: Doctor
Categoría profesional: TITULAR	Situación laboral: Plantilla
UNIVERSID.	

Resto de Investigadores:

Apellidos: GAZQUEZ ORTIZ	Nombre: ANTONIO
DNI: 30.060094 Sexo: V	Año de nacimiento: 1950
Titulación: VETERINARIA	Grado: Doctor
Categoría profesional: CU.	Situación laboral: Plantilla

INVESTIGADORES DE OTRAS ENTIDADES

Entidad: DPTO. DE FISILOGIA. UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. FAC. MEDICINA	ARGENTINA
Apellidos: CARDINALLI	Nombre: DANIEL P.
D.N.I.: 4420993	Año de nacimiento: 1943
Sexo: V	Grado: Doctor
Titulación: MEDICINA	
Categoría profesional: CU.	Situación laboral: Plantilla

Entidad: DPTO. DE FISILOGIA. UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. FAC. MEDICINA	ARGENTINA
Apellidos: CUTRERA	Nombre: RODOLFO
D.N.I.: 11553138	Año de nacimiento: 1955
Sexo: V	Grado: Doctor
Titulación: BIOLOGIA	
Categoría profesional: TU.	Situación laboral: Plantilla

INTRODUCCION

LA GLANDULA PINEAL EN MAMIFEROS: RECORDATORIO HISTORICO**RECORDATORIO HISTORICO SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLANDULA PINEAL**

Según el neuroanatomista **KAPPERS** (1979), la primera mención de la glándula pineal la encontramos en el Mundo Griego. **HEROFILO DE ALEJANDRÍA** (325-280 a. J.C.) afirmaba que este órgano actuaba como “*esfínter que controla el flujo de pensamientos*”. La descripción tan precoz de la epífisis se debe fundamentalmente a su situación en el SNC, que desde siempre atrajo la atención, al suponerse que en él estarían situadas las facultades específicamente humanas.

Estas ideas iniciales serían recogidas y ampliadas por **ARISTOTELES** (384-328 a. J.C.). Según este autor, el alma tiene tres facultades que residen en las tres partes del sistema ventricular: “*fantasía*” situada en los ventrículos laterales; “*anamnesis*” ubicada en el tercer ventrículo; y por último “*mneme*” situada en el cuarto ventrículo. De esta forma por su situación entre el tercer y cuarto ventrículo, a la pineal se le asignaba un papel de esfínter en el control de la circulación de ideas en el sistema ventricular. En este sentido la antigua literatura india recoge la idea de que la epífisis “*es un órgano de clarividencia y meditación que podría permitirnos el recordar las vivencias pasadas*”.

GALENO (130-200 d.J.C.) quitó importancia funcional a la pineal al considerarla como una glándula linfática. Desde el punto de vista morfológico, debido a su aspecto piriforme en algunas especies, le daría el nombre de “*coronarium*”, término que aún hoy en día continúa empleándose.

VESALIO (1514-1564) en su obra “*De Humanis Corporis Fabrica*” publicada en 1543, describía la situación anatómica de la glándula, señalando que dicho órgano no forma parte del cerebro, pero se apoya sobre los tubérculos cuadrigéminos anteriores.

DESCARTES (1596-1656), recogiendo en gran parte la idea de la filosofía griega, llega a afirmar que la epífisis es el asiento del alma racional. La pineal,

situada en el centro del sistema ventricular, sería la encargada de extraer ciertas partículas de la sangre y convertirlas en espíritus animales que, posteriormente serían vehiculados hasta las diferentes partes del sistema ventricular.

STENON (1638-1686) abandona las teorías de Descartes, y en su obra *“Discours sur L’anatomie du cerveau”*, publicada en 1670, demostró que la pineal se situaba en posición dorsal respecto al sistema ventricular (y no en el centro) y, además, sus uniones con las meninges la convertían en un elemento inmóvil lo que impedía cualquier papel de esfínter de los espíritus animales.

DIEMERBROECK (1609-1674) en la obra *“Opera omnia anatomica et medica”*, publicada en 1685, describía de forma certera la situación de la glándula pineal en distintas especies, detallando el mayor tamaño en cordero y ternero que en el hombre.

Tras un siglo de silencio, en el siglo XIX renacía el interés por dicha glándula. **TIEDEMANN** (1823) detallaba el desarrollo de la epífisis en fetos humanos de tres meses, originando a los cuatro meses de gestación una glándula pequeña y redondeada. *“En el séptimo mes es un pequeño cuerpo blando, que pasa a ser alargado al noveno mes”*.

CLARKE (1862) describía a la epífisis formada por células de núcleo redondeado y granuloso. En 1866 **LEYDIG** narraba la presencia de fibras nerviosas en pineal.

Las distintas opiniones de los investigadores de la segunda mitad del siglo XIX podemos clasificarlas de la siguiente manera:

Primera: se atribuía a la glándula pineal una estructura comparable a la de los ganglios linfáticos (**HENLE**, 1887).

Segunda: Se consideraba que la glándula estaba formada por elementos nerviosos (**DARKSCHE-WITSCH**, 1886).

Tercera: Se admite la naturaleza neurológica (elementos epiteliales modificados) de las células glandulares (**WEIGERT**, 1895).

Cuarta: las células glandulares son de naturaleza mixta (epiteliales y/o nerviosas) (**HAGEMANN**, 1872).

La hipótesis de la inhibición gonadal por parte de la pineal, planteada por **GUTZEIT** (1896) al asociar la existencia de un tumor pineal a 1 síndrome de desarrollo sexual precoz, quedó promulgada por **MARBURG** (1930), quien describía a la pineal como una glándula endocrina con acción inhibitoria sobre el desarrollo y la función gonadal.

DIMITROVA (1901) describía en la pineal una *zona periférica*, con poca cantidad de células y dispersa; y otra central con abundancia celular y distribución regular.

JORDAN (1911) apuntó que la pineal ovina inicia su desarrollo como una evaginación del techo diencefálico; y en su crecimiento adoptaba formas redondeadas, con recesos superficiales y continuos hacia el tercer ventrículo. No encontró evidencias morfológicas de que el cuerpo pineal tenga función glandular.

FOA (1912) demostró experimentalmente que la pinealectomía producía un desarrollo precoz de los caracteres sexuales secundarios.

ROUX (1937) describe la pineal envuelta en una cápsula de tejido conectivo que la relaciona con los plexos coroideos. Este tejido penetra en el interior de la cápsula formando finas trabéculas; se trata de un tejido conectivo fibroso, especialmente abundante en el vértice de la glándula. Afirmaba *“que el tejido conectivo suele faltar en embriones y animales jóvenes, y siempre era más abundante en équidos y cerdos que en ovinos”*.

BARGHMANN (1943) señaló que la pineal de los mamíferos se originaba a partir del área endodimaria diencefálica, situándose entre las comisuras habenular y posterior.

MIKAMI (1951) estudió las células parenquimatosas de la epífisis de caballo, cerdo y cabras, encontrando gránulos argentófilos, tanto en el citoplasma como en las prolongaciones. Además observó pigmentos de melanina y lipofuscinas, que según el Autor hacen de la epífisis un órgano endocrino y no degenerado.

BRACK (1962) en su trabajo *“Morpho-und histogene-tische Untersuchungen der Epiphysis cerebro von Rind”* describía la evolución de la glándula pineal bovina a lo largo del desarrollo, cifrando la presencia del esbozo pineal en

embriones de 4 cm. de longitud; el tamaño final de la glándula pineal se adquiriría hacia los 60 cm.

FRAUCHIGER (1963) consideraba a la epífisis compuesta por dos zonas, glandular y neuronal, diferentes ontogénicamente. Además señaló que en la vaca y la oveja los pinealocitos no son de origen neuroectodérmico, sino que derivan de células mesenquimatosas, que a lo largo del desarrollo embrionario se diferenciaban en pinealocitos, mientras las células intrínsecas del esbozo pineal evolucionaban a células gliales.

ANDERSON (1965) señaló que la glándula pineal de bovinos y ovinos iniciaba su desarrollo como una evaginación del techo diencefálico; evaginación que posteriormente se verá rodeada de células endimarias. En su proceso diferenciador la pineal se alargaba, adoptando una morfología sacular, para posteriormente comenzar a diverticularse.

WARTENBERG Y GUSERK (1965) realizaron un estudio ultraestructural sobre la epífisis de conejo, poniendo de manifiesto la existencia en los pinealocitos de prolongaciones y mazas terminales; además, estas células mostraban mayor cantidad de retículo endoplásmico liso que rugoso, escasos ribosomas y mitocondrias de disposición perinuclear. El núcleo pobre en cromatina, mostraba un nucléolo poco desarrollado. Por último describían la presencia de fibras gliales en escasa cantidad.

ARSTILA (1967) en pinealocitos de rata, a parte de las características genéricas que coinciden con lo referenciado por **WARTENBERG Y GUSERK** (1965), destacaron la presencia de mitocondrias abundantes, tanto en pericarion como en prolongaciones, próximas a las barras sinápticas. En el citoplasma de pinealocitos referenciaron la presencia de filamentos cuyo diámetro oscilaba entre 0.5 y 4 micras de diámetro.

BOSTELMAN (1968) sugería que el contenido lipídico de los pinealocitos de rata se encontraba ligado a la actividad funcional de la glándula pineal, pues observó la liberación de gotas lipídicas hacia el espacio perivascular.

WELSER Y COL. (1968) estudiaron la ultraestructura del pinealocito canino, describiéndolo como una célula redondeada y con pocos procesos citoplasmáticos. Acompañando a este tipo celular más común, también

pusieron de manifiesto la presencia de pinealocitos oscuros, con núcleo más pequeño y mayor número de organoides citoplasmáticos.

WARTENBERG (1968) en mono y gato describían dentro de las células de la glía, la existencia de tres tipos celulares: astrocitos fibrosos, astrocitos citoplasmáticos, y células de la glía con procesos más pequeños y delgados, localizados fundamentalmente en las proximidades de los vasos sanguíneos.

GONZALEZ Y ALVAREZ-URIA (1970) analizaron las características ultraestructurales de la célula intersticial de la glándula pineal en rata adulta, destacando: núcleo oval, complejo de Golgi muy desarrollado y mitocondrias alargadas de aspecto granuloso.

BAYEROVA Y MALINSKI (1972) realizaron un estudio ultraestructural cuantitativo de los pinealocitos de rata desde el nacimiento hasta la pubertad. Constataron que el volumen relativo celular, aumentó a consta del volumen relativo del núcleo, no encontrando cambios significativos en el volumen de los organoides protoplasmáticos.

ROMIJN (1973) distinguía dos tipos de pinealocitos en la glándula pineal de conejo; unos claros situados en la corteza y la médula del órgano; y otros oscuros, localizados en la zona medula. La abundante presencia de gránulos pigmentarios en los pinealocitos oscuros, diferenciaba ambos tipos celulares.

SHERIDAN Y REITER (1973) en hámster, señalaban que el núcleo del pinealocito presentaba un borde marginal de cromatina, formando un estrechamiento relacionado con la envoltura nuclear.

QUAY (1974) describía la existencia de tres fases en el desarrollo de la pineal:

- 1.- *Fase Morfogénética*, desde la diferenciación hasta el nacimiento.
- 2.- *Fase de Proliferación Glandular*, desde la diferenciación hasta después del nacimiento.
- 3.- *Fase de Hipertrofia y Diferenciación Celular*, desde el nacimiento hasta la duodécima semana de vida extrauterina.

BOYA Y ZAMORANO (1975) encontraron en la pineal de pollo dos áreas distintas: los folículos, formados por dos categorías celulares (células pineales

A y B), y la zona parafolicular, que rodea y separa los folículos de las paredes conectivas.

PEVET (1977) en sus investigaciones en epífisis de distintos tipos de mamíferos distinguía dos tipos celulares: pinealocitos tipo I y tipo II, pudiéndose incluir en ambos tipos, tanto los pinealocitos oscuros como los claros. Los tipo I, representaban la mayoría de la población celular epifisaria; los tipo II eran una población minoritaria y se situaban preferentemente en los espacios extracelulares y perivasculares. Señalaba igualmente, que el tipo I aparecía en: rata, erizo, topo, lirón, perro, oveja y cabra; y los de tipo II en: murciélago, rata, ratón cobaya, topo, chinchilla, macao, ardilla y conejo.

MOLLER Y COL. (1978) realizaron una demostración inmunohistoquímica de la GFAP en las células intersticiales de la glándula pineal de rata adulta, detectando inmunopositividad diseminada por toda la glándula.

BOYA Y CALVO (1979) en sus estudios sobre pineal de gallinas adultas, destacaron un gran desarrollo de organoides citoplasmáticos en pinealocitos de animales adultos; en jóvenes se evidenciaba menor desarrollo. En lo referente al estroma, gran cantidad de fibras de colágeno en adulto, a diferencia de jóvenes.

HWANG (1982) Detallaba la presencia de tres tipos de células parenquimatosas (aunque las consideraba el mismo tipo celular, pero en diferentes estadios ontogénicos) pinealocitos, células gliales y células pigmentadas.

CALVO Y BOYA (1983) describían en pineal de rata la presencia de pinealocitos tipo I y II, de acuerdo a las características ultraestructurales y a su localización dentro del parénquima pineal.

COZZI Y FERRANDI (1984) analizaron ultraestructural e histoquímicamente la glándula pineal de los équidos, observando la presencia de gránulos pigmentarios.

URIA Y COL. (1984 a, b) clasificaron los capilares intrapineales en la rata adulta, como de tipo no fenestrado. Este mismo tipo de capilares fue observado por **BOYA Y COL.** (1995) en la glándula pineal de gatos adultos; también describían la presencia de fibras nerviosas amielínicas.

CALVO Y BOYA (1984 a, b) y **BOYA Y CALVO** (1984) estudiaron el desarrollo postnatal de la glándula pineal de rata, destacando que todos los componentes pineales mostraron cambios regresivos de diferente intensidad, con la edad. En los pinealocitos tipo I: incremento en los cuerpos densos y la masiva presencia de células vesiculazas; en los pinealocitos tipo II, depósitos de lipofuscinas. Por otra parte, con la edad, se detectó un incremento del tejido conectivo y de las concreciones calcáreas en la cápsula pineal.

ZANG Y COL. (1985) estudiaron mediante la técnica inmunoperoxidasa anti GFAP los astrocitos de la pineal en la oveja. Encontraron unas células muy numerosas y desarrolladas, con estructuras en forma de cesta y multitud de prolongaciones citoplasmáticas que rodean a los pinealocitos.

RUIZ-NAVARRO (1986), en sus investigaciones en ratas normales y castradas, defendían que los pinealocitos claros y oscuros detectados, eran el mismo tipo celular en distinta fase de actividad.

COZZI (1986) en sus investigaciones en la pineal de caballo encontró tres tipos celulares: pinealocitos, de distribución regular; células intersticiales, de distribución perivascular y células grandes con contenido melánico. Los mismos tipos celulares fueron definidos por **CALVO Y COL.** (1988 a, b; 1990) en sus estudios sobre glándula pineal de perros; si bien hemos de decir que a las células intersticiales las definían como astrocitos.

CALVO Y COL. (1988) demostraron la presencia de tres antígenos gliales en la glándula pineal de rata: Proteína Glial Fibrilar Acida (GFAP), Vimentina (VIM) y S-100. La morfología, distribución tisular y relaciones, fue similar a la descrita por **CALVO Y BOYA** (1984), para la segunda población celular pineal.

REDECKER Y COL. (1989) demostraron la presencia de células inmunopositivas a GFAP y VIM en los espacios perivasculares de la glándula pineal de *Mongolian gerbil*.

REDECKER Y COL. (1990) detectaron mediante técnicas inmunohistoquímicas para detección de pinealocitos, la presencia de células synaptophysin positivas (SYNAP), y enolasa neuronal específica positivas (NSE), regularmente distribuidas por todo el parénquima pineal de *Meriones unguiculatus*.

CIECIURA Y KRAKOWSKI (1991) detallaron la presencia de uniones tipo *gap junctions* entre pinealocitos, entre células intersticiales y entre fibras nerviosas.

MOLLER (1992) distinguía en la inervación de la glándula pineal de los mamíferos la existencia de fibras nerviosas tanto simpáticas como parasimpáticas. Las fibras simpáticas tienen su origen en el ganglio terigopalatino y eran inmunoreactivas al NPY; las fibras parasimpáticas se originaban en el ganglio cervical superior y eran inmunoreactivas al VIP.

CALVO Y BOYA (1992) describían la presencia de células pigmentadas en la pineal de gato, a partir del segundo día de vida postnatal.

LOPEZ-MUÑOZ (1992 a, b) definían a los pinealocitos tipo II como células intersticiales, aduciendo su naturaleza glial, dada su inmunoreactividad frente a GFAP y VIM.

BOYA Y CALVO (1993) describían la expresión de los antígenos GFAP y VIM en la glándula pineal de gato y perro, desde el primer día postnacimiento hasta el estado adulto. Estos mismos antígenos fueron detectados en pineal de rata durante el desarrollo postnatal por **BORREGON Y COL.** (1993).

En 1994, **SATO Y COL.** Utilizando como marcadores de pinealocitos NSE y SYNAP, diferenciaban dentro del parénquima pineal bovino dos zonas: corteza y médula. Estos mismos autores (**SATO Y COL.**, 1995) detallaron el mapa de distribución de células NSE positivas, en la glándula pineal de la gallina durante el desarrollo postnatal.

SUZUKI Y KACHI (1995) concluyeron en sus estudios inmunohistoquímicos sobre las células de soporte glial en la glándula pineal de ratas adultas, que el patrón de distribución y la naturaleza inmunohistoquímica de las células gliales, mostraba diferencias regionales dentro del parénquima pineal.

REDONDO Y COL. (1996) analizaron el desarrollo prenatal de la pineal de la oveja, destacando la presencia de tres tipos celulares: pinealoblastos, células intersticiales y células pigmentadas. En esta misma especie, **FRANCO Y COL.** (1997) definían a la segunda población celular como un conjunto de células de naturaleza glial-astrocitaria en diversos estadios de maduración. Profundizando en la caracterización de la segunda población celular durante el desarrollo pre y

postnatal, **REDONDO Y COL.** (2001 a) reportaron que estas células eran menos numerosas que los pinealocitos y ocupaban los espacios perivasculares. Estos mismos autores **REDONDO Y COL.** (2001 b), reflejaron una hipotética actividad funcional de la glándula pineal de la oveja durante la vida intrauterina.

La presencia de fibras nerviosas inmunoreactivas a NPY y VIP, ha sido demostrada en la glándula pineal de hámster, de rata, y de oveja durante el desarrollo pre y postnatal (**MOLLER Y COL.** 1998; **MIKKELSEN Y MOLLER,** 1999; **REGODON Y COL.,** 1998 a; y **REDONDO Y COL.,** 2003 a, b).

HIRA Y COL. (1998) observaron en la periferia de la pineal de rata, gran cantidad de fibras nerviosas simpáticas, inmunoreactivas a la tirosina-hidrolasa.

FENG Y COL. (1998) investigaron la presencia de células NSE, NNE y SYNAP en la pineal de rata durante el desarrollo postnatal. Cuantitativamente, la presencia de células NSE positivas fue dos veces mayor que la de NNE y SYN, lo que les hizo pensar que existían diferencias en la fisiología celular.

REGODON Y COL. (1998 a,b) analizaron la estructura de la glándula pineal ovina durante la vida intrauterina encontrando un parénquima con pinealocitos, células intersticiales y células pigmentadas; y un estroma, formado porseudolóbulos, integrados por septos de fibras reticulares y/o de colágeno, y también capilares sanguíneos no fenestrados y fibras nerviosas amielínicas.

LEWZUK Y PRYBYLSKA-GRONOWIZS (2000 a, b) en sus experiencias en cerdos, apuntaron que las modificaciones ultraestructurales de los pinealocitos, sometidos a diferentes fotoperiodos naturales, o distintos ciclos de luz/oscuridad, afectaban a volumen relativo de mitocondrias, retículo endoplásmico granular, complejo de Golgi y gotas lipídicas.

KARASEK Y ZIELINSKA (2000) en un estudio comparativo sobre la ultraestructura de los pinealocitos, en 8 especies de mamíferos, encontraron una gran similitud en la morfología celular; hasta el punto de afirmar que los pinealocitos eran cualitativamente similares, existiendo solamente diferencias cuantitativas, a destacar, el gran desarrollo de los cuerpos membranosos en cerdo; la abundante presencia de gránulos de pigmento en caballo; la nutrida existencia de concreciones calcáreas en el gerbil; y las diferencias en el

volumen relativo de algunos orgánulos citoplasmáticos. No encontraron correlación entre el tipo de secreción de melatonina y la ultraestructura de los pinealocitos.

REGODON Y COL. (2001) realizaron un estudio inmunestructural de la glándula pineal ovina durante el desarrollo postnatal, definiendo dos tipos celulares: pinealocitos y células intersticiales.

REDONDO Y COL. (2001 b) definieron la naturaleza neuroendocrina de los pinealocitos de oveja, durante el desarrollo postnatal, al expresar dichas células inmunoreactividad frente a NSE, NNE y SYN.

RECORDATORIO HISTÓRICO SOBRE LA LUZ Y LA GLÁNDULA PINEAL

La estacionalidad de la reproducción cíclica de la oveja es un fenómeno de latitudes medias, generalmente controlado por el fotoperiodo a través de las variaciones de la luz. La glándula pineal es esencial para la percepción de los cambios fotoperiódicos en las especies fotosensibles. La información nerviosa llega a la pineal, vía adrenérgica, procedente del hipotálamo, a través de las fibras nerviosas del ganglio cervical superior. La pineal transforma la información nerviosa en secreción endocrina, a través de la síntesis de melatonina (**ARENDE Y COL.**, 1988).

ZENDEGS Y COL. (1988) exponían: *“que en fetos y ovejas preñadas, desde los 114 hasta los 142 días de gestación. “La melatonina atraviesa la placenta desde la circulación materna hasta la fetal; y en consecuencia, la melatonina presente en la circulación fetal de la oveja, ¿podría ser solamente de origen materno?, ¿o derivar de ambas fuentes, materna y fetal?”*

McMILLEN Y NOWAK (1989) realizaron en un grupo control de animales intactos y otros pinealectomizados, mediciones de melatonina en fetos ovinos y ovejas 4 días antes del parto. En animales pinealectomizados no había diferencias en el contenido en melatonina, tanto en el plasma fetal como en el materno. Las concentraciones de melatonina se incrementaban con la edad fetal, tanto durante el día, como durante la noche; y tanto en fetos, como en las madres.

HERNANDEZ Y COL. (1990) determinaron en la glándula pineal de la rata que los valores absolutos y la ritmicidad circadiana de la melatonina, obtenida

mediante HPLC, estaba en concordancia con lo previamente validado mediante RIA.

SADOWSKY Y COL. (1991), analizaron el último tercio de la gestación de la oveja. Determinaron el ritmo circadiano de las concentraciones plasmáticas de melatonina fetal y materna; y concluyeron que la melatonina materna es la mayor fuente de melatonina en la circulación fetal.

McMILLEN Y WALKER (1991) sometieron a las ovejas preñadas a un régimen normal de 12h de luz y 12 de oscuridad, y un régimen alterado de 12h de luz y 12 de oscuridad. Las concentraciones de melatonina fueron altas en la oscuridad, en ambos grupos, y tanto en ovejas como en fetos.

REPPERT Y COL. (1994) utilizando técnicas de hibridación in situ demostraron la presencia de ARN_m que codifica la expresión de la melatonina en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo.

HELLIWELL Y WILLIAMS (1994) describían en la vida fetal ovina, en torno a los 30 días de gestación, la presencia de receptores específicos de melatonina, sugiriendo un papel prioritario de la melatonina en el desarrollo fetal ovino.

HOUGHTON Y COL. (1995) realizaron una experiencia con dos grupos de ovejas: uno intactas, y otro con desconexión quirúrgica del hipotálamo y la hipófisis. Ambos grupos fueron sometidos a regímenes de 8L/16D y de 16L/8D. Encontraron aumento significativo en las concentraciones de melatonina en todos los supuestos, salvo en animales sometidos a 16L/8D. y con desconexión quirúrgica del hipotálamo y la hipófisis. Concluyeron en consecuencia, que la abolición de la conexión hipotálamo-hipófisis, provocaba interrupción del ritmo diario de concentraciones de melatonina en condiciones de fotoperiodo largo.

McMILLEN Y COL. (1995) demostraron que el ritmo materno de la melatonina proporcionaba al feto de la oveja, durante el desarrollo, una señal circadiana y/o estacional, acerca del momento y la duración del fotoperiodo externo.

MIGUEZ Y COL. (1996) encontraron importantes elevaciones en las concentraciones de melatonina y dopamina durante la noche, en la pineal de hembras de hámster sometidas a fotoperiodos largos y cortos, sugiriendo un

papel de soporte de la dopamina en la regulación de la síntesis de melatonina, y en la sincronización de las funciones de la glándula pineal.

CHEMINEAU Y COL. (1996) en ovejas bajo la influencia de fotoperiodos cortos, detallaban que la amplitud y la duración en el ritmo nocturno de las concentraciones plasmáticas de melatonina, estaban altamente relacionadas con las características individuales de la oveja. **ZARAZAGA Y COL.** (1998) observaron que la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de melatonina dependían de un fuerte control genético.

OKATANI Y COL. (1998) cuantificaron mediante HPLC los niveles de melatonina en ratas peripuberales sometidas a déficit y estimulación de estrógenos, afirmando que los estrógenos modulan la síntesis de melatonina.

COON Y COL. (1999) estudiaron la variabilidad de las concentraciones plasmáticas de melatonina durante la noche, en grupos de ovejas, cuyos progenitores evidenciaban concentraciones altas y bajas de melatonina; concluyendo que la variabilidad no se debía a las diferencias genéticas, sino que eran atribuibles a las diferencias en el tamaño de la pineal.

SANTIAGO MORENO Y COL. (2000) detectaron que las diferencias observadas entre ovejas y muflones, durante los cambios estacionales, en las concentraciones de melatonina, eran atribuibles a la influencia genética en la respuesta endocrina para el mismo fotoperiodo.

CORNELISEN Y COL. (2000) en ovinos, detectaron descensos de las concentraciones plasmáticas de melatonina con relación a la edad.

LEWZUK Y PRYBYLSKA-GRONOWIZS (2000a) describían que el ritmo diario de la concentración de melatonina es generado endógenamente, independientemente de la luz ambiental, confirmando la idea de la pobre regularidad de los cambios diurnos en la circulación de melatonina en cerdo.

REDONDO Y COL. (2003 a, b) detallaron que la pineal de los ovinos durante el desarrollo postnatal, sometidas a los cambios cíclicos de luz y oscuridad durante un fotoperiodo natural corto (estimulador), evidenciaba cambios en las concentraciones de melatonina en plasma y pineal. Estas modificaciones en la fisiología glandular, fueron significativamente mayores en animales férti-

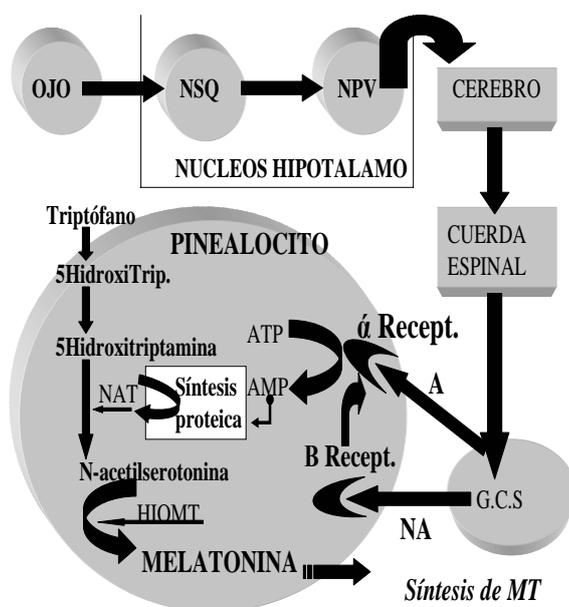
puberales, que en prepuberales y adultos, e involucraban tanto el periodo de luz como de oscuridad.

HISTOFISIOLOGIA DE LA GLANDULA PINEAL: SECRECION DE MELATONINA

MELATONINA: SINTESIS, SECRECION Y CATABOLISMO

La glándula pineal es la responsable de la recepción de la información de la terminación de la luz del día, y el inicio del periodo de oscuridad. Todo esto es debido a la secreción de la hormona melatonina.

Los fotorreceptores de la retina, captan la duración de las horas de luz, y



la transforman en una señal nerviosa que es transmitida a los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ) a través del tracto retinohipotalámico; a través de la médula espinal, y pasando previamente por el ganglio cervical superior del sistema nervioso simpático. La intervención del ganglio cervical superior resulta determinante para la traducción de la información del fotoperiodo en un

mensaje hormonal (ZARAZAGA Y COL., 2000).

De tal manera que a los animales a los que se les practica una gangliectomía del ganglio cervical superior, no perciben la información fotoperiódica, ya que se impide la actividad sintética de la glándula pineal.

La melatonina fue descubierta por LERNER Y COL., 1958. Es una indolamina amarilla, poco soluble en agua y soluble en etanol. Cuando se acaba el periodo de luz, y se inicia la fase de oscuridad, la noradrenalina liberada por el ganglio cervical superior, estimula a los pinealocitos a la síntesis de melatonina (de ahí su denominación de hormona de la oscuridad).

La noradrenalina proveniente del ganglio cervical superior se une a los receptores α_1 y B_1 de la membrana de los pinealocitos. Dicha unión desencadena una reacción bioquímica intracelular, que se traduce en un incremento de la expresión del ARN_m para la síntesis de la enzima arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT) que transforma la serotonina en N-acetil serotonina. La acción de la hidroxiindol-O-metil-transferasa (HIOMT), transformará la N-acetil serotonina en melatonina. A su vez la serotonina deriva del 5-hidroxitriptófano, cuya transformación en triptófano es catalizada por la triptófano-hidrolasa.

Aunque la secreción de melatonina se realiza principalmente en glándula pineal, también se puede realizar en otros territorios orgánicos como: los leucocitos, la retina, la glándula lacrimal y el tracto gastrointestinal. A todos estos niveles orgánicos han podido ser detectados receptores de membrana de melatonina, en sus tres tipos MT_1 (**REPERT Y COL.**, 1994), MT_2 (**DUBOKOVICH Y COL.** 1998), MT_3 (**MOLINARY Y COL.** 1996). Recientemente se ha podido evidenciar, en glándula pineal de hámster sirio, la coexpresión de los receptores de membrana tipo MT_1 , con los receptores nucleares ROR δ_1 (**TOMAS-ZAPICO Y COL.**, 2005).

De cualquier forma la secreción de melatonina sigue un ritmo circadiano, con concentraciones altas durante la noche y basales durante el día. La duración de la noche está reflejada por el pico de las diferentes concentraciones de melatonina (comienza a subir en el crepúsculo, y a disminuir en la madrugada). Esta ritmicidad endógena en la producción de melatonina (**FORCADA Y COL.**, 2000), condicionada por los ciclos de luz-oscuridad, se halla circunscrita a un periodo de 24 horas. Este hecho ha podido ser evidenciado, con la desaparición de dicho ritmo, cuando los animales son sometidos a luz constante; y cuando los animales son sometidos a oscuridad constante, se sigue detectando secreción rítmica, pero no sincronizada, y de duración inferior a las 24 horas (**ZARAZAGA Y COL.**, 2000).

La secreción de melatonina aparece condicionada por la duración del ciclo luz/oscuridad. Así en los días cortos y las noches largas, las concentraciones de melatonina comienzan a disminuir antes del final de la noche; mientras que

los días largos y las noches cortas, las concentraciones disminuyen al final de la noche.

Incluso la señal de melatonina es capaz de reflejar información fotoperiódica acerca de los cambios estacionales. De modo genérico, podríamos decir que en el verano se producen bajos niveles de melatonina; y en invierno concentraciones mayores, pero de menor amplitud (**ARENDE Y COL.** 1981).

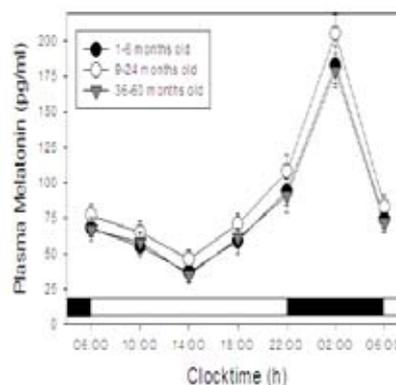
La melatonina secretada es liberada inmediatamente al torrente circulatorio; en consecuencia las concentraciones plasmáticas de melatonina, son un buen indicativo del estado funcional de la glándula pineal.

La melatonina secretada alcanza la circulación general a través de dos vías:

1. de la vena de Galiano, que drena al seno sagital, y desde aquí a la vena yugular. Desde la yugular es transportada al sistema nervioso central, a través de las carótidas.
2. Existen pequeñas cantidades de melatonina que se secretan directamente al líquido cefalorraquídeo, en los ventrículos cerebrales. Sin embargo, de acuerdo a nuestras experiencias (*observaciones no publicadas*) y en correspondencia con lo referenciado por **ZARAZAGA Y COL.**, 2000, la mayor parte de la melatonina presente en el líquido cefalorraquídeo proviene directamente de la glándula pineal.

En cualquier caso lo que es incuestionable, es la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de melatonina, influidas por multitud de factores como pueden ser:

- El sometimiento a variaciones en los ciclos de luz/oscuridad. Así la exposición a oscuridad constante, produce un incremento en el peso de la pineal, relacionado con el aumento del volumen de los pinealocitos, y el consecuente aumento de las concentraciones plasmáticas de melatonina (**REDONDO Y COL.**, 2003 a, b).
- La edad de los individuos, genéricamente en adultos se



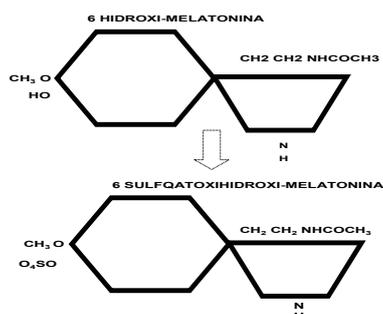
dan concentraciones plasmáticas de melatonina más elevadas que en jóvenes y ancianos (**REDONDO Y COL.**, 2003 a, b). . También de modo general, las hembras disfrutaban de concentraciones elevadas de melatonina.

- La inmovilización física produce cambios regresivos en la pineal en primera instancia; posteriormente se produce un incremento en su actividad, y como consecuencia elevación de las concentraciones de melatonina (**GONZALEZ Y ALVAREZ-URIA**, 1981).
- El aislamiento, provoca incremento de peso de la pineal, con hiperplasia de pinealocitos y aumento de niveles de melatonina (**QUAY Y COL.**, 1969).
- Los estímulos auditivos; las vibraciones; y las estimulaciones olfativas, producen atrofia de los pinealocitos, y consecuentemente reducción de niveles de melatonina (**FONTANA Y ALVES DE AZEVEDO**, 1978).
- Los ultrasonidos, producen modificaciones en la secreción de melatonina, relacionadas con la disminución del peso de la pineal, y el aumento de la actividad de la HIOMT (**BLAZQUEZ Y GONZALEZ**, 1975).
- El frío desencadena aumentos en la secreción de melatonina como consecuencia de fenómenos de hipertrofia e hiperplasia de pinealocitos. Efectos similares son desencadenados por el calor (**BUCANA Y COL.**, 1973; **ALVAREZ-URIA Y GONZALEZ**, 1981).
- Los implantes de estrógenos promueven disminución del peso de la pineal además de una disminución de la actividad sintética de los pinealocitos (**HOUSSAY Y BARCELO**, 1972).
- La administración de anti-androgénicos (acetato de ciproterona) provocan hiperactividad funcional de la pineal (**GUSEK**, 1971).
- La hipofisiectomía desencadena hipoactividad en la secreción de melatonina, relacionada con disminución del peso de la glándula; con la reducción del volumen de los pinealocitos; y con la atrofia de

pinealocitos. Similares efectos han sido detectados tras la adrenalectomía; y tras la simpatectomía (**KARASEK, 1971**)

- La gonadectomía produce efectos estimulantes sobre la pineal y en consecuencia incremento en el ritmo de producción de melatonina; este hecho está directamente relacionado con el incremento del peso de la pineal (**GONZALEZ Y ALVAREZ-URIA, 1981**).
- Existen otro tipo de factores que no muestran influencia sobre la secreción de melatonina, como el momento del ciclo sexual, y el estado de gestación[^].

En definitiva, parece claro que la mayores diferencias en la variabilidad está presente entre individuos, hay un factor genético, sin duda, y pudiera estar relacionado con las diferencias en el número de pinealocitos de la glándula (**ZARAZAGA Y COL., 2000**).



De una u otra manera, bien por el aumento, o bien por la disminución de la secreción de melatonina, el organismo va a recibir información que va a modular diversas funciones fisiológicas, como la reproducción, el

funcionamiento del sistema inmunitario, el peso corporal, el crecimiento celular (de células normales y neoplásicas), la actividad locomotriz y los ritmos circadianos...,etc.

El Catabolismo de la melatonina viene representado por la hidroxilación a 6 hidroximelatonina, a nivel hepático y renal; posteriormente, se elimina por orina en forma conjugada, sulfatada o glucosilada.

[^] Ayudas para estancias de Profesores e Investigadores en Centros de Investigación extranjeros. Laboratorio de Neurociencias. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Buenos Aires. **Observaciones no publicadas.**

HISTOFISIOLOGIA DE LA PINEAL HUMANA

Tres millones de años han tenido que transcurrir en la historia de la Humanidad, para descubrir los secretos de esta inocente hormona, entre otras cosas:

- Es un potente potenciador del sistema inmune. Se sabe que la melatonina es capaz de incrementar la mayor parte de las células defensivas del organismo. Además, precisamente por esta capacidad, es uno de los amortiguadores más eficaces frente al estrés.
- Es posiblemente uno de los mejores tratamientos adyuvantes frente al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Antiretrovirales, tipo AZT y melatonina es una combinación ideal para tratar el SIDA, por tres razones:
 1. Por su potenciación de la respuesta inmunitaria.
 2. Porque es un potente antioxidante y citoprotector.
 3. Por su capacidad de disminuir el poder de replicación del virus.
- Es un eficaz antitumoral, sobretodo en los tumores de mama y próstata. Además reduce el efecto tóxico de la quimioterapia, y mejora la calidad de vida de los pacientes.
- En el campo de la cardiología es un indicativo de primera línea. Hemos de tener en cuenta, que la mayor frecuencia de infartos ocurre alrededor de las 12 horas, precisamente cuando las tasas de melatonina son más bajas. ¿Es casualidad o hay una relación causa efecto? En estudios comparativos de pacientes de igual edad y sexo y de regímenes de vida parecida, con y sin enfermedades coronarias, los que no padecieron enfermedades coronarias, tenían niveles de la hormona más elevados.
- Es un excelente citoprotector; su capacidad antioxidante, la mayor conocida actualmente, está revelando datos de protección y regeneración en fases agudas de infarto de miocardio, hasta ahora no pensados. Dos razones más podría darles para considerar a la melatonina como una reductora del riesgo de padecer accidentes cardio-vasculares: 1ª. Que es capaz de reducir hasta un 20% las tasas de colesterol y 2ª. Que presenta una relación inversa con la hipertensión, de tal modo que las personas hipertensas tienen tasas bajas de melatonina.

- Está implicada, de manera muy directa, en la memoria animal.
- En el campo de la psiquiatría, la melatonina ha resultado determinante. Hay algunos datos reveladores al respecto: los individuos muertos por suicidio, presentaban concentraciones de melatonina muy bajas en pineal. Además, los suicidios ocurren más de día que de noche, precisamente cuando los niveles de esta hormona son más bajos. En los tratamientos de ansiedad y depresión, se ha mostrado con una eficacia mucho mayor que las benzodiacepinas. Algunos fármacos que incrementan la melatonina, reducen la depresión; y una parte importante de los ansiolíticos, tranquilizantes y antidepresivos están relacionados con la melatonina.
- Es un inductor de sueño biológico, inocuo, tolerante y mucho más eficaz que hipnóticos y tranquilizantes. Los insomnes, la Tercera Edad (con patología del sueño), e incluso los alcohólicos (con los episodios de vigilia etílica), tienen en la melatonina un remedio natural, efectivo y que no crea adicción. En relación al sueño hemos de decir que la melatonina pone a nuestra disposición un remedio muy eficaz para contrarrestar la desordenada vida fisiológica que llevamos. Hemos alterado el binomio cama y descanso y placer; pues la cama que inicialmente se concibió para el descanso y la sexualidad, es utilizada también para ver la televisión, oír la radio, comer, leer...,etc. Hemos sustituido el tradicional y sano acto del “vaso de leche en la cama” –la leche es un vehículo excelente de melatonina, y por consiguiente un excelente inductor del sueño-, por estimular mediante excitantes nuestro ritmo vigilia –sueño, y consecuentemente, alterar la natural reducción del metabolismo basal cuando llega el crepúsculo; consecuencia, en el Mundo Occidental, Media Humanidad anda insomne perdida.
- Es responsable de la aparición de nuevas ciencias, como la Cronofarmacología, pues es claro que para cada tipo de medicación, el organismo ha desarrollado ritmos circadianos (24 horas) de efectividad y tolerancia medicamentosa. O también, de ciencias como la Cronoterapia, pues las variaciones de las condiciones ambientales de luz, van a tener una respuesta biológica.

Expresiones como: “ponerse las pilas al sol[♦]”, están relacionadas con esto.

Una demanda creciente de la Sociedad Moderna es el trabajo en turnos; caminamos en el siglo XXI hacia la sociedad de 24 horas. Esto conlleva, que cuando los turnos rotatorios no son fijos, hay toda una cronopatología relacionada con el estrés del trabajador. Cronopatología que puede proceder de:

1º. La alteración de sus ritmos circadianos.

2º. Las alteraciones del sueño.

3º. Las alteraciones de la vida social. Estas alteraciones llevan implícito: fatiga, disrupción del sueño, inadecuación social y doméstica, disminución del rendimiento, incremento del riesgo laboral. La luminoterapia ambiental y la melatonina, son los tratamientos de elección para minimizar las consecuencias de La Sociedad de 24 horas, en un Mundo intercomunicado (“la Aldea Global del siglo XXI[∇]”), para el cual no tenemos un diseño fisiológico adecuado.

Hablar de melatonina es hablar de salud; por eso los productos que disminuyen la melatonina, como el alcohol, tabaco, tranquilizantes, antidepresivos, cafeína, B-bloqueantes, aunque algunos de ellos tengan efectos beneficiosos a corto plazo, en tratamientos prolongados, van a tener consecuencias: mayor susceptibilidad al cáncer, bajada de defensas, trastornos del sueño, depresión, ansiedad, e incremento del riesgo de padecer enfermedades degenerativas tales como Alzheimer`s, Parkinson`s, artrosis...,etc. Por idénticas razones, los incrementos de melatonina con el calcio, el Mg, B₃, B₆, la meditación, están relacionados con el bienestar humano o animal.

Hemos visto hasta ahora, como nuestra vida está condicionada por la existencia de relojes biológicos, en los cuales la pineal, desempeña el papel fundamental. Sin embargo lo que para los Científicos era un hecho conocido, no trasciende a la opinión pública hasta que en 1998, La Literatura Medica

♦ Redondo E, Masot A.J. Franco A (2005). Pineal y Melatonina. **Arst et Sapientia**. Junio, año VI, 183-191.

∇ Cardinali D.P., Pevet P. (1998) Basis Aspects Of Melatonin Action. Sleep Medicine Reviews 2 (3): 175-190.

Americana describe al producto de secreción de la pineal, la melatonina, como “un afrodisíaco rejuvenecedor”. En modelos animales, se ha podido comprobar las propiedades antienvjecimiento de la melatonina. Es capaz de prolongar la vida hasta un 15-18%. Todas las hembras domésticas (también en la mujer) presentan tasas más elevadas de melatonina. ¿Es tal vez esta hormona la causa de la longevidad en las hembras? Hay razones muy poderosas que nos inducen a pensar que la melatonina podría prolongar la vida animal, incluida la especie humana.

- 1ª. Reduce el daño de los radicales libres y consecuentemente protege a las células.
- 2ª. Estimula la actividad del sistema inmunológico.
- 3ª. Protege el sistema cardio-vascular.
- 4ª. Estabiliza los biorritmos corporales.
- 5ª Estabiliza la producción de la hormona del crecimiento.

Cabría preguntarse: ¿Estamos ante la fuente de la eterna juventud? no tenemos respuesta para ello; lo que si se conoce es que en EEUU la melatonina se dispensa en grandes superficies y su consumo se ha disparado. Nunca esta inocente molécula, hubiera pensado en despertar tanto interés y expectativas, hasta tal punto de que podemos decir que se ha desatado la *melatoninomania*. Cinco funciones biológicas de la melatonina en el hombre han contribuido a ello:

1. La sincronización circadiana con adelantos y retrasos de fase de ritmos fisiológicos.
2. La promoción del sueño.
3. La regulación de la temperatura corporal
4. El efecto inmunoestimulador
5. Intervención en la maduración sexual.

HISTOFISIOLOGIA DE LA PINEAL OVINA: SECRECIÓN DE MELATONINA

La importancia de la pineal en especies fotoperiódicas en general, y en la especie ovina en particular, guarda relación con su producto de secreción: la melatonina.

TRICOIRE Y COL., 2003, sugerían una secreción directa de la melatonina desde la glándula pineal a la luz ventricular del receso pineal. *“Existen uniones comunicantes de los pinealocitos con la luz ventricular; y por consiguiente, una secreción directa de la melatonina hacia el líquido cerebro-espinal”*.

La utilización de la melatonina en veterinaria es reciente, sin embargo su aplicación es muy variada; podríamos decir que Veterinaria y melatonina, son un campo virgen. Actualmente, se empieza a utilizar la melatonina en la reproducción dirigida en las ovejas. La productividad en la especie ovina, se halla condicionada por la estacionalidad reproductiva. Este condicionante que en otras especies como la bovina, ha podido ser eliminado mediante la domesticación, tan sólo ha podido ser reducida, pero no eliminada. En los Países Mediterráneos hay una menor dependencia de la actividad sexual y la estacionalidad, que en los Países de latitudes superiores. Sin embargo, nuestras ovejas, siguen sin entrar en celo en primavera, y si queremos que lo hagan hemos de recurrir a:

- El efecto macho
- Las esponjas vaginales de progesterona, como inductores y sincronizadores del celo
- Las Gonadotropinas como estimuladores de los folículos del ovario.

En el Campo de la Medicina Veterinaria, la melatonina es la encargada de indicarles a los pequeños rumiantes cuando han de iniciar la reproducción. Según nuestro refranero rural *“la danza viene de la panza”*; de acuerdo con esto, los animales iniciarían su reproducción en primavera, en época de abundancia. Sin embargo, lo que ocurre es exactamente lo contrario, pues existe un reloj biológico – *la glándula pineal que produce melatonina*- que les indica a las ovejas que si se preñan en primavera, parirán en invierno, en

época de penuria de pastos, por eso en primavera están en estado anovulatorio, no entran en celo.

Si tenemos en cuenta que:

- a.- que la melatonina se secreta durante las horas de oscuridad;
- b.- que las horas de oscuridad cambian a lo largo del año, según la duración de los días
- c.- Y que la melatonina controla la actividad hipotálamo-hipófisis-órganos sexuales, estamos ante las bases neuroendocrinas de los ritmos reproductores estacionales.

Considerando que el fotoperiodo (la variación de la intensidad de luz en relación a los días y las estaciones) es el principal regulador de la estacionalidad reproductiva de la especie ovina, parecería más lógico incidir en él, para modular el condicionante de “falta de celo en primavera”, que no recurrir a los tratamientos hormonales. Este hecho ha condicionado la investigación en reproducción en veterinaria, y durante los últimos 10 años, numerosos grupos de investigación, entre los que nos encontramos, se han dedicado a averiguar la influencia de las variaciones anuales de la iluminación diaria en la actividad sexual del ganado ovino.

Dentro de estos mecanismos, la melatonina sintetizada por la glándula pineal durante la noche, ocupa un lugar destacado en la traducción de la información fotoperiódica, en un mensaje hormonal que va a regular las funciones reproductivas. Desde la década de los 90, comenzaron a utilizarse los tratamientos con melatonina para acortar los períodos de anoestro; desde entonces hasta ahora, los implantes exógenos de melatonina se han convertido en una herramienta imprescindible para permitir a los ganaderos organizar la reproducción de sus ovejas de acuerdo a las disponibilidades de los recursos alimenticios y de los condicionantes del mercado. La abundante información obtenida hasta hoy, ha permitido el uso comercial de la melatonina en España desde el año 2001, al igual que había sucedido con anterioridad, en otros países europeos, con una fuerte implantación ovina, como Grecia, Gran

* REDONDO E (2005)

Histofisiología de la glándula pineal: La Melatonina. Cáceres, 2005, En prensa.

Bretaña, Francia y Portugal. La hormona se aplica en forma de microimplantes subcutáneos que contienen 18 mg de la hormona; inducen una liberación continua de la melatonina durante 70 días , proporcionando una señal fotoperiódica que la oveja interpreta como días cortos, es decir estimulatorios. Los tratamientos se inician próximos al equinoccio de primavera, aunque los resultados son similares a los obtenidos a los tratamientos inmediatamente después del solsticio de invierno, obteniéndose hasta un 20% más de corderos adicionales en los lotes tratados con melatonina en relación a los testigos.

Sin embargo, siendo determinante el uso de melatonina en reproducción asistida en ovinos, el futuro, no está ahí. Hemos superado la era de los productos “Ecológicos” y “Biológicos”, y entramos en la era de la cronobiología; por eso, nuestros sistemas de producción, basándose en condicionantes de bienestar animal, cronobiología y fototerapia, han de derivar irremediabilmente hacia la consecución de productos “cronobiológicos”: leches, quesos, jamones...,etc.

Actualmente se comienza a utilizar la melatonina de manera sistemática en el campo de la medicina veterinaria. En este sentido es destacable su utilización como coadyuvante (mezclado con hidróxido de aluminio) en las vacunas en ovinos frente a *Dichelobacter nodosus* (REGODON Y COL., 2005).

BIENESTAR, ESTRÉS ANIMAL Y MELATONINA

La modulación y el desacoplamiento al que deben someterse las explotaciones agroganaderas en la Europa Comunitaria, viene contingenciada con tres condicionantes: pago único de subvenciones, seguridad alimentaria y bienestar animal.

El bienestar animal está condicionando todos los sistemas de producción animal, sobretodo en intensividad. Parece claro que la modificación de los parámetros zootécnicos, fisiológicos y comportamentales, conducen a los animales a una situación de estrés (**CHAVARRI**, 2003).

De acuerdo a lo reflejado por **ALBERTO QUILES** (2005), podríamos definir el bienestar animal como: *“una medida de la adaptación de los animales a su medio ambiente”*.

Las condiciones medioambientales modificadas, unidas a las modificaciones en la intensificación, han tenido como consecuencia modificaciones en las características genéticas y fisiológicas de los animales, llevándolos a la situación de estrés.

El concepto de estrés como: *“respuesta no específica del organismo frente a una agresión, independientemente de la naturaleza de la misma”*¹, ha quedado superada por la de **BROOM** (1988): “es el proceso por el cual los factores ambientales sobrepasan a los sistemas de control de un individuo”.

Bienestar animal y estrés son interdependientes, pues el estrés prepara al organismo para afrontar primero, y combatir después, la situación adversa, y aproximarse o conducir al bienestar animal. Hemos de señalar que, estrés y bienestar animal, forman parte como causa y efecto, de un complejo mecanismo interrelacionado en el que interviene el sistema neuroinmunoendocrino.

El estrés físico y emocional se encuentra entre las condiciones patológicas que producen inmunodepresión. Los animales sometidos a esta situación son propensos a la enfermedad, particularmente cáncer e infecciones recurrentes. La causa de estas alteraciones reside en la disminución de la reactividad inmunitaria, y el incremento del cortisol sanguíneo, cuya fuente es la corteza

¹ E. REDONDO. Estudio morfológico del proceso de shock renal experimental, provocado por la inoculación experimental de endotoxinas de *Salmonella enteritidis*. Tesis Doctoral. Cáceres, 1987.

suprarrenal. Conforme avanza la edad, disminuye la producción de melatonina y se elevan los niveles séricos de cortisol. Su exceso en el torrente sanguíneo se ve favorecido por las situaciones de gran contenido emotivo y afecta negativamente la actividad fisiológica del sistema inmunitario. Estas disfunciones revierten por la aplicación de la melatonina; en este sentido, esta neurohormona posee propiedades antiestrés y antioncostáticas (**GARCIA Y CAMPOS**, 1997).

FINALIDAD DE LA INVESTIGACION**FINALIDAD DE LA INVESTIGACION**

La finalidad del trabajo de investigación que presentamos será: **EVALUAR EL EFECTO DE LA MELATONINA FRENTE AL ESTRÉS DE MANEJO, EN OVINOS.** Para ello hemos diseñado un modelo animal en ovinos (animales altamente fotoperiódicos) bajo las condiciones de estrés inducido (cambios de ubicación y alimentación); modelo que se completa con un grupo experimental bajo las condiciones de bienestar animal; y dos grupos experimentales que contemplan el efecto de la melatonina, tanto en condiciones de bienestar animal, como en condiciones de estrés inducido.

La cuantificación y cualificación de los parámetros histofisiológicos del hipotálamo y la pineal, en cada uno de los supuestos experimentales anteriores, nos ofrecerá datos de las modificaciones morfofuncionales de los órganos diana (hipotálamo y pineal, bajo influencia de fotoperíodos, largos y cortos), inducidas por el estrés, y modificadas por el tratamiento con melatonina.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Antecedentes: Estudios sobre la pineal de la oveja.

La histofisiología de la pineal de los mamíferos ha sido objeto de numerosas investigaciones, basadas en la concepción de la misma como órgano neuroendocrino implicado en la regulación fotoperiódica de ritmos biológicos endógenos (**REITER**, 1993). La mayoría de las investigaciones de la pineal de los mamíferos en desarrollo, se han llevado a cabo en roedores, fundamentalmente rata; sin embargo los modelos biológicos de estudios sobre la pineal, empiezan a considerar a la oveja.

Encontramos cuatro condicionantes que convierten a la oveja, en un excelente modelo experimental para las investigaciones histofisiológicas relacionadas con la glándula pineal:

- El hecho de ser un animal altamente fotoperiódico (**RAVAULT Y COL.**, 1989).
- El poseer un ritmo circadiano prominente en cuanto a la secreción de melatonina (**PANGERL AND REITER**, 1990).
- El disponer de una glandula pineal de desarrollo considerable (**REDONDO Y COL.**, 1996a,b ;2001; 2003 a,b; **FRANCO Y COL.**,1997; 2000; **REGODÓN Y COL.**, 1998 a,b; 2001)
- Su condición de hembra poliéstrica estacional. En este sentido la glándula a través de sus interconexiones con el hipotálamo y con la hipófisis , ejerce un efecto modulador de la actividad sexual regulada por la hipófisis (**SHEDPURE AND KUMAR**, 1995).

Antecedentes: Actividades de nuestro Grupo de Investigación

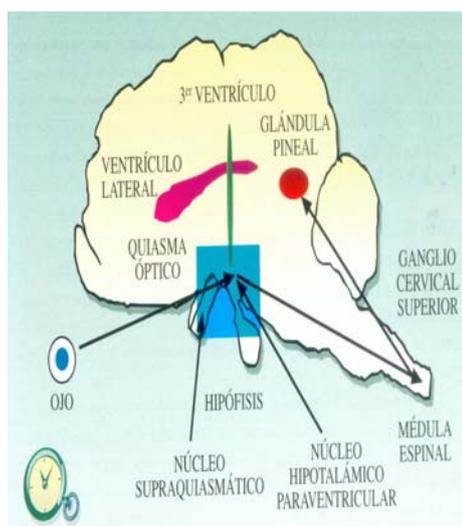
Nuestros primeros pasos en el abordaje del desarrollo de la pineal, se centraron en el estudio global de desarrollo en etapas de vida intrauterina (**REDONDO Y COL.**, 1996a,b; **FRANCO Y COL.**, 1997; **REGODON Y COL.**, 1998 a-b). Posteriormente se contempló el desarrollo postnatal (**REGODON Y COL.**, 2001; **REDONDO Y COL.**, 2003 a,b).

Dentro de la globalidad de la histofisiología de la pineal en desarrollo, nuestras investigaciones, siguiendo las directrices dimanadas de la European Pineal Society, y las tendencias de los grupos prioritarios de investigación pineal se centraron en:

- 1.- “El estudio de la inervación de la pineal de ovino en desarrollo^{*}”
- 2.- “ La caracterización inmunohistoquímica y ultraestructural de las células intersticiales, en la glándula pineal ovina en desarrollo^Ω” .
- 3.- “Pineal ovina; estrés de manejo y melatonina[◊]”

Antecedentes: Vinculación del tema propuesto con temáticas semejantes desarrolladas en ámbitos internacionales^{}.*

En la tierra todos los organismos vivos necesitan adaptar sus funciones fisiológicas y comportamentales a las variaciones diarias y estacionales de los



factores externos (luz, temperatura, alimentación...,etc). Estos procesos adaptativos requieren, en primer lugar, el reconocimiento de estas variaciones; en segundo trasladarlas en mensajes hormonales y nerviosos; y por último traducirlas para elaborar respuestas adaptativas. En los mamíferos estos procesos adaptativos implican a tres estructuras principales: la retina, los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ) y la

pineal. Los NSQ tienen un ritmo diario propio de alrededor de 24 horas. Este periodo se sincroniza con las variaciones de la intensidad lumínica percibida por las células especializadas de la retina, y transmitida a los NSQ por el tracto retinohipotalámico.

El reloj biológico circadiano es capaz de integrar las variaciones fotoperiodicas estacionales del ciclo de luz/oscuridad. Entre las estructuras

^{*} Investigación objeto de subvención según el I PRI + DT; Exp n° IPRI 98B002 y según el II PRI + DT; Exp n° 2PR01A003.

^Ω Proyecto de Investigación no Coordinado Modalidad B, Exp n° IPRI 99 A004

[◊] Proyecto de Investigación: “La influencia del estrés de manejo en la histofisiología del hipotálamo y la pineal: efecto de la melatonina”. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Dirección General de Investigación.

^{*} Aparecen reflejadas en el apartado de Grupos de Investigación que trabajan en el tema.

implicadas en la transmisión de este mensaje destaca la glándula pineal. Este órgano neuroendocrino es el punto final de una vía polisináptica que termina con fibras noradrenérgicas.

La noradrenalina se libera durante la noche, con una duración proporcional a la longitud de esta. Esta noradrenalina se une a los B-adrenoreceptores de la membrana de los pinealocitos, produciendo la estimulación de la síntesis y liberación de melatonina. La melatonina se libera en la corriente sanguínea tan pronto como es sintetizada para alcanzar estructuras diana con receptores específicos para ella.

El estudio de las respuestas moleculares y comportamentales al estrés, se ha incrementado en los últimos años, al comprobarse que este ocasiona daño neuronal en algunas estructuras cerebrales sensibles, lo cual puede traducirse posteriormente en déficit funcional permanente.

En un primer momento se atribuyeron estos daños exclusivamente, a la respuesta al estrés del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Los glucocorticoides fueron identificados como los únicos responsables de las atrofiaciones neuronales reversibles e irreversibles, especialmente en el hipocampo (**DALLMANN Y COL.**, 1994). Más tarde, la atención fue desplazándose hacia factores neurotróficos, como proteínas inhibitoras o facilitadoras de los daños causados por la activación del eje hipófisis-adrenal.

Desde su descubrimiento hace más de 40 años, algunas neurotrofinas como el factor de crecimiento neuronal (NGF) fueron relacionadas con el crecimiento y la diferenciación de las neuronas centrales y periféricas durante el desarrollo del Sistema Nervioso. Más tarde se comprobó, que la falta de neurotrofinas provoca la atrofia neuronal y pérdida de la transmisión fenotípica en el Sistema Nervioso adulto. Recientemente se demostró que muchas neuronas contienen al mismo tiempo neurotrofinas y sus receptores, lo que sugiere que éstas puedan actuar también por mecanismos autocrinos. Algunas neurotrofinas presentes en el hipotálamo en ratas, estarían involucradas en la depresión comportamental espontánea inducida por el estrés. Los animales sensibles a la depresión presentan menor concentración de Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) (**ANGELUCI Y COL.**, 2000).

Actualmente varias neurotrofinas han sido clonadas, entre ellas el BDNF. Esta proteína se encuentra en grandes cantidades en todo el cerebro adulto, incluyendo el hipotálamo y otras áreas límbicas (**NAWA Y COL.**, 1994). La administración de BDNF produce un marcado aumento de NPY y otros neuropéptidos, estimulando el crecimiento dendrítico de las neuronas piramidales del cerebro en animales adultos.

Se ha comprobado que el estrés agudo y crónico reduce la expresión de ARN_m de BDNF, y que las drogas antidepresivas, la incrementan, vía receptores 5-HT_{2A} y B₁-Adrenoreceptores (**ALTAR**, 1999). Se conoce que, además de elevar los niveles de corticosterona, el estrés provoca cambios estructurales y daño neuronal paralelo con una reducción del ARN_m de BDNF en el hipocampo.

VAIDYA, 1997, sugería que *“la corticosterona per se disminuía la expresión de BDNF, pero el estrés continuaba reduciendo la expresión de BDNF en el giro dentado, aún en animales adrenalectomizados, lo que hacía presuponer que algún componente adicional de la respuesta al estrés debía contribuir a cambios de esa neurotrofina. Un candidato sería el sistema 5-HT ya que la reducción de BDNF por estrés es bloqueada por el antagonista 5-HT₂”*.

El BDNF y el NGF, parecen ser importantes en el sistema nervioso adulto para la plasticidad neuronal, la adaptación al estrés y participarían también en el mecanismo de los déficit cognitivos que ocurren en el envejecimiento y en el estrés postraumático (**SMITH Y COL.**, 1995).

El BDNF está presente en los núcleos paraventricular y lateral del hipotálamo. **SMITH Y COL.**, 1995, demostraron que el estrés, a diferencia de lo que ocurre en el hipocampo, aumenta el ARN_m de BDNF en el hipotálamo. Esto indicaría que esta proteína pudiera ser importante en la respuesta hormonal al estrés.

Las proteínas de golpe de calor (heat shock proteins –HSP-) parecen ser también factores tróficos en varios tejidos. La HSP 70 del hipocampo es reconocida como un marcador de estrés y se expresa en neuronas resistentes a la injuria, por lo que es considerada como neuroprotectora. La HSP 90 estaría ligada a los receptores de corticosterona en el hipocampo, y parece ser otro

factor neurotrófico protector de la injuria neuronal experimental, por su acción antiapoptótica. La expresión génica de esta proteína fue rápidamente inducida por el daño provocado por estrés (**TRUETTNET Y COL.**, 1999).

Estado Actual Del Tema

INGLES AND COL., 1987, estudiaron los niveles de melatonina en sangre venosa de ovejas intactas, muestreadas con variaciones de frecuencia y de intervalos temporales. Evidenciaron que la venipuntura frecuente activaba el eje de la tensión de las hormonas adrenocorticotropas, con elevación de los niveles de cortisol. Los niveles de melatonina en plasma demostraron una variación considerable con valores picos de 365pg/ml y un fondo entre 30 y 60 pg/ml. Existía una frecuencia constante de los picos intermitentes, la cual aumentó con la frecuencia de muestreo; sin embargo, el cortisol no demostró ninguna correlación con la frecuencia o amplitud de los picos de melatonina.

STANKOV AND KANCHEV, 1989, demostraron la influencia del estrés agudo en ovejas (ovariectomizadas), y en búfalos machos y hembras (inserción de catéter venoso), en la actividad funcional de la glándula pineal durante el día y la noche. En ambos supuestos detectaron una influencia de las condiciones de estrés, en la secreción pineal de melatonina; los niveles de melatonina, bajo condiciones de estrés, descendían durante el día y aumentaban durante la noche.

La intervención de la melatonina en situaciones de estrés ha sido muy variada, tanto en medicina humana como veterinaria. En el campo de la medicina veterinaria, **FOLDES AND MAXWELL**, 1993, sugerían el involucramiento de la melatonina, en la influencia de la alimentación en el crecimiento de las fibras de lana en la oveja merina. Así hablaban que en condiciones de abundancia de nutrientes, la melatonina no tenía intervención en el crecimiento de las fibras de lana; sin embargo, en condiciones de estrés, con límite de nutrición, la melatonina resultaría determinante en el diámetro final de las fibras de lana.

MILIN, 1998, analizó la respuesta de la píneal de gerbil frente al estrés por inmovilización y en condiciones de postestrés. En condiciones de estrés la glándula incrementaba la actividad funcional de los pinealocitos con un incremento de la actividad peptidérgica y la formación de nuevas concreciones; en lo referente a las células intersticiales, éstas aumentaron el tamaño de las concreciones.

Las condiciones de postestrés por inmovilización se manifestaron con una reducción de la actividad funcional de los pinealocitos y un incremento, de dicha actividad, en las células intersticiales.

REITER Y COL, 2000, exponían el significativo papel de la melatonina, en la reducción del estrés oxidativo in vivo, tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas. Cuando se producía pinealectomía quirúrgica, disminuían las concentraciones de melatonina, y aumentaba el daño molecular debido a la masiva presencia de radicales libres, como consecuencia del estrés oxidativo. Los Autores consideraban que la suplementación de melatonina –dado su conocido efecto antioxidante-, en los periodos de masiva presencia de radicales libres, podría tener repercusiones clínicas en enfermedades neurodegenerativas, en el cáncer, en la isquemia y en el envejecimiento. La capacidad de la melatonina para ser absorbida por cualquier vía de administración; su facultad de atravesar todas las barreras morfofisiológicas (hematoencefálica, placenta...,etc); y su potencial de llegada a todas partes en algunas células, le confieren un papel prioritario en la:

- Prevención del daño oxidativo.
- Protección de la función mitocondrial.
- Disminución de la toxicidad.

BRULS Y COL., 2000, estudiaron la fisiología de la secreción de la melatonina, encontrando factores asociados a altas y bajas concentraciones de melatonina. La presencia de concentraciones bajas en melatonina estuvo relacionada con:

- Campos electromagnéticos.
- Sexo masculino.
- La edad.
- Hipogonadismo
- Síndrome de Cushing.
- Alcoholismo.

La presencia de concentraciones altas en melatonina estuvo relacionada con:

- Hipergonadismo.

- Sexo femenino.
- Deporte.

Exponían que: *“la influencia de la melatonina era acusada ya que existían receptores de la misma en diversos órganos: retina, NSQ, hipófisis, cerebro, vasos sanguíneos, tracto digestivo, ovarios...,etc”*.

SIBAROV Y COL., 2000, analizaron la actividad funcional de los pinealocitos de rata, sometidas a estrés por supresión de agua y comida durante 48 horas. La actividad funcional de las ratas sometidas a estrés fue 4/6 veces mayor que en controles. El aumento del número de *“fast cells”* fue considerable en ratas estresadas. La estimulación eléctrica del epitelio olfatorio disminuía la actividad secretoria de los pinealocitos. Encontraron una relación cerrada entre actividad secretoria de los pinealocitos y su actividad eléctrica; por consiguiente, debería existir la existencia de un mecanismo olfativo limitante de la activación pineal.

AKBULUT Y COL., 2001, investigaron el efecto de la melatonina en la respuesta inmune humoral de ratas jóvenes y viejas, experimentalmente inyectadas con eritrocitos de oveja. Después de la inyección y a las tres semanas del tratamiento con melatonina, los niveles de IgG e IgM del grupo tratado con melatonina, fueron significativamente mayores que en controles, en ratas adultas; no así en las jóvenes. Concluyeron que la inyección de melatonina exógena, podría aumentar la depreciada respuesta inmune humoral de las ratas viejas.

BERNARD, 2001, plantearon la hipótesis de diferencias en la modulación de la respuesta inmune, bajo los efectos de la melatonina. Para ello, en dos grupos de ovejas, con altas y bajas concentraciones plasmáticas de melatonina (naturales), fueron analizados: los linfocitos, polimorfonucleares, monocitos y subpoblaciones de linfocitos (T4, T8, T19, B Y Monocitos). Se testaron los niveles de melatonina en ambos grupos encontrando:

GRUPOS	ALTAS [MT] Pg/mL	BAJAS [MT] Pg/mL
DIA	9	664
NOCHE	5	169

En ambos grupos se realizó una inmunización experimental con LPS. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros inmunológicos analizados, entre ambos grupos, ni entre el día y la noche. Tampoco encontraron diferencias en los parámetros inmunológicos, antes y después de la inmunización experimental. En los niveles de anticuerpos entre ambos grupos de animales (altas y bajas concentraciones de melatonina, [MT]), tampoco hubo diferencias significativas. Los resultados sugerían que las condiciones naturales de altos y bajos niveles de melatonina, no modifican la actividad del sistema inmune en ovejas.

MAESTRONI, 2001, defendía el potencial inmunoterapéutico de la melatonina: *“la interacción entre el cerebro y el sistema inmune es esencial para la respuesta adaptativa de los organismos a los cambios medio ambientales. En este contexto, la glándula pineal a través de la secreción de la melatonina juega un importante papel. Los linfocitos T Citotóxicos presentan en su membrana citoplasmática receptores de melatonina; la activación de los receptores de melatonina provoca la liberación de Th₁ citoquinas, interferon gamma (gamma-IFN), e interleuquina tipo 2 (IL-2). La melatonina estimula también la producción de los receptores de IL-6 y IL-12 en los monocitos. Estos mediadores de inmunidad celular podrían interactuar en la inmunodepresión asociada a estrés, y en otras inmunodeficiencias secundarias; y proteger frente a encefalitis virales, enfermedades bacterianas, y shock séptico; en definitiva, que la melatonina ofrece un interesante potencial inmunoterapéutico”*.

BARRIGA Y COL., 2001, trataron de evaluar el ritmo circadiano de la melatonina, el cortisol y la fagocitosis, en ratas en situación de metabolismo basal y estrés provocado por la ingestión forzada de partículas de látex. La fagocitosis se evaluó utilizando macrófagos peritoneales. Comparados los animales sometidos a estrés, respecto a los controles, presentaban un ritmo circadiano de melatonina, con valores pico durante la noche, más elevado que en controles; también los niveles séricos de melatonina fueron mayores. Sin embargo, el ritmo circadiano de corticosterona y los niveles de corticosterona

disminuyeron. La actividad fagocítica de los macrófagos estuvo incrementada durante todo el día, en animales sometidos a estrés.

LAN Y COL., 2001, analizando la influencia de la privación del sueño en la ultraestructura de los pinealocitos de rata, y el efecto modulador de la administración de melatonina, encontraron:

- Dilatación de las cisternas del REG y del Complejo de Golgi.
- Dilatación de mitocondrias.
- Aumento de las gotas lipídicas y de las vesículas de corazón denso.

Todas estas modificaciones ultraestructurales son signos morfológicos de incrementos de la actividad de síntesis en pinealocitos; y también signos de degeneración en pinealocitos, y fibras nerviosas simpáticas. La inyección de melatonina, tras la privación del sueño, reduce todos los signos de degeneración celular. Se demuestra claramente el efecto neuroprotector de la melatonina frente al daño neuronal inducido por la privación del sueño.

CALLAGHAN, 2002, analizaba la participación de factores psicológicos, como la depresión y el estrés, en el desarrollo del cáncer. Cambios en la secreción de melatonina han sido relacionados con factores psicológicos como la depresión y el estrés. Por otra parte, también es conocida la influencia de estos factores y de la melatonina, en el sistema inmune. La combinación de tratamientos psicológicos y tratamiento con melatonina provoca alivios clínicos del curso del cáncer; en consecuencia, El autor hipotetiza acerca de cómo la glándula pineal y la melatonina están implicadas en el mecanismo de los efectos psicológicos como moduladores de la progresión del cáncer.

SRINIVASAN, 2002, Analizó el estrés oxidativo, y su implicación como uno de los factores primarios que contribuían al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas -Alzheimer's y Parkinsons- , episodios epilépticos, daño cerebral, neurotraumatismos...,etc. La melatonina tiene una conocida capacidad antioxidante; y también es conocida su disminución con la edad, por lo que sugería que la melatonina podría jugar un papel crucial en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Basándose en:

1. Que la administración de melatonina ejerce un papel de contención en los fenómenos neurodegenerativos, y

2. Que los disturbios en el ritmo y la secreción de melatonina, son frecuentemente observados en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, Este autor atribuía un papel neuroprotector a la melatonina.

ARUSHANIAN AND BEIER, 2002, analizaron la influencia directa e indirecta de la melatonina en el estado del sistema inmune. La actividad inmunotrópica de la melatonina era relacionada con la protección frente al estrés, con el efecto antitumoral y con la inducción antiviral.

GOMEZ BRUNET Y COL., 2002, seleccionaron dos grupos de corderos de acuerdo a procedencia de progenitores, con altas y bajas concentraciones de melatonina. Se calculó el número y el tamaño de los pinealocitos; encontrando, que las pineales de corderos procedentes de madres con altas concentraciones de melatonina, contenían un número significativamente mayor de pinealocitos que las del otro grupo. No hubo diferencias significativas en el tamaño de los pinealocitos, entre los dos grupos genéticos.

BONDARENKO Y COL., 2003, estudiaron los efectos de la hipotermia (4 °C durante 3h) sobre la estructura y funcionalidad de la pineal de ratas Wistar. Demostraron que los niveles de melatonina se elevaron durante la inicial fase de adaptación (15 primeros minutos); seguida de una gradual inhibición (a partir de los 30 minutos); y supresión a las 3h. La supresión de la actividad funcional de la glándula pineal, la relacionaron con la exclusión de una proporción de pinealocitos fuera de los procesos de actividad funcional.

GUPTA Y COL., 2003, señalaron la implicación del estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas tipo Parkinsons y Alzheimer's. La melatonina tiene conocidos efectos antioxidantes, y basándose en esto, estos Autores, trataron de señalar la relación existente entre, la presencia de enfermedades neurodegenerativas y las concentraciones bajas de melatonina en las edades avanzadas, precisamente, cuando se detecta una mayor incidencia de dichas enfermedades.

MANDERA Y COL., 2003, apuntaron que la compresión de la glándula pineal en ratas, producía una reducción de las concentraciones de Melatonina en sangre; concluyeron diciendo que: "el estrés por compresión producía

disfunción en la pineal, y consecuentemente bajada en las concentraciones de melatonina, probablemente relacionada con la disminución de la acción protectora de las indolaminas”.

LYSENKO Y RED´KIN (2003), estudiaron el papel de la glándula pineal en la protección frente a las injurias por traumatismo corporal, encontrando siempre una disfunción pineal. Estos autores sugerían la sustitución de los glucocorticoides por la melatonina en los casos de shock traumático; basando sus afirmaciones en el involucramiento de la pineal en la reacción frente al estrés.

JOU Y COL., 2004, argumentaban que la disfunción mitocondrial inducida por el estrés oxidativo, jugaba un papel crucial en la patogénesis de un grupo importante de enfermedades. La función protectora mitocondrial resultaría imprescindible para el mantenimiento de la supervivencia celular. La melatonina protegería la disfunción mitocondrial frente al estrés oxidativo, y consecuentemente, prevendría la apoptosis y muerte celular; hecho demostrado en astrocitos de rata.

ORIGINALIDAD E INNOVACION DEL TEMA**ORIGINALIDAD Y GRADO DE INNOVACIÓN DEL TEMA PROPUESTO**

El estudio del estrés, el daño neuronal, y las implicaciones endocrino-funcionales, se ha incrementado en los últimos años. Sin embargo, el abordaje que planteamos en nuestro estudio, ofrece un grado de originalidad importante por diversos motivos:

1º- Por el sujeto de estudio: la oveja, animal altamente fotoperiodico.

2º- Por el modelo de estrés manejado (cambio de ubicación y alimentación), algo rutinario en los sistemas de producción intensiva o semiintensiva de los ovinos.

3º- Por la utilización de la melatonina como potencial tratamiento anti-estrés.

La escasez de estudios de idéntica naturaleza, en modelos animales, que contemplen el posible efecto anti estrés de la melatonina, unido a la metodología histofisiológica, convierten a nuestra investigación en original, innovadora, y con una aplicación directa: *“la modulación por la melatonina del estrés de manejo en ovejas”*.

GRUPOS DE INVESTIGACION QUE TRABAJAN EN EL TEMA

- Departamento de Biología Celular y Estructural de la Universidad de Texas: **Prof. Reiter.**
- Departamento de Anatomía de la Universidad de Copenhagen: **Prof. Möller y Prof. Mikkelsen.**
- Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires: **Prof. Cardinali.**
- Departamento de Anatomía de la Universidad de Carolina del Sur: **Prof. Zhang.**
- Instituto de Fisiología Comparada de la Universidad de Tours: **Prof. Ravault.**
- Departamento de Anatomía de la Universidad de Bangkok: **Prof. Phansuwan-Pujito.**
- Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid: **Prof. Calvo y Prof. Boya.**
- Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada: **Dr. Acuña Castroviejo**
- Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla: **Dr. Guerrero**
- Neurobiología de los ritmos. CNRS-Universidad Luis Pasteur. Estrasburgo. Francia: **Prof. Pevet**
- Departamento de Microscopía Electrónica. Universidad de Lodz Polonia **Prof. Karasek**
- Departamento de Obstetricia y Ginecología. Universidad de Adelaida. Australia: **Prof. Kennaway.**

OBJETIVOS

HIPOTESIS DE PARTIDA

Es conocida *la eficacia neuroprotectora y anti-estresante de la melatonina* en Medicina Humana. Basándonos en este hecho acreditado, planteamos una hipótesis sobre -“**el hipotético potencial anti-estrés de la melatonina**”-, en un modelo animal, de desarrollo de estrés por manejo.

En ovinos, bajo diversas condiciones de estrés (por manejo, cambios de alimentación, y de ubicación), y su correspondiente situación análoga en condiciones de bienestar animal, pretendemos modular estas condiciones, a través del hipotético poder anti-estresante de la melatonina.

Pretendemos que la realización de este trabajo de investigación, permitirá a la comunidad científica y a la industria farmacéutica, disponer de una mayor información sobre aspectos básicos poco contemplados:

1. La catalogación del bienestar animal, como un posible indicador del indicio de salud.
2. La consideración de los agentes estresantes como patógenos; y del estrés como enfermedad.
3. La consideración de la melatonina como fármaco eficaz en el tratamiento anti-estrés.

RESULTADOS PREVIOS DEL GRUPO DE TRABAJO

LA GLANDULA PINEAL OVINA

Desarrollo Prenatal

En la especie que nos ocupa, la cronología de aparición del primer esbozo glandular (como engrosamiento de la línea media diencefálica, próxima a La comisura posterior) se sitúa a los 30 días de edad prenatal (**REDONDO Y COL.**, 1996a, b).

Del estudio comparativo del primordio pineal en la oveja, con diversas especies de mamíferos, se deduce que en esta especie, al igual que ocurre en carnívoros y en la vaca, el esbozo de la pineal aparece en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Esta prontitud no es comparable con la que alcanza el desarrollo prenatal de la glándula en el hombre, que se sitúa en torno a los 33 días de gestación. En especies como el hámster, la rata o el conejo, la diferenciación es mucho más tardía, situándose en torno a los últimos días del desarrollo embrionario.

El crecimiento glandular a partir del esbozo pineal, fue bifásico:

- Fase ontogénico-proliferativa.
- Fase hipertrófico-diferenciadora.

La fase ontogénico-proliferativa se inició con la diferenciación del esbozo pineal a los 30 días de vida intrauterina, y comprendía los fenómenos de invasión de células endimarias hacia el parénquima pineal constituyente, y multiplicación de las células propias de la pineal. La característica diferencial de esta fase fueron las numerosas mitosis observadas a nivel periluminal (luz del receso pineal) e intersticial.

La fase hipertrófico diferenciadora alcanzaba el incremento de volumen de los pinealoblastos y su diferenciación en pinealocitos. Se situaba cronológicamente en torno a los 118 días de gestación, llegaba hasta las etapas perinatales y continuaba durante la vida extrauterina (**REDONDO Y COL.**, 2003 a,b).

El crecimiento de glandular a partir del esbozo embrionario, no seguía un modelo determinado. Se configuraba una estructura pseudolobular con folículos integrados, similar al modelo lobular observado en gatos, y que en nada se parece al modelo folicular detectado en el desarrollo embrionario del pollo y la rata; y también sin similitud con el modelo de crecimiento cordonal, propuesto por **CALVO Y COL.**, 1990, para el desarrollo postnatal de la glándula pineal del perro. De cualquier modo a partir de los 98 días de gestación, la glándula adquiría un aspecto compacto, fenómeno al que contribuían dos hechos:

1. El crecimiento glandular en un volumen casi constante, relacionado con una alta densidad celular, a la que contribuye la inmigración de células endimarias. En estadios perinatales, existe menor densidad, como consecuencia de la finalización de la migración endimaria y la hipertrofia pinealoblástica detectada.
2. La oclusión del receso pineal que se completa a partir de los 98 días de edad embrionaria. Dos hechos intervenían en este fenómeno:
 - a) El plegamiento epitelial consecuente con la estrecha relación parénquima estroma, evidenciable por la penetración de procesos pinealoblásticos en el mesénquima perivascular.
 - b) La irrupción de elementos pinealoblásticos hacia la luz del receso, facilitada por la discontinuidad en las uniones intercelulares.

En el proceso de oclusión del receso pineal quedaban oquedades (cisternas o rosetas), que disminuían considerablemente en estadios embrionarios perinatales. No encontramos significación funcional a la desaparición de dichas estructuras; sin embargo, la causa podría obedecer a la presión ejercida por las células colindantes; o bien, ser consecuencia de la obliteración de su luz por proliferación de células de su pared.

En el desarrollo prenatal de la pineal ovina, ha sido evidenciada una discreta zonificación en corteza y médula. Sin embargo, esta distinción zonal, no es tan clara como la evidenciada en cerdos y conejo.

La tipología celular en la histogénesis glandular venía definida por dos células: Pinealoblastos y Células Intersticiales. Los pinealoblastos estuvieron presentes a lo largo de toda la ontogénesis. Se mostraron en todo momento, con un gran desarrollo de los orgánoides del Sistema Vacuolar Citoplasmático, y abundante cantidad de microtúbulos en los procesos citoplasmáticos.

En etapas iniciales de la ontogénesis, fue frecuente la presencia de gránulos de glucógeno en el citoplasma de estas células. Sin embargo, a medida que avanza la ontogénesis desaparecían; este hecho nos planteó una doble cuestión: ¿desaparecía el glucógeno con el desarrollo embrionario porque representa una característica diferencial de la inmadurez celular? O ¿se trataba de un problema de la labilidad del glucógeno a las técnicas rutinarias?

A lo largo de la ontogénesis de los fetos ovinos, no hemos observado laminillas sinápticas en el citoplasma de los pinealoblastos. Este fenómeno podría deberse a 1 doble causa:

- a) A que los animales fueron eutanasiados durante el día.
- b) O bien deberse a la relación detectada entre el alto número de fibras amielínicas y la escasez o ausencia de laminillas sinápticas; hecho evidenciado en carnívoros por **CALVO Y COL.**, 1990.

A partir de los 118 días de gestación se observaron dos tipos de pinealoblastos de diferente electrodensidad; si embargo, estas diferencias en electrodensidad no podían soportar la hipótesis de la existencia de dos poblaciones celulares diferentes.

El papel de los pinealoblastos como células secretoras durante la vida intrauterina, aparece soportado por evidencias morfológicas tales como:

- La presencia de uniones comunicantes, tipo *gap junctions*, en los procesos pinealoblásticos.
- El tropismo perivascular de sus procesos citoplasmáticos.
- La presencia de vesículas adieletrónicas y electrodensas en los bulbos terminales de los procesos citoplasmáticos.

Estas características, unidas al gran desarrollo de membrana nuclear, Complejo de Golgi y retículo endoplásmico granular, se asociaban con una hipotética actividad funcional de la glándula durante la vida intrauterina.

Las células intersticiales aparecían en torno a los 98 días de gestación, por lo que podemos considerar a la oveja como una especie con desarrollo prematuro de las células intersticiales prenatales. En la vaca no aparecen hasta los 189 días de gestación; y en los carnívoros hasta la segunda semana de gestación.

La naturaleza de estas células fue determinada mediante el marcaje de células gliales [Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica (PTAH positivas)] y el inmunomarcaje con GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida). El análisis comparativo de estas dos determinaciones demostró que sobre la globalidad de células gliales (PTAH +), sólo un porcentaje expresaba positividad a la GFAP, lo que nos llevó a concluir que en el desarrollo prenatal de la glándula pineal ovina, existe una combinación de células de naturaleza glial-astrocitaria, en diversos estadios de maduración, y que constituye la segunda población celular (**FRANCO Y COL.**, 1997). La característica ultraestructural más destacable de estas células, fue el abundante contenido en microfilamentos de sus procesos citoplasmáticos; procesos citoplasmáticos de alto tropismo vascular, y que en su disposición alrededor de los vasos sanguíneos configuraban la barrera glial pineal.

A partir de los 117 días de gestación fueron observadas unas células diferentes a los pinealoblastos con un abundante contenido en gránulos pigmentarios y que denominamos células pigmentadas. Consideramos a estas células como un nuevo tipo celular basándonos en la carencia de microfilamentos en su citoplasma.

El pigmento detectado ha sido la melanina (positividad a la técnica de Masson Fontana). Dos poblaciones celulares evidenciaron gránulos pigmentarios: pinealoblastos y células pigmentadas; estas últimas, asumían el papel fundamental en la biosíntesis del pigmento melánico, durante la vida prenatal, como demostró la variabilidad de gránulos pigmentarios detectada.

Aunque la morfología y tamaño granular fue diferente, pensamos se trata, de diversos estadios de maduración, del mismo tipo de gránulo.

El estroma glandular se estructuraba a partir del conectivo capsular, trabecular, perivascular, y por la malla reticular que derivaba de los procesos citoplasmáticos de los pinealocitos y de las células intersticiales.

La vascularización de la pineal en ovinos prenatales fue intensa. Desde las primeras etapas prenatales se diferenciaba una densa red de capilares no fenestrados, que se dirigían, a través del conectivo trabecular, hasta la zona medular glandular, donde aumentaban su densidad y reducían su calibre.

A partir de los 70 días de edad intrauterina, se visualizaban fibras nerviosas amielínicas, que aumentaban progresivamente a lo largo del periodo prenatal.

Los hallazgos morfológicos de la pineal de fetos ovinos, arrojaban datos contradictorios a cerca del papel funcional de la glándula durante el desarrollo prenatal. Argumentos a favor fueron:

- El incremento de organoides citoplasmáticos implicados en la proteosíntesis de pinealoblastos.
- La configuración de una barrera glial perivascular con los procesos citoplasmáticos de las células intersticiales.
- La implicación de las células pigmentadas en la melanosíntesis.

En contra de esto:

- El bloqueo del posible vertido de secreciones pineales hacia el líquido cefalorraquídeo, por el alejamiento anatómico progresivo de la glándula con respecto al tercer ventrículo.

Desarrollo Postnatal

De acuerdo a criterios topográficos definidos por **VOLLRATH**, 1981, y en concordancia con lo reportado para la vida intrauterina (Redondo y Col. 1996 a, b; 2001 a, b) la glándula pineal ovina durante el desarrollo postnatal se podía definir como de Tipo A, próxima al tercer ventrículo. La extensión de la superficie pineal sobre la pared del tercer ventrículo, junto con los datos de longitud fronto-occipital y sagital media, mostraron que el crecimiento de la pineal se iniciaba en la edad prepuberal (1-6 meses) y se continuaba en la

edad fértil-puberal (24 meses). A partir de los 30 meses se evidenció un estancamiento de dicho crecimiento.

Durante la vida postnatal la citología pineal estuvo integrada por:

1. Pinealocitos.
2. Células Intersticiales.
3. Células que contienen gránulos pigmentarios.

Los pinealocitos se expandieron numéricamente hasta los 24 meses de edad; además, con valores de densidad celular más elevados en zona periférica que en zonas centrales de la glándula, argumentos a favor de la zonificación pineal en corteza y médula, como previamente había sido descrito durante la vida prenatal de ovinos (**REDONDO Y COL.**, 1998a).

La respuesta inmunocitoquímica de los pinealocitos a los marcadores neuroendocrinos [Synaptofisin (SYNAP), Enolasa neuronal Específica (NSE) y Enolasa neuronal No Específica (NNE)] fue variable de acuerdo al grupo de edad analizado. Como norma genérica dicha respuesta fue moderada en prepuberales y adultos, y máxima en fértil-puberales. La densidad numérica celular, la distribución en la superficie glandular, y la intensidad de inmunotinción, encontradas entre los diferentes marcadores neuroendocrinos utilizados, nos indicaban la existencia de un solo tipo celular, entre los pinealocitos, en diferentes grados de actividad funcional y desarrollo. Estas observaciones contradecían lo previamente reportado por **REDONDO Y COL.**, 1996a, quienes argumentaban la existencia de subpoblaciones dentro de los pinealocitos, en el desarrollo prenatal de la pineal ovina. También son contradictorias con las observaciones ultraestructurales, pues aunque observaron diferencias en los pinealocitos, en cuanto a la electrodensidad (pinealocitos adieletrónicos y electrodensos; pinealocitos tipos I y II), esta configuración no se mantenía a lo largo de todo el desarrollo postnatal, pues a partir de los 36 meses de edad, sólo observó pinealocitos electrodensos; por consiguiente, la diferenciación prenatal de subpoblaciones celulares dentro de los pinealocitos, no se continuaba a lo largo del desarrollo postnatal.

Se evidenció de forma general una expansión numérica de células SYNAP, GFAP y VIM positivas, hasta los 24 meses de desarrollo postnatal. La distribución de estas células fue más intensa en el área medular que en la zona cortical de la glándula pineal, confirmando lo que **REDONDO Y COL.**, 1996 a habían descrito en el desarrollo prenatal de la pineal ovina: *“que corteza y médula eran dos áreas funcionalmente distintas”*.

A lo largo de todo el desarrollo postnatal, hemos observado un tropismo vascular de los procesos citoplasmáticos de las células pinealocíticas. Esta afinidad, unida a la presencia de vesículas claras y oscuras en los bulbos terminales de los procesos celulares, y de uniones comunicantes tipo *gap junctions*, hicieron pensar que los pinealocitos podían llevar a cabo funciones secretoras. La presencia abundante de las estructuras citoplasmáticas implicadas en la actividad metabólica secretora, unida al mayor desarrollo de dichas estructuras en los pinealocitos de los fértil-puberales, representaba la expresión morfológica de esta hipotética funcionalidad.

La presencia de gránulos de glucógeno en los pinealocitos fue ocasional, y nunca en animales mayores de 12 meses; la progresiva desaparición del glucógeno durante el desarrollo postnatal, representaría una característica diferencial de la inmadurez celular.

Al igual que ocurría en la vida prenatal, durante el desarrollo postnatal, no se detectaron laminillas sinápticas; el sacrificio de los animales durante el día y la abundancia de fibras nerviosas amielínicas contribuían a este hecho.

El segundo tipo celular que integraba la pineal ovina durante el desarrollo postnatal, eran las células intersticiales. Dichas células evidenciaron una expansión numérica similar a la descrita para los pinealocitos. Su localización al igual que ocurría en la vida prenatal, fue fundamentalmente perivascular, evidenciando diferencias de densidad celular entre corteza y médula. La reacción inmunohistoquímica frente a la PTAH, junto a la expresión de inmunomarcadores de células gliales, nos indujo a pensar en su naturaleza glial-astrocitaria, hecho descrito con anterioridad en ovinos durante el

desarrollo intrauterino (**FRANCO Y COL.**, 1997; **REGODÓN Y COL.**, 1998 a; **REDONDO Y COL.**, 2001b).

El comportamiento de las células intersticiales frente a los marcadores de células gliales [Hematoxilina Ácida Fosfotúngstica (PTAH positivas) y el inmunomarcaje con Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) y con Vimentin (VIM)], evidenció que el número de células PTAH positivas se incrementaba desde el primer de edad hasta los 24 meses. Este incremento, fue paralelo al aumento de la densidad numérica de células GFAP positivas; sin embargo, el número de células GFAP positivas fue siempre menor que el de PTAH positivas, lo cual nos indicaría que algunas de las células gliales (PTAH) no eran positivas a la GFAP. En este sentido **FRANCO Y COL.**, 1997 y **REDONDO Y COL.**, 2001b, en sus estudios durante el desarrollo pre y postnatal, de la pineal ovina, apuntaban que las células GFAP negativas, podrían ser astrocitos inmaduros.

Durante el desarrollo postnatal (hasta los 24 meses de edad) se detectó un gradual incremento en el número de células VIM positivas; este hecho, podría confirmar la validez de la VIM como marcador de células intersticiales con un cierto grado de madurez (**FRANCO Y COL.**, 1997).

La interpretación de los resultados morfométricos e inmunocitoquímicos, nos llevó al establecimiento de dos conclusiones en lo referente a la segunda población celular de la pineal ovina durante el desarrollo postnatal:

1. La no existencia de una clara relación de correspondencia entre el número de células PTAH positivas, y el de GFAP y VIM positivas.
2. La población de células intersticiales fue una combinación de células de naturaleza glial-astrocitaria en varios estadios de madurez.

REDONDO Y COL., 2001b, mediante análisis ultraestructural de células intersticiales, evidenciaron signos morfológicos de actividad funcional en estas células, alcanzando su máxima expresión entre los 9 y los 24 meses de edad. Apoyándonos en estos argumentos; y considerando la relación de proximidad con los vasos sanguíneos de las células VIM positivas; y muy especialmente las GFAP positivas, podríamos hipotetizar a favor de la actividad funcional de dichas células. Dicha actividad podría estar representada por el intercambio de

sustancias entre el parénquima pineal y las estructuras vasculares, todo lo cual, completaría la clásica función de células de sostén que tradicionalmente se atribuía a estas células.

En lo referente a las características ultraestructurales de las células intersticiales mostraron una cierta homogeneidad, similar a la descrita en el desarrollo prenatal (**FRANCO Y COL.**, 1997); no obstante, los datos electronmicroscópicos de estas células revelaban que los animales en edad fértil-puberal (9-24 meses) mostraron mayores signos morfológicos de actividad funcional.

Por otro lado, el mayor número de uniones comunicantes tipo *gap junctions*, entre los bulbos terminales de las células intersticiales, fue evidenciado en los animales sacrificados entre los 9 y los 24 meses de edad. Hallazgos similares fueron descritos en pinealocitos; poniendo de manifiesto dos hechos fundamentales:

1. El importante papel que desempeñaban estas uniones en el parénquima pineal ovino, como barreras controladoras de la circulación de los fluidos intercelulares, y
2. Que las pineales de los animales de edades comprendidas entre los 9 y 24 meses, fueron funcionalmente muy activas, debido al alto número de uniones comunicantes que se establecían entre los pinealocitos; entre las células intersticiales; y entre los pinealocitos y células intersticiales.

Otro hecho importante a considerar para las células intersticiales, fue su relación con las fibras nerviosas. Hemos detectado relaciones de contacto específico entre las células intersticiales y las fibras nerviosas amielínicas; dichos contactos son más numerosas en las glándulas funcionalmente más activas (las de los animales de edades comprendidas entre los 9 y 24 meses). No se sabe con certeza el significado funcional de esta relación; sin embargo, se especula que las fibras nerviosas pudieran intervenir en el desarrollo de dichas células; de hecho, la ausencia de inervación hace que estas células no se desarrollen (**CALVO Y BOYA**, 1983).

Durante el desarrollo prenatal del pineal de la oveja (**REGODÓN Y COL.**, 1998 a, b), se hablaba de las células pigmentadas, como un tipo celular diferente a los pinealocitos, y que desempeñaba un papel fundamental en la biosíntesis del pigmento melánico. En estudios ultraestructurales durante la vida postnatal de la oveja, no se han detectado células pigmentadas diferentes a los pinealocitos y células intersticiales (**REGODON Y COL.** 2001). Estas afirmaciones estarían en correspondencia con nuestras observaciones, donde la detección de glándulas pineales pigmentadas, se reducía considerablemente con la edad. En nuestro estudio se confirmó la diferenciación postnatal de células que contenían gránulos pigmentarios. Estos gránulos pigmentarios (melanina, por su positividad a la técnica de Masson Fontana) han sido observados tanto en pinealocitos como en células intersticiales. El papel prioritario de las células pigmentarias durante la vida intrauterina de la oveja, en relación a la síntesis de melanina, podría ser asumido por los pinealocitos en el desarrollo postnatal; y ello en base a dos hechos:

1. El elevado número de gránulos pigmentados detectado en dichas células
2. La heterogeneidad de dichos gránulos en cuanto a morfología, y tamaño y electrodensidad.

La organización de la arquitectura glandular, con formación de pseudolóbulos que contenían glomérulos, fue una continuación de lo evidenciado en etapas embrionarias. Se seguían detectando rosetas pero en menor número y en franca disminución con la edad. De acuerdo a nuestros resultados, y en correspondencia a lo refrendado en la vida prenatal de la oveja (**REGODÓN Y COL.**, 1998 a) estas cavidades se constituyeron por pinealocitos. La presencia de rosetas en animales prepuberales, y su desaparición en puberales y adultos, nos hizo pensar que son un mecanismo de crecimiento glandular, que se iniciaba durante la vida prenatal, y que en la vida postnatal, desaparecía cuando la glándula adquiría su mayor desarrollo.

El estroma glandular se configuraba por fibras de colágeno y de reticulina, de disposición intercelular y perivascular, que aumentaban progresivamente

hasta los 24 meses de edad. En realidad el estroma fue muy similar al detectado por **REDONDO Y COL.**, 1996a, en pineales de ovinos de 150 días de gestación (perinatales).

La vascularización de la glándula pineal ovina, durante el desarrollo postnatal, estuvo representada por una amplia red de capilares sanguíneos intrapineales, de tipo no fenestrado, similares a los observados en el desarrollo prenatal de la glándula pineal ovina (**REDONDO Y COL.**, 1996a; **FRANCO Y COL.**, 1997; **REGODÓN Y COL.**, 1998 a). La existencia de capilares no fenestrados durante el desarrollo postnatal de la glándula pineal ovina, confirmaba y ampliaba la hipótesis referenciada por **REDONDO Y COL.**, 1996a, a cerca de la no existencia de barrera hemato-encefálica a lo largo de la ontogénesis de la pineal ovina. La vascularización fue aumentando progresivamente a lo largo de la vida postnatal hasta los 24 meses de edad; de tal modo que las pineales de los animales fértil-puberales fueron los que evidenciaron una vascularización mas intensa.

Con la técnica de la PTAH, fibras nerviosas gliales, de localización fundamentalmente perivascular, fueron detectadas a lo largo de todo el desarrollo postnatal, más patentes en los animales de edades comprendidas entre los 9 y 24 meses de edad (puberales). Con técnicas inmunohistoquímicas, utilizando los marcadores [Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) y Neuropéptido Y (NPY)] se pudo evidenciar que se trataba de una inervación peptidérgica simpática y parasimpático.

La presencia de fibras nerviosas VIP positivas, ha sido detectada en la glándula pineal ovina durante el desarrollo postnatal. La cantidad de fibras nerviosas VIP positivas fue escasa en la pineal de la oveja, en franca correspondencia con lo detectado en otras especies de mamíferos. El origen de las fibras VIP positivas ha sido objeto de numerosas controversias, no existiendo unanimidad al respecto. La mayoría de las investigaciones en mamíferos (**MOLLER Y COL.**, 1992) apuntaban una procedencia derivada del ganglio parasimpático terigopalatino. **COZZI Y COL.**, 1990 indicaban que las fibras nerviosas VIP positivas, presentes en la cápsula pineal ovina, podrían

derivar de un ganglio periférico de la cabeza. **UEMURA Y COL.**, 1987 en pineales de perro, aducían que el ganglio cervical superior podría ser una fuente de fibras nerviosas inmunoreactivas a la VIP. Por consiguiente podríamos considerar un origen múltiple para las fibras VIP en la pineal ovina.

La localización fue fundamentalmente perivascular, estando siempre presentes en poca cantidad, en coincidencia generalizada con la mayoría de los autores consultados.

La presencia de receptores específicos para las fibras VIP, evidenciada mediante autorradiografía, en rata (**MARTÍN Y COL.**, 1987), demostró una acción directa de VIP sobre los pinealocitos, relacionándose dicha acción con la liberación de MT por la influencia sobre vasos sanguíneos.

Al igual que ocurría para las fibras nerviosas VIP positivas, Las fibras nerviosas NPY positivas, fueron detectadas en la glándula pineal ovina durante el desarrollo postnatal.

Su localización en los tres grupos de edades analizados, coincidiendo con lo detectado en otras especies de mamíferos, fue fundamentalmente perivascular; aunque la localización parenquimatosa.

El calcio en nuestra experiencia se detectó a los 9 meses de edad, aumentando los depósitos hasta los 60 meses. Se pudo detectar una correlación entre la edad postnatal y el número de capas de los acérvulos de calcio. La formación de estas capas, podría estar conectada con cambios circunstanciales en los niveles de calcio en la pineal, o con la actividad secretora de los pinealocitos, o ser el reflejo de un fallo en la homeostasis del calcio.

En cultivos celulares de pinealocitos de rata, se ha demostrado que el neuropéptido Y incrementa el calcio intracelular (**SIMMONEAUX Y COL.** 1999). En nuestra experiencia no detectamos esta relación, ya que la mayor parte de la inmunoreactividad frente al NPY, presente en los animales de edad fértil-puberal, no coincidió con los mayores depósitos de calcio, presentes en el grupo de animales de edad adulta.

La glándula pineal ovina mostró signos morfológicos de actividad metabólica endocrina a lo largo del todo el desarrollo postnatal. Los pinealocitos evidenciaban gran desarrollo de las estructuras implicadas en los mecanismos secretores. Por su parte, las células intersticiales, unirían a su clásica función de sostén, la de regular el intercambio de sustancias entre la sangre y el parénquima pineal (**FRANCO Y COL.**, 1997).

Tanto los pinealocitos como las células intersticiales se mostraron, en los animales del grupo II, muy activos, sobretodo en lo relacionado al establecimiento de uniones comunicantes entre sus procesos citoplasmáticos. Entre los 9 y 24 meses de edad, la pineal alcanzó el mayor grado de diferenciación morfológica y funcional. La intensa vascularización, unida a la abundante presencia de fibras nerviosas corroboró este hecho.

A partir de los 36 meses de desarrollo postnatal fueron evidenciados signos morfológicos de declive celular y consecuentemente glandular. Este hecho se debía a la menor presencia de vascularización y de fibras nerviosas amielínicas; al menor número de uniones intercelulares comunicantes; a la mayor presencia de depósitos de calcio; y al amplio desarrollo del estroma.

Todas las observaciones histológicas detalladas con anterioridad, son fruto de un diseño experimental, planteado para definir la morfología de la pineal de la oveja durante la vida postnatal. Con este propósito, 24 hembras ovinas fueron distribuidas en tres grupos experimentales, de acuerdo a su edad y fisiología reproductiva: Grupo I (1-6 meses: prepuberales y/o infantiles), Grupo II (9-24 meses: fértil-puberales) y Grupo III (36-60 meses: adultos). En los 8 animales de cada grupo se determinó la longitud, peso y coloración de la pineal; y se ejecutaron análisis estructurales; inmunohistoquímicos; morfométricos y finalmente ultraestructurales. La interpretación de los resultados obtenidos, nos ha llevado al establecimiento de las siguientes conclusiones:

1. La glándula pineal ovina durante la vida postnatal, se mostró histofisiológicamente activa desde el primer mes (edad infantil), alcanzando su paroxismo de actividad morfofuncional entre los 9 y 24 meses (edad fértil-puberal); a partir de los 36 meses (edad adulta), se detectaron evidencias morfológicas de declive funcional.
2. Las glándulas pineales de los animales puberales, fueron más pesadas y de mayor longitud en diámetros fronto-occipital y sagital medio, que la de los prepuberales y adultos. La coloración estuvo más presente en prepuberales (38%), que en puberales y adultos (13%).
3. La arquitectura glandular fue cualitativamente similar en todo el desarrollo postnatal, apareciendo integrada por un parénquima con pinealocitos y células intersticiales, un estroma colágeno-reticular, alta vascularización y moderada presencia de fibras nerviosas.
4. Los pinealocitos en los tres grupos de edades analizados: prepuberal, fértil-puberal y adultos, mostraron afinidad por los marcadores neuroendocrinos; mayor para la synapthophysin, y la enolasa neuronal no específica, que para la específica; y más notoria en pinealocitos de animales puberales. La densidad numérica celular fue inferior en corteza que en médula, para todas las edades analizadas. Desde el primer mes, y más significativamente entre los 9 y 24 meses, la ultraestructura de los pinealocitos mostró signos morfológicos de actividad funcional, implicando especialmente a los organoides del SVC.
5. La expresión de la PTAH y de los Neuropéptidos GFAP Y VIM, en células intersticiales, nos indicó que la segunda población celular de la glándula pineal ovina, durante el desarrollo postnatal, fue una combinación de células glial/astrocitarias en diversos estadios de maduración. En estas células, y de manera más manifiesta en los animales fértil-puberales, se encontraron signos de actividad funcional, morfológicamente representados por el establecimiento de contactos específicos con las fibras nerviosas en el espacio perivascular, y la presencia de nexos entre los bulbos terminales de los procesos citoplasmáticos.

6. La expresión manifiesta del neuropéptido Y, más intensa en animales fértil-puberales, fue un indicativo de inervación peptidérgica simpática. La inmunodetección, tanto estructural como ultraestructural, fue pericapsular, en el conectivo interseptal y en el espacio perivascular. La inervación parasimpática, evidenciada a través del péptido intestinal vasoactivo, estuvo menos presente y guardó idénticos patrones de intensidad y distribución que el neuropéptido Y. Ambos tipos de fibras nerviosas se expresaban ultraestructuralmente como no mielinizadas.
7. Las estructuras vasculares se configuraban como una amplia red de capilares no fenestrados, más numerosos en la zona medular que en la corteza; y de mayor tamaño en corteza que en médula.

OBJETIVOS GLOBALES**OBJETIVOS GENERALES**

Se evalúa en la oveja, el efecto modulador de la melatonina, como tratamiento alternativo y potencial, del estrés inducido por cambios de alimentación y ubicación. Dentro de los objetivos científico-tecnológicos prioritarios de esta investigación, podríamos destacar el establecimiento de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades como el estrés. Se trata en definitiva del uso racional de compuestos alternativos a los que se encuentran regulados.

Se ensaya un estudio histofisiológico sobre la utilización de la *melatonina*, como compuesto modulador de la acción del agente patógeno (*agente estresante*); y de la respuesta del hospedador (*oveja*), para el control de la enfermedad (*estrés*).

OBJETIVOS CONCRETOS**OBJETIVOS CONCRETOS**

1.- Establecer parámetros histofisiológicos del hipotálamo en condiciones de bienestar animal; la modulación de los mismos por el tratamiento con melatonina; las modificaciones de dichos parámetros bajo las condiciones de estrés inducido; y por último evaluar el posible efecto anti estrés de la melatonina. Todos los indicadores morfofuncionales se analizarán bajo condiciones de fotoperiodos largos y cortos. Se analizará, la histología normal de los NSQ del hipotálamo; y las variaciones de los receptores de melatonina MT₁, en las neuronas de los NSQ. Se evaluará el efecto neurotrófico protector, las acciones antiapoptóticas frente a las injurias neuronales estrés-inducidas, y la respuesta hormonal al estrés, a través de inmunodetección y cuantificación de neurotrofinas hipotalámicas (BDNF) y proteínas de golpe de calor (HSP-90).

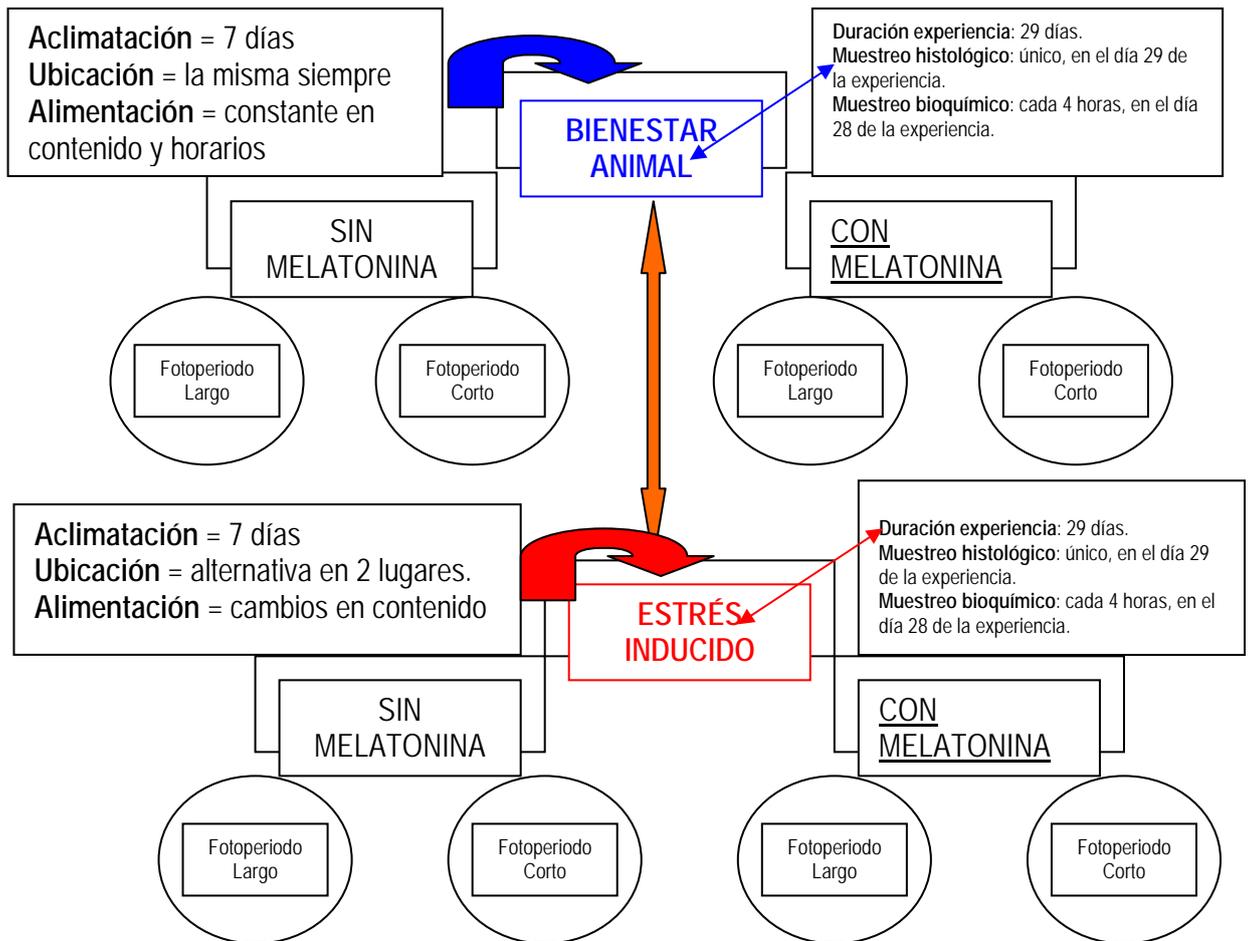
2.- Determinar el efecto modulador de la melatonina, sobre la histofisiología pineal, en condiciones de estrés inducido por manejo, y en condiciones de bienestar animal. La evaluación histofisiológica se realizará a través, de análisis histológicos rutinarios, del comportamiento inmunohistoquímico de pinealocitos, de la implicación del Sistema Nervioso Simpático y Parasimpático (mediante la inmunodetección de los neuropéptidos VIP y NPY), y de la evaluación de las modificaciones de expresión del ARN_m de los B₁ Adrenoreceptores en la membrana de los pinealocitos.

3.- Evaluar las modificaciones en contenidos de melatonina en plasma y en parénquima pineal; así como la cuantificación de las concentraciones séricas de corticosterona, y niveles de inmunoglobulinas, en condiciones de estrés inducido, con y sin tratamiento con melatonina, frente al bienestar animal, con y sin tratamiento con melatonina.

MATERIAL Y METODOS

DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

ESQUEMATIZACIÓN DE LA EXPERIENCIA



Condiciones Fotoperiódicas

El experimento tendrá dos etapas de realización: una en el mes de junio, bajo condiciones fotoperiódicas inhibitorias, fotoperiodo largo (LP –16 h. De luz/ 8 horas de oscuridad-); y otra en en el mes de diciembre, bajo condiciones fotoperiódicas estimuladoras, fotoperiodo corto (SP – 8 h. De luz/ 16 horas de oscuridad).

Diseño experimental

La distribución de animales para el diseño experimental será la siguiente:

Condiciones →	BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
	LP	SP	LP	SP	LP	SP	LP	SP
Número de animales por Ciclos L/D	3	3	3	3	3	3	3	3
	1L/2D	1L/2D	1L/2D	1L/2D	1L/2D	1L/2D	1L/2D	1L/2D

Condiciones De Bienestar Animal, Con Y Sin Melatonina

Los animales experimentales (corderas sexualmente maduras, de un año de edad , en anoestro) fueron alojados en 2 habitáculos de 20 m² (1 para los los animales con bienestar y sin tratamiento con melatonina; y otro para los tratados con melatonina).

Las corderas se aclimataron durante 7 días y fueron sometidas a un regimen alimenticio de paja de avena, concentrados y agua “*ad libidum*”. En el día 8 posterior a la aclimatación, se procederá a la colocación (previa tranquilización) de un implante subcutaneo con excipiente...csp 20,106 en animales sometidos a bienestar y sin melatonina; y un implante de melatonina a los tratados (**Melovine** –melatonina...18,000 mg y excipiente...csp 20,106 mg; CEVA, SANTE ANIMALE).

Muestreo

20 días después de los implantes se procederá al la toma de muestras, realizándose del modo siguiente:

*Fotoperiodo Largo*_(LP –16 h. De luz/ 8 horas de oscuridad; mes de junio)

-Periodo de luz...a las 14 h, mitad del periodo.

-Periodo de oscuridad...a las 2 h, mitad del periodo.

*Fotoperiodo Corto*_(SP –8 h. De luz/ 16 h. de oscuridad; mes de diciembre)

-Periodo de luz...a las 14 h, mitad del periodo.

-Periodo de oscuridad...a las 2 h, mitad del periodo.

La toma de muestras, supondrá:

-*Muestreo bioquímico*: toma de muestras cada 4 horas, durante 24, en el día 28 de la experiencia.

-*Muestreo histológico*: Tranquilización, miorelajación y eutanasia en el día 29 de la experiencia. El muestreo histológico se ejecutará en las mitades de los períodos de luz y oscuridad; a las 14:00 h, y a las 2:00 h. respectivamente.

Condiciones De Estrés Animal, Con Y Sin Melatonina

Las corderas fueron alojadas en 2 habitáculos de 20 m² (1 para los los animales con estrés y sin tratamiento melatonina; y otro para los tratados con melatonina).

Los animales sometidos a estrés, con o sin melatonina, tras un periodo de aclimatación de 7 días, se procedió a la colocación de implantes subcutáneos de excipiente y melatonina, en tiempo y forma, similar a lo descrito para los supuestos experimentales anteriores.

Durante los 20 días de permanencia con el implante, se realizaron inducciones de estrés, mediante cambios alternativos de:

- alimentación (tipo 1: paja de avena-concentrados y tipo 2: heno de pradera- cereales grano -5 días para cada tipo de alimentación-).
- de ubicación (dos habitáculos, cambiándose los animales alternativamente, coincidiendo con el cambio de alimentación).

El muestreo bioquímico e histológico, será ejecutado de igual forma que para las condiciones de bienestar animal.

DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA:

- 1.- Aclimatación.
- 2.- Implantes.
- 3.- Muestreos.

ACLIMATACION: Días

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---

IMPLANTE EXCIPIENTE Y/O MELATONINA: Días

8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

MUESTREO BIOQUÍMICO	MUESTREO HISTOLÓGICO
Día 28	Día 29

ANALISIS MACROSCOPICOS DE LA GLANDULA PINEAL[®]**ASPECTO MACROSCOPICO Y SITUACION ANATOMICA DE LA PINEAL**

Se describieron aspectos macroscópicos relacionados con el volumen, la coloración y la consistencia. Además se detalló la situación topográfica de la glándula, pormenorizando en las relaciones anatómicas de la misma.

Peso, longitud y Pigmentación Glandular

Previas tranquilización con inyección intramuscular (0,5 mg/100kg de peso vivo) de propionil-fenotiazina; y anestesia por inyección intra venosa de tiopental sódico (4gr en 20% de solución acuosa), los animales fueron sacrificados y decapitados. Tras el sacrificio[®] se realizó la disección del bloque cefálico, y la separación de ambos hemisferios cerebrales; se accedió a la glándula pineal para proceder, una vez exteriorizada, al análisis de su superficie, coloración y pesado. Seguidamente se realiaron las mediciones de la glándula con dos cortes:

- Longitudinal, En Dirección Fronto-Occipital
- Transversal, En Dirección Dorso-Ventral.

La superficie de corte se proyectó en una plantilla planimétrica para realizar las correspondientes mediciones.

[®] El Análisis se realizó durante las mitades de los períodos de luz y oscuridad, a las 14:00 h, y a las 02:00 h., respectivamente, y en los meses de junio y diciembre, para fotoperiodos largo y corto, respectivamente.

ANÁLISIS ESTRUCTURALES DE LA GLANDULA PINEAL®**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA GLANDULA PINEAL**

Troceada la glándula en dos mitades, cada una de ellas fue fijada en formol al 10% en pH neutro, procesadas al vacío, incluidas en parafina y teñidas con:

- Hematoxilina-Eosina (H-E)
- Tricómico de Masson (TM)
- Van Gieson (VG)
- Reticulina de Gomori (RG)
- Hematoxilina fosfotúngstica (PTAH)
- Masson Fontana (MF).

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA GLÁNDULA PINEAL[®]

INMUNODETECCIÓN ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE PINEALOCITOS (SYNAP, NNE, NSE).

La técnica de la Extravidina-Biotina se aplicó sobre pineales (La glándula seccionada a la mitad) lavadas durante 1 hora en tampón cacodilato 0,2M, pH 7.2 con 1% de sacarosa; y fijadas en formol al 10% en pH neutro, procesadas al vacío, incluidas en parafina de bajo punto de fusión, e inmunoteñidas con los marcadores específicos de pinealocitos (Cuadro 1):

- SYNAP (Sinaptophysin)
- NSE (Enolasa Neuronal Específica)
- NNE (Enolasa Neuronal No Específica).

Cuadro 1: Anticuerpos Primarios Y Secundarios Utilizados En La Inmunodetección De Pinealocitos

<u>ANTICUERPOS PRIMARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
Synaptophysin	Ratón	Células Neuroendocrinas	1/200; 3 Horas a 20°C	Sigma Aldrich, España.S-5768
Enolasa Neuronal Específica	Ratón	Células Neuroendocrinas	1/50; 3 Horas a 20°C	Novocastra, España. NCL-NSE
Enolasa Neuronal No Específica	Ratón	Células Neuroendocrinas	1/50; 3 Horas a 20°C	Dr. Carapeto SES. Cáceres.
<u>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
IgG De Cabra Anti Ratón	Cabra	IgG De Ratón	1/200; 30 Minutos a 20°C	Sigma Aldrich, España.B-7151

INMUNODETECCION ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECIFICOS DE CELULAS INTERSTICIALES (PTAH, GFAP, VIM).

En primer lugar se determinó la presencia de células de naturaleza glial, mediante la técnica Hematoxilina Acida Fosfotungstica (PTAH).

- PTAH (Hematoxilina Acida Fosfotúngstica)

Ulteriormente, y con idéntica técnica y metodología, a la referenciada para en marcaje de pinealocitos, se llevó a cabo la inmunodetección de marcadores específicos de células intersticiales (cuadro 2).

- GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida)
- VIM (Vimentin).

Cuadro 2: Anticuerpos Primarios Y Secundarios Utilizados En La Inmunodetección De Células Gliales.

<u>ANTICUERPOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
<u>PRIMARIOS</u>				
Proteína Fibrilar Glial Acida	Ratón	Células Gliales	1/400; 3 Horas a 20°C	Sigma Aldrich, España.G-3893
Vimentin	Ratón	Células Gliales	1/20; 3 Horas a 20°C	Sigma Aldrich, España.V-5255
<u>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</u>				
IgG De Cabra Anti Ratón	Cabra	IgG De Ratón	1/200; 30 Minutos a 20°C	Sigma Aldrich, España.B-7151

INMUNODETECCION ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECIFICOS DE FIBRAS NERVIOSAS VIP, NPY)

La técnica de la Extravidina-Biotina se aplicó sobre pineales fijadas en formol al 10% en pH neutro, procesadas al vacío incluidas en parafina de bajo punto de fusión, e inmunoteñidas con los marcadores específicos de fibras nerviosas (cuadro 3):

- VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo)
- NPY (Neuropéptido Y)

INMUNODETECCION ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECÍFICOS MELATONINA

La técnica de la Extravidina-Biotina se aplicó sobre pineales fijadas en formol al 10% en pH neutro, procesadas al vacío incluidas en parafina de bajo punto de fusión, e inmunoteñidas con los marcadores específicos de fibras nerviosas (cuadro 3):

- Melatonina

Cuadro 3: Anticuerpos Primarios Y Secundarios Utilizados En La Inmunodetección De Fibras Nerviosas y Melatonina.

<u>ANTICUERPOS PRIMARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
VIP	Ratón	Fibras Nerviosas	1/500; 3 Horas a 20°C	Dr. Carapeto. SES. Cáceres.
NPY	Ratón	Fibras Nerviosas	1/1000; 3 Horas a 20°C	Dr. Carapeto. SES. Cáceres.
Melatonina	Ratón	Melatonina	1/50; 30 minutos a 20°C	Dr. Carapeto. SES. Cáceres.
<u>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
IgG De Cabra Anti Ratón	Cabra	IgG De Ratón	1/200; 30 Minutos a 20°C	Sigma Aldrich, España. B-7151

ANÁLISIS HISTOMORFOMETRICOS Y ESTADÍSTICOS DE LA GLANDULA PINEAL[®]

ANÁLISIS HISTOMORFOMETRICO Y ESTADISTICO

Los estudios histomorfométricos se realizaron sobre muestras incluidas en parafina e inmunoteñidas mediante Extravidina-Biotina con los marcadores específicos de pinealocitos, células intersticiales y fibras nerviosas. Las muestras se tomaron de las siguientes áreas: proximal, intermedia y distal (cerca del receso pineal); y en las regiones dorso- y ventroperiférica, y dorso- y ventrocentral. Las áreas dorsoperiférica y ventroperiférica correspondían a la corteza glandular, y las regiones dorsocentral y ventrocentral al área medular (**REDONDO Y COL.**, 2003 a,b). Se extrajeron dos secciones por cada glándula, separadas por una distancia de 50 μm . Dos campos de 10.000 μm^2 fueron seleccionadas al azar por cada sección.

Análisis Histomorfométrico Y Estadístico supuso la determinación de:

- Número Total De Pinealocitos Por Area De Rererencia.
- Número Total De Células Intersticiales Por Area De Rererencia.
- El Volumen Promediado^a De Células SYNAP + Y GFAP+

El análisis histomorfométrico supuso también la realización de:

- Inmunohistoquímica Cuantitativa De La Presencia De Fibras Nerviosas VIP y NPY En Area De Referencia.
- Inmunohistoquímica Cuantitativa De La Presencia De Melatonina En Area De Referencia.

La densidad del perfil de las fibras NPY y VIP y de la melatonina fue realizada siguiendo la metodología propuesta por **MÖLLER Y COL.** (1998)^b. Se utilizará un microscopio óptico con objetivo de 25 y una rejilla rectangular (área

^a El volumen promediado fue determinada en 100 células inmunomarcadas, seleccionados de los campos y secciones anteriormente descritas.

^b Möller M., Masson-Pevet M., Pevet P. (1998) Annual variations of the NPYergic innervation of the pineal gland in the European hamster (*Cricetus cricetus*): a quantitative immunohistochemical study. Cell Tissue Res. 291(3): 423-431.

total de la rejilla $158400 \mu\text{m}^2$) subdividida en 400 pequeños rectángulos (área de $396 \mu\text{m}^2$). La rejilla rectangular suponía aproximadamente el 20% de La superficie pineal. La densidad tanto de fibras, como de la melatonina fue medida dentro de cada pequeño rectángulo. El número de perfiles fue contado en 15 secciones de cada animal (en torno a $2.4 \text{ mm}^2/\text{animal}$) y referenciado como media \pm Error Estándar. Los datos obtenidos fueron analizados mediante 1 prueba no paramétrica de rangos señalados de Wilcoxon.

Finalmente se completó la histomorfometría con el cálculo de:

- **El Volumen Glandular.**

Primero se determinó la densidad numérica de pinealocitos y de células intersticiales; y a continuación el volumen glandular (volumen pineal).

El volumen pineal se computó de acuerdo a la fórmula propuesta por (**CERNUDA-CERNUDA Y COL.**, 2000): $V_{\text{pineal}} = t \sum S_i$; ($t = 100 \mu\text{m}$); donde S es el área de las secciones calculadas con un analizador semiautomático de imágenes (Vid 4).

La densidad numérica celular (de pinealocitos y células intersticiales), fue calculada mediante la fórmula propuesta por (**CERNUDA-CERNUDA Y COL.**, 2000): $N_V = N_A / (T+D-2h)$, en la cual N_A el número de pinealocitos o células intersticiales, por unidad de área y sección.

T es la media del grosor de la sección ($1 \mu\text{m}$).

D es la media del diámetro nuclear.

h es la altura de la sección.

ANALISIS ULTRAESTRUCTURALES DE LA GLANDULA PINEAL®**ANALISIS ULTRAESTRUCTURALES DE LA GLANDULA PINEAL**

La glándula pineal se fijó en 2.5% de glutaraldehído 0.1M y paraformaldehído al 2% en buffer fosfato (pH 7.4). Tras 24 horas de fijación a 4°C, se postfijaron en 1% de tetraóxido de osmio de 0.1M de buffer fosfato (pH 7.4), durante dos horas. Las muestras fueron deshidratadas en una solución de etanol graduado (50,70,90 y 100%) y finalmente embebidas en resina epoxy. Las secciones ultrafinas se contrastaron en citrato de plomo y acetato de uranilo.

ANÁLISIS INMUNOELECTRONOMICROSCÓPICOS DE LA GLÁNDULA PINEAL[®]

INMUNODETECCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE PINEALOCITOS Y CELULAS INTERSTICIALES.

Las muestras glandulares correspondientes, una vez fijadas en glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en buffer fosfato 0.1M, pH = 7.4 a 4°C, durante 24 horas. Posteriormente se siguió la metodología anteriormente descrita en el estudio ultraestructural; y finalmente las muestras se incluyeron en LR White, para ser sometidas a la técnica inmunohistoquímica del oro coloidal, para la inmunodetección electronmicroscópica de los marcadores específicos de pinealocitos y células intersticiales (cuadro 4). Previamente a la incubación del anticuerpo primario, las muestras sufrieron un pretratamiento en una solución acuosa saturada de metaperyodato sódico, durante 30 minutos, para eliminar el osmio del tejido.

- SYNAP.
- GFAP.

Cuadro 4: Anticuerpos Primarios Y Secundarios Utilizados En La Detección Inmuno-electronmicroscópica De Pinealocitos y Células Intersticiales.

<u>ANTICUERPOS PRIMARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
Synaptophysin	Ratón	Células Neuroendocrinas	1/200; 1 Hora a 37°C	Sigma Aldrich, España.S-5768
Proteína Fibrilar Glial Ácida	Ratón	Células Gliales	1/250; 1 Hora a 37°C	Sigma Aldrich, España.G-3893
<u>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
IgG De Cabra Anti Ratón Conjugada con oro coloidal 10nm	Cabra	IgG De Ratón	1/40; 1 hora a 20°C	SERVA, ALEMANIA

**ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL CUANTITATIVO DE LA GLÁNDULA
PINEAL®****Análisis Ultraestructural Cuantitativo De Organoides Citoplasmáticos
En Pinealocitos.**

El análisis cuantitativo fue realizado siguiendo los métodos estereológicos propuestos por **LEWCZUK AND PRZYBYSKA-GORNOWICZ** (2000) y aplicados en pineal ovina por **REDONDO Y COL.** (2003 b).

10 fotografías de las zonas distal, intermedia y proximal de cada glándula fueron realizadas a 10.000 aumentos. El volumen relativo, expresado en porcentaje de citoplasma de pinealocitos, fue realizado en cada uno de los supuestos experimentales, para los siguientes organoides citoplasmáticos:

- Retículo Endoplásmico Granular.
- Complejo De Golgy.
- Mitocondrias.
- Lisosomas.
- Gotas Lipídicas.

**HIBRIDACION IN SITU PARA EL ARN_m DE LOS B₁
ADRENORECEPTORES EN LOS PINEALOCITOS[®]****LOCALIZACIÓN CELULAR POR HIBRIDAZION IN SITU MEDIANTE
SONDA CONJUGADA CON DIGOXIGENINA DEL ARN_m QUE CODIFICA LA
EXPRESION DE LOS B₁ ADRENORECEPTORES EN LA MEMBRANA DE
LOS PINEALOCITOS.**

Para la hibridación se utilizó 1 copia en ADN de la sonda específica para los B₁ adrenoreceptores de la membrana de los pinealocitos[∅]. La sonda[®] de los B₁ adrenoreceptores es complementaria con la secuencia de bases 19-66 (CAG CGG CGC CGA CAG GTT GCA GCC TTC GGA GGC GCC CAG GGC) del gen B₁ receptor (**MACHIDA Y COL.**, 1990).

La metodología seguida fue la propuesta por **MOLLER Y COL.**, 1997. Secciones de glándula pineal fijadas al 4% en paraformaldehído en PBS, fueron hibridadas con sonda conjugada con digoxigenina a 37°C, durante toda la noche (20 pmol de sonda por preparación). Las secciones fueron incubadas con fosfatasa alcalina conjugada con anti-digoxigenina Fab fragmentos (diluida 1/500 en PBS), a temperatura ambiente, durante 3 horas. La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó por incubación de las secciones durante 48 horas en 1 solución que contenía 45µL de nitroblue tetrazolium en 70% de dimetilformamida y 35 µL de bromo-4-cloro-3indol fosfatasa en 100% de dimetilformamida . Se añadirá levamisol (10 µL, 1M) para reducir la actividad de la fosfatasa endógena. Finalmente después de 1 corto lavado en agua destilada las secciones serán montadas con glicergel.

[∅] Obtenido del Centro de Biotecnología de la UBA, Argentina.

[®] La sonda fue suministrada por el Dr. Cardinali. Laboratorio de Neurociencias, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina. UBA, Argentina.

DENSIDAD DE INMUNOMARCAJE B₁ ADRENORECEPTORES EN LA MEMBRANA DE LOS PINEALOCITOS.

Será determinado por la metodología propuesta por **MÖLLER Y COL** (1998) y referenciada para la inmunohistoquímica cuantitativa de fibras nerviosas. Los datos obtenidos serán analizados estadísticamente por 1 Wilcoxon no paramétrico.

CONFIGURACION ESTRUCTURAL DE LOS NUCLEOS SUPRAQUIASMATICOS DEL HIPOTALAMO®

Los NSQ del fueron troceados en dos mitades, cada una de ellas fue fijada en formol al 10% en pH neutro, procesada al vacío, incluidas en parafina y teñidas con:

- Hematoxilina-Eosina (H-E)
- Tricómico de Masson (TM)

ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICOS DE LOS NSQ DEL HIPOTALAMO®

INMUNODETECCION ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECIFICOS DE NEUROTROFINAS HIPOTALAMICAS Y PROTEINAS DE GOLPE DE CALOR EN LOS NSQ DEL HIPOTALAMO.

La técnica de la Extravidina-Biotina se aplicó sobre los NSQ del hipotálamo, para la inmunodetección de neurotrofinas hipotalámicas y proteínas de golpe de calor. Dichos núcleos fueron lavados durante 1 hora en tampón cacodilato 0,2M, pH 7.2 con 1% de sacarosa; y fijados en formol al 10% en pH neutro, procesados al vacío, incluidos en parafina de bajo punto de fusión, e inmunoteñidos con los marcadores específicos de neurotrofinas hipotalámicas, (cuadro 5):

- BDNF (Factor Neurotrófico Derivado Del Cerebro)
- HSP 90 (Proteína De Golpe De Calor).

Cuadro 5: Anticuerpos Primarios Y Secundarios Utilizados En La Inmunodetección de BDNF Y HSP 90.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORIGEN	REACTIVIDAD	INCUBACION	PROCEDENCIA
BDNF	Ratón	Neuronas Hipotalámicas	1/50; 24 Horas a 4°C	Dr. Cardinali. UBA. Argentina [⊗]
HSP90	Ratón	Neuronas Hipotalámicas	1/50; 24 Horas a 4°C	Dr. Cardinali. UBA. Argentina [⊗]
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ORIGEN	REACTIVIDAD	INCUBACION	PROCEDENCIA
IgG De Cabra Anti Ratón	Cabra	IgG De Ratón	1/20; 1hora a 20°C	Sigma Aldrich, España. B-7151

DENSIDAD DE INMUNOMARCAJE NEUROTROFINAS HIPOTALAMICAS Y PROTEINAS DE GOLPE DE CALOR EN LOS NSQ DEL HIPOTALAMO.

Se extrajeron dos secciones por cada NSQ de hipotálamo, separadas por una distancia de 50 μm . Dos campos de 0.1 mm^2 fueron seleccionadas al azar por cada sección inmunoteñida. El análisis histomorfométrico y estadístico supuso la determinación de:

- Densidad De Inmunomarcaje De BDNF En Un Área De Referencia De 0.1 mm^2 .
- Densidad De Inmunomarcaje De HSP 90 En Un Área De Referencia De 0.1 mm^2 .

La histomorfometría se determinó por la metodología de **MÖLLER Y COL** (1998) y referenciada para la inmunohistoquímica cuantitativa de fibras nerviosas. Los datos obtenidos serán analizados estadísticamente por 1 Wilcoxon no paramétrico.

[⊗] suministrados por el Dr. Cardinali. Laboratorio de Neurociencias, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina. UBA, Argentina.

[⊗] suministrados por el Dr. Cardinali. Laboratorio de Neurociencias, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina. UBA, Argentina.

INMUNOHISTOQUIMICA PARA LOS MT₁ EN LOS NUCLEOS SUPRAQUIASMATICOS DEL HIPOTALAMO[®]

DETERMINACION MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA (MT₁) EN LAS NEURONAS DE NUCLEOS SUPRAQUIASMATICOS DEL HIPOTALAMO.

La metodología seguida fue sera la técnica Extravidina-Biotina Extravidina-Biotina referenciada para BDNF Y HSP 90 (cuadro 6):

Cuadro 6: Anticuerpos Primarios Y Secundarios Utilizados En La Inmunodetección De Los Receptores de Melatonina MT₁.

<u>ANTICUERPOS PRIMARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
Receptor MT ₁	Ratón	Membrana de Pinealocitos	1/50; 24 Horas a 4°C	Dr. Cardinali. UBA. Argentina [®]
<u>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>REACTIVIDAD</u>	<u>INCUBACION</u>	<u>PROCEDENCIA</u>
IgG De Cabra Anti Ratón	Cabra	IgG De Ratón	1/20; 1hora a 20°C	Sigma Aldrich, España.B-7151

DENSIDAD DE INMUNOMARCAJE DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA (MT₁) EN LAS NEURONAS DE NUCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS DEL HIPOTALAMO.

Se extrajeron dos secciones por cada NSQ de hipotálamo, separadas por una distancia de 50 µm. Dos campos de 10.000 µm² fueron seleccionadas al azar por cada sección inmunomarcada mediante inmunohistoquímica. El análisis histomorfológico y estadístico supuso la determinación de:

- Densidad De Inmunomarcaje De MT₁ En Un Área De Referencia De 0.1 mm².

[®] suministrados por el Dr. Cardinali. Laboratorio de Neurociencias, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina. UBA, Argentina.

DETERMINACIONES MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO[©]**DETERMINACION MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MELATONINA.[©]**

Se utilizó un Radioinmunoensayo comercial para melatonina humana estandarizado por TAST Y COL., 2001. Este ensayo es altamente específico para medir concentraciones de melatonina en el plasma de diversas especies de mamíferos . La sensibilidad de este ensayo es de 0.3 pg/mL. La toma de muestras de sangre se realizó a las 06:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00^β, 02:00, 06:00 horas. uetas de plasma recogidas con heparina como anticoagulante y almacenadas a -20°C, fueron incubadas con un antisuero específico frente a la melatonina de oveja[©] y ³H melatonina. El coeficiente de variación inter e intra ensayo fue menor del 10%.

DETERMINACION MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO DE LAS CONCENTRACIONES SERICAS DE CORTICOSTERONA.

La toma de muestras de sangre para la determinación de los niveles séricos de corticosterona, se realizó en la mitad del período de luz (14horas) y de oscuridad (02 horas).

La corticosterona sérica se determinó mediante RIA comercial estandarizado, modificado por REDONDO Y COL., 1993. La sensibilidad de este ensayo es de 0.3 pg/mL. El coeficiente de variación inter e intra ensayo fue menor del 10%.

^β Durante la noche se utilizó luz roja de 2 lux de intensidad para la toma de muestras.

[©] N° G/S/704-6483, Stockgrand Ltd, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad de Surry, Guildford, UK

DETERMINACIONES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC) ©**DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE MELATONINA EN PARENQUIMA DE GLANDULA PINEAL MEDIANTE HPLC.**

La toma de muestras de pineal se realizó en la mitad del período de luz (14 horas) y de oscuridad (02 horas). Las pineales fueron homogenizadas por sonicación (100 W, 6 segundos) en 250 µL de ácido perclórico 0,1M; tras la centrifugación a 6000g durante 6 minutos, los sobrenadantes fueron congelados y almacenados. Alíquotas de 25 µl de pineal homogenizados y centrifugados, serán inyectadas en un sistema de HPLC con detección electroquímica (Coulouchen, 5100^a, ESA;USA). El sistema se llevó a un ritmo de 1.2 ml/minuto a 1 presión de 2300 psi.

La fase móvil (pH 3.4) será 0.1 M tampón fosfato, conteniendo 50 mM ácido cítrico, 50 mM acetato sódico, y 0.05 mM EDTA. La melatonina fue separada mediante columnas (Spherisorb ODS II reversed phase column -100 x 4.6; 3 µm-) y oxidizada a un potencial de 0.9V frente a un electrodo de platino de referencia (Ag/AgCL). La sensibilidad mínima detectable fue de 15 pg. Los coeficientes de variación del intra y del intertest fueron de 5 y 6% respectivamente. El test de proteína fue medido de acuerdo con el método de **LOWRY Y COL.,1951.**

DETERMINACION DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE NEFELOMETRIA OPTICA®**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE NEFELOMETRIA OPTICA**

Se trata de un sistema que mide la intensidad de luz, y la dispersión de un haz luminoso, al atravesar una suspensión de fluidos celulares. Las partículas son formadas por la inmunoprecipitación, provocada por la reacción de un antígeno con su anticuerpo específico. Se utilizaron anticuerpos monoclonales^σ anti- IgG, IgA, e IgM, para su reacción con los sueros problema. Las inmunoglobulinas fueron cuantificadas en mg/dl.

^σ Los anticuerpos monoclonales fueron proporcionados por la Dra Tovar. SES, Cáceres.

ANÁLISIS DE DATOS®**ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL**

Todos los valores se expresaron como la Media \pm Error Estándar de la Media (SEM), de n observaciones, donde n representa el número de muestras analizadas. Los resultados se analizaron usando un *análisis de varianza multifactorial*. Cuando fueron analizados dos grupos, se empleó un *t-Test* para datos no pareados. Dentro de cada grupo se comparó el periodo de luz con el de oscuridad; la comparación entre grupos se realizó: periodo de luz con periodo de luz, y el de oscuridad con el de oscuridad. Un valor de P menor de 0.05 se consideró significativo.

El análisis estadístico de los diversos parámetros testados, se halla expuesto en forma de letras en las diversas tablas. Cada letra expresa una significación estadística diferente para cada grupo, con respecto al tomado como referencia. La ausencia de letras, implica la existencia de diferencias no significativas para un valor de $P < 0.05$.

En la inmunohistoquímica cuantitativa de fibras nerviosas, de melatonina, de neurotrofinas hipotalámicas, de proteínas de golpe de calor; y en la ISH de los B₁ adrenoreceptores de pinealocitos, se utilizó 1 *prueba no paramétrica de rangos señalados de Wilcoxon*.

RESULTADOS

RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

TABLA 1: Resumen De Los Resultados Obtenidos

CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL		BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
PARAMETROS		FOTOPERIODOS LARGOS Y CORTOS (LP Y SP) ‡							
		LUZ	OSCU	LUZ	OSCU	LUZ	OSCU	LUZ	OSCU
		ANALISIS MACROSCOPICOS							
MACRO	PESO	++	b	+++	b	-	b	+	b
	LONGITUD	++	b	+++	b	-	b	+	b
	COLORACION	2/6		1/6		1/6		2/6	
		ANALISIS ESTRUCTURALES							
ESTRUCTURA	PINEALOCITOS	++	++	++	++	-	-	+	+
	CELULAS INTERSTICIAL	++	++	++	++	-	-	+	+
	VASOS	++	++	++	++	-	-	+	+
	FIBRAS NERVIOSAS	++	++	++	++	-	-	+	+
			ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICOS						
PINEALOCIT	SYNAP	++	++	++	++	-	-	+	+
	NNE	++	++	++	++	-	-	+	+
	NSE	++	++	++	++	-	-	+	+
CELL. INTE.	GFAP	++	++	++	++	-	-	+	+
	VIM	++	++	++	++	-	-	+	+
FIBR. NER.	VIP	++	b	++	b	-	b	+	b
	NPY	++	b	++	b	-	b	+	b
		ANALISIS HISTOMORFOMETRICOS							
DENSID. CELUL.	SYNAP	++	ns	++	ns	-	ns	+	ns
	GFAP	++	ns	++	ns	-	ns	+	ns
VOL. PRO.	SYNAP	++	b	++	b	-	b	+	b
	GFAP	++	b	++	b	-	b	+	b
% FIB. NER.	VIP	++	b	++	b	-	b	+	b
	NPY	++	b	++	b	-	b	+	b
		MELATONINA		VOLUMEN GLANDULAR					
		++	b	+++	b	-	b	+	b
		++	b	++	b	-	b	+	b
		Presencia normal = ++ Presencia aumentada = +++ Presencia reducida = + Presencia muy reducida = -				b = diferencias significativas versus luz ns = diferencias no significativas			

‡ No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.

b = diferencias significativas versus luz.

TABLA 2: Resumen De Los Resultados Obtenidos

CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL		BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
		LUZ	OSCU	LUZ	OSCU	LUZ	OSCU	LUZ	OSCU
PARAMETROS		FOTOPERIODOS LARGOS Y CORTOS (LP Y SP)‡							
ANÁLISIS INMUNOELECTRONOMICROSCÓPICOS									
IEM	SYNAP	++	ns	++	ns	-	ns	+	ns
	GFAP	++	ns	++	ns	-	ns	+	ns
ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURALES CUALITATIVOS									
ULTRAESTRUCT.	PINEALOCITOS	++	++	++	++	-	-	+	+
	CELULAS INTERSTICIAL	++	++	++	++	-	-	+	+
	VASOS	++	++	++	++	-	-	+	+
	FIBRAS NERVIOSAS	++	++	++	++	-	-	+	+
ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURALES CUANTITATIVOS									
% DE ORGANOIDES CITOPLASMÁTICOS	REG.	17±4	22±4	16±3	23±4	5±5	10±3	9±3	15±4
	C. GOLGI	8.5±1	11.5±2	8.5±2	11±2	3±1	5±1	5±1.5	7±0.5
	MITOCONDRIAS								
	LISOSOMAS	1.3±0.3	1.2±0.2	1.1±0.2	1.2±0.3	1.3±0.1	1.4±0.2	1.3±0.1	1.4±0.2
	LIPOSOMAS	9±2	10±2	8.5±2	10.5±2	19±3	22±2	14±3	15±2
ANÁLISIS MEDIANTE ISH DEL ARN_m DE LOS B₁ ADRENORECEPTORES EN PINEALOCITOS									
ISH DE ARN _m B ₁ ADRENORCP	ARN _m B ₁ ADRENORCP	++	b	++	b	-	b	+	b
	DENSID. MARCAJE ARN _m B ₁ ADRENORCP	201±13	220±15	196±12	218±14	60±13	80±11	98±15	120±13
ANÁLISIS ESTRUCTURALES DE LOS NSQ DE HIPOTALAMO									
ESTRUC. NSQ	PARENQUIMA	Normal		Normal		Muy Alterado Neuronofagia		Alterado; signos de recuperación	
	ESTROMA	++		++		-		+	
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LOS NSQ DE HIPOTALAMO									
IHQ EN NSQ	BDNF	++	b	++	b	-	b	+	b
	HSP 90	++	b	++	b	-	b	+	b
	BDNF	34±3	43±4	48±4	59±5	84±5	96±7	108±6	120±8
	HSP 90	13±3	24±4	25±5	34±5	56±5	66±6	78±6	88±8
ANÁLISIS MEDIANTE ISH DE MT₁ EN NSQ DE HIPOTALAMO									
MT ₁ EN NSQ	MT ₁ EN NSQ	++	b	++	b	-	b	+	b
	DENS. MARCAJ. MT ₁ EN NSQ	105±14	124±16	107±12	127±14	33±6	48±7	47±7	65±6

‡ No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.
b = diferencias significativas versus luz.

TABLA 3: Resumen De Los Resultados Obtenidos

CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL		BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA		
PARAMETROS		FOTOPERIODOS LARGOS Y CORTOS (LP Y SP) ‡								
		LUZ	OSCU	LUZ	OSCU	LUZ	OSC	LUZ	OSCU	
CORTIC (ng/ml)		<u>ANÁLISIS MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO</u>								
		CORTICOSTER.	36±4	26±3	42±3	30±5	75±6	63±6	62±5	51±4
Horario de Muestreo		06:00	10:00	14:00	18:00	22:00	02:00	06:00		
MELATONINA (pg/ml)	BIENESTAR	87± 6	75± 6	57 ± 4	82 ± 8	119 ± 12	216 ± 15	93 ± 10		
	BIENESTAR CON MT	108 ± 11	96 ± 8	77 ± 7	104 ± 10	141 ± 12	238 ± 14	113 ± 11		
	ESTRES	52 ± 5	43 ± 6	20 ± 3	46± 6	76 ± 8	164 ± 10	57 ± 5		
	ESTRES CON MELATONINA	67 ± 5	58 ± 4	35 ± 3	61 ± 6	91 ± 8	179 ± 14	72 ± 10		
HPLC MT		<u>ANÁLISIS MEDIANTE HPLC</u>								
		MELATONINA (ng/mg de prot)	20±3	28±4	31±5	42±6	11±2	17±3	18±4	29±4
NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (ng/dl)		<u>ANÁLISIS MEDIANTE NEFELOMETRIA OPTICA</u>								
		IgG	2460±	2500±	2689±	2712±	1212	1514±2	1750±	1790±
			250	200	300	256	±310	25	198	230
		IgA	206±	215±	252±	261±	98±	102±	175±	183±
10	12		13	15	12	14	11	14		
IgM	45±5	46±6	55±7	61±6	28±4	29±3	37±5	39±4		

‡ No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.

ANALISIS MACROSCOPICOS

ASPECTO MACROSCOPICO Y RELACIONES ANATOMICAS[‡]

En los 4 grupos experimentales analizados (Bienestar Animal; Bienestar Animal Con Melatonina; Estrés Inducido; Estrés Inducido Con Melatonina), apariencia normal de la epífisis, evidenciándose una morfología alargada (Fig.



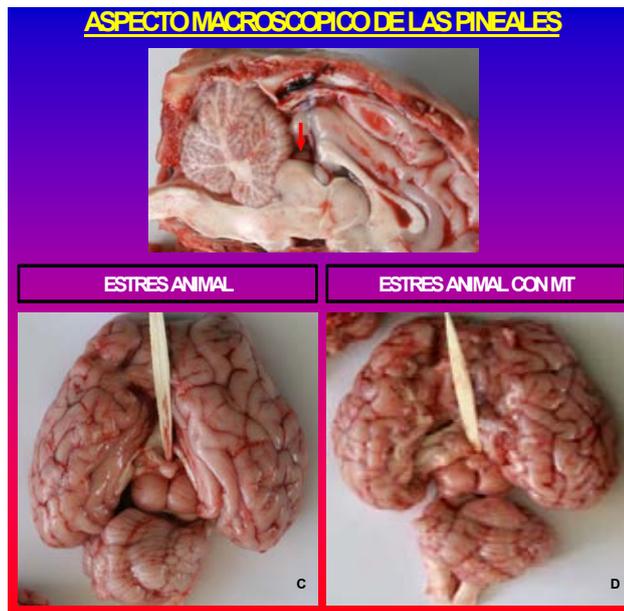
A, B, C, D). Los ciclos de luz-oscuridad (L/D,16/8 para el fotoperiodo largo; y L/D, 8/16 para el fotoperiodo corto) no modificaron las apariencias macroscópicas de las glándulas.

Las glándulas presentaban un pedúnculo pineal muy corto, por lo que la pineal dejaba huella en el interior del tercer ventrículo. Su vértice aparecía situado detrás

del cuerpo calloso. En general y tomando como punto de referencia el cuerpo calloso, la pineal de la oveja era subcallosa.

De acuerdo a las descripciones de **ANDERSON** (1965), la pineal de la oveja permanecía unida al diencéfalo por un corto tallo, el pedúnculo pineal, cuya porción dorsal se unía a la comisura habenuar mientras que la ventral está fijada a la comisura posterior. En definitiva la pineal se localizaba en la ranura que forman los tubérculos cuadrigéminos.

[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros macroscópicos analizados.



De acuerdo a la clasificación de **VOLLRATH** (1979; 1981) la glándula pineal ovina podría clasificarse *Tipo proximal (Tipo A)*: “*gran parte del tejido proximal se sitúa en estrecha relación con el tercer ventrículo*”.

La glándula anatómicamente no mostró diferencias en todos los grupos estudiados. Presentaba un vértice en

relación con el espacio subaracnoideo, y una base en relación con la pared que delimita al tercer ventrículo. Su cara antero-superior convexa, formaba con la tela coroidea el receso suprapineal; la cara postero-inferior más achatada, se relacionaba centralmente con los tubérculos cuadrigéminos, y dorsalmente, con el cerebelo.

ANALISIS MACROSCOPICOS**ANALISIS MACROSCOPICOS: PESO****Tabla 4: Resultados Del Peso Pineal Y Análisis De Datos Obtenidos**

CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL	BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
	← LP	SP	LP	SP	LP	SP	LP	SP [‡]
	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.
Peso absoluto De la Pineal (mg)	72±7 ^{abde}	83±8 ^{ade}	82±7 ^{bcde}	92±6 ^{cde}	51±7 ^{abce}	60±6 ^{ace}	61±5 ^{abcd}	72±6 ^{acd}
Peso relativo De la Pineal	NORMAL ++		AUMENTADO +++		MUY REDUCIDO -		REDUCIDO +	

o a p< 0,05 versus grupo de bienestar animal con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

o b p< 0,05 versus oscuridad.

o c p< 0,05 versus grupo de bienestar animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

o d p< 0,05 versus grupo de estrés inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

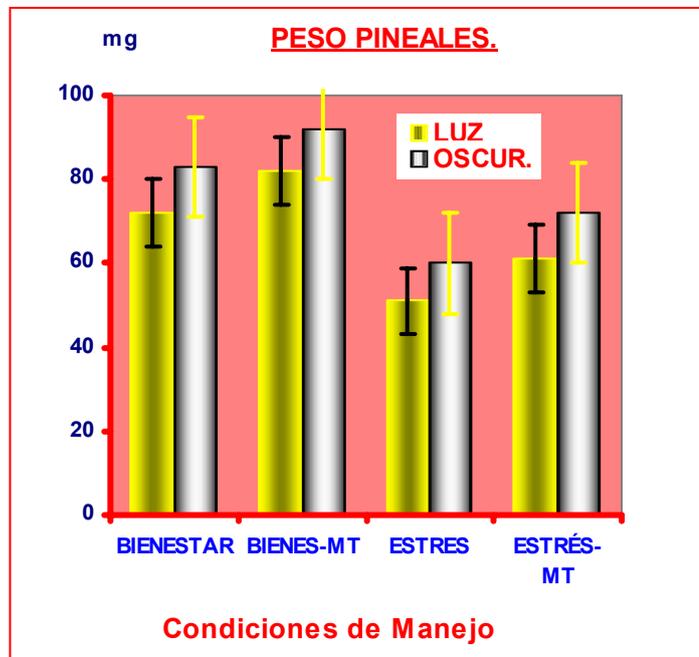
o e p< 0,05 versus grupo de estrés inducido con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

• dentro de cada grupo se comparó el periodo de luz con el de oscuridad.

• La comparación entre grupos se realizó comparando el periodo de luz con el de luz, y el de oscuridad con el de oscuridad.

[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros macroscópicos analizados.

Las condiciones fotoperiódicas no modificaron el peso glandular, en ninguno de los cuatro supuestos experimentales contemplados. Todo lo contrario



ocurrió con los ciclos de luz-oscuridad que si alteraron el peso pineal. En los 4 grupos analizados (Tabla 4):

Bienestar Animal;
Bienestar Animal Con Melatonina;
Estrés Inducido; Estrés Inducido Con Melatonina , todas las

glándulas de los animales sacrificados durante la noche, tuvieron significativamente mayor

peso que la de los animales sacrificados durante el día (F = 11.2, Tuckey test : P < 0.001; F = 12.3, Tuckey test : P < 0.002; F = 15.2, Tuckey test : P < 0.001; F = 13.3, Tuckey test : P < 0.003, respectivamente). Además el peso de las pineales de los animales del grupo de **Bienestar Animal Con Melatonina**, tanto en el periodo de luz como en el de oscuridad, evidenció diferencias significativas, con respecto al peso glandular del resto de grupos (F = 19.3, Tuckey test : P < 0.0002; F = 18.2, Tuckey test : P < 0.0001; F = 23.2, Tuckey test : P < 0.0001; F = 21.2, Tuckey test : P < 0.0002; F = 12.2, Tuckey test : P < 0.001; F = 13.2, Tuckey test : P < 0.002 para los grupos de **Bienestar Animal**, y ambos **Grupos De Estrés** y en los ciclos de luz / oscuridad respectivamente).

El peso de las pineales del grupo de **Bienestar Animal** fue significativamente mayor que el peso glandular de los grupos de **Estrés Inducido, y Estrés inducido Con Melatonina** (F = 14.2, Tuckey test : P < 0.002; F = 15.2, Tuckey test : P < 0.003). De igual modo los grupos de **Estrés Inducido Y Estrés Inducido Con Melatonina**, evidenciaron significativas diferencias entre ellos (F = 14.7, Tuckey test : P < 0.004) (Tabla 4).

ANÁLISIS MACROSCÓPICOS: LONGITUDES**Tabla 5: Resultados De Las Longitudes Y Análisis De Datos Obtenidos**

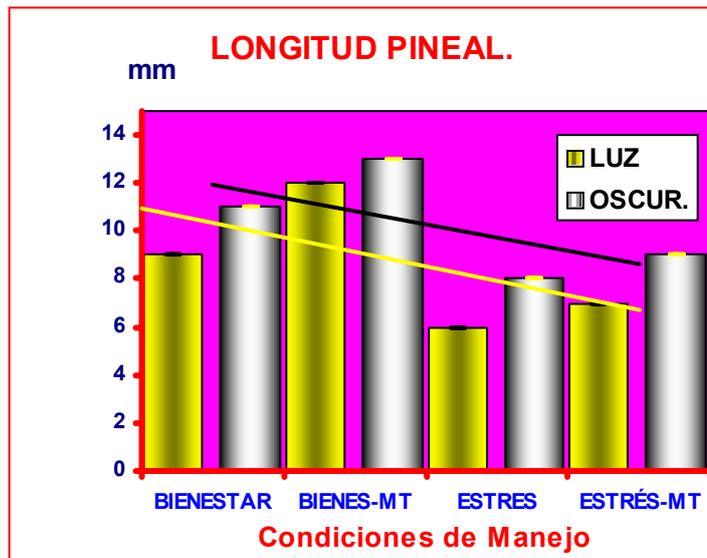
CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL	BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
	← LP	SP	LP	SP	LP	SP	LP	→ SP [‡]
	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.
Sig. Estadística	abde	ade	bcde	cde	abce	ace	abcd	acd
Longitud (mm) Fronto-Occipt	0.9±0.02	1.1±0.05	1.2±0.04	1.3±0.05	0.6±0.07	0.8±0.05	0.7±0.05	0.9±0.06
Longitud (mm) Sagital	No se consideró por ofrecer idénticos resultados cualitativos a los reflejados para la Longitud Fronto-Occipital.							
<ul style="list-style-type: none"> ○ a p< 0,05 versus grupo de bienestar animal con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad. ○ b p< 0,05 versus oscuridad. ○ c p< 0,05 versus grupo de bienestar animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad. ○ d p< 0,05 versus grupo de estrés inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad. ○ e p< 0,05 versus grupo de estrés inducido con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad. ● dentro de cada grupo se comparó el periodo de luz con el de oscuridad. ● La comparación entre grupos se realizó comparando el periodo de luz con el de luz, y el de oscuridad con el de oscuridad. 								

[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.

Al igual que ocurrió con el peso glandular, las condiciones fotoperiódicas no modificaron la longitud pineal, en ninguno de los cuatro supuestos experimentales contemplados. El factor día/noche si alteró la longitud pineal.

En los cuatro grupos experimentales (Tabla 5), todas las glándulas de los animales sacrificados durante la noche, tuvieron significativamente mayor longitud que la de los animales sacrificados durante el día ($F = 9.3$, Tuckey test : $P < 0.002$; $F = 8.4$, Tuckey test : $P < 0.002$; $F = 9.6$, Tuckey test : $P < 0.003$; $F = 7.3$, Tuckey test : $P < 0.001$, respectivamente).

Además la longitud de las pineales de los animales del grupo de **Bienestar Animal Con Melatonina**, tanto en el periodo de luz como en el de oscuridad, evidenciaron diferencias significativas, respecto a la

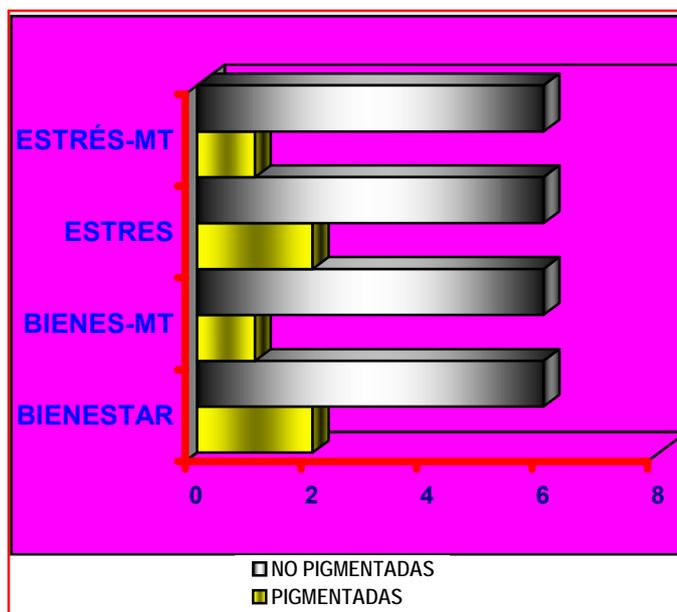


longitud glandular del resto de grupos ($F = 19.4$, Tuckey test : $P < 0.0001$; $F = 18.5$, Tuckey test : $P < 0.0001$; $F = 21.4$, Tuckey test : $P < 0.0005$; $F = 22.5$, Tuckey test : $P < 0.0004$; $F = 20.7$, Tuckey test : $P < 0.0002$; $F = 19.4$, Tuckey test : $P < 0.0002$, para los distintos grupos, y en los periodos de luz y oscuridad).

La longitud de las pineales del grupo de **Bienestar Animal** fue significativamente mayor que la longitud de los grupos de **Estrés Inducido, y Estrés inducido Con Melatonina** ($F = 13.5$, Tuckey test : $P < 0.003$; $F = 11.5$, Tuckey test : $P < 0.002$). De igual modo entre los grupos de **Estrés Inducido, y Estrés inducido Con Melatonina**, se evidenciaron diferencias con un nivel de significación de ($F = 10.8$, Tuckey test : $P < 0.003$) (Tabla 5).

ANALISIS MACROSCOPICOS: PIGMENTACION

La coloración macroscópica de la glándula pineal (microscópicamente correspondía al pigmento melánico, detectado mediante Masson-Fontana), no



se modificó bajo las condiciones fotoperiódicas estimulatorias (fotoperiodo corto) ni inhibitorias (fotoperiodo largo); e incluso fue independiente de los ciclos de luz/oscuridad.

La relación de glándulas microscópicamente pigmentadas, para cada una de las condiciones

experimentales fue la siguiente:

- **Bienestar Animal:** 2 / 6.
- **Bienestar Animal Con Melatonina:** 1 / 6.
- **Estrés Animal:** 1 / 6.
- **Estrés Animal Con Melatonina:** 2 / 6.

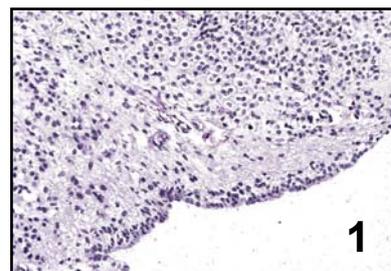
ANALISIS ESTRUCTURALES

ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA GLANDULA PINEAL

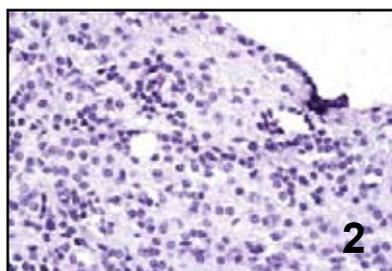
Las condiciones fotoperiódicas (fotoperiodo largo- mes de junio- inhibitorio; y fotoperiodo corto-mes de diciembre-estimuladorio) no modificaron la morfología glandular, en ninguno de los cuatro supuestos experimentales contemplados. De igual modo, los ciclos de luz-oscuridad (L/D, 16/8 para el fotoperiodo largo; y L/D, 8/16 para el fotoperiodo corto) tampoco alteraron la arquitectura pineal.

GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL

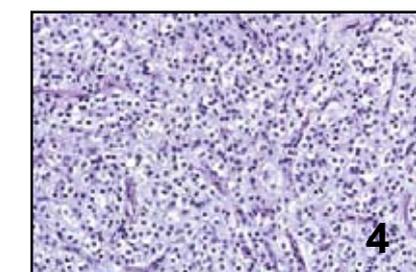
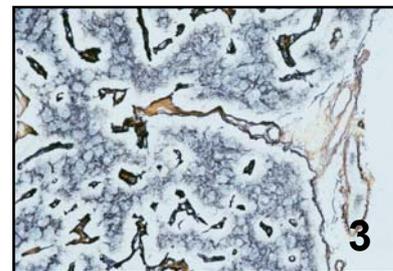
En secciones sagitales la glándula presentó una morfología ovoide-redondeada, quedando localizada rostralmente al cerebelo y caudalmente a los hemisferios cerebrales. La superficie dorsal de la glándula estuvo flanqueada por la pared de III ventrículo; estando revestida dicha pared por un epéndimo de células cúbicas ciliadas (Fig. 1). La delimitación lateral de la glándula se realizó a través de las comisuras habenuar y posterior.



La glándula quedó rodeada en toda su superficie por una capsula con un epitelio de células cúbicas (Fig. 2), y un tejido conectivo subepitelial donde podrían evidenciarse fibroblastos aislados, escasa cantidad de fibras



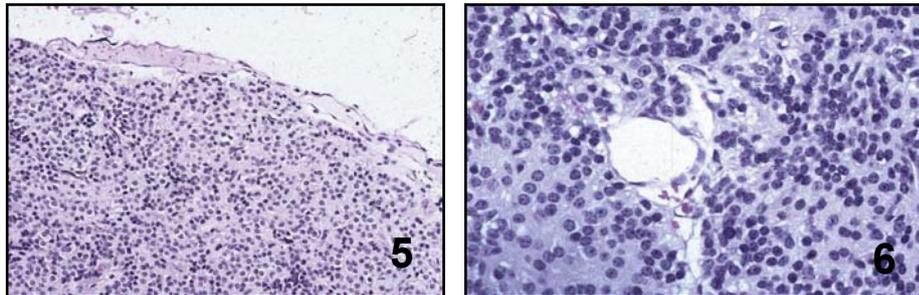
elásticas y de colágena, y moderada cantidad de fibras reticulares (Fig. 3).



Dentro de la cápsula podrían evidenciarse estructuras vasculares. Desde la cápsula irradiaban hacia el interior del parénquima

tabiques conectivos-vasculares, que delimitaban pseudolóbulos; en el interior de dichos pseudolóbulos encontramos agrupaciones de células pineales constituyendo estructuras folículo-glomerulares (Fig. 4).

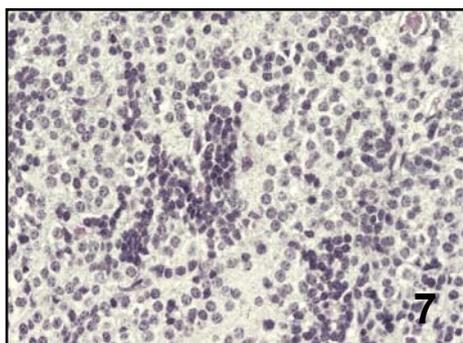
Todas las glándulas de este grupo evidenciaron una elevada densidad celular. La estructuración de la glándula fue zonal; con una zona dorso y ventroperiférica, *corteza*, (Fig. 5), de menor densidad celular; y una zona dorsomedial y ventromedial, *médula* (Fig. 6) de mayor riqueza celular.



La organización celular fue difusa, sin alineamiento direccional. Esta distribución difusa aparecía interrumpida por rosetas o pseudorosetas (Fig. 2), situadas tanto en corteza como en médula. Dichas rosetas aparecían constituidas por una luz, ovalada o irregular, circundada por un alineamiento celular más o menos abundante.

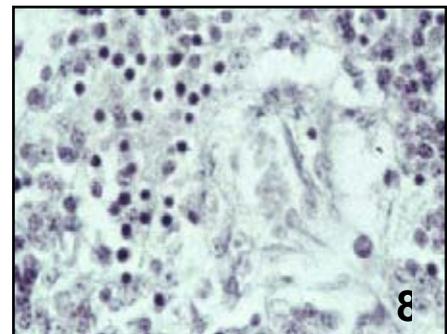
La citología glandular mostró dos tipos de células principales:

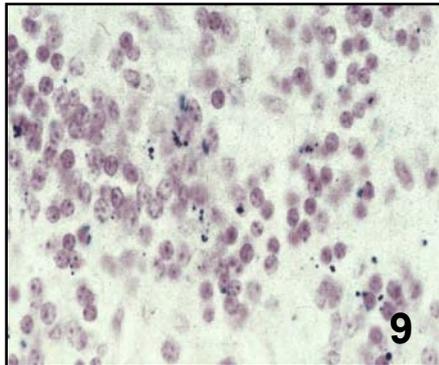
- **Pinealocitos y Células Intersticiales.**



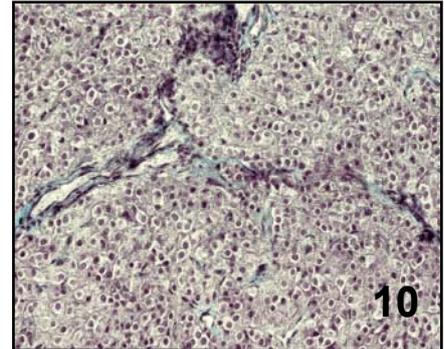
Los *pinealocitos* fueron más abundantes (80-15 %). Se trataba de células grandes, con núcleos de cromatina pálida y evidente nucléolo (Fig. 7).

Las *células intersticiales* eran menos abundantes, de localización perivascular, y con núcleos ovoides de cromatina densa y homogénea (Fig. 8).



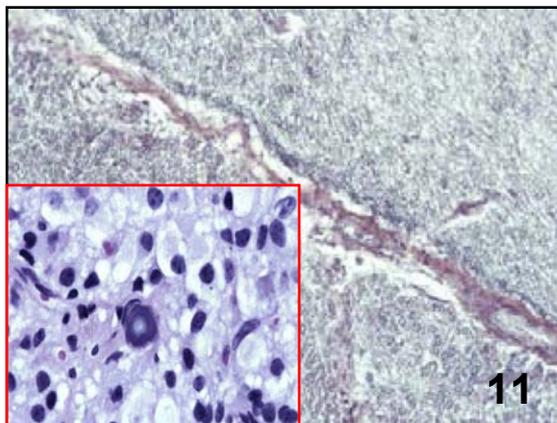


El resto de la citología pineal estuvo representado por *células pigmentadas*, de fuerte reacción argirófila con la técnica de Masson-Fontana; y aislados linfocitos (Fig. 9).



El estroma glandular se configuraba por escasa cantidad de fibras de colágeno y moderada cantidad de fibras reticulares. Este estroma irradiaba desde la cápsula y septos trabeculares hacia el parénquima, situándose en el espacio intersticial y perivascular (Fig. 10).

Las estructuras vasculares fueron más numerosas y de menor tamaño en la corteza (Fig. 5), que en la médula (Fig. 6).

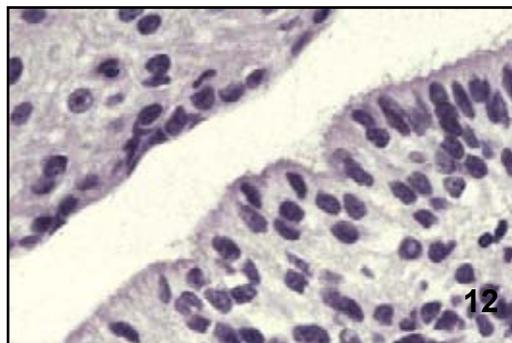
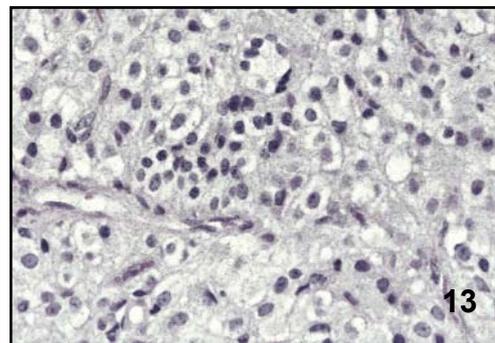


Aisladas fibras gliales, más abundantes en la periferia glandular, fueron detectadas con la técnica de la PTAH .

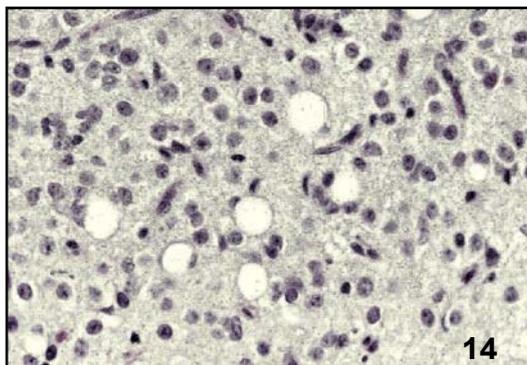
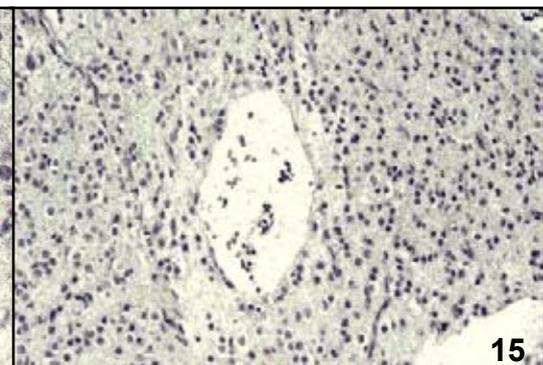
Presencia de calcio en cantidades y localizaciones normales (Fig. 11).

GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA

Todas las características morfológicas de los animales de este grupo, coincidieron, cualitativamente y cuantitativamente, con las descritas para los animales del **Grupo De Bienestar Animal**; tanto en lo referente al estroma organizado a partir de la cápsula y tabiques trabeculares (Fig. 12); como a la disposición de dicho estroma a nivel intersticial, y delimitando las estructuras pseudolobulares (Fig. 13).

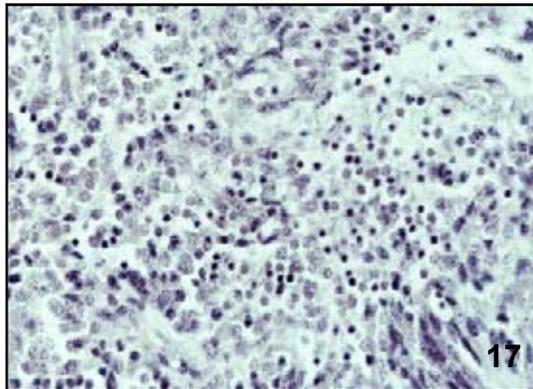
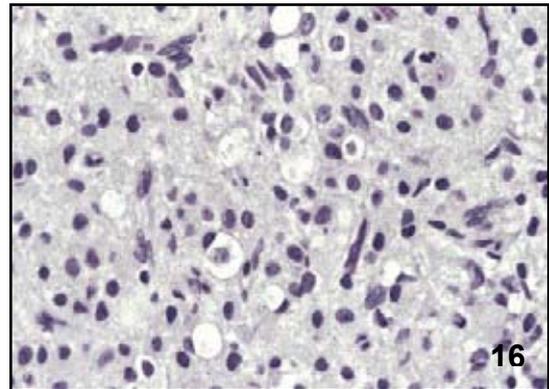
CAPSULAPSEUDOLOBULACION

Por lo que respecta al parénquima glandular, no encontramos diferencias estructurales en los diversos componentes de la citología glandular: los pinealocitos (Fig. 14 y 15), las células intersticiales (Fig. 16 y 17), y las células pigmentadas (Fig. 18).

PINEALOCITOSMEDULACORTEZA

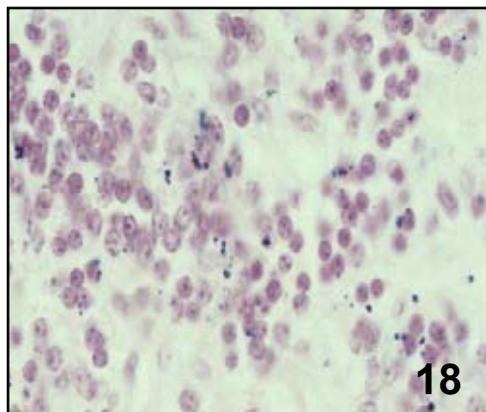
Como ocurrió en el **Grupo De Bienestar Animal**, en *las células intersticiales*, también se observaron diferencias en la densidad ; y al igual que en pinealocitos, tanto en zona cortical como medular (Fig. 16 y 17).

CELULAS INTERSTICIALES

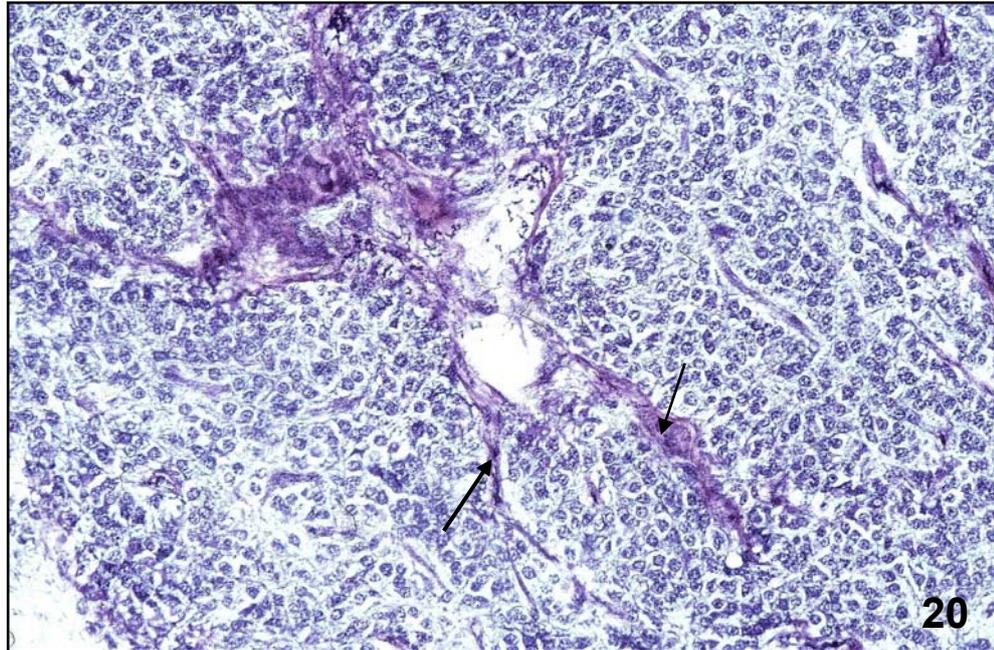
MEDULA**CORTEZA**

La presencia de *células pigmentadas*, no varió significativamente respecto al grupo anterior (Fig. 18); al igual que le ocurrió a la presencia de calcio, que evidenció cantidades y localizaciones dentro de los parámetros de normalidad.

Tanto en corteza como en médula, en este grupo, se detectó una vascularización similar a la referida para el grupo de Bienestar Animal (Fig. 19).

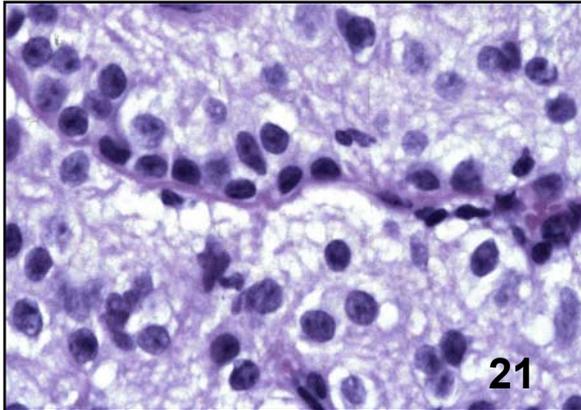


La vascularización, en este **Grupo de Bienestar Animal con Melatonina**; así como la inervación (presencia de fibras nerviosas gliales detectadas con la técnica PTAH) no mostraron diferencias reseñables respecto al **Grupo de Bienestar Animal**(Fig. 20).

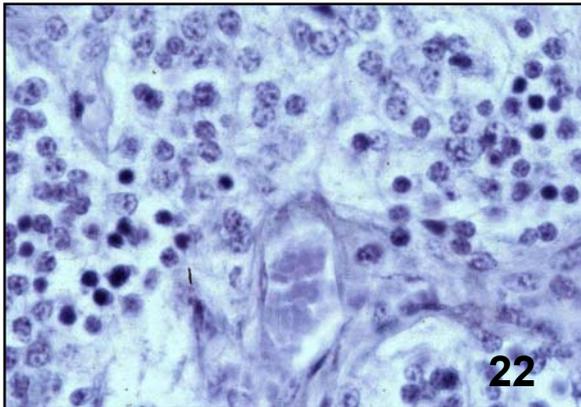


GRUPO DE ESTRÉS ANIMAL

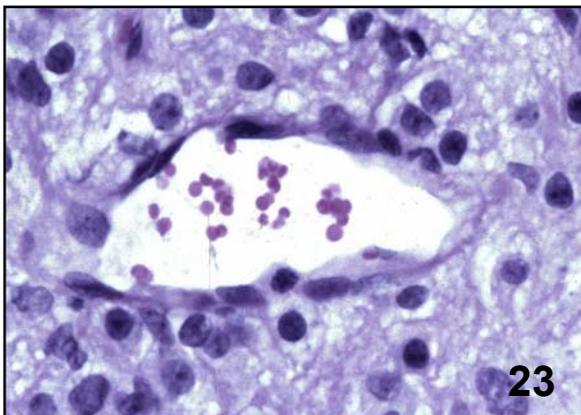
En este grupo, respecto al **Grupo De Bienestar Animal**, que tomamos como referencia, diferencias cuantitativas, que interesan tanto al parénquima como al estroma de la glándula. Desorganización de la arquitectura tisular, sin ningún patrón morfológico de distribución celular.



Con relación a *los pinealocitos* destacar la menor densidad celular tanto en zona cortical como en la medular (Fig. 21).

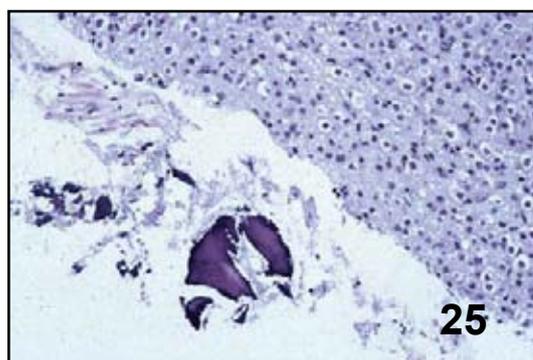
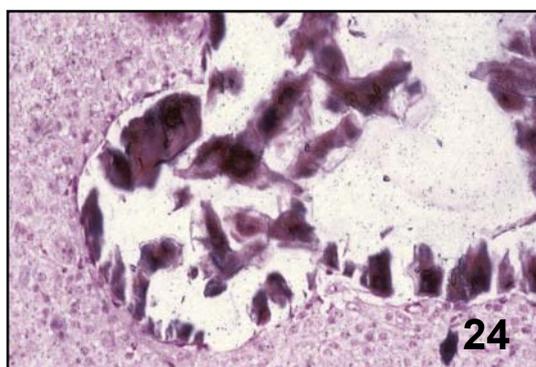


En lo que respecta a *las células intersticiales*, resaltar la disminución de, tanto en corteza como en médula (Fig. 22).



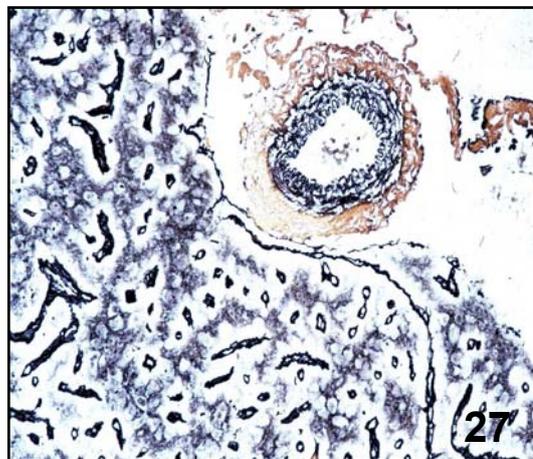
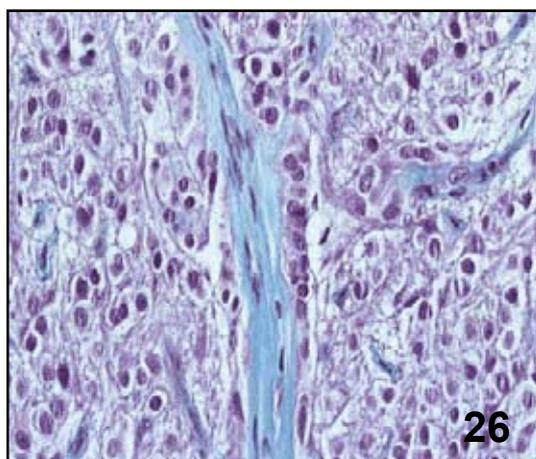
La presencia de estructuras vasculares también varió cuantitativamente, detectándose una menor vascularización que en el **Grupo De Bienestar Animal** tanto en corteza como en médula (Fig. 23).

La presencia de inervación y de calcio, también varió respecto al **Grupo De Bienestar Animal** tomado como control. Así se evidenció una menor presencia de fibras nerviosas gliales detectadas con la técnica PTAH. De igual modo, se observó una mayor presencia de Calcio, tanto en cápsula, como en corteza como médula. El calcio ocupaba grandes áreas irregulares, con ausencia de citología glandular (Fig. 24 y 25).



El estroma pineal, varió cuantitativamente, respecto al **Grupo De Bienestar Animal**, en todos sus componentes y localizaciones; así se detectó:

- Mayor presencia de fibras de colágeno y reticulina en cápsula (Fig. 26).
- Tabiques trabeculares y pseudolóbulos con mayor presencia de fibras de colágeno y de reticulina (Fig. 26).
- Mayor cantidad de fibras de colágeno y de reticulina en el tejido conectivo intersticial, tanto intercelular como perivascular (Fig. 27).



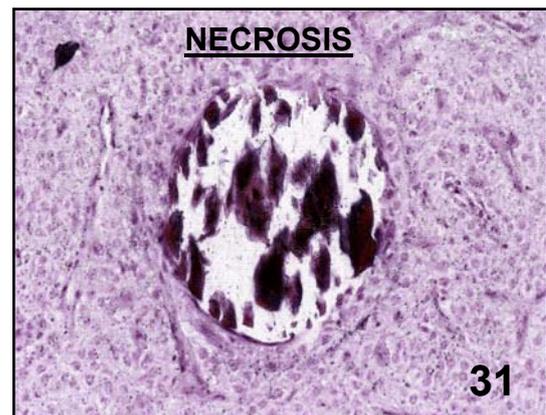
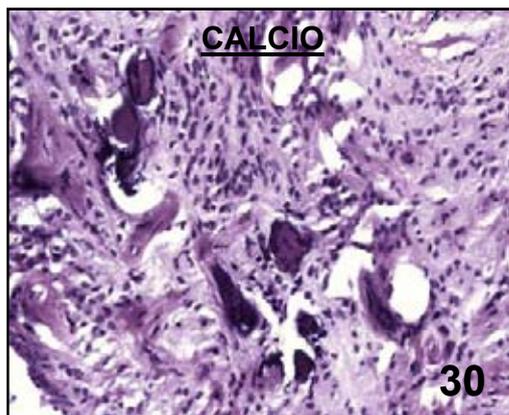
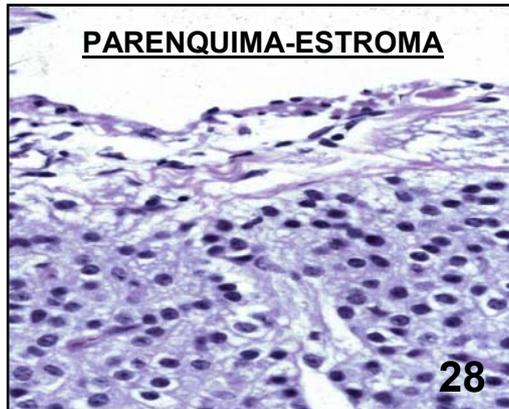
GRUPO DE ESTRÉS ANIMAL CON MELATONINA

Las características morfológicas de este grupo, fueron intermedias entre el **Grupo De Estrés Y El De Bienestar Animal**. La glándula evidenciaba un intento de aproximación a la normalidad, representado por una citología glandular en aumento; un aumento de la vascularización y de la inervación; acompañada de una reducción del estroma, y de las áreas de depósitos de calcio, carentes de citología.

Así encontramos:

- ✚ Una densidad celular, tanto en lo referente a pinealocitos, como a células intersticiales; y tanto en corteza como en médula, mayor que en el **Grupo De Estrés** y menor que en ambos **Grupos De Bienestar Animal** (Fig. 28).
- ✚ Una vascularización menor que en ambos **Grupos De Bienestar Animal**, y mayor que en el de **Estrés Animal** (Fig. 29).
- ✚ Una densidad de fibras gliales PTAH +, mayor que en el **Grupo De Estrés** y menor que en ambos **Grupos De Bienestar Animal**.
- ✚ Una cantidad de estroma, tanto en lo referente al colágeno, como a las fibras reticulares; y tanto en cápsula-trabéculas, como en pseudolóbulos e intersticio, mayor que en el **Grupo De Estrés** y menor que en ambos **Grupos De Bienestar Animal**.
- ✚ El calcio estuvo presente en cantidad y localización normal, similar a ambos **Grupos De Bienestar Animal**. En ningún caso se evidenció como áreas irregulares, carentes de citología glandular, como se mostraba en el grupo de **Estrés Animal** (Fig. 30 y 31).

Características Morfológicas De Las Pineales Del Grupo De Estrés Animal
Con Melatonina.



ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA GLÁNDULA PINEAL

INMUNODETECCIÓN ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE PINEALOCITOS (SYNAP, NNE, NSE).

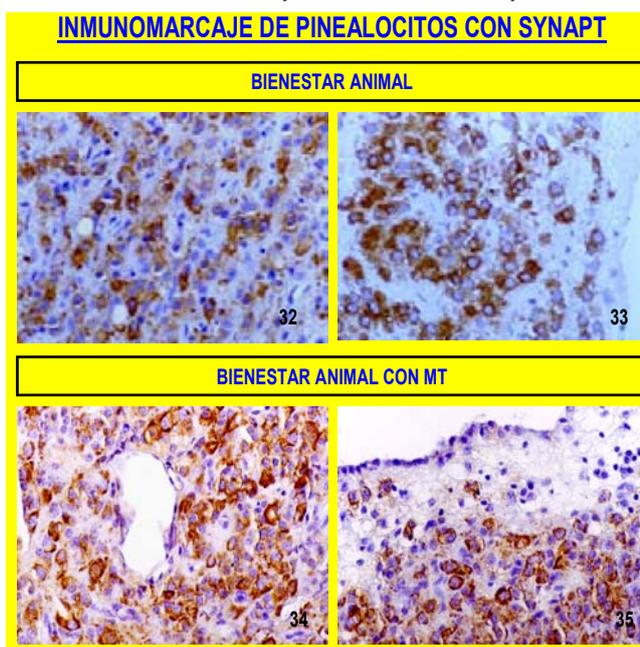
SYNAPTOPHYSIN (SYNAP)

En ninguno de los cuatro supuestos experimentales contemplados, las condiciones fotoperiódicas (fotoperiodo largo- mes de junio- inhibitorio; y fotoperiodo corto- mes de diciembre- estimuladorio) modificaron la inmunorreacción de los pinealocitos a la *synaptophysin*.

En el Grupo de Bienestar Animal el inmunomarcaje fue muy intenso. La morfología de las células inmunoteñidas se correspondía con los pinealocitos.

Su tropismo fue fundamentalmente perivascular, no detectándose inmunorreacción en los vasos sanguíneos.

Detectamos diferencias de inmunotinción al considerar diferentes regiones de una misma glándula; sin embargo, la cantidad de células inmunoteñidas fue sensiblemente mayor en



médula que en corteza (Fig. 32 y 33). Por otra parte, la inmunorreacción de células synaptophysin positivas en pineales de los animales sacrificados durante la noche, fue similar a la de los animales sacrificados durante el día.

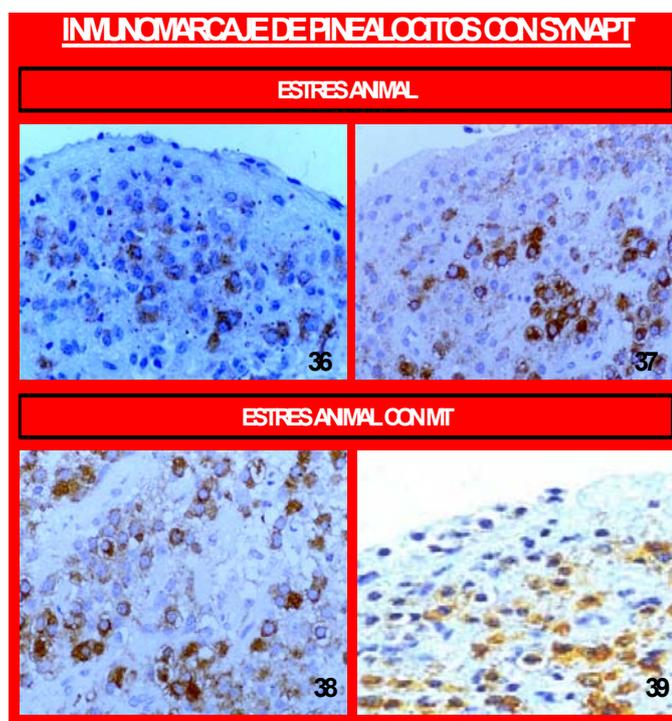
La inmunopositividad interesó tanto a células aisladas, como a grupos celulares. En la periferia celular el inmunomarcaje fue más intenso (Fig. 32 y

33). En el espacio intercelular, lleno de procesos pinealocíticos, también se detectó inmunoreacción a la *synaptophysin*.

El Grupo de Bienestar Animal con Melatonina La morfología, la localización y la distribución, de las células inmunoteñidas con la *synaptophysin*, cualitativamente fueron similares a lo detectado en el **Grupo de Bienestar Animal** (Fig. 34 y 35).

Al igual que en el Grupo anterior, en médula el número de células inmunopositivas fue sensiblemente mayor. También en los ciclos de oscuridad, no influyeron en la cantidad de células inmunoreactivas a la *synaptophysin*.

En el Grupo de Estrés Animal el comportamiento de la glándula pineal frente a la *synaptophysin* evidenció diferencias tanto cualitativas como



cuantitativas, respecto al **Grupo de Bienestar Animal**, considerado como referencia (Fig. 36 y 37). Destacamos:

- Escaso número de células SYNAP Positivas.
- Escasa densidad de inmunomarcaje.

El resto de las características fue similar:

- Diferencias regionales en la superficie glandular en cuanto a la

distribución de células inmunoteñidas; con menor número de células inmunopositivas en corteza; y similitud durante la noche y el día.

En el Grupo de Estrés Animal con Melatonina

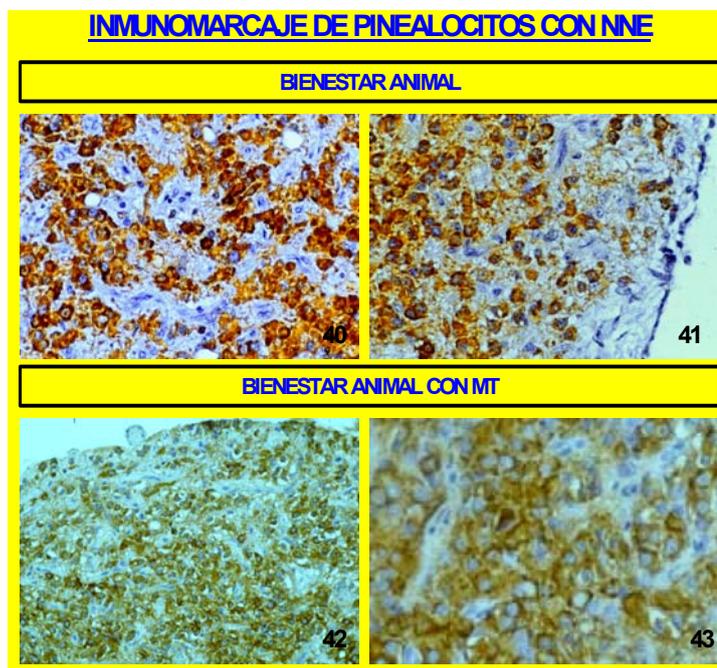
Se inició una recuperación de los parámetros de distribución, localización e intensidad de la inmunoreacción a la *synaptophysin*, acercándose a los referenciados para el **Grupo De Bienestar Animal**, tomado como referencia (Fig. 38 y 39).

ENOLASA NEURONAL NO ESPECÍFICA (NNE)

La inmunoreacción de los pinealocitos a *Enolasa Neuronal No Específica* no varió en ninguno de los cuatro supuestos experimentales contemplados, bajo condiciones fotoperiódicas diferentes (fotoperiodos largo y corto).

En el Grupo de Bienestar Animal se detectaron células positivamente teñidas con la NNE cuyas características morfológicas coincidían con las de los pinealocitos. En términos genéricos el número de células inmunoreactivas fue

moderado, detectándose un menor número de ellas en corteza que en médula (Fig. 40 y 41).



No se observaron diferencias en el grado de inmunotinción entre las células de animales sacrificados durante el día y durante la noche. Dentro de la misma glándula no se detectaron diferencias en el grado de positividad

entre células inmunomarcadas frente a la NNE.

Las células intersticiales adyacentes a las NNE positivas resultaron negativas; las estructuras vasculares y el estroma conectivo resultaron también negativos.

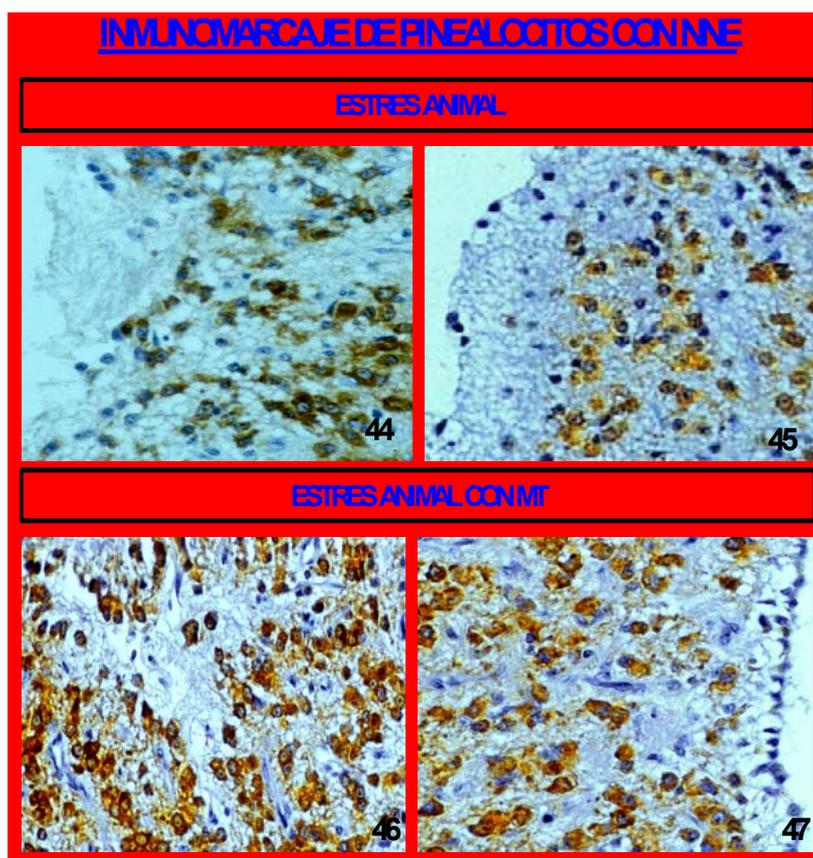
En el Grupo de Bienestar Animal con Melatonina se evidenció una inmunoreactividad de idéntica intensidad y localización a la visualizada para el Grupo de Bienestar Animal (Fig. 42 y 43). Se seguía observando diferencias regionales en cuanto al comportamiento glandular frente a la NNE. Se registró mayor número de células inmunopositivas en corteza que en médula. La densidad de inmunomarcaje en los ciclos de oscuridad, también fue similar que en los de luz.

En el Grupo de Estrés Animal Al igual que ocurrió para la *synatophysin*, en la reacción frente a la NNE (Fig. 44 y 45), se evidenciaron las máximas diferencias respecto al **Grupo de Bienestar Animal**. Destacamos:

- Reducida densidad de células NNE positivas.
- Escasa intensidad de inmunomarcaje.
- Diferencias regionales en la superficie glandular en cuanto a la distribución de células inmunoteñidas; con mayor número de células inmunopositivas en médula.

Al igual que en los **Grupos de Bienestar Animal, con y sin Melatonina**, la densidad de células positivas a la NNE, fue similar durante el día y la noche.

En el Grupo de Estrés Animal con Melatonina el comportamiento de las pineales frente a la NNE (Fig. 46 y 47), fue básicamente similar a lo



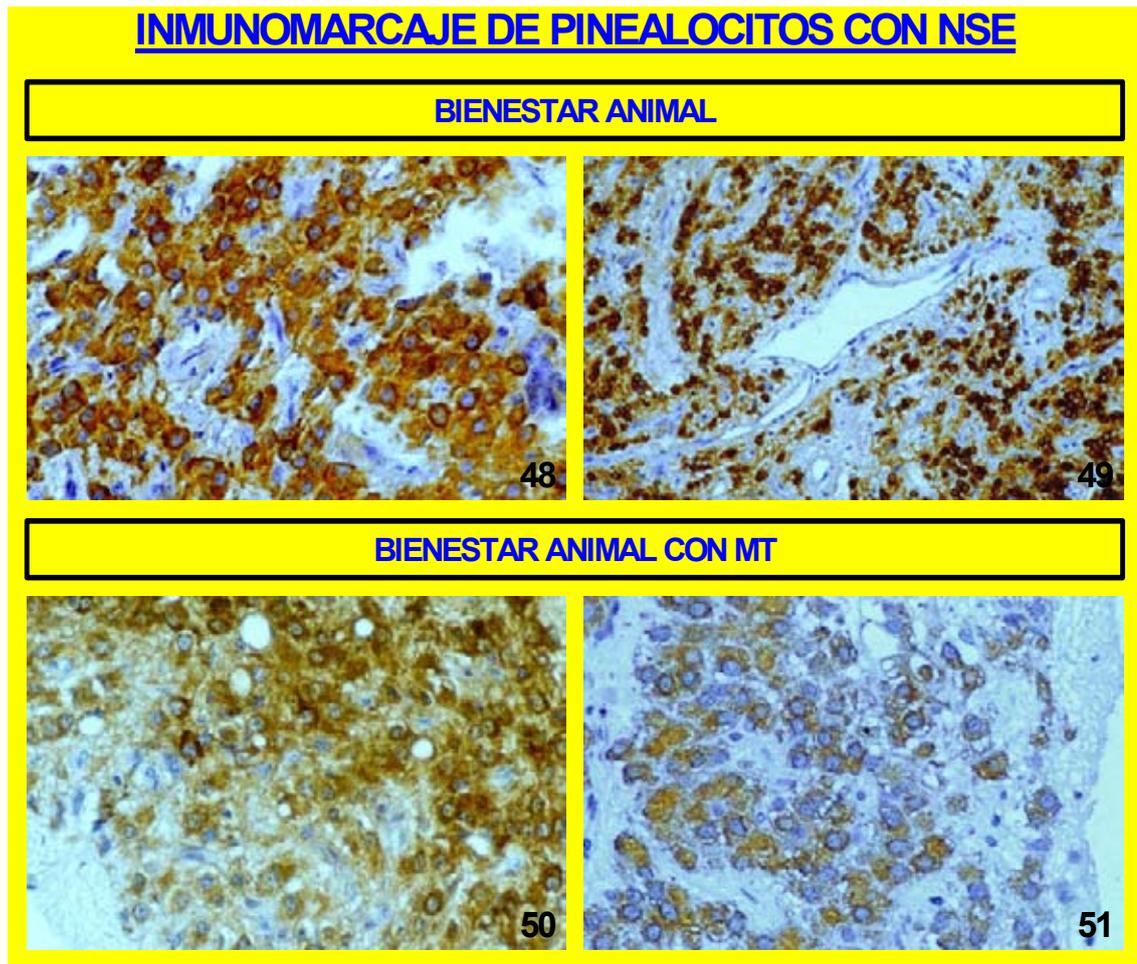
referenciado para el Grupo de Bienestar Animal tomado como referencia:

- Moderada cantidad e intensidad de inmunorreacción.
- Diferencias entre corteza y médula en la inmunodetección.

- Inmunopositividad similar en la luz y la oscuridad.
- Ausencia de inmunotinción en el estroma conectivo vascularizado.

ENOLASA NEURONAL ESPECIFICA (NSE)

La inmunoreacción de los pinealocitos a *Enolasa Neuronal Específica* no varió en ninguno de los cuatro supuestos experimentales contemplados, bajo condiciones fotoperiódicas diferentes (fotoperiodos largo y corto).



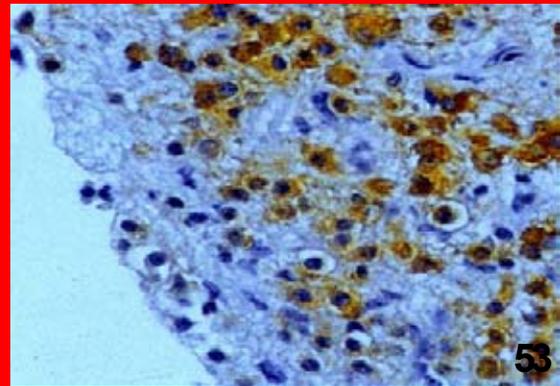
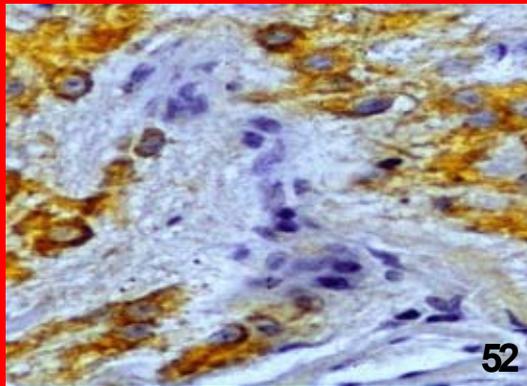
El comportamiento morfológico de las pineales de los 4 grupos experimentales (**Bienestar y Estrés Animal, con y sin Melatonina**) frente a la NSE, fue básicamente similar a lo referenciado para la Enolasa Neuronal No Específica. De modo genérico, las diferentes observadas, obedecían al patrón de similitud cualitativa y cuantitativa, anteriormente enunciado (Fig. 48-55).

Dicho patrón morfológico se caracterizó por:

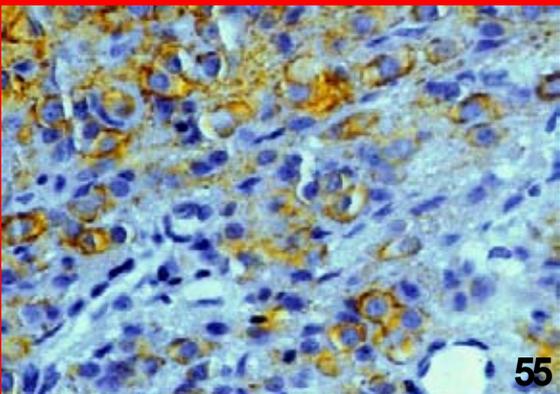
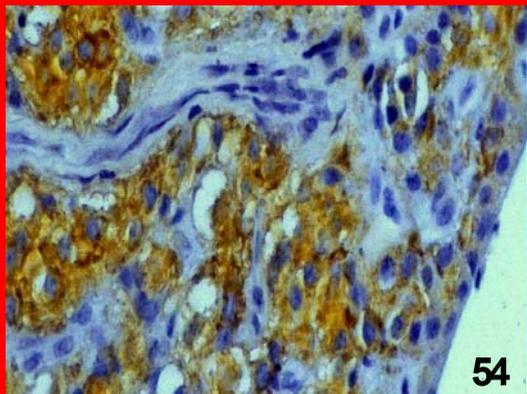
- Positividad en los pinealocitos.
- Ausencia de reacción positiva en las células intersticiales y en el estroma intersticial.
- La no existencia de diferencias en el grado de inmunotinción entre células inmunopositivas dentro de la misma glándula.
- La diferente inmunoreacción según consideremos corteza/médula.

INMUNOMARCAJE DE PINEALOCITOS CON NSE

ESTRES ANIMAL



ESTRES ANIMAL CON MT



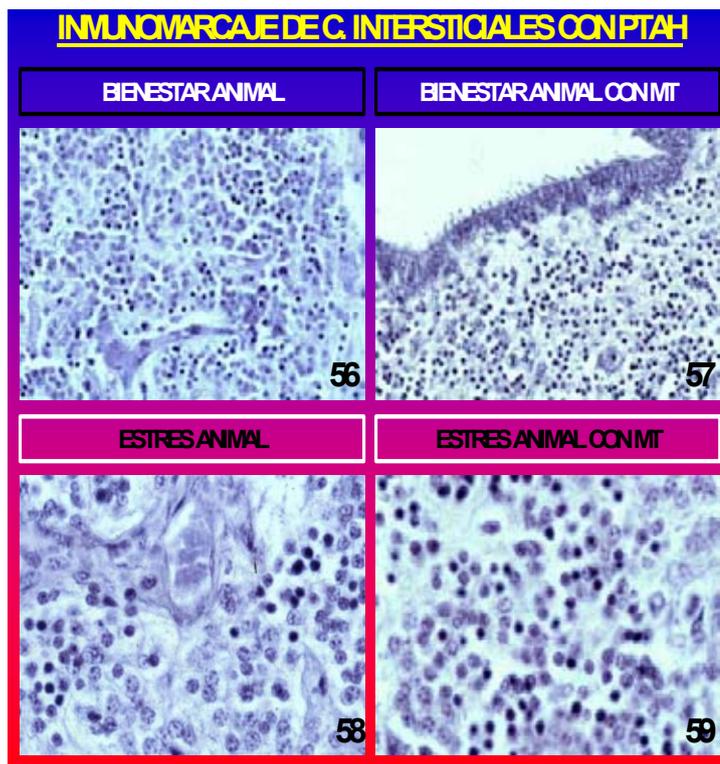
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA GLÁNDULA PINEAL

INMUNODETECCIÓN ESTRUCTURAL DE MARCADORES[‡] ESPECÍFICOS DE CELULAS INTERSTICIALES (PTAH, GFAP, VIM).

HEMATOXILINA ACIDA FOSFOTUNGSTICA (PTAH)

Las células PTAH+ evidenciaron características morfológicas diferentes, a las detectadas en los pinealocitos inmunoreactivos a los marcadores de células neuroendocrinas. La morfología de las células positivas a la PTAH, coincidía con la de los astrocitos del SNC: núcleos pequeños y de morfología oval o redondeada. La distribución de dichas células fue uniforme, formando acúmulos perivasculares a lo largo de todo el parénquima pineal.

Morfológicamente las células PTAH + fueron similares en los cuatro grupos



experimentales analizados, observándose tan solo diferencias cuantitativas.

Grupo de Bienestar Animal: presencia normal; moderada (Fig. 56).

Grupo de Bienestar Animal con Melatonina: presencia normal (Fig. 57).

Grupo de Estrés Animal: presencia escasa (Fig. 58).

Grupo de Estrés Animal con Melatonina:

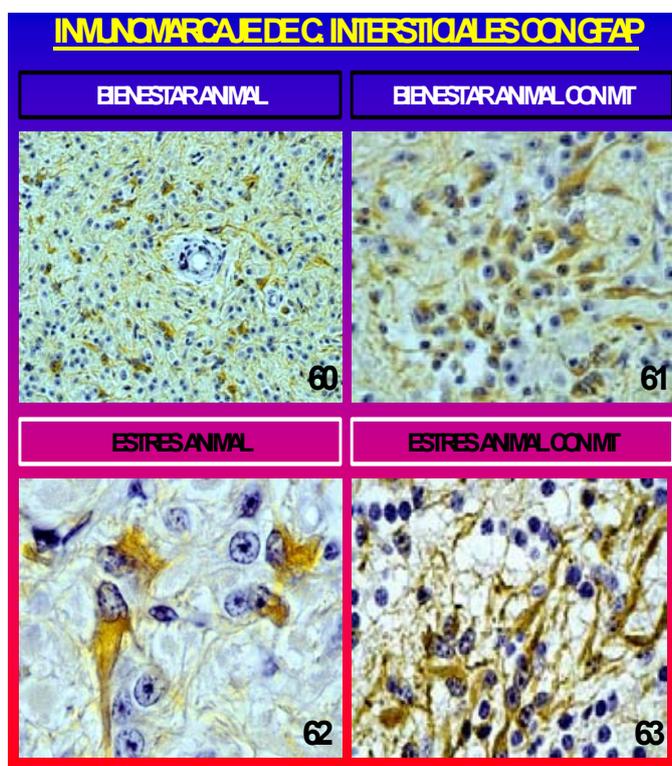
presencia escasa-moderada (Fig. 59).

Los ciclos de luz/ oscuridad no influyeron en el inmunomarcaje de células PTAH +.

PROTEINA GLIAL FIBRILAR ACIDA (GFAP)

Las células GFAP + fueron observadas en las pineales de los cuatro grupos de edades analizados: **Bienestar Animal**; **Bienestar Animal con Melatonina**; **Estrés Animal**; **Estrés Animal con Melatonina**.

Estas células, de manera genérica y en todos los grupos experimentales, se distribuían uniformemente por toda la superficie glandular; con localización eminentemente perivascular. En ninguno de los cuatro supuestos experimentales se evidenció diferencias de inmunomarcaje, al considerar el factor día/noche. La inmunotinción fue mayor en médula que en corteza.



Morfológicamente mostraban un parecido a los astrocitos del SNC, presentando un núcleo pequeño, denso, ovoide y negativo a la inmunotinción, rodeado de un citoplasma intensamente teñido. Del citoplasma partían un pequeño número de procesos que se disponían longitudinal y transversalmente con respecto a los pinealocitos (Fig. 60-63).

La reactividad a la GFAP en el **Grupo de Bienestar Animal** fue moderada (Fig. 60); y de similar intensidad y localización a la detectada en el **Grupo de Bienestar Animal con Melatonina**, donde aparecían cluster de células GFAP+ en la vecindad de los vasos sanguíneos (Fig. 61). En el **Grupo de Estrés Animal** los somas y procesos citoplasmáticos GFAP positivas, fueron

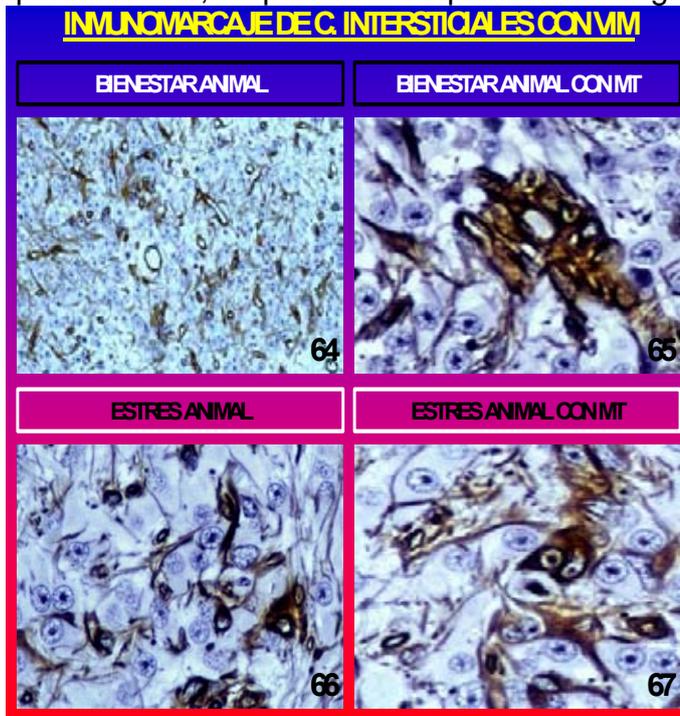
No se observaron diferencias en la distribución y localización de células inmunoteñidas respecto a los grupos previos.

En el **Grupo De Estrés Animal Con Melatonina** la reacción positiva a la GFAP evidenció una gran similitud (Fig. 63), a la referida para el **Grupo De Bienestar Animal**:

- Células de morfología estrellada con amplios somas y largos procesos citoplasmáticos y Distribución por todo el parénquima pineal, con localización perivascular.

VIMENTIN (VIM)

La distribución de las células VIM + en las pineales de los cuatro grupos experimentales, respondió al esquema morfológico de:



Grupo de Bienestar

Animal: presencia normal; moderada (Fig. 64).

Grupo de Bienestar

Animal con Melatonina: presencia moderada (Fig. 65).

Grupo de Estrés

Animal: presencia escasa (Fig. 66).

Grupo de Estrés Animal

con Melatonina: presencia escasa-moderada (Fig. 67).

La localización fue similar a la reflejada para las células GFAP+; sin embargo, el tropismo vascular detectado para las células VIM + fue menor que el de las células GFAP positivas. Además, las células positivas a la VIM fueron frecuentemente localizadas en el tejido conectivo del estroma glandular.

La inmunopositividad de la médula fue mayor que la de la corteza. El factor luz/oscuridad, al igual que ocurría para la GFAP, no repercutió en la intensidad de inmunomarcage de las células VIM positivas.

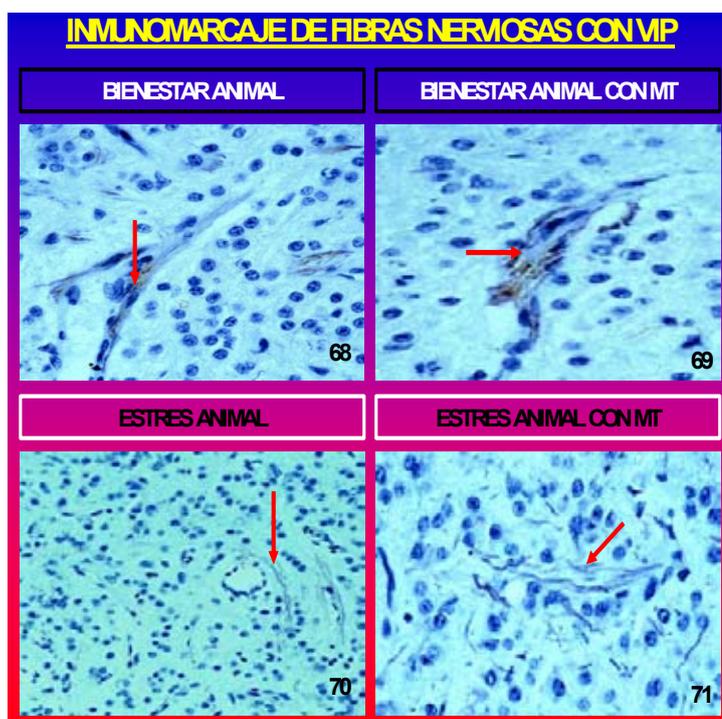
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA GLÁNDULA PINEAL

INMUNODETECCIÓN ESTRUCTURAL DE MARCADORES[‡] ESPECÍFICOS DE FIBRAS NERVIOSAS (VIP, NPY).

PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)

En los cuatro grupos experimentales se detectaron fibras nerviosas inmunoreactivas a la VIP. Genéricamente su distribución y localización fue similar en todos los grupos, con diferencias cuantitativas. Dichas diferencias cuantitativas en la inmunotinción de VIP, obedecían al patrón referenciado de:

Grupo de Bienestar Animal: presencia normal; moderada (Fig. 68).



Grupo de Bienestar Animal con Melatonina:

presencia normal-moderada (Fig. 69).

Grupo de Estrés Animal: presencia escasa (Fig. 70).

Grupo de Estrés Animal con Melatonina: presencia escasa-moderada (Fig. 71).

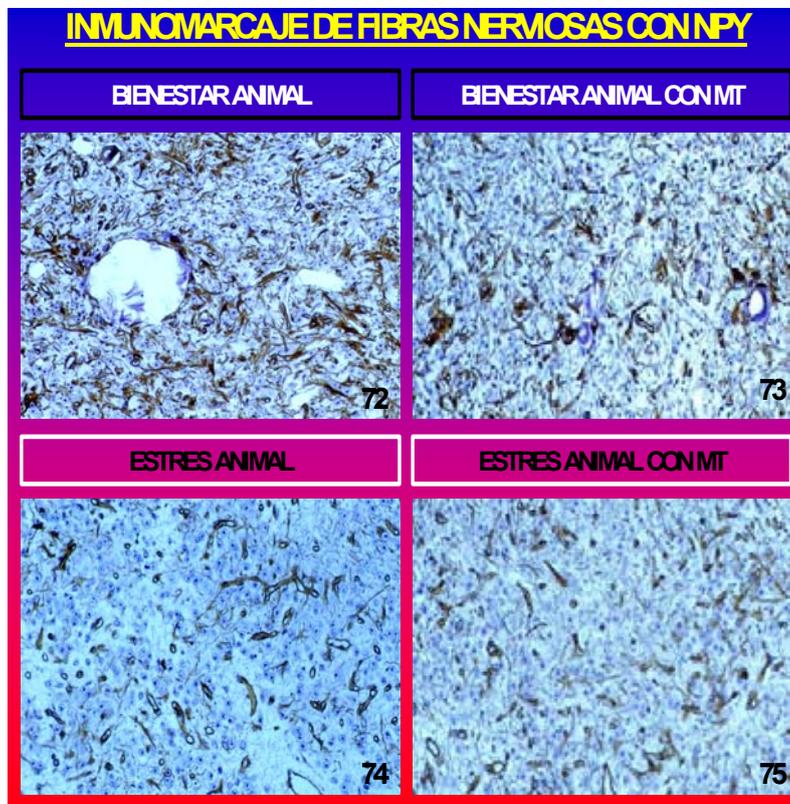
Las fibras nerviosas, en todos los grupos experimentales, fueron

poco numerosas y situadas preferentemente en la parte proximal de la glándula; en la porción distal de la pineal, se visualizaron aisladas fibras VIP+. La localización fue diversa: a lo largo de las estructuras vasculares; penetrando en la glándula a través de la cápsula; abandonando la cápsula y situándose entre los pinealocitos y células intersticiales; y en el tejido conectivo septal.

Se detectó influencias en la inmunoreacción relacionadas con los ciclos de luz/oscuridad; siempre mayor en la oscuridad.

NEUROPEPTIDO Y (NPY)

Al igual que ocurrió para el VIP, en todos los grupos experimentales, se detectó la presencia de inmunotinción positiva para el NPY en las fibras nerviosas perivasculares. De modo genérico, se detectaron fibras nerviosas inmunoreactivas al NPY en mayor abundancia que las fibras nerviosas VIP+. Su distribución y localización fueron similares en los cuatro grupos experimentales, detectándose tan solo, una mayor o menor cantidad e intensidad de inmunomarcaje. Las diferencias cuantitativas en la inmunotinción de NPY, obedecían al patrón referenciado de:

**Grupo de Bienestar**

Animal: presencia normal; moderada (Fig. 72).

Grupo de Bienestar

Animal con Melatonina:

presencia normal-moderada (Fig. 73).

Grupo de Estrés

Animal: presencia escasa (Fig. 74).

Grupo de Estrés

Animal con Melatonina:

presencia escasa-moderada (Fig. 75).

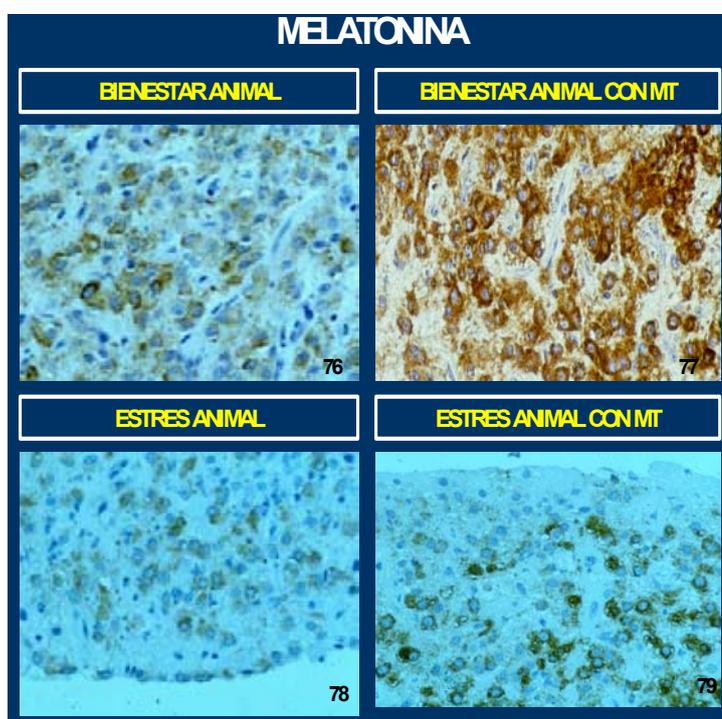
Las fibras nerviosas, en todos los grupos experimentales, fueron abundantes, y con idénticas localizaciones a las referenciadas para VIP. De igual modo, también se detectaron influencias en la inmunoreacción relacionadas con los ciclos de luz/oscuridad.

MELATONINA (MT)

En todos los grupos experimentales, se detectó inmunotinción positiva para la MT. La inmunoreacción para la MT fue intensa en el citoplasma de los pinealocitos. En un animal, del grupo de bienestar con melatonina se detectó una pequeña inmunoreactividad dentro del núcleo. La inmunotinción fue localizada tanto en zonas periféricas, como intermedias de la glándula; aunque más pronunciada en zonas periféricas. En las zonas intermedias de la pineal, la reacción interesó a los pinealocitos adyacentes a las calcificaciones. El inmunomarcaje afectó también a los procesos citoplasmáticos de los pinealocitos, situados en el espacio perivascular. Las células intersticiales adyacentes no evidenciaron inmunopositividad.

Genéricamente su distribución y localización fue similar en los cuatro grupos experimentales, detectándose tan sólo diferencias cuantitativas en la inmunotinción de MT, que obedecían al patrón referenciado de:

Grupo de Bienestar Animal: positividad normal-moderada (Fig. 76).



Grupo de Bienestar

Animal con Melatonina:

positividad abundante (Fig. 77).

Grupo de Estrés Animal:

positividad muy escasa (Fig. 78).

Grupo de Estrés Animal

con Melatonina:

positividad escasa (Fig. 79).

En todos los grupos experimentales se visualizaron diferencias en

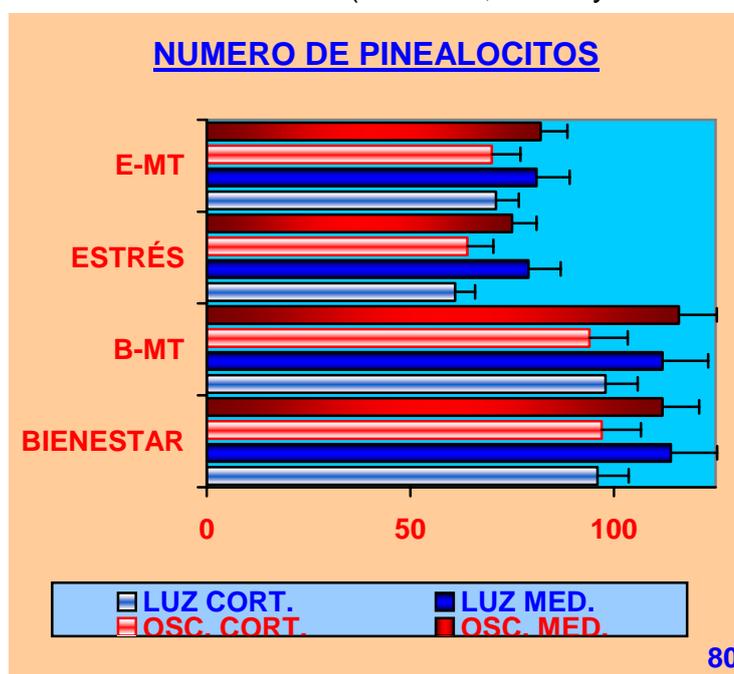
la inmunoreacción relacionadas con los ciclos de luz/oscuridad. La inmunotinción para la melatonina, siempre fue más manifiesta en intensidad y distribución durante la noche.

ANALISIS HISTOMORFOMETRICO Y ESTADISTICO

ANALISIS HISTOMORFOMETRICO Y ESTADISTICO^F

Número De Pinealocitos (Células SYNAP +) Por Area de Referencia.

El número células SYNAP+ (identificadas como pinealocitos) en el **Grupo de Bienestar Animal** fue significativamente mayor que en los **Grupos de Estrés, Sin Y Con Melatonina** ($F = 16.6$, Tuckey test : $P < 0.0003$; $F = 12.6$, Tuckey



test : $P < 0.0001$). Entre los **Grupos De Bienestar Animal, Con Y Sin Melatonina**, no hubo diferencias significativas; sin embargo, si las hubo entre los **Grupos De Estrés Con Melatonina Y Estrés Sin Melatonina**, donde el tratamiento del estrés con la melatonina se tradujo

en un aumento significativo en el número de células pinealocíticas ($F = 6.3$ Tuckey test : $P < 0.001$).

En los periodos de luz/oscuridad, en todos los grupos analizados, no hubo diferencias significativas en cuanto al número de pinealocitos en área de referencia.

El número de pinealocitos (células SYNAP+) fue significativamente mayor en médula que en corteza para todos los grupos experimentales ($F = 15.5$, Tuckey test : $P < 0.0002$; $F = 14.4$, Tuckey test : $P < 0.0001$; $F = 12.8$, Tuckey test : $P < 0.0001$; $F = 13.2$, Tuckey test : $P < 0.0003$, respectivamente) (Tabla 6; Fig. 80).

Número de Células Intersticiales (Células GFAP) Por Area De Referencia

La pineal de los animales de los **Grupos De Bienestar Sin Melatonina**,

presentó mayor número de células Intersticiales que la pineal de los ovinos de los **Grupos De Estrés, Con Y Sin Melatonina**

(F = 14.6, Tuckey test : P < 0.0003; F = 15.5, Tuckey test : P <

0.0002). Entre los **Grupos De Bienestar Animal, Con Y Sin Melatonina**, no hubo diferencias significativas. En los **Grupos De Estrés Con Melatonina Y Estrés Sin Melatonina**, el tratamiento del estrés con la melatonina se tradujo en un aumento significativo en el número de células intersticiales (F = 6.5, Tuckey test : P < 0.003).

En los periodos de luz/oscuridad, en todos los grupos analizados, no hubo diferencias significativas en cuanto al número total de células intersticiales.

Como expresan los factoriales del ANOVA, la densidad numérica de células intersticiales fue significativamente mayor en médula que en corteza (F = 10.4, Tuckey test : P < 0.0001; F = 11.5, Tuckey test : P < 0.0002; F = 9.5, Tuckey test : P < 0.0003; F = 8, Tuckey test : P < 0.0003) (Tabla 6; Fig. 81).

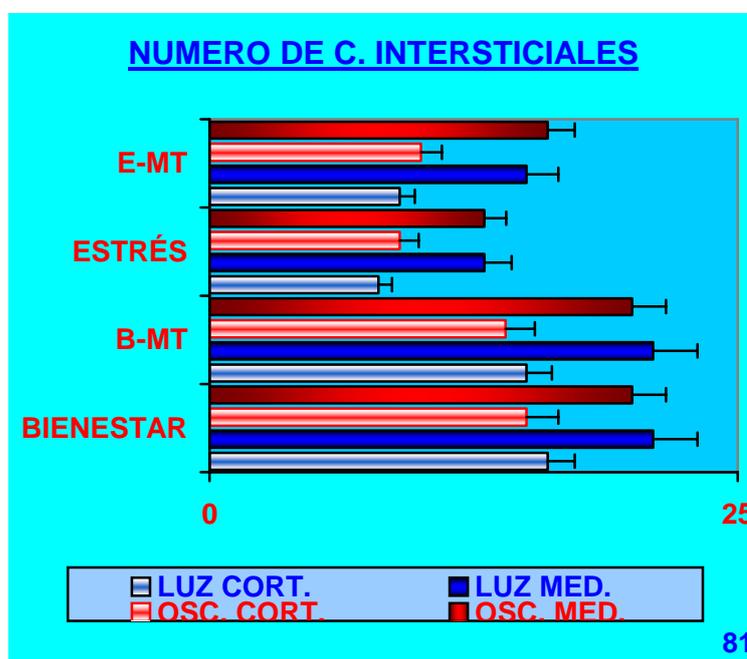


Tabla 6: Número De Pinealocitos (Células SYNAP +) Y De Células Intersticiales (Células GFAP+) Por Area de Referencia.

	BIENESTAR ANIMAL				BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA				ESTRES INDUCIDO				ESTRES INDUCIDO CON MELATONINA			
	LP		SP		LP		SP		LP		SP		LP		SP [‡]	
	LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.	
SYNAP	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
		96	114	97	112	98	112	94	116	61	79	64	75	71	81	70
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	6	8	4	7	8	6	4	7	5	8	6	8	6	8	4	7
SIG.EST	bde	de	bde	de	bde	de	bde	de	abce	ace	abce	ace	abcd	acd	acd	acd
GFAP	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
	16	21	15	20	15	21	14	20	6	11	5	11	10	16	11	16
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2	3	2	2	3	1	3	2	3	2	1	2	1	2	2	1
SIG.EST	bde	de	bde	de	bde	de	bde	de	abce	ace	abc	ac	abc	ac	ac	ac

○ a $p < 0,05$ versus grupo de Bienestar Animal Con Melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ b $p < 0,05$ versus médula en el correspondiente grupo.
 ○ c $p < 0,05$ versus grupo de Bienestar Animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ d $p < 0,05$ versus grupo de Estrés Inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ e $p < 0,05$ versus grupo de Estrés Inducido Con Melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 • Dentro de cada grupo se comparó el periodo de luz con el de oscuridad.
 • La comparación entre grupos se realizó comparando corteza con corteza y médula con médula.
 ❖ La muestra es la Media \pm el Error Estándar; n = 100 en cada grupo.

[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.

Volumen Promediado¹ De Células SYNAP Positivas

El volumen promediado de pinealocitos (Tabla 7; Fig. 82), siguió la pauta histomorfométrica hasta ahora referenciada:

o Mayor en el **Grupo De Bienestar Animal Sin Melatonina** que en los **Grupos de Estrés**

(F = 11.9, Tuckey test : P < 0.0005; F = 12.5, Tuckey test : P < 0.0004).

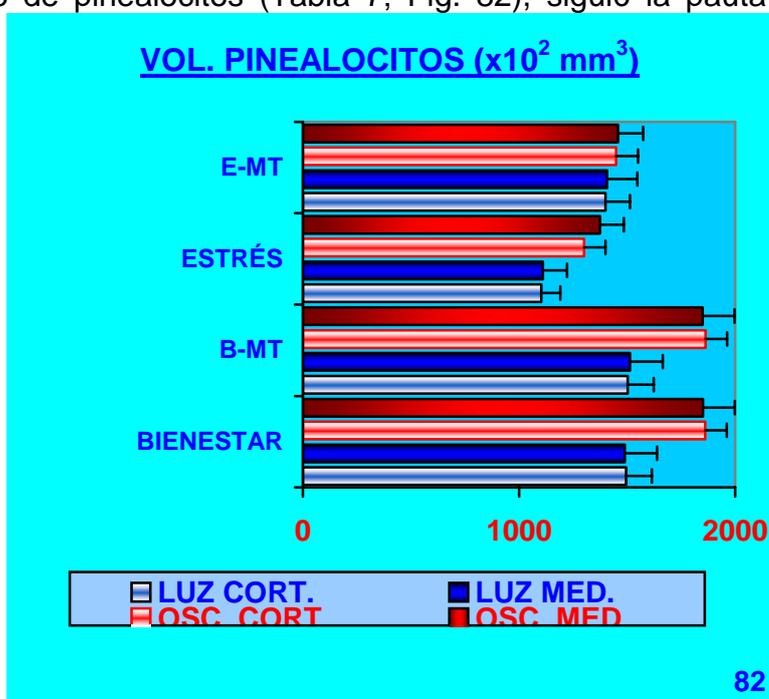
o Sin diferencias significativas entre los **Grupos De Bienestar**

Con Y Sin Melatonina.

o Con diferencias significativas entre los **Grupos De Estrés Animal Con Y Sin Melatonina** (F = 9.4, Tuckey test : P < 0.0001).

o Sin diferencias significativas entre todos los grupos estudiados al introducir el factor de zonificación glandular: corteza y médula.

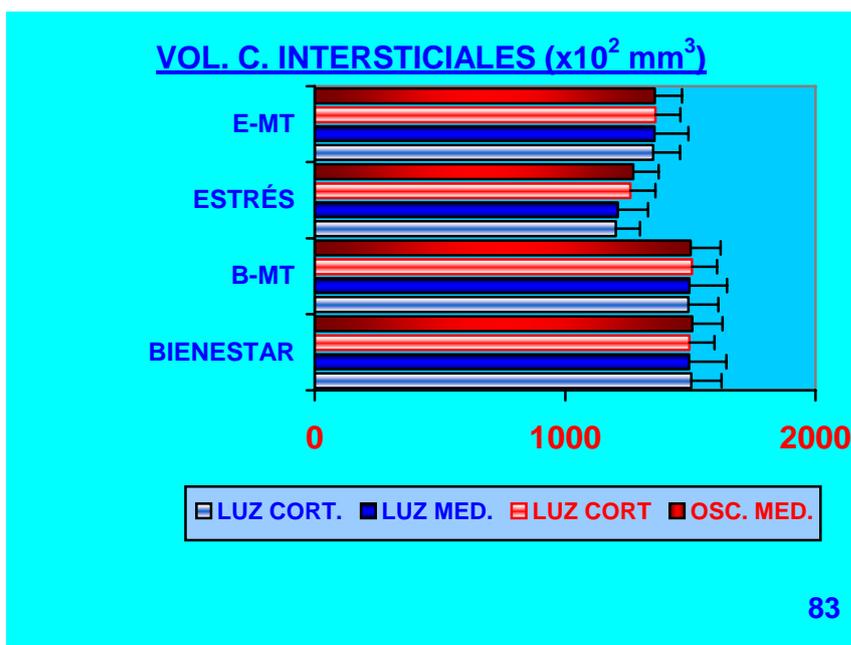
o Mayor volumen promediado en los pinealocitos de los ovinos sacrificados durante la noche comparados con los sacrificados de día (F = 21.4, Tuckey test : P < 0.0002; F = 20.9, Tuckey test : P < 0.0002; F = 18.9, Tuckey test : P < 0.0001; F = 17.9, Tuckey test : P < 0.0003, respectivamente para cada grupo experimental).



¹ El volumen promediado de pinealocitos y células intersticiales fue determinado en 100 de células inmunomarcadas, seleccionados de los campos y secciones anteriormente descritas.

Volumen Promediado² De Células GFAP Positivas

El volumen promediado de las células intersticiales (Tabla 7; Fig. 83) evidenció un comportamiento histomorfométrico similar al enunciado para los pinealocitos, con una diferencia: los ciclos luz/oscuridad no influyeron



significativamente, de tal modo que el volumen de las células intersticiales durante el día, fue muy similar al volumen durante la noche.

- Mayor en el **Grupo De Bienestar Animal Sin Melatonina** que en los **Grupos de Estrés** (F = 10.8, Tuckey test : P < 0.0003; F = 11.5, Tuckey test : P < 0.0002).
- Sin diferencias significativas entre los **Grupos De Bienestar Con Y Sin Melatonina**.
- Con diferencias significativas entre los **Grupos De Estrés Animal Con Y Sin Melatonina** (F = 8.4, Tuckey test : P < 0.0002).
- Sin diferencias significativas entre todos los grupos estudiados al introducir el factor de zonificación glandular: corteza y médula.

² El volumen promediado de pinealocitos y células intersticiales fue determinado en 100 de células inmunomarcadas, seleccionados de los campos y secciones anteriormente descritas.

Tabla 7: Volumen Promediado ($\times 10^2 \text{ mm}^3$) de Pinealocitos Y De Células Intersticiales. Volumen Pineal ($\times 10^6 \text{ mm}^3$)

	BIENESTAR ANIMAL				BIENESTAR ANIMAL CON MT				ESTRÉS INDUCIDO				ESTRÉS INDUCIDO CON MT			
	← LP		SP		LP		SP		LP		SP		→ LP		SP [‡]	
	LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.	
VOL. PIN.	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
		149	1489	1862	1851	1503	1514	1863	1849	1102	1110	1301	1375	1401	1407	1450
	5	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	±	28	22	27	25	30	34	37	35	29	21	38	20	16	17	16
	26															
SIG. EST.	bde	bde	de	de	bde	bde	de	de	abce	abce	ace	ace	abcd	abcd	acd	acd
VOL. CLINT.	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
	150	1495	1497	1508	1493	1497	1507	1501	1202	1210	1260	1272	1351	1357	1360	1358
	4	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	±	39	29	27	25	26	24	27	23	29	22	28	21	28	24	25
	27															
SIG. EST.	de	de	de	de	de	de	de	de	ace	ace	ace	ace	acd	acd	acd	acd
VOL.	LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.		LUZ		OSCUR.	
	895		1251		898		1249		602		775		801		867	
	±		±		±		±		±		±		±		±	
	16		17		15		17		15		18		20		16	
SIG. EST.	bde		de		bde		de		abce		ace		abcd		abcd	

○ a $p < 0,05$ versus grupo de Bienestar Animal Con Melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ b $p < 0,05$ versus oscuridad en el correspondiente grupo.
 ○ c $p < 0,05$ versus grupo de Bienestar Animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ d $p < 0,05$ versus grupo de Estrés Inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ e $p < 0,05$ versus grupo de Estrés Inducido Con Melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ Dentro de cada grupo se comparó el periodo de luz con el de oscuridad. n = 100 en cada GRUPO
 • La comparación entre grupos se realizó comparando corteza con corteza y médula con médula.

[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.

Imunohistoquímica Cuantitativa De La Presencia De Fibras Nerviosas (VIP Y NPY) En Área De Referencia.

El patrón histomorfométrico cualitativo de la presencia de fibras nerviosas VIP+ y NPY+ (Fig. 84 A,B), en un área de referencia conocida fue el siguiente:

Grupo de Bienestar Animal: presencia normal; moderada.

Grupo de Bienestar Animal con Melatonina: presencia normal; moderada.

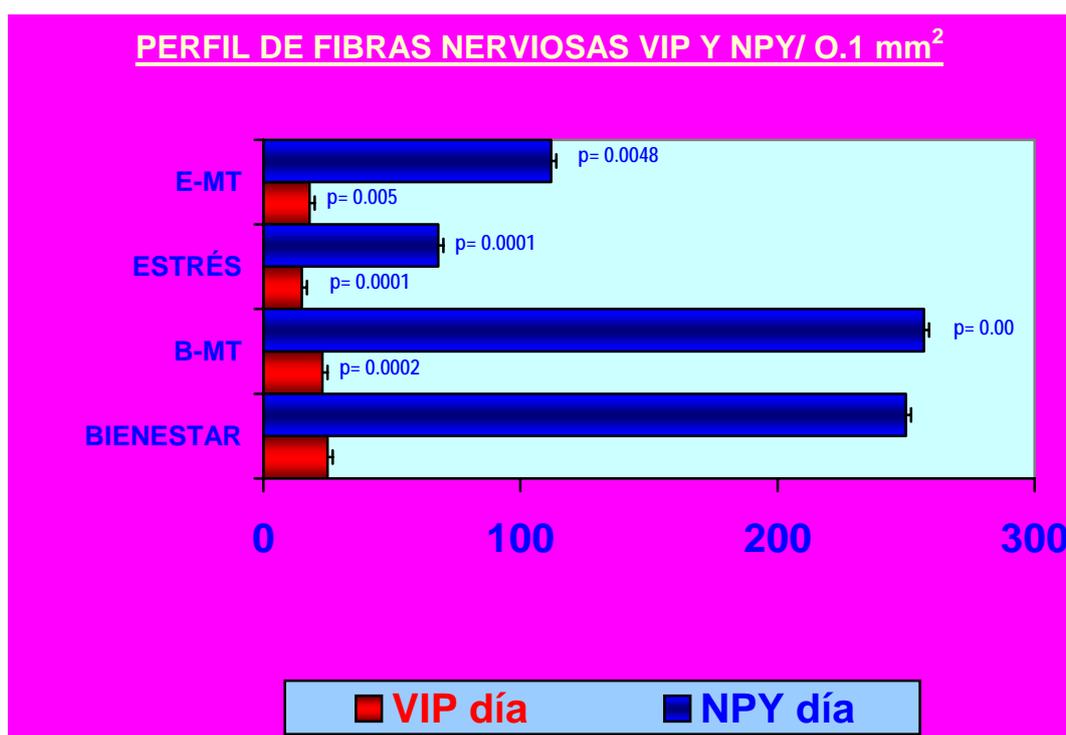
Grupo de Estrés Animal: presencia escasa.

Grupo de Estrés Animal con Melatonina: presencia escasa-moderada.

Estas reseñas cualitativas se tradujeron en los siguientes datos cuantitativos:

Grupo de Bienestar Animal: 250 ± 12 y 25 ± 2 para NPY y VIP, en los ciclos de luz, respectivamente.

Fig.84 A.- Fibras Nerviosas VIP y NPY durante el día, en 0.1 mm^2 de pineal.



Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: 257 ± 14 y 23 ± 3 para NPY y VIP, respectivamente.

Grupo De Estrés Animal: 68 ± 13 y 15 ± 2 para NPY y VIP, respectivamente.

Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: 112 ± 13 y 18 ± 2 para NPY y VIP, respectivamente.

En los ciclos de oscuridad, el patrón histomorfométrico cuantitativo de la presencia de fibras nerviosas VIP y NPY positivas, fue el siguiente:

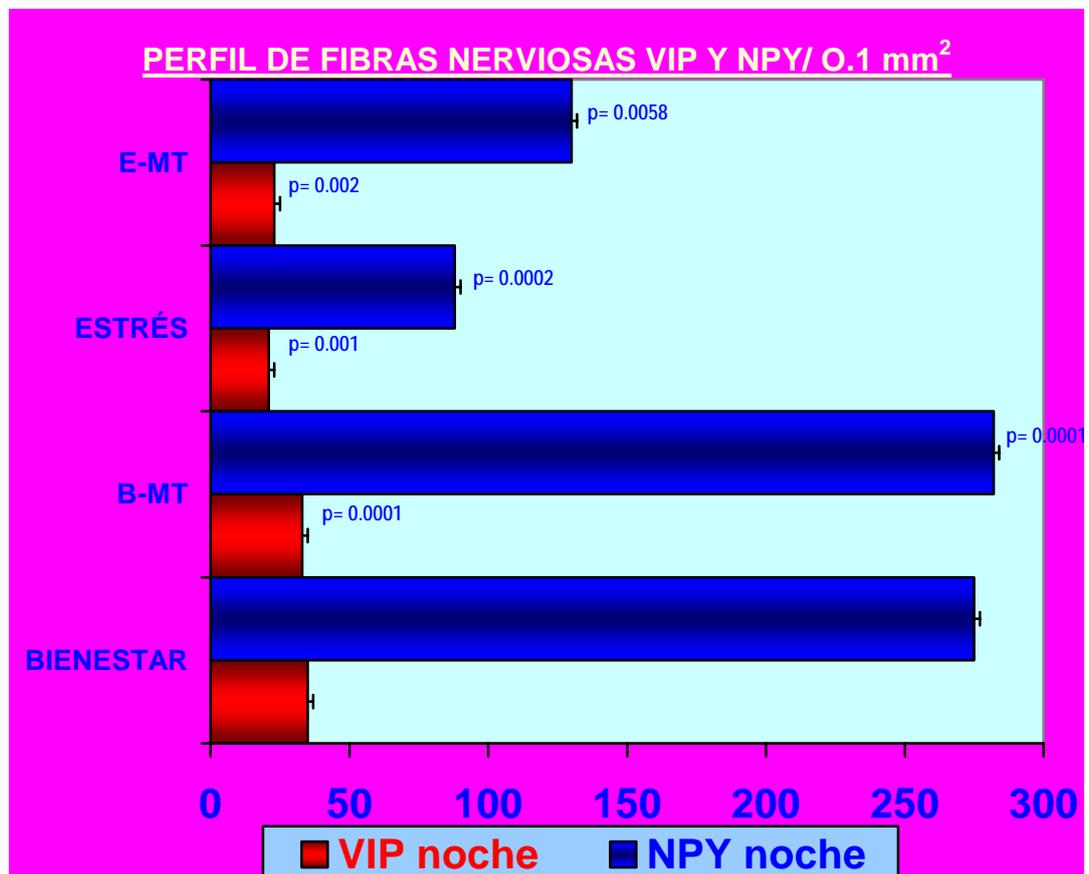
Grupo de Bienestar Animal: 275 ± 15 y 35 ± 4 para NPY y VIP, respectivamente .

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina : 282 ± 10 y 33 ± 4 para NPY y VIP, respectivamente.

Grupo De Estrés Animal: 88 ± 10 y 21 ± 4 para NPY y VIP, respectivamente.

Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: 130 ± 11 y 23 ± 4 para NPY y VIP, respectivamente.

Fig.84 B.- Fibras Nerviosas VIP y NPY durante la noche, en 0.1mm^2 pineal.



Imunohistoquímica Cuantitativa De La Presencia De Melatonina.

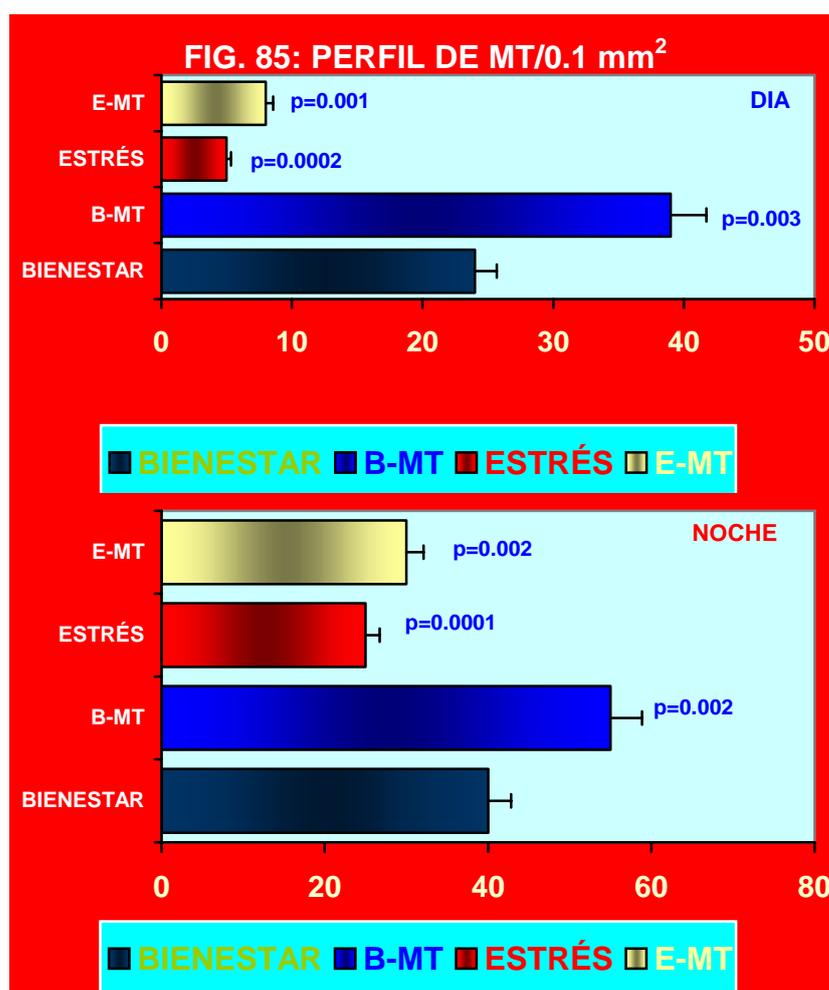
El patrón histomorfométrico de la presencia de MT (Fig. 85), fue el siguiente:

Grupo de Bienestar Animal: presencia normal; moderada.

Grupo de Bienestar Animal con Melatonina: presencia normal; moderada.

Grupo de Estrés Animal: presencia escasa.

Grupo de Estrés Animal con Melatonina: presencia escasa-moderada.



La melatonina ocupaba, en un área de 0.1 mm² los siguientes los siguientes datos cuantitativos, durante el día y la noche, respectivamente:

Grupo de Bienestar Animal: 22± 4; 40± 5

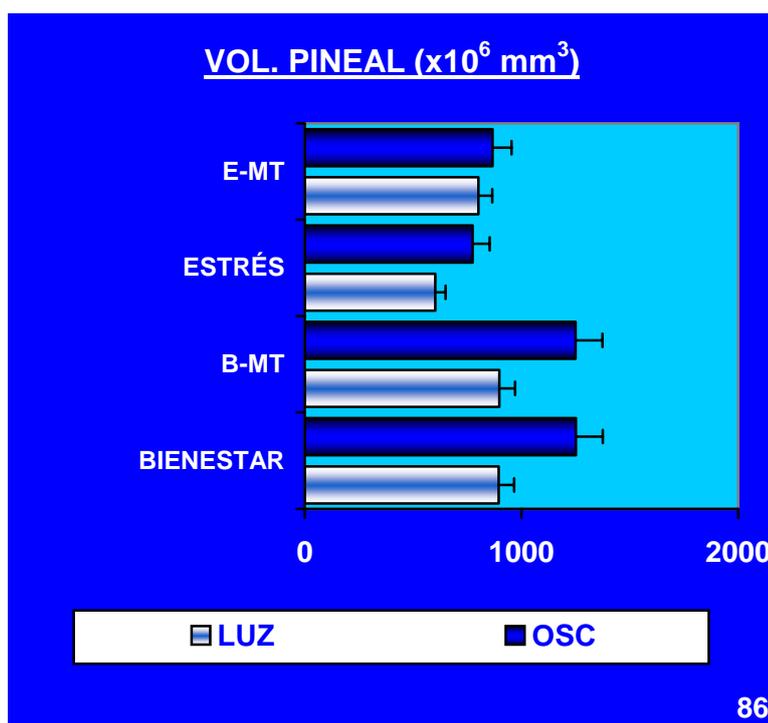
Grupo de Bienestar Animal con Melatonina : 39±6; 55±6.

Grupo de Estrés Animal: 5±3; 25±5 .

Grupo de Estrés Animal con Melatonina: 8±3 .

Volumen Glandular.

En todos los grupos experimentales, el volumen de las pineales de los animales sacrificados a las 2:00 h fue significativamente mayor que el de los ovinos sacrificados a las 14:00 h (F = 8.7, Tuckey test : P < 0.003; F = 9.8, Tuckey test : P < 0.002; F = 8.5, Tuckey test : P < 0.001; F = 7.7, Tuckey test : P < 0.002).

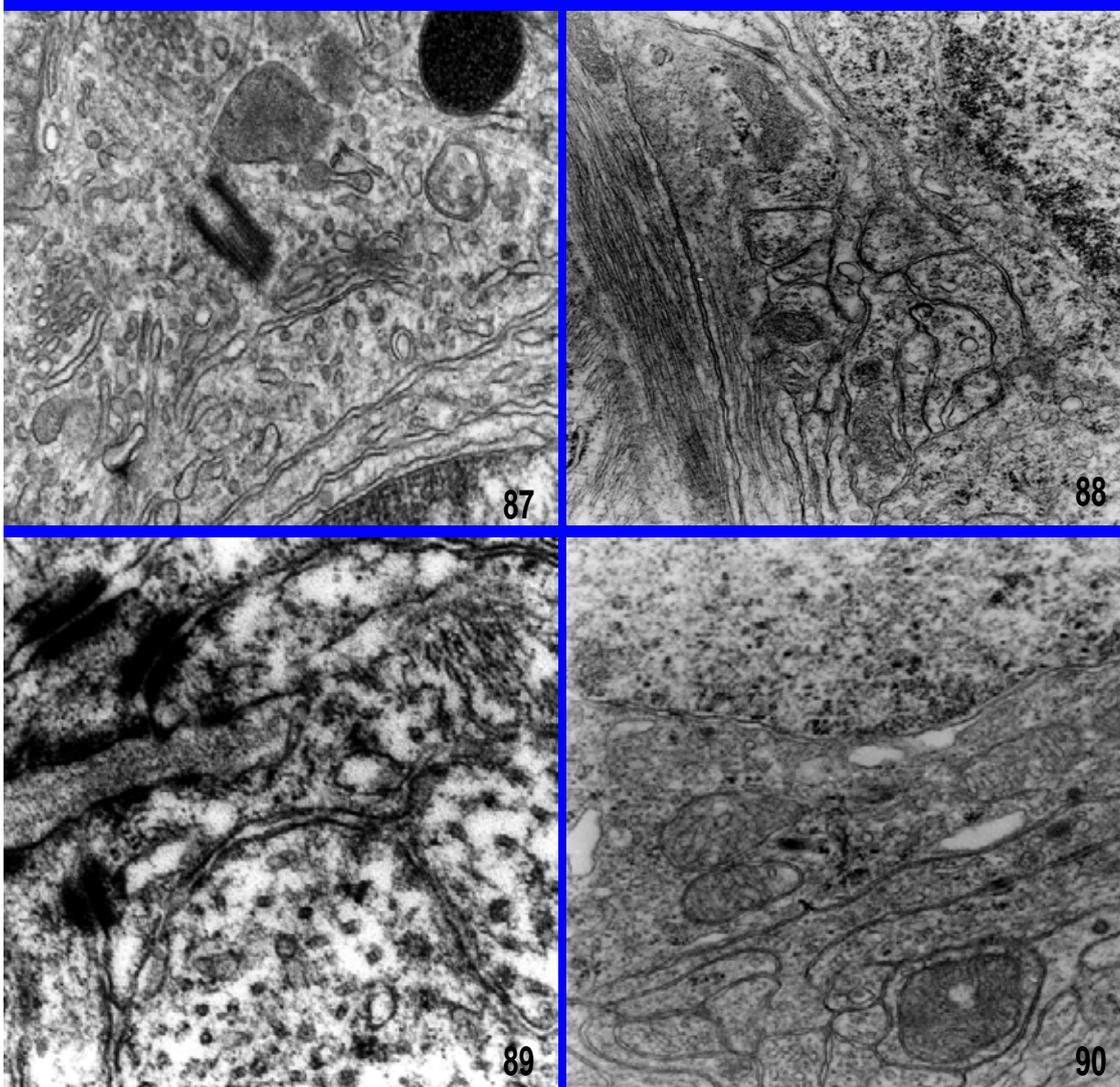


El volumen glandular en el Grupo De Bienestar Animal fue significativamente mayor que en Grupos De Estrés, Con Y Sin Melatonina (F = 16.2, Tuckey test : P < 0.0003; F = 8.7, Tuckey test : P < 0.002). Entre los

Grupos De Bienestar Animal, Con Y Sin Melatonina, no hubo diferencias significativas; sin embargo, si las hubo entre los Grupos de Estrés con Melatonina y el de Estrés sin Melatonina, donde el tratamiento del estrés con la melatonina se tradujo en un aumento significativo en el volumen pineal (F = 7.6 Tuckey test : P < 0.003) (Tabla 7; Fig. 86).

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURALES DE LA GLÁNDULA PINEAL®**ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURALES DE LA GLÁNDULA PINEAL****GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL**

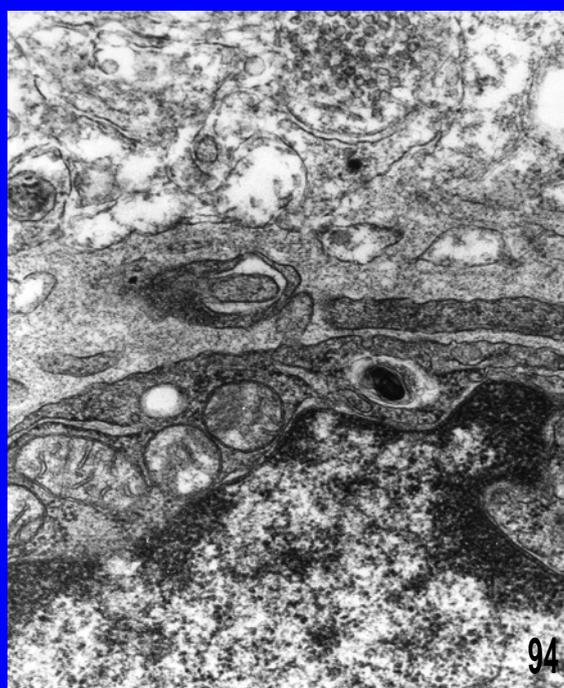
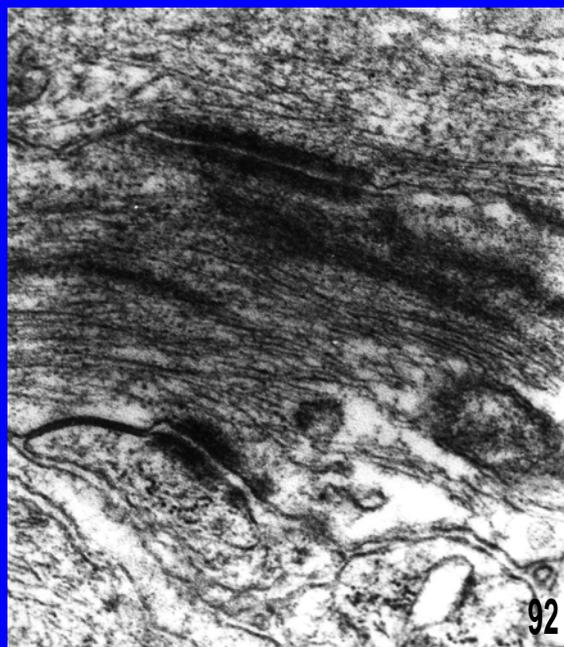
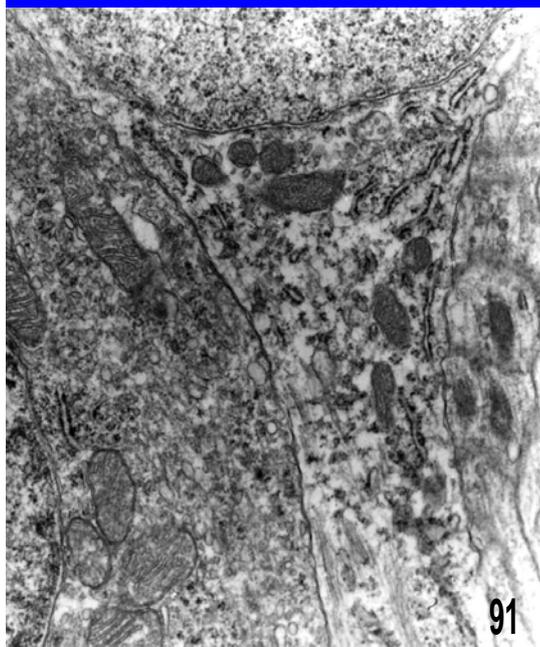
Los pinealocitos (Fig.87 y 88) evidenciaban núcleos ovales y/o redondeados,

ULTRAESTRUCTURA PINEAL: GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL

con nucléolos bien desarrollados y con nítido nucleolema. La presencia de poros en la envoltura nuclear fue abundante. El citocentro estuvo representado por un complejo de Golgi bien desarrollado, y el diplosoma. Las mitocondrias, ovals o elongadas, mostraban una matriz electrodensa y grandes crestas tubulares. El retículo endoplásmico liso y rugoso estuvieron presentes irregularmente distribuidos por todo el citoplasma destacó la presencia de abundantes ribosomas. El resto del citoplasma estaba ocupado por aisladas gotas lipídicas y gránulos de glucógeno, y gránulos pigmentarios de variado tamaño, morfología y electrodensidad. En los procesos pinealocíticos, de disposición perivascular, a nivel de sus bulbos terminales se advertía la presencia de vésiculas adielectrónicas y electrodensas, numerosos microtúbulos y gap junctions (Fig. 89 y 90).

Las células intersticiales (Fig. 91), en menor número que los pinealocitos

ULTRAESTRUCTURA PINEAL: GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL



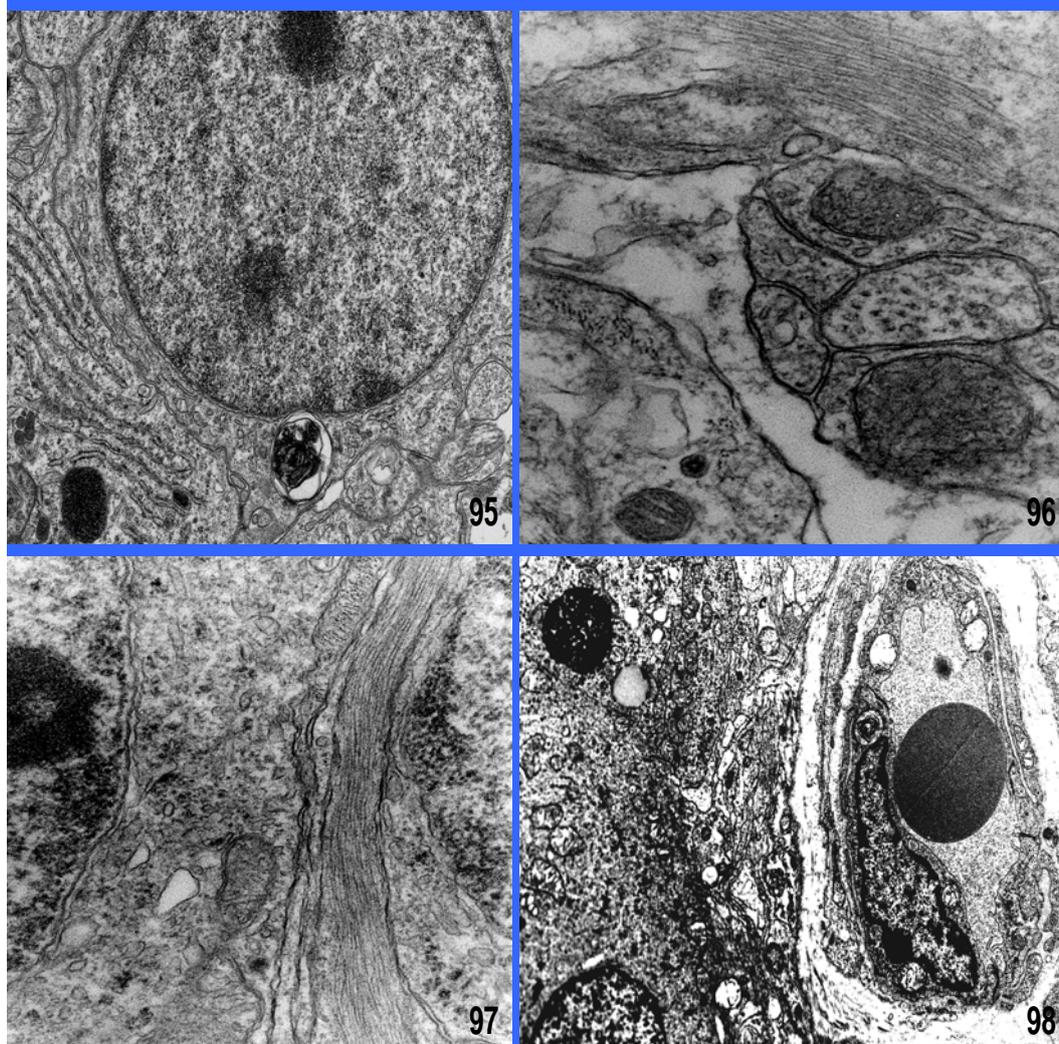
y de clara disposición perivascular, se caracterizaban por poseer un núcleo de morfología redondeada; con cromatina finamente granular dispersa en un nucleoplasma claro; y nucléolo central con un denso nucleololema. En el citoplasma destacaba una presencia considerable de complejo de Golgi, retículo endoplásmico granular y mitocondrias. También observamos lisosomas con una membrana limitante claramente definida, así como diposomas en el citoplasma perinuclear. Ocasionalmente evidenciábamos gránulos pigmentarios de variada morfología y electrodensidad. Fue también destacable la observación de largos procesos citoplasmáticos, asociados a los procesos pinealocíticos, y con la presencia de numerosos microfilamentos en su interior. Igualmente se detectaron abundantes uniones comunicantes, tipo *gap junctions*, con los bulbos terminales de los procesos pinealocíticos (Fig. 92).

En la vascularización fue destacable con presencia de capilares *tipo no fenestrado* (Fig. 93). La configuración de los capilares intrapineales estuvo representada por la presencia de una u dos células endoteliales, con considerable desarrollo de los organoides del sistema vacuolar citoplasmático (SVC) y una membrana basal nítidamente definida.

El espacio intersticial estuvo ocupado por las fibras de colágeno (Fig. 93), y fibras nerviosas amielínicas, intercaladas entre los procesos citoplasmáticos. Dichas fibras nerviosas exhibían la presencia de vesículas de variada morfología y electrodensidad, y zonas de contacto específico con los procesos citoplasmáticos de las células intersticiales (Fig. 94).

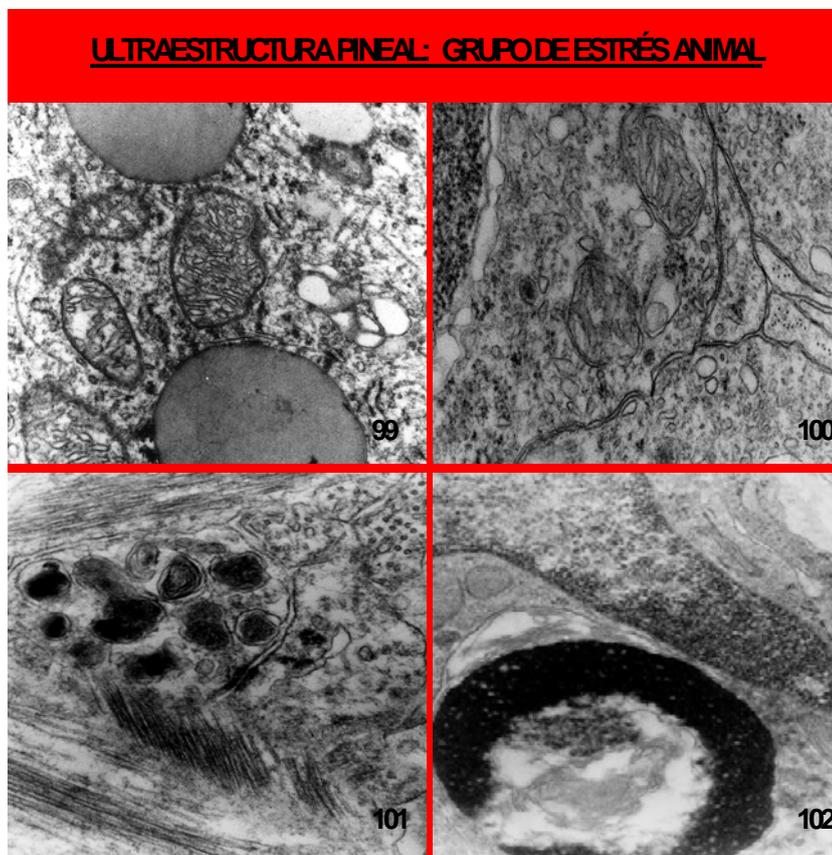
GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA

Las diferencias en la morfología ultraestructural de las pineales de este grupo, respecto al grupo de bienestar animal, fueron muy exiguas, evidenciando un patrón morfológico de gran similitud al referenciado para el grupo anterior (Fig. 95-98). A través de las descripciones ultraestructurales solo podemos destacar el mayor desarrollo de los organoides del sistema vacuolar citoplasmático, en comparación al **Grupo de Bienestar Animal**.

ULTRAESTRUCTURA PINEAL: GRUPO DE BIENESTAR ANIMAL CON MT

GRUPO DE ESTRES ANIMAL

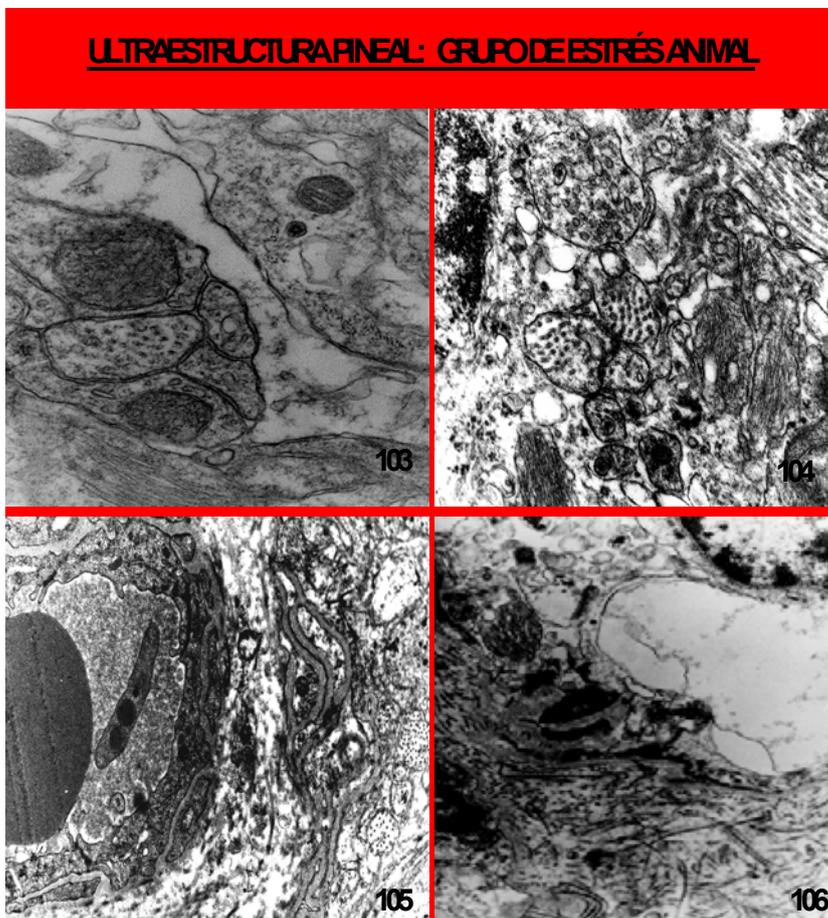
Los pinealocitos (Fig. 99-102) se caracterizaban por presentar un núcleo



pequeño con acúmulos de cromatina visibles dentro de un denso nucleoplasma. El nucléolo era visible ocasionalmente. El citoplasma de alta electrodensidad destacaba por presentar una escasa cantidad de organoides. El complejo de Golgi y el retículo endoplásmico

fueron particularmente escasos. Las mitocondrias aparecían tumefactas, de alta electrodensidad y heterogeneidad en cuanto a morfología y distribución; los fenómenos de criptolisis fueron frecuentes. Los liposomas se presentaban en abundante número, gran tamaño y alta electrodensidad. La presencia de cuerpos apoptóticos fue una constante en el citoplasma de los pinealocitos de este grupo (Fig. 101), siempre en estrecha relación de proximidad con las mitocondrias (Fig. 99). Respecto a los procesos citoplasmáticos cabría resaltar que estos aparecían delgados y en escaso número, presentando una moderada cantidad de microtúbulos. En los bulbos terminales se evidenciaban escasas cantidades de uniones comunicantes (*gap junctions*) y de vesículas; incluso fue relativamente frecuente el hallazgo de signo de degeneración celular con la presencia de figuras de mielina en dichos bulbos terminales (Fig. 102).

En relación a las células intersticiales estas se caracterizaban por presentar un núcleo ovoide, con presencia ocasional de nucléolo, y cromatina de aspecto



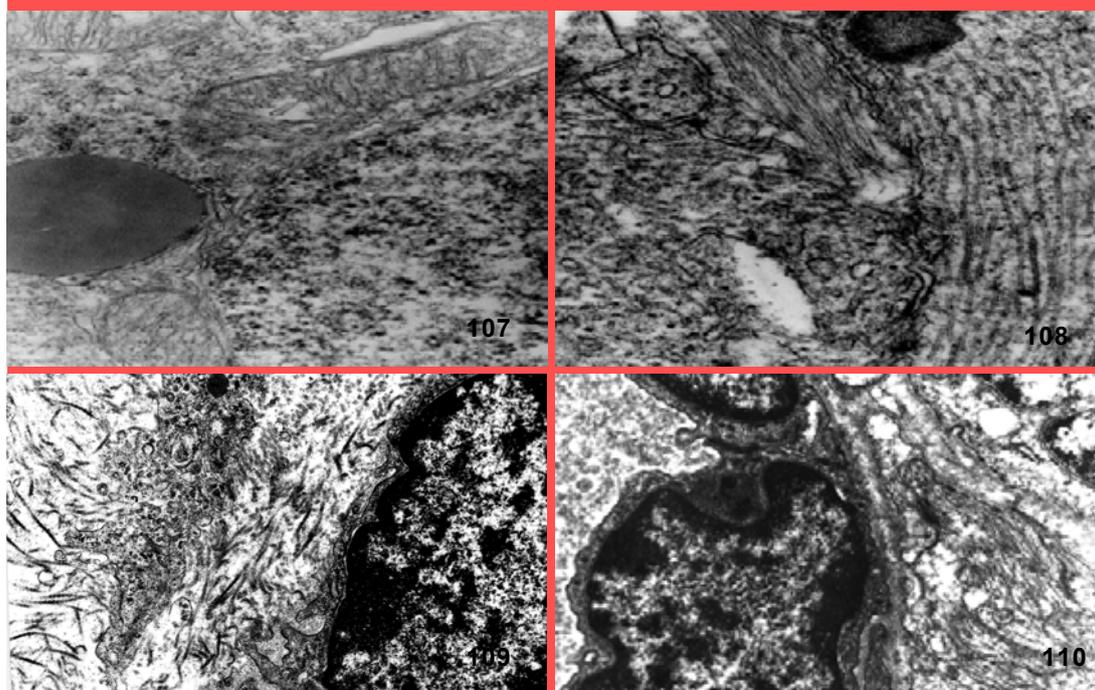
granular dentro de un claro nucleoplasma (Fig. 103). En su citoplasma visualizamos escasas cantidades de retículo endoplásmico, aislados ribosomas y complejo de Golgi. Gránulos de lipofuscina y mitocondrias tumefactas y con

criptolisis, fueron un hallazgo frecuente. Los procesos citoplasmáticos de estas células, presentaban menor cantidad de microfilamentos; sus bulbos terminales evidenciaban reducidas cantidades de uniones comunicantes y vesículas secretorias (Fig. 104).

Los capilares no fenestrados (Fig. 105) y las fibras nerviosas no mielinizadas (muy escasas) rellenaban el espacio intersticial intercalándose con los procesos citoplasmáticos de pinealocitos y células intersticiales. Los capilares se configuraban por varias células endoteliales, con una moderada cantidad de orgánoides citoplasmáticos, y una membrana basal tenue y con interrupciones, que les separaba del estroma adyacente, muy rico en fibras de colágeno (Fig. 106).

GRUPO DE ESTRES ANIMAL CON MELATONINA

Los pinealocitos destacaron por presentar un núcleo habitualmente alargado con una cromatina densa y uniformemente granular (Fig. 107). Con frecuencia

ULTRAESTRUCTURA PINEAL: GRUPO DE ESTRÉS ANIMAL CON MT

se observaba la presencia de un nucléolo. Su citoplasma resaltaba por ser electrodenso y con moderado desarrollo de los organoides: pequeños sáculos y cisternas de Golgi; retículo endoplásmico liso y rugoso de desarrollo y distribución irregular; aislados ribosomas, mitocondrias, gránulos pigmentarios y microtúbulos; y abundante presencia de liposomas. Los procesos citoplasmáticos presentaban escasa presencia de microtúbulos, de retículo y de mitocondrias. Los bulbos terminales, en menor número y tamaño que en los pinealocitos de los **Grupos De Bienestar Animal**, conservaban su disposición perivascular, y la en su interior de vesículas de variada morfología y electrodensidad.

Las células intersticiales (Fig. 108) evidenciaron dos características genéricas enunciadas en los **Grupos De Bienestar:**

1. Su menor abundancia que los pinealocitos.
2. Su distribución perivascular.

El núcleo era de morfología redondeada, de contorno irregular. Cromatina laxa, finamente granular e irregularmente distribuida en un nucleoplasma claro. En ocasiones se visualizaba un nucléolo con un nucleololema denso. El citoplasma era adieletrónico con escasez de organoides: una pequeña cantidad de poliribosomas libres; aisladas cisternas de retículo endoplásmico rugoso; escasas mitocondrias. Ocasionalmente pudieron ser evidenciados lisosomas, con membrana limitante muy definida; diplosomas en el citoplasma perinuclear; y gránulos pigmentarios de variada morfología y electrodensidad. Los procesos citoplasmáticos evidenciaron menor relación con los procesos pinealocíticos que la argumentada para los **Grupos De Bienestar Animal**, y menor número de microfilamentos en su interior.

La vascularización aparecía constituida por capilares con una o dos células endoteliales. La membrana basal capilar era fina y con pequeñas interrupciones. Dichos capilares carecían de poros (no fenestrados); y su espacio pericapilar, aparecía ocupado por aisladas fibras nerviosas amielínicas y por escasas prolongaciones de pinealocitos y de células intersticiales (Fig. 109).

El estroma que rodeaba el espacio perivascular se caracterizó por presentar una considerable cantidad de fibras de colágeno (Fig. 110).

ANÁLISIS INMUNOELECTRONOMICROSCÓPICOS DE LA GLANDULA PINEAL®

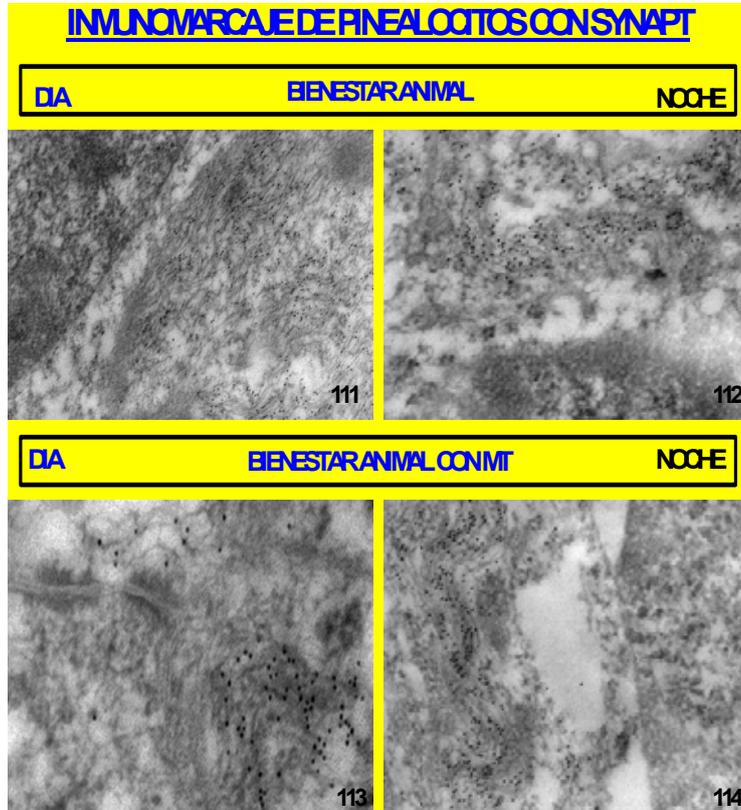
INMUNODETECCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE PINEALOCITOS Y CÉLULAS INTERSTICIALES.

MARCADORES DE PINEALOCITOS: SYNAPTOPHYSIN (SYNAPT)

En los cuatro grupos experimentales analizados las partículas de inmunoro coloidal fueron detectadas en células de similares características a las detectadas, ultraestructuralmente, para los pinealocitos.

En el Grupo De Bienestar Animal el inmunomarcaje fue muy intenso. La morfología de las células inmunoteñidas se correspondía con los pinealocitos. No se detectó inmunoreacción en los vasos sanguíneos.

La intensidad del inmunomarcaje fue sensiblemente mayor en médula que en corteza. Por otra parte, la inmunotinción en pineales de los animales sacrificados durante la noche, fue similar a la de los sacrificados durante el día



(Fig. 111 y 112).

En el espacio intercelular, lleno de procesos pinealocíticos, también se detectó inmunoreacción positiva.

El Grupo De Bienestar Animal Con

Melatonina La morfología, la localización y la distribución, de las células inmunoteñidas con la *synaptophysin*, cualitativamente fueron

similares a las detectadas en el **Grupo De Bienestar Animal** (Fig. 113 y 114).

Al igual que en el Grupo anterior, en médula el número de células inmunopositivas fue sensiblemente mayor. También en los ciclos de oscuridad, la detección de células inmunoreactivas a la *synaptophysin* fue igual que en los ciclos de luz.

En el **Grupo De Estrés Animal** el comportamiento de la glándula pineal frente a la *synaptophysin* evidenció diferencias tanto cualitativas como cuantitativas, respecto al **Grupo De Bienestar Animal**, considerado como referencia; destacamos:

- Escaso número de células *synaptophysin* positivas.
- Escasa densidad de inmunomarcaje (Fig.115).

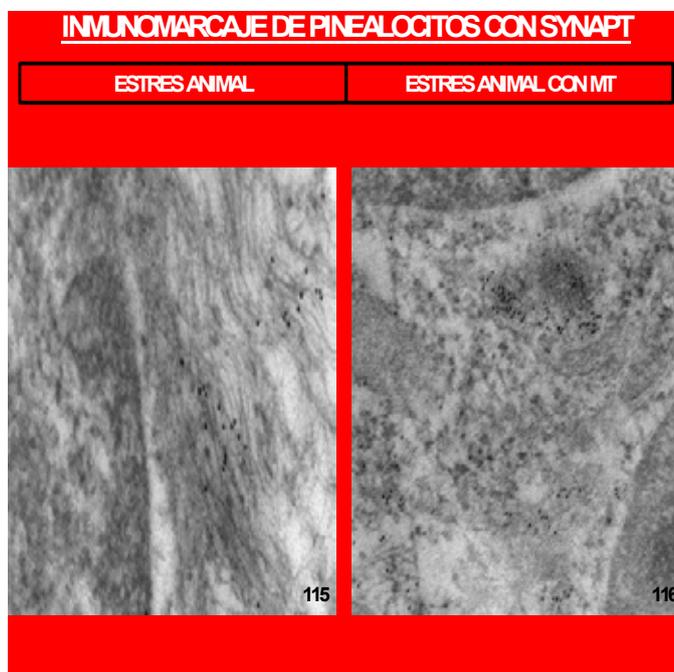
- Diferencias regionales en la superficie glandular en cuanto a la distribución de la inmunotinción; con menor inmunopositividad en corteza que en médula.

- Al igual que en los

Grupos De Bienestar Animal, Con Y Sin Melatonina, la inmunoreacción no varió al considerar el factor día/noche.

En El Grupo De Estrés Animal Con Melatonina

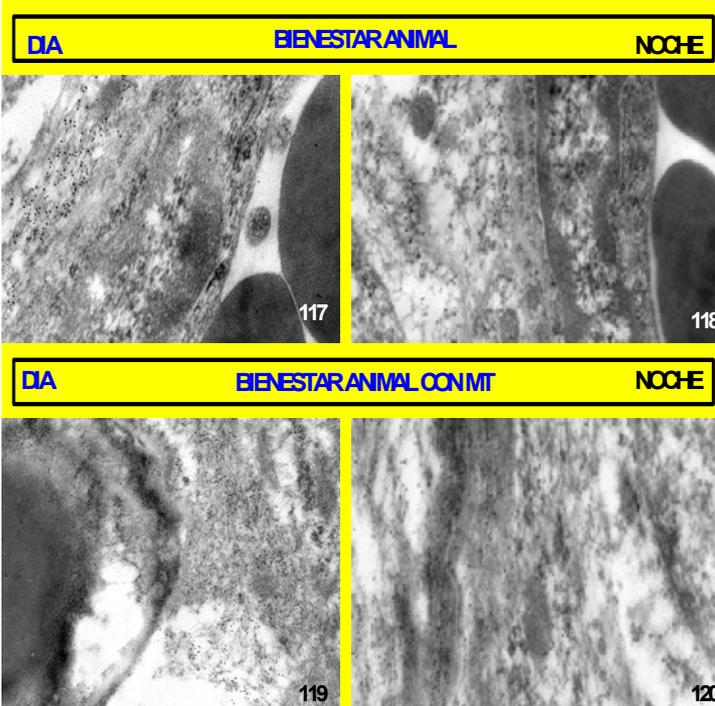
Se inició una recuperación de los parámetros de distribución, localización e intensidad de la inmunoreacción a la *synaptophysin*, acercándose a los referenciados para el **Grupo De Bienestar Animal** (Fig. 116): menor intensidad de marcaje en corteza, igualdad de inmunotinción en el día y la noche e inmunopositividad en los procesos pinealocíticos intersticiales.



MARCADORES DE CELULAS INTERSTICIALES: PROTEINA GLIAL FIBRILAR ACIDA (GFAP)

Las células GFAP inmunoro positivas fueron observadas en las pineales de los cuatro grupos de edades analizados: **Bienestar Animal; Bienestar Animal Con Melatonina; Estrés Animal; Estrés Animal Con Melatonina.** Dichas células evidenciaron una morfología similar a la expresada ultraestructuralmente por las células intersticiales. Se localizaban adyacentes a los vasos sanguíneos; y presentaban un núcleo ovoide no inmunoteñido, y un citoplasma inmunomarcado con clara afinidad por los microfilamentos de los procesos citoplasmáticos. Los pinealocitos adyacentes resultaron inmunonegativos.

Estas células inmunomarcadas, en todos los grupos experimentales, se distribuían uniformemente por toda la superficie glandular; con localización perivascular. En ninguno de los cuatro supuestos experimentales se evidenció

IMUNOMARCAJE DE C. INTERSTICIALES CON GFAP

diferencias de inmunomarcaje, al considerar el factor día/noche.

La inmunoreactividad a la GFAP en el **Grupo De Bienestar Animal** fue moderada (Fig. 117 y 118); y de similar intensidad y localización a la detectada en el **Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina**, donde aparecían cluster de células GFAP positivas en

la vecindad de los vasos sanguíneos (Fig. 119 y 120).

En el **Grupo De Estrés Animal** los somas y procesos citoplasmáticos GFAP positivas, fueron claramente menos numerosos que en los **Grupos De Bienestar Animal** (Fig. 121). No se observaron diferencias en la distribución y localización de células inmunoteñidas con respecto a los grupos previos.

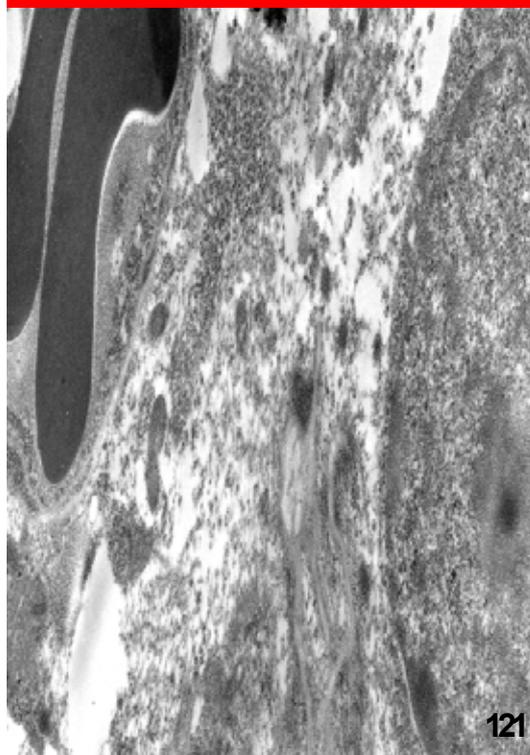
En el **Grupo de Estrés Animal con Melatonina** la reacción positiva a la GFAP evidenció una gran similitud (Fig. 122), a la referida para el **Grupo De Bienestar Animal**:

- Células de morfología estrellada con amplios somas y largos procesos citoplasmáticos.
- Distribución por todo el parénquima pineal.
- Localización perivascular.

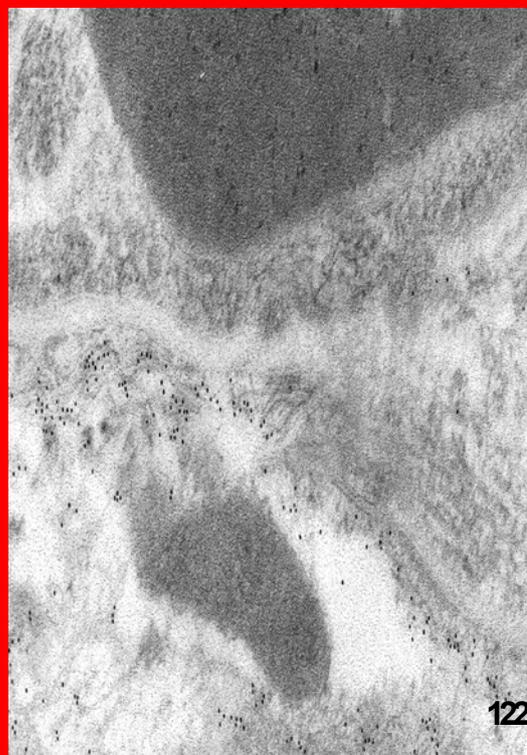
INMUNOMARCAJE DE C. INTERSTICIALES CON GFAP

ESTRES ANIMAL

ESTRES ANIMAL CON MT



121



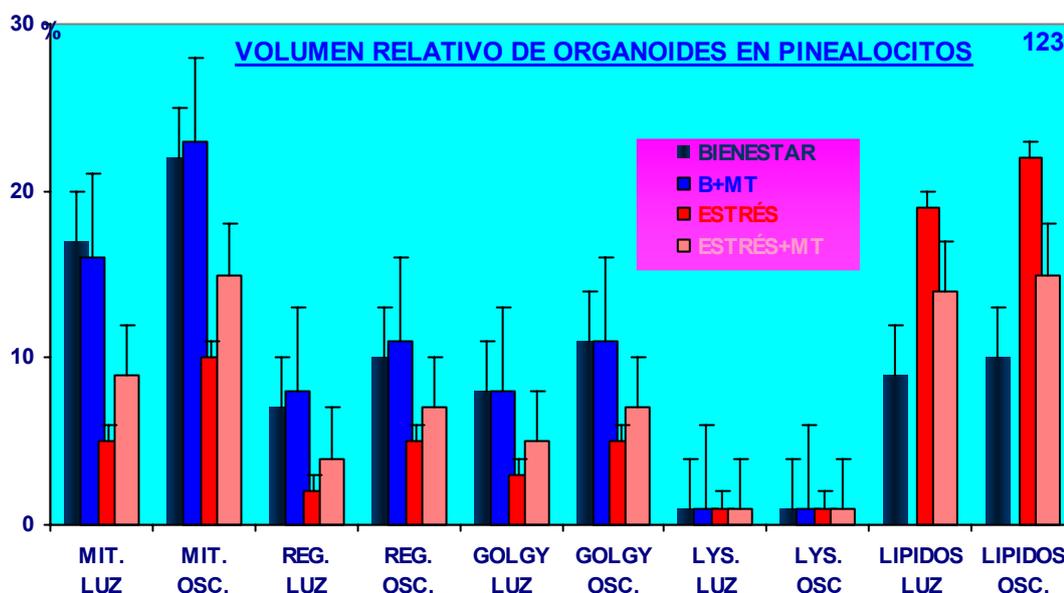
122

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL CUANTITATIVO DE LA GLANDULA PINEAL®

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL CUANTITATIVO DE ORGANOIDES CITOPLASMÁTICOS EN PINEALOCITOS.

MITOCONDRIAS

El volumen relativo de las mitocondrias de los pinealocitos del **Grupo De Bienestar Animal** fue significativamente mayor que el volumen mitocondrial en ambos **Grupos De Estrés Animal** (F= 13.2, Tuckey test: P< 0.0002 y F= 11.3, Tuckey test: P< 0.0003, respectivamente). Entre los **Grupos De Bienestar Animal**, no hubo diferencias significativas en el volumen relativo mitocondrial. Si las hubo entre los **Grupos De Estrés Animal Y Estrés Animal Con Melatonina** (F= 12.2, Tuckey test: P< 0.004). Dichos volúmenes fueron mayores en los animales sacrificados en el periodo de oscuridad que en el periodo de luz (F= 16.2, Tuckey test: P< 0.0001; F= 17.3, Tuckey test: P< 0.0003; F= 15.7 Tuckey test: P< 0.0002 y F= 16.9,



Tuckey test: P< 0.0002, para cada uno de los cuatro grupos experimentales contemplados, respectivamente) (Tabla 8; Fig.123).

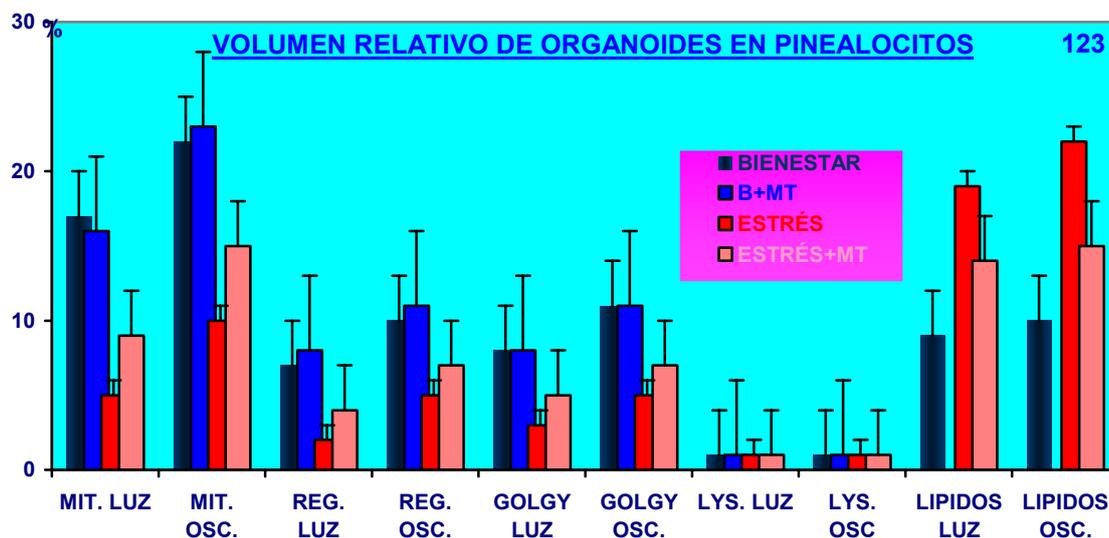
RETICULO ENDOPLASMICO GRANULAR

El comportamiento del volumen relativo del retículo endoplásmico granular fue similar al de las mitocondrias, variando únicamente los niveles de significación estadística.

Grupo De Bienestar Animal versus ambos **Grupos De Estrés Animal** ($F= 15.2$, Tuckey test: $P < 0.0001$ y $F= 12.3$, Tuckey test: $P < 0.0001$, respectivamente). Entre los **Grupos De Bienestar Animal**, no hubo diferencias significativas. **El Grupos De Estrés Animal** versus el **Grupo de Estrés Animal Con Melatonina** ($F= 12.5$, Tuckey test: $P < 0.005$). El periodo de oscuridad versus el periodo de luz ($F= 17.2$, Tuckey test: $P < 0.0002$; $F= 16.3$, Tuckey test: $P < 0.0002$; $F= 15.9$ Tuckey test: $P < 0.0001$ y $F= 15.3$, Tuckey test: $P < 0.0002$, para cada uno de los cuatro grupos experimentales contemplados, respectivamente). (Tabla 8; Fig.123).

COMPLEJO DE GOLGI.

En lo referente al volumen relativo del complejo de Golgi, encontramos tan sólo variaciones en los niveles de significación, respecto a lo referenciado para el volumen relativo de mitocondrias y de retículo endoplásmico granular.



Grupo De Bienestar Animal frente ambos **Grupos De Estrés Animal** ($F= 17.3$, Tuckey test: $P < 0.0003$ y $F= 14.9$, Tuckey test: $P < 0.0003$, respectivamente). Entre los **Grupos De Bienestar Animal**, no hubo diferencias

significativas. **El Grupos De Estrés Animal** frente al **Grupo de Estrés Animal Con Melatonina** ($F= 14.4$, Tuckey test: $P< 0.003$). El periodo de oscuridad frente al periodo de luz ($F= 18.3$, Tuckey test: $P< 0.0002$; $F= 17.3$, Tuckey test: $P< 0.0001$; $F= 16.9$ Tuckey test: $P< 0.0002$ y $F= 15.9$, Tuckey test: $P< 0.0002$, para cada uno de los cuatro grupos experimentales contemplados, respectivamente). (Tabla 8; Fig.123).

LISOSOMAS

Los lisosomas no evidenciaron diferencias significativas en su volumen relativo. (Tabla 8; Fig.123).

LIPOSOMAS

El volumen relativo de las gotas lipídicas del **Grupo De Bienestar Animal** fue significativamente menor que en ambos **Grupos De Estrés Animal** ($F= 11.3$, Tuckey test: $P< 0.0001$ y $F= 11.8$, Tuckey test: $P< 0.0003$, respectivamente). Entre los **Grupos De Bienestar Animal**, y entre los **Grupos De Estrés Animal Y Estrés Animal Con Melatonina** no hubo diferencias significativas. Tampoco hubo diferencias significativas al considerar el factor luz/oscuridad. (Tabla 8; Fig.123).

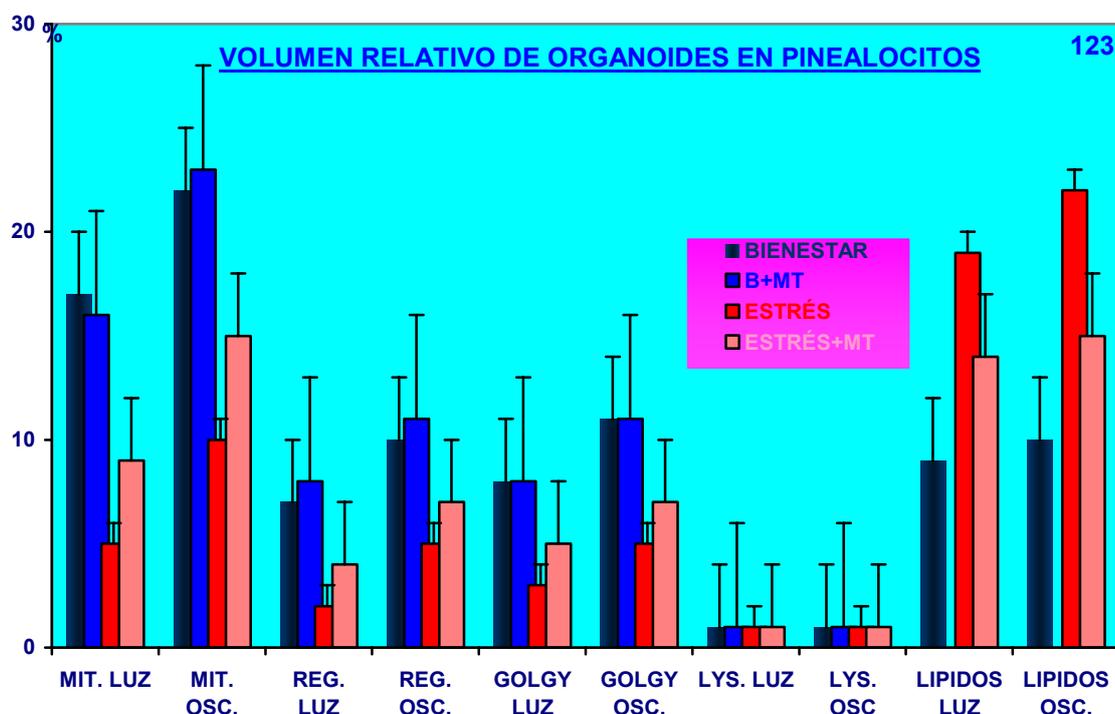


Tabla 8: Volumen Relativo De Organoides Celulares En Pinealocitos

		BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR CON MT		ESTRÉS ANIMAL		ESTRÉS CON MT	
		FOTOPERIODOS LARGOS Y CORTOS (LP Y SP) ‡							
		LUZ	OSCU	LUZ	OSCU	LUZ	OSC	LUZ	OSCU
		PORCENTAJE DE ORGANOIDES EN CITOPLASMATICOS DE PINEALOCITOS							
VOLUMEN RELATIVO %	MITOCONDRIAS	17±4	22±4	16±3	23±4	5±2	10±3	9±3	15±4
	Signif. Estadística	bde	de	bde	de	abce	ace	abcd	acd
	R.E.G.	7±2	10±2	8±3	11±3	2±1	5±2	4±2	7±2
	Signif. Estadística	bde	de	bde	de	abce	abce	abcd	abcd
	C. GOLGI	8.5±1	11.5±2	8.5±2	11±2	3±1	5±1	5±1.5	7±0.5
	Signif. Estadística	bde	de	bde	de	abce	ace	abcd	acd
LISOSOMAS	1.3±0.3	1.2±0.2	1.1±0.2	1.2±0.3	1.3±0.1	1.4±0.2	1.3±0.1	1.4±0.2	
Signif. Estadística									
LIPOSOMAS	9±2	10±2	8.5±2	10.5±2	19±3	22±2	14±3	15±2	
Signif. Estadística	de	de	de	de	ace	ace	acd	acd	

○ a p< 0,05 versus grupo de bienestar animal con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ b p< 0,05 versus oscuridad.
 ○ c p< 0,05 versus grupo de bienestar animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ d p< 0,05 versus grupo de estrés inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 ○ e p< 0,05 versus grupo de estrés inducido con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
 • dentro de cada grupo se comparó el periodo de luz con el de oscuridad.

La comparación entre grupos se realizó comparando el periodo de luz con el de luz, y el de oscuridad con el de oscuridad.

‡ No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados.

HIBRIDACION IN SITU PARA EL ARN_m DE LOS B₁ ADRENORECEPTORES EN LOS PINEALOCITOS[®]

LOCALIZACIÓN POR ISH Y CUANTIFICACION DEL ARN_m DE LOS B₁ ADRENORECEPTORES EN LA MEMBRANA DE LOS PINEALOCITOS.

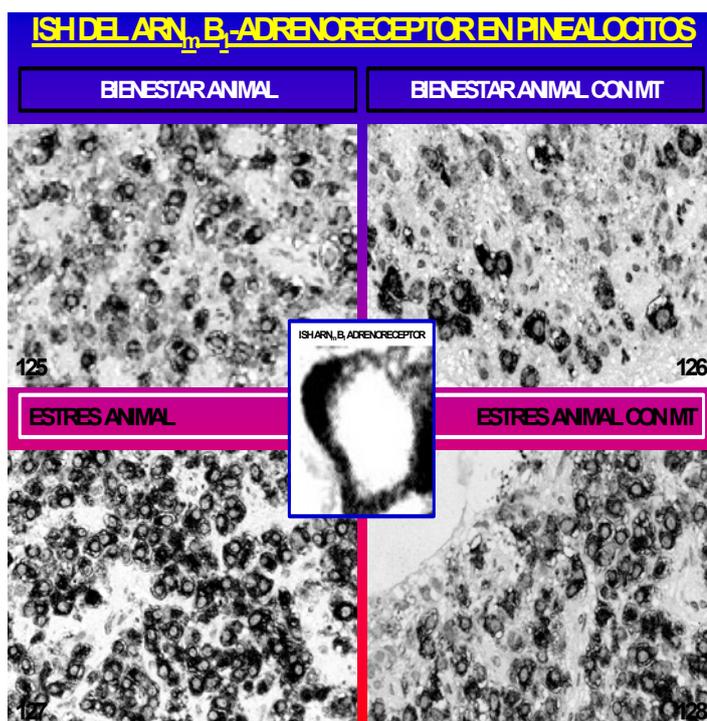
En los cuatro grupos experimentales analizados, todas las pineales exhibían señales de hibridación positiva para el ARN_m de B₁-Adrenoreceptor. Las señales de hibridación se localizaban en la periferia de los pinealocitos; las células intersticiales adyacentes resultaron negativas. La cuantificación de la expresión del ARN_m B₁- Adrenoreceptor evidenció diferencias individuales (la señal de hibridación variaba considerablemente entre pinealocitos de la misma glándula) y diferencias entre grupos. En los cuatro grupos experimentales, los ciclos de luz/oscuridad influyeron en la presencia de señales de hibridación para el ARN_m B₁-Adrenoreceptor. De modo genérico, para todos los grupos experimentales, durante la noche hubo mayor señal de hibridación que durante el día.

Las señales de hibridación en los cuatro grupos experimentales para el

ARN_m B₁-Adrenoreceptor se expresaron cualitativamente de la siguiente manera:

Grupo de Bienestar Animal: señal normal; moderada (Fig. 124).

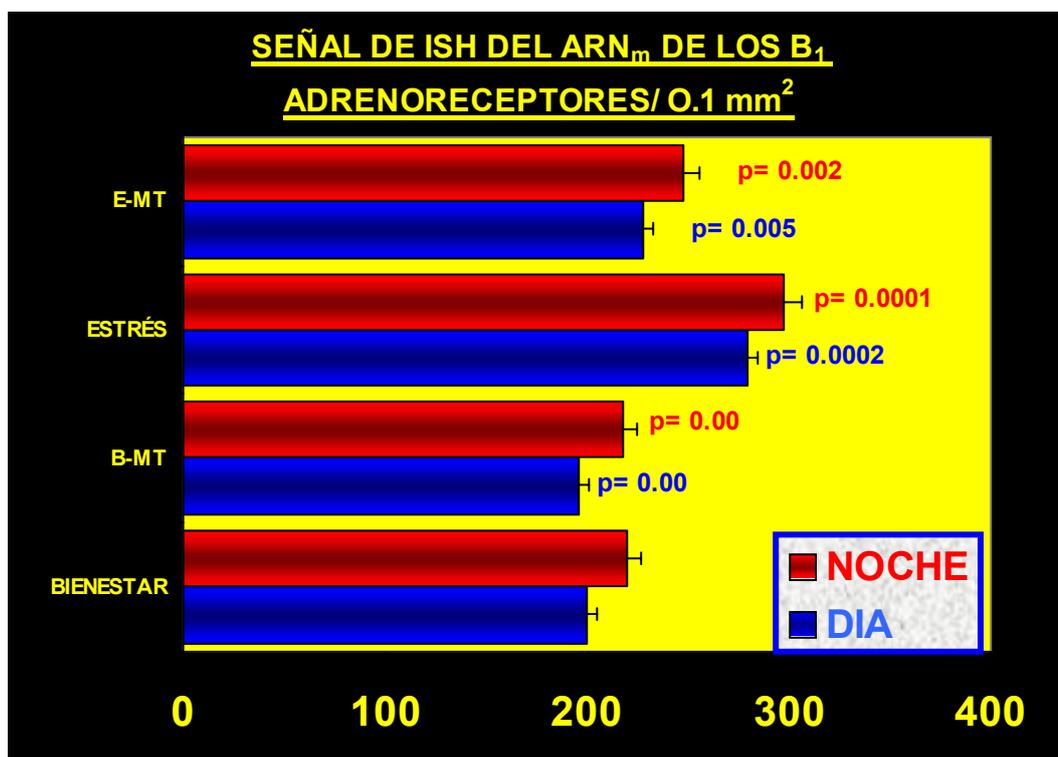
Grupo de Bienestar Animal con Melatonina: señal normal-moderada (Fig. 125).



Grupo de Estrés Animal: señal muy abundante (Fig. 126).

Grupo de Estrés Animal con Melatonina: señal abundante (Fig. 127).

La cuantificación de la expresión del ARN_m B₁-Adrenoreceptor en la membrana de los pinealocitos, expresada en la **Figura 128:**



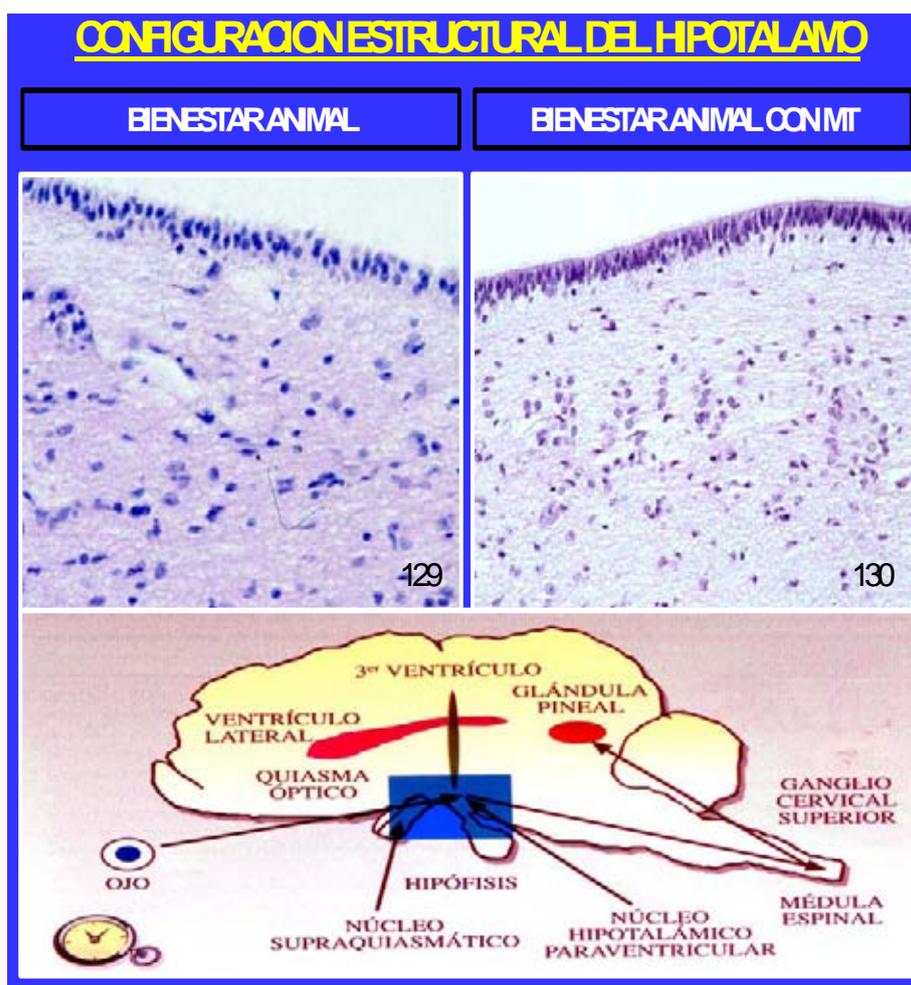
arrojó los siguientes resultados:

Grupo De Bienestar Animal: 201±13; 220±15, para el día y la noche.

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: 196±12; 218±14, para el día y la noche.

Grupo De Estrés Animal: 280 ±13 ; 298±11, para el día y la noche.

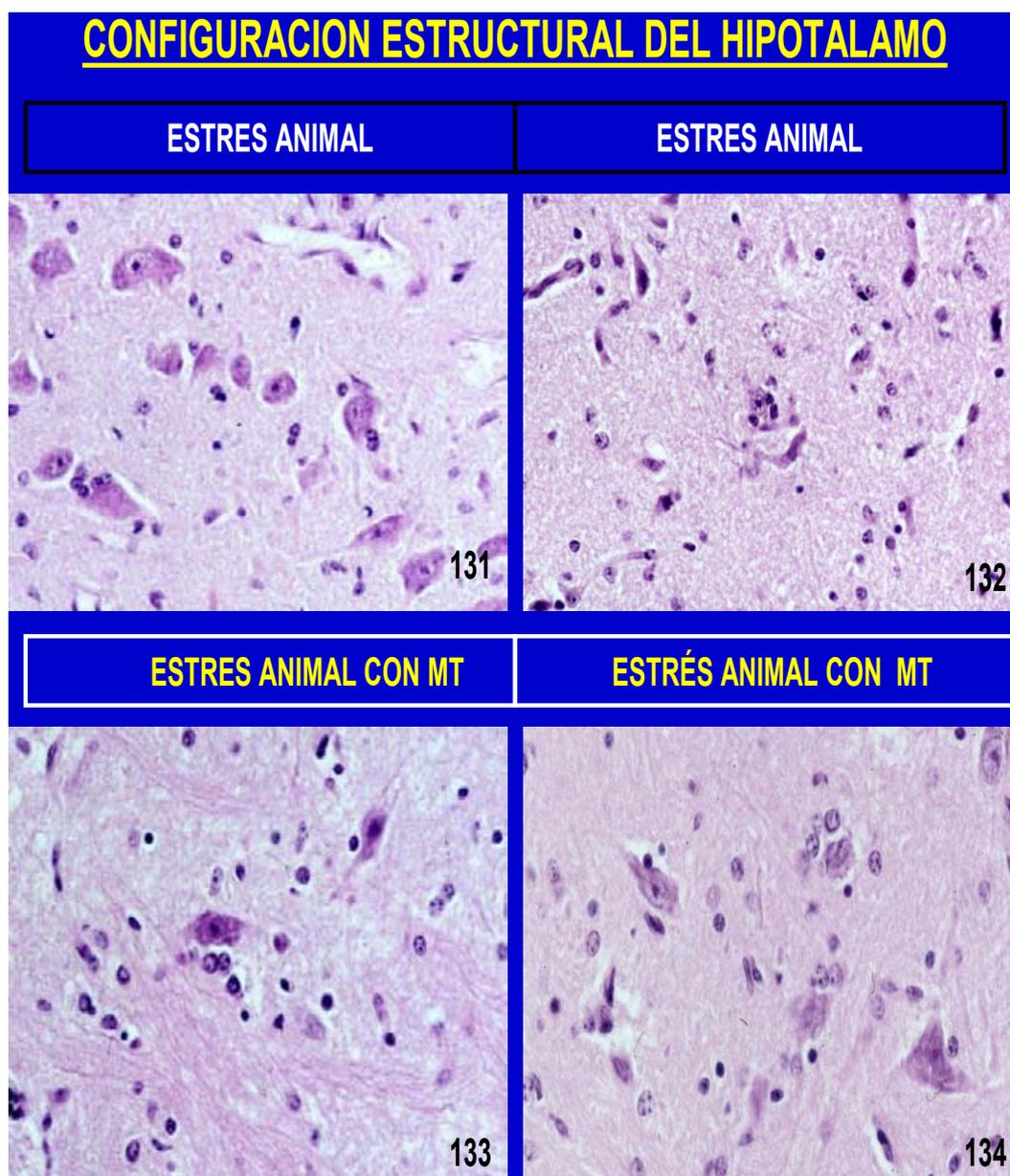
Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: 228±15. ; 248±13, para el día y la noche.

CONFIGURACION ESTRUCTURAL DE LOS NSQ DEL HIPOTALAMO®**CONFIGURACION ESTRUCTURAL DE LOS NSQ DEL HIPOTALAMO**

En todos los grupos experimentales analizados, el factor día/noche no influyó en la configuración estructural de los NSQ del hipotálamo.

En el **Grupo De Bienestar Animal** el hipotálamo evidenció un epitelio delimitante (pseudoestratificado y ciliado), correspondiente a la pared del III ventrículo. El parénquima nervioso mostró normalidad en cuanto a número, tamaño, morfología, distribución y localización, tanto en neuronas como en células de la glía (Fig. 129). **El Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina** no mostró diferencias morfológicas respecto al grupo anterior (Fig. 130).

El Grupo De Estrés Animal presentaba signos de degeneración neuronal con moderada movilización de células de glía, y fenómenos de satelitosis y neuronofagia (Fig. 131-132).

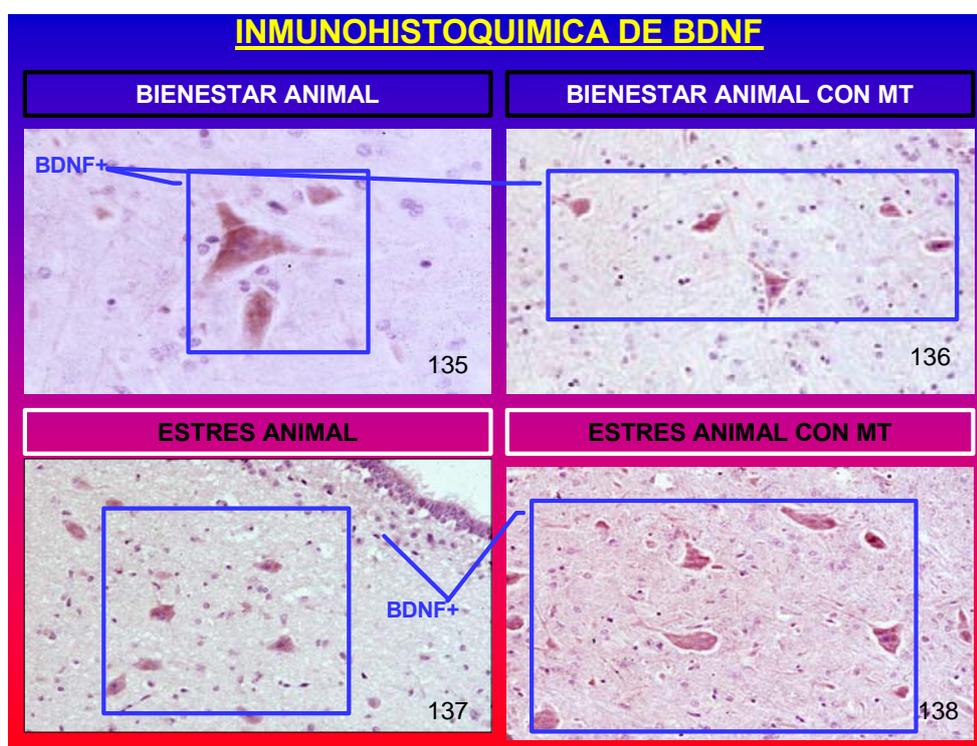


El Grupo De Estrés Animal Con Melatonina exhibía tan solo diferencias cuantitativas respecto al **Grupo De Estrés Inducido**; de tal modo que la movilización de glía y la satelitosis estuvieron menos presentes, siendo un hallazgo ocasional la presencia de neuronofagia (Fig. 133-134).

ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO DE LOS NSQ DEL HIPOTALAMO®**INMUNODETECCIÓN ESTRUCTURAL DE MARCADORES ESPECÍFICOS DE NEUROTROFINAS Y PROTEÍNAS DE GOLPE DE CALOR EN LOS NSQ DEL HIPOTÁLAMO.****FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF)**

En los cuatro grupos experimentales analizados todas los hipotálamos exhibían inmunoreacción para el BDNF. La inmunotinción interesaba al pericarion y prolongaciones neuronales, no afectando al núcleo. Las células de la glía adyacentes resultaron negativas.

La reacción inmunohistoquímica en los cuatro grupos experimentales para el BDNF se expresó cualitativamente de la siguiente manera:



Grupo De Bienestar Animal: inmunopositividad moderada (Fig. 135).

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: inmunopositividad aumentada (Fig. 136).

Grupo De Estrés Animal: inmunopositividad abundante (Fig. 137).

Grupo de Estrés Animal con Melatonina: inmunopositividad muy abundante (Fig. 138).

Los ciclos de luz/oscuridad influyeron en la inmunoreacción para BDNF; de tal modo que la inmunotinción de día fue significativamente mayor que durante la noche. La cuantificación de la expresión inmunohistoquímica del BDNF (Fig. 139) en las neuronas hipotalámicas (sobre una superficie de referencia de 0.1mm^2) arrojó los siguientes resultados, para el día y la noche, respectivamente:

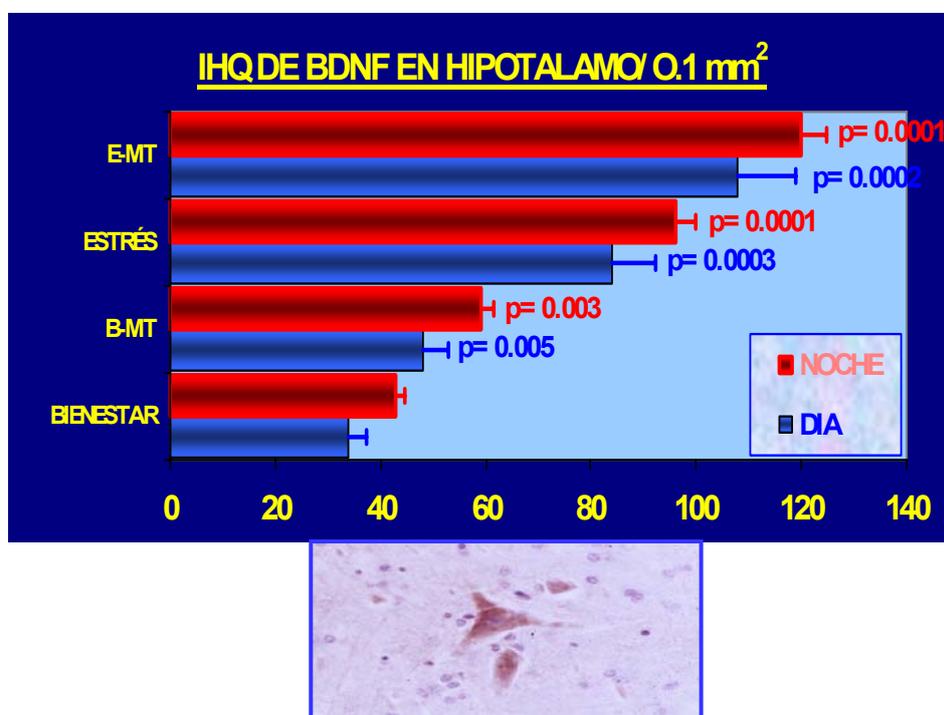
Grupo De Bienestar Animal: 34 ± 3 ; 43 ± 4

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: 48 ± 42 ; 59 ± 5

Grupo De Estrés Animal: 84 ± 5 ; 96 ± 7

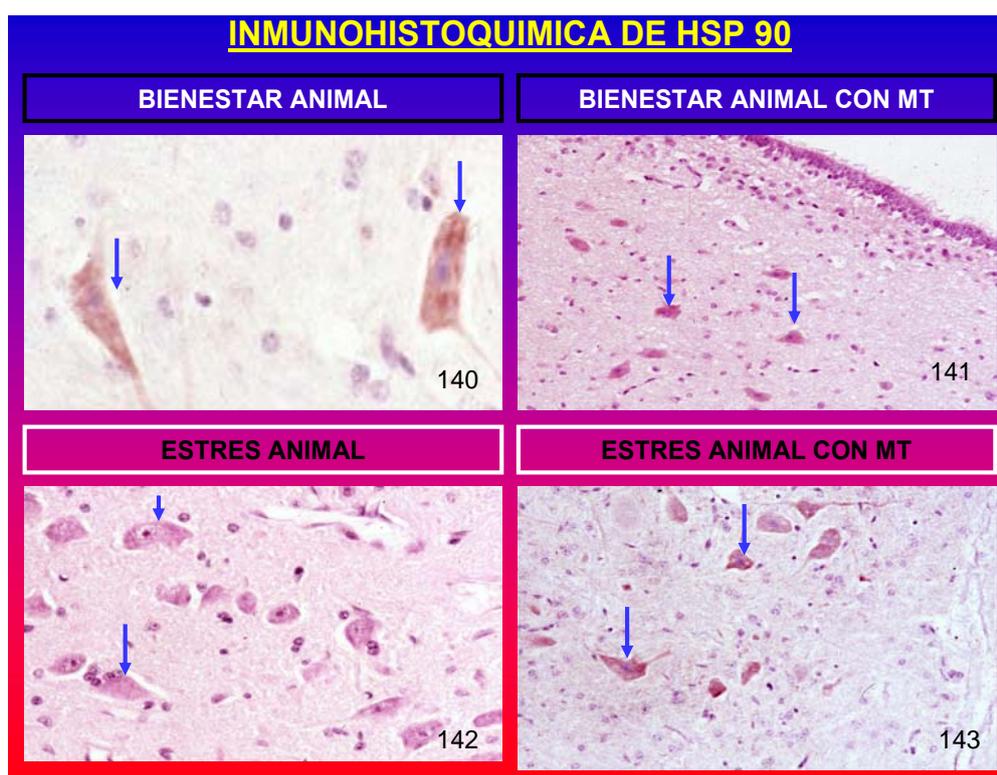
Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: 108 ± 6 ; 120 ± 8 .

FIG. 139: CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL BDNF EN LAS NEURONAS HIPOTALÁMICAS



PROTEINA DE GOLPE DE CALOR HSP 90

En los cuatro grupos experimentales analizados todas los hipotálamos exhibían inmunoreacción para la HSP 90. La inmunotinción interesaba al pericarion y prolongaciones neuronales, no afectando al núcleo. Las células de la glía adyacentes resultaron negativas.



La inmunopositividad en los cuatro grupos experimentales para el HSP 90 se expresó cualitativamente de la siguiente manera:

Grupo De Bienestar Animal: inmunoreacción moderada (Fig. 140).

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: inmunoreacción aumentada (Fig. 141).

Grupo De Estrés Animal: inmunoreacción abundante (Fig. 142).

Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: inmunoreacción muy abundante (Fig. 143).

En todos los grupos experimentales analizados, la inmunoreacción fue mayor durante la noche que durante el día.

La cuantificación de la reacción inmunohistoquímica de la HSP 90 (Fig. 144) en las neuronas hipotalámicas (sobre una superficie de referencia de 0.1mm²) provocó los siguientes resultados, para el día y la noche, respectivamente:

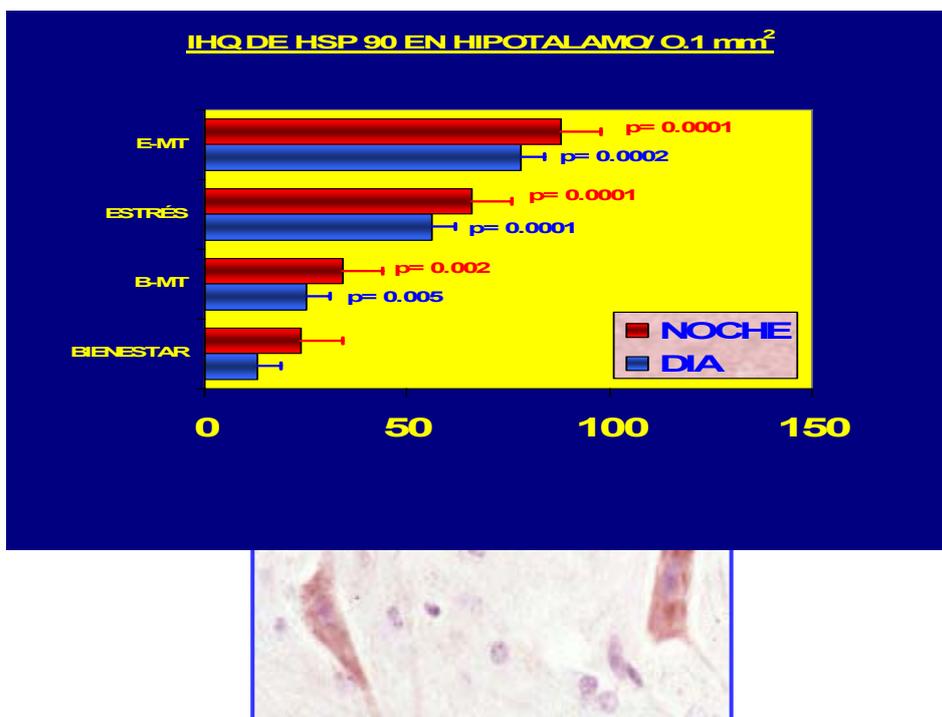
Grupo De Bienestar Animal: 13 ± 3; 24 ± 4.

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: 25 ± 5; 24 ± 4.

Grupo De Estrés Animal: 56 ± 5; 24 ± 4.

Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: 78 ± 6; 24 ± 4.

FIG 144: CUANTIFICACIÓN DE LA REACCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA HSP 90 EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS.



INMUNOHISTOQUIMICA PARA LOS MT₁ EN LOS NUCLEOS SUPRAQUIASMATICOS DEL HIPOTALAMO[®]

DETERMINACION INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS RECEPTORES DE MELATONIA (MT₁) EN LAS NEURONAS DE NUCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS DEL HIPOTÁLAMO.

Las neuronas de los NSQ exhibían señales de inmunoreacción para los receptores de melatonina (MT₁) en los cuatro grupos experimentales analizados. La inmunotinción interesaba fundamentalmente al pericarium neuronal y de una manera más manifiesta en la periferia de las neuronas. Las células de la glía adyacentes no evidenciaron inmunopositividad.

Las reacción inmunohistoquímica en los cuatro grupos experimentales para los receptores de melatonina (MT₁) se expresó cualitativamente de la siguiente manera:

Grupo de Bienestar Animal:

inmunotinción normal; moderada (Fig. 145).

Grupo de Bienestar Animal con Melatonina:

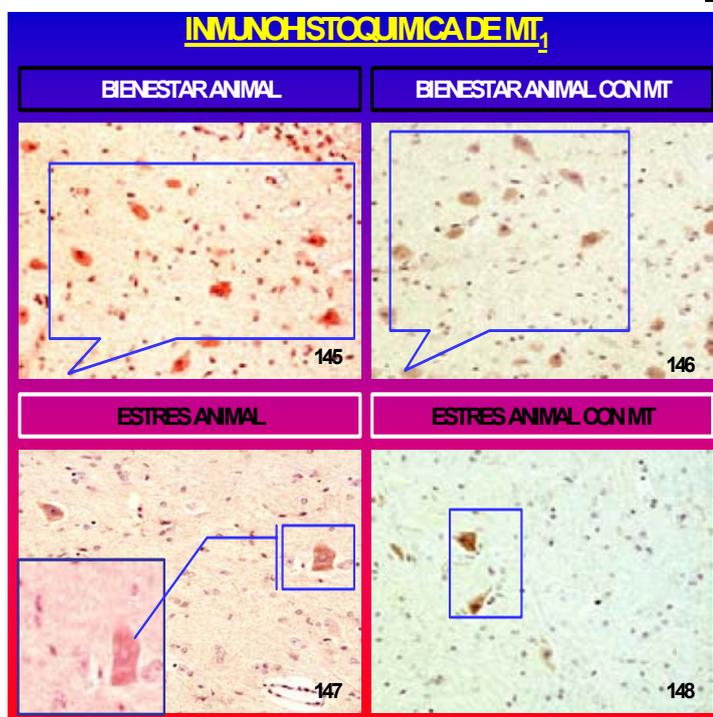
inmunotinción normal-moderada (Fig. 146).

Grupo de Estrés Animal:

inmunotinción escasa (Fig. 147).

Grupo de Estrés Animal con Melatonina:

inmunotinción escasa-moderada (Fig. 148).



Para todos los grupos experimentales, la reacción inmunohistoquímica para los receptores MT₁, fue mayor durante la noche que durante el día.

En la Figura 149 se expresa la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica para MT₁ de las neuronas de los NSQ (sobre una superficie de referencia de 0.1mm²). Dicha configuración arrojó los siguientes resultados:

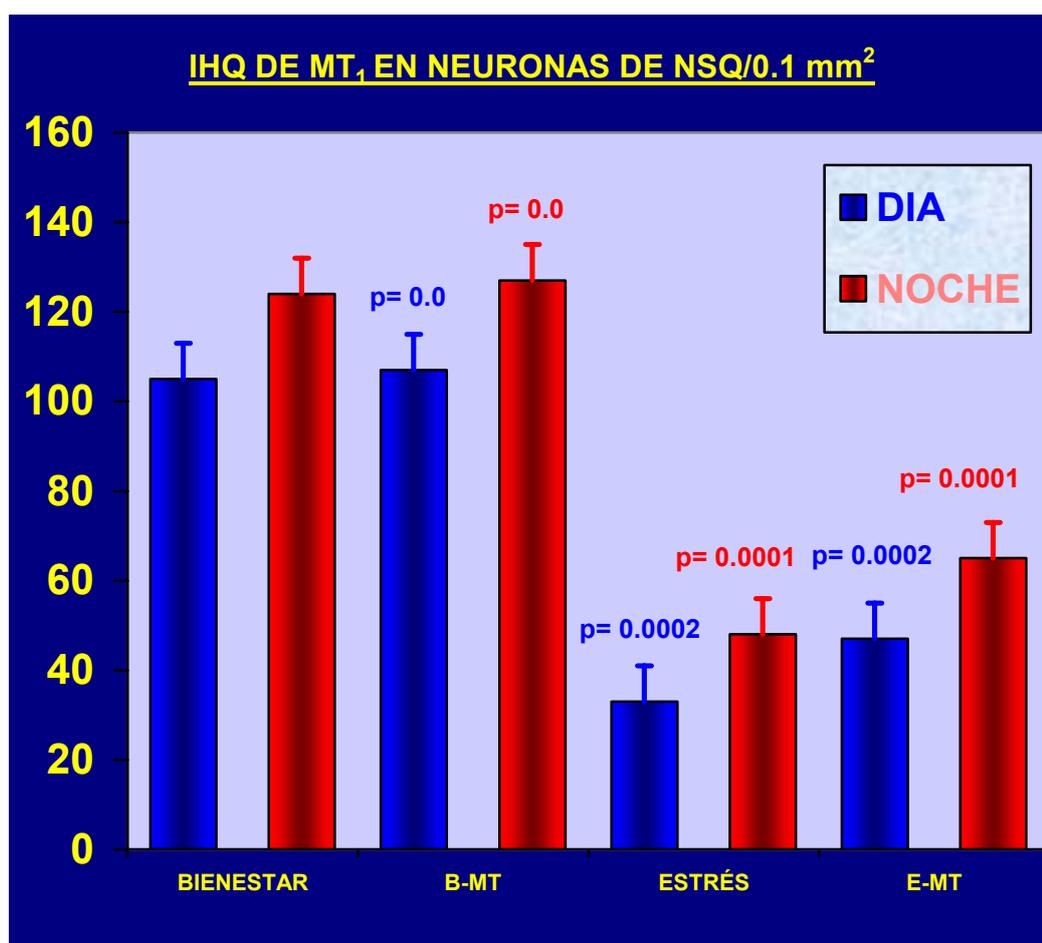
Grupo De Bienestar Animal: 105 ± 14; 124 ± 6.

Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina: 107 ± 11; 127 ± 14.

Grupo De Estrés Animal: 33 ± 6; 48 ± 7.

Grupo De Estrés Animal Con Melatonina: 47 ± 7; 65 ± 6.

FIGURA 149: CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MT₁ DE LAS NEURONAS DE LOS NSQ



**DETERMINACIÓN POR RIA DE LAS CONCENTRACIONES
DE CORTICOSTERONA[®]**

**DETERMINACION POR RADIO-INMUNOENSAYO DE LAS
CONCENTRACIONES SERICAS DE CORTICOSTERONA.**

Las concentraciones séricas de corticosterona en los distintos grupos experimentales aparecen reflejadas en la tabla 9.

Las concentraciones en el **Grupo De Bienestar Animal** fueron significativamente menores que las concentraciones en ambos **Grupos De Estrés Animal** (F= 17.3, Tuckey test: P< 0.0003 y F= 13.3, Tuckey test: P< 0.0001, respectivamente). Entre los **Grupos De Bienestar Animal**, no hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas de corticosterona. Si las hubo entre los **Grupos De Estrés Animal Y Estrés Animal Con Melatonina** (F= 9.3, Tuckey test: P< 0.005). Dichas concentraciones fueron menores en los animales sacrificados en el periodo de oscuridad que en el periodo de luz (F= 17.3, Tuckey test: P< 0.0002; F= 18.4, Tuckey test: P< 0.0001; F= 16.6 Tuckey test: P< 0.0001 y F= 17.1, Tuckey test: P< 0.0002, para cada uno de los cuatro grupos experimentales contemplados, respectivamente) (Tabla 9; Fig.150).

**Tabla 9: Resultados De Las Concentraciones Séricas De Corticosterona
Y Análisis De Datos Obtenidos**

CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL	BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
	← LP	SP	LP	SP	LP	SP	LP	SP [‡]
	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.
Niveles séricos Corticosterona ng/ml	36±4 ^{bde}	26±3 ^{de}	42±3 ^{bde}	30±5 ^{de}	75±6 ^{abce}	63±6 ^{ace}	62±5 ^{abcd}	51±4 ^{acd}
Niveles relativos	NORMAL ++		NORMAL ++		MUY AUMENTADO +++		AUMENTADO ++	

o a p< 0,05 versus grupo de bienestar animal con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

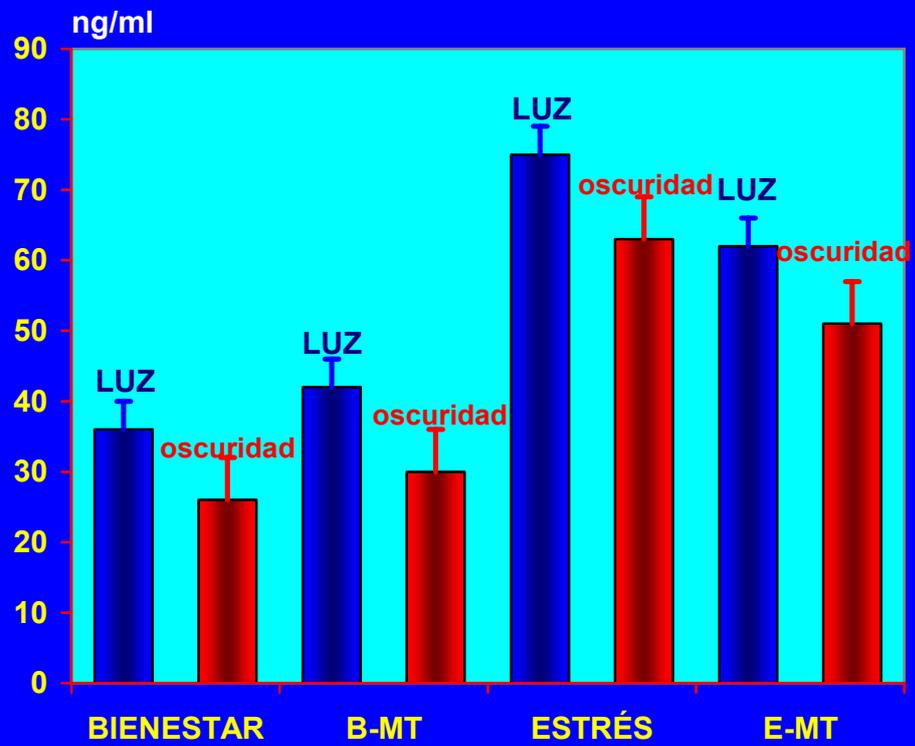
o b p< 0,05 versus oscuridad.

o c p< 0,05 versus grupo de bienestar animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

o d p< 0,05 versus grupo de estrés inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

e p< 0,05 versus grupo de estrés inducido con melatonina en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.

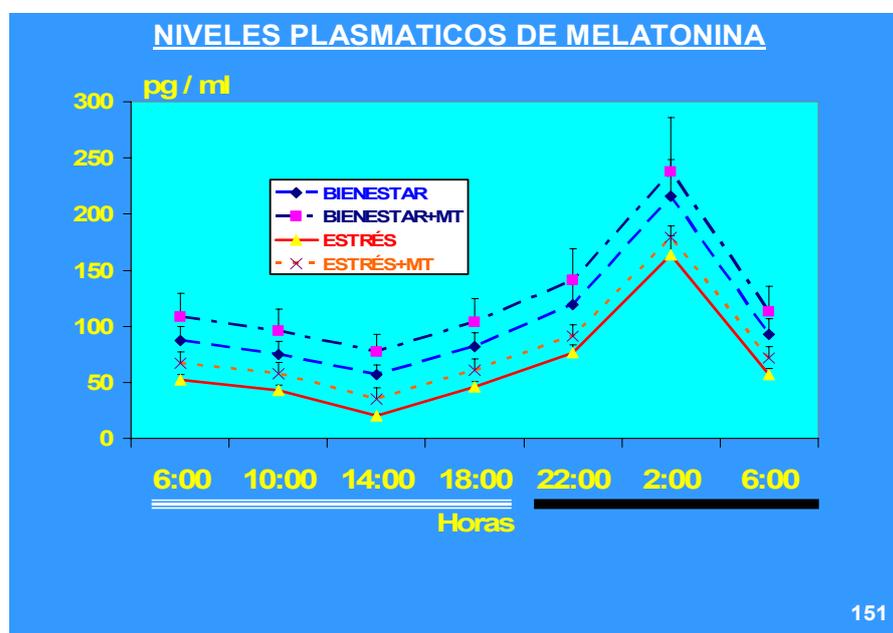
[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para todos y cada uno de los parámetros analizados mediante RIA.

FIGURA 150: NIVELES SERICOS DE CORTICOSTERONA

DETERMINACIÓN POR RIA DE LAS CONCENTRACIONES DE MELATONINA®

DETERMINACION POR RADIO-INMUNOENSAYO DE LAS CONCENTRACIONES SERICAS DE MELATONINA.

Las concentraciones plasmáticas de melatonina en los distintos grupos experimentales aparecen reflejadas en la tabla 10 y la figura 150-1.



Dentro de cada uno de los cuatro grupos experimentales analizados, las concentraciones plasmáticas de melatonina variaron significativamente en todas las horas analizadas, con la excepción de las 6:00 y las 18:00 (Tabla 9; Fig. 151).

En todas las horas analizadas*Las concentraciones en el **Grupo De Bienestar Animal** fueron significativamente diferentes a las concentraciones en el **Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina** ($F= 13.7$, Tuckey test: $P < 0.0002$; $F= 12.9$, Tuckey test: $P < 0.0004$, para las 14 y 02 horas,

* Se expresa el nivel de significación de las 14 y las 02 horas, mitad de los periodos de luz y oscuridad respectivamente.

respectivamente); y también diferentes a las de ambos **Grupos De Estrés Animal** (F= 15.8, Tuckey test: P< 0.0002; F= 15.4, Tuckey test: P< 0.0002; F= 13.3, Tuckey test: P< 0.0001; F= 13.7, Tuckey test: P< 0.0002, para las 14 y 02 horas, respectivamente. El análisis de varianza mostró una disminución significativa de las concentraciones de melatonina en el **Grupos De Estrés Animal** frente al de **Estrés Animal Con Melatonina** (F= 11.9, Tuckey test: P< 0.004; F= 12.2, Tuckey test: P< 0.003, para las 14 y las 02 horas, respectivamente).

Por otro lado para todos, los grupos analizados, la media de las concentraciones plasmáticas de melatonina fue descendiendo desde las 06:00 hasta las 14:00 horas, para a partir de las 18:00 comenzar a aumentar, incremento que continuaría hasta las 02:00horas, momento en que comenzaría a disminuir (Tabla 10; Fig.151).

Tabla 10: Resultados De Las Concentraciones Plasmáticas De Melatonina (pg/ml) Y Análisis De Datos Obtenidos

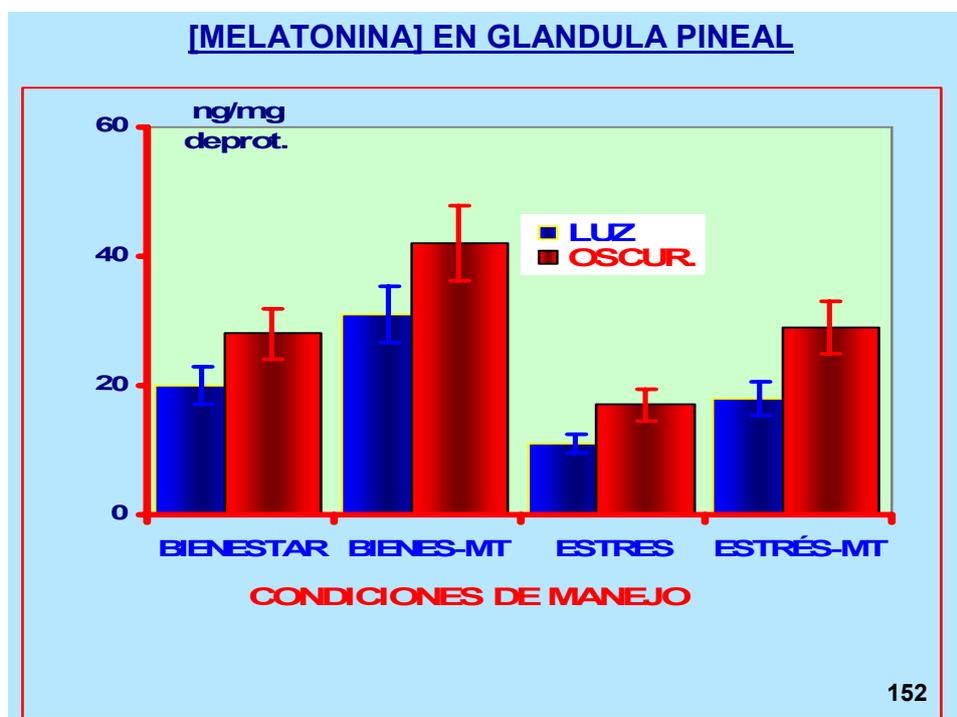
HORAS	06:00	10:00	14:00	18:00	22:00	02:00	06:00
BIENESTAR	87 ± 6	75 ± 6	57 ± 4	82 ± 8	119 ± 12	216 ± 15	93 ± 10
Sig. Estad.	cde	acde	acde	bcde	acde	acde	cde
BIENESTAR CON MT	108 ± 11	96 ± 8	77 ± 7	104 ± 10	141 ± 12	238 ± 14	113 ± 11
Sig. Estad.	bde	abde	abde	bde	abde	abde	bde
ESTRÉS	52 ± 4	43 ± 6	20 ± 3	46 ± 6	76 ± 8	164 ± 10	57 ± 5
Sig. Estad.	bce	abce	abce	bce	abce	abce	bce
ESTRES CON MT	67 ± 5	58 ± 4	35 ± 3	61 ± 6	91 ± 8	179 ± 14	72 ± 10
Sig. Estad.	bcd	abcd	abcd	bcd	abcd	abcd	bcd

- a p< 0,05 versus 06:00 en los grupos correspondientes.
- b p< 0,05 versus Grupos de Bienestar en las correspondientes horas.
- c p< 0,05 versus Grupo De Bienestar Animal Con MT en las correspondientes horas.
- d p< 0,05 versus Grupo De Estrés inducido en las correspondientes horas.
- e p< 0,05 versus Grupo De Estrés Inducido Con Melatonina en las correspondientes horas.

DETERMINACIÓN POR HPLC DE MELATONINA EN GLANDULA PINEAL[®]

DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO DE LOS CONTENIDOS DE MELATONINA EN GLANDULA PINEAL

Las concentraciones de melatonina en la glándula pineal[∪] de los distintos grupos experimentales aparecen reflejadas en la tabla 11 y la figura 152.



El contenido en melatonina de la pineal incrementó significativamente durante la noche en todos los grupos experimentales ($F= 8.7$, Tuckey test: $P< 0.0002$; $F= 9.4$, Tuckey test: $P< 0.0003$; $F= 7.2$, Tuckey test: $P< 0.0001$; y $F= 8.3$, Tuckey test: $P< 0.0002$, para los cuatro grupos analizados, respectivamente) (Tabla 11, Fig. 152).

[∪] Se expresaron en relación a los mg de proteína de la pineal determinados por el método de Lowry.

Las concentraciones de melatonina en las pineales del **Grupo De Bienestar Animal**, tanto en el día como en la noche, fueron significativamente diferentes a las del **Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina**, (F= 15.7, Tuckey test: P< 0.0001; F= 16.3, Tuckey test: P< 0.0002); y a las de ambos **Grupos De Estrés Animal** (F= 23.5, Tuckey test: P< 0.0003, F= 22.7, Tuckey test: P< 0.0002 ; y F= 19.8, Tuckey test: P< 0.0004, F= 18.7, Tuckey test: P< 0.0001, respectivamente, para el día y la noche). El análisis de varianza, mostró una disminución significativa, tanto a las 14 como a las 02 horas, de las concentraciones en pineal de melatonina en el **Grupos De Estrés Animal**, frente al de **Estrés Animal Con Melatonina** (F= 11.9, Tuckey test: P< 0.004; F= 13.7, Tuckey test: P< 0.003) (Tabla 11, Fig. 152).

Tabla 11: Resultados De Las Concentraciones De Melatonina (ng/mg de proteína) En Glándula Pineal Y Análisis De Datos Obtenidos.

CONDICIONES DE MANEJO EXPERIMENTAL	BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
	← LP	SP	LP	SP	LP	SP	LP	SP [‡]
	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.
[MELATONINA] EN LA PINEAL (ng/mg de prot.)	20±3 ^{abd}	28±4 ^{ad}	31±5 ^{bcde}	42±6 ^{cde}	11±2 ^{abce}	17±3 ^{ace}	18±4 ^{abd}	29±4 ^{ad}

- a p< 0,05 versus Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina en los correspondientes ciclos L/D.
- b p< 0,05 versus oscuridad.
- c p< 0,05 versus Grupo De Bienestar Animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
- d p< 0,05 versus Grupo De Estrés Inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
- e p< 0,05 versus Grupo De Estrés Inducido Con Melatonina en los correspondientes ciclos L/D.

[‡] No se tendrá en cuenta el factor fotoperiodo, ya que no se encontraron diferencias significativas, al considerar dicho factor, para las concentraciones de MT en glándula pineal.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS®

DETERMINACION POR NEFELOMETRIA OPTICA DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS

Los niveles séricos de inmunoglobulinas se reflejan en la tabla 12 y la figura 153.

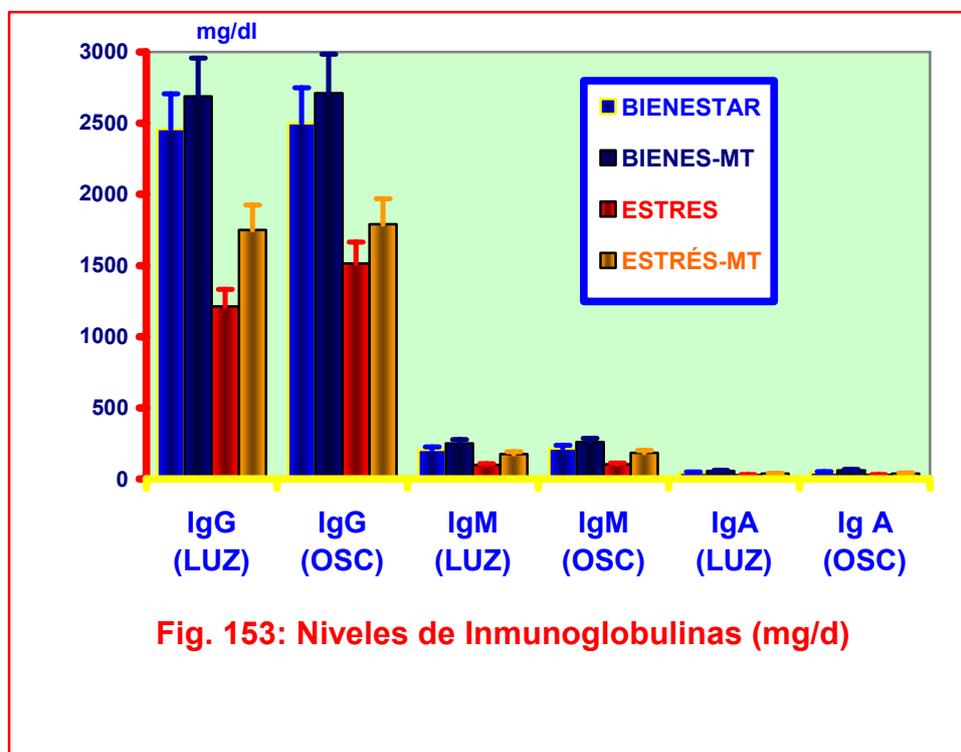


Fig. 153: Niveles de Inmunoglobulinas (mg/d)

No hubo diferencias significativas en los niveles séricos de IgG, IgM e IgA al considerar el factor luz/oscuridad, en todos los grupos experimentales.

Las concentraciones séricas de de IgG, IgM e IgA, en el **Grupo De Bienestar Animal** no evidenciaron diferencias significativas respecto a las del **Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina**.

Como expresan los factoriales del ANOVA Las concentraciones de Inmunoglobulinas en el suero de los animales del **Grupo De Bienestar Animal**

fueron significativamente diferentes a las de ambos **Grupos De Estrés Animal** (F= 23.7, Tuckey test: P< 0.0001; y F= 18.9, Tuckey test: P< 0.0003, respectivamente). El análisis de varianza, mostró una disminución significativa de las concentraciones séricas de inmunoglobulinas en el **Grupos De Estrés Animal**, frente al de **Estrés Animal Con Melatonina** (F= 13.5, Tuckey test: P< 0.003); y frente a las concentraciones pineales de melatonina en ambos **Grupos De Bienestar Animal** (F= 23.7, Tuckey test: P< 0.0001; F= 22.8, Tuckey test: P< 0.0001) (Tabla 12, Fig. 153).

Tabla 12: Resultados De Las Concentraciones Séricas De Inmunoglobulinas (mg/dl).

	BIENESTAR ANIMAL		BIENESTAR ANIMAL CON MELATONINA		ESTRÉS INDUCIDO		ESTRÉS INDUCIDO CON MELATONINA	
	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.	LUZ	OSCUR.
IgG	2460±250	2500±200	2689±300	2712±256	1212±310	1514±225	1750±198	1790±230
Sig. Est.	de	de	de	de	ace	ace	acde	acde
IgM	206±10	215±12	252±13	261±15	98±12	102±14	175±11	183±14
Sig. Est.	de	de	de	de	ace	ace	acde	acde
IgA	45±5	46±6	55±7	61±6	28±4	29±3	37±5	39±4
Sig. Est.	de	de	de	de	ace	ace	acde	acde

- a p< 0,05 versus Grupo De Bienestar Animal Con Melatonina en los correspondientes ciclos L/D.
- b p< 0,05 versus oscuridad.
- c p< 0,05 versus Grupo De Bienestar Animal en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
- d p< 0,05 versus Grupo De Estrés Inducido en los correspondientes ciclos de luz y oscuridad.
- e p< 0,05 versus Grupo De Estrés Inducido Con Melatonina en los correspondientes ciclos L/D.

DISCUSSION

ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS**ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS****RELACIONES ANATOMICAS**

No hubo diferencias en cuanto a configuración anatómica y topografía, en las pineales de los cuatro grupos experimentales contemplados. De acuerdo a las descripciones de **ANDERSON** (1965), y posteriormente reflejadas por nuestro grupo (**FRANCO Y COL.**, 1997; **REDONDO Y COL.**, 1996 a, b; 2001 a, b, c; 2003 a, b; **REGODON Y COL.**, 1998 a, b; 2001) la pineal de la oveja permanecía unida al diencéfalo por un corto tallo, y se situaba entre las comisuras habenular y posterior.

De acuerdo a la clasificación de **VOLLRATH** (1979; 1981) la glándula pineal ovina podría clasificarse *Tipo proximal (Tipo A): “gran parte del tejido proximal se sitúa en estrecha relación con el tercer ventrículo”*.

PESO GLANDULAR

Las glándulas más pesadas fueron las del grupo de bienestar animal con melatonina, con diferencias significativas respecto al resto de grupos. Del mismo modo, las pineales menos pesadas (grupo de estrés animal) mostraron diferencias significativas respecto al resto de grupos.

Variaciones en el peso de las pineales han sido descritas en rata (**WALKER Y COL.**, 1978), entre los 45 y los 180 días de vida postnatal; y en ovinos en edades fértil-puberales (**REDONDO Y COL.**, 2003 a,b). Las pineales de mayor y menor peso, fueron también las que evidenciaron concentraciones máximas y mínimas de melatonina. En ovinos, este hecho fue referenciado con anterioridad por **COON Y COL.**, 1999; y por **REDONDO Y COL.**, 2003 a,b.

LONGITUD GLANDULAR

Al igual que ocurría con el peso, las pineales de mayor y menor longitud fueron las del grupo de bienestar animal con melatonina y las del grupo de estrés animal, respectivamente. No hemos encontrado datos referenciales a la

longitud en pineales de ovinos sometidos a estrés. Todo lo referenciado se relaciona con la edad. Así en rata, **WALLACE Y COL.** 1969 y **CALVO Y BOYA**, 1984, reportaron incrementos de longitud entorno a los 60 y 180 días de vida postnatal, respectivamente. En ovinos, **REDONDO Y COL.**, 2003 a,b. referenciaban incrementos en la longitud pineal durante el desarrollo postnatal, que se iniciaban en edad prepuberal (1-6 meses); que se continuaban en la edad fértil puberal (24 meses); y que a partir de los 30 meses evidenciaban un estancamiento de dicho crecimiento.

PIGMENTACION GLANDULAR

La apariencia macroscópica de glándulas pigmentadas fue del 33%, en el grupo de bienestar animal y en las del grupo de estrés animal con melatonina, y de 16% en las de los grupo de bienestar animal con melatonina y las del grupo de estrés animal. Los únicos datos relativos al tema son los de **REGODON Y COL.**, 1998 a; **REDONDO Y COL.**, 2003 a,b, quienes reflejaban una disminución de la pigmentación pineal de ovinos en relación directa con el desarrollo de la vida prenatal y postnatal.

ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA GLANDULAR

En los cuatro supuestos experimentales contemplados la citología glandular estuvo integrada por pinealocitos, células intersticiales y células que contenían gránulos pigmentarios. Esta citología coincidía con lo reportado por **REDONDO Y COL.**, 2003 a, b, para el desarrollo postnatal de la pineal ovina.

Los pinealocitos en los grupos de bienestar animal con y sin melatonina, se evidenciaron, en cantidades, morfología y distribución, de forma similar a lo reportado en estudios de la glándula pineal ovina (**REGODON Y COL.**, 2001; **REDONDO Y COL.**, 2003 a,b). En el grupo de estrés animal se produjo una reducción de la densidad celular. No hemos encontrado datos referenciales en situaciones de estrés en ovinos; sin embargo, hemos de apuntar que, el estrés por inmovilización física en ratas (**GONZALEZ Y ALVAREZ-URIA**, 1981); por exposiciones al frío en hámster (**BUCANA Y COL.**, 1973); por exposiciones al calor en ratas (**ALVAREZ-URIA Y GONZALEZ**, 1981); y por cambios en la alimentación en *Microtus montanus* (**NEGUS Y BERGER**, 1971), producía

modificaciones en la expansión numérica de pinealocitos. En el grupo de estrés animal con melatonina se evidenciaba un intento de aproximación a la normalidad de de la glándula, con un incremento en el número de pinealocitos.

Las diferencias ultraestructurales evidenciadas en todos los grupos experimentales en los pinealocitos son probablemente, el resultado de diferentes estados funcionales del mismo tipo celular (**COZZI**, 1986; **REDONDO Y COL.**, 2003 a, b). En todos los grupos experimentales, aunque de manera más reducida en el grupo de estrés, hemos encontrado un tropismo vascular de los procesos citoplasmáticos de los pinealocitos. Esta afinidad, previamente señalada por **GARCIA-MAURIÑO Y BOYA**, 1992 a,b; **REDONDO Y COL**, 1996; 2003a,b; **REGODÓN Y COL.** 1998 a, unida a la presencia de vesículas secretorias en los bulbos terminales (**GARCIA-MAURIÑO Y BOYA**, 1992 a,b; **BOYA Y COL.**, 1995; **REDONDO Y COL.** 2003 a,b) y de uniones comunicantes tipo *gap junctions* (**CIECIURA Y KRAKOWSKI**,1991; **GARCIA-MAURIÑO Y BOYA**, 1992 a,b; **REDONDO Y COL**, 1996; 2003a,b), apoyaban la capacidad secretora de los pinealocitos. Sin embargo hemos de considerar que la ultraestructura de las células pinealocíticas, siempre estuvo condicionada por las condiciones de bienestar o estrés animal. **MILIN**, 1998, al analizar la ultraestructura de la píneal de gerbil, en situaciones de estrés (por inmovilización) encontró que la glándula incrementaba la actividad funcional de los pinealocitos, con mayor presencia de fibras nerviosas y la formación de nuevas concreciones.

En todos los grupos experimentales, la ultraestructura de los pinealocitos de oveja, sufrió modificaciones relacionadas con los cambios de luz-oscuridad; con variaciones más prominentes en el periodo de oscuridad. Este hecho fue detallado anteriormente en cerdo, por **LEWCZUK Y PRZYBYSKA-GORNOWICZ**, 2000, y en oveja por **REDONDO Y COL.**, 2003 a, b.

En relación a los organoides citoplasmáticos de pinealocitos, las mitocondrias, el retículo endoplásmico granular y el complejo de Golgi, alcanzaron sus valores mínimos de volumen relativo, en el grupo de estrés; igualmente, el volumen relativo, fue mayor durante la noche que durante el día

para todos los grupos experimentales, lo que redundaría en una hipotética actividad sintética aumentada durante la noche. **LAN Y COL.**, 2001, analizando la influencia de la privación del sueño en la ultraestructura de los pinealocitos de rata, y el efecto modulador de la administración de melatonina, encontraron: dilatación de las cisternas del REG y del Complejo de Golgi, dilatación de mitocondrias. Todas estas modificaciones ultraestructurales son signos morfológicos de incrementos de la actividad de síntesis en pinealocitos. La inyección de melatonina, tras la privación del sueño, reducía los signos de degeneración celular. Estos datos coinciden con lo reportado en cerdos y en oveja (**LEWCZUK Y PRZYBYSKA-GORNOWICZ**, 2000; **REDONDO Y COL.**, 2003 a,b); sin embargo, son contradictorios con lo reportado por **LEWCZUK Y COL.** 1996, quienes detectaron que el volumen relativo de mitocondrias en pinealocitos de cerdos –sometidos a fotoperiodos naturales- era mayor durante el día que durante la noche.

En ninguno de los supuestos experimentales contemplados, se observaron diferencias significativas en el volumen relativo de lisosomas.

Las gotas lipídicas no evidenciaron diferencias en relación a los ciclos de luz/oscuridad; estas informaciones son contradictorias a lo reportado en cerdo, por **LEWCZUK Y PRZYBYSKA-GORNOWICZ**, 2000, y en oveja por **REDONDO Y COL.**, 2003 a, b. El mayor volumen relativo de las gotas lipídicas se detectó en el grupo de estrés; si bien, el tratamiento con melatonina redujo dicho volumen relativo. No hemos encontrado referencias a dichas fluctuaciones en situaciones de estrés. Estas variaciones en los liposomas podrían asociarse con, cambios en la actividad metabólica de estas células (**KARASEK Y REITER**, 1992; **AARSETH Y STOKKAN**, 2003); o con variaciones estacionales -más abundantes en invierno que en verano- (**AARSETH Y STOKKAN**, 2003).

Las células intersticiales evidenciaron el patrón morfológico de expansión numérica referenciado para los pinealocitos: presencia normal en los grupos de bienestar animal con y sin melatonina, y presencia muy reducida y reducida en los grupos de estrés animal sin melatonina y con melatonina. En todos los

grupos experimentales estudiados, su localización perivascular y su naturaleza glial-astrocitaria, coincidía con lo previamente reportado en pineal ovina (**FRANCO Y COL.**, 1997; **REGODON Y COL.**, 1998 b; 2001; **REDONDO Y COL.**, 96b; 2001a, c; 2003a, b). En ambos grupos de bienestar animal, estas células mostraron, al igual que los pinealocitos, signos de actividad funcional, con alto número de uniones comunicantes entre ellas y con los pinealocitos. Estas uniones tipo *gap junctions*, podrían jugar un importante papel como barreras controladoras de la circulación de fluidos en el parénquima pineal (**CIECIURA Y KRAKOWSKI**, 1991). En todos los grupos experimentales, aunque de manera más reducida en el grupo de estrés, se pusieron de manifiesto la existencia de contactos específicos entre las células intersticiales y las fibras nerviosas. No se sabe con certeza el significado funcional de esta relación; se especula que las fibras nerviosas pudieran intervenir en el desarrollo de dichas células, de hecho, la ausencia de inervación hace que estas células no se desarrollen (**CALVO Y BOYA**, 1983).

La presencia de pineales pigmentadas (pigmento melánico) no guardó ningún patrón diferencial significativo entre los diferentes grupos experimentales contemplados. Las células que contenían pigmento melánico eran los pinealocitos y las células intersticiales, en correspondencia a lo reportado por (**REGODON Y COL.**, 1998a) en el desarrollo postnatal de la pineal ovina.

La organización del parénquima glandular en corteza y médula, pudo ser observada en todos los grupos experimentales, aunque con los valores de densidad numérica diferentes. Esta estructuración pineal, cortical y glandular, coincide plenamente con lo apuntado por (**REGODON Y COL.**, 2001; **REDONDO Y COL.**, 2003 a, b.). La organización de la arquitectura glandular, con formación de pseudolóbulos que contenían glomérulos; así como la presencia de rosetas (*mecanismos de crecimiento celular*), se visualizó en los grupos de bienestar animal con y sin melatonina, y de estrés animal con melatonina, coincidiendo con lo reseñado en el desarrollo prenatal y postnatal de la pineal ovina (**FRANCO Y COL.**, 1997; **REGODON Y COL.**, 2001;

REDONDO Y COL., 2001a, b, c; 2003 a, b,). En el grupo de estrés animal se observó una desorganización de la arquitectura glandular, sin ningún patrón morfológico de distribución celular.

La vascularización los grupos de estrés animal con y sin melatonina, fue menor que en ambos grupos de bienestar animal ; aunque en el grupo de estrés animal, la reducción fue mayor. En todos los grupos experimentales, y en coincidencia con lo previamente descrito en la glándula pineal ovina, la vascularización estuvo representada por capilares de tipo no fenestrado (**FRANCO Y COL.**, 1997; **REGODON Y COL.**, 1998a, b; 2001; **REDONDO Y COL.**, 1996 a; 2003 a, b,).

El estroma capsular, trabecular, pseudolobular e intersticial, constituido por fibras de colágeno y reticulina, en los grupos de bienestar animal con y sin melatonina, y de estrés animal con melatonina, exhibió idénticos patrones de presencia y distribución que lo referido en pineal de oveja (**REDONDO Y COL.**, 2003 a, b,). En el grupo de estrés animal, varió cuantitativamente, con mayor presencia de fibras de colágeno y reticulina en todos sus componentes. En este mismo grupo, la inervación y el calcio, también variaron respecto a los grupos de bienestar animal con y sin melatonina, con una menor presencia de fibras nerviosas; y una mayor presencia de calcio acompañada de áreas necróticas.

INMUNOHISTOQUIMICA

La reacción inmunocitoquímicas de las células SYNAP-, NNE-, y NSE-positivas, en todos los grupos experimentales contemplados, nos reveló la coincidencia, de dichas células, con las características morfológicas de los pinealocitos, en franca coincidencia con lo reseñado por **SATO Y COL.**, 1994, en terneros; **HIRA Y COL.**, 1998, en ratas; y por **REGODON Y COL.**, 2001 y **REDONDO Y COL.**, 2001b; 2003 a, b, en ovinos.

En todos los grupos experimentales, la afinidad de los pinealocitos para el inmunomarcaje con SYNAP y NNE, fue mayor que para la NSE. Hallazgos similares han sido revelados en el desarrollo prenatal y postnatal de la glándula pineal ovina (**REDONDO Y COL.**, 2001b; 2003 a,b). Igualmente fue una

constante en todos los grupos, la mayor presencia de células inmunomarcadas en médula que en corteza. Pocos datos comparativos existen, tan solo resaltar, la zonificación glandular referencia por **SAKAI Y COL.**, 1996, en ratas; por **REDONDO Y COL.**, 2001b; 2003 a,b en ovinos. En contraste con estas observaciones, **SATO Y COL.**, 1994, en terneros, detectaron un mayor número de células SYNAP positivas y NNE positivas, en corteza que en médula; de lo que se deduce, que no hay consenso a la hora de considerar corteza y médula como dos áreas funcionalmente distintas.

El tratamiento con melatonina no provocó diferencias en la densidad numérica de pinealocitos inmunoteñidos, entre los grupos de bienestar animal con y sin melatonina. En el grupo de estrés animal, para todos los inmunomarcadores, destacó el reducido número de células inmunopositivas, y la escasa intensidad de inmunotinción. Sin embargo, aquí si se produjo influencia del tratamiento con melatonina, ya que, en el grupo de estrés animal con melatonina, se inicio una recuperación de los parámetros de localización e intensidad de la inmunoreacción, para todos los inmunomarcadores, acercándose a los parámetros referenciados para los grupos de bienestar animal con y sin melatonina.

El volumen de los pinealocitos fue similar en ambos grupos de bienestar animal. El tratamiento con melatonina en los grupos de estrés, provocó un incremento significativo de dicho volumen. En todos los grupos experimentales el criterio de zonificación glandular, no modificó el volumen pinealocítico. Todo lo contrario ocurrió cuando consideramos el factor día/noche, con mayores volúmenes durante la noche; hecho ya evidenciado en pineal de oveja (**REDONDO Y COL.**, 2003 a).

En todos los grupos experimentales la reacción histoquímica positiva para la PTAH y la inmunotinción para la GFAP y VIM, se produjo en células de características morfológicas de las células intersticiales. Genéricamente, la población de células intersticiales era una combinación de células de naturaleza glial-astrocitaria en varios estadios de madurez, como previamente reportaron **LOPEZ-MUÑOZ**, 1992a,b, en rata y **FRANCO Y COL.**, 1997;

REDONDO Y COL., 1996b;2001a,c; 2003 a,b, en oveja. Los patrones morfológicos aludidos para pinealocitos referidos a la distribución, mayor en médula que en corteza, se seguían evidenciando en todos y cada uno de los grupos experimentales. Además, también se comprobó como el tratamiento con melatonina, en el grupo de estrés animal, era un indicador de la recuperación de los parámetros de normalidad presentes en ambos grupo de bienestar animal. De cualquier modo, con mayor o menor presencia y/o intensidad de inmunoreacción, en todos los grupos experimentales, las células GFAP y VIM positivas se localizaban cerca de los vasos sanguíneos. Esta localización perivascular (**BOYA Y CALVO**, 1993; **BORREGON Y COL.**, 1993) podría representar el indicio de una hipotética actividad funcional en relación al intercambio de sustancias entre el parénquima pineal y las estructuras vasculares (**ZANG Y COL.**, 1985; **FRANCO Y COL.**, 1997; **REDONDO Y COL.**, 1996b; 2001a,c; 2003a,b,).El volumen de las células intersticiales siguió el patrón referenciado para los pinealocitos; sin embargo el factor día/noche no influyó.

La presencia de fibras nerviosas VIP positivas, pudo ser demostrada en las pineales ovinas de todos los grupos experimentales. No hubo diferencias en cuanto a su localización, siendo visualizadas penetrando y abandonando la cápsula glandular; entre los pinealocitos y células intersticiales y en el conectivo septal e intersticial, con clara disposición perivascular. Se localizaban fundamentalmente en las zonas periféricas de la glándula^r; en la pineal profunda no se visualizaron, en convergencia con lo reportado por (**MIKKELSEN Y COL.**, 1994). La presencia de fibras VIP positivas ha sido significada en diversas especies de mamíferos: ratón (**MIKKELSEN Y COL.**, 1994); gerbo (**SHIOTANI Y COL.**, 1986); conejo (**UDMAN Y COL.**, 1980); gato (**MÖLLER Y COL.**, 1981); perro (**UEMURA Y COL.**, 1987); cerdo (**UDMAN Y COL.**, 1980) y oveja (**REGODON Y COL.**, 2003; **REDONDO Y COL.** 2003b).

Coincidiendo con la mayoría de los autores consultados, las fibras VIP positivas fueron poco numerosas en las pineales de los distintos grupos

^r Procedencia del ganglio parasimpático terigopalatino (**MÖLLER Y COL.**, 1992).

experimentales. El tratamiento con melatonina, no influyó en la presencia de dichas fibras nerviosas en los grupos de bienestar animal; sin embargo, en los grupos de estrés, dicho tratamiento fue determinante, con una presencia de fibras VIP más abundante en el grupo de estrés y melatonina. Los ciclos de luz y oscuridad si influyeron en el inmunomarcaje inmunoreacción en contradicción con lo reportado en pineal ovina (**REDONDO Y COL.** 2003b).

Las fibras nerviosas NPY[⊕] positivas fueron más numerosas que las VIP positivas, en las pineales de todos los grupos experimentales. La presencia de fibras nerviosas NPY positivas en las pineales ovinas, en situaciones de bienestar y estrés animal, coincidía con lo señalado en ratón (**MIKKELSEN Y COL.**, 1994); en gerbo (**SHIOTANI Y COL.**, 1986); en hámster y visón (**ZANG Y COL.**, 1991); en gato (**MÖLLER Y COL.**, 1994); en cerdo (**PRZYBYSKA-GORNOWICZ**; 1997); en bovino (**PANSUWAN-PUJITO Y COL.**, 1993) y en oveja (**REGODON Y COL.**, 2003; **REDONDO Y COL.** 2003b). La inmunodetección cualitativa y cuantitativa de dichas fibras coincidió con lo expuesto para las fibras VIP. Para ambos tipos de fibras, su localización perivascular y adyacente a los pinealocitos, podría relacionarse con su influencia en la liberación de melatonina mediante una acción directa sobre pinealocitos y vasos sanguíneos. En este sentido, hemos de señalar que las diferencias en el marcaje, entre el día y la noche, para ambos tipos de fibras nerviosas, está en franca correspondencia con las variaciones anuales de las fibras nerviosas simpáticas NPY, detectadas en pineal de hámster europeo; variaciones que se correlacionaron con los cambios en la síntesis de melatonina (**MÖLLER Y COL.**, 1998).

La inmunohistoquímica reveló la presencia de melatonina en la pineal ovina, en todos los grupos experimentales. La presencia de melatonina, también ha sido reportada en pineal de rata mediante radio-inmunoensayo (**KENNAWAY Y COL.**, 1977); mediante HPLC en pineal ovina (**REDONDO Y COL.**, 2003a); y mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, en pinealocitos de diferentes especies (**TILLET Y COL.**, 1989; **MENENDEZ-PELAEZ Y COL.**,

[⊕] Procedencia del ganglio simpático cervical superior (**PANSUWAN-PUJITO Y COL.**, 1993).

1993; **CARVAJAL Y COL.**, 2004). La inmunotinción de la melatonina evidenció diferencias cuantitativas. La menor inmunoreacción, tanto en número como en intensidad, fue evidente en el grupo de estrés inducido; de cualquier modo, tanto en los grupos de bienestar animal, como en los de estrés, el tratamiento con melatonina inducía a una mayor presencia de dicha hormona en la glándula. La inmunoreacción interesaba a las células pinealocíticas, afectando fundamentalmente al citoplasma (**CARVAJAL Y COL.**, 2004); aunque algunos autores han demostrado la presencia de inmunotinción en el núcleo (**MENENDEZ-PELAEZ Y COL.**, 1993). De la misma forma, se detectó menor presencia en zonas intermedias que en zonas centrales de la glándula, lo que se correspondería con la mayor densidad de pinealocitos en la zona medular (**REDONDO Y COL.**, 2003a,b). Así mismo, la mayor presencia de melatonina, en todos los grupos experimentales, en la fase de oscuridad, se relacionaría con el superior volumen de pinealocitos durante la noche (**REDONDO Y COL.**, 2003a).

En todos los grupos experimentales, el volumen de las pineales de los animales sacrificados durante la noche fue superior que durante el día. Este hallazgo ya fue detallado por (**REDONDO Y COL.**, 2003a) en pineal de ovino. Pensamos que este incremento en el volumen glandular, podría estar relacionado con el incremento del volumen de los pinealocitos; y a su vez, estar implicado en el aumento del peso de la glándula (**REDONDO Y COL.**, 2003a).

ARN_m B₁ ADRENORECEPTOR EN MEMBRANA DE PINEALOCITOS

Señales de hibridación positiva para el ARN_m B₁ Adrenoreceptor en la membrana de los pinealocitos, fueron detectadas en las glándulas de los 4 grupos experimentales. Estas afirmaciones coincidían con lo reportado en rata por **PANGERL Y COL.**, 1990; **CARTER Y COL.**, 1993; **MÖLLER Y COL.**, 1997. La presencia de señal de hibridación positiva para ARN_m B₁ Adrenoreceptor, fue muy abundante en el grupo de estrés. Entre ambos grupos de bienestar animal, no hubo diferencias significativas; sin embargo, en los grupos de estrés, el tratamiento con melatonina se tradujo en una disminución del ligamiento para ARN_m B₁ Adrenoreceptor.

La presencia de receptores de glucocorticoides, y su estimulación interdependiente de los niveles de ARN_m B₁ Adrenoreceptor, ha sido demostrada en pineal de rata (**SARRIEU Y COL.**, 1988). Es conocido, que el tratamiento con corticoides se traduce en un incremento de los niveles de ARN_m B₁ Adrenoreceptor (**ZHONG Y MINNEMAN**, 1993). En nuestra experiencia, las mayores señales de hibridación se han detectado en el grupo de estrés, precisamente cuando se detectaron los niveles más elevados de corticosterona.

En todos los grupos experimentales, durante la noche, hubo mayor señal de hibridación que durante el día; y es precisamente durante la noche, cuando se evidenciaron los niveles menos elevados de corticosterona, todo lo cual redundaría en el control de los corticoides en la regulación del ritmo nocturno de producción del ARN_m B₁ Adrenoreceptor reportado por **MÖLLER Y COL.**, 1997. Experiencias de hibridación para ARN_m B₁ Adrenoreceptor, mostraron un pico en la fase tardía del periodo de luz y una disminución en el inicio de la oscuridad (**PANGERL Y COL.**, 1990). En estudios recientes en vivo/ in vitro, en pineal de ratas, se demostró que la presencia de ARN_m B₁ Adrenoreceptor era muy alta en medio de la fase de oscuridad (**CARTER Y COL.**, 1993). **MÖLLER Y COL.**, 1997, encontraron que los niveles picos de ARN_m B₁ Adrenoreceptor, ocurrían en medio de la fase oscura (24 h) y los niveles más bajos en medio de la fase de luz (12 h); concluyeron diciendo que: *“los cambios en ARN_m B₁ Adrenoreceptor de pineal de rata, podrían relacionarse con el inicio de los periodos de luz y de oscuridad, precisamente por estas variaciones”*.

NUCLEOS SUPRAQUIASMATICOS DEL HIPOTALAMO

En los grupos de bienestar animal la configuración estructural de los NSQ del hipotálamo, mostró normalidad en cuanto a tamaño, número, morfología y distribución, tanto de neuronas como de células de glía. En el grupo de estrés se evidenciaron signos de degeneración neuronal, signos que disminuyeron con el tratamiento con melatonina. En un primer momento se atribuyeron estos daños exclusivamente, a la respuesta frente estrés del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (**ANGELUCCI**, 2000). Más tarde, la atención fue desplazándose hacia

factores neurotróficos (BDNF), como proteínas inhibitoras o facilitadoras de los daños causados por la activación del eje hipófisis-adrenal. En nuestra experiencia es precisamente en los grupos de estrés en los que la cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de BDNF, alcanzó sus máximos niveles, lo que nos hizo pensar, en correspondencia con investigaciones anteriores (**SMITH Y COL.**, 1995), que esta proteína pudiera desempeñar un papel importante en la respuesta hormonal al estrés.

La máxima expresión inmunohistoquímica de BDNF, coincidió con los máximos niveles de corticosterona, en el grupo de estrés. **ALTAR Y COL.**, 1999, demostraron que el estrés agudo y crónico, además de elevar los niveles de corticosterona, provocaba cambios estructurales y daño neuronal paralelo con variaciones en la expresión del ARN_m de BDNF en hipotálamo. Parece claro, que existe una relación directa entre la corticosterona desencadenada por el estrés y la expresión de BDNF en hipotálamo (**VAIDYA**, 1997).

En todos los grupos analizados la expresión de esta proteína fue mayor durante la noche. Fue reseñable, la relación inversa de esta expresión, con los niveles de corticosterona más bajos durante la noche; sin embargo, si se encontró una relación con el incremento en las fases de oscuridad en la expresión de NPY. **NAWA Y COL.**, 1994, reportaron que la administración de BDNF producía un marcado aumento de NPY y otros neuropéptidos, estimulando el crecimiento dendrítico de las neuronas piramidales del cerebro en animales adultos.

Las proteínas de golpe de calor parecen ser factores tróficos neuronales, relacionados con las situaciones de estrés. La expresión génica de la HSP-90 fue rápidamente inducida por el daño provocado por estrés (**TRUETTNET Y COL.**, 1999). La HSP 90 del hipotálamo es reconocida como un marcador de estrés, por su capacidad neuroprotectora, por su acción antiapoptótica y por su ligamiento a los receptores de corticosterona en el hipotálamo. En nuestra experiencia evidenció, al igual que el BDNF, su relación con los niveles más elevados de corticosterona en los grupos de estrés.

La presencia de receptores específicos de melatonina fue descrita por **HELLIWELL Y WILLIANS** (1994) a los 30 días de gestación, sugiriendo un papel prioritario de la melatonina en el desarrollo fetal ovino. **REPERT Y COL.** (1994) utilizando técnicas de hibridación in situ demostraron la presencia de ARN_m que codifica la expresión de MT₁ en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo. En nuestra experiencia se detectó la presencia de receptores tipo MT₁, en todos los grupos experimentales. Dos hallazgos hemos de destacar al respecto: 1.- la expresión mínima de dichos receptores en el grupo de estrés; 2.- la mejora de dicha expresión con los tratamientos con melatonina y 3.- la mayor expresión durante la noche que durante el día. En la bibliografía consultada, no hemos encontrado referencias a las modificaciones de MT₁, en NSQ de hipotálamo en situaciones de estrés.

CORTICOSTERONA, MELATONINA E INMUNOGLOBULINAS.

Los niveles de corticosterona en el grupo de estrés fueron muy elevados; además el tratamiento con melatonina supuso una reducción de dichos niveles, hecho que no ocurrió en los grupos de bienestar animal. En ovinos, **INGLES Y COL.**, 1987, estudiaron los niveles de melatonina en sangre venosa de ovejas intactas, muestreadas con variaciones de frecuencia y de intervalos temporales. Evidenciaron que la venipuntura frecuente activaba el eje de la tensión de las hormonas adrenocorticotropas, con elevación de los niveles de cortisol. Los niveles máximos de corticosterona en el grupo de estrés, coincidía con las máximas expresiones de BDNF, hallazgos aludidos con anterioridad, en situaciones de estrés por **ALTAR Y COL.**, 1999, y **VAIDYA**, 1997. En todos los grupos experimentales, durante la noche, se evidenciaron los niveles menos elevados de corticosterona; y también durante la noche hubo señales de hibridación más altas para el ARN_m B₁ Adrenoreceptor de la membrana de los pinealocitos, argumentos a favor del control de los corticoides en la regulación del ritmo nocturno de producción del ARN_m B₁ Adrenoreceptor, reportado por **MÖLLER Y COL.**, 1997, en pineal de hámster.

De nuestra experiencia se deducen dos hechos significativos en relación a las concentraciones de melatonina, tanto en plasma como en pineal: 1.- que el

tratamiento con melatonina, modifica las concentraciones de melatonina, tanto en plasma como en pineal. 2.- que el estrés tiene influencias en las concentraciones de melatonina.

Los niveles más bajos de melatonina, en plasma y en pineal, se detectaron en el grupo de estrés. Concentraciones bajas de melatonina relacionadas con situaciones de estrés, han sido descritas en ratas (**BONDARENKO Y COL.**, 2003; **MANDERA Y COL.**, 2003), en ovinos (**STANKOV Y KANCHEV**, 1989; **INGLES Y COL.**, 1987), y en el hombre (**REITER Y COL.**, 2000; **BRULS Y COL.**, 2000; **GUPTA Y COL.**, 2003; **LYSENKO Y RED´KIN**, 2003; **JOU Y COL.**, 2004). Las concentraciones de melatonina, tanto en plasma como en pineal, y tanto en condiciones de bienestar animal, como de estrés, aumentaron por la noche. Este hecho ha sido descrito en ovejas sometidas a fotoperiodos naturales largos y cortos (**RAVAULT Y CHESNEAU**, 1999; **REDONDO Y COL.**, 2003 a, b) y en fotoperiodos alterados (**McMILLEN Y WALKER**, 1991); y es tan claro, que **McMILLEN Y NOVAK**, 1989, en ovinos pinealectomizados, no encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de melatonina entre el día y la noche.

Las concentraciones de melatonina en plasma y pineal mostraron un patrón similar en todos los grupos examinados, con un máximo a las 02.00 horas y un mínimo a las 14:00 horas. Estos resultados coinciden con numerosas observaciones (**MIGUEZ Y COL.**, 1996; **RAVAULT Y CHESNEAU**, 1999; **HAMASE Y COL.** 2000). Las concentraciones más elevadas de melatonina se detectaron en el grupo de bienestar con melatonina, siendo estos los que presentaban las pineales más pesadas (**COON Y COL.**, 1999; **REDONDO Y COL.**, 2003a, b). Los niveles de melatonina, en plasma y pineal, se correlacionaron con algunos parámetros histomorfométricos en pineales de ovejas sacrificadas durante las horas de niveles máximos y mínimos (02.00 y 14:00 horas, respectivamente); esto incluía, un aumento de peso glandular y un incremento significativo de células SYNAP positivas. Hallazgos similares han sido descritos en pineal de rata (**FENG Y COL.**, 1998) y oveja (**REDONDO Y COL.**, 2003a, b). En este mismo sentido, **GOMEZ BRUNET Y COL.**, 2002,

encontraron que las pineales de corderos procedentes de madres con altas concentraciones de melatonina, contenían un número significativamente mayor de pinealocitos.

Las concentraciones séricas de inmunoglobulinas en el grupo de estrés, fueron significativamente menores que en ambos grupos de bienestar animal. El tratamiento con melatonina mejoró los niveles de inmunoglobulinas; resultados similares fueron descritos en ratas (**AKBULUT Y COL.**, 2001). No obstante, en la modulación de la respuesta inmune, bajo los efectos de la melatonina, no existió unanimidad; así, **BERNARD**, 2001, en dos grupos de ovejas, con altas y bajas concentraciones plasmáticas de melatonina, encontraron que las condiciones naturales de altos y bajos niveles de melatonina, no modificaban la actividad del sistema inmune en ovejas.

MAESTRONI, 2001, defendía el potencial inmunoterapéutico de la melatonina, ya que es capaz, mediante la activación de los receptores de melatonina en la membrana citoplasmática de los linfocitos T Citotóxicos y los monocitos, provocar la liberación de Th₁ citoquinas, interferon gamma interleuquina tipo 2 (mediadores de inmunidad celular) que podrían interactuar en la inmunodepresión asociada a estrés, y en otras inmunodeficiencias secundarias. En medicina humana existió unanimidad en relación al reconocimiento de la actividad inmunotrópica de la melatonina relacionada con la protección frente al estrés (**CALLAGHAN**, 2002; **ARUSHANIAN Y BEIER**, 2002).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES**CONTRIBUCIONES CIENTÍFICO-TÉCNICAS DEL PROYECTO**

Las principales contribuciones científico-técnicas extrapolables son:

1.- Se ha efectuado el establecimiento de parámetros de normalidad en los Núcleos SupraQuiasmáticos del hipotálamo (NSQ) en condiciones de bienestar animal; las modificaciones introducidas por el tratamiento con melatonina; la comparación de dichos parámetros, con los obtenidos en condiciones de estrés inducido; y la modulación de dicho estrés por el tratamiento con melatonina. Los parámetros evaluados tanto en condiciones de bienestar animal, como en condiciones de estrés por manejo, han sido analizados a través de variaciones cualitativas (configuración histológica de los NSQ), como cuantitativas (neurotrofinas hipotalámicas y proteínas de golpe de calor - *considerados como indicadores de estrés*-).

2.- Se ha detallado la configuración morfológica de la glándula pineal, en condiciones de bienestar animal frente a las condiciones de estrés inducido por manejo; y la modulación en ambos supuestos (bienestar/estrés) por el tratamiento con melatonina. Todo ello, a través de la determinación de las características histomorfométricas, estructurales, ultraestructurales, e inmunohistoquímicas de la glándula pineal; a través del establecimiento de relaciones entre la presencia de neuropéptidos implicados en la transmisión de impulsos nerviosos (VIP y NPY determinado inmunohistoquímicamente) y la presencia de B₁ Adrenoreceptores presentes en la membrana de los pinealocitos (determinación por ISH del ARN_m que regula la expresión de los B₁ adrenoreceptores).

3.- Se han establecido las relaciones entre histología de los NSQ y la pineal, en condiciones de bienestar y estrés, ambas condiciones moduladas, por el tratamiento o no, con melatonina, con las variaciones las secreciones plasmáticas de melatonina; con las modificaciones en las concentraciones hipotalámicas y pineales de melatonina y con las modificaciones de la corticosterona sérica e inmunoglobulinas.

BENEFICIOS Y RESULTADOS TRANSFERIBLES

Podríamos concluir diciendo que la realización de este trabajo de investigación, permite a la comunidad científica y a la industria farmacéutica, disponer de una mayor información sobre aspectos poco contemplados: “*el potencial poder anti-estrés de la melatonina*”. La divulgación de los resultados obtenidos podría contribuir a sensibilizar a los profesionales sanitarios en tres cuestiones básicas:

- 1. La catalogación del bienestar animal, como un posible indicador del indicio de salud.**
- 2. La consideración de los agentes estresantes como patógenos; y del estrés como enfermedad.**
- 3. La consideración de la melatonina como fármaco eficaz en el tratamiento anti-estrés.**

CONCLUSION FINAL

“La melatonina se mostró como un fármaco muy eficaz frente al estrés inducido en oveja, por modificaciones en el manejo y/o la alimentación”.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA**BIBLIOGRAFIA RELEVANTE**

1. Akbulut K.G., Gonul B., Akbulut H. (2001) The effect of melatonin on humoral immune responses of young and aged rats. *Immunol Invest.* 30(1): 17-20.
2. Alfonso J, Frasch AC, Flugge G. (2005); Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus.; *Rev Neurosci.*16(1):43-56.
3. Altar C.A. Neurotrophins and depression. (1999). *Trends Pharmacol Sci* 20(2): 59-61.
4. Alvarez-Uria M., Gonzalez G. (1981) Influencia de los agentes físicos ambientales sobre la ultraestructura de la glándula pineal en mamíferos. III frío y IV calor. *Phronesis* 2 (2): 83-86.
5. Anderson E. (1965) The anatomy of bovine and ovine pineals. Light and electron microscopic studies. *J. Ultrastruct. Res. (Suppl. 8)* 12: 1-80.
6. Angelucci F., Aloe L., Vázquez P.J., Mathe A.A. (2000). Mapping the differences in the brain concentration of BDNF and NGF in animals models depression. *Neuroreport* 11(6): 1369-1373.
7. Arendt J.(1995) Melatonin and the mammalian pineal gland. London: Chapman and Hall.
8. Arendt J.,Symons A,M., Laud C.A. (1981) Pineal function in the sheep: evidence of a possible mechanismmediating seasonal reproductive activity. *Experientia* 37: 584-586.
9. Arstila A.U. (1967) Electron microscopic studies on the structure and histochemistry of the pineal gland of the rat. *Neuroendocrinology* 2, Suppl., 1-101.

10. Arushanian E.B. and Beier E.V. (2002) Immunotropic properties of the pineal melatonin. *Eksp. Klin Farmakol* 65(5): 73-80.
11. Bailey MJ, Cassone VM. (2005); Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland.; *Brain Res Mol Brain Res. Apr 4;134(2):345-8.*
12. Bargmann W. (1943) Die Epiphysis Cerebri. In VON MOLLENDORFF ED., *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Vol. IV, pp. 309-502. Springer, Berlin.
13. Barriga C., Martín M.I., Tabla R., Ortega E., Rodríguez A.B. (2001) Circadian rhythm of melatonin, corticosterone and phagocytosis effect of stress. *J. Pineal Res.* 30(3): 180-187.
14. Bayerova G. and Malinski J. (1972) Quantitative ultrastructural study of the rat pinealocytes during prenatal development. *Folia Morphol.* 20: 56-59.
15. Benard S., Macedo N., Malpaux B., Chemineau P. (2001) Comparison of immune parameters of sheep with naturally high or low plasma concentration of melatonin. *J. Pineal Res.* 31(3): 248-255.
16. Blázquez E., González G. (1978) The effect of ultrasound waves on the hydroxyindole-O-methyl transferase activity and ultrastructure of the rat pineal gland. *Trab.Inst. Cajal de Invest. Biol.* 70:15-24.
17. Bondarenko L.A., Gubina-Vakulik G.I. (2003) Morphofunctional changes in the pineal gland during dynamic adaptation to hypothermia. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33(4): 405-409.
18. Borregón A., Boya J., Calvo J.L., López-Muñoz F. (1993) Immunohistochemical study of pineal glial cells in the postnatal development of the rat pineal gland. *J. Pineal Res.* 14(2): 78-83.
19. Bostelman W. (1968) Das ultrastrukturelle und enzymhistochemische Verhalten der Rattenzirbeldrüse nach Funktionsphasenwechsel durch Dauerbeleuchtung und ständige Dunkelheit. *Endokrinol.* 53:365-384.
20. Boya J. and Calvo J.L. (1979) Evolution of the pineal gland in the adult chicken. *Acta Anat* 104: 104-122.

21. Boya J. and Zamorano L. (1975) Ultrastructural study of the pineal gland of the chicken (*Gallus gallus*). *Acta Anat.* 92: 202-226.
22. Boya J., Calvo J.L. (1984) Structure and ultrastructure of the aging rat pineal gland. *J.Pineal Res.* 1: 83-89.
23. Boya J., Calvo J.L. (1993) Immunohistochemical study of the pineal astrocytes in the postnatal development of the cat and dog pineal gland. *J. Pineal Res.* 15: 13-20.
24. Boya J., Calvo J.L., Rancaño D. (1995) Structure of the pineal gland in the adult cat. *J. Pineal Res.* 18: 112-118.
25. Brack E. (1962) Morpho und Histogenetische Untersuchungen der Epiphysis cerebri von Rind. *Anat. Histol. Embriol.* 9: 905-924.
26. Brom D.M. (1988) The concept of stress and welfare. *Rec. Med. Vet.* 164: 715-722.
27. Bruls E., Crason M., Legros J.J. (2000) Melatonin.I. Physiology of its secretion. *Rev. Med. Liege* 55(8): 785-792.
28. Bucana C.D. and Nadakavukaren M.J., Frehn J.L. (1973) Ultrastructural features of the pineal gland from cold-exposed golden hamster. *J. Neurocyt.* 2: 237-247.
29. Callaghan BD (2002) Does the pineal gland have a role in the psychological mechanisms involved in the progression of cancer. *Med. Hypotheses* 59(3): 302-311.
30. Calvo J.L. and Boya J.(1984a) Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. *J. Anat* 138: 45-53.
31. Calvo J.L. and Boya J.(1984b) Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. *Anat.* 138:405-409.
32. Calvo J.L. and Boya J.(1984c) Ultrastructure of the rat pineal stalk. *Acta Anat.* 123: 172-177.
33. Calvo J.L. and Boya J. (1983) Postnatal development of cell types in the rat pineal gland. *J. Anat.* 186:185-195.

34. Calvo J.L., Boya J. García-Mauriño J.E. (1988 a) Ultrastructure of the pineal gland in the adult dog. *J. Pineal Res.* 5: 479-487.
35. Calvo J.L., Boya J. García-Mauriño J.E., López-Carbonel A. (1988 b) Structure and ultrastructure of the pigmented cells in the adult dog pineal gland. *J. Anat.* 160: 73-76.
36. Calvo J.L., Boya J. García-Mauriño J.E., López-Carbonel A. (1990) Postnatal development of the dog pineal gland: Electrón microscopy. *J. Pineal Res.* 8: 245-254.
37. Calvo J.L., Boya J. García-Mauriño J.E., Rancaño D. (1992) Presence of melanin in the cat pineal gland. *Acta Anat.* 145: 73-78.
38. Cardinali D.P (2001) Manual de neurofisiología. Daniel P Cardinali. 8ª Edición. Buenos Aires.
39. Cardinali D.P., Pevet P. (1998) Basis aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews* 2 (3): 175-190.
40. Carter D.A. (1993) Up-regulation of B₁-adrenoceptor messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland; nocturnally, through a B-adrenoceptor-linked mechanism, and in vitro through a novel posttranscriptional mechanism activated by specific protein synthesis inhibitors. *Endocrinology* 133:2263-2268.
41. Carvajal JC., Gómez-Esteban MB., Carbajo S., Muñoz-Barragán L. (2004) Melatonin-like immunoreactivity in the pineal gland of the cow: an immunohistochemical study. *Histol. Histopathol* 19: 1187-1192.
42. Chaurasia SS, Rollag MD, Jiang G, Hayes WP, Haque R, Natesan A, Zatz M, Tosini G, Liu C, Korf HW, Iuvone PM, Provencio I. (2005); Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types.; *J Neurochem.* Jan;92(1):158-70.

43. Chemineau P., Beltran de Heredia I., Daveau A., Bodin L. (1996) High repeatability of the amplitude and duration of the nyctemeral rhythm of the plasma melatonin concentration in the Ile-de-France ewe. *J. Pineal Res.* 21(1): 1-6.
44. Cieciora L., and Krakowski G. (1991) Junctional systems in the pineal gland of the wistar rat (*Ratus ratus*). A freeze-fracture and thin section study. *J. submicrosc. Cytol. Pathol* 23(2): 327-330.
45. Cikler E, Ercan F, Cetinel S, Contuk G, Sener G. (2005); The protective effects of melatonin against water avoidance stress-induced mast cell degranulation in dermis.; *Acta Histochem.* 106(6):467-75.
46. Clarke (1862) Structure of the pineal gland. *Proceedings of the Royal Society.* Vol. XI.
47. Coon S.L., Zarazaga L.A., Malpoux B., Ravault J.P., Bodin L., Voisin P., Woller J.L., Klein D.C. (1999) Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzymes activities. *Am. J. Physiol* 277(5): 792-797.
48. Cornelisen G., Halberg F., Burioka N., Perfetto F., Tarquini R., Bakken E.E. (2000) Do plasma melatonin concentrations decline with age. *Am. J. Med.* 109 (4): 343-345.
49. Cozzi B. Ferrandi B. (1984 a) The pineal gland of the horse. Morphological and histochemical results. (With notes on the donkey and mule pineal) *Bas. Appl. Histochem.* 28: 81-90.
50. Cozzi B. Ferrandi B. (1984 b) Fine structure and histochemistry of the equine pineal gland, with special reference to the possible functional role of the electron-dense intrapinealocyte bodies. *Clin. Vet.* 107: 337-346.
51. Cozzi B.(1986) Cell types in the pineal gland of the horse: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Anat. Record* 216: 165-174.

52. Darksche-witsch L. (1886). Zur Anatomie der glandula pinealis. *Neurologisches Centralblatt*. Nº 2, s. 29.
53. Day HE, Nebel S, Sasse S, Campeau S. (2005); Inhibition of the central extended amygdala by loud noise and restraint stress.; *Eur J Neurosci*. Jan;21(2):441-54.
54. De Reviere MM., Tillet Y., Pelletier J. (1991) Melatonin Binding Sites In The Brain Of Sheep Exposed To Light Or Pinealectomized. *Neur. Lett* 121(1-2): 17-20.
55. Deak T, Bordner KA, McElderry NK, Barnum CJ, Blandino P Jr, Deak MM, Tammariello SP. (2005); Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms.; *Brain Res Bull*. Jan 30;64(6):541-56.
56. Derenzo J, Macknight B, DiVittore NA, Bonafide CP, Cronin AJ. (2005); Postoperative elevated cortisol excretion is not associated with suppression of 6-sulfatoxymelatonin excretion.; *Acta Anaesthesiol Scand*. Jan;49(1):52-7. ;
57. Descartes R. (1662) *De Homine. Figuris et Latinitate* Donatus a Schuyf, F. Lugduni Batavorum.
58. Diemerbroeck I. (1685) *Opera omnia et medica*. Utrecht.
59. Dimitrova Z. (1901) *Recherches sur la structure de la glande pinéale chez quelques mammifères*. Thèse.
60. Douglas AJ, Meddle SL, Toschi N, Bosch OJ, Neumann ID. (2005); Reduced activity of the noradrenergic system in the paraventricular nucleus at the end of pregnancy: implications for stress hyporesponsiveness.; *J Neuroendocrinol*. Jan;17(1):40-8.
61. Dubocovich M.L. (1988) Pharmacology and function of melatonin receptors. *Faseb J*. 2 (12)2765-2773.

62. El Qandil S, Chakir J, El Moussaouiti R, Oukouchoud R, Rami N, Benjelloun WA, Lakhdar-Ghazal N. (2005); Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent.; *Brain Res Bull.* Jan 15;64(5):371-80.
63. Engel L, Gupta BB, Lorezkowski V, Heinrich B, Schwerdtle I, Gerhold S, Holthues H, Vollrath L, Spessert R. (2005); Fos-related antigen 2 (Fra-2) memorizes photoperiod in the rat pineal gland.; *Neuroscience.* 132(2):511-8.
64. Engel L, Lorezkowski V, Langer C, Rohleder N, Spessert R. (2005); The photoperiod entrains the molecular clock of the rat pineal.; *Eur J Neurosci.* Apr;21(8):2297-304.
65. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. (2004); The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited.; *Front Neuroendocrinol.* Sep-Dec;25(3-4):132-49.
66. Engelmann M, Ludwig M. (2004); The activity of the hypothalamo-neurohypophysial system in response to acute stressor exposure: neuroendocrine and electrophysiological observations.; *Stress.* Jun;7(2):91-6.
67. English J., Arendt J., Poulton A., Symons A.M.(1987) Short-term variations of circulating melatonin in the ewe. *J. Pineal Res.*4(4): 359-366.
68. Faluhelyi N, Reglodi D, Csernus V. (2005); Development of the Circadian Melatonin Rhythm and Its Responsiveness to PACAP in the Embryonic Chicken Pineal Gland.; *Ann N Y Acad Sci.* Apr;1040:305-9.
69. Faluhelyi N, Reglodi D, Lengvari I, Csernus V. (2004); Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin release in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study.; *Regul Pept.* Dec 15;123(1-3):23-8.

70. Feng X.L., Usui H., Fujita T., Ichikawa T., Katagiri T., Washiyama K., Kumanishi T. (1998) Postnatal development changes in NSE and NNE mRNA expression in the rat pineal gland: in situ hybridization histochemistry. *J. Pineal Res.* 24(2): 108-116.
71. Foa C. (1912) Hypertrofié der testicules et de la crete, après léxtirpation de la glande pinéale chez le coq. *Arch. Ital. Biol.* 57: 233-252.
72. Foldes A., Maxwell CA. Scaramuzzi RJ., Donnelly JB., Hoskinson RM., Rintoul AJ. (1985) Seasonal changes in the sensitivity of ovine pineal B-adrenoceptors to steroids. *Neuroendocrinology* 41(6): 494-498.
73. Foldes A., Maxwell CA.(1993) Effect of pinealectomy and plane of nutrition on wool growth in Merino sheep. *J. Pineal Res* 15(1): 27-34.
74. Fontana P., Jr., and Alves De Azevedo, B. (1978) effect of sound stimulation on pineal glands of female albino rats. *An. Acad. Bras. Ciências* 50:116.
75. Forcada F. (2000) El papel del fotoperiodo y la melatonina en la actividad reproductora. *Monografía ovis nº 71: 1-86.*
76. Franco A., Redondo E., Masot A.J., Regodon S. (2000) Mathematical Model Applied To Growth Prenatal Development Of The Sheep Pineal Gland. *Revue Médecine Vétérinaire De Toulouse* 151 (11): 1031-1037.
77. Franco A., Regodon S., Masot A.J., Redondo E. (1997) A Combined Immunohistochemical And Electron Microscopic Study Of The Second Cell Type In The Developing Pineal Gland. *J. Pineal Res:* 22, 30-136.
78. Frauchiger E. (1963) Atlas und neueres über die zirbeldrüse (Epiphysis cerebri). *Schweiz. Arch. Tierheilk* 105:183-194.
79. Fukuhara C, Yamazaki S, Liang J. (2005); Pineal circadian clocks gate arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the mouse pineal gland.; *J Neurochem.* Apr;93(1):156-62.

80. Fukuhara C. (2004); Effect of dark exposure in the middle of the day on Period1, Period2, and arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA levels in the rat suprachiasmatic nucleus and pineal gland.; Brain Res Mol Brain Res. Nov 4;130(1-2):109-14.
81. García de H., Sánchez C., Colmenares J. (1998) Evaluación comparativa de tres sistemas de amasamiento de cabritos bajo explotaciones intensivas. Zootecnia Tropical 16 (1): 87-98.
82. García J.A., Campos R. (1997) La glándula pineal y sus efectos en el sistema inmunológico. La Academia, Mayo-Junio: 1-19.
83. García Mauriño J.E. and Boya J (1992a) Postnatal development of the rabbit pineal gland. A light and electron microscopic study. Acta Anat. 143: 19-26.
84. García Mauriño J.E. and Boya J (1992b) Postnatal maturation of the parenchymal cell types in the rabbit pineal gland. Histol. Histopathol 7: 75-81.
85. Gómez-Brunet A., Gómez-Brunet A., Malpoux B., Daveau A., Taragnat C., Chemineau P. (2002) Genetic variability in melatonin secretions originates in the number of pinealocytes in sheep. J. Endocrinol. 172(2): 397-404.
86. Gómez-Brunet A., Malpoux B., Daveau A., Taragnat C., Chemineau P. (2000) Ontogeny of the genetic variability in plasma melatonin concentrations in lambs. Relationship between the number of pinealocytes and the secretion of melatonin. Proc. ICHBB and SBN Joint Meeting, Madrid, August 5 th-9th, pp 133-135.
87. Gonzalez G. and Alvarez-Uria M. (1981). Influencia de los agentes físicos ambientales sobre la ultraestructura de la glándula pineal en mamíferos. II frío y IV calor. Phronesis 2 (3): 163-167.
88. González G. and Alvarez-Uria M.(1970) Ultraestructura de la glándula pineal de los mamíferos. II. Célula Intersticial. Trab. Inst. Cajal Inv. Biol. 62: 29-37.

89. Gupta Y.K., Gupta M., Coolí K. (2003) Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 47(4): 373-386.
90. Gusek W.(1971) Der einflub von antiandrogen (Cyproteronaceta) auf die Morphologie der Zirbeldrüse. *Acta Endocrin. (Kbh) Suppl.* 152 : 37.
91. Gutzeit R. (1896) Ein teraton der Zilbeldrüse. Königsberg.
92. Hagemann G. (1872).Ueber den bau des Conarium. *Arch. F. Anat. Physiol. U. Viss. Med.*, 429-454. 1 pl. Leipzig.
93. Hamase K., Tomika T., Kiyomizu A., Zaitso K. (2000) Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reverse phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice. *Anal. Biochem* 279(1): 106-110.
94. Helliwell R.J., Willians L.M: (1994) The Development Of Melatonin-Binding Sites In The Ovine Fetus. *J Endocrinol* 142(3): 475-484.
95. Henle (1887) *Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Nervenlhre.* Pp.322.
96. Hernández G., Abreu P., Alonso R., Calzadilla C.Z. (1990) Determination of pineal melatonin by HPLC with electrochemical detection: applications for rhythm studies and tissue explants. *J. Pineal Res.* 8(1): 11-19.
97. Hira Y., Sakai Y., matsushima S. (1998) Quantitative light microscopic study on the heterogeneity in the superficial pineal gland of the rat. *Anat. Record.* 250(1): 80-94.
98. Houghton D.C., Yong I.R., McMlllen I.C. (1995) Evidence for hypothalamic control of the diurnal rhythms in prolactin and melatonin in the fetal sheep during late gestation. *Endocrinol* 136:218-223.
99. Houssay A.B. and Barcelo A.C.(1972) Effects of estrogens and progesterone upon the biosynthesis of melatonin by the pineal gland. *Experientia (Basel)* 28: 478-479.

100. Hwang B. H. (1982) Fluorescence and electron microscopic study of the tre shrew pineal organ. *J. Neural Transmission* 53: 193-212.
101. Ibáñez M., González de Chavarri E. (2003) Comportamiento y bienestar animal. En: *Bienestar animal*. Ed. Editorial Agrícola Española, Ancoporc y M.A.P.A. pp: 11-35.
102. Jacobson L. (2005); Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation.; *Endocrinol Metab Clin North Am.* Jun;34(2):271-92.
103. Jordan H.E. (1911) The histogenesis of pineal body of the sheep. *Am.J. Anat.* 12: 249-270.
104. Joren Aarseth Jo and Arne Stokkan K.(2003) Quantitative differences in the pineal ultrastructure of perinatal and adult harp (*Phoca groelandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*).
105. Jou M.J., Peng T.I., Reiter R.J., Jou S.B., Wu H.Y., Wen S.T. (2004) visualization of the antioxidative effect of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J.Pin. Res.* 37(1): 55-70.
106. Karasek M. (1971) Ultrastructure of the pineal body in white rats in normal conditions and after pituitary gland extraction. *Endokryn. Pol.*, 22: 15.
107. Karasek M. and Reiter R.J. (1992) Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.* 21: 136-157.
108. Karasek M. and Zielinska A (2000) Comparative quantitative ultrastructural study of pinealocytes in eight mammalian species. *Neuro Endocrinol. Lett.* 21(3): 195-202.
109. Kennaway DJ., Frith R.G., Phillipou G., Mattheews CA., Seamark RF. (1977) A specific radioimmunoassay for melatonin in biological tissue and fluids and its validation by gas chromatography mass spectrometry. *Endocrinology* 101: 119-127.

110. Kwiatkowski F, Abrial C, Gachon F, Chevrier R, Cure H, Chollet P. (2005); Stress, cancer and circadian rhythm of melatonin; *Pathol Biol (Paris)*. Jun;53(5):269-72.
111. Lan C., Hsu J., Ling E. (2001) Influence of sleep deprivation coupled with administration melatonin on ultrastructure of rat pineal gland. *Brain Res. 10 ; 910(1-2): 1-11.*
112. Leite-Kassuya CA, Pereira OC. (2005); Adrenergic response patterns in vas deferens isolated from rats under diurnal rhythms. Influence of stress.; *Life Sci.* Aug 26;77(15):1844-54.
113. Lepage O, Larson ET, Mayer I, Winberg S. (2005); Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout.; *J Pineal Res.* May;38(4):264-71.
114. Lerner AB., Case JD., Takahashy Y., Lee TH., Mori W. (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lighthens melanocytes. *J. Am. Chem Soc.* 80: 2587.
115. Lewczuk B. and Przybyska-Gornowicz (2000 a) The effect of continous darkness and illuminations on the fuction and the morphology of the pineal gland and the domestic pig. The effect on the pinealocyte ultrastructure. *Neuroendocrinology Letters* 21(4): 293-299.
116. Lewczuk B. and Przybyska-Gornowicz (2000 b) The effect of exogenous melatonin on the pinealocyte ultrastructure in domestic pig (*Sus domesticus*) depends on the time of its administration. *Polish. J. Vet. Sci* 3 :29-38.
117. Leydig F. (1866) *Traité d'Histologie comparée de l'homme et des animaux.* (Trad. Franc.) pp 199.
118. López-Muñoz F., Calvo J.L., Boya J. López-Carbonel A. (1992b) Coexpresion of vimentin and GFAP in glial cells of the adult rat pineal gland. *J. Pineal Res.* 12: 145-148.

119. López-Muñoz F., Calvo J.L., Boya J., Marín F. (1992a) Immunohistochemical localization of GFAP in rat pineal stalk astrocytes. *Histol-Histopathol* 7: 643-646.
120. Low J.M., Griffith G.R., Alston C.L. (1996) Australian farm work injuries: incidence, diversity and personal risk factors. *Aust. J. Rural Health* 4(3):179-189.
121. Lysenko A.S., Red'kin IuV (2003) Role of the pineal gland in the body protection from injury. *Usp. Fiziol Nauk.* 34(4): 26-36.
122. Ma S, Morilak DA. (2005); Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress.; *J Neuroendocrinol.* Jan;17(1):22-8.
123. Machida C.A., Bunzow J.R., Searles R.P., Van Tol H., Tester B. (1990) Molecular cloning and expression of the rat B₁-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem* 265: 12960-12965.
124. Maestroni G.J. (2001) The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert. Opin Investig. Drugs* 10(3): 467-476.
125. Mahmoud F, Sarhill N, Mazurczak MA. (2005); The therapeutic application of melatonin in supportive care and palliative medicine.; *Am J Hosp Palliat Care.* Jul-Aug;22(4):295-309.
126. Malpaux B., Robinson J.E., Brown M.B., Karsch F.J. (1988) Importance of changing photoperiod and melatonin secretory pattern in determining the length of the breeding season in the suffolk ewe.
127. Mander M., Dec R., Marcol W., Kotulska K. (2003) Melatonin secretion profile after experimental pineal gland compression in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 24(6): 392-396.
128. Marburg O. (1930) Die Physiologie der Zirbeldrüse (Glandula pinealis, Epiphysis) *Handb. Norm. Pathol. Physiol.*, 13: 493-590.

129. Martínez-Soriano F., Jordan M., Hernández T., Ruiz A. (1996) A photophase and seasonal study of the pineal parenchyma melatonin serum levels in the albino rat subjected to immobilization stress. *Arch. Ital. Biol.* 134(3): 235-248.
130. Maxwell CA., Foldes A., Scaramuzzi RJ., Carter NB., Downing JA (1989 a) Seasonal modification of ovine pineal function. I. Interaction of gonadal steroids and sympathetic innervation on beta-adrenoceptors. *Neuroendocrinology* 49(1): 65-70.
131. McMillen I.C. and Walker D.W. (1991) Effect of different lighting regimes on daily hormonal and behavioural rhythms in the pregnant ewe and sheep fetus. *J. Physiol. (London)*, 442: 465-476.
132. McMillen I.C., Novak R. (1989) Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentration in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J. Endocrinol.* 120: 459-464.
133. McMillen I.C., Houghton D.C., Young I.R. (1995) Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. *J. Reprod. Fertil Suppl.* 49: 137-146.
134. Menéndez-Peláez A., Reiter RJ (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15: 59-69.
135. Messer L.A., Wang L., Tuggle C.K., Yerle M., Chardon P., Pomp D., Wo-mack J.E., Barendse W. Rothschild M.F. (1997) Mapping of the melatonin receptor 1a (MT₁RNA) gene in pigs, sheep and cattle. *MammGenome* 8: 368-370.
136. Míguez J.M., Recio J., Vivien-Roels B., Pevet P. (1996) Diurnal changes of the contents of indolamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the Hungarian hamster: effect of photoperiod. *J. Pineal Res.* 21 (1): 7-14.
137. Mikami S. (1951) Cytological and histochemical studies of the pineal bodies of domestic animals. *Tohoku J. Agric. Res.* 2: 41-48.

138. Mikkelsen J.D. and Möller M.(1999) Neuropeptide Y in the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.* 46(4-5): 239-256.
139. Mikkelsen J.D. Möller M., Larsen P.J., Fahrenkrug J.(1994) The presence of nerve fibers immunoreactive for VIP, PHI and prepro VIP(111-112) in the mouse pineal gland. *J Pineal Res.* 16: 50-56.
140. Milin J. (1998) Stress-reactive response of the gerbil pineal gland: concretion genesis. *General and Comparat. Endocrin.* 110(3): 237-251
141. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
142. Molinary E.J., North P.C., Dubocovich M.L. (1996) 2-[¹²⁵I] iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML₂ binding sites. *Eur. J. Pharmacol* 301: 159-168.
143. Möller M. (1992) Fine structure of pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Technol.* 21: 188-204.
144. Möller M., Fahrenkrug J., Ottesen B.(1981) The presence of vasoactive intestinal peptide in nerve fibers connecting the brain and the pineal gland of the cat. *Neurosci. Lett (Suppl)* 7: 411.
145. Möller M., Masson-Pevet M., Pevet P. (1998) Annual variations of the NPYergic innervation of the pineal gland in the European hamster (*Cricetus cricetus*): a quantitative immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 291(3): 423-431.
146. Moller M., Phansuwan-Pujito P., Morgan K.C., Badiu C. (1997) Localization and diurnal expression of mRNA encoding the B₁ Adrenoceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization study. *Cel. Tissue Res.* 2 : 279-284.

147. Möller M., Zhang E., Cozzi B. (1994) Experimental immunohistochemical studies of neuropéptido Y (NPY), vasointestinal peptide (VIP) and peptide histidine isoleucine (PHI) in the mammalian pineal gland. *Adv. Pineal Res.*, 8: 135-142.
148. Nawa H., Pelley M.A., Carnahan J. (1994) Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in new-born rat brain. *J. Neurosci* 14: 3751-3765.
149. Negus N.C., and Berger P.J. (1971) Pineal weight response to a dietary variable in *Microtus montanus*. *Experientia (Basel)* 27: 215-216.
150. O'Connor KA, Ginsberg AB, Maksimova E, Wieseler Frank JL, Johnson JD, Spencer RL, Campeau S, Watkins LR, Maier SF. (2004); Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression.; *Neuroendocrinology*. 80(4):252-63.
151. Okatani Y., Okamoto K., Hayashi K., Wakatsuki A., Tamura S., Sagara Y. (1998) Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J. Pineal Res.* 25(3): 129-134.
152. Pagava KI, Gogberishvili K. (2004); Differences in modification of stress mechanisms in rat pups exposed to continuous and intermittent maternal deprivation.; *Bull Exp Biol Med.* Aug;138(2):202-4.
153. Pandi-Perumal SR, Zisapel N, Srinivasan V, Cardinali DP. (2005); Melatonin and sleep in aging population.; *Exp Gerontol.* Sep 22.
154. Pangerl B., Pangerl A., Reiter R.J. (1990) Circadian variation of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland. *J. Neural Transm* 81: 17-29.
155. Pangerl B., Pangerl A., Reiter R.J., Jones D.J. (1989) Circadian variation of B-adrenoceptor binding sites in the pineal gland of the syrian hamster and prevention of the nocturnal reduction by light exposure or propranolol treatment. *Neuroendocrinology* 49: 570-573.

156. Pansuwan-Pujito P. Pramaukijja S., Govitrapong P., Möller M. (1993) An immunohistochemical study of neuropéptido Y in the bovine pineal gland. *J.Pineal Research* 15: 53-58.
157. Pelletier J., Bodin L., Hanocp E., Malpaux B., Teyssier J., Thimonier J., Chemineau P. (2000) Association between expresion of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel_{1a} receptor in the ewe. *Biology of Reproduction* 62: 1096-1101.
158. Pevet P. (1977) On the presence of difference populations of pinealocyte inthemammalian pineal gland. *J.Neural. Transm.* 40: 289-304.
159. Piketty V., Pelletier J. (1993) Melatonin receptors in the lambs pars tuberalis /median eminence throughout the day. *Neuroendocrinology* 58: 359-365.
160. Przybyska-Gornowicz, B., Lewczuk B., Duzsa I.(1994a) Effect of p-chrophenilamine, amiflamine and melatonin treatment on the ultrastructure of pinealocytes in sus scrofa. *Cytobios* 77: 233-236.
161. Przybyska-Gornowicz, B., Lewczuk B., Karasek M.(1994b) Effect of long term administration of melatonin treatment on ultrastructure of pinealocytes in gilts. *Folia Morphol (Warsz)* 53: 129-136.
162. Quay W.B. (1974) Pineal chemistry in cellular and physiological mechanisms. Ed. Springfield. Ill. Charles C. Tomas. New York.
163. Quay W.B., Bennett E.L., Rosenzweig M.R., Krech D. (1969) Effects of isolation and environmental complexity on brain and pineal organ. *Physiol. Behav.* 4: 489-494.
164. Quiles A. (2005). El binestar animal en relación a los animales de granja. *Información Veterinaria*. Mayo, 20-26.
165. Ramón y Cajal S. (1895) Apuntes para el estudio del bulbo raquídeo, cerebelo y origen de los nervios encefálicos. *Anal. De la Soc. Esp. de Hitol. Natur.*

166. Ramón y Cajal S. (1904) Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados II. Madrid, ed. Moya.
167. Ravault J.P., Chesneau D. (1999) The onset of increased melatonin secretion after the onset of darkness in sheep depends on the photoperiod. *J. Pineal Research* 27: 1-8.
168. Redecker P. (1989) Immunohistochemical localization of GFAP and Vimentin in the subcommisural organ of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Cell. Tissue Res.* 255(3): 595-600.
169. Redecker P. and Bargten G. (1993) Synaptophysin a common constituent of presynaptic secretory microvesicles in the mammalian pinealocyte: a study of rat and gerbil pineal glands. *J. Neurosci. Res.* 34(1): 79-96.
170. Redecker P., Grube D., Jahn J (1990) Immunohistochemical localization of synaptophysin (p38) in the pineal gland of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Anat. Embryol. (Berlin)* 181: 433-440.
171. Redondo E., Masot A.J., Gázquez A., Roncero V. Duran E. Piriz S. (1993) Experimental reproduction of acute pneumonic pasteurellosis in rabbits. *Histology and Histopathology* 8:97-104.
172. Redondo E., Franco A.J., Regodón S. (1996a) prenatal development of the sheep pineal gland: an ultrastructural study. *J. Pineal. Res* 21:140-148.
173. Redondo E., Franco A., Lopez C., Regodón S. (1996b) the presence of supportive cells in the prenatal development of sheep pineal gland. *Int. J. Dev. Biol. Supplement* 1: 211s.
174. Redondo E., Franco A., Masot A.J., Regodón S.(2001 a) ultrastructural and immunohistochemical characterization of interstitial cells in the developing sheep pineal gland. *European Journal Histochemistry.* 45 (3): 249-258.

175. Redondo E., Masot A.J., Franco A., Regodón S.(2001 b) immunohistochemical and ultrastructural characterization of pinealocytes in sheep prenatal development. *Revue Médecine Vétérinaire De Toulouse*. 152(7): 535-544.
176. Redondo E., Franco A., Lopez C., Regodón S. (2001 c) immunohistochemical and ultrastructural study of interstitial cells during postnatal development of the sheep pineal gland. *International Journal Develomental Biology* 45 (S1): S87-S88.
177. Redondo E., Regodon S., Masot A. J., Gázquez A., Franco A. (2003 a) postnatal development of female sheep pineal gland under natural inhibitory photoperiods: an immunocytochemical and physiological (melatonin concentration) study. *Histol. Histopathol.* 18 (1):7-17.
178. Redondo E., Regodon S., Franco A., Masot A.J., Albornoz L., Cardinali D.P. (2003 b) Day-night changes in plasma melatonin levels and ultrastructural properties of pinealocytes in developing female sheep under natural long and short photoperiods. *Histol. Histopathol.* 18(2): 333-342 .
179. Redondo E (2003c). Desde el poder y la fascinación de la oscuridad hasta la fuente de la eterna juventud: La historia de la melatonina. *Anales de la Academia de Ciencias Veterinarias de Extremadura*. Vol. 1, nºs 1-2 Badajoz, pp. 419-427. Depósito Legal: BA-84-2003.
180. Regodón S., Franco A., Masot A.J., Redondo E. (1998 a) Structure of ovine pineal gland during prenatal development. *J. Pineal Research* 25: 229-239.
181. Regodón S., Franco A., Masot A.J., Redondo E. (1998 b) Presence of pigment in the ovine pineal gland during prenatal development. *Histol. Histopathol.* 13: 147-154.

182. Regodón S., Masot A.J., Franco A., Redondo E. (2001) Postnatal maturation of parenchymal cell types in sheep pineal gland: an ultrastructural and immuno-electron microscopic study. *Revue Médecine Vétérinaire De Toulouse*. 152(4): 325-333.
183. Regodón S., Franco A., Regodon M^a T., Masot A. J., Redondo E. (2003) an immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide y in the sheep pineal gland during prenatal development. *Revue Médecine Vétérinaire De Toulouse*. 154(7): 205-210.
184. Reiter R.J. (1991) Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molec. And Cellular Endocrinol*. 79: 153-158.
185. Reiter R.J., Tan D.X., Qi W., Manchester L.C., Karbownik M., Calvo JR (2000) Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept*. 9 (3-4): 160-171.
186. Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5): 1177-1185.
187. Reviere M.M., Tillet Y., Pelletier J. (1991) Melatonin binding sites in the brain of sheep exposed to light or pinealectomized. *Neurosci Lett* 121(1-2): 17-20.
188. Romijn H.J. (1973) Structure of the innervation of the pineal gland of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) I: A light microscopic investigation. *Z. Zellforsch*. 139: 473-485.
189. Roux P. (1937) Contribution à l'étude de la glande pinéale ou épiphyse. Thèse de Doctorat Sciences. París.
190. Ruiz-Navarro A. (1986) Estudio Ultraestructural de la glándula pineal de ratas normales y castradas. *Acta Microscópica* 9 (1): 81-88.

191. Sadowky D.W., Yellon S., Mitchell M.D., Nathanielsz P.W.(1991) Lack of effect of melatonin on myometrial electromyographic activity in the pregnant sheep at 138-142 days of gestation (term 0 147 days). *Endocrinology* Apr., 128(4): 1812-1824.
192. Santiago-Moreno J., López-Sebastian A., González-Bulnes A., Gómez-Brunet A., Chemineau P. (2000) Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in muflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 40 (5): 421-430.
193. Sarrieu A.,Dussailant M., Moguilewsky M., Coutable D., Rostene PDW (1988) Autorradiographic localization of glucocorticosteroid bindings sites in rat brain after in vivo injection of [³H] RU 28362. *Neurosci lett* 92: 14-20.
194. Sato T., Kaneko M., Ekataksin W., Wake K. (1995) Expression of Neuron Specific Enolase in the pineal organ of the domestic fowl during post-hatching development. *Cell Tissue Res.* 279(1):25-36.
195. Schwerin M, Kanitz E, Tuchscherer M, Brussow KP, Nurnberg G, Otten W. (2005); Stress-related gene expression in brain and adrenal gland of porcine fetuses and neonates.; *Theriogenology*. Mar 1;63(4):1220-34.
196. Shalyapina VG, Rakitskaya VV. (2004); Reactivity of the hypophyseal-adrenocortical system to stress in rats with active and passive behavioral strategies.; *Neurosci Behav Physiol*. Oct;34(8):821-4.
197. Shavit Y, Weidenfeld J, DeKeyser FG, Fish G, Wolf G, Mayburd E, Meerson Y, Beilin B. (2005); Effects of surgical stress on brain prostaglandin E2 production and on the pituitary-adrenal axis: attenuation by preemptive analgesia and by central amygdala lesion.; *Brain Res*. Jun 14;1047(1):10-7.

198. Shedpure M., and Kumar A. (1995) The pineal gland: structural and functional diversity. *Indian J. of Exp. Biol.* 33: 625-640.
199. Sheridan M.N. and Reiter R.J. (1973) The fine structure of the pineal gland in the pocket gopher, *Geomys bursarius*. *Amer. J. Anat.* 136: 363-382.
200. Shiotani Y., Yamano M., Shiosaka S., Emson P.C. (1986) Distribution and origins of SP, CGRP, VIP and NPY containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neuroscience lett.*, 70: 187-192.
201. Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Nozdrachev A.D. (2000) Pinealocyte functioning in stress during daytime in rats. *Russ Fiziol Zh Lm I M Sechenova* 86(8): 1049-1056.
202. Smith M.A., Makino S., Kim S.Y., Kvetnansky R. (1995) Stress increases brain derived neurotropic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136(9):3743-3750.
203. Smith M.A., Makino S., Kim S.Y., Kvetnansky R. (1995) Stress increases brain derived neurotropic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136(9):3743-3750.
204. Sofroniew M.V., Cooper J.D., Svendsen C.N., Crossman P., Ip N.Y., Lindsay R.M., Zafra F., Lindholm D. (1993) Atrophy but not death of adult septal cholinergic neurons after ablation of target capacity to produce mRNAs for NGF, BDNF, and NT3. *J. Neurosci* 13: 5263-5276.
205. Srinivasan V. (2002) Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Indian J. Exp. Biol.* 40(6): 668-679.
206. Stankov B., Kanchev L.N. (1989). Influence of acute stress on the pineal activity during day-a nighttime. *Acta Physiol. Pol* 40(1):116-125.
207. Stenon N. (1670) *Discours sur l'anatomie du cerveau*. Paris.
208. Suzuki T. and Kachi T (1995) Immunohistochemical studies on supporting cells in the adrenal medulla and pineal gland of adult rat, specially on S-100 protein, glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Kaibogaku Zasshi. Apr.* 70(2): 130-139.

209. Tast A., Hálli O., Ahlström S., Andersson H., Love R.J., Peltoniemi O.A.T. (2001). Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt. *J. Pineal Res.* 30(1): 43-49.
210. Taylor MM, Samson WK. (2005); Stress hormone secretion is altered by central administration of intermedin/adrenomedullin-2.; *Brain Res.* May 31;1045(1-2):199-205.
211. Tiedemann F. (1823) Anatomie du cerveau contenant l`histoire de son développement dans le fœtus avec une exposition comparative de sa structure dans les animaux. Traduction Jourdan, Paris.
212. Tillet Y., Ravault JP., Selve C., Evin G., Castro B., Dubois MP. (1986) Immunohistochemical visualization of serotonin and melatonin in the sheep pineal gland using specific antibodies. *CR. Acad. Sci Paris* 303 Series III 77-82.
213. Tomás-Zapico C., Antonio Boga J., Caballero B., Vega-Naredo I., Sierra V., Alvarez-García O., Tolivia D., Cotomontes A. (2005) coexpresión of MT1 and RORalpha1 melatonin receptor in the Syrian hamster pineal gland. *J. Pineal Res.* 39(1): 212-26.
214. Tricoire H., Malpoux B., Möller M. (2003) Cellular lining of the sheep pineal recess studied by light-transmission-, and scanning electron microscopy : morphologic indication for a direct secretion of melatonin from the pineal gland to the cerebrospinal fluid. *J.Comp. Neurol* 456 (1): 39-47.
215. Tringali G, Pozzoli G, Vairano M, Mores N, Preziosi P, Navarra P. (2005); Interleukin-18 displays effects opposite to those of interleukin-1 in the regulation of neuroendocrine stress axis.; *J Neuroimmunol.* Mar;160(1-2):61-7.
216. Truettner J., Schmidt-Kastner R., Busto R., Alonso O.F., Loo J.Y., Dietric W.D., Ginsberg MK (1999) Expression of BDNF, NGF and HSP70 following fluid percussion brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 16(6): 471-486.

217. Udman R., Alumets J., Hakanson R., Loren I., Sundler F. (1980) VIP occurs in nerves of the pineal gland. *Experientia* 36: 1119-1120.
218. Uemura Y., Sugimoto T., Kikuchi H., Mizuno N. (1987) Changes of VIP like immunoreactivity in cerebrovascular nerve fibers after cervical sympathectomy in the dog. *Neurosci. Lett.*, 82: 6-10.
219. Uria H., Antolin I., Tolivia D., Rodríguez-Columba M.J., Menéndez-Peláez M. (1992) The pineal gland of the trumpettailed rat (*Octodon Degus*). *J. Pineal Res.* 13: 174-183.
220. Vaidya V.A., Terwilliger R.M., Duman R.S. (1999) Role of 5-HT_{2A} receptors in the stress induced down-regulation of BDNF factor expresion in rat hyppocampus. *Neurosci Lett* 262(1):1-4.
221. Van den Burg EH, Metz JR, Spanings FA, Wendelaar Bonga SE, Flik G. (2005); Plasma alpha-MSH and acetylated beta-endorphin levels following stress vary according to CRH sensitivity of the pituitary melanotropes in common carp, *Cyprinus carpio*.; *Gen Comp Endocrinol.* Feb;140(3):210-21.
222. Van den Burg EH, Peeters RR, Verhoye M, Meek J, Flik G, Van der Linden A. (2005); Brain responses to ambient temperature fluctuations in fish: reduction of blood volume and initiation of a whole-body stress response.; *J Neurophysiol.* May;93(5):2849-55.
223. Vangelova KK, Israel MS. (2005); Variations of melatonin and stress hormones under extended shifts and radiofrequency electromagnetic radiation.; *Rev Environ Health.* Apr-Jun;20(2):151-61.
224. Vaughan G.M. (1993) New sensitive serum melatonin radioimmunoassay employing the Kennaway G280 antibody: Syrian hamster morning adrenergic response. *J. Pineal Res.* 15: 88-103.
225. Vaughan G.M. (1993) New sensitive serum melatonin radioimmunoassay employing the Kennaway G280 antibody: Syrian hamster morning adrenergic response. *J. Pineal Res.* 15: 88-103.

226. Wachira SJ, Hughes-Darden CA, Nicholas HB Jr, Taylor CV, Robinson TJ. (2004); Neural melanocortin receptors are differentially expressed and regulated by stress in rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis.; *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. Sep;50(6):703-13.
227. Walker RF., McMaho K.M., Pivorun E.B. (1978) Pineal gland structure and respiration as affected by age and hypocaloric diet. *Exper.Gerontol*. 13: 91-99.
228. Wartenberg H. and Guserk W. (1965) Licht-und elektronenmikroskopische Beobachtungen über die struktur der epiphysis cerebri des kaninchens. *Progr. Brain Res*. 10: 296-316.
229. Weiger G. (1895) Beitrag zur kenntnis der normalen menschlichen Neuroglia. *Abhandlungen der Senckenbergerger Naturforscher-Gesellschaft Frankfurt a.M.*, Bd.19.
230. Welser J.R., Hinsman E.J., Stromberg M.W. (1968) Fine structure of the canine pinealocytes. *Amer. J. Vet. Res*. 29: 587-599.
231. Widmer IE, Puder JJ, König C, Pargger H, Zerkowski HR, Girard J, Müller B. (2005); Cortisol response in relation to the severity of stress and illness.; *J Clin Endocrinol Metab*. Aug;90(8):4579-86.
232. Young EA, Abelson J, Lightman SL. (2005); Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health.; *Front Neuroendocrinol*. Jul;25(2):69-76.
233. Zang E.T. (1991) Tyrosine hydrolase and neuropéptido Y immunoreactivie nerve fibers in pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res.*, 265: 63-71.
234. Zang X., Nilaver G., Stein B.M., Feteli M.R., Duffy P.E. (1985) Immunocytochemistry of pineal astrocytes: species differences and functional implications. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 44: 486-495.

235. Zarazaga L.A., Chemineau P., Malpoux B., Forcada F. (2000) La melatonina: síntesis, ritmo de secreción y catabolismo. Monografía ovis nº 71: 1-86.
236. Zarazaga L.A., Malpoux B., Bodin L., Chemineau P. (1998 b) The large variability in the blood levels in ewes in under strong genetic influence. *Am. J. Physiol.* 274 (4): 607-610.
237. Zarazaga L.A., Malpoux B., Chemineau P. (1997) The characteristics of the melatonin secretory rhythm are not modified by the stage of pregnancy in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 37 (1): 105-112.
238. Zarazaga L.A., Malpoux B., Guillaume D., Bodin L., Chemineau P.(1998 a) Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. *Am J. Physiol*, 274 (6): 1086-1090.
239. Zhong h., and Minneman K.P. (1993) Close reciprocal regulation of Beta1 and Beta 2-adrenergic receptors by dexamethasone in C6 glioma cells. Effects on catechjoline responsiveness. *Mol. Pharmacol.* 44: 1085-1093.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS**AGRADECIMIENTOS**

✚ En primer lugar y de forma muy especial, al Doctor D. ELOY REDONDO, profesor del Departamento de Medicina y Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura, director de esta tesis, por tantas y tantas cosas.

Por su ejemplo de investigador infatigable, faceta que nunca abandonó a pesar de otras muchas ocupaciones y que ha marcado su trayectoria profesional.

Por su ánimo constante, su apoyo, su paciencia al orientarme e instruirme, su delicadeza al reconducir mis múltiples deficiencias investigadoras, su tolerancia con mis otras actividades profesionales que me limitaban constantemente el tiempo de dedicación a la tesis.

Por haber sido siempre cercano, entrañable y amigo. Por haberme enseñado tanto, de ciencia y de vida, durante los muchos años en que he tenido la suerte de poder trabajar con él.

✚ A los Doctores D. JAVIER MASOT Y D. ANTONIO FRANCO, profesores del Departamento de Medicina y Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura, co-directores de esta tesis, por su marcada personalidad investigadora, por su inestimable ayuda, por su generosa colaboración científica y su ejemplo como científicos entusiastas que hacen progresar el capital de conocimiento de nuestra Universidad y de nuestra tierra extremeña.

Por su cariño, su amabilidad y su disponibilidad de todos estos años.

- ✚ Al doctor D. ANTONIO GAZQUEZ, catedrático del Departamento de Medicina y Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura, por su constante apoyo y hospitalidad. Durante todos los años en que he tenido la oportunidad de colaborar con el departamento, me ha hecho sentirme en mi casa, poniendo a mi disposición todo aquello que necesité. Siempre admiré y, por ello se lo agradezco, su entusiasmo por la vida y todo lo que le rodea y su increíble capacidad para entregarse en tareas polifacéticas que dan a sus investigaciones gran riqueza multidisciplinar.

- ✚ A la Consejería de Sanidad y Consumo y al Servicio Extremeño de Salud de la Junta de Extremadura , mis lugares de trabajo y la fuente de mi entusiasmo por luchar por una Extremadura mejor, por su ayuda y disponibilidad.

- ✚ Al Consejero de Sanidad de la Junta de Extremadura, D. GUILLERMO FERNANDEZ VARA y al Gerente del Servicio Extremeño de Salud , D. FRANCISCO GARCÍA PEÑA, por su apoyo y su amistad. Con su actitud cercana y entrañable, lograron en mi un estímulo permanente para poder realizar este trabajo, en el marco de otros muchos proyectos y ocupaciones.

- ✚ A todas las personas, compañeros y amigos, que con su callada colaboración ,su apoyo constante, su trato amable y su disponibilidad, han contribuido al estímulo necesario para que este trabajo fuese posible.

- ✚ A toda mi familia, y a Gaspar y a mis hijos, que dan sentido a mi vida y a los que ofrezco esta tesis como resultado de un nuevo reto, dedicado a la meta de todos nuestros desvelos, ser cada día mejores personas y esforzarnos por aquello con lo que soñamos.