

Inv. Pesq.	37 (1)	págs. 167-190	febrero 1973
------------	--------	---------------	--------------

Acción de la metopirona sobre el eje hipofiso-interrenal de la chucla (*Spicara maena*) (L.)

por

M. CARRILLO * Y S. ZANUY *

INTRODUCCIÓN

La 2-metil-1,2 bis (3-piridil)-1 propanona, compuesto sintetizado por ALLEN & col., es un inhibidor de la 11- β hidroxilasa cuando se inyecta a dosis bajas. La mayoría de los trabajos experimentales están relacionados con la disminución de los esteroides 11- β hidroxilados en el plasma o en la orina después de la administración de metopirona en el hombre o en el perro, asociados con un incremento de los correspondientes 11-desoxiesteroides.

GOLD y col., 1961, utilizaron esta propiedad específica, con el fin de medir la capacidad de la hipófisis para liberar ACTH, determinando el nivel de los 17 α -hidroxicorticoesteroides en el plasma y orina, después de liberar el bloqueo de cortisol con la metopirona. LIDDLE y col. (1958) demostraron que la 11 β -hidroxilasa es inhibida por la metopirona en sistemas «in vitro». Además de estas propiedades, la metopirona, ha permitido la identificación de las células corticotropas (ϵ), de la hipófisis, en diversos vertebrados.

En lo que se refiere a vertebrados inferiores, la metopirona, ha sido utilizada para estudiar la función pituitárica-adrenal en la anguila (OLIVEREAU, 1963, 1965; BALL & OLIVEREAU, 1966; OLIVEREAU & BALL, 1963b), *Poecilia latipinna* (BALL & SLICHER, 1962; OLIVEREAU & BALL, 1963a; BALL & OLIVEREAU, 1966), *Poecilia formosa* (OLIVEREAU & BALL, 1963a), *Protopterus s.p.* (JANSEN & col., 1965), *Oncorhynchus nerka* (FAGERLUND & col., 1968), *Mixine* (OLSSON & col., 1964), *Anoptich-*

* Instituto de Investigaciones Pesqueras, Paseo Nacional, s/n, Barcelona.

thys jordani (MATTHEIJ, 1958), *Cyprinus carpio* (LIERAY, 1968), *Rana temporaria* (Van KEMENADE & Van DONGEN, 1965; Van KEMENADE, 1959), resultados resumidos por OLIVIEREAU, 1971.

En la presente publicación, la metopirona será utilizada para identificar las células corticotropas de la hipófisis de *Spicara maena* L. y su acción sobre la interrenal. Este trabajo forma parte de un estudio anatómico e histofisiológico de la glándula hipófisis de *S. maena* en el que se identificaron los restantes tipos celulares y su evolución a lo largo del año.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos sobre *S. maena*, fueron realizados en enero de 1972, en el I.I.P. de Barcelona, utilizando machos adultos cuyos pesos estaban comprendidos entre 60 y 97 gr con una media de 84,11 gr; la talla total comprendida entre 18 cm y 21 cm (talla media 19,11 cm) y el I.G.S. entre 0,08 y 0,69. El índice gonosomático (I.G.S.) se tomó como indicador del estado sexual, y se calculó de acuerdo con la fórmula: $p \times 100/P$ (siendo p = peso de la gónada expresado en gramos y P peso del cuerpo expresado también en gramos). Los peces fueron mantenidos dentro de bolsas de plástico con agua circulante, las cuales se alojaron también en agua al mismo nivel —para facilitar las operaciones de manejo— a una temperatura de 13-14°C, con fotoperíodo natural. Las chuclas fueron alimentadas con sardina fresca, en días alternos.

El SW-4485* (metopirona), fue administrado diariamente a las chuclas por inyección intraperitoneal, ya que en experimentos anteriores se comprobó que las inyecciones de metopirona en la masa muscular dorsal, producían grandes ulceraciones, perdiéndose al administrarles el producto una gran cantidad de líquido, siendo además su absorción muy lenta.

El grupo estaba compuesto por 9 testigos, cinco de los cuales no recibieron tratamiento alguno, mientras que los cuatro restantes, eran inyectados diariamente con 0,1 ml de suero fisiológico al 7‰, junto con 100 ó 200 U.I. de Penicilina G sódica, para evitar posibles infecciones; estas inyecciones fueron administradas durante nueve días. El grupo experimental lo formaban 21 ejemplares, a los cuales se les inyectó SU-4885 diariamente, a lo largo de un período de nueve días y a una dosis constante de 10 mg en 0,1 ml de solución fisiológica al 7‰; cada inyección se acompañó de 100 ó 200 U.I. de Penicilina G sódica.

Los animales fueron sacrificados por decapitación rápida, para minimizar el «stress», 24 horas después de la última inyección, con el fin de tener la seguridad que el producto había sido totalmente absorbido.

* Suministrado por la CIBA (Barcelona).

El tejido interrenal, el hígado y las gónadas fueron fijados en Bouin alcohólico, y las hipófisis con Sublimado de Bouin Hollande (HERLANT, 1956). Las piezas fueron incluidas en parafina y se obtuvieron cortes de cuatro micras de espesor.

Las interrenales se tiñeron con Hematoxilina-eosina, Ácido periódico de Schiff (PAS) y Cleveland Wolfe (HERLANT, 1956). Las hipófisis se tiñeron utilizando varios métodos de tinción: Tetracromo de HERLANT (1960), Cleveland Wolfe (HERLANT, 1956), Azul alcian-PAS-Orange G HERLANT (1960), Aldehído Fucsina según GABE (1953), y Hematoxilina plúmbica de MAC CONAILL (1947) precedida por el PAS; ésta última se utilizó como coloración de rutina. La Hematoxilina plúmbica, tiñe selectivamente las células ϵ y un tipo de la «pars intermedia».

La superficie nuclear tanto de las células de la interrenal como la de las de la hipófisis, se midió a 2000 aumentos (1 división del micrómetro ocular utilizado = $0,48 \mu$; $1 \text{ div.}^2 = 0,23 \mu^2$). El número de núcleos medidos por animal fue de 60 para las interrenales y de 100 para la hipófisis.

El índice nuclear o número de núcleos existentes en una área estándar ($2464 \mu^2$ para las interrenales y $661,5 \mu^2$ para la hipófisis), se contó sobre 100 áreas para la hipófisis y 40 para las interrenales, en cada uno de los testigos y experimentales y a 2000 aumentos.

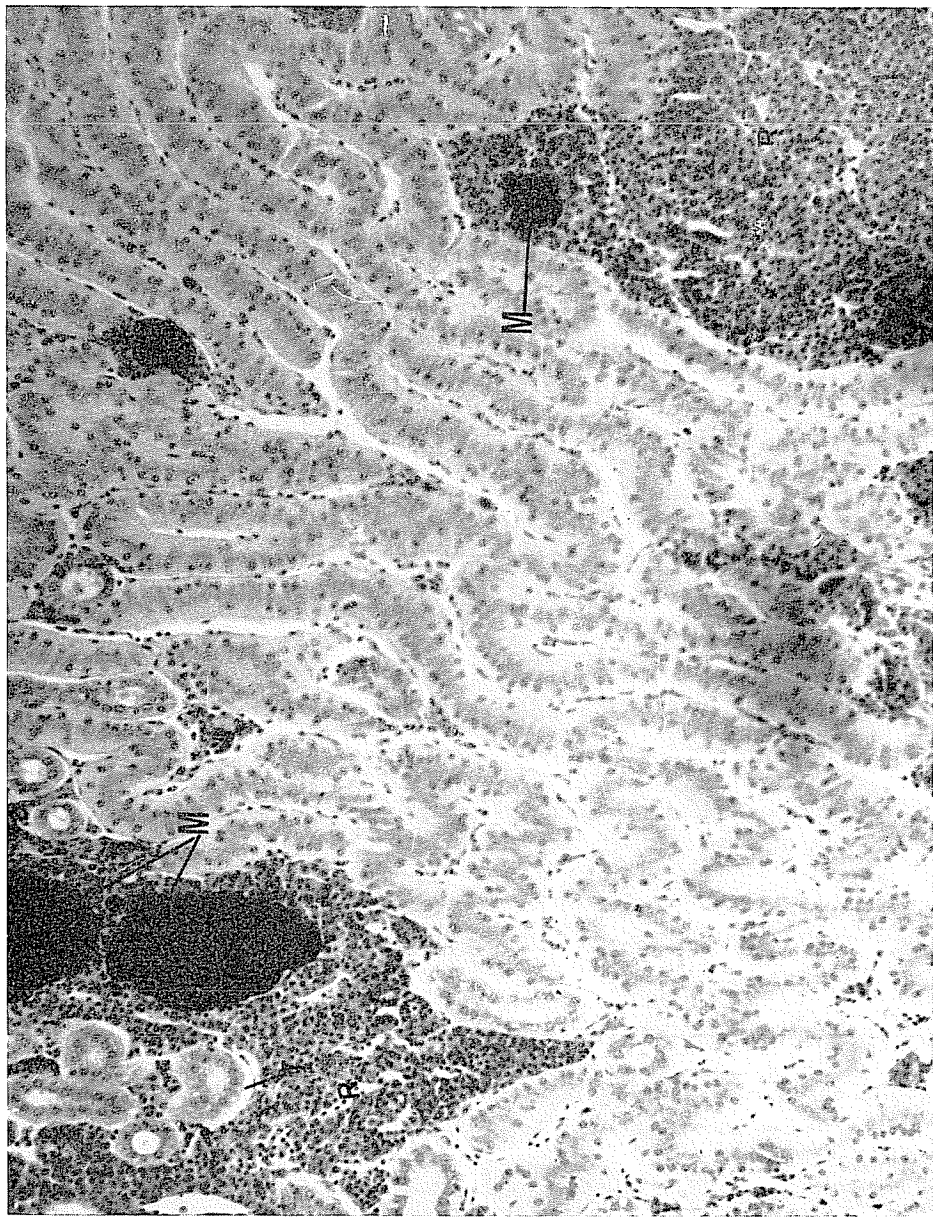
RESULTADOS

INTERRENALES

I. — *Testigos*. Las glándulas interrenales de *Spicara maena*, como las de la mayoría de los Teleósteos, no están individualizadas; los islotes glandulares se encuentran junto a las venas cardinales anterior y posterior, separados del lumen cardinal por un endotelio y diseminados en la masa linfoide del riñón cefálico, que es aplanado y alargado, de forma más o menos triangular; dicho riñón se encuentra muy próximo al corazón y representa $1/5$ de la longitud total del riñón.

Las células de las interrenales de *S. maena*, están dispuestas en cordones más o menos alargados que se van entrelazando entre sí; en la mayoría de los casos estos cordones presentan un espesor de dos capas celulares, nunca una sola, aunque ocasionalmente pueden presentar más de dos.

Los cordones celulares de los testigos, están muy próximos entre sí, o al menos ligeramente separados; la luz o espacio que dejan entre ellos, está generalmente vacío. Los límites de las células que los constituyen, son poco visibles; los citoplasmas, alargados poseen un núcleo periférico de forma redonda u ovalada (fot. 1,2).



Foro 1. — *Spicaria maena*. Perspectiva general de la glándula interrenal de un animal testigo que ha recibido cuatro inyecciones de suero fisiológico. R, tejido renal; T, túbulos renales; M, granulos de melanina. Hema-tóxilina-cosina, x 420.

La embriología de la glándula interrenal de los peces, es comparable a la de la corteza suprarrenal (GIACOMI, 1910, 1912). Las pruebas de una homología funcional entre estas dos glándulas, las dieron LÉLOUP-HALEY (1964).

En las chuclas del grupo de los testigos que no recibieron tratamiento alguno (ver material y métodos), la superficie nuclear varió entre

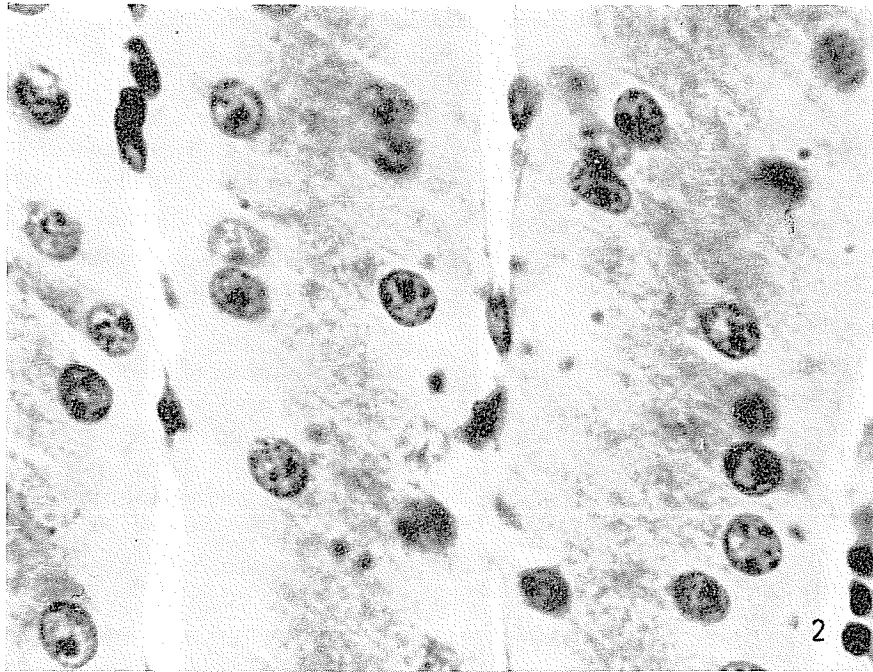


Foto 2. — *Spicara macna*. Ampliación de la glándula interrenal presentada en la fotografía 1 en la que se pone en evidencia la poca separación de los cordones celulares. Hematoxilina-eosina, $\times 3000$.

58,95 y 69,80 div.², con una media de $64,78 \pm 1,33$ div.². Los cuatro testigos que recibieron suero fisiológico al 7‰, tenían una superficie nuclear que variaba entre 58,75 y 70,54 div.², con una media de $64,33 \pm 1,55$ div.². Al hacer la prueba de significación (T de Student) entre ambos grupos, se vio que no eran significativamente diferentes, por lo que se les reunió, para formar un solo grupo de testigos. La superficie nuclear en este nuevo grupo, variaba entre 56,55 div.² y 70,54 div.², con una media de $64,58 \pm 0,94$ div.²; a este valor nos referiremos al comparar los testigos con los experimentales. La dimensión máxima encontrada para el nucléolo en los testigos, fue de 2 divisiones.

El índice nuclear, varió entre 22,88 y 28,33, con una media de $25,73 \pm$

0,68 para los nueve testigos, y no se vio alterado por el tratamiento con suero fisiológico al 7 ‰ (media 24,88 \pm 0,83).

II. — *Experimentales.* Los animales del grupo experimental, mostraron desde el primer día de tratamiento una pérdida de apetito, lo cual se tradujo en una ligera pérdida de peso, cuya media fue de 81,10 gr. Los 9 testigos dieron una media de 84,11 gr. La media de los pesos de las gónadas fue la misma tanto para los testigos como para los experimentales (0,30 gr).

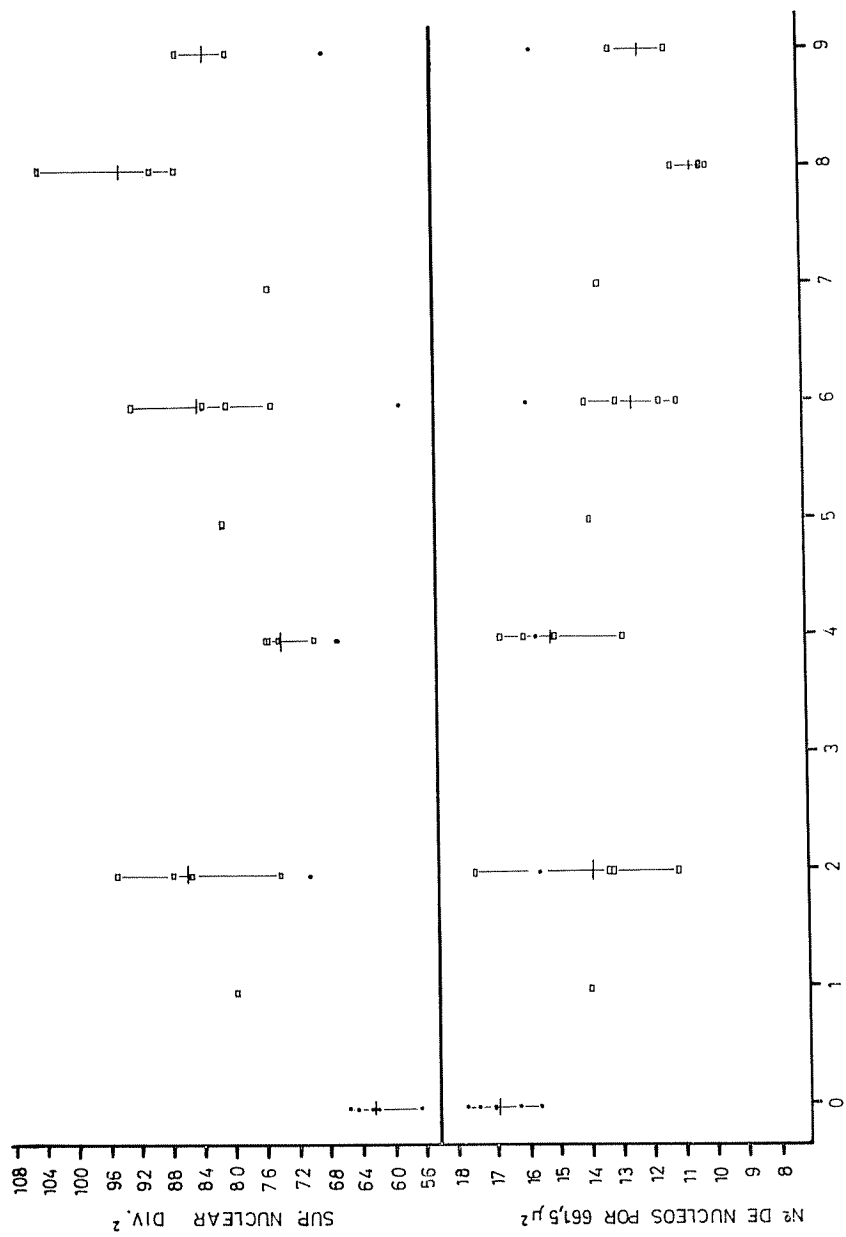
La disección nos mostró una vesícula biliar hipertrofiada y el hígado más amarillento en los experimentales. Los animales se tornaron progresivamente más asténicos. La pigmentación, en general fue más oscura, especialmente en la zona ventral, alrededor del punto donde fue aplicada la inyección.

a) *Primer día.* El único animal sacrificado en este día, no presentó ninguna diferencia con los testigos, ni en la superficie nuclear, ni en el índice (I.N.).

b) *Segundo día.* El citoplasma estaba ligeramente menos teñido que en los testigos, el nucléolo más destacado, los núcleos —fuertemente estimulados— presentaban una superficie variable entre 67,45 y 83,34 div.²; la media (75,62 \pm 1,72 div.²) era significativamente mayor que la de los testigos ($p < 0,01$, $T=3,67$), alguno de los núcleos hipertrofiados, llegó a medir 103,62 div.². El I.N. varió entre 24,20 y 28,43, con una media de 24,12 \pm 0,94, siendo ligeramente inferior al de los testigos ($p < 0,40$, $T=1,03$) (fig. 1).

c) *Del tercero al sexto día.* Durante este período la superficie nuclear, que era relativamente baja en el único animal sacrificado al tercer día (68,66 \pm 2,94 div.²), experimentó un aumento progresivo y constante a lo largo de los tres días siguientes; 70,47 \pm 1,64 div.² media de los cuatro animales del cuarto día (comparándola con la de los testigos, la superficie nuclear de los experimentales es significativamente mayor para una $p < 0,05$, $T=2,25$), el único animal del quinto día presentaba una superficie nuclear de 71,19 \pm 2,83 div.², y la de los del sexto día era de 74,66 \pm 1,74 div.², superior a la de los testigos $p < 0,02$, $T=2,87$ (fig. 1).

Las medias del I.N. para estos mismos días fueron: 25,15 \pm 1,74 para el tercer día, 23,98 \pm 0,26 para los del cuarto (ligeramente menores que en los testigos, $p < 0,30$, $T=1,27$); el quinto día presentó una superficie media de 24,75 \pm 1,78; en el sexto día, con cuatro animales, la media fue de 20,36 \pm 0,73 (comparándolos con los testigos $p < 0,01$, $T=4,42$). En este período, se vio que había una mayor irrigación sanguínea entre los cordones celulares (fot. 3 y 4); el número de figuras



NUMERO DE INYECCIONES

FIG. 1. — *Spicara macula*. Variaciones de la superficie nuclear y del conteo nuclear (numero de nucleos por $2.646 \mu^2$) en las células de la glándula interrenal por efecto del SU 4885. ●, testigos; □, experimentales; —, valor medio de los testigos al iniciar el experimento (punto cero) y los experimentales (sucesivos).

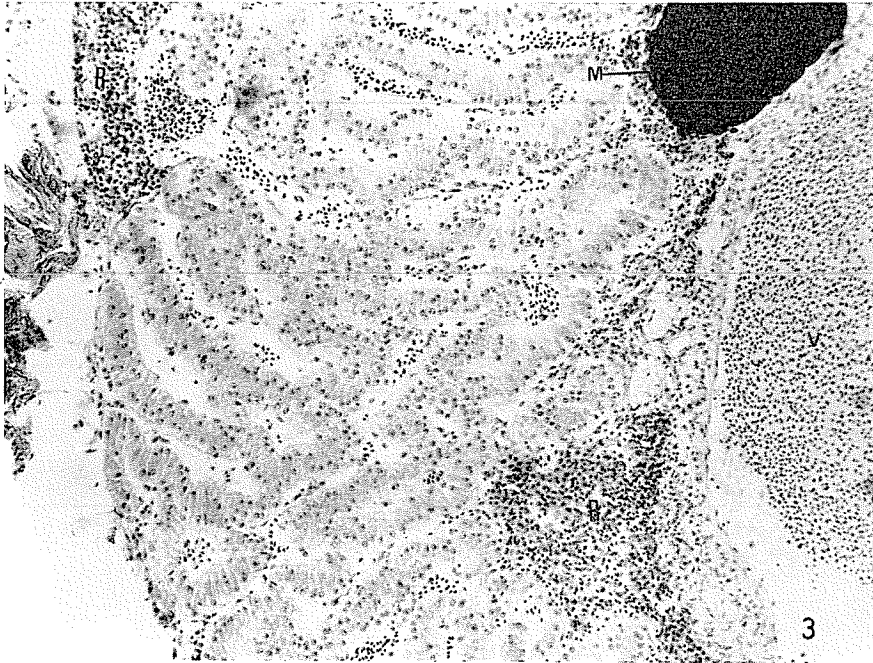


Foto 3. — *Spicara macna*. Perspectiva general de las glándulas interrenales de un animal experimental que ha recibido cuatro inyecciones de SU 4885, nótese la considerable separación de los cordones celulares y la gran irrigación sanguínea. V. vena cardinal; R, tejido renal; M, gránulo de melanina. Hematoxilina-eosina, $\times 310$.

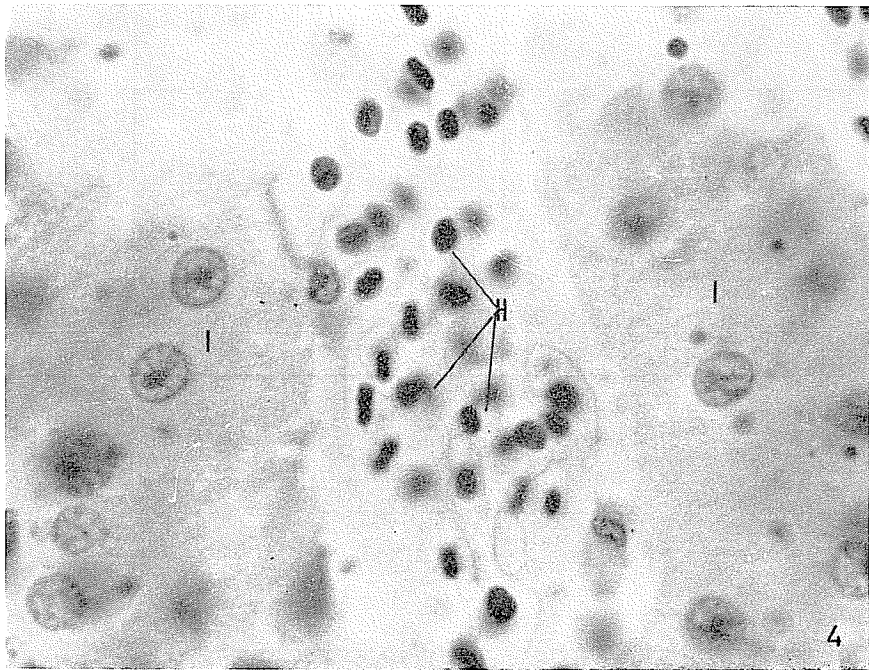


Foto 4. — *Spicara macna*. Detalle de la fotografía 3 que muestra la gran separación de los cordones celulares y el aumento de irrigación sanguínea. I, interrenal; H, hematíes. Hematoxilina-eosina, $\times 3000$.

mitóticas, fue máximo al sexto día, habiendo contado en un ejemplar hasta 25 mitosis en 25 campos a 800 aumentos. El alargamiento de los cordones celulares empieza a distinguirse a partir del cuarto día; en la periferia de las células se apreció vacuolización.

d) *Del séptimo al noveno día.* En este período la estimulación de la glándula interrenal llegó a ser máxima, la hipertrofia celular y nuclear fueron notables, el citoplasma celular se presentó muy vacuolizado, los cordones celulares se alargaron y adelgazaron, presentando en algunos casos un espesor de una sola célula. La separación entre ellos aumentó como consecuencia de una dilatación de los vasos sanguíneos y algunas veces, la luz estaba invadida con núcleos picnóticos. Los islotes glandulares, herniaban las paredes vasculares que, a su vez, se adelgazaban.

La superficie nuclear se incrementó desde 75,88 a 80,54 div.²; en el séptimo día la media fue de $80,54 \pm 2,42$ div.² para los tres del octavo día (media significativamente mayor de la de los testigos para $p < 0,01$ y $T=3,76$); en el noveno día, la media de los dos animales sacrificados ($77,36 \pm 3,90$ div.²) fue significativamente mayor de la de los testigos ($p < 0,05$, $T=2,75$).

El I.N. fue de $22,03 \pm 1,33$ para el único animal del séptimo día, de $18,55 \pm 1,14$ para los tres del octavo día ($p < 0,01$, $T=4,33$) y de $20,12 \pm 0,94$ para los dos del último día, siendo esta media significativamente menor de la de los testigos para $p < 0,02$ y $T=3,22$.

RIÑÓN

Desde la primera inyección se percibe una ligera vacuolización en las células del epitelio de los túbulos renales, la cual es muy notable a partir del tercer día; el núcleo de estas células se tiñe con menor intensidad, se vuelve turgente y se encuentra relegado hacia la luz del túbulo (fots. 5, 6, 7, 8). Los segmentos proximales y túbulos colectores, se afectan muy poco con el tratamiento, al igual que los glomérulos. El tejido linfoide que se encuentra entre los glomérulos, entre los túbulos y en las proximidades de la interrenal, tampoco se ve visiblemente afectado por el tratamiento.

HIPÓFISIS

El estudio detallado de esta glándula, como ya anunciábamos anteriormente, será objeto de un trabajo posterior. Nos limitaremos ahora a dar una descripción somera de sus tipos celulares y de la distribución de éstos.

La hipófisis de *S. macna* es de forma triangular. Como en todos los vertebrados, está formada por dos porciones atendiendo a consideracio-

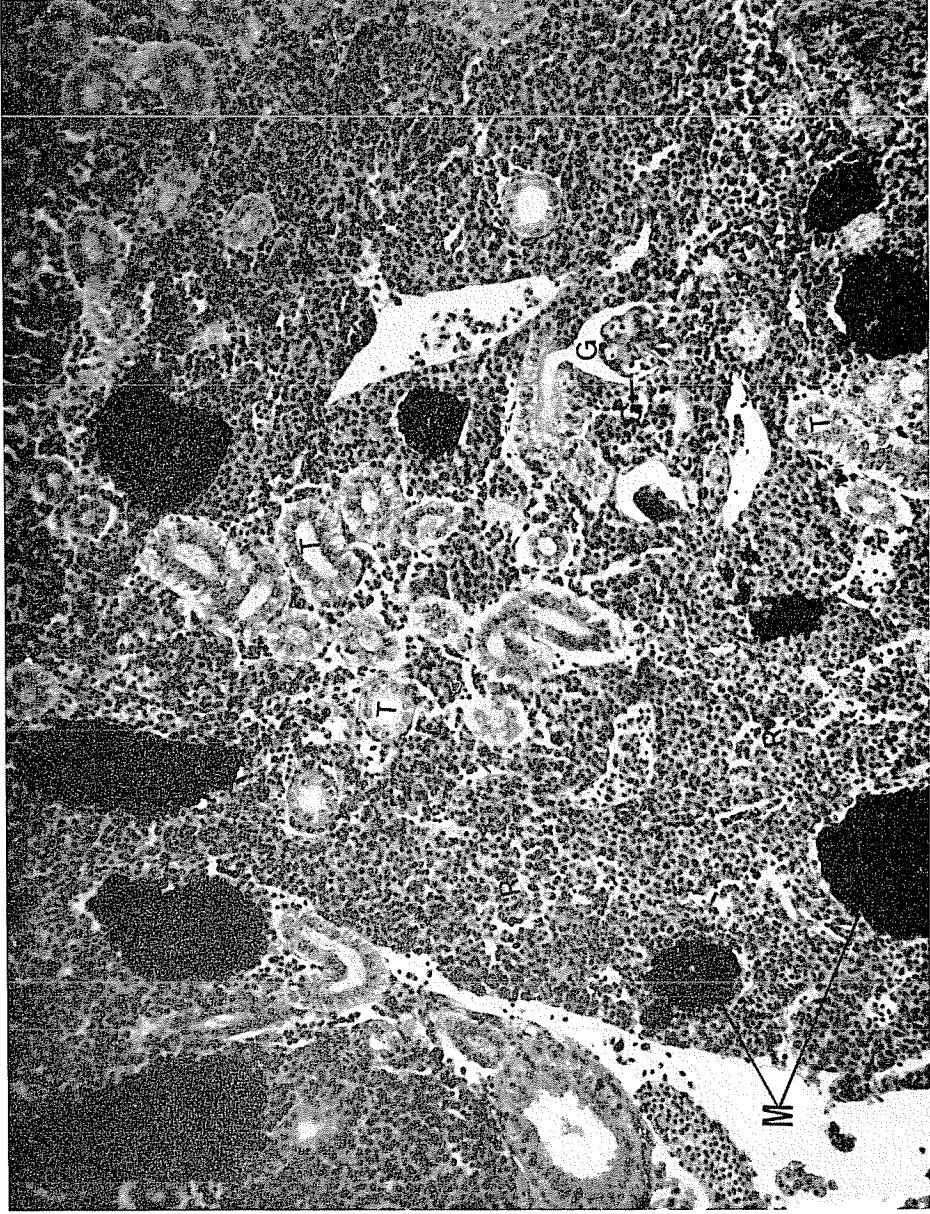


Foto 5. — *Spicara maena*. Perspectiva general del tejido renal de un testigo tratado con suero fisiológico. M, gránulos de melanina; G, glomérulo; T, túbulo renal. Hematoxilina-eosina. $\times 420$.

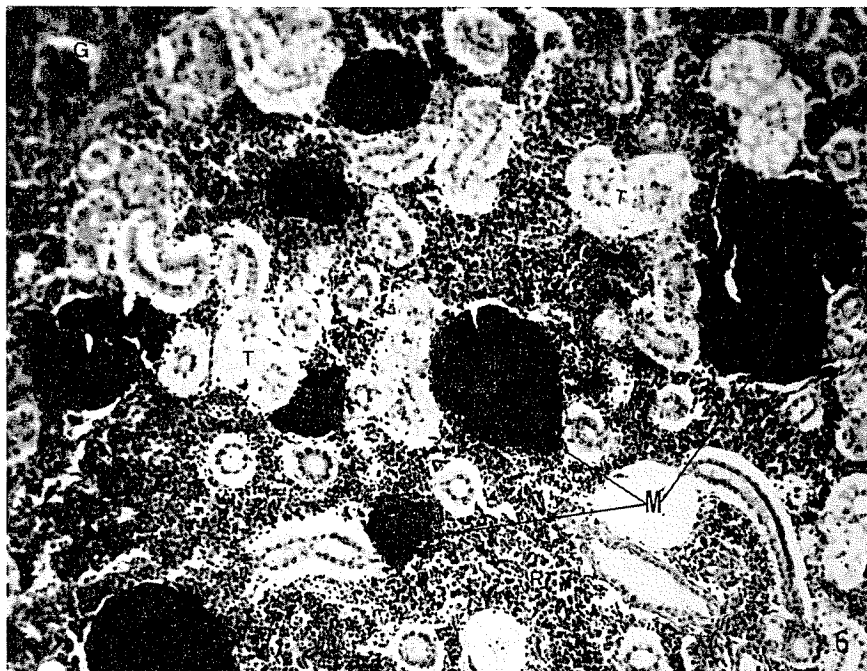


Foto 6. — *Spicara macna*. Perspectiva general del tejido renal de un ejemplar experimental que ha recibido cuatro inyecciones de metopirona. Obsérvese la fuerte vacuolización de los túbulos renales (compárese con la fotografía 5), las letras tienen la misma significación que en la fotografía anterior. Hematoxilina-eosina, $\times 310$.

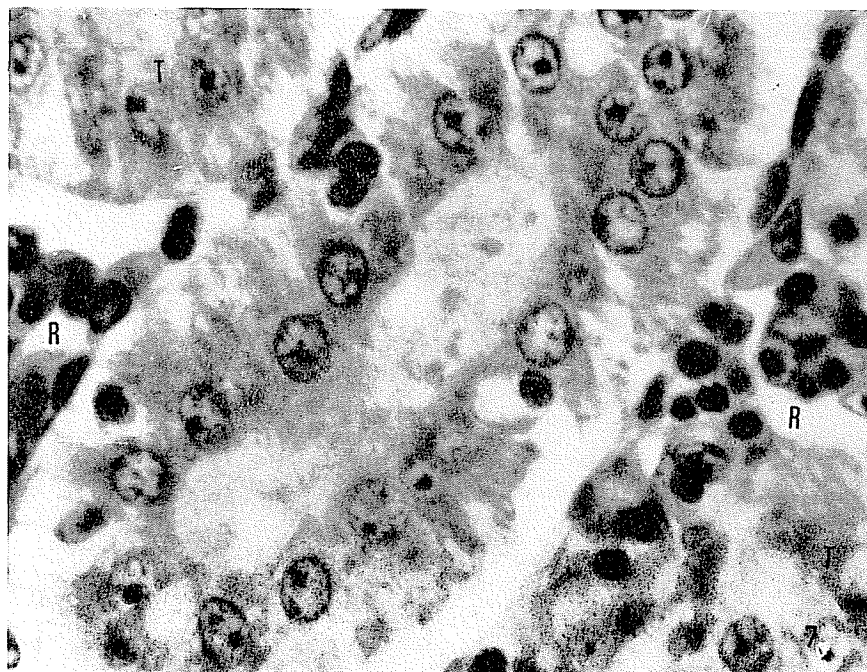
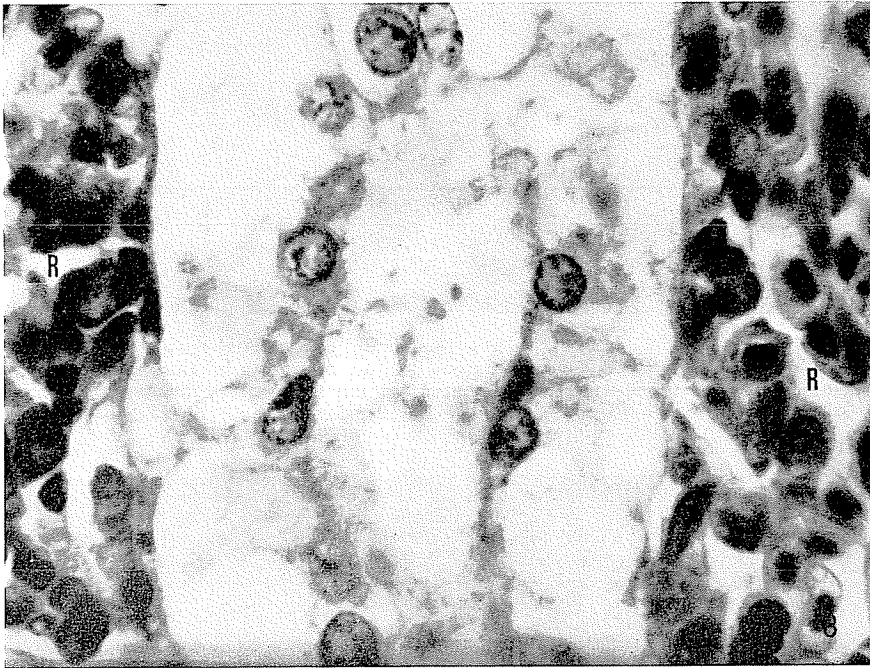


Foto 7. — *Spicara macna*. Detalle de un tútulo renal de la fotografía 5. R, tejido renal; T, tútulo renal. Hematoxilina-eosina, $\times 3000$.

nes de tipo embriológico, estructural y fisiológico: la neurohipófisis y adenohipófisis.

La adenohipófisis es el lugar de síntesis, almacenamiento y liberación al torrente circulatorio de diferentes hormonas proteicas; el objeto principal de la histofisiología de esta glándula, es determinar la localización de los tipos celulares que secretan dichas hormonas.



Foro 8. — *Spicara maena*. Detalle de un túbulo renal de la fotografía 6; nótese la intensa vacuolización de sus células. R, tejido renal. Hematoxilina-eosina, $\times 3000$.

La adenohipófisis se divide, a su vez, en «pars intermedia» y «pars distalis» (homóloga de la «pars distalis» anterior de los vertebrados superiores). Esta última, a su vez, está subdividida en los peces en «pars distalis rostral» y «pars distalis proximal».

En la «pars distalis rostral» de la chucla, encontramos tres categorías celulares: dos serosas y una glicoproteica PAS+; de las dos serosas, unas presentan afinidad por la Hematoxilina plúmbica (H. Pb.) y el Azul de Alizarina (células «e») (fot. 9) y las otras por la eritrosina y el Orange G. Estas últimas seguramente están relacionadas con la producción de prolactina.

En la «pars distalis proximal», se encuentran también tres categorías celulares: una sérica, fuertemente orangeófila, seguramente se trate de



Foro 9. — *Spicaria maena*. Perspectiva general de la «pars distalis rostral» de la hipófisis. N, neurohipófisis; C, células ACTH; PDR, pars distalis rostral; PDP, pars distalis proximal. PAS-Hematoxilina plumbica, $\times 420$.

células somatotropas y dos glicoproteicas, una de las cuales es positiva al PAS y negativa a la H. Pb. (posiblemente células FSH) y otra positiva al PAS y a la H. Pb. (seguramente LH). La existencia de estas dos clases de células gonadotropas en la hipófisis ha sido motivo de diversas controversias entre diferentes autores; sin embargo son muchos los que apoyan la posible existencia de estas dos categorías celulares (OLIVEREAU, 1967, 1961; OLIVEREAU & HERLANT, 1960; OLIVEREAU & RIDGWAY, 1962; CHAVIN & CARDELL, 1962; KNOWLES & VOLLRATH, 1966).

La «pars intermedia», posee dos tipos celulares: uno PAS+ y situado en las proximidades de la neurohipófisis que posee abundante neurosecreción y otro en estrecha relación con el anterior que presenta una fuerte afinidad por la H. Pb.

En este trabajo insistiremos solamente sobre las células « de la «pars distalis rostral».

I. — *Testigos*. La zona corticotropa presenta, generalmente, un espesor de 2 ó 3 capas celulares, comprendido entre las 15 y 20 div. Esta zona, como ya decíamos anteriormente, está situada en la «pars distalis

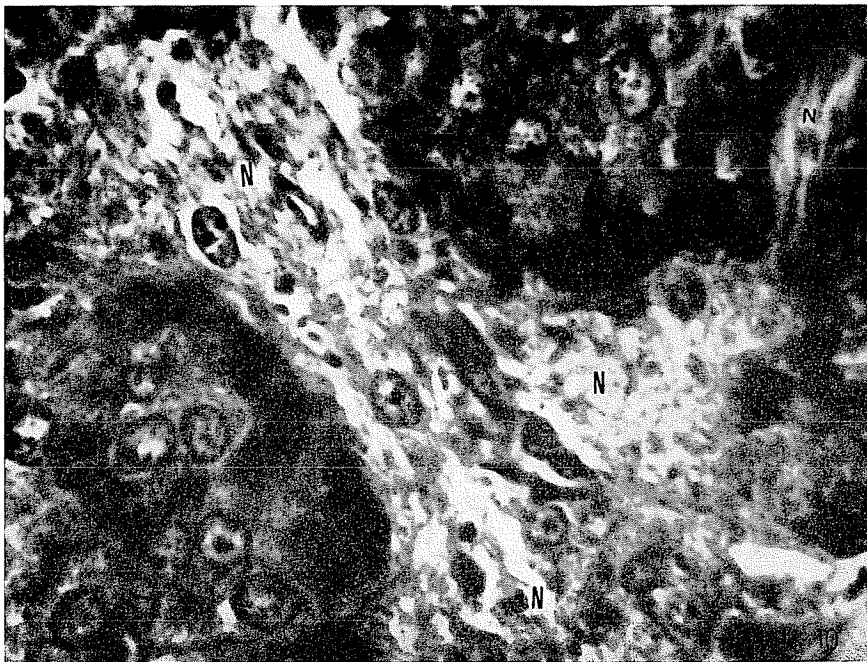


Foto 10. — *Spicara maena*. Hipófisis de un animal testigo que ha recibido seis inyecciones de suero fisiológico, las células corticotropas en el borde de la neurohipófisis están muy granuladas con un núcleo redondo u ovalado. N, neurohipófisis. PAS-Hematoxilina plúmbica, $\times 3000$.

rostral», formando una delgada capa celular a lo largo de las ramificaciones anteriores de la neurohipófisis. Estas células, como en la generalidad de los Teleósteos estudiados, no se tiñen con el PAS, alhído fucsina y azul alcian. Sus granulaciones presentan una débil afinidad por la eritrosina, aunque la mayoría de las veces se las ha definido como cromóforas; su característica más interesante es su afinidad por la H. Pb. que da una coloración negra a sus finas granulaciones, y por el azul de alizarina que las tiñe de color violeta. La coloración es mucho más intensa en los bordes celulares adyacentes a las digitaciones neurohipofisarias; el resto del citoplasma celular, con granulaciones como decíamos antes muy finas, presenta un aspecto pulverulento y se tiñe menos intensamente con ambos colorantes que los bordes adyacentes a la neurohipófisis (fot. 10). Topográficamente, las células ACTH de la *S. maena*, ocupan una posición idéntica a las de la anguila y *Poecilia latipinna* (OLIVEREAU & BALL, 1964); las reacciones tintoriales son cualitativamente idénticas, aunque menos intensas que en la anguila (OLIVEREAU, 1964).

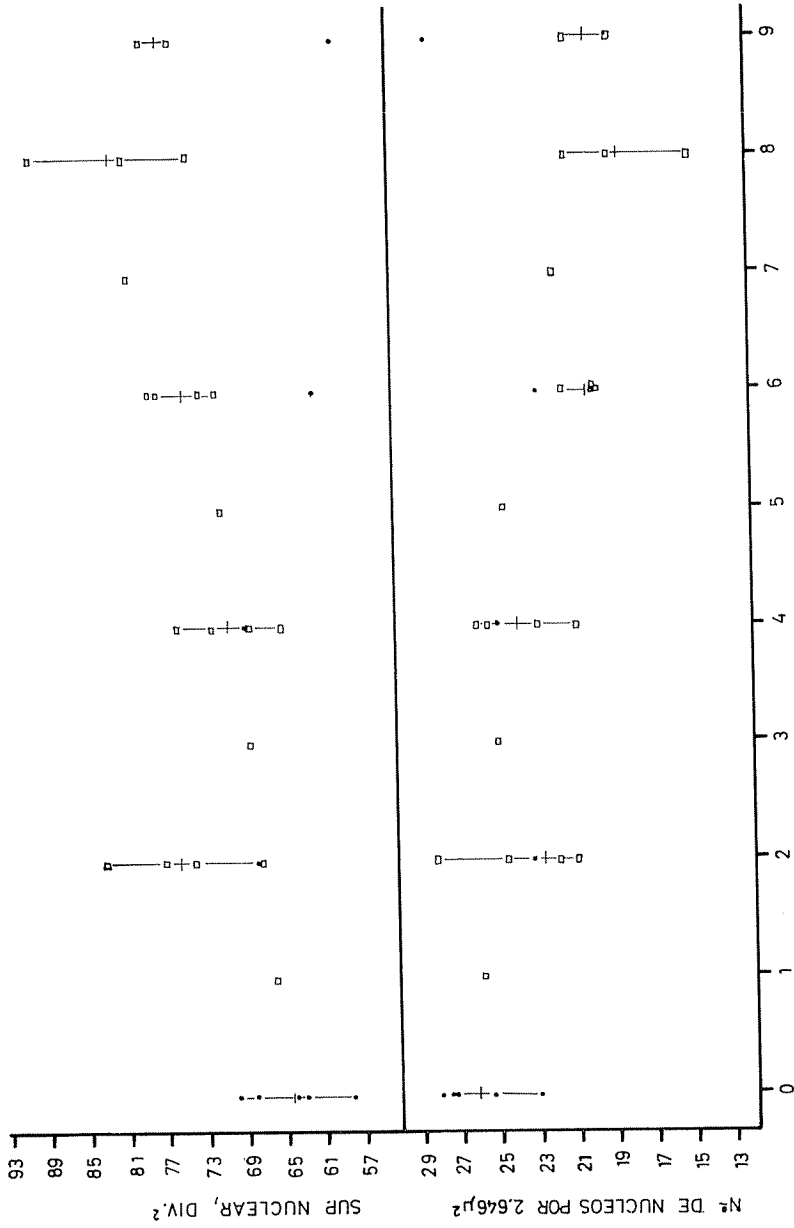
En las chuclas del grupo de los testigos que no recibieron tratamiento alguno, la superficie nuclear estuvo comprendida entre 56,55 y 65,54 div.², con una media de $62,35 \pm 1,79$ div.²; en los cuatro testigos tratados con suero fisiológico al 7‰, esta superficie varió entre 58,75 y 70,54 div.² (media $65,91 \pm 1,85$ div.²), habiéndose efectuado entre ambos grupos una prueba de significación (T de Student), y no siendo, en ningún caso, ambos grupos significativamente diferentes se les reunió en un solo grupo. La variación en la superficie nuclear ahora estaba comprendida entre 56,55 y 70,54 div.² con una media de $63,93 \pm 1,22$ div.²; a estos valores nos referiremos en la comparación con los resultados experimentales.

Los mismos criterios estadísticos fueron aplicados para el I.N., comprobándose que las medias entre los testigos intactos y los inyectados con solución fisiológica al 7‰, no eran significativamente diferentes en ninguno de los casos (media intactos $17,02 \pm 0,52$ y $15,76 \pm 0,44$ en los inyectados); la media de ambos grupos reunidos fue: $16,46 \pm 0,38$. Al comparar con los experimentales nos referiremos a ella.

II. — *Experimentales.* a) *Primer día.* — En el ejemplar que fue sacrificado el primer día, se nota ya una intensa degranulación citoplasmática de las células periféricas. La superficie nuclear alcanza un valor de $79,88 \pm 3,09$ div.², el núcleo aumenta de tamaño, y la capa de células corticotropas adquiere un grosor medio de 20 divisiones.

El I.N. es de $14,1 \pm 0,68$ (fig. 2).

b) *Segundo día.* La estimulación celular fue más marcada que en el primer día, las superficies nucleares individuales se incrementaron; la media de los cuatro animales sacrificados fue $85,46 \pm 1,56$ div.², siendo muy superior a la de los testigos ($p < 0,001$, $T=6,8$) (fig. 2); la degra-



NUMERO DE INYECCIONES

FIG. 2. — *Spizocara macra*. Variaciones de la superficie nuclear y del conteo nuclear (numero de núcleos por 661.5 μ²) en las células ACTH de la glándula hipófisis por efecto del SU 4885. ●, testigos; □, experimentales; —, valor medio de los testigos al iniciar el experimento (punto cero) y de los experimentales (sucesivos).

nulación aumenta, afectando principalmente a las células más periféricas y en su polo apical, los gránulos H. Pb.+ se acumulan en las terminaciones celulares adyacentes a la neurohipófisis, es decir, en su polo basal. El nucléolo es muy acusado y el núcleo es casi esférico (fot. 11).

El I.N. disminuye a medida que la superficie nuclear va aumentando (fig. 3), la media de los cuatro animales sacrificados este día posee un

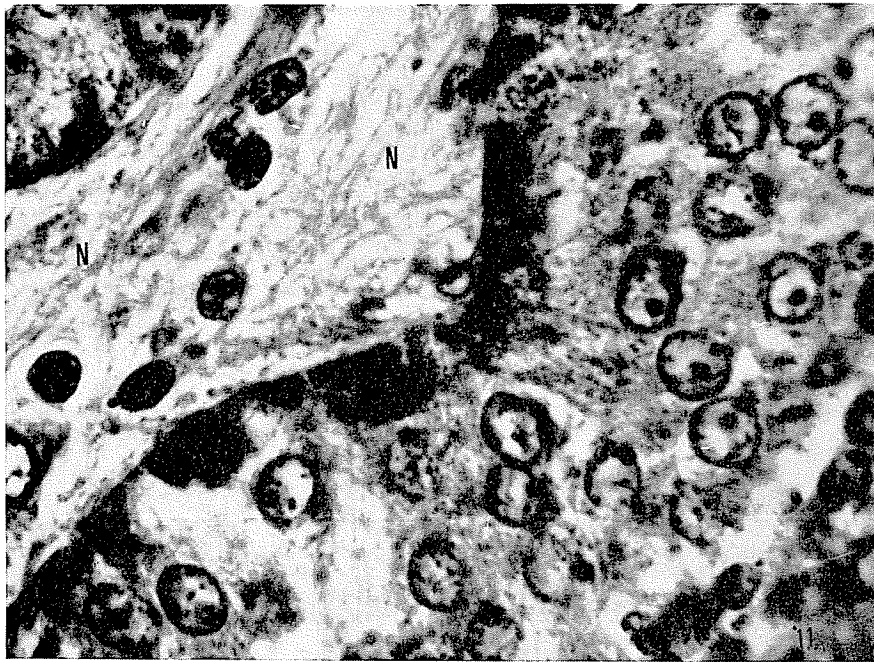


Foto 11. — *Spicara maena*. Hipófisis de un animal experimental que ha recibido seis inyecciones de metopirona, obsérvese la intensa degranulación celular, quedando los gránulos Hematoxilina plúmbica+ relegados a las terminaciones celulares que están en contacto con las ramificaciones neurohipofisarias (compárese con la fotografía 10), nótese también el aumento de tamaño de los núcleos. N, neurohipófisis.

PAS-Hematoxilina plúmbica, $\times 3000$.

valor para esta variable de $13,89 \pm 0,52$ siendo menor que el de los testigos para $p < 0,05$, $T=2,62$. Las células periféricas presentan una completa degranulación, el material secretado también se concentra en la proximidad de los vasos sanguíneos, la hipertrofia celular alcanza progresivamente a las células más internas.

c) *Cuarto día*. En los animales que recibieron la cuarta inyección de metopirona, la superficie nuclear varió de 69,94 a 75,84 div.², con una media de $73,92 \pm 1,69$ div.², siendo significativamente mayor que la de los testigos ($p < 0,01$, $T=4,13$). Se inició la vacuolización celular y se

incrementó notablemente la irrigación sanguínea ; el I.N. para los experimentales de este día fue ligeramente inferior al de los testigos, $15,23 \pm 0,44$ ($p < 0,3$, $T=1,09$).

d) *Del quinto al noveno día.* A partir del quinto día el aumento de la superficie nuclear fue progresivo. El único animal sacrificado en este quinto día dio un valor para la superficie nuclear de $81,05$ div.² ; los cuatro animales sacrificados en el sexto día dieron una media de $84,20 \pm 1,90$ div.², siendo este aumento muy significativo respecto a la media de los testigos ($p < 0,001$, $T=6,89$).

El espesor de las células ϵ se incrementó a lo largo de este período de 25 div. a 35 div., llegando en algunos casos hasta 40 div. (octavo día) ; el diámetro nucleolar alcanzó 3 div., aumento que representa el triple frente a los testigos (1 div.). En el octavo día el aumento de la media fue de $93,73 \pm 2,83$ div.² ($p < 0,001$, $T=7,68$). En el último día la media de los dos animales sacrificados fue $83,22 \pm 2,83$; comparando con la de los testigos ($p < 0,001$, $T=5,58$) resultó significativamente mayor (fig. 2).

El I.N. para este mismo lapso de tiempo fue de $13,92 \pm 0,68$, en el quinto día, de $12,47 \pm 0,36$ en los cuatro del sexto día que era inferior a la de los testigos ($p < 0,001$, $T=6,33$) ; $13,63 \pm 0,73$ en el séptimo ; en el octavo día la media de los tres animales sacrificados fue : $10,64 \pm 0,52$, significativamente menor de la de los testigos ($p < 0,001$, $T=10,03$) ; para el noveno día, media $12,16 \pm 0,52$, inferior a la media de los testigos ($p < 0,001$, $T=5,66$).

DISCUSIÓN

El mecanismo mediante el cual la metopirona produce sus efectos sobre el eje hipófisis-interrenal, presumiblemente es similar al de los Mamíferos.

La metopirona bloquea en particular la 11β -hidroxilación en los Mamíferos (DOMÍNGUEZ y col., 1963), inhibiendo la presencia de los principales corticoides : hidrocortisona, corticoesterona y aldosterona. Al no haber hidrocortisona en el torrente circulatorio, se elimina el principal inhibidor natural de la secreción de ACTH. El exceso de ACTH, actúa sobre las suprarrenales cuyas principales vías de esteroideogénesis están bloqueadas, produciendo un exceso de dos esteroides que en condiciones normales, se segregan en pequeñas cantidades : 11-desoxihidrocortisona y 11-desoxicorticoesterona ; la presencia de estos dos esteroides en exceso, produce una gran retención de sales en el organismo (GAUNT & col., 1961).

La evidencia de esta acción para la chucla, aunque indirecta e in-

completa, nos sugiere que la droga produce en los Teleósteos un efecto similar al que se encuentra en los Mamíferos.

BALL y OLIVEREAU (1966) establecieron que en *Poecilia latipinna* hipofisectomizada, la acción de la metopirona sobre la glándula interrenal, era ineficaz en lo que se refiere a su hipertrofia e hiperplasia celular, de lo que se deduce que la acción de la metopirona, en animales intactos, se realiza por mediación de la hipófisis y que el factor involucrado en ello por definición deberá ser la ACTH. Estos mismos autores, comprobaron una fuerte estimulación de las células productoras de ACTH en la hipófisis; dichas observaciones fueron corroboradas por las realizadas por FAGERLUND y col. (1968) inyectando SU 4885 y ACTH a dos Teleósteos (*Oncorhynchus nerka* y *Salmo gairdneri*), y midiendo luego la concentración de cortisol plasmático y su acción sobre la hipófisis y la interrenal.

En el presente estudio, todo parece indicar que la metopirona, inyectada a nuestros peces intactos, produce una fuerte estimulación en las células ϵ de la hipófisis, debido a un aumento en la secreción de ACTH. La estrecha sincronía entre la degranulación de las células ϵ y la de las de la interrenal, sin que ningún otro tipo celular hipofisario perteneciente a la «pars distalis rostral» muestre respuestas tan notables, nos indica que estas células son corticotropas; este argumento se ve reforzado si tenemos en cuenta que este tipo de células presenta una afinidad selectiva por la H. Pb. (que las tiñe de negro) y el azul de alizarina (que las tiñe de violeta) además de su localización en los bordes neurohipofisarios de la «pars distalis rostral».

La degranulación, muy marcada de las células corticotropas de la hipófisis durante la administración de metopirona, permite suponer una descarga del ACTH normalmente acumulado, equivalente a la «reserva hipofisaria» determinada en los tests clínicos. Esta hipersecreción del ACTH será la responsable de la hipertrofia de la interrenal.

La hiperplasia e hipertrofia de las células, los núcleos y los nucléolos y la hiperhemia y degranulación que se observan en las células de ACTH de la hipófisis y en las células de la interrenal de los animales tratados con SU 4885, son argumentos contundentes de que ha habido una fuerte estimulación en estos tipos celulares.

Las variaciones que se observan en la superficie nuclear, tanto de las células ϵ de la hipófisis como de las de la interrenal en los días 3, 5, 7 de tratamiento con SU 4885, pueden atribuirse al escaso número de individuos, pero este punto es poco importante comparado con el conjunto de datos que muestran una estimulación muy satisfactoria y estadísticamente diferente de los testigos. El aumento de la superficie nuclear de las células ϵ , tratadas con SU 4885 durante los nueve días, y consideradas en un solo grupo, es altamente significativo si lo comparamos con la

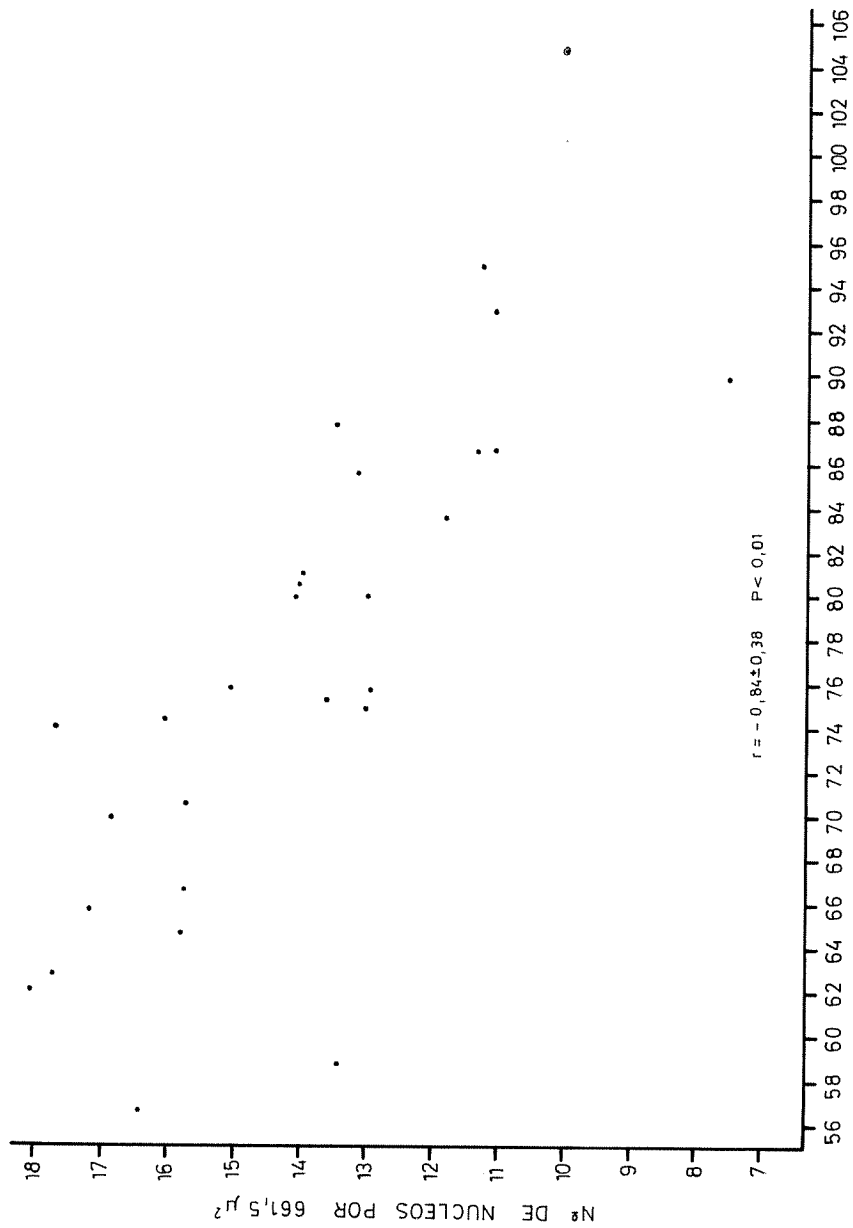


FIG. 3. — *Spicara maena*. Relación entre la superficie nuclear y el número de núcleos por 661,5 μ^2 de las células ACTH de la hipófisis. Cada punto representa un animal.

superficie media del grupo de los testigos ; valor medio $82,90 \pm 1,01$ div.² ($p < 0,001$, $T=4,53$).

Puesto que las superficies celulares se incrementan, el I.N. disminuye (ver fig. 3); sin embargo, esta disminución del número de núcleos contados en una superficie estándar no es muy notable en los primeros días de experiencia; pero dicho índice disminuye de una manera continua a medida que avanza el tratamiento, quedando de esta manera, perfectamente establecida su tendencia (ver resultados y figs. 1 y 2).

Los datos expresados en las figs. 1 y 2, nos muestran una estimulación máxima localizada en el segundo día de tratamiento, observándose en los días 3 y 4 una ligera disminución, seguida de un aumento progresivo, para alcanzar un nuevo máximo en el octavo día; el número de peces con que contamos, no permite precisar, si este comportamiento obedece a una evolución fisiológica de los peces o a variaciones individuales de los mismos.

El aumento de la pigmentación en las chuclas tratadas con SU 4885 puede estar también relacionado con una descarga de hormonas hipofisarias. CHAVIN (1959) demostró el papel de la ACTH en la melanogénesis del Carpin pero no podemos excluir la participación de la intermedina en este proceso. En la anguila los melanóforos, responden directamente ante la intermedina (WARRING, 1963), en esta misma especie OLIVEREAU (1965) estudió la acción de la metopirona sobre el sistema hipofiso-corticosuprarrenal y observó, que además de la correspondiente estimulación de las células ACTH, había una degranulación, con anisocariosis parcial de un tipo celular de la «pars intermedia». Nosotros hemos constatado que, en la chucla, existe una hipertrofia celular de este mismo tipo de células hipofisarias, coloreables por la Hematoxilina plúmbica, que refuerza esta hipótesis, cuyo estudio detallado, será objeto de un trabajo posterior.

El examen del riñón aporta un argumento a favor de la acción probablemente tóxica de la metopirona en la chucla. La reabsorción del agua se efectúa al nivel del túbulo renal y desde los primeros días de tratamiento, las células del epitelio tubular se tornan turgescientes y vacuolizadas (fots. 6 y 8); esta observación coincide con la efectuada por OLIVEREAU (1963) en la anguila. Dicha autora aconseja una cierta prudencia en la administración de esta droga como diurético, en el hombre, puesto que siempre debe ir asociada a la dexametasona y a un salidiurético.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos efusivamente a la Dra. M. Olivereau del Laboratorio de Fisiología del Instituto Oceanográfico de París, la valiosa ayuda prestada en todo momento, y al Dr. P. Arté, investigador del Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona, quien ha hecho posible la obtención de los ejemplares utilizados y su mantenimiento en condiciones experimentales.

SUMMARY

METOPIRONE EFFECT ON THE PITUITARY-INTERRENAL AXIS OF *Spicara maena*, L. (Teleost fish). — Metopirone (SU 4885) an inhibitor of the β hydroxylation of adrenocorticosteroids, was administered by intraperitoneal injection to 21 *Spicara maena* for one to nine days.

Corticotropic cells are easily identified; they were located in the rostral pars distalis of the pituitary gland, bordering the neurohypophyseal strands, they are stainable with erythrosin, alizarin blue and lead hematoxylin. They rapidly react by hypertrophy, degranulation and vacuolization; simultaneously, similar changes occur in the interrenal tissue with mitotic activity. This is a good evidence that the drug induces, an hypersecretion in ACTH cells of the pituitary gland.

The treated *Spicara maena* turn darker, the stainable cells with lead hematoxylin in the pars intermedia are hypertrophied. In the Kidney, vacuolization of the tubules occurs, modifications are discussed in relation to water metabolism. Metopirone provokes pituitary-adrenocortical reactions which can be compare to the ones of the higher vertebrates and constitutes an interesting method for identification of corticotropic cells, of *Spicara maena*.

BIBLIOGRAFÍA

- BALL, J. N., & A. M. SLICHER. — 1962. Influence of hypophysectomy and of an adrenocortical inhibitor (SU 4885) on the stress response of the white blood cells in the Teleost fish, *Molliesia latipinna* Le SUEUR. *Nature*, 196: 1331-1332.
- BALL, J. N., & M. OLIVEREAU. — 1966. Identification of ACTH cells in the pituitary of two Teleost, *Poecilia latipinna* and *Anguilla anguilla*: Correlated changes in the interrenal and in the pars distalis resulting from administration of metopirone (SU 4885). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 6: 5-18.
- CHAVIN, W. — 1959. Pituitary hormones in melanogenesis. Dans «*Pigment Cell Biology*» (M. Gordon, ed.). Academic Press, New York, 63-83.
- CHAVIN, W. & A. R. CARDELL. — 1962. *Abstr. II^m Ann. Meeting Amer. Soc. Cell Biol.*, p. 34; cité par CARDELL. — 1964. *J. vetrastruct. Res.*, 20: 317-333.
- DOMÍNGUEZ, O. V. & L. T. SAMUELS. — 1963. Mechanism of inhibition of adrenal steroid 11 β -hidroxylase by Methopyrapona (Metopirone). *Endocrinology*, 73: 304-309.
- FAGERLUND, U. H. M., J. R. MCBRIDE & E. M. DONALDSON. — 1968. Effect of metopirone on pituitary interrenal fuction in two Teleost sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 25 (7): 1465-1474.
- GABE, M. — 1953. Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. *Bull. Micro. appl.* 3, n.º 11-12: 153-162.
- GAUNT, R., J. J. CHART & A. A. RENZI. — 1961. Endocrine Pharmacology. *Science*, 133: 613-621.
- GIACOMINI, E. — 1910. Il sistema interrenale e il sistema cromaffine (Sistema feocromo) in alcune specie di Teleostei con reni cefolico (pronefros) persistente. Caratteri differenziale fra interrenale anteriore e corposcoli di Stannius Cennosullo sviluppo di quest organi nei Salmonidi. *Rend. R. Accad. Sci. Ist. Bologna*, 14: 86-103.
- 1912. Anatomia microscopica e sviluppo del sistema interrenale e del sistema cromaffine (Sistema feocromo) dei Salmonidi. *Parte II. Sviluppo, Mem. R. Accad. Sci. Ist. Bologna*, 9, Ser. VI: 381-439.
- GOLD, E. M., J. R. KENT & P. H. FORSHAM. — Clinical use of a new diagnostic agent, Methopyrapone (SU 4485) in pituitary and adenocortical disorders. *Ann. Intern. Med.*, 54: 175-188.
- HERLANT, M. — 1956. Corrélations hypophysogénitales chez le femelle de la chauve-souris, *Myotis myotis* (Borkhausen). *Arch. Biol.*, 67: 89-180.
- 1960. Etude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull. Micr. Appl.*, 10: 37-44.
- JANSSSENS, P. A., G. P. VINSON, CHESTER-JONES & W. MOSLEY. — 1965. Amphibian characteristics of the adrenal cortex of the african lungfish (*Protopterus sp.*). *J. Endocrinol.*, 32: 373-382.
- KEMENADE, J. A. M. Van. — 1969. The effects of metopirone and aldactone on the pars distalis of the pituitary, the interrenal tissue and the interstitial tissue of the testis in the common frog, rana temporaria. *Z. Zellforsch.*, 96: 446-447.
- KEMENADE, J. A. M. Van & W. J. Van DONGEN. — 1965. Adrenal cortical activity in the common frog, rana temporaria. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5: 712.
- KNOWLES, F. & L. VOLLRATH. — 1966. Neurosecretory innervation of the pituitary of the eels *Anguilla* and *Conger*. 11 The structure and innervation of the pars distalis at different stages of the life cycle. *Phil. Trans. Roy. Soc. Ser., B*, 250 (b): 329-342.

- LELOUP-HATEY, J. — 1964. Fonctionnement de l'interrenal antérieur de deux Téléostéens : le Saumon atlantique et l'Anguille européenne (étude expérimentale et influence de la migration). *Ann. Inst. Océanogr. Monaco*, 42 : 221-338.
- LERAY, C. — 1968. Étude histophysiological de l'hypophyse chez le Muge et la Carpe. Ses corrélations avec l'hypothalamus, la thyroïdes et les gonades. *Thèse Doct. Sci. Nat. Univ. Aix-Marseille*, 1-300.
- LIDDLE, G. N., D. ISLAND, E. M. LANCE & A. P. HARRIS. — 1958. Alterations of adrenal Steroid patterns in man resulting from Treatment with a chemical inhibitor of 11- β -hydroxylation. *J. Clin. Endocrinol.*, 18 : 906.
- MAC CONAILL, M. A. — 1947. The staining of the central nervous system with lead-hematoxylin. *J. Anat. (London)*, 81 : 371-372.
- MATTHEIJ, J. A. M. — 1968. The ACTH cells in the adenohipophysys of the mexican cave fish *Anoptichthys jordani*, as identified by metopirone (SU 4885) treatment. *Z. Zellforsch.*, 92 : 588-595.
- OLIVEREAU, M. — 1960. Étude volumétrique de l'interrenal antérieur au cours de la smoltification de *Salmo salar* L. *Acta Endocrinol.*, 33 : 142-156.
- 1961. Maturation sexuelle de l'Anguille mâle en eau douce. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 252 : 3660-3662.
- 1963. Métopirone et interrenal chez l'Anguille, *Anguilla anguilla* L. *C. R. Soc. Biol.*, 157 : 1207-1211.
- 1964. L'hématoxyline au plomb permet-elle l'identification des cellules corticotropes de l'hypophyse des Téléostéens? *Z. Zellforsch.*, 63 : 496-505.
- 1965. Action de la métopirone chez l'Anguille normale et hypophysectomisé, en particulier sur le système hypophysocorticosurrenalien. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3 : 723.
- 1970. Coloration de l'hypophyse avec l'hématoxyline au plomb (H.Peb.) donnés nouvelles chez les Téléostéens et comparaison avec les résultats obtenus chez d'autres vertébrés. *Acta Zool. (Stockl.)*, 51 : 229-249.
- OLIVEREAU, M. & J. N. BALL. — 1963a. Cytophysiology adenohipophysaire chez un poisson : *Mollinensia species*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3 : 723.
- 1963b. Fonction corticotrope et cytologie hypophysaire chez deux Téléostéens : *Mollinensia latipinna* Le Sueur et *Anguilla anguilla* L. *Compt. Rend.*, 256 : 3766-3769.
- 1964. Contribution à l'histophysiology de l'hypophyse des Téléostéens, en particulier de celle de *Poecilia species*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 4 : 523-532.
- OLIVEREAU, M. & M. HERLANT. — 1960. Étude de l'hypophyse de l'Anguille mâle au cours de la reproduction. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 154 : 706-709.
- OLIVEREAU, M. & J. RIDGWAY. — 1962. Cytologie hypophysaire et antigène sérique en relation avec la maturation sexuelle chez *Oncorhynchus species*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 253-755.
- OLSSON, R., B. FERNHOLM & A. FRENNE. — 1965. Cytology of the Myxine adenohipophysys. *Naturwissenschaften*, 52 : 92.
- WARING, H. — 1963. «Color change mechanisms of cold-blooded vertebrates», pp. 266. Academic Press, New York & London.