

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ORGANIZACIÓN
ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PINEAL EN LA
ESPECIE OVINA

DIEGO DUALDE BELTRÁN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 12 de Juliol de 2003 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Víctor Smith Agreda
- Dra. D^a. Amparo Ruiz Torner
- Dra. D^a. María Castaño Rosado
- Dra. D^a. María Pilar García Palencia
- Dr. D. Miguel José Pérez Bacete

Va ser dirigida per:

Dr. D. Francisco Martínez Soriano

Dra. D^a. Cristina Novoa Martínez

©Copyright: Servei de Publicacions
Diego Dualde Beltrán

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5769-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ORGANIZACIÓN
ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PINEAL
EN LA ESPECIE OVINA**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Diego Dualde Beltrán

DIRIGIDA POR:

Prof. Dr. D. Francisco Martínez Soriano

Prof^a. Dra. D^a. Cristina Novoa Martínez

Valencia, mayo de 2001



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO CIENCIAS MORFOLOGICAS
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

Av. Blasco Ibáñez, 15
Teléfono 386 48 07/08 - Fax 386 48 07
46010 VALÈNCIA

FRANCISCO MARTÍNEZ SORIANO, CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA, Y

CRISTINA NOVOA MARTÍNEZ, DOCTORA EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE MADRID Y PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL II DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

COMO DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR EL LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA DON DIEGO DUALDE BELTRÁN,

CERTIFICAN:

Que el doctorando DON DIEGO DUALDE BELTRÁN ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión todos los trabajos que ha supuesto la ejecución de su Tesis Doctoral en Medicina y Cirugía titulada ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PINEAL EN LA ESPECIE OVINA.

Que la mencionada Tesis Doctoral en Medicina y Cirugía constituye una importante aportación al conocimiento de la glándula pineal, como trabajo de investigación y desde el punto de vista de la anatomía comparada, ya que la pineal de la especie ovina tiene mucha similitud con la de la especie humana. A juicio de los firmantes, dicho trabajo contiene las contribuciones personales de carácter científico suficientes para que figure como Tesis de Doctorado, y están de acuerdo con su presentación para ser juzgada.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, de acuerdo con las disposiciones vigentes, extendemos el presente certificado en Valencia, a catorce de mayo de dos mil uno.

Fdo.: Francisco Martínez Soriano



Fdo.: Cristina Novoa Martínez

*A mi esposa Judit
A mis padres Diego y Delfina*

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la ayuda recibida por parte de varias personas e instituciones, motivo por el cual les queremos expresar nuestro agradecimiento.

En primer término al Profesor Dr. Don Francisco Martínez Soriano, Catedrático del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valencia, gran especialista en glándula pineal, el cual desde hace muchos años, concretamente a partir de su estancia en Alemania con el Prof. Lutz Vollrath al comienzo de la década de los años 80, inició una línea de investigación sobre dicho órgano, la cual ha dado ya muchos frutos. Bajo su dirección han visto la luz muchos libros, tesis, publicaciones, presentaciones a congresos, etc. todo lo cual determina que actualmente el Prof. Martínez Soriano esté considerado como una verdadera autoridad en la materia. El hecho de que aceptara la dirección de nuestra Tesis Doctoral, aparte de motivos de gratitud, supone un honor para nuestro trabajo.

Habida cuenta que nuestras investigaciones están orientadas al estudio de la pineal en la especie ovina, creímos oportuno que nuestra Tesis Doctoral fuera asimismo dirigida por la Profesora Dra. D^a. Cristina Novoa, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal II de la Universidad Complutense, la cual desde hace tiempo ha dedicado su atención a estudios sobre sistema neuroendocrino, así como a la aplicación de modernas técnicas de inmunocitoquímica en histología normal y patológica. Por lo tanto su incorporación a la Dirección de nuestra Tesis ha sido fundamental, dada su experiencia en los citados campos. Por ello, le expresamos nuestro reconocimiento por su valiosa ayuda.

Agradecimientos

Queremos agradecer la colaboración prestada por los Profs. Francisco Olucha y Alfonso Valverde, del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valencia, de cuya ayuda en nuestros estudios morfométricos queremos dejar constancia. Así mismo a la Srta. Vicenta Botella por la ayuda prestada en la toma de muestras de microscopía electrónica y subsiguiente procesado.

Al Dr. D. Diego Dualde Pérez, mi padre, motor e impulsor de esta Tesis Doctoral sin cuyos consejos, enseñanzas esfuerzo y entrega no huera sido posible la realización de la misma.

A mi madre, Delfina, que con su ejemplo, dedicación y callado sacrificio es un modelo a seguir.

A Judit, mi esposa, que pacientemente ha renunciado a muchas horas de compañía y que con su ánimo ha colaborado para que esta Tesis viera la luz.

A mi hermano Fernando, por su valiosa ayuda, sus consejos y colaboración en la redacción y elaboración del original.

A todos aquellos que, de uno u otro modo, han colaborado en la elaboración de la presente Tesis Doctoral, muchas gracias

SUMARIO

Capítulo 1. Introducción y antecedentes históricos y bibliográficos	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Anatomía	3
1.3. Desarrollo embrionario.....	4
Fase morfogénica.....	4
Fase proliferativa.....	5
Fase de hipertrofia glandular	5
1.4. Organización estructural y ultraestructural	7
Pinealocito.....	9
Células intersticiales	14
Células pigmentarias.....	20
Estroma glandular	20
1.5. Inervación.....	23
Fibras autónomas vegetativas simpáticas	23
Fibras autónomas vegetativas parasimpáticas	24
Fibras centrales o intercomisurales	24
Fibras eferentes	25
1.6. Vascularización	25
1.7. Fisiología.....	26
1.8. Bioquímica.....	33
Capítulo 2. Planteamiento del problema y objetivos	37
Capítulo 3. Material y métodos	41
3.1. Toma de muestras.....	42
3.2. Estudio a microscopía óptica	47
Obtención de cortes	47
Tinciones.....	48
3.3. Estudio inmunohistoquímico	51
3.4. Estudio morfométrico	56
3.5. Estudio a microscopía electrónica de transmisión	59
3.6. Recuento de cuerpos sinápticos	64

Capítulo 4. Resultados.....	65
4.1. Caracteres macroscópicos.....	66
4.2. Estudio a microscopía óptica e inmunocitoquímico	66
Grupo de animales jóvenes (serie diurna)	66
Grupo de animales jóvenes (serie nocturna)	70
Grupo de animales adultos (series diurna y nocturna)	72
4.3. Estudio morfométrico	73
4.4. Estudio a microscopía electrónica de transmisión.....	142
4.5. Recuento de cuerpos sinápticos	153
Capítulo 5. Discusión.....	161
5.1. Caracteres macroscópicos.....	162
5.2. Estudio a microscopía óptica	162
5.3. Estudio inmunocitoquímico	168
5.4. Estudio morfométrico	171
5.5. Estudio a microscopía electrónica de transmisión.....	176
5.6. Recuento de cuerpos sinápticos	177
Capítulo 6. Resumen	185
Capítulo 7. Conclusiones.....	188
Capítulo 8. Bibliografía	191

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES
HISTÓRICOS Y BIBLIOGRÁFICOS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y BIBLIOGRÁFICOS

1.1 INTRODUCCIÓN

La glándula pineal, cuerpo pineal o epífisis, descrita ya por GALENO, cuando en su *De usu partium* nos habla del *Corpus pineale*, dice que los anatómicos la llaman con el término griego *conarion*, diminutivo de *conos*, que además de significar el cono geométrico es, sobre todo, el nombre dado a la piña. Posteriormente fue latinizada por *conarium*, si bien fue traducido por el término *glandula pinealis*. El citado autor ya describe el cuerpo pineal, afirmando que "es de naturaleza glandular y su forma se parece en alto grado a una piña de lo que le deriva el nombre", si bien hay que advertir que para GALENO las glándulas no eran, ni lo fueron después de él por mucho tiempo, unos órganos secretores, sino que se les atribuía la función de rellenar espacios huecos del organismo y también la de proteger vasos (ZRENER, 1985).

En siglo XVIII, DESCARTES considera que esta glándula era el "asiento del alma racional" (DESCARTES, 1709); y a partir de entonces se han sucedido las especulaciones e investigaciones sobre su función, las cuales continúan, ya que este interesante órgano (o "reloj biológico" al decir de algunos) que une el ambiente a la fisiología de los mamíferos tiene una serie de funciones que actualmente no están totalmente esclarecidas.

1.2 ANATOMÍA

Este órgano que en la especie humana es del tamaño de un guisante, se halla situado en el techo del mesencéfalo, encima de los tubérculos cuadrigéminos anteriores y detrás del tercer ventrículo (MARTINEZ SORIANO, 1987).

En la especie ovina, la glándula pineal está sujeta a la porción dorsal del diencéfalo por un pequeño tallo, el pedúnculo pineal, cuya cavidad constituye el receso pineal del tercer ventrículo. La parte dorsal de este pedúnculo, está anclada a la comisura habenular, mientras que la porción ventral está fijada a la comisura posterior.

Una clasificación basada en la localización y forma de la epíffisis fue propuesta por VOLLRATH en 1981, en la que tiene en cuenta la relación de la glándula pineal con el tercer ventrículo, así como la forma y distribución del tejido pineal. De acuerdo con esta clasificación, existen tres tipos de epíffisis. El tipo A o proximal, propio, entre otras de las especies humana y ovina, se caracterizan por ser gruesas, poco elongadas y próximas al tercer ventrículo; las tipo AB (bovinos, porcinos) son pineales de mayor tamaño que las anteriores y las tipo ABC o distales son pineales largas y grandes, cuya longitud puede llegar hasta el cerebelo y sus proximidades (ratón, cobaya).

Uno de los primeros que se ocuparon del estudio de la pineal (BARGMANN, 1943) señala que la epíffisis cerebral en la especie ovina es esférica y recuerda la forma de un guisante. LANG (1959) indica que sus dimensiones vienen a ser de 7'5 mm de largo por 5'5 mm de ancho y 4'5 mm de alto; prácticamente las mismas dimensiones le asignaron anteriormente BLIN Y MAURIN (1956), cuya longitud la cifran en 7 mm.

Por lo que concierne al peso, no hay acuerdo entre los distintos autores. Así, mientras KENNAWAY Y SEAMARK (1975) dan la cifra de 69'3mg, frente a los 182mg que le asignan los citados BLIN Y MAURIN (1956), otros autores como BASINSKA et al. (Burck, 1969), o SANTAMARINA Y VENZKE (1953), obtienen pesos de 101mg y 81'34mg respectivamente. En este sentido, estos últimos autores estudian las diferencias de peso en los ovinos, según la edad, y los pesos varían, en el caso de las ovejas, desde 56'50mg±12'30 las que están en edades comprendidas entre 12 y 24 meses, para ir aumentando con la edad y llegar a los 86'00mg±18'38, las que tienen 4 años. Para los carneros, estos autores dan cifras de 96'64mg±27'07 cuando tienen 2 años, para ir en aumento hasta los 102'96mg±40'28 en los de 3 años, y sin embargo en los de 4 años se observa una disminución de peso (87'37mg±45'38).

1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

De acuerdo con VOLLRATH la pineal ovina se considera, al igual que la del hombre y orangután, como tipo A al estar próxima al tercer ventrículo y ser gruesa y poco elongada.

Siguiendo a QUAY (1974 b) en el desarrollo de la pineal podemos distinguir tres fases: morfogenética, proliferativa y de hipertrofia glandular.

Fase morfogenética: el esbozo inicial se da en el día 30 del desarrollo prenatal localizándose en la línea media del techo del diencefalo, entre las comisuras habenular y caudal. Este receso pineal tiene una amplia luz en su interior y se comunica con el tercer ventrículo. Está recubierto por un epitelio pseudo estratificado de células ependimarias. Esta fase se prolonga durante dos o tres días.

Fase proliferativa: Sigue a la fase anterior. En ella se da la emigración de los diferentes precursores de las células de la glándula pineal adulta. Así a partir del epitelio neural derivan los pineoblastos y espongioblastos que darán lugar a los pinealocitos y astrocitos; de la cresta neural proceden schwanocitos, melanocitos y simpaticoblastos; y del mesénquima meníngeo fibroblastos, células endoteliales, mastocitos e histiocitos.

Cada grupo proveniente de las diferentes matrices se dispone formando islotes o rosetas.

Alrededor del día 98 la glándula adquiere un aspecto compacto y se produce la obliteración de la luz del receso pineal debido a fenómenos mecánicos (limitación de espacio) y a la presencia de abundantes mitosis.

Fase de hipertrofia glandular: ocurre alrededor del día 118. Se completa la maduración de la glándula. En ella se pueden distinguir dos zonas, cortical y medular.

En un trabajo reciente de REGODÓN et al (1998 a) se realiza una detallada descripción de la estructura de la glándula pineal ovina durante su desarrollo prenatal. Estos autores dividen su estudio en cuatro fases desde el día 30 al 150 de la gestación. Estudian su evolución desde la aparición, alrededor de los 30 días, del esbozo o receso pineal, cubierto por un epitelio pseudoestratificado de células endimarias y comunicado con el tercer ventrículo. A medida que progresa el desarrollo, este neuroepitelio del esbozo aumenta en grosor por migración de células endimarias del tercer ventrículo y por mitosis. En esta primera fase y en la siguiente, es decir hasta el día 97 del desarrollo se produce una reducción de la luz del receso y se interrumpe la comunicación con el tercer ventrículo. El parénquima

glandular presenta un aspecto compacto y está constituido exclusivamente por pinealoblastos. Son una característica destacable la presencia de rosetas o cisternas, que poseen una pequeña luz circular, carecen de contenido y están delimitadas por pinealoblastos. Estos autores comentan que estas cavidades podrían ser restos de la luz del receso pineal tras su obliteración. Otros, como ANDERSON (1965), CALVO Y BOYA (1981) y GARCÍA-MAURIÑO Y BOYA (1992) sugieren que las células de estas rosetas son células ependimarias del tercer ventrículo, células indiferenciadas y células intersticiales respectivamente. En la tercera fase del desarrollo, alrededor del día 98, estos autores describen la aparición de la segunda población celular, las células intersticiales o pinealocitos tipo II. Además, en el parénquima glandular se distinguen dos zonas, una cortical, de aspecto pseudolobular y una medular. En la última fase, del día 118 al 150, se completa el desarrollo, manteniéndose estas dos zonas descritas. Los pinealoblastos cambian su forma redondeada y empiezan a adquirir prolongaciones. Siguen existiendo rosetas aunque en menor cantidad, que se localizan en la zona medular de la glándula. Además se observan también las denominadas pseudo rosetas de aspecto irregular y más desorganizado, que tienen una morfología variable, distribución panglandular y son menos numerosas. En cuanto a su estructura son iguales a las ya descritas.

A partir de la cápsula de tejido conjuntivo, penetran tabiques que se van engrosando a lo largo del desarrollo. La vascularización de la glándula se da desde el principio del desarrollo embriológico, aumentando progresivamente y es más abundante en el área medular.

1.4 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ULTRAESTRUCTURAL

La glándula pineal está envuelta por la piamadre, de la que parten tabiques delgados hacia el interior para rodear cordones o lóbulos de parénquima. Con tinción tricrómica se pueden observar dichos tabiques o trabéculas de tejido conjuntivo que penetran profundamente en la glándula y transportan vasos sanguíneos y nervios. La arquitectura de la glándula se caracteriza por carecer de un patrón común observándose agrupaciones celulares cordonales, foliculares, en roseta, etc. La división compartimental de la glándula no es tan evidente como en otras glándulas del cuerpo (BARGMANN, 1981; FAWCETT, 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). Distintos autores han estudiado la estructura histológica de esta glándula en diversas especies de mamíferos.

BOYA et al. (1993) en sus estudios a microscopía óptica sobre la pineal del gato adulto, la describen con una morfología lanceolada a la sección sagital. Su superficie dorsal es plana y se encuentra en contacto con el receso suprapineal del III ventrículo. Cerca del 70 al 80% de esta superficie tiene un revestimiento endimario constituido por una sola capa de células cúbicas ciliadas. En la porción proximal de la glándula se observa un corto receso pineal. Con técnicas de tinción convencionales no han encontrado diferencias en la disposición de los pinealocitos entre la parte periférica y central de la glándula, ni tampoco describen lobulaciones o formaciones foliculares. En el parénquima glandular las células se disponen en cordones amplios, irregulares separados por zonas eosinófilas en las que se encuentran los vasos sanguíneos. Excepcionalmente han observado quistes revestidos por células endimarias en la zona próxima al receso pineal.

Características muy semejantes en cuanto a organización arquitectural observan CALVO et al. (1990) en la pineal del perro adulto, que describen en forma de pera, con una amplia zona proximal y una delgada parte distal. La parte dorsal de la glándula también aparece revestida por una capa de células cúbicas ciliadas. Estos autores no observan cavidades en el parénquima, ni folículos ni indicios de polarización celular.

Cozzi (1986) en un estudio ultraestructural en el caballo describe lobulaciones dentro del parénquima integradas por células pineales y delimitadas por tejido conjuntivo rodeado de células intersticiales. En el mismo estudio resalta la presencia en muchas glándulas de un estrecho espacio en la parte central. Considera que puede tratarse de un resto de la primitiva luz embrionaria.

En algunas especies cabe distinguir una zona cortical, externa o periférica y una zona central, interna o medular, según se desprende de diversos estudios morfológicos y funcionales. Estas diferencias se basan en muy diversos criterios: distribución de los tipos celulares (ROMIJN, 1973), forma de los pinealocitos (ZACH, 1960), distribución de la melatonina (FREUND ET AL, 1977), o variaciones en el tamaño del núcleo de los pinealocitos en cada una de estas zonas (VOLLRATH, 1981; BECKER & VOLLRATH, 1983).

Concretamente, en la oveja, en el estudio de la estructura de la glándula pineal durante el desarrollo prenatal anteriormente citado, REGODÓN et al. en 1998 (a), en la tercera fase de desarrollo prenatal (98-116 días), describen en el parénquima glandular dos zonas claramente diferenciadas en función de la densidad celular: cortical y medular. La zona cortical se caracteriza por su configuración pseudolobular, con folículos integrados por pinealoblastos. La zona medular, de

menor densidad celular, no tiene la estructura pseudolobular descrita en la cortical. En la última fase de desarrollo (117-150 días) esta estructura diferenciada, con una zona periférica, cortical y una central, medular se mantiene, aunque el número de células, sin embargo es menor, seguramente debido al aumento del tamaño.

El parénquima glandular está integrado fundamentalmente por dos tipos de células: los pinealocitos y los astrocitos. Además se encuentran otros tipos celulares como células pigmentarias, de naturaleza discutida, células cebadas, macrófagos, fibroblastos, linfocitos, especialmente en los tabiques de tejido conjuntivo. También se ha descrito la presencia de calcificaciones pineales (arenilla cerebral, córpora arenácea o calcosforitos).

Pinealocito: Es el tipo celular predominante y específico (80-90%) en los mamíferos. Es una célula bastante grande que, en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina muestra un citoplasma claro, débilmente basófilo, en ocasiones de aspecto vacuolizado, y cuyos límites no están claramente definidos. Con impregnaciones argénticas se observan prolongaciones citoplásmicas que le dan a la célula aspecto estrellado. Estas prolongaciones, ya descritas en 1922 por DEL RÍO-HORTEGA, terminan en expansiones bulbosas que se relacionan con sus homónimas de otros pinealocitos o con los cuerpos de éstos, con prolongaciones de astrocitos o con el espacio perivascular. REGODÓN et al. (1998 a) observan mayor vascularización en la zona medular, aún cuando los vasos van disminuyendo de calibre a medida que penetran en el parénquima glandular. El núcleo de los pinealocitos es grande, esférico y a veces indentado, con nucleolo evidente y cromatina en grumos asociados a la carioteca (ANDERSON, 1965; BARGMANN, 1981; FAWCETT, 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Estudios cariométricos realizados por diferentes autores en distintas especies, han puesto de manifiesto la presencia de variaciones del tamaño del núcleo de los pinealocitos según el periodo del día considerado, la estación del año o las zonas de la pineal en cada caso, periférica o cortical, y central o medular. Las diferencias en el tamaño de los núcleos también han sido descritas según la región de la glándula (ventral o dorsal, proximal o distal) (HIRA ET AL, 1998; POPOVA, 1975; CIMAS ET AL, 1992; FERRANDO, 1988) dichas variaciones no han sido confirmadas por todos los autores que se han ocupado del tema (WELSCH, 1979; HEIDBÜCHEL & VOLLRATH, 1983).

En el estudio con microscopio electrónico los pinealocitos muestran las organelas celulares típicas y comunes al resto de las células . Núcleo con nucleolo evidente y heterocromatina dispuesta periféricamente. El citoplasma contiene numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso y un discreto complejo de Golgi. En las prolongaciones celulares se observan microtúbulos y, en sus extremos, vesículas pequeñas, en ocasiones electrodensas. Además de estas organelas comunes en los pinealocitos se encuentran unas organelas típicas que se denominan cuerpos sinápticos (FAWCETT, 1995).

Cuerpos sinápticos. Los cuerpos sinápticos son unas organelas de los pinealocitos que se localizan en la proximidad de otro pinealocito. También se dan en otros tipos celulares como las células fotorreceptoras de la retina, órgano de Corti o en el órgano vestíbulo-coclear. Se han descrito tanto en mamíferos como en vertebrados no mamíferos (reptiles, aves, peces, anfibios), así como en invertebrados (BHATNAGAR, 1994).

Los cuerpos sinápticos son un grupo heterogéneo de organelas que, de acuerdo con su morfología y siguiendo a STRUWE Y VOLLRATH (1990), incluyen a: cintas sinápticas, esferas sinápticas y estructuras intermedias.

Su número es variable y difícil de cuantificar dado el tamaño de las mismas y su variabilidad con el fotoperíodo. Por lo que concierne a las *cintas sinápticas* aumentan en 2-3 veces durante la fase oscura y disminuyen en el día, tal como han señalado diversos autores (VOLLRATH, 1973; KURAMADO Y MORI, 1977; Mc. NULTY, 1980; MATUSUSHIMA, 1983; MARTÍNEZ SORIANO ET AL, 1984; CIMAS GARCÍA ET AL, 1987). Asimismo el número de cintas sinápticas varía con la estación del año en la que se estudia, siendo menores en marzo y abundantes en septiembre (KARASEC ET AL, 1988). El número también varía según determinadas condiciones experimentales y se ha relacionado con la innervación adrenérgica de la glándula (KARASEC, 1983; ROMJIN, 1975) y con el ritmo de síntesis de melatonina (VOLLRATH, 1973), sin embargo, algunos estudios recientes han cuestionado estas interpretaciones (SEIDEL ET AL., 1990; SOUSA-NETO ET AL, 1990).

Respecto a las *esferas sinápticas*, aunque también presentan fluctuaciones en su número, no coinciden con las que experimentan las cintas sinápticas (VOLLRATH, 1981; KARASEC Y VOLLRATH, 1982; MARTÍNEZ SORIANO ET AL., 1984; KHALEDPOUR Y VOLLRATH, 1987), sugiriendo que pueden ser funcionalmente diferentes de las cintas sinápticas.

Se localizan a nivel del citoplasma celular así como en las prolongaciones citoplasmáticas, con frecuencia en contacto con la membrana celular a través de un tallo y perpendiculares a la misma o bien paralelas a la membrana. Aparecen tanto aisladas como emparejadas o formando grupos más amplios dando lugar a los

llamados campos sinápticos (se piensa que estos campos puedan ser el reservorio / almacén de material para los cuerpos sinápticos). Se han observado diferencias en cuanto a la localización según el pinealocito pertenezca a la zona medular o cortical; HEWING (1980) observa en el ratón de campo que, el 40 % de los cuerpos sinápticos de los pinealocitos de la zona cortical y el 60 % en la medular contactan con la membrana y se localizan enfrente de las células gliales. En cambio el 18 %, en ambas zonas se localizan enfrente de los pinealocitos. También observa que aquellos cuerpos sinápticos que se localizan cerca de los vasos sólo se dan en la región cortical de la pineal y los de la región medular contactan con el tercer ventrículo. Estas observaciones hacen pensar a HEWING en una posible división funcional de las dos zonas de la pineal del ratón.

En cuanto a su forma y estructura (STRUWE Y VOLLRATH, 1990) señalan que las *cintas sinápticas* son organelas electrodensas planas o en forma de barra rodeadas de vesículas claras. Son tri- o pentalaminares y miden aproximadamente entre 0.2-2.0µm, siendo las vesículas que las rodean de 20-60 nm de diámetro. Algunas de éstas vesículas aparecen unidas a la cinta por un tallo. Las *esferas sinápticas* tienen forma esférica u ovoidea, son de mayor tamaño que las anteriores, 60-220nm y también se rodean de vesículas. Por último las *estructuras intermedias* tienen una morfología variada - rectangular, trapezoidal, triangular, ovoidea –y como las anteriores se rodean de vesículas.

Su composición histoquímica es muy poco conocida atribuyéndosele ser depósito de monoaminas y carecer de DNA, RNA o carbohidratos.

A los cuerpos sinápticos se les han atribuido multitud de funciones, entre ellas destacan la de ser almacén de monoaminas, comunicación intercelular, constituir un

mecanismo de comunicación entre las fibras adrenérgicas y los pinealocitos, intervenir en la síntesis de melatonina, e incluso ser reliquias filogenéticas sin función alguna (BHATNAGAR, 1994).

En lo referente a la especie ovina solamente hay un trabajo publicado que estudie específicamente los cuerpos sinápticos en dicha especie (STRUWE & VOLLRATH, 1990) ya que en un extenso estudio de 1965 por parte de ANDERSON en las especies ovina y bovina no los menciona y en la revisión que BHATNAGAR hace en 1994 sobre las cintas sinápticas de los mamíferos nos remite al trabajo de STRUWE. En este trabajo se estudian específicamente los cuerpos sinápticos en las glándulas pineales de bóvidos, cerdo y óvidos. Los resultados que obtiene con respecto a la oveja se basan en el sacrificio de 15 ovejas adultas hembra, 5 en el mes de Abril, otras 5 sacrificadas en Octubre y otras 5 en Septiembre (éstas últimas se sacrificaron en Ruanda); todas ellas se sacrificaron entre las 10-11 h. El número total de cuerpos sinápticos que STRUWE Y VOLLRATH encuentran es de $4'3 \pm 0'9 / 20.000 \mu\text{m}^2$; de ellos ninguna cinta sináptica, las esferas sinápticas suponen $3'9 \pm 0'8 / 20.000 \mu\text{m}^2$ y las estructuras intermedias $0'4 \pm 0'1 / 20.000 \mu\text{m}^2$. En lo referente a las esferas sinápticas no encuentra diferencias entre las ovejas sacrificadas en Europa y África, estando el 63 % localizadas en el interior del pinealocito y el 37 % en vecindad a la membrana; se observa que la mayoría (2/3) están aisladas, que en 1/3 de las veces se agrupan en parejas y que raramente se observan grupos de 3 ó más. En cuanto a las estructuras intermedias si que observa diferencias significativas entre las ovejas sacrificadas en Europa y las sacrificadas en África, siendo más numerosas en África (no ocurre lo mismo con los bóvidos en los que no hay diferencia). Para este autor, el hecho de que no aparezcan cintas sinápticas en

la oveja (ni tampoco en los bóvidos) indicaría que las cintas sinápticas en estas especies, más que estar relacionadas con la regulación de producción de melatonina servirían para procesos de comunicación intercelular, dato que ya apuntaba VOLLRATH et al (1984) en la rata. Por otra parte el hecho que las esferas sinápticas en la oveja estén más próximas a la membrana del pinealocito que en bóvidos o en el cerdo, les conferiría para estos autores, una cierta función de membrana y no ser sólo precursoras de cintas sinápticas o ser producto de la degradación de éstas. Por último especulan con la posibilidad de que dado el menor número de cuerpos sinápticos que se dan en el orden artiodactilo frente a rodentia o primates, estaría en relación con las diferencias existentes en la inervación de la glándula ya que en algunos mamíferos existe una correlación inversa entre el número de terminaciones nerviosas y el número de cintas sinápticas (KARASEK ET AL, 1983); o quizá el número de cuerpos sinápticos este en relación con el tipo de glándula pineal en el sentido que aquellas glándulas pineales de tipo ABC necesiten, al ser de morfología muy alargada y con gran cantidad de tejido pineal en superficie, mayor número de cuerpos sinápticos para comunicarse con el resto de pinealocitos y con el cerebro que las de tipo AB o A (caso de la oveja).

Las células intersticiales o pinealocitos tipo II: Han recibido numerosas denominaciones: células intersticiales, debido precisamente a su disposición entre los pinealocitos y sus prolongaciones, pinealocitos tipo II, células gliales y astrocitos.

La morfología de estas células ya fue estudiada en 1922 por DEL RÍO- HORTEGA mediante técnicas de impregnación argéntica, por ANDERSON (1965) y, más recientemente se han publicado numerosos estudios utilizando microscopía

electrónica y técnicas de inmunocitoquímica, en roedores, carnívoros, équidos y rumiantes.

Estas células son más pequeñas que los pinealocitos, sus núcleos se tiñen más intensamente y son más alargados o triangulares con nucleolo evidente. Con microscopía electrónica, destacan en su citoplasma la presencia de un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, depósitos de glucógeno, abundantes filamentos intermedios y prolongaciones celulares muy largas que se relacionan con las de otras células intersticiales o con las de los pinealocitos, terminando frecuentemente en las proximidades de los vasos.

La naturaleza glial de estas células se ha puesto de manifiesto con técnicas inmunocitoquímicas con las que se ha demostrado la presencia de proteína ácida fibrilar glial (LÓPEZ-MUÑOZ ET AL, 1992 a), vimentina, y S-100. La mayoría de los estudios inmunocitoquímicos se han realizado en rata (MOLLER ET AL,1978; SCHACHNER ET AL,1984; CALVO et al. 1988 a; LÓPEZ-MUÑOZ et al, 1992 a,b; BORREGÓN ET AL.1993). Otros autores han trabajado en hámster (HUANG ET AL,1984), carnívoros (BOYA & CALVO, 1993) y équidos (COZZI, 1986) aunque el número de referencias es mucho menor. Son escasos los trabajos realizados en ovinos.

MOLLER et al. en 1978, utilizan en la rata, dos marcadores, el suero anti-GFAP y el anti-proteína S-100. Comprueban que existen células positivas sobre todo en la zona próxima al tallo pineal. Las prolongaciones de estas células se aproximan al espacio perivascular, constituyendo una barrera entre el espacio perivascular y el parénquima pineal.

En 1988 , CALVO et al. (1988 a) también en la rata utilizan, para identificar las células intersticiales, además de estos marcadores, vimentina. Ésta es un filamento

intermedio clásicamente descrito en células de origen mesenquimatoso y posteriormente localizado también en células de glía, sobre todo astrocitos, células endimarias y células de Schwann. La vimentina aparece pronto en el desarrollo de los astrocitos, antes de que éstos expresen GFAP (proteína fibrilar de la glía), que es el principal componente de los filamentos gliales. La proteína S-100 es una proteína citoplásmica ligadora de calcio descrita en distintas células neuroectodérmicas incluyendo los astrocitos. Las células positivas a estos tres antígenos mostraban una morfología muy similar, estrellada, diferenciándose fácilmente de los pinealocitos por su núcleo denso, con nucleolo evidente. De su cuerpo partían varias prolongaciones hacia el tejido conjuntivo. Tanto GFAP como proteína S-100 mostraron un patrón de tinción idéntico, localizándose en la parte proximal de la glándula. Sin embargo, las células positivas con la técnica para vimentina se localizaban en toda la glándula. Además pudo apreciarse también inmunotinción para vimentina en las células endoteliales de los vasos. De estos resultados, estos autores concluyeron que estas células eran una población celular de naturaleza glial, distintas de los pinealocitos y no homogénea, ya que casi todas eran positivas a vimentina mientras que sólo las de la mitad proximal de la glándula lo eran a GFAP y proteína S-100. Estos resultados concordaban con los expuestos por SCHACHNER et al. en 1984, quienes habían estudiado en ratas la expresión de vimentina, GFAP y antígeno C1, un marcador de astrocitos inmaduros. Estos autores consideraban la expresión de vimentina y antígeno C1 un signo de inmadurez y, en cambio la de GFAP como típica de una población glial más madura. La conclusión es que las células positivas tanto a vimentina como a GFAP y a C1, más maduras, se localizan en la parte proximal de la glándula y las positivas sólo a

vimentina, en la parte más distal. Por último, destacan que en el desarrollo de otras regiones en el SNC, la expresión de vimentina y antígeno C1 precede a la aparición de GFAP. Por ello, extrapolando a partir de hallazgos sobre el estado antigénico de los astrocitos en otras regiones del cerebro en desarrollo, para estos autores la pineal parece ser una región del SNC donde astrocitos inmunopositivos a vimentina y GFAP persisten en la vida adulta. Sus funciones no están claras. Como la glándula pineal es un transductor neuroendocrino que responde a estímulos ambientales, puede preservar un estado de plasticidad correspondiendo con el estado funcional de algunos astrocitos inmaduros. Estos autores consideran la expresión de vimentina y antígeno C1 un signo de inmadurez y, en cambio la de GFAP como típica de una población glial más madura. La conclusión es que las células positivas tanto a vimentina como a GFAP y a C1, más maduras, se localizan en la parte proximal de la glándula y las positivas sólo a vimentina, en la parte más distal.

Resultados semejantes obtuvieron en las glándulas pineales de ratas otros autores como LÓPEZ-MUÑOZ et al.(1992 b), quienes estudiaron la coexpresión de vimentina y GFAP en ratas adultas, y BORREGÓN et al.(1993) que estudiaron la expresión de vimentina, GFAP y proteína S-100. Estos últimos autores destacaron un aumento en la expresión de GFAP en los animales más viejos.

En perros y gatos, BOYA Y CALVO,(1993) realizan un estudio inmunohistoquímico del desarrollo postnatal de los astrocitos. Describen la expresión de vimentina y GFAP desde el nacimiento a la edad adulta y llegan a conclusiones muy semejantes a las descritas en anteriores trabajos. La vimentina es típica de astrocitos inmaduros y aparece desde el principio, mientras que la GFAP

se expresa sólo en los más maduros y aparece más tardíamente. En los carnívoros hay que destacar una diferencia en cuanto a la disposición de los astrocitos. Así como en la rata los más maduros, positivos a GFAP, se limitaban a la parte proximal de la glándula, en los carnívoros, cuya epífisis tiene una localización más profunda, éstos se encuentran distribuidos por toda la glándula, mostrando un patrón muy semejante a la vimentina. De esto deducen estos autores que las células intersticiales de las pineales de localización más profunda, como el perro y el gato, tienen una mayor diferenciación astrogliol. En los gatos de más edad observan grandes nidos de células negativas a vimentina y positivas a GFAP cuyos procesos parecen cicatrices gliales. Por último, estos autores describen también una intensa inmunotinción con vimentina de las células endimarias que, en el perro y el gato, revisten gran parte de la superficie dorsal de la glándula pineal.

Los estudios realizados en ovejas son escasos. En 1996, REDONDO et al. realizan un estudio ultraestructural de la glándula pineal de la oveja durante el desarrollo embrionario. Describen, en primer lugar los pinealoblastos que se originan a partir del receso pineal. Desde el día 98 de desarrollo detectan la presencia de una segunda población celular, las células intersticiales, así llamadas porque se disponen entre los pinealoblastos y sus prolongaciones. En 1997 FRANCO et al. estudian en la oveja estas células intersticiales desde el punto de vista inmunohistoquímico así como mediante microscopía electrónica. Los resultados de dicho estudio indican la presencia de un segundo tipo celular en la glándula pineal ovina que ya aparece en la época de desarrollo prenatal, a partir de los 98 días de gestación. Estas células presentan positividad para PTAH (hematoxilina ácida fosfotúngstica) y para GFAP indicando su naturaleza glial, aunque pudo

comprobarse que no todas las células positivas a PTAH lo eran a GFAP. Esto sugería que cierta proporción de células gliales positivas PTAH podían ser astrocitos inmaduros que no expresaban GFAP, dato que por otra parte ya había sido observado en ratas (SCHACHNER ET AL., 1984; LÓPEZ-MUÑOZ ET AL, 1992 a) y en carnívoros (BOYA Y CALVO, 1993). Por ello, la proteína ácida fibrilar de la glía se considera un marcador válido para detectar el grado de maduración de los astrocitos.

Además, la localización topográfica de las células en la glándula pineal está en relación con la localización anatómica de la glándula; así en la oveja, en la que la pineal se localiza en profundidad, rodeada de estructuras nerviosas, las células positivas a GFAP se distribuyen en toda la superficie. Datos similares se han observado en el hámster, gato y perro (BOYA Y CALVO,1993); en cambio en la rata, cuya pineal es más superficial estas células se localizan sólo en el tallo y en la parte más superficial de la glándula (CALVO et al. 1988 a, LÓPEZ-MUÑOZ et al. 1992 a).

Tradicionalmente, debido a su localización entre los pinealocitos, se ha atribuido a estas células una misión de sostén similar a la de los astrocitos en el SNC (LÓPEZ-MUÑOZ ET AL., 1992 a,b). Numerosos autores han descrito la tendencia que tienen las prolongaciones celulares a localizarse en las proximidades de los espacios perivasculares (MOLLER et al. 1978, HUANG ET AL. 1984, SCHACHNER ET AL.1984, COZZI,1986, CALVO ET AL.1988 a,b, BOYA Y CALVO, 1993), por lo que se ha considerado la posibilidad de que estas células intersticiales permitan el intercambio de sustancias entre la glándula pineal y la sangre; no obstante, no todos los autores están de acuerdo en que esta relación entre los vasos sanguíneos y los procesos celulares exista. (FRANCO ET AL, 1997).

Células pigmentarias: Estas células, que contienen gránulos de pigmento en su interior, han sido objeto de estudio en distintas especies animales. Cozzi, 1986 las estudia en el caballo. CALVO et al. en 1988 b y 1992, las estudian respectivamente en el perro y en el gato, en los que describen la presencia de pigmento. En el perro, observan células con gránulos de pigmento en la superficie ventral de la glándula y al lado de la comisura posterior. En el gato, estas células se encuentran en la parte distal de la glándula. En ambas especies la cantidad de pigmento presenta variaciones de tipo individual. No se encontró relación entre la cantidad de pigmento y el sexo o la edad. REGODÓN et al. (1988 b), realizan un estudio sobre la presencia de pigmento en la glándula pineal ovina. Estos autores consideran cuatro grupos durante diferentes estadios del desarrollo embrionario. Grupo I (54-67 días de desarrollo embrionario), grupo II (71-92), grupo III (98-113) y grupo IV (118-150). Macroscópicamente, el porcentaje de células pigmentadas creció del grupo I al III (83%) y luego decreció en el grupo IV en el cual sólo se encontró en el 25% de las glándulas. Todos estos autores han confirmado, mediante estudios histoquímicos y ultraestructurales que se trata de melanina. El origen de estas células es controvertido. Para unos, se trataría de un tipo especial de pinealocitos que contienen gránulos de pigmento. Otros, como REGODÓN et al. (1998 b) consideran que sus características ultraestructurales no coinciden con las de los pinealocitos y las células intersticiales, por lo que consideran la posibilidad de que se trate de un tercer tipo celular.

Estroma glandular: Está constituido por el tejido conjuntivo que penetra desde la cápsula y profundiza hacia el interior del parénquima. Es rico en fibras de colágeno, elásticas y de reticulina. En el tejido conjuntivo del espacio perivascular

se encuentran fibras nerviosas amielínicas, próximas a las prolongaciones bulbosas de los pinealocitos y de los astrocitos. Las prolongaciones de ambos tipos de células se entremezclan con las fibras de reticulina formando una compleja trama glandular (REGODON ET AL 1998 b). Entre el tejido conjuntivo y el endotelio de los vasos se encuentra presente una membrana basal.

La vascularización penetra desde la cápsula y es mayor en la zona medular aun cuando el calibre de los vasos va disminuyendo a medida que profundizan en el parénquima (REGODON ET AL., 1998 b).

En un estudio sobre la influencia de las fases luminosa y oscura sobre la proliferación celular en la glándula pineal, CALVO et al. (1997), observan que el volumen de la pineal alcanza su máximo durante la fase luminosa. Estos autores opinan que este cambio de volumen es secundario a variaciones en el estroma de tejido conjuntivo, dilatación de los espacios conjuntivos y aumento del suministro de sangre y de los espacios intercelulares.

Con la edad, la cantidad de tejido conjuntivo aumenta, como describen en la rata BOYA Y CALVO en 1984. Estos autores observan un mayor grosor de los septos de tejido conjuntivo, más marcado en la periferia de la glándula. A medida que aumenta la edad aumenta la fibrosis.

COZZI Y FERRANDI (1984), en la glándula pineal de caballos viejos describen algunas zonas de degeneración, con rarefacción celular, destrucción de tabiques conjuntivos y degeneración tisular.

BARGMANN (1981) comenta que con la edad aumentan el grosor y el número de las prolongaciones gliales. La involución de los pinealocitos, que se produce por focos y por causas desconocidas, junto con la proliferación simultánea de glía hace

que aparezcan manchas gliales, cuya fusión conduce a la formación de quistes llenos de líquido. Muchas veces precede a la proliferación de la glía la destrucción de células pineales. En esos casos se encuentran hendiduras irregulares con detritus entre los pinealocitos. Si estos quistes aumentan de tamaño progresivamente pueden desplazar el parénquima epifisario. Estas cavidades están limitadas por un fieltro de fibrillas gliales, que a su vez está rodeado por una zona glial más laxa. Parece que los quistes se forman por la desintegración de las manchas gliales.

MARTÍNEZ SORIANO (1987) también describe en las glándulas pineales humanas, en un 25-40%, la presencia de quistes de origen desconocido, que no parecen relacionados ni con el sexo ni con la edad.

Finalmente, se ha descrito también en la glándula pineal la presencia, ocasionalmente, de concreciones extracelulares denominadas *corpora arenacea*, *acervuli cerebri*, "arenilla cerebral" o simplemente calcificaciones pineales. Están constituidas por fosfatos y carbonatos cálcicos que se depositan concéntricamente (BARGMANN, 1981; FAWCETT, 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). Su origen no es bien conocido aunque BANKS (1993) apunta que podría ser estromal o glial. No se consideran patológicos ya que pueden encontrarse en la infancia y van aumentando en número y tamaño con la edad, a pesar de lo cual el aumento de su frecuencia no se asocia a una disminución de la actividad pineal (BARGMANN, 1981; BOYA ET AL, 1984; COZZI, 1986; MARTÍNEZ SORIANO, 1987; FAWCETT, 1995; VIGH, 1998; JUNQUEIRA, 2000).

1.5 INERVACIÓN

La inervación de la glándula pineal ovina sigue el mismo patrón que en la mayoría de las especies. En lo referente a la inervación aferente podemos distinguir dos tipos de fibras: cerebrales o comisurales o centrales y las autónomas o vegetativas, siendo estas últimas las mejor conocidas.

Autónomas vegetativas simpáticas: El efecto de la luz ambiental sobre la pineal está mediado por un tracto nervioso de la vía retino-hipotalámica, la cual discurre formando parte del nervio óptico y es amielínica. Esta vía alcanza el núcleo supraquiasmático del que parten fibras hacia la zona periventricular y tuberal del hipotálamo y a través de la columna reticular medial desciende hasta la columna medular intermedio-lateral torácica superior para conectar con el ganglio simpático cervical superior, del cual salen las fibras simpáticas postganglionares que alcanzan a la glándula pineal, siguiendo el trayecto de la arteria conaria, formando el nervio conario que alcanza la glándula por el cono de la misma. MOCKETT ET AL(1994) confirma que la inervación simpática entraría en la pineal por su superficie y no por el tallo.

La simpatectomía bilateral del ganglio cervical superior en la oveja provoca una disminución del tamaño y probablemente del número de pinealocitos. Esto no ocurre si la simpatectomía es unilateral. Además parece ser que la inervación de cada hemipineal procede de los dos ganglios cervicales, derecho e izquierdo, de forma que fibras del ganglio derecho inervan también a la hemipineal izquierda y viceversa (MOCKETT ET AL 1994).

Estas fibras liberan noradrenalina la cual actuando a través de receptores β y del sistema AMP_c estimulan a la N-acetil transferasa favoreciendo la producción de melatonina.

Se ha detectado por inmunorreactividad una densa red de neuropéptido Y (NPY) en la glándula pineal ovina. Las regiones dorsales y periféricas tienen la mayor concentración de fibras, la región media pocas y casi ninguna el tallo. Así mismo se ha visto que el NPY no tiene efecto en la estimulación del AMP_c o en la síntesis de melatonina mediada por receptor adrenérgico, pero sí que es posible que module la liberación de noradrenalina al actuar sobre receptores α y β así como al provocar vasoconstricción arterial. El origen de estas fibras estaría en el ganglio cervical superior en el que se han encontrado cuerpos celulares con inmunorreactividad para NPY (WILLIAMS ET AL., 1989).

Autónomas vegetativas parasimpáticas: El origen y terminación de este tipo de fibras no está claramente establecido en todas las especies. Se ha descrito en el mono y el conejo. Parece ser que se originarían en el núcleo parasimpático salivar superior del troncoencéfalo y que su destino sería el ganglio intrapineal.

Centrales o intercomisurales: Proceden de puntos no bien conocidos del SNC (núcleo geniculado lateral, núcleo hipotalámico paraventricular, área hipotalámica lateral, núcleo habenular, núcleo de la comisura posterior) (Revisado por MØLLER, 1991) y penetran en la glándula a través de las comisuras habenular y caudal siendo las habenulares más numerosas. Confirmación de este tipo de fibras en la pineal ovina nos lo proporciona MOCKETT ET AL (1994) al encontrar a nivel del tallo pineal una extensa red de fibras tanto en la comisura caudal como habenular, que ocasionalmente se ha visto que se introducen en el cuerpo de la pineal, que

son resistentes a la simpatectomía bilateral del ganglio cervical superior lo cual a juicio de dicho autor es indicativo de un segundo tipo de inervación probablemente de origen central, como también lo afirman RAVALT (1990) y COZZI ET AL (1992).

Al principio (KAPPERS, 1965) se las consideraba fibras aberrantes y con ninguna función, pero hoy se supone que formarían parte de un complejo habénulo-pineal de misión no bien precisada.

Fibras eferentes: Se han detectado fibras eferentes cuyo origen serían las neuronas del ganglio intrapineal, de probable origen parasimpático, y conectarían la pineal con el SNC. Estas neuronas no se han podido observar en la especie humana, ni en la mayoría de los mamíferos. (MARTINEZ SORIANO, 1987)

1.6 VASCULARIZACIÓN

En los mamíferos la vascularización proviene de las arterias cerebrales posteriores de las que parten las arterias coroideas posteriores que rodean a la cápsula pineal y penetran en ella. En el caso de la oveja la vascularización se distribuye por igual en toda la glándula no pareciendo existir grandes diferencias regionales.

El drenaje venoso viene a confluir a un grueso vaso que tras unirse a la gran vena de Galeno desemboca en la porción anterior del seno recto.

El aporte vascular a la glándula pineal es de los mayores de la economía, comparable al de la hipófisis y sólo superado por el riñón.

La exposición a la luz disminuye el aporte sanguíneo al producir vasoconstricción arterial.

1.7 FISIOLÓGÍA

En extractos de pineal ovina se ha detectado la presencia de diversas sustancias: melatonina, la principal, péptido neurohipofisario, vasotocina (LEAKE ET AL., 1986), hormonas liberadoras hipotalámicas etc. (BENSON & EBELS, 1978; REINHARZ ET AL., 1985).

La principal hormona secretada por la glándula pineal es la *melatonina* la cual transduce en los animales estacionales como la oveja, la información foto periódica al eje neuroendocrino para regular su procreación. No se sabe con precisión cómo o dónde la melatonina ejerce su acción.

Una vez formada la melatonina no se almacena en la glándula pineal sino que se secreta. La secreción de la melatonina en la oveja comienza a los 11 minutos de establecerse la noche en las épocas de foto período largo y a los 20 minutos en las de foto período corto por lo que la aparición de la secreción de melatonina depende del fotoperíodo (RAVAULT & CHESNEAU, 1999) (para NAMBOODIRI (1991) el aumento se produce a los 30 minutos). La secreción se realiza hacia dos compartimentos, uno es el plasma dónde la melatonina actuará en órganos periféricos y otro es el líquido cefalorraquídeo (a una concentración 20 veces superior a la del plasma) en dónde actuará sobre las neuronas. En ambos compartimentos la concentración de melatonina es un reflejo de la duración de la noche y disminuye rápidamente con la luz. El aumento de la melatonina se da antes en sangre que en el LCR y no parece que exista conexión entre los compartimentos vía plexos coroideos ya que la concentración de melatonina en los ventrículos laterales es 7 veces menor que en el tercer ventrículo (SKINNER & MALPAUX, 1999).

Se han observado diferencias en la concentración de melatonina en sangre de ovejas hembra genéticamente diferentes y se cree que estas diferencias se deben a su síntesis y no a su catabolismo (ZARAZAGA ET AL, 1998). Para COON (1999) la concentración media de melatonina nocturna en sangre en la oveja varía de $(189'7 \pm 24'4)$ a $(344'1 \pm 3)$ pg/ml estando esta variación en relación con el tamaño de la pineal y no con diferencias en la actividad enzimática de la glándula ya que las pineales de mayor tamaño presentan mayores niveles de melatonina en sangre.

Aunque la capacidad para producir y secretar melatonina de acuerdo con el ritmo luz-oscuridad por parte de la pineal ovina no se da hasta el periodo postnatal, el feto ovino tiene la habilidad de responder a la melatonina que le llega procedente de la madre vía placenta (EBLING & FOSTER, 1989). En este sentido HELIWELL (1994) indica la presencia de receptores de melatonina en diversas zonas del feto ovino (a los 30 días de gestación ya hay receptores para melatonina en el tiroides, hipófisis, nervios espinales, cavidad nasal, bronquios en desarrollo y a los 40 días en el epitelio nasal, epitelio coclear, áreas del cerebro, pars distalis y tuberalis de la hipófisis) que van modificando su expresión a lo largo del desarrollo (los de la pars distalis son más numerosos a los 30 días que a los 40) lo que sugiere un amplio papel de la melatonina en el desarrollo fetal ovino, mayor del que se pensaba (HELIWELL, 1994).

Una de las acciones más importantes atribuidas a la melatonina es su relación con la reproducción estacional de la oveja.

La ausencia prolongada de celo en los animales se denomina anoestro, la cual puede estar motivada por diversos motivos: estación del año, post-parto, lactación, etc. Desde el punto de vista reproductivo la oveja es un animal poliéstrico

estacional, es decir sólo se reproduce en unas determinadas épocas del año. En la mayor parte de las especies salvajes los nacimientos tienen lugar en primavera (época en la que las condiciones climáticas y alimenticias favorecen la supervivencia) para lo cual, ya que en la especie ovina la gestación dura 5 meses, la cubrición debe darse en otoño. Esta estacionalidad se ha mantenido en la mayoría de las razas y se ha comprobado que cuando aumenta el fotoperíodo disminuye el nivel de presentación de celos, es decir la oveja entra en anoestro estacional, siendo los meses de mayor porcentaje de celos los de foto periodo corto: octubre a febrero. En este sentido se observa un distinto grado e intensidad en la presentación de los celos según la latitud siendo las razas nórdicas muy estacionales y las meridionales mas continuas en cuanto a la presentación del celo. Este efecto del fotoperíodo en la oveja también se da en el morueco, ya sea en el ámbito de producción espermática como en el apetito o actividad sexual, siguiendo lógicamente el mismo orden estacional que en la oveja (PEINADO ET AL, 1993).

El reciente descubrimiento de que en la pars tuberalis hipofisaria hay un elevado número de receptores de melatonina sugiere que esta área hipofisaria juegue un importante papel para la acción de la melatonina sobre la liberación de LH y prolactina hipofisarias. No obstante para MALPEUX ET AL(1995) la melatonina no afecta directamente a la secreción de la LH hipofisaria y si a la de la prolactina. Pero de acuerdo con la teoría de la existencia de un doble-sitio de acción, la melatonina actuaría primariamente a nivel del hipotálamo mediobasal (en el caballo no se han encontrado receptores de melatonina en dicha zona hipotalámica (GERLACH & AURICH, 2000)) para controlar el eje reproductivo y secreción de gonadotropina y actuaría sobre la hipófisis vía pars tuberalis para controlar la secreción de prolactina

y la capa de lana. Esta diferente regulación ayuda a explicar como la prolactina puede ser la "hormona del verano" de todos los animales ungulados con características fotoperiódicas independientemente de sus características estacionales de reproducción (LINCOLN, 1998). La actividad que tiene la melatonina sobre la *pars tuberalis* ovina es dependiente de la duración del estímulo de forma que exposiciones prolongadas a la melatonina llevan a una sensibilización tiempo-dependiente de la adenilciclase y a un descenso de los receptores de melatonina en la *pars tuberalis*. (HAZLERIGG ET AL, 1993). Las células de la *pars tuberalis* de la hipófisis secretan un factor sin identificar que es un potente estímulo para la secreción de prolactina por células de la *pars distalis* por lo que la melatonina estaría implicada en la regulación de la prolactina al ejercer su acción sobre la *pars distalis* vía *pars tuberalis* y no directamente sobre aquella (HAZLERIGG ET AL, 1996).

En cuanto a la influencia de la melatonina en la reproducción estacional de la oveja se sabe que ejerce su acción, por lo menos en parte, cambiando la capacidad del estradiol para inhibir la secreción de LH por parte de la hipófisis. Es más la pineal media en la respuesta en los dos fotoperíodos, el estimulador y el inhibidor (BITMAN, 1983). La melatonina no inhibe directamente la síntesis y liberación de la FSH hipofisaria sino que ejerce su acción inhibitoria sobre el hipotálamo o centros cerebrales superiores, en cambio el péptido pineal antigonadotrópico si que actúa directamente sobre la hipófisis (BHAGAT ET AL 1994). La inhibición que este decapeptido antigonadotrópico ejerce sobre la liberación pulsátil de LH está modulada por alteraciones en la frecuencia de descarga de GnRH y los cambios en la actividad inhibitoria de este péptido pineal antigonadotrópico pueden contribuir a la regulación estacional de la Gn RH hipotalámica en la oveja hembra (LEE, 1999).

Los cambios en la liberación de Gn RH inducen los correspondientes cambios en la secreción de LH los cuales son responsables de la alternante presencia / ausencia de ovulación en la oveja hembra y de la variación en la producción de espermatozoides en la oveja macho. Aunque los lugares de acción de la melatonina se encuentran preferentemente en la pars tuberalis de la adenohipófisis, el hipotálamo presenta los lugares fisiológicos de acción de la melatonina en cuanto a la reproducción. La melatonina no parece actuar directamente sobre las neuronas Gn RH sino que incluiría un complejo circuito interneuronal que incluiría al menos neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y aminoacidérgicas excitatorias. (MALPEAUX, 1999).

La diferente sensibilidad al efecto de la melatonina en la reproducción estacional también se ve reflejada en el número, densidad y afinidad de los receptores β en las fases luteínica y folicular del ciclo estrogénico existiendo un antagonismo estacional dependiente entre la inervación simpática (presumiblemente vía noradrenalina) y los esteroides gonadales (estradiol) en cuanto a la regulación del receptor β (MAXWELL ET AL., 1989) lo que se refleja en los niveles de prolactina. Esto, unido a otros factores como la información foto periódica, entre otros, muestran la capacidad de los esteroides gonadales en regular la función de la pineal ovina (FOLDES ET AL., 1985).

En 1989, DE REVIERS describe la presencia de receptores para la melatonina en la pars tuberalis del tallo hipofisario ovino pero no así en la eminencia media la cual está rodeada por la pars tuberalis. En la caracterización del receptor de melatonina y del sistema de traducción de señal se ha conseguido aislar el receptor de melatonina de la pars tuberalis ovina como un complejo unido a la proteína G.

Este complejo tiene un peso molecular de 525KDa y difiere de otro complejo-receptor de melatonina aislado en el pollo o en el lagarto o en el mismo hipocampo ovino, lo cual indica la posibilidad de la unión de proteínas no G a dicho receptor (BARRETT ET AL, 1994).

Se han encontrado receptores para melatonina además de en la pars tuberalis, en el telencéfalo (sobre todo en los núcleos ventrolateral septal y septohipotalámico, en el hipocampo y las regiones entorinal y retroesplenial del córtex) en el hipotálamo, en el tálamo retina y epitelio pigmentario de la retina (BITTMAN & WEAVER, 1990; DREW, 1998), siendo la pars tuberalis el lugar de mayor concentración de receptores (BITTMAN & WEAVER, 1990).

En la pineal ovina se ha detectado la presencia de *LH-RH* (WHEATON, 1980) la cual también presenta un ritmo estacional, aumentando en Primavera y disminuyendo en Invierno y presenta una estructura similar a la LH RH hipotalámica (KING & MILLAR, 1981; NOTEBORN ET AL., 1988 c). Para este último autor hay al menos dos formas moleculares de proteínas LH like en la glándula pineal ovina, una de un peso molecular de 21000 y otra de < 60000 siendo la primera similar a la LH de la adenohipófisis (NOTEBORN ET AL 1992).

También se ha evidenciado en la pineal ovina la existencia de *GH like* y *PRL like* mediante técnicas de inmunoreacción. (NOTEBORN ET AL., 1993).

Así mismo se ha encontrado la presencia de mRNA de *vasopresina (AVP)* pero de forma dispersa y no tan abundante como en la hipófisis por lo que se sospecha que neuronas vasopresinérgicas puedan influir en la función de la glándula pineal ovina (MATTHEWS ET AL, 1993). La *AVT (arginina-vasotocina)* ya se detecta en la sangre del feto ovino pero su significado fisiológico no es conocido (ERVIN ET AL,

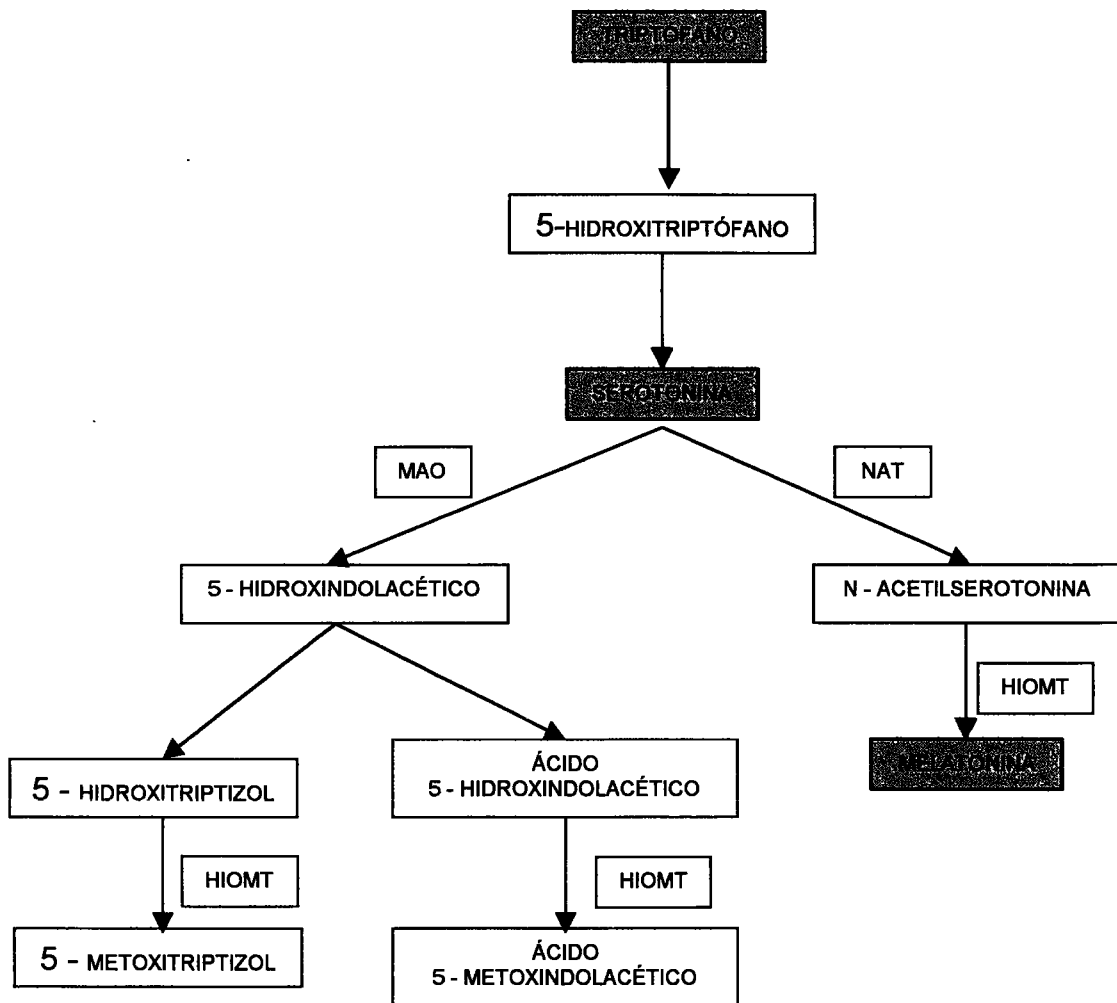
1985). Esta AVT fetal sigue un ritmo circadiano y parece ser que proviene de la glándula pineal del feto (LEAKE ET AL., 1986), pero para NOTEBORN (1988 b) esto no es así y no detecta la presencia de AVT en la pineal ovina adulta pero si la presencia de AVP y **oxitocina** (NOTEBORN ET AL 1988 b). Parece ser que la oxitocina y la AVP modulan la secreción de melatonina. Sin embargo poco se sabe acerca de sus receptores. En 1997 RAHMANI publica que la pineal ovina presenta una alta densidad de receptores de oxitocina siendo éstos más numerosos (unas 10 veces mas) que los receptores de AVP.

Otra sustancia presente en la pineal ovina es la **5 methoxytryptophol (5 MT)** que sigue un ritmo inverso al de la melatonina (aumenta en el día y disminuye en la noche) y también está relacionada con el tamaño de la glándula ya que las de mayor tamaño tienen mas cantidad de 5 MT que las de menor. El papel que desempeña la 5 MT está por determinar (VIVIEN-ROELS, 1999).

También se ha detectado la presencia en la pineal ovina de un péptido similar al inductor del sueño delta del conejo (NOTEBORN ET AL., 1988 a).

1.8 BIOQUÍMICA

En el proceso de síntesis de la melatonina a partir del triptófano intervienen 2 enzimas fundamentales: la NAT (N-acetil transferasa) y la HIOMT (Hidroxindol-O-metiltransferasa).



Basados en estudios con ratas, se podría pensar que la actividad de la NAT fuera el principal factor que regulara la síntesis de melatonina así como su concentración en sangre. En la rata la actividad de la NAT aumenta de 50 a 100 veces durante la noche lo que lleva a un aumento de la síntesis de la melatonina en

la glándula pineal y a un aumento de 10 veces de su nivel en sangre. Estudios recientes sugieren que este modelo en la rata puede no ser aplicable a otras especies como la oveja. Para NAMBOODIRI (1991) el papel de la actividad de la NAT como llave en el metabolismo de la serotonina (su aumento lleva a la acetilación de la serotonina y sino a su oxidación) que se da en las ratas es dudoso que se dé en la oveja ya que:

1º) En la oveja el aumento de actividad de la NAT con la llegada de la oscuridad es relativamente bajo (3 a 5 veces) frente al aumento que se da en la rata (50 a 100 veces). Apoyando estos datos tenemos que la proporción día / noche de mRNA de la NAT es <2 en la oveja y >150 en la rata (COON ET AL., 1995) y PRIVAT, ET AL(1999 a,b) sugiere que por tanto debe haber un mecanismo postranscripcional que este involucrado en la síntesis de melatonina.

2º) Hay ocasiones en las que hay una clara disociación entre la actividad de la NAT y la producción de melatonina (por ejemplo el tratamiento con un antagonista α adrenérgico como el prazosín produce disminución de la melatonina en sangre circulante pero no afecta a la actividad de la NAT ni a la concentración de N-acetilserotonina en la glándula pineal ni a la HIOMT ni a la serotonina; o por ejemplo la introducción en la noche de pulsos de luz de 30 minutos hace que la concentración de melatonina en sangre disminuya así como la actividad de la NAT pero la vuelta de la oscuridad eleva de nuevo la melatonina pero no afecta a la actividad de la NAT).

3º) Los niveles de serotonina disminuyen en lugar de aumentar cuando la melatonina aumenta por la noche y además al administrar serotonina durante el día la melatonina aumenta lo cual indica que la saturación de la NAT es incompleta (le

cuesta saturarse) por lo que debe tener poca importancia en la regulación de la síntesis de melatonina.

Así para NAMBOODIRI (1991) en especies evolutivamente superiores (oveja frente a rata) la HIOMT puede jugar un importante papel en la regulación de la síntesis de melatonina a partir de triptófano-serotonina.

La NAT ovina tiene una similitud estructural del 94'20 % con la bovina, mayor que con otras especies como la rata, el pollo o el hombre (CRAFT ET AL, 1999). Esta enzima se ha encontrado además de en la glándula pineal en la pars tuberalis y distalis ovinas pero en concentraciones menores (1/15 en pars tuberalis y 1/300 en pars distalis). No obstante no hay evidencias que a dicho nivel se sintetice melatonina por lo que dicha NAT tendría funciones diferentes a la NAT pineal (quizá en el amplio campo de la traducción de señales a través de la biotransformación de aminas) (FLEMING ET AL, 1999).

La función de la glándula pineal ovina parece que está regulada por dos tipos de receptores adrenérgicos α_1 y β (el receptor β está distribuido ampliamente por toda la glándula existiendo 2 subtipos el β_1 y el β_2) (MORGAN ET AL, 1988). Hoy en día los detalles de la regulación de la síntesis de melatonina en la glándula pineal ovina son poco conocidos. Por un lado SUGDEN en 1985 afirma que el receptor α_1 adrenérgico jugaría un papel principal frente al receptor β en la síntesis y liberación de melatonina. Sin embargo en 1988 MORGAN publica que la producción de AMPc y melatonina en la pineal ovina están reguladas principalmente a través de un mecanismo mediado por el receptor β . HOWELL en 1991, basándose en estudios con cultivos de pinealocitos ovinos jóvenes, concluye afirmando que el papel principal lo juega el receptor β adrenérgico siendo la misión del receptor α_1 adrenérgico poco

clara aunque no parece ser que juegue un papel potenciador del receptor β como ocurre en la rata.

CAPÍTULO 2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Aunque se han realizado estudios experimentales en animales inferiores (reptiles, aves, algunas especies de mamíferos de laboratorio), nuestro propósito es estudiar determinados aspectos en mamíferos superiores, concretamente en la especie ovina, donde la bibliografía al respecto es más bien escasa, pese a que se trata de una especie de gran interés, no sólo desde el punto de vista de la morfología comparada, sino porque su conocimiento puede esclarecer determinados aspectos poco conocidos de este órgano en la especie humana, toda vez que el género de vida de este animal, criado en espacios abiertos al aire libre, es en cierto modo similar al del hombre, en especial por lo que concierne a la influencia de la luz solar y también al ejercicio físico que realizan diariamente.

Como se ha expuesto en la revisión bibliográfica, la glándula pineal desempeña un papel esencial en la secreción de melatonina, hormona que influye sobre la actividad gonadal en especies de reproducción estacional. Como la oveja, desde el punto de vista reproductivo, es poliéstrica estacional, creemos que es interesante estudiar las variaciones de la estructura histológica de la glándula pineal de esta especie en función del momento o fotoperíodo en que sean sacrificados los animales.

Para ello nos hemos propuesto los siguientes **objetivos**:

1º) Realizar el estudio histológico de la glándula pineal ovina de animales jóvenes (2-3 meses) con técnicas convencionales, estudiando las diferencias que existan entre las pertenecientes a animales sacrificados de día y de noche. También

se utilizarán técnicas de inmunocitoquímica para el estudio de los astrocitos. Dentro de este objetivo, y de cara a planteamiento de futuros trabajos, se estudiarán también, aplicando las técnicas citadas, animales adultos para establecer las diferencias más relevantes con respecto a los animales más jóvenes.

2º) Verificar un estudio morfométrico y estadístico de los núcleos de los pinealocitos, mediante análisis de imagen con ayuda de un programa informático, con el objeto de averiguar las variaciones en el tamaño de los núcleos de los mismos según el fotoperíodo del día considerado (día y noche), y la zona de la glándula estudiada (cortical y medular).

3º) Efectuar un estudio a microscopía electrónica de transmisión. Nuestras investigaciones en este campo se centrarán sobre los cuerpos sinápticos y las variaciones fotoperiódicas de los mismos, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

El tema abordado forma parte de una de las líneas de investigación en los dos Departamentos donde se ha realizado esta Tesis Doctoral. Así, en el de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia se sigue una línea de investigación sobre las características de la pineal en diferentes especies de animales de laboratorio (rata, hámster, conejo) y sus variaciones circadianas y estacionales. En el de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid se ha trabajado en el estudio de diversas glándulas endocrinas (tiroides, hipófisis, adrenales y páncreas) y, por otra parte se está desarrollando un estudio morfofuncional del aparato reproductor en cabras.

Es pues, finalidad principal de este trabajo, contribuir en la medida de nuestra capacidad al mejor conocimiento de la organización estructural y funcional de la

pineal en la especie ovina al objeto de llenar una pequeña parte de ese gran vacío que aún existe en el conocimiento de este órgano, cuya importancia es cada vez mayor, a medida que mejor son conocidas sus funciones y estructura.

CAPÍTULO 3
MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo de nuestras investigaciones ha sido orientado en varios aspectos para poder efectuar un estudio comparativo morfofuncional de la pineal en la especie ovina.

3.1 TOMA DE MUESTRAS

Nuestros estudios daban comienzo en el matadero durante el reconocimiento en vivo que sistemáticamente se practica a todas las reses destinadas al sacrificio, al objeto de tener la seguridad que se trataba de animales sanos sin que presentasen signos de enfermedad.

De cada animal se tomaron los datos relativos a sexo, edad, peso de la canal, fecha y hora de sacrificio, según se observa en las tablas I y II.

En total tomamos 60 pineales, de las cuales la mitad corresponden a animales sacrificados en las horas centrales del día (de 12 del mediodía hasta las 17 horas), y la otra mitad a individuos sacrificados en la plenitud de la noche (después de las 20 horas y hasta pasada la 1 de la madrugada).

En cuanto a la edad, se trata en su mayoría (65%) de individuos jóvenes (39), de edades comprendidas entre 2'5 y 4 meses, es decir corderos, y el resto (21, o sea el 35%), lo componen animales adultos (de mas de 2 años), en edades que oscilan de 2 a 10 años de edad.

Por lo que se refiere al sexo, la mayor parte (61'6%) fueron machos (37), y en menor número (38'3%, es decir 23) hembras. Sin embargo, si tenemos en cuenta la

TABLA I

Relación de epifisis tomadas en matadero en periodo diurno

Nº	Sexo	Edad	Raza	Peso canal (Kg)	Fecha	Hora
1	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'1	24 Nov	13:40
2	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'2	24 Nov	13:41
3	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'3	24 Nov	13:42
4	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'1	24 Nov	13:44
5	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'0	24 Nov	13:45
6	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'5	24 Nov	13:47
7	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'4	24 Nov	13:48
8	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'6	24 Nov	13:50
9	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	11'5	24 Nov	13:51
10	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'1	24 Nov	13:53
11	Hembra	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'2	24 Nov	13:55
12	Macho	3 meses	Segureña	12'1	15 Dic	16:30
13	Macho	3 meses	Merina	12'3	15 Dic	16:32
14	Hembra	2'5 meses	Manchega	10'1	15 Dic	16:34
15	Macho	3'5 meses	Manchega	11'0	15 Dic	16:36
16	Hembra	2'5 meses	Manchega	9'5	15 Dic	16:38
17	Hembra	4 años	Cruce de merina	18'2	11 Ene	16:30
18	Hembra	8 años	Cruce de merina	16'4	11 Ene	16:31
19	Hembra	7 años	Cruce de merina	17'8	11 Ene	16:33
20	Macho	2 años	Cruce de merina	21'3	11 Ene	16:40
21	Hembra	10 años	Cruce de merina	19'2	11 Ene	16:45
22	Macho	4 años	Cruce de merina	22'5	11 Ene	16:50
23	Hembra	10 años	Cruce de merina	19'2	11 Ene	17:00
24	Hembra	6 años	Cruce de merina	22'1	13 Ene	15:00
25	Macho	3 años	Segureña	23'2	13 Ene	15:02
26	Hembra	5 años	Manchega	26'1	13 Ene	15:05
27	Hembra	4 años	Manchega	25'8	13 Ene	15:06
28	Macho	4 meses	Rasa aragonesa	12'1	13 Ene	16:00
29	Hembra	4 meses	Rasa aragonesa	12'0	13 Ene	16:02
30	Macho	4 meses	Rasa aragonesa	12'2	13 Ene	16:05

TABLA II

Relación de epíffisis tomadas en matadero en periodo nocturno

Nº	Sexo	Edad	Raza	Peso canal (Kg)	Fecha	Hora
31	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'5	22 Nov	0:45
32	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'8	22 Nov	0:47
33	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'6	22 Nov	0:49
34	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	11'8	22 Nov	0:50
35	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	11'9	22 Nov	0:53
36	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'1	22 Nov	0:56
37	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'6	22 Nov	0:57
38	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'4	22 Nov	0:58
39	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'1	22 Nov	1:09
40	Macho	4 meses	Merina x rasa aragonesa	12'8	22 Nov	1:10
41	Hembra	2'5 meses	Merina	9'9	14 Dic	21:00
42	Macho	3 meses	Merina	10'8	14 Dic	21:02
43	Macho	3 meses	Merina	10'6	14 Dic	21:05
44	Macho	2'5 meses	Manchega	8'1	14 Dic	21:07
45	Macho	3 meses	Manchega	9'2	14 Dic	21:10
46	Hembra	4 años	Segureña x castellana	22'1	11 Ene	22:45
47	Hembra	6 años	Segureña x castellana	21'7	11 Ene	22:47
48	Hembra	6 años	Segureña x castellana	20'9	11 Ene	22:50
49	Macho	2 años	Cruce de merina	25'9	11 Ene	22:52
50	Hembra	8 años	Segureña x castellana	19'8	11 Ene	23:08
51	Hembra	5 años	Segureña x castellana	21'2	11 Ene	23:11
52	Hembra	3 años	Segureña x castellana	23'1	11 Ene	23:15
53	Hembra	4 años	Merina x rasa aragonesa	22'4	13 Ene	22:00
54	Macho	3 años	Manchega	26'2	13 ene	22:04
55	Hembra	5 años	Segureña	20'7	13 Ene	22:06
56	Macho	3 meses	Merina x rasa aragonesa	11'1	13 Ene	22:09
57	Macho	3 meses	Merina x rasa aragonesa	11'9	13 Ene	22:15
58	Macho	3 mese	Merina x rasa aragonesa	11'2	13 Ene	22:18
59	Hembra	4 meses	Manchega	12'3	13 Ene	22:20
60	Hembra	4 meses	Manchega	12'2	13 Ene	22:25

edad, la proporción varía, según sean animales jóvenes o adultos. Así, en los jóvenes, hay 32 machos (82%) y 7 hembras (18%), mientras que en los adultos, hay 5 machos (23'8%) y 16 hembras (76'2%).

Esta circunstancia obedece al hecho de que los ovinos jóvenes que llegan al matadero en su mayoría son machos (incluso hay partidas que en su totalidad), ya que las hembras se guardan en el rebaño para, llegada la época puberal, ser utilizadas como reproductoras. Sin embargo, en el caso de los ovinos adultos y viejos sucede todo lo contrario: la mayoría son ovejas de desvieje y en más pequeña proporción hay machos que por razón de su edad ya no se utilizan con fines reproductores.

Las razas de los animales estudiados son las habituales en nuestros mataderos. Así, nos encontramos con individuos de raza rasa aragonesa, merina, manchega, castellana, segureña, en mayor o menor pureza, y sobre todo híbridos zootécnicos de las citadas razas.

El peso de las canales es el habitual en estas, razas y edades y figura en las tablas correspondientes.

Las muestras se tomaron en la segunda mitad del otoño y primer mes de invierno de los años 1999 y 2000, a fin de poder estudiar mejor las modificaciones en el ritmo fotofásico, ya que durante esta estación, y especialmente desde el 20 de noviembre hasta el 15 de enero, es cuando son más largos los periodos nocturnos, y como es sabido, la pineal tiene durante la noche una mayor actividad; de ahí que eligiésemos esta época del año para realizar la toma de muestras.

Habida cuenta del horario de muchos mataderos que suelen trabajar a partir de la media tarde hasta altas horas de la madrugada y solo excepcionalmente lo

hacen en horas con luz de día durante alguna jornada laboral (v. gr. algún día entre semana para regularizar fallos de abastecimiento de alguna especie), resolvimos el problema de la toma de muestras con luz de día, aprovechando precisamente esas jornadas, y sobre todo gracias a la colaboración prestada por los veterinarios directores y personal del matadero, pudimos llevar a término nuestro propósito.

Otro problema que también resolvimos satisfactoriamente, gracias a esta colaboración fue la extraordinaria rapidez en la toma de muestras (GRIEM, 1975), de suerte que entre el sacrificio del animal y la inmersión de la muestra en el fijador (formol tamponado al 10% para microscopía óptica y glutaraldehído para microscopía electrónica), transcurrió un plazo entre cinco y diez minutos; excepcionalmente en tres ocasiones este tiempo fue superior a los diez minutos, sin llegar a los quince.

Esta rapidez se consiguió porque el sacrificio de los animales objeto de estudio se realizaba, a medida que íbamos extrayendo las epífisis, de modo que nunca había animales sacrificados en espera de dicha extracción. En la especie ovina, es norma en los mataderos proceder a su sacrificio por degüello mediante sección de la yugular y una vez exangües se les suspende de unos ganchos y se les quita la piel (desuello); seguidamente se les decapita y eviscera. En nuestro caso, y por razones de tiempo, tras la degollación, se decapitaba inmediatamente la res, antes del desuello, y un operario especializado con una cuchilla ad hoc procedía a quitar la calota, y seguidamente nosotros extraíamos la epífisis.

Como nuestro propósito era el estudio a microscopía óptica y a microscopía electrónica de transmisión, las muestras, inmediatamente después de haber sido tomadas, fueron sometidas a fijación, para lo cual se introdujeron en dos series de

frascos convenientemente numerados. Las muestras destinadas al estudio histológico con métodos convencionales y las destinadas al estudio inmunohistoquímico se fijaron en formol tamponado comercial al 10% durante un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras de la serie destinada a microscopía electrónica de transmisión se fijaron en una solución tamponada de glutaraldehído al 5% que se mantenía en el interior de una nevera portátil cuya temperatura era aproximadamente de +4° C. Obvia señalar que previamente a su introducción en los respectivos fijadores, las pineales fueron seccionadas longitudinalmente en dos mitades, cada una de las cuales había de ser procesada de diferente modo, toda vez que con dicho seccionamiento se favorecía la acción del fijador correspondiente.

3.2 ESTUDIO A MICROSCOPIA ÓPTICA

Las piezas destinadas a este estudio fueron objeto de inclusión en parafina sintética Histosec pastillas Merck®, entre los 56°C y 57°C, mediante el uso de un procesador automático de tejidos Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400®, con un programa de cambio de alcoholes y bencenos automático. Una vez concluido este proceso, las piezas se pasaron a la unidad formadora de bloques donde se realizaron los mismos en la consola Tissue-Teck® (dispensador de parafina, consola térmica y crioconsola) Miles Scientific®.

Obtención de cortes: Para el estudio estructural se realizaron cortes seriados de estas muestras de 4-5µm de grosor con micrótopo de rotación utilizando, indistintamente, dos modelos (LEICA® RM 2155, JUNG® RM 2055). A continuación se colocaron en portaobjetos previamente desengrasados y tratados con diversos

adhesivos según la técnica posteriormente empleada. Así para la aplicación de técnicas histológicas convencionales, los portaobjetos se trataron con albúmina glicerizada y para las técnicas inmunohistoquímicas se empleó Vectabond® (Vector Laboratories SP 1800) Por último los cortes se dejaron secar en estufa a 37°C durante 16-18 horas.

Tinciones: Las secciones se desparafinaron en xilol y fueron hidratadas pasando por una serie de alcoholes de gradación decreciente; a continuación se tiñeron con distintas técnicas histoquímicas convencionales: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, y plata metanamina.

Técnica de hematoxilina-eosina

a) Soluciones

- Hematoxilina de Carrazi (500 cc).
 - * Hematoxilina (0,5g) + sulfato aluminico potásico (25g), triturar bien en un mortero.
 - * Mezclar con glicerina (100cc).
 - * Añadir agua (400cc).
 - * Agitar fuertemente.
 - * A los 10 minutos añadir yodato potásico (0,10g).
 - * Mantener 1 mes madurando en la oscuridad.

- Eosina (250cc)
 - * Eosina amarilla (2,5g).
 - * Agua (250cc).
 - * Ácido acético glacial (11 gotas).

b) Método

- 1.- Después de desparafinar, hidratar y lavar.
- 2.- Hematoxilina de Carrazi (15').
- 3.- Agua corriente (10'-15').
- 4.- Eosina (1segundo-1 minuto), controlar visualmente.
- 5.- Lavado rápido (sumergir y extraer).
- 6.- Deshidratar y montar.

c) Resultados

- Núcleos (azul / negro).
- Eritrocitos (naranja a rosa).
- Restantes estructuras (rosado a rojo).

Técnica de tricómico de Masson

a) Soluciones

• Elaboración de la hematoxilina-A

- * Hematoxilina 1g.
- * Alcohol de 90° 100ml.

• Elaboración de la hematoxilina-B

- * Cloruro férrico..... 4ml.
- * Ácido clorhídrico 1ml
- * Agua destilada 95 ml

b) Método

- 1.- Desparafinar, hidratar y lavar.
- 2.- Hematoxilina férrica de Weigert 5 minutos (Solución A y B a partes iguales)

- 3.-Lavar en agua corriente 5-10 minutos (si es necesario se vuelve a diferenciar en hematoxilina B unos segundos y luego se lava)
- 4.- Fucsina ácida Ponceau 5 minutos (1cc de fucsina stock y 9cc de solución de ácido acético 0.2%)
- 5.- Lavar en agua acética 1%
- 6.- Ácido fosfotungsténico 5% 5 minutos
- 7.- Lavar en agua acética 1%
- 8.- Azul de anilina 1 minuto
- 9.- Lavar en agua acética 5-6 minutos
- 10.- Deshidratar y montar

Técnica de la plata metenamina

(Utilizamos el Kit comercializado para plata metenamina del laboratorio Bio Óptica (nº ref. 043822) y seguimos el método allí indicado).

a) Soluciones

- Ácido periódico (A)
- Nitrato de plata (B)
- Hexametilentetramina (C)
- Tetraborato de sodio (D)
- Cloruro de oro (E)
- Solución de fijación (F)

b) Método

- 1.- Desparafinar, hidratar y lavar2.- poner 10 gotas de la solución A durante 30 minutos.
- 2.- Poner 10 gotas de la solución A durante 30 minutos.

- 3.- Lavar en agua destilada.
- 4.- Hacer una solución mezclando 10 gotas de la solución B mas 10 gotas de la solución C y añadiendo 10 gotas de la solución D y dejando incubar durante 60 minutos a 60 ° C.
- 5.-Lavar en agua destilada 5 minutos.
- 6.- Incubar las preparaciones con 10 gotas de la solución E durante 1 minuto.
- 7.- Lavar con agua destilada.
- 8.- Poner en las muestras 10 gotas de la solución F durante 1 minuto.
- 9.- Lavar con agua destilada.
- 10.- Deshidratar y montar.

El medio de montaje utilizado para su conservación y observación fue DPX[®] (Nustain).

3.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

El estudio inmunocitoquímico se realizó utilizando la técnica de streptoavidina-biotina para el estudio de la expresión de: vimentina; filamento glial, y serotonina en las distintas secciones.

Técnica de streptoavidina-biotina

a) soluciones

- Buffer citrato

* Agua destilada 1 litro

* Citrato sódico 2,94 g.

* Ajustar pH a 6

- TRIS (solución stock)

- * Agua destilada 1 litro
- * Trizma base 13,9g.
- * Trizma clorhídrico 60'6g.
- * Ajustar pH a 7,4

- TBS (solución de trabajo)

- * Agua destilada 900ml.
- * TRIS 100ml.
- * Sodio cloruro 6,5g.
- * Ajustar pH a 7,4

- Bloqueo peroxidasa

- * Metanol 99ml.
- * Agua oxigenada 1ml.

- Diamino bencidina

- * TBS 100ml.
- * Agua oxigenada 100µl
- * DAB 2 pastillas

b) Método (Strep-ABC-HRP para cortes en parafina)

- 1.- Desparafinado de las secciones desde el xilol hasta el paso por los alcoholes en grados decrecientes.
- 2.- Lavado de las preparaciones en agua destilada durante 10 minutos.
- 3.- Tratamiento de las secciones en horno microondas para el desenmascaramiento de los antígenos. Las secciones son colocadas en un

recipiente de plástico resistente al microondas y sumergidas en tampón citrato (10mM pH 6,0). Se someten a tres ciclos de 5 minutos a la máxima potencia del horno microondas (Singer® SE 116,790 W) reemplazando el tampón evaporado por agua destilada. A continuación se deja enfriar en el tampón caliente durante 20 minutos a temperatura ambiente.

- 4.-Tres lavados sucesivos en TBS de 5 minutos cada uno.
- 5.-Inhibición de la peroxidasa endógena dejando las secciones en una solución compuesta de 99 ml de metanol y 1 ml de peróxido de hidrógeno, durante 10 a 15 minutos.
- 6.-Se realizan dos lavados en agua destilada de 5 minutos cada uno, y dos lavados en TBS de otros 5 minutos.
- 7.- Incubación con antisuero primario durante toda la noche en nevera a +4 ° C. Las diluciones de trabajo varían en función del antisuero primario utilizado:

* Anti-vimentina monoclonal de cristalino de cerdo obtenido en ratón (V 9) (Dako Patts® M 725). Dilución de trabajo 1/25.

* Anti-Filamento glial de cabra obtenido en conejo (Dako Patts®; Z 0334) 1/500.

* Anti-serotonina ncl-serotp (Novocastra Laboratories® Ltd) Dilución de trabajo 1/200.

- 8.- Lavar nuevamente las secciones tres veces durante 5 minutos en TBS.
- 9.-Incubación con el antisuero anti-ratón biotinilado (Dako Patts® E 0354, 1:400) durante 30 minutos a temperatura ambiente para el suero monoclonal (vimentina) y con el antisuero anti-conejo biotinilado (Dako Patts® E 0353

1:400) durante 30 minutos para los sueros policlonales. (filamento glial y serotonina).

- 10.- Tres lavados sucesivos de 5 minutos en TBS.
- 11.- Incubación con estreptavidina (Zymed® P50242; 1:400) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12.- Lavados en TBS de 5 minutos tres veces.
- 13.- Revelado con 25 gramos de diaminobencidina (DAB) (Sigma Chemical® Co P3039) disueltos en 100 ml de TBS y 100 µl de peróxido de hidrógeno, durante un máximo de 10 minutos en oscuridad.
- 14.- Lavar en agua destilada durante 5 minutos.
- 15.- Contrastado de las preparaciones en hematoxilina de Carrazi durante 2 minutos.
- 16.- Lavado, deshidratación y montaje en DPX® (Nustain).

c) Resultados

- El control positivo en cada caso fue para:
 - * Vimentina: endotelio vascular interno
 - * Filamento glial: astrocitos del SNC
 - * Serotonina: intestino delgado de perro
- Como control negativo
 - * Omisión de la primera capa (anticuerpo primario) sustituida por TBS.

Las preparaciones fueron observadas y cuantificadas por dos observadores simultáneamente con un microscopio de múltiples cabezales (LEITZ® LABORLUX-S).

En total hemos realizado unas 600 preparaciones histológicas que fueron seleccionadas para su estudio. De ellas se han elegido las más representativas, y a partir de las mismas hemos obtenido las microfotografías, realizadas mediante captura digital con un equipo OLYMPUS® compuesto por un microscopio VANOX AHBS3, dotado de óptica planapocromática, una cámara digital DP10 y un adaptador U-PMTVC a partir de las cuales se han realizado las copias que figuran en el capítulo de Resultados. Al pie de cada microfotografía se señalan los datos correspondientes a la óptica empleada en cada caso.

Nuestros estudios a microscopía óptica, tanto los exámenes efectuados con métodos y tinciones convencionales (hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y plata metenamina), como los realizados mediante el empleo de métodos inmunohistoquímicos, se efectuaron sobre la totalidad de los animales que figuran en nuestro protocolo. Sin embargo, como luego señalaremos, para el estudio morfométrico de los núcleos de los pinealocitos y para los estudios a microscopía electrónica, escogimos dos series mas reducidas de animales (una sacrificados de día y otra de noche), que fueran lo más homogéneas posibles, con el fin de evitar que los resultados de nuestros estudios comparativos pudieran achacarse a factores distintos al fotoperiodo, en el que se realizó la toma de muestras (alimentación, edad, raza, sexo, etc.).

Este modo de proceder se justifica por el hecho de que son varios los estudios, que según el fotoperiodo, existen sobre tamaños de los núcleos de los pinealocitos así como a microscopía electrónica de transmisión, en especies que habitualmente se utilizan en experimentación animal; no así en la especie ovina como ya señalamos en el Capítulo II. Por ello, hemos querido trabajar en este campo con una

población lo más homogénea posible y poder concluir afirmando que las diferencias halladas no son debidas a factores exógenos distintos al fotoperiodo considerado. Por el contrario, en la bibliografía internacional, hay pocos trabajos sobre inmunohistoquímica (en ovinos y en otras especies). De ahí que nuestros estudios incluyan en este campo un grupo más numeroso de animales, más heterogéneo (diferentes edades, razas, etc.) pues consideramos nuestra aportación en este campo como un estudio inicial y a la vista de los resultados hallados, sirva de base para en un futuro, profundizar en determinados aspectos más concretos.

3.4 ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Con las preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina y con las de cortes semifinos coloreados con azul de toluidina hemos realizado el análisis de imagen de los núcleos de los pinealocitos, para conocer de un modo mensurable el tamaño de los mismos, comparando las dimensiones de los situados en las zonas periférica y central.

Para ello se tomaron las imágenes en blanco y negro con escala de grises mediante una cámara de video "Sony[®] CCD-Iris" acoplada mediante una rosca "C" a un microscopio "Leica[®] DM RB". Todas las imágenes correspondientes a campos microscópicos elegidos al azar fueron tomadas mediante un objetivo 100x de inmersión, con apertura numérica 1'25 con el mismo nivel de iluminación (iluminación según el principio de KÖHLER y empleo de filtro neutro N4) y digitalizadas con una tarjeta capturadora de imágenes de vídeo "VHXtreme software". Utilizando dicha óptica e idénticas condiciones de trabajo, se tomó una imagen de un micrómetro objetivo que fue utilizado para calibrar el sistema. De este

modo se formaban imágenes con formato BMP que se utilizaron en el procesamiento subsiguiente.

Para el análisis de las imágenes empleamos el programa informático "Scion Image", cuyos pasos realizados fueron los siguientes:

1º. Calibrado para convertir los puntos o unidades informáticas de imagen (píxeles) en unidades del sistema métrico decimal, para lo cual utilizamos la escala del micrómetro objetivo a que nos hemos referido. Este calibrado dio la siguiente equivalencia: $100\mu\text{m} = 500$ píxeles, de forma que el campo microscópico objeto de estudio que es un rectángulo cuyos lados miden 640 píxeles x 845 píxeles, tiene realmente unas dimensiones de $128\mu\text{m} \times 169\mu\text{m}$, es decir, $21.632\mu\text{m}^2$.

2º.- En cada imagen se definía el ROI (Region of Interest) que coincidía con la superficie digitalizada previamente.

3º.- De acuerdo con los umbrales de los distintos grises de la escala, se diferenciaban las partículas de interés (núcleos de los pinealocitos) del resto de la imagen que no nos interesaba, efectuando las oportunas correcciones en caso de haber tomado alguna otra estructura o espacio por el núcleo de un pinealocito. Se desecharon sistemáticamente los núcleos que aparecían incompletos por estar situados en algún borde de la imagen, ya que en tal caso desconocíamos los límites reales.

4º.- Los núcleos existentes en cada imagen, tras este proceso selectivo, eran analizados por el ordenador, obteniéndose así información detallada e individualizada de cada núcleo, referida a la superficie, expresada en μm^2 .

5º.-Con esta información numérica de cada imagen y de cada núcleo, creamos una base de datos, a partir de la cual y con la ayuda del programa informático

“Microsoft® Excel 2000” verificamos los estudios estadísticos, cuyos resultados figuran en el capítulo correspondiente.

En total, realizamos análisis de imagen de 7.472 núcleos de pinealocitos, de los que hicimos cuatro estudios separados: los procedentes de pineales obtenidas en periodo diurno (3.402 núcleos) y las obtenidas en periodo nocturno (4.070 núcleos). A su vez de las pineales obtenidas de día realizamos un estudio morfométrico de la zona cortical o periférica (1.172 núcleos) y los de la zona central o medular (2.230 núcleos), y otro tanto de las pineales obtenidas de noche (1.717 núcleos de la zona cortical y 2.353 de la medular).

Este análisis de imagen lo hemos verificado, sobre 20 animales jóvenes, concretamente los señalados en las tablas I y II con los números 1 al 10 (sacrificados de día) y 31 al 40 (sacrificados de noche). Intencionadamente no hemos querido incluir más animales por varias razones: la primera porque queríamos estudiar las variaciones de tamaño que experimenta el núcleo de los óvidos, según el ritmo fotofásico, estudiando una población lo más homogénea posible, evitando factores que pudieran distorsionar el resultado, como por ejemplo la edad, la raza, la alimentación, el régimen de vida (estabulación o pastoreo), de suerte que, según puede verse en los datos que figuran en las tablas, y en la información recibida cuando tomamos las muestras, estos dos lotes son semejantes, eran del mismo propietario y habían sido criados y alimentados en idénticas condiciones y las muestras de uno y otro lote fueron tomadas con menos de 48 horas de diferencia. Otra razón por la cual no extendimos nuestro análisis de imagen a un mayor número de animales fue que preferimos hacer un estudio sobre series numéricas muy representativas, de suerte que por cada animal y zona -

central y cortical- hicimos casi 200 mediciones -186'8 de promedio-, con lo cual las cifras obtenidas tienen *per se* un valor estadístico superior al que tendrían si hubiésemos estudiado mas animales, con menos determinaciones por animal y zona.

Para una mejor información de la metodología seguida, acompañamos una imagen de tejido pineal (corresponde al número 2 de nuestro protocolo; se trata de la zona central) en dos fases del proceso de análisis (figura 1). En la figura 1-A, la imagen digitalizada aparece tal como la hemos tomado del microscopio (teñida con azul de toluidina, pero por la razón expuesta aparece en blanco y negro). En la figura 1-B, se muestra el resultado de la aplicación del programa informático "Scion Image" donde las estructuras que han de ser procesadas (en nuestro caso los núcleos de los pinealocitos), aparecen numerados y silueteados.

3.5 ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La primera parte del proceso de fijación con glutaraldehído al 5%, a +4° C duraba un mínimo de 6 horas y seguidamente continuamos el procesado en el laboratorio, del modo siguiente:

Una vez sometidas las piezas a la acción del glutaraldehído, se lavaron con solución tamponada (2 lavados de 30 minutos cada uno), y seguidamente, se introdujeron en un baño de tetróxido de osmio al 1%¹ durante 2 a 4 horas (postfijación) según el volumen de la pieza, seguido de otro doble lavado con solución tamponada de 30 minutos, todo ello a la misma temperatura de +4° C.

¹ El tetróxido de osmio se prepara partiendo de una solución al 1% del modo siguiente:
Solución de tetróxido de osmio al 1%..... n volúmenes
Agua destilada n volúmenes
Tampón 0'2 M..... 2n volúmenes

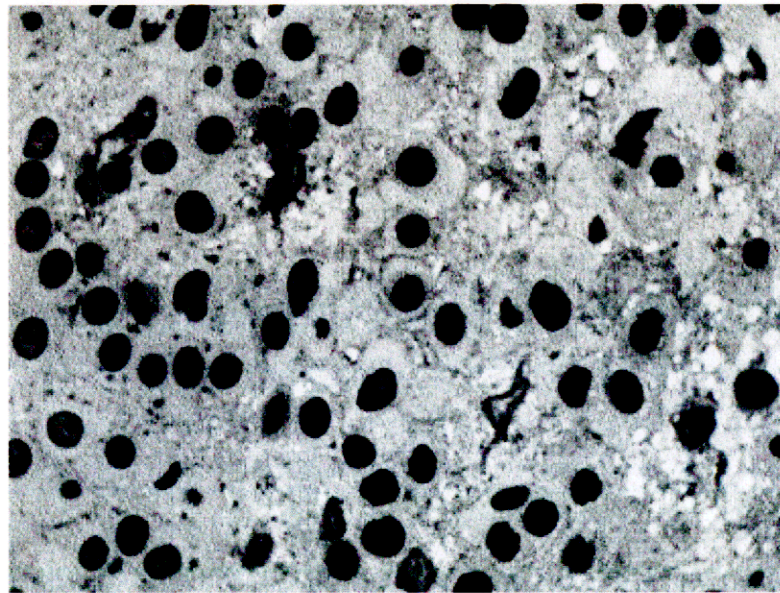


Fig. 1-A.- Imagen de la zona medular

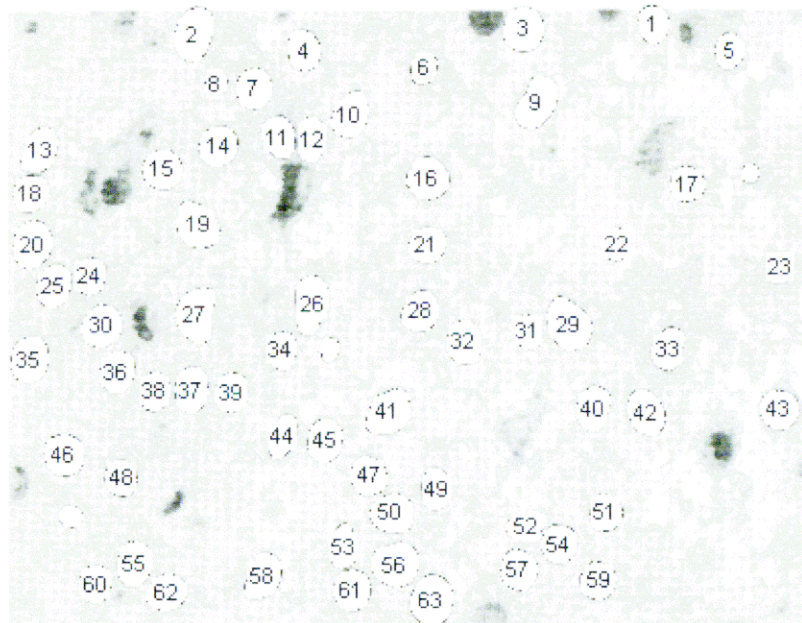


Fig. 1-B.- Resultado de la aplicación del programa "Scion Image" con los núcleos de los pinealocitos numerados y silueteados.

Fig. 1.- Dos fases del análisis de imagen realizado con el programa "Scion Image". Explicación en el texto. Las imágenes corresponden a la zona central de la epifisis tomada de día; nº 2 de nuestro protocolo.

Realizada la fijación, las piezas fueron objeto de deshidratación, empleando para ello, soluciones de concentración creciente de acetona (30%, 50% y 75%) donde se depositaban las piezas durante 30 minutos en cada solución.

A continuación, para contrastar, las piezas permanecieron en una solución de acetato de uranilo y acetona² por un tiempo mínimo de 2 horas, aunque en ocasiones permanecieron 12-18 horas (toda la noche). Para concluir el proceso de deshidratación, las piezas permanecieron en solución de acetona al 90% durante 30 minutos y en dos baños de acetona anhidra durante 30 minutos cada uno.

La inclusión en resina epoxídica (Durcupan ACM[®] Fluka)³ se realizó según proceder habitual, es decir, introduciendo sucesivamente las piezas -ya deshidratadas- en Acetona al 100% y Durcupan ACM nº 1 en la proporción 3/1 durante 2 horas, en la proporción 1/1 otras 2 horas y en la proporción 1/3 otras 2 horas. Todas estas operaciones las realizamos a + 4º, excepto la última que se verificó a temperatura ambiente y dejando abierto el recipiente con la mezcla 1/3 al objeto de favorecer la evaporación de la acetona. Así mismo, las fases siguientes del proceso de inclusión, consistentes en introducir las piezas en Durcupan ACM nº 1 (dos baños de 2 horas cada uno) y Durcupan ACM nº 2 (un baño de dos horas), se realizaron a temperatura ambiente.

Sin embargo, y al objeto de favorecer la polimerización de la resina, el último paso de este proceso de inclusión lo realizamos en estufa a + 70º C, de modo que las piezas las depositamos en una solución de Durcupan ACM nº 2, que colocamos

² La solución de acetato de uranilo-acetona tiene la siguiente composición:

Acetato de uranilo 2 g.

Acetona al 75% 100 ml

³ El Durcupan ACM son realmente dos productos denominados nº 1 y nº 2. El nº 1, es una mezcla compuesta por una resina epoxídica, un endurecedor y talato de butilo que actúa como plastificante. El nº 2, lleva además, un acelerador (catalizador) del proceso de polimerización.

en cápsulas de gelatina desechables, la mas de las veces, aunque en ocasiones, empleamos moldes recuperables, en cuyo medio permanecieron durante 72 horas.

Conseguido el bloque ya endurecido, lo tallamos a mano para eliminar la resina sobrante y formar del bloque un tronco de pirámide, valiéndonos de una cuchilla, y en algún caso utilizamos el Pyramitome® LKB-11800.

Realizamos cortes semifinos de 1µm de espesor, mediante Ultramicrotomo Reichert® Ultracut S Leica. Tras recoger los cortes de la cubeta de la que va provista el dispositivo de la cuchilla, los colocamos en portaobjetos, sobre los cuales previamente habíamos depositado una gota de agua. Acto seguido se ponían a secar sobre plancha eléctrica unos minutos, para favorecer la evaporación del agua.

Una vez secos se tiñen con azul de toluidina⁴ -operación que también realizamos sobre la plancha eléctrica- durante un tiempo que varía de 20 a 45 segundos, según la apetencia tintorial de la pieza. Se tira el exceso de colorante, y a la vez se lava con agua destilada y se deja secar nuevamente sobre plancha. Se deposita sobre las piezas (ya que generalmente solemos colocar varias en cada portaobjetos) una gota de Eukit® Zeiss, sobre la cual se coloca el cubreobjetos.

Si el campo observado a microscopía de luz, resulta interesante, procedemos a efectuar cortes con el ultramicrotomo antes mencionado de 60-70nm⁵, los cuales, se recogen de la cubeta que lleva aneja la cuchilla de vidrio, directamente con las rejillas (aquí, obviamente, solo colocamos un corte por cada rejilla) que van a ser observadas con el microscopio electrónico de transmisión. Estos cortes ultra finos se adhieren directamente a las rejillas por tensión superficial. Antes de su uso,

4 La solución colorante de azul de toluidina está compuesta por:
Azul de toluidina..... 1g.
Solución tampón de pH 7'5100ml.

recubrimos las rejillas con una membrana de polivinilo formal (Formvar® Monsanto). Una vez que las rejillas contienen los cortes ultra finos se dejan secar al aire sobre papel de filtro y se tiñen con solución de Reynolds.

Utilizamos dos tipos de rejillas, ambas de cobre: La tipo Square 75 mesh (de 3'05 mm. de diámetro, con un porcentaje de transmisión del 73%. Ref. G 2075 C de la firma Agar Scientific Ltd.), con la cual, y merced a la cuadrícula de 75µm de lado que dispone, realizamos el montaje de los cuerpos sinápticos. El otro tipo de rejilla utilizada, la Slot Grids también de 3'05mm. de diámetro con una ventana de 2 x 1 mm. (Ref. G. 2500 C de la misma firma comercial) nos permite visualizar todo el campo, sin las limitaciones que impone la presencia de la cuadrícula.

Realizamos la tinción, según la técnica de Reynolds, partiendo de soluciones de nitrato de plomo y citrato sódico, lo que determina la conversión de aquel en citrato de plomo, el cual se disuelve en una solución valorada de hidróxido sódico, con un pH 12. Las rejillas, con los cortes hacia abajo, se dejan flotar sobre esta solución durante 10-15 minutos.

El estudio de los cortes montados sobre rejillas se realizó con Microscopio Electrónico de transmisión Philips® CM-10, y de los campos que consideramos más interesantes se tomaron las correspondientes electronografías, para lo cual utilizamos placas de película negativa Agfa® Scientia, E.M. film con un formato 6'5 x 9 cm. De dichas electronografías escogimos las más representativas, las cuales figuran en el capítulo de Resultados. Al pie de cada una se indican los aumentos en que fueron realizados los negativos.

5 Para conocer con cierta aproximación el espesor de la pieza cortada recurrimos a la siguiente escala: gris plateado, 60nm; dorado claro, 70-80nm; dorado oro viejo, 90-100nm.

3.6 RECUESTO DE CUERPOS SINÁPTICOS.

El recuento de los cuerpos sinápticos se realizó, según hemos dicho, mediante rejillas provistas de una cuadrícula de $75\mu\text{m}$ de lado, es decir sobre una superficie de $5.625\mu\text{m}^2$. Por cada animal realizamos el contaje sobre 4 cuadrículas, lo que supone haber verificado el recuento sobre una superficie de $22.500\mu\text{m}^2$ y como el estudio se realizó sobre 20 animales -10 sacrificados de día y 10 de noche- en total examinamos una superficie de $450.000\mu\text{m}^2$ ($225.000\mu\text{m}^2$ de cada grupo). El número total de cuerpos sinápticos contados fue de 112 en la serie diurna y 211 en la nocturna.

El estudio descriptivo de la organización ultraestructural de la pineal en ovinos, mediante microscopía electrónica de transmisión, así como el recuento de cuerpos sinápticos se realizó sobre los mismos dos grupos de animales en los que efectuamos el análisis de imagen de los núcleos de los pinealocitos, es decir, 20 animales jóvenes (los reseñados en la tabla I con los números 1 al 10 -sacrificados de día- y en la tabla II con los números 31 al 40 -sacrificados de noche). Los motivos de tal elección quedaron expuestos líneas arriba.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 CARACTERES MACROSCÓPICOS

La pineal en la especie ovina exhibe un color sonrosado, tiene una forma esferoidal, y se halla situada en la parte anterior del mesencéfalo, en la porción antero-inferior de los tubérculos cuadrigéminos anteriores, encima del tercer ventrículo. Estas particularidades anatómicas permiten llegar a ella fácilmente, separando mediante dos erinas los dos hemisferios cerebrales (Fig. 2).

El tamaño de la pineal en los ovinos, tal como puede observarse en la Fig. 3 es de medio centímetro o algo mas, según el diámetro que se considere.

4.2 ESTUDIO A MICROSCOPIA ÓPTICA E INMUNOCITOQUÍMICO

Se han utilizado técnicas de tinción convencionales (hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y plata metenamina) para el estudio de las características generales como la organización arquitectural, cápsula, estroma parénquima glandular y vascularización, y técnicas de inmunocitoquímica (vimentina y GFAP) con el propósito de estudiar, de manera más específica, los astrocitos.

Grupo de animales jóvenes (serie diurna): Las glándulas pineales de este grupo presentan desde el punto de vista de su organización, una estructura muy semejante que describiremos a continuación.

Estas glándulas están ricamente vascularizadas y rodeadas por una cápsula de tejido conjuntivo de la cual parten trabéculas, ricas en vasos sanguíneos, que se dirigen hacia el interior sin formar lobulillos. En dichas trabéculas observamos abundantes fibras de colágeno y de reticulina, que se tiñen con las técnicas del tricrómico de Masson y de la plata metenamina. Con esta última técnica se aprecia



Fig.2.- Pineal de especie ovina antes de ser extraída.

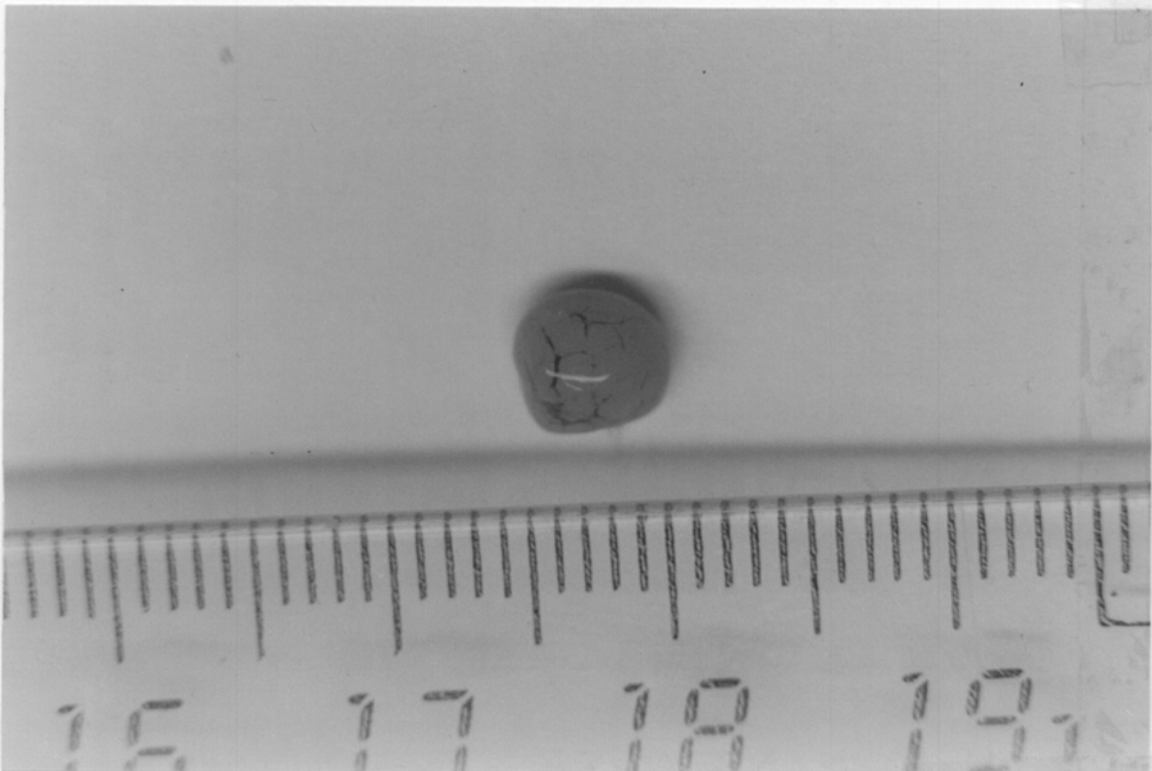


Fig.3.- Pineal de especie ovina extraída para mostrar su tamaño.

una discreta cantidad de fibras de reticulina en la cápsula que van aumentando en cantidad en los tabiques y alrededor de los vasos sanguíneos a medida que éstos profundizan en el parénquima. En algunas pineales se distingue la zona del receso pineal, revestida por un epitelio pseudoestratificado de células endimarias. Parte de la superficie dorsal de la glándula próxima al receso aparece también revestida por una capa de células endimarias cúbicas ciliadas (Fig. 4).

En el parénquima glandular se distinguen dos zonas claramente definidas (Fig. 5), una periférica o cortical, más basófila, de organización pseudolobular, y otra zona central, más clara y celular y bien vascularizada en la que las células no adoptan la disposición pseudolobular descrita, sino que se organizan de forma irregular, unas veces constituyendo trabéculas, otras islotes; entre ellos se dispone el estroma conjuntivo, más desarrollado que en la zona cortical, ocupando a veces amplios espacios entre los pinealocitos que aparecen más separados. Este estroma, eosinófilo, en ocasiones presenta un aspecto esponjoso o vacuolizado y está más desarrollado en el espacio perivascular.

El parénquima glandular, está constituido principalmente por pinealocitos, redondeados, de citoplasma claro, a menudo vacuolizado, núcleo central con cromatina dispuesta periféricamente y uno o dos nucleolos. En las muestras teñidas con plata metenamina, a mayores aumentos, pueden apreciarse las delgadas prolongaciones de estas células (Fig. 6).

Tanto en cortical como medular se observa una segunda población celular, mucho menos numerosa, los astrocitos o células intersticiales, de menor tamaño, forma alargada o triangular y núcleo más picnótico con un nucleolo bien visible. Estas células se encuentran entre los pinealocitos, en los septos conjuntivos, pero

sobre todo perivascularmente. Su naturaleza sólo puede confirmarse inequívocamente con técnicas de inmunocitoquímica, como comentaremos más adelante (Fig. 7).

Dentro del parénquima glandular y, especialmente en la zona medular, observamos la presencia, en varias de las pineales estudiadas, de pequeñas cavidades o rosetas, escasas y diseminadas casi siempre sin contenido en su interior. Dado que dichas cavidades son mucho más numerosas en las pineales de la serie nocturna las describiremos dentro de ese grupo.

Además de estas cavidades pequeñas, en algunas pineales hemos observado otras, de morfología variable y mayor tamaño, que se distribuyen de manera irregular por toda la glándula (Fig. 8). Por último, en la zona cortical de la mayoría de las pineales existen cavidades semejantes a cisternas, de mucho mayor tamaño, a veces con contenido amorfo o fibrilar eosinófilo (Figs.9 y 10).

En ninguna de las glándulas pineales de este grupo hemos apreciado la presencia de calcificaciones.

Con las técnicas de **inmunocitoquímica** hemos observado células positivas a vimentina y a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que nos permite, sin ningún género de dudas afirmar que se trata de astrocitos, la segunda población celular de la pineal, que ya hemos descrito con las técnicas de tinción convencionales. A continuación describiremos las características morfológicas y la localización de estas células.

Las células del revestimiento endimario pseudoestratificado del receso pineal así como las células cúbicas ciliadas de la porción dorsal glandular son intensamente inmunoreactivas frente al suero anti-vimentina. El resto de células

positivas se encuentran distribuidas por toda la glándula (Fig.11). Se aprecia positividad en su soma, que tiene un núcleo más oscuro que el de los pinealocitos, y en sus prolongaciones, ahora visibles (Fig.12). Estas células tienen tendencia a disponerse en nidos en las proximidades de los vasos sanguíneos aunque otras veces se encuentran aisladas entre los pinealocitos. Es frecuente observar sus prolongaciones dispuestas alrededor de los vasos o formando una red entre los pinealocitos (Fig.13). En relación con los vasos tenemos que destacar que sus células endoteliales son también positivas a la vimentina. Por último, hemos observado, en algunas de las cavidades de mayor tamaño descritas en la cortical glandular, un material, a veces de aspecto fibrilar, que es también positivo al suero anti- vimentina (Fig.14).

Las células positivas al suero anti-GFAP se encuentran distribuidas por toda la glándula, tienen forma estrellada, con numerosas prolongaciones que se disponen entre los pinealocitos, en el intersticio y especialmente alrededor de los vasos, donde constituyen una capa nítida por fuera de la membrana basal de los capilares (Fig.15). No se aprecia positividad en las células endoteliales de los vasos. Estas células tienen menor tendencia a formar nidos que las positivas a vimentina. También hemos encontrado un material de aspecto fibrilar positivo a este suero en las cavidades de la cortical, como en el caso del suero anti-vimentina.

Grupo de animales jóvenes (serie nocturna): Las características histológicas generales de las pineales de estos animales son semejantes a las descritas en la serie diurna. Es decir, se repite la división en dos zonas, cortical pseudolobulada y medular, de organización más irregular y mayor número de vasos.

Sin embargo, hemos observado las siguientes diferencias que a continuación describimos:

- En este grupo el límite entre cortical y medular es menos nítido (Fig.16).
- El parénquima glandular, especialmente en la parte central o medular posee numerosas cavidades pequeñas, en forma de roseta, casi siempre sin contenido en su interior, que le confieren un aspecto criboso cuando se estudia a pocos aumentos (Fig. 17). A mayores aumentos, sus bordes, bien definidos, parecen delimitados por pinealocitos. En algunos casos, sin embargo, en los contornos de estas cavidades se observan núcleos más teñidos y pequeños, fusiformes o triangulares, compatibles con la morfología de los astrocitos (Figs. 18, 19 y 20). Este tipo de cavidades se encuentran sobre todo en la zona medular aunque pueden también observarse, en menor número y aisladas en la periferia. Es notoria la diferencia en la frecuencia de su hallazgo y en el número, en estos animales, si los comparamos con los de la serie diurna. Las hemos observado en muchas pineales de esta serie, formando casi siempre grupos numerosos.
- Las cavidades cisternales descritas en la cortical son discretamente más frecuentes en los animales de la serie nocturna (Fig. 21).
- La vascularización glandular es menos intensa que en las pineales diurnas, hecho que se aprecia claramente en la zona medular, que es la más rica en vasos sanguíneos.
- En las células positivas a vimentina las diferencias entre estos animales y los anteriores no son muy marcadas, aunque parece que estas células se

localizan más en la parte central de la glándula, y tienen más tendencia a disponerse alrededor de los vasos y constituir nidos (Figs. 22, 23 y 24).

- Las células positivas al suero anti-GFAP tienen mayor tendencia a formar nidos y sus prolongaciones alrededor de los vasos se aprecian con mayor nitidez (Figs. 25 y 26).
- En varios animales jóvenes de la serie nocturna, hemos observado, en la zona periférica de la pineal cavidades claramente delimitadas por células endimarias. En uno de los casos se trataba de una cavidad amplia en la que además de las células endimarias observamos una discreta cantidad de pigmento parduzco. En otros casos se trataba de cavidades más pequeñas, aunque del mismo tipo, formando pequeños grupos (de 3 ó 4 a lo sumo) y sin pigmentación (Figs. 27 y 28).

Grupo de animales adultos (series diurna y nocturna): Las diferencias entre serie diurna y nocturna siguen el mismo patrón que en los animales jóvenes, si acaso existe una diferencia en lo que se refiere a las cavidades o rosetas descritas en la medular. En los animales jóvenes observábamos que éstas eran más numerosas y frecuentes durante la noche y, sin embargo en los adultos ocurre al contrario. Es decir, se invierte ligeramente el patrón descrito en los animales jóvenes.

Sí nos referiremos a aquellas diferencias específicas encontradas en los animales adultos con respecto a los jóvenes que son las siguientes:

- Las cavidades cisternales descritas en animales jóvenes son de mayor tamaño en los animales adultos y no se localizan sólo en la cortical,

observándose cavidades dispersas por toda la glándula que, a veces, confluyen formando otras más grandes (Fig. 29).

- Los animales adultos tienen mayor cantidad de estroma conjuntivo que los jóvenes (Fig. 30).
- Las células positivas a vimentina son más abundantes que en los animales jóvenes y se disponen de forma más difusa y tienen menos tendencia a formar nidos (Figs. 31 y 32).
- Las células positivas a GFAP también son más abundantes en los animales adultos que en los jóvenes. Sus prolongaciones constituyen una compleja red que se observa claramente entre las células pineales y alrededor de los vasos sanguíneos (Figs. 33 y 34).
- En dos pineales de animales adultos, de dos y cuatro años de edad, hemos encontrado calcificaciones dispersas por el parénquima pineal (Fig. 35).

4.3 ESTUDIO MORFOMÉTRICO.

Al objeto de tener información por separado de las distintas poblaciones celulares, efectuamos el análisis de imagen de modo independiente sobre las cuatro series de núcleos de pinealocitos ovinos que suman un total de 7.472, distribuidas del modo siguiente (Tabla III).

a) Pinealocitos de la zona central o medular de animales sacrificados de día:
2.230 núcleos.

b) Pinealocitos de la zona periférica o cortical de animales sacrificados de día:
1.172 núcleos.

c) Pinealocitos de la zona central o medular de animales sacrificados de noche: 2.353 núcleos.

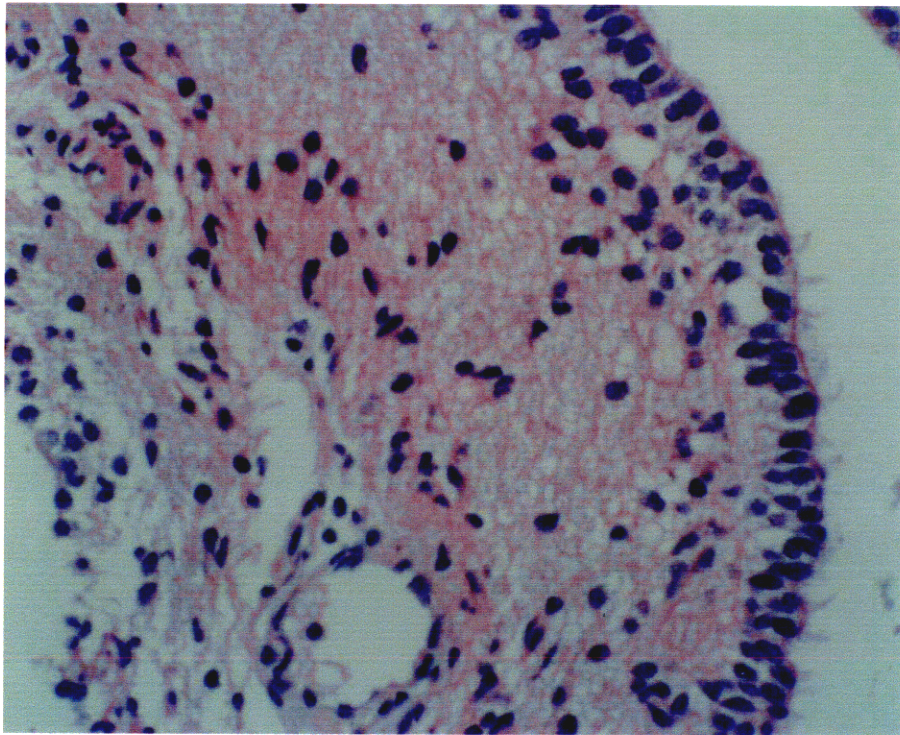


Fig.4.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Epitelio ependimario cúbico ciliado. HE x400.

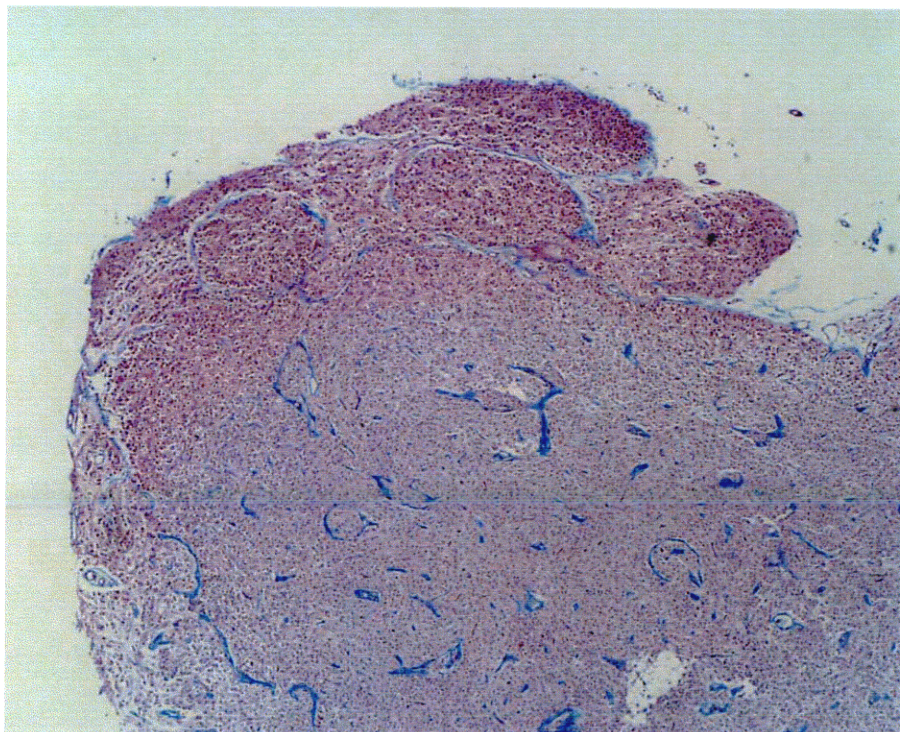


Fig.5.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Límite claro entre cortical y medular. Sin cavidad tipo roseta. Estroma conjuntivo. Tricrómico de Masson. X100.

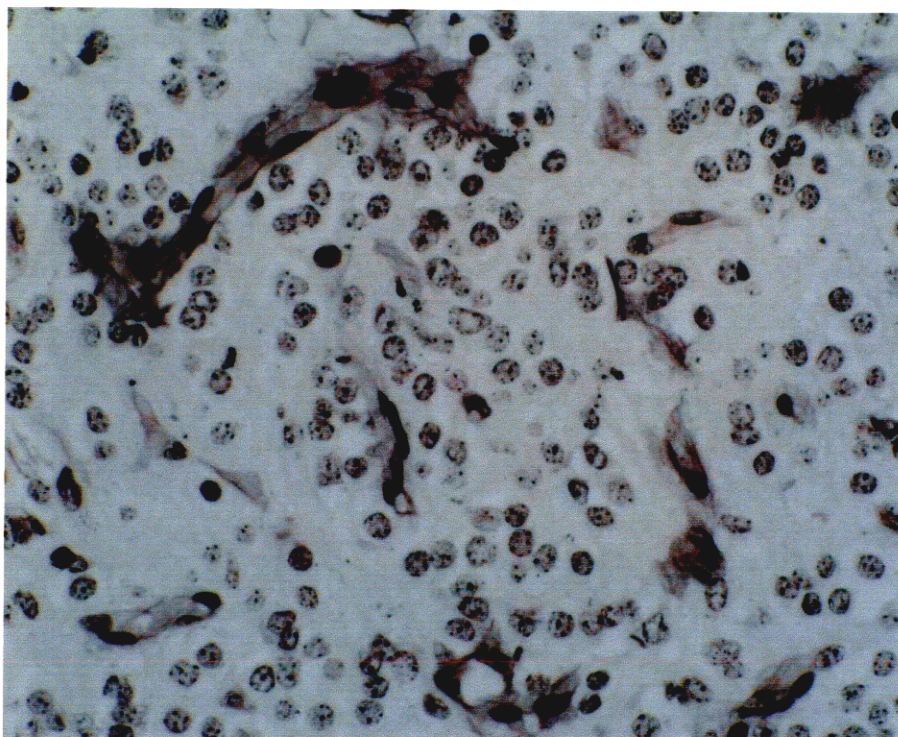


Fig.6.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Fibras de reticulina perivasculares. Prolongaciones de pinealocitos. Plata metenamina X400.

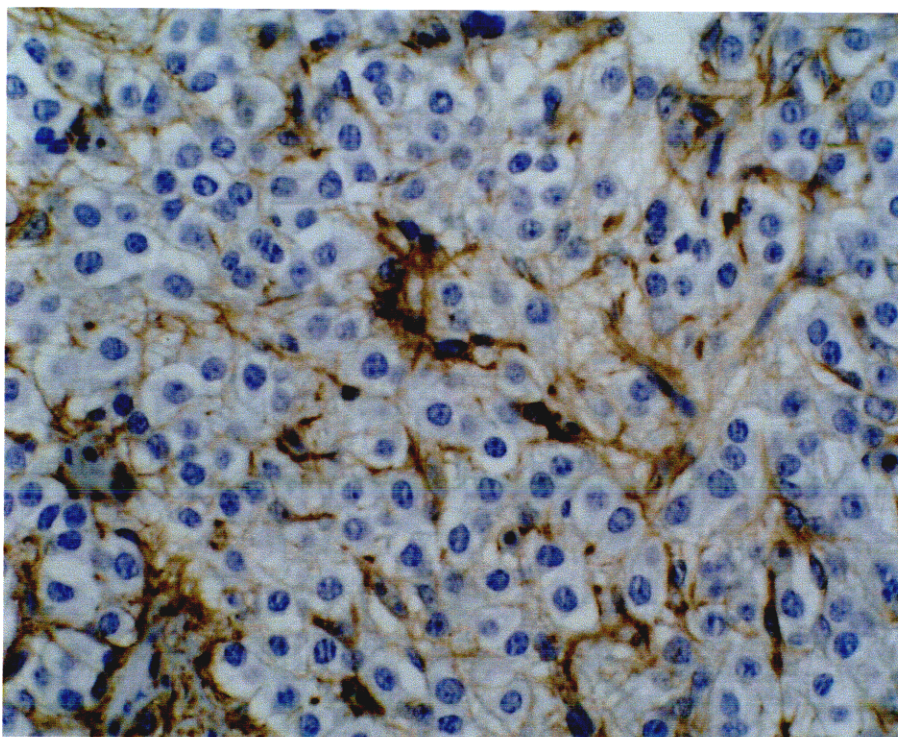


Fig.7.- Glándula Pineal de animal joven (sacrificio diurno). Astrocitos: núcleo con nucleolo evidente. Filamento glial en soma y prolongaciones. Estreptavidina- biotina anti- vimentina x400.

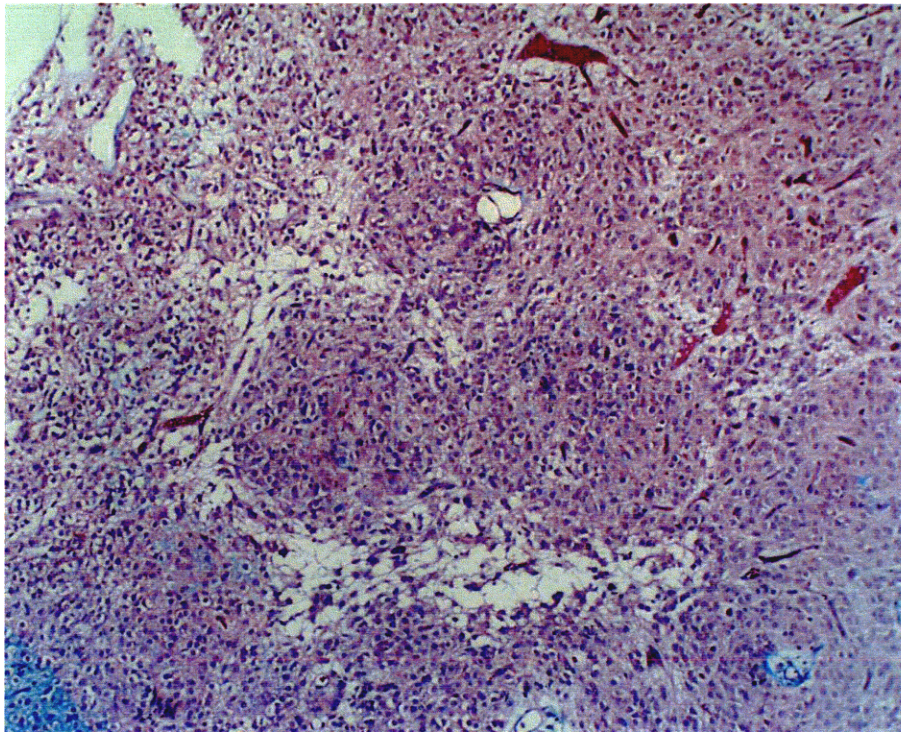


Fig.8.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Presencia de cavidades intraparenquimatosas. Tricrómico de Masson. X100.

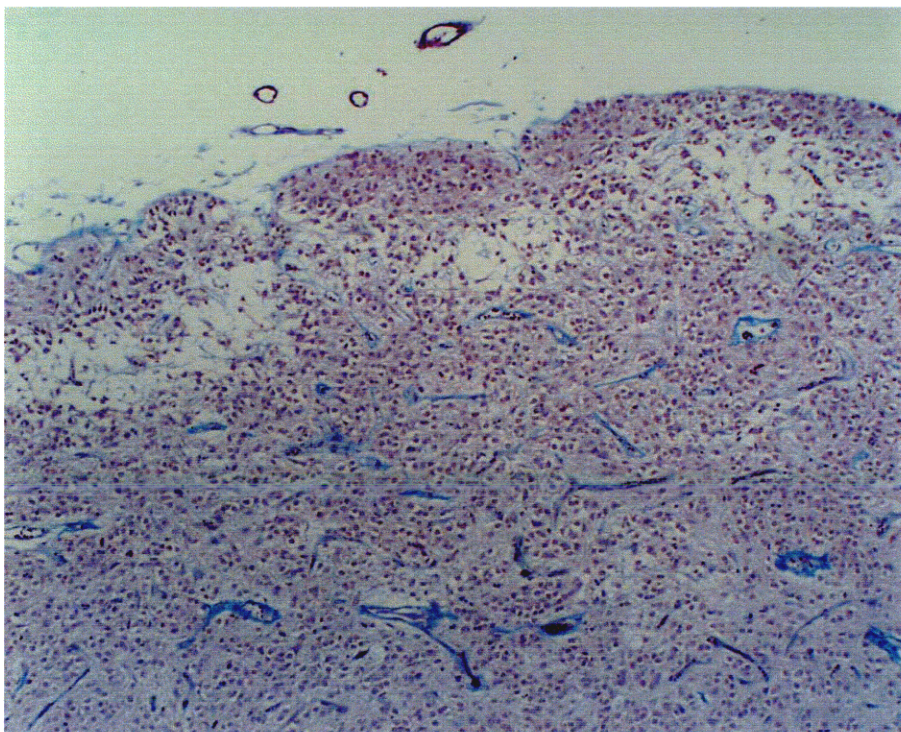


Fig.9.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Cisternas en zona cortical. Tricrómico de Masson. X100.

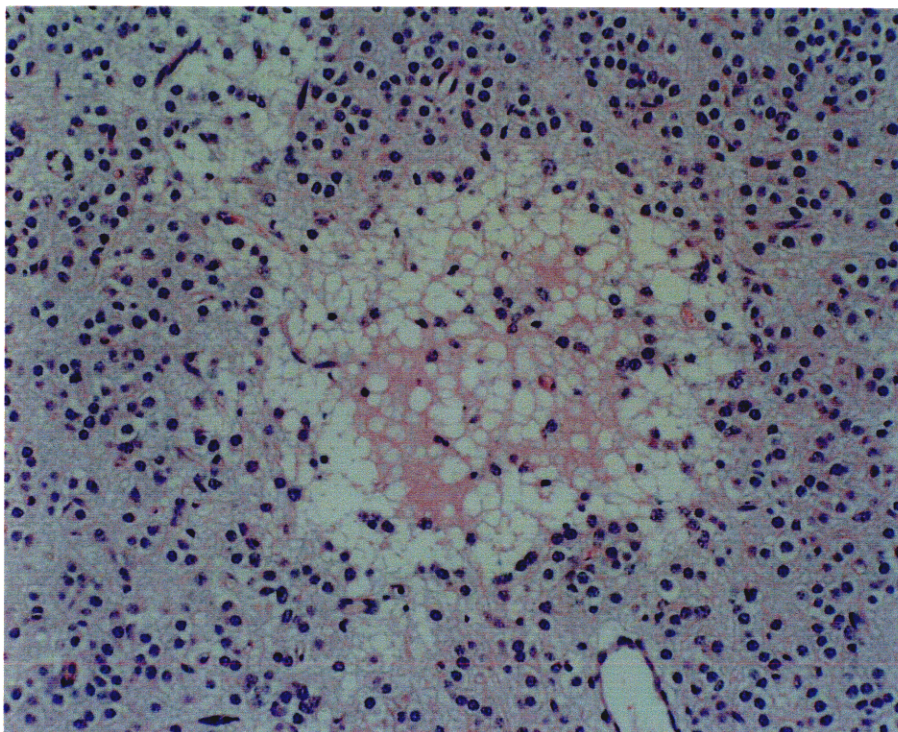


Fig.10.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Cavidad con contenido eosinofílico. HE x200.

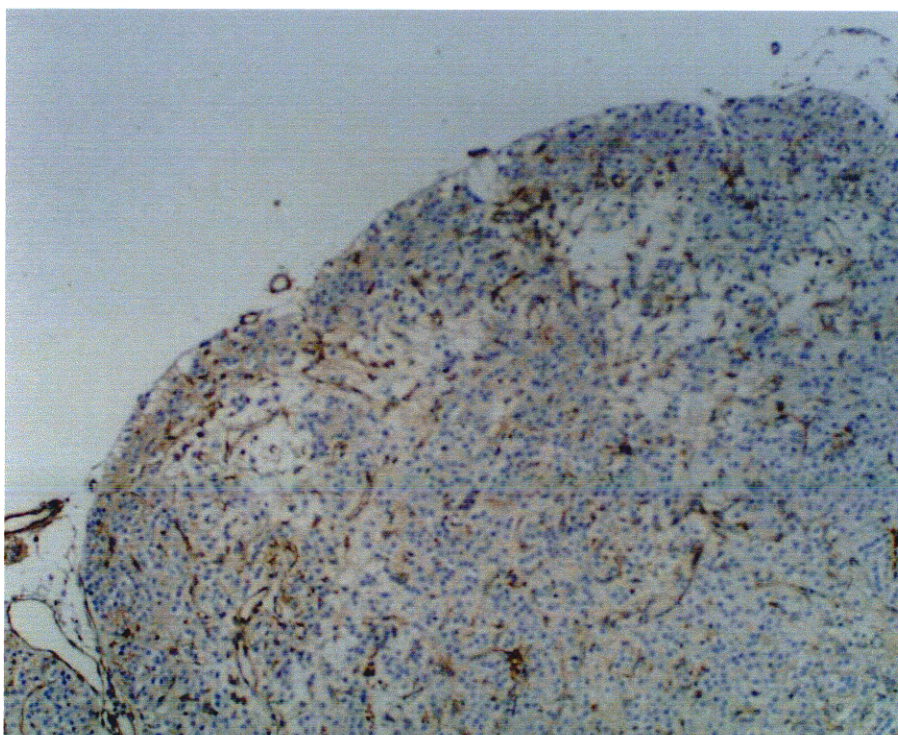


Fig.11.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Células positivas en ambas zonas, cortical y medular. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x100.

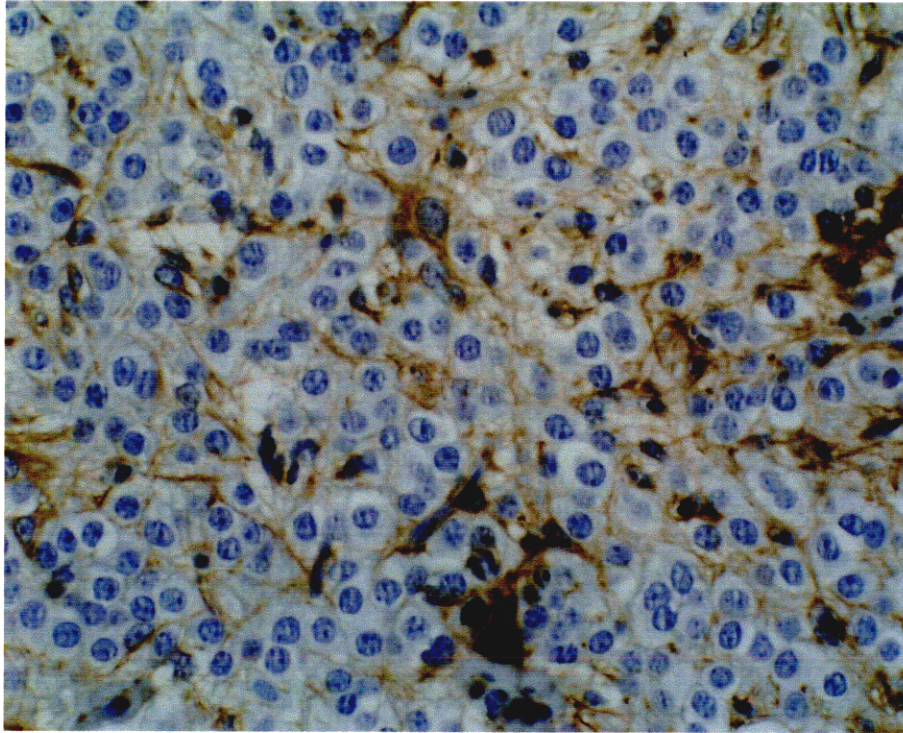


Fig.12.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Astrocitos. Positividad en soma y prolongaciones. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x400.

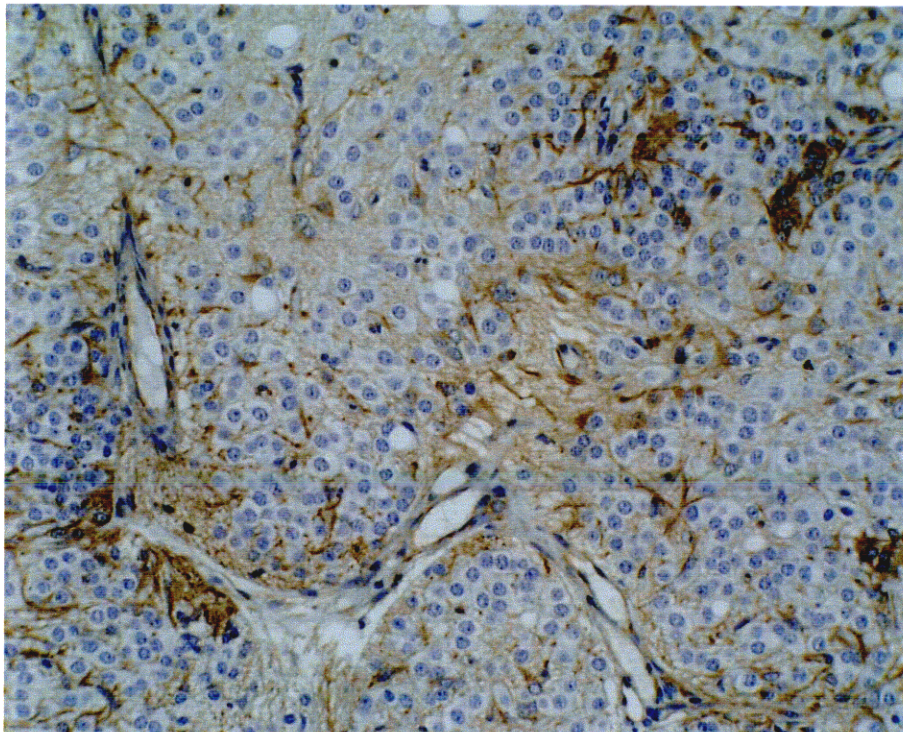


Fig.13.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Astrocitos alrededor de capilares. Estreptavidina-biotina anti- vimentina x200.

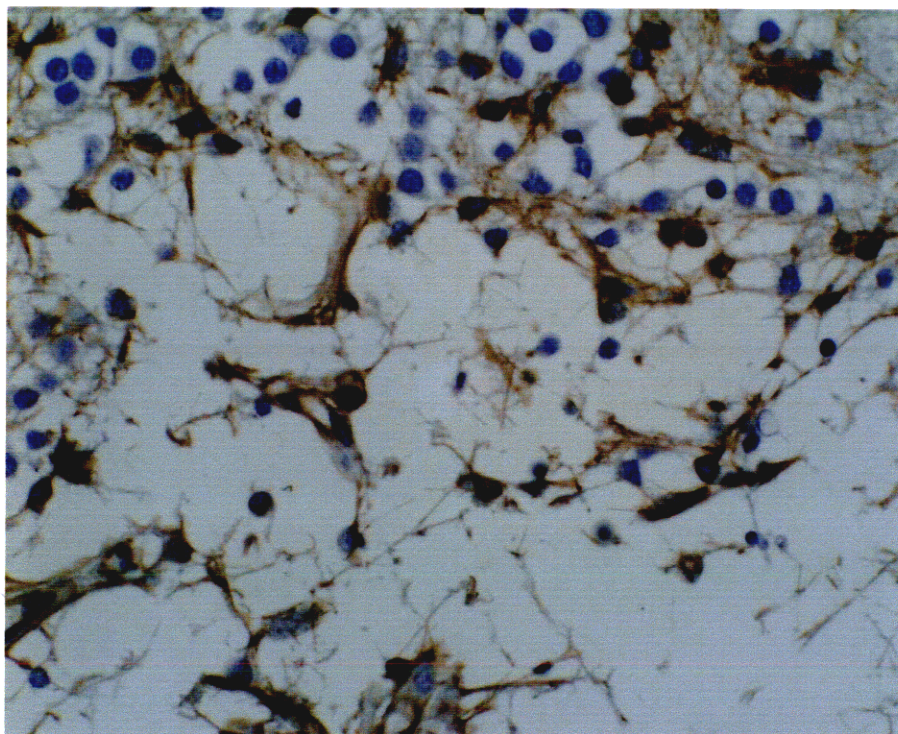


Fig.14.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Cisterna con astrocitos y material fibrilar en el interior. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x400.

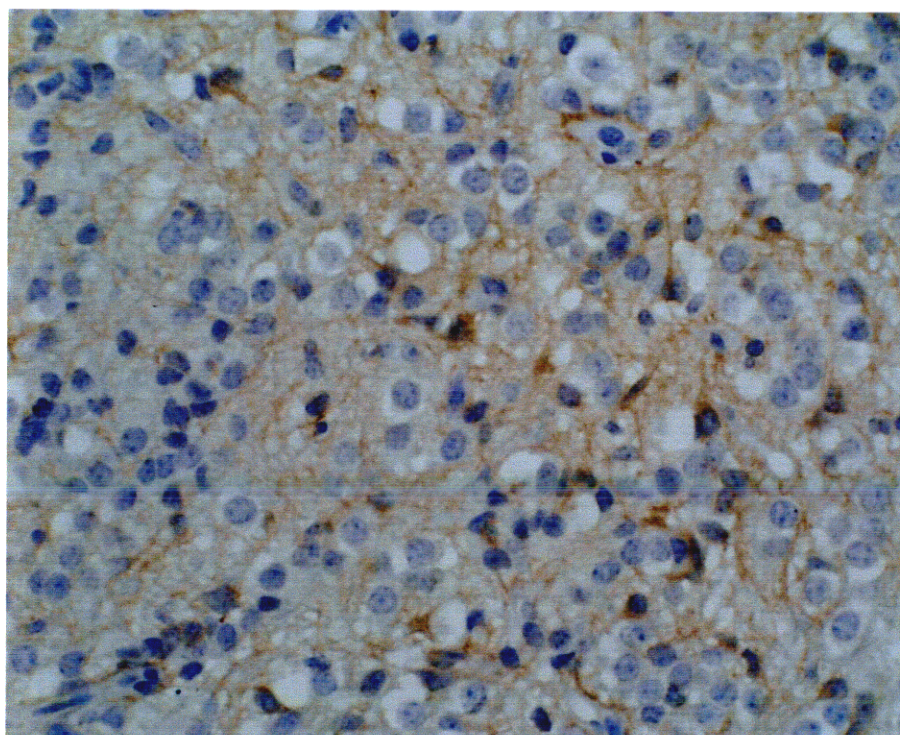


Fig.15.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Parénquima glandular discretamente positivo. Estreptavidina-biotina anti-FGAP x400.

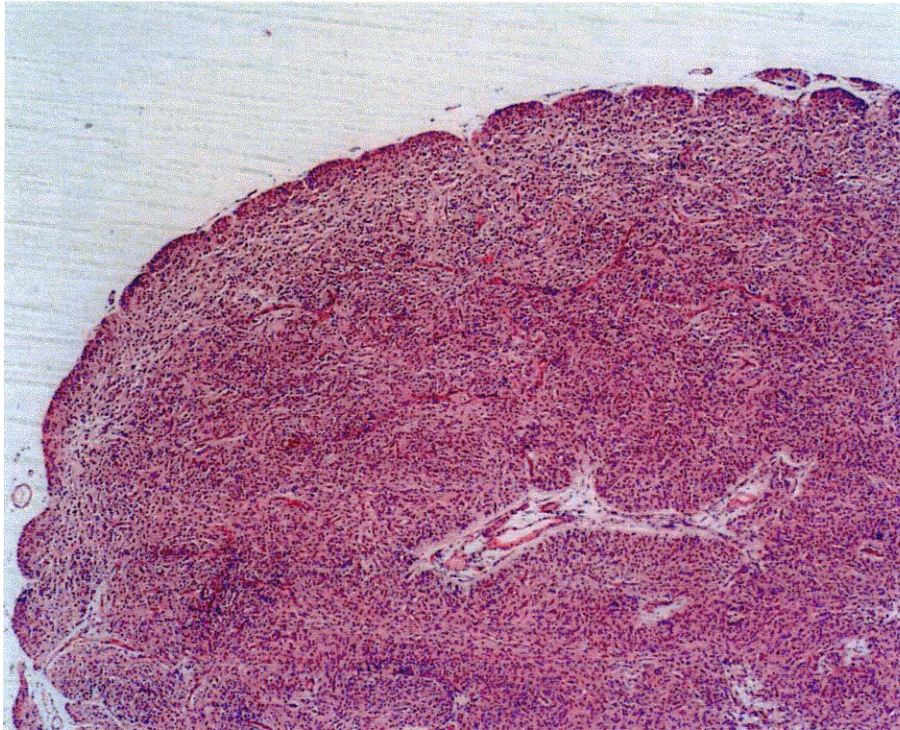


Fig.16.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Límite córtico medular. Vascularización intensa en medular. HE x40.

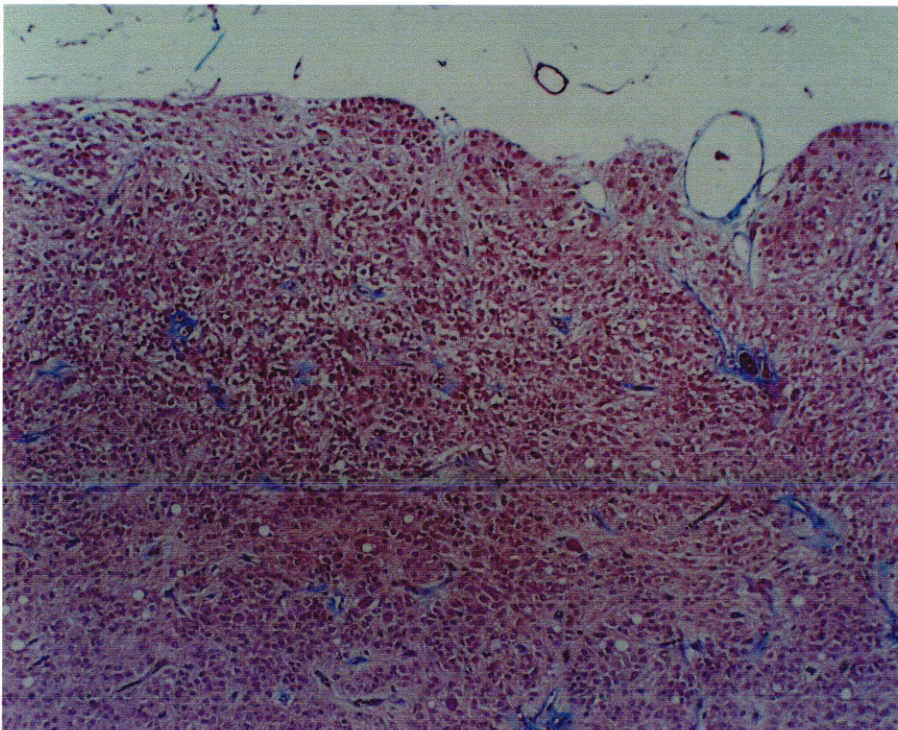


Fig.17.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Límite córtico medular. Presencia de rosetas en medular. Estroma conjuntivo abundante. Tricrómico de Masson X100.

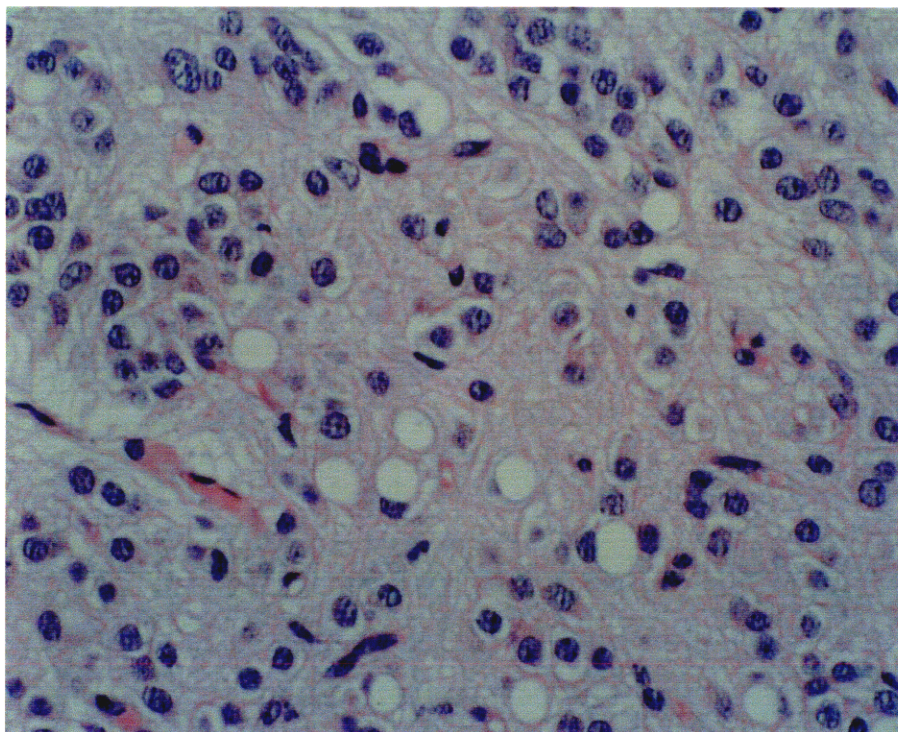


Fig.18.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Cavidades o rosetas en medular. Pinealocitos alrededor. Intersticio de aspecto vacuolizado. HE x400.

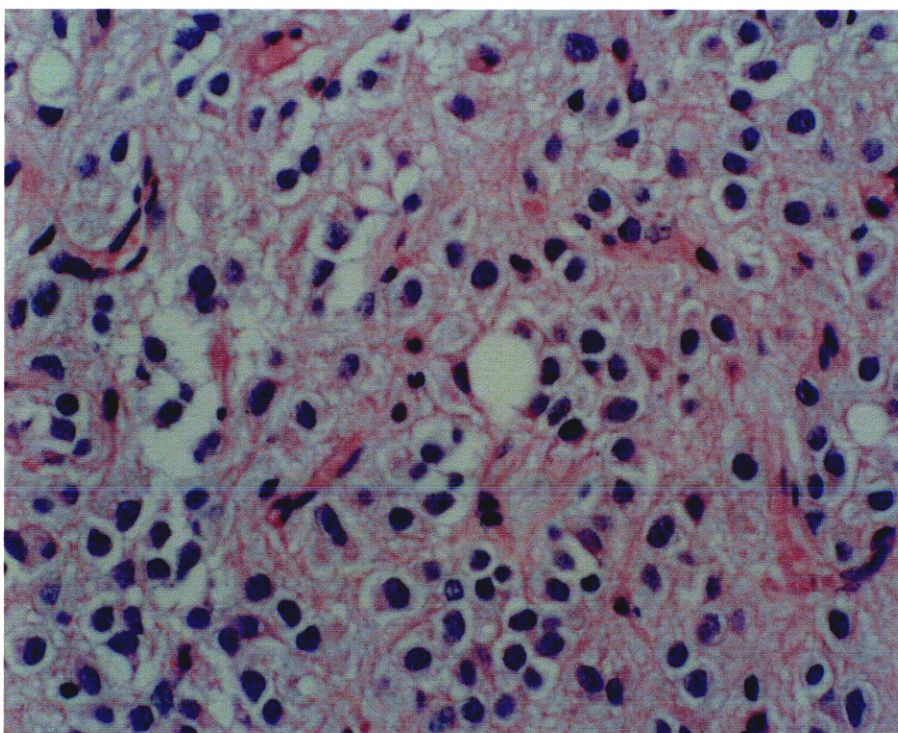


Fig.19.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Roseta rodeada por pinealocitos y un posible astrocito, de núcleo triangular. HE x400.

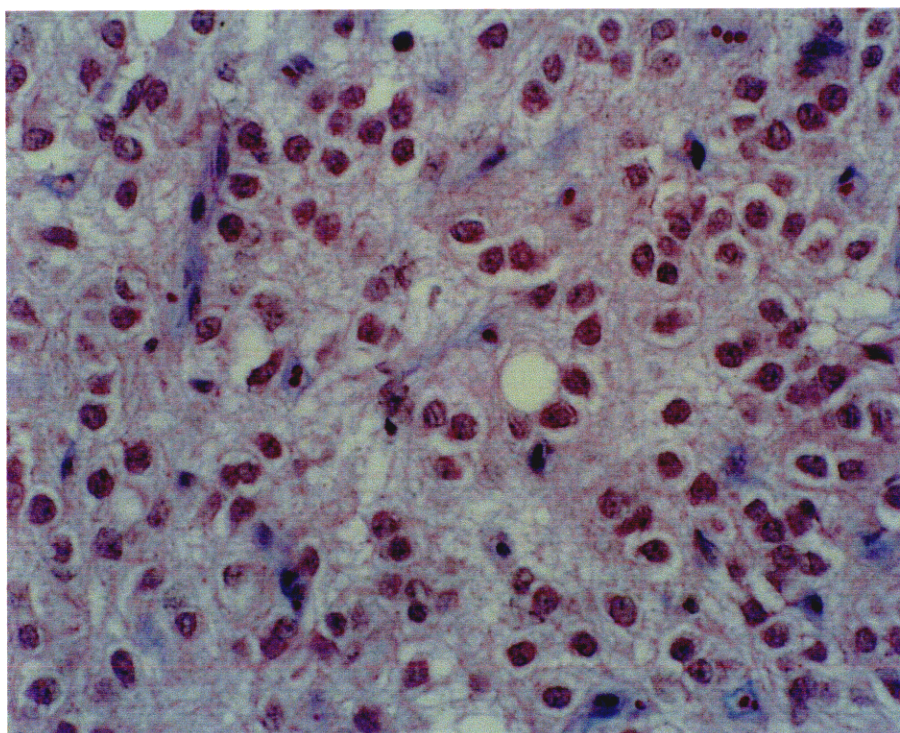


Fig.20.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio diurno). Detalle de roseta. Pinealocitos alrededor, Tricrómico de Masson. X400.

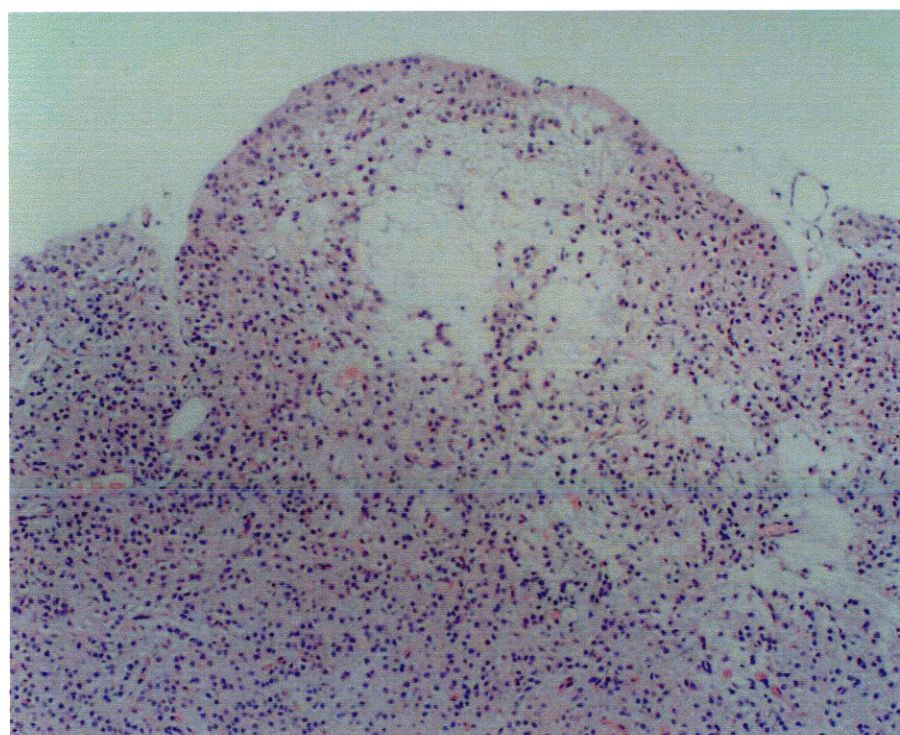


Fig.21.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Cavidades cisternales en cortical. HE x100.

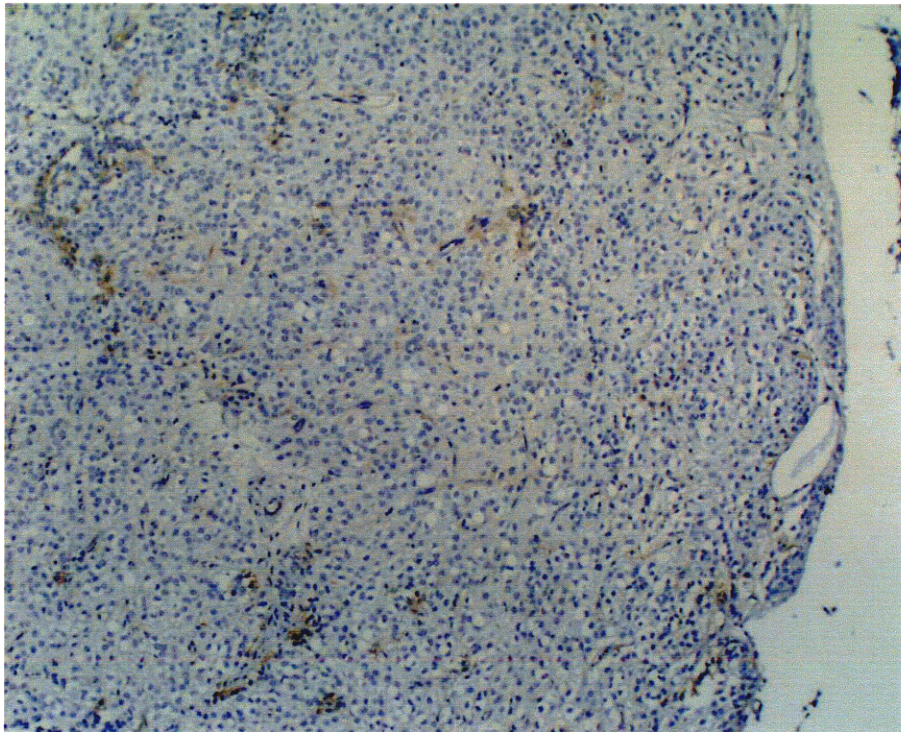


Fig.22.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Panorámica glandular. Más células positivas a filamentos gliales en medular. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x100.

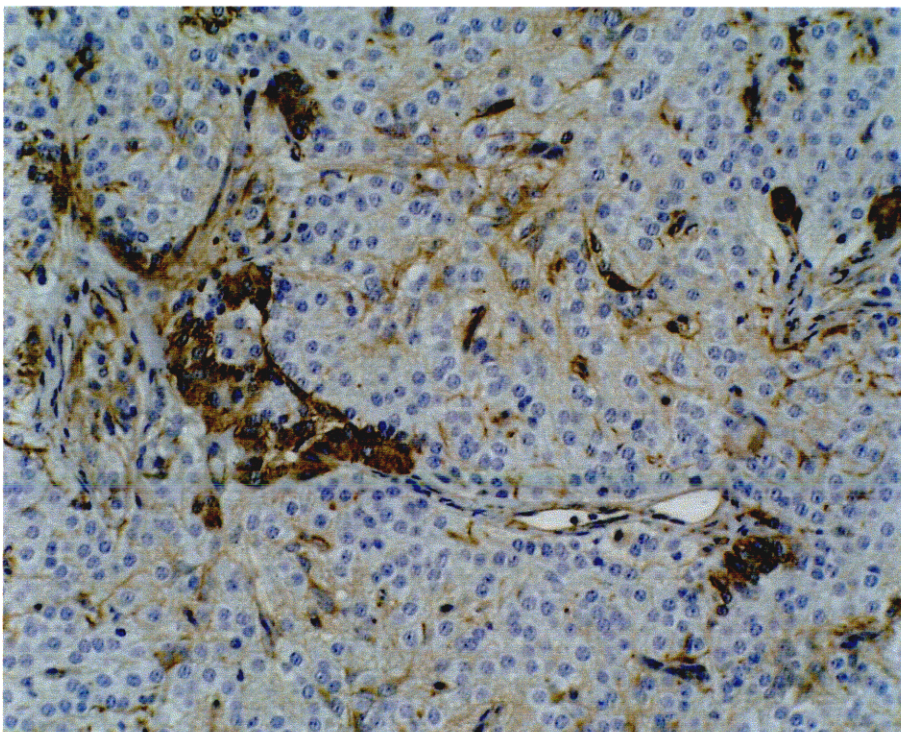


Fig.23.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Astrocitos alrededor de capilares y entre pinealocitos. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x200.

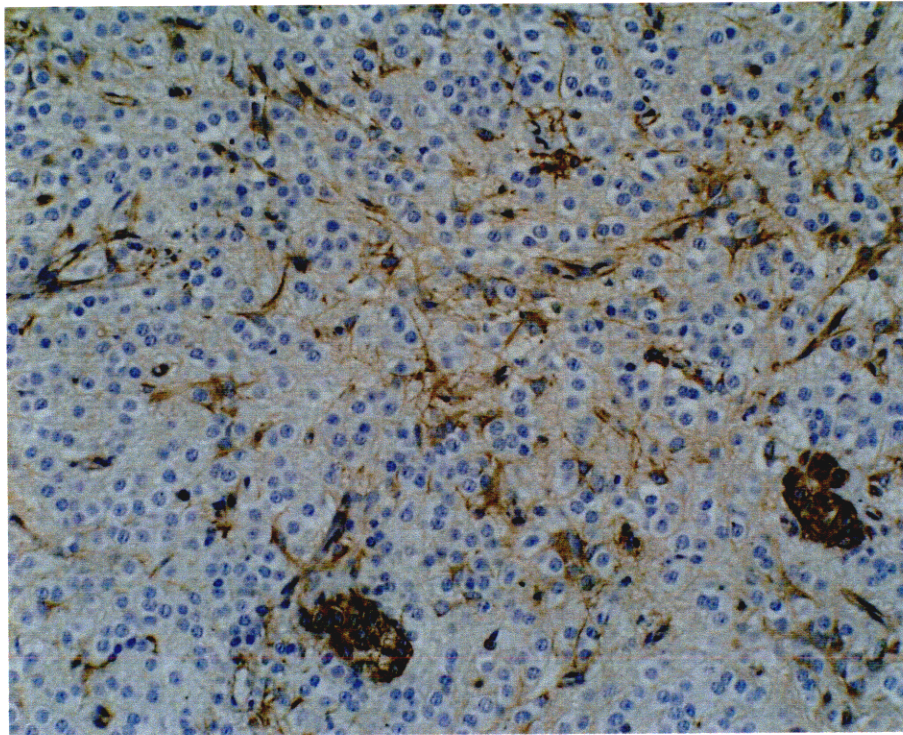


Fig.24.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Nidos de astrocitos. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x200.



Fig.25.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Prolongaciones astrocitarias dispuestas nítidamente alrededor de un capilar. Estreptavidina-biotina anti-FGAP x200.

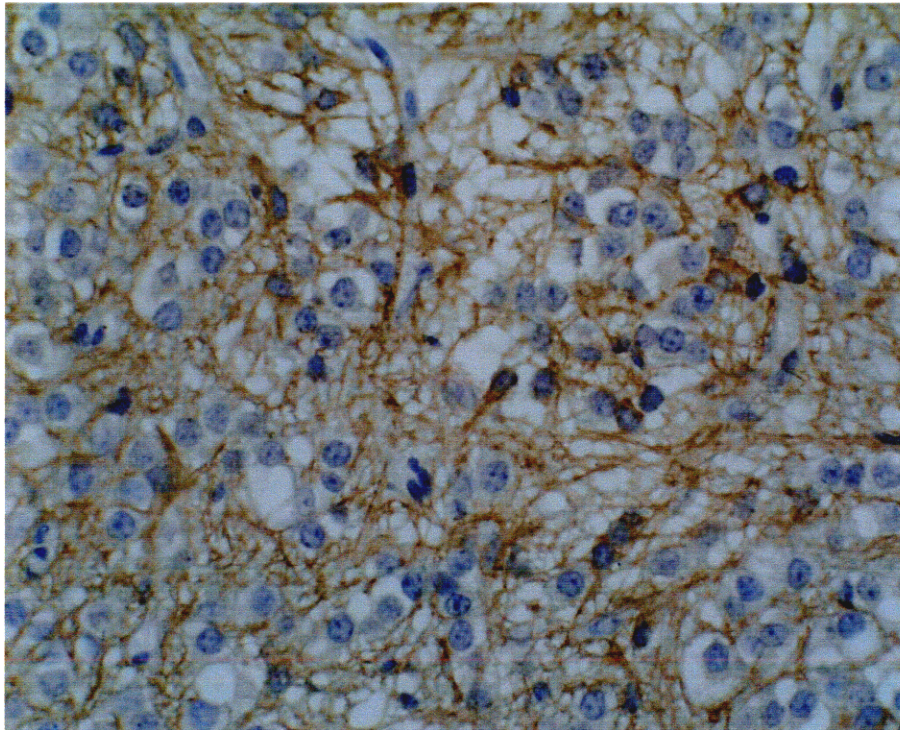


Fig.26.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Astrocitos. Positividad en soma y prolongaciones. Estreptavidina-biotina anti-FGAP x400.

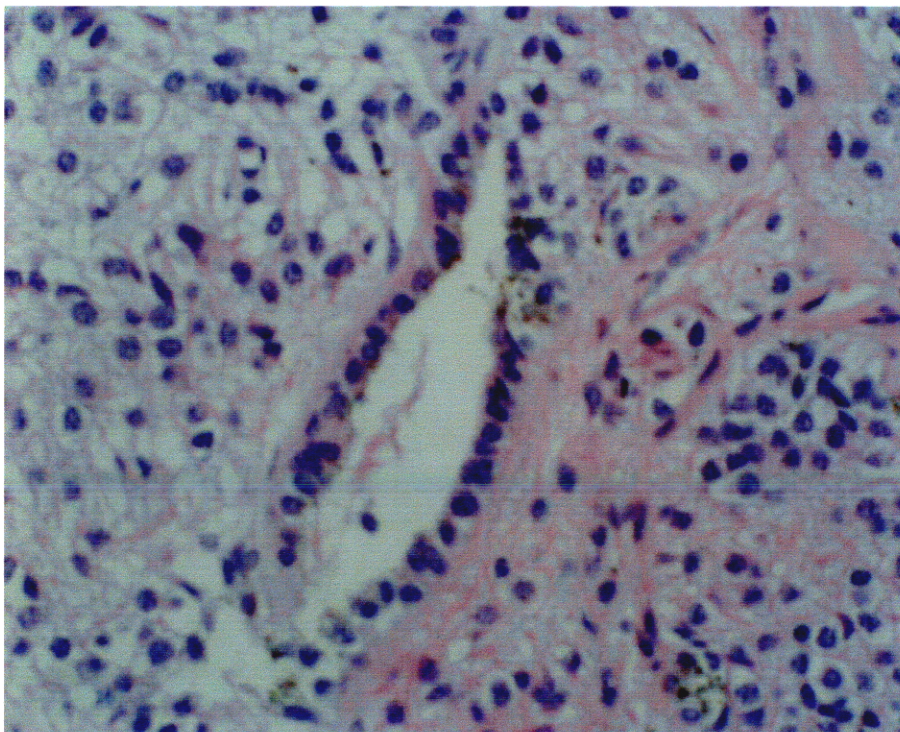


Fig.27.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Cavity en cortical delimitada por células ependimarias. HE x400.

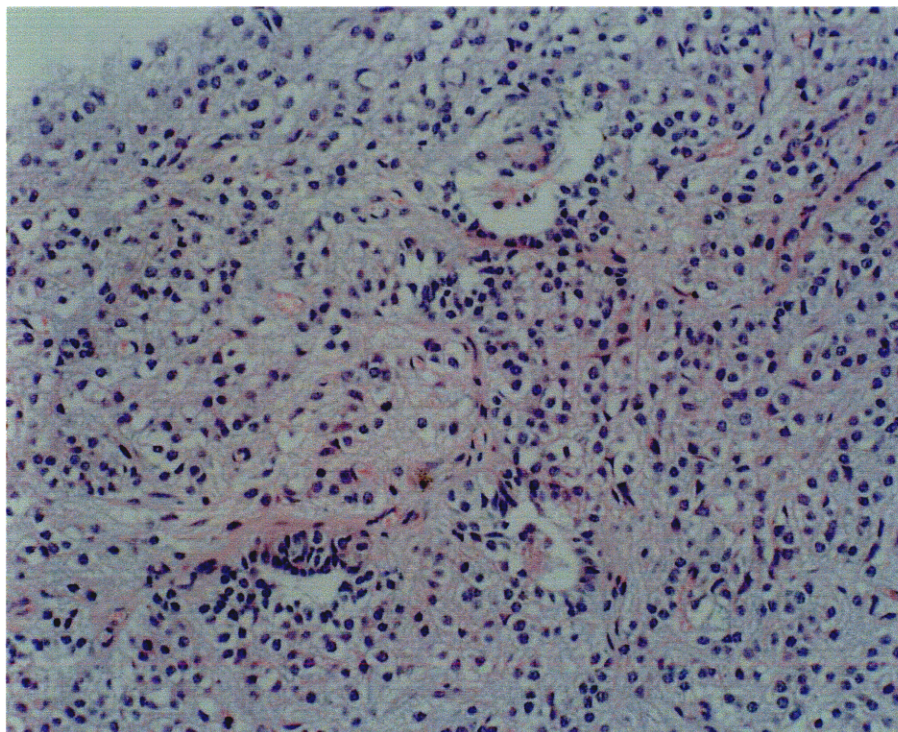


Fig.28.- Glándula pineal de animal joven (sacrificio nocturno). Varias cavidades delimitadas por células ependimarias en cortical. HE x200.

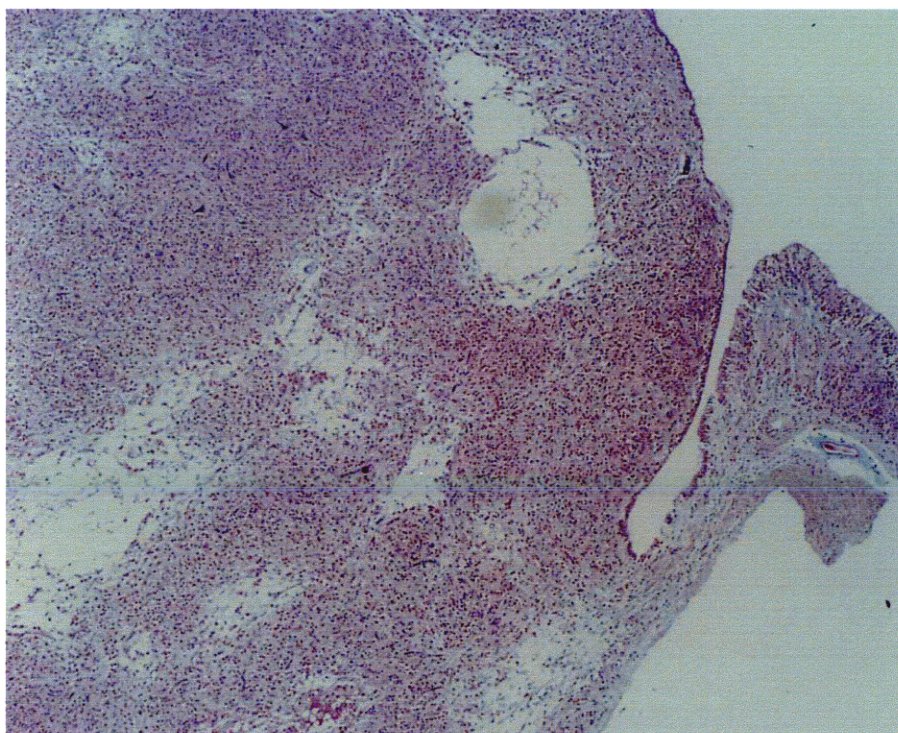


Fig.29.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio diurno). Grandes cisternas de localización panglandular. Receso pineal. HE x40.

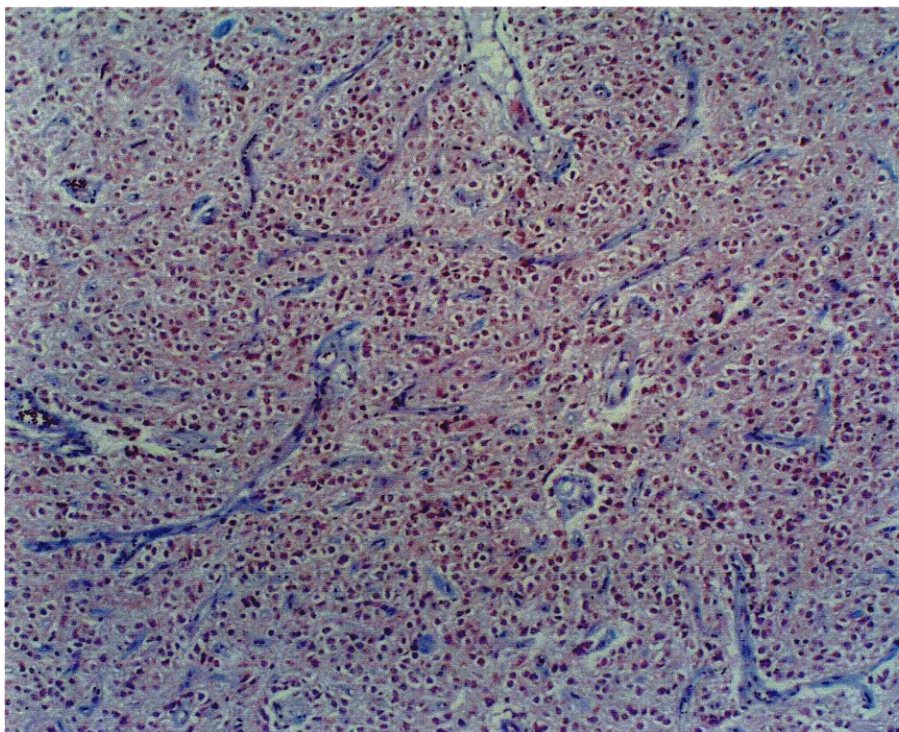


Fig.30.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio diurno). Gran cantidad de tejido conjuntivo. Tricrómico de Masson x100.

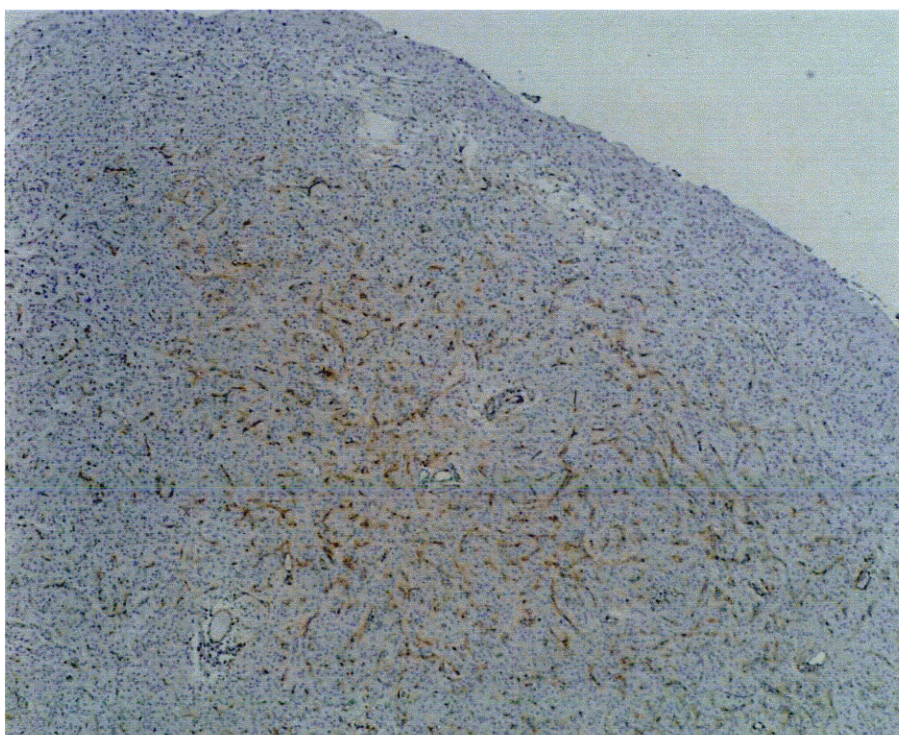


Fig.31.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio diurno). Células positivas de localización difusa por toda la glándula. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x40.

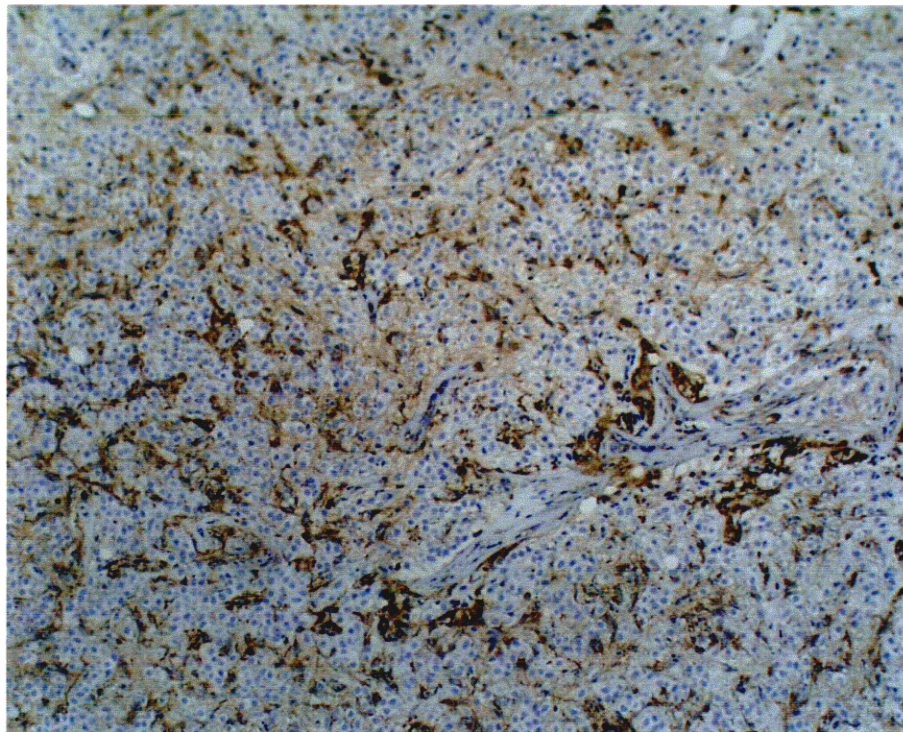


Fig.32.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio nocturno). Abundantes células positivas. Disposición perivascular. Estreptavidina-biotina anti-vimentina x100.

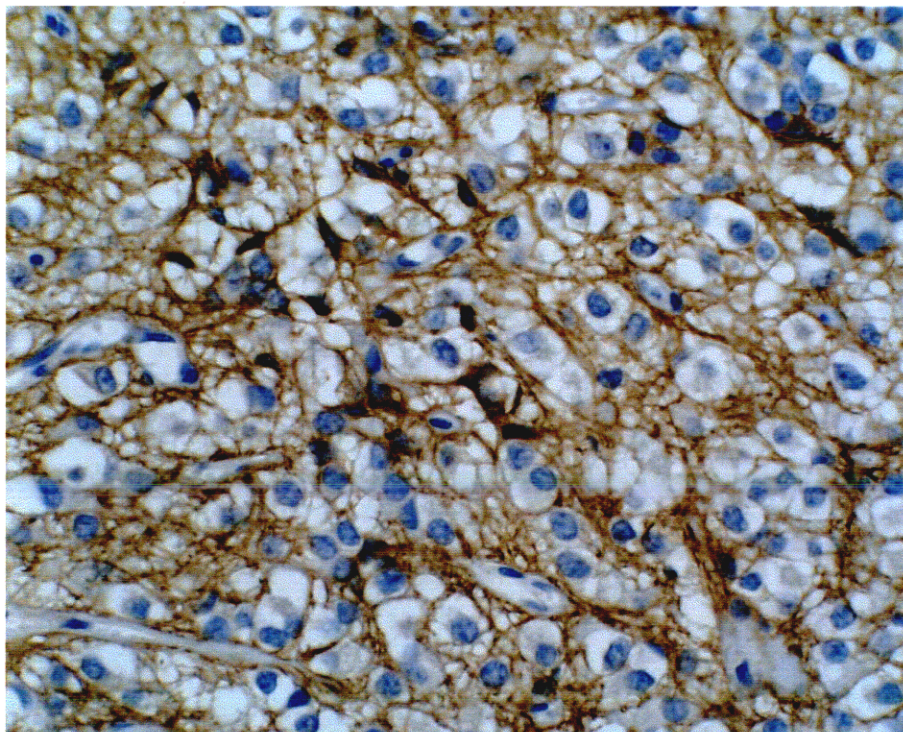


Fig.33.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio nocturno). Gran cantidad de prolongaciones astrocitarias formando una red entre pinealocitos. Estreptavidina-biotina anti-GFAP x400.

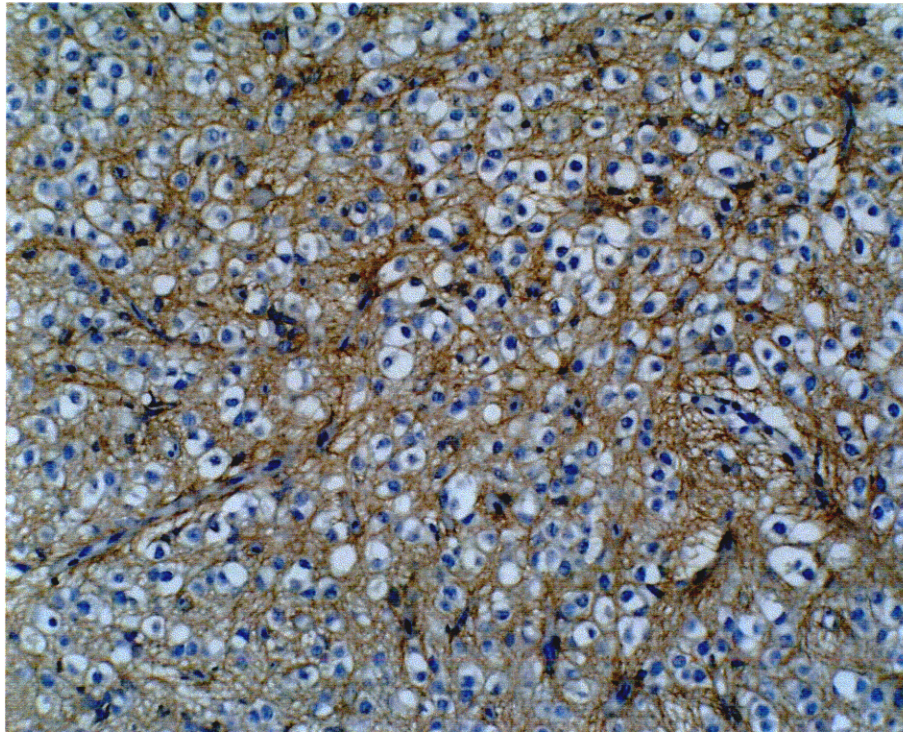


Fig.34.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio nocturno). Procesos astrocitarios entre pinealocitos. Estreptavidina-biotina anti-GFAP x200.

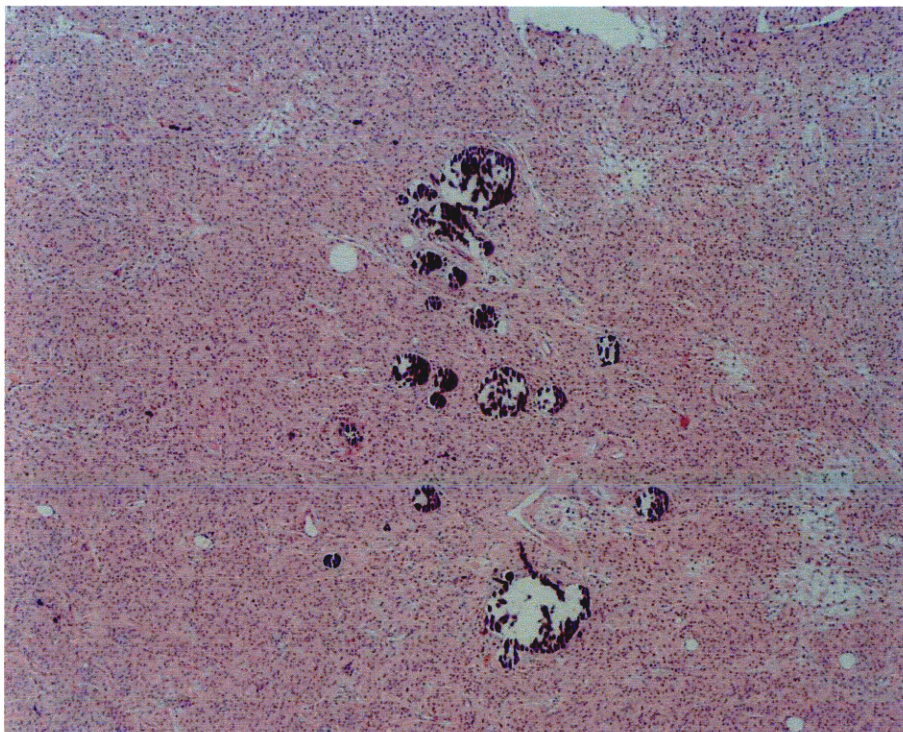


Fig.35.- Glándula pineal de animal adulto (sacrificio nocturno). Calcificaciones dispersas por el parénquima glandular. HE x40.

d) Pinealocitos de la zona periférica o cortical de animales sacrificados de noche: 1.717 núcleos.

En la Tabla IV se recogen los datos relativos a los 2.230 núcleos de pinealocitos de la zona medular de la glándula, procedente de animales sacrificados de día, en la cual se detallan los resultados obtenidos por separado en cada uno de los animales estudiados y en el total del grupo.

En esta población y por lo que se refiere a la superficie de los núcleos, la media aritmética es de $42'93\mu\text{m}^2$, con una desviación standard de $\pm 15'13\mu\text{m}^2$, lo que supone un coeficiente de variabilidad de Pearson del 35'24%.

Dentro de este grupo hemos hallado núcleos que oscilan desde $5'76\mu\text{m}^2$ (el más pequeño), hasta $106'92\mu\text{m}^2$ (el más grande sometido a estudio).

En la Gráfica nº1 se representa en un polígono de frecuencias los valores de las superficies de los núcleos de pinealocitos de la zona medular, procedentes de ovinos sacrificados de día, cuyos datos numéricos figuran en la Tabla IV. En esta Gráfica se han agrupado por clases, con intervalos de $10\mu\text{m}^2$, las frecuencias correspondientes a los valores hallados.

La Tabla V expresa los resultados del análisis de imagen efectuado sobre los 1.172 núcleos de pinealocitos que constituyen la población correspondiente a la zona cortical de la epífisis de ovinos sacrificados de día y como en el grupo anterior se especifican los datos hallados en cada animal y en conjunto de todos ellos.

El área nuclear arroja una media de $42'98\mu\text{m}^2$, una desviación típica de $\pm 15'32\mu\text{m}^2$, y le corresponde un coeficiente de variabilidad de 35'66%.

El extremo inferior de variación tiene un valor de $8'72\mu\text{m}^2$, y el núcleo de mayor tamaño estudiado por nosotros tiene una superficie de $88'12\mu\text{m}^2$.

La Gráfica nº2 recoge los resultados del análisis estadístico verificado sobre los núcleos de células epifisarias de la porción cortical de ovinos sacrificados de día, agrupándolos en el mismo intervalo de clase ($10\mu\text{m}^2$) que la anterior, y la cual corresponde a los datos que figuran en la Tabla V

El grupo de 2.353 núcleos celulares de la zona medular de la glándula pineal, correspondiente a animales sacrificados de noche, ofrece los resultados que figuran en la Tabla VI, relativos a cada animal y al total de esta población nuclear.

La media alcanza la cifra de $37'17\mu\text{m}^2$, con una desviación standard del orden de $\pm 12'39\mu\text{m}^2$, siendo el coeficiente de Pearson de 33'34%.

En este grupo de población, el núcleo de menor tamaño tiene un área de $5'12\mu\text{m}^2$, y el extremo superior de variación se sitúa en $79'76\mu\text{m}^2$.

La Gráfica nº3 se refiere a los núcleos celulares de la zona central de las epífisis procedentes de animales sacrificados de noche y ha sido confeccionada con los datos que figuran en la Tabla VI, agrupados con intervalos de clase de $10\mu\text{m}^2$.

Finalmente la Tabla VII expresa los resultados del análisis morfométrico realizado sobre los 1.717 núcleos de las células pineales situadas en la zona cortical de animales que fueron sacrificados de noche, referidos a cada individuo y a la totalidad de este grupo de población.

La media tiene un valor de $37'99\mu\text{m}^2$, con una desviación standard de $\pm 12'05\mu\text{m}^2$, lo que corresponde a un coeficiente de variabilidad de 31'73%.

En este grupo, los valores extremos hallados, oscilan entre el de mayor superficie con $98'72\mu\text{m}^2$ y el que exhibe un área de menor tamaño cuyo valor es de $4'08\mu\text{m}^2$.

El polígono de frecuencias de la Gráfica nº4 es la representación de las superficies nucleares halladas en el estudio verificado sobre células de la zona cortical pineal de ovinos sacrificados en plena noche, cuyos datos están en la Tabla VII, y como en los casos anteriores, para calcular las frecuencias se han utilizado las mismas agrupaciones e intervalos de clase ($10\mu\text{m}^2$).

Para ofrecer una idea de conjunto de los estudios morfométricos que hemos realizado sobre las superficies de todos los núcleos de pinealocitos en las dos zonas estudiadas (medular y cortical), así como en los dos momentos del día que fueron tomadas las muestras de los ovinos sacrificados (diurno y nocturno), cuyos datos figuran en las tablas IV, V, VI y VII, hemos confeccionado la Gráfica nº5 que recoge con distintos trazos y colores (y utilizando el mismo intervalo de clase de $10\mu\text{m}^2$) las frecuencias obtenidas de todos estos cuatro grupos de población.

Con objeto de disponer de elementos de comparación válidos que permitan conocer las diferencias entre los tamaños nucleares de las cuatro poblaciones estudiadas (día-zona central, día-zona periférica, noche-zona central y noche-zona periférica) y poder concluir que estas son o no significativas, hemos comparado las medidas halladas entre estos cuatro grupos, mediante la "T" de Student, y hemos obtenido unos valores de p, que son los que figuran en la Tabla VIII.

En este sentido podemos observar que si comparamos la media del grupo día-zona central con la media del grupo noche-zona central, obtenemos un valor de $p < 0'001$. De igual modo, si comparamos la media del grupo día-zona periférica con la del grupo noche-zona periférica, nos encontramos con un valor de $p < 0'001$.

La comparación entre los grupos de las zonas central y periférica de animales sacrificados de día, tiene un valor de $p > 0.9$; y si efectuamos la misma comparación zonal de los ovinos sacrificados de noche, obtenemos un valor $p < 0.05$.

TABLA III
Superficies de los Núcleos de Pinealocitos (μm^2)

III – A Día Zona Central

1.1		1.2		1.3		1.4	
21,28	58,20	46,76	49,04	63,56	52,24	49,36	34,84
48,80	29,48	38,48	45,40	55,16	52,56	78,56	52,68
29,84	51,72	65,68	20,60	57,80	51,70	67,84	53,10
11,40	44,92	33,68	36,28	58,04	34,01	18,24	41,24
39,24	45,16	49,28	51,04	60,20	59,40	39,12	57,52
25,44	58,20	73,36	35,56	48,68		60,80	
48,20	65,66	19,60	54,40	33,96		72,32	
52,04	44,92	48,52	49,12	44,48		52,44	
50,92	43,52	27,96	21,16	17,92		39,68	
40,60	44,86	55,44	23,28	42,88		59,84	
16,24	35,24	56,16		65,08		62,04	
86,20		12,04		42,12		71,76	
24,92		54,36		37,36		46,92	
33,52		54,00		52,52		68,92	
61,48		77,40		46,88		68,48	
62,88		39,04		59,08		37,16	
41,52		51,48		58,92		53,90	
42,24		21,00		58,60		50,36	
54,24		28,40		47,92		26,40	
46,60		44,76		63,08		55,32	
56,68		68,72		59,60		46,80	
29,08		48,24		51,84		59,92	
53,24		56,40		17,60		65,28	
21,64		68,32		66,88		61,76	
18,24		48,88		39,44		65,96	
31,64		49,28		50,44		40,48	
40,68		48,40		63,16		57,24	
38,64		34,76		59,44		75,00	
70,00		47,88		50,32		42,12	
56,04		47,48		58,80		29,20	
62,00		38,16		29,20		31,44	
62,36		38,56		50,84		55,72	
30,92		67,20		65,08		72,00	
51,12		59,56		56,84		13,96	
41,60		59,24		57,72		59,16	
25,04		46,00		42,24		64,24	
17,76		33,80		41,44		57,80	
44,88		55,60		48,16		21,44	
19,52		46,48		41,80		37,64	
58,88		58,20		52,26		37,32	
59,36		73,72		32,95		54,12	
33,00		69,04		47,96		36,24	
36,32		46,72		56,56		52,40	

III – A Día Zona Central (continuación)

2.1		2.2		2.3		2.4	
52,92	54,52	11,28	14,88	106,92	44,40	27,64	63,96
56,20	29,88	56,56	57,28	17,16	52,36	52,40	45,00
38,96	24,84	39,48	18,08	45,36	50,00	17,08	48,48
46,12	59,56	77,72	71,16	34,68	48,96	46,32	24,64
45,76	42,04	30,08	28,48	50,32	43,88	33,76	51,56
50,92	68,16	48,56	55,08	32,52	45,36	26,64	44,92
15,08	44,72	53,12	37,24	41,88	33,00	38,68	58,16
34,56	39,96	22,44	50,60	38,76	55,48	12,08	27,88
37,08	35,84	26,20	55,31	68,40	54,16	32,28	23,52
50,68	21,60	56,34	20,08	41,56	49,04	41,12	45,60
43,28	49,44	58,40	66,52	48,28	43,84	48,36	40,60
35,72	34,76	49,12	41,56	45,24	39,00	47,12	29,88
48,32	39,92	18,40	36,32	46,16	53,54	43,64	49,08
35,92	37,84	51,88	24,88	24,80	46,20	41,48	32,32
46,72	33,12	10,04	41,40	47,60	38,44	38,64	52,84
43,60	10,08	31,76	30,96	31,32		36,28	22,12
46,68	45,12	55,36	33,48	42,96		19,12	
63,68	25,60	67,80	41,32	37,36		28,36	
62,20	4,36	69,16	52,20	47,32		50,52	
59,00		31,48	21,12	23,52		45,84	
47,12		40,28	38,56	31,68		41,40	
15,92		30,44	50,08	49,80		48,00	
40,08		17,76	25,56	43,24		71,12	
42,76		19,44	24,88	42,08		33,28	
45,24		30,32	44,28	50,44		55,92	
41,24		70,80	49,52	39,80		45,76	
34,60		60,80	32,52	50,38		54,12	
32,36		25,60	57,60	24,96		21,28	
41,00		29,96	45,64	44,32		61,68	
59,36		60,76	27,52	53,56		37,04	
38,24		59,88	10,44	48,08		63,48	
45,44		50,12	34,10	43,72		53,28	
13,48		47,72	50,69	14,16		30,48	
31,60		42,60	47,40	37,56		15,16	
49,36		27,44		29,16		36,92	
46,40		30,92		14,68		34,72	
43,32		19,24		40,56		30,40	
57,20		20,72		48,24		36,76	
48,40		25,36		27,88		56,28	
60,28		22,84		52,64		54,12	
42,80		36,08		46,20		28,36	
52,20		55,84		19,08		41,92	
40,00		43,12		64,36		46,32	
64,80		29,16		43,68		28,28	
25,32		27,88		27,40		38,56	
37,44		53,20		46,44		46,16	
46,92		47,60		42,68		37,04	

III – A Día Zona Central (continuación)

3.1		3.2		3.3	3.4
43,12	12,84	59,48	63,72	81,96	42,96
52,20	23,12	17,08	34,92	46,72	52,64
78,24	60,48	26,84	47,80	32,80	48,72
49,36		47,92	23,56	66,60	59,44
23,24		15,76	52,60	29,96	20,56
7,32		44,98	56,82	67,40	48,28
68,00		53,88	58,52	42,12	60,95
28,20		13,72	71,40	46,76	42,12
72,28		46,64	63,16	30,76	50,12
32,28		53,08	62,48	26,48	74,64
21,84		26,40	69,00	46,64	31,44
24,68		55,08	39,26	56,32	46,68
45,84		42,80	36,92	55,20	65,48
67,92		22,60	41,48	82,16	47,36
80,68		44,36	42,80	73,40	51,28
65,88		35,64	49,66	52,48	36,24
61,24		51,72	61,88	30,36	30,92
16,00		8,20		80,68	33,04
54,12		50,16		52,96	25,64
60,92		54,44		66,68	24,76
65,52		67,20		73,08	30,68
30,60		28,48		62,48	56,70
47,40		33,72		59,88	56,44
56,48		50,76		74,12	52,12
60,00		40,36		80,20	89,04
60,60		62,68		28,40	71,60
28,24		54,40		39,64	46,60
20,52		48,64		67,32	57,24
29,52		35,40		43,20	67,08
46,24		14,48		69,28	66,12
58,84		43,16		39,76	51,64
8,16		50,72		43,64	57,36
22,92		20,80		61,68	33,24
70,20		43,96		43,96	39,48
25,64		46,60		74,12	45,64
38,64		29,92		67,28	50,24
23,04		37,08		41,48	45,96
48,76		17,96			46,28
71,80		70,16			26,28
67,00		16,40			57,45
46,68		10,40			57,10
57,32		28,00			
39,08		49,40			
36,00		21,16			
63,48		15,36			
21,28		36,12			
66,72		60,80			

III – A Día Zona Central (continuación)

4.1		4.2	4.3		4.4
25,12	42,08	62,44	32,52	14,00	63,60
39,24	43,00	53,28	38,52	43,56	30,00
23,72	53,68	65,32	43,52	29,68	45,52
35,32	20,12	55,16	29,92	47,48	36,64
30,60	63,68	63,92	51,72	55,76	21,76
31,68	14,24	59,32	59,20	30,68	59,32
21,28	52,84	46,36	66,40	35,60	34,52
43,12	44,17	16,68	57,88	52,44	58,52
31,96	49,26	38,12	44,16	21,24	35,56
11,80	34,84	43,76	70,80	53,76	66,04
36,80		14,80	47,08	39,84	47,68
17,80		33,80	38,56	47,92	43,48
19,32		72,56	65,80	39,76	42,96
45,44		46,28	34,32	55,80	55,08
34,88		58,24	19,20	45,28	49,20
50,32		35,04	64,72		48,64
21,60		70,04	59,92		56,68
38,68		44,80	61,48		61,56
37,88		49,12	26,76		13,60
21,68		67,68	35,88		45,48
44,88		70,76	46,52		38,56
27,92		12,40	67,28		61,96
47,44		35,76	57,04		46,92
37,40		57,76	49,60		11,16
35,00		29,04	52,72		39,40
44,92		37,08	47,44		53,04
37,36		30,76	44,16		60,72
24,32		19,16	26,16		58,40
61,60		65,56	17,76		45,44
17,40		48,96	25,88		13,52
31,44		50,88	35,36		62,52
35,16		42,52	53,96		48,04
45,15		38,60	53,24		42,00
25,12		44,64	47,80		29,00
41,96		34,60	24,12		45,80
45,68		43,28	24,08		43,68
53,88		52,96	67,00		58,60
36,04		45,40	30,60		75,24
33,12		44,08	49,96		
34,08		45,08	32,04		
27,32			18,80		
36,88			30,08		
18,80			54,08		
27,36			10,68		
40,28			18,20		
45,62			56,76		
33,00			27,60		

III – A Día Zona Central (continuación)

5.1		5.2		5.3		5.4	
9,72	30,00	26,16	40,12	30,92	21,04	34,08	44,00
89,80	43,44	44,76	41,40	47,40	45,80	38,44	12,20
50,32	38,72	47,68	9,92	25,68	13,16	35,32	26,96
35,52	55,28	46,04	53,84	7,96	30,84	30,08	19,64
27,84	44,24	25,12	39,84	55,88	29,00	40,92	54,16
62,36	26,56	21,40	29,20	12,20	38,76	38,92	45,48
64,88	30,15	24,28	18,16	24,48	37,28	29,28	35,88
45,44	49,40	32,80	17,24	34,12	35,16	30,84	36,32
91,96	60,32	40,88	25,52	37,24	33,00	37,12	25,56
54,48		40,68	25,10	42,36	27,20	15,92	38,08
44,16		30,36	39,57	43,24	28,20	18,36	20,38
58,96		50,08	20,20	36,64	39,40	23,60	37,12
15,56		13,68		26,72		32,68	44,88
20,76		16,00		21,28		24,40	34,08
39,40		31,20		56,40		42,80	33,48
15,40		25,72		11,76		22,72	38,08
14,88		46,28		35,24		26,04	15,84
22,56		38,16		45,08		30,88	25,64
14,00		41,92		46,52		38,72	31,92
28,44		42,92		37,96		39,12	39,44
60,48		31,12		39,72		17,00	42,20
37,36		38,52		17,56		30,36	37,24
55,08		57,92		26,64		21,00	39,12
42,96		32,16		32,80		28,00	47,40
39,08		44,20		42,44		24,64	33,28
30,04		35,04		29,56		49,20	46,56
35,04		32,82		25,96		23,64	32,92
56,44		43,08		38,28		49,44	54,08
35,88		25,28		15,04		15,20	38,92
60,08		41,96		31,80		17,76	38,96
45,60		36,92		15,44		30,40	35,72
20,64		57,68		41,84		11,20	50,76
54,08		24,76		46,92		45,88	42,92
36,00		14,56		41,20		33,16	11,12
42,56		41,71		24,24		33,12	12,04
53,12		28,92		47,40		32,84	39,52
25,08		37,40		45,76		46,64	20,04
52,28		33,32		41,28		41,32	52,16
60,48		34,88		16,80		38,64	35,00
24,36		43,76		38,44		46,48	36,64
73,00		29,20		40,76		29,40	10,24
46,88		28,68		17,84		39,12	40,00
46,68		48,32		39,16		42,68	20,38
20,56		44,72		29,72		21,68	24,96
29,28		13,60		11,96		33,64	
55,09		21,56		18,16		8,52	
55,60		42,88		47,72		15,84	

III – A Día Zona Central (continuación)

6.1		6.2		6.3	6.4
44,28	29,92	68,84	56,52	50,80	46,40
53,84	63,24	38,72	42,04	19,32	23,84
55,00	42,44	50,44	47,68	53,88	33,64
5,80	59,48	82,32	28,04	49,96	66,84
61,76	26,40	49,04	49,68	30,76	29,12
45,08	24,08	16,32		47,85	23,52
45,60	59,30	38,80		69,44	28,00
54,32	56,92	70,44		58,16	23,32
56,68		50,80		45,24	47,92
52,36		16,84		36,80	38,76
26,76		54,68		28,72	65,00
49,88		48,20		69,88	52,72
57,96		56,80		25,32	35,68
50,28		48,56		47,92	36,96
45,68		55,16		33,64	37,76
38,04		44,08		33,64	58,88
31,20		52,20		34,72	23,96
71,44		60,08		44,88	44,08
55,96		58,88		55,16	68,60
29,72		55,16		34,04	22,36
66,96		64,40		21,48	33,52
58,80		49,12		62,00	24,64
56,56		40,04		26,68	38,02
34,76		33,56		48,92	31,04
52,60		46,92		49,36	21,48
20,60		56,48		42,68	28,12
63,76		19,88		27,44	11,96
48,32		30,68		24,28	48,28
25,88		76,08		55,16	48,36
59,30		26,12		41,80	39,68
61,96		49,00		30,72	52,68
43,48		56,16		48,48	45,64
67,16		52,36		49,52	33,44
45,44		52,36		37,72	29,04
35,16		46,76		60,08	20,92
63,88		71,20		59,56	60,88
21,20		24,36		52,52	40,48
61,12		24,28		31,80	57,88
37,40		14,44		38,60	61,24
35,60		37,52		56,32	77,08
60,60		46,40		59,08	24,16
40,76		49,40		59,20	43,68
48,08		61,88		64,84	38,02
62,16		62,36		26,48	
40,20		33,28		66,40	
28,40		45,84		14,76	
29,72		51,52		39,19	

III – A Día Zona Central (continuación)

7.1		7.2	7.3	7.4
65,32	32,55	54,84	58,56	36,88
28,92	65,32	39,32	30,96	48,36
66,48		12,44	63,48	42,92
60,56		58,88	48,08	40,72
66,12		49,60	37,44	40,08
62,64		69,76	62,64	56,72
31,76		65,80	51,44	45,84
65,88		30,16	35,08	55,72
63,00		28,52	69,08	73,24
46,20		67,20	63,72	21,68
66,80		72,20	48,96	40,24
64,12		16,80	53,16	47,60
65,24		8,56	30,92	66,20
25,08		21,84	60,16	65,16
72,40		43,64	64,28	63,76
64,08		34,12	31,00	66,36
74,32		59,24	64,64	44,88
59,60		69,28	71,36	19,88
68,24		65,92	32,68	44,44
43,32		48,64	71,28	56,76
18,56		63,40	16,96	51,52
31,64		45,52	59,96	41,28
86,72		59,80	52,72	67,36
70,24		20,96	50,48	37,40
49,80		48,00	42,84	48,08
21,44		24,44	61,80	68,00
54,12		25,80	70,44	57,12
76,16		42,00	61,00	37,68
60,56		11,84	46,68	53,96
47,04		34,88	60,44	58,52
64,16		26,24	48,40	52,12
80,08		41,88	60,80	41,52
54,92		64,12	56,20	63,76
59,96		46,08	72,24	16,84
58,40		50,88	30,20	43,64
81,76		58,32		70,68
70,64		37,00		64,00
71,20		59,24		46,80
55,32				44,92
49,20				39,12
26,56				19,04
59,89				
49,52				
55,92				
42,80				
51,44				
33,64				

III – A Día Zona Central (continuación)

8.1		8.2		8.3		8.4	
28,40	15,56	41,16	63,80	56,92	49,24	63,96	57,16
24,60	54,80	63,08	37,36	47,96	41,72	41,32	40,44
86,60	48,36	63,76	58,70	36,68	41,00	46,04	52,92
51,36	50,12	51,64	57,86	52,28	52,84	89,68	31,40
54,64	55,04	39,40	43,20	26,84	56,04	33,44	37,98
23,48	16,32	57,12	31,48	61,00	37,12	50,04	67,84
17,32	57,00	63,20	10,12	55,68	36,68	29,00	
31,40	26,04	50,16	58,52	56,36	34,36	22,76	
51,12	55,96	58,28	45,76	48,04	39,08	33,40	
22,72	49,48	44,96	44,08	44,68		46,52	
56,68	43,12	40,36	29,65	49,52		35,04	
20,36	33,96	47,96	28,12	36,24		68,56	
66,40	47,56	63,72	29,46	47,44		49,32	
33,84	65,96	29,64	52,50	66,68		57,48	
36,00	49,64	47,40	53,10	37,36		49,68	
30,60	67,16	59,48	12,08	29,84		62,76	
49,32	45,48	52,16		43,68		19,36	
60,08	49,40	44,08		59,56		44,96	
40,48	56,68	67,96		31,96		49,52	
28,76	47,88	54,76		40,16		41,84	
47,88	54,16	14,12		65,88		37,98	
59,08		56,16		28,24		51,92	
50,96		53,03		69,16		59,52	
62,48		21,16		38,56		54,40	
54,52		48,16		46,56		39,20	
68,48		51,24		51,96		47,40	
65,80		49,08		28,36		58,40	
14,20		59,84		62,52		56,48	
53,80		32,36		34,72		51,44	
46,40		46,36		43,88		55,28	
17,60		56,76		43,04		47,80	
46,04		39,12		52,84		40,68	
56,40		54,12		54,92		50,24	
55,00		29,76		43,72		35,04	
35,40		39,96		51,56		44,20	
48,20		53,48		48,56		38,16	
60,52		55,48		42,48		60,16	
39,92		55,98		32,40		35,92	
35,84		55,52		40,12		46,84	
43,28		26,92		38,08		45,56	
59,60		66,08		49,68		25,96	
53,84		49,48		37,56		37,84	
55,20		43,52		52,64		31,04	
31,96		53,00		42,08		36,56	
39,44		16,92		46,80		44,24	
39,64		61,36		52,28		34,80	
36,28		51,28		38,52		64,96	

III – A Día Zona Central (continuación)

9.1		9.2		9.3		9.4	
37,36	50,16	49,80	33,12	45,48	67,68	33,24	51,76
33,48	42,56	45,20	59,88	54,80	61,80	23,56	22,80
48,32	31,64	56,12	41,24	30,96	54,84	56,44	49,64
27,88	22,16	10,52	43,92	46,44	12,44	43,88	43,08
26,08	41,52	42,92	53,64	23,36	59,32	49,80	42,20
37,96	44,16	22,24	61,28	33,72	53,40	11,40	30,12
41,36	50,40	52,76	45,80	27,16	69,24	64,40	54,52
38,31	58,04	62,72	55,32	34,64	21,32	55,40	29,15
20,72	45,88	33,00	30,76	52,68	39,96	47,64	28,89
52,56	32,84	37,96	26,68	31,28	22,76	26,72	73,28
47,48	46,57	19,00		39,16	19,20	42,32	
52,36	41,12	52,56		33,76	57,12	33,12	
49,08	42,30	46,92		44,88	56,76	55,92	
45,24	26,48	44,96		37,68	29,76	38,52	
54,16		28,68		48,44	14,92	41,24	
50,40		53,44		58,12	46,19	49,04	
34,84		45,16		54,84	47,64	30,32	
35,84		9,40		53,32		46,80	
52,64		37,04		44,32		35,24	
45,40		45,20		47,24		35,16	
45,68		50,24		41,52		58,48	
40,84		71,24		33,80		41,36	
35,12		27,44		36,80		46,80	
65,80		42,28		17,32		35,44	
62,44		36,28		30,24		48,88	
44,00		42,68		32,60		16,12	
42,52		36,32		23,72		48,08	
45,16		41,60		61,08		14,84	
40,00		49,00		32,68		31,12	
38,68		60,12		58,80		36,52	
40,16		40,44		42,28		35,12	
16,60		63,20		56,52		59,56	
52,68		94,32		43,68		31,64	
23,64		45,40		34,68		44,92	
24,52		59,52		32,08		44,40	
54,84		59,28		31,48		48,56	
49,30		59,60		55,21		47,28	
51,40		61,12		52,68		40,20	
37,72		54,80		23,72		34,08	
47,60		23,32		32,12		54,40	
62,16		40,20		56,56		48,88	
31,68		52,72		55,92		44,12	
53,24		16,76		55,24		30,00	
40,00		23,12		36,80		24,56	
47,64		51,92		47,76		38,40	
44,32		47,80		28,20		44,28	
61,08		42,40		22,56		27,20	

III – A Día Zona Central (continuación)

10.1		10.2		10.3		10.4	
26,24	46,80	50,76	42,28	38,32	59,16	45,44	27,56
32,88	28,24	46,00	46,12	34,72	49,60	29,04	33,72
44,32	51,60	47,20	53,36	32,04	65,80	32,60	36,76
48,84	35,24	17,88	45,00	51,88	61,64	30,96	22,84
12,32	32,36	43,92	51,28	47,44	30,32	55,60	49,36
49,92	15,92	47,20	56,12	41,76	29,80	30,40	12,52
44,28	50,76	63,80	40,88	49,76	28,00	46,92	43,80
49,44	48,88	47,88	53,32	35,84	34,48	18,60	35,48
49,88	19,12	28,20	63,08	40,80	19,12	29,24	40,80
41,08	16,36	27,96	44,88	36,04	40,06	34,08	13,84
22,40	49,56	48,68		30,32	49,80	31,40	43,64
53,12	12,32	19,80		34,44		45,48	24,16
13,84	56,92	50,48		30,84		38,56	45,56
10,68	33,24	35,00		40,06		31,04	45,20
37,88	38,56	53,00		50,32		41,24	40,92
45,88	29,76	62,00		12,08		26,16	28,28
47,44	49,40	51,08		47,44		27,96	12,72
50,08	19,04	17,40		30,96		36,96	37,16
35,36	48,00	41,84		27,40		18,28	15,88
40,16	44,36	54,96		42,72		24,04	52,68
43,52	51,28	50,68		51,40		12,60	36,04
33,52	50,00	41,24		31,72		37,16	29,84
30,20	41,48	22,28		38,56		60,56	42,64
48,88	34,64	55,48		36,08		56,20	27,44
33,80	40,36	30,04		46,44		32,04	34,25
12,56	43,16	63,92		10,56		52,44	34,40
32,88		39,76		49,88		32,20	
42,76		30,84		35,12		21,80	
64,80		44,72		37,80		35,24	
55,08		57,80		36,16		54,16	
45,28		36,12		13,40		42,76	
52,20		52,00		44,96		10,76	
42,72		37,88		55,84		42,68	
40,36		57,20		25,76		44,08	
49,44		36,60		34,96		35,48	
52,64		22,36		50,72		34,04	
23,96		77,04		19,88		54,40	
42,16		48,28		57,72		27,24	
40,16		68,88		42,56		17,96	
39,76		39,00		48,24		32,16	
52,32		55,64		62,96		46,48	
5,76		25,40		24,44		45,60	
12,48		39,52		17,36		53,64	
45,00		44,12		34,64		23,80	
20,48		36,52		57,68		28,72	
36,36		25,64		26,08		40,68	
48,96		33,16		20,92		27,84	

III – B Día Zona Periférica

1.1	1.2	1.3	1.4
52,04	66,28	56,4	22,36
38,24	62,32	77,28	52,28
28,2	60,12	32,86	39,16
34,36	40,08	56,8	57,36
22,32	62,12	18,72	55,36
44,44	69	47,44	51,16
53,44	52,76	44,56	34,44
27,48	50,92	36,12	12,32
62,52	56,2	52,96	21,8
51,76	34,76	41,68	42,16
42,64	56,08	66,28	45,88
52,25	49,52	27,08	25,88
23,88	71,56	31,84	58,08
56,96	66,16	46,72	43,96
34,48	61,8	52,32	35,48
19,24	47,12	61,48	37
59,16	53,8	50,72	44,12
54,08	52,4	65,88	30,72
63,92	43,56	76,44	19,4
50,84	50,88	38,08	43,6
24,28	23,08	56,24	59,08
29,52	8,92	43,68	39,72
20,68	46,68	42,16	49,68
20,72	65,88	57,32	54,6
40,96	45,36	51,8	49,16
38,88	52,64	48,6	50,52
41,04	28,64	58,48	62,6
56,88	31,88	65,88	43,16
23,12	43,24	52,96	51,92
58,64	74,68	32,86	16,48
56,04	77,4		51,24
52,84	65,16		24,88
30,36	73,2		57,44
53,8			25,48
20,72			31,84
50,36			71,48
32,32			33,24
53,44			72,8
74,36			51,48
52,25			50,4
52,25			39,56
50,84			28,56
			49,56

III – B Día Zona Periférica (continuación)

2.1	2.2	2.3	2.4
55,44	47,6	21,6	31,6
22,88	46,8	45,52	45,24
42,2	30,44	32,72	71,12
50,96	42,2	47,2	46,28
53,28	57,2	26,2	51,6
56,76	35,84	46	44,92
33,4	34,4	38,6	55,08
20,6	64,4	32,32	45
29,64	46	42,08	40
16,8	51	36,8	34,32
46,68	67,08	36,16	43,8
68,52	49,36	36,12	17,88
23,56		28,28	66,12
63,16		12,6	36,68
12,36		32,36	54,84
37,56		39,56	
53,76		34,88	
55,56		37,04	
43,24		10,72	
58,52		15,48	
10,4		17,88	
49,72		31,96	
48,44		46,92	
46,6		20,48	
38,52		43,52	
38,4		63,36	
60,2		35,04	
38,48		42,68	
19,32		53,84	
61,36		60,4	
43,2		30,12	
69,16		33,48	
34,84		59,4	
36,08		36,84	
		13,48	
		31,96	
		25	
		47,48	
		12,4	
		44,2	
		54,6	
		8,96	
		35,44	
		53,24	
		42,28	
		44,6	
		16,12	
		9,56	

III – B Día Zona Periférica (continuación)

3.1	3.2	3.3	3.4
52,44	49,44	45,44	40,2
67,4	40,88	41,84	48,72
49,84	25,28	43,44	71,36
20,12	54,04	53,68	37,52
59,64	57,64	21,08	50,64
62,44	62,2	35,12	65,08
68,88	60,76	26,48	68,12
63,44	48,36	17,28	47,2
75,44	33,68	52,44	31,92
56,68	43,4	55,6	87,68
35,16	61,16	18,24	65,36
45,88	51,48	55,52	70,64
58,56	35,52	46,48	67,84
51,08	63,48	16,44	64,16
71,16	47,88	49,92	25,24
51,64	46,12	47,96	53,4
41,96	56,16	22,88	10,64
57	38,72	12,68	34,12
41,6	45,44	66,88	47,36
56,32	47,92	72,68	21,56
42,36	59,6	37,08	25,44
	44,36	27,52	41,72
	55	46,23	67,24
	63,92	49,12	74,68
		45,16	55,16
		63	31,8
		20,2	61,52
		50,21	39,6
		42,92	15,08
		49,44	44,88
		47,96	39,64
			78,56

III – B Día Zona Periférica (continuación)

4.1	4.2	4.3	4.4
40,56	60,24	48,44	44,68
49,24	54,6	20,72	52,72
71,84	59,72	69,66	36,56
38,04	69	16,12	36,2
51,36	31,52	45,62	37,72
66,04	52,56	46,64	44,24
68,88	65,92	19,92	58,76
47,72	65,88	68,88	66,08
32,28	72,16	55,6	30,68
88,12	36,76	38,96	22,2
65,88	14,92	52,52	62,56
71,04	79	46,36	50,6
68,16	56,88	56,76	25,08
64,72	67,48	17,56	33,76
25,44	53,04	46,68	69,68
53,8	46,48	67,6	55,4
35,32	65,48	51,8	19,36
47,92	42,92	48	40,96
22,04	46,92	63,28	66,48
25,8	51,44	20,2	20,3
42,52	68,6	16,76	55
67,56	70,24	43,36	27,44
76,12	70,08	16,52	65,64
56,2	62,12	15,36	64,88
31,92	68,16	45,32	37,72
61,68		71,12	74,04
40,16		40,8	47,2
15,36		52,08	50,24
45,28		54,04	
40,28		44,76	
		63,76	
		49,4	
		56,6	
		47,84	
		55,39	
		31,6	
		38,92	
		43,96	
		55,96	
		19,12	
		69,66	

III – B Día Zona Periférica (continuación)

5.1	5.2	5.3		5.4	
51,68	33,56	34,44	52,68	17,28	56,52
53,56	39,4	33,6	24,48	37,96	37,72
44,04	39,92	37,36	49,12	28,88	40,64
55,76	58,36	33,52	40,88	28,76	35,64
52,52	46,24	45,84		24,16	44,88
61,76	40,8	43,76		18,4	37,36
42,92	40,6	50,36		24,64	14,24
33,4	12,64	36,32		12,4	13,68
52,15	39	14,4		36,08	37,36
41,6	49,16	47,44		29,2	
57,52	48,16	26,64		35,24	
53,12	28,52	32,6		39	
53,45	43,04	24,76		38,04	
60,76	27,28	38,2		25,28	
62,96	44,8	44,32		34,92	
24,52	48,04	18,24		14,76	
29,16	35,12	22,88		22,16	
24,68	47,96	44,28		23,08	
46,04	44,8	13,48		38,76	
44,08	52,24	43,88		19,4	
	35,12	12,32		50,28	
	22,56	62,08		35,76	
		36,2		54,8	
		44,04		50,4	
		39,04		39,24	
		39,4		20,84	
		41,68		31,44	
		48,88		13,04	
		23,04		28,84	
		48,36		31,32	
		32,72		25,32	
		33,64		51,92	
		31		49,92	
		32,92		44,8	
		35,96		39,24	
		48,56		50,6	
		44,56		49,6	
		37,84		43,84	
		50,44		40,52	
		30,64		51,68	
		25,64		46,4	
		56,32		26,92	
		32,8		53,96	
		30,15		40	
		37,8		22	
		47,36		13	
		28,6		58,84	
		26,32		25,16	

III – B Día Zona Periférica (continuación)

6.1	6.2	6.3	6.4
25,72	53,48	42,32	63,6
40,2	55,44	31,60	38,08
45,32	23,64	46,52	53
39,24	27,52	38,16	55,72
49,08	41,08	44,28	38,36
40,04	18,92	55,40	63,88
29,88	10,36	16,20	48,52
17,08	32,64	38,20	39,68
42,68	52,56	30,92	54,12
56,08	12,68	28,40	30,68
34,76	27,24	44,16	46,96
62,8	25,04	22,68	41,88
43,48	33,28	49,92	27,44
19,72	19,68	32,84	49,72
11,92	67,08	15,28	38,92
14,28	51,28	15,84	48,72
40,52	41,32	29,72	33,8
12,04	56,08	21,12	46,96
20,8	15,76	40,04	27,4
28,32	20,08	35,52	53,24
21,2	43,68	22,60	49,04
50,72	28,28	42,12	28,64
46,64	35,84	13,68	19,44
50,76	37,6	61,12	52,08
38,88	52,36	35,32	79,08
58,76	62,04	51,24	35,2
48,92	31,96	32,24	48,48
42,24	59,76	43,56	65,88
57,68	55,48	49,88	42,64
56,12	49,84	48,44	
44,56	50,24	27,28	
55,14	61,12	33,84	
56,12	29,08		
54,15	55,52		
21,6	26,6		
17,88	36,12		
13,6	48,64		
21,15	37,4		
21,72	29,14		
44,96			
35,56			
49,32			

III – B Día Zona Periférica (continuación)

7.1	7.2	7.3	7.4
39,36	15,23	45,04	41,32
35,8	61,12	50	53,44
34,26	64,32	46,44	41
39,52	23	46,88	33,96
42,56	78,36	36,32	54,08
53,76	42,96	47,12	44,68
37,12	74,88	38,72	44,12
34,28	47,92	54,23	44,24
50,28	14,3	32,84	
37,08	68,6	67,44	
14,96	25,98	50,4	
37	52,8		
34	30,44		
26,24	22,12		
20,84	61,25		
30,8	60,95		
55,68	36,25		
26,04	37,89		
38,44	36,58		
36,68	45,89		
39,76			
42,6			
49,36			
38,96			
41,88			

III – B Día Zona Periférica (continuación)

8.1	8.2	8.3	8.4
38,72	30,24	39,68	39,44
50,16	47,08	50,64	57,96
50,36	38,32	39,48	20,15
63,12	44,6		17,52
43,8	42,24		26
66,04	48,52		50,04
64,72	47,12		67,72
68,36	51,72		46,04
71,24	53,92		58,28
64,92	43,76		70,36
54,48	47,36		73,36
55,96	57,6		32,72
59,96	9,64		66,64
42,72	38,04		23,88
80,48	29,52		28
	48,84		43,96
	41,12		16,6
	27,88		54,92
	48,4		60,56
	47,62		53,76
	39,44		19,6
	32,44		63,12
	18,32		20,84
	65,6		57,28
	14,92		62,76
	11,88		29,88
	19,96		17,08
	47,4		59,56
	45,4		61,76
	42,72		54,76
	11,16		50,68
	10,2		63,52
	51,16		13,4
	35,44		20,15
	44,6		
	30,44		
	8,72		
	20,48		
	43,4		
	41,36		
	10,8		
	38,95		
	47,6		
	38,68		
	45,56		
	44,23		
	57		
	44,6		
			52,12
			45
			15,24
			50,36
			16,64
			45,68
			70,44
			27,16
			40,68
			48,4
			42
			57,8
			21,68
			40,52
			77,68
			42,92
			44,96
			64,52
			23,44
			41,24
			59
			46,2
			41,92
			37,8
			14,92
			21,68
			56,8
			42,68
			27,04
			52,04
			48,16
			46,08
			13,24
			44,32
			56,92
			22,48
			58,48
			41,56
			19,62
			25,68

III – B Día Zona Periférica (continuación)

9.1	9.2	9.3	9.4
36,52	27,56	42,36	48,24
65,12	72,04	50,96	59,2
56,16	46,88	68,24	35,6
40,4	40,24	31,6	11,6
41,15	62,52	49,32	50,48
67,04	27,68	43,88	44,44
71,84	53,48	52,56	63,44
77,12	14,36	44,44	29,68
61,36	62	44,84	62,04
57,96	48,16	53,88	54,96
72,6	61,24	16,76	38,12
66,32	31,36	52,84	63,76
26,3	24,84	60,48	52,52
66,72		35,32	42,04
62,2		53,56	69,28
39,4		28,64	46,56
68,84		50,04	26,16
38,95		17,52	52,88
68,25		39,88	55,04
32,25		34,04	42,84
		39,92	40,48
		49,96	52,28
		30,84	54,2
		42,28	22,16
		34,02	54,98
		63,72	48,6
		50,52	55,56
		54,68	43,28
		45,36	43,52
			30,4
			42,88
			49,4
			42,36
			35,26

III – B Día Zona Periférica (continuación)

10.1	10.2	10.3	10.4
42,36	42,16	43,8	36,87
47,92	27,16	50,68	37,24
38,92	47,48	33,2	20,56
28,4	44,44	51,16	31,92
27,24	45,08	34,32	16,52
36,44	36,28	47,72	18,44
28,48	39,36	38,64	47,64
26,44	18,64	30,04	39,04
33,8	43,96	40,28	52,48
52,64	44,72	21,44	49,56
37,88	35,12		48,44
24,64	59,32		49,32
37,36	51,6		59,52
30,32	13,96		39,2
47,36	12,64		28,68
21,68	13,92		49,76
33,92	49,96		47,6
43,2	36,8		43,64
25,48	40,24		48,44
48,8	49,28		19,96
46,56	27,2		33,88
26,56	36,32		
50,2	40,36		
28,04	35,48		
34,28	35,8		
37,12	40,23		
35,4			
30,64			
57,44			
42,6			
43,84			
46,6			
41,2			

III – C Noche Zona Central

31.1		31.2	31.3		31.4	
65,8	54,04	50,88	51,52	47,04	43,68	49,64
33,84	53,24	50,76	58,96	29,4	31,58	52,96
48,24	44,28	39,68	41,32	42,88	31,76	43,76
55,2	54,92	33,76	42,36	30,12	31,76	36,92
41,12	14,68	45,92	46,56	31,88	30,32	38,48
36,76	28,56	53,2	56,32	13,96	29,64	43
49,2	60,48	51,32	26	32,2	36,32	13,08
22,2	35,48	49,52	48	37,16	41,36	37
39,56	52,12	49,76	40,64	41,56	47,72	34,36
34,32	66,16	62,28	55	41,32	14,6	54,16
56,88	53	18,08	53,32	33,64	16,64	46,64
41,68	36,92	51,88	46,6	34,76	29,28	46,04
48,04	28,12	50,04	26,6	20,48	38,8	45,64
34,56	29,32	25,92	24,76	47,52	37,24	54,72
29,28	55,48	49,72	47,88	42,88	51,64	36,8
52,08	56,14	19,24	42,12	49,82	38,36	30,72
12,36	55,6	48,24	37,6	47,21	45,12	21,52
58,2	55,6	45,48	29,84	47,21	37,88	43,88
29,04	53	31,92	49,82	48,36	25,32	55,68
56,14		46,92	47,8	50,08	42,44	18,28
22,2		24,64	64,36	39,8	29	43,48
58,56		49,56	57,72		42,04	57,16
42,72		42,76	47,21		53,16	39,56
36,72		26,4	28,24		28,72	49,8
48,8		48,68	49,28		38,32	12,96
24,04		42	50,48		33,84	37,32
46,56		42,64	44,2		49,2	31,58
55,32		53,24	48,08		49,8	
42,4		46,2	28,44		43	
29,84		35,72	52,4		55,76	
47,12		40,08	34,6		35,04	
41,28		60,52	55,96		44,2	
48,88		55,08	52,92		40,32	
49,52		43,72	51,8		33,6	
55,6		44,08	48,36		44,68	
50,4		51,6	50,08		19,6	
61,08		48,64	39,16		31,52	
18,84		48,4	54,4		48,72	
37,76		53,16	24,8		36,92	
51,44		43,28	39,8		31	
39,56		53,96	20,92		23,8	
49,04		46,92	28,88		45,08	
13,2		42	46,2		6,68	
60,68			79,76		36,32	
21			19,72		33,08	
48,68			49,36		44,36	

III – C Noche Zona Central (continuación)

32.1			32.2		32.3		32.4		
23,24	43,88	31,64	30,6	29,68	11,12	51,8	34,32	41,64	38,2
33,4	24,16	31,16	34,72	22,4	34,08	29,52	43,92	41,72	39,96
32,52	33,68	34,88	15,96	38,72	54,8	29,08	12,92	20,56	47,4
34,08	39,4	37	40,96	37,72	42,04	38	41,04	41,44	11,52
46,56	38,24	32,56	42,08	30,52	47,48	40,64	40,52	37,08	40,2
33,48	16,68	29,92	35,6	34,56	39,12	46,88	24,2	42,04	44,08
32,44	32,64	24,94	13	14,6	47,56	16,04	36,04	46,6	35,36
6,28	13,6	37,2	27,4	46,48	16,72	43,96	26,4	36,4	48
34,24	21		9,36	39	53,16	15,72	14,2	52,08	51,32
12,24	28,88		19,16	42,28	13,24	26,96	45,6	46,84	29,44
41,56	36,76		17,44	39,76	32,6	24,6	26,56	44,5	14,88
18	26,08		9,72	42,88	26,96	29,48	33,16	43,96	42,16
36,96	18,28		10	42,92	52,01	18,2	12,44	9,52	40
31,76	43,84		41,32	36,16	39,44	24,68	27,08	51,16	26,98
17	27		24,28	19,68	45,56	43,6	12,24	34,6	44,5
31,68	24,44		35,32	18,52	39	41,48	40	27,52	
35,36	38,48		41,24	11,44	33,16	8,44	11,44	52,76	
33,48	31,88		33	35,8	36,48	10,24	33,88	36,76	
23,2	9,68		11,36	29,6	33,44	32,44	20,72	41,36	
34,32	38,08		52,2	36,6	40,8	14,36	31,08	43,48	
34,44	34,04		44,68	32,44	25,96	41,84	21,96	32,76	
40,28	14,28		28,76	50,92	37,36	9,8	37,76	36,36	
32,68	27,24		16,64	22,76	43,14	36,1	46,6	38,28	
14,8	21,96		30,28	33,12	31,88	43,14	31,88	21,72	
44,48	22,52		12,76	35,8	37,36		26,28	24,32	
12,52	26,44		31,04	37,4	44,08		39,04	14,48	
43,2	28,92		23,48		26,4		22,68	39,44	
14,08	24,32		31,44		24,8		43,92	20,2	
18,96	39,56		31,88		36,48		34,28	47,88	
36,2	31,72		49,16		42,56		26,98	17,16	
35,16	24,94		30,92		13,16		29,12	13,84	
38,92	24,96		34,6		36,4		36,84	36,24	
35,96	21,84		37,4		34,56		42,6	61,8	
32,24	42,56		28,2		17,88		39,04	36,56	
47,24	24,6		39,04		31,36		22,04	30	
12,64	31,92		45,24		37,68		42,8	35,96	
45,08	37,2		45,76		41,8		40,24	22,28	
35,52	37,84		14,48		13,8		36,36	39,76	
35,28	29,44		54,76		33,4		29,4	44	
10,92	36,08		37,08		32,28		38,84	22,8	
36,44	13,88		32,92		45,92		30,72	53,96	
14,72	29,64		22,96		37,76		37,16	11,36	
26,4	29,16		35,16		5,12		18,76	52,56	
26,8	32,72		50,44		18,72		31,2	9,64	
37,48	25,84		19,92		39,52		29,56	34,36	
43,6	18,96		16,12		36,96		16,72	44,28	
12,44	7,64		35,56		39,96		40,36	41,48	
11,64	34,48		42,84		34,08		42,2	43,48	

III – C Noche Zona Central (continuación)

33.1		33.2		33.3		33.4	
35,64	46,04	19,84	47,2	59,92	56,72	41,4	48,84
37,72	42,4	25	40,76	59,44	39,4	39,52	40,08
40,24	45,8	39,6	33,8	47,4	43,92	35,6	23,88
47,84	59,92	28,24	46,16	41,44	40,92	53,88	31,2
37,16	64,92	32,08	41,36	47,32	59,68	57,88	46,36
41,38	53,92	32	45,8	38,84	24,12	47,36	40,32
41,64	51,64	50,6	20,84	7,64	25,68	34,32	42,28
47,08	54,4	35,36	55,44	45,76	41,24	39,92	45,08
36,64	15,96	43,28	27,52	37,52	46,12	60,12	33,04
56,12	48,96	52,56	57,76	42,2	50,48	15,04	46
53,8	48,28	42,92	59,2	24,64	71,12	53,4	51,12
40,16	45,92	34,2	25,04	55,24	49,2	46,28	30,88
56,48	57,16	48,68	40,94	49,88	35,44	30,88	48,36
61,2	38,48	58,28		49,96	47,96	46,2	41,96
28,28	28,32	41,28		69,2	24,4	40,04	23,4
34,04	62,72	49,04		66,2	55,24	27,16	23,04
54,76	29,96	46,96		57,24	59,92	44,76	52,36
53,32	39,12	26,8		51,72		38,84	46,28
31,04	55,96	36,56		64,72		42,04	48,94
44,32	43,4	49,32		44,72		46,64	51,38
69,56	35,64	45,44		36,88		46,28	52,12
49,72	37,16	25,72		42,64		41,52	56,74
27,72	41,38	53,28		44,8		60,96	46,36
22,4	40,32	44,44		52,12		37,48	23,4
40,32	38,4	49		30,8		50,56	37,5
12,08	22,24	19,72		68,64		15,56	
38,4	54,6	39,12		39,24		39,2	
40	42,1	31,16		18,84		41,48	
23,12	45,92	53,52		49,52		48,94	
22,24		48,04		37,88		39,72	
20,8		11,12		44,64		37,5	
62,16		47,64		19,8		43,2	
31,28		37,32		58,08		51,38	
42,16		36,44		56,72		48,36	
26,4		7,88		40,6		52,12	
32,68		47,84		62,68		52,08	
22,36		40,94		43,2		24,8	
22,44		28,88		28,6		37,24	
41,76		56,12		36,36		45,64	
38,04		17,96		61,28		30,68	
56,96		27,08		43,76		41,16	
51,64		25,04		36,16		44,36	
34,76		30,08		31,6		56,74	
45,48		50,88		56,08		34,16	
54,6		30,2		66,4		49,32	
58,52		51,64		27,92		27,32	
44,16		33,36		57		57,96	
42,1		30,76		46,64		22,44	

III – C Noche Zona Central (continuación)

34.1		34.2		34.3		34.4	
40,4	35,68	49,64	46,64	28,12	40,04	36	32,64
28,12	18,6	51,56	40,4	27,88	50,64	40,36	32,12
31,04	38,16	40,68	38,8	22	34,76	35,36	50,6
46,16	18,24	27,92	26,4	28,84	25,64	22,32	17,84
46,28	22	39	26,78	30,04	10,88	23,28	11,84
33,96	21,92	53,72		39,64	38,64	12,36	34,04
38	41,16	16,44		18,4	26,36	45,76	
33,92	16,44	33,36		26,48	26,96	45,6	
39,4	32,68	46,6		23,88	27,48	22,04	
44,8	27,8	34,4		38,24	18,92	39,4	
38,16	43,76	26,78		15,24	26,4	36,16	
26,8	25,32	15,36		22,6	21	34	
44,32	33,56	55,88		23,16	39,88	34,04	
27,44	38,72	35,72		27,6	25,48	35,32	
39,76	16,56	50,2		29,24	12,44	53,48	
27,88	30,6	39,32		43,36	30,8	52,2	
17,04	38,16	27,2		35,64	22,64	42,16	
26,28		40,2		32,6	21,48	17,52	
28		47,16		18,44	33,08	34,12	
24,08		47,4		17,48	26,28	38,68	
15,04		13,64		32,64	45,28	49	
38		53,84		28,16	10,84	18,52	
42,56		34,56		22,12	24,64	48,32	
40,32		24,12		40,92	34,08	22,6	
32,64		47,72		30,68	15,88	21,84	
30,52		34,08		33,96	46,16	52,08	
34,64		19,4		26,44	29,2	24,36	
28,4		49,28		27,24	38,92	37	
43,8		37,28		20,88	45,12	31,04	
47,24		44,16		38,64	34,56	32,36	
36,08		43,28		25,28	40,24	45,12	
36,72		47,88		28,4	28,76	22,08	
30,8		43,64		36,44	35,48	31,04	
24,36		18,08		36,64	29,08	22,68	
37,6		47		41,24	37,32	43	
23,8		31,8		24,52	32,04	37,52	
18,64		39,76		25	33	16,84	
27,04		20,24		26,92		35	
15,44		42,88		33		43,8	
27,68		49		28,44		40,72	
32,76		41,88		22,84		34,04	
30,2		15,36		26,92		38,12	
13,52		37,24		18,64		39,84	
32,56		39,6		29,44		30,4	
23,92		54,48		15,52		39,48	
24,6		42,32		18,24		32,4	
38,72		38,96		21,64		47,2	
38,4		29,28		23,24		50,92	

III – C Noche Zona Central (continuación)

35.1		35.2		35.3		35.4	
36,8	27,62	34,14	42,84	51,04	47,52	24,16	26,92
18,12	19,08	44,8	34,16	31,24	44,76	36,56	36,72
39,88	12,32	10,64	26,48	47,52	28,28	42,04	29,28
40,68	21,72	35,4	34,6	17,44	21,2	45,32	15,48
35,12	29,6	13,28	30,36	35,88	56,84	57,16	32,84
34	36,76	19,24	12,2	54,56	43,4	23,08	27,2
23,56	33,6	39,44	39,6	16,28	37,64	44,08	24,88
38,52	6,8	36,56	26,48	51,4	56,4	40,64	12,88
42,44	35,64	29,68	26,48	42,68	47,44	23,56	36,2
32,08	35	23,28	36,72	46,12	23,4	19,24	39,88
36,48	35,84	20,72	35,24	40,92	40,24	28,02	32,12
20,76	21,04	28	23,52	33,32	42,32	45,68	21,56
39,2	39,84	32,92	22,44	47,2	48,16	46,88	14,04
39,88	39,6	36,14	41,96	49,48	21,72	28	28,02
39,24	27,64	35,08	35,8	46,28	29,56	48,84	
28,04	19	13,2	12,72	27,6	29,2	40,52	
22,6	9,72	33,28	35,44	42,72	35,76	62,72	
16,96	34	11,52	34,6	40,92	23,92	18,72	
33,24	32,4	34,84	29,92	45,52	48,08	38,24	
30,84	30,36	32,92	31,52	38,16	34,44	44,2	
46,88	29,36	31,6	33,16	40,4		35,72	
28,12	40,9	30,16	27,44	43		35,16	
35,08	23,72	30,04	9,24	42,12		29,04	
27,8	27,24	40,08	32,08	34,16		39,92	
31,04	36,76	30,68	38,08	17,64		33,72	
30,52	35,52	40,28	36,04	23,24		13,52	
19,04	28,28	32,68	31,16	49,8		41,4	
28,64	28,2	32,08	16,4	45,48		15,44	
34,76	39,4	33,24	26,72	40,76		38,12	
38,68	16,68	39,88	31,64	41,92		37,88	
40,36	33,38	37,68	27,92	42,32		31,2	
25,68	22,4	33,84	30,4	19,12		45,76	
42,2	11,36	13,2	37,36	17,24		38,24	
42,04	41,16	41,24	32,8	20,56		45,44	
16,2	39,32	42,56	7,92	36,88		38,36	
36,16	32,64	38,28	44,68	41,76		19,12	
33,96	31,2	36,68	36,84	34,44		57,8	
32,68	39,44	36,64	36,56	48,44		34,68	
39,4	14,24	49,16	19,76	53,44		21,08	
23,2	36,32	35,2	41,16	35,8		48,44	
10,88	33,38	21,72	36,14	36,28		33,6	
23,2	40,9	38,12	34,14	28,44		18,24	
36,84	27,62	36,52		52,36		39,36	
30,48		32,92		13,36		20,28	
41,44		27,92		56,08		13,6	
35,64		21,92		38,28		38,96	
47,6		16		39,44		27,6	
33,96		36,52		18,8		33,32	

III – C Noche Zona Central (continuación)

36.1		36.2		36.3		36.4	
36,24	35,72	40,6	38,84	39,16	41,24	43,6	43,36
49,84	23,76	39,48	40,52	34,16	49,32	24,8	36,48
43,96	22,72	21,28	42,56	36,12	54,36	39,76	29,84
54,2	17,88	32,56	41,4	25,08	34,68	52,92	38,56
29,96	45,2	41,64	17,56	52,52	17,28	44,88	25,64
58,88	47,44	22,68	44,08	35,48	60,08	60,12	15,68
35,08	48,28	46,8	36,2	32,48	48,32	30,68	24,36
44,76	30,88	41,48	29,04	15,44	41,8	47,68	37,96
25,44	36,72	40,2	49,52	25,44	36,96	38,8	13,84
42,8	21,72	37,64	34	34,64	29,76	27,2	45,6
44,48	39,4	40,84	32,28	32,08	40,2	28,44	35,56
17,48		45,52	20,36	33,24	39,96	59,24	32,84
49,2		23,32	25,24	20,6	47,96	50,04	43,04
29,64		18,92	31,32	33,76	40,76	38,84	26,2
47,24		14,04	28,56	37,88	22,08	34,68	45,4
40		16,16	25,2	44,68	54,64	39,6	
14,4		54,88	24,56	41,04	12,68	48,8	
40,48		35,2	35,76	39,4	44,04	37,28	
41,64		44,2	12,36	37,72	34,32	45,12	
38,56		47,24	41,08	20	44,96	45	
41,68		36,24	36,16	21,4	36,96	25,8	
57,56		43,8	11,56	46,16	32	42,2	
52,4		25	38,04	54	34,84	47,44	
44,4		47,76	48,76	41,52	41,12	42,8	
25,12		22,44	45,64	45,92	19,92	41,08	
47,28		19,84	23,08	37,76	37,12	46,4	
17,92		63,84	32,34	25,04		40,36	
47		41,6	35,04	27,12		26,68	
34,4		36,6	45,28	50,52		13,16	
52,56		30,2	38,4	51,12		38,92	
32,6		45	47,4	61,88		38,48	
17,6		28,4	37	32,48		38,48	
37,56		12,4	46,48	23,8		37,48	
36,04		44	43,6	17,52		34,28	
28,88		31,8	37,08	34,48		45,2	
50,36		27,48	24,88	19,68		47,6	
59,08		47,04	20,44	45		56	
35,68		21,76	31,76	21,88		52,76	
33,8		18,96	22,88	52,68		29,48	
39,8		41,68	30,32	17,12		26,48	
32,6		36,24	48,84	31,36		26,96	
49,6		35,4	36,96	31,8		16,24	
37,4		41,88	34,8	59,8		20,32	
32,88		17,56	32,64	40,76		42,44	
32,76		46,08	16,72	25,64		23,96	
48,4		31,96	32,34	37		22,36	
48,56		40,88		40,4		21,84	
46,48		29,88		25,8		40,6	

III – C Noche Zona Central (continuación)

37.1		37.2		37.3		37.4	
42,6	38,24	56	58,12	61,24	51,68	51	38,84
18,44	43,92	18	20,48	39,04	35,44	47,84	23,24
32,04	33,52	56,8	25,8	69,72		39,88	52,96
33,92	10	57,16	52,92	17,24		33,72	60,08
43,32	19,84	27,44	55,24	64,12		50,28	34,32
19,12	19,84	50,16		58,68		51,8	39,52
30,6	40,84	62,52		48,08		33,92	30,08
42,52	41,16	56,6		42,76		53,72	44,16
46,28	37,96	48,88		42,8		12,52	32,48
14,28	45,4	16,64		46,76		22,32	32,6
49,6	31,84	43,6		19,36		35	52,28
58,68	49,04	45,88		27,24		42,16	59,72
33,96	35,6	66,96		49,12		45,34	43,56
52,04	54,56	63		47,88		49,92	50,52
49,8	44,56	71,4		57,64		27	45,34
46,88	47,2	54,2		49,2		51,24	36,92
51,88	17,88	54,4		15,88		34	
33	38,8	49,44		45,24		40,24	
54,04	41,8	47,12		35,44		13,16	
48,12	12,36	22,08		57,64		57,48	
53,6	52,84	47,48		32,76		38,48	
49,36	48,76	41,36		14,92		31,32	
55,8	34,12	51,16		51,56		47,88	
31,88	24,92	41,84		56,68		52,28	
30,76	27,8	59,52		51		48,76	
31,32	52,28	27,12		50,76		60,56	
43,6	31,96	64,84		55,16		47,04	
11,2		47,16		49,28		50,08	
26,64		52,44		33,48		29,2	
40,28		16,44		61,32		27,32	
40,32		47,88		36,92		36,92	
25,4		28,44		40,64		53,92	
51,12		40,44		22,72		33,68	
9,4		48,6		35,6		56,76	
23,8		48,88		43,04		56,64	
19,6		60,64		34,68		44,48	
23		45,72		30,36		48,88	
46,04		49,32		59,8		44,36	
52,92		54,8		22,12		61,52	
34,76		57,28		42,88		51,28	
51		63,48		53,12		34,92	
14,52		48,36		49,96		55,64	
51,08		50,44		51,4		42,2	
31,56		53,2		45,36		54,8	
49,12		27,28		21,08		26,16	
42,68		53,92		51,36		47,64	
36,72		41,04		49,8		35,36	
24,16		32		55,08		57,64	

III – C Noche Zona Central (continuación)

38.1		38.2		38.3		38.4	
38,04	48,76	11,28	16,36	57,96	50,04	36,52	30,72
42,16	20,88	29,36	42,36	61,92	17,8	45,2	13,24
46,92	52,2	48,88	36,36	38,84	53,96	59	43,48
44,2	17,4	38,28	38,52	22,08	54,92	42,44	51,36
40,96	60,76	27,68	42,64	46,52	47,56	56,12	10,4
42,16	49,6	48,84	48,36	60,76	31,88	21,8	44,92
48,4	49,2	32,24	14,6	51,96	9,48	46,46	49,2
26,16	33,16	57,24	46,68	51,92	51,36	22,28	31,68
43,32	40,12	48,84	61,04	27,52	53,56	43,84	38,16
35,2	23,6	41,48	14,16	47,88	25,32	43,84	15,6
25,72	23	29,48	30,04	10,92		43,68	31,68
59,56	35,4	18	31,88	17,88		55,88	47,92
49,24	16,24	35,64	45,76	10,6		28,88	17,88
37,72	54,36	47,22	44,44	29,04		26,6	39,16
50,36	20,44	51,2	25,6	10,56		54,6	55,76
66,36	46,4	44,2	43,16	50,76		51,28	37,28
36,8	36,64	43,2	26,08	55,68		18,2	13,44
16,64	41,24	43,96	22,76	51,96		42,4	36,48
51	37,32	24,28	12,28	59,44		47,08	27,32
47,96	26,4	34,64	21,16	41,08		25,28	45,2
70,64	36,6	54,84	47,22	26,36		45	46,46
35	28,36	47,04	34,64	50,16		31,92	
43,88	38,44	38,32		13,8		46,68	
40,4	44,2	49,28		52,96		31,44	
33,32		27,28		70,44		43,72	
22,68		42,4		46,28		55,64	
47,84		31,04		26,84		37,4	
50,44		41,52		32,6		30,4	
33,48		19,48		35,12		42,04	
38,96		44,8		53,2		46,92	
51,04		37,16		33,72		44,16	
30		47,96		37,32		49,64	
43,08		39,32		37,52		36,4	
48,84		40,08		19,68		54,92	
42,2		41		14,76		11	
22,96		47,64		42,56		51,36	
45,08		40,52		53,56		47,24	
28,6		47		38,76		40,64	
36,76		43,6		50		38,68	
27,32		34,72		52,16		48,88	
49,76		32,84		54,68		29,84	
40,16		35,36		77,08		27,88	
47		39,04		36,24		57,68	
38,44		27,56		45,12		40,88	
40,68		41,04		26,2		49,4	
20,56		36,2		72,52		40,44	
17,84		37,44		22,76		35,76	
36,24		44,32		57,24		61,96	

III – C Noche Zona Central (continuación)

39.1	40.1	40.2
52	18,32	43,96
26,36	51,2	56,28
29,76	54,72	41,68
47,96	49,84	46,12
51,16	32	44,2
57	19,44	47,44
38,68	17,52	58,16
31,96	35,56	50,72
30,88	44,48	28,88
52,08	15,12	61,6
33,28	49,08	41,8
45,8	52,68	26,12
45,84	44,24	36,6
46,24	41,68	62,52
44,48	52,48	48,6
58,68	56,36	34,44
46,12	45,32	39,16
51,36	54,2	54,52
46,76	44,4	27,88
42,88	41,56	35,72
56,16	31,36	39,44
40,56	30,68	54,64
44,92	42,08	41,76
42,6	41,32	48,04
39,28	37,24	
54,88	27,4	
41,6	45,32	
24,12	38,56	
46,92	39,36	
37,68	28,84	
53,52	28,52	
29,24	31	
50,28	24,84	
48,96		
50,24		
46,44		
44,16		
43,6		
31,72		
42,16		
51,32		
39,28		

III – D Noche Zona Periférica

31:1	31:2	31:3		31:4	
52,6	51,44	39,56	31,84	45,04	39,36
45,56	17,96	24,04	43,36	47,36	37,48
31,88	55,76	34,16	45,36	29,16	44,52
39,12	47,08	45,84	33,08	37,6	18,16
37,72	63,8	25,16		54,36	29,8
50,44	50,28	39,36		47,8	29,88
39,76	52,48	46,28		31,12	28,04
41,6	26,36	39,96		24,68	40,96
50,28	22,24	13,08		28,36	38,12
16,12	39,32	48,72		32,08	20,16
32,84	37,92	38,24		40,52	53,48
37,96	33,16	46,88		14	31,96
13,56	55,8	59,64		34,92	24,2
44,04	49,32	27,32		45,36	46,52
36,36	39,48	39,24		47,48	46,44
25,56	22,04	29,48		41,16	23,4
31,08	44,48	53		23,72	46,16
41,76	43,52	55,88		19,72	56,12
55,44	53,96	30,48		50,88	44,88
30,8	54,48	48,84		34,24	49,92
21,16	18,16	35,52		34,92	46,76
49,8	24,92	50,64		24,48	43,76
44,36	46,16	17,52		50,96	52,44
54,48	22,68	42,52		37,44	53,64
59,84	47,24	39,08		20,68	29,16
52,56	34,72	59,84		29,2	
11,56	44,84	50,76		62,56	
58,52	50,08	32,16		18,24	
23,64	32,92	23,2		28,2	
26,96	46,24	53,28		34,24	
33,6	47,4	50,8		37,32	
44,36	35,44	49,44		44,88	
34,56	32,96	50,76		54,32	
25,28	46,12	38,12		19,44	
33,28	37,08	47,88		12,68	
41,28	49,84	18,48		46,32	
32,92	31,32	43,4		26,76	
36,76	53,48	45,84		40,52	
38,52	32,64	33,28		50,04	
22,08	47,12	40,84		15,32	
39,72		45,16		50,32	
27,64		48,24		21,28	
23,16		33,08		18,64	
43,68		33,8		45,12	
33,82		25,48		46,28	
59,48		33,64		35,08	
42,88		45,84		23,56	
33,82		15,44		20,24	

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

32.1	32.2	32.3	32.4
33,2	39,44	31,68	8,72
42,16	44,52	34,36	28,28
41,2	26,12	38,48	22,2
26,52	38,24	13,88	58,4
41,84	55,04	41,72	11,48
27,96	48,12	26,72	46,72
41,2	40,48	29,6	48,08
25,52	15,12	37,64	27,92
39,12	23,96	19,44	6,72
36,52	33,6	20,88	16,48
26,32	19,84	26,96	11
42,12	44,4	6,16	31,32
34,32	45,2	11,52	30,04
33,24	23,84	22,12	33,2
42,72	19,24	43,2	27,68
42,2	37,12	29,24	35,12
38,8	39,8	20,52	54,92
36,76	13,04	36,04	43
28,88	40,56	28,92	29,6
27,16	42,64	33,48	38,32
20,24	38,4	39,76	29,6
44,08	51,8	16,52	31,52
25,8	46,6	20,44	30,04
29,72	44,68	37,24	16,4
43,24		27,92	52,16
23,96		39,04	39,8
38,16		37	33,16
34,08		23,84	35,4
50,12		27,04	20,64
47,92		37,4	12,52
7,76		11,76	43,68
55,24		12,68	43,04
35,32		31,6	34,16
35,92		38,4	26,32
53,2		14,64	34,28
46,24		11,04	8,92
21,24		12,4	56,16
45,44		28,64	41,4
45		31,92	27,56
43,52		31,84	31,72
13,44			47,6
			43,28
			25,36
			22,88
			40,92

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

33.1		33.2		33.3	33.4
35,6	45,32	49,52	50,04	53,56	43,84
58,44	11,56	39,8	45,64	23,76	17,44
54,88	31,36	32,28	45,04	26,12	48,08
53,24	44,4	32,88	28,52	48,36	38,28
39,2	44,16	20,52	39,6	34,12	38,2
34,44	44,24	19,48	48,88	49,8	44,72
30,44	25,8	39,2	39,64	45,52	24,48
32,52	48,24	35,76	18,24	39,32	33,08
53,48	62,08	40,04	24,8	45,24	44,92
16,44	60,72	57,92	41,8	39	38,92
53,72	35,32	49,64	44,2	27,84	27,52
48,8		38,04	45,64	49,28	48,92
35,32		18,08		38,2	19,24
6,76		54,08		40,6	41,56
42,48		38,88		44,4	52,32
54,56		21,76		53,04	46,68
51,56		42,92		51,64	46,8
18,08		22,52		53,62	33,52
47,64		36,48		29,4	42,32
16,32		54,44		39,44	26,76
55,4		17		31	44,92
48,48		45,32		20,8	30,56
53		15,28		50,84	45,08
43,88		31,72		52,84	44
34		21		50,32	33,04
45,76		9,52		49,8	25,44
48,64		32,6		34,96	50,36
42,48		57,24		26,92	48,92
42,56		40,48		50,72	40,68
49,96		60,8		53,56	39,2
20,76		42,88		25,8	44,48
58,84		20,44		64,2	26,8
17,16		46,28		49,96	45,76
31,88		45,12		54,68	44,72
50,04		42,84		50,4	49,24
41,6		47		45,16	48,36
37,56		64,28		33,56	30,08
46,84		38,76		25,4	47,64
45,2		11,16		53,62	22,68
53,68		17,84			43,44
29,28		43,52			39
45,96		50,48			
60,84		47,6			
30,92		30,2			
49,24		30,28			
47,88		46,04			
55,56		34,68			
50,4		40,16			

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

34.1		34.2		34.3		34.4	
24,8	50,84	38,56	48,08	39,32		52,44	37,56
42	48,04	25,44	47	98,72		46,2	53,84
23,2	36	23,16	49,52	42,24		23,52	32,64
54,4	32,24	49,04	37,08	39,8		43,12	37,76
24,92	31,78	25	53,68	61,88		29,56	13
42,12		39,24	43,56	28,24		46,2	61,68
36,68		53	20,76	45,56		24,84	40,92
64,96		43,28	37,96	46,96		36,04	33,84
34,4		40,56	45,14	43,04		50,28	43,84
44,12		40,12		34,92		35,92	35
36,8		57,84		44,24		49,76	38,36
30,56		37,44		61,16		44,36	56,56
25,8		40,48		35,2		51,24	
42,84		30,72		39,12		39,76	
23,64		44,68		52,8		48,04	
28,84		36,04		37,08		42,68	
32,96		49,56		49,52		27,36	
20,44		32,32		38,24		50,26	
36,52		9,48		32,16		41,44	
19,48		56,32		26,44		29,68	
33,52		59,12		48,32		61,48	
28,72		26,84		37,72		33,36	
40,6		46,6		39,6		30,56	
27,24		43,16		47,6		31,32	
33,92		45,64		35,52		53,76	
40,4		35,76		37,88		50,72	
45,64		26,4		43,84		25,4	
22,48		44,48		40,72		22,28	
30,96		31,4		54,4		26,96	
26,44		25,24		36,16		37,04	
31,78		20,4		20,28		62,96	
28,8		36,6		46,68		48,76	
19,48		45,04		23,96		40,76	
16,68		38,92		54,8		37,88	
44,6		46,44		51,92		45,36	
26,64		42,04		33,32		48,72	
42,76		38,2		26		21,68	
49,32		53,36		48,36		26,2	
44,52		44,04		45,16		37,88	
21,32		50,56		48,28		35,92	
41,68		45,14		41,48		56,56	
48,28		41,12		45,84		29,12	
22,4		38,64		34,6		31,64	
46,68		40,56		40,16		22,8	
50,2		44,04		49,88		52,52	
44,72		44,12		25,4		20,52	
42,6		32,16		40,92		41,76	
49,08		39,88		39,8		44,08	

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

35.1	35.2	35.3		35.4
57,84	17,32	24,64	45	30,48
50,16	27,84	6,32	40,12	36,2
30	46,92	53,6	15,04	34,4
30,52	52,6	53,24	27	42
22,92	35,8	21,8	31,84	29,36
47,08	47,52	43,16	25,32	54,04
47,2	48,04	41,68	42,04	45,28
18,84	31,48	21,56	46,52	26,96
46,32	33	50,76	37,56	27,36
40,12	25,56	43,24	50,84	28,28
47,36	28,8	40,96	50,36	40,68
29,44	20,68	47,84	51,68	55
44,36	34,28	37,08	29,28	58,68
25,04	22,64	45	49,08	38,84
29,28	53,32	22,6		39,8
49,8	67,76	46,88		37,6
39,36	23,6	45,28		24,92
38,56	22,36	42,36		22,76
37,72	37,92	47,48		17,56
56,8	45,76	59,44		29,96
22,92	34,44	41,04		45,4
26,28	34,6	37,16		48,88
32,36	29,2	48,96		31,12
56,84	29,24	35,68		41,84
54,28	36,96	17,48		38,32
49,56	45,08	48,92		42,88
31,56	27,4	31,08		40,92
40	37,24	31,8		44,84
24,6	34,16	39,36		58,28
50	33,96	47,2		53,2
41,64	65	48,24		17,72
54,08		49,08		42,52
39,88		41,16		45
55,64		39,4		35
27,2		42,28		47,52
23,4		33,24		33,06
39,76		45,56		68,44
31,96		55,84		33,28
38,12		45,44		46,8
57,48		53,76		37,52
47,16		43,56		42,88
44,08		37,96		37,52
33,2		11,96		49,56
38,48		33,96		33,06
39,52		18,76		
38		32,2		
40,16		24,52		
42		49,28		

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

36.1		36.2		36.3		36.4
6,84	19,08	33,3	31,4	51,24	38,92	51,68
43,72	40,08	40,16	46,84	24,72	41,92	37,84
40,6	33	31,32	35,64	35,68	12,16	35,32
36,2	36,92	35,32	47,16	42,2	23,56	38,76
8,08	45,3	40,28	61,8	30,52	27,64	43,04
20,52	12,36	13,8	32,92	47,76	40,28	57,92
41,16	32,6	36,2	19,04	43,72	37,12	30,72
40,32	40,04	40,72	43,88	21,84	38,68	31,24
14,92	34,84	33,6	50,92	18,48	43,6	42,04
18,8	40,08	29,64	42,04	22,96	13,64	37,86
26,76	43,24	25,04	22,92	49,72	22,28	35,04
10,36	12,2	40,16	33,3	40	20	28,76
29,72	40,36	16,6	33,19	35,92	22,28	29,36
39,08	46,56	30,36		41,92		18,52
30,12	38,48	51,64		17,8		29,56
17,68	23,36	30,56		36,4		8,12
18,04	34,92	32,2		41,08		38,56
42,44	21,84	21,24		38,12		17,84
25,28	38,24	46,76		38,32		16,4
27,48	53,24	45,88		23,2		28
40,84	23,2	46,8		30,52		24,96
35,08	33,84	43,2		35,28		30,2
43	49,84	27,76		38,24		40,8
30,8	45,3	60,08		54,48		38,16
28,76		56,2		35,88		44,2
35,04		15,88		55,28		33,48
26,32		42,04		44,52		39,44
65,24		43,28		22,84		23,8
22,48		39,96		28,6		40,4
43,2		39,32		43,88		43,24
49,72		44,24		44,52		36,56
32,28		49,48		51,92		37,28
16,24		12,48		47,2		40,36
36,6		57,84		40,2		34,08
38,76		34,96		37,2		19,96
46,12		21,92		25,56		12,4
8,64		28,76		22,36		32,16
44,2		22,12		40,32		21,8
23		53,64		45		19,16
36,72		23,44		27,68		44,48
23,8		40,56		33,24		38,12
22,32		45,56		39,84		51,04
29		29,88		40		37,86
19,84		20,84		23,44		
41,4		48,56		21,84		
49,56		23,36		14,72		
20,48		43,24		43,76		
32,16		33,04		13,16		

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

37.1		37.2	37.3	37.4
37,68	32,56	37,24	39,36	21,88
21,32	34,72	22,68	46,72	52,92
35,56	49,12	47,08	51,4	36,84
19,12	43,96	32,8	49,6	47,96
38,52	37,28	46,92	22,6	42,04
39,4	46,32	49	44,88	31,24
31,88	44,28	53,4	19,36	22,56
39,12	31,36	24,8	54,64	21,52
34	37,88	56,76	35,24	45
42,12	22,16	47,68	27,56	19,44
31,12	32,44	26,96	40,68	36,16
38,88		27,2	38,92	31
49,76		52,88	32,2	46,6
47,4		46,36	14,04	44,72
35,44		38,68	18,08	26,68
15,52		45,44	30,56	12,64
47,64		33,04	23,72	33,36
32,24		47,64	29,92	28,6
19,24		41,44	51,84	40,92
28		40,72	31,72	37,08
33,16		41,48	43,6	39,44
30,72		54,28	40,88	28,52
24,48		17,8	43,52	37
33,12		20,28	18,68	16,48
47,2		51,12	31,76	37,2
27,32		55,12	32,56	20,6
35,36		46,72	51,48	36,24
42,16		33,28	45,88	40,28
46,32		50,64	24,72	38,92
34,56		41	54,32	37,88
42,88		36,8	54,6	34,96
52,76		25,12	46,36	19,96
22,04		50,2	22,32	37,36
50,72		30	25,56	40,48
25,84		34,96	55,16	44,96
37,48		47,4	13,84	42,28
43,6		51,76	25,12	37,12
52,08		55,36	42,04	40,64
32,16			53,6	38,68
54,6			27,36	36,28
31,44			16,68	
47,68			25,12	
35,2				
32,16				
37				
34,64				
39,48				

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

38.1		38.2		38.3		38.4	
56,76	47,92	33,16	12,44	45	13,52	52,06	41,2
44,92	37,8	52,6	22,76	24,72	46,56	28,16	28,2
35,32	47,24	41,56	41	53,08	38,88	45,2	30,4
51,8	23,84	52,76	60,72	22,16	18,44	17,76	53,6
26,76	43,96	56,48	44,84	20,6		52,88	52,68
47,16	41,04	35,08	39,24	47,92		25,76	33,6
42,56	29,4	44,88	62,36	54,6		49,56	39,8
20	20,2	23,2	18,68	28,72		43,08	33,84
49,4		53,88	40,04	11,32		45,44	52,68
38,72		31,96	44,68	21,12		31,44	52,64
26,2		57,36	56,52	53,44		43,04	48,46
27,68		23,52	56,4	34,92		42,92	50,2
29,56		12,4	61,48	27,32		14,84	52,06
19,32		51,16	25,72	42,36		63,8	
42,16		46,88	35,12	45,08		28,72	
16,64		52,12	42,32	50,04		59,16	
47,04		42,04	50,94	12,28		32,48	
51,76		52,36		50,8		55,8	
34,12		49,56		31,12		45,96	
4,08		58		40,64		39,84	
42,76		56,88		40,08		43,68	
30,32		50,04		51,56		50,2	
17,84		33,56		46,88		33,88	
30,6		51,36		45,68		18,88	
34,24		39,12		25,08		55,44	
47		11,76		54,76		10,88	
39,92		38,52		35,28		49,12	
28,88		38,28		43,72		34,92	
40,8		50,94		18,08		37,32	
47,24		48,28		52,64		34,08	
56,4		31,08		61,84		42,96	
41,32		34,56		48,6		43,28	
13,8		54,16		59,2		42,08	
57,76		16,36		39,04		15,28	
50,12		45,16		21,24		39,52	
13,2		26,56		27,44		51,28	
39,4		26,56		24,68		26,6	
16,28		42,88		48,88		36,04	
43,2		42,4		34,44		57,92	
20,2		46,36		43,24		48,46	
46,16		62,32		51,32		52,64	
39,36		51,24		18,44		38,68	
41,72		34,2		50,68		44,4	
41,28		35,24		40,64		50,76	
46,28		18,64		29,4		37,2	
15,48		53,96		23,56		29,12	
48,92		54		51,8		44,44	
29,84		33,88		44,68		53,96	

III – D Noche Zona Periférica (continuación)

39.1		40.1	40.2
40,4	33,47	45,28	51
48,64		27,36	36,04
44,84		41,16	55,44
22,84		34,52	54,12
47,56		53,8	45,88
61,12		33,68	54,84
42,72		47,72	55,8
40,84		60,92	50
39,65		35,68	37,28
30,48		25,72	75,96
51,88		30,04	21,28
64,4		47,12	27,8
40,52		41,4	62,04
48,44		63,64	57,72
33,5		41,2	52,32
54,76		63,08	41,76
44,32		54,32	33,4
40,25		38,24	54,88
44,6		42,92	48,92
50,84		40,44	60,8
43,64		37,96	53,2
46,25		45,2	58,48
29,68		43,32	37,04
52,04		28,72	48,6
41,12		48,08	56,04
24,68		37,96	
51,44		29,16	
43,92		53,52	
57,12		45,12	
50,56			
37,32			
44,32			
37,72			
53,64			
28,96			
57,12			
50,16			
47,24			
51,92			
44,64			
42,48			
54,64			
47,16			
41			
50			
35,16			
24,08			
33,5			

TABLA IV

Datos de la Superficie de los Núcleos de Pinealocitos (μm^2)

Día Zona Central

Resultados Individuales

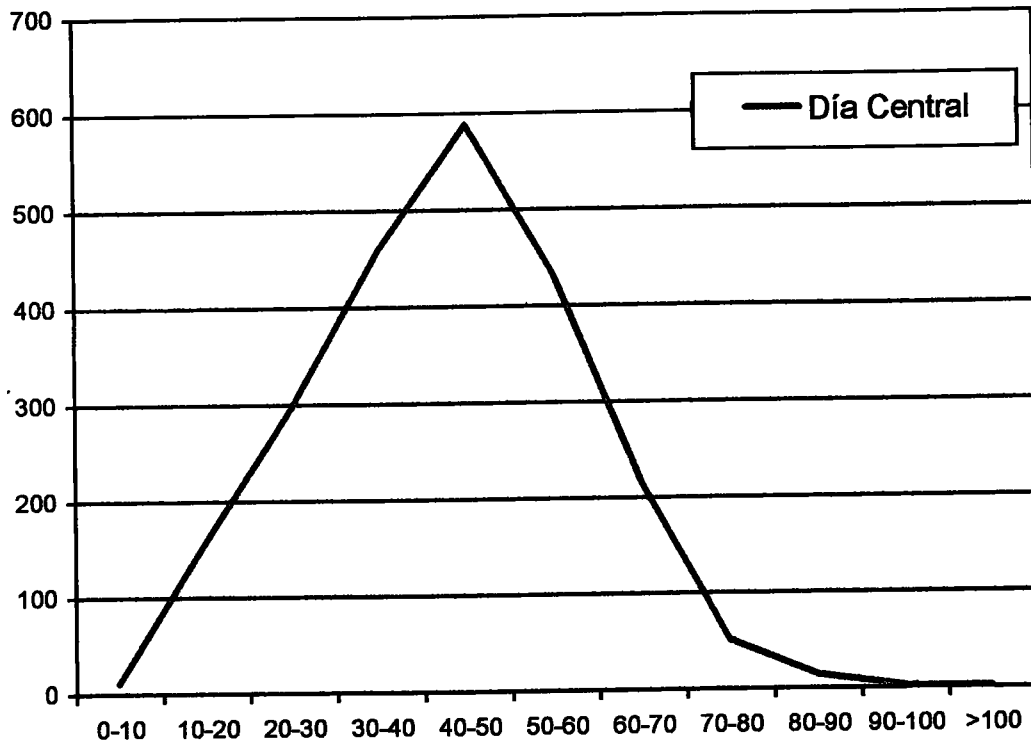
N°	n	Max	Min	Media	D. estándar
1	203	86'20	11'40	47'82	14'46
2	272	106'92	10'04	41'30	13'80
3	192	89'04	7'32	44'73	17'17
4	197	75'24	10'68	42'53	14'37
5	265	91'96	7'96	35'41	13'05
6	198	82'32	5'80	44'49	14'87
7	163	86'72	8'56	50'36	15'90
8	240	89'68	10'12	45'96	13'06
9	239	94'32	9'40	42'37	13'14
10	261	77'04	5'76	38'97	12'85

Resultados del Grupo

n	2230
Suma	95735,0900
Máximo	106,92
Mínimo	5,76
D. estándar	15,13181611
Mediana	43,68
Moda	38,56
Media	42,93

GRÁFICA Nº 1

Polígono de Frecuencias de las Superficies de los núcleos de pinealocitos de ovino sacrificados de día correspondientes a la zona central



Clases (µm ²)	Frecuencias
0 -10	11
10'1 - 20	158
20'1 - 30	297
30'1 - 40	460
40'1 - 50	588
50'1 - 60	432
60'1 - 70	216
70'1 - 80	51
80'1 - 90	14
90'1 - 100	2
>100	1
Totales	2.230

TABLA V

Datos de la Superficie de los Núcleos de Pinealocitos (μm^2)

Día Zona Periférica

Resultados Individuales

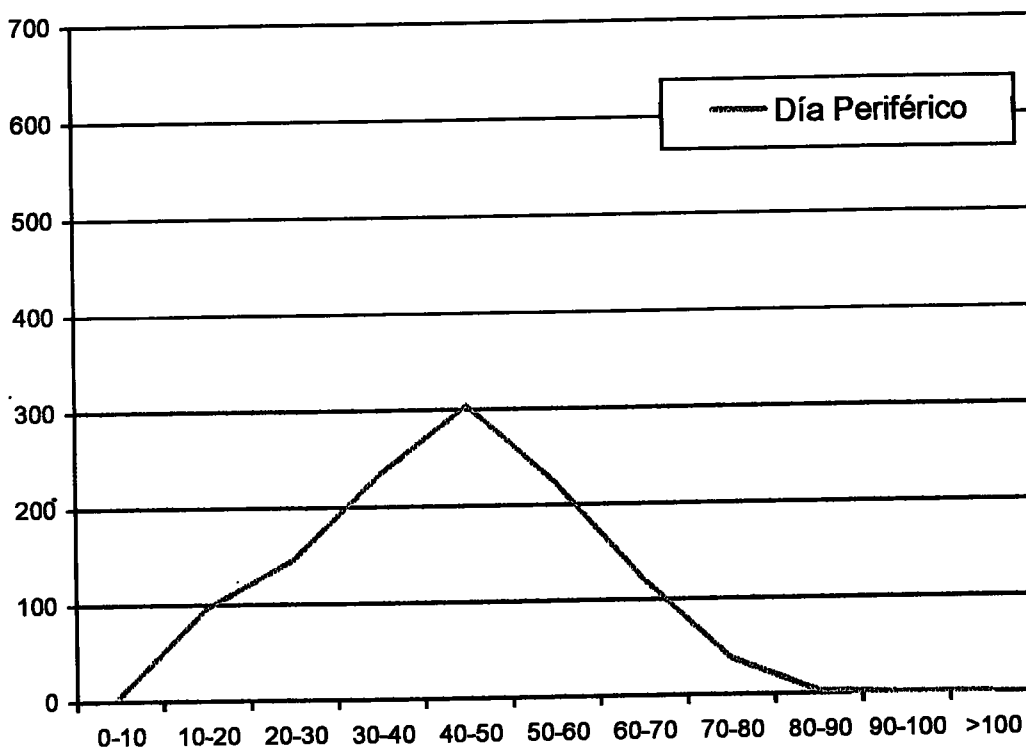
Nº	n	Max	Min	Media	D. estándar
1	148	77'4	8'92	47'08	14'61
2	109	71'12	8'96	42'6	13'7
3	108	87'68	10'64	48'57	14'65
4	124	88'12	14'92	49'53	16'46
5	151	62'96	12'40	40'04	11'49
6	142	79'08	10'36	39'43	14'01
7	64	78'36	14'30	43'57	11'27
8	140	80'48	8'72	45'40	15'27
9	96	77'12	11'6	47'52	14'58
10	90	59'52	12'64	38'18	10'83

Resultados del Grupo

n	1172
Suma	50368,82
Máximo	88,12
Mínimo	8,72
D. estándar	15,3238741
Mediana	43,8
Moda	65,88
Media	42,98

GRÁFICA N° 2

Polígono de Frecuencias de las Superficies de los núcleos de pinealocitos de ovino sacrificados de día correspondientes a la zona periférica



Clases (μm ²)	Frecuencias
0 -10	5
10'1 - 20	96
20'1 - 30	146
30'1 - 40	234
40'1 - 50	304
50'1 - 60	224
60'1 - 70	122
70'1 - 80	38
80'1 - 90	3
90'1 - 100	0
>100	0
Totales	1.172

TABLA VI

Datos de la Superficie de los Núcleos de Pinealocitos (μm^2)

Noche Zona Central

Resultados Individuales

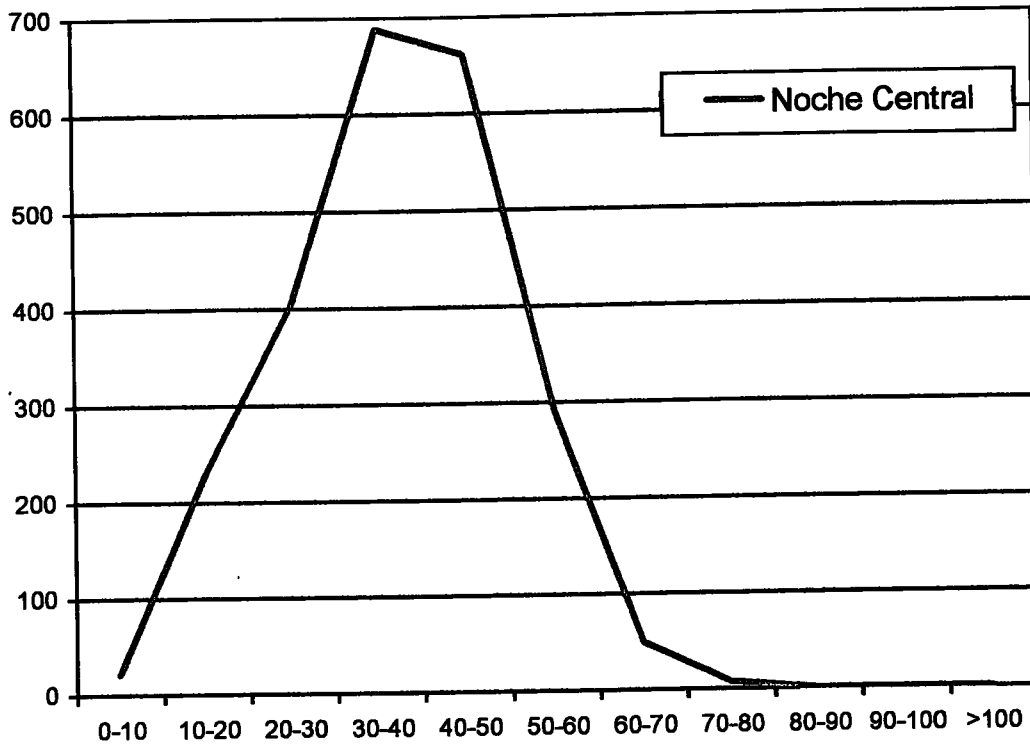
Nº	n	Max	Min	Media	D. estándar
31	248	79'76	6'68	42'61	11'64
32	361	61'80	5'12	31'87	11'23
33	276	69'56	7'64	42'06	12'14
34	257	55'88	10'84	33'16	9'85
35	311	62'72	6'80	33'26	10'23
36	290	63'84	11'56	36'48	11'08
37	242	71'40	9'40	42'62	12'94
38	269	77'08	9'48	39'20	13'07
39	42	58'68	24'12	43'78	8'60
40	57	62'52	15'12	41'46	10'94

Resultados del Grupo

n	2353
Suma	87472,54
Máximo	79,76
Mínimo	5,12
D. estándar	12,3969788
Mediana	37,76
Moda	43,6
Media	37,1749001

GRÁFICA Nº 3

Polígono de Frecuencias de las Superficies de los núcleos de pinealocitos de ovino sacrificados de noche correspondientes a la zona central



Clases (µm²)	Frecuencias
0 -10	21
10'1 - 20	230
20'1 - 30	404
30'1 - 40	688
40'1 - 50	661
50'1 - 60	293
60'1 - 70	49
70'1 - 80	7
80'1 - 90	0
90'1 - 100	0
>100	0
Totales	2.353

TABLA VII

Datos de la Superficie de los Núcleos de Pinealocitos (μm^2)

Noche Zona Periférica

Resultados Individuales

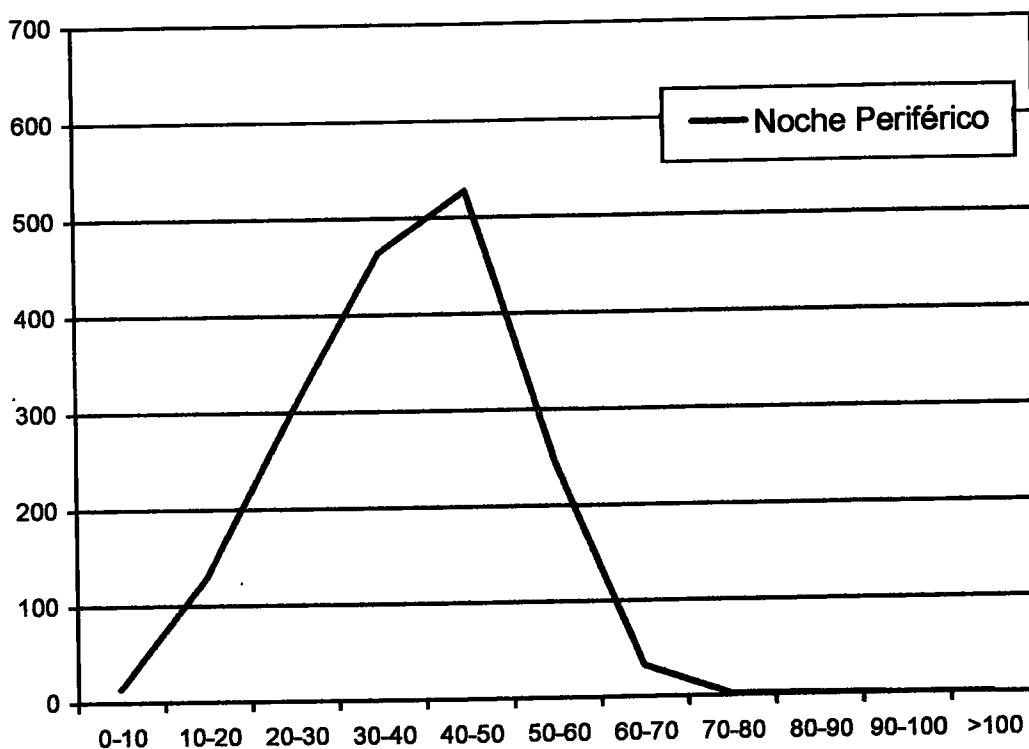
Nº	n	Max	Min	Media	D. estándar
31	213	63'80	11'56	38'58	11'76
32	150	58'40	6'16	32'79	11'36
33	199	64'28	6'76	40'24	11'63
34	218	98'72	9'48	39'42	11'13
35	185	68'44	6'32	38'69	11'39
36	237	65'24	6'84	34'09	11'41
37	178	56'76	12'64	36'40	10'57
38	234	63'80	4'08	39'22	12'95
39	49	64'40	22'84	43'83	9'44
40	54	75'96	21'28	45'95	11'15

Resultados del Grupo

n	1717
Suma	65229,59
Máximo	98,72
Mínimo	4,08
D. estándar	12,0571246
Mediana	39,2
Moda	42,04
Media	37,9904426

GRÁFICA Nº 4

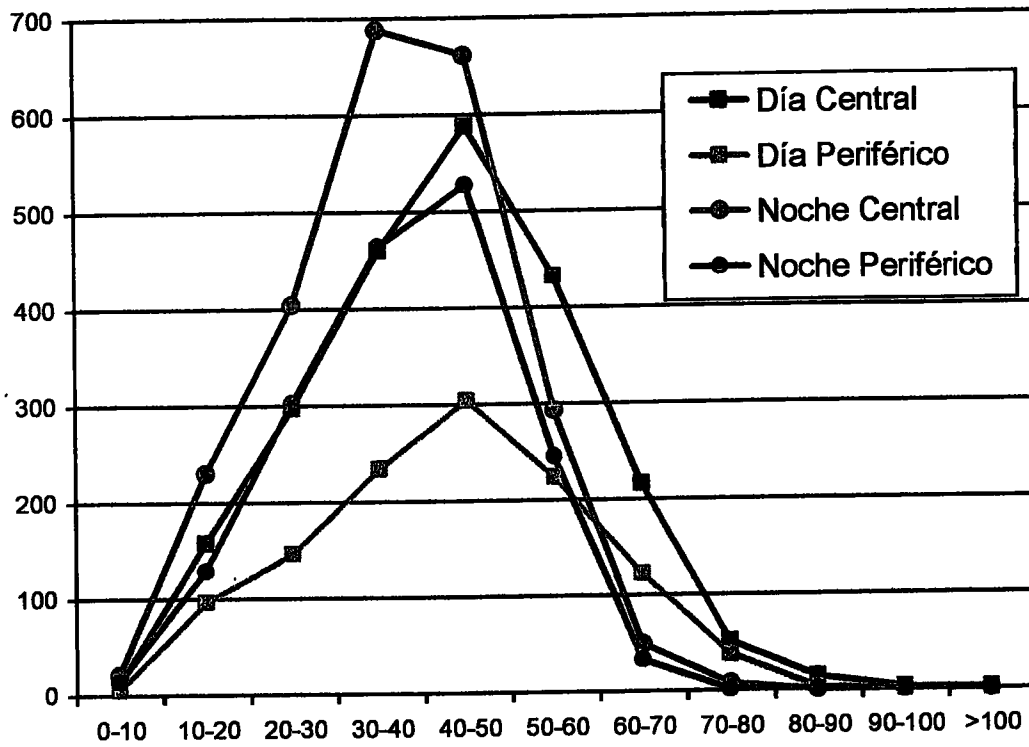
Polígono de Frecuencias de las Superficies de los núcleos de pinealocitos de ovino sacrificados de noche correspondientes a la zona periférica



Clases (µm ²)	Frecuencias
0 -10	14
10'1 - 20	129
20'1 - 30	303
30'1 - 40	464
40'1 - 50	527
50'1 - 60	245
60'1 - 70	33
70'1 - 80	1
80'1 - 90	1
90'1 - 100	0
>100	0
Totales	1.717

GRÁFICA Nº 5

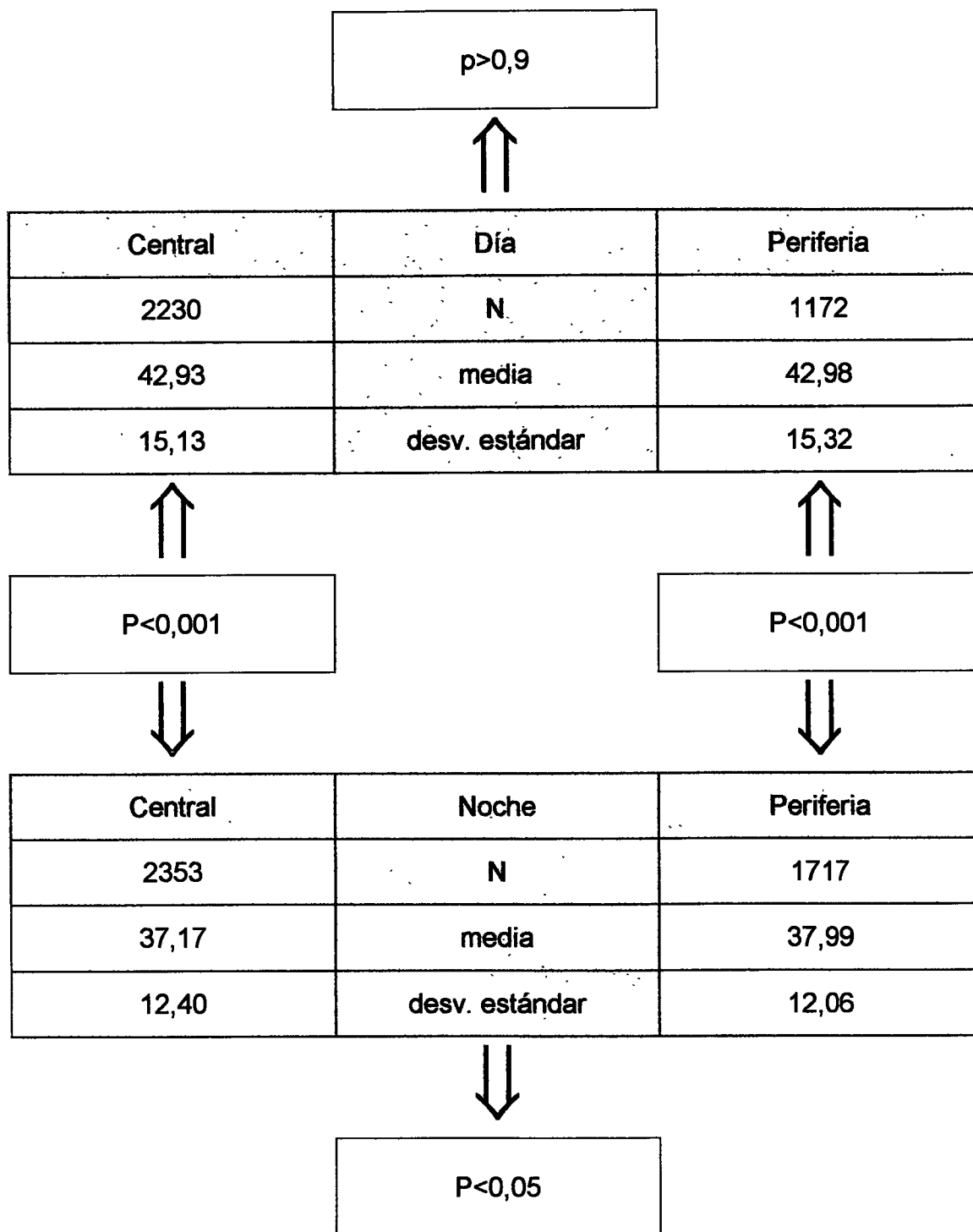
Polígonos de frecuencias de las superficies de los núcleos de pinealocitos de ovino correspondientes a los cuatro grupos estudiados



Clases (μm^2)	Frecuencias			
	Día		Noche	
	Central	Periférico	Central	Periférico
0 - 10	11	5	21	14
10'1 - 20	158	96	230	129
20'1 - 30	297	146	404	303
30'1 - 40	460	234	688	464
40'1 - 50	588	304	661	527
50'1 - 60	432	224	293	245
60'1 - 70	216	122	49	33
70'1 - 80	51	38	7	1
80'1 - 90	14	3	0	1
90'1 - 100	2	0	0	0
>100	1	0	0	0
Totales	2.230	1.172	2.353	1.717

TABLA VIII

Comparación de las medias de los tamaños de los núcleos en las distintas poblaciones mediante " t " de Student



4.4 ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La observación y estudio de las pineales ovinas con el microscopio electrónico, confirma la descripción general hecha con el microscopio óptico.

Hemos encontrado pineales con organizaciones compactas y uniformes coexistiendo con zonas en las que las células se agrupan formando trabéculas y otras en las que existen disposiciones de apariencia folicular. Esta disposición no es similar en todos los animales estudiados, sino que existen unas peculiaridades individuales. En cualquier caso sí que parece existir un cierto predominio de una de las formas de organización mencionadas y es la que a continuación pasamos a describir.

En la zona periférica la organización celular es más compacta que en la central, con células de citoplasma oscuro y núcleo con cromatina dispersa y condensaciones periféricas de la misma. En medio de estas células se observan numerosas prolongaciones protoplásmicas de color claro y mitocondrias muy densas, pertenecientes probablemente a astrocitos de tipo protoplasmático (Figs. 36 y 37).

Lo más significativo, desde el punto de vista morfológico, es sin duda la zona central del parénquima, donde la celularidad es mayor que en la periferia, los pinealocitos, más claros, se encuentran a su vez, más agrupados y se observa en el citoplasma de gran número de ellos una gran cavidad central en cuyo interior se aprecia el contenido de un material granular muy fino y disperso acompañado por gránulos muy densos y pequeños y en poca cantidad, situados próximos a borde celular que delimita la cavidad. Este material, es de aparente procedencia citoplásmica según se puede observar a mayor detalle en las figuras 38 y 39.

Es también de destacar la circunstancia de que en algunos de los bordes de estas cavidades, de morfología irregular se puede observar de manera aislada y ocasional la presencia de unas prolongaciones protoplasmáticas que sobresalen a modo de microvellosidades en la luz de la cavidad que describimos (Fig. 40). Estas cavidades son de diferentes tamaños, las más grandes son únicas y ocupan gran parte del citoplasma del pinealocito, en otros son más pequeñas y numerosas, encontrándose algunas dispersas por el citoplasma, pero en otras ocasiones están muy próximas unas a otras, siendo presumible que tiendan a agruparse y comunicarse para formar cavidades mayores (Fig. 41).

En la zona más periférica hemos podido apreciar la existencia de espacios intercelulares, similares a los descritos en otras especies, en cuyo interior se encuentra un material escaso y amorfo, granular y filiforme (Fig. 42).

La observación del resto del parénquima nos permite apreciar la presencia de largas prolongaciones protoplásmicas correspondientes a células gliales que discurren a lo largo del parénquima entre las prolongaciones del citoplasma de los pinealocitos (Fig. 43).

En el interior del citoplasma de los pinealocitos de la zona central es posible observar gran cantidad de mitocondrias e imágenes densas de diferentes morfologías, (Figs 44 y 45), algunas rodeadas de vesículas que corresponden a los cuerpos sinápticos, cuya cantidad y distribución describiremos en el apartado siguiente (Figs. 46, 47, 48 y 49).

En general se puede afirmar que la disposición morfológica entre las pineales ovinas obtenidas tanto en las horas diurnas como en las nocturnas, solo difiere en que en estas últimas la disposición es más compacta y con menos cavidades

intracitoplásmicas respecto a las descritas en las pineales pertenecientes a animales sacrificados durante el mediodía.

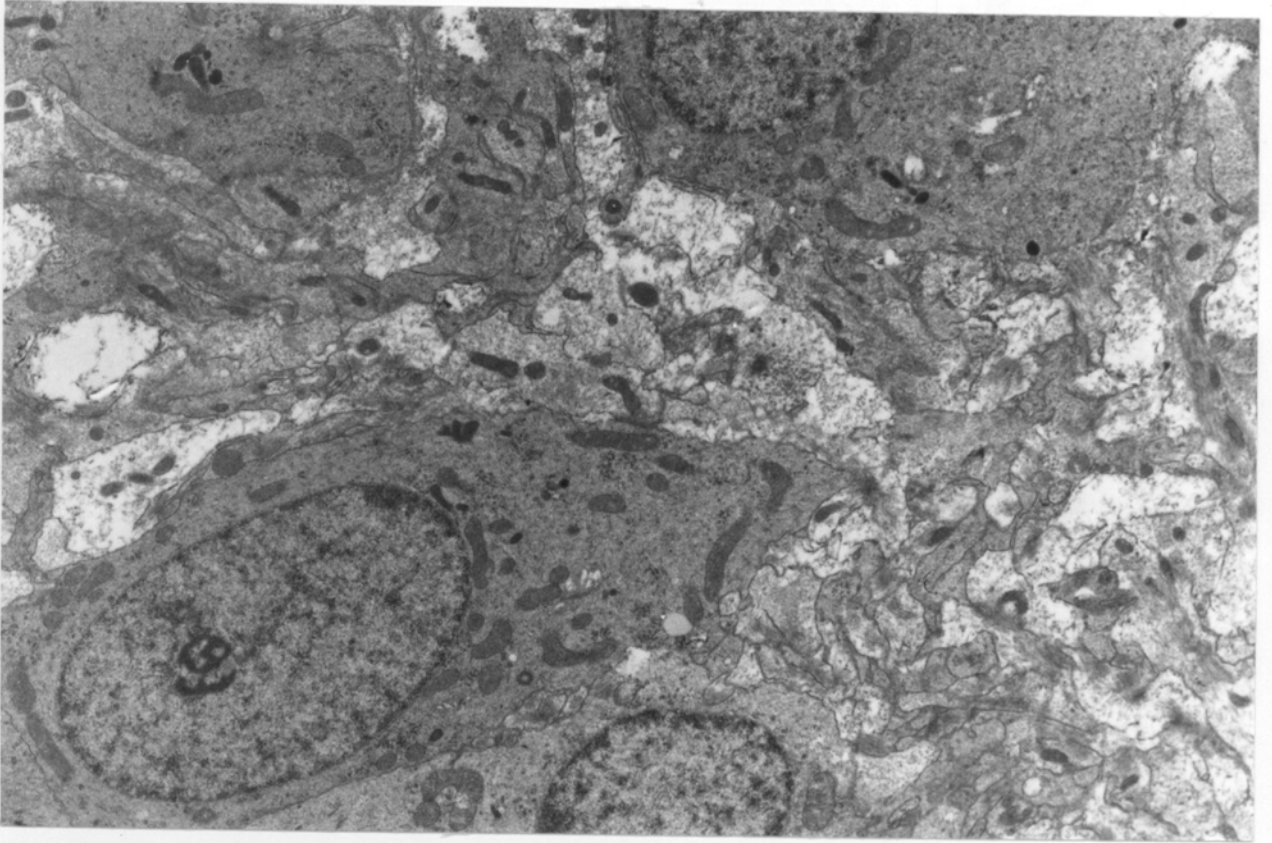


Fig.36.- Pinealocitos de la zona cortical. Aumentos del negativo 2950.

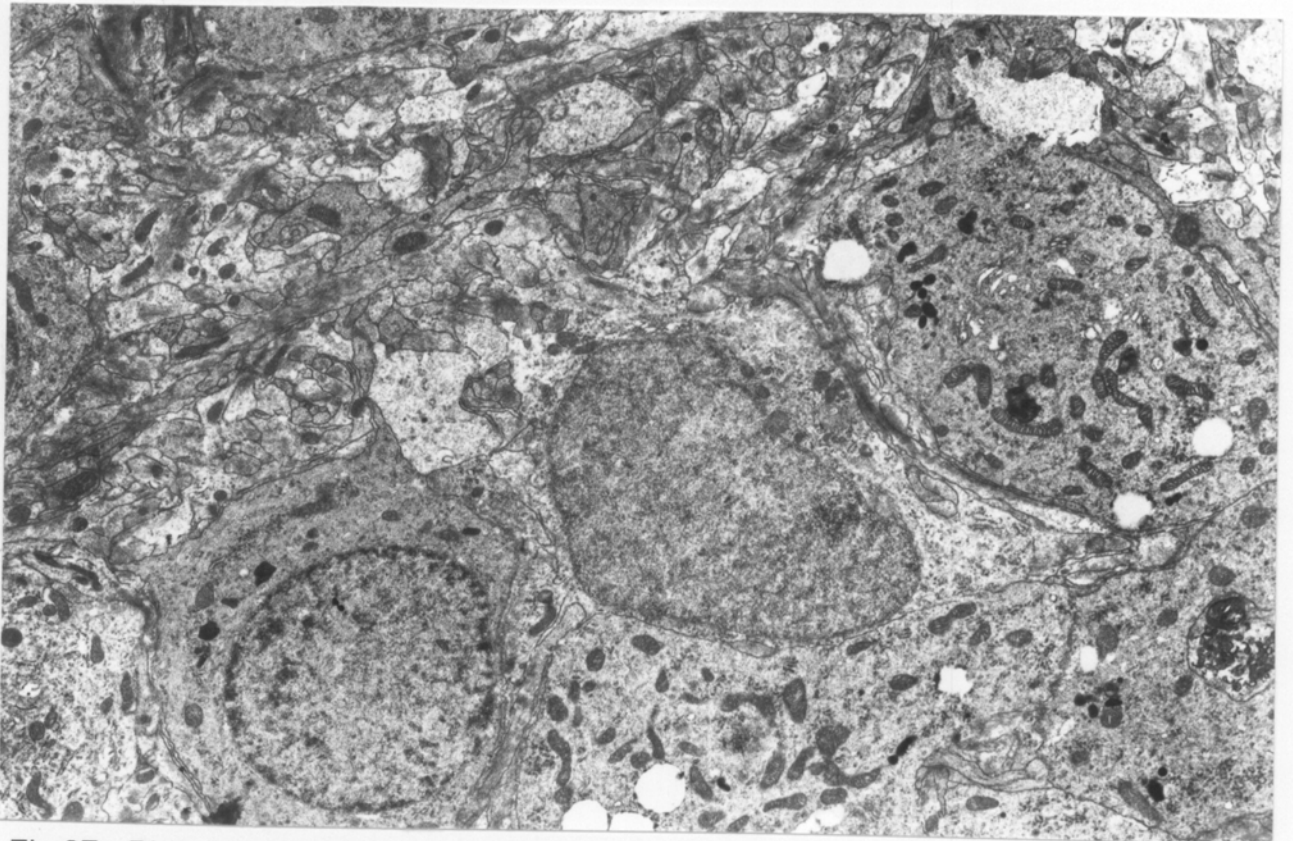


Fig.37.- Pinealocitos de la zona de transición entre cortical y medular. Aumentos del negativo 2950.

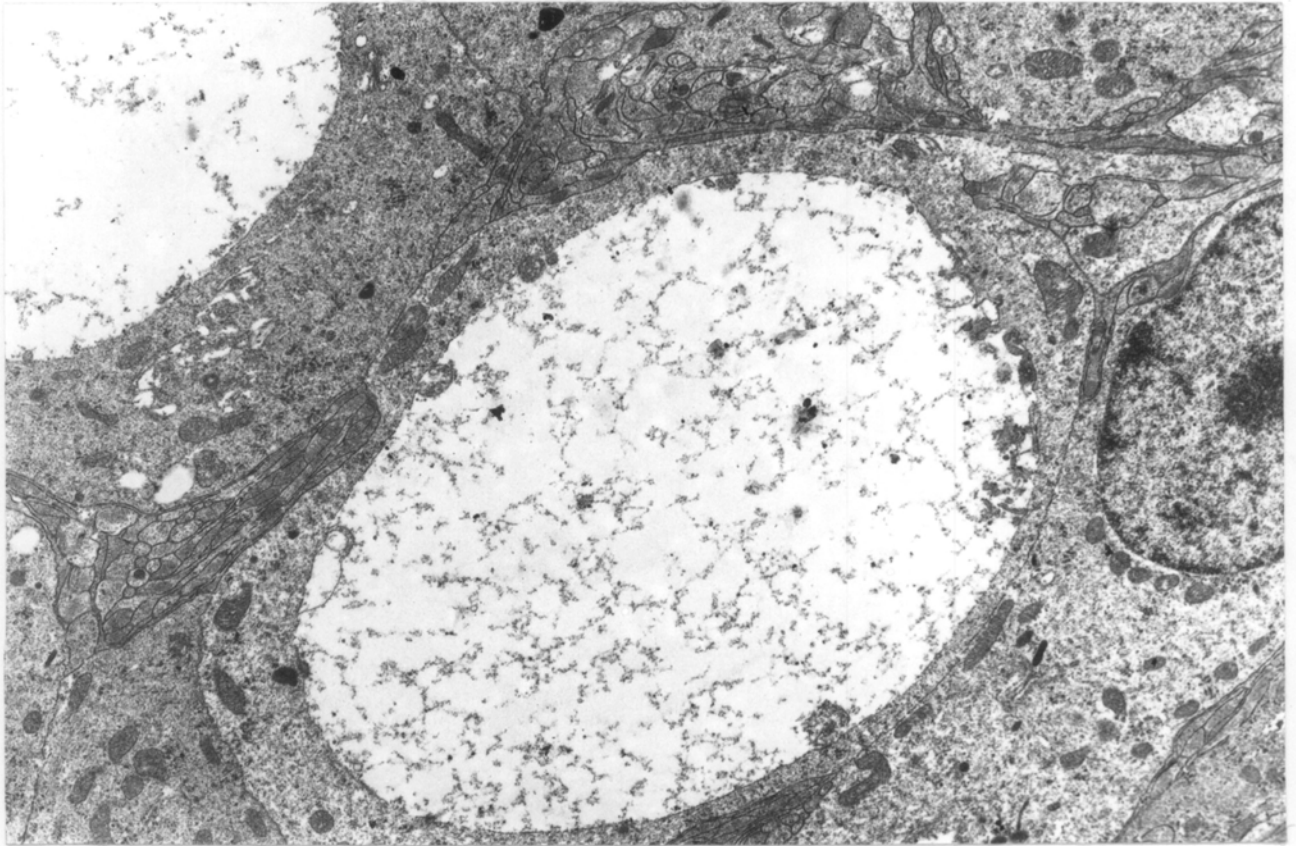


Fig.38.- Cavidad pinealocítica intracelular de la zona central. Aumentos del negativo 3900.

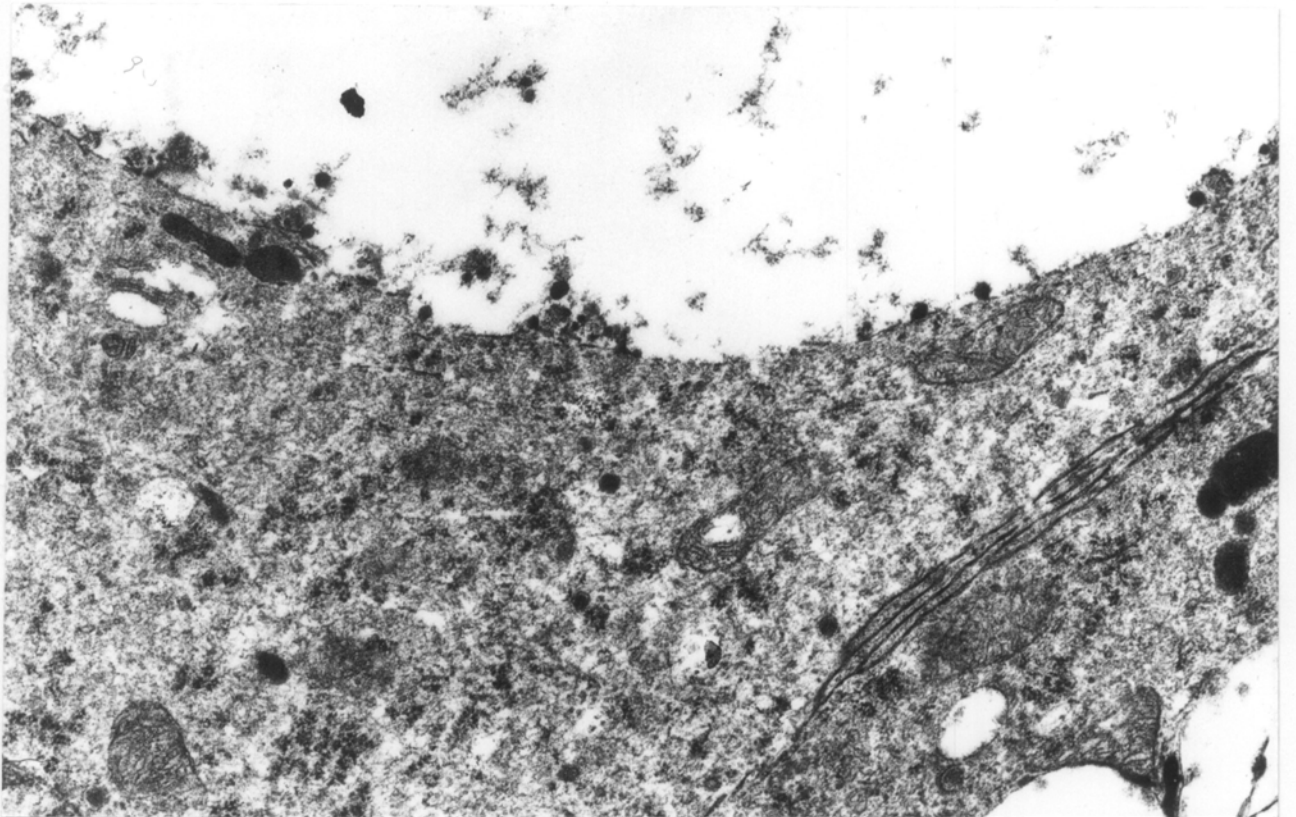


Fig.39.- Detalle del borde citoplásmico de una cavidad intracelular. Zona central. Aumentos del negativo 11500.

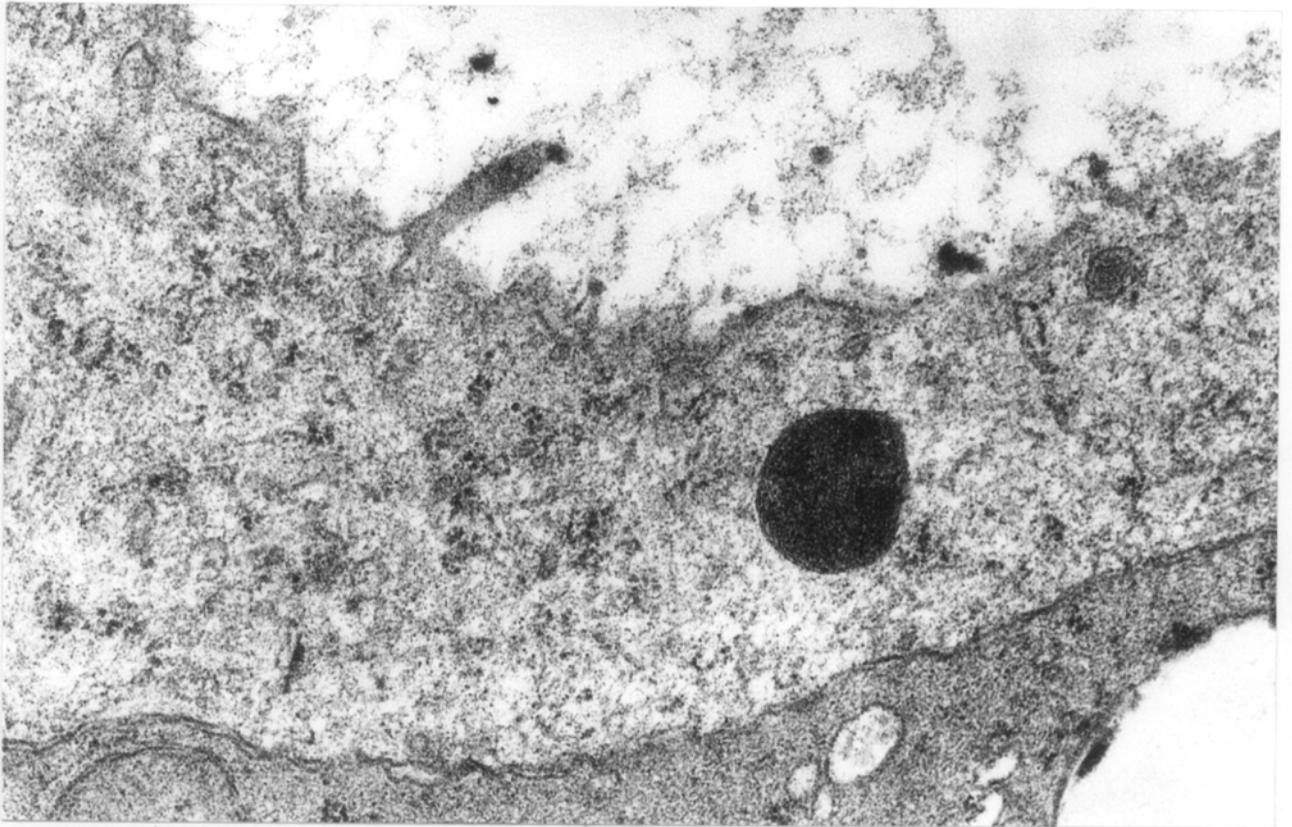


Fig.40.- Cavidad intracelular de la zona central mostrando detalle de una microvellosidad. Aumentos del negativo 21000.

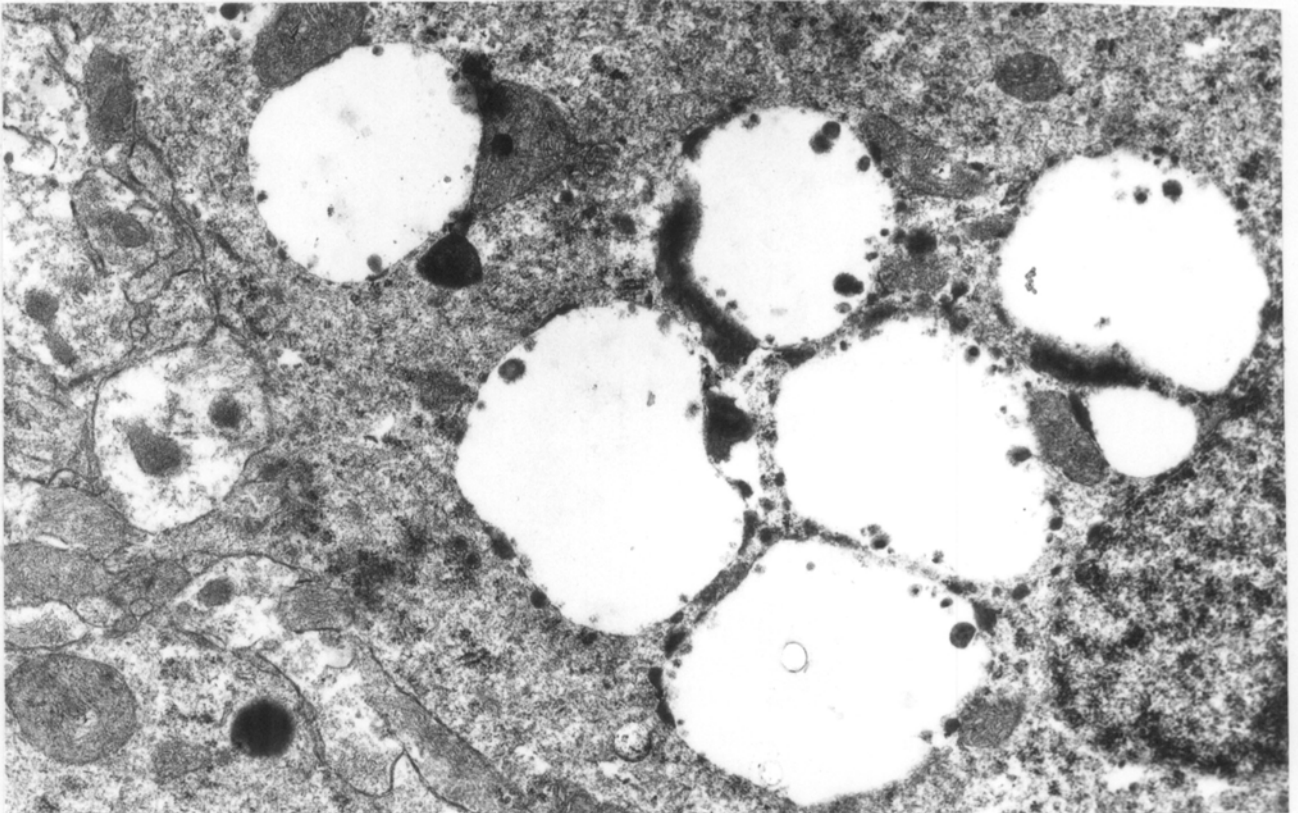


Fig.41.- Detalle de citoplasma del pinealocito mostrando la formación y agrupación de pequeñas cavidades. Aumentos del negativo 6610.



Fig.42.- Espacio intercelular. Zona periférica. Aumentos del negativo 11500.

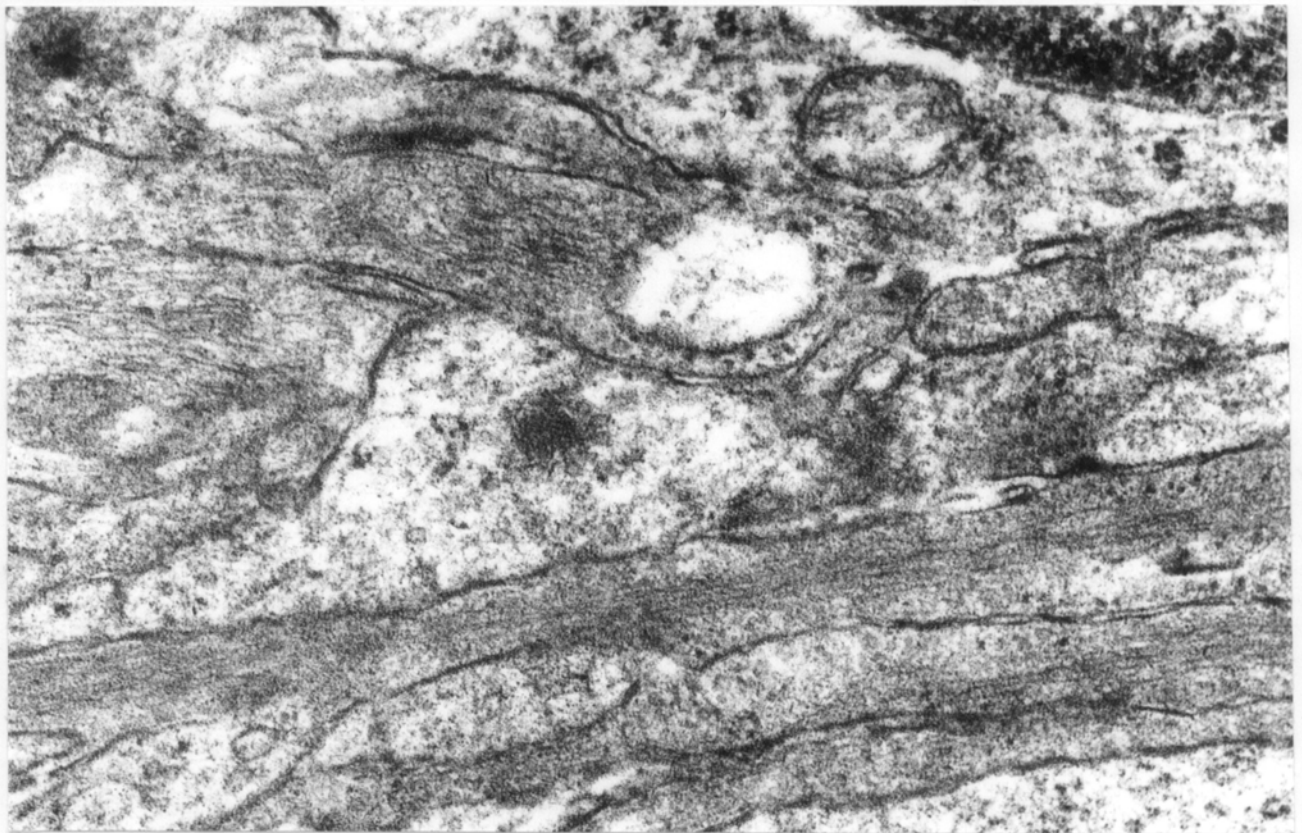


Fig.43.- Prolongaciones protoplasmáticas gliales y pinealocíticas. Cuerpo sináptico de forma intermedia cuadrangular. Aumentos del negativo 21000.

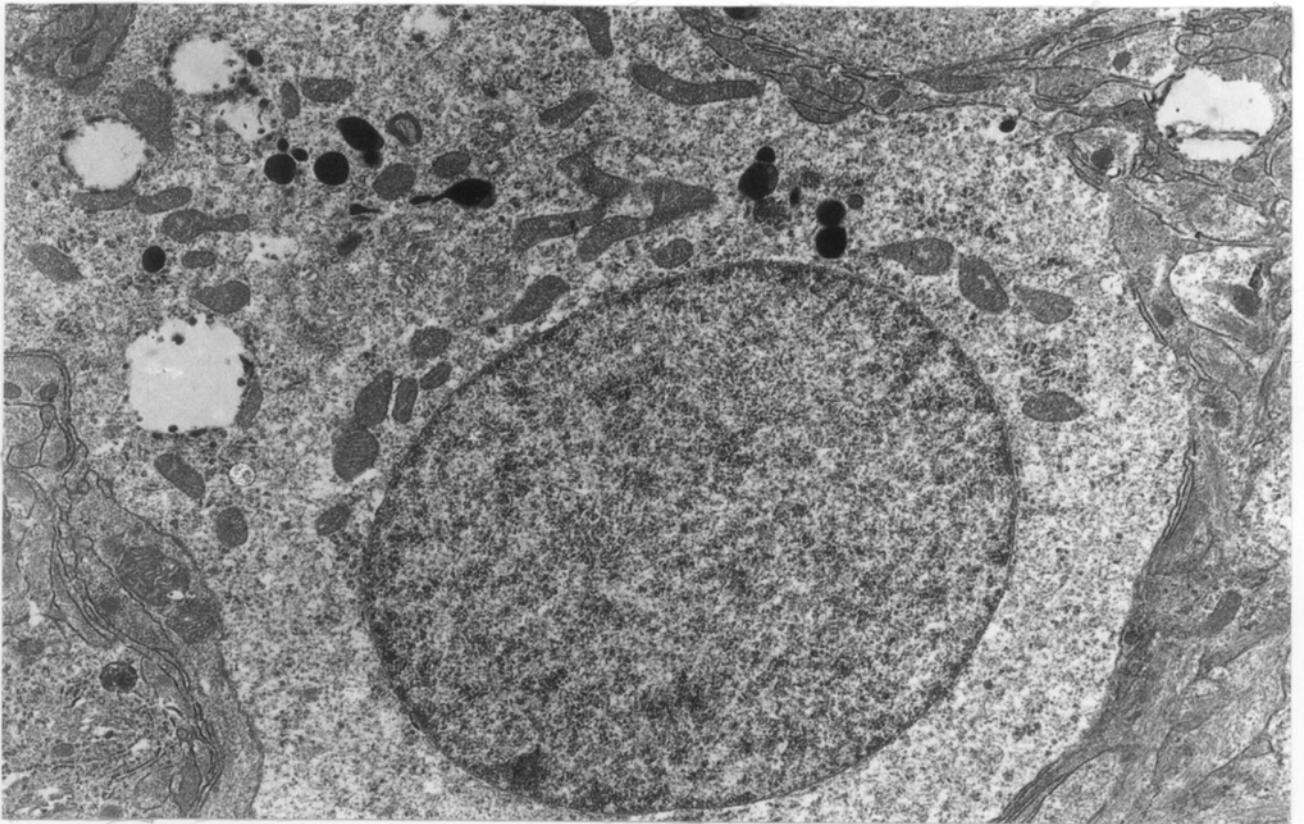


Fig.44.- Pinealocito claro. Zona central. Mitochondrias y cavidades intracelulares en formación. Aumentos del negativo 3900.

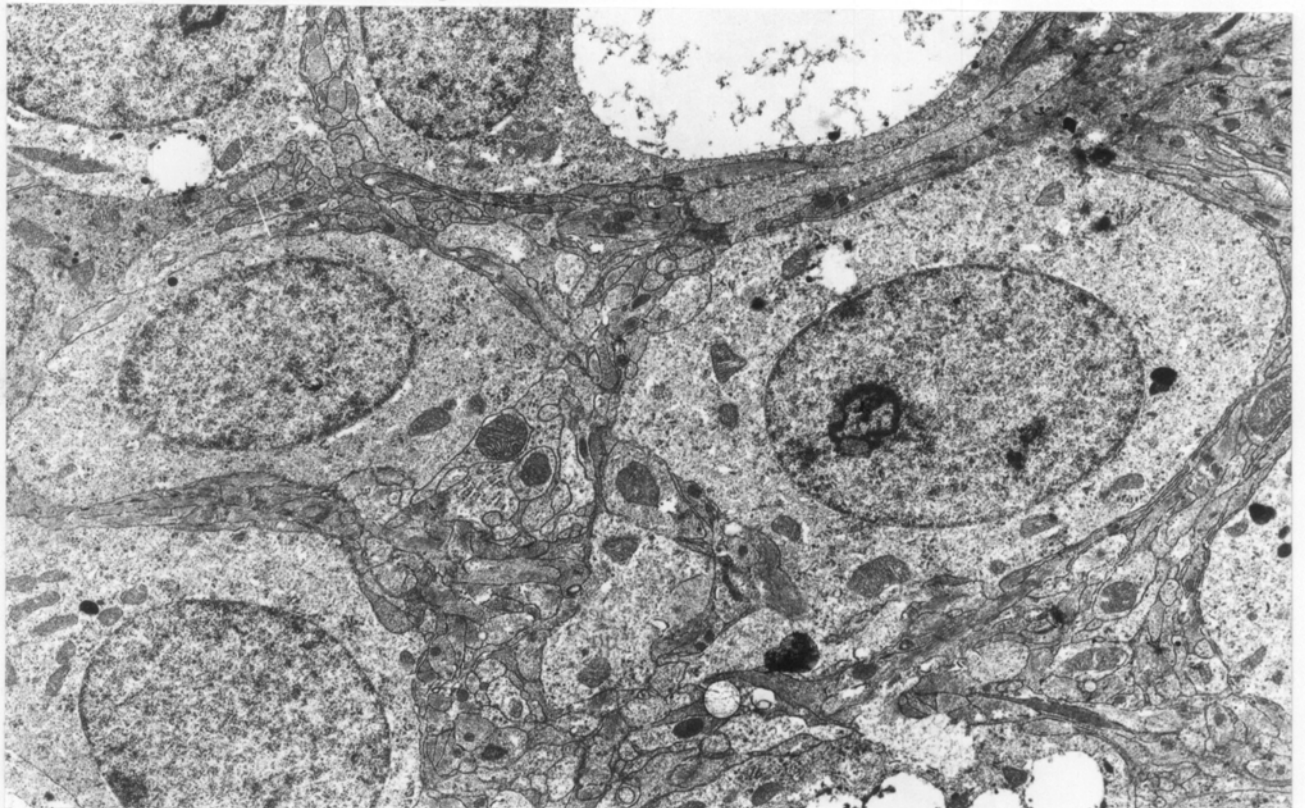


Fig.45.- Pinealocito, zona central. Mitochondrias. Aumentos del negativo 2950.

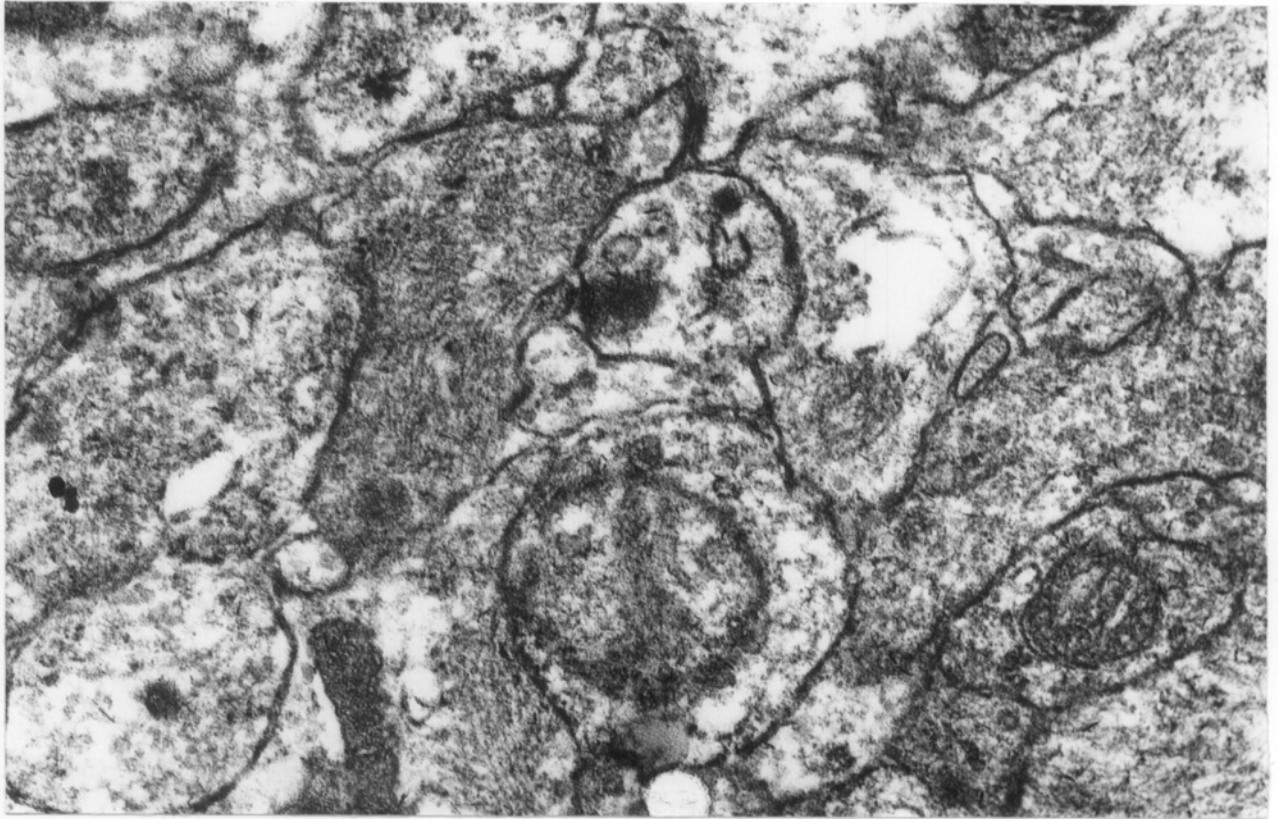


Fig.46.- Diferentes cuerpos sinápticos: esfera, cuerpo intermedio cuadrangular y cuerpo intermedio triangular. Aumentos del negativo 21000.



Fig.47.- Detalle de la anterior.

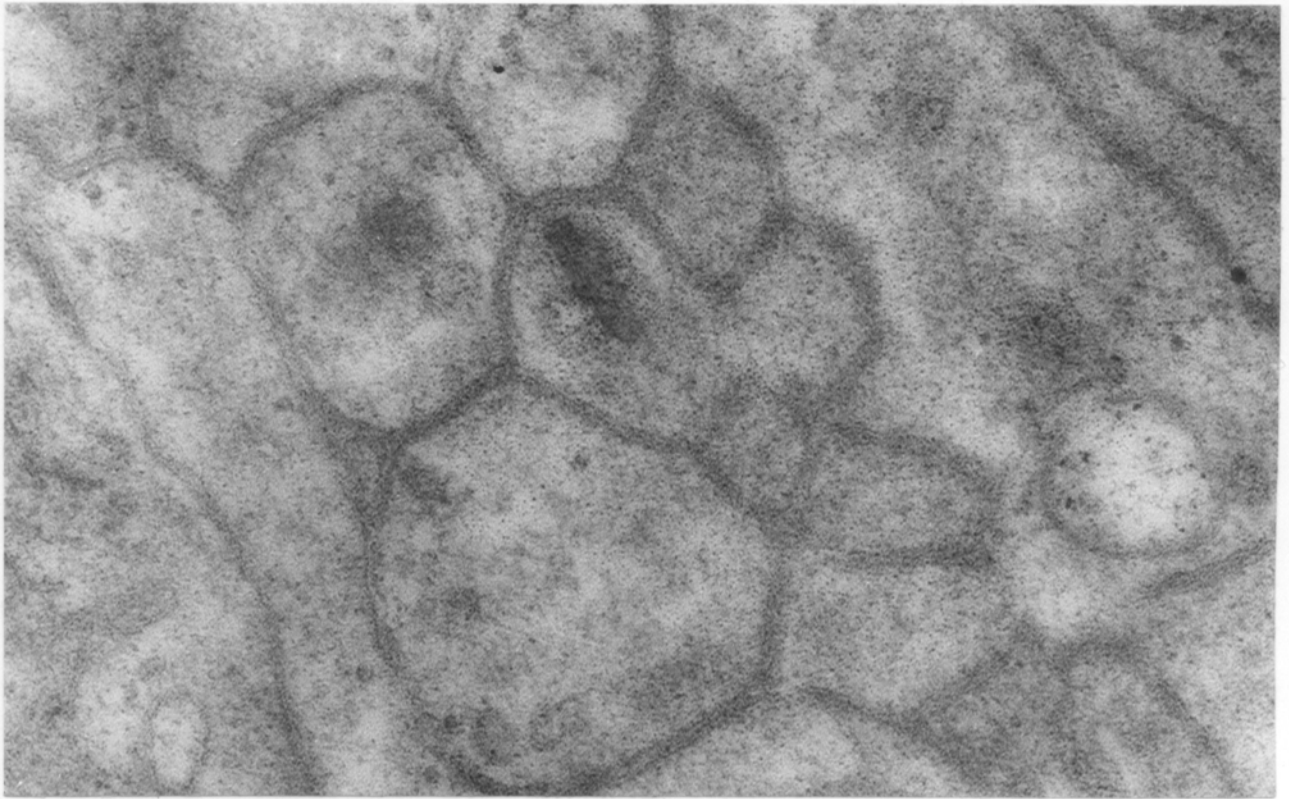


Fig.48.- Cinta sináptica. Aumentos del negativo 39000.

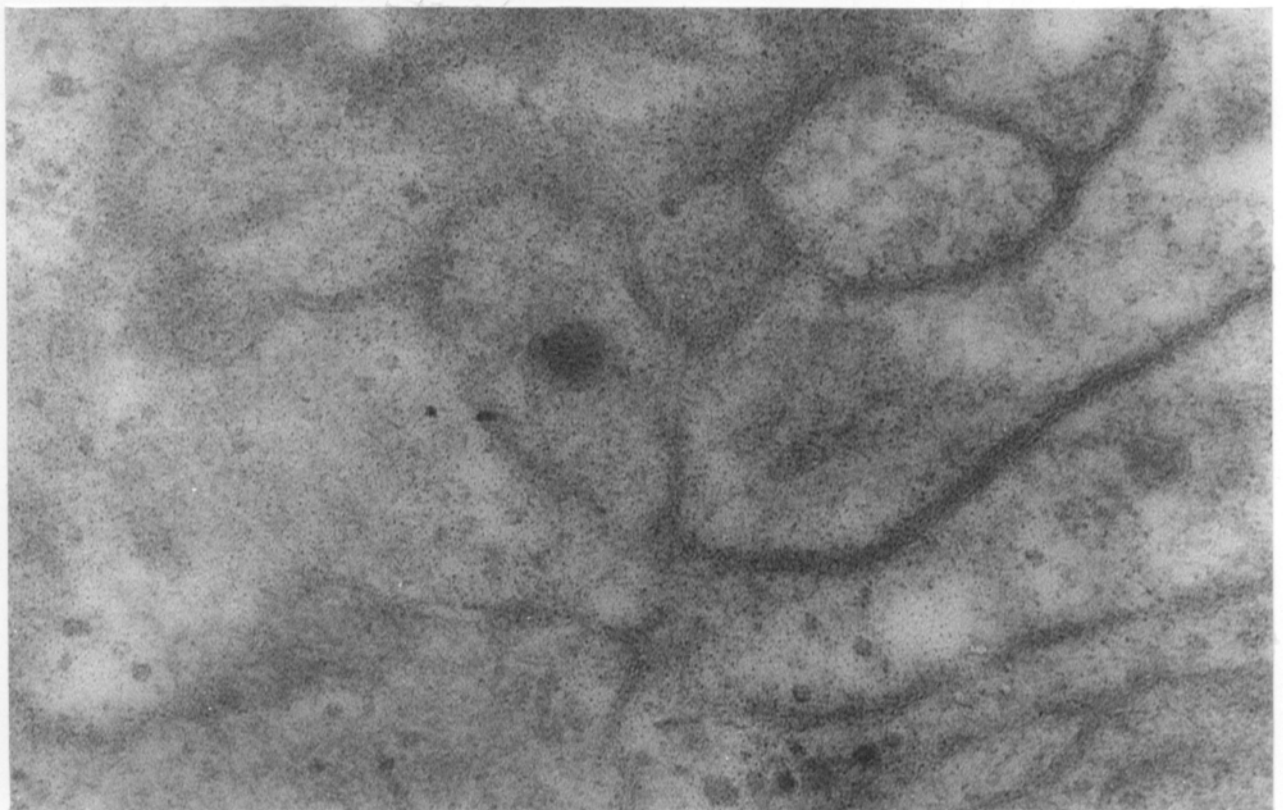


Fig.49.- Esfera sináptica. Aumentos del negativo 39000.

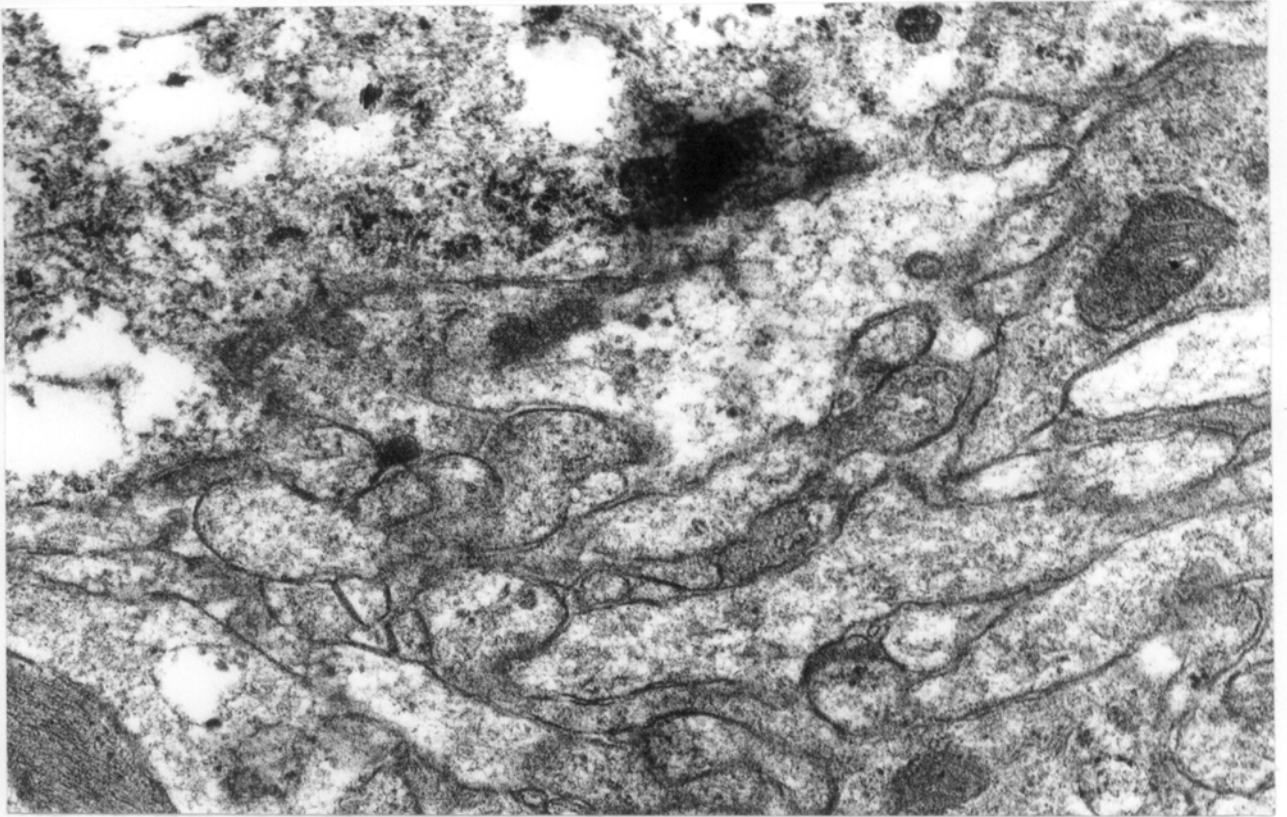


Fig.50.- Cuerpo sináptico intermedio cuadrangular. Aumentos del negativo 11500.

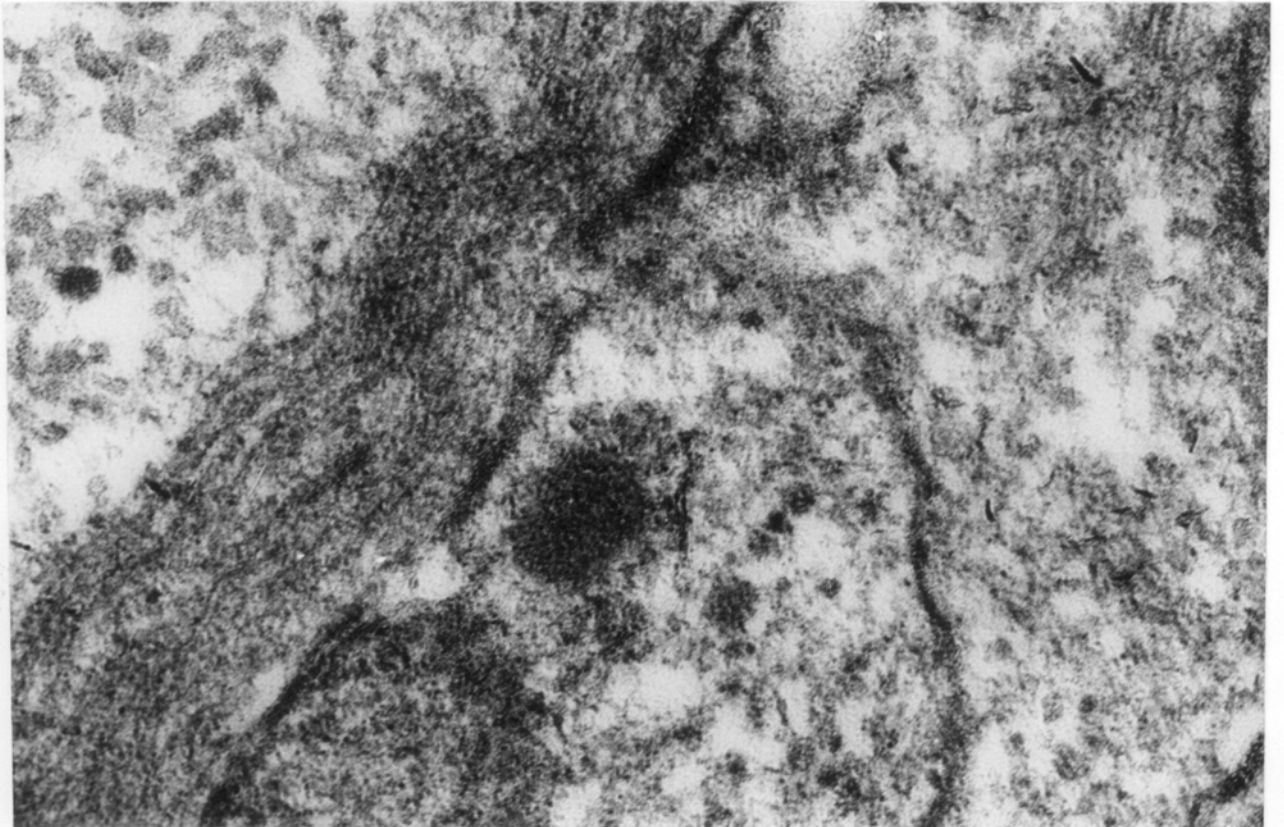


Fig.51.- Cuerpo sináptico intermedio cuadrangular. Aumentos del negativo 28500.

4.5 RECUENTO DE CUERPOS SINÁPTICOS.

En el Capítulo III ya indicamos que este estudio lo habíamos realizado examinando y contando el número de estas partículas sobre una superficie total de $450.000\mu\text{m}^2$. De cada grupo de animales (10 sacrificados de día y 10 de noche), verificamos el recuento sobre una superficie de $225.000\mu\text{m}^2$, lo que supone haber examinado por cada animal $22.500\mu\text{m}^2$.

En la superficie citada contamos un total de 323 cuerpos sinápticos, de los cuales 112 corresponden a la serie de animales sacrificados de día, mientras que en el lote de animales sacrificados de noche el recuento en la misma superficie alcanzó la cifra de 211. Ahora bien, como es norma en la bibliografía referir las cifras a una superficie de $20.000\mu\text{m}^2$, en las Tablas IX y X y en la Gráficas nº6-9, ya se especifica este dato, y en lo sucesivo las cifras quedarán referida a esta superficie convencional.

La Tabla IX y Gráficas nº6 y 9 se refieren la población de cuerpos sinápticos en la serie diurna. En ellas observamos que la cifra total encontrada en $20.000\mu\text{m}^2$ fue de $9'95$ cuerpos sinápticos, con una desviación estándar de $\pm 3'77$, de los cuales $3'11 \pm 1'69$ corresponden a cintas sinápticas, $3'29 \pm 1'51$ está representado por esferas sinápticas, mientras que la cifra de cuerpos intermedios hallados en dicha superficie fue de $3'55$, cuya expresión detallada corresponde $2'58 \pm 1'99$ a cuerpos intermedios triangulares, $0'97 \pm 1'35$ a cuerpos intermedios cuadrangulares y 0, es decir, ausencia total de cuerpos intermedios ovoideos.

La Tabla X y las Gráficas núms. 7 y 9, recogen la información de los cuerpos sinápticos contados en la serie de animales sacrificados de noche. En las mismas se evidencia que la cifra total de estas formaciones supone la cifra de $18'75$ con una

desviación típica de $\pm 3'83$. Esta cifra se distribuye en las siguientes clases: Cintas sinápticas, $1'6 \pm 0'82$; esferas sinápticas, $4'98 \pm 1'27$ y cuerpos intermedios $12'18$, de los que $4'09 \pm 1'27$ corresponden a cuerpos intermedios triangulares, $5'33 \pm 0'94$ a cuerpos intermedios cuadrangulares (Figs. 50 y 51) y $2'76 \pm 1'94$ a cuerpos intermedios ovoideos.

Un estudio comparativo entre los animales sacrificados de día y de noche está representado en las Gráficas nº9 y 10. En la primera y en forma de diagrama circular se representa la totalidad de cuerpos sinápticos (sin especificar los tipos o variedades) encontrados. Así en el grupo diurno la cifra es de $9'95 \pm 3'77$ cuerpos sinápticos / $20.000 \mu\text{m}^2$, mientras que en el grupo nocturno esta cifra es de $18'75 \pm 3'83$ cuerpos sinápticos en la misma unidad de superficie.

La Gráfica nº9 muestra de una manera detallada las variaciones de las distintas clases de cuerpos sinápticos en las dos series estudiadas (día y noche), así como la significación estadística que tienen estas diferencias, mediante el cálculo de la "t" de Student. Remitimos al lector a dicha gráfica y la tabla que figura al pie de la misma, donde aparecen las variaciones de las distintas clases de cuerpos sinápticos según el fotoperiodo considerado.

TABLA IX

Recuento de cuerpos sinápticos en pineales de ovino. Serie diurna.

**Cuerpos sinápticos hallados en una superficie real de 225.000 μm^2
(22.500 μm^2 por cada epífisis)**

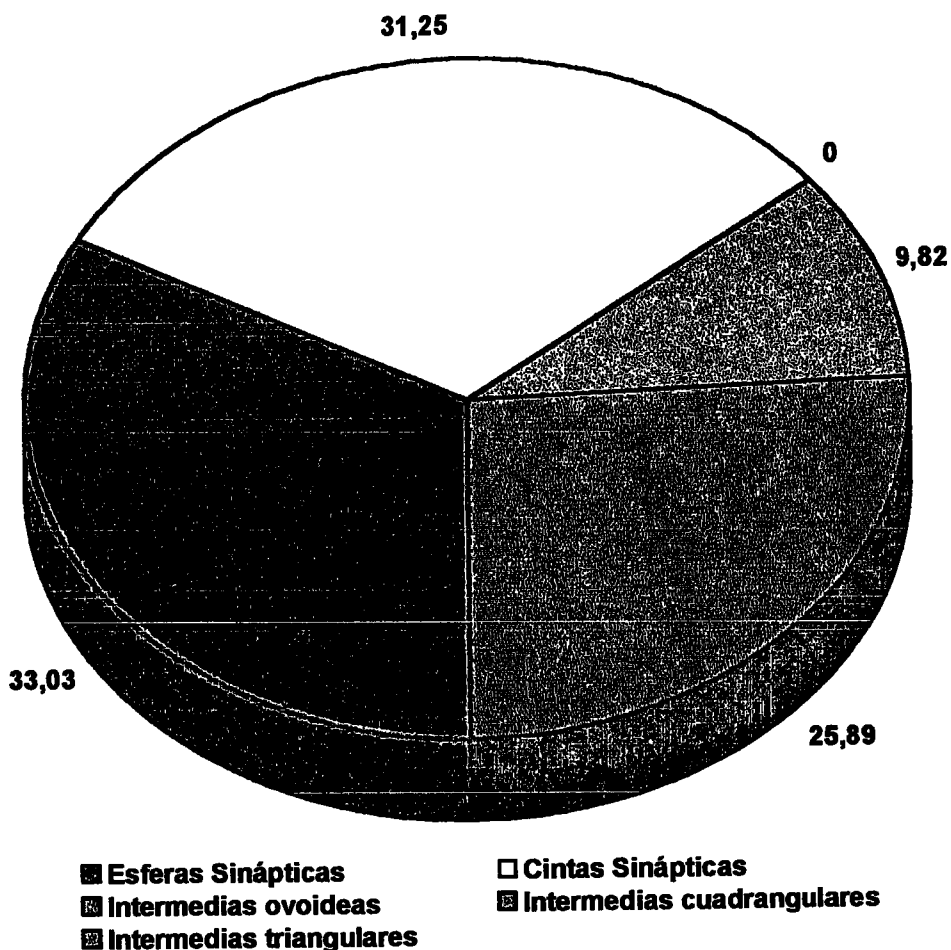
Nº de protocolo	Tipo de cuerpo sináptico					Total
	Cintas	Esferas	Intermedios			
			Triangulares	Cuadrangulares	Ovoideos	
1	4	3	0	0	0	7
2	3	3	3	0	0	9
3	4	1	8	1	0	14
4	7	5	2	1	0	15
5	6	4	4	5	0	19
6	3	4	3	0	0	10
7	1	3	1	2	0	7
8	1	5	3	0	0	9
9	3	2	1	1	0	7
10	3	7	4	1	0	15
Total	35	37	29	11	0	112
%	31'25	33'03	25'89	9'82	0	100

Cuerpos sinápticos referidos a una superficie de 20.000 μm^2 .

Nº de protocolo	Tipo de cuerpo sináptico					Total
	Cintas	Esferas	Intermedios			
			Triangulares	Cuadrangulares	Ovoideos	
1	3,56	2,67	0	0	0	6,23
2	2,67	2,67	2,67	0	0	8,01
3	3,56	0,88	7,11	0,88	0	12,43
4	6,22	4,44	1,78	0,88	0	13,32
5	5,33	3,56	3,56	4,44	0	16,89
6	2,67	3,56	2,67	0	0	8,9
7	0,88	2,67	0,88	1,78	0	6,21
8	0,88	4,44	2,67	0	0	7,99
9	2,67	1,78	0,88	0,88	0	6,21
10	2,67	6,22	3,56	0,88	0	13,33
media	3,11	3,29	2,58	0,97	0	9,95
Desv. est	1,69	1,51	1,99	1,35	0	3,77

GRÁFICA Nº 6

Diagrama representativo de la cantidad de cuerpos sinápticos por unidad de superficie (20.000 μm^2). Serie diurna.
(cifras absolutas y relativas)



Cuerpo sináptico		Nº (referido a 20.000 μm^2)	Porcentaje
Cintas Sinápticas		3'11	31'25
Esferas Sinápticas		3'29	33'03
Intermedios	Triangulares	2'58	25'89
	Cuadrangulares	0'97	9'82
	Ovoideos	0	0
Total		9'95	100

TABLA X

Recuento de cuerpos sinápticos en pineales de ovino. Serie nocturna.

**Cuerpos sinápticos hallados en una superficie real de 225.000 μm^2
(22.500 μm^2 por cada epífisis)**

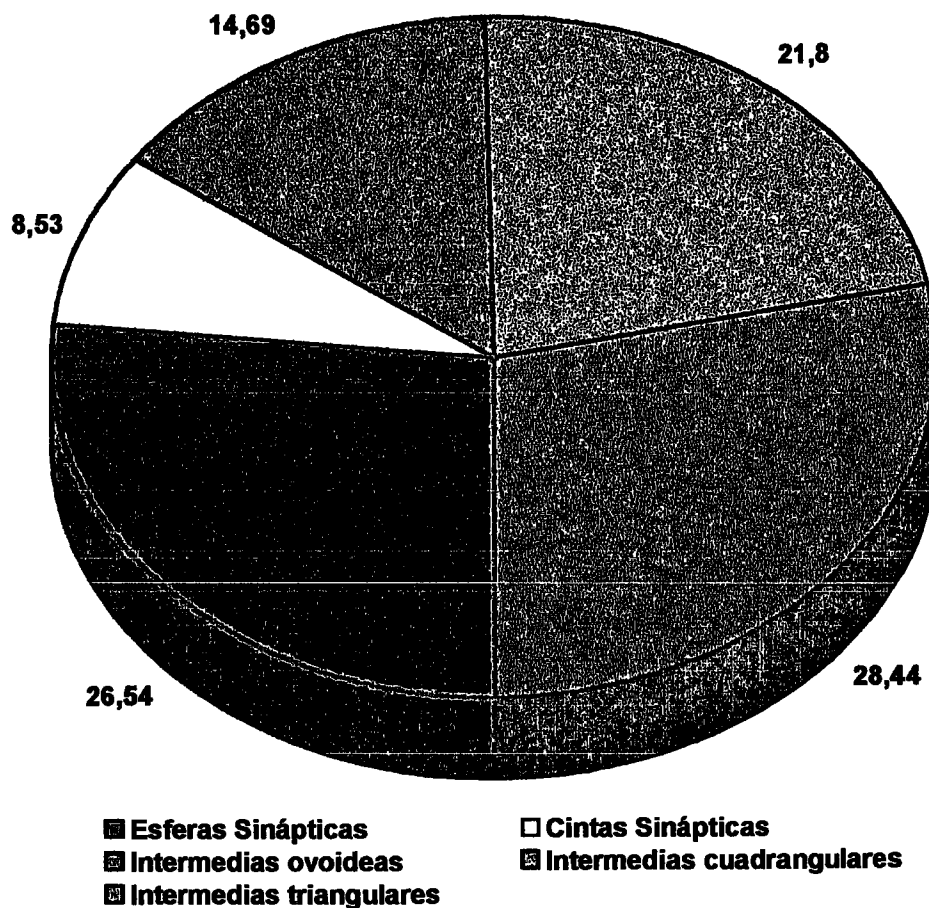
Nº de protocolo	Tipo de cuerpo sináptico					Total
	Cintas	Esferas	Intermedios			
			Triangulares	Cuadrangulares	Ovoideos	
1	2	8	4	8	7	29
2	1	6	5	5	3	20
3	0	7	3	7	2	19
4	2	5	7	6	4	24
5	2	6	4	6	0	18
6	3	6	3	5	1	18
7	1	3	4	6	2	16
8	2	4	7	5	4	22
9	2	5	4	5	2	18
10	3	6	5	7	6	27
Total	18	56	46	60	31	211
%	8,53	26,54	21,80	28,44	14,69	100

Cuerpos sinápticos referidos a una superficie de 20.000 μm^2 .

Nº de protocolo	Tipo de cuerpo sináptico					Total
	Cintas	Esferas	Intermedios			
			Triangulares	Cuadrangulares	Ovoideos	
1	1,78	7,11	3,56	7,11	6,22	25,78
2	0,88	5,33	4,44	4,44	2,67	17,76
3	0	6,22	2,67	6,22	1,78	16,89
4	1,78	4,44	6,22	5,33	3,56	21,33
5	1,78	5,33	3,56	5,33	0	16
6	2,67	5,33	2,67	4,44	0,88	15,99
7	0,88	2,67	3,56	5,33	1,78	14,22
8	1,78	3,56	6,22	4,44	3,56	19,56
9	1,78	4,44	3,56	4,44	1,78	16
10	2,67	5,33	4,44	6,22	5,33	23,99
media	1,6	4,98	4,09	5,33	2,76	18,75
Desv. est.	0,82	1,27	1,27	0,94	1,94	3,83

GRÁFICA N° 7

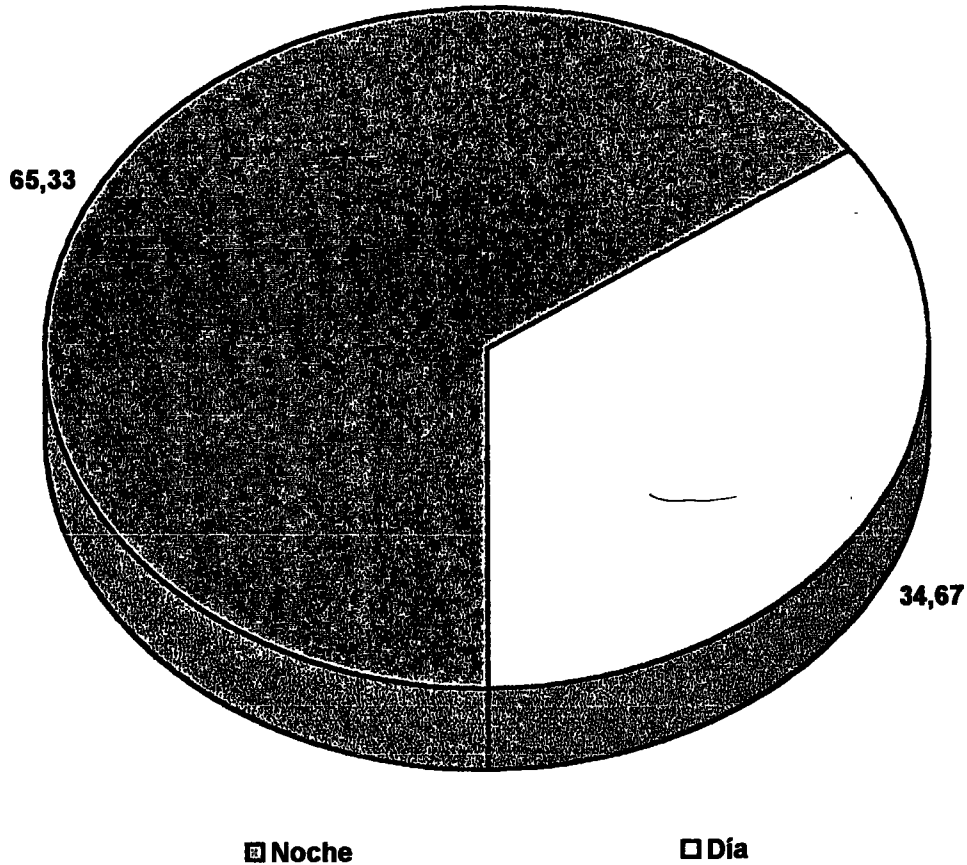
Diagrama representativo de la cantidad de cuerpos sinápticos por unidad de superficie (20.000 μm^2). Serie nocturna.
(cifras absolutas y relativas)



Cuerpo sináptico		N° (referido a 20.000 μm^2)	Porcentaje
Cintas Sinápticas		1'6	8'53
Esferas Sinápticas		4'98	26'54
Intermedios	Triangulares	4,09	21'80
	Cuadrangulares	5,33	28'44
	Ovoideos	2'76	14'69
Total		18'75	100

GRÁFICA N° 8

Diagrama comparativo de la suma total de cuerpos sinápticos por unidad de superficie (20.000 μm^2). Series diurna y nocturna. (cifras absolutas y relativas)



Fotofase	Nº absoluto (referido a 20.000 μm^2)	Porcentaje
Día	9'95	34,67
Noche	18,75	65,33
P < 0.05		

GRÁFICA Nº 9

Diagrama comparativo de los distintas clases de cuerpos sinápticos por unidad de superficie (20.000 μm^2). Series diurna y nocturna

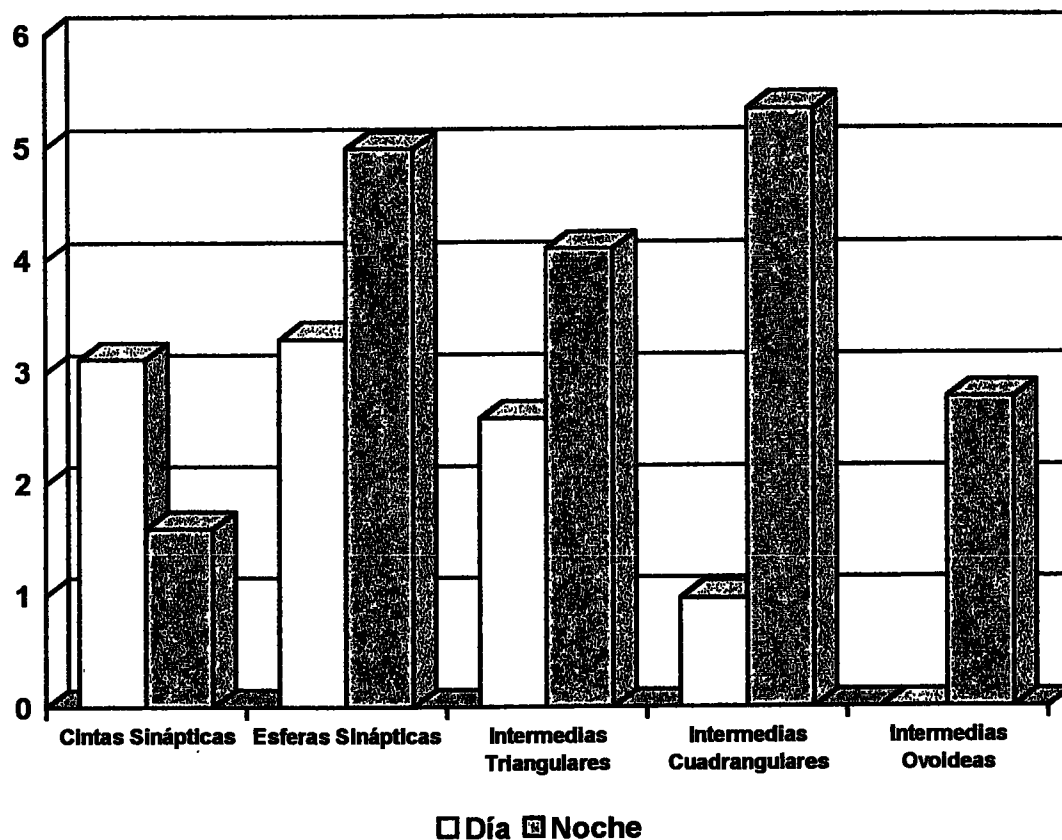


Foto periodo	Tipo de cuerpo sináptico					Total
	Cintas	Esferas	Formas intermedias			
			Triangulares	Cuadrangulares	Ovoideas	
Día	3,11 ± 1,69	3,29 ± 1,51	2,58 ± 1,99	0,97 ± 1,35	0	9,95 ± 3,77
Noche	1,60 ± 0,82	4,98 ± 1,27	4,09 ± 1,27	5,33 ± 0,94	2,76 ± 1,94	18,75 ± 3,83
prueba t	0,012	0,007	0,030	1,5 E-07	0,0007	3,1E-05

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1 CARACTERES MACROSCÓPICOS.

Nuestras observaciones coinciden, en general, con las referencias de otros autores. En cuanto a la forma, es prácticamente esferoidal bastante regular, tal como ya señaló en 1943 BARGMANN que la describe como esférica que se asemeja a un guisante. Las dimensiones observadas por nosotros son parecidas a las referidas por BLIN Y MAURIN en 1956 y por LANG en 1959; estos autores dan cifras de 7 y 7'5mm para la longitud de la glándula, y para la anchura y la altura 5'5mm y 4'5mm respectivamente, nosotros, según puede observarse en la figura 3 hemos visto unas dimensiones bastante semejantes a estas; se trata de un cuerpo esferoidal de algo mas de 0'5cm de diámetro. Aunque los citados autores no indican la edad de los individuos objeto de medición, suponemos debe tratarse de animales jóvenes, ya que en nuestro caso, la fotografía de referencia corresponde a un macho de 4 meses de edad.

5.2 ESTUDIO A MICROSCOPIA ÓPTICA.

Los trabajos publicados sobre estudios estructurales, ultraestructurales o inmunocitoquímicos de la glándula pineal ovina son muy escasos (ANDERSON, 1965; REDONDO ET AL,1996; FRANCO ET AL, 1997; REGODON ET AL1998 a,b). Queremos destacar además que, a excepción del trabajo de Anderson, los otros se han realizado en glándulas pineales durante el desarrollo embrionario.

Por ello, y dado que nuestro estudio se ha llevado a cabo sobre pineales de dos grupos de ovejas, jóvenes y adultas, sacrificadas en cada grupo siguiendo un patrón horario fijo, en la mitad de los casos diurno y, en la otra mitad, nocturno, consideramos que nuestras observaciones pueden contribuir a profundizar más en el conocimiento actual de la glándula pineal ovina.

En nuestro trabajo, hemos utilizado técnicas de tinción convencionales para conocer la estructura de la glándula pineal ovina, y técnicas de inmunocitoquímica con el fin de identificar la segunda población celular de esta glándula, es decir las células intersticiales o células gliales.

Siguiendo el mismo orden de exposición de los resultados nos referiremos primero al estudio histológico de las glándulas pineales de los animales jóvenes, destacando las diferencias entre el sacrificio diurno y el nocturno. A continuación, comentaremos las características y alteraciones de la estructura glandular observadas en los animales adultos.

En líneas generales las características histológicas que hemos observado en las pineales ovinas coinciden con las descripciones clásicas (ANDERSON, 1965; BARGMANN, 1981; FAWCETT, 1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

La glándula pineal ovina observada a pequeños aumentos presenta forma esférica y se encuentra rodeada por una cápsula delgada de tejido conjuntivo que emite tabiques hacia el interior. En algunas de ellas hemos podido apreciar la zona del receso pineal, revestida por un epitelio endimario pseudoestratificado, así como parte de la superficie dorsal de la glándula, revestida por un epitelio simple cúbico de células ciliadas. De acuerdo con la clasificación de VOLLRATH (1981), la pineal ovina es de tipo A. BOYA et al. (1995), en el gato, y CALVO et al. (1990), en el

perro, describen también un corto receso pineal y un revestimiento semejante al observado por nosotros en gran parte de la superficie dorsal.

Nosotros hemos observado en la oveja dos zonas perfectamente diferenciadas; una periférica o cortical, más basófila, cuyas células adoptan una disposición pseudolobular, y otra central o medular, más clara y de organización más irregular, coincidiendo con la descripción realizada recientemente por REGODÓN et al. (1998 a) en su estudio del desarrollo prenatal de la pineal ovina, y con anterioridad por QUAY (1974 b); ROMJIN, (1975); MATSHUSIMA, (1983). Para estos autores, estas dos zonas aparecen en la tercera fase del desarrollo, a los 98 días, y se mantienen hasta el final. Nosotros hemos apreciado una mayor nitidez entre cortical y medular de día que de noche. Creemos que puede tener relación con la actividad glandular y también con el hecho de que el suministro de sangre es mayor de día.

En el parénquima glandular hemos observado dos tipos celulares: los pinealocitos, mucho más abundantes, ovoides y con prolongaciones visibles con tinción de plata metenamina, y las células intersticiales o astrocitos, de menor tamaño, fusiformes o triangulares, con núcleo más denso y nucleolo evidente, también dotadas de numerosas prolongaciones. Las prolongaciones de una y otra célula se entremezclan entre sí en ocasiones y terminan frecuentemente en las proximidades de los vasos, en el espacio perivascular.

Nosotros no hemos encontrado células pigmentadas en ninguna glándula pineal, con la excepción de un caso que comentaremos más adelante. Otros autores, sin embargo las describen en el caballo (Cozzi, 1986) y en el perro y el gato (CALVO ET AL.1990; 1992). Creemos que puede deberse al hecho, comentado

por REGODÓN et al. (1998 b) en ovejas de que, al nacimiento, sólo se ve pigmento en la cuarta parte de las glándulas, o bien, coincidiendo con los trabajos anteriormente citados en perro, gato y caballo, a que las muestras que hemos observado nosotros no correspondieran a una zona pigmentada.

En el parénquima glandular, pero de manera más marcada en la medular hemos observado en muchos animales la presencia de pequeñas cavidades, sin contenido, que parecen delimitadas por pinealocitos. Creemos que puede tratarse de las rosetas descritas durante el desarrollo de la pineal ovina por REGODÓN et al. (1998 a). Estos autores comentan que en el proceso de oclusión del receso pineal durante el desarrollo prenatal quedan cavidades que serían restos de la luz del receso. Al final del desarrollo prenatal, aunque su número disminuye, dichas rosetas permanecen, especialmente en la zona medular. En nuestro estudio su presencia no ha sido constante en todos los animales estudiados. Las diferencias observadas entre los animales de las series diurna y nocturna, tanto en los animales jóvenes como en los adultos, no siguen un patrón determinado ni constante en cada uno de estos grupos. En los animales jóvenes son discretamente más abundantes por la noche y en los adultos ocurre al contrario, aunque dentro de unos márgenes muy estrechos, por lo que nos inclinamos a pensar que se trata, más bien de diferencias de tipo individual. En cuanto a las células que delimitan estas rosetas en la mayoría de los casos creemos que se trata de pinealocitos, lo que coincide con las observaciones de REGODÓN et al. (1998 a). Sin embargo, limitando algunas de ellas hemos observado, en algunas ocasiones, células de núcleo triangular o alargado y más teñido que pudieran ser células intersticiales, coincidiendo con la descripción realizada en la pineal del conejo por GARCÍA-MAURIÑO (1992). El hallazgo en la zona

periférica de las glándulas pineales de tres animales jóvenes de la serie nocturna de cavidades revestidas por células ependimarias nos parece casual y no relacionado con el fotoperiodo ni con la edad. En una de estas cavidades se aprecia una discreta cantidad de pigmento que no hemos identificado. Creemos que podría tratarse de restos de la luz del receso pineal que se oblitera progresivamente a lo largo del desarrollo prenatal. CALVO Y BOYA (1981) en la pineal de la rata mencionan cavidades revestidas por células ependimarias del tercer ventrículo.

Hemos descrito también en algunas pineales, cavidades menos numerosas de morfología variable, en ocasiones como hendiduras, distribuidas irregularmente por toda la glándula, que podrían corresponder con las pseudo rosetas descritas también en el estudio anteriormente citado de REGODÓN et al. (1998 a).

En la zona cortical de la mayoría de las pineales estudiadas por nosotros existen cavidades mucho mayores que las descritas hasta ahora, de aspecto cisternal, a veces con un contenido amorfo o fibrilar eosinófilo. Estas cisternas parecen discretamente más abundantes en los animales de la serie nocturna lo que nos induce a pensar que su aparición tenga relación con la actividad funcional en distintos momentos del día. La diferencia, en todo caso, repetimos es discreta. Sin embargo, en el grupo de los animales adultos estas cisternas corticales son de mucho mayor tamaño y se encuentran no sólo en la cortical sino por toda la glándula, llegando en ocasiones a confluir para formar otras más grandes. En el caso de estas cisternas creemos que pueden coincidir con los quistes descritos por otros autores. BARGMANN (1981) comenta que con la edad puede producirse una involución de los pinealocitos y simultáneamente una proliferación de la glía que hace que aparezcan manchas gliales, cuya desintegración y fusión conduciría a la

formación de quistes que pueden aumentar de tamaño progresivamente. Estas cavidades estarían limitadas por fibrillas gliales. Esto podría explicar el hecho de que nosotros las hayamos encontrado en mayor cantidad en las pineales de los animales adultos.

Asimismo, COZZI Y FERRANDI (1984) describen en la glándula pineal de caballos viejas zonas de degeneración con destrucción de tabiques conjuntivos aunque no precisan si tienen aspecto quístico.

Por último, MARTÍNEZ SORIANO (1987) describe quistes de origen desconocido en el 25-40% de las glándulas pineales humanas que no relaciona ni con la edad ni con el sexo.

Hemos observado, tanto en los animales jóvenes como en los adultos, un aporte sanguíneo mayor en las pineales de los animales de la serie diurna que en los de la nocturna, especialmente apreciable en la zona medular que es la más vascularizada (REGODON ET AL., 1998 a). Nosotros lo atribuimos a una diferente actividad glandular relacionada con el fotoperiodo y creemos que puede estar relacionado con la descripción de CALVO et al (1997), quienes observan que el volumen de la glándula pineal alcanza su máximo durante la fase luminosa, debido entre otras causas a un aumento del suministro de sangre en esta fase.

En dos animales adultos, de dos y cuatro años respectivamente hemos encontrado calcificaciones dispersas en el parénquima glandular, coincidiendo con las observaciones de numerosos autores en distintas especies. No se consideran patológicas y aunque su número y tamaño tiende a aumentar con la edad, también se han observado durante la infancia. (BARGMANN, 1981; BOYA & CALVO, 1984;

COZZI, 1986; MARTÍNEZ-SORIANO, 1987; BANKS, 1993; FAWCETT, 1995; VIGH ET AL., 1998; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Finalmente, queremos comentar que coincidiendo con las observaciones de BOYA Y CALVO (1984) en la rata, las pineales de los animales adultos tienen mayor cantidad de estroma conjuntivo que las de los jóvenes. Es decir, la fibrosis aumenta con la edad.

5.3 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Tras la utilización de sueros anti-vimentina y anti-GFAP hemos observado, en todas las pineales de animales jóvenes y adultos células positivas a ambos. Esto nos permite asegurar que estas células, también denominadas intersticiales, son de naturaleza glial, coincidiendo con numerosos autores en distintas especies animales (MOLLER ET AL, 1978; SCHACHNER ET AL, 1984; HUANG ET AL, 1984; COZZI, 1986; CALVO ET AL, 1988 a,b; LÓPEZ-MUÑOZ ET AL, 1992 a; BORREGÓN ET AL, 1993); (FRANCO ET AL., 1997).

Nosotros hemos encontrado células positivas a vimentina distribuidas por toda la glándula. En esto coincidimos con la totalidad de los autores consultados. La vimentina es típica de astrocitos inmaduros y aparece desde el principio. Está presente en astrocitos inmaduros y maduros (BOYA Y CALVO, 1993). Además queremos destacar que las células endoteliales y las ependimarias del receso pineal y de la porción dorsal de la glándula también han sido positivas a vimentina, coincidiendo con las descripciones de CALVO et al (1988 a) y de BOYA Y CALVO, (1993) respectivamente.

Por lo que respecta a las células positivas a GFAP las hemos encontrado distribuidas por toda la glándula, igual que las que expresan vimentina, coincidiendo con las descripciones realizadas en glándulas pineales de localización más profunda como es el caso del perro y el gato (BOYA Y CALVO, 1993) y de la oveja (FRANCO ET AL., 1997). Queremos destacar la diferencia con respecto a pineales tipo ABC como es el caso de la rata que presenta un patrón de distribución de estas células distinto, describiéndose células que expresan vimentina por toda la glándula mientras que las que expresan GFAP sólo se han observado en la parte proximal (MOLLER ET AL., 1978; HUANG ET AL., 1984; LÓPEZ-MUÑOZ ET AL., 1992 a; BORREGÓN ET AL., 1993).

En este caso no hemos observado inmunotinción en las células endoteliales.

Tanto las células positivas a vimentina como las positivas a GFAP tienen una morfología muy semejante. Son estrelladas, con núcleo fusiforme o triangular y nucleolo, a menudo evidente y poseen numerosas prolongaciones que se entremezclan tanto con las prolongaciones de los pinealocitos como con otras semejantes. La inmunotinción puede observarse en cada caso tanto en el soma celular como en las prolongaciones. Estas prolongaciones son especialmente evidentes en el espacio perivascular, formando un anillo alrededor de los vasos. Esto se aprecia con mayor nitidez en el caso de las células positivas a GFAP, probablemente porque las células endoteliales no son positivas a GFAP.

Entre la serie diurna y nocturna las diferencias en la expresión de vimentina y GFAP no son muy marcadas. En ambos casos (vimentina y GFAP) se aprecia una mayor tendencia en la serie nocturna a disponerse alrededor de los vasos y a formar nidos, hecho que pensamos que puede tener relación con la actividad

glandular. Debido a la tendencia que muestran estas células a disponerse en los espacios perivasculares (MOLLER ET AL., 1978; HUANG ET AL., 1984; SCHACHNER ET AL., 1984; COZZI, 1986, CALVO ET AL., 1988 a,b; BOYA Y CALVO, 1993) consideramos, de acuerdo con numerosos autores, la posibilidad de que estas células intersticiales o astrocitos jueguen un papel en el intercambio de sustancias entre la glándula pineal y la sangre, además de realizar una misión de sostén entre los pinealocitos, semejante a la desarrollada por los astrocitos en el SNC (LÓPEZ-MUÑOZ ET AL., 1992 b). No obstante esta opinión no es totalmente compartida por todos los autores (FRANCO ET AL., 1997).

En cuanto a las glándulas pineales de los animales adultos queremos destacar que se aprecia un mayor número tanto de células positivas a vimentina y como a GFAP, más marcado en el caso de estas últimas.

El hecho de que en los animales adultos las células positivas a vimentina sean más abundantes, adoptando una disposición más difusa y con menor formación de nidos, creemos que puede deberse al hecho ya citado anteriormente de que el estroma conjuntivo de la glándula pineal aumenta con la edad, y es posible, por lo tanto que también muestren positividad a vimentina elementos de origen mesenquimatoso de dicho estroma.

La mayor cantidad de células positivas a GFAP observada por nosotros coincide con las descripciones de BOYA Y CALVO (1993) en gatos viejos y de LÓPEZ-MUÑOZ et al. (1992 b) y BORREGÓN et al. (1993) en ratas de edad avanzada.

Por último queremos comentar que la positividad a vimentina y GFAP que hemos observado en el interior de las cavidades quísticas podría estar en consonancia con la teoría sostenida por BARGMANN (1981) de que estos quistes se

forman por la desintegración de manchas gliales. La mayor cantidad y tamaño de estos quistes en los animales adultos podría explicarse por la mayor cantidad de células positivas, sobre todo a GFAP, que se da a medida que avanza la edad.

5.4 ESTUDIO MORFOMÉTRICO.

Los resultados estadísticos referidos al núcleo de los pinealocitos, considerados en el conjunto de las cuatro poblaciones estudiadas, merecen unos comentarios.

En general, se trata de poblaciones bastante agrupadas, con unas desviaciones típicas que son relativamente bajas, y consecuentemente con unos coeficientes de variabilidad de Pearson que oscilan desde el 31'73% al 35'66%. Ello ofrece una expresión gráfica en forma de polígono de frecuencias unimodal que se corresponde con una curva de Gauss típica.

La única particularidad que merece atención especial (común a los cuatro grupos estudiados); es la configuración de la "cola" (en terminología estadística) de la derecha de dicha curva de Gauss, que determina que no sea simétrica respecto a las medidas de posición, es decir, que los extremos superiores de variación tienen una dispersión mayor que los extremos inferiores.

Este hecho es debido, en gran parte a un artificio de la técnica microtómica. Recordemos que la cuchilla del microtomo secciona los núcleos celulares (y en general cualquier estructura) al azar. Esto significa que la imagen que nos ofrecen los cortes se corresponde a un plano en el espacio; en dicho plano, como es lógico todos los núcleos no estén al mismo nivel. Dicho con otros términos y utilizando un símil geográfico: imaginemos que seccionamos con una gran cuchilla un montón de

esferas las cuales son todas del mismo tamaño. La cuchilla cortaría unas por el centro o ecuador, otras por los casquetes polares y otras por zonas intermedias, de modo que pese a ser las esferas completamente iguales la imagen que ofrecería esta sección teórica a que nos referimos no coincidiría con la realidad, ya que habría secciones de distinto tamaño por la razón apuntada, si bien habría predominio de los diámetros medios e inferiores (recordemos que por cada plano ecuatorial hay dos planos polares y varios planos intermedios). Teniendo en cuenta estos hechos, no nos debe extrañar que haya una mayor agrupación en la parte izquierda del polígono de frecuencias respecto a la parte derecha, la cual presenta una "cola" más alargada.

El análisis de imagen realizado sobre nuestro universo estadístico, es decir, los núcleos de pinealocitos de la especie ovina en los cuatro grupos estudiados (ovinos sacrificados de día y de noche y dentro de cada grupo el estudio por separado de los núcleos de la zona central y de la zona periférica) evidencia como rasgo a destacar que existen diferencias significativas entre el tamaño de los núcleos de los individuos sacrificados de día con respecto a los sacrificados de noche. Por el contrario hemos encontrado bastante similitud entre los núcleos de los pinealocitos situados en las zonas central y periférica de la glándula.

Por lo que concierne al tamaño del núcleo de los pinealocitos de ovinos sacrificados de día (tanto de la zona central de la glándula como de la periférica) resulta evidente que en conjunto presentan un mayor tamaño ($42'93\mu\text{m}^2 \pm 15'13\mu\text{m}^2$ los de la zona central y $42'98\mu\text{m}^2 \pm 15'32\mu\text{m}^2$ los de la zona cortical) que los núcleos de animales sacrificados de noche ($37'17\mu\text{m}^2 \pm 12'39\mu\text{m}^2$ los de la zona medular y $37'99\mu\text{m}^2 \pm 12'05\mu\text{m}^2$ los de la región periférica).

Si analizamos en particular los núcleos de las mismas zonas, la diferencia observada queda expuesta en la Tabla VIII. Así, la superficie de los núcleos de la **zona central tomados de día** tienen una media de $42'93\mu\text{m}^2 \pm 15'13\mu\text{m}^2$, frente a la media de los **tomados de noche** de $37'16\mu\text{m}^2 \pm 12'39\mu\text{m}^2$. Tras haber calculado la "t" de Student entre ambas poblaciones, nos da un valor de $p < 0'001$.

Estas cifras y datos nos permiten afirmar que se trata de dos poblaciones bien diferenciadas. Tomando en consideración estas cifras de las superficies nucleares, resulta evidente que esta superficie está sensiblemente aumentada en un 15'49% en los animales sacrificados en periodo diurno frente a los que fueron sacrificados de noche. Ahora bien, hay que tener presente que el núcleo es una estructura tridimensional. Por lo tanto, si realizamos un cálculo teórico y suponemos que las superficies encontradas por nosotros se corresponden a planos ecuatoriales de los núcleos (lo cual dista de la realidad, según las consideraciones que hemos hecho líneas arriba), y aplicamos la fórmula de la superficie del círculo, obtendremos el valor del radio. Si con este valor calculamos el volumen de la esfera (que es el cuerpo geométrico que más se asemeja al núcleo) obtendremos un valor teórico para el volumen de los núcleos de pinealocitos de animales sacrificados de día del $210'83\mu\text{m}^3$, frente a $170'36\mu\text{m}^3$ que correspondería al volumen de los núcleos de pinealocitos de animales sacrificados de noche, lo cual supone un aumento teórico del volumen nuclear en favor de aquellos del 23'75%.

Cabe suponer, que esta diferencia aún podría ser mayor, si nuestros animales objeto de estudio (los sacrificados de noche) hubieran permanecido en estancias con absoluta oscuridad (tal como ocurre en las condiciones naturales de vida de estos animales), lo cual en las estancias del matadero no sucede así, ya que dichas

dependencias están iluminadas de noche, si bien con una luz muy tenue. No obstante, hay que señalar que en estas dependencias del matadero, dicha luz no sobrepasa los 2000 lux de intensidad luminosa, la cual sería necesaria para poder producir cambios funcionales objetivables.

Esta reducción del volumen del núcleo del pinealocito durante la noche suponemos que es debida a la diferente actividad que tiene la glándula epífisis en cada periodo, que se pone de manifiesto no solamente en el aspecto funcional, sino también desde un punto de vista puramente morfológico.

En la citada Tabla VIII figuran también los resultados de los estudios estadísticos del análisis de imagen de los núcleos de pinealocitos de la **zona periférica**, tanto de los ovinos **sacrificados de día como de noche**. En estas dos poblaciones, igual que acontece con la zona central que acabamos de ver, también es manifiesta la diferencia de superficies que hay entre ellas, ya que en los sacrificados de día hemos obtenido un valor para la media de $42'8\mu\text{m}^2 \pm 15'32\mu\text{m}^2$, y los sacrificados de noche tienen una media de $37'99\mu\text{m}^2 \pm 12'05\mu\text{m}^2$, lo que significa que los núcleos de los pinealocitos de los animales sacrificados de día exhiben una superficie superior en un 13'13% a la de los que lo fueron de noche. Calculada la "t" de Student nos da un valor para $p < 0'001$, es decir, con la misma significación estadística que en el caso de la zona central, lo cual nos exime de hacer los comentarios que hemos realizado a propósito del estudio de aquella.

Caso distinto es el de las poblaciones nucleares correspondientes a las dos zonas **central y periférica** de la epífisis, ya que si establecemos comparación entre ellas solo hay diferencias significativas de tamaño durante la noche. Así, en el caso de los animales sacrificados de **día**, obtenemos medias de $42'93\mu\text{m}^2 \pm 15'13\mu\text{m}^2$ para

los núcleos de la zona central y $42'98\mu\text{m}^2 \pm 15'32\mu\text{m}^2$ para los de la periferia de la glándula, lo que supone una diferencia de valor en cuanto a superficie se refiere de tan solo el 0'1%, lo cual se pone así mismo de manifiesto, tras haber calculado la "t" de Student que da un valor de p muy próximo a la unidad (concretamente $p > 0'9$), por lo que las diferencias no son significativas.

Con referencia a las dos poblaciones de núcleos de las zonas **central y periférica** de los animales sacrificados de **noche**, arrojan las siguientes cifras: $37'17\mu\text{m}^2 \pm 12'39\mu\text{m}^2$ para los de la región central y $39'99\mu\text{m}^2 \pm 12'05\mu\text{m}^2$ para los de la cortical, lo que supone un aumento de superficie de éstos respecto a aquellos del 2'2%, y la "t" de Student da un valor de $p < 0'05$, lo cual es estadísticamente significativo.

Estos hechos guardan relación con los hallazgos a microscopía electrónica, en los que la presencia de cavidades intracelulares es más numerosa en las horas diurnas, lo que en principio puede resultar paradójico con relación a la idea funcional de que la pineal es más activa durante la noche, pero sin embargo si analizamos los trabajos de CIMAS (1992) en los que se realiza un estudio circadiano y estacional de la actividad cariométrica cortico-medular de la rata, se observa que los valores cariométricos de estas zonas fluctúan de manera ostensible a lo largo de las 24 horas y de las estaciones, obteniendo en la estación de otoño los valores cariométricos más bajos entre las 22:00 y las 02:00 horas.

Estos datos nos señalan que el factor horario y estacional puede ser determinante para valorar la actividad funcional cariométrica de la pineal y en consecuencia, los datos obtenidos en puntos horarios determinados solo serían indicadores relativos de la actividad funcional de la glándula. En cualquier caso, lo

que se desprende de nuestros resultados es que existen dos zonas funcionales diferentes en la pineal de los óvidos y que la actividad de la glándula varía según el fotoperiodo.

El debate sobre la posible existencia de dos zonas funcionalmente diferentes en la pineal de los mamíferos, ya fue planteado por QUAY Y RENZONI (1966) en la rata y por ROMJIN (1975) en el conejo, aunque los resultados en los años que siguieron fueron contradictorios, condicionándolos a la región pineal estudiada (BECKER & VOLLRATH, 1983), al sexo (LÓPEZ IGLESIAS ET AL, 1987), a la edad y al fotoperiodo (MATSHUSIMA ET AL, 1989), a la estación y al punto horario en el que se hizo la valoración (CIMAS GARCÍA ET AL., 1992; MATSHUSIMA ET AL, 1990) o a la situación topográfica de los núcleos a analizar (HIRA ET AL, 1998).

Estas diferencias también han sido señaladas por datos electrofisiológicos (SEMM ET AL, 1981).

Los resultados de nuestro trabajo creemos que vienen a apoyar lo señalado por QUAY (1964, 1966), ROMJIN, (1975), MATSHUSIMA, (1990) CIMAS, (1992), e HIRA, (1998) en roedores y a señalar por vez primera en los óvidos la existencia de esas diferencias funcionales periféricas y centrales descritas en otras especies, así como a insistir en el hecho de que la pineal de los mamíferos puede ser un órgano, al menos bifuncional.

5.5 ESTUDIO A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRASMISIÓN

En el caso de las pineales ovinas que nos ocupan, parece ser que la presencia en ciertas zonas, de cavidades foliculares intracelulares, es un hecho bastante común referido también por ANDERSON (1965). Nosotros, basándonos en el

contenido gránulo-vesiculoso de las mismas y en la existencia de algunas microvellosidades en los bordes celulares que las delimitan, unido a una mayor presencia de estas cavidades en el centro de la glándula, pensamos que este tipo de organización estructural se puede establecer para facilitar el intercambio metabólico de la glándula

En roedores, concretamente en rata (QUAY, 1973; 1974 a; GIMÉNEZ-GONZÁLEZ ET AL, 1991; CIMAS GARCÍA ET AL., 1992) y hámster (MATSHUSIMA ET AL., 1989), han sido puestos de manifiesto mecanismos similares, en los que en vez de formarse folículos, las células pineales, en determinados momentos funcionales establecen unos "canales" o pasillos que favorecen la circulación de los productos metabólicos desde la parte central de la glándula hasta la periferia y viceversa.

5.6 CUERPOS SINÁPTICOS.

El recuento de cuerpos sinápticos en ovinos jóvenes muestra diferencias significativas entre los dos grupos de población estudiados, es decir, los sacrificados de día y los sacrificados de noche.

En la tabla IX y Gráfica N° 6 se observa que en el grupo de animales sacrificados de día, y sobre una superficie total examinada de 225.000 μm^2 solamente hemos contado 112 cuerpos sinápticos. Sin embargo en el grupo de animales sacrificados de noche, sobre la misma superficie, representados en la Tabla X y Gráfica N° 7, el número de cuerpos sinápticos contados ha sido de 211, lo que supone que de noche hay casi doble número de estas organelas que en el periodo diurno, tal como se evidencia en la Gráfica N° 8. Referidas estas dos cantidades a cifras expresadas por la unidad convencional de superficie

(20.000 μm^2) hallamos unos valores de 9'95 para la serie diurna y 18'75 para la nocturna. Esta diferencia creemos que se explica por la diferente actividad de la glándula, mayor de noche que de día, lo que se traduce en este aumento significativo de cuerpos sinápticos en su conjunto.

Al analizar las distintas clases de cuerpos sinápticos, nos encontramos con hechos de particular interés. Así, en la Gráfica N° 6, se observa que la proporción de los tres grupos de cuerpos sinápticos en la serie diurna, es casi igual (1/3 para cada clase), ya que las cintas sinápticas representan el 31'25%, las esferas sinápticas el 33'03% y los cuerpos intermedios en su conjunto (triangulares y cuadrangulares) suponen el 35'71%. Es de destacar que en la serie diurna no nos ha sido posible encontrar cuerpos intermedios ovoideos.

Si efectuamos la comparación con los resultados que figuran en la Gráfica N°7, que representa la serie nocturna, la distribución de las tres clases citadas es completamente diferente. Pese a que en conjunto hemos contado casi doble número de cuerpos sinápticos, según hemos dicho, la cantidad de cintas sinápticas en la serie nocturna está muy disminuida-la mitad con respecto a la serie diurna -, de modo que si por unidad de superficie (20.000 μm^2) en aquella vimos que había 3'11 cintas (lo que representa el 31'25% del total), en la serie nocturna esta cifra baja a 1'6, lo cual supone tan solo el 8'53% de la población total de cuerpos sinápticos en este fotoperiodo.

Por el contrario, es manifiesto el aumento experimentado por los cuerpos intermedios en la fase nocturna, ya que de 3'55 / 20.000 μm^2 (que representa el 35'71%) que se cuentan en la fase diurna, en la serie nocturna hay 12'18, lo que supone el 64'93%, o sea, casi los 2/3 de la población total de cuerpos sinápticos.

El estudio detallado de cada una de estas formas intermedias confirma este hecho, ya que los cuerpos intermedios cuadrangulares, que en la fase diurna existen en número de 0'97 / 20.000 μm^2 (equivalente al 9'82% del total), en la fase nocturna aumentan considerablemente su presencia, ya que se cuentan 5'33 / 20.000 μm^2 (lo que significa el 28'44% de la población total).

Aún más significativo es lo que acontece con los cuerpos intermedios ovoideos que en la serie diurna no nos ha sido posible evidenciarlos en ninguno de los campos examinados (una superficie total de 225.000 μm^2) y sin embargo en los animales sacrificados de noche hemos contado un total de 31 organelas de este tipo, lo que equivale a una cifra de 2'76 / 20.000 μm^2 y representa el 14'69% de la población total de cuerpos sinápticos en este periodo nocturno.

Las variaciones más discretas, las hemos registrado en la población de cuerpos intermedios triangulares que de 2'58 / 20.000 μm^2 (25'89% del total) en la fase diurna, pasan a 4'09 / 20.000 μm^2 (21'80% del total) en la serie de noche.

Asimismo y por lo que respecta a las variaciones habidas en las esferas sinápticas, tampoco son muy acusadas, ya que de 3'29 / 20.000 μm^2 que observamos en la fase diurna (33'03% del total de cuerpos sinápticos), ascienden a 4'98 / 20.000 μm^2 ; sin embargo como en esta fase, según quedó expuesto, el total de cuerpos sinápticos es mayor, la proporción relativa de las esferas sinápticas disminuye al 26'54%.

El diagrama de barras de la Gráfica N° 9 recoge las variaciones habidas en las distintas clases de cuerpos sinápticos, según el fotoperiodo considerado; se observa claramente la manifiesta disminución de las cintas en el periodo nocturno (únicas formaciones que disminuyen en sentido absoluto y relativo) frente al

aumento absoluto de los otros cuerpos sinápticos. Mención especial merecen los cuerpos intermedios ovoideos que no se evidencian de día y sin embargo por la noche su presencia es muy significativa.

Si analizamos los resultados del recuento de cuerpos sinápticos, podemos confirmar que en los óvidos, al igual que en el hámster (MATSUSHIMA ET AL., 1983) y en el conejo, (MARTÍNEZ-SORIANO ET AL, 1984; 1999) existe una población heterogénea de los mismos, observándose la presencia de cintas y de esferas junto a formas triangulares, cuadrangulares y ovoideas, que se distribuyen a lo largo del citoplasma y las prolongaciones de los pinealocitos.

De una manera similar, STRUWE Y VOLLRATH (1990) describen la existencia de esta población heterogénea, pero no describen la existencia de cintas, solo de esferas, que son más abundantes que las formas intermedias, y no desglosan los diferentes tipos de éstas últimas.

De nuestros resultados, hay dos cosas que llaman la atención respecto a lo descrito por STRUWE (1990), lo primero es la presencia de cintas, y lo segundo, es que el número porcentual de formas intermedias es siempre mayor que el de esferas y cintas, hasta el punto que en la fase nocturna las formas intermedias llegan a ser más numerosas (casi el doble) que la suma de las esferas y las cintas. Sorprende este hecho, porque hasta ahora en las especies animales estudiadas, las formas intermedias solo han sido descritas en el hámster y en el conejo como hallazgos porcentualmente mínimos respecto a las cintas y esferas (HEWING, 1980; MATSUSHIMA ET AL., 1983; MARTÍNEZ-SORIANO, ET AL 1984; 1999). Este mayor porcentaje de formas intermedias se mantiene tanto durante el día como durante la noche, siendo la diferencia mayor en el periodo de oscuridad.

Otro dato a destacar es que el menor número de cuerpos sinápticos corresponda a las cintas (31.25% de día y 8.53% de noche), cuando en todas las especies estudiadas hasta el momento las cintas no bajan de un 80%, y además es más sorprendente aún, que éste porcentaje alcance las cotas más bajas (8.5%) durante el periodo nocturno, que es precisamente en el periodo donde el número de cuerpos sinápticos es mayor.

No existen antecedentes en la literatura al respecto, siendo éste el primer estudio fotofásico que se realiza sobre los cuerpos sinápticos en la pineal de los óvidos.

Solo STRUWE (1990) describe por primera y única vez las formas intermedias, ya que ANDERSON (1965) en su magnífico trabajo descriptivo con el microscopio electrónico, no menciona la existencia de ninguna de estas organelas.

Nosotros coincidimos con STRUWE (1990) en que existe un elevado número de esferas sinápticas, pero discrepamos en que la cantidad de cintas sinápticas sea mayor, ya que en nuestros recuentos, el número hallado siempre ha sido menor, especialmente de noche; durante el día la diferencia no es tan manifiesta.

Las diferencias observadas entre nuestros resultados y los publicados por STRUWE (1990), pueden estar determinadas porque los datos de este autor, están referidos exclusivamente a animales sacrificados durante el periodo diurno de máxima luminosidad (10:00-11:00 horas); mientras que en nuestro caso los animales sacrificados en el periodo diurno lo fueron en torno a las 14:00-15:00 horas. Estas diferencias son solo relativas, ya que nosotros hemos encontrado una media de 3.55 formas intermedias por $20.000\mu\text{m}^2$ y de 3.29 esferas, mientras su trabajo con la misma metodología hace referencia a 0.4 y 3.9 respectivamente. Esta

diferencia numérica puede ser atribuida, no solo a la distinta banda horaria utilizada, ya comentada, sino también a la latitud y por consiguiente a las diferentes condiciones de luminosidad en el que se han realizado ambos experimentos (España, Ruanda y Alemania).

Las cintas sinápticas descritas por VOLLRATH (1973) en la pineal de la rata, experimentan una variación en número a lo largo del día, que alcanza su máximo en las horas de la madrugada y el mínimo en las de mitad de la mañana (MARTÍNEZ SORIANO ET AL, 1992); además representan el porcentaje mayor de cuerpos sinápticos en todas las especies de mamíferos y vertebrados inferiores, analizadas hasta el momento. Su función está relacionada con la inervación adrenérgica (KARASEK ET AL, 1983; GONZALEZ & ÁLVAREZ-URÍA, 1986) y se piensa que puedan estar involucradas en los procesos de comunicación intercelular (VOLLRATH, 1973) y en la regulación del número de β -receptores (KING & DOUGHERTY, 1982) y en sus mecanismos de regulación de indolaminas (MC NULTY & FOX, 1992). Por tanto la disminución del número de cintas en los óvidos debe de estar necesariamente relacionada con la regulación de estos mecanismos, cuya base puede ser genética, ya que la inducción de la formación del segundo mensajero, AMP_c, imprescindible para la formación de cintas, está a su vez regulado por la transcripción de un regulador genético temprano, el ICER (STHELE ET AL., 1993), el cual podría ser liberado según la iluminación ambiental y en dependencia de los hábitos nocturnos o diurnos de la especie.

Dado que los óvidos son animales de hábitos diurnos se puede pensar que las modificaciones totales y fotofásicas, con relación al número de cintas que se observan en esta especie puedan ser debidas a estas razones.

Con relación a las esferas, resulta interesante comentar de nuestros resultados, que las variaciones del número de las mismas en relación con lo descrito en otras especies se mantiene dentro de lo que es habitual, ya que han sido descritas variaciones ínter especies, dentro de unos porcentajes con relación al resto de cuerpos sinápticos que oscilan entre el 14 y el 43%, por lo que los porcentajes encontrados en los óvidos no son discrepantes con los existentes en la literatura.

Respecto a su relación con las cintas sí que existen datos interesantes descritos y parece que se comportan de manera diferente, ya que muestran ritmos diferentes circadianos en el cobaya (KHALEDPOUR & VOLLRATH, 1987) y en el conejo (MARTÍNEZ-SORIANO, 1999; 2000), aumentan mucho más que las cintas en el cobaya durante la preñez (LUES, 1971), y en el conejo, tras la denervación simpática también se incrementa su número inicialmente más que las cintas (ROMJIN, 1975).

Las últimas publicaciones apuntan a que las cintas pueden transformarse en esferas, y que esta transformación puede estar determinada, entre otras cosas, por la cantidad de luz ambiental (ADLY ET AL, 1999), lo que explicaría que en las curvas evolutivas circadianas de estas estructuras en las horas de máxima luminosidad, los valores de cintas y esferas se solapan, tal como ocurre en las curvas del conejo y del gato durante la primavera (MARTÍNEZ SORIANO ET AL, 1999; 2000)

Sobre las formas intermedias, por su escasa presencia y su correspondencia numérica con las cintas y esferas, se había especulado en la posibilidad de que fuesen secciones de cintas y de esferas en diferentes angulaciones y fases de formación (JASTROW, 1997; MARTÍNEZ-SORIANO ET AL, 2000).

En los óvidos, los resultados obtenidos por nosotros, en principio no parecen apoyar estas opiniones, solo en el caso de las cintas y las esferas sí que desde una igualdad diurna, el incremento nocturno de las esferas se acompaña de una disminución ostensible de las cintas, pero en el caso de los cuerpos intermedios no parecen existir relaciones claras entre las variaciones de los diferentes tipos de cuerpos y el incremento o disminución de las cintas o esferas y creemos que sería necesario realizar un estudio circadiano evolutivo de las diferentes organelas para poder conocer mejor estos hechos.

CAPÍTULO 6
RESUMEN

CAPÍTULO 6

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral está dedicada a estudiar determinados aspectos de la glándula pineal en la especie ovina, ya que se trata de un mamífero superior, apenas utilizado como animal de experimentación, pese a que tiene semejanzas con la especie humana en lo que se refiere a los caracteres de esta glándula (ambas pertenecen al tipo A o proximal) y al género de vida que realizan: las dos especies viven en espacios abiertos al aire libre y reciben directamente la influencia de la luz solar.

Los estudios pertinentes se han realizado sobre un total de 60 animales sanos, de varias razas y edades (jóvenes y adultos), los cuales fueron sacrificados en matadero.

Nuestros trabajos se han orientado en los siguientes aspectos:

- **Estudio a microscopía óptica.** Las investigaciones en este campo se refieren al estudio histológico de la glándula pineal, mediante técnicas convencionales para observar las diferencias existentes entre los animales sacrificados de día y los que lo fueron de noche, así como entre jóvenes y adultos.

Asimismo hemos empleado técnicas de inmunohistoquímica para el estudio de los astrocitos y poder establecer diferencias entre grupos de animales según la edad y el fotoperíodo.

- **Estudio morfométrico** sobre una población de núcleos de los pinealocitos de animales jóvenes, mediante análisis de imagen con ayuda de un programa

informático para conocer las modificaciones habidas en el tamaño nuclear según el momento del día y la zona de la glándula (cortical y medular).

- ***Estudio a microscopía electrónica de transmisión*** de las características de la glándula pineal en animales jóvenes, centrandó nuestra atención principalmente en el estudio y recuento de las distintas clases de cuerpos sinápticos en función del fotoperiodo.

De todos los datos recogidos en nuestros estudios, cabe deducir las siguientes conclusiones.

CAPÍTULO 7
CONCLUSIONES

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1ª. La glándula pineal ovina, al igual que en la especie humana, es del tipo A de acuerdo con la clasificación de VOLLRATH (1981). Al estudio con el microscopio óptico, parte de su superficie dorsal, está revestida por un epitelio ependimario simple cúbico. El parénquima presenta dos zonas claramente diferenciadas, la cortical, pseudolobulada y la medular, en la que es frecuente la observación de pequeñas cavidades o rosetas. Asimismo es común el hallazgo de cavidades quísticas. La vascularización está más desarrollada en la zona medular.

2ª. Con técnicas de inmunocitoquímica hemos observado células inmunorreactivas a vimentina y GFAP por toda la glándula. La GFAP se considera un marcador válido de la madurez astrocitaria, por lo que podemos afirmar que en la oveja los astrocitos maduros tienen una disposición panglandular, a diferencia de la pineal de la rata, en la que los astrocitos maduros se encuentran sólo en la porción proximal. Esta observación es común para animales jóvenes y adultos, lo que significa que en la glándula pineal ovina coexisten después del nacimiento y durante toda la vida astrocitos inmaduros y maduros.

3ª. Las células endoteliales presentan inmunotinción positiva a vimentina y negativa a GFAP.

4ª. En los animales adultos hemos observado más tendencia a la formación de quistes, mayor cantidad de tejido conjuntivo y de células positivas a vimentina y, sobre todo de células positivas a GFAP.

5ª. Los núcleos de los pinealocitos en la especie ovina son de mayor tamaño en los animales sacrificados de día que en los sacrificados de noche, ya que su superficie durante el periodo diurno es un 15'49% más grande que durante la noche. Estas diferencias son estadísticamente significativas.

6ª. El número de cuerpos sinápticos totales contados sobre una superficie de $20.000\mu\text{m}^2$ es inferior en el grupo diurno ($9'95\pm 3'77$) que en el nocturno, donde el número de estas organelas en la misma superficie alcanza una cifra de casi el doble ($18'75\pm 3'83$).

7ª. En el periodo diurno, las cintas sinápticas representan alrededor de 1/3 (el 31'25%) de la población total de cuerpos sinápticos; el otro tercio (33'03%) corresponde a las esferas sinápticas; y las formas intermedias suponen algo más de la otra tercera parte (35'71%).

8ª. En el periodo nocturno, las cintas sinápticas disminuyen y sólo representan el 8'53% del total de cuerpos sinápticos, mientras que casi dos terceras partes de estos (el 64'93%) son formas intermedias. La variación menos manifiesta corresponde a las esferas sinápticas cuya presencia en este periodo nocturno es del 26'54%.

9ª. En el periodo diurno no hay formas intermedias ovoideas, a diferencia del grupo de animales sacrificados de noche en que aparecen estas organelas en número de $2'76/20.000\mu\text{m}^2$, cifra que representa el 14'69% del total de la población de cuerpos sinápticos en dicho fotoperiodo.

10ª. Sobre la base de los datos anteriores, cabe afirmar que la actividad de la glándula pineal de los ovinos presenta una diferente actividad dependiendo del fotoperiodo.

CAPÍTULO 8
BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Adly, M.A., Spiwoкс-Becker, I., & Vollrath, L. (1999). Ultrastructural changes of photoreceptor synaptic ribbons in relation to time of day and illumination. Inves. Ophthalmol. Vis. Sci., 40, 2165-2172.
- 2.- Anderson, E. (1965). The anatomy of ovine and bovine pineal glands. Light and electron microscopic studies. J Ultrastruct Res, 8, 1-80.
- 3.- Banks, W. (1993). Applied Veterinary Histology. (3^a ed.). Mosby-Year book.
- 4.- Bargmann, W. (1943). Die epiphysis cerebri. In Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen. Bd. VI/4, hrsg. von W. v. Möllendorf. In Anonymous, (pp. 309-502). Berlin: Springer.
- 5.- Bargmann, W. (1981). Histología y anatomía macroscópica humanas. In Anonymous, (pp. 372-378). Barcelona: Editorial Espaxs, S.A.
- 6.- Barrett, P., MacLean, A., & Morgan, P.J. (1994). Evidence for multiple forms of melatonin receptor-G-protein complexes by solubilization and gel electrophoresis. J Neuroendocrinol. 6(5), 509-15.
- 7.- Becker, V.G., & Vollrath, L. (1983). Twenty-four hour variation of pineal gland volume, pinealocyte nuclear volume and mitotic activity in male Sprague-Dawley rats. J. Neural Transm., 56, 211-221.
- 8.- Benson, B., & Ebels, I. (1978). Pineal peptides. J Neural Transm Suppl. (13), 157-73.
- 9.- Bhagat, L., Duraiswami, S., & Muralidhar, K. (1994). Mode of action of inhibin-like pineal antigonadotropin is different from melatonin during compensatory ovarian hypertrophy. J Pineal Res. 16(4), 193-7.
- 10.- Bhatnagar, K.P. (1994). Synaptic ribbons of the mammalian pineal gland: enigmatic organelles of poorly understood function. Adv Struct Biol. 3, 47-94.
- 11.- Bittman, E.L., Karsch, F.J., & Hopkins, J.W. (1983). Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. Endocrinology. 113(1), 329-36.

- 12.- Bittman, E.L., & Weaver, D.R. (1990). The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. Biol Reprod, 43, 986-993.
- 13.- Blin, P.C., & Maurin, C. (1956). Anatomie macroscopique de l'épiphyse des mammifères domestiques. Rec. Méd. Vét, 132, 36-53.
- 14.- Borregón, A., Boya, J., Calvo, J., & López Muñoz, F. (1993). Immunohistochemical study of the pineal glial cells in the postnatal development of the rat pineal gland. J Pineal Research, 14, 78-83.
- 15.- Boya, J., & Calvo, J. (1984). Structure and ultrastructure of the aging Rat pineal gland. J Pineal Research, 1, 83-9.
- 16.- Boya, J., & Calvo, J. (1993). Immunohistochemical study of the pineal astrocytes in the postnatal development of the cat and dog pineal gland. J Pineal Research, 15, 13-20.
- 17.- Boya, J., Calvo, J., & Rancaño, D. (1995). Structure of the pineal gland in the adult rat. J Pineal Research, 18, 112-8.
- 18.- Burck, H.C. (1969). Técnica Histológica. In Anonymous, Madrid: Paz Montalvo.
- 19.- Calvo, J., & Boya, J. (1981). Embryonic development of the rat pineal gland. Anat Rec, 200, 491-500.
- 20.- Calvo, J., Boya, J., Borregón, A., & García-Mauriño, J. (1988 a). Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. Anat Rec, 220, 424-8.
- 21.- Calvo, J., Boya, J., García-Mauriño, J., & López Carbonell, A. (1990). Postnatal development of the dog pineal gland. Light microscopy. Histol Histopathol, 5, 31-6.
- 22.- Calvo, J., Boya, J., García-Mauriño, J., & López Carbonell, A. (1997). Influence of the light and dark phase of the cycle on the cellular proliferation in the pineal gland of the adult rat: a bromodeoxyuridine immunohistochemical study. J Pineal Research, 23, 1-4.
- 23.- Calvo, J., Boya, J., García-Mauriño, J., & Rancaño, D. (1992). Presence of melanin in the cat pineal gland. Acta Anat, 145(73-8)
- 24.- Calvo, J., García-Mauriño, J., & López-Carbonell, A. (1988 b). Structure and ultrastructure of the pigmented cells in the adult dog pineal gland. J Anat, 160, 67-73.

- 25.- Cimas García, C., Martínez Soriano, F., & Ruiz Torner, A. (1987). Circadian and photoperiodic correlation between the number of pineal gland synaptic ribbons and serum melatonin levels in the rat. Acta Anat. **130**, 228-231.
- 26.- Cimas García, C., Martínez Soriano, F., & Ruiz Torner, A. (1992). Circadian and seasonal cortico-medullary variations in pinealocyte nuclear size. A comparative statistical analysis. Histol Histopath. **7**, 679-687.
- 27.- Coon, S.L., Roseboom, P.H., Baler, R., Weller, J.L., Namboodiri, M.A., Koonin, E.V., & Klein, D.C. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. Science, **270**(5242), 1681-3.
- 28.- Coon, S.L., Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Ravault, J.P., Bodin, L., Voisin, P., Weller, J.L., Klein, D.C., & Chemineau, P. (1999). Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. Am J Physiol. **277**(5 Pt 1), E792-7.
- 29.- Cozzi, B. (1986). Cell types in the pineal gland of the horse: an ultrastructural and immunocytochemical study. Anat Rec. **216**, 165-74.
- 30.- Cozzi, B., & Ferrandi, B. (1984). Fine structure and histochemistry of the equine pineal gland, with special reference to the possible functional role of the electrodense intrapinealocyte bodies. Clin Vet. **107**, 337-46.
- 31.- Cozzi, B., Mikkelsen, J.D., Ravault, J.P., & Moller, M. (1992). Neuropeptide Y (NPY) and C-flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. J.Comp. Neurol. **316**, 238-250.
- 32.- Craft, C.M., Murage, J., Brown, B., & Zhan-Poe, X. (1999). Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. Brain Res Mol Brain Res. **65**(1), 44-51.
- 33.- De Reviere, M.M., Ravault, J.P., Tillet, Y., & Pelletier, J. (1989). Melatonin binding sites in the sheep pars tuberalis. Neurosci Lett. **100**(1-3), 89-93.
- 34.- Del Rio Hortega, P. (1922). Constitución histológica de la glándula pineal. Arch Neurob. **3**, 359-389.
- 35.- Descartes, R. (1709). Description du Corps Humain et passions de l'Ame. Oeuvres, Vol. XI. In Anonymous, Paris: Ch .y P. Tannery (Eds).
- 36.- Drew, J.E., Barrett, P., Williams, L.M., Conway, S., & Morgan, P.J. (1998). The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. J. neuroendocrinol. **Sep;10**(9), 651-661.

- 37.- Ebling, F.J., & Foster, D.L. (1989). Pineal melatonin rhythms and the timing of puberty in mammals. Experientia, 45(10), 946-54.
- 38.- Ervin, M.G., Leake, R.D., Ross, M.G., Calvario, G.C., & Fisher, D.A. (1985). Arginine vasotocin in ovine fetal blood, urine, and amniotic fluid. J Clin Invest, 75(5), 1696-701.
- 39.- Fawcett, D. (1995). Tratado de Histología (Bloom-Fawcett). (12ª ed.). Madrid: Interamericana.
- 40.- Ferrando Pons, A. (1988). Variaciones circadianas y estacionales del parénquima pineal del conejo: análisis morfológico y funcional. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- 41.- Fleming, J.V., Barrett, P., Coon, S.L., Klein, D.C., & Morgan, P.J. (1999). Ovine arylalkylamine N-acetyltransferase in the pineal and pituitary glands: differences in function and regulation. Endocrinology, 140(2), 972-8.
- 42.- Foldes, A., Maxwell, C.A., Scaramuzzi, R.J., Donnelly, J.B., Hoskinson, R.M., & Rintoul, A.J. (1985). Seasonal changes in the sensitivity of ovine pineal beta-adrenoceptors to steroids. Neuroendocrinology, 41(6), 494-8.
- 43.- 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 sheep pineal gland. J Pineal Res, 22(3), 130-6.
- 44.- Freund, D., Arendt, J., & Vollrath, L. (1977). Tentative immunohistochemical demonstration of melatonin in the pineal gland. Cell. Tiss. Res., 181, 239-244.
- 45.- García Mauriño, J., & Boya, J. (1992). Postnatal maturation of the parenchymal cell types in the rabbit pineal gland. Histol Histopathol, 7, 75-81.
- 46.- Gerlach, T., & Aurich, J.E. (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. Anim Reprod Sci, 58(3-4), 197-213.
- 47.- Giménez-González, M., Martínez Soriano, F., Amañanzas, E., & Ruiz Torner, A. (1991). Morphometric and structural study of the pineal gland of the Wistar rat subjected to the pulse action of a 52 Gauss, (50 Hz) magnetic field. Evolutive anlysis over 21 days. J. Hirnforsch., 6, 779-786.

- 48.- Gonzalez, G., & Álvarez-Uría, M. (1986). Morphometric analysis of the synaptic ribbons and nerve vesicles of the cat pineal gland after electrical stimulation of the superior ganglia. J. Pineal. Res., **3**, 15-23.
- 49.- Griem, W. (1975). Dies postmortalen Veranderunger der Schildruse des Rindes. Fleischwirtschaft, **55**(12), 1719-1723.
- 50.- Hazlerigg, D.G., Gonzalez-Brito, A., Lawson, W., Hastings, M.H., & Morgan, P.J. (1993). Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. Endocrinology, **132**(1), 285-92.
- 51.- Hazlerigg, D.G., Hastings, M.H., & Morgan, P.J. (1996). Production of a prolactin releasing factor by the ovine pars tuberalis. J Neuroendocrinol. **8**(7), 489-92.
- 52.- Heidbüchel, V., & Vollrath, L. (1983). Morphological findings relating to the problem of cortex and medulla in the pineal gland of rat and hamster. J. Anat., **136**, 723-734.
- 53.- Helliwell, R.J., & Williams, L.M. (1994). The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. J Endocrinol. **142**(3), 475-84.
- 54.- Hewing, M. (1980). Synaptic ribbons in the pineal system of normal and light deprived Golden hamster. Anat. Embryol., **159**, 71-80.
- 55.- Hira, Y., Sakai, Y., & Matsushima, S. (1998). Quantitative light microscopic study on the heterogeneity in the superficial pineal gland of the rat. Anat. Rec., **250**, 80-94.
- 56.- Howell, H.E., & Morgan, P.J. (1991). Beta-adrenergic stimulation increases cAMP and melatonin production in ovine pinealocyte cultures. J Pineal Res. **10**(3), 122-9.
- 57.- Huang, S., Nobbling, R., Schachner, M., & Taugner, R. (1984). Interstitial and parenchymal cells in the pineal gland of the golden hamster. Cell Tissues Res. **235**, 327-37.
- 58.- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2000). Histología Básica. Texto y Atlas. (5ª ed.). Barcelona: Masson.
- 59.- Kappers, J.A. (1965). Survey of the innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organs of vertebrates. Prog. Brain Res., **10**, 88-153.

- 60.- Karasek, M., King, T.S., Hansen, J.K., Petteborg, L.J., & Reiter, R.J. (1983). Inverse correlation between "synaptic" ribbons number and the density of adrenergic nerve endings in the pineal gland of various mammals. Anat. Rec., **205**, 93-99.
- 61.- Karasek, M., Lewinski, A., & Vollrath, L. (1988). Precise annual changes in the numbers of "synaptic" ribbons and spherules in the rat pineal gland. Journal of Biological Rhythms, **3**(1), 41-48.
- 62.- Karasek, M., & Vollrath, L. (1982). "Synaptic" ribbons and spherules of the rat pineal gland: day/night changes in vitro. Exp. Brain Res., **46**, 205-208.
- 63.- Kennaway, D.J., & Seamark, R.F. (1975). The occurrence of Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in fetal sheep pineal tissue and its relationship to preparturient endocrine changes. J. Reprod. fertil., **45**(529-531)
- 64.- Khaledpour, C., & Vollrath, L. (1987). Evidence for the presence of two 24-hour rhythms 180° out of phase in the pineal gland of male Pirbright-White guinea pigs as monitored by counting "synaptic" ribbons and spherules. Exp. Brain Res., **66**, 185-190.
- 65.- King, J.A., & Millar, R.P. (1981). Decapeptide luteinizing hormone releasing hormone in ovine pineal gland. J Endocrinol., **91**(3), 405-14.
- 66.- King, T.S., & Dougherty, R.J. (1982). Effects of denervation on synaptic ribbon populations in the rat pineal gland. J. Neurocytol., **11**, 19-28.
- 67.- Kurumado, K., & Mori, W. (1977). A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. Cell issue Res., **182**, 565-568.
- 68.- Lang, K. (1959). Anatomische und histologische untersuchungen der epiphysis cerebri von rind und schaf. Thesis, München .
- 69.- Leake, R.D., Stegner, H., Ross, M.G., Ervin, M.G., Oddie, T.H., & Fisher, D.A. (1986). Diurnal variations in plasma arginine vasotocin (AVT) concentrations in the ovine fetus. Life Sci., **38**(16), 1485-90.
- 70.- Lee, H., Esquivel, E., & Wise, M.E. (1999). Inhibition of hypothalamic GnRH secretion in the ewe by antigonadotropic decapeptide during the estrous cycle and nonbreeding season. Endocrine, **11**(1), 75-82.
- 71.- Lincoln, G.A. (1998). Photoperiod-melatonin relay in deer. Acta Vet Hung., **46**(3), 341-56.

- 72.- López Iglesias, C., Arias, J.C., & Álvarez Uría, M. (1987). The rat pinealocyte during the estrous cycle. A morphometric study. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exper., **75**, 19-27.
- 73.- López-Muñoz, F., Boya, J., Calvo, J., & Martín, F. (1992 a). Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in rat pineal stalk astrocytes. Histol Histopathol., **7**, 643-6.
- 74.- López-Muñoz, F., Calvo, J., Boya, J., & Carbonell, A. (1992 b). Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in glial cells of the adult rat pineal gland. J Pineal Research., **12**, 145-8.
- 75.- Lues, G. (1971). Die feinstruktur der zirbeldrüse normaler, trächtiger und experimentell beeinflusster meerschweinchen. Z.Zellforsch., **114**, 38-60.
- 76.- Malpoux, B., Skinner, D.C., & Maurice, F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. J Neuroendocrinol., **7(3)**, 199-206.
- 77.- Malpoux, B., Thiery, J.C., & Chemineau, P. (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. Reprod Nutr Dev., **39(3)**, 355-66.
- 78.- Martínez Soriano, F. (1987). Glándula pineal: estructura y función. In Anonymous, Valencia: Editorial Gregori.
- 79.- Martínez Soriano, F., Hernández Gil De Tejada, T., Cimas García, C., & Armañanzas, E. (1992). Pineal "synaptic" ribbons evolution over a 24 hour period during two different photoluminous seasons, a comparative and statistical analysis. J. Hirnforschung., **33(3)**, 271-275.
- 80.- Martínez Soriano, F., Hernández-Gil de Tejada, T., López Bigorra, M., Ballester Carmona, S., & Vollrath, L. (1999). Circadian and seasonal changes of synaptic bodies in different parts of the rabbit pineal gland. Histol. Histopathol., **14**, 1079-1091.
- 81.- Martínez Soriano, F., Ruiz-Torner, A., Lombillo de Oñate, M., & Valverde-Navarro, A.A. (2000). Evolution of synaptic body numbers in the pineal gland of the cat over a 24-hour period in spring. a descriptive morphometric and statistical analysis. Eur. J. Anat., **4((3))**, 169-176.
- 82.- Martínez Soriano, F., Welker, H.A., & Vollrath, L. (1984). Correlation of the number of pineal "synaptic" ribbons and spherules with the level of serum melatonin over a 24-hour period in male rabbits. Cell. Tissue Res., **236**, 555-560.

- 83.- Matshushima, S., Sakai, Y., & Hira, Y. (1989). Twenty-four changes in pinealocytes, capillary endothelial cells and pericapillary and intercellular spaces in the pineal gland of the mouse. Cell Tissue Res., 255, 323-332.
- 84.- Matshushima, S., Sakai, Y., & Hira, Y. (1990). Effect of photoperiod on pineal gland volume and pinealocyte size in the Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. Am. J. Anat., 187, 32-38.
- 85.- Matsushima, S., Morisawa, Y., Aida, I., & Abe, E. (1983). Circadian variations in pinealocytes of the Chinese Hamster, *Cricetulus griseus*. A quantitative electron microscopic study. Cell Tissue Res., 228, 231-244.
- 86.- Matthews, S.G., Parrott, R.F., & Sirinathsinghji, D.J. (1993). Distribution and cellular localization of vasopressin mRNA in the ovine brain, pituitary and pineal glands. Neuropeptides, 25(1), 11-7.
- 87.- Maxwell, C.A., Rintoul, A.J., Foldes, A., Downing, J.A., Scaramuzzi, R.J., & Carter, N.B. (1989). Seasonal modification of ovine pineal function. 2. Steroidal effects on melatonin and prolactin profiles. Neuroendocrinology, 50(3), 274-9.
- 88.- Mc Nulty, J.A. (1980). Ultrastructural observations on synaptic ribbons in the pineal organ of the goldfish. Cell Tissue Res, 210, 249-256.
- 89.- Mc Nulty, J.A. (1986). Phylogeny and functional implications of synaptic ribbons in the pineal gland. IRCS Med. Sci., 14, 855-858.
- 90.- Mc Nulty, J.A., & Fox, L.M. (1992). Pinealocyte synaptic ribbons and neuroendocrine function. Microsc. Res. Techn., 21, 175-187.
- 91.- Mockett, B.G., & Lapwood, K.R. (1994). Changes in ovine pineal gland neuron-specific enolase immunoreactivity following bilateral, but not unilateral, superior cervical ganglionectomy. J Pineal Res, 16(4), 202-9.
- 92.- Moller, A., Inglid, A., & Bock, E. (1978). Immunohistochemical demonstration of S-100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. Brain Research, 140, 1-13.
- 93.- Moller, M., Ravault, J.P., Cozzi, B., Zhang, E.T., Phansuwan-Pujito, P., Larsen, P.J., & Mikkelsen, J.D. (1991). The multineuronal input to the mammalian pineal gland. Adv. Pineal. Res., 6, 3-12.
- 94.- Morgan, P.J., Williams, L.M., Lawson, W., & Riddoch, G. (1988). Stimulation of melatonin synthesis in ovine pineals in vitro. J Neurochem, 50(1), 75-81.

- 95.- Namboodiri, M.A., Valivullah, H.M., & Moffett, J.R. (1991). Regulation of melatonin synthesis in the ovine pineal gland. Adv Exp Med Biol, 294, 137-48.
- 96.- Noteborn, H.P., de Koning, J., de Jong, F.H., Ebels, I., & Salemink, C.A. (1992). Identification of luteinizing hormone-like proteins in the ovine pineal gland. J Pineal Res, 12(3), 118-27.
- 97.- Noteborn, H.P., Graf, M.V., Ernst, A., Schoenenberger, G.A., Weusten, J.A., Ebels, I., & Salemink, C.A. (1988 a). Purification and characterization of DSIP-like material from ovine pineal glands: possible peptide-protein interaction. J Pineal Res, 5(2), 161-77.
- 98.- Noteborn, H.P., Reinharz, A.C., Pevet, P., Ebels, I., & Salemink, C.A. (1988 b). Neurohypophyseal hormone-like peptides in the ovine pineal gland using reverse-phase liquid chromatography and radioimmunoassay. Peptides, 9(3), 455-62.
- 99.- Noteborn, H.P., Slama-Scemama, A., de Koning, J., de Jong, F.H., Ramakers, G.A., Ebels, I., & Salemink, C.A. (1988 c). Studies on a high molecular weight luteinizing hormone release stimulating factor of the ovine pineal gland. J Neural Transm, 72(1), 19-36.
- 100.- Noteborn, H.P., van Balen, P.P., van der Gugten, A.A., Hart, I.C., Ebels, I., & Salemink, C.A. (1993). Presence of immunoreactive growth hormone and prolactin in the ovine pineal gland. J Pineal Res, 14(1), 11-22.
- 101.- Peinado, J., Fernández, N., Rodríguez, M., & Torres, A. (1993). Manejo de la reproducción del ganado ovino de carne. Valencia: Generalitat Valenciana.
- 102.- Popova, N.K., Kolaeva, S.G., & Dianova, I.I. (1975). State of the pineal gland during hibernation. Bull. Exp. Biol. Med., 79(467-468)
- 103.- Privat, K., Fevre-Montange, M., Brisson, C., Chesneau, D., & Ravault, J.P. (1999 a). Regulation of melatonin synthesis in the ovine pineal gland. An in vivo and in vitro study. Adv Exp Med Biol, 460, 133-5.
- 104.- Privat, K., Ravault, J.P., Chesneau, D., & Fevre-Montange, M. (1999 b). Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina. J Pineal Res, 26(4), 193-203.
- 105.- Quay, W.B. (1973). Twenty-four-hour rhythmicity of pineal canaliculi and evidence for their intrinsic humoral regulation. Physiologist, 16, 427

- 106.- Quay, W.B. (1974 a). Pineal canaliculi: demonstration, twenty-four-hour rhythmicity and experimental modification. Amer. J. Anat., **139**, 81-94.
- 107.- Quay, W.B. (1974 b). Pineal chemistry in Cellular and physiological mechanism. In Anonymous, New York: Springfield, IL, Charles C. Thomas.
- 108.- Quay, W.B., & Renzoni, A. (1964). Daily karyometric and mitotic rhythm of pineal and parenchymal cells in the rat. Am. Zoologist, **4**, 416-417.
- 109.- Quay, W.B., & Renzoni, A. (1966). Twenty-four-hour rhythms in the pineal mitotic activity and nuclear and nucleolar dimensions. Growth, **30**, 315-327.
- 110.- Rahmani, H.R., Muge, D.K., & Ingram, C.D. (1997). Pharmacological characterisation of oxytocin binding sites in the ovine pineal gland. Regul Pept, **70**(1), 23-7.
- 111.- 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 Res, **27**(1), 1-8.
- 112.- Ravault, J.P., Cozzi, B., Fahrenkrug, J., Mikkelsen, J.D., & Moller, M. (1990). Presence of VIP- and PHI-containing nerve fibers in the pineal gland of ganglionectomized sheep. Fifth colloquium of the European Pineal Study Group. Abstract 81.
- 113.- Redondo, E., Franco, A., & Regodon, S. (1996). Prenatal development of the sheep pineal gland: an ultrastructural study. J. Pineal Res., **21**, 140-148.
- 114.- Regodon, S., Franco, A., Masot, J., & Redondo, E. (1998 a). Structure of the ovine pineal gland during prenatal development. J Pineal Res, **25**(4), 229-39.
- 115.- Regodon, S., Franco, A.J., Gazquez, A., & Redondo, E. (1998 b). Presence of pigment in the ovine pineal gland during embryonic development. Histol Histopathol, **13**(1), 147-54.
- 116.- Reinharz, A.C., Noteborn, H.P., Klein, M., Vallotton, M.B., Ebels, I., & Pevet, P. (1985). Presence of immunoreactive neurophysins of a higher molecular weight in addition to the 10.000 form in the ovine pineal gland. Peptides, **6**(2), 199-203.
- 117.- Romijn, H.J. (1973). Structure and innervation of the pineal gland of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* L. II. An electron microscopic investigation of the pinealocytes. Z. Zellforsch., **141**, 545-560.

- 118.- Romjin, H.J. (1975). The ultrastructure of the rabbit pineal gland after sympathectomy, parasympathectomy, continuous illumination and continuous darkness. J. Neural Transm., 36, 83-94.
- 119.- Santamarina, E., & Venzke, W.G. (1953). Physiological changes in the mammalian pineal gland correlated with the reproductive system. Amer. J. Vet. Res., 14, 555-562.
- 120.- Schachner, M., Huang, S., Ziegelmeüller, P., Bizzini, B., & Taugner, R. (1984). Glial cells in the pineal gland of mice rats. A combined immunofluorescence and electron-microscopic study. Cell Tissue Research, 237, 245-52.
- 121.- Seidel, A., Sousa-Neto, J.A., Klaulke, N., Huesgen, A., Manz, B., & Vollrath, L. (1990). Effects of adrenergic agonists and antagonists on the numbers of synaptic ribbons in the rat pineal gland. Eur. J. Cell Biol., 52, 163-168.
- 122.- Semm, P., Schneider, T., & Vollrath, L. (1981). Morphological and electrophysiological evidence for habenular influence on the Guinea-pig pineal gland. J. Neural. Transm., 50, 247-266.
- 123.- Skinner, D.C., & Malpoux, B. (1999). High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. Endocrinology, 140(10), 4399-405.
- 124.- Sousa-Neto, J.A., Seidel, A., Vollrath, L., & Manz, B. (1990). Synaptic ribbons of the rat pineal gland: responses to in vivo and in vitro treatment with inhibitors of protein synthesis. Cell Tissue Res., 260, 63-67.
- 125.- Sthele, J.H., Foulkes, N.S., Molina, C., Simmoneaux, V., Pevet, P., & Sassonecorsi, P. (1993). Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. Nature, 365, 314-320.
- 126.- Struwe, M.C., & Vollrath, L. (1990). 'Synaptic' bodies in the pineal glands of the cow, sheep and pig. Acta Anat (Basel), 139(4), 335-40.
- 127.- Sugden, D., Namboodiri, M.A., Klein, D.C., Pierce, J.E., Grady, R., & Mefford, I.N. (1985). Ovine pineal alpha 1-adrenoceptors: characterization and evidence for a functional role in the regulation of serum melatonin. Endocrinology, 116(5), 1960-7.
- 128.- Vigh, B., Szél, A., Debreceni, K., Féjer, Z., Manzano e Silva, M., & Vigh-Teichmann. (1998). Comparative histology of pineal calcification. Histol Histopathol, 13, 851-70.

- 129.- Vivien-Roels, B., Pevet, P., Zarazaga, L., Malpoux, B., & Chemineau, P. (1999). Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-ML) in ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. J Pineal Res. 27(4), 230-6.
- 130.- Vollrath, L. (1973). Synaptic ribbons of a mammalian pineal gland. Circadian changes. Z.Zellforsch. 145, 171-183.
- 131.- Vollrath, L. (1981). The pineal organ in Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, vol VI/7. In Anonymous, (pp. 1-665). Berlin: Oskene,A.// Vollrath,L.Springer.
- 132.- Vollrath, L., & Welker, H.A. (1984). No correlation of pineal synaptic ribbon numbers and melatonin formation in individual rat pineal glands. J. Pineal Res. 1, 187-195.
- 133.- Welsh, M.G., Cameron, A.L., & Reiter, J.R. (1979). The pineal gland of the Gerbil, *Meriones unguiculatus*. II. Morphometric analysis over a 24 hour period. Cell Tissue Res. 204, 95-109.
- 134.- Wheaton, J.E. (1980). Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in ovine pineal glands. Horm Metab Res. 12(7), 314-7.
- 135.- Williams, L.M., Morgan, P.J., Pelletier, G., Riddoch, G.I., Lawson, W., & Davidson, G.R. (1989). Neuropeptide Y (NPY) innervation of the ovine pineal gland. J Pineal Res. 7 (4), 345-53.
- 136.- Zach, B. (1960). Topographie und mikroskopisch-anatomischer feinaufbau der epiphysis cerebri von hund and katze.Anat. Histol. Embryol.7, 273-303.
- 137.- Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Guillaume, D., Bodin, L., & Chemineau, P. (1998). Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. Am J Physiol. 274(6 Pt 1), E1086-90.
- 138.- Zrener, C. (1985). Pineal Research Reviews, vol. III. In Anonymous, Theories of pineal function from classical Antiquity to 1900: A history. New York: Alan R Liss.

