

INFLUENCIA DEL BULBO OLFATORIO SOBRE LAS CELULAS CORTICOTROPAS

*A. Pérez Casas **
*A. López Muñiz **
*M. Bengoechea González**

INTRODUCCION

La influencia que el sistema límbico tendría en la secreción endocrina ha sido origen de distintos trabajos con resultados muy diversos.

Es preciso destacar la importancia del bulbo olfatorio en la esfera endocrina, ya que esta estructura anatómica es la principal vía de información en los animales macrosmóticos, como es el utilizado en nuestro trabajo.

En este sentido hemos demostrado que el bulbo olfatorio influye en la secreción de prolactina (Pérez Casas y López Muñiz). Esta afirmación coincide con las observaciones realizadas por otros autores (Mangat² y Leadmen³). Sin embargo, no existen trabajos que analicen las consecuencias de la bulbectomía sobre la producción de ACTH, aunque sí se hayan realizado estudios sobre las repercusiones que la destrucción del bulbo olfatorio originaría en las hormonas periféricas y sus metabolitos.

Así, Montilla⁴ no encontró alteraciones en los niveles circulantes de hormonas producidas por la corteza suprarrenal en los 25 días consecutivos a la bulbectomía unilateral. Hull⁵ tampoco encontró modificaciones en las citadas hormonas después de la operación. Palmi⁶ y Lecuona,⁷ tras la estimulación eléctrica o química del bulbo olfatorio encontra-

ron aumento de la actividad corticotropa; el primero registró deplección de ácido ascórbico en las suprarrenales, y el segundo, aumento en la corticosterona plasmática; por otro lado, Leyber⁹ y Feldmann,¹⁰ tras la destrucción de los bulbos olfatorios o áreas hipotalámicas (en relación con el olfato) han encontrado que la corticosterona en sangre o sus metabolitos en orina disminuyen en forma notable.

Por otro lado, tenemos la confirmación histológica de la existencia de fibras nerviosas que parten del bulbo olfatorio y regiones ventrales de la vía olfatoria y alcanzan zonas hipotalámicas. (Palkovits,^{11,12} Zaborsky,¹³ Crowley¹⁴ y Halasz,¹⁵ relacionadas con la adenohipófisis.)

Hemos procedido a la exéresis de los bulbos olfatorios y al estudio posterior de las células corticotropas mediante técnicas histológicas modernas en la adenohipófisis de un grupo de animales y hemos comparado los resultados con el estudio histológico de preparaciones procedentes de la glándula pituitaria de animales intactos o que habían pasado por una operación simulada (craniectomía sin extirpación de tejido nervioso).

De esta manera estudiaremos el efecto que el bulbo olfatorio puede hacer sobre la producción de ACTH.

Se sabe que esta hormona interviene en "la reacción de defensa o alarma" ante un estímulo físico que causa *stress*.

De aquí que no solamente investigaríamos la influencia del bulbo olfatorio en la produc-

* Doctores profesores del Depto. de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, España.

ción de corticotropina, sino también el significado que el olfato pueda tener en "la reacción de alarma" del animal.

MATERIAL Y METODO

Hemos usado como materiales de experimentación 108 ratas blancas machos cepa Wistar, alimentadas libremente con "pienso artificial".

Planteamiento

Se sacrificaban animales cada 15 días, empezando a los 15 días después de la operación (animales experimentales) o de la selección (animales testigo) y se terminó a los 6 meses de elección del animal. Cuadro I.

Cuadro I

15 días	3	3	3
1 mes	3	3	3
1 mes y medio	3	3	3
2 meses	3	3	3
2 meses y medio	3	3	3
3 meses	3	3	3
3 meses y medio	3	3	3
4 meses	3	3	3
4 meses y medio	3	3	3
5 meses	3	3	3
5 meses y medio	3	3	3
6 meses	3	3	3
	<u>36</u>	<u>36</u>	<u>36</u>

Cada 15 días se sacrificaban 9 animales, de los que tres pertenecerían a los bulbectomizados, tres al grupo de animales de operación simulada (a los que se les practicaba la trepanación pero no se les extirpaba ninguna estructura nerviosa) y tres testigos (que se habían separado y estaban en contacto con los animales de experimentación). Cuadro II.

Cuadro II

Animales controles:	36
Animales craneotomizados:	36
Animales bulbectomizados:	<u>36</u>
	108 animales.

Bulbectomía

Tras la anestesia con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal e inmovilización en un arco metálico (semejante al usado en esterotaxia), se rasuró la cabeza del animal, se realizó la incisión de 1 cm de longitud y de situación interocular, en sentido anteroposterior.

Retirada la piel y la aponeurosis epicraneal, se perfora el cráneo con un trépano de 1 cm de diámetro y se retira posteriormente el disco óseo.

A continuación se electrocoagula el seno longitudinal superior y se abre la duramadre. Llegado a este punto se procede a suturar de nuevo cada plano en el grupo de animales con operación simulada (craniectomizados solamente).

En los animales experimentales, con una sonda de microaspiración de 0.8 mm de diámetro, se aspiran ambos bulbos olfatorios. Esta operación será realizada con un equipo de microcirugía (foto 1).

Se comprobará la perfección en la realización de la bulbectomía (foto 2).

Se hace hemostasia por coagulación bipolar y Surgical^R.

Se cierra por planos, dejando abierta la duramadre, sin reponer el hueso.

Los animales serán sometidos a cuidados posoperatorios y vigilancia intensiva en las 24 horas siguientes.

Valoración de resultados

Hemos utilizado las técnicas histológicas más recientes y de resultados comprobados para identificar las células corticotronas.

Las técnicas utilizadas han sido:

- 1) de hematoxilina de plomo;
- 2) del aldehidotionina-PAS-orange G.

Con la segunda técnica, las células corticotropas aparecen teñidas por la aldehidotionina, igual que las células tireotropas (aunque existen características diferenciales en la morfología de cada uno de estos grupos celulares).

La primera técnica posee mayor especificidad, ya que sólo son teñidas por la *hematoxilina de plomo* las células corticotropas. Este dato ha sido comprobado en nuestros trabajos ya

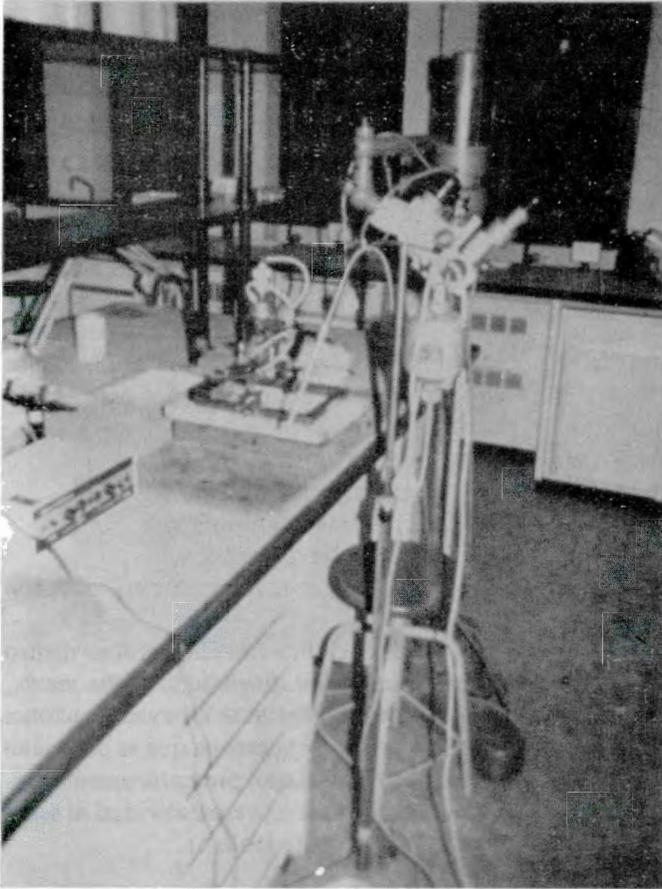


Foto 1.- Detalle del material de microcirugía empleado.

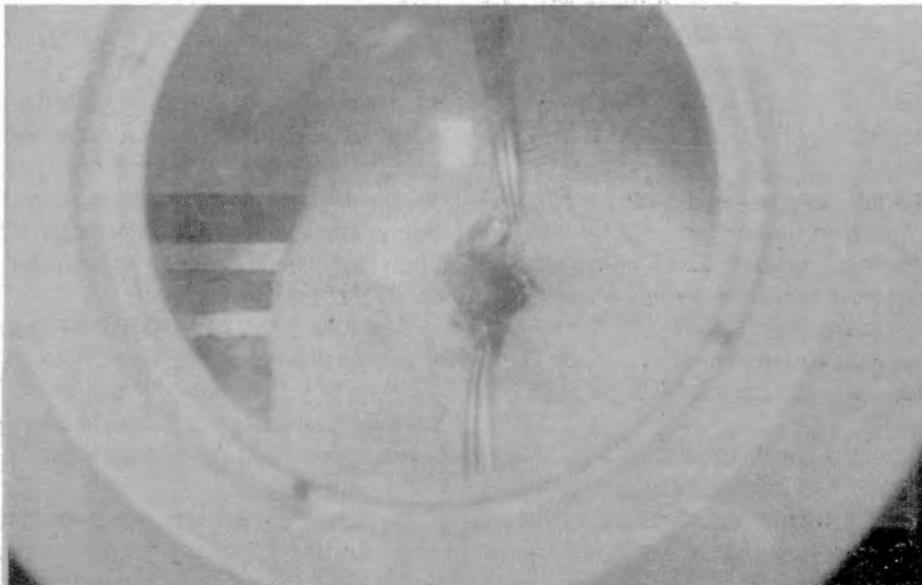


Foto 2.- Observación del endocráneo de una rata a la que se han extirpado los bulbos olfatorios.

que las células coloreadas poseen las características propias de las productoras de ACTH, y existen estudios realizados por diversos autores en distintos animales experimentales que, con técnicas histoinmunológicas, ratifican nuestra observación. Así, citaremos a Marchand¹⁶ quien trabajó en patos y Dubois¹⁷ en pollos; Romanin¹⁸ en peces, lo mismo que Olivereau.¹⁹ Al igual que Hansen,²⁰ Andrieux²¹ ha utilizado anfibios. Por otra parte, tenemos en mamíferos los magníficos trabajos de Bugnon²² y Ryan²³ en hipófisis de fetos humanos.

Nuestros resultados son superponibles con las dos técnicas, y, dada su mayor especificidad, hemos elegido las microfotografías de las preparaciones teñidas con la técnica de la *hematoxilina de plomo*.

Una vez fijadas las piezas en Bouin-Hollander-sublimado, han sido incluidas en parafina y cortadas a 4-5 micras, se desparafinan y se eliminan los precipitados mercuriales.

Los cortes se introducen en una mezcla de hematoxilina plúmbica, preparada en el momento de su utilización, durante más de cinco horas; pasadas éstas, se procede a la eliminación de precipitados y montaje de las preparaciones para observación al microscopio.

Las células corticotropas aparecerán con tinte azulado en contraste con otros tipos celulares que permanecerán cromóforos (fotos 3 y 4).

RESULTADOS

En los animales testigo las células corticotropas aparecen teñidas por el colorante, en tanto que los restantes tipos celulares presentan citoplasma cromóforo aunque a veces sus núcleos toman color (fotos 3 y 4).

En los animales de operación simulada los resultados son semejantes a los de animales testigo.

Durante los primeros tiempos de la experimentación se observa disminución ligera en el número de células corticotropas con reducción de la colorabilidad. Se han observado alteraciones de signo variable en los gránulos citoplásmicos (aumento o disminución de su diámetro). Los núcleos presentaban aumento

de coloración (foto 5).

Después del segundo mes destacan:

- reducción del número y volumen celular (aunque existen algunos elementos hipertróficos);
- deformidades del citoplasma (con desgranulación);
- deformidades nucleares.

Todas estas alteraciones alcanzan su máximo en los animales que vivieron seis meses después de intervenidos y puede llegar a disminución muy considerable de la población celular corticotropa. Está formada por células que muestran:

- tamaño pequeño;
- límites retraídos e imprecisos;
- citoplasmas desgranulados;
- núcleos hipercromáticos;
- aumento del cociente núcleo/citoplásmico.

Estas alteraciones van enmarcadas dentro de una *celularidad disminuida globalmente*, en la que pueden destacar las modificaciones de la población corticotropa que se presentan (según hemos señalado) prematuramente y alcanzan su máxima representatividad al sexto mes del experimento (foto 6).

DISCUSION

Disentimos de los resultados obtenidos por Hull⁵ pero no de los obtenidos por Montilla,⁴ ya que este autor analizó los resultados a corto plazo (estudió los 25 primeros días) de la bulbectomía unilateral y, según nuestros trabajos, la ablación unilateral no se acompaña de alteraciones significativas; por otro lado, los controles deben realizarse en periodos mayores de tiempo.

Nuestros resultados están acordes con las observaciones de Palmi,⁶ Lecuona,⁷ Loyber^{8,9} y Feldmann,¹⁰ que por distintos métodos, estimulación o destrucción, indican que el bulbo olfatorio podría estimular la actividad corticotropa.

Sin embargo, todos estos autores han analizado el eslabón final de este eje, es decir, los niveles plasmáticos de las hormonas suprarrenales o de sus metabolitos en orina, sin que se haya determinado a qué nivel se producen las

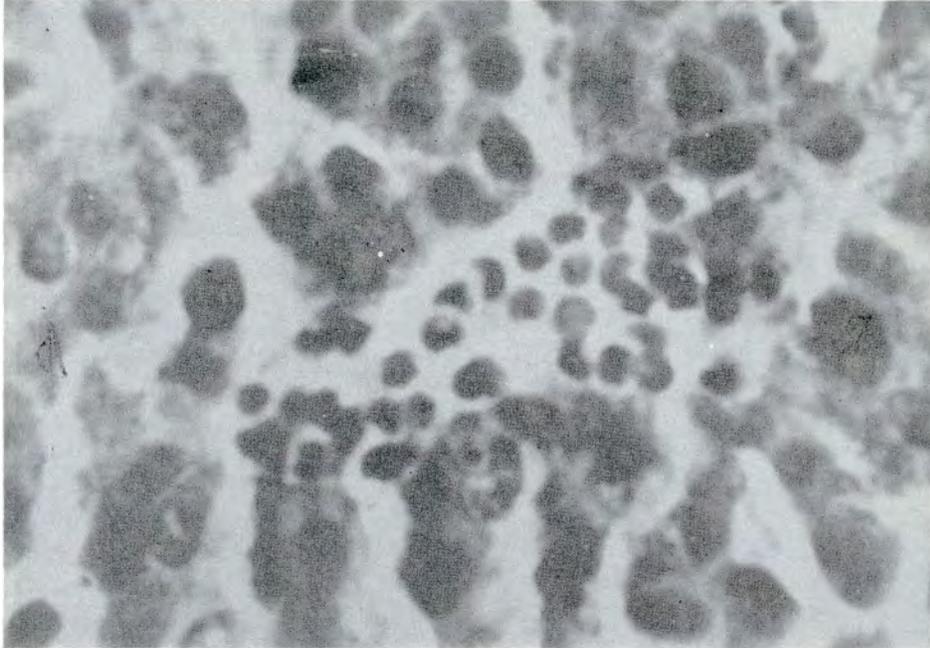


Foto 3.- Microfotografía tomada con objetivo de inmersión en un animal testigo. Grupo de células corticotropas, en la proximidad de un capilar, con las características morfológicas normales.

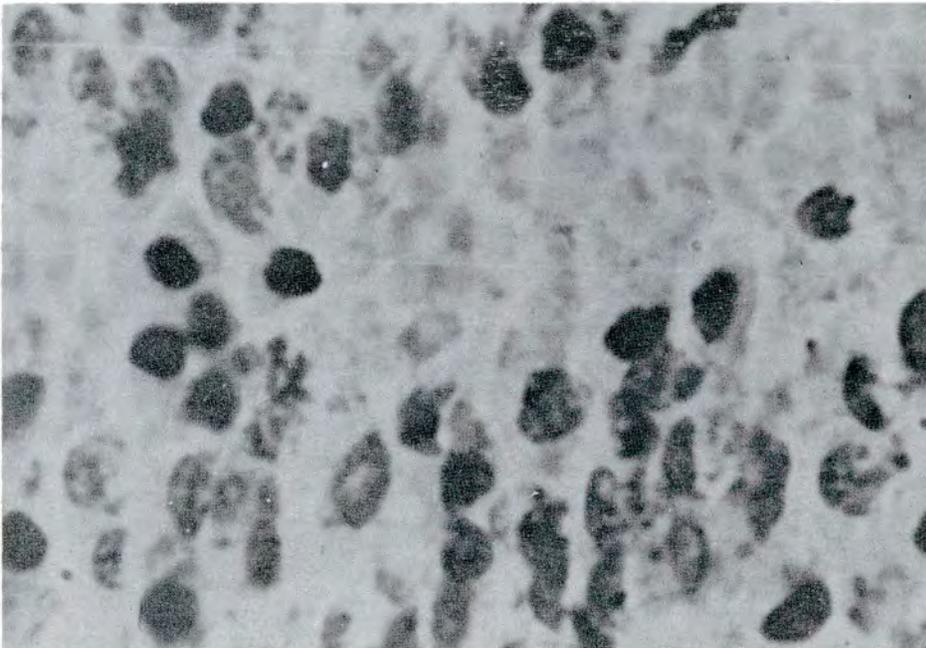


Foto 4.- Adenohipófisis de un animal testigo (1,250 aumentos). Las células no corticotropas aparecen con su citoplasma sin teñir (los núcleos pueden teñirse o no).

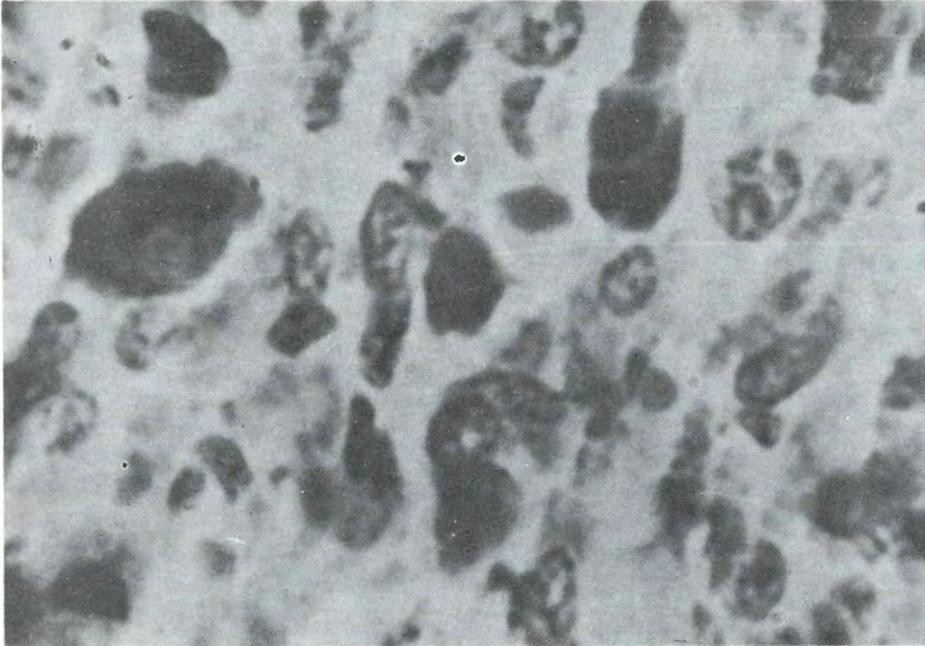


Foto 5.- Animal sacrificado a los dos meses de la bulbectomía. Objetivo de inmersión. Células corticotropas deformes con núcleos muy alterados.

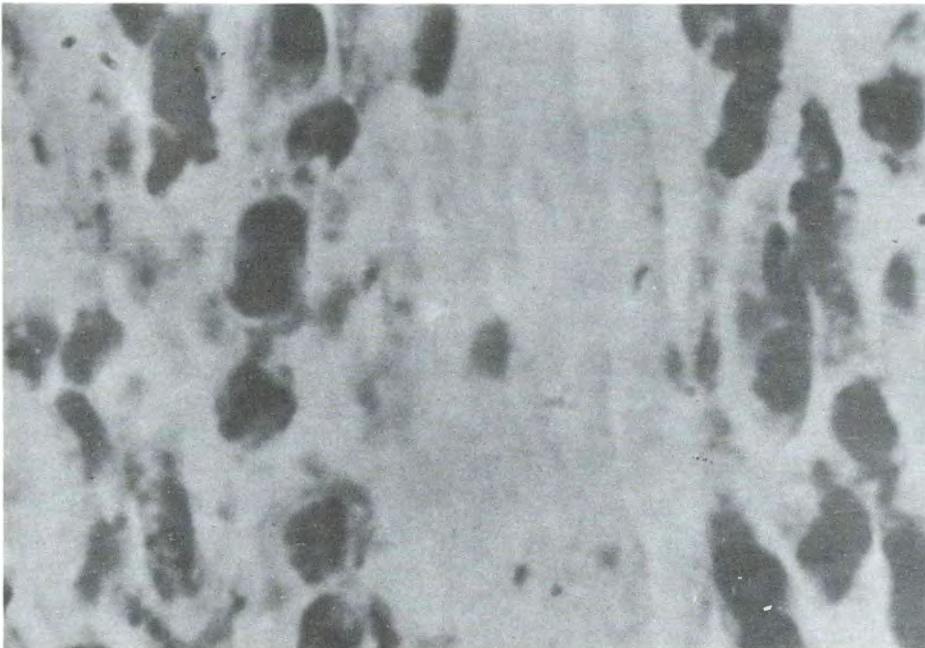


Foto 6.- Animal sacrificado a los seis meses de la bulbectomía. Microfotografía tomada con objetivo de inmersión. Gran disminución de todas las estirpes celulares, células corticotropas con netos signos regresivos.

modificaciones y, en consecuencia, cuál sería el mecanismo de estas transformaciones.

Al destruir los bulbos olfatorios (ya que la estimulación posee un mayor margen de error al valorar los resultados) hemos encontrado que se produce disminución en la secreción de ACTH y que ésta, a su vez, causa disminución de la actividad de la corteza suprarrenal. Esta disminución en la producción de corticotropina podría obedecer a decremento en la liberación hipotalámica, factor de liberación, ya que los núcleos hipotalámicos reciben proyecciones desde el bulbo olfatorio y regiones ventrales del cerebro, según han demostrado Pal-kovits^{11,12} y Zaborsky,¹³ aunque también debemos señalar que estas regiones olfatorias envían proyecciones que alcanzan la eminencia media (Crowley¹⁴ y Halasz¹⁵) y podrían controlar la secreción de la adenohipófisis sin utilizar el hipotálamo como eslabón intermedio; hipótesis que no aceptan gran número de investigadores, entre los que destacaremos a Zaborsky¹³.

En consecuencia, podemos afirmar que el bulbo olfatorio estimula la producción de corticotropina (ACTH), debido a que su destrucción origina profundas modificaciones en la estirpe corticotropa de la adenohipófisis y, por tanto, se producirá depresión del eje pituitario-corticosuprarrenal.

También debemos destacar que el olfato, y concretamente el bulbo olfatorio, interviene en la reacción de alarma del animal, ya que su acción pone en funcionamiento el citado eje endocrino, base fisiológica de la reacción de defensa a un estímulo agresor del perimundo; en este sentido recordaremos que en los animales inferiores (anfioxo o ascidia) existe relación íntima entre el sistema de filtro-alimentación del animal y el esbozo de lo que será en animales superiores la glándula hipófisis, el cual posee células de características similares a las corticotropas, capaces de elaborar sustancias que protegen al ser viviente del acoso exterior (Barrington²⁴).

RESUMEN

La extirpación quirúrgica de los bulbos olfatorios en la rata origina gran disminución en el

número de células corticotropas, acompañada de incremento de los signos regresivos en los elementos celulares existentes.

Se considera la posibilidad de que la extirpación de los bulbos olfatorios causa decremento primario de la actividad del eje corticotropo seguida por una disminución secundaria en la reacción de alarma o defensa del animal.

SUMMARY

Surgical removal of the olfactory bulbs in the rat caused a marked decrease in the number of corticotroph cells, which was accompanied by an increase of the regressive signs in the existents cells.

The possibility that olfactory bulbs removal caused a primary decrease in corticotrophic axis activity followed by a secondary diminution of the alarm response, is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. Pérez Casas, A., A. López Muñiz, M. Bengoechea y F. Seijo: "Estudio de las células de prolactina en ratas bulbectomizadas". *Phronesis* (Organo Oficial de la Sociedad Iberoamericana de Ciencias Neurológicas). Aceptado, pendiente de publicación, 1983.
2. Mangat, H. K.: "Influence of Limbic system on prolactin secretion in rats". *Indian J. Exp. Biol.* 15, 1042-1043, 1977.
3. Leadem, C. A.: "Morphological correlations of pineal inhibition of prolactin cell activity in blind-anosmic female rats". *An. Rec.* 202, 3, 110A, 1982.
4. Montilla, P., M. E. Bellido, M. L. Dorado y R. Muñoz: "Influencia de la extirpación bilateral de los bulbos olfatorios sobre las fluctuaciones diarias de los niveles de corticosterona plasmática". *Rev. Española. Fisiol.* 33, 17-20, 1977.
5. Hull, C.M.: "Pituitary-adrenal hormones do not influence bulbectomy induced behaviour changes". *Physiol Behav.* 22 (3), 417-421, 1979.
6. Palmi, J.A., N.I. Perassi and I. Loyber: "Effect of the olfactory bulbs removal on the hypophyseal-adrenal axis". *Life science*, 10, 908-918, 1971.
7. Leucona, F.A., N.I., Petassi, J.A. Palmi and I. Loyber: "Effect of electrochemical stimulation of the olfactory bulbs on the plasmatic corticosterone levels". *J. Endocrinol.* 54, 353-354, 1972.
8. Loyber, I., N.I. Perassi, F.A. Leucona and M.E. Peralta.: "Effect of the bilateral olfactory bulbs removal on the plasmatic corticosterone levels". *Neuroendocrinology* 13, 93-94, 1974.
9. Loyber, I., F.A. Leucona, J.A., Palmi and N.I. Perassi: "The influence of the bilateral destructions of

- the olfactory bulbs on the urinary 17-hydroxycorticosteroid levels". *Medicina (Buenos Aires)* 31,391-392, 1971.
10. **Feldman, S.N.:** "Complete inhibition of adrenocortical responses following sciatic nerve in rats with hypothalamic islands". *Acta Endocrin.* 78,539-544, 1975.
 11. **Palkovits, M., E. Mezoy and L. Zaborsky:** "Adrenergic innervation of the rat hypothalamus". *Neurosc. Lett.* 18,237-243, 1980.
 12. **Palkovits, M. and L. Zaborsky:** "Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: experimental, biochemical and electron microscopic studies". *Brain Res.* 191,160-171, 1980.
 13. **Zaborsky, L.:** "Afferent connections of the medial basal hypothalamus". *Ed. Springer-Verlag (Berlin).* 107 p., 1982.
 14. **Crowley, W.R. and L.C. Terry:** "Biochemical mapping of somatostatinergic system in rat brain: effects of periventricular hypothalamic and medial basal amygdaloid lesions on somatostatin like immunoreactivity in discrete brain nuclei". *Brain Res.* 200, 283-291, 1980.
 15. **Halasz, B., M. Rethelyi and M. Bodoky:** "Intra and extrahypothalamic neuronal circuits in the control of anterior pituitary function". *Ed. Cumming A., Funder J.W., Mendelshon F.* "Endocrinology. Australian Academy of Science, Canberra (proc. of the VI Int. Cong. of Endocrinol). Melbourne, 630-633, 1980.
 16. **Marchand, C.R.:** "Immunological characterization of the gonadotropic and corticotropic cells of adenohipophysis of the barbary druck". (Cairina Moschata L.) *Gen. comp. Endocrin.* 29, 2, 265 (res), 1976.
 17. **Dubois, M.P.:** "Recherche par immunofluorescence des cellules adenohipophysaires élaborant des hormones polypeptidiques: ACTH: a-MSH, b-MSH. *Bull. Assoc. Anat.* 57,156,63-67, 1973.
 18. **Romain, R.:** "Etude cytoimmunologique des cellules hématoxyline au plomb positives de l' adenohipophyse de la tanche (*Tinca tinca*). *C. R. Soc. Biol.* 168, 1245-1248, 1974.
 19. **Olivereau, M. et C. Burnon:** "Localización cytoimmunológica de MSH et d' ATCH dans les cellules hipophysaires colorables avec l'hématoxyline au plomb chez l'anguille." *C. R. Acad. Sc. Paris.* 283, 11 (D), 1321-1323, 1976.
 20. **Hansen, G. N. and B. L. Hansen:** "Immunohistochemical of ACTH in the pituitary of the toad." *Gen. Comp. Endocrinol.* 28, 1, 52-58, 1976.
 21. **Andrieux, B. et M. P. Dubois:** "Localización e identificación de tipos celulares de L'hipofise distal de triton pleurodeles". *Biol. Cell.* 29, 2-3, 135-148, 1977.
 22. **Bugnon, C., A. Gouget et C. Dessy:** "Les cellules corticotropes et melanotropes de l'adenohipofise du chat: étude par les techniques à l'hématoxyline plombique". *Bull. Assoc. Anat.* 59 (166), 791-192, 1975.
 23. **Ryan, N.:** "Staining of human pituitary glands with lead hematoxylin; comparison with other histochemical procedures, including immunoenzyme techniques". *Acta Histochem.* 59, 1, 96-105, 1977.
 24. **Barrington, E. D. W.:** "Organización y evolución de la hipófisis". En: *Neuroendocrinología General y Comparada.* Ed. Blume Hermann, 64-100, 1977.