

**ESTUDI ULTRASTRUCTURAL DE LES FORMES
CRISTAL·LINES PRESENTS A LA ZONA GLOMERULOSA
DE LA GLÀNDULA ADRENAL DE LA RATA ESTIMULADA
AMB DIETES AMB CONTINGUT DE SODI BAIX ***

per

GABRIEL PALACIOS

Departament d'Histologia. Facultat de Medicina.
Nova Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra).

• Accèssit al Premi Leandre Cervera, 1977.

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules de l'escorça adrenal, a la zona glomerulosa i fasciculada, contenen cristalls birefringents. Això ha estat demostrat en nombrosos treballs duts a terme amb el microscopi de llum ²⁹.

Estudis ultraestructurals han demostrat la presència d'aquestes formes cristallines associades a vacúols lipídics, principalment a la zona fasciculada, d'animals normals i en situacions experimentals que actuen estimulants o inhibint l'esteroideogènesi ^{17, 18, 19, 22, 24, 26, 27}.

Aquests cristalls es relacionen, tant en els treballs òptics com en els submicroscòpics, amb el colesterol i principalment els seus èsters compostos, que, com ha estat demostrat, es localitzen sobretot a nivell dels vacúols lipídics de les adrenals ^{1, 8, 16, 20, 21, 25}.

Formes cristallines d'aquest tipus també han estat observades en altres cèl·lules secretores d'esteroides, com és ara les cèl·lules intersticials i les del cos luti ^{2, 4, 13}.

En el nostre treball pretenem de demostrar la presència d'aquestes formes cristallines a la zona glomerulosa de la rata normal i el seu augment després d'un estímul de dietes de baix contingut de sodi.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi fou dut a terme sobre un total de 50 rates wistar, mascles, d'un pes entre 250 i 300 g.

Els animals foren dividits en 2 grups:

Un primer grup de 36 rates que fou processat segons els mètodes de microscòpia electrònica.

Un segon grup de 14 rates que fou utilitzat per a manifestar l'activitat enzimàtica de les fosfatases àcides.

El primer grup es dividí en els subgrups següents:

Un primer subgrup de sis rates rebé una dieta d'estabulari normal i serví com a control.

Un segon grup de 24 rates fou sotmès a una dieta de baix contingut en sodi durant sis setmanes, segons una pauta semblant a la de HARTROFT

i EISENSTEIN¹¹. D'aquest subgrup foren sacrificats quatre animals cada setmana de l'experiment.

Un tercer subgrup de sis rates també serví com a control, que rebé durant sis setmanes la mateixa dieta del subgrup anterior però amb una quantitat equilibrada de sodi. Els animals foren sacrificats la darrera setmana. Tots els animals, tret dels del primer subgrup, begueren aigua destil·lada i desionitzada. Els animals foren anestesiats amb una injecció intraperitoneal d'hidrat de cloral (300 mg/kg de pes corporal). El tòrax fou obert i l'arc aòrtic canulat per tal de procedir a la perfusió. Inicialment hom va perfondre sèrum *ringer* durant un minut i a continuació la solució fixadora feta de glutaraldehid al 3 % en *buffer* fosfat 0,12 M i pH 7,4 durant 15 minuts. Les glàndules adrenals foren extirpades, seccionades en fines làmines d'un mm de gruix, submergides en el mateix fixador durant dues hores i finalment postfixades en tetròxid d'osmi a l'1 % en el mateix *buffer*.

Els 14 animals del segon grup utilitzat per a l'estudi histoenzimàtic foren afegits als subgrups anteriors, reberen el mateix tractament i foren distribuïts de la forma següent:

2 animals en el primer subgrup.

12 animals en el segon subgrup, del qual foren processats dos animals cada setmana.

Aquests animals foren anestesiats i operats de la mateixa forma que els del grup anterior i se'ls perfongué una solució fixadora de glutaraldehid al 2,5 % en *buffer* cacodilat 0,1 M, pH 7,3 durant 15 minuts. Les glàndules adrenals foren postfixades en el mateix fixador durant dues hores. Hom féu seccions en criòstat d'unes 50 a 100 micres, que foren incubaren en el medi de GOMORI¹⁰ de mitja hora a una hora. Les seccions incubades foren postfixades en tetròxid d'osmi a l'1 % en el mateix *buffer* cacodilat.

Els blocs obtinguts d'ambdós grups foren deshidratats en concentracions creixents d'acetona i inclosos en Durcupan (Fluka). Seccions semifines d'una a dues micres tenyides amb blau de toluïdina, serviren per a control topogràfic per a la localització de les diferents zones de la glàndula adrenal. Seccions ultrafines foren tenyides amb citrat de plom segons VENABLE i COGGESHALL²⁸ i examinades amb un microscopi electrònic Hitachi HU-12.

RESULTATS

En els animals controls del primer subgrup i del tercer, la zona glomerulosa ocupava una estreta franja subcapsular, i les cèl·lules es disposa-

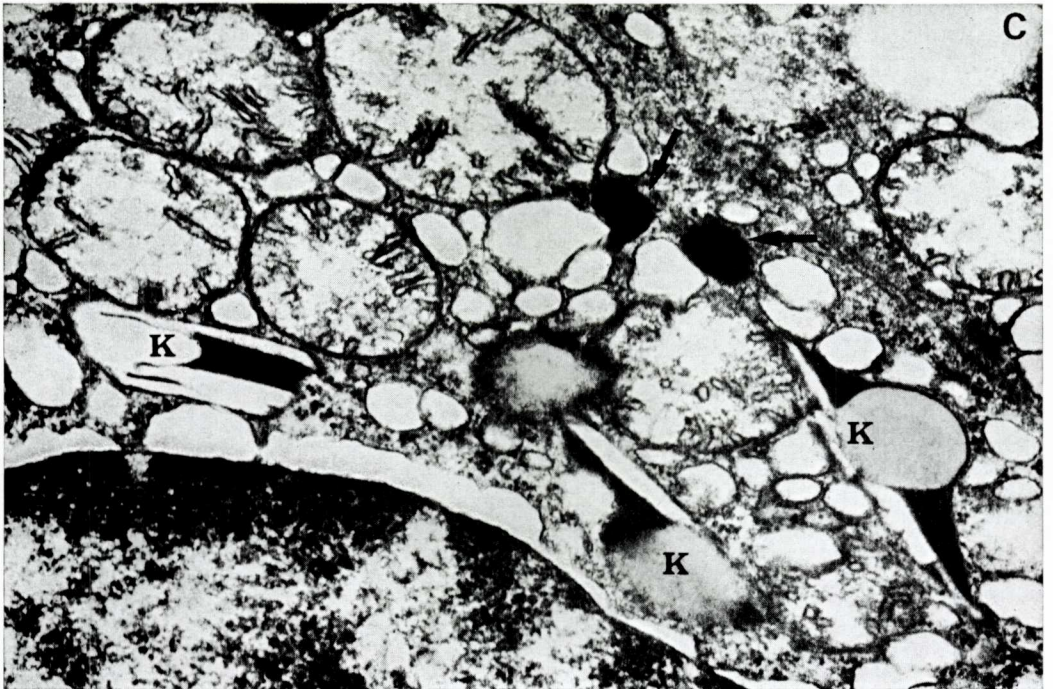
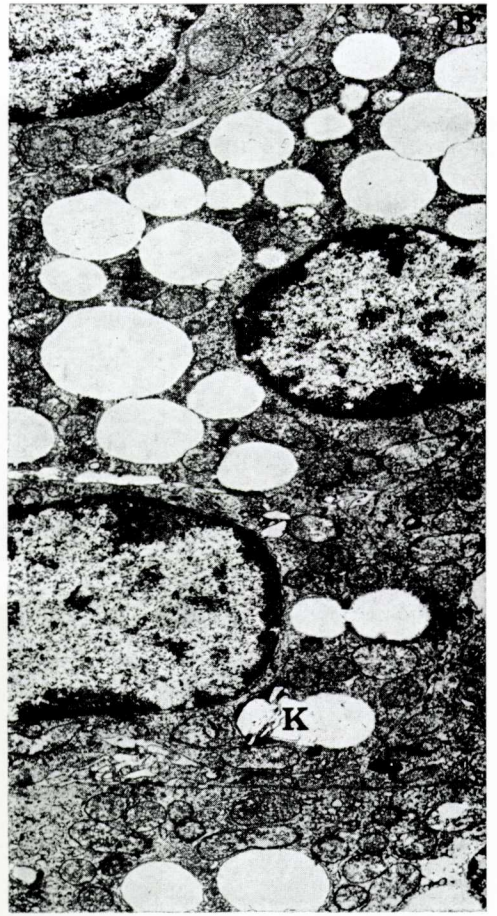


FIG. 1. — A) Animals controls: microfotografia electrònica d'un grup de cèl·lules de la zona glomerulosa en disposició pericapil·lar. Hom hi observa una cèl·lula endotelial (E), i la paret capil·lar mostra alguns porus (asteriscs). Les cèl·lules glandulars presenten un nucli (N) i en llur citoplasma apareixen alguns vacúols lipídics (v), mitocondries (m) i membranes de reticle llis (r) X 10.000. B) Animals controls: Un grup de cèl·lules de la zona glomerulosa amb els mateixos components estructurals ja assenyalats. Hom pot apreciar una forma cristallina (K) en el citoplasma d'una de les cèl·lules. X 6.000. C) Animals experimentals: cèl·lula de la zona glomerulosa amb tres estructures cristallines en llur citoplasma (K). Podem veure alguns cossos densos (sagetes) prop dels cristalls. X 15.000.

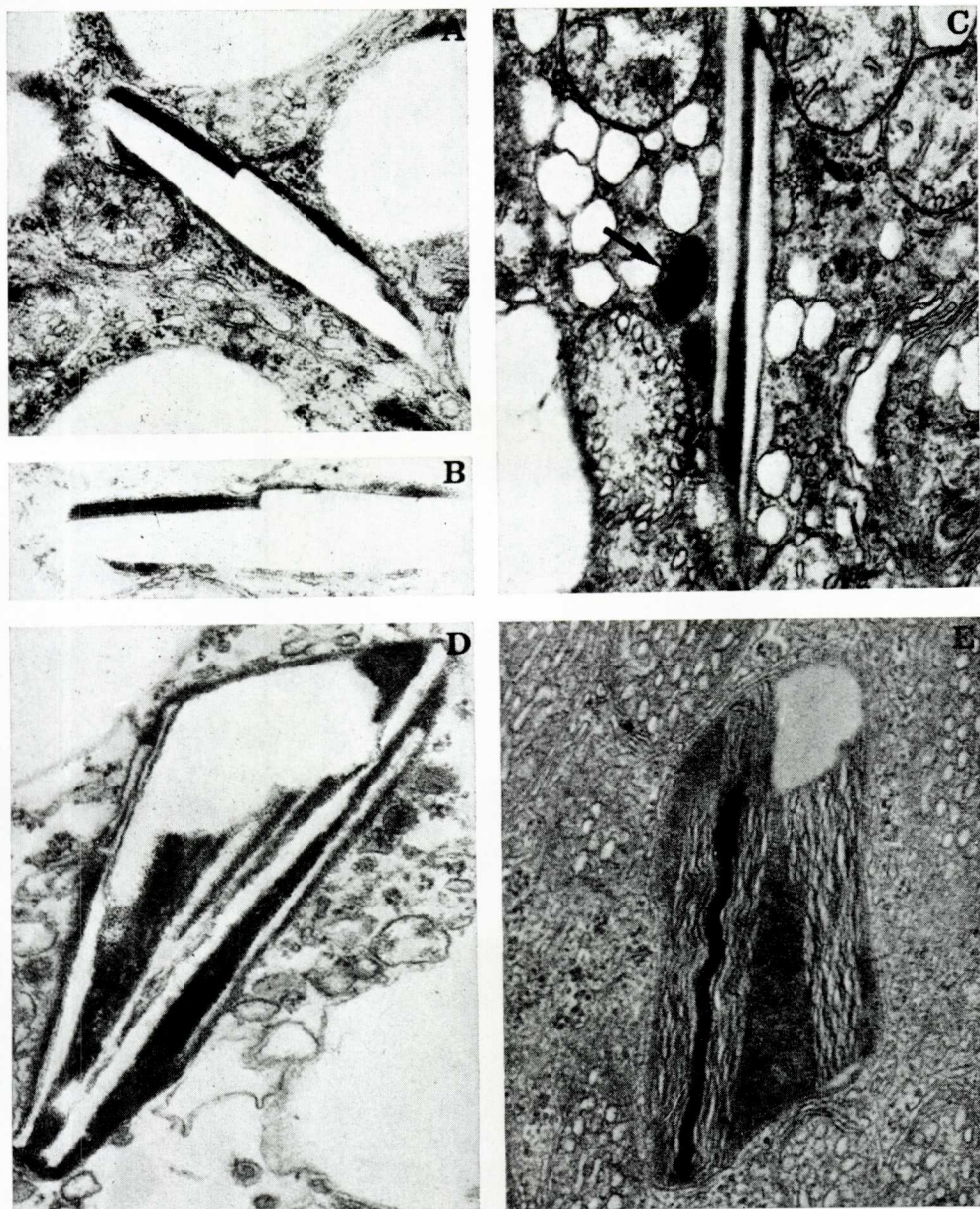


FIG. 2. — Formes cristallines no associades a vacúols lipídics. A) Cristall aïllat. X 12.000. B) Detall perifèric del mateix cristall mostrant la seva estructura laminar. X 14.000. C) Cristall compost; hi podem veure cossos densos perifèrics (sagetes). X 15.000. D) i E) Cristalls compostos amb estructures laminars internes. X 27.000, X 15.000.

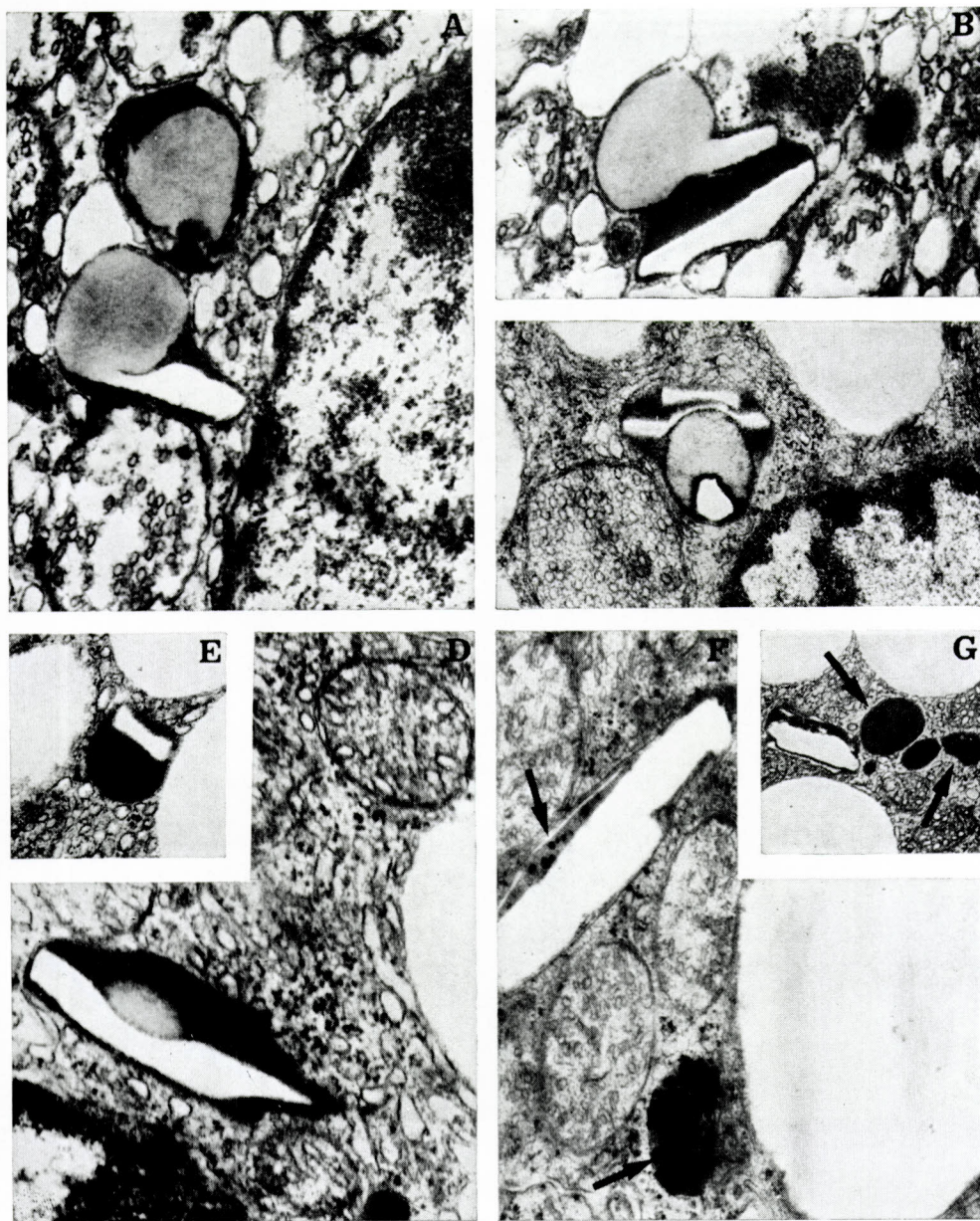


FIG. 3. — Formes cristallines en relació amb vacúols lipídics. A), B), C) i D) mostren diversos cristalls amb diferents formes angular, els vacúols lipídics associats tenen un contingut bastant dens. Un material molt electrodens envolta totes aquestes formacions. X 21.000, X 21.000, X 15.000, X 15.000. E) Petit cristall en el cos dens. X 15.000. F) l'activitat enzimàtica de les fosfatases àcides s'aprecia en forma de precipitats foscos en els lisosomes i en el material dens que envolta una formació cristallina (sagetes). X 20.000. G) S'observen diversos lisosomes (sagetes) a les proximitats d'un cristall. X 15.000.

ven formant cordons i agrupacions al voltant dels capil·lars (fig. 1 A). L'estructura de les seves cèl·lules era la pròpia d'una cèl·lula secretora d'esteroides, amb nuclis arrodonits o ovalats, i l'heterocromatina formava masses enganxades a la membrana nuclear amb predomini de l'eucromatina. Hom podia veure-hi un nuclèol o —quai mai— dos. En el citoplasma hom podia observar mitocòndries molt poliformes pel que fa a l'estructura de les crestes, un aparell de Golgi paranuclear i el reticle endoplasmàtic llis bastant desenvolupat. Les gotes lipídiques es disposaven formant típics vacúols de contingut clar. Associades a aquests vacúols pogueren ésser vistes, ocasionalment, algunes formes cristallines (fig. 1 B).

En els animals sotmesos a la dieta de baix contingut en sodi, hom pogué apreciar des de la segona setmana una hipertròfia i hiperplàsia global de la zona glomerulosa que, a nivell submicroscòpic, corresponia a un augment real dels organoides més implicats en la esteroideogènesi, com és ara les mitocòndries, el reticle endoplasmàtic llis i els vacúols lipídics. Les formes cristallines objecte d'aquest estudi es posaren més de manifest en aquests animals experimentals (fig. 1 C). Principalment hom hi pogué veure dos tipus d'estructures cristallines:

Un tipus format per cristalls allargats i angulars que no guardaven cap relació amb els vacúols lipídics de les cèl·lules adrenals i solien presentar-se sols o agrupats (figs. 2 A, B, C). Característicament, en alguns d'aquells cristalls hom podia veure restes d'estructures laminars paral·leles molt denses i estratificades col·locades principalment als voltants del cristall i emmarcant una zona realment buida (figs. 2 A, B).

Dins aquest mateix grup també hi havia cristalls grans que presentaven un contingut laminar format per membranes denses paral·leles i desorganitzades (figs. 2 D, E).

Un altre tipus d'estructures cristallines estava en íntima associació amb les gotes lipídiques; el contingut d'aquestes últimes tenia més densitat electrònica que la resta de vacúols lipídics, probablement a causa de la preservació en la preparació del teixit (figs. 1 C; 3 A, B, C). Els cristalls ajuntats a aquestes gotes lipídiques presentaven estructures angulars diverses. Hom hi pogué observar formes diferents; des de les grans gotes lipídiques amb petits cristalls, fins a cristalls de grans dimensions que només mantenien relació amb sobres de gotes lipídiques, com si la transformació hagués estat gradual dels vacúols a les formes cristallines i a l'inrevés. Totes aquestes formes cristallines associades o no a vacúols lipídics solien ésser envoltades d'una coberta amb un material molt electrodens (figs. 1 C; 3 A, B, C, D, E, F). No pogué ésser demostrat clarament l'origen d'aquest material del voltant. Algunes vegades foren trobats lisosomes a les proximitats dels cristalls (figs. 2 C; 3 B, F, G).

i el material dens donà positiva la reacció de les fosfatases àcides (fig. 3 F).

DISCUSSIÓ

En el nostre treball, ha estat assenyalada l'aparició esporàdica d'estructures cristallines a la zona glomerulosa de la glàndula adrenal de la rata, en animals en situacions funcionals considerades normals. El fet que aquestes formacions hagin estat trobades també en cèl·lules d'altres parts de la glàndula²⁴ i en altres glàndules secretores d'esteroides⁴, pot donar força a la hipòtesi segons la qual són organoides corrents, bé que no habituals d'aquestes cèl·lules. Tanmateix, l'aparició d'aquestes estructures és més freqüent en situacions d'estimulació o inhibició de la síntesi esteroidal de la glàndula^{17, 18, 22, 24, 26, 27}. En aquest sentit, ha estat suficientment provat que les dietes prolongades de baix contingut de sodi actuen estimulants específicament la zona glomerulosa^{3, 9, 14, 15, 23}. Aquest estímul podria explicar la nostra troballa (a les cèl·lules citades) d'una freqüència més gran d'aparició d'aquestes formes cristallines.

En el present estudi no han estat emprades tècniques específiques per a la preservació dels lípids^{6, 7, 12}, i consegüentment apareixen dissolts en els vacúols lipídics. La persistència de restes laminars en alguns cristalls, n'indicaria una consistència sòlida i un despreniment per l'acció del tall, o bé, en part, una dissolució després del procés de fixació i d'inclusió.

Si aquests vacúols lipídics, segons es desprèn de força proves^{8, 16, 20, 21}, emmagatzemen colesterol i principalment els seus èsters, seria lògic de pensar que els cristalls relacionats amb ells representen reserves d'aquests compostos precursors de l'esteroidogènesi i serien utilitzats per a la cèl·lula adrenal en moments de demanda funcional més gran. Una altra possibilitat seria la de servir com a magatzem d'un excés de colesterol lliure o els seus èsters en moments depressius intercalats o terminals d'un període hiperfuncional.

D'altra part, les formes cristallines de forma laminar descrites en el nostre estudi i independentment dels vacúols lipídics, poden ésser interpretades com una altra variant relacionada amb l'aprofitament de la resta de membranes procedents d'organoides en fase de destrucció, freqüent en tota cèl·lula exposada a un intens intercanvi dels seus components. Se sap que el contingut en colesterol de les membranes de les cèl·lules esteroidals és important⁵. Aquest compost podria ésser emmagatzemat en aquells cristalls d'origen membranari per a la reutilització i formació de noves membranes o esteroidogènesi.

El material electrodens que envolta moltes d'aquestes formes cristal·

lines, ha fet positiva la reacció de les fosfatases àcides. Aquest fet, que ja fou assenyalat per SZABÓ²⁴, podria induir-nos a pensar que aquest material és d'origen lisosomal, tenint en compte, a més, la freqüent relació d'aquestes estructures cristallines amb alguns cossos densos. La composició en enzims hidrolítics d'aquestes cobertes denses explicaria la desintegració dels cristalls com una possible forma d'evolució.

BIBLIOGRAFIA

1. APPELGREN, L.-E.: *Sites of steroid formation. Autoradiographic studies using labelled precursors*. «Acta physiol. Scand.», Suppl. 301: 1-108 (1967).
2. BOURNEVA, V.: *Feinstruktur der Luteinzellen des Meerschweincheneierstocks während der Schwangerschaft und des Zyklus*. «Z. Zellforsch.», 142: 525-537 (1973).
3. DOMOTO, D. T., BOYD, J. E., MULROW, P. J., i KASHGARIAN, M.: *The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets*. «Amer. J. Pathol.», 72: 433-446 (1973).
4. FAWCET, D. W. i BURGOS, M. H.: *Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue*. «Amer. J. Anat.», 107: 245-270 (1960).
5. FAWCET, D. W., LONG, J. i JONES, A. L.: *Ultrastructure of the endocrine glands*. «Recent. Progr. Hormone Res.», 25: 315-380 (1969).
6. FRÜHLING, J., i CLAUDE, A.: *Preservation of lipids and ultrastructures in cells of the adrenal cortex of the rat*. «Fourth Europ. Reg. Conf. Electr. Micr., Rome. (BOCCIARELLI, D. S., ed.)», II: 17-18 (1968).
7. FRÜHLING, J. PENASSE, W. SAND, G., i CLAUDE, A.: *Préservation du cholestérol dans la corticosurrénale du rat au cours de la préparation des tissus pour la microscopie électronique*. «J. Microscopie», 8: 957-982 (1969).
8. FRÜHLING, J., SAND, G., PENASSE, W. PECHEUX, F., i CLAUDE, A.: *Corrélation entre la morphologie et le contenu lipidique des corticosurrénales du cobaye, du rat et du boeuf*. «J. Ultrastruc. Res.», 44: 113-133 (1973).
9. GIACOMELLI, F., WEINER, J., i SPIRO, D.: *Cytological alterations related to stimulation of the zona glomerulosa of the adrenal gland*. «J. Cell Biol.», 26: 499-521 (1965).
10. GOMORI, G. W.: *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. University of Chicago Press, Chicago (1952).
11. HARTROFT, P. M., i EISENSTEIN, A. B.: *Alterations in the adrenal cortex of the rat induced by sodium deficiency: correlation of histologic changes with steroid hormone secretion*. «Endocrinology», 60: 641-651 (1957).
12. IDELMAN, S.: *Modification de la technique de Luft en vue de la conservation des lipides en microscopie électronique*. «J. Microscopie», 3: 715-718 (1964).
13. LENNEP, E. W., i MADDEN, L. M.: *Electron microscopic observations on the involution of the human corpus luteum of menstruation*. «Z. Zellforsch.», 66: 365-380 (1965).
14. LEVER, J. D.: *Cytological studies on the hypophysectomized rat adrenal cortex: The alterations of its fine structure following ACTH administration and lowering the Na/K ratio*. «Endocrinology», 58: 163-180 (1956).
15. LONG, J. A. i JONES, A. L.: *Alterations in fine structure of the opossum adrenal cortex following sodium deprivation*. «Anat. Rec.», 166: 1-26 (1970).
16. MOSES, H. L., DAVIS, W. W., ROSENTHAL, A. S. i GARREN, L. D.: *Adrenal cholesterol: Localization by electron microscope autoradiography*. «Science», 163: 1203-1205 (1969).
17. PENNEY, D. P. i AVERILL, K.: *Effects of chronic administration of SU-4885 and recovery on the rat adrenal cortex*. «Anat. Rec.», 169: 398 (1971).

18. PENNEY, D. P., OLSON, J. i AVERILL, K.: *Fine structural studies of rat adrenal cortices following prostaglandin administration.* «Z. Zellforsch.», 146: 297-307 (1973).
19. RHODIN, J. A. G.: *The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions.* «J. Ultrastruct. Res.», 34: 23-71 (1971).
20. SAND, G., FRÜHLING, J., PENASSE, W. i CLAUDE, A.: *Distribution du cholestérol dans la corticosurrénale du rat. Analyse morphologique et chimique des fractions subcellulaires, isolées par centrifugation différentielle.* «J. Microscopie», 15: 41-66 (1972).
21. SAND, G., FRÜHLING, J. i PLATTEN-GODFROID, C.: *Contribution à l'étude de l'ultrastructure de la corticosurrénale de cobaye.* «J. Microscopie», 17: 283-298 (1973).
22. SHARAWAY, M., DIRKSEN, T. R. i PENNEY, D. P.: *Effects of a steroidogenic inhibitor (U-8113) on adrenal lipids.* «Fed. Proc.», 31: 293 (Abs.) (1972).
23. SHELTON, J. H. i JONES, A. L.: *The fine structure of the mouse adrenal cortex and the ultrastructural changes in the zona glomerulosa with low and high sodium diets.* «Anat. Rec.», 170: 147-181 (1971).
24. SZABO, D.: *Ultrastructural localization of a crystalline substance in the adrenal zona fasciculata of the rat.* «Acta morph. Acad. Sci. hung.», 16: 121-128 (1968).
25. SZABO, D., DZSINICH, CS. i ÖKRÖS, I.: *Ultrastructural localization of adrenal cholesterol by autoradiography and digitonin reaction after cycloheximide-induced inhibition of corticosterone synthesis.* «Histochemie», 27: 43-49 (1971).
26. SZABO, D., GLAZ, E. i KELEMEN, J.: *Subcellular localization of adrenal cholesterol by autoradiography and digitonin reaction after aminoglutethimide-induced inhibition of corticosterone synthesis.* «Histochemistry», 38: 213-221 (1974).
27. SZABO, D., STARK, E., POSALAKY, Z. i VARGA, B.: *Electron-microscopic studies of the adrenal cortex of the rat in various functional conditions.* «Acta physiol. Acad. Sci. hung.», 29: 380-381 (1966).
28. VENABLE, J. H. i COGGESHALL, R.: *A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy.* «J. Cell Biol.», 25: 407-408 (1965).
29. YOFFEY, J. M. i BAXTER, J. S.: *The formation of birefringent crystals in the suprarenal cortex.* «J. Anat.» (Lond), 81: 335-342 (1947).